



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL DÖNEMDE DİKLOFENAK SODYUMA
MARUZ KALAN ERKEK SIÇAN HİPOKAMPUSUNDA
MELATONİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kıymet Kübra YURT

Samsun

Haziran-2014



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL DÖNEMDE DİKLOFENAK SODYUMA
MARUZ KALAN ERKEK SIÇAN HİPOKAMPUSUNDA
MELATONİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kıymet Kübra YURT

Danışman

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN

Samsun

Haziran-2014

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bana vermiş olduğu emek ve desteği için tez danışmanım ve hocam Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Süleyman KAPLAN' a;

Anabilim dalımız öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Berrin Zuhâl ALTUNKAYNAK'a, Uzm. Dr. Aysın Pınar TÜRKMEN'e, Yrd. Doç. Dr. Ebru ELİBOL'a, Doktora Öğrencisi Ahmad YAHYAZADEH'e, Yüksek Lisans Öğrencisi Işınsu AYDIN'a, Gülay YILDIZ'a, stajyer öğrenci Hanife ARSLAN'a, tez çalışmamda resim çizimleriyle destek veren Sefa Ersan KAYA'ya,

Yetişmemde emeğini ve sevgisini esirgemeyen sevgili babam Kadir YURT'a annem Kadiriye YURT'a canım kardeşlerime, sevgili anneanneme ve dedeme, tez çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirgemeyen sevgili dostum Elfide Gizem KIVRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından PYO.TIP.1901.13.010 nolu proje olarak desteklenmiştir.

ÖZET

PRENATAL DÖNEMDE DİKLOFENAK SODYUMA MARUZ KALAN ERKEK SIÇAN HİPOKAMPUSUNDA MELATONİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışma ile prenatal dönemde kullanılan bir nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ) olan diklofenak sodyumun (DS) yeni doğan sıçanların beyin dokularında meydana getireceği olumsuz etkilerin bir nöroprotektif ajan olan melatonin (MEL) tarafından önlemenin mümkün olup olmayacağının deneysel sıçan modelinde stereolojik yöntemlerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda 24 adet 12 haftalık Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Prenatal dönemde serum fizyolojik (SF) 1ml/kg, DS (3,6 mg/kg), DS+MEL (50 mg/kg)'e maruz kalan sıçanlar kontrol (KONT) grubuyla birlikte 4 gruba ayrıldı. Postnatal 12. haftada tüm hayvanlar yüksek doz anestezi altında kardiyak perfüzyona alındı. Çıkarılan beyin dokusu örnekleri histolojik ve stereolojik yöntemler kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: DS uygulanan gruplardaki deneklere ait hipokampus örneklerindeki ortalama nöron sayılarında, KONT ve SF grubuna oranla istatistiksel açıdan anlamlı oranda azalma olduğu gözlemlendi ($p<0.01$). Bunun yanı sıra hipokampustaki ortalama nöron sayısında DS+MEL uygulaması yapılan grupta DS ve SF gruplarına oranla sinir hücresi sayısında anlamlı derecede artma olduğu gözlemlendi ($p<0.01$). Ayrıca, gebelik döneminde yapılan SF uygulamasının da tüm hipokampustaki toplam hücre sayısını anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi ($p<0.01$).

Sonuç: Gebelikte DS kullanımının postnatal dönemde hipokampusta nöron sayısında azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. DS'nin toksik etkisinin nöroprotektif bir ajan olan melatoninle önenebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Diklofenak sodyum; hipokampus; melatonin; rat; stereoloji.

Kıymet Kübra YURT, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2014

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFICIENCY OF MELATONIN ON THE MALE RAT HIPPOCAMPUS WHICH WAS EXPOSED TO DICLOFENAC SODIUM DURING THE PRENATAL PERIOD

Aim: The aim of the present study is to show the effects of Melatonin (MEL) as a neuroprotective agent will possible to prevent potential adverse effects of diclofenac sodium (DS) which is used during prenatal period as a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAII) on the new born experimental rat brain tissues by using stereological methods.

Materials and Methods: In the study, 24 male 12-week old Wistar albino rats were used. The rats which were exposed to saline (SF) 1ml/kg, DS (3.6 mg / kg), DS + MEL (50 mg / kg) during prenatal period were divided into 4 groups which includes control group (CG). All animals were performed to cardiac perfusion under high-dose anesthetized on 12th week of postnatal period. The extracted brain tissue samples were assessed by using histological and stereological methods.

Results: It was observed that the average number of neurons in the hippocampus samples of experimental groups which were exposed to DS has statistically significant decrease than CONT and SF groups ($p<0.01$). As well as, the average number of neurons in the hippocampus were significantly increased in the DS+MEL group when compared to DS and SF groups ($p<0.01$). Also, it was observed that the SF application was significantly decreased the total cell numbers in the all hippocampus during the gestational period ($p<0.01$).

Conclusion: DS usage during pregnancy in the postnatal period leads to a reduction in the number of neurons in the hippocampus were observed. It has been shown that the toxic effects of DS can be prevented by Melatonin which is a neuroprotective agent.

Keywords: Diclofenac sodium; hippocampus; melatonin; rats; stereology.

Kıymet Kübra Yurt, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University- Samsun, June-2014

SİMGELER VE KISALTMALAR

- 6-HMS : 6- Hidroksimelatonininsülfat
AA : Araşidonik asit
bFGF : Bazik fibroblast büyüme faktörü
CA : Cornu ammonis
CCK : Kolesistokinin
COX : Siklooksijenaz
DA : Duktus arteriosus
DS : Diklofenak sodyum
EET : Epoksieikozatetraenoik
FDA : Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi
G : Gebelik
GAD : Glutamat dekarboksilaz
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz
HETE : Hidroksieikozatetraenoik asit
HIOMT : Hidroksiindol-o-metiltransferaz
HPETE : Hidroperoksieikozatetraenoik asit
KONT : Kontrol
LD 50 : Ortalama öldürücü doz
LO : Lipooksijenaz
LT : Lökotirenler
MEL : Melatonin
MSS : Merkezi sinir sistemi
NAT : N-asetil transferaz
NO : Nitrik oksit
NOS : Nitrik oksit sentetaz
NSAİİ : Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar
OH : Hidroksil
PAR : Poly ADP riboz
PG : Prostaglandin
PVN : Periventriküler çekirdek

ROS : Reaktif oksijen türleri
RT : Radyoterapi
SCN : Suprakiazmatik çekirdek
SF : Serum fizyolojik
SOD : Süperoksit dismutaz
SR : Sekonder radikal
SRÖ : Sistemik rastgele örnekleme
TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü beta
tx : Tromboksan
UV : Ultraviyole
VIP :Vazoaktif intestinal polipeptid

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Prostaglandinler.....	4
2.1.1. Prostaglandinlerin Merkezi ve Çevresel Sinir Sistemine Etkileri.....	5
2.2. Nonsteroidal Anti-İnflamatuvar İlaçlar.....	6
2.3. Diklofenak Sodyum.....	7
2.3.1. Diklofenak Sodyumun Gebelikte Kullanımı.....	8
2.4. Hipokampus.....	9
2.4.1. Anatomisi.....	9
2.4.2. Histolojisi.....	10
2.4.3. Hipokampusün Afferent ve Efferent İletim Yolları.....	12
2.4.4. Hipokampus İşlevleri	13
2.4.5. Hipokampus Lezyonları	15
2.5. Melatonin.....	16
2.5.1. Melatonin Sentezi.....	18
2.5.2. Melatonin Antioksidan Etkileri.....	21
2.6. Stereoloji	23
2.6.1. Stereolojik Çalışmalarda Sistematik Tekdüze Rasgele Örnekleme.....	24
2.6.2. Optik Parçalama	25
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi.....	29
3.2. Deney Protokolü.....	29
3.3. Çalışma Grupları ve Uygulanan İşlemler	29
3.4. Anestezi ve Kardiyak Perfüzyon.....	30
3.5. Histolojik Takip İşlemi	31
3.5.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü.....	32

3.5.2. Kesit Alma İşlemi.....	32
3.5.3. Krezil Viyolete Boyama İşlemi	33
3.5.4. İstatiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	35
4.2. Stereolojik Bulgular.....	35
4.2.1. CA1 Alanında Elde Edilen Bulgular.....	35
4.2.2. CA2 Alanında Elde Edilen Bulgular.....	36
4.2.3. CA3 Alanında Elde Edilen Bulgular.....	38
4.2.4. Tüm Hipokampustaki Nöron Sayısına İlişkin Elde Edilen Bulgular.....	39
4.3. Işık Mikroskopik Bulgular.....	41
4.3.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular.....	41
4.3.2. Serum Fizyolojik Grubuna Ait Bulgular.....	43
4.3.3. Diklofenak Sodyum Grubuna Ait Bulgular	45
4.3.4. Diklofenak Sodyum ve Melatonin Grubuna Ait Bulgular	47
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	67

1. GİRİŞ

Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ağrı, ateş ve enflamasyon tedavisinde sıklıkla kullanımı tercih edilen ilaçlardır (Odacı ve ark., 2001). Etki mekanizması siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe edip, araşidonik asit (AA) salınımını azaltmaya yöneliktir. COX tepkimesi araşidonik asitten prostaglandin sentezini etkileyen önemli basamaklardan birisidir (Siu ve ark., 2000). Prostaglandinler, vücutta tüm organlarda etkisi olan çok önemli kimyasal mediatörlerdendir. Diklofenak sodyumda (DS) bu gruba giren bir prostaglandin sentez inhibitörüdür. DS'un zararları üzerine çok sayıda tek doz ve tek peryodlu çalışmalar yapılmıştır (Gökçimen ve ark., 2007; Canan ve ark., 2008; Ozyurt ve ark., 2011; Ekici ve ark., 2012; Ayrancı ve ark., 2013; Kaplan ve ark., 2013). Özellikle merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemine olan etkisi araştırılmıştır (Keskin, 2011; Elibol, 2014).

NSAİİ gebelik süresince çeşitli ağrıların tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ilaçlar özellikle 1. ve 2. trimesterde insan plasentasından geçebilmektedir. Gebelik boyunca karşılaşılan preterm uterus kasılmalarını engellemek ve polihidramnios tedavisinde tokolitik ajan olarak bu tür ilaçlar tercih edilmekle birlikte, fetusda duktus arteriosus (DA) konstriksiyonu, renal disfonksiyon gibi fetal yan etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Gökçimen ve ark., 2003). Kudo ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada NSAİİ lerin hücre siklusunu G₀/G₁ fazında durdurduğunu belirtmişlerdir (Kudo ve ark., 2003).

Beyinde birçok bölgeyle bağlantı halinde olan hipokampus; canlı yaşamında ve kültürel gelişiminde, öğrenme ve hafızada bunun yanısıra üreme, ağrı algılanması, besin alımı, kan basıncı, iyon dengesi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonların yönetiminde görev alan önemli bir yapıdır (Nolte, 1988; Raitiere, 1992; Lathe, 2001).

Hipokampus, Cornu ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak da isimlendirilir. CA içerdiği hücre tiplerinden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alana bölünmüştür. Yapılan toksikolojik çalışmalarda hipokampus kısımlarından en çok etkilenen bölge CA1 bölgesi olmuştur. Hipokampusun lezyonlarında canlıda yeni bilgiler öğrenememe, yeni beceriler elde edememe, hafıza kaybı, canlı-cansız ayrımının yapılamaması, korku ve kızgınlık duygularında azalma, yiyecekleri sürekli ve uzun şekilde kokladıktan sonra yeme ya da değişik cisimlere karşı yeme isteği gibi vahim klinik tablolar ortaya çıkmıştır (Moss ve ark., 1981; Dere, 2000; Songur ve ark., 2001). Günümüzde oldukça yaygın hale gelen Alzheimer hastalığında, hipokampusdaki hücre sayısında azalma

tespit edilmiştir (Guyton, 2012).

Nöroprotektif ajan olarak çalışmamızda kullandığımız melatonin (MEL) (N asetil-5-metoksitriptamin), pineal bezden salgılanan bir nöroendokrin hormondur. MEL, lipit çözünürlüğünden dolayı hücre membranını kolaylıkla geçer ve tüm hücre organellerine nüfuz edebilir. DNA üzerine koruyucu etkisi vardır. Fizyolojik olarak en güçlü serbest radikal temizleyicisi olarak bilinmektedir. MEL serbest radikallere direkt etkisinin yanında, glutatyon peroksidazı aktive ederek glutatyon üzerinden de antioksidan etki gösterebilmektedir. MEL'in antioksidan savunma sisteminde rol alan superoksit dismutaz ve nitrik oksit sentetaz gibi enzim aktivitelerini değiştirdiği de bilinmektedir (Reiter, 1996).

Glutatyon peroksidaz enzimi, antioksidan savunma sisteminin bir elemanı olarak özellikle nöral dokuda önemli rol oynar (Gitto ve ark., 2011). Sıçana eksojen MEL uygulanmasına bağlı olarak beyin glutatyon peroksidaz aktivitesi 30 dakika sonra iki katına çıkmaktadır. Enzim aktivitesi ile doku melatonin yoğunluğu arasında pozitif ilişki bulunmuştur. Son yıllarda hipokampus ile ilgili çalışmalarda, MEL'in 1-50 mg/kg dozlarında nöroprotektif etkisi gündeme gelmiştir (Erdem, 2014). Melatoninin merkezi sinir sisteminde apoptotik hücre ölümünü engellemesine ek olarak, periferal aksotomi sonrası nöron ölümünü de azalttığı bildirilmiştir. Bu etkisini hem aksotomi yapılmış motor nöronları koruyarak hem de arka boynuzdaki hücre kayıplarını azaltarak gerçekleştirdiği öne sürülmektedir (Odaci ve Kaplan, 2009). Sinir hasarı sonrasında eksojen melatonin uygulamasının, kollajen birikimini azaltarak ve nöroma oluşumunu engelleyerek akson sayısı ve miyelin kılıf kalınlığına olumlu etki yaptığı gösterilmiştir (Turgut ve Kaplan, 2011).

MEL'in yanısıra MEL metabolitlerinden hiçbirisinin prooksidatif aktivitesi yoktur (Reiter, 1981). Hatta, antioksidanlar içerisinde, MEL'in en güçlü radikal tutucu olduğu öne sürüldüğünden, MEL'e olan ilgi giderek artmakta ve antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Sayan ve ark., 2004).

Bu bilgilerden yola çıkarak, gebelik döneminde kullanılan bir NSAİİ olan DS'un (sodium-(o-((2,6-dichlorophenyl)-amino)-phenyl)-acetate) yeni doğan sıçanların beyin dokularında meydana getireceği olumsuz etkilerinin nöroprotektif ajan olan MEL tarafından önlemenin mümkün olup olmayacağını sıçan modelinde deneysel olarak gösterilmesi hedeflenmektedir.

İncelediğimiz birçok literatürde DS'un zararlı olduğunu gösteren pek çok çalışma olduğu görülmüştür (Gökçimen ve ark., 2007; Canan ve ark., 2008; Ozyurt ve ark., 2011;

Ayrancı ve ark., 2013; Kaplan ve ark., 2013; Türkmen, 2013; Elibol, 2014).

Modern yaşam, her geçen gün toksik maddelere maruz kalmayı arttırmaktadır. Özellikle gebelik esnasında karşılaşılan bu maddelerin yeni doğanda ve onun postnatal yaşamında büyük sorunlara neden olacağı açıktır.

Nöroprotektif bir ajan olan melatonin hormonunun DS'un olumsuz etkileri sonucu gelişen nöron hasarını ne derece azaltacağı veya düzeltebileceği teorisinden yola çıkıyoruz. Bu çalışmanın tüm nöronal hasarlarda uygulanan tedavilere alternatif yaklaşımlar oluşturulmasına katkı sağlayacağını ümit ediyoruz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostaglandinler

Yağ asidi türevlerinden olan prostaglandinler (PG) inflamatuvar cevabın oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır. İlk olarak 1930'larda prostat sıvısında keşfedildiklerinden, bu moleküllere prostaglandin (prostate gland) adı verilmiştir (Ricotti ve ark., 2012). Prostaglandinlerin yapısında yirmi karbon atomu bulunur. Organizma üzerinde kuvvetli fizyolojik etkilere sahip olan PG'lerin en fazla vezikula seminalisler olmak üzere kırmızı kan hücreleri dışında vücuttaki her hücrede üretilbildiği gösterilmiştir. Bu moleküller normal ve patolojik koşullarda hücre işleyişini düzenleyen hormonlar gibi işlev görürler. Etkilerini oluştuktan sonra dokularda ya da bu dokunun yakınlarında gösterirler (Yılmaz, 1990; Nelson ve Randy, 2005). PG'lerin yapısındaki atomların kaynağı, vücutta üretilmeyen, dışarıdan besinler yoluyla alınan yağ moleküllerinden biri olan AA'dir ve hücre membranında fosfolipit olarak depolanır. Böylece hücre bu öncüle ihtiyaç duyduğunda kolaylıkla erişebilmektedir (Hirsh ve ark., 1989).

AA, hücre membranından fosfolipaz enzimi (örneğin fosfolipaz A2) aracılığı ile ayrıştırılır. AA asit başlıca üç farklı enzim sistemi tarafından metabolize edilir. Birincisi; siklooksijenaz yoluyla PG'ler ve tromboksanlar (tx), ikincisi; lipooksijenaz yoluyla hidroperoksieikozatetraenoik asit (HPETE), hidroksieikozatetraenoik asit (HETE), lipoksin ve lökotirenler (LT), üçüncüsü ise; epoksijenaz yoluyla epoksieikozatetraenoik asitler (EET) meydana gelir (Hirsh ve ark., 1989; Fitzgerald, 1992; Katzung ve Trevor, 1993). Araşidonik asitten tromboksan ve prostaglandin yapımında katalizör görevi gören siklooksijenaz enziminin iki izoformu tanımlanmıştır: COX-1 ve COX-2 (O'Banion ve ark., 1991).

COX-1 vücudun birçok hücresinde bulunan yapısal bir izoformdur. Gastrik epitelde baskındır ve sitoprotektif prostaglandin oluşumu kaynağıdır (Türkmen, 2013). İnflamasyona eşlik eden proinflamatuvar sitokinler (tümör nekroz faktörü-alfa veya interlökin-1beta) ve büyüme faktörleri (mitogenler) COX-2 üretimini uyarırlar. COX-2; böbrek ve özellikle beynin selektif nöronlarında yapısal olarak olarak eksprese edilirken endotel hücrelerindeki laminar gerilme kuvvetleri tarafından da indüklenmektedir (Yamagata ve ark.,1993; Breder ve ark., 1995; Kaufmann ve ark., 1996; Andreasson ve ark., 2001; Canan ve ark., 2008).

COX-2'nin kolorektal kanser gibi diğer patolojik durumlardaki prostaglandinlerden de sorumlu olduğunu düşündürecek kanıtlar bulunmaktadır (Dubois ve ark., 1998; Aronoff ve Neilson, 2001; Green, 2002; Solomon, 2009).

İnflamasyona neden olan uyaranlar, araşidonik asitten COX enzimi vasıtasıyla prostasiklin ve PG sentezini artırır ve bu sırada siklik endoperoksitler (PGG₂ ve PGH₂), tromboksan A₂ ve trombosit aktivite edici faktör (PAF) oluşumu da artar. Bu maddeler veya bunlardan oluşan stabil metabolitler inflamasyon bölgesinde gösterilmiştir. Benzer şekilde iltihaplı dokuda lipooksijenaz (LO) yolu ürünleri olan lökotrienlerin miktarlarının arttığı da yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Solomon, 2009).

Hücrenin fizyolojik durumu, bulundurduğu enzim çeşidi ve miktarı o hücrede hangi metabolik yolun çalışacağını belirler. Bir metabolik yolda oluşacak son ürünün de hangisi olacağı hücreden hücreye farklılık gösterir. PG üretimi genellikle inflamasyon olmayan dokuda oldukça düşük olup, akut enflamasyonda lökositlerin ve bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonu ile hemen artış gösterir (Ricciotti ve ark., 2012). Hücre enzimlerinden birinin ilaçlarla inhibisyonu o yola ait tüm alt ürünlerin oluşmasını engeller.

2.1.1. Prostaglandinlerin Merkezi ve Çevresel Sinir Sistemine Etkileri

Prostaglandinler, diğer dokular gibi merkezi sinir sisteminde de bulunur. Birçok organizma türünün hipokampusünde çok yüksek düzeyde PGE₂ üretildiği görülmüş ve buda prostaglandinlerin limbik sistem fonksiyonlarıyla yakın ilişki içinde olduğunu düşündürmüştür (Abdel-Halim ve Anggard, 1979).

Merkezi sinir sisteminde, prostaglandinler ve bunların seçici agonistleri spesifik G-protein-bağlanmış reseptörler üzerinde hareket ederek, nörotoksik veya nöro-koruyucu etkiler gösterirler. Mikroglia ve astrosistlerin aktivasyonu veya lökosit sızdırılması gibi inflamatuvar yollarla sitokin ve prostaglandin gibi mediatörler üretilir (Hata ve Breyer, 2004).

PGE₂'ye beyinde en çok hipokampus, eminensia medialis ve pineal bezde rastlanmıştır. PGI₂ ise damar endotelinden köken alır ve beyin-omurilik sıvısında bulunur. PGE₂ organizma üzerindeki güçlü etkisi yatıştırma (sedasyon) ve uyuşukluktur. PGF₂ 'nin merkezi sinir sistemi içine verilmesi vücut ısısının yükselmesine (ateş) gibi hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Enfeksiyon hastalıklarında bakterilerin salınan pirojen maddeler PGE₂ oluşumunu artırarak, hipotalamustaki ısı düzenleyen merkeze etkili olduğu sanılmaktadır. Aspirin, diklofenak ve benzeri ilaçlar prostaglandin oluşumunu

azaltarak ateşi düşürür (Mc. Isaac, 1968; Gündüz, 1977; Kayaalp, 1986). Eikozanoidler; astrositlerde, nöronlara göre oldukça fazla miktarda üretilirler (Seregi ve ark., 1987).

2.2. Nonsteroidal Anti-İnflamatuvar İlaçlar

NSAİİ analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar ve anti-romatizmal ilaçlardır ve klinikte oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Organizmada ağrı yapıcı kimyasal veya mekanik etkenler prostaglandin sentezinde artışa neden olur. NSAİİ'lerin etki mekanizması ise dokulardaki araşidonik asitten prostaglandin ve diğer bazı prostanoidlerin (tromboksan, lökotrien, prostasiklin) oluşumunu katalizleyen COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe etmesidir. Bu ilaçların kullanılması ağrıya sebep olan PG'lerin oluşumunu engellemekte ve ağrıyı ortadan kaldırmaktadır (Kayaalp, 1992).

NSAİİ osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit gibi hastalık durumlarında ağrı, ateş ve inflamasyonun tedavisinde kullanılmaktadırlar (Todd ve Sorkin, 1988; Simons, 1994; Siu ve ark., 2000; Alves ve Duarte, 2002; Kudo ve ark., 2003; Chang ve ark., 2005). Romatoid artiritli hastaların iltahaplı sinoviyal dokularında PGE₂ sentezinin arttığı, aspirin tedavisi ile PGE₂ düzeyinin yok denecek kadar azaldığı gözlenmiştir (Kayaalp, 1992). NSAİİ'lerin antipiretik özellikleri ise bu ilaçların merkezi sinir sistemine olan etkileriyle ilgilidir. Hipotalamustaki, hipotalamik kan damarlarında üretilen prostaglandinlerin sentezinin inhibisyonundan NSAİİ'lerin sorumlu olduğu bildirilmektedir. Hücre membranında depo edilen AA ürünleri yangı oluşumunda önemli mediator ve modülatörlerdir. Araşidonik asitten köken alan prostaglandinler inflamasyon, ağrı ve ateş meydana gelmesinde büyük rol oynar. NSAİİ'ler PG sentez enzimini bloke edip vücudun immun-inflamatuvar cevabını azaltılması ile etki göstererek yangıyı azaltırlar, ateş yükselmesine engel olarak, ağrı kesici ve ateş düşürücü etki gösterirler (Gökçimen ve Malas, 2003).

NSAİİ' ye bağlı gastrik hasarda nötrofiller önemli rol oynar. Hasarı başlatan mekanizma, intrasellüler adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması ve bunun sonucunda nötrofillerin küçük damarların endoteline yapışmasıdır (Wallace ark., 1993). Bu durum NSAİİ kullanımından sonra prostaglandin seviyelerinde anlamlı düşüşün olduğu 30. dakikada başlar. Sonuçta dolaşım bozulur ve iskemik hasar ortaya çıkar.

Yaygın olarak kullanılan ve NSAİİ olarak kabul edilen ilaçlar; aspirin (asetilsalisilik asit), selekoksib, diklofenak, etodolak, fenomates, ibuprofen, indometazin, ketoprofen, ketorolak, nabumeton, oksaprozin, oksikam, piroksikam, sulindak ve

tolmetindir. Tarihsel açıdan bakıldığında, terapötik yararları ile ilk NSAİİ olarak 100 yılı aşkın süredir kullanılan aspirin olmuştur (Fiorucci ve ark., 2001).

2.3. Diklofenak Sodyum

NSAİİ ilaçlardan olan diklofenak sodyum (DS), güçlü analjezik etkili, antiinflamatuvar ve antipiretik etki gösteren farmakolojik bir ajandır. Bununla birlikte literatürde ilacın olumsuz etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. NSAİİ'ler medikal tedavide, özellikle kadın doğum hastalıklarında sıklıkla kullanılırlar (Odacı ve ark., 2001 ; Gökçimen ve ark., 2003).

Diklofenak sodyum (Na [2 (2,6, dicloroanilino) fenil] asetat) fenil asetik asitten köken alan (Güven, 2006) nispeten düşük bir molekül ağırlığa sahip NSAİ bir ilaçtır (Scholer ve ark., 1986 ; Siu ve ark., 2000). Bu tür ilaçlar çoğunlukla artrit, osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit gibi romatizmal ya da romatizmal olmayan hastalık durumlarında ağrı, ateş ve inflamasyonun tedavisinde iltihap giderici, ateş düşürücü ve ağrı giderici olarak yaygın bir şekilde kullanılan DS, güçlü analjezik etkiye sahip narkotik olmayan bir ağrı kesici olduğundan sıklıkla tercih edilir (Todd ve Sorkin, 1988; Siu ve ark., 2000; Alves ve Duarte, 2002; Kudo ve ark., 2003; Chang ve ark., 2005; Güven, 2006).

Diklofenak sodyum postoperatif dönemde ağrı kontrolünde tüm cerrahi modalitelerde sık kullanılan nonsteroid antiinflamatuvar bir ilaçtır. Diklofenak sodyum'un % 99'undan fazlası geri dönüşümlü olarak plazma albuminine bağlanır ve dağılım hacimleri düşüktür. Diklofenak, aspirin ile birlikte verilirse plazma düzeyi belirgin şekilde azalır. Karaciğerde metabolize olur. Esas olarak hidrosillenme ve konjugasyon yoluyla inaktive edilir. Metabolitleri ise daha sonra glukuronid ve sülfat bileşiklerinde idrar ile atılır. Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 2 saattir. Bazılarının sinovial sıvıda birikme özellikleri vardır. Kronik böbrek yetmezliğinde atılımları azalır (Kayaalp, 2009). Uygulanan dozu takip eden ilk 4 saat içinde diklofenak eklem içine difüze olur. Bu süre içinde plazma konsantrasyonları sinovyal sıvıdan daha yüksek iken daha sonra bu durum tersine döner ve sinovyal sıvı konsantrasyonları plazma düzeylerinden biraz daha yüksek hale gelir. Genç ve yaşlı hastalar arasında ve böbrek ya da karaciğer yetmezliği olan hastalarda diklofenak farmakokinetiğinde farklılık saptanmamıştır. COX inhibisyonu, prostaglandin sentezinin baskılanması, lipoksijenaz inhibisyonu ile lökotrien sentezinin ve süperoksit üretiminin baskılanması, lizozomal enzim salınımının baskılanması, kıkırdak metabolizmasına etkileyerek kondroprotektif ya da kondrodestrüktif etki göstermesi, hidrojen peroksit

yapımının inhibisyonu, hücre membranında fosfolipaz-C aktivitesinin inhibisyonu, lenfoid transformasyonu ve DNA sentezinin azaltılması, santral analjezik etki, bradikinine bağlı inflamatuvar olayların baskılanması, nötrofil agregasyonu ve aktivasyonu için gerekli olan sinyallerin inhibisyonunu sağlamak, granülosit-monosit migrasyon ve fagositozunun inhibisyonunu düzenlemek NSAİİ'lerin genel etkileridir. Bu grup ilaçların gastrointestinal yan etkileri, kan tablosu üzerinde anemi ve pıhtılaşma faktörlerine olumsuz etkileri, karaciğer ve böbrek metabolizmasına olumsuz etkileri, vücudun immun ve inflamatuvar cevabını azaltıcı etkileri ve kemik metabolizmasında istenmeyen yan etkileri mevcuttur (Ro ve ark., 1976; Keller ve ark., 1987; Reikeraas ve Engebretsen, 1988; Dimar ve ark., 1996).

2.3.1. Diklofenak Sodyumun Gebelikte Kullanımı

Düşük bir molekül ağırlığına sahip olan DS, gebeliğin ilk trimestirinde belirli bir dereceye kadar seçici geçirgen olan plasentadan kolaylıkla geçebilmektedir. NSAİİ prostanooidlerin biyosentezine engel olduklarından placentaya bariyerini geçip fetal dolaşıma katılarak fetüs ve yeni doğanlarda önemli yan etkilere ve hatta malformasyonlara neden olabilirler (Dawood, 1993; Ostensen ve Ramsey-Goldman, 1998; Zenker ve ark., 1998).

Sıçanlarda, maternal toksik dozların distosi, gestasyon süresinde uzama, fetüs sağ kalımında düşüş ve intrauterin büyüme geriliğine neden olduğu belirtilmiştir. Diklofenakin fertilitate ve doğum üzerindeki minör etkileri ve rahim içi duktus arteriyozus konstriksiyonu, NSAİİ sınıfının farmakolojik sonuçlarıdır.

Hamilelikte ilaç kullanımı konusunda bilgilerimiz ilaçların etkilerine yönelik prospektif klinik çalışma yapmak etik olmadığından sınırlıdır.

Bizim çalışmamızda kullanılan diklofenak sodyum C kategorisine aittir (Cassina ve ark., 2010). Hamilelik sürecinde, sadece mecbur kalınan durumlarda ve etkili en düşük dozda uygulanmalıdır. DS'un ve diğer prostaglandin sentetaz inhibitörlerinin hamileliğin özellikle son üç ayı için oldukça toksik etkileri vardır. Çünkü bu dönemde uterus tembelliği ve/veya DA' un erken kapanma olasılığına ve fetusta ciddi malformasyonlara neden olabilirler (Dawood,1993).

Prenatal dönemde DS uygulanması sonucu 20 haftalık sıçanların omuriliklerindeki nöron sayılarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir (Ozyurt ve ark., 2011). Yine prenatal dönemde diklofenak sodyum uygulanmış 4 ve 20 haftalık sıçanların periferik sinirlerinde akson sayılarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir (Keskin, 2011).

Doğum öncesi dönemde uygulandıklarında DS'un, merkezi sinir sistemi ve ilgili yapılar üzerinde nörotoksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Kudo ve ark., 2003; Gokçimen ve ark., 2007; Ragbetli ve ark., 2007; Canan ve ark., 2008).

2.4. Hipokampus

Hipokampus'un ilk diseksiyonu 1587 yılında Aranthius tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacı, enine kesitinin denizatına benzemesinden dolayı, bu bölgeye "hipokampus" adını vermiştir. Daha sonra aynı bölge üzerinde çalışan araştırmacılar, üstten bakıldığında sağlı sollu bir çift boynuz benzeyen bu yapıya "kornu ammonis" (koç boynuzu) adını vermişlerdir (Bektaşlı, 2008; İşgen, 2009).

Histolojik kesitlerde C harfi şeklinde gözlenen yaklaşık 5 cm olan bu yapı filogenetik olarak beyinin en eski kısımlarından biridir. İnsanlar ve diğer memelilerde, beyin içinde her iki yanında simetrik olarak yer alan iki hipokampus, lateral ventrikül alt boynuzunun tabanında bulunur. Algı ve bellek sistemleri arasında bağlantı kuran hipokampus, beyin birçok bölgesinden duyu lifleri alır. Aldığı bu duyuları, forniks aracılığıyla hipotalamus, talamus ve septal sahaya iletir. Bunun yanında limbik sistemin temel yapıları olan amigdala, septum pellucidum ve mamillar cisim ile de sayısız bağlantısı bulunur (Kurtuluş, 2005).

Hipokampus embriyolojik olarak koroid fissür kavsinin dış parçasındaki projenitör hücrelerden gelişir. Hemisferlerin iç duvarı kalınlaşır ve lateral ventrikülün medial duvarına doğru bir çıkıntı yapar. Projenitör hücreler buraya göç ederek birlikte hipokampusu meydana getirirler (Williams, 1989; Moore, 2009).

2.4.1. Anatomisi

Koroideal fissürün konveks kenarına komşu olan hipokampal formasyon, hemisferin medial pallium kenarından gelişir (Williams, 1989). Hipokampus, gri cevher tabakasından oluşmuştur ve lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır (Arıncı ve Elhan, 2001). Genişlemiş ön kısmına pes hippocampi adı verilir ve bu bölgede digitationes hippocampi olarak isimlendirilen iki ya da üç adet çıkıntı bulunur. Hipokampus'un konveks olan ventriküler yüzeyi kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu alveus ile örtülüdür. Bu lifler medialde şerit şeklinde birbirine yaklaşarak fimbria hippocampi'yi oluşturur. Fimbria hippocampi'nin arka ucu alveus ile birlikte crus

fornicis'i meydana getirir. Ön ucu ise uncus gyri hippocampi'nin beyaz cevherinde sonlanır. Alveus'tan gelip fimbria hippocampi'ye dahil olan lifler, fornix'in başlangıcını oluşturur (Arıncı ve Elhan, 2001).

Üç ana zon archipalliumda belirlenmiştir. Bunlar; dentat gyrus, cornu ammonis ve subikulumdur. Dentat gyrus ve cornu ammonis ayırt edilebilen özelliklere sahiptir. Fakat en fazla pirimitif trilaminer korteks olarak bilinirler. Subikulum ise çevresindeki neokorteks ile bittiği yere kadar 4-5 veya modifiye 6 tabakalı bir çeşitlilik gösterir (Williams, 1989).

Hipokampus, Cornu ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak da isimlendirilir. CA içerdiği hücre tiplerinden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alana bölünmüştür.

CA1 subiculum'a en yakın olan bölgedir. Küçük piramidal hücrelerden oluşur ve hipokampal formasyonun en karmaşık organizasyonlu bölgesidir. Hipokampus'un CA1 alanı, en karmaşık ve en gelişmiş hipokampal alandır. Bu bölge çok fazla sayıda heterojen nöron içerir (insanda ~ 4.5 milyon).

CA2 bölgesi sıkı biçimde düzenlenmiş büyük piramidal hücrelerden oluşur ve kesitlerde yoğun bir bant şeklinde gözlenir.

CA3 ise gyrus dentatus'a en yakın olan hipokampus alanıdır (Songur ve ark., 2005). CA3 bölgesi yaygın, gevşek düzenlenmiş büyük piramidal hücrelerden oluşan tabakadır.

Gyrus dentatus'un bir parçası veya hilusu olarak tanımlanan CA4 bölgesi de, CA3 ile gyrus dentatus arasında yerleşmiştir (Berry ve ark., 1995).

2.4.2. Histolojisi

Hipokampus'un mikroskopik yapısı incelendiğinde, ventriküler yüzeyden derine doğru toplam yedi tabakadan meydana geldiği görülür (Berry ve ark., 1995).

1. Alveus hippocampi

Hipokampus'a ait piramidal hücre aksonları, afferent ve efferent lifleri içeren tabakadır (Berry ve ark., 1995).

2. Stratum oriens

Piramidal hücrelerin bazal dendritleri ve internöronlar bu katmanda yerleşmiştir. Bu tabakada bulunan hücre aksonlarının çoğu alveus liflerine katılırken, bir kısmı da en derinde yer alan moleküler tabakaya uzanmaktadır (Berry ve ark., 1995). Str. Oriens hipokampusa giren ve çıkan liflerin kollateralleri ve aksonları ile bağlantılıdır ve komşu tabakanın geniş piramidal nöronlarının bazı bazal dendritleri tarafından delinir. Hücre

soması düzensiz küçük dendritleri, basket hücreleri ihtiva eder. St. polimorfe de denen bu tabaka nonpiramidal hücrelerden zengindir. Bu tabaka, piramidal hücrelerin basal dendritleri ile ara nöronları içerir. Karşı hemisfere ait hipokampus ve entorhinal korteksten gelen komisural lifler, bu tabakada sonlanır (Williams, 1989; Canan, 1997).

3. *Stratum pyramidale*

Bu tabakadaki hücreler hipokampus'un esas piramidal hücreleridir. Yoğun olarak piramidal ve Golgi tip II hücreleri bulunmaktadır. Piramidal hücrelerin mimarisinin farklılığından dolayı hipokampus dört alt bölgeye ayrılır. Bu hücrelerin tabanı hipokampus'un ventriküler yüzeyine doğru dönüktür. Bazı hücrelerin her iki kutbundan çıkan zengin pleksus ağı piramit görünümüne neden olur. Piramidal hücrelere ait aksonlar stratum oriens tabakasını geçerek alveus liflerine katılır. Bu hücrelerin bazal-apikal dendritleri de komşu tabakalara kadar uzanır (Vida ve Frotscher, 2000).

Piramidal katmanda, kısa aksonlu hücreler de bulunmaktadır. Sepet hücreleri bu grup hücreler arasında yer alır. Hipokampus'un iç aktivitesini düzenleyen sepet hücreleri stratum oriens ile stratum pyramidale arasındaki geçiş alanında bulunur. Bu hücrelerin aksonları alveus hippocampi'ye uğramadan zıt yönde ilerler ve piramidal hücrelerin çevresinde yoğun bir ağ yapar. Daha sonra stratum radiatum'a geçer (Vida ve Frotscher, 2000). Sepet hücreleri, piramidal hücreler tarafından uyarılan "inhibitör" hücrelerdir ve bir piramidal hücrelerin deşarjı, bu hücreler vasıtasıyla komşu piramidal hücreleri duraklatır (Williams, 1989; Canan, 1997).

4. *Stratum lucidum*

Sadece CA3 alanında bulunan bu tabaka, yosunsu liflerden (mossy lifleri) zengindir. Yosunsu lifler ise piramidal hücreler ile bağlantıyı sağlar (Berry ve ark., 1995).

5. *Stratum radiatum*

Işınal dallara sahip olan bu tabaka geniş bir ağ yapısındadır (Berry ve ark., 1995).

6. *Stratum lacunosum*

Area entorhinalis'ten gelen önemli afferent liflerin sonlandığı tabakadır (Berry ve ark., 1995).

7. *Stratum moleculare*

Çok az miktarda nöron ve sinir lifleri içermektedir. Bunun yanı sıra, hipokampus'un son üç tabakası "stratum moleculare" adı altında tek bir katman olarak da kabul edilmektedir. Bazı kaynaklarda ise son iki tabaka "stratum lacunosum-moleculare" ismiyle ifade edilmektedir (Vida ve Frotscher, 2000).

Subikulum, gyrus dentatus'un medialinde kalan kortikal alandır. Anatomik olarak, hipokampal sulkus aracılığıyla, gyrus dentatus ile bitişik bir konumda bulunur. Presubikulum, subikulum ve parasubikulum olarak üç bölümde incelenir.

Dentate gyrus, 3 tabakalı kortikal bir yapı olarak değerlendirilir. Hipokampal sulkustan derinde uzandığı kadarı ile 1-Süperfisial moleküler katman, 2-Orta granüler katman, 3-Derin polimorfik katmanı içerir. Bazı hipokampal ekstrinsik kaynaklardan ve komşu nöronlardan sinaptik terminaller alır. Bazı hücreler Golgi 2 tipi nöronludur. Diğerleri daha uzun aksonlara sahiptir ve fimbriadaki efferent lifler ile kollaterallerin dallarını verdikten sonra birleşirler. Yosunsu lifler olarak bilinenler ise granüler katmandaki birçok hücreden köken alır.

Hipokampus'un arteriyel beslenmesi a. karotis interna dan posterior kominikan arter hizasından ayrılan, koroidal fissürden lateral ventriküle giren a. koroideadan alır. Venöz dönüşü ise v.serebri magna'ya dökülen v. bazalis yoluyla olur (Williams, 1989; Canan, 1997).

2.4.3. Hipokampusun Afferent ve Efferent İletim Yolları

Afferent Yollar

Hipokampus'un afferent lifleri tüm duyuşsal uyarıları ihtiva eder. Hipokampus, gyrus parahippocampalis'ten aldığı uyarıları fornix aracılığı ile corpus mamillare, area septalis ve hypothalamus'un bazı çekirdeklerine gönderir (Noback ve Demarest, 1986). Hipokampus, yine fornix aracılığı ile nuclei anteriores thalami, area hypothalamica posterior, corpus mamillare, area septalis, substantia innominata, area tegmentalis ventralis, nuclei raphe ve nucleus parabrachialis'ten lifler almaktadır (Barr ve Klernam, 1988; Steward ve Scoville,1988). Hipokampal devrenin ilk basamağını gyrus dentatus oluşturur. Bilgi, subikulum ve dentat gyrus arasında yarık gibi görünen yerden atlayarak hipokampusa girer. Bu yol, bu ikisi arasındaki boşluğu perfore etmesinden (delmesinden) dolayı perforant yol olarak isimlendirilir. Sonra entorinal aksonlar, dentat gyrus hücrelerinin üzerinde sinaps yaparlar. Dentat nöronlar sıra ile, CA3'e aksonlar gönderirler, bunlara "yosunsu lifler" denir. CA1'e "Schaeffer kollateralleri" denilen aksonlar gönderen CA3, subiculum da diğer bir lif grubunu gönderir. Subiculum, hipokampusun çıktıklarından sorumludur (Waxman, 2002). Subkortikal alanlardan gelen alvear lifler alveus'tan hipokampus'a geçer. Hipokampus'un CA1 alanı ile subiculum'un iç tabakasına dağılır (Barr ve Klernam, 1988; Witter ve ark., 1989).

Efferent Yollar

Hipokampusun dış bağlantıları genellikle “Papez Devresi” olarak ifade edilir. Papez (1937) hipokampusu çeşitli kortikal bölgelerden duyuşal bilgilerin kabul edildiği alan olarak ifade eder. Forniks büyük ölçüde hipokampustan çıkan ana yolu oluşturur. Subikulum ve hipokampusun büyük piramidal hücreleri fornikse aksonlar gönderirler. Hipokampus ayrıca amigdala ve striatum ile de bağlantılıdır (Amaral ve Insausti, 1990). Fornix, hipokampus’un en büyük efferent yoludur. Hipokampus ve subiculum’dan başlayan miyelinli lifler, alveus’tan fimbria hippocampi’ye geçer. Sayıları 1.2-2.7 milyon arasında değişen bu lifler, splenium corporis callosi’nin altında crus fornicis; thalamus’un arkasında ise corpus fornicis olarak devam eder. Her iki crus fornicis arasında çapraz yapan liflere commissura hippocampi adı verilir (Barr ve Klernam, 1988; Songur, 2001).

2.4.4. Hipokampusun İşlevleri

Hipokampusun beyindeki birçok bölge ile bağlantılı olması, hipokampusun fonksiyonlarının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Nolte, 1988). Hipereksitabilite özelliğine sahip olan hipokampus, hafif elektriksel uyarılar hipokampus bölgesinde uyarın kesildikten sonra bile saniyeler süren lokal epileptik nöbetlere sebep olur. Bu da hipokampusun belki normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir. İnsanda hipokampal nöbetler sırasında kişi koku, görme, işitme, dokunma vb. halüsinasyonlar içeren çeşitli psikomotor etkiler yaşar. Bilincini kaybetmemiş olsa ve yaşananların gerçek olmadığını bilse de bu halüsinasyonlar önlenemez. Hipokampusun bu hipereksitabilitesinin sebeplerinden biri, belki de hipokampus korteksinin bazı alanlarının beynin diğer bölgeleri gibi altı tabakalı değil üç sinir hücresi tabakasından oluşmasıdır (Guyton ve Hall,1996).

Hipokampusun elektroensefalografi (EEG) dalgaları ritmik sinüzoidal tipteki teta dalgalarıdır. Bu durum hipokampusun spontan aktivitesini ve bilincin değişik devrelerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Teta dalgalarının sadece dikkat ve uyanıklık ile değil, aynı zamanda birçok fizyolojik fonksiyonla ilgili olduğu bilinmektedir (Brodal, 1981).

Anestezi altındaki kedilerde yapılan çalışmalarda, hipokampusun uyarılmasıyla dikkatli bakış ve arayış hareketleri gözlenmiştir. Bu davranışların fiziksel işlemlere karşı duyarlı motor reaksiyonlar tarafından başlatıldığı kabul edilmektedir. Bilinci yerinde olan kedilerin hipokampusunda oluşturulan lokal uyarılar veya lezyonlar sonunda gözlenen davranış değişiklikleri psikomotor epilepside meydana gelenlerle benzerlik göstermektedir. Hipokampusun hafıza ve özellikle yakın hafıza ile ilgili olduğuna dair önemli bilgiler

mevcuttur. Bazı kişilerde epilepsi tedavisi için hipokampuslar cerrahi olarak iki taraflı çıkarılmıştır. Bu insanlar önceden öğrenilmiş anıları hatırlayabilmekte, ancak sözel sembolizme dayanan yeni bir bilgi edinememektedirler. Saniyeler ile birkaç dakika arasında değişen kısa süreli bellek oluşturabilirler; ancak birkaç dakikadan fazla uzun süreli bellek oluşturma yetenekleri kısmen ya da tamamen yok olmuştur (anterograt amnezi). Hipokampusların harabiyeti eskiden öğrenilen anıların kaybına da neden olur (retrograt amnezi); ancak bu uzak geçmiş anılarda ziyade bir yıl önceki anılar için daha geçerlidir. Hipokampusun kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesi güdüsünü sağladığı, yani hipokampusun yeni informasyonun kalıcı depolanmaya çevrilmesi gerçekleşinceye kadar zihnin onu tekrarlamasını gerektiren sinyal veya sinyaller ilettiği ileri sürülmüştür. Mekanizma ne olursa olsun hipokampuslar olmadan verbal ya da sembolik uzun süreli anıların kalıcı olması mümkün olamaz (Guyton ve Hall, 1996).

Hipokampus olfaktor korteks ile de alakalıdır. Canlının ne yiyeceğini hangi nesnenin tehlikeli olduğunu, hangi kokunun sekse davet ettiğini belirler, ölüm kalım önemi taşıyan kararları alır. Hipokampus bir nöronal sinyalin önemli olduğunu bildirdiğinde, bu belleğe alınır (Guyton, 1996).

Enformasyonun öneminin belirlenmesi ve önemli ise bellekte saklanması hususunda ödülleme ve cezalanma en büyük rolü oynar. Kişi nötr uyarılara çabucak alıştığı halde, zevk veya cezalanmaya sebep olan bir duysal deneyimi daha candan öğrenir. Hipokampusun kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüştürülmesi güdüsünü sağladığı, yani hipokampusun yeni enformasyonun kalıcı depolanmaya çevrilmesi gerçekleşinceye kadar zihnin onu tekrarlamasını gerektiren sinyal veya sinyaller ilettiği ileri sürülmüştür. Mekanizması ne olursa olsun hipokampus olmadan verbal veya sembolik uzun süreli anıların kalıcı olması mümkün olmaz (Guyton, 1996).

Sonuç olarak, hipokampal formasyon; hayvanlarda ve insanda oldukça önemli görevler üstlenen bir beyin bölgesidir. Özellikle insanın yaşamında ve kültürel gelişiminde, öğrenme ve hafıza olgusunun önemi göz önüne alındığında, hipokampus ve hipokampal formasyon ile ilgili çalışmaların, halihazırda olduğu gibi, gelecekte de tıbbi araştırmalarda oldukça önemli bir yer tutacağı rahatlıkla söylenebilir. Bu kadar çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, bu bölgeyle ilgili bilinmeyen birçok konunun hala var olması da, tıp bilimlerinin diğer alanlarında olduğu gibi, daha birçok çalışma yapılması gerektiğini açıkça ortaya koymaktadır. Hipokampusun, olfaktor sistemle, emosyonel ve otonomik fonksiyonlarla da ilişkili olduğu bilinmektedir (Ruit, 1988). Ayrıca bağışıklık, üreme, ağrı

algılanması, yiyecek alımı, kan basıncı, iyon dengesi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonların, günlük ya da yıllık ritimlerinin düzenlenmesi gibi hipokampal roller bildirilmiştir (Gol ve Faibisch, 1966; Raitiere, 1992; Lathe, 2001).

2.4.5. Hipokampus lezyonları

İnsanda, tek taraflı hipokampus lezyonları belirgin bir fonksiyon kaybına sebep olmazken, bilateral lezyonlarda, hafıza bozuklukları (anterograd amnezi) ve bunama (demans) görülür. İlerlemiş temporal lob epilepsisi olgularında bu bölge cerrahi olarak çıkarılmış ve bu kişiler yapılan çalışmalar sonucu oldukça önemli bilgiler elde edilmiştir. Fakat hipokampus lezyonları, uzun süreli (sekonder ve tersiyer) hafıza, kişilik ve zekâyı etkilememektedir. Yani hipokampusunda lezyon olan bir şahıs, eskiden öğrendiklerini rahatlıkla hatırlayıp ifade edebilirken, yeni şeyler öğrenememektedir. Alzheimer hastalığına yakalanmış insanların hipokampuslarındaki hücre sayısında bir azalma tespit edilmiştir (Guyton, 1996; Mu ve Gage; 2011).

Hipokampusların harabiyeti eskiden öğrenilen anıların kaybına da neden olur (retrograd amnezi) ancak bu uzak geçmiş anılarından ziyade bir yıl önceki anılar için daha geçerlidir (Guyton, 1996).

Hipokampus'u da içine alacak bir biçimde lobus temporalis medial parçalarının çift taraflı çıkarılmasından sonra hafıza kaybının yanı sıra, Klüver-Bucy Sendromu olarak bilinen klinik tablonun meydana geldiği bildirilmiştir (Moss ve ark., 1981; Dere, 2000; Songur ve ark., 2001). Bu sendromda ise aşağıdaki belirtilerin görüldüğü ortaya konmuştur;

1. Canlı ya da cansız ayrımı yapmaksızın değişik tür ve cinsteki nesnelere karşı seksüel aktivitede artış,
2. İlk defa görülen objelere anlam verememe,
3. Yeni şeyleri hafızada tutma zorluğu,
4. Yeni beceriler elde edememe,
5. Korku ve kızgınlık duygularında azalma, uysallık hali,
6. Beslenme alışkanlıklarında değişiklikler (yiyecekleri sürekli ve uzun şekilde kokladıktan sonra yeme ya da değişik cisimlere karşı yeme isteği vs.).

Bunun yanı sıra, şiddetli alkolizm, tiamin eksikliği, kronik malnutrisyon, kanama ve enfarktüs durumlarında hipokampus'ta iki taraflı olarak disfonksiyonlarının ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu lezyonlar sonucu yeni şeylerin hafızda tutulamadığı ve Korsakoff Sendromu (Dismnezik Sendrom) denilen bir amnezi durumunun meydana geldiği ifade

edilmiştir. Bahsedilen bu sendromda, kişi yeni öğrendiği becerileri uygulamaya koyamamaktadır. Fakat şahıs, rahatsızlanmadan önce öğrenmiş olduğu karmaşık işlevleri kolaylıkla yapabilmektedir. Ayrıca hastaların kendi geçmişi ile ilgili hayal veya konfüzyon tarzı deneyimlerden bahsettiği ve bu deneyimlere kendilerinin de inandığı belirtilmektedir. Bu durum konfabulasyon olarak tanımlanmaktadır (Dere, 2000; Andreoli ve ark., 2008).

2.5. Melatonin

Melatonin, karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Melatonin, epifiz bezinde triptofandan sentezlenir ve plazma proteinlerine bağlıdır. Karaciğerde metabolize olan melatoninin büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır ve başlıca metaboliti 6- Hidroksimelatonininsülfat (6-HMS)'dir (Lane ve Moss, 1985; Gitto ve ark., 2011). Melatoninin sahip olduğu antioksidatif mekanizma; elektron transferini düzenleyebilme, reaktif ara ürün radikalleri detoksifiye edebilme, peroksidatif reaksiyon zincirlerini güçlü bir şekilde kontrol edebilme gibi özelliklere sahiptir (Palaoglu ve Beskonaklı,1998). Bu temel antioksidan etkinin organizmadaki karşılığı ise hücre ve dokunun bütünlüğünün korunmasına katkıdır. Organizmanın biyokimyasal işleyişinde oksidasyon ara ürünleri ve dolayısıyla oksidatif stres oluşumu kaçınılmazdır.

Biyolojik sistemlerde prooksidan veya antioksidan dengenin bozulmasıyla oluşan oksidatif stres, birçok patolojik durumla ilişkilendirilmektedir. Ancak yine organizma, prooksidan etki gösteren serbest radikallerin hasarına karşı, antioksidan adı verilen ajanlarla kendini savunur (Reiter, 1996). Yapılan çalışmalar, bu endojen antioksidan maddelerden en güçlüsünün MEL olduğunu göstermiştir (Reiter, 1996). MEL molekülü kolaylıkla oksitlenmez, otooksidasyona uğramaz ve redoks döngüsüne, hidroksil radikali üreten reaksiyonlara katılmaz. MEL'in yanısıra MEL metabolitlerinden hiçbirisinin prooksidatif aktivitesi yoktur (Reiter,1981). Pineal bezin başlıca salgısı olan MEL, in vivo ve in vitro antioksidan etkiye sahiptir.

Yüksek derecede lipofilik özelliği olan MEL'in serbest radikal toplayıcı etkisi için herhangi bir bağlanma bölgesine ve reseptöre ihtiyacı yoktur. MEL'in hidroksil radikali nötralize etme özelliği glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat, peroksit radikal tutucu özelliği ise E vitamininden 2 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Reiter, 1996).

MEL'in etkili bir serbest radikal tüketicisi olduğu gerek in vivo gerek in vitro deneyler ile kanıtlanmıştır. İn vitro olarak; hidroksil ve peroksit radikallerini direkt olarak

tüketir, bu konuda diğer antioksidanlardan daha büyük bir potansiyele sahiptir. İn vivo olarak, MEL'in fizyolojik ve farmakolojik seviyeleri serbest radikal sınıfındaki kimyasalların tahrip edici gücüne karşı savaşıır (Tan ve ark., 1993; Tan ve Reiter, 1994).

MEL'in apopitozun önlenmesinde etkili olduğu düşünölmektedir. Yapılan çalışmalarda yaşlılıkta serbest radikal hasarındaki artışın azalmış MEL düzeyleri ile birlikte olması ve MEL verilmesi ile hücreseel hasar göstergelerinin düzelmesi MEL'in apopitozis üzerine etkili olabileceğini düşöndürmektedir (Maestroni,1993). Ayrıca, MEL tedavisinin viral enfeksiyonları, kronik stresi, cerrahi müdahaleler ve yaşlanmayla ikincil olarak gelişen immünolojik zayıflamayı önleyebildiği de son bilgiler arasındadır (Parlakpınar ve ark., 2004).

Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen MEL, lipofilik özelliğine rağmen, membran reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerine ulaşır. Otoradyografik çalışmalarda, beyinin çeşitli bölgelerinde, bağırsak, ovaryumlar, kan damarları ve karaciğerde MEL reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (Acuna ve ark., 1994; Brzezinski, 1997). MEL reseptörlerinin sensitivitesi ve ekspresyonu, günlük ışık ritmi ile ilişkilidir (Forsling, 2001). Lipofilik özelliği nedeniyle, hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilen MEL için sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır (Brzezinski, 1997). Vücutda bulunan diğer organlara oranla beyin, daha az antioksidan kapasiteye sahiptir ve beyinin özellikle toksik maddeler tarafından kayba uğrayan nöronlarını korumada antioksidanların kullanılmasını gündeme getirmiştir. Melatonin (N – asetil– 5-metoksitriptamin) serbest oksijen radikallerini yakalayarak, glutasyon peroksidaz ve süperoksit dismutazı uyararak antioksidan etki gösterir (Tan ve Reiter, 2002).

Ratlara, akut/kronik uygulanan MEL'in beyin dokusu Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini artırdığı ve bu yolla oksidatif hasara karşı beyin dokusunu koruduğu (Kotler ve ark., 1998) ayrıca anne rata verilen MEL'in plasentadan geçebildiği ve fetus beyinde SOD aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Thomas ve ark., 1998; Burmistrov ve ark.,2001).

Melatoninin yukarıda bahsedilen etkilerinin yanında nöroprotektif etkilerine dair de çok sayıda çalışma mevcuttur (Leon ve ark., 2005; Kaplan ve ark., 2011; Aygun ve ark., 2012; Shinozuka ve ark., 2013). Melatonin eksojen olarak uygulandığında kan beyin bariyerini kolaylıkla geçer ve beyinde yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Merkezi sinir sistemini etkileyen birçok koşulda sahip olduğu serbest radikal temizleyici ve lipofilik - hidrofilik özelliklerinden dolayı potansiyel bir nöroprotektif etkisi vardır. Bu sayede başta hücre çekirdeği olmak üzere hücre zarı ve organelleri serbest radikal hasarına karşı

koruyabilmektedir (Aygün ve ark., 2012). Örneğin oksidatif stresi azaltarak nöronal apoptosisi ve mitokondriyal DNA hasarını önemli ölçüde engellediği bildirilmiştir (Feng ve ark., 2006; Pandi-Perumal ve ark., 2006).

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ve Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Schwann hücre aktivitesinde ve fibroblastların kollajen üretiminde önemli bir role sahiptir. Pinealektomili ratlarda sinir epinöryumunda TGF- β ve bFGF ekspresyonu önemli ölçüde artarken, eksojen MEL uygulamasının bu ekspresyonu azalttığı görülmüştür. Dolayısıyla MEL, anastomoz bölgesinde kollajen birikimi ve nöroma oluşumunu kontrol ederek sinir rejenerasyonunda olumlu etki yapmaktadır (Odacı ve Kaplan, 2009).

Eksojen MEL uygulaması antioksidatif savunma mekanizmasını önemli ölçüde artırdığı için oksidatif hasarla ilişkili hücre kayıplarının klinik tedavisinde kullanımı faydalı olabilir (Chang ve ark., 2008).

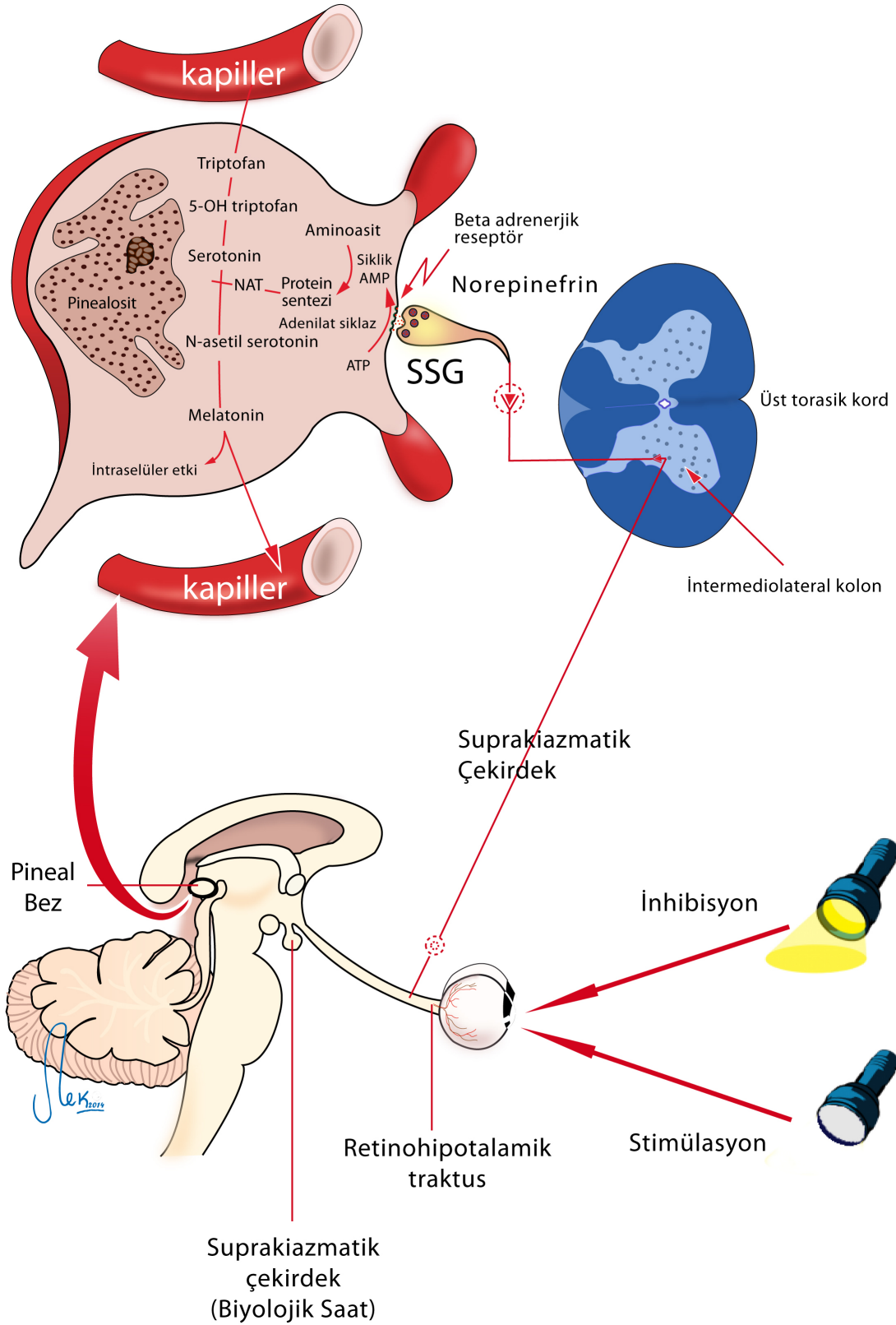
2.5.1. Melatonin Sentezi

Pineal bezde MEL sentezi suprakiazmatik nükleus tarafından kontrol edilen ritimlerden biridir (Pandi-Perumal ve ark., 2008). MEL sentezinde birinci basamak bir indol aminoasit olan triptofanın pinealositler içine alınması ve orada pinealositlerde triptofan hidrosilaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla 5-hidroksitriptofan'a hidrosillenmesidir (Şener, 2010). Bu bileşik, 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptamin (Serotonin)'e dekarboksillenir, pineal bir enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) tarafından N-asetil serotonine dönüştürülür. Bu bileşik de MEL sentez hızını tayin eden enzim olan hidroksiindol-o-metil transferaz enziminin etkisiyle MEL'e (N-asetil 5-metoksitriptamine) dönüşür (Şener, 2010).

N-asetil serotoninin MEL'e dönüşümü diğer bir pineal enzim olan hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) aracılığı ile olur (Brzezinski, 1997; Noyan, 1998). Sentezin düzenlenmesi primer olarak geceye, diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır (Letelier ve ark., 2010). Sentezlenen MEL pineal bezin endokrin hücreleri olan pinealositlerden hızla salgılanmaktadır. Sentezden sorumlu NAT'ın aktivitesi dolayısıyla melatonin sentezi spesifik c-AMP bağımlı transkripsiyon faktörleri ve fotoperiyodik şartlar tarafından düzenlenir. Işık altında, retinadan başlayan nöronal impulslar, hipotalamusta suprakiazmatik çekirdek (SCN) ve diğer hipotalamik yapılara aktarılır (Şener, 2010). Uyarı SCN ve periventriküler çekirdek (PVN) aracılığı ile superior servikal gangliyonuna geçer. İnsanda karanlığın başlaması ile postganglionik sempatik liflerden salıverilen noradrenalin

esas olarak $\beta 1$ reseptörlere bağlanarak, depolardaki serotonin ve NAT'nin intrasellüler salıverilmesine neden olur. Nöronlarda ve pineal bezdeki biyokimyasal sinyallerin bu döngüsü insanda MEL anabolizmasını hızlandırır ve aynı zamanda MEL'in gün içi ritme bağlı olarak sentez ve salıverilmesini oluşturur (Şener, 2010; Şekil 1). Sentezlenen MEL plazmada proteinlere bağlıdır ve karaciğerde metabolize olur (Lane ve Moss, 1985).





Şekil 1: Melatonin hormonunun karanlığın stimülasyon etkisiyle sentezlenme basamaklarını göstermektedir. (Yazıcı ve Köse, 2004' ten uyarlanmıştır).

2.5.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri

MEL sentez ve salınımı günün karanlık evresinde artan, aydınlık evresinde ise azalan, diurnal varyasyon gösteren siklik bir ritme sahiptir (Macchi ve Bruce, 2005; Ergin ve Başaloğlu, 2008). Pineal bezden salgılanan MEL (Baydas ve ark., 2002; Djeridane ve ark., 2005), direkt radikal süpürücü ve güçlü bir antioksidandır (Gomez ve ark., 2005; Oktem ve ark., 2005; Mogulkoc ve ark., 2006; Kavaklı ve ark., 2007; Doğan, 2008) ve özellikle en zararlı serbest radikallerden birisi olan 'hidroksil radikali' (OH) ile reaksiyona girerek, onu indolil katyonuna dönüştürerek etkisizleştirmektedir (Meki ve ark., 2001; Patat ve ark., 2003). MEL; hücrede DNA'yı serbest radikallerin neden olduğu hasardan korumanın yanı sıra (Soysal ve ark., 2008), onkostatik, anti-inflamatuar ve antikonvülzan etkilere ve sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesi, reproduktif aksın düzenlenmesi gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip bir hormondur (Doğan, 2008). Bu hormon, nörodejeneratif hastalıklarda antioksidan ve nöron koruyucu olarak önemli bir role sahiptir (Venkataraman ve ark., 2008). MEL'in yüksek lipofilik bir yapıya sahip (Özgüner ve ark., 1998; Kavaklı ve ark., 2007) olduğu çok iyi bilinmektedir ve hücrenin tüm komponentlerine girebilir (Salie ve ark., 2000; Oktem ve ark., 2005; Kavaklı ve ark., 2007) örneğin MEL lipofilik özelliğinden dolayı kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilirken prekürsörü olan serotonin ise çok az miktarda geçebilir. Güçlü bir antioksidan olan E vitamini de kan beyin bariyerini geçemez bu nedenle MEL daha üstün bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. MEL'in birçok antioksidanın aksine kolaylıkla kan beyin bariyerini geçmesi, büyük oranda nöral antioksidan olduğunun göstergesidir (Carneiro ve Reiter, 1998).

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Membranlarda lipid peroksidasyonunun meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin ROS ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir.

Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidan yıkıma karşı

antioksidanlar olarak isimlendirilen birçok koruyucu mekanizma bulunmaktadır. En iyi bilinen antioksidanlar C ve E vitaminleri ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda melatoninin çok daha güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Carneiro ve Reiter, 1998; Altun ve ark., 2001; Anisimov ve ark., 2006; Letelier ve ark., 2010). Hidroksil radikalini, hidrojen peroksidi, süperoksit radikalini detoksifiye eder. Melatoninin serbest radikal toplayıcı etkisi için herhangi bir bağlanma bölgesine ve reseptöre ihtiyacı yoktur (Hardel ve Reiter, 1993; Reiter, 1996; Ianas ve ark., 1997).

MEL, elektrondan zengin bir moleküldür ve direkt antioksidan özelliği (Şahin ve ark., 2004), hem yağda hem de suda çözünür özelliğe sahip olması nedeniyle, vücudun her hücresine, sitozole ve hücre içindeki diğer yapılara kolaylıkla girer ve bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir (Manda ve Reiter, 2010).

Beyin de yapılan çalışmada da melatonin iskemi reperfüzyon hasarını önemli ölçüde azaltabilmiştir (Kavaklı, 2007). MEL'in toksik ilaçlara, bakteriyel toksinlere, şiztosomiaya, ağır metallere maruz kalmaya karşı koruyucu etkileri mevcut olmakla beraber Alzheimer, tardive diskinezisi, demir ve eritropoetin alımı, ultraviyole (UV) radyasyonun neden olduğu cilt eritemine karşı protektan etkileri gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalarla antiproliferatif ve antioksidan etkilere de sahip olduğu gösterilen MEL'in radyoterapi (RT) esnasında sekonder oluşan doku hasarını engelleyici etkisi de mevcuttur. Sekonder radikallerin (SR) temizlenmesinde görev alan ve SR yakalama özelliğinden dolayı antioksidan olarak etki eden MEL, radyasyonun sebep olduğu SR'ler ile oluşan hücre hasarında modülatör bir rol oynadığı ve RT'ye karşı koruyucu etkisinin olduğu düşünülmektedir (Özdemir, 2010). MEL'in RT'nin karaciğer, akciğer, ince bağırsak, lens ve spinal kord üzerindeki etkilerini engelleyici etkisinin serbest radikallerin ortamdaki uzaklaştırılması ile veya SOD gibi antioksidan enzimlerinin aktivasyonunu sağlayarak oluşturduğu yapılan hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Özdemir, 2010). MEL en zararlı radikal olan OH radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır (Reiter ve ark., 2011). MEL, hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü bir süpürücüsüdür (Abuja ve ark., 1997; Yılmaz ve ark., 2008). Ayrıca inflamasyon reaksiyonları sırasında makrofajların aktivasyonu ile oluşan ve toksik bir oksijen türevi olan hipokloroz asit (HOCl)'e karşı da süpürücü etki göstermektedir. Ancak melatoninin hidrojen peroksit (H₂O₂) ve oksijen (O₂) radikalleri üzerine direkt süpürücü etkisi zayıftır.

Melatonin antioksidan özelliğinin yanı sıra birçok enzimi de aktive edici özelliğe sahiptir (Paredes ve Reiter, 2010).

MEL'in serbest radikaller üzerinde dolaylı etkileri de vardır. MEL, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O₂ radikalini H₂O₂' ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu NOS enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir (Kara ve ark., 2012).

MEL'in serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi onun aynı zamanda güçlü bir antiinflamatuvar ajan olduğunu da açıklamaktadır. İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarına giden yolak üzerinde çeşitli kademelerde MEL ile blokaj bu ajana antiinflamatuvar ve doku koruyucu etki sağlamaktadır. Çeşitli inflamasyon modellerinde (yanık hasarı, sepsis, iskemi/reperfüzyon gibi) nötrofil aktivasyonunun dokularda neden olduğu oksidan hasarları MEL anlamlı olarak geri çevirmiştir (Şener, 2010). MEL'in merkezi sinir sisteminde apoptotik hücre ölümünü engellemesine ek olarak, periferel aksotomi sonrası nöron ölümünü de azalttığı bildirilmiştir (Odaci ve Kaplan, 2009).

Eksojen MEL uygulaması antioksidatif savunma mekanizmasını önemli ölçüde artırdığı için oksidatif hasarla ilişkili olan DS uygulamasının hipokampus nöron kaybında klinik tedavisinde kullanımı faydalı olabilir (Chang ve ark., 2008).

MEL aynı zamanda inflamatuvar yanıtı, serebral ödem oluşumu ile kan-beyin bariyeri geçirgenliğini azaltır (Kondoh ve ark., 2002; Chen ve ark., 2006; Lee ve ark., 2007). MEL uygulaması işlevsel olarak, kavrama kuvveti ve motor koordinasyonu geliştirir, hiperaktivite ve anksiyeteyi zayıflatır (Kilic ve ark., 2008).

2.6. Stereoloji

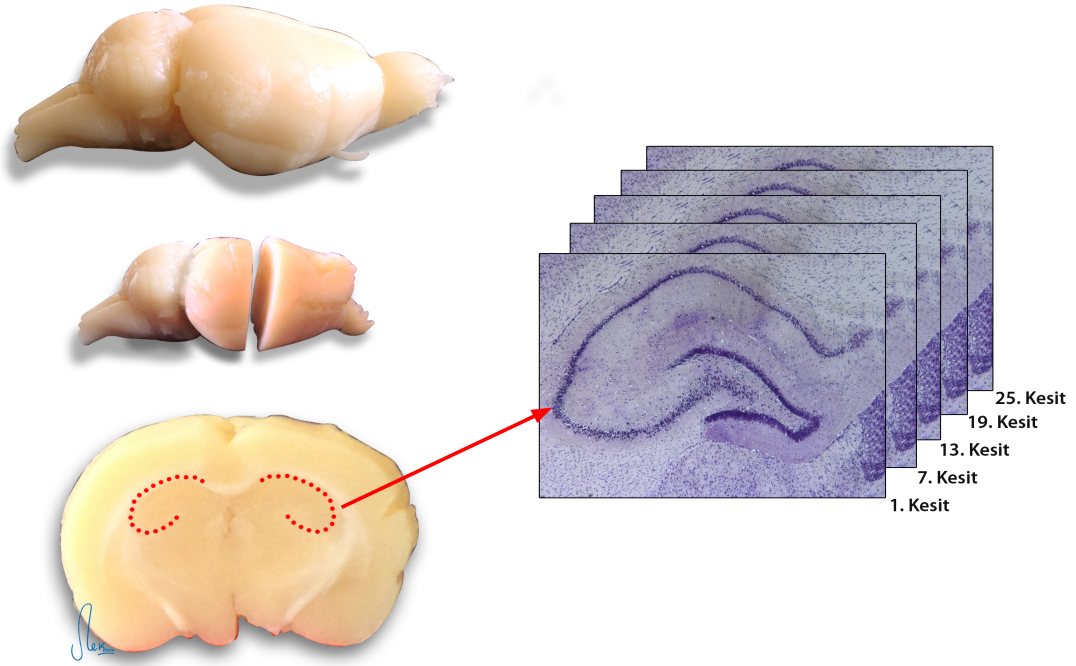
Üç boyutlu canlı ya da cansız yapıların, iki boyutlu düzlemde elde edilen histolojik görüntülerinden yola çıkarak geometrik ve sayısal özellikleri hakkında tarafsız bilgi edinilmesini sağlayan bir morfometri bilimidir. Yapıyı oluşturan bileşenler boy, şekil, hacim ve doku içindeki yönelimlerine bağlı olarak kesitler üzerinde izdüşümlerini oluştururlar. Histolojik işlemler sırasında dokunun büzülmesi, şişmesi gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir. Kesit düzlemindeki bir değişim doku içerisindeki anizotropik partiküllerin farklı izdüşümü oluşturmasına neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra kesit alma işlemi ilgili objelerde boyut azalmasına yol açabilir (Altunkaynak ve ark., 2012). Stereolojik yöntemler bu gibi sorunlardan bağımsız olarak; hacim, yüzey alanı ve sayı gibi birçok

önemli sayısal değerin tarafsız ve etkin olarak hesaplanmasına olanak vermektedir (Kaplan ve ark., 2012).

2.6.1. Stereolojik Çalışmalarda Sistemik Tekdüze Rasgele Örnekleme

Stereolojik metotların temelini “Sistemik Rastgele Örnekleme” (SRÖ) prensibi oluşturmaktadır. Bu örneklemenin temel özelliği, araştırılacak yapıdan örnekler almanın gerekli olduğu durumlarda, alınan örneğin yapının bütünü hakkında gerçek değere en yakın bilgiler verebilmesidir. Biyolojik materyaller içindeki hücre, çekirdek, vezikül vb. gibi incelenecek yapılara oranla büyük oldukları için, materyalden elde edilen tüm kesitlerin incelemeye dahil edilerek incelenmesi oldukça zor olacaktır. Örneğin bir insan hipokampusündeki toplam nöron sayısını öğrenmeye yönelik bir çalışma için, örneklenecek beyinlerden on binlerce histolojik kesit alınması ve bu hücrelerin tek tek değerlendirmeye alınması hemen hemen mümkün değildir. Bu gibi durumlarda yapıların en iyi şekilde örneklenmesi ve bu örneklerinde yapının tamamını temsil etmesi gerekmektedir. Bu amaçla SRÖ, daha önce bir ön çalışma ile belirlenmiş sabit bir örneklem aralığı boyunca, ilk aralık içinden rasgele bir noktadan başlamak şartıyla incelenecek yapının tamamını etkili bir biçimde örnekleme amaçlar. Örneklemenin sistemik bölümünü pilot çalışmayla belirlenen örneklem aralığı, örneklemenin rasgelelik kısmını ise ilk aralık içinde rasgele bir noktadan başlanması oluşturmaktadır. İstatistiksel olarak böyle bir örnekleme, ne kadar çok örnek üzerinde uygulanırsa, biyolojik materyalin her noktası için eşit örnekleme şansı tanıdığı için homojen ve verimli bir örnekleme elde etme şansında bir o kadar artacaktır (Gundersen Jensen, 1987; West, 1999). Bu ön çalışma bir kez sonuçlandırıldıktan sonra, aynı organda yapılacak tüm çalışmalar aynı örnekleme aralığıyla sürdürülebilir.

Çalışmamızda belirlenen kesit örnekleme aralığı 1/6'dır. Rasgele bir kesitten başlayıp her 5. kesitten sonraki 6. kesit lam üzerine alınmıştır. Her sıçan beyninden 20 µm kalınlığında 20-30 kesit elde edilmiştir. Kesitler içerisinden hipokampus alanlarına sahip olanlar üzerinde çalışmaya devam edilmiştir. Optik parçalama ve optik disektör metodunun uygulanması için stereoinvestigator programında kesitlerdeki hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri atlas aracılığıyla belirlenmiştir (Rat Brain Atlas) ve sonrasında bu bölgelerde piramidal hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Rat beyin örneklerinde hipokampusun lokalizasyonu ve 1/6 oranında sistematik rastgele örnekleme ile alınan t mikron kalınlığında kesitler görülmektedir.

2.6.2. Optik Parçalama

Parçalama (fractionator) yöntemi, bir yapıdaki herhangi bir niceliğin (sayı, yüzey alanı vb) tüm yapıdaki toplam değerini bulmak amacıyla kullanılır. Bu yöntemle elde edilen sayısal değer, ilgilenilen niceliğin toplam değeri olduğu için, sayısal yoğunluk gibi diğer sayısal parametrelerin dezavantajlarından bağımsız karşılaştırmalar yapma imkanı sağlar.

Parçalama yöntemi aslında bir örnekleme sistemidir. Temel mantığı, toplam nicelik hesabı yapmak istediğimiz bir yapıdan, bilinen bir oranda bir örnek almak ve bu örnek üzerinde tarafsız bir yöntemle yapılan sayımlardan yola çıkarak, o yapıdaki niceliğin toplam değerini hesaplamaktır (Gundersen ve Jensen, 1987).

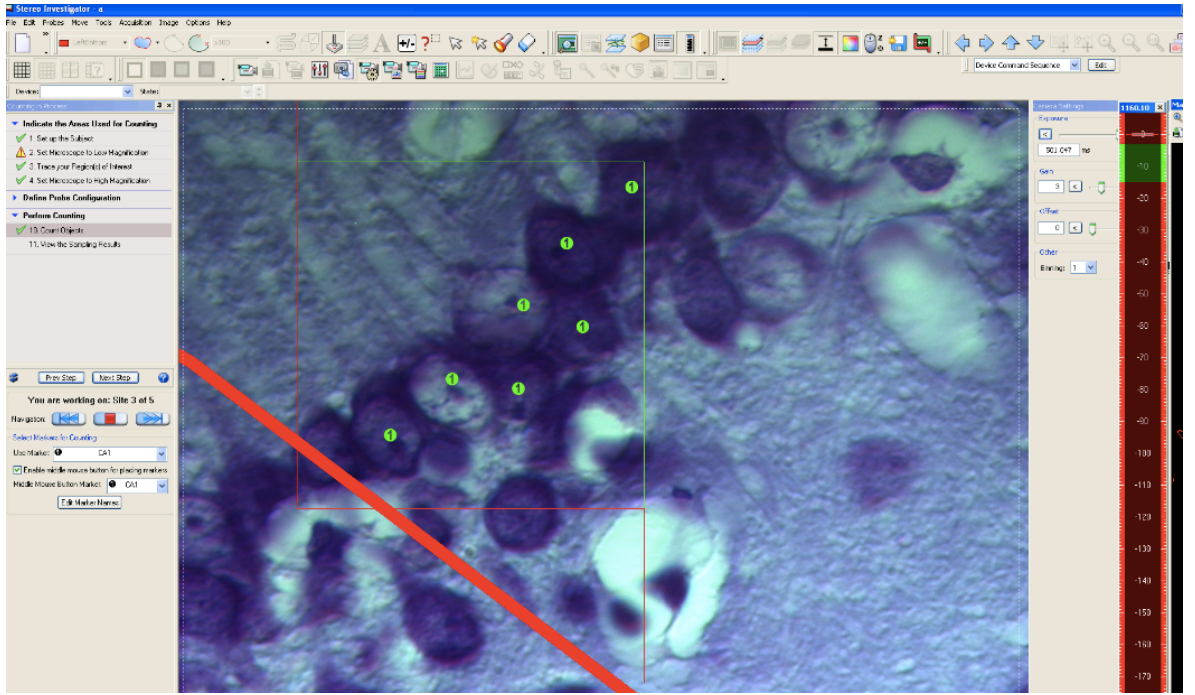
Optik disektör yöntemi uygulanırken; doku üzerinde belirlenen rasgele bir örnekleme alanında, şeffaf olan kalın kesit içerisinde belirli adım aralığıyla optik olarak ilerleme yapılarak sayım işlemi gerçekleştirilir. Bahsi geçen örnekleme alanına gelindiğinde öncelikle kesitin üst yüzeyine odaklanarak ilk net görüntünün elde edildiği düzey kesitin üst yüzeyi olarak kabul edilir. Kesitin alt ve üst yüzeylerinde olmuş

olabilecek kimi artefaktlar veya yüzeylerde bulunan yarım kesilmiş partiküller gibi, kesit kalınlığına veya tanecik sayısına etki edebilecek faktörlerden kaçınmak üzere, sayım yapılacak hacim ile, kesitin alt ve üst yüzeyleri arasında bir “güvenlik aralığı” bırakılır (Canan, 1998). Ortalama 3-5 mm’lik bir mesafe yeterli görülmektedir. Takiben pilot çalışma da belirlenmiş olan disektör mesafesi kadar (10-15 mm) ilerleme yapılarak gözlemlenen tanecikler işaretleme yapılarak sayılır. Bu yolla gerçekleştirilen bir sayım o disektör hacmi içerisinde bulunan tanecik sayısını verecektir. Sonuç olarak toplam disektör tanecik sayısı toplam disektör hacmine bölündüğünde birim hacimde bulunan tanecik sayısına (sayısal yoğunluk) ulaşılmış olur. Toplam tanecik sayısını elde etmek için sayısal yoğunluk değeri yapının toplam hacmi ile çarpılır (Bregaard ve ark., 1990).

Işık mikroskobunda uygulanan optik parçalanma yöntemi için kalınlık ölçümleri, mikroskop tablasının dikey (z eksenini) hareketlerini ölçebilen herhangi bir araç yardımıyla yapılabilir. Stereoloji laboratuvarlarında bu amaç için en çok kullanılan araç “mikrokator” denen elektronik bir aygıttır. Mikrokator, genellikle, mikroskobun z eksenine monte edilen, harekete duyarlı bir bölüm ile, burada meydana gelen değişimleri sayısal olarak gösteren bir dijital gösterge kısmından oluşmaktadır. Tek dezavantajı, kalınlık ölçümleri sonucunda elde edilen değerlerin, değişik araştırmacılara göre farklılık göstermesidir. Bunun sebebi ise, mikrokator ölçümlerinin, esasen görme duyusuna dayalı olması ve yapılan ölçümlerde araştırmacıların kullandığı kabullerin farklı olmasıdır. Mikrokator veya başka bir dikey hareket göstergesi (West ve ark., 1991; Çon, 2000) ile yapılan ölçümlerde, öncelikle, yukarıdan aşağıya veya tersi yönde mikroskopta gerçekleştirilen bir odak ilerlemesi esnasında kesitin ilk net görüntüsünün alındığı nokta belirlenir. Burası kesitin üst (veya alt) yüzeyi olarak kabul edilir ve ölçüm aracı “sıfır” değerine ayarlanır. Buradan sonra, kesitin diğer yüzüne doğru odaklanma ilerletilir ve en son net görüntünün alındığı, yani kesit sınırına gelindiği zaman, bu yüzey de kesitin alt (veya üst) yüzeyi olarak belirlenerek ölçüm cihazından, iki seviye arasındaki fark mikrometre olarak okunur. Bu değer “kesit kalınlığı”dır. Yüzey belirlemelerinde kimi subjektif veya kişiye özgü değişimler olabilir. Ama bunlar hem çok küçük aralıklar içinde kaldığından ve hem de parçalamada, oranlar açısından anlamlı bir değişim oluşturmadıklarından, sayım sonuçlarında önemsenecek bir etkiye sebep olmazlar (Canan, 1998).

Stereoloji analiz sisteminin temel mantığı olan ‘tarafsızlık’ ve ‘etkinlik’ kavramlarından yola çıkılarak yapılmış olduğumuz sayımın geçerli olabilmesi için sayım çerçevesi de amaca uygun olmalıdır. Sayım çerçevesinin boyutları en verimli olacak

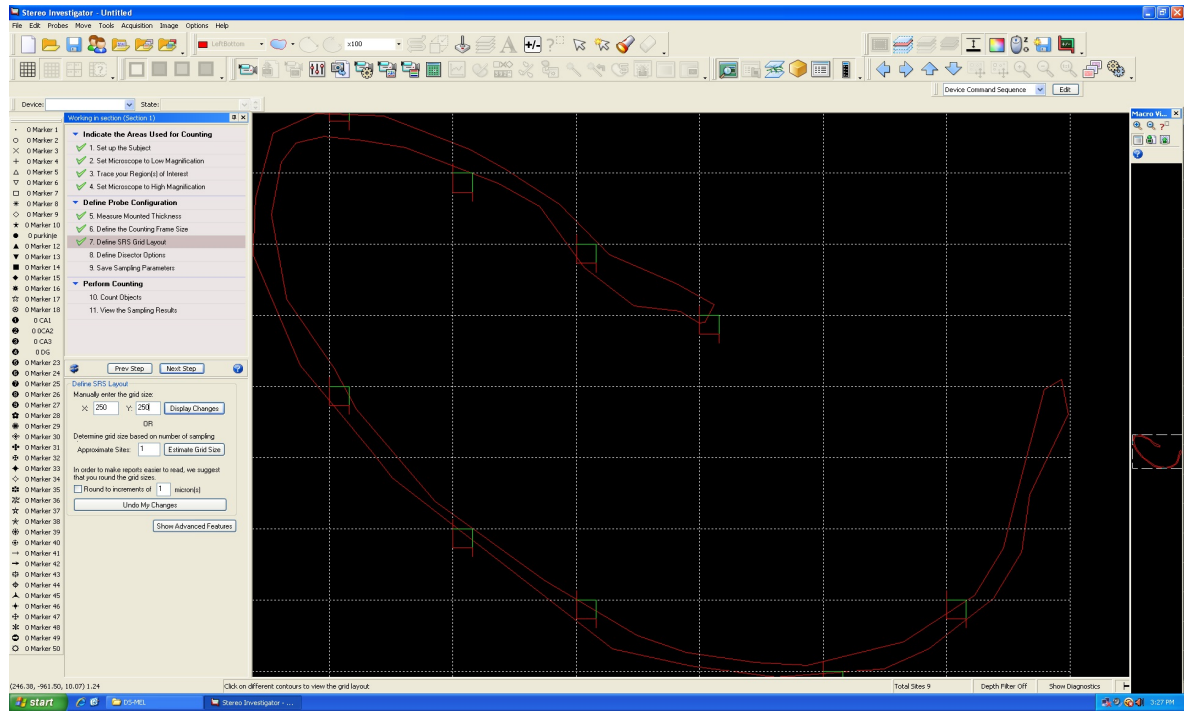
şekilde ayarlanmalıdır. Genellikle, optik disektör uygulamalarında, sayım çerçevesinin boyutları, her bir örnekleme alanında ve her bir üç boyutlu disektör sondası boyunca 1 veya 2 tanecik sayılabilecek şekilde ayarlanır. Böylece toplamda 600-1000 arasında tanecik sayılmış oluruz. Yani, belirlenen bir örnekleme alanında optik odaklama ile yapılan sondaj boyunca, çerçevenin sayılabılır alanı içerisinde istenilen değerde bir hata katsayısına ulaşabilmek için yeterli sayıda tanecik sayılmış olur. Bu kadarlık bir çerçeve büyüklüğü, adımlama sayısı ve aralığını hesaplamada kolaylık sağladığı gibi, elde edilen sonucun güvenilir olması için de yeterli bir büyüklüktür (Canan, 1998; Şekil 3).



Şekil 3. Hipokampus alanına rastgele yerleştirilmiş olan tarafsız sayım çerçeveleri ve sayıma dahil edilen işaretli nöronlar gösterilmektedir.

Toplam hücre sayısını hesaplamak için gerekli bir başka parametre alan örnekleme oranıdır. Stereolojik çalışmalar yapılırken sistematik rastgele örnekleme göre seçilen kesitlerde, ilgilenilen bölgenin alanı mikroskopta belli aralıklarla x ve y eksenleri boyunca taranır. Her adım aralığı, sayılamayacak kadar fazla sayıda tanecik içerecektir. Bu nedenle, sayım çerçevesinin boyutları küçük tutulup; sayım için örneklenen parçanın ve onu içeren tek bir adım alanına olan oranını bilinerek, istatistiksel örnekleme mantığı kullanılır. Bu oranı, diğer oranlarla beraber, sonuçta bulunan tanecik sayısı ile çarparak, örnekleme sayısı

arttırıldıkça gerçek değere yaklaşan bir toplam tanecik sayısı elde edilir. Böylece "x, y adımlama alanı" tanımlanmış olur. Çalışmamızda adım alanı $250 \times 250 = 62500 \mu\text{m}^2$ ve tarafsız sayım çerçevesinin alanı $40 \times 40 = 1600 \mu\text{m}^2$ olarak pilot çalışma aşamasında belirlenmiştir. Böylece optik parçalama yöntemine göre toplam hücre sayısını hesaplamada gerekli parametrelerden biri olan, alan örnekleme oranı belirlenmiştir ($A\ddot{O}O = 1600/62500$). Bu çerçeveler sayım alanlarını temsil etmektedirler. Yani her bir adım, alanın sadece bir kısmının sayımı için kullanılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. Analiz için çevrenilmiş hipokampus alanına sistematik olarak rastgele yerleştirilmiş olan tarafsız sayım çerçevelerini göstermektedir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi

Çalışmada gebeliğin 5. ve 15. günleri arasında 10 gün süreyle DS'a maruz bırakılmış yetişkin dişi sıçanlar kullanıldı. Bu amaç için 250-300 gr ağırlığında 12 adet Wistar albino cinsi sıçanla çalışıldı. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda, standart laboratuvar koşullarında tutuldu ve standart yem ile beslendi. Gebeliğin oluşması için dişi sıçanlar erkek sıçanlarla 24 saat çiftleşmeye bırakıldı. Çiftleşmenin ertesi günü vaginal plak gözlenen sıçanlar, gebeliğin sıfırncı günü kabul edildi. Tüm deney protokolü OMÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 11.10.2012 tarihi 2012/52 onayından sonra başlatılmıştır.

3.2. Deney Protokolü

Gebe kaldığı tespit edilen sıçanlar rasgele 4 grup yavru sıçan elde etmek amacıyla ayrı ayrı kafeslere konulup gebelikleri boyunca takip edildiler. Çiftleşmenin 5. günü DS, DS+MEL ve SF gruplarına enjeksiyon işlemine başlandı ve 15. gününe kadar devam edildi. Daha sonra sıçanlar normal yaşam koşullarında yaşatılarak doğumun gerçekleşmesi beklendi.

Doğumun gerçekleştiği gün postnatal sıfırncı gün kabul edildi. Postnatal 3-4 hafta arası yavruların perine mesafelerine bakılarak erkek ve dişi ayrımı yapıldı ve daha sonra farklı kafeslere alındılar (erkek ve dişi ayrımı ise erkek sıçanda perine dişiye oranla daha geniştir bilgisine dayanılarak yapıldı). Çalışma için, doğan erkek yavrular 12 haftalık erişkinlik sürelerini tamamlamalarının ardından yüksek doz anestezi ile perfüzyon işlemine alındı.

3.3. Çalışma Grupları ve Uygulanan İşlemler

Çalışmamızda DS için öldürücü doz (LD) 50 dozu için 90 mg/kg kabul edilip (Hirose et al., 1984). LD 50 dozunun 1/25' i (3,6 mg/kg) kullanılmıştır. Her bir grup için birey sayısı 6 olarak belirlenmiş ve aşağıdaki gruplar oluşturulmuştur.

Kontrol (KONT) Grubu: Hiçbir madde uygulanmadı.

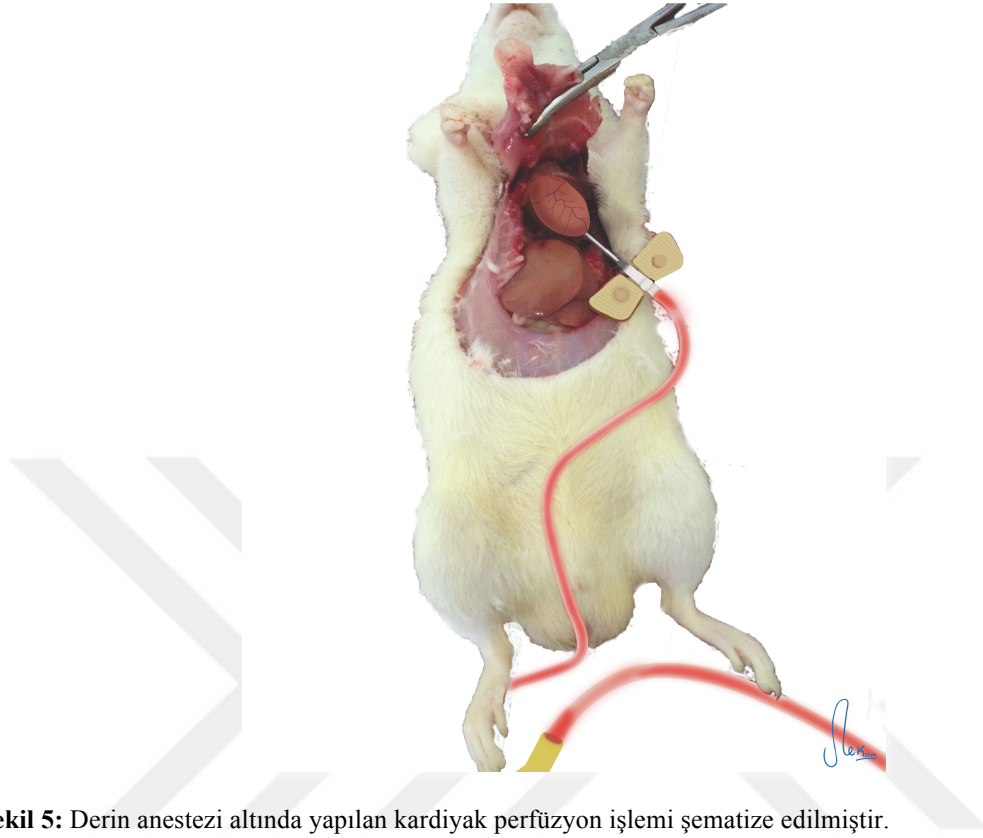
Serum Fizyolojik (SF) Grubu: Gebeliğin 5. ve 15. günleri arası her gün saat 16: 00 ve 17: 00 arası 1 ml/kg i.p. serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldı.

Diklofenak Sodyum (DS) Grubu: Gebeliğin 5. günü ile 15. günü arası 3,6 mg/kg/gün i.p. DS enjeksiyonu yapıldı (Voltaren 75 mg/3 ml, Novartis).

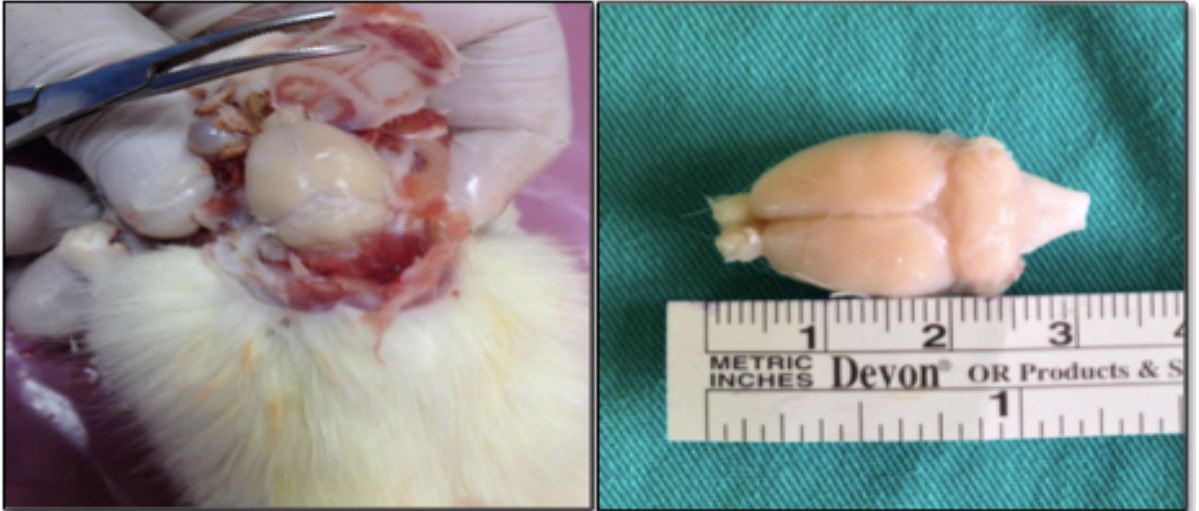
Diklofenak Sodyum+Melatonin (DS+MEL) Grubu: DS grubundaki protokole ek olarak gebeliğin 5. ve 15. günleri arası her gün saat 16: 00 ve 17: 00 arası 50 mg/kg dozunda i.p. melatonin verildi.

3.4. Anestezi ve Kardiyak Perfüzyon

Denekler 12 haftalık erişkinlik sürelerini tamamlamalarının ardından intrakardiyak perfüzyon işlemine tabi tutuldular. Genel anestezi için deneklere 50 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar ampul, Eczacıbası), 10 mg/kg xylazine (Rompun ampul, Bayer) karışımı intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulandı. Ekstremitelerdeki refleksi kaybolana kadar beklendi. Pens ve makas yardımıyla sternumun serbest uç kısmından, yukarı-sağa ve sola doğru ilerleyerek göğüs kafesi açıldı. Kalp çalışır durumdayken kanül yardımıyla sol ventrikül apeksine yakın bir noktadan girildi. Kanülden % 0,9'luk serum fizyolojik verildi. Bu esnada hızlı bir şekilde mikromakas yardımıyla sağ atriyumda küçük bir kesik oluşturularak kanın dışarı akması sağlandı. Sağ atriumdan çıkan kanın rengi berraklaşınca kadar (yaklaşık 1-1,5 dakika) bu işleme devam edildi. Serum fizyolojik ile kan damarlarının lümenleri kandan temizlendikten sonra yine aynı yol kullanılarak yaklaşık 3-4 dakika süreyle (fiksasyon katılığı sağlanıncaya kadar) tamponlanmış % 10'luk nötral formalin verilerek tespit sağlandı (Şekil 5). Perfüzyon işlemi boyunca sıçanlar gözlendi. Formalin fiksasyonunun belirtisi olan ekstremitelerdeki tetanik kasılmalar izlendi. Perfüzyonun bitiminden sonra hayvanların kafatasının deri kısmı uzaklaştırıldı. Beyin ve beyinciğin çıkartılması için kafatası kemikleri kemik makasıyla (guj) dikkatli bir şekilde kırıldı. Beyin ve beyinciğin hasar görmemesine azami derecede dikkat edildi, beyinleri tamamen (beyincik ve diğer beyin bölgeleri ile birlikte) çıkarıldı (Şekil 6). Dokular % 10'luk formol içeren özel şişelere konuldu ve 10 gün tespit solüsyonu içerisinde post fiksasyona tabi tutuldu. Bu arada tespit solüsyonu birkaç kez yenilendi. 10 gün fiksatif içerisinde bırakılan beyinlerin sol ve sağ beyin yarım küreleri birbirinden ayrıldı. Histolojik takip işlemine alındı (Tablo 1). Sağ beyin hemisferi çalışmaya dahil edildi.



Şekil 5: Derin anestezi altında yapılan kardiyak perfüzyon işlemi şematize edilmiştir.



Şekil. 6. Kafatasından beyin çıkarma işlemi

3.5. Histolojik Takip İşlemi

% 10' luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 10 gün bekletilip post-fiksasyona tabi tutulan beyin dokularının ışık mikroskopik takibi yapıldı.

3.5.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Doku takibi Thermo Fisher Scientific marka Shandon Citadel 2000 model doku takip cihazında, otomatik olarak Tablo 1'de belirtilen süreli programla yapıldı.

Tablo 1. Histolojik doku takibi prosedürü

Histolojik Doku Takip Protokolü	
1. Akarsuda yıkama	24 saat
2. Dehidratasyon	
%70'lik Alkol	1 gece
%80'lik Alkol	1 saat
%96'lık Alkol	1 saat (2 değişim)
%100'lük Alkol	1 saat (2 değişim)
3. Şeffaflaştırma	
Ksilol I	20 dakika
Ksilol II	30 dakika
Ksilol III	30 dakika
4. Parafin	2 saat (60°C'lik etüvde)
Parafin II	2 saat
5. Doku bloklama	

3.5.2. Kesit Alma İşlemi

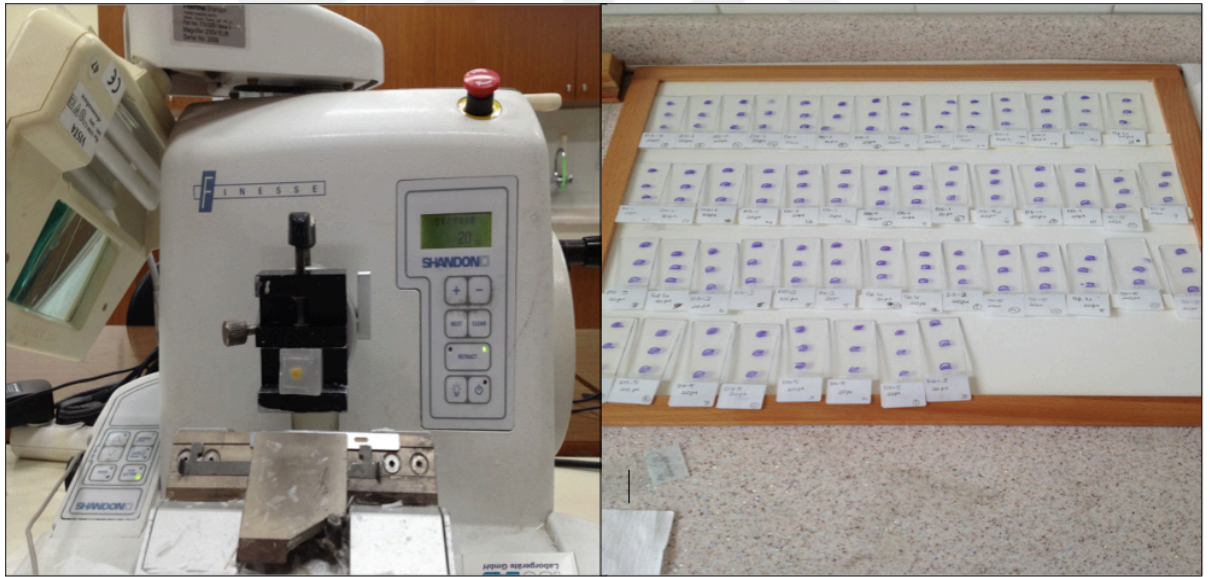
Takibi yapılan dokular bloklandı. Gruplara uygun etiketler bloklara yerleştirildi. Stereolojik incelemeler için elde edilen bloklardan mikrotom aracılığıyla (Leica RM 2125RT, Germany) 20 mikron kalınlığında (1/6 örnekleme), histopatolojik incelemeler için ise 7 mikron kalınlığında (1/18 örnekleme) kesitler alındı (Şekil 7). Kalın kesitlerin boyama sırasında lam üzerinden dökülmelerini engellemek için benmari suyuna jelatin katıldı. Alınan kesitlerin suda açılması beklendi ve lam üzerine yerleştirildi. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 59 °C derecede 1 gece bekletildi. Boyama işlemine geçildi.

3.5.3. Krezil Viyolet Boyama İşlemi

100 ml distile suya 0,1 gr krezil viyolet (Merck, Cresyl violet acetate, FN 1107635, Germany) katılarak boya hazırlandı. Boyama işlemine geçilmeden önce boya etüve konuldu ve ısınması sağlandı. Boya homojen dağılması için karıştırıldıktan sonra kesitler boyaya daldırıldı. Boyama işlemi aşağıda verilen prosedüre uygun olarak yapıldı (Tablo 2).

3.5.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 21.0 for Mac (IBM Corporation) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Analiz öncesinde gruplara normalite testi yapıldı. Verilerin homojen dağılım gösterdiği tespit edildi. Grupların karşılaştırılmasında One Way ANOVA (Tukey Post-Hoc Test) testi kullanıldı. Tüm grupların karşılaştırılmasında $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi.



Şekil 7. Mikrotom yardımıyla alınan ve krezil viyolet ile boyanmış beyin kesitleri görülmektedir.

Tablo 2. Krezil viyolet boyama prosedürü

Krezil Viyolet Boyama Protokolü	
Aşamalar	Süre
1. Ksilol	4x30 dakika
2. %100 alkol	2x10 dakika
3.%96 alkol	10 dakika
4.%80 alkol	10 dakika
5.Distile su	10 dakika
6. Krezil Viyolet	4 dakika
7.Distile su	2 dakika
8. %70 alkol	5 dakika
9.%80 alkol	5 dakika
10.%96 alkol	5 dakika
11.Ayrıştırma solüsyonu (200ml %96 alkol + 5 damla glasial asetik asit)	Daldır çıkar
12.%96 alkol	5 dakika
13.%100 alkol	10 dakika
14.Ksilol	3x20 dakika
15.Entallan ile kapama	

4. BULGULAR

4.1. Stereolojik Bulgular

Çalışmamızda kullanılan tüm gruplardaki deneklerden elde edilen kesitlerde hipokampus görüntüleri üzerinde, tarafsız stereolojik bir yöntem olan optik parçalama metodu kullanılarak CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri ile tüm hipokampus alanında ayrı ayrı “ortalama nöron sayısı” hesaplaması yapılmıştır. Sözü edilen stereolojik değerlendirme sonucunda elde edilen bulgular aşağıda belirtildiği gibidir.

4.1.1. CA1 Alanında Elde Edilen Bulgular

CA1 alanında ortalama nöron sayısı değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular (Ortalama \pm SEM) ve değişim katsayıları (DK) aşağıda sunulmuştur (Tablo 3; Şekil 8).

Tablo 3. Bütün gruplara ait CA1 bölgesinde yer alan ortalama nöron sayısı, (OSH; Ortalama standart hata) ve değişim katsayısı değerleri

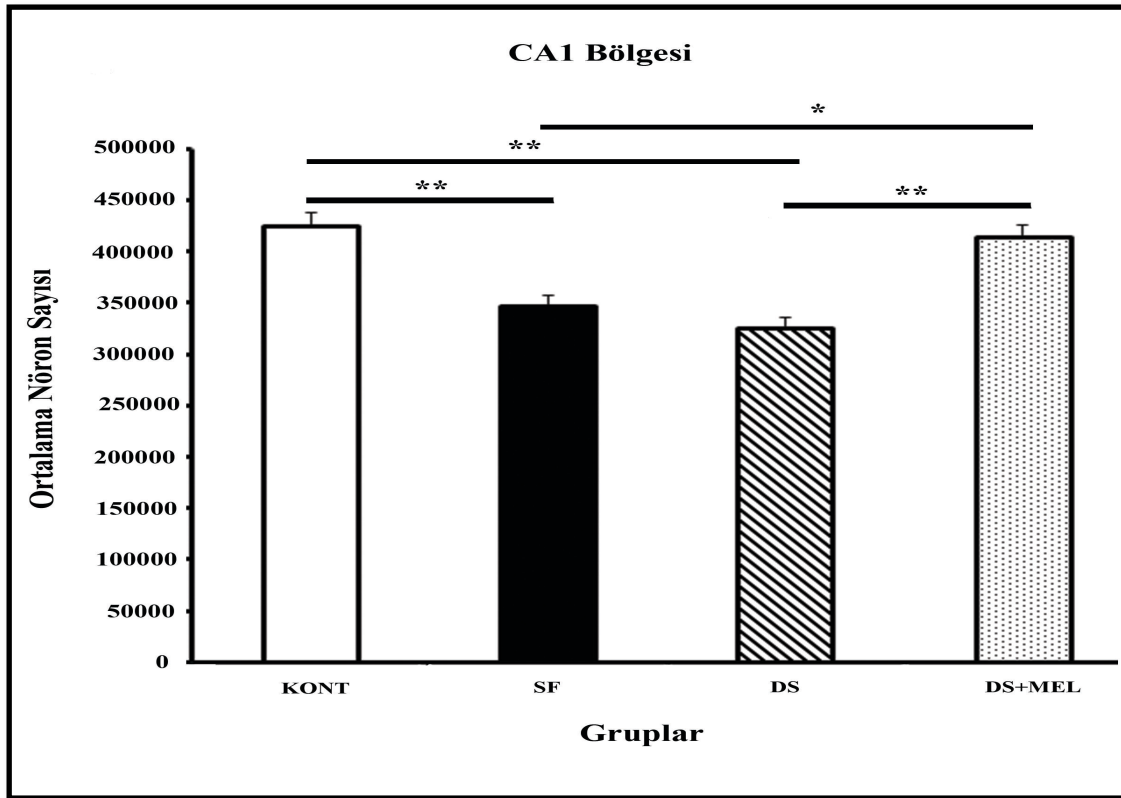
Gruplar	(Ortalama \pm SEM)	DK
KONT	423992 \pm 13568	0.04
SF	346336 \pm 10443	0.05
DS	325540 \pm 10120	0.04
DS+MEL	413662 \pm 12608	0.05

CA1 Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının Gruplara Göre Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre aynı gebelik döneminde DS uygulaması yapılan grupta DS+MEL uygulaması yapılan grupların hipokampus CA1 bölgesine ait ortalama piramidal nöron sayıları birbiriyle karşılaştırıldı. Ek olarak KONT, SF, DS, DS+MEL gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Buna göre; KONT ile DS grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,01$).

DS ile DS+MEL grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,01$). KONT ile DS+MEL arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) fakat SF grubu ile iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi ($p<0,01$).

Bu sonuçlara ek olarak; DS ile SF grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (Şekil 8).



Şekil 8. Aynı gebelik dönemlerinde SF, DS ve DS+MEL uygulanan gruplar ile KONT grubuna ait CA1 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir.

4.1.2 CA2 Alanında Elde Edilen Bulgular

CA2 alanında ortalama nöron sayısı değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular (Ortalama \pm SEM) ve değişim katsayıları (DK) aşağıda sunulmuştur (Tablo 4; Şekil 9).

Tablo 4. Bütün gruplara ait CA2 bölgesinde yer alan ortalama nöron sayısı, (OSH; Ortalama standart hata) ve değişim katsayısı değerleri

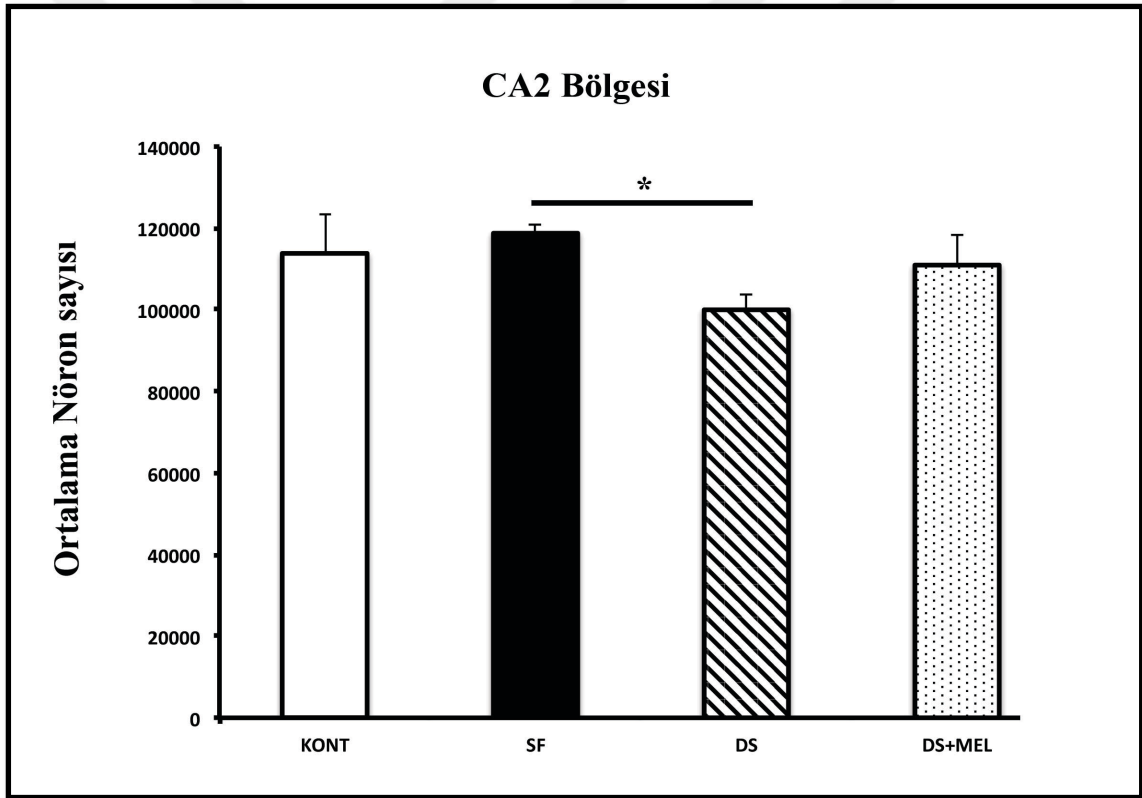
Gruplar	(Ortalama \pm SEM)	DK
KONT	113731 \pm 5557	0.05
SF	118761 \pm 4859	0.05
DS	94617 \pm 4051	0.07
DS+MEL	110948 \pm 3420	0.04

CA2 Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının Gruplara Göre Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre aynı gebelik döneminde DS uygulaması yapılan grupta DS+MEL uygulaması yapılan grupların hipokampus CA2 bölgesine ait ortalama piramidal nöron sayıları birbiriyle karşılaştırıldı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan gruplardan ve DS, DS+MEL gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Buna göre; KONT grubu ile SF, DS ve DS+MEL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p>0,05$).

SF ve DS grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,01$). SF grubu ile DS+MEL grubu arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$).

DS ve DS+MEL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$).



Şekil 9. Aynı gebelik dönemlerinde SF, DS ve DS+MEL uygulanan gruplar ile KONT grubuna ait CA2 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir.

4.1.3. CA3 Alanında Elde Edilen Bulgular

CA3 alanında ortalama nöron sayısı değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular (Ortalama \pm SEM) ve değişim katsayıları (DK) aşağıda sunulmuştur (Tablo 5; Şekil 10).

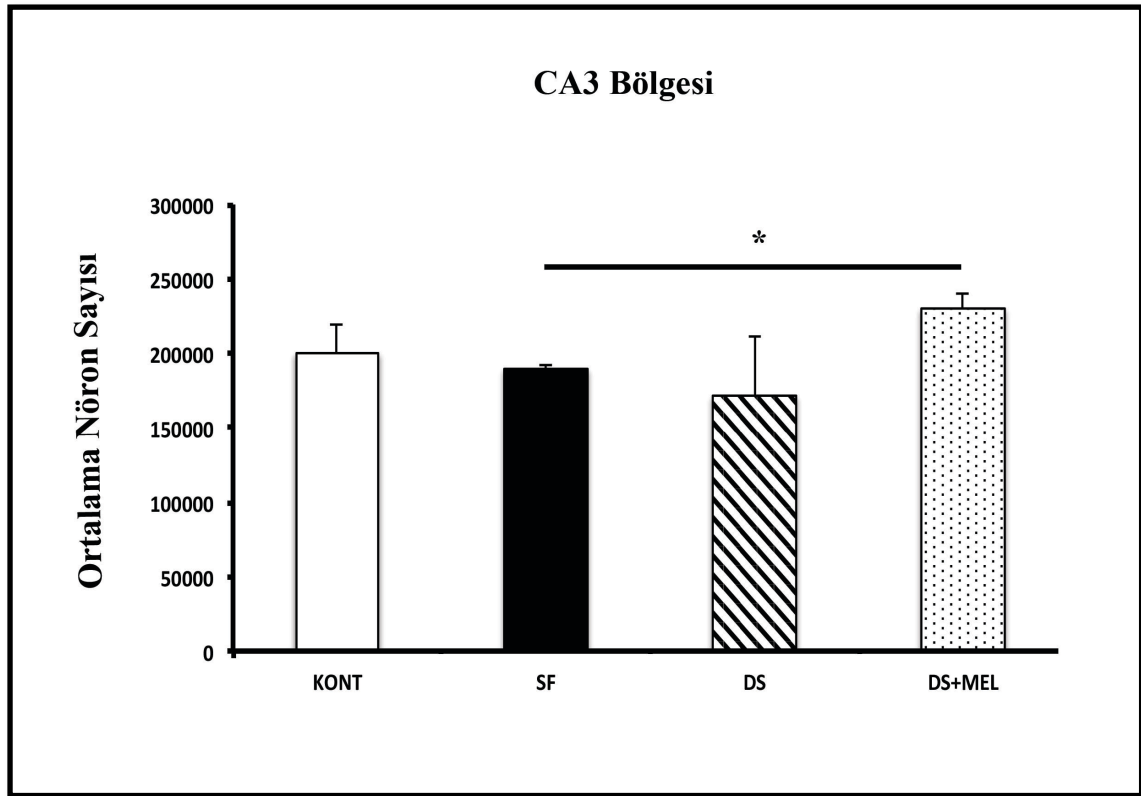
Tablo 5. Bütün gruplara ait CA3 bölgesinde yer alan ortalama nöron sayısı, (OSH; Ortalama standart hata) ve değişim katsayısı değerleri

Gruplar	(Ortalama ± SEM)	DK
KONT	200082 ±3166	0.06
SF	169543 ±2829	0.04
DS	171536 ±4892	0.06
DS+MEL	211143±3522	0.03

CA3 Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının Gruplara Göre Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre aynı gebelik döneminde DS uygulaması yapılan grupla DS ve MEL uygulaması yapılan grupların hipokampus CA3 bölgesine ait ortalama piramidal nöron sayıları birbiriyle karşılaştırıldı. Ayrıca KONT ve SF uygulaması yapılan gruplardan ve DS, DS+MEL gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Buna göre; KONT grubu ile karşılaştırılan gruplardan SF, DS ve DS+MEL grupları arasında anlamlı bir farkın olmadığı ($p>0,05$), SF ile DS arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$), SF grubu ile DS+MEL grubu arasında anlamlı bir farkın olduğu bulundu ($p<0,01$).

Bu sonuçlara ek olarak; DS ile DS+MEL arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$).



Şekil 10. Aynı gebelik dönemlerinde SF, DS ve DS+MEL uygulanan gruplar ile KONT grubuna ait CA3 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir.

4.2.4. Tüm Hipokampustaki Nöron Sayısına İlişkin Elde Edilen Bulgular

Tüm hipokampustaki CA alanında ortalama nöron sayısı değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular (Ortalama \pm SEM) ve değişim katsayıları (DK) aşağıda sunulmuştur (Tablo 6; Şekil 11).

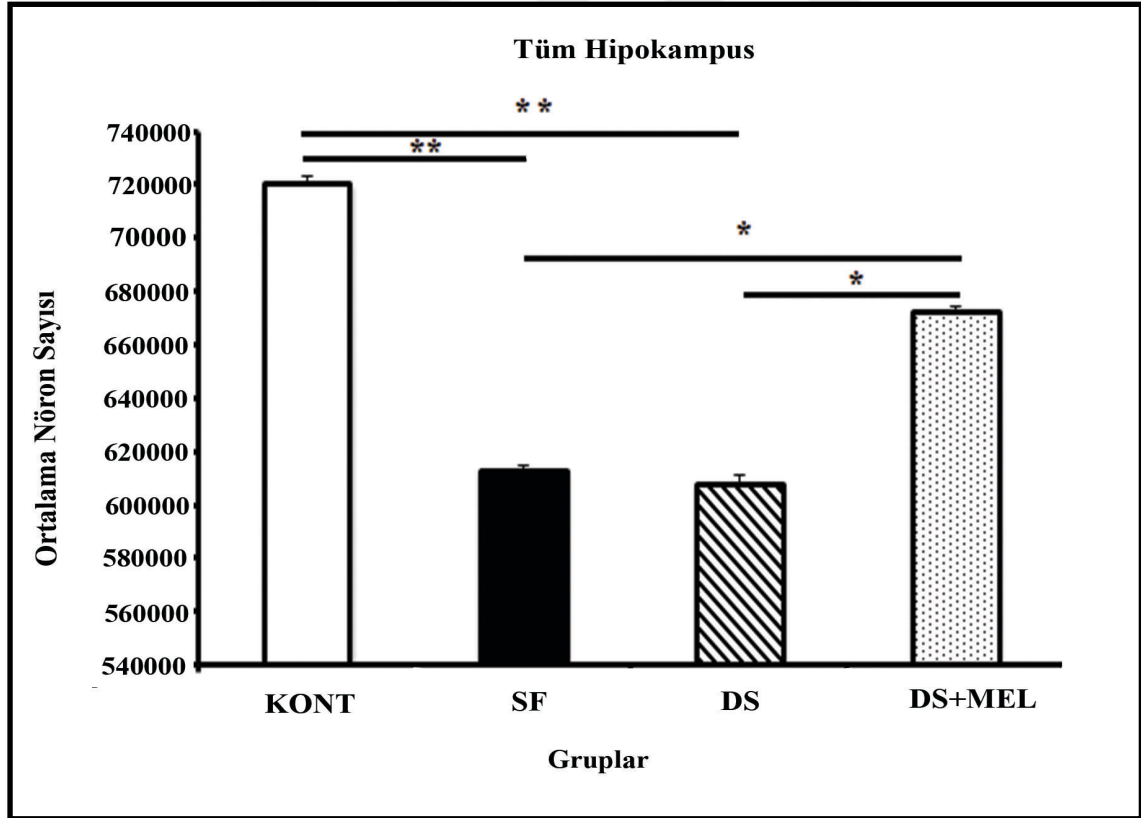
Tablo 6. Bütün gruplara ait tüm hipokampus alanında yer alan ortalama nöron sayısı, (OSH; Ortalama standart hata) ve değişim katsayısı değerleri

Gruplar	(Ortalama \pm SEM)	DK
KONT	720996 \pm 20934	0.07
SF	612947 \pm 2159	0.04
DS	608509 \pm 2921	0.03
DS+MEL	672662 \pm 1799	0.07

Tüm Hipokampusta Hesaplanan Nöron Sayısının Gruplara Göre Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre aynı gebelik döneminde DS uygulaması yapılan grupta DS ve MEL uygulaması yapılan grupların tüm hipokampustaki piramidal nöron sayıları birbiriyle karşılaştırıldı. Ayrıca sağlıklı kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan gruplardan ve söz konusu DS, DS+MEL gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Buna göre; KONT ile SF grupları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0,01$), KONT ile DS grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,01$). KONT ile DS+MEL grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$). Bunun yanı sıra, SF ile DS+MEL grupları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0,01$), DS ile DS+MEL grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,01$).

Bu sonuçlara ek olarak; DS ile SF grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$) (Şekil 11).



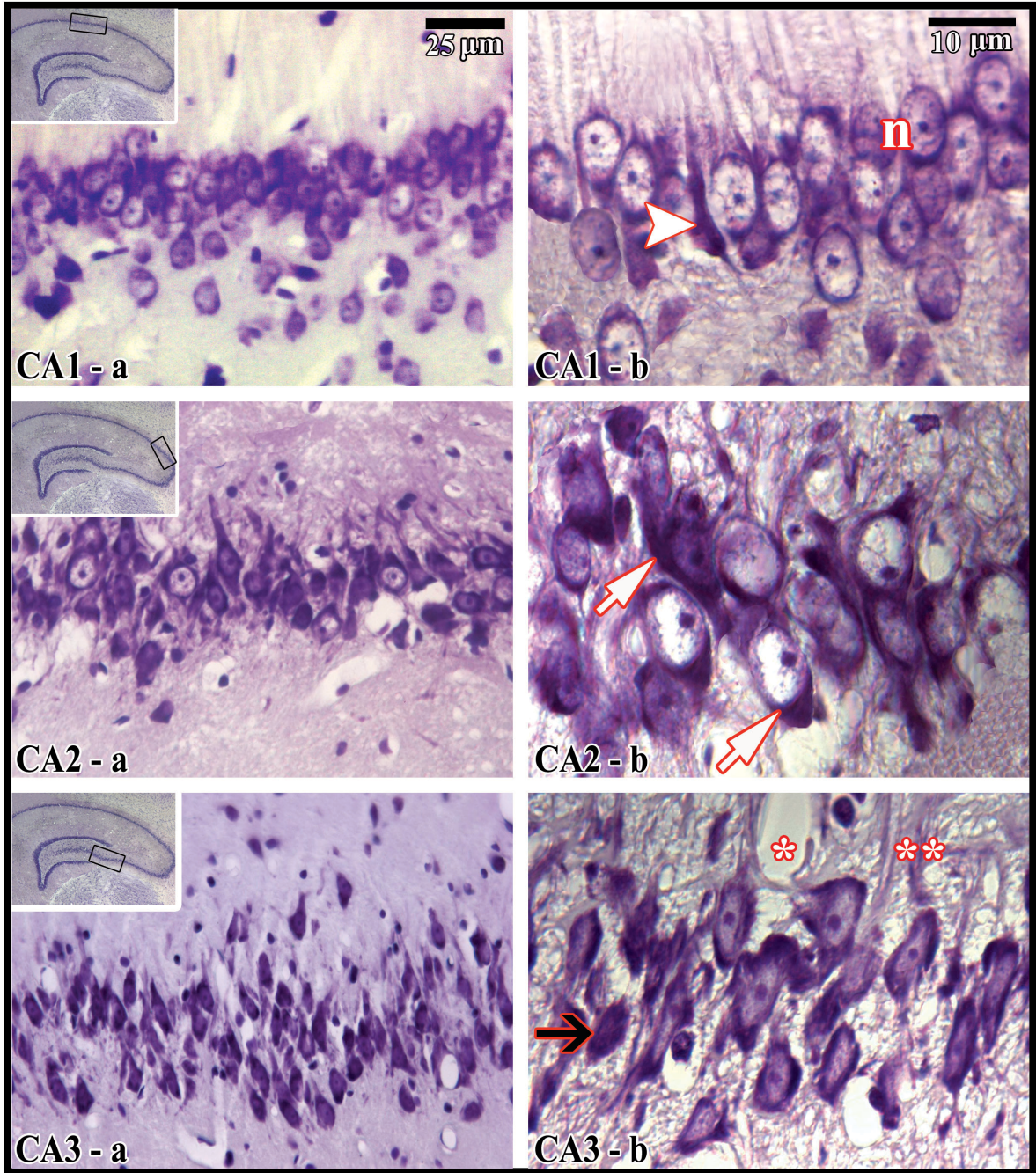
Şekil 11. Aynı gebelik dönemlerinde uygulanan DS, DS+MEL, SF gruplarına ait tüm hipokampusta hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir.

4.3. Işık Mikroskopik Bulgular

4.3.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde, hipokampusun genel yapısı ve nöronlar normal görünümdeydi. Işık mikroskopik düzeyde yapılan incelemede nöronların perikaryonlarının sınırları düzgün; piramidal şekilli olarak izlendi. Ayrıca bu hücrelerin çekirdekleri ökromatik ve belirgin çekirdekçikliydi (Şekil 12). Nöronların uzantıları olan dendrit ve aksonları normal genişlikteydi. Kontrol grubuna ait deneklerin hipokampus kesitlerinde piramidal nöronların 3-4 sıra halinde düzgün bir dizilim gösterirken; nöroglia hücrelerinin de normal görünümde oldukları izlendi (Şekil 12).



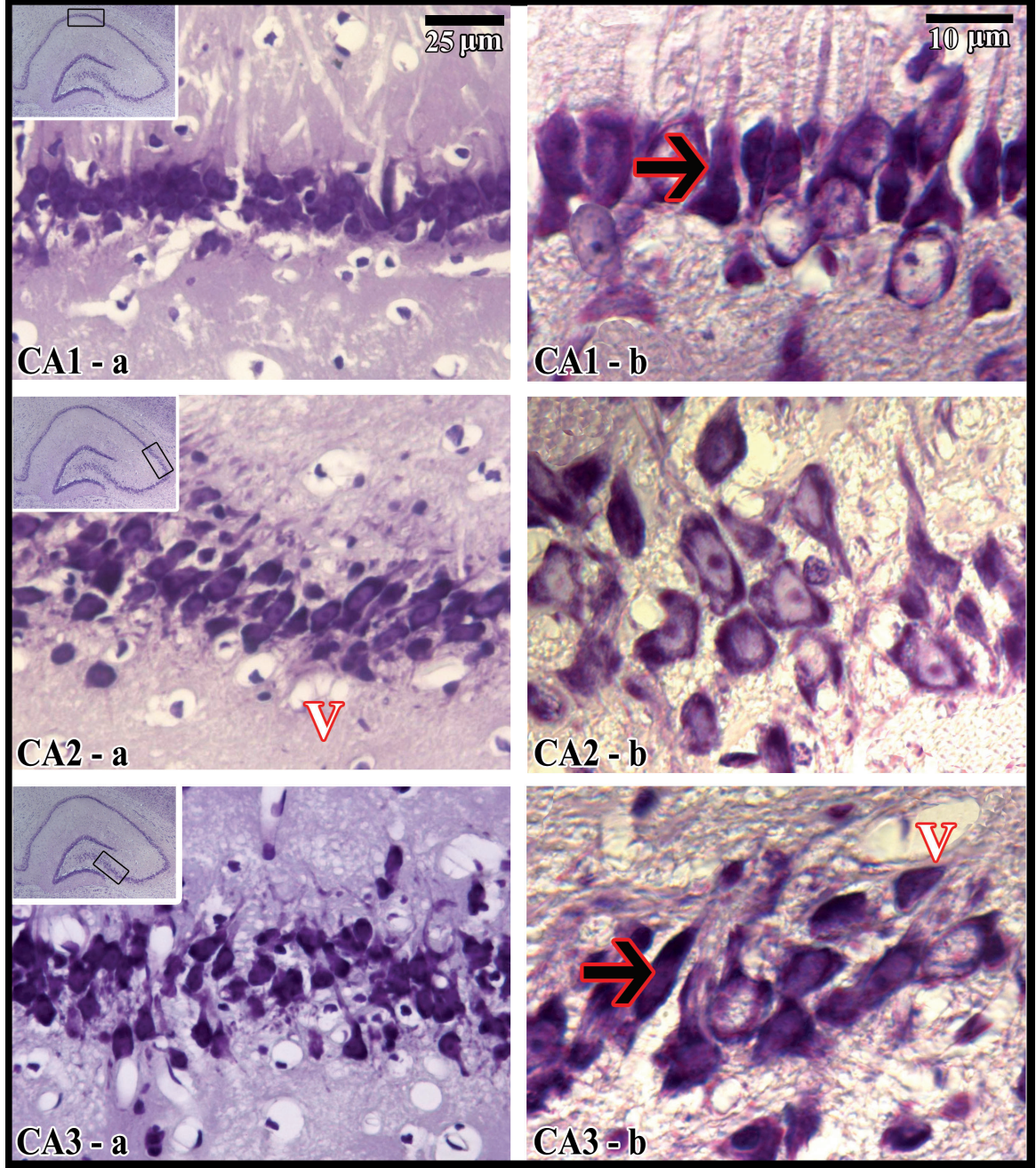


Şekil 12. Kontrol grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. **n**; sağlıklı nöron, **siyah ok**; heterokromatik çekirdekli koyu boyanmış sitoplazmalı nöronlar, **beyaz ok**; hücre ayrıntıları seçilemeyen nöron, **beyaz yıldız**; hücre sınırları düzensiz nöronlar, **beyaz okbaşı**; çekirdek ve sitoplazması ayırd edilemeyen soluk boyanmış nöronlar. Sol taraftaki görüntüler CA1-CA2-CA3 bölgelerinin x40 büyütmedeki görüntüleri, sağ taraftaki görüntüler aynı bölgelerin x100 lük büyütmedeki görüntüleri gösterilmektedir. Küçük resimlerdeki çerçeveli alan ile belirtilen kısımda sırası ile CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri izlenmektedir (x5). Boya: Krezil viyolet.

4.3.2. Serum Fizyolojik Grubuna Ait Bulgular

Gebelik boyunca serum fizyolojik uygulanan SF grubuna ait kesitlerde, nöronların kontrol grubuna kıyasla az sayıda sağlıklı nöron içerdiği ve daha eozinofil sitoplazmalı oldukları gözlemlendi. Ayrıca bu hücrelerin nöron uzantıları olan dendritler ve aksonları genişlemişti. Yine bu nöronların hem hücre hem de çekirdek sınırları düzensiz görünümdeydi. Ayrıca, bu gruptaki glia hücreleri KONT ve DS+MEL gruplarına kıyasla iri çekirdekli ve belirgin çekirdekçikli olarak izlendi. Bazı alanlarda hasarlı nöronların hücre sınırları tespit edilememekteydi. Ayrıca bu glia hücrelerinin diğer gruplardan farklı olarak nöronlara yakın konumda yer aldığı tespit edildi. Bu gruptaki hipokampusların beyaz cevherinde ise vakuoler yapıların varlığı dikkati çekmekteydi (Şekil 13).

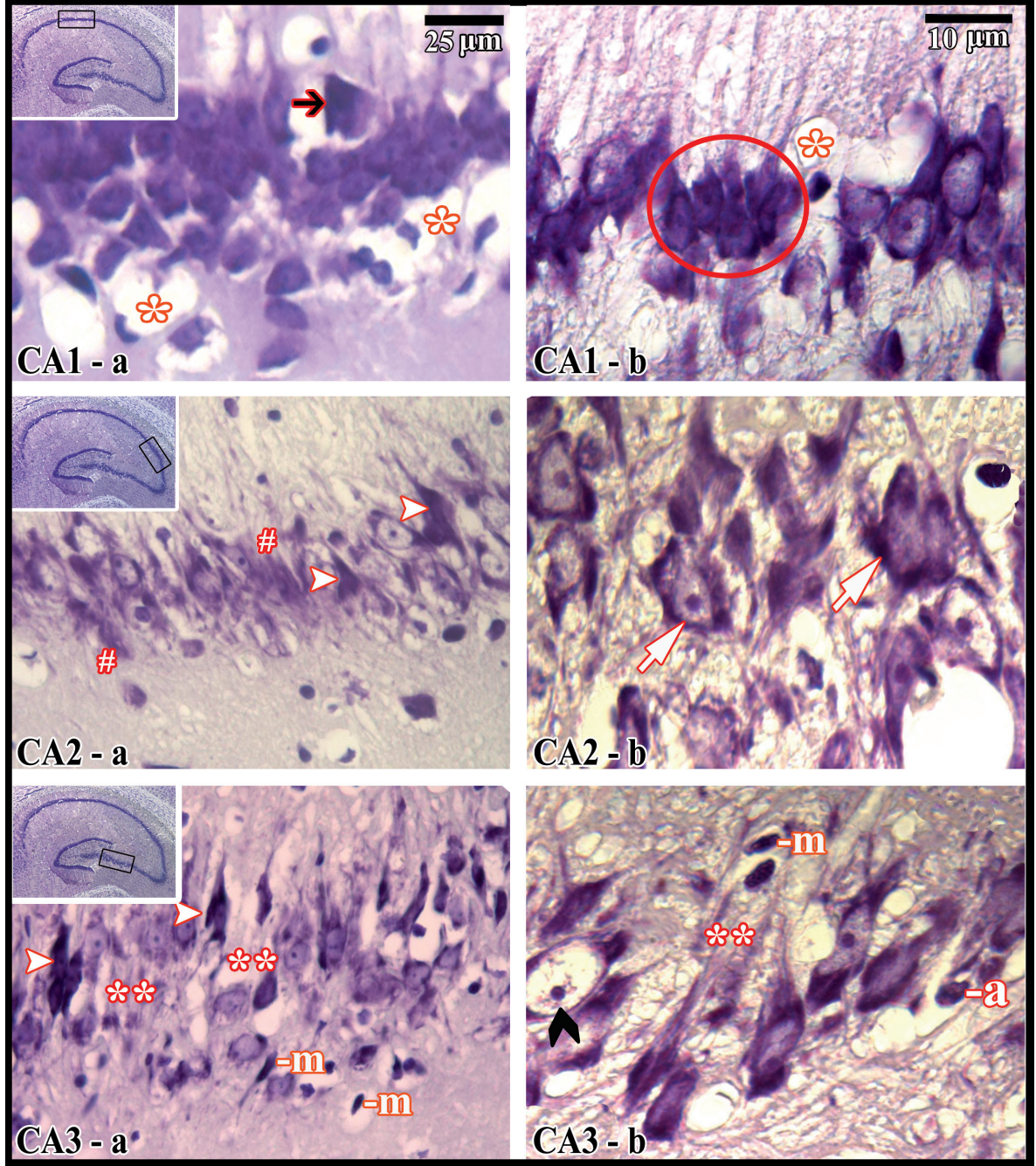




Şekil 13. Serum Fizyolojik grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. **siyah ok;** heterokromatik çekirdekli koyu boyanmış sitoplazmalı nöronlar, **V;** vakuol. Sol taraftaki görüntüler CA1-CA2-CA3 bölgelerinin x40 büyütmedeki görüntüleri, sağ taraftaki görüntüler aynı bölgelerin x100 lük büyütmedeki görüntüleri gösterilmektedir. Küçük resimlerdeki çerçeveli alan ile belirtilen kısımda sırası ile CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri izlenmektedir (x5). Boya: Krezil viyolet.

4.3.3. Diklofenak Sodyum Grubuna Ait Bulgular

Gebelik esnasında gebelik boyunca DS'a maruz bırakılan gruba ait kesitlerde yapılan ışık mikroskopik değerlendirme sonucu, nöronların kontrol grubuna kıyasla az sayıda sağlıklı nöron içerdiği göze çarpmaktaydı (KONT: 720996; DS: 608509). Yer yer kromatini azalmış çekirdeğe, dar ve koyu boyanmış sitoplazmaya sahip nöronlar ile koyu bazofil bir nükleus yanında koyu boyanmış düzensiz sınırlı sitoplazmaya sahip piramidal nöronlar ve piknotik çekirdekli nöronlar ile koyu boyanmış sitoplâzmalı, açılanma gösteren piramidal nöronlara rastlandı (Şekil 14). KONT, SF ve DS+MEL gruplarına kıyasla bu grupta piramidal hücre tabakası sayısının azaldığı görüldü. Ayrıca; koyu boyanmış dar sitoplazmaları ve vakuollü çekirdekleri ile hasarlanmış görünüme sahip nöronlar ve irileşmiş oligodendrosit, mikroglia ve periferel Nissl yoğunlaşması anlamına gelen kromatoliz bulgusuna dejenere olmuş nöronların bir kısmında rastlanmaktaydı. Yine bu gruba ait deneklerin hipokampus kesitlerinde hasarın erken evresindeki nöronların yanı sıra artık tamamen ölü olan anormal şekilli, büzüşmüş, sitoplazma ve çekirdeği ayırt edilemeyen nöron kalıntılarına da rastlandı. Bazı nöronlar ise çekirdekçikleri seçilemeyen ve soluk boyanmış çekirdekleri ve sitoplâzmaları ile ödemli görünümdeydi. Bu yapılar bazı kesitlerde nekrotik alanlar şeklinde göze çarpmaktaydı (Şekil 14).

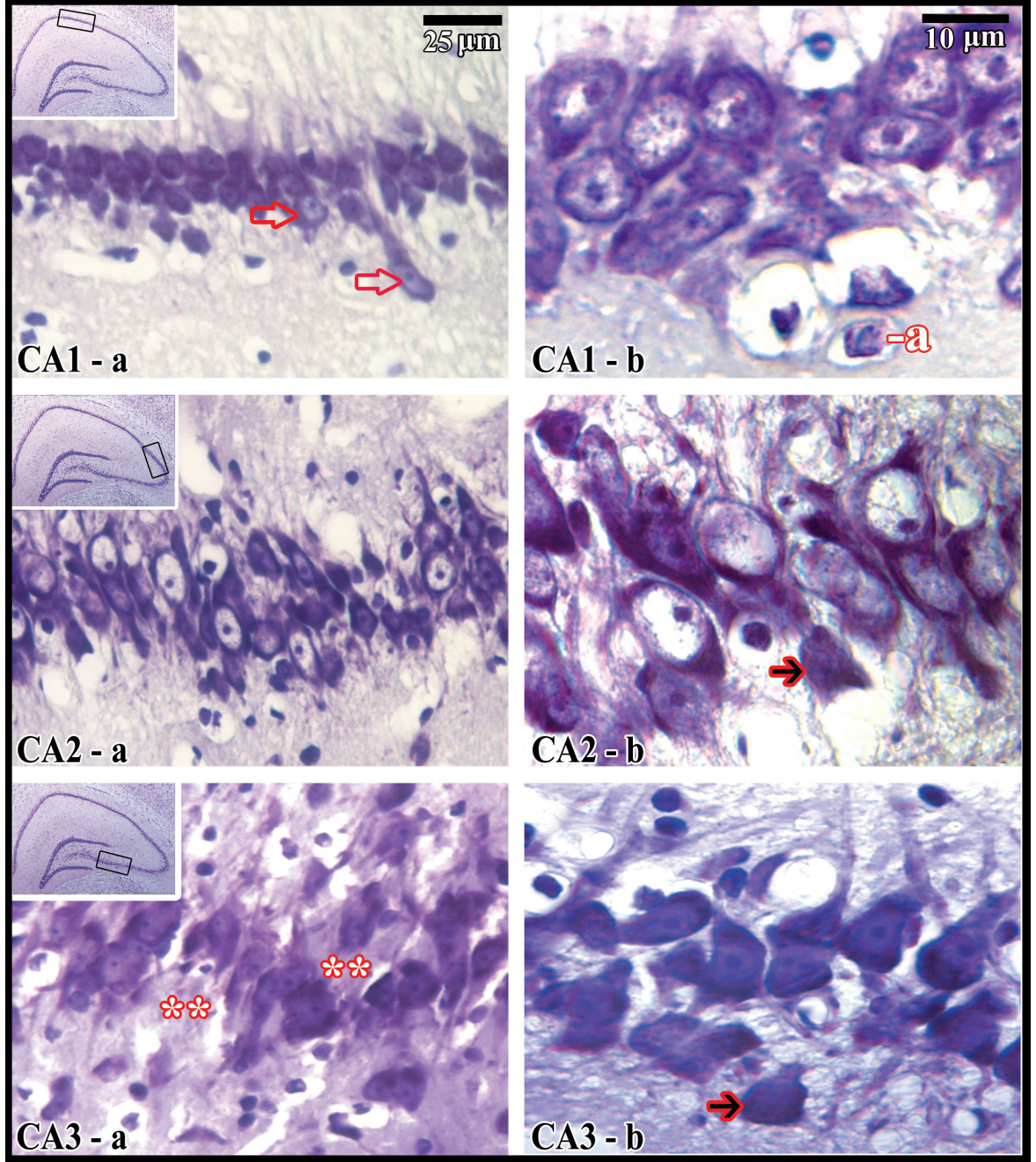


Şekil 14. DS grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. **siyah ok**; heterokromatik çekirdekli koyu boyanmış sitoplazmalı nöronlar, **beyaz dolgulu ok**; hücre ayrıntıları seçilemeyen nöron, **#**; debris, **kırmızı halka**; heterokromatik ve piknotik çekirdekli nöron, **beyaz okbaşı**; kromatini soluk çekirdekli nöron, **beyaz yıldız**; hücre sınırları düzenli yapısını kaybetmiş nöronlar, **siyah okbaşı**; çekirdek ve sitoplazması ayırt edilemeyen soluk boyanmış nöronlar, **a**; astrosit, **m**; mikroglia hücresi. CA1 bölgesinde ileri derecede yoğunlaşmış sitoplazmaya sahip hücrelerin çekirdeklerinin ayırt edilemediği gözlenmektedir. Boya: Krezil viyolel

4.3.4. Diklofenak Sodyum+Melatonin Grubuna Ait Bulgular

DS+MEL grubuna ait kesitlerde, hipokampusun genel yapısı ve nöronlar normal görünümdeydi. Işık mikroskopik düzeyde yapılan incelemede nöronların perikaryonlarının sınırları düzgün; piramidal şekilli olarak izlendi. Ayrıca bu hücrelerin çekirdekleri ökromatik ve belirgin çekirdekçikliydi. Nöronların uzantıları olan dendrit ve aksonları normal genişlikteydi (Şekil 15). DS maruziyeti ile birlikte melatonin uygulaması özellikle CA1 bölgesinde belirgin biçimde nöronları korumaktaydı, buradaki nöronların sitoplazması ve çekirdeklerinin kolaylıkla gözlenebilmesi melatoninin koruyucu etkisinden kaynaklanabilir.





Şekil 15. DS+MEL grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. **İçi boş ok**; Ökromatik çekirdekli sağlıklı nöron, **siyah ok**; heterokromatik çekirdekli koyu boyanmış sitoplazmalı nöronlar, **beyaz yıldız**; hücre sınırları düzenli yapısını kaybetmiş nöronlar, **a**; astrosit.. Boya: Krezil viyolet.

4. TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmada elde edilen stereolojik bulgulara göre prenatal dönemde 3.6 mg/kg dozda DS uygulanan sıçanlarda postnatal 12. hafta sonunda CA1 bölgesinde ve tüm hipokampustaki ortalama piramidal nöron sayısı KONT ve SF grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalmıştır ($p<0,01$). Ayrıca CA1 bölgesinde ve tüm hipokampusteki ortalama piramidal nöron sayısı bakımından KONT grup ile MEL uygulaması yapılmış DS+MEL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Ağrı kişinin yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen bir durumdur. Akut veya kronik ağrılı, enflamasyonlu, ateşli durumlara neden olan mediyatörler prostaglandin ve lökotrienler gibi maddelerdir (Gökçimen ve Malas, 2003). Bu maddeler normal durumlarda hücre membranında olan, patolojik durumlarda ise düzeyi artan mediyatörlerdir. Ağrılı, ateşli ve enflamasyonlu durumlarda antiinflamatuvar ve analjezik etkilerinden dolayı en sık reçete edilen ilaçlar NSAİİ'lerdir (Kudo ve ark., 2003; Chang ve ark., 2005; Güven, 2006). NSAİİ etki mekanizması siklooksijenaz enzim inhibisyonu yoluyla prostaglandin sentezini inhibe etme prensibine dayalıdır. COX enziminin tanımlanan iki formu vardır. COX-1 tüm vücut dokularında (barsak, böbrek ve trombositler dahil) yapısal olarak mevcut olan bir enzimdir. COX-2 beyin ve kısmen böbrek hariç diğer dokularda çok az bulunur. COX-2'ye özellikle inflamasyonlu dokularda rastlanır (Konturek ve ark., 2005).

Merkezi sinir sisteminde nöron dejenerasyonunda, beyin tümörlerinde veya yaşlanmayla COX- 2 indüklenir ve sentezi artar (Kenneth, 2008; Vardeh ve ark., 2009). Kullanılmakta olan NSAİİ'lerin tümü COX-1 veya COX-2'yi beraber inhibe eder. Bu nedenle NSAİİ'ler, antiinflamatuvar ve analjezik bileşikler olmalarına rağmen, kimi zaman hayatı tehdit edebilecek kadar ciddi yan etkilere sahiptirler (Beck ve ark., 2003; Dişel, 2005).

NSAİİ'lerin özellikle gebelik süresince kullanımına çok dikkat edilmelidir. Yapılan bir çalışmada prenatal dönemde yüksek dozda uygulanmış ibuprofen ve tolmetinin annede toksik etki yaptığı, intrauterin gelişimi engellediği ve gelişimsel varyasyonlara neden olduğu bulunmuştur (Burdan, 2004). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda hamilelikte düşük riskini artırdığını, ölü doğumların olduğu ve yavru sayısında azalmaların olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Li, 2003; Elibol, 2014).

NSAİİ'lerin toksik etkilerine yönelik yapılan bu çalışmaların sonuçlarıyla paralel olarak, NSAİ grubundan bir ilaç olan DS'unda benzer toksik etkileri gösterilmiştir.

Yapılan bir çok çalışmada DS'un çeşiti doku ve organlarda toksisiteye ve

anormaliye neden olduğu gösterilmiştir (Gökçimen ve ark., 2007; Canan ve ark., 2008; Ozyurt ve ark., 2011; Ekici ve ark., 2012; Ayrancı ve ark., 2013; Kaplan ve ark., 2013).

Odacı ve ark. (2001)'de yaptıkları bir çalışmada postnatal 20. haftada, sıçan yavrularının eklem kırkırdaklarından hazırlanan preparatlar alsıyan mavisi ile boyandığında 1mg/kg dozda i.m. uygulanan DS'un asidik proteoglikanların sentezini inhibe ederek fetal dönemde kırkırdığın gelişimini olumsuz yönde etkilediğini ve postnatal dönemde de devam ettiğini göstermişlerdir. Elde edilen bu veriler bizim çalışmamızdaki toksik etkiyle örtüşmektedir.

Diklofenak sodyum tedavisinin sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan akut subduralhematom modelinde (ASDH), hipokampus üzerine olası etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, tedavi grubundaki deneklere ait hipokampus örneklerindeki CA1, CA2, CA3 bölgelerinin ortalama nöron sayıları ve hipokampustaki toplam nöron sayılarında, ilaç kullanılmayanlara göre azalma olduğu gözlenmiştir (Türkmen, 2013). Çalışmamızdan elde edilen bulgular, Türkmen'in (2013) bulgularıyla örtüşmektedir. Bu derece toksik etki gösterebilen bir ilacın prenatal dönemde uygulanmasına oldukça dikkat edilmelidir. Prenatal uygulanan DS'un postnatal dönemdeki olumsuz etkileri birçok çalışmada bildirilmiştir (Ozyurt ve ark., 2011; Türkmen, 2013; Ayrancı ve ark., 2013; Kaplan ve ark., 2013).

Prenatal dönemde DS uygulanması sonucu 20 haftalık sıçanların omuriliklerindeki nöron sayılarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir (Özyurt ve ark., 2011). Yapılan diğeri bir araştırmada DS'nin beyincikteki Purkinje hücresi sayısına etkisi incelenmiş ve ilaç uygulanan grupta hücre sayısında azalma olduğu görülmüştür (Rağbetli, 2007). Bu çalışmalarda dokular farklı olsa da DS'un MSS'de yaptığı toksik etki bakımından çalışmamız daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Literatürde prenatal dönemde intraperitoneal DS (1mg/kg/gün) uygulanmış 4 haftalık ve 20 haftalık yavru sıçanların hipokampusları optik disektör yöntemi ile stereolojik kurallara uygun olarak CA bölgesindeki piramidal hücrelerin ve dentat girustaki granüler hücrelerin sayı hesaplamaları yapılmıştır; Dört haftalık kontrol erkek sıçan grubu ile dört haftalık DS erkek sıçan grubu arasında hücre sayıları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat prenatal dönemde DS'ye maruz kalan 20 haftalık erkek sıçanlardan oluşan gruptaki hayvanların hipokampuslarındaki nöron sayılarında kontrol grubuna oranla DS grubunda azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Gökçimen ve ark., 2007).

Çalışmamızın bulguları Gökçimen ve ark. (2007), 20 haftalık sıçanlardan elde edilen bulgularıyla örtüşmektedir. Çalışmamızda kullanılan hayvanlar 12 haftalık olmalarından dolayı belirteilen araştırmacıların 4 haftalık sayım sonuçları ile karşılaştırma imkanımız bulunmamaktadır.

Odacı ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada, 1mg/kg/gün DS'un 20 haftalık dişi sıçanların Purkinje hücrelerinin sayısını arttırdığını bildirmişlerdir. Elde edilen bulguların bizim sonuçlarımızdan farklı olmasının nedeni, çalışılan dokuların farklı olması ve cinsiyet farkı olabilir.

Başka bir çalışmada hipokampustan elde edilen stereolojik bulgulara göre farklı gebelik dönemi ve farklı ilaç dozlarına ait grupların CA1, CA2 ve CA3 bölgesinde bulunan nöronların sayısı pür kontrol ve SF grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalmıştır (p<0,01) (Elibol, 2014). Bu çalışmalar istatistik sonuçları itibarı ile çalışmamızın bulguları ile örtüşmektedir. Bizim uyguladığımız 3.6 mg/kg/gün DS'un da benzer toksik etki göstermesi sonuçlarımızın Elibol (2014) sonuçlarıyla uyumlu olduğunu göstermektedir. Yapılan tüm bu çalışmalara dayanarak çalışmamızda DS uygulamasıyla ortaya çıkan bu toksik etki beklenen bir sonuçtur.

Daha önce yapılan çalışmalarda serum fizyolojik enjeksiyonunun oluşturduğu prenatal stresin bile postnatal dönemde nöron sayısını azaltıcı yönde bir etkiye yol açabileceği gösterilmiştir (Gökçimen ve ark., 2007). Çalışmamızdaki SF grubundaki nöron sayısında KONT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalma olması bu ifadeyi destekler niteliktedir.

Biyolojik ritmin düzenlenmesi, uyku, mizaç, üreme, tümör büyümesi ve yaşlanma sürecinde etkili bir molekül olan MEL pineal bezden salgılanır. Karanlık ve aydınlık siklusuna bağımlı olarak sentezi artar veya azalır. MEL yağda ve suda eriyerek hücre membranlarından kolaylıkla geçebilir ve hidroksil ve lipid radikallerini uzaklaştırır. Böylelikle hem lipit peroksidasyonunun başlamasını, hem de ilerlemesini önler. Yüksek derecede toksik etkiye sahip olduğu bilinen hidroksil ve peroksil radikallerini güçlü bir şekilde detoksifiye eder. Direkt olarak radikal uzaklaştırıcı özelliğine ek olarak MEL; SOD, GPx gibi endojen antioksidan enzim aktivasyonunu da uyardığı ve beynin GPx düzeyini arttırdığı bildirilmiştir (Reiter ve ark., 1995; Uz ve ark., 1996). Melatonin elektrondan zengin bir moleküldür ve direkt antioksidan özelliği vardır.

Nöronal bilgiler pineal beze norepinefrin ile gelir, MEL ile çıkar. MEL'in nörohormonal görevlerinin yanı sıra güçlü antioksidan ve nöroprotektif etkileri de dikkat

çekmektedir (Pandi-Perumal ve ark., 2006).

Direkt olarak serbest oksijen radikallerini temizleyici, oksidatif stresi azaltıcı, mitokondri fonksiyonlarını geliştirici ve glutatyon homeostasisini tamir edici etkileri, 5-lipooksijenaz gibi lökotrienlerin sentezinde görev alan ve reaktif türlerin zararsız bileşiklere dönüşümünü sağlayan enzimlerin uyarılması antioksidan etkilerine örnektir (Michiels ve ark., 1994; Gitto ve ark., 2011).

MEL'in yukarıda bahsedilen etkilerinin yanında nöroprotektif etkilerine dair de çok sayıda çalışma mevcuttur (Leon ve ark., 2005; Kaplan ve ark., 2011; Aygun ve ark., 2012; Shinozuka ve ark., 2013). MEL, eksojen olarak uygulandığında kan beyin bariyerini kolaylıkla geçer ve beyinde yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Merkezi sinir sistemini etkileyen birçok koşulda sahip olduğu serbest radikal temizleyici ve lipofilik - hidrofilik özelliklerinden dolayı potansiyel bir nöroprotektif etkisi vardır. Bu sayede başta hücre çekirdeği olmak üzere hücre zarı ve organelleri serbest radikal hasarına karşı koruyabilmektedir (Aygun ve ark., 2012).

İlaçların neden olduğu toksik etki dokulardaki reaktif oksijen türleri seviyesinin artışından kaynaklanır ve reaktif oksijen de serbest radikallere okside olabilir (Odaci ve Kaplan, 2009). MEL, antioksidan etkisini başlıca DNA'yı, membran lipitlerini ve hücre içi proteinleri oksidatif hasardan koruyarak göstermektedir (Pandi-Perumal ve ark., 2006; Odaci ve Kaplan, 2009; Kaplan ve ark., 2013). Çalışmamızda uygulanan DS'un göstermiş olduğu toksik etkinin MEL tarafından ortadan kaldırılmış olması bu mekanizmayla açıklanabilir.

Yapılan bir çalışmada MEL uygulamasının yaşlanmayla birlikte organizmada artan radikal hasar düzeyinin azaltılmış olduğu ve nörodejeneratif hasarlara karşı melatoninin etkili olabileceği bildirilmiştir (Aktan, 2013). Yaşlanmanın tanımı olan nöron kaybının MEL ile azaltılmış olması bizim çalışmamızdaki nöroprotektif etkisiyle benzerlik göstermektedir.

MEL'in MSS'de apoptotik hücre ölümünü engellemesine ek olarak, periferel aksotomi sonrası nöron ölümünü de azalttığı bildirilmiştir. Bu etkisini hem aksotomi yapılmış motor nöronları koruyarak hem de arka boynuzdaki hücre kayıplarını azaltarak gerçekleştirdiği öne sürülmektedir (Odaci ve Kaplan, 2009). Sinir hasarı sonrasında eksojen MEL uygulamasının, kollajen birikimini azaltarak ve nöroma oluşumunu engelleyerek akson sayısı ve miyelin kılıf kalınlığına olumlu etki yaptığı gösterilmiştir (Turgut ve Kaplan, 2011). MEL, bu çalışmada yaptığı protektif etki bakımından bizim çalışmamızdaki

bulgularla örtüşmektedir.

Hipokampus üzerine yapılan başka bir çalışmada ise, 900 MHz elektromanyetik alana prenatal dönem boyunca günde 1 saat maruz bırakılan ve bununla birlikte 50 mg/kg/gün MEL enjeksiyonu yapılan grupta yalnızca elektromanyetik alana maruz bırakılan gruba kıyasla hipokampustaki ortalama nöron sayısının anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir (Koç, 2014). MEL'in hipokampus üzerine nöroprotektif etkisi bu çalışmada oldukça net gözlenmektedir ve bizim çalışmamızda MEL uygulanan grupta benzer nöroprotektif etki görülmüştür.

Pinealektomili ratlarda sinir epinöryumunda TGF- β ve bFGF ekspresyonu önemli ölçüde artarken, eksojen MEL uygulamasının bu ekspresyonu azalttığı görülmüştür. Dolayısıyla melatonin, anastomoz bölgesinde kollajen birikimi ve nöroma oluşumunu kontrol ederek sinir rejenerasyonunda olumlu etki yapmaktadır (Odacı ve Kaplan, 2009). Yapılan bu çalışmadaki rejeneratif bulgulara benzer olarak bizim çalışmamızdaki DS+MEL grubunda da rejenerasyon alanları mevcuttu.

Çalışmamızda DS grubuna kıyasla; DS ile birlikte MEL uygulanması sonucunda deneklerin hipokampusundaki nöron artışı histolojik ve stereolojik yöntemlerle gösterilmiş olup MEL'in nöroprotektif etkisi açıkça gözlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Bu çalışmada, prenatal dönemde uygulanan DS'un olası nörodejenaratif zararlarına karşı MEL hormonunun nöropotektif etkileri tarafsız ve etkin değerlendirme yöntemlerinden olan stereolojik sayım metotları kullanılarak araştırıldı.
- 2- SF enjeksiyonu yapılan grupla KONT grubu kıyaslandığında piramidal nöron sayısında anlamlı derecede azalma gözlenmiştir ($p<0.01$). Prenatal dönemde SF enjeksiyonunun yarattığı stres hamilelik döneminde yaşanan fizyolojik stresle bağdaştırılabilir ve doğacak yavrular için zararlı olduğu söylenebilir.
- 3- Gebeliğin 5-10 gün arasında 3.6 mg/kg/gün DS uygulanan grup (DS), KONT grubuna ait deneklerle kıyaslandığında hipokampustaki ortalama nöron sayısında anlamlı derecede azalma olmuştur ($p<0.01$). Bulgularımızdan elde edilen sonuca göre, gebelik döneminde DS kullanımında oldukça dikkatli olunması gerekliliği söylenebilir.
- 4-DS+MEL grubuna ait deneklere 10 gün boyunca DS (3.6 mg/kg/gün) ve MEL (50 mg/kg/gün) uygulandığında; MEL nöropotektif etkisinden dolayı CA1 bölgesindeki ve tüm hipokampüsteki ortalama piramidal nöron sayıları DS grubundakilerine göre anlamlı derecede artmıştır. MEL uygulamasıyla nöron koruyucu katkı sağlanabilir.
- 5- Sonuç olarak çalışmamızda prenatal dönemde DS'a ya da fizyolojik strese maruz kalınmasıyla ortaya çıkan nöronal hasarın eksojen MEL uygulaması yapılarak ortadan kaldırılabileceğini veya azaltılabileceğini düşünmekteyiz.

Belirtilen ifadeler ve bulguların ışığında; gebelikte DS'un hekim kontrolü altında kullanılması ve hekimler tarafından daha dikkatli bir şekilde reçete edilmesi hastalar ve gelecek nesiller adına oldukça önemli olmakla beraber kullanılan DS'un meydana getirdiği nöro-toksik etkilerin MEL uygulamasıyla ortadan kaldırılabileceği görülmektedir.

Sunulan bu çalışma, kullanılan yöntemlerin geçerliliği ve etkinliği bakımından, MEL uygulamasının sinir hücrelerinin yenilenmesi ve korunmasında tedavi niteliğinde kullanılabileceği önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Acuna CD, Reiter RJ, Menendez PA, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res.* 1994; 16: 100-112.
- Alves D, Duarte I. Involvement of ATP-sensitive K channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *Eur J Pharmacol.* 2002;444:47-52.
- Amaral DG, Insausti R. Hippocampal formation. In: Paxinos D Editors. *The human nervous system.* 2nd Edition. Academic Press, Inc. San Diego, California. 1990.
- Andreasson KI, Savonenko A, Vidensky S, Goellner JJ, Zhang Y, Shaffer A, Kaufmann WE, Worley PF, Isakson P, Markowska AL. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J. Neurosci.* 2001; 21: 8198–8209.
- Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CJ, Plum F, Smith LH. *Andreoli and carpenter's Cecil essentials of medicine.* Mıstık S editör, 7. Baskı, İstanbul, Yüce Yayınları, 2008; 1031-1164.
- Arıncı K, Elhan A. *Anatomi.* 3. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001;318-393.
- Aronoff DM, Neilson EG. Antipyretics: Mechanisms of action and clinical use in fever suppression. *Am. J. Med.* 2001; 111: 304–315. doi:10.1016/S0002-9343(01)00834-8.
- Aygun D, Kaplan S, Odacı E, Onger ME, Altunkaynak ME. Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review of melatonin and diclofenac sodium association. *Histol Histopathol.* 2012; 27: 417-36.
- Ayrancı E, Altunkaynak BZ, Aktaş A, Rağbetli MÇ, Kaplan S. Prenatal exposure of diclofenac sodium affects morphology but not axon number of the median nerve of rats. *Folia Neuropathol.* 2013; 51:76-86.
- Barr ML, Klernam JA. *The human nervous system.* 5th edition. Philadelphia: JB Lippincott. Comp. 1988; 266-269.

- Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U. Influence of diclofenac (group of nonsteroidal antiinflammatory drugs) on fracture healing. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 2003; 123, 327-332.
- Bektaşlı M. Beyin ve kafa tabanı ışınlamalarında radyasyona toleransı düşük olan hipokampusun aldığı dozların araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Tıbbi Radyofizik Programı, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- Berry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous System. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ Editors. *Gray's Anatomy*. 38th edition, New York, Churchill Livingstone, 1995;1124-1126.
- Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1995; 355: 296–315.
- Brodal H. *Neurological Anatomy*. 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford. 1981.
- Brooks PM, Needs C. Antirheumatic medication in pregnancy (letter). *Br J Rheumatology*, 1985; 24(4): 382.
- Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336: 186-195.
- Burmistrov SO, Arutyunyan AV, Stepanov MG, Oparina TI, Prokopenko VM. Effect of chronic inhalation of toluene and dioxane on activity of free radical processes in rat ovaries and brain. *Bull Exp Biol Med*. 2001; 132: 832-836.
- Canan S, Aktas A, Ulkay MB, Colakoglu S, Ragbetli MC, Ayyildiz M, Geuna S, Kaplan S. Prenatal exposure to a non-steroidal anti-inflammatory drug or saline solution impairs sciatic nerve morphology: A stereological and histological study. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2008; 26: 733–738.
- Canan S. 1997. Hipokampusun Yapısı, Fonksiyonları. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Semineri. Samsun. 1997.
- Canan S. Geçici serebral iskemisi sonrası civciv hipokampusunda meydana gelen nöron sayısı değişimlerinin optik fraksiyonlama yöntemi ile araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 1998.

- Carp HJ, Fein A, Nebel L. Effect of diclofenac on implantation and embryonic development in the rat. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1988; 28(3): 273-7.
- Cassina M, De Santis M, Cesari E, Marion van Eijkeren, Matitahu Berkovitch, Giorgio Eleftheriou, Francesco Raffagnato, Elena Di Gianantonio, Maurizio Clementi. First trimester diclofenac exposure and pregnancy outcome. *Repro Toxicol.* 2010;30:401-404.
- Chang JK, Wang GJ, Tsai ST, Ho ML. Non-steroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity, and cell death. *Connect Tissue Res.* 2005;46:200-210.
- Chang HM, Huang YL, Lan CT, Wu U.I., Hu, ME, Youn, SC. Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. *J Pineal Res.* 2008; 44: 172-80.
- Chen TY, Lee MY, Chen HY, Kuo YL, Lin SC, Wu TS, Lee EJ. Melatonin attenuates the postischemic increase in blood-brain barrier permeability and decreases hemorrhagic transformation of tissue-plasminogen activator therapy following ischemic stroke in mice. *J. Pineal Res.* 2006; 40: 242–250.
- Çon N. Optikal fraksiyoner ile civciv görsel projeksiyon alanı olan nükleus rotundus'daki toplam sinir hücresi sayısının hesaplanması. Stereolojik çalışma. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir, 2000 .
- Dawood MY. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and reproduction. *Am J Obstet Gynecol,* 1993; 169(5): 1255-1265.
- Dere F. Nöroanatomi. 3. Baskı, Adana, Nobel Tıp Kitabevleri, 2000; 428.
- Dimar JR, Ante WA, Zhang YP, Glassman SD. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on posterior spinal fusions in the rat. *Spine* 1996; 21(16): 1870-1876.
- Dişel U. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Gç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Meme kanserinde siklooksijenaz-2 ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi Yan Dal Uzmanlık tezi Adana 2005.

- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE, Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998; 12: 1063–1073.
- Ekici F, Keskin İ, Aslan H, Erişgin Z, Altunkaynak BZ, Gökçimen A, Odacı E, Kaplan S. Does prenatal exposure to diclofenac sodium affect the total number of cerebellar granule cells in male juvenile and adult rats? *J Exp Clin Med.* 2012; 29:52-57.
- Elibol E. Prenatal dönemde farklı dozlarda uygulanan diklofenak sodyumun merkezi sinir sistemi gelişimi üzerine toksik etkisinin araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Doktora Tezi, 2014.
- Feng Z, Qin C, Chang Y, Zhang JT. Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 101-109.
- Fiorucci S, Meli R, Bucci M and Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase: A new avenue in anti-inflammatory therapy. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 62: 1433-1438.
- Fitzgerald GA. Prostaglandins and related compounds. In: Wyngarden JB, Smith LH, Bennett JC, editors. *Cecil Textbook of Medicine*, 19 th Ed., Philadelphia, W.B. Saunders, 1993; 1206-1212.
- Forsling ML. Melatonin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.* 2001; 8: 147-153.
- Gitto E, Aversa S, Reiter RJ, Barberi I, Pellegrino S. Update on the use of melatonin in pediatrics. *J Pineal Res.* 2011; 50: 21-8.
- Gol A, Faibisch GM. Hippocampectomy for relief of intractable pain. *Tex Med.* 1966; 62(10): 76–79.
- Gökçimen A ve Malas MA. Nonsteroidal Anti-İnflamatuvar ilaçların gebelikteki toksisiteleri ile ilgili literatürlerin gözden geçirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2003; 10(3): 50-52.
- Gökçimen A, Rağbetli MC, Baş O, Tunc AT, Aslan H, Yazici AC, Kaplan S. Effect of prenatal exposure to an anti-inflammatory drug on neuron number in cornu ammonis and dentate gyrus of the rat hippocampus: A stereological study. *Brain Res.* 2007;

1127:185-192.

Green GA. Understanding NSAIDs: From aspirin to COX-2. Clin. Cornerstone. 2002; 3: 50-59.

Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of sistematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc 1987; 147: 229-263.

Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H editors. 9. Baskı. Nobel Tıp kitabevi, İstanbul. 1996; 715-759.

Güven KC. Tıbbi Formüller. 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2006;112.

Güven KC. Tıbbi Formüller. 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2006;112.

Gündüz M. Fizyopatoloji. Cilt i. F. Ü. Matbaası, Bornova, İzmir. 1977.

Hardeland R, Reiter RJ. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin . Neurosci Biobeh av Rev. 1993; 17: 347-356.

Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacol. Ther. 2004; 103, 147–166.

Hirsh JA., Salzman EW., Harker, L., Fuster, V., Dalen, JE., Cairns, JA., Collins, R. Aspirin and other platelet active drugs:relationship among dose, effectiveness, and side effects. Chest. 1989; 95: 12-18. doi:10.1378/chest.95.2_Supplement.12S.

Ianas O, Olivescu R, Badescu I. Melatonin In relation to cellular antioxidative defence mechanisms. Horm Metab Res 1997; 29(8): 363-372.

İşgen A. Civcivlerde değişik sürelerle uygulanan iskeminin hipokampusun hacmi, toplam nöron sayısı ve öğrenme davranışı üzerine olan etkisinin stereolojik metotlarla araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Uzmanlık Tezi, 2009.

Kaplan S, Esrefoglu M, Aktas A, Gul M, Onger ME, Altunkaynak ME, Ulkay MB, Ragbetli MC. The effect of prenatal exposure of a non-steroidal anti-inflammatory drug on the optic nerve of female rats: A stereological, histological, and electron microscopic study J Matern Fetal Neonatal Med. 2013; 26: 1860-1864.

- Kaplan S, Piskin A, Ayyildiz M, Aktas A, Koksall B, Ulkay MB, Turkmen AP, Bakan F, Geuna S. The effect of melatonin and platelet gel on sciatic nerve repair: An electrophysiological and stereological study. *Microsurgery*. 2011; 31: 306-313.
- Kaplan S, Esrefoglu M, Aktas A, Gul M, Onger ME, Altunkaynak ME, Ulkay MB, Ragbetli MC. The effect of prenatal exposure of a non-steroidal anti-inflammatory drug on the optic nerve of female rats: a stereological, histological, and electron microscopic study *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;26:1860-1864.
- Katzung B, Trevor A. *Pharmacology*. 3rd Edition, London, Longman Group Ltd. 1993.
- Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P. Cox-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 2317–2321.
- Kayaalp SO, Mc Isaac RJ. Absence of effects of PGE₂ and E, on ganglionic transmission. *Eur. J. Pharmacol.* 1968; 283-288.
- Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar. 3 Baskı . Ankara.1986; 2504-2059, 2586-2613.
- Keller J, Bünger C, Andreassen TT, Bak B, Lucht U. Bone repair inhibited by indomethacin. Effects on bone metabolism and strength of rabbit osteotomies. *Acta Orthop Scand* 1987; 58: 379-383.
- Kenneth I. Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. *Brain. Behav. Immun*. 2008; 22: 285–298.
- Keskin Aktan, A. Yaşlı sıçanlarda hipokampusta oksidatif stres ve bcl-2 ilişkisi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 2013.
- Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, Guo Z, Ben Abdallah N, Wolfer DP, Reiter RJ, Hermann DM, Bassetti CL. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J. Pineal Res*. 2008, 45, 142–148.

- Kondoh T, Uneyama H, Nishino H, Torii K. Melatonin reduces cerebral edema formation caused by transient forebrain ischemia in rats. *Life Sci.* 2002; 72: 583–590.
- Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG and Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005; 56: S57-73.
- Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res.* 1998; 24: 83- 89.
- Kudo C, Kori M, Matsuzaki K, Yamai K, Nakajima A, Shibuya A, Niwa H, Kamisaki Y, Wada K. Diclofenac inhibits proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66: 289–295.
- Kurtuluş A. Sıçanlarda elektrik akımına bağlı hipokampal hasarın stereolojik yöntemlerle değerlendirilmesi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, Denizli, Uzmanlık Tezi, 2005.
- Lane AE, Moss HB. Pharmacokinetics of melatonin in man: First pass hepatic metabolism. *J Clin Endocrinol & Metab.* 1985; 61: 1214-1216.
- Lathe R. Hormones and the hippocampus. *J Endocrinol.* 2001; 169(2): 205–231.
- Lee MY, Kuan YH, Chen HY, Chen TY, Chen ST, Huang CC, Yang IP, Hsu YS, Wu TS, Lee E.J. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Pineal Res.* 2007, 42, 297–309.
- Leon, J., Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Tan, D.X., Reiter, R.J. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res.* 2005; 38: 1-9.
- Maestroni GJ. The immunoendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993; 14: 1-10.
- Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier J-P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann. Rheum. Dis.* 2003; 62: 501-509.

- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17: 235-48.
- Moore KL, Persaud TVN. *Human Embriyology. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi.* Yıldırım M, Dalcik H editors,. 8th edition, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009; 381-399.
- Moss M, Mahut H, Zola MS. Concurrent discrimination learning of monkeys after hippocampal, entorhinal or fornix lesions. *J Neurosci.* 1981; 1:227-40.
- Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 2011; 22: 6-85. doi: 10.1186/1750-1326-6-85.
- Nelson Randy F. *An introduction to behavioral endocrinology.* 3rd edition. Sunderland, Mass: Sinauer Associates. 2005 ; 100. ISBN 0-87893-617-3.
- Noback CR, Demarest RJ. *The Nervous System.* 3th Edition. New York: Mc Graww-Hill Book Comp. 1986; 265-266.
- Nolte J. *The Human Brain. An introduction to its functional anatomy.* 2nd Edition. C.V. Mosby Company, St. Louis, Toronto, 1988.
- O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, Young DA. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* 1991; 266: 23261-23267.
- Odacı E, Korkmaz A, Ayas B, Rağbetli MÇ, Çiftçi N. Prenatal dönemde uygulanan diklofenak sodyumun, postnatal dönemde sıçanın eklem kıkırdak dokusuna etkisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* 2001; 21: 278-281.
- Odacı E, Kaplan S. Chapter 16: Melatonin and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87: 317-35.
- Ostensen M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy. *Scand J Rheumatol.* 1998b; 107: 128-132.
- Ostensen M. Treatment of inflammatory rheumatic disorders in pregnancy: What are the

- safest treatment options? *Drug Saf*, 1998a; 19(5): 389-410.
- Ozyurt B, Kesici H, Alici SK, Yılmaz S, Odacı E, Aslan H, Rağbetli MÇ, Kaplan S. Prenatal exposure to diclofenac sodium changes the morphology of the male rat cervical spinal cord: A stereological and histopathological study. *Neurotoxicol Teratol*. 2011; 33: 282-287.
- Özdoğan L, Ayerden T, Örnek D, Şaştım H, Kılıcı O, Ün C, Dikmen B. The neurotoxic effect of intrathecal diclofenac sodium in rats. *Kafkas Uni Vet Fak Derg*. 2011;17: 309-314.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006; 273: 2813-2838.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006; 273: 2813-38.
- Parlakpınar H, Koç M, Acet A. Yaşlanmada apopitozis ve melatonin etkisi. *T Klin J Med Sci* 2004; 24: 62-67.
- Rağbetli MC, Ozyurt B, Aslan H, Odacı E, Gokcimen A, Sahin B, Kaplan S Effect of prenatal exposure to diclofenac sodium on Purkinje cell numbers in rat cerebellum: A stereological study. *Brain Res*. 2007; 1174: 130–135.
- Raitiere MN. Proposed role of septohippocampal and pallido-habenulo–raphe systems in photoperiodic time measurement. *Med Hypotheses*. 1992; 38(3): 229–235.
- Reikeraas O, Engebretsen L. Effects of ketoralac tromethamine and indomethacin on primary and secondary bone healing. An experimental study in rats. *Acta Orthop Trauma Surg*. 1998; 118: 50-52.
- Reiter RJ. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol*. 1996; 134:412-420.
- Reiter RJ. Functional diversity of the pineal hormone melatonin: Its role as an antioxidant. *Exp clin endocrinol*, 1996; 104: 10-16.

- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(5): 986-1000. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207449
- Ro J, Sudman E, Marton PF. Effect of indomethacin on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scan* 1976; 47: 588-599.
- Ruit KG, Neafsey EJ. Cardiovascular and respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the hippocampus in anesthetized and awake rats. *Brain Res.* 1988; 457(2): 310–321.
- Russel JG. Antirheumatic medication in pregnancy (letter). *Br J Rheumatol*, 1986; 25(2): 229.
- Sakano K, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a melatonin metabolite, 6-hydroxymelatonin, via a unique non-o-quinone type of redox cycle. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 1869-1878
- Sasaki T, Nakagomi T, Kirino T, Tamura A, Noguchi M, Saito I, Takakura K. Indomethacin ameliorates ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampal CA1 sector. *Stroke.* 1988; 19: 1399-1403.
- Shinozuka K, Staples M, Borlongan CV. Melatonin-based therapeutics for neuroprotection in stroke. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 8924-8947.
- Shinozuka, K., Staples, M., Borlongan, C.V. Melatonin-based therapeutics for neuroprotection in stroke. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 8924-47.
- Siu SSN, Yeung JHK, and Lau TK. A study on placental transfer of diclofenac in first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod.* 2000;15:2423-2425.
- Siu KL, Lee WH. Maternal diclofenac sodium ingestion and severe neonatal pulmonary hypertension. *J. Paediat. Child Health.* 2004; 40: 152–153.
- Solomon DH. NSAIDs: Mechanism of action. *UpToDate.* 2009; 17: 2.
- Solomon DH. Overview of selective COX-2 inhibitors. *UpToDate* 2009; 17: 2.
- Songur A, Özen OA, Sarsilmaz M. Hipokampus. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2001; 21: 427- 431.

- Songur A. Sıçanlarda solunan formaldehitin postnatal gelişim sürecinde formatio hippocampi üzerine etkilerinin morfolojik olarak incelenmesi. Doktora Tezi. 2001
- Steward O, Scoville SA. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J. Comp. Neurology.* 1976; 169: 347-70.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1993; 1: 57-60.
- Tan DX, Reiter RJ. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole *In vivo*. *Carcinogenesis* 1994; 15: 215-218.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2: 181-197.
- Thomas L, Drew JE, Abramovich DR, Williams LM. The role of melatonin in the human fetus (review). *Int J Mol Med.* 1998; 1: 539-543
- Turgut M, Kaplan S. Effects of melatonin on peripheral nerve regeneration. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2011; 5: 100-8.
- Türkmen A. Diklofenak sodyum'un akut unilateral subdural hematumlu sıçan hipokampusu üzerine etkilerinin histolojik, stereolojik ve moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık tezi, 2013.
- Uz T, Giusti P, Franceschini D, Kharlamov A, Manev H. Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. *Neuroscience.* 1996; 73: 631-639.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature.* 1971; 231: 232-235.
- Vardeh D, Wang D, Costigan M, Lazarus M, Saper CB, Woolf CJ, FitzGerald GA, Samad TA. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 287-294.

- Vida I, Frotscher M. A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. Proc. Natl. Acad. Sci. 2000; 97: 1275-1280.
- Wallace JL, McKnight W, Miyasaka M, et al. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. Am J Physiol 1993; 265: 993-998.
- Waxman SG. Korelatif Nöroanatomi. Yıldırım M. Editor. 24. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara. 2002; 81-248.
- 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. 1991; 231(4): 482-497.
- West MJ. New stereological methods for counting neurons. Neurobiol aging 1993; 14: 275-285.
- Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH. Gray's Anatomy, 37th Edition, Churchill Livingstone, London, 1989; 1035-1038.
- Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. Topographical organisation of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. J. Neurosci. 1989; 9: 216-228.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. Neuron. 1993; 11: 371-386.
- Yılmaz B. Prostaglandinler. A. O. Vet. Fak. Derg. 1990; 37 (3): 516-537.
- Zenker M, Klinge J, Krüger C, Singer H, Scharf J. Severe pulmonary hypertension in a neonate caused by premature closure of ductus arteriosus following maternal treatment with diclofenac: A case report. J Perinat Med. 1998; 26:231-234.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Kıymet Kübra YURT

Doğum Yeri: Sivas

Doğum Tarihi: 1990

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Giriş Yılı: 2007

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Giriş Yılı: 2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı-2014

E-posta: kubrayurt55@gmail.com