



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL DÖNEMDE FARKLI DOZLARDA UYGULANAN
DİKLOFENAK SODYUMUN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ
GELİŞİMİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ebru ELİBOL

**Samsun
Mart-2014**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL DÖNEMDE FARKLI DOZLARDA UYGULANAN
DİKLOFENAK SODYUMUN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ
GELİŞİMİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ebru ELİBOL

Danışman

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN

**Samsun
Mart-2014**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ebru ELİBOL tarafından Prof. Dr. Süleyman KAPLAN Danışmanlığında hazırlanan Prenatal Dönemde Farklı Dozlarda Uygulanan Diklofenak Sodyumun Merkezi Sinir Sistemi Gelişimi Üzerine Toksik Etkisinin Araştırılması başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından /..... /..... tarihinde yapılan sınav ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

..... / /.....

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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;

Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında analiz sistemini kullanımımıza açan anabilim dalı başkanı sayın Prof. Dr. Cafer MARANGOZ' a ve Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ'a, tez çalışmamda yardımını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Abdurahman AKSOY'a, tez çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirgemeyen anabilim dalımız öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Berrin Zuhale ALTUNKAYNAK ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER'e, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı personeli ile tüm değerli hocalarıma özellikle Araş. Gör. Ömür Gülsüm DENİZ ve Araş. Gör. Gamze ALTUN' a;

Yetişmemde emeği geçen aileme ve bana bu yoğun dönemde en büyük anlayışı gösteren sevgili oğlum Yiğit Efe'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez projesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından (PYO.TIP.1904.11.027) desteklenmiştir.

ÖZET

PRENATAL DÖNEMDE FARKLI DOZLARDA UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUMUN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ GELİŞİMİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada sıçanlarda farklı gebelik dönemlerinde farklı dozlarda uygulanan diklofenak sodyum'un hipokampus üzerine olası etkilerinin stereolojik ve histopatolojik yöntemlerle tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda 84 adet *Wistar albino* cinsi erkek yavru sıçan kullanıldı. Denekler pür kontrol (D), serum fizyolojik (E), düşük doz (3,6 mg/kg), orta doz (9mg/kg) ve yüksek doz (18 mg/kg) olmak üzere beş ana gruba ayrıldı. Daha sonra ilaç uygulama dönemlerine göre gruplar kendi içinde dört alt gruba ayrıldı. Postnatal yedinci günde tüm hayvanlar yüksek doz anestezi altında ötenazi edildi. Alınan beyin doku örnekleri histolojik ve stereolojik açıdan değerlendirildi.

Bulgular: Diklofenak sodyum uygulanan gruplardaki deneklere ait hipokampus örneklerindeki CA1, CA2, CA3 bölgelerinin ortalama nöron sayıları ve hipokampustaki toplam nöron sayılarında, pür kontrol ve serum fizyolojik grubuna oranla anlamlı oranda azalma olduğu gözlemlendi.

Sonuç: İlaç uygulanan gruplar ışık mikroskopik düzeyde incelendiğinde normal histolojik yapıdaki nöronların sayılarında önemli ölçüde azalma olduğu gözlenmiştir. Yüksek doz ilaç uygulanan grup, diğer gruplarla kıyaslandığında nekroza giden nöronların daha fazla sayıda olduğu tespit edilmiştir. Diklofenak sodyum kullanımının CA1, CA2, CA3 bölgelerinin tümünde ve hipokampustaki toplam nöron sayılarında azalmaya neden olduğu stereolojik teknikler kullanılarak gösterilmiştir.

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

Ebru ELİBOL, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Mart-2014

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF TOXIC EFFECT ON THE DEVELOPMENT OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM EXPOSED TO DIFFERENT DOSES DICLOFENAC SODIUM IN PRENATAL PERIOD

Aim: It was aimed in the present study to examine the toxic effects of prenatally exposed to different doses of diclofenac sodium on the rat hippocampus by stereological and histopathological methods.

Material and Method: For this aim, 84 male offspring *Wistar albino* rats were used. The subjects were divided into five main groups. These are pure control (D), saline (E), low dose (3.6 mg/kg), medium dose (9 mg/kg) and high dose (18 mg/kg). Afterwards, main groups were divided into four subgroups according to drug administration period. On the 7th day of postnatal life, all animals were euthanized with an overdose of anesthetic. Then, the brain tissue samples were analysed by histological and stereological techniques.

Results: In the diclofenac sodium administered groups were observed a significant decrease in terms of the average neuron number in the CA1, CA2 and CA3 regions and whole hippocampus compared to the pure control and the saline groups.

Conclusion: Light microscopic investigation of the drug administered groups indicated a significant decreasing in the number of healthy neurons. Additionally; in the high dose group, it was identified more necrotic neurons compared to the other groups. In this study, it was shown by means of stereological techniques that using of diclofenac sodium caused to decrease in the number of the neurons in the CA1, CA2, and CA3 regions and whole hippocampus.

Keywords: Diclofenac sodium; hippocampus; rats; stereology.

Ebru ELİBOL, Ph.D. Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, March-2014

SİMGELER VE KISALTMALAR

- CA : Cornuammonis
CCK : Kolesistokinin
COX : Siklooksijenaz
DA : Duktusarteriozus
DS : Diklofenak sodyum
FDA : Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi
G : Gebelik
GAD : Glutamatdekarboksilaz
MSS : Merkezi sinir sistemi
NSAİİ : Nonsteroidalantiinflamatuvar ilaçlar
PG : Prostaglandin
ROS : Reaktif oksijen türleri
SRÖ : Sistemik rastgele örnekleme
VIP : Vazoaktifintestinalpolipeptid

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Sinir Sistemi Embriyolojisi.....	4
2.2. Beynin Gelişimi.....	5
2.3. Merkezi sinir sistemi	6
2.4. Hipokampus.....	7
2.4.1. Anatomisi.....	8
2.4.2. Histolojik Yapısı.....	9
2.4.3. Hipokampal Yollar	11
2.4.4. Papez Devresi	13
2.4.5. Fizyolojisi ve Biyokimyası.....	13
2.4.6. Fonksiyonları	14
2.4.7. Lezyonları.....	15
2.5. Diklofenak Sodyum	15
2.5.1. Diklofenak Sodyumun Farmakolojisi.....	15
2.5.2. Gebelikte Diklofenak Sodyum	19
2.6. Stereoloji	19
2.6.1. Stereolojide Tarafsızlık ve Etkinlik Kavramları.....	20
2.6.2. Stereolojik Çalışmalarda Sistemik Rasgele Örneklem	20
2.6.3. Stereolojide Ön Çalışma	20
2.6.4. Stereolojide Boyut Kavramı	21
2.6.5. Tarafsız Sayım Çerçevesi	23
2.6.6. Stereolojide Tanecik Sayımı: Disektör	24
3. MATERYAL ve METOT.....	26
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi	26
3.2. Deney Protokolü	26
3.3. Diklofenak Sodyum Stok Solusyonun Hazırlanışı.....	27
3.4. Çalışma Grupları ve Uygulanan İşlemler	27
3.5. Anestezi İşlemi.....	28
3.6. Perfüzyon ve Fiksasyon İşlemi.....	28
3.7. Histolojik Takip İşlemi	29
3.7.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü	29

3.7.2. Kesit Alma İşlemi	30
3.7.3. Krezil viyoleet Boyama İşlemi.....	31
3.8. Kesitler Üzerinde Stereolojik Analiz	32
3.9. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Makroskobik Bulgular.....	38
4.2. Stereolojik Bulgular	38
4.2.1. CA1 Alanında Elde Edilen Bulgular	39
4.2.2. CA2 Alanında Elde Edilen Bulgular	44
4.2.3. CA3 Alanında Elde Edilen Bulgular	49
4.2.4. Tüm Hipokampustaki Nöron Sayısına ilişkin Elde Edilen Bulgular.....	54
4.3. Işık Mikroskobik Bulgular	59
4.3.1. D Grubuna Ait Bulgular	59
4.3.2. E Grubuna Ait Bulgular.....	61
4.3.3. A grubuna Ait Bulgular	63
4.3.4. B grubuna Ait Bulgular	65
4.3.5. C grubuna Ait Bulgular	67
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	84

1. GİRİŞ

Gelişen teknolojiye paralel olarak her alanda olduğu gibi sağlıkta da teknolojik ürünler, piyasada aşırı bir artış göstermiş ve bu nedenle serbest ticaret anlayışı gelişmiştir. Bunun sonucu olarak da ticari kaygılar yükselerek dünya genelinde her alanda olduğu gibi sağlık alanında da bu ürünlerin tüketimi artmıştır. Bunlar son yıllarda gereksiz ilaç tüketiminin artmasının altındaki ana nedenlerden sayılabilir. Bu noktada; özellikle antibiyotikler, ağrı kesici ve antiromatizmal ilaçların tüketiminin arttığı dikkat çekmektedir. Odacı ve ark. (2001), non-steroidal antiinflamatuar ilaçların (NSAİİ) bağımlılık yapmadığı için birçok romatizmal hastalıkların tedavisinde yaygın bir şekilde kullanıldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan NSAİİ türevi olan diklofenak sodyum (DS) kadın hastalıkları ve doğum uzmanları tarafından hastalara tedavi amaçlı verilen ve oldukça yaygın kullanılan ilaçlardan biridir (Gökçimen ve Malas, 2003; Cassina ve ark., 2010).

NSAİİ'ler etkilerini genellikle siklooksijenazları inhibe ederek gösterirler (Siu ve ark., 2000; Beck ve ark., 2003; Aygün ve ark., 2012). Gebelik döneminde NSAİİ'nin kullanımının bazı anne adaylarında problemlili doğumlara neden olduğu, bazı anne adaylarında da düşük yapma riskini artırdığı belirtilmiştir (Nielsen ve ark., 2001). Yapılan deneysel hayvan çalışmaları sonucunda, NSAİİ kullanımının fetüsteki zararlı etkilerinin; duktus arteriosusun kapanması (Harris, 1980; Rudolf, 1981; Shastri ve ark., 2013), pulmoner arteriel hipertansiyon ve malformasyon olduğu bildirilmiştir (Persaud ve Moore, 1974; Sabry ve ark., 2014).

NSAİİ ilaçlar etkilerini ayrıca; prostaglandin (PG) sentezinin ve fosfolipaz C gibi enzim aktivasyonu, membranlar arası iyon transportu, mitokondrial oksidatif fosforilasyon ve hücreler arası etkileşim gibi çok sayıda olayların inhibisyonuna katılarak da gösterirler (Weismann, 1991; Gupta, 2014). Prostaglandin sentez inhibitörlerinin fetal gelişme ve organlar üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir (Goldin ve ark., 1987, Aygün ve ark., 2012).

NSAİİ'lerin medikal tedavide yaygın olarak kullanımı ile farklı organ ve sistemler üzerine toksik etkileri araştırılmıştır. Merkezi sinir sistemi (MSS) üzerine NSAİİ'lerin etkilerini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda, diklofenak sodyumun MSS'nin gelişimini etkilediği ve DS'nin nöral kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Kudo ve ark., 2003; Ayrancı ve ark., 2013).

NSAİİ ilaçlardan olan DS; güçlü analjezik etkili, antiinflamatuar ve antipiretik etki gösteren farmakolojik bir ajandır. Düşük molekül ağırlığa sahip olan ve kimyasal formülü

Na [2 (2,6, dicloroanilino) fenil] asetat olan DS nispeten fenil asetik asitten türevlenmiştir (Siu ve ark., 2000; Güven, 2006). Bu tür ilaçlar artrit, osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit gibi romatizmal hastalıkların tedavisinin yanı sıra, romatizmal olmayan hastalık durumlarında ağrı, ateş ve inflammasyonun tedavisinde iltihap giderici, ateş düşürücü ve ağrı giderici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Alves ve Duarte, 2002; Kudo ve ark., 2003; Chang ve ark., 2005; Güven, 2006).

Prenatal dönemde DS uygulaması sonucu 20 haftalık sıçanların omuriliklerindeki nöron sayılarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir (Ozyurt ve ark., 2011). Yine prenatal dönemde DS uygulanmış 4 haftalık sıçanlar üzerinde yapılan stereolojik ve elektron mikroskopik bir çalışmada ise, siyatik sinir akson sayısında kontrol grubuna oranla azalma ve miyelin kılıf yapısında ciddi dejenerasyon bulguları gösterilmiştir (Canan ve ark., 2008).

Gökçimen ve ark. (2000), yüksek doz DS'nin karaciğer ve böbrek dokuları üzerine olan muhtemel etkilerini araştırmışlar; ve enjeksiyondan 24 saat sonra karaciğer mikroskopisinde hepatoselüler dejenerasyon bulgularının yanı sıra karışık hücre infiltrasyonları ve portal alanda safra kanalı proliferasyonu olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca böbrek doku kesitlerinde peritübüler lenfosit infiltrasyonu ve tübül epitel hücre dejenerasyonu tespit etmişlerdir.

Anne ile yavru arasındaki kuvvetli bağ olan plasenta belirli bir dereceye kadar seçici geçirgen olabilmektedir. Dawood (1993), DS'nin hamileliğin ilk trimesterinde insan plasentasından kolaylıkla geçebildiğini bildirmiştir. NSAİİ'ler prostanoitlerin biyosentezine engel olarak plasenta bariyerini geçip fetal dolaşıma katılırlar ve bunun sonucunda fetusta teratojenik etkilere neden olabilirler (Zenker ve ark., 1998; Cassina ve ark., 2010).

Gebelik süresince düşük doz DS verilen ratlarla yapılan başka bir çalışmada; bu ilacın postnatal karaciğer üzerine etkileri araştırılmış, ve herhangi bir etki gözlenmemiştir (Rağbetli ve ark., 2009). Odacı ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ise NSAİİ ilaçların kıkırdak proteoglikanlarının sentezini inhibe ederek kıkırdak yapısını bozduğu, kondrositlerde sayıca azalmaya neden olduğu, normal yapılarına ulaşamayıp şekil ve büyüklüklerinin değişerek izogen gruplar oluşturamadıkları tespit edilmiştir.

Hamilelik esnasında NSAİİ kullanımının anne ve fetus için olumsuz etkileri arasında hamilelik süresinin ve doğum sancısının uzaması da vardır (Ostensen, 1998). NSAİİ'lerin fetus üzerinde; duktus arteriosus (DA) daralması (Takahashi ve ark., 1996; Zenker ve ark., 1998; Shastri ve ark., 2013), kol (extremite) iskemisi (Arad ve ark., 1995), hydrops fetalis (Mogilner ve ark., 1982; Pratt ve ark., 1997), oligohidramnios, ileal perforasyon ve kistik

beyin lezyonları gibi teratojenik yan etkilerin olduğunu rapor eden çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca hamileliğin erken dönemlerinde aspirin ve ibuprofen gibi ilaçların kullanımı sonucu muhtemel teratojenik etkileri arasında gastroşizis de tespit edilmiştir (Rein ve ark., 1999).

Siu ve Lee (2004), tarafından yapılan çalışma sonucu DS'nin kısa süreli maternal kullanımından sonra DA'nın erken kapanmasına bağlı olarak, yeni doğanda ciddi pulmoner hipertansiyon ve kalbinde sağ taraflı geçici hipertrofik kardiyomiyopati vakası tespit edilmiştir.

Günümüzde hamilelik sürecinin herhangi bir döneminde bu ilaçlar tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar (Bitto ve ark., 1997). Yaptığımız literatür taraması sonucunda fetal dönemde DS'ya maruz kalmanın postnatal hayatta beyin üzerindeki etkileri hakkında yeterli sayıda deneysel bir çalışmaya rastlanılmazken özellikle gebe sıçanlara uygulanan farklı doz ve farklı trimesterlerdeki DS'nin postnatal beyin dokusundaki değişikliklerin tespitine yönelik stereolojik bir çalışma da literatürde bulunmamıştır.

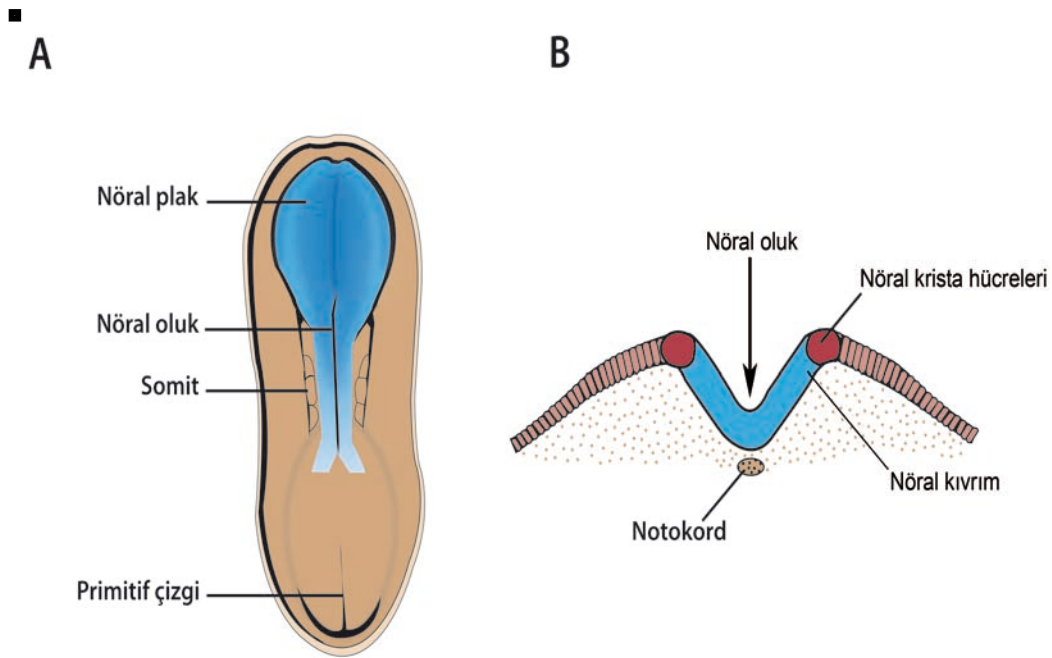
Çalışmamızın amacı; gebeliklerinin farklı periyotlarında farklı dozlarda uygulanan DS'nin, sıçanların postnatal bir haftalık yavrularının beyin dokularındaki nöron sayısı üzerine etkilerinin stereolojik yöntemler kullanarak araştırılmasıdır.

Çalışmamızda verileri elde etmek için kullandığımız yöntem olan stereoloji, üç boyutlu örneklerin (biyolojik yapılar) iki boyutlu kesitlerini kullanarak, gerçekteki üç boyutlu özellikleri ile ilgili yorumlar yapılmasını sağlayan yöntemdir. Bu bilim dalı daha kısa zamanda daha az hatalı iş yapmayı sağlayan (etkin) ve gerçek değerden sistematik bir sapmaya neden olmayan (tarafsız) metotları ile gerçeğe en yakın değerleri tahmin etmeye yarayan geliştirilmiş kurallar bütünüdür (Canan ve ark., 2002; Kaplan ve ark., 2012a). Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda tarafsız ve gerçeği yansıtan en yakın sonuçları bulmamızı sağlayacak olan stereolojik teknikleri kullandık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi Embriyolojisi

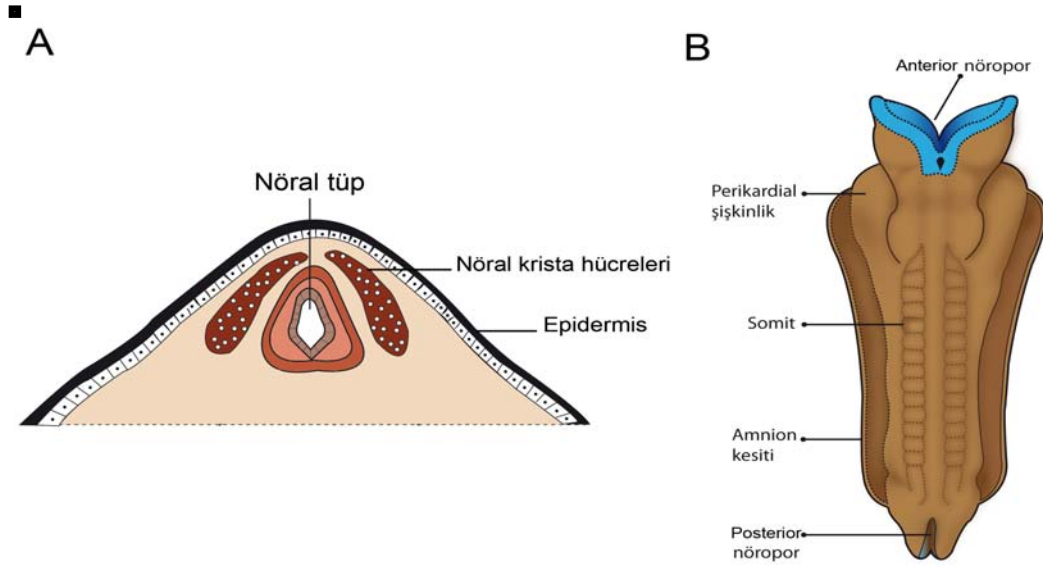
Sinir sisteminin gelişimi insanda fertilizasyondan sonraki üçüncü haftada başlar. Sinir sistemine ait bütün yapılar embriyonik gelişim esnasında oluşan bir alan olan nöral plaktan köken alır. Embriyonel yapı üçüncü haftada baş bölgesinde geniş, kuyruk bölgesinde dar bir disk şeklindedir. Sırt ipliklerin ilkel iskeleti olan notokordun gelişmesi sonucu notokord üzerinde yer alan ektodermal bölüm kalınlaşır ve nöral plağı oluşturur (Moore ve Persaund, 2009) (Şekil 1A).



Şekil 1. İnsan embriyosu gelişiminin üçüncü haftasındaki embriyonal görünüm **A.** Nöral plak oluşumu, **B.** Nöral oluk ve nöral kıvrımların oluşumu (Moore ve Persaund, 2009'dan uyarlanmıştır)

Embriyonik gelişim devam ettikçe nöral plağın orta bölümü çukurlaşır ve bunun sonucunda nöral oluk ve nöral kıvrımlar oluşur (Şekil 1B). Daha sonra nöral kıvrımlar yükselir ve orta hatta doğru yönelirler. Üçüncü haftanın sonunda sağ ve sol nöral kıvrımlar birbiri ile kaynaşır ve nöral tüpü oluştururlar (Şekil 2A). Bu tüp geçici bir süre baş bölgesinde anterior nöropor, kuyruk bölgesinde ise posterior nöropor adı verilen açıklıklarla amnion boşluğuna açılır. Anterior nöropor 25. günde, posterior nöropor ise 27. günde kapanmaktadır (Şekil 2B). Nöroporların kapanmasıyla nöral tüp oluşumu (nörulasyon) tamamlanmış olur

(Moore ve Persaund, 2009). Nöral tüpün ileri gelişimi ile beyin, medulla spinalis, preganglioner tüm otonom lifler ve iskelet kaslarının fonksiyon görmesini sağlayan motor sinirler oluşmaktadır. Nöral kıvrımların nöral tüp oluşumuna katılmayan bölümleri nöral kristayı oluşturur. Nöral krista türevleri ise hem sinir sistemine ait çok sayıda hücre çeşitlerini, hem de nöronal olmayan hücreleri meydana getirir (Moore ve Persaund, 2009).



Şekil 2. İnsan embriyosu gelişiminin üçüncü haftasının sonunda embriyonal görünüm **A.** Nöral tüp oluşumu, **B.** Anterior ve posterior nöropor (Moore ve Persaund, 2009'dan uyarlanmıştır)

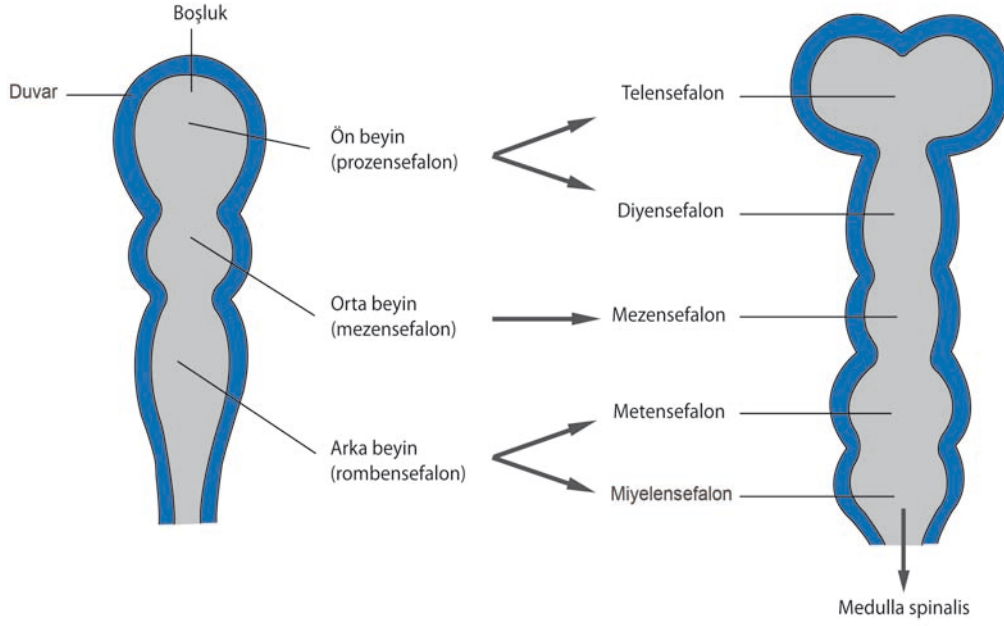
2.2. Beynin Gelişimi

Dördüncü somit çiftlerinin kranial tarafında nöral tüp, beyni oluşturmak üzere gelişir. Kranial bölgede, nöral kıvrımların füzyonu ve rostral nöroporun kapanmasıyla birlikte beyinin gelişeceği üç ilkel beyin vezikülü oluşur (Moore ve Persaund, 2009).

Üç ilkel beyin vezikülü şunlardır:

- *Ön beyin vezikülü* (prozensefalon)
- *Orta beyin vezikülü* (mezensefalon)
- *Arka beyin vezikülü* (rombensefalon)

Beşinci hafta içinde ön beyin tam olmayan iki sekonder veziküle (telensefalon ve diyensefalon) ayrılır; mezensefalon bölünmez; rombensefalon ise sekonder iki veziküle bölünür (metensefalon ve miyelensefalon); böylece beş sekonder beyin vezikülü ortaya çıkar (Moore ve Persaund, 2009) (Şekil 3).



Şekil 3. Üç ilkel beyin vezikülü ve beş sekonder beyin vezikülü (Moore ve Persaund, 2009'dan uyarlanmıştır)

Telensefalondan; serebral korteks, rinensefalon (hipokampus), korpus striatum, diyensefalondan; epitalamus, talamus, hipotalamus, mezensefalondan; crus cerebri ve colliculi tegmentum, metensefalondan cerebellum, pons ve miyelensefalondan medulla oblongata gelişir (Sadler, 1993).

2.3. Merkezi sinir sistemi

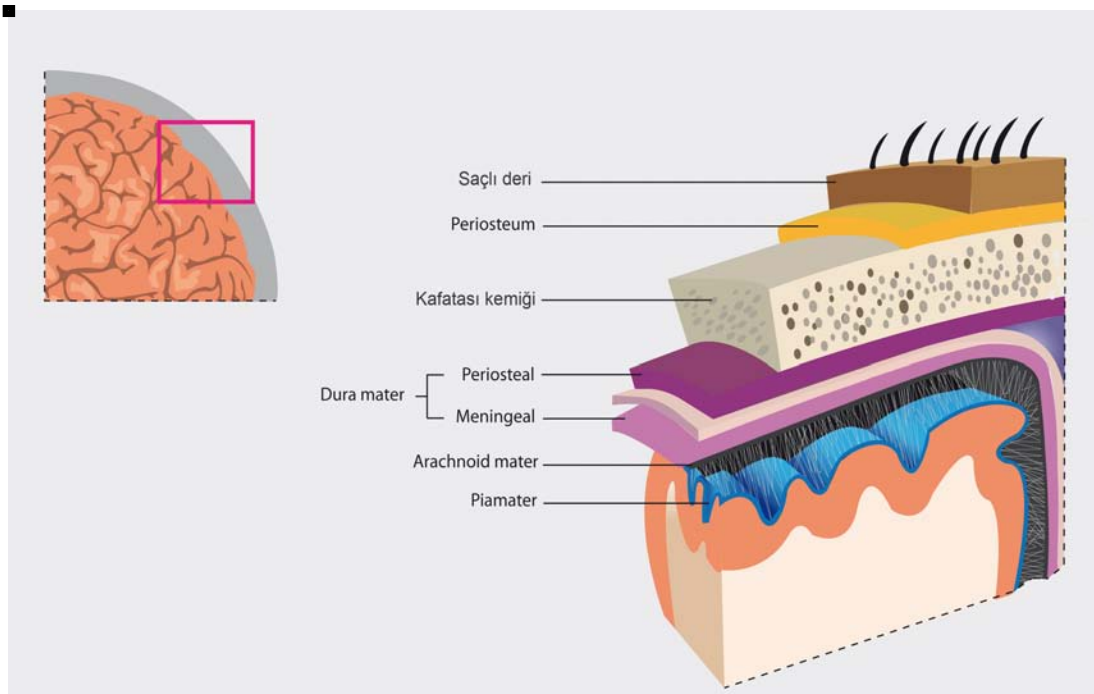
MSS; omurilik ve beyin olmak üzere iki anatomik bölümden oluşur. Beyin cavum crani, omurilik ise canalis vertebralis içinde yer alır. Beyinde dış tarafta substantia grisea, iç tarafta substantia alba yer alır. Omurilik ise beyindeki yerleşimin tam tersidir. MSS'nin gri cevheri nöron ve nöroglia hücrelerini, beyaz cevheri ise çoğunlukla miyelinli aksonları içerir (Hall, 2013). Beyin ve medulla spinalis dışarıdan içeriye doğru; dura mater, arachnoidea mater ve pia mater adı verilen üç bağ doku tabakası tarafından sarılıdır.

Dura mater iki tabakadan oluşur. İçteki tabaka meningeal tabaka, dıştaki tabaka ise periosteal tabaka olarak adlandırılır. Her iki tabaka da sıkı fibröz bağ dokusundan oluşmuştur. *Periosteal tabaka* kafa kemiklerinin iç yüzünü döşeyen periosteumu yapar.

Foramen magnumdan geçerek medulla spinalis etrafında dura mater olarak devam eder. *Meningeal tabaka* beyin bölümleri arasına uzantılar gönderir. Bu uzantılar falx cerebri, falx cerebelli, tentorium cerebelli olarak adlandırılır (Arıncı ve Elhan, 2001; Ross, 2011).

Pia mater, beyin dokusuna yapışık durumda bulunur. Beyin ve medulla spinalis içine kan damarlarını taşır. Pia mater beyin ve medulla spinalis'in bütün oluklarının içine girer. Bol miktarda damar ağına sahiptir. Pia mater, damarların beyin dokusuna girdiği yerde beyine daha sıkı bir şekilde yapışmıştır (Arıncı ve Elhan, 2001; Ross, 2011).

Arachnoidea mater; vasküler, ince, geçirgen olmayan bir zarıdır. Dura mater ile arachnoidea arasında spatium subdurale, arachnoidea ile pia mater arasında spatium subarachnoideum adı verilen aralık bulunur. Spatium subdurale ince bir aralıktır. Her iki aralıkta da beyin omurilik sıvısı bulunur. Arachnoidea mater, falx cerebri, falx cerebelli, tentorium cerebellinin bulunduğu büyük yarıklara girer. Diğer oluklara ise girmez (Arıncı ve Elhan, 2001; Ross, 2011) (Şekil 4).



Şekil 4. Beyinde yer alan bağ dokusu tabakaları kesitte görülmektedir.

2.4. Hipokampus

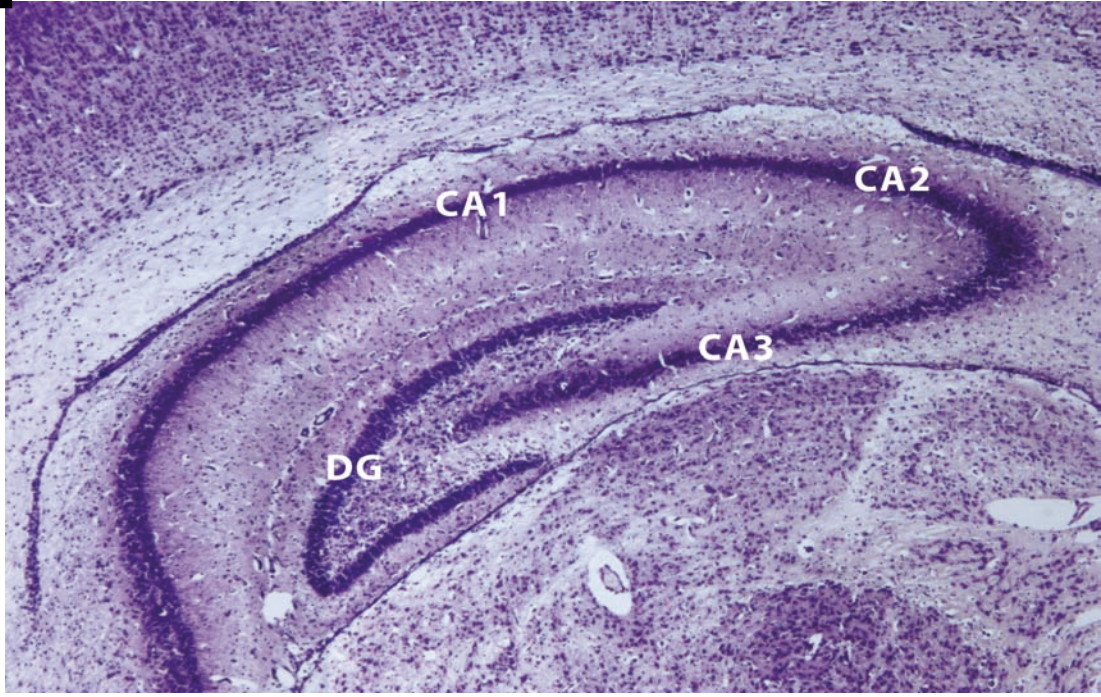
Hipokampus filogenetik olarak en eski beyin kısımlarından biridir ve insanda lateral ventrikül alt boynuzunun tabanında bulunur. Kesitlerde C harfi şeklinde gözlenen bu yapı görünümü itibariyle denizatına benzetildiğinden dolayı hipokampus adı verilmiştir. Algı ve bellek sistemleri arasında bağlantı kuran hipokampus, beynin birçok bölgesinden duyu lifleri

alır. Aldığı bu duyuları, fornix aracılığıyla hipotalamus, talamus ve septal sahaya iletir. Bunun yanı sıra, hipokampus subkortikal alanlarla olan bağlantısı sayesinde, beynin birçok bölgesi ile iletişim halindedir (Sadler, 1996; Aktan, 1997; Ozan, 2014).

2.4.1. Anatomisi

Hipokampus, gri cevher tabakasından oluşmuştur ve lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır. Uzunluğu yaklaşık 5 cm'dir (Arıncı ve Elhan, 2001; Ozan, 2014). Genişlemiş ön kısmına pes hippocampi adı verilir ve bu bölgede digitationes hippocampi olarak isimlendirilen iki ya da üç adet çıkıntı bulunur. Hipokampusun konveks olan ventriküler yüzeyi kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu alveus ile örtülüdür. Bu lifler medialde şerit şeklinde birbirine yaklaşarak fimbria hippocampi'yi oluşturur. Fimbria hippocampi'nin arka ucu alveus ile birlikte crus fornicis'i meydana getirir. Ön ucu ise uncus gyri hippocampi'nin beyaz cevherinde sonlanır. Alveustan gelip fimbria hippocampi'ye dahil olan lifler, fornix'in başlangıcını oluşturur (Arıncı ve Elhan, 2001; Ozan, 2014).

Hipokampus, Cornu ammonisin baş harflerini temsilen CA olarak da isimlendirilir. CA içerdiği hücre tiplerinden dolayı CA1, CA2, CA3 olmak üzere üç bölgeye bölünmüştür. CA1 subiculuma en yakın olan bölgedir. CA3 ise gyrus dentatusa en yakın olan hipokampus alanıdır (Songur ve ark., 2005). İ kişi arasında bulunan alan ise CA2 olarak adlandırılır. Piramidal hücre boyutlarının en büyük olduğu hipokampus bölgesi CA3'tür. CA2 ise piramidal hücre yoğunluğunun en çok olduğu alandır. CA1 ise hipokampusun en karmaşık bölgesidir. Boyutları birbirinden farklı piramidal hücrelerin bulunduğu bu alanda, hücrelerin % 10'unu internöronlar meydana getirir (Amaral ve Lavenex, 2007) (Şekil 5).



Şekil 5. Hipokampusta yer alan bölgeler ; DG, dentate gyrus

2.4.2. Histolojik Yapısı

Hipokampusun mikroskobik yapısı incelendiğinde, ventriküler yüzeyden derine doğru toplam yedi tabakadan meydana geldiği görülür (Berry ve ark., 1995).

1. Alveus hippocampi

Hipokampusa 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).

3. Stratum pyramidale

Bu katmanda yoğun olarak piramidal ve Golgi tip II hücreleri bulunmaktadır. Bölgede yerleşmiş olan piramidal hücreler hipokampusun şeklini ortaya koyar. Bu hücrelerin tabanı hipokampusun 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. Hipokampusun 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).

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*

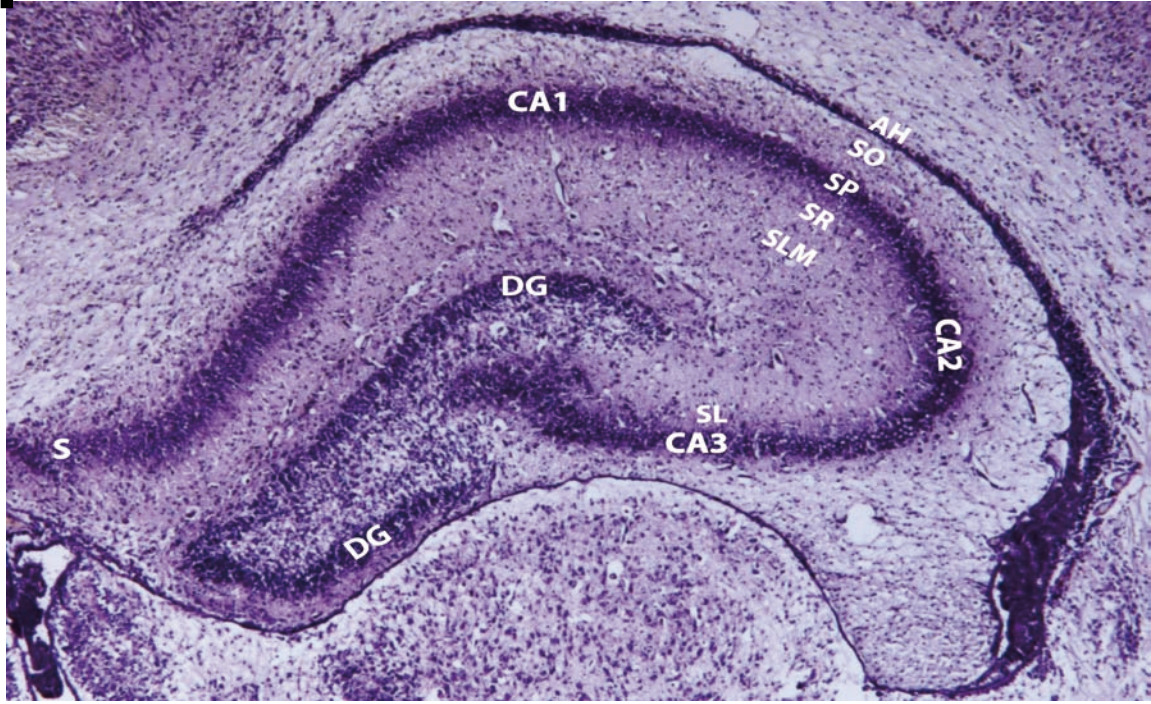
İşinsal dallara sahip olan bu tabaka geniş bir ağ yapısındadır (Berry ve ark., 1995).

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, hipokampusun 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) (Şekil 6).



Şekil 6. Hipokampusta yer alan tabakalar; DG; dentate gyrus, AH; Alveus hippocampi, SO; Stratum oriens, SP; Stratum pyramidale, SR; Stratum radiatum, SLM; stratum lacunosum-moleculare, SL; Stratum lucidum, S: Subikulum

2.4.3. Hipokampal Yollar

Afferent Yollar

Hipokampusun afferent lifleri tüm duyuşal uyarıları ihtiva eder. Area entorhinalis'ten gelen duyuşlar dört yolla hipokampusa ulaşmaktadır;

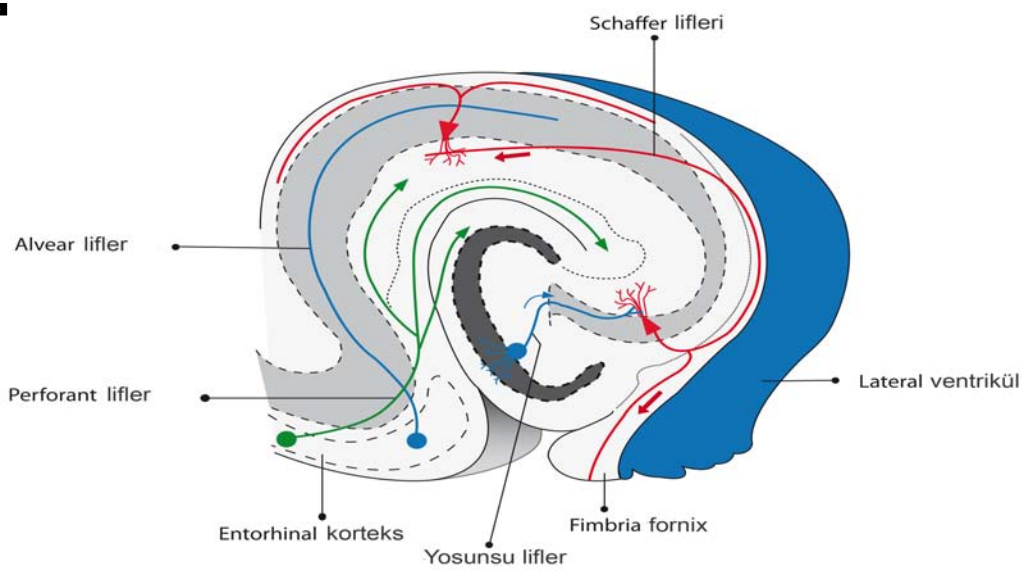
1- *Perforant lifler:* Entorhinal korteksten gelen lifler, subiculum boyunca gyrus dentatus'a ilerleyerek tüm hipokampusa dağılır.

2- *Yosunsu (mossy) lifler:* Gyrus dentatustan CA3 alanına gider.

3- *Schaffer lifleri:* Piramidal hücre lifleri olan bu dallar CA3 ve CA2 alanlarından CA1 alanına doğru uzanır.

4- *Alvear lifler*: Subkortikal alanlardan gelen bu lifler alveustan hipokampusa geçer. Hipokampusun CA1 alanı ile subiculumun iç tabakasına dağılır (Sluyter ve ark., 2005).

Hipokampus, gyrus parahippocampalisten aldığı uyarıları fornix aracılığı ile corpus mamillare, area septalis ve hypothalamusun bazı çekirdeklerine gönderir. Hipokampus, yine fornix aracılığı ile nuclei anteriores thalami, area hypothalamica posterior, corpus mamillare, area septalis, substantia innominata, area tegmentalis ventralis, nuclei raphe ve nucleus parabrachialisten lifler almaktadır (Sluyter ve ark., 2005) (Şekil 7).



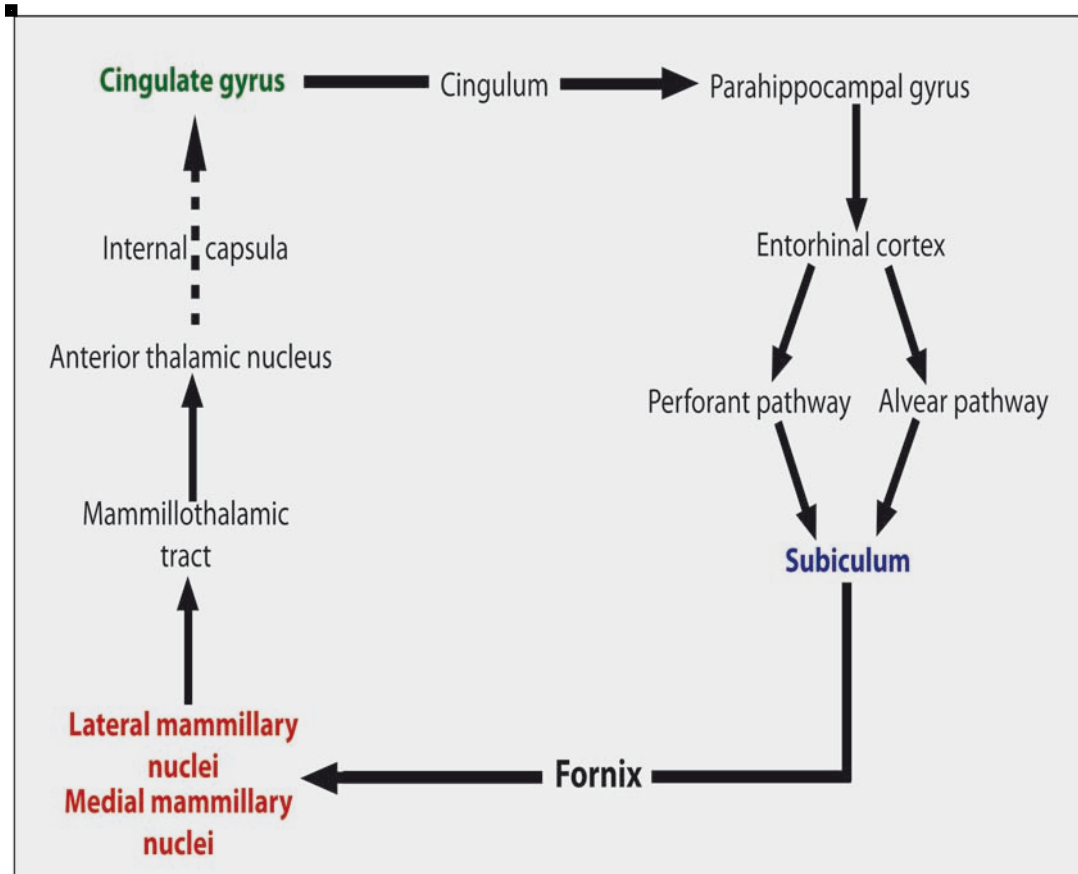
Şekil 7. Hipokampusun afferent lifleri (Sluyter ve ark., 2005'den uyarlanmıştır)

Efferent Yollar

Fornix, hipokampusun en büyük efferent yoludur. Hipokampus ve subiculumdan başlayan miyelinli lifler, alveustan fimbria hippocampi'ye geçer. Sayıları 1,2-2,7 milyon arasında değişen bu lifler, splenium corporis callosi'nin altında crus fornicis; thalamusun arkasında ise corpus fornicis olarak devam eder. Her iki crus fornicis arasında çapraz yapan liflere commissura hippocampi adı verilir. Corpus fornicis'ten sonra columnna fornicis olarak uzanan aksonlar, foramen interventriculare önünde kavis yaparak nuclei anteriores thalami ve nucleus dorsalis lateralis thalamiye lifler gönderir. Bu liflere postcommissural lifler adı verilir. Buradan hypothalamusa uzanan liflerin çoğu corpus mamillare ve nucleus ventromedialis hypothalamica'da sonlanır. Columnna fornicisten commissura anteriora ayrılan az sayıdaki fornix lifleri ise area septalis, substantia innominata ve area hypothalamica rostralise geçerler (Aktan, 1997; Ozan, 2014).

2.4.4. Papez Devresi

Hipokampusun dış bağlantılarını ifade eden Papez Devresi, sırasıyla hipokampus, fornix, corpus mamillare, tractus mamillothalamicus, nuclei anteriores thalami, gyrus cinguli, gyrus parahippocampalis ve hipokampusa geri bağlantılar yapan nöronları kapsar (Taner, 2005). Bu devre içerisinde, uyarıların ardı ardına birbirini izlemesi, yaşadığımız bir duygunun giderek şiddetlenmesine ve iz bırakmasına neden olur. Duygusal tepkilerin olabilmesi için papez devresinin iyi çalışması gerekmektedir (Shah ve ark., 2012) (Şekil 8).



Şekil 8. Papez devresi (Shah ve ark., 2012'den uyarlanmıştır)

2.4.5. Fizyolojisi ve Biyokimyası

Hipokampus yapısında monoaminerjik, kolinerjik ve GABAerjik afferentler mevcuttur. Dokuda en çok salgılanan eksitator transmitterler glutamat ve aspartattır. Stratum oriens tabakasında, somatostatin-immunoreaktif ve glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif lifler, stratum lacunosum'da somatostatin-immunoreaktif lifler, stratum

pyramidale'de glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif ve kolesistokininin (CCK)-immunoreaktif lifler, stratum radiatum'da ise glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif lifler bulunmaktadır. Ayrıca, hipokampusun çoğu bölgelerinde vazoaaktif intestinal polipeptid (VIP) ile CA3 bölgesine giden mossy liflerinde bir opioid peptid olarak bilinen dinorfin yaygın olarak bulunur (Berry ve ark., 1995).

2.4.6. Fonksiyonları

Karmaşık yapısı ve beyindeki birçok bölge ile bağlantılarının olması nedeniyle, hipokampus fonksiyonlarının tanımlanmasında güçlük çekilmektedir (Cooper, 1981). 1948'lere kadar, sadece koku ile ilgili bağlantılarının olduğu düşünülen hipokampusun (Arıncı ve Elhan, 2001), koku yollarının gelişmediği kişilerde de normal bir düzeyde gelişimini tamamladığı ortaya konmuştur (Carpenter ve Sutin, 1983; Berry ve ark., 1995).

İşitme, görme, koku alma, dokunma ve visceral duyular gibi her türlü duyuşsal stimuluslar, minimal düzeyde de olsa hipokampusu aktive etmektedir. Uyarılan hipokampus ise hypothalamus, ventral thalamus ve limbik sistem üyelerine sinyaller göndermektedir. Bu şekilde hipokampus, hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinden önce, limbik sistemi etkileyerek davranışların şekillenmesine neden olur (Vida ve Frotscher, 2000). Bu yüzden, hipokampusun gelen duyuşsal sinyalleri içerisinden geçiren ek bir kanal rolü oynadığı düşünülmektedir (Hall, 2013).

Hipokampusun, kısa süreli hafıza (yeni bilgilerin depolanma kapasitesi) ile çok yakın bir ilişkisi vardır. Bu yüzden, verbal veya sembolik anıların uzun süreli ve kalıcı olabilmesi için sağ ve sol hipokampusa gereksinim vardır (Carpenter ve Sutin, 1983; Hall, 2013). Ayrıca görsel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda sağ, sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda ise sol hipokampus daha fazla aktivite göstermektedir. Bu bölgelerin lezyonlarında da ilgili hafızalarda kayıplar meydana geldiği bildirilmektedir (Kandel ve ark., 2000; Taner, 2005).

Hipokampusun endokrin fonksiyonlar üzerinde de etkili olduğu bildirilmektedir. Hipokampusun uyarılması sonucu ovulasyonda inhibisyonun meydana geldiği gösterilmiştir (Aktan, 1997). Ayrıca, fornixin kesilmesine bağlı olarak adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımında düzensizlikler olduğu saptanmıştır (Aktan, 1997). Bunun yanı sıra, hipokampus yapısının cortex cerebri üzerinde retiküler aktivitenin ayarlanması, heyecanın kontrolü ve iç organlara ait aktivitenin düzenlenmesi gibi işlevleri de mevcuttur (Songur ve ark., 2001).

2.4.7. Lezyonları

Hipokampusun uyarılması sonucu epileptik nöbetlerin oluştuğu bildirilmektedir. Bu nöbetler esnasında kişinin bilinci açıktır ve şahıs gerçek olmadığını bildiği koku, görme, işitme, dokunma ve benzeri tarzda hallusinasyonlar tanımlamaktadır (Dere, 2000; Hall, 2013).

Hipokampusu 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;

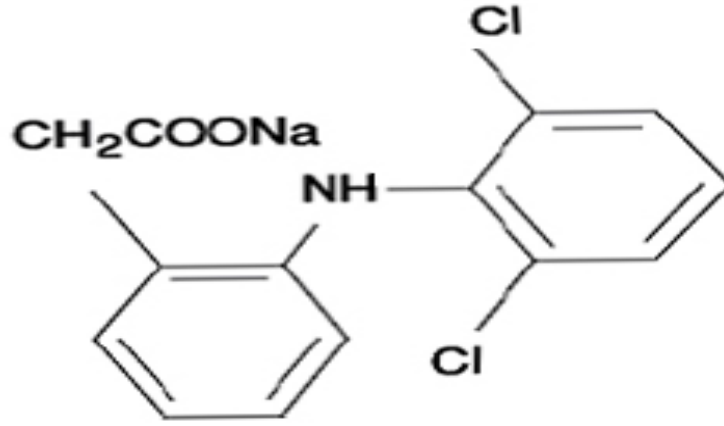
1. Canlı ya da cansız ayrımı yapmaksızın değişik tür ve cinsteki nesnelere karşı seksüel aktivitede artış,
2. İlk defa görülen objelere anlam verememe,
3. Yeni şeyleri hafızada tutma zorluğu,
4. Yeni beceriler elde edememe,
5. Korku ve kızgınlık duygularında azalma, uysallık hali,
6. Beslenme alışkanlıklarında 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 Hipokampusta 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. Diklofenak Sodyum

2.5.1. Diklofenak Sodyumun Farmakolojisi

Çalışmamızda kullandığımız Diklofenak sodyum'un moleküler formülü $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ olup kimyasal formülü şekilde belirtildiği gibidir (Şekil 9).



Şekil 9. Diklofenak sodyum'un moleküler formülü (<http://www.rxlist.com/voltaren-xr-drug.htm>, 2014)

DS [Na (2 (2,6, dicloroanilino) fenil) asetat] fenil asetik asitten türevlenmiş olan (Güven, 2006) NSAİİ'den biridir. Nispeten düşük bir molekül ağırlığa sahiptir (Scholer ve ark., 1986; Siu ve ark., 2000). Bu tür ilaçlar çoğunlukla arthritis, osteoarthritis, romatoid arthritis ve ankilozan spondilit gibi romatik ya da romatik olmayan hastalık durumlarında, travma sonrası ve postoperatif ağrı, ayrıca jinekolojide ağrılı ve/veya enflamatuvar durumlar; örneğin dismenore veya adneksit gibi durumlarda ağrı ateş ve enflamasyonun tedavisinde iltihap giderici, ate düşürücü ve ağrı kesici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Alves ve Duarte, 2002; Kudo ve ark., 2003; Chang ve ark., 2005; Ommaty, 2013).

Aneljezik, antiinflatuar ve antipiretik etkili bir ilaçtır. Romatoid artrite karşı aspirin ve indometazin kadar ve osteoartrite karşıda indometazin derecesinde etkili olmuştur. Bu gruptaki diğer ilaçlara göre mide ve duodenum mukozasını bozucu etkisi daha zayıftır. Plazma proteinlerine fazla bağlanır. DS'nin aspirin ile birlikte verilmesi durumunda plazma düzeyinde belirgin şekilde azalma olur. Böbreklerden ve kısmen karaciğerden itrah edilir. DS bir PG sentetaz inhibitörüdür. NSAİİ'lerin sınıflandırılması aşağıdaki şekilde belirtilmiştir (Şekil 10).

Nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar	
Salisilik asitler	Oksikamlar
1. Asetilsalisilik asit	1. Lornoksikam
2. Diflunisal	2. Piroksikam
3. Metilsalisilat	3. Tenoksikam
4. Sodyum salisilat	Pirazolonlar
Propionik asitler	1. Azapropazon
1. Fenbu fen	2. Fenilbutazon
2. Fenoprofen	3. Metamizol
3. Flurbiprofen	4. Oksifenbutazon
4. İbuprofen	5. Propifenazon
5. Ketoprofen	Diğer narkotik olmayan analjezik ilaçlar
6. Naproksen	1. Benzidamin
7. Oksaprozin	2. Parasetamol
8. Pranoprofen	3. Prokuazon
9. Tiaprofenik asit	Selektif COX₂ inhibitörleri
Asetik asitler	Koksibler
1. Asetemasin	1. Etorikoksib
2. Diklofenak	2. Lumirakoksib
3. İndometasin	3. Rofekoksib
4. Ketorolak	4. Selekoksib
5. Nabumeton	5. Valdekoksib
6. Sulindak	Diğerleri
7. Tolmetin	1. Eto dolak
Fenamotlar	2. Meloksikam
1. Etofenamat	3. Nimesulid
2. Mefenamik asit	
3. Meklofenamat	

Şekil 10. NSAİİ'lerin sınıflandırılması (Kayaalp, 2002)

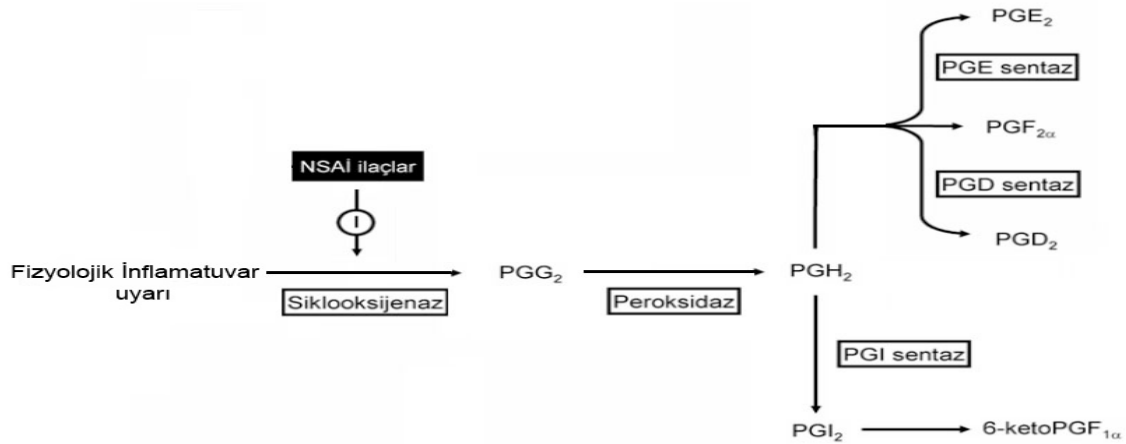
DS'nin % 99'undan fazlası, geri dönüşümlü olarak plazma albuminine bağlanır. Maksimum plazma düzeyine 1,5-2 saatte erişir. En yüksek plazma düzeyine ulaşıldıktan 2-4 saat sonra sinoviyal sıvıda da doruk düzeylere erişilir ve plazmadakinden daha yüksek konsantrasyonda kalır. Çoğunluğu hidroksilasyonla oluşan metabolitleri ve %1'den az miktarı değişmeyen molekül biçiminde idrarla atılır. Geri kalan kısmının atılması ise feçesledir. Böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluklarında, ilacın farmakokinetiği değişmemektedir (Kayaalp, 2002). Aynı şekilde, değişik yaşlardaki hastalarda; absorpsiyon, metabolizma ve eliminasyonda farklılık gözlenmemiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda NSAİİ kullananlarda meme kanseri görülme insidansında azalma olduğu gösterilmiştir.

NSAİ ilaçlar COX enzim sistemi üzerinden, COX-1 ve COX-2 enzimleri aracılığı ile etkisini gösterir (Brunton ve ark., 2009). Düzenli olarak aspirin ya da NSAİİ kullanan insanlarda kolorektal kanser gibi bazı kanser tiplerinin sıklığında azalma gösterilmiştir (Morgan, 1996). Bu etkinin COX'in aracılık ettiği prostaglandin biyosentezinin baskılanması yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2004). Ayrıca; NSAİİ'ler, ailesel

adenomatoz polipozis'li hastalarda premalign kolorektal poliplerde gerilemeye ve bazı kemirgen deneylerinde karsinogenezde inhibisyona neden olurlar (Hashimoto ve ark., 2004).

COX inhibisyonu, prostoglandin 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.

Prostoglandin E₂, prostoglandin I₂ gibi bazı prostoglandinler inflamasyonda görev almaktadır. NSAİİ'lar teropötik etkilerini prostoglandin üretiminde görev alan COX enzimini inhibe ederek gerçekleştirirler (Brunton ve ark., 2009) (Şekil 11).



Şekil 11. PG sentezi ve COX yolunun NSAİİ'ler tarafından inhibisyonu (Brunton ve ark., 2009).

Böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluklarında, ilacın farmakokinetiği değişmemektedir. Aynı şekilde, değişik yaşlardaki hastalarda; absorpsiyon, metabolizma ve eliminasyonda farklılık gözlenmemiştir. Karaciğerde hidroksillenme ve konjugasyon suretiyle inaktive edilir (Kayaalp, 2009).

2.5.2. Gebelikte Diklofenak Sodyum

Plasenta belirli bir dereceye kadar seçici geçirgen olabilmektedir. DS hamileliğin daha ilk trimestiri sürecinde insan plasentasından kolaylıkla geçebilmektedir. NSAİİ prostanoitlerin biyosentezine engel olduklarından plasenta bariyerini geçip fetal dolaşıma katılarak fetusta teratojenik etkilere neden olabilirler (Dawood, 1993; Ostensen ve Ramsey-Goldman, 1998; Zenker ve ark., 1998).

Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi (FDA) var olan klinik deneyimlere göre ilaçları 5 kategoride sınıflandırmıştır:

A kategorisi: İlk trimestirde fetüs üzerinde zararını göstermemiştir. Daha sonraki dönemlerde de ilacın zararlı olduğu hakkında kanıt yoktur. Gebelerde en güvenilir ilaçlardır.

B kategorisi: Teratojenik etki göstermemiştir ama hamilede klinik deney yetersizdir. Deney hayvanında yapılan çalışmalar ilacın fetotoksik etkisinin olduğunu göstermiştir. Ancak hamilelerde yapılan kontrollü çalışmada klinik fetotoksik etkisini göstermemiştir. Gerekli ise gebede kullanılabilir.

C Kategori: İlaçların hayvanlarda embriyosit ve teratojenik etkileri gösterilmiştir, fakat hamilelerde ilaç incelenmesi yetersizdir. Bu tür ilaçların gebe kadınlara sağlayacağı yararın fetüs üzerindeki zararından daha fazla olduğuna inanıldığı durumlarda hekim tarafından kullanımına izin verilmektedir.

D Kategori: İnsanda fetüs üzerinde zararlı etkisi kanıtlanmıştır.

X Kategori: Bu kategorideki ilaçların deney hayvanı ve hamilede fetusa zararlı etkisi gösterilmiştir (Süzer, 2005).

Bizim çalışmamızda kullanılan diklofenak sodyum C kategorisine aittir (Cassina ve ark., 2010).

2.6. Stereoloji

Stereoloji, gerçekte üç boyutlu olan canlı ya da cansız yapıların, iki boyutlu düzlemde elde edilen görüntülerinden yola çıkarak geometrik ve sayısal özellikleri hakkında bilgi elde edilmesini sağlayan bir yöntem bilimidir (Baddeley and Jensen, 2005). Bu yöntem bilimi, belli kurallar dahilinde yapılardan elde edilen dilimlerden, histolojik kesitlerden, bilgisayarlı tomografi ya da manyetik rezonans gibi cihazlardan elde edilen radyolojik görüntülerden ilgili yapılar hakkında güvenilir veriler elde etmek için kullanılan bir dizi yöntemi içerir.

Stereolojik yöntemler; hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi birçok önemli sayısal değere ulaşılabilmeyi sağlamaktadır (West ve ark., 1999).

2.6.1. Stereolojide Tarafsızlık ve Etkinlik Kavramları

Stereolojide tarafsızlık sözcüğü, plan-tabanlı stereolojik yöntemlerin uygulanması ile ortaya çıkan önemli kavramlarından biridir. Çalışma öncesi ve çalışma sürecinde yapıların ilgilenilen geometrik özellikleri hakkında herhangi bir varsayım veya kabulün yapılmaması ve yapının her noktasına eşit örneklenme şansının tanınması, tarafsızlık kavramının özünü oluşturmaktadır (Gundersen, 1986).

Etkinlik, stereolojik yöntemlerde tarafsızlık kadar önemli bir kavramdır. Etkinlik prensibi çalışmalarda kısa zamanda güvenilir sonuca ulaşmak olarak özetlenebilir. Prensibin temelini “Sistemik Rasgele Örneklem” (SRÖ) oluşturur (Canan ve ark., 2002a; 2002b).

2.6.2. Stereolojik Çalışmalarda Sistemik Rasgele Örneklem

Çalışmanın özelliğine de bağlı olmakla birlikte, çoğu zaman yapının tamamında çalışmak gerçekçi olmadığı gibi her zaman mümkün de olmayabilir. Bu nedenle çalışmalarda isteyerek ya da istemeyerek yapıdan örneklem yapmak, sıklıkla tercih edilen yollardan birisidir. Örneklem yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların, gerçek değere yakınlığı ise örneklemenin şekli ile doğrudan ilişkilidir (Canan ve ark., 2002a; 2002b).

Stereolojik çalışmalarda elde edilen verilerin güvenilir ve gerçek değerden sistemik bir sapma göstermemesi için uyulması gereken en önemli noktalardan birisi de örneklemenin doğru yapılmasıdır. Stereolojide kullanılan örneklem şekli SRÖ olarak bilinen örneklem şeklidir. Bu örneklemde ilgilenilen yapının tamamına eşit ihtimallikte örneklem şansı verilmektedir (Canan ve ark., 2002a; 2002b).

2.6.3. Stereolojide Ön Çalışma

Stereolojik çalışmalarda esas çalışmaya başlamadan önce bir ön çalışma yapılarak çalışmanın tamamında kullanılacak bir örneklem planı belirlenir. Ön çalışmada istenen hata miktarına göre yaklaşık olarak ne sıklıkta bir örneklem yapılması gerektiği saptandıktan sonra bu örneklem çalışmadaki diğer bireyler için herhangi bir değişikliğe uğratılmadan uygulanır (Canan ve ark., 2002b).

Uygulamada değişik sıklıktaki farklı örneklemeler istatistiksel analizlere tabi tutularak en uygun örneklem belirlenir ve bu örneklem tüm çalışmaya uygulanır (Kaplan ve ark.,

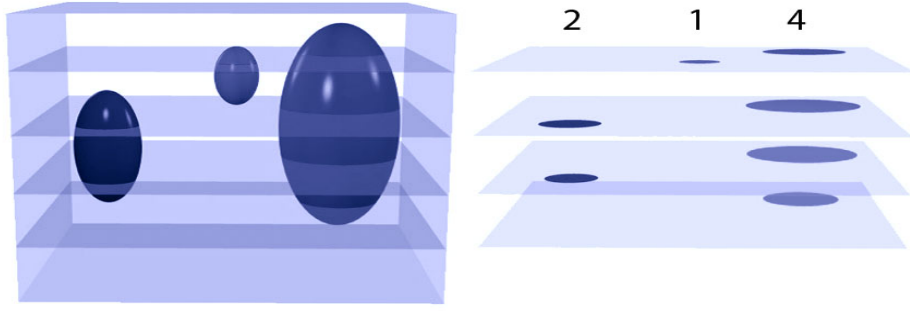
2012a). Çalışmadaki toplam hata miktarı, hata katsayısı (Coefficient of Error) ile belirlenir. Stereolojik bir çalışmanın güvenilirliği için genellikle 0,05 değerinin altında bir hata katsayısı yeterli kabul edilmektedir (West, 1999). Hata katsayısının 0,05 değerinin altında ya da bu değerde tutabilmek için çoğu zaman bir grupta en az 5 hayvanın olması gerekir. Biyolojik varyasyonun hata payına katkısı, çalışılan canlıya göre de değişir. Örneğin sıçan, fare ve civciv gibi deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, istenilen hata katsayısı, 5 adet hayvanın çalışmaya dâhil edilmesi ile sağlanabilir. Çünkü bu hayvanlarda bireyler arasındaki biyolojik varyasyon azdır. Aynı hata katsayısı değerini insan örneklerinden elde edebilmek için ise en az 25 birey üzerinde çalışmak gereklidir (West, 1993). Bunun nedeni ise insanlar arasındaki biyolojik varyasyonun yüksek olmasıdır. Dolayısıyla, yapılan her çalışma belli bir hata katsayısı sınırı içinde gerçekleştirilecek ve bu sınırlar içinde elde edilen veriler, araştırmacı için yeterli güvenlikte olacaktır (Canan ve ark., 2002b).

2.6.4. Stereolojide Boyut Kavramı

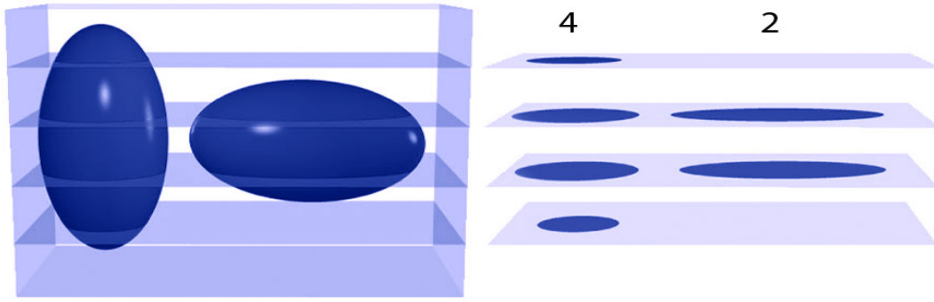
Stereolojide iki boyutlu düzlemde çalışılacak yapıların üç boyutlu şeklinin yorumunu yapabilmek bazı noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir. Kesitlerde gerçekte üç boyutlu olan yapıların, iki boyutlu düzlemdeki izdüşümlerinden yola çıkarak sonuç elde edinilmeye çalışılır. Kesitler ilgili yapının içinden geçerken yapıda bulunan bileşenlerin boy, şekil, hacim ve yönelimlerine bağlı olarak kesit izdüşümleri oluştururlar. Kesit doğrultusundaki bir değişim, eğer ilgilenilen doku içindeki partikül dağılımı izotropik değilse farklı izdüşümlerin oluşumuna neden olmaktadır (Kaplan ve ark., 2012a) (Şekil 12). Boyut kavramıyla yakından ilgili diğer bir terim ise sonda'dır. Sonda, hesaplanacak yapının boyutuna göre uygun biçimde hazırlanan (1 boyutlu, 2 boyutlu, 3 boyutlu) geometrik şekillerdir. Yani, stereolojide yapılar sonda denilen çeşitli geometrik şekillerle (nokta sondası, çizgi sondası, düzlem sondası ve disektör denen hacim sondası) araştırılır. Kural olarak incelenecek yapının boyutu ve sonda boyutunun toplamı üç etmelidir. Bir başka deyişle tek boyutlu uzunluk iki boyutlu düzlem sondası, iki boyutlu alan tek boyutlu çizgi sondası, üç boyutlu hacim boyutsuz nokta sondası ve boyutsuz tanecik sayısı üç boyutlu disektör hacim sondası ile çalışılmalıdır (Kaplan ve ark., 2012b) (Şekil 13).

■

A

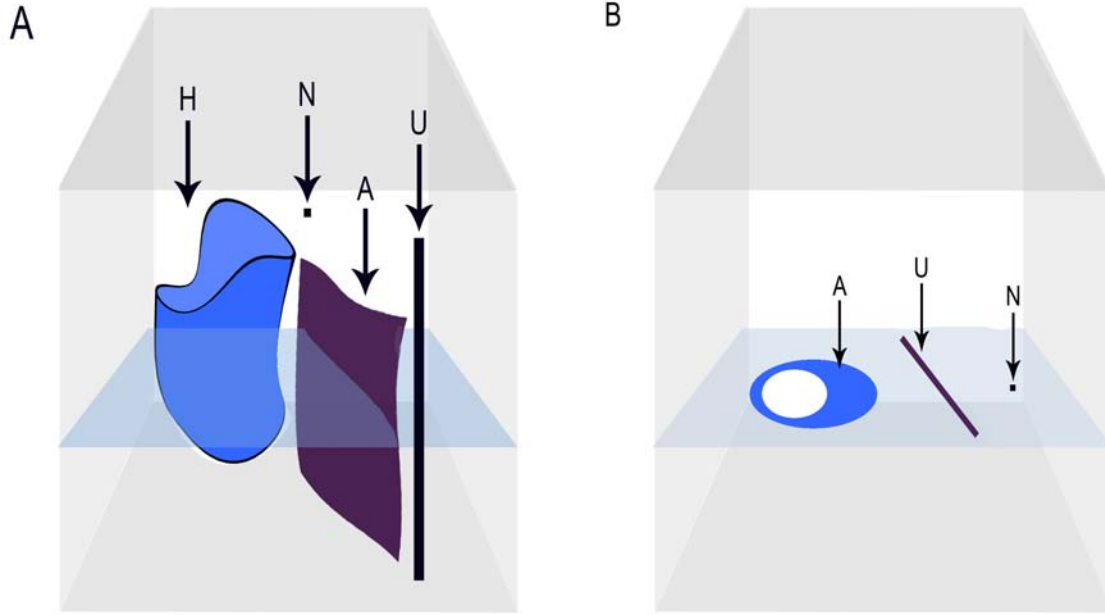


B



Şekil 12. Tanecik boyutu taraflı sayım metotlarının kullanıldığı çalışmalarda sonuçları olumsuz etkilemektedir. Seri histolojik kesitlerde farklı boyuttaki tanecikler (**A**) ile aynı boyutta ancak farklı yönelimde olan tanecikler (**B**) farklı sayıda profil izdüşümü verirler. Büyük tanecikler küçük olanlara göre daha fazla izdüşüm vermektedir. Her bir izdüşümün sayılması dokuda gerçekte var olan tanecik sayısı hakkında doğru bilgi elde etmeyi imkansız hale getirmektedir (Kaplan ve ark., 2012a' dan uyarlanmıştır)

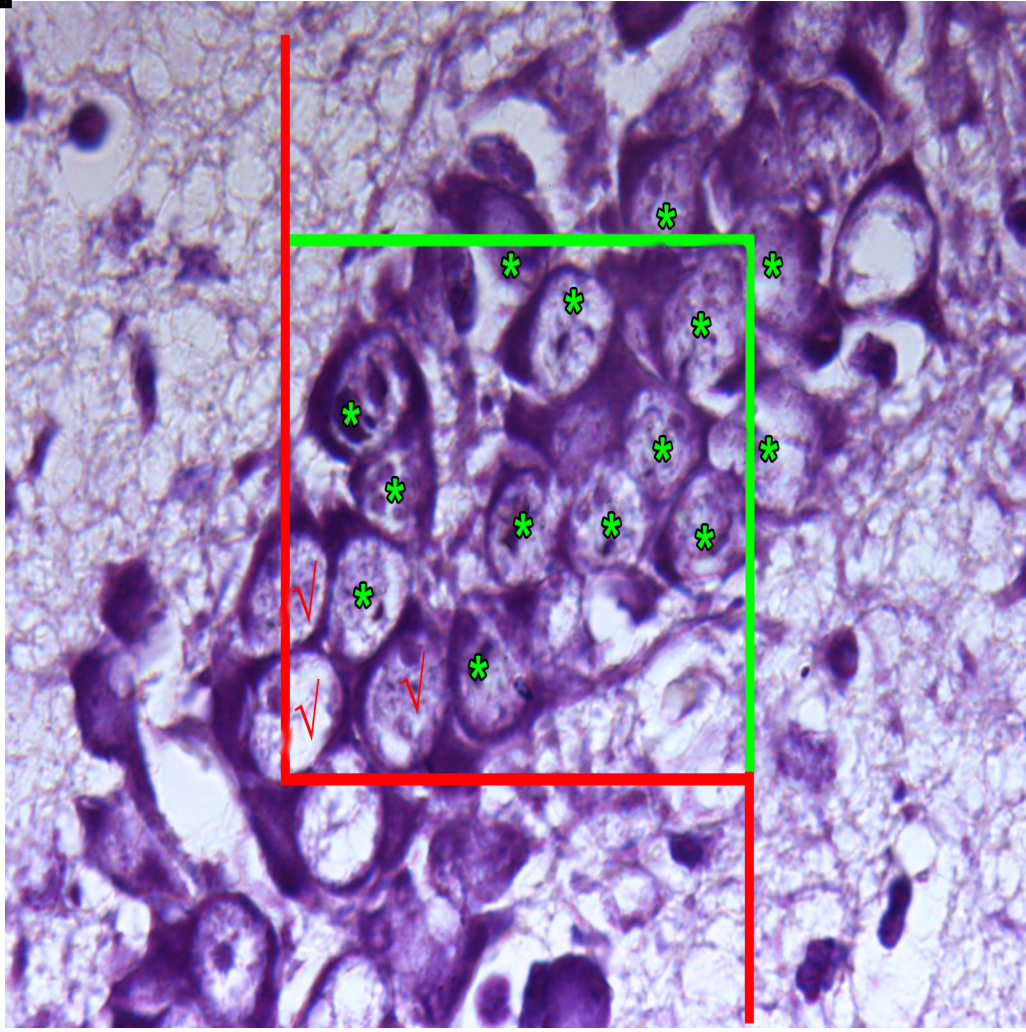
■



Şekil 13. Üç boyutlu yapıdan (A) geçen iki boyutlu bir düzlemde (B) biyolojik taneciklerin görünümü. Kesim düzlemi üzerinde hacim (H) alan (A) profili olarak, alan uzunluk (U) profili olarak, uzunluk ise nokta (N) profili olarak görülmektedir. Noktasal parametreler ise iki boyutlu kesim düzlemi üzerinde fark edilebilir değildir (Kaplan ve ark., 2012a'dan uyarlanmıştır)

2.6.5. Tarafsız Sayım Çerçevesi

Tarafsız sayım çerçevesi mikroskobik görüntü alanında sayım işlemini tarafsız olarak standardize etmek için geliştirilmiştir. Tarafsız sayım çerçevesi, komşu iki kenarı serbest, diğer komşu iki kenarı yasak olan ve bu yasak kenarların uzantılarının sonsuza doğru uzanan bir dörtgen veya karedir (Şekil 14). Kenarların isimlerinden de anlaşılacağı gibi serbest kenarlarla (yeşil çizgiler) temas eden tanecikler sayılırken yasak kenarlara (kırmızı çizgi) ve bunların uzantılarına temas edenler sayım dışı bırakılır. Tarafsız sayım çerçevesinin kuralı olarak içine düşen tanecikler doğal olarak sayılmaktadır (Kaplan ve ark., 2012a).



Şekil 14. Tarafsız sayım çerçevesi, Kırmızı tik işareti; sayıma dahil edilmeyen nöronları, yeşil yıldız; sayıma dahil edilen nöronları göstermektedir.

2.6.6. Stereolojide Tanecik Sayımı: Disektör

Tanecik ilgilenilen doku bileşeni olarak ifade edebilir. Bu sözcüğün anlamı ve içeriği, yapılan çalışmaya göre değişir. Çalışmanın özelliğine göre ilgilenilen yapı, glomerül, hücre, çekirdek, organel, sinaps veya çekirdekçik olabilir. Örneğin sinir hücreleri ile ilgili bir stereolojik çalışmada sinir hücresi tanecik olarak isimlendirilir (Kaplan ve ark., 2012b).

Bir yapıyı mikroskopik düzeyde çalışabilmek için bunun kesitlerinin elde etmek zorundayız. Kesitlerde ortaya çıkan tanecik izdüşümlerinin tamamı sayılırsa elde edilen değer, bize gerçek sayı hakkında doğru bilgi vermeyecektir. Bunun nedeni kesitlerdeki izdüşümler, taneciklerin büyüklüğüne ve yönelimine göre değişmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi sayı boyutsuz bir parametre olmasından dolayı, parametre boyutu + sonda boyutu = 3 olması

kuralından dolayı, tanecik sayımı yapılacağı zaman üç boyutlu hacim (disektör) sondasının kullanılması gerekmektedir (Ünal ve ark., 2002a).

Disektör yönteminin fiziksel ve optik disektör olarak iki uygulama şekli vardır. Biz çalışmamızda optik disektör kullandık. Optik disektör uygulaması kalın kesitlerle yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Bu uygulama için ideal kesit kalınlığı histolojik işlemlerden sonra en az 15–20 µm (t) olmalıdır. Bunun nedeni kesitin üst ve alt yüzeylerinde güvenlik kuşağı olarak adlandırılan yaklaşık 2 µm'lik mesafelerin arasında kalan 8–10 µm'lik mesafede sayım yapılmasıdır. Güvenlik kuşağının, kesit yüzeyinde meydana gelebilecek pürüzler veya yüzeylerde bulunan yarım kesilmiş tanecikler gibi kesit kalınlığına ve tanecik sayısına etki edebilecek bir kısım etkilerden kurtulmak için gerekli olduğu savunulmaktadır (West, 1993).

Optik disektörde tanecik sayımı, seçilen örnekleme alanında kesit kalınlığı boyunca oluşturulan optik kesitler arasında oluşturulan sanal küpler olarak da adlandırabileceğimiz disektör sondası içerisinde yapılır. Bu yöntemde sayım yapılırken, önce görüntü kaybolana kadar kesitin üst yüzüne çıkılır, daha sonra mikrovida ile yavaşça aşağıya (dokunun içine) doğru ilerlenir. Dokunun ilk net olarak belirdiği an da mikrokator sıfırlanır. Burası kesitin üst yüzüdür. Buradan itibaren bırakılan güvenlik kuşağından sonra ön çalışmada belirlenen yükseklik (h) kadar doku içine girilerek tarafsız sayım çerçevesi kurallarına uyularak tanecik sayımı yapılır. Bu esnada sayıma dâhil edilen tanecikler disektör taneciği (Q⁻) olarak adlandırılır. Bu yükseklik sayılan taneciğin Z eksenindeki (zemine dik olan) uzunluğundan daha fazla olmalıdır (Sterio, 1984). Optik disektörde belirli bir hacim içinde sayım yapıldığından elde edilen değer sayısal yoğunluktur (NV).

$$NV = \Sigma Q^{-} / \Sigma V_{dis}$$

NV: Sayısal yoğunluk

ΣQ^{-} : Toplam disektör taneciği sayısı

ΣV_{dis} : Toplam disektör hacmi

Toplam tanecik sayısını hesaplamak için ise, yapının toplam hacminin bilinmesi gereklidir. Örneğin, beyindeki hipokampus bölgesinin birim hacmindeki sinir hücresi sayısı disektör yöntemiyle hesaplanmış ise, toplam sayıya ulaşmak için, hipokampus bölgesinin toplam hacminin de bilinmesi gerekir. Bunun için en uygun ve tarafsız yöntem Cavalieri hacim hesaplama yöntemidir. Tarafsız bir yöntemle elde edilmiş olan toplam hacim değeri, disektör yönteminden elde edilen sayısal yoğunluk değeri ile çarpıldığında ($N = NV \times V_{ref}$) ilgilenilen taneciklerin yapıdaki toplam sayısının tarafsız bir hesabı yapılır (Ünal ve ark., 2002b).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi

Çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden sağlanan 28 adet *Wistar albino* cinsi 280-300 g ağırlığında, yetişkin dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü uygulanan, standart sıcaklık ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) ve neme sahip odalardaki plastik kafeslerde tutuldu. Hayvanlar çeşme suyu ve palet halindeki standart sıçan yemiyle beslendi. Ardından dişiler gebe kalabilmeleri için ayrı kafeslerde erkek sıçanlarla birkaç gün çiftleşmeye bırakıldı. Çiftleşmenin ertesi günü vaginal plak gözlenen sıçanlar, gebeliğin sıfırncı gününde oldukları kabul edildi. Çalışmamız Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 28.02.2011 tarih ve 2011/11 sayılı karar ile onaylanmıştır.

3.2. Deney Protokolü

Çalışmada yer alan ve rastgele seçilen dişi erişkin ratlar ikişer olarak 14 adet farklı kafese ayrıldı. Denek gruplarına (3,6mg/kg, 9mg/kg ve 18mg/kg) DS, serum fizyolojik grubuna ise aynı dönem içinde 1ml/kg serum fizyolojik intramüsküler olarak enjekte edildi. Pür kontrol grubuna ise hiçbir işlem yapılmadı. Doğuma yakın gebe ratların diğer yavrulara zarar vermemesi için her hayvan ayrı kafese alındı. Voltaren SR 75 adlı ilacın aktif maddesi olan DS için Novartis Sağlık, Gıda Ve Tarım Ürünleri Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Kurtköy-Pendik, İstanbul) tarafından ürün desteği alındı. Bütün gruplardaki gebe ratlar ortalama olarak gebeliğin 21. gününde yavrularını doğurdu ve yeni doğan yavru ratlar ortalama 7 cm boya ve 0,006 gr ağırlığa sahipti. Yavruların 7. günde ise boyları ortalama 9 cm, ağırlıkları ise 0,012 gr'a ulaştı (Şekil 15).



Şekil 15. Yedi günlük yavru rat görüntüsü

3.3. Diklofenak Sodyum Stok Solusyonun Hazırlanışı

10,8 mg diklofenak sodyum 1ml distile su içinde çözüldü. Vortex kullanılarak çözeltinin homojen olması sağlandı. 300 gr hayvan için enjekte edilecek 3,6 mg/kg'lık doz için stoktan 0,1 ml; 9 mg/kg'lık doz için stoktan 0,25 ml; 18 mg/kg'lık doz için stoktan 0,5 ml ilaç enjeksiyonu yapıldı.

3.4. Çalışma Grupları ve Uygulanan İşlemler

Çalışmada ratlar için Letal doz (LD 50) olarak 90 mg/kg kabul edildi (Hirose et al., 1984; Liles ve Flecknell, 1992). Uygulanan dozlar: *I. doz (yüksek) olarak* LD 50 dozunun 1/5 (18 mg/kg), *2. doz (orta) olarak* LD 50 dozunun 1/10 (9 mg/kg), *3. doz (düşük) olarak* LD 50 dozunun 1/25'i (3,6 mg/kg) kullanıldı.

Gebe hayvanlara ilaç enjeksiyonu farklı gebelik (G) periyotlarında yapıldı. Bu noktada hipokampusun gelişim dönemi dikkate alındı (Clancy, 2001). Bu periyotlar: *I. trimester* dönemi için G1 - G7 arası (7 gün), *II. trimester* dönemi için G8 - G14 arası (7 gün), *III. trimester* dönemi için G15 - G21 arası (7 gün) ve bütün gebeliği kapsayan G1.-G21 arası olarak belirlendi.

Uygulanan dozlar ve gebelik dönemleri dikkate alındığında çalışmamızda toplam 14 grup oluşturuldu.

Bu gruplar ve gruplara ait yapılan kodlandırmalar sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

1. Grup: 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (A1 grubu)
2. Grup: 08-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (A2 grubu)
3. Grup: 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (A3 grubu)
4. Grup: 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (A4 grubu)
5. Grup: 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (B1 grubu)
6. Grup: 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (B2 grubu)
7. Grup: 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (B3 grubu)
8. Grup: 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (B4 grubu)
9. Grup: 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (C1 grubu)
10. Grup: 08-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (C2 grubu)
11. Grup: 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (C3 grubu)
12. Grup: 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu (n:6) (C4 grubu)
13. Grup: Pür Kontrol (Hiçbir işlem yapılmadı) (n:6) (D grubu)
14. Grup: Serum Fizyolojik (1 ml SF enjeksiyonu) (n:6) (E grubu)

3.5. Anestezi İşlemi

Yavru ratlara yüksek doz anestezi ile ötenazi yapıldı. Anestezi dozu olarak 50 mg/kg ketaminhidroklorid (Ketalar ampul, Eczacıbaşı), 10 mg/kg xylazine (Rompun ampul, Bayer) karışımı enjekte edildi. Enjeksiyon işlemi intraperitoneal olarak gerçekleştirildi. Yavrular anesteziden sonra spontan solunuma bırakıldı. Anesteziye, deney sırasında ağrıya yanıtız olacakları şekilde devam edildi ve doku diseksiyonu için solunumlarının durmasına kadar beklendi.

3.6. Perfüzyon ve Fiksasyon İşlemi

Yedi günlük erkek yavru ratlar intrakardiyak perfüzyon yapılması için uygun büyüklükte olmadığından bu işlem yapılamadı. Yüksek doz anestezi sonucu ötenazi yapılan yavruların kafaları bedenlerinden ayrıldı. Ayrılan kafanın derisi uzaklaştırıldı (Şekil 16). Daha ince bir kıkırdak plak olan kafatası soyulup içindeki beyin çıkarıldı ve diseke edilen beyinler %10'luk tamponlu formaldehit'in bulunduğu etiketli numune kaplarına konuldu.

Dokular formaldehit içinde 10 gün bekletilerek fikse edilmesi sağlandı. Daha sonra rutin doku takip işlemleri ve stereolojik analiz işlemlerine geçildi.



Şekil 16. Yedi günlük yavru ratdan diseke edilen beyin dokusu

3.7. Histolojik Takip İşlemi

% 10' luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 10 gün bekletilip fikse edilen beyin dokularının ışık mikroskopik takibi yapıldı.

3.7.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Doku takibi Thermo Fisher Scientific marka Shandon Citadel 2000 model doku takip cihazında, otomatik olarak aşağıda belirtilen süreli programla yapıldı (Şekil 17).

- 1) Dokular gruplar halinde kasetler içinde 1 gece akar suda yıkamaya bırakıldı.
- 2) Dehidratasyon işlemi için alkol serisinden geçirildi.
% 70'lik alkolde 1saat bekletildi.
% 80'lik alkolde 1 gece bekletildi.
% 96'luk alkolde 1 saat (2 kez)
% 100'lük alkolde 1 saat (2 kez)
- 3) Şeffaflaştırma işlemi için ksilen serisinden geçirildi.

Ksilen 30 dk

Ksilen 15 dk

4) Paraplast serisinden geçirildi.

Paraplast 1 saat

Paraplast 1 saat

Paraplast 45 dakika

5) Gömme

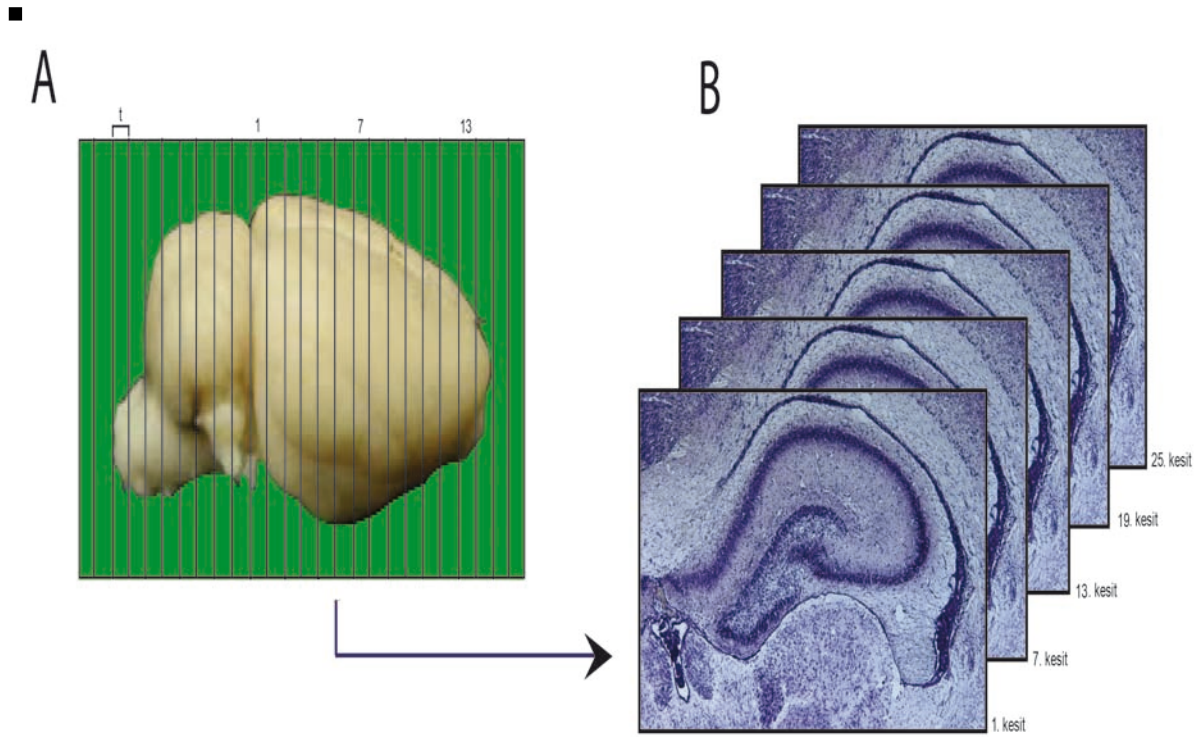


Şekil 17. Doku takip cihazı

3.7.2. Kesit Alma İŞlemi

Takibi yapılan dokular bloklandı. Elde edilen bloklardan mikrotom aracılığıyla

(Leica RM 2125RT, Germany) stereolojik incelemeler için sistematik rastgele örnekleme mantığı çerçevesinde 20 mikron kalınlığında 1/6 örnekleme ve histopatolojik incelemeler için ise 7 mikron kalınlığında 1/18 örnekleme ile kesitler alındı (Şekil 18A, B). Kalın kesitler lam üzerinde boyama sırasında dökülmelerini engellemek için jelâtinli sıcak su banyosuna konularak açıldı ve kuruması beklendi. Etüvde üzerinde kesit bulunan lamlar 59⁰C etüv içinde 1 gece bekletilerek deparafinize edilmesi sağlandı. Daha sonra boyama işlemine geçildi.



Şekil 18. Sistematik rastgele örnekleme ile t mikron kalınlığında 1/6 örnekleme ile alınan kesitlerin şematik gösterimi

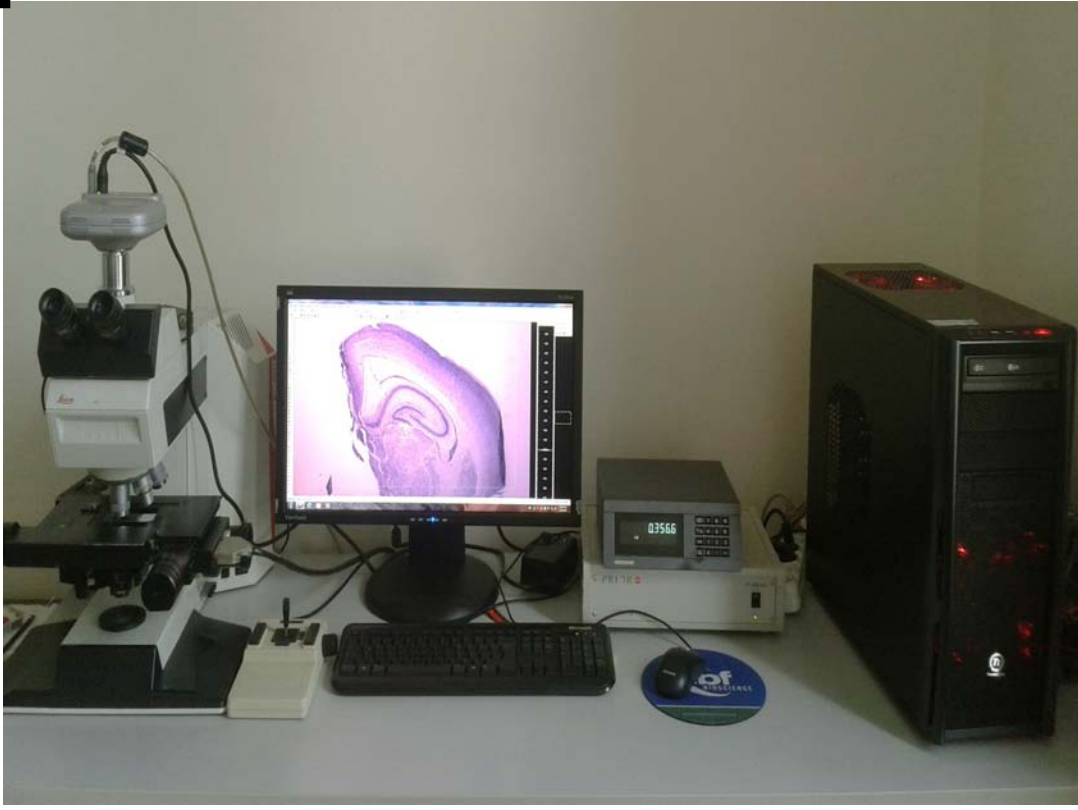
3.7.3. Krezil vyolet Boyama İşlemi

0,1 gr krezil vyolet (Merck, Cresyl violet acetate, FN 1107635, Germany) 100 ml distile suya katılarak boya hazırlandı. Hazırlanan boya boyamaya başlamadan etüve konuldu. Boyama işlemi aşağıda verilen prosedüre uygun olarak yapıldı.

1. Ksilen 15 dakika (4 kez)
2. %100'lük alkol 10 dakika (2 kez)
3. %96'lık alkol 5 dakika (2 kez)
4. %80'lik alkol 10 dakika
5. Distile su 10 dakika
6. Krezil viyoleet boyası 4 dakika
7. Distile su 2 dakika
8. % 70 alkol 5 dakika
9. % 80 alkol 5 dakika
10. % 96 alkol 5 dakika
11. Ayırıştırma solüsyonu 7 dakika (Solusyon: 500ml %96 alkol + 10 damla glasiyal asetik asit).
12. % 96 alkol 5 dakika
13. % 100 alkol 10 dakika
14. Ksilen 15 dakika (3 kez)
15. Entellan ile kapama

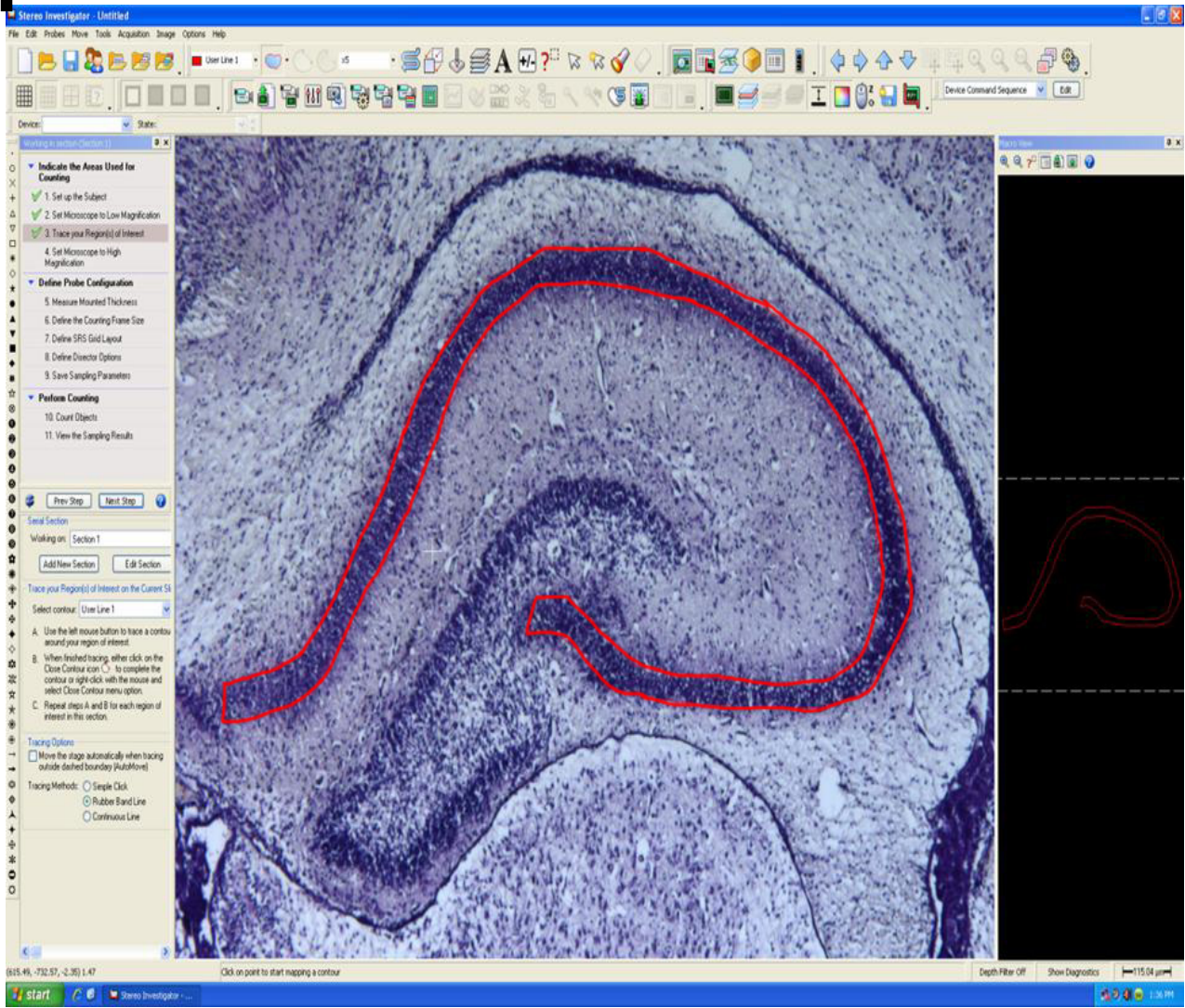
3.8. Kesitler Üzerinde Stereolojik Analiz

Çalışmada, hipokampustaki toplan nöron sayısını hesaplamada özel bir yazılıma sahip bilgisayar destekli stereolojik analiz sistemi (9.0., MicroBrieldField; Colchester; USA) kullanıldı. Sistem Leica marka bir mikroskop, Heidenhain marka bir mikrokatör ve tablayı hareket ettiren motorize bir joystickten oluşmaktadır (Şekil 19).



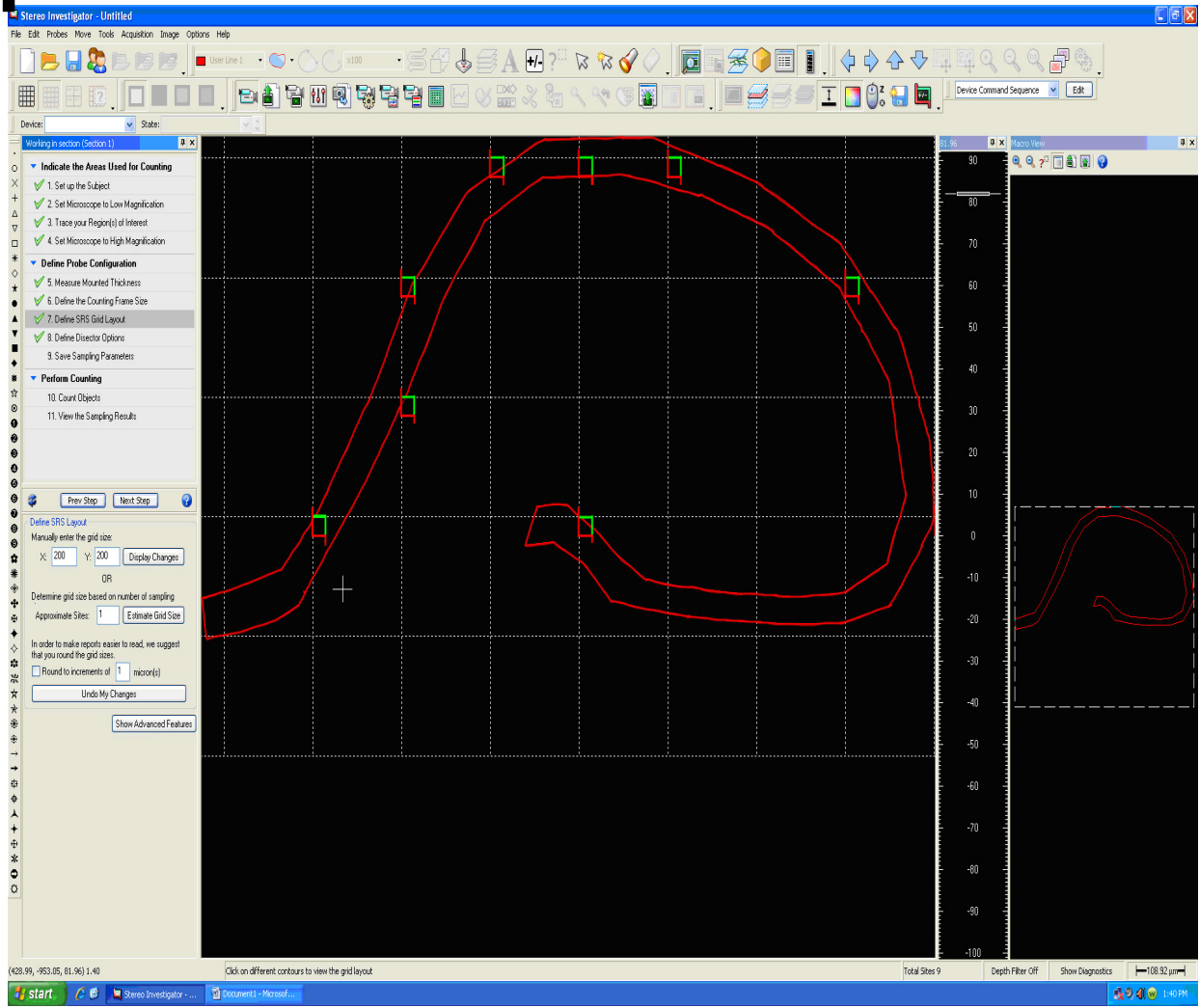
Şekil 19. Stereolojik analiz sistemi

Kesitler, mikroskop tablasına yerleştirdikten sonra üzerinde ölçüm yapacağımız hipokampus alanının dış hatları program yardımıyla çizilerek belirlendi (Şekil 20).



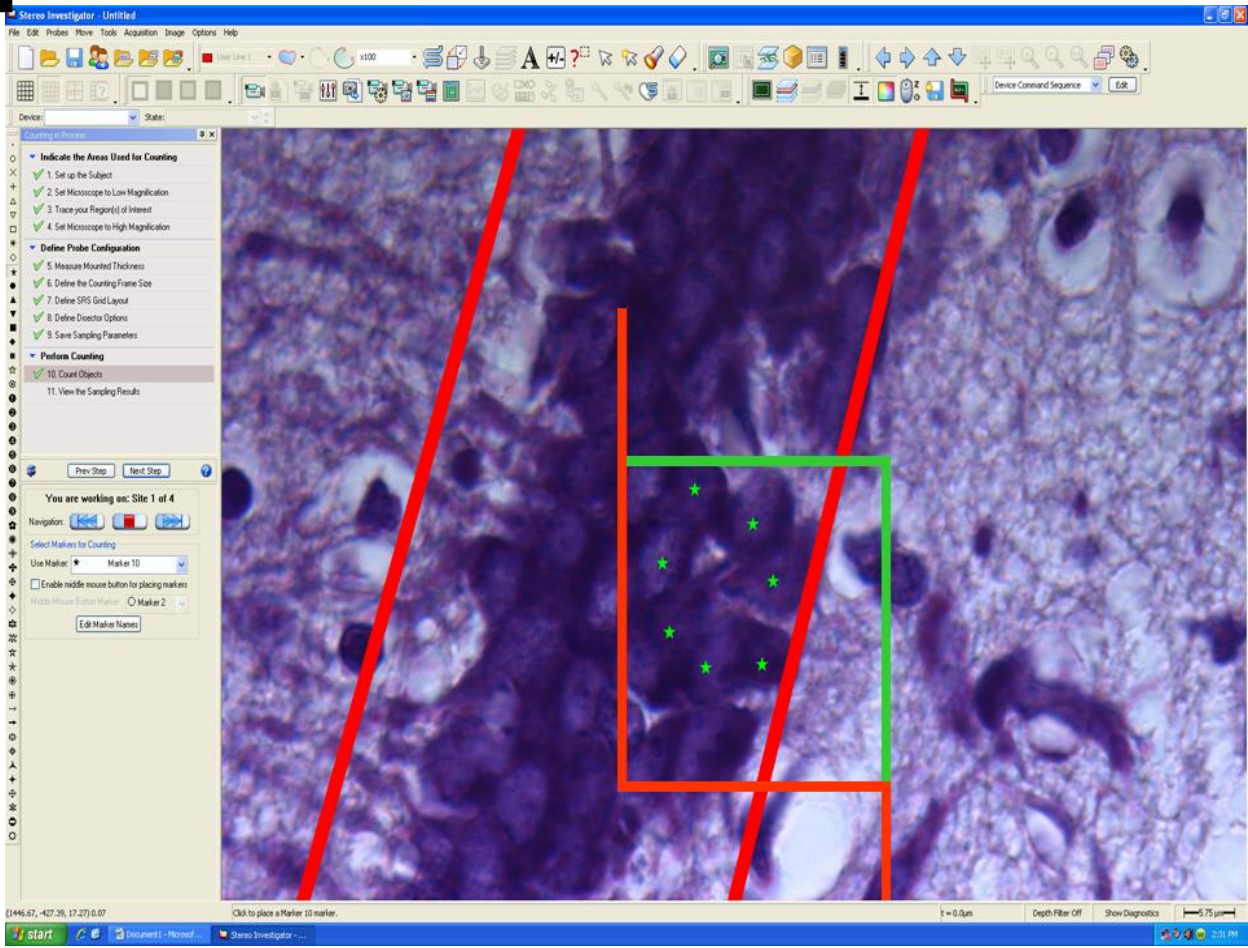
Şekil 20. Analiz için alanı çevrelenmiş hipokampus

Ölçüm yapılacak alanlar belirlendikten sonra, optik parçalama metodu ile birbirinden eşit aralıklarla ayrılmış olan optik disektör sondaları rastgele bir açıyla kesit üzerine yerleştirildi. Bilgisayarda kullanılan yazılım bu imkânı sağlamaktadır (Şekil 21).



Şekil 21. Analiz için alanı çevrelenmiş hipokampus alanına rastgele yerleştirilmiş olan tarafsız sayım çerçeveleri

Çalışmamızda kullanılan optik disektörlerin büyüklüğü ve optik parçalamada belirlenen adım aralıkları uygun bir hata katsayısı değerine göre belirlendi (Gundersen ve Jensen 1987). Sonraki aşamalarda, beyin kesitleri üzerindeki optik disektör sondalarının içine ya da sayılabilir kenarlarına denk gelen nöronlar uygun marker ile işaretlenerek sayıma dâhil edildi (Şekil 22).

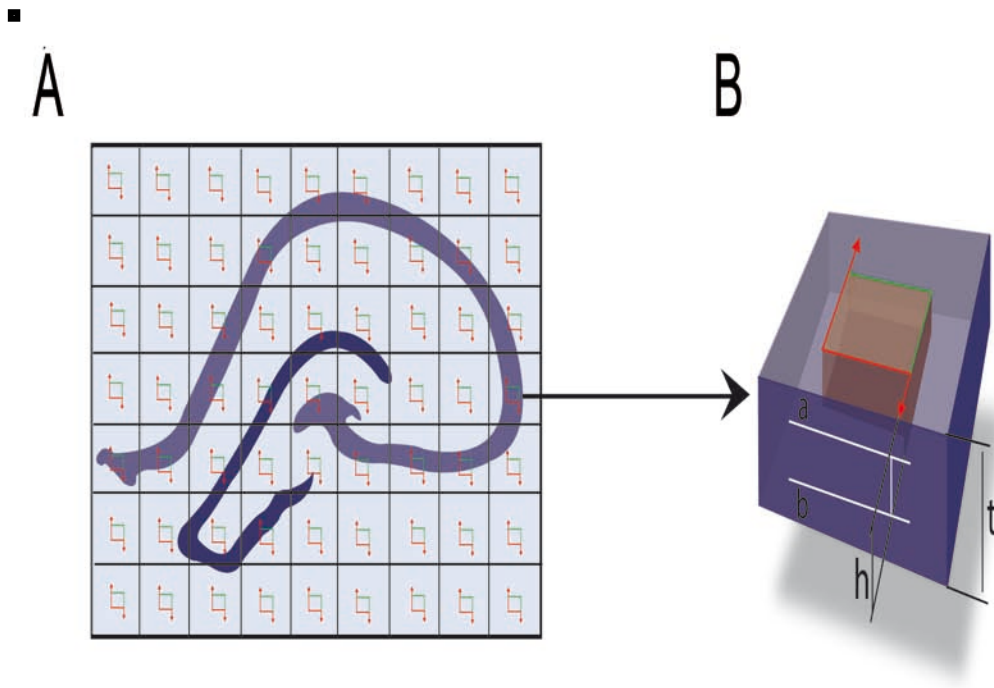


Şekil 22. Hipokampus alanına rastgele yerleştirilmiş olan tarafsız sayım çerçeveleri ve sayıma dahil edilen işaretli nöronlar

Belirli bir hacime sahip olan optik disektör sondası (tarafsız sayım çerçevesi) (Şekil 23) içine düşen noktalar işaretlendikten sonra, aşağıda ifade edilen formül yardımıyla kesitlerdeki toplam nöron sayısı çalışma boyunca kullanılan örnekleme oranları da dikkate alınarak hesaplandı.

$$N = \frac{1}{a.o.p} \cdot \frac{1}{k.o.p} \cdot \frac{1}{k.a.o.p} \cdot \Sigma Q'$$

Formülde; a.ö.p: Alan örnekleme payı, k.ö.p: Kesit örnekleme payı, k.a.ö.p: Kalınlık örnekleme payı, Q' : Sayılan tanecik miktarı, N= Hesaplanan toplam tanecik sayısını göstermektedir. Çalışmamızda örnekleme çerçeve 30µm x 30µm, alan örnekleme 200µm x 200µm olarak belirlendi.



Şekil 23. Tarafsız sayım çerçevesi ve belirli bir hacime sahip olan optik disektör sondası

3.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 21.0 for Mac (IBM Corporation) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Analiz öncesi normallik testi yapıldı. Normallik testi sonucu verilerin normal 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.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Bu çalışmada 84 adet *Wistar albino* cinsi erkek yavru ratlar kullanılmıştır. Denekler yüksek doz anestezi altında ötenaziden sonra beyin dokuları dikkatlice çıkarılmıştır. Ayrıca; yavru hayvanların dış görünümünde ve iç organlarında herhangi bir malformasyon gözlenmemiştir.

4.2. Stereolojik Bulgular

Çalışmamızda kullanılan tüm gruplardaki deneklerden elde edilen 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.

4.2.1. CA1 Alanında Elde Edilen Bulgular

CA1 alanında ortalama nöron sayısı hesaplanması sonucu elde edilen bulgular ve değişim katsayıları aşağıda sunulmuştur (Tablo 1; Şekil 24-25).

Tablo 1. Bütün gruplara ait CA1 bölgesinde yer alan ortalama nöron sayısı ve değişim katsayısı değerleri (OSH; Ortalama standart hata)

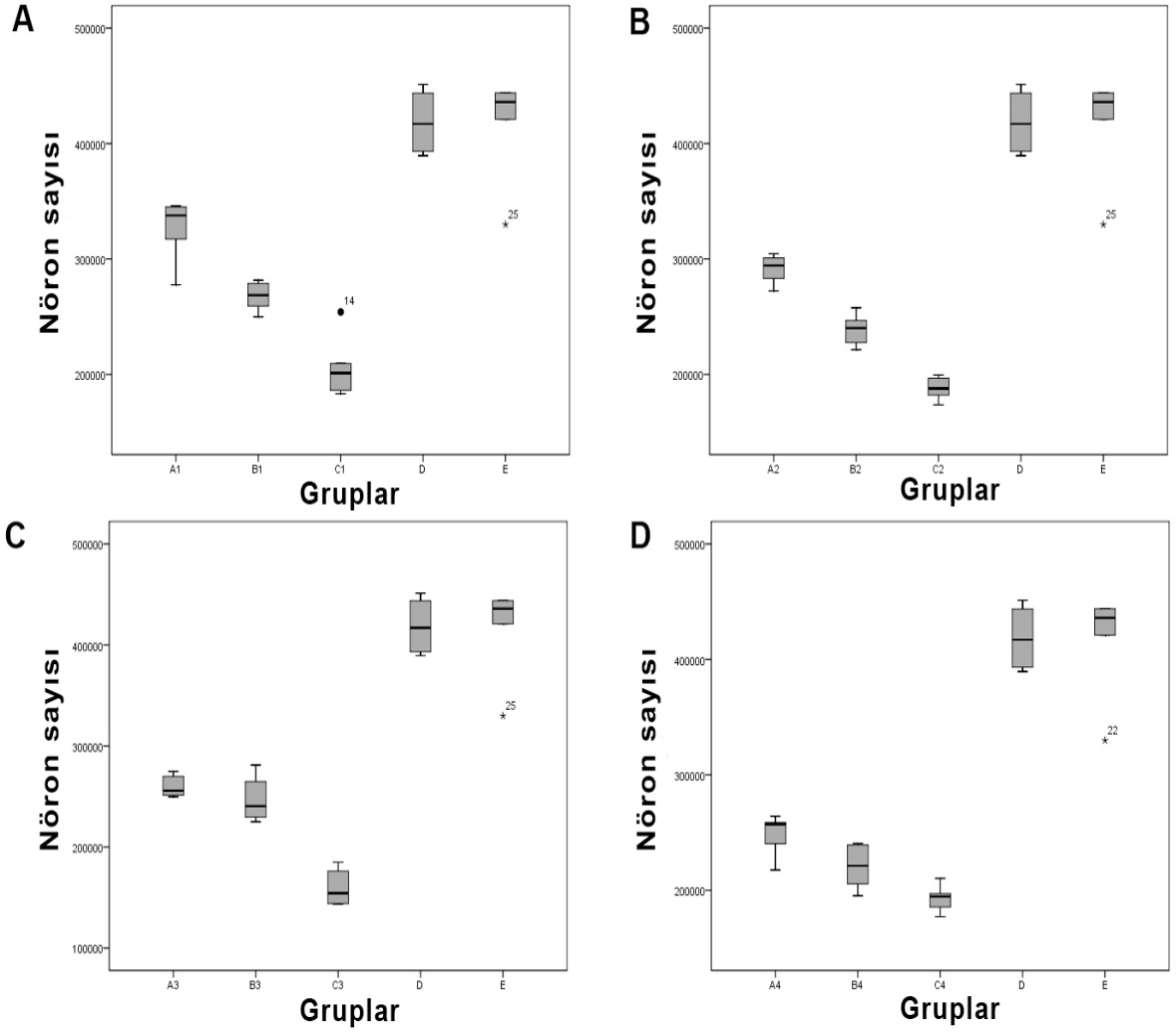
GRUPLAR	CA1 BÖLGESİ NÖRON SAYISI (ORTALAMA ± OSH)	DEĞİŞİM KATSAYISI
A1	326896 ± 9878	0,07
A2	291602 ± 4718	0,04
A3	259545 ± 3839	0,04
A4	247625 ± 7596	0,07
B1	267836 ± 4464	0,04
B2	238982 ± 4935	0,05
B3	246983 ± 8411	0,08
B4	220402 ± 8029	0,08
C1	205933 ± 9597	0,11
C2	187933 ± 3718	0,05
C3	159577± 6481	0,1
C4	192954 ± 5007	0,06
D	418632 ± 10563	0,06
E	418514 ± 16520	0,1

Çalışmamızda kullanılan deneklerden elde edilen hipokampus örneklerinin CA1 bölgelerinde bulunan nöron sayıları aşağıdaki prosedüre göre kıyaslanmıştır.

CA1 Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının Doza Bağlı Olarak Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre aynı gebelik döneminde farklı DS dozu uygulamasına maruz bırakılan A, B ve C eşlenik grupları (A1-B1-C1; A2-B2-C2; A3-B3-C3 ve A4-B4-C4 grupları) kendi içerisinde kıyaslandı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan D ve E gruplarından ve söz konusu A, B ve C eşlenik gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu kıyaslamaya göre; A1, B1 ve C1 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,01$). Ayrıca; A2, B2 ve C2 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,01$). A3 ile B3 grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) fakat C3 grubu ile iki grup arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Bu sonuçlara ek olarak; A4 ile B4 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) fakat C4 grubu ile iki grup arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$). D ve E grupları arasında ise anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Fakat D ve E grupları ile DS uygulanan tüm gruplar arasında ileri derecede anlamlı bir fark vardı ($p<0,01$) (Şekil 24A-D).

CA1 BÖLGESİ

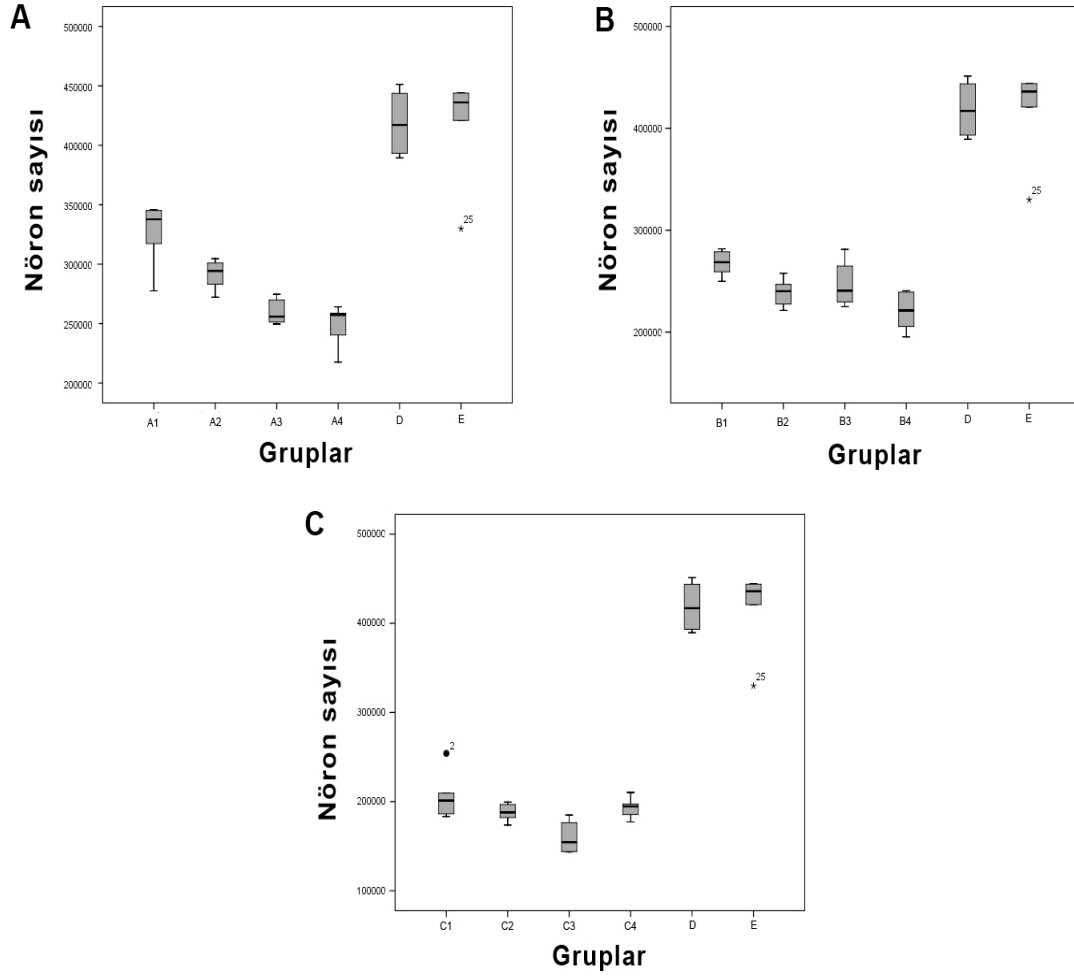


Şekil 24. Aynı gebelik dönemlerinde uygulanan farklı dozlara göre karşılaştırılan gruplara ait CA1 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir. (**A1:** 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A2:** 8-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A3:** 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A4:** 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **B1:** 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B2:** 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B3:** 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B4:** 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **C1:** 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C2:** 8-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C3:** 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C4:** 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **D:** Pür kontrol; **E:** Serum fizyolojik)

CA1 Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının DS'nin Uygulandığı Gebelik Dönemine Göre Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre; farklı gebelik dönemlerinde aynı DS dozu uygulamasına maruz bırakılan A, B ve C eşlenik grupları (A1-A2-A3-A4; B1-B2-B3-B4; C1-C2-C3-C4; grupları) kendi içerisinde kıyaslandı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan D ve E gruplarından ve söz konusu A, B ve C eşlenik gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu kıyaslamaya göre; A1 ile A3 ve A1 ile A4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,01$). A2 grubunun diğer gruplarla arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). B1, B2, B3 ve B4 grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$). C1, C2, C3 ve C4 grupları arasında ise anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Ayrıca; D ve E grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Fakat D ve E grupları ile DS uygulanan tüm gruplar arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$) (Şekil 25A- C).

CA1 BÖLGESİ



Şekil 25. Farklı gebelik dönemlerinde uygulanan aynı doz DS'ye göre karşılaştırılan gruplara ait CA1 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir. (**A1:** 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A2:** 8-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A3:** 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A4:** 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **B1:** 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B2:** 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B3:** 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B4:** 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **C1:** 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C2:** 8-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C3:** 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C4:** 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **D:** Pür kontrol; **E:** Serum fizyolojik)

4.2.2. CA2 Alanında Elde Edilen Bulgular

CA2 alanındaki ortalama nöron sayısı hesaplanması sonucunda elde edilen bulgular ve değişim katsayıları aşağıda sunulmuştur (Tablo 2; Şekil 26-27).

Tablo 2. Bütün gruplara ait CA2 bölgesinde yer alan ortalama nöron sayısı ve değişim katsayısı değerleri

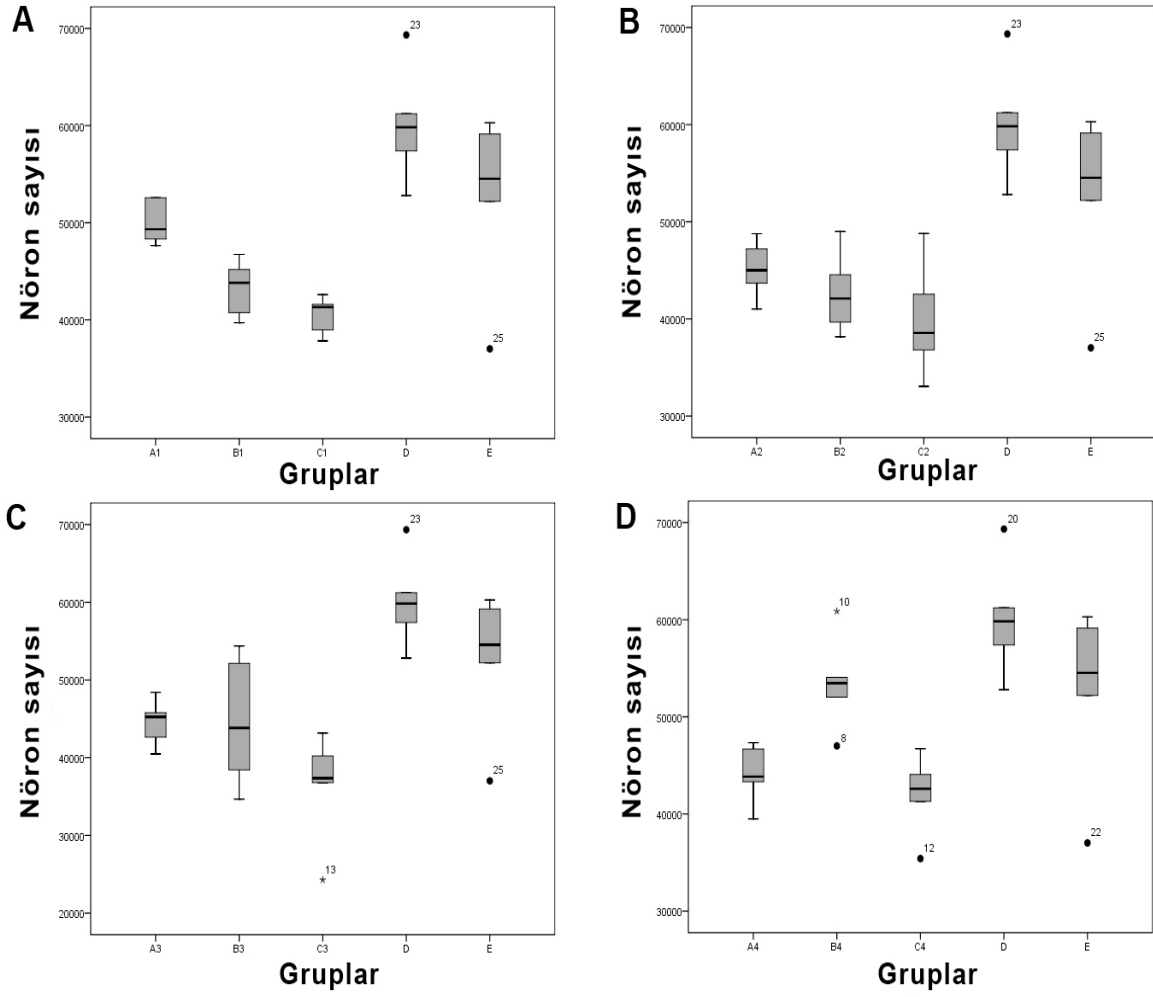
GRUPLAR	CA2 BÖLGESİ NÖRON SAYISI (ORTALAMA ± OSH)	DEĞİŞİM KATSAYISI
A1	49529 ± 639	0,03
A2	45118 ± 1032	0,06
A3	44636 ± 1023	0,06
A4	44136 ± 1251	0,06
B1	43333 ± 990	0,06
B2	42594 ± 1455	0,08
B3	44543 ± 2846	0,16
B4	53489 ± 1991	0,08
C1	40609 ± 675	0,04
C2	39722 ± 2052	0,13
C3	36526 ± 2412	0,16
C4	42015 ± 1682	0,09
D	60072 ± 2033	0,08
E	52953 ± 3124	0,14

Çalışmamızda kullanılan deneklerden elde edilen hipokampus örneklerinin CA2 bölgelerinde bulunan nöronların sayısı aşağıdaki prosedüre göre kıyaslanmıştır.

CA2 Alanında Hesaplanan Nöron Sayılarının Doza Bağlı Olarak Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre aynı gebelik döneminde farklı DS dozu uygulamasına maruz bırakılan A, B ve C eşlenik grupları (A1-B1-C1; A2-B2-C2; A3-B3-C3 ve A4-B4-C4 grupları) kendi içerisinde kıyaslandı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan D ve E gruplarından ve söz konusu A, B ve C eşlenik gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu kıyaslamaya göre; A1, B1 ve C1 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Fakat D ve E gruplarının B1 ve C1 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark saptanırken ($p<0,01$), A1 grubu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$), (Şekil 26A). Ayrıca; A2, B2 ve C2 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Fakat D grubu ile A2, B2 ve C2 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark vardı ($p<0,01$). E grubunun A2 ve B2 grupları ile arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0,05$), C2 grubu ile arasında ileri derecede anlamlı bir fark bulundu ($p=0,01$) (Şekil 26B). A3, B3 ve C3 grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Fakat D grubu ile A3, B3 ve C3 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). E grubu ile A3 ve B3 grupları arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0,05$), C3 grubu ile arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$) (Şekil 26 C). Ayrıca; A4, B4 ve C4 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). E grubu ile A4, B4 ve C4 grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı gözlenirken ($p>0,05$), D grubu ile A4 ve C4 grupları arasında ileri derecede anlamlı fark olduğu bulundu ($p<0,01$), (Şekil 26D). Ayrıca D ve E grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$).

CA2 BÖLGESİ

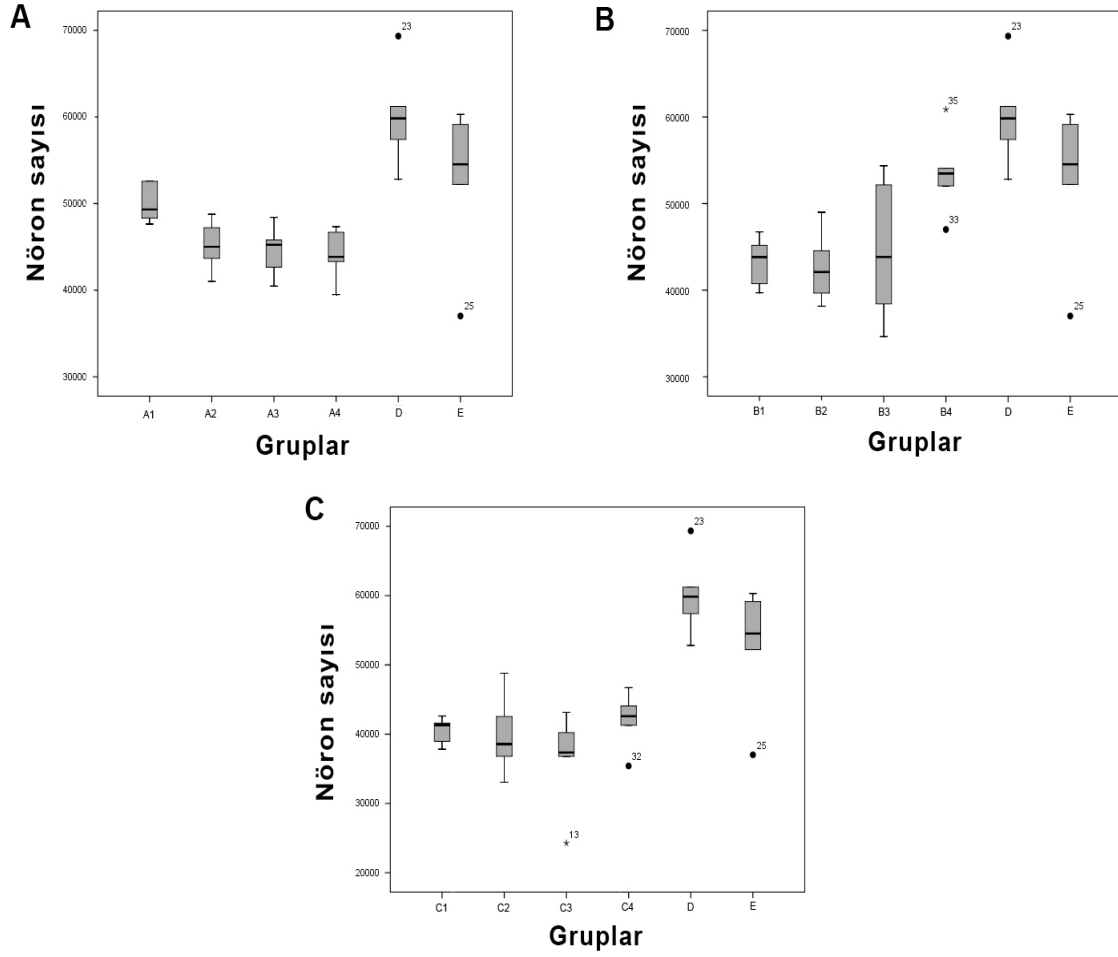


Şekil 26. Aynı gebelik döneminde uygulanan farklı dozlara göre karşılaştırılan gruplara ait CA2 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir.(**A1:** 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A2:** 8-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A3:** 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A4:** 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **B1:** 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B2:** 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B3:** 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B4:** 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **C1:** 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C2:** 8-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C3:** 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C4:** 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **D:** Pür kontrol; **E:** Serum fizyolojik)

CA2 Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının DS'nin Uygulandığı Gebelik Dönemine Göre Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre; farklı gebelik dönemlerinde aynı DS dozu uygulamasına maruz bırakılan A, B ve C eşlenik grupları (A1-A2-A3-A4; B1-B2-B3-B4; C1-C2-C3-C4; grupları) kendi içerisinde kıyaslandı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan D ve E gruplarından ve söz konusu A, B ve C eşlenik gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu kıyaslamaya göre; A1, A2, A3 ve A4 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanırken ($p>0,05$), D grubu ile A2, A3 ve A4 grupları arasında ileri derecede anlamlı fark olduğu saptandı ($p<0,01$). E grubu ile A1, A2, A3 ve A4 grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$), (Şekil 27A). B1, B2, B3 ve B4 grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$). Fakat D grubu ile B1, B2 ve B3 grupları arasında ileri derecede anlamlı fark olduğu belirlendi ($p<0,01$). E grubu ile B1, B2, B3 ve B4 grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$), (Şekil 27B). Ayrıca; C1, C2, C3 ve C4 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$). Fakat D grubu ile C1, C2, C3 ve C4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,01$). E grubu ile C1, C2 ve C3 grupları arasında ise ileri derecede anlamlı fark olduğu gözlemlenirken ($p<0,01$), (Şekil 27C), D ve E grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$).

CA2 BÖLGESİ



Şekil 27. Farklı gebelik dönemlerinde uygulanan aynı doz DS'ye göre karşılaştırılan gruplara ait CA2 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir. (**A1:** 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A2:** 8-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A3:** 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A4:** 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **B1:** 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B2:** 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B3:** 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B4:** 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **C1:** 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C2:** 8-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C3:** 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C4:** 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **D:** Pür kontrol; **E:** Serum fizyolojik)

4.2.3. CA3 Alanında Elde Edilen Bulgular

CA3 alanında ortalama nöron sayısı hesaplanması sonucunda elde edilen bulgular ve değişim katsayıları aşağıda sunulmuştur (Tablo 3; Şekil 28-29).

Tablo 3. Bütün gruplara ait CA3 bölgesinde yer alan ortalama nöron sayısı ve değişim katsayısı değerleri

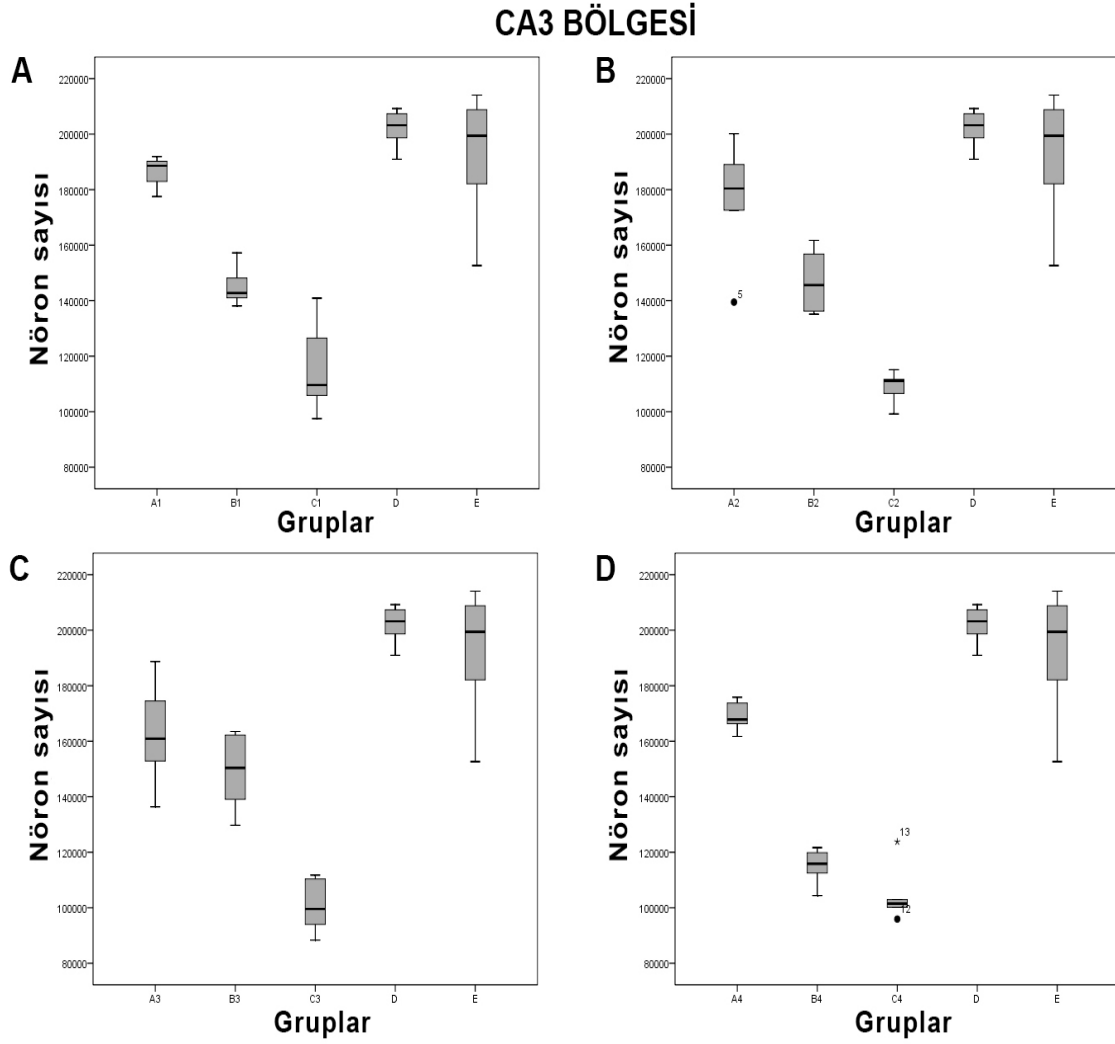
GRUPLAR	CA3 BÖLGESİ NÖRON SAYISI (ORTALAMA ± OSH)	DEĞİŞİM KATSAYISI
A1	186641 ± 2013	0,03
A2	177012 ± 7705	0,11
A3	162385 ± 6697	0,1
A4	169094 ± 2285	0,03
B1	145000 ± 2578	0,04
B2	146851 ± 4503	0,08
B3	149208 ± 5033	0,08
B4	114842 ± 2740	0,05
C1	114996 ± 5906	0,13
C2	109151 ± 2084	0,05
C3	93978 ± 7954	0,2
C4	104860 ± 4359	0,09
D	202103 ± 2481	0,03
E	192751 ± 8397	0,11

Çalışmamızda kullanılan deneklerden elde edilen hipokampus örneklerinin CA3 bölgelerinde bulunan nöronların sayısı aşağıdaki prosedüre göre kıyaslandı.

CA3 Alanında Hesaplanan Nöron Sayılarının Doza Bağlı Olarak Değerlendirilmesi

Bu değerlendirmeye göre aynı gebelik döneminde farklı DS dozu uygulamasına maruz bırakılan A, B ve C eşlenik grupları (A1-B1-C1; A2-B2-C2; A3-B3-C3 ve A4-B4-C4 grupları) kendi içerisinde kıyaslandı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan D ve E gruplarından ve söz konusu A, B ve C eşlenik gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmaya göre; A1 ile B1 ve A1 ile C1 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark saptanırken ($p < 0,01$), D ve E grupları ile A1 grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$). B1 ve C1 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,01$), (Şekil 28A). Ayrıca; A2 ile C2 ve B2 ile C2 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark vardı ($p < 0,01$). Buna karşılık D ve E grupları ile A2 grubu arasında anlamlı bir fark yokken ($p > 0,05$), B2 ve C2 grupları arasında ileri derecede anlamlı fark olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$), (Şekil 28B). B3 ile C3 ve A3 ile C3 grupları arasında ise ileri derecede anlamlı fark olduğu saptanırken ($p < 0,01$), A3 ve B3 grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$). D grubu ile A2, B2 ve C2 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p < 0,01$). E grubu ile B3 ve C3 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark varken ($p < 0,01$), A3 grubu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$), (Şekil 28C). Ayrıca; A4 ile B4 ve A4 ile C4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p < 0,01$). Fakat D ve E grupları ile B4 ve C4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$). A4 grubu ile D ve E grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p > 0,05$), (Şekil 28D). Ayrıca D ve E grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p > 0,05$).

■

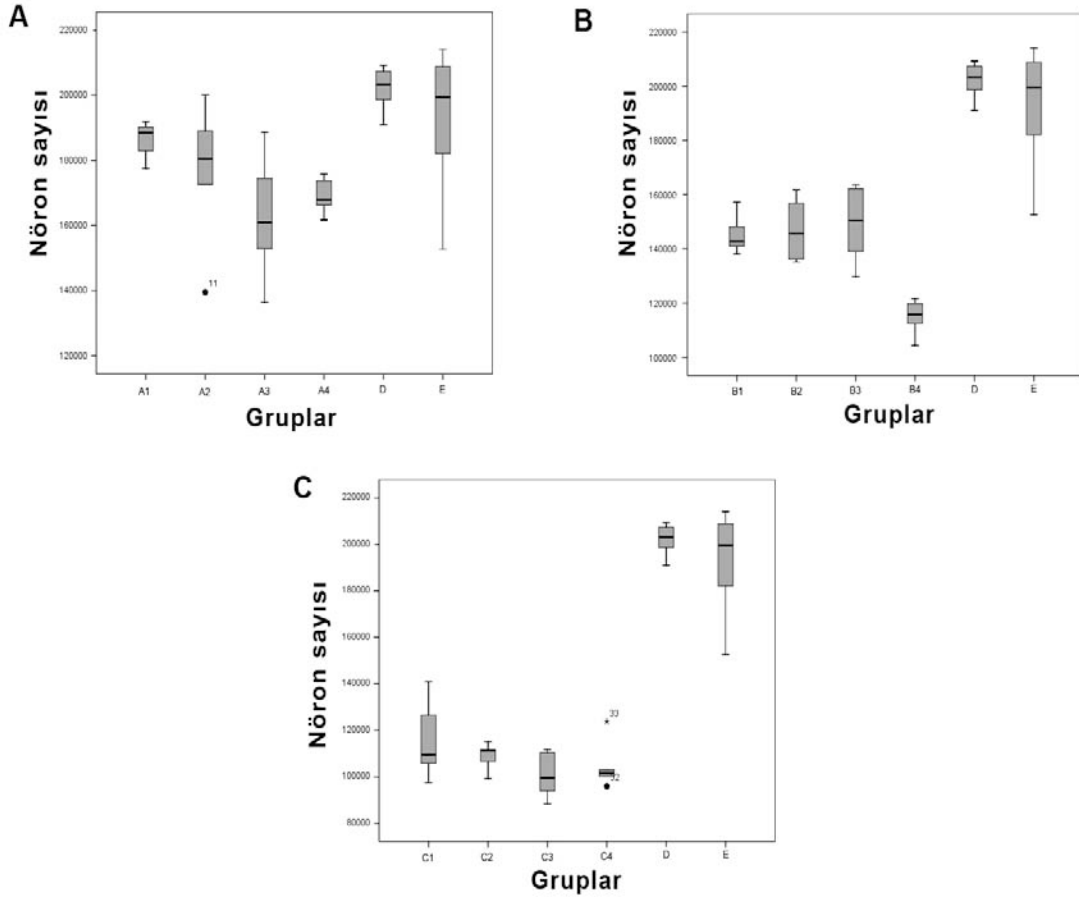


Şekil 28. Aynı gebelik döneminde uygulanan farklı dozlara göre karşılaştırılan gruplara ait CA3 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir.(**A1:** 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A2:** 8-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A3:** 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A4:** 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **B1:** 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B2:** 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B3:** 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B4:** 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **C1:** 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C2:** 8-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C3:** 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C4:** 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **D:** Pür kontrol; **E:** Serum fizyolojik)

CA3 Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının DS'nin Uygulandığı Gebelik Dönemine Bağlı Olarak Değerlendirilmesi

Bu değerlendirmeye göre; farklı gebelik dönemlerinde aynı DS dozu uygulamasına maruz bırakılan A, B ve C eşlenik grupları (A1-A2-A3-A4; B1-B2-B3-B4; C1-C2-C3-C4; grupları) kendi içerisinde kıyaslandı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan D ve E gruplarından ve söz konusu A, B ve C eşlenik gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu kıyaslamaya göre; A1, A2, A3 ve A4 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$). D grubu ile A1, A2 ve A4 grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken ($p>0,05$), A3 grubu ile ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$). E grubu ile A1, A2, A3 ve A4 grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$), (Şekil 29A). Ayrıca; B1, B2, B3 grupları arasında da anlamlı bir farkın olmadığı saptandı ($p>0,05$). Buna karşılık B3 ve B4 grupları arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). D ve E grupları ile B1, B2, B3 ve B4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark vardı ($p<0,01$), (Şekil 29B). Ayrıca C1, C2, C3 ve C4 grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p>0,05$). D ve E grupları ile C1, C2, C3 ve C4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark gözlenirken ($p<0,01$), (Şekil 29C), D ve E grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$).

CA3 BÖLGESİ



Şekil 29. Farklı gebelik dönemlerinde uygulanan DS'ye göre karşılaştırılan gruplara ait CA3 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir. (**A1:** 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A2:** 8-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A3:** 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A4:** 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **B1:** 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B2:** 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B3:** 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B4:** 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **C1:** 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C2:** 8-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C3:** 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C4:** 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **D:** Pür kontrol; **E:** Serum fizyolojik)

4.2.4. Tüm Hipokampustaki Nöron Sayısına İlişkin Elde Edilen Bulgular

Hipokampus alanındaki ortalama toplam nöron sayısının hesaplanması sonucu elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur (Tablo 4) (Şekil 30-31).

Tablo 4. Bütün gruplara ait tüm hipokampusta yer alan ortalama nöron sayısı ve değişim katsayısı değerleri

GRUPLAR	HİPOKAMPUS TOPLAM NÖRON SAYISI (ORTALAMA ± OSH)	DEĞİŞİM KATSAYISI
A1	563141 ± 11195	0,05
A2	513805 ± 11913	0,06
A3	466567 ± 10085	0,05
A4	460856 ± 7883	0,04
B1	456169 ± 5533	0,03
B2	428426 ± 7606	0,04
B3	440734 ± 11910	0,07
B4	388733 ± 10782	0,06
C1	361537 ± 14297	0,1
C2	336806 ± 5661	0,04
C3	290081 ± 12897	0,11
C4	339829 ± 8516	0,06
D	680881 ± 12890	0,05
E	671559 ± 28613	0,1

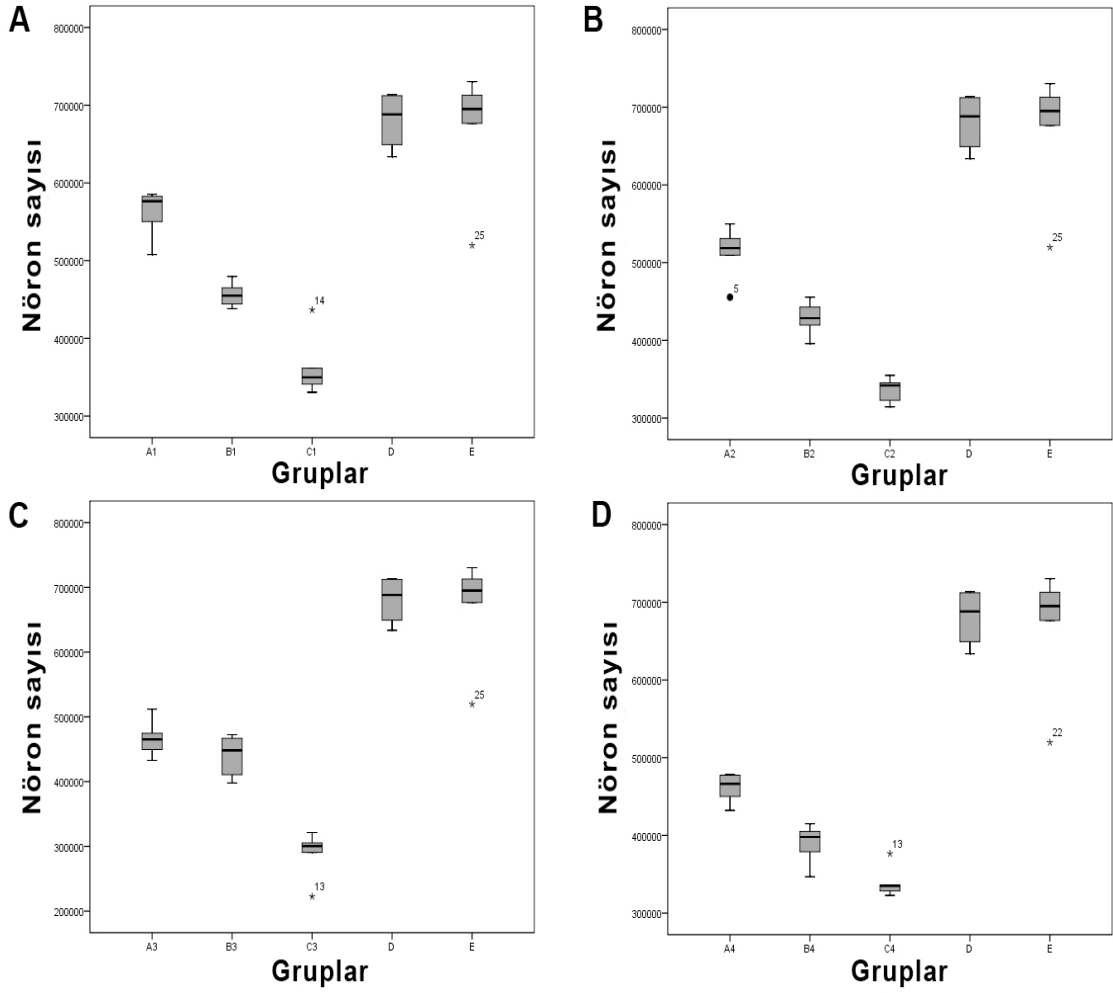
Çalışmamızda kullanılan deneklerden elde edilen hipokampus örneklerinin bütün hipokampus alanında bulunan nöronlarının sayısı aşağıdaki prosedüre göre kıyaslandı.

Bütün Hipokampus Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının Doza Bağlı Olarak Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre aynı gebelik döneminde farklı DS dozu uygulamasına maruz bırakılan A, B ve C eşlenik grupları (A1-B1-C1; A2-B2-C2; A3-B3-C3 ve A4-B4-C4 grupları) kendi içerisinde kıyaslandı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan D ve E gruplarından ve söz konusu A, B ve C eşlenik gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmaya göre; A1, B1 ve C1 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$). D ve E grupları ile A1, B1 ve C1 grupları arasında da ileri derecede anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,01$), (Şekil 30A). Hem A2, B2 ve C2 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark ($p<0,01$) hem de D ve E grupları ile A2, B2 ve C2 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,01$), (Şekil 30B). B3 ile C3 ve A3 ile C3 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark vardı ($p<0,01$). D ve E grupları ile A3, B3 ve C3 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,01$), (Şekil 30C). Ayrıca A4 ile C4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$). Buna karşın A4 ile B4 ve B4 ile C4 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenirken ($p>0,05$), D ve E grupları ile A4, B4 ve C4 grupları arasında ileri derecede anlamlı fark olduğu saptandı ($p<0,01$), (Şekil 30D). D ve E grupları arasında da anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$).

■

HİPOKAMPUS (CA1+CA2+CA3)

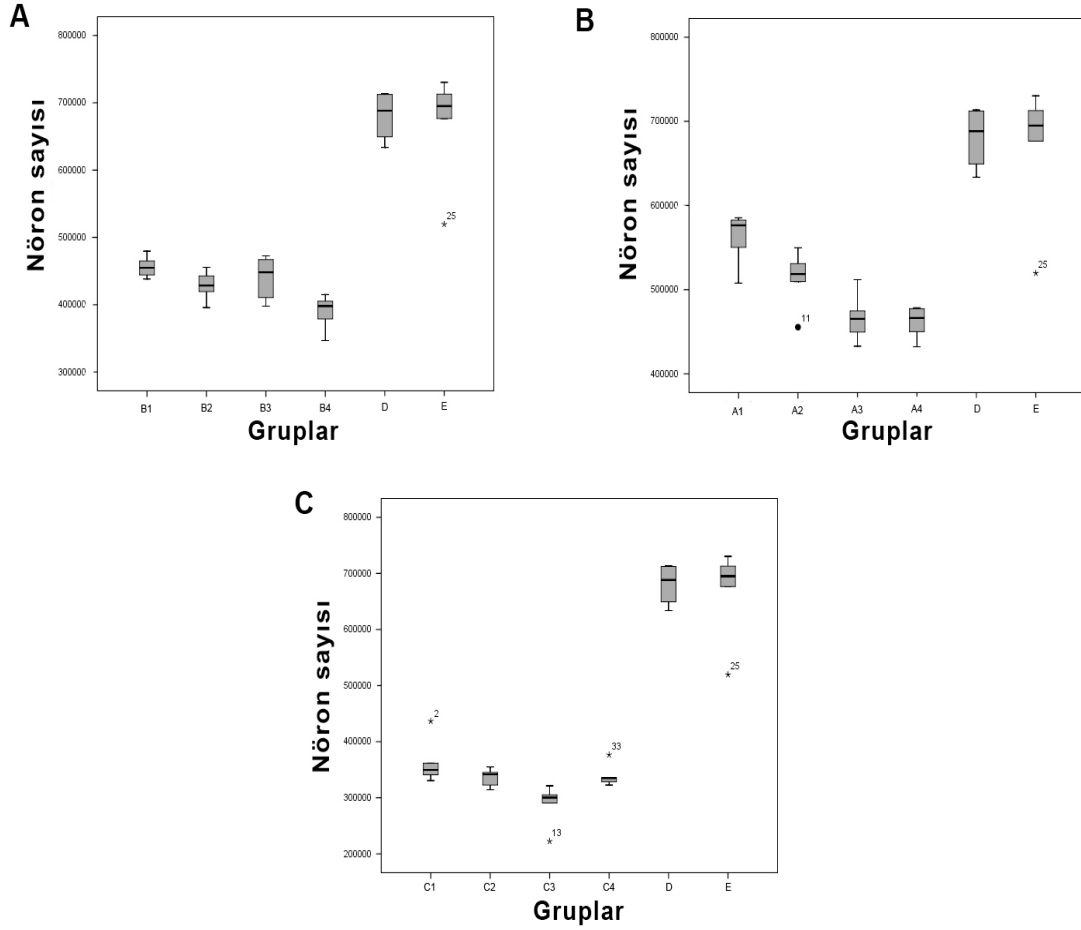


Şekil 30. Aynı gebelik döneminde uygulanan farklı dozlara göre karşılaştırılan gruplara ait tüm hipokampusta hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir. (**A1:** 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A2:** 8-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A3:** 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A4:** 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **B1:** 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B2:** 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B3:** 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B4:** 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **C1:** 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C2:** 8-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C3:** 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C4:** 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **D:** Pür kontrol; **E:** Serum fizyolojik)

Bütün Hipokampus Alanında Hesaplanan Nöron Sayısının DS'nin Uygulandığı Gebelik Dönemine Bağlı Olarak Değerlendirilmesi:

Bu değerlendirmeye göre; farklı gebelik dönemlerinde aynı DS dozu uygulamasına maruz bırakılan A, B ve C eşlenik grupları (A1-A2-A3-A4; B1-B2-B3-B4; C1-C2-C3-C4; grupları) kendi içerisinde kıyaslandı. Ayrıca kontrol ve sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan D ve E gruplarından ve söz konusu A, B ve C eşlenik gruplarından elde edilen bulgular da birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmaya göre; A1 ile A3 ve A1 ile A4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Ayrıca; D ve E grupları ile A1, A2, A3 ve A4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$), (Şekil 31A). B1, B2, B3 ve B4 grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenirken ($p>0,05$), D ve E grupları ile B1, B2, B3 ve B4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$), (Şekil 31B). C1, C2, C3 ve C4 grupları arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0,05$), D ve E grupları ile C1, C2, C3 ve C4 grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark vardı ($p<0,01$), (Şekil 31C). D ve E grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$).

HİPOKAMPUS (CA1+CA2+CA3)

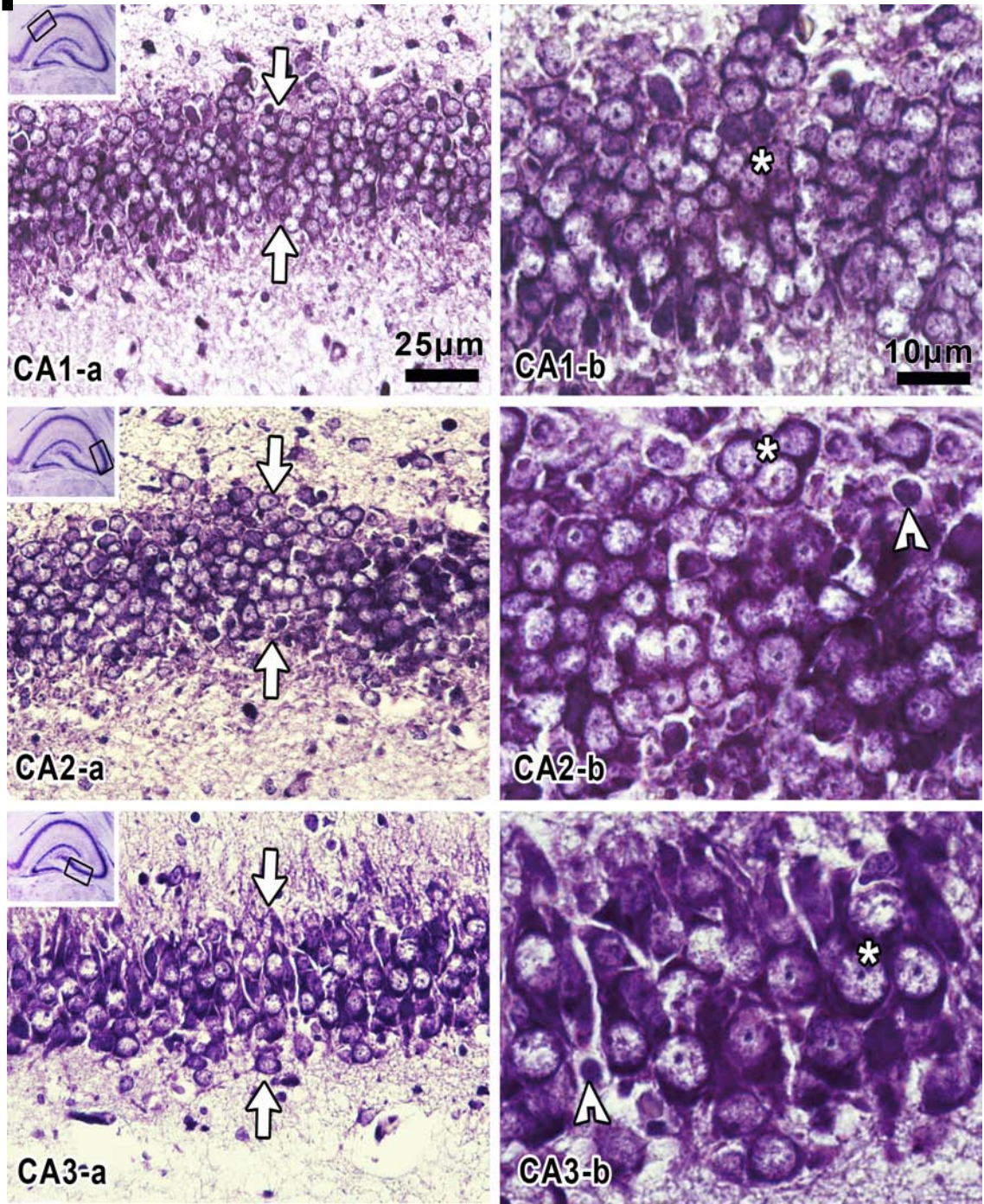


Şekil 31. Farklı gebelik döneminde uygulanan DS'ye göre karşılaştırılan gruplara ait tüm hipokampusta hesaplanan ortalama nöron sayısı değerleri gösterilmektedir.(**A1:** 0-7. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A2:** 8-14. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A3:** 15-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **A4:** 0-21. gün 3,6 mg/kg DS enjeksiyonu; **B1:** 0-7. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B2:** 8-14. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B3:** 15-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **B4:** 0-21. gün 9 mg/kg DS enjeksiyonu; **C1:** 0-7. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C2:** 8-14. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C3:** 15-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **C4:** 0-21. gün 18 mg/kg DS enjeksiyonu; **D:** Pür kontrol; **E:** Serum fizyolojik)

4.3. Işık Mikroskopik Bulgular

4.3.1. D Grubuna Ait Bulgular

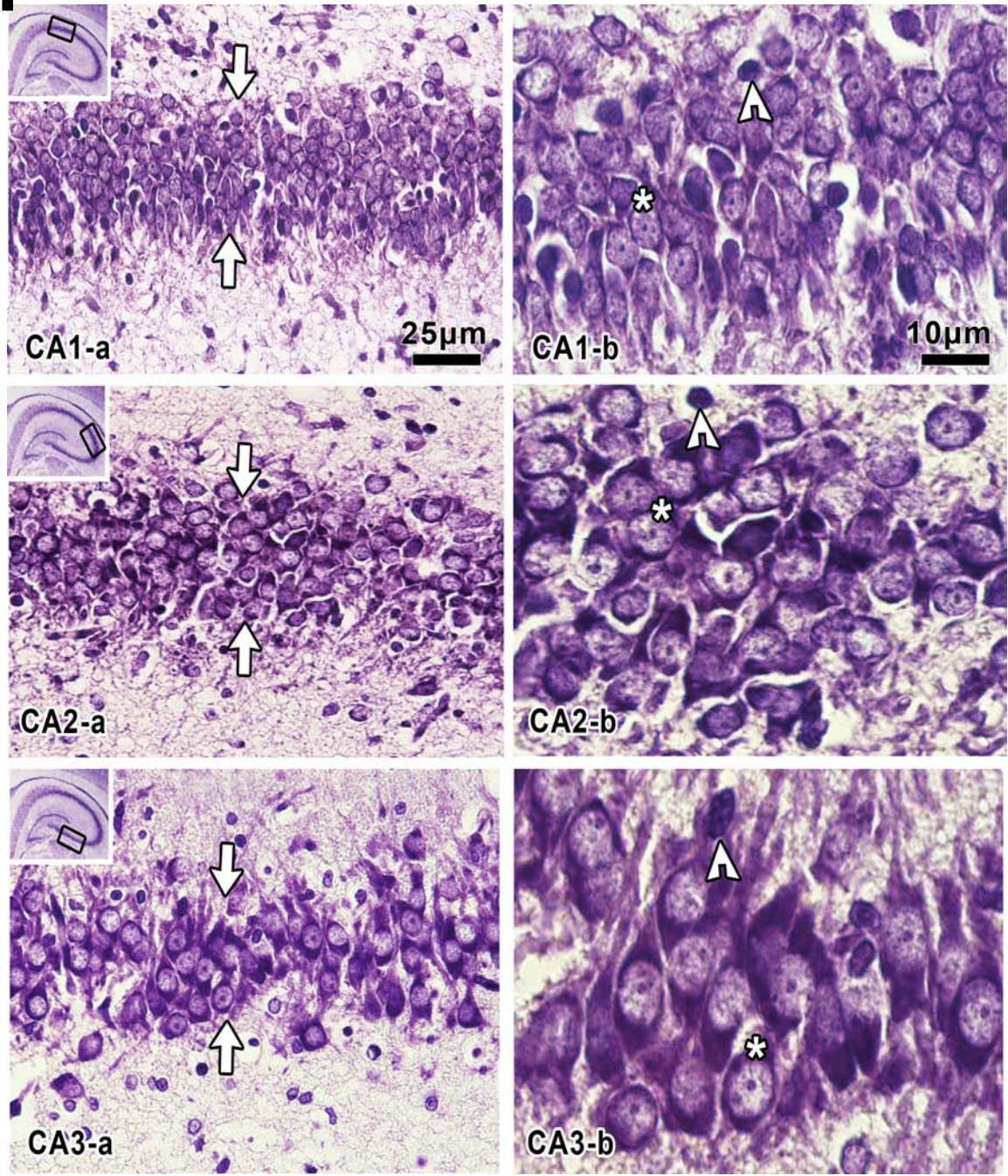
D (pür kontrol) grubuna ait kesitlerde, hipokampusun genel yapısı ve nöronlar normal görünümdeydi. Işık mikroskopik düzeyde yapılan incelemede nöronların perikaryonlarının sınırları düzgün; pramidal şekilli olarak izlendi. Ayrıca bu hücrelerin çekirdekleri ökromatik ve belirgin çekirdekçikliydi (Şekil 32). Nöronların uzantıları olan dendrit ve aksonları normal genişlikteydi. Pür kontrol grubuna ait deneklerin hipokampus kesitlerinde piramidal nöronların 6-7 sıra halinde düzgün bir dizilim gösterirken; nöroglia hücrelerinin de normal görünümde oldukları izlendi (Şekil 32).



Şekil 32. D (pür kontrol) grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. 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). Siyah çerçeveli beyaz ok; ait oldukları bölgedeki piramidal nöron tabakasını, siyah çerçeveli beyaz ok başı; nöroglia hücrelerini, siyah çerçeveli beyaz yıldız sağlıklı piramidal nöronları göstermektedir. Boya: Krezil viyolet

4.3.2. E Grubuna Ait Bulgular

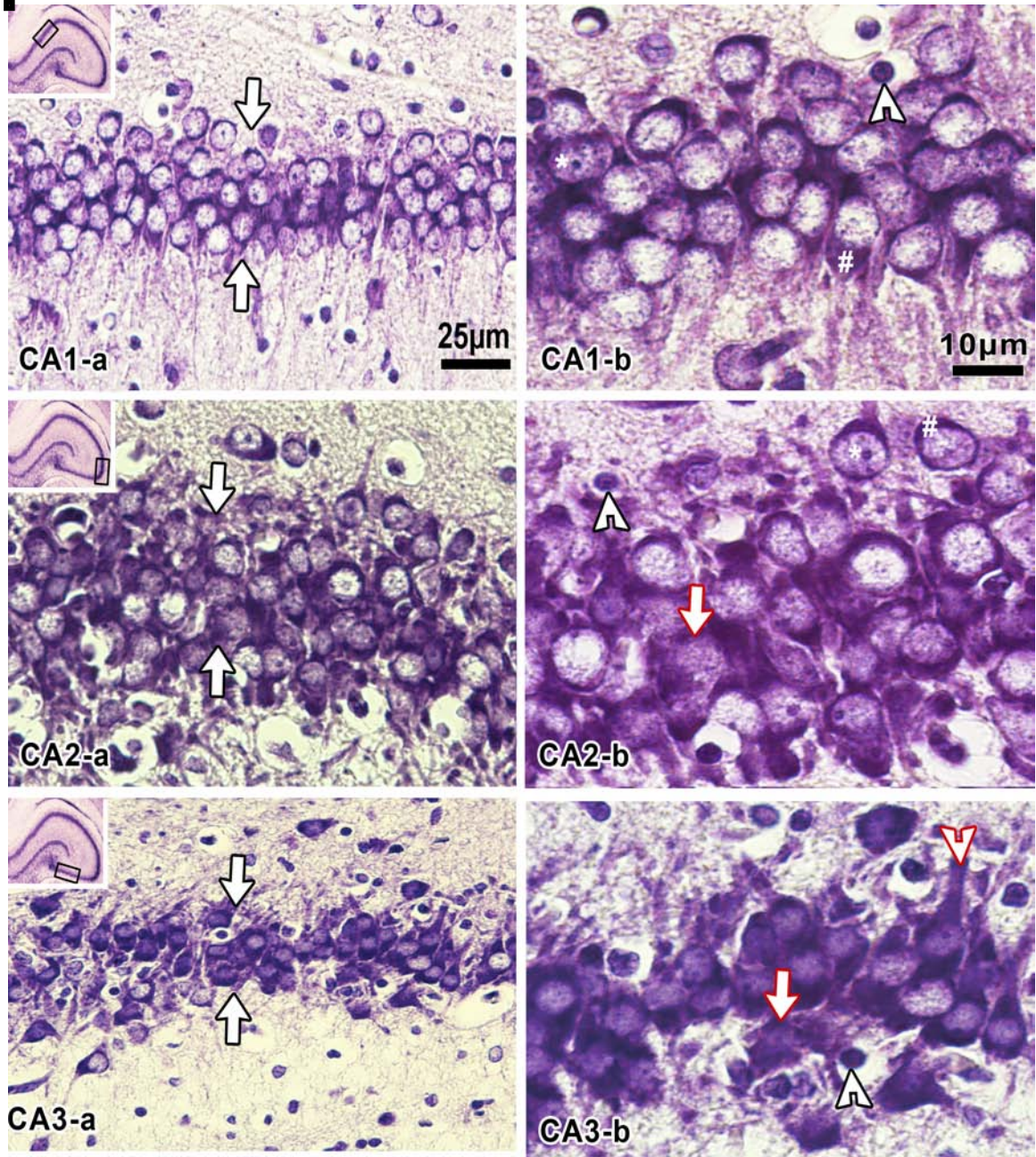
Gebelik boyunca serum fizyolojik uygulanan E grubuna ait kesitlerde, hipokampusun genel yapısı ve nöronlar normal görünümdeydi (Şekil 33). Işık mikroskopik düzeyde yapılan incelemede nöronların pramidial şekilleri ve düzgün sınırlı perikaryonları ile sağlıklı yapıda oldukları tespit edildi. Ayrıca bu hücrelerin çekirdekleri ökromatik idi ve çekirdekçikleri belirgin olarak göze çarpmaktaydı. Nöronların uzantıları olan dendrit ve aksonları normal genişlikteydi. Hipokampusun CA1, CA2, ve CA3 bölgelerinde, piramidial nöronların düzgün dizilimli; nöroglia hücrelerinin de normal ve sağlıklı oldukları görüldü (Şekil 33).



Şekil 33. E (serum fizyolojik) grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. 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). Siyah çerçeveli beyaz ok; ait oldukları bölgedeki piramidal nöron tabakasını, siyah çerçeveli beyaz ok başı; nöroglia hücrelerini, siyah çerçeveli beyaz yıldız sağlıklı piramidal nöronları göstermektedir. Boya: Krezil vyolet

4.3.3. A grubuna Ait Bulgular

Gebelik esnasında farklı periyotlarda (A1-A3) ya da gebelik boyunca (A4) düşük doz diklofenak sodyum'a maruz bırakılan A grubuna ait kesitlerde yapılan ışık mikroskopik değerlendirme sonucu, nöronların kontrol grubuna kıyasla daha eozinofilik sitoplâzmalı oldukları gözlemlendi. Ayrıca bu hücreler ökromatik nükleuslu ve belirgin nükleoluslu (Şekil 34 CA1-b ve CA2-b). Nöron uzantıları olan dendritler ve akson genişlemişti (Şekil 34 CA3-b). Yine bu nöronların hem hücre, hem de çekirdek sınırları düzensiz görünümdeydi. Ayrıca, bu gruptaki glia hücreleri D ve E gruplarına kıyasla iri çekirdekli ve belirgin çekirdekçikli olarak izlendi.

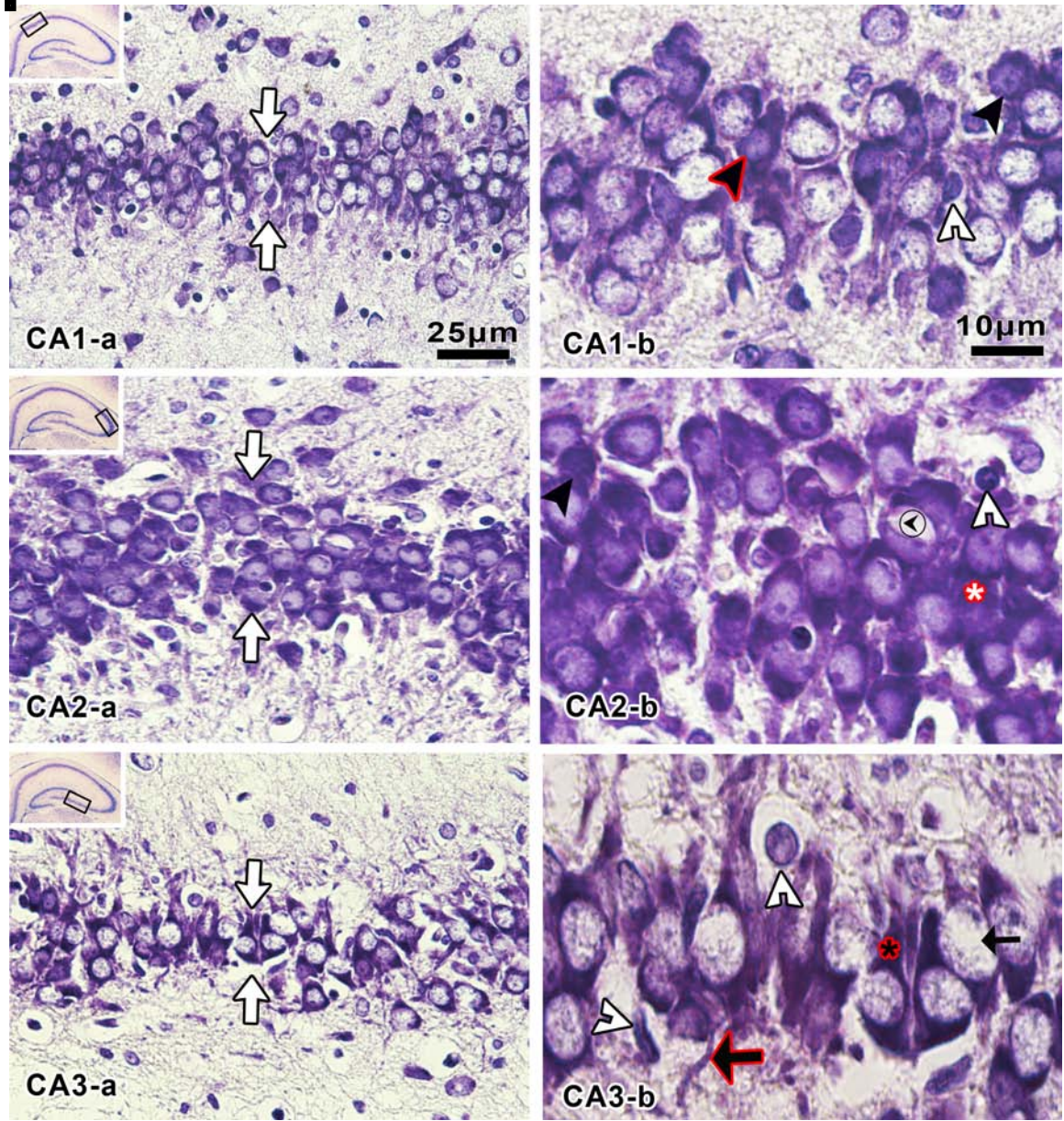


Şekil 34. A (düşük doz) grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. Sol taraftaki görüntüler CA1-CA2-CA3 bölgelerinin x40 büyütmedeki görüntüleri, sağ taraftaki görüntüler aynı bölgelerin x100 lük büyütmedeki görüntüleri gösterilmektedir. Küçük resimlerdeki çerçeveli alan ile belirtilen kısımda sırası ile CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri izlenmektedir (x5). Siyah çerçeveli beyaz ok; ait oldukları bölgedeki piramidal nöron tabakasını, siyah çerçeveli beyaz ok başı; iri çekirdekli nöroglia hücrelerini, beyaz yıldız; belirgin nükleoluslu nöronları, # işareti; eozinofil sitoplazmalı nöronları, kırmızı çerçeveli

beyaz ok; hücre sınırı düzensiz nöronları, kırmızı çerçeveli beyaz ok başı; genişlemiş olan nöron uzantısını göstermektedir. Boya: Krezil viyolet

4.3.4. B grubuna Ait Bulgular

Gebelik esnasında farklı periyotlarda (B1-B3) ya da gebelik boyunca (B4) orta doz diklofenak sodyum'a maruz bırakılan B grubuna ait deneklerin hipokampuslarından elde edilen örneklerinin ışık mikroskopik düzeyde histolojik olarak değerlendirilmesi sonucu D ve E gruplarına kıyasla normal histolojik yapıdaki nöronların yanı sıra, heterokromatik ve piknotik çekirdekli nöronlar ile koyu boyanmış sitoplazmalı, açılanma gösteren piramidal nöronlara rastlandı (Şekil 35 CA1-b, CA2-b). D, E ve A gruplarına kıyasla bu grupta (B grubu) piramidal hücre tabakası sayısının azaldığı görüldü. Ayrıca; koyu boyanmış dar sitoplazmaları ve vakuollü çekirdekleri ile hasarlanmış görünüme sahip nöronlar ve irileşmiş oligodendrosit, mikroglia ve astrositler de bu grupta sözü edilen önceki gruplara göre daha sıklıkla dikkati çekmekteydi (Şekil 35 CA2-b). Nöronal uzantılar değerlendirildiğinde akson başlangıçlarının önceki gruplara kıyasla yoğun boyandığı ve dalgalı görünümde olduğu tespit edildi. Dejenere olmuş nöronların bir kısmında ise periferik Nissl yoğunlaşması anlamına gelen kromatoliz bulgusuna rastlanmaktaydı. Bazı nöronlar ise çekirdekçikleri seçilemeyen ve soluk boyanmış çekirdekleri ve sitoplazmaları ile ödemli görünümdeydi (Şekil 35 CA3-b). Ayrıca bu gruptan elde edilen hipokampus örneklerinde hücreler arası ortamda sınırları tam olarak tespit edilemeyen ölü hücre artığı olası yapılara rastlandı. Bu yapılar bazı kesitlerde nekrotik alanlar şeklinde göze çarpmaktaydı (Şekil 35 CA2-b).

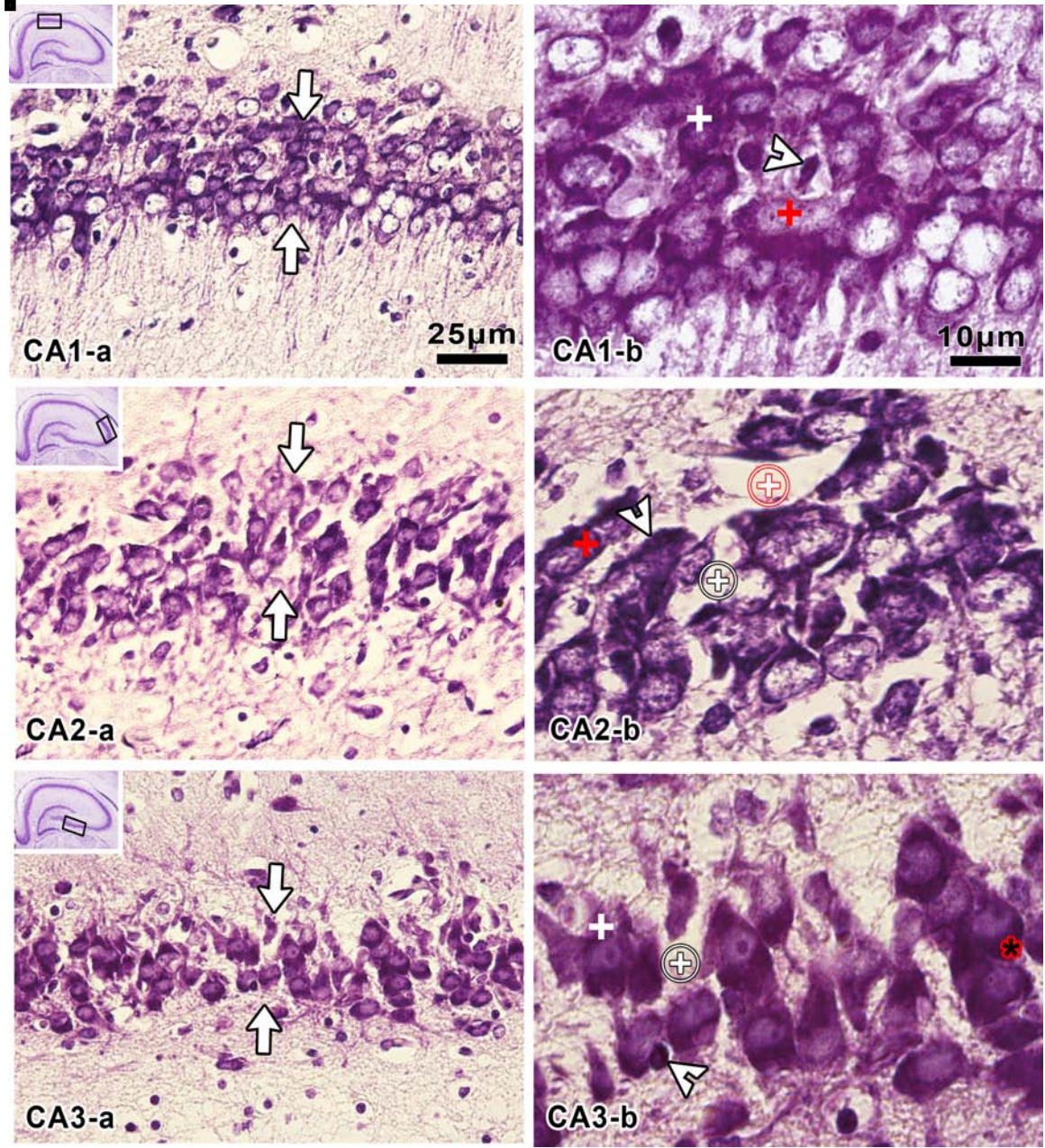


Şekil 35. B (orta doz) grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. Sol taraftaki görüntüler CA1-CA2-CA3 bölgelerinin x40 büyütmedeki görüntüleri, sağ taraftaki görüntüler aynı bölgelerin x100 lük büyütmedeki görüntüleri gösterilmektedir. Küçük resimlerdeki çerçeveli alan ile belirtilen kısımda sırası ile CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri izlenmektedir (x5). Siyah çerçeveli beyaz ok; ait oldukları bölgedeki piramidal nöron tabakasını, siyah çerçeveli beyaz ok başı; iri çekirdekli nöroglia hücrelerini, siyah ok başı; heterokromatik ve piknotik çekirdekli nöronları, kırmızı çerçeveli siyah ok başı; koyu boyanmış sitoplazmalı nöronları, siyah halkalı ok başı; ödemli nöronları, kırmızı çerçeveli beyaz yıldız; ölü hücre artığı olası yapıları, kırmızı çerçeveli siyah

yıldız; kromatoliz bulgulu nöronları, siyah ok; ödemli nöronu, kırmızı çerçeveli siyah ok; dalgalı aksonu göstermektedir. Boya: Krezil viyolet

4.3.5. C grubuna Ait Bulgular

Gebelik esnasında farklı periyotlarda (C1-C3) ya da gebelik boyunca (C4) yüksek doz DS'ye maruz bırakılan C grubuna ait ışık mikroskopik kesitlerin diğer tüm gruplardakine kıyasla en az sayıda sağlıklı nöron içerdiği göze çarpmaktaydı (Şekil 36). Ayrıca bu grupta komşu nöronlar arasında yer alan dilate kan damarları dikkati çekmekteydi (Şekil 36 CA2-b). Yer yer kromatini azalmış çekirdeğe, dar ve koyu boyanmış sitoplâzmaya sahip nöronlar ile koyu bazofil bir nükleus yanında koyu boyanmış düzensiz sınırlı sitoplazmaya sahip piramidal nöronlar gözlenmekteydi (Şekil 36 CA1-b). Hatta bazı alanlarda bu hasarlı nöronların hücre sınırları tespit edilememekteydi. Yine sitoplazmasında Nissl granülleri yoğunlaşmış, nükleusları kenara itilmiş aynı zamanda koyu bazofil boyanmış nöronlar da gözlenmekteydi (Şekil 36 CA3-b). C grubuna ait hipokampus kesitlerinde glia hücrelerinin iri çekirdekleri ve belirgin çekirdekçikli oldukları tespit edildi. Ayrıca bu glia hücrelerinin diğer gruplardan farklı olarak nöronlara yakın konumda yer aldığı tespit edildi. Bu gruptaki hipokampusların beyaz cevherinde ise vakuoler yapıların çokluğu ve ödemli olduğu dikkati çekmekteydi (Şekil36).



Şekil 36. C (yüksek doz) grubuna ait hipokampus örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitler görülmektedir. 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). Siyah çerçeveli beyaz ok; ait oldukları bölgedeki piramidal nöron tabakasını, siyah çerçeveli beyaz ok başı; iri çekirdekli nöroglia hücrelerini, beyaz artı işareti; koyu boyanmış sitoplazmaya sahip nöronları, kırmızı artı işareti; hücre sınırları belli olmayan hasarlı nöronları, kırmızı halkalı artı işareti; dilate olmuş kan damarını,

beyaz halkalı artı işareti; beyaz cevherdeki vakuoler yapıları, kırmızı çeçeveli siyah yıldız; nissl granülleri yoğunlaşmış nöronları göstermektedir. Boya: Krezil viyolet

5. TARTIŞMA

NSAİİ'ler analjezik, anti-inflammatuar ve antipiretik etkilerinden dolayı yıllardır kullanılmaktadır. Chan ve ark. (2002), NSAİİ'nin anti-inflammatuar etkisini COX-1 ve COX-2'yi non-selektif olarak inhibe ederek gösterdiklerini bildirmişlerdir. COX-1 ve COX-2 prostaglandin yapımında enzim görevi yapan maddeler olduğu için, dolaylı olarak prostaglandin sentezi de engellenmektedir. Prostaglandinler inflamasyon oluşum sürecinde diğer görevli maddelerle birlikte iletim molekülü olarak rol oynamaktadır. NSAİİ'ler PG sentezini önleyerek yangıyı azaltırlar, ateş yükselmesine engel olarak, ağrı kesici ve ateş düşürücü etki gösterirler (Gökçimen ve Malas, 2003; Gupta, 2014).

Bilindiği gibi COX-2 santral sinir sisteminde nöronlarda oluşan inflamasyon sonucu indüklenir (Vardeh ve ark., 2009). Bu tür ilaçlar menoreji, dismenore, migren, artrit ve ağrının çeşitli tiplerini içeren rahatsızlıklarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Siu ve ark., 2000, Chan ve ark., 2002; Sabry ve ark., 2014). NSAİİ'lerin tedaviye yönelik etkileri dışında gastrointestinal hasar, deri döküntüleri ve hepatit gibi yan etkileride mevcuttur (Ekici ve ark., 2012). Ayrıca bu ilaçların fetal duktus arteriozusun erken kapanmasına yol açarak devamında fetusta pulmoner hipertansiyon, solunum problemleri ve böbrek fonksiyonu üzerinde istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Ericson ve Källén, 2001; Ostensen ve Skomsvoll, 2004).

NSAİ ilaçların toksik etkisi üzerine yapılan bir araştırmada ibuprofen ve tolmetin prenatal dönemde yüksek dozda uygulanmış ve her iki ilacın annede toksik etki yaptığı, intrauterin gelişimi engellediği ve gelişimsel varyasyonlara neden olduğu bulunmuştur (Burdan, 2004). Hamilelik esnasında uygulanan NSAİ ilaçların düşük riskini artırmaya neden olduğunu gösteren bir araştırma da mevcuttur (Nielsen, 2001). Bu araştırmaya benzer şekilde yapılan bir incelemede prenatal dönemde kullanılan NSAİİ'lerin ve aspirinin düşük riskini artırdığı bulunmuştur (Li, 2003). Bizim çalışmamızda yüksek doz enjekte edilen gruba ait hayvanlarda doğuma birkaç gün kaldığı esnada kanama ve ölü doğum olayları gözlemlendi. Hayvanlara uyguladığımız ilaç olan DS'nin de yukarıda adı geçen ilaçlarla benzer etki gösterdiği söylenebilir.

DS'nin MSS' nin gelişimini etkilediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. İnsan hastalıklarının tedavilerinin bulunması ya da tedavilerin geliştirilmesi amacıyla ve ayrıca

toksikolojik çalışmalarda yaygın olarak hayvan modelleri kullanılmaktadır. Sıçan modelleri kullanılarak DS'nin siyatik sinir, median sinir, optik sinir, beyincik, omirilik ve hipokampus üzerinde etkisini gösteren çeşitli 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).

DS'nin nöral kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (Kudo ve ark., 2003). 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 diğer bir araştırmada ise DS'nin beyincikteki Purkinje hücresi sayısına etkisi incelenmiş ve ilaç uygulanan grupta hücre sayısında azalma olduğu görülmüştür (Rağbetli, 2007). Aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında prenatal dönemde uygulanan DS'nin postnatal dönemde yirmi ve dört haftalık dişilerde Purkinje hücre sayısındaki değişikliği incelemişler ve yirmi haftalık dişilerde hücre sayısında artma olduğunu fakat dört haftalıklarda fark olmadığını bulmuşlardır (Odacı, 2009).

Literatürde prenatal dönemde intraperitoneal DS (1mg/kg/gün) uygulanmış 4 haftalık ve 20 haftalık yavru sıçanların hipokampusları optik disektör yöntemi ile analiz edilmiş; 4 haftalık erkek sıçanlarla kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Fakat prenatal dönemde DS'ye maruz kalan 20 haftalık erkek sıçanlardan oluşan gruptaki hayvanların hipokampuslarındaki nöron sayılarında kontrol grubuna oranla azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Gökçimen ve ark., 2007).

Nitekim daha önce yapılan çalışmalarda da serum fizyolojik enjeksiyonunun oluşturduğu prenatal stresin bile postnatal dönemde nöron sayısını azaltıcı yönde bir etkiye yol açabileceği gösterilmiştir (Gökçimen ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda da E (serum fizyolojik) grubunda, D (pür kontrol) grubuna oranla toplam hipokampustaki ortalama nöron sayısında azalma gözlenmiştir. Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde değildi.

Çalışmamızdan elde edilen stereolojik bulgulara göre ilaç uygulanan gebelik dönemi ve farklı dozlara ait grupların CA1, CA2 ve CA3 bölgesinde bulunan nöronların sayısı pür kontrol ve serum fizyolojik grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalmıştır ($p < 0,01$). Üç bölgedeki nöron sayısı ilaç uygulanan periyotlara göre kendi aralarında değerlendirildiğinde anlamlı bir fark olmadığı anlaşıldı ($p > 0,05$). Fakat uygulanan doz arttıkça toplam ortalama nöron sayısında anlamlı ölçüde azalma olduğu gözlendi ($p < 0,01$). Gökçimen ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada gebelikte 1mg/kg/gün diklofenak sodyum uygulanması sonucunda hipokampustaki nöron sayısının kontrole oranla azaldığı bildirilmiştir. Bu nedenle

çalışmamızda düşük doz olarak uyguladığımız 3,6 mg/kg (A grubu) diklofenak sodyum'un da benzer toksik etki göstermesi beklenen bir sonuçtu. Buna ilaveten doğal olarak düşük dozda görülen bu olası toksik etkinin orta doz olarak uyguladığımız 9 mg/kg (B grubu) DS ve yüksek doz olarak uyguladığımız 18mg/kg (C grubu) DS'ye ait gruplarda da görülmesi bizim için de şaşırtıcı bir sonuç olmadı.

Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. İ laç kullanımı ROS seviyesinde artışa neden olur ve böylece bunlar da serbest radikallere okside olabilir (Kaplan ve ark., 2013). Hücrede oluşan ROS, antioksidan savunma sistemleri olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırırlar (Galano ve ark., 2011).

Organizmada hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldan daha fazla ROS'un meydana gelmesi sonucunda oksidatif stresin oluştuğu bilinmektedir (Kaplan ve ark., 2013). Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsis, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumların patogenezinde oksidatif stresin rolünden söz edilmektedir (Jomova ve ark., 2010; Chrissobolis ve ark., 2011). DS ile yapılan başka bir çalışmada elektron mikroskopik inceleme sonucunda; DS verilen grupta; DS'nin nörotoksik etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. DS, uygulamasının doza bağlı olarak nörodejenerasyona neden olduğu, ekstrasellüler ödem ve buna bağlı olarak hücre organellerinde baskılanma oluşturduğu saptanmıştır (Jomova ve Valko, 2011). Nörodejenerasyonun hücre aktivitesinde belirgin azalmaya bağlı gelişebileceği kanısına varılmıştır (Özdoğan ve ark., 2011). Yine prenatal dönemde DS uygulanmış 4 haftalık sıçanlar üzerinde elektron mikroskobu ile yapılan analizlerde belirgin düzeyde miyelin kılıf bozulmaları ile siyatik sinir akson sayısında kontrol grubuna oranla azalma gösterilmiştir (Canan ve ark. 2008). Buna benzer bir çalışma Ayrancı ve ark. (2013) tarafından yapılmış olup median sinir örneklerinde uygulanan DS'ye bağlı olarak herhangi bir makroskobik anormallik gözlenmezken, mikroskobik incelemede yer yer miyelin kılıflarda büzüşme ve dejenerasyonun olduğu tespit edilmiştir. DS'nin teratojenik etkisini indükleyen mekanizma hala belirsizdir. Fakat Ornoy ve ark. (2011), bu etkinin gelişen embriyodaki ROS ve diğer bileşen maddelerle alakalı olabileceğini bildirmiştir.

Öne sürülen bir diğer mekanizma ise bu ilaçların vazodilatör prostaglandinlerin sentezini inhibe etmeleri ve böylece kan desteğinin azalmasına bağlı olarak hücre ölümüne ve

malformasyona neden olabileceği yönündedir (Chan ve ark., 2002). Yüksek doza ait toksisitedeki bu artışa diğer bir sebep olarak kan desteğinin azalması sonucu hücre ölümü gösterilebilir. Bizim çalışmamızda D ve E gruplarına ait ışık mikroskopik düzeyde yapılan incelemede nöronların perikaryonlarının sınırları düzgün; pramidal şekilli ve çekirdekçiklerinin belirgin olduğu gözlenirken bunun aksine düşük dozdan yüksek doza doğru gittikçe ışık mikroskopik incelemede CA1-CA2-CA3 bölgelerine ait hücre tabaka sayısında ve hücre sıklığında azalma, hasarlı ve ölü nöron sayısında artma ve iri çekirdekli olmaları dikkat çeken nöroglia hücrelerinde sayısında artış olduğu tespit edildi. Ayrıca bu gruplarda nükleusları kenara itilmiş aynı zamanda koyu bazofil boyanmış nöronların çokluğu ve hücreler arası ortamda sınırları tam olarak tespit edilemeyen ölü hücre artışı olası yapılara rastlandı. Bu yapılar bazı kesitlerde nekrotik alanlar şeklinde göze çarpmaktaydı.

Yapılan bir hücre kültürü çalışmasında DS'ye maruz bırakılan rat embriyolarında in vitro konsantrasyona bağlı numunelerde embriyo ağırlığı, baş-kalça uzunluğu ve somitlerin sayısı gibi gelişimsel parametrelerde azalma olduğu gösterilmiştir (Singh ve ark., 2013). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada DS'ye maruz kalmanın nöral tüp defekti, kraniofasiyal şekil bozukluğu ve bodur büyümeyi içeren genel embriyonal şekil bozukluklarında artışa neden olduğu belirtilmiştir (Chan, 2002). Çalışmamızda bu gibi malformasyonların görülmemesi yetersiz doz uygulaması ile açıklanabilir.

Şimdiye kadar DS'nin embriyonik gelişim sırasında plental transferini kanıtlayan bir çalışma tam anlamıyla çalışılmamıştır. Fakat Siu ve ark. (2000) DS'nin gebeliğin ilk trimesterinde insan plasentasından geçtiğini belirtmektedir. Clancy ve ark. (2001), yaptıkları bir çalışmada insan, sıçan ve farelerin hamilelik dönemlerine göre sinir sisteminin gelişim günlerini göstermişlerdir. Bu çalışmaya göre sıçanlarda bizim analiz yaptığımız bölge olan hipokampustaki nöronların en yüksek değer ulaştığı dönem 15-16-17. günlere denk gelmektedir.

Çalışmamızda ilaç uygulama dönemlerine göre gruplarımızı gebeliğin 1. haftası, 2. haftası, 3. haftası ve gebelik süresince olmak üzere 4 alt gruba ayırdık. İstatistiksel sonuçlara baktığımızda her dozun kendi alt grubu olan ilaç uygulama dönemlerine göre ortalama nöron sayılarında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Fakat her doza ait farklı dönemlere ait gruplarla (A1-A2-A3-A4, B1-B2-B3-B4, C1-C2-C3-C4) D (pür kontrol) ve E (serum fizyolojik) grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olması bu ilacın gebeliğin her döneminde toksik etkisinin olabileceği düşüncesini ortaya çıkardı.

Sonuç olarak, yukarıda taranan literatür bilgisi ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar dikkate alınacak olursa DS'nin gebelikte kullanımının birçok toksik etkiye neden

olduğu söylenebilir. Tabi ki hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda ortaya çıkan toksik etkiler tam anlamıyla insanlarda olabilecek total etkileri yansıtmayabilir. Bu sebeple klinisyenlerin bu tür ilaçları tedavi amacı ile bayan hastalara verirken gebelik sürecini dikkate almaları önerilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda güvenilir sonuçlar veren ve kullanımı son yıllarda gittikçe artan stereolojik yöntemler kullanılmıştır. Bu araştırma ile erkek yavru ratlara ait beyin dokusu örneklerindeki hipokampus alanı CA1- CA2- CA3 bölgeleri açısından değerlendirilmiştir.
- Stereolojik analizler sonucunda; ilaç uygulanan grubun CA1 bölgesindeki ortalama nöron sayısında pür kontrol ve serum fizyolojik gruplarına oranla anlamlı ölçüde azalma olduğu saptanmıştır.
- İlaç uygulanan grubun CA2 bölgesindeki ortalama nöron sayısında ise pür kontrol ve serum fizyolojik gruplarına oranla anlamlı ölçüde azalma olduğu bulunmuştur.
- İlaç uygulanan grubun CA3 bölgesindeki ortalama nöron sayısında pür kontrol ve serum fizyolojik gruplarına oranla anlamlı ölçüde bir azalmanın olduğu belirlenmiştir.
- İlaç uygulanan grubun tüm hipokampus bölgesindeki ortalama nöron sayısında pür kontrol ve serum fizyolojik gruplarına oranla anlamlı ölçüde azalma olduğu saptanmıştır.
- İlaç uygulanan grupların tüm hipokampus bölgesindeki ortalama nöron sayısı düşük doz (A grubu- 3,6mg/kg), orta doz (B grubu, 9mg/kg) ve yüksek doz (C grubu, 18mg/kg) olarak değerlendirildiğinde, ilaç dozu yükseldikçe nöron sayısında anlamlı ölçüde azalma olduğu bulunmuştur.
- Grupların tüm hipokampus alanındaki ortalama nöron sayısı bakımından ilaç uygulama dönemleri dikkate alınıp her grup kendi arasında değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Fakat her dozda ilaç uygulama dönemlerine ait grupların ortalama nöron sayısı pür kontrol ve serum fizyolojik gruplarına göre değerlendirildiğinde anlamlı ölçüde bir azalmanın olduğu saptanmıştır.
- İlaç uygulanan gruplar ışık mikroskopik düzeyde pür kontrol ve serum fizyolojik grupları ile kıyaslandığında normal histolojik yapıdaki nöronların sayılarında önemli ölçüde azalmanın olduğu gözlenmiştir. Mikroskopik görüntüler incelendiğinde; çekirdekleri heterokromatik boyalı, piknotik görümlü ve sitoplazmaları koyu boyanmış nöronlara sık rastlanmıştır. Yüksek doz ilaç uygulanan grup diğer gruplarla kıyaslandığında ise nekroza doğru giden nöronların sayıca daha fazla olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Aktan ZA. Limbik sistem. Sendrom. 1997;9:65-69.
- Alves D, Duarte I. Involvement of ATP-sensitive K channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. Eur J Pharmacol. 2002;444:47-52.
- Amaral D, Lavenex P. Hippocampal Neuroanatomy. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. The Hippocampus Book. Oxford University Press, 2007;67-75.
- 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-Türkçe. Mıstık S editör, 7. Baskı, İstanbul, Yüce Yayınları, 2008;1031-1164.
- Arad I, Bar-Oz B, Amit Y. Neonatal limb ischaemia following maternal indomethacin treatment in twin pregnancies. J Perinat Med. 1995;23:487-491.
- Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001;318-393.
- Aygün 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;27:417-436.
- 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.
- Baddeley A, Jensen EBV. Stereology for Statisticians. Florida, CRC Press, 2005;2-10.
- Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L, Claes L. Influence of diclofenac (group of nonsteroidal antiinflammatory drugs) on fracture healing. Arch Orthop Trauma Surg, 2003;123:327-332.
- 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.

- Bitto A, Gray RH, Simpson JL. Adverse outcomes of planned and unplanned pregnancies among users of natural family planning: a prospective study. *Am J Public Health*. 1997;87:338-343.
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman and Gilman Tedavinin Farmakolojik Temelleri. Süzer Ö. Editör, 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009;671-716.
- Burdan F. Developmental toxicity evaluation of ibuprofen and tolmetin administered in triple daily doses to Wistar CRL(WI)WUBR rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2004;71:321-330.
- Canan S, Aktaş 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, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Toplam Hacim, Hacim Yoğunluğu ve Hacim Oranlarının Hesaplanmasında Kullanılan Bir Stereolojik Yöntem: Cavalieri Prensibi. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2002a;22:7-14.
- Canan S, Şahin B, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Parçacıkların Toplam Sayısının Hesaplanması İçin Bir Metot: Parçalama. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2002b;22:30-46.
- Carpenter MB, Sutin J. *Human Neuroanatomy*. 8th edition, Baltimore, Williams & Wilkins Press, 1983;237.
- Cassina M, De Santis M, Cesari E, Marion van Eijkeren, Matitiahu Berkovitch, Giorgio Eleftheriou, Francesco Raffagnato, Elena Di Gianantonio, Maurizio Clementi. First trimester diclofenac exposure and pregnancy outcome. *Repro Toxicol*. 2010;30:401-404.
- Chan LY , Chiu PY , Siu NS , Wang CC , Lau TK. Diclofenac-induced embryotoxicity is associated with increased embryonic 8-isoprostaglandin F2alpha level in rat whole embryo culture . *Reprod Toxicol*. 2002;16:841-844.
- 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.
- Chen Q, Shinohara N, Abe T, Watanabe T, Nonomura K, Koyanagi T. Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 2004;108:825-832.
- Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, Kemp-Harper BK, Sobey CG. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Front Biosci*. 2011;16:1733-1745.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*. 2001;105:7-17.

- Cooper LN. Distributed memory in the central nervous system: possible test of assumptions in visual cortex. Schmitt FO, Worden FG, Adelmar G, Dennis SG editors, The Organisation of The Cerebral Cortex. 2nd edition, Cambridge, MIT Press, 1981;479-503.
- Dawood MY. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and reproduction. Am J Obstet Gynecol. 1993;169:1255-1265.
- Dere F. Nöroanatomi. 3. Baskı, Adana, Nobel Tıp Kitabevleri, 2000;428.
- 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.
- Ericson A , Källén B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in early pregnancy . Reprod Toxicol. 2001;15:371-375.
- Galano A , Tan DX , Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. J Pineal Res. 2011;51:1-16.*
- Goldin E, Harel S, Tomer A, Yavin E. Arachidonic acid oxidation by brain and placenta preparations from normal and placental insufficient fetal rabbit. J Neurochem. 1987;48: 695-701.
- Gomez-Lechon MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell JV, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. Biochem Pharmacol. 2003;66:2155-2167.
- Gökçimen A, Akdoğan M, Karaöz E, Çiçek E, Malas MA, Öncü M. Akut yüksek doz diklofenak sodyum uygulanan sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında meydana gelen yapısal ve biyokimyasal değişiklikler. Isparta Yeni Tıp Derg. 2000;17:72-77.
- Gökçimen A, Malas MA. Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların gebelikteki toksisiteleri ile ilgili literatürlerin gözden geçirilmesi. Süleyman Demirel Üniv Tıp Fakül Derg. 2003;10:50-52.
- 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.
- Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R Thomson. J Microsc. 1986;143:3-45.
- Gupta R. "Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs." Pain Management. Springer Berlin Heidelberg, 2014;45-46.

- Güven D, Altunkaynak BZ, Ayrancı E, Kaplan S , Bildircin FD , Kesim Y, Rağbetli MÇ. Stereological and histopathological evaluation of ovary and uterine horns of female rats prenatally exposed to diclofenac sodium. *J Obstet Gynaecol.* 2013;33:258-263.
- Güven KC. *Tıbbi Formüller.* 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2006;112.
- Hall JE. *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji.* Çağlayan Yeğen B editör, 12. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2013;697-749.
- Harris WH. The effects of repeated doses of indomethacin on fetal rabbit mortality and on the patency of the ductus arteriosus. *Can J Physiol Pharmacol.* 1980;58:212-216.
- Hashimoto Y, Kondo Y, Kimura G, Matsuzawa I, Sato S, Ishizaki M, Imura N, Akimoto M, Hara S. Cyclooxygenase-2 expression and relationship to tumour progression in human renal cell carcinoma, *Histopathology.* 2004;44:353-359.
- Hirose K, Jyoyama H, Kojima Y, Eigyo M, Hatakeyama H, Asanuma F, Umehara H, Yamaguchi T. Pharmacological properties of 2-[4-(2-Thiazolyloxy)-phenyl]-propionic acid (480156-S), a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Arzneittelforschung* 1984;34:280-286.
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 2010;345:91-104.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011;283:65-87.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science.* 4th edition, New York, Mc Graww-Hill Comp, 2000;1233.
- Kaplan S, Canan S, Altunkaynak ME, Odacı E, Aslan H, Unal B. An unbiased way to estimate total quantities: The fractionator technique. *Neuroquantology.* 2012a;10:54-65.
- Kaplan S, Odacı E, Canan S, Onger ME, Aslan H, Unal B. The disector counting technique. *Neuroquantology.* 2012b;10:44-53.
- Kaplan S, Esrefoglu M, Aktas A, Gul M, Onger ME, Altunkaynak ME, Ulkay MB, Rağbetli 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.
- Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji.*10. Baskı, Ankara, Hacettepe-Taş Kitabevleri, 2002;960-994.
- Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji.* 12. Baskı, Ankara, Hacettepe-Taş Kitabevleri, 2009;854.
- 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.

- Li DK, Liu L, Odouli R. Exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and risk of miscarriage: population based cohort study, *BMJ*. 2003;327.
- Lee HM, Kim HI, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH. Diclofenac inhibition of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons, *Brain Res*. 2003;992:120-127.
- Liles JH, Flecknell PA. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. *Lab Anim*. 1992;26:241-255.
- Milusheva E, Baranyi M, Kittel A, Fekete A, Zelles T, Vizi ES, Sperlagh B. Modulation of dopaminergic neurotransmission in rat striatum upon in vitro and in vivo diclofenac treatment. *J Neurochem*. 2008;105:360-368.
- Mogilner BM, Ashkenazy M, Borenstein R, Lancet M. Hydrops Fetalis caused by maternal indomethacin treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1982;61:183-185.
- Moore KL, Persaud TVN. Human Embryology. Klinik Yonleri ile İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Dalcik H editors, 8th edition, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009;381-399.
- Morgan G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the chemoprevention of colorectal and nonaspirin oesophageal cancers. *Gut*. 1996;8:646-648.
- Moss M, Mahut H, Zola MS. Concurrent discrimination learning of monkeys after hippocampal, entorhinal or fornix lesions. *J Neurosci*. 1981;1:227-240.
- Nielsen GL, Sorensen HT, Larsen H, Pedersen L. Risk of adverse birth outcome and miscarriage in pregnant users of non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based observational study and case-control study. *BMJ*. 2001;322:266-270.
- Odacı E, Korkmaz A, Ayas B, Rağbetli MÇ, Çiftçi N. Prenatal dönemde uygulanan diklofenak sodyumun, postnatal dönemde sıçanın eklem kıkırdak dokusuna etkisi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 2001;21:278-281.
- Odacı E, Cihan OF, Aslan H, Rağbetli MÇ, Kaplan S. Prenatal diclofenac sodium administration increases the number of Purkinje cells in female rats : A stereological study. *Int J Devl Neurosci*. 2009;28:145-151.
- Ommatı R. VADEMECUM Modern İlaç Rehberi 25. Yıl, 35. Baskı, İstanbul, Medical Tribune Yayıncılık, 2013;1436-1437.
- Ornoy A, Livshitz A, Ergaz Z, Stodgell CJ, Miller RK. Hyperglycemia, hypoxia and their combination exert oxidative stress and changes in antioxidant gene expression: studies on cultured rat embryos. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2011;92:231-239.
- Ostensen M, Ramsey-Goldman R. Treatment of inflammatory rheumatic disorders in pregnancy: What are the safest treatment options? *Drug Saf*. 1998;19:389-410.
- Ostensen M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1998;107:128-132.

- Østensen ME , Skomsvoll JF. Anti-infl ammatory pharmacotherapy during pregnancy. *Expert Opin Pharmacol.* 2004;5:571-580.
- Ozan H. Premium Ozan ANATOMİ. 3. Baskı, Ankara, Klinisyen Tıp Kitabevleri, 2014; 520-550.
- Ozyurt B, Kesici H, Alıcı 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.
- Persaud TVN, Moore KL. Inhibitors of prostaglandin synthesis and fetal development. *Lancet.* 1974;1:93.
- Pratt L, DiGiosia J, Swenson J, Trampe B, Martin CB. Reversible fetal hydrops associated with indomethacin use. *Obstet Gynecol.* 1997;90:676-678.
- Ragbetli C, Aydinlioglu A, Kara M, Ragbetli MÇ, Ilhan F. Effects of diclofenac sodium on the rat liver in postnatal period. *J Anim Vet Adv.* 2009;8:1761-1764.
- Rağbetli MÇ, Ozyurt B, Aslan H, Odacı E, Gökçimen A, Şahin 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.
- Rein AJ, Nadjari M, Elchalal U, Nir A. Contraction of the fetal ductus arteriosus induced by diclofenac. *Fetal Diagn Ther.* 1999;14:24-25.
- Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas – With Correlated Cell and Molecular Biology.* 6th edition, China, Lipincott Williams &Wilkins, 2011;383-384.
- Rudolf AM. The effect of nonstereoidal antiinflamatory compounds on fetal circulation and pulmanary function. *Obstet Gynecol.* 1981;58:63-67.
- Sabry SA, Sakr SM, Shahin MA. Histological and Ultrastructural Studies on the Effect of Diclofenac Sodium on the Renal Cortex of Fetuses of Albino Mice. *Global J Pharmacol,* 2014;8:369-377.
- Sadler TW. *Langman’s Medikal Embriyoloji.* Basaklar AC editor, 6th edition, Ankara, Palme Yayıncılık, 1993;346-350.
- Sadler TW. *Langman’s Medikal Embriyoloji.* Basaklar AC editor, 7th edition, Ankara, Palme Yayıncılık, 1996;51-84.
- Shah A, Jhavar SS, Goel AJ. Analysis of the anatomy of the Papez circuit and adjoining limbic system by fiber dissection techniques. *Clin Neurosci.* 2012;19:289-298.

- Shastri AT, Abdulkarim D, Clarke P. Maternal Diclofenac Medication in Pregnancy Causing in Utero Closure of the Fetal Ductus Arteriosus and Hydrops. *Pediatric cardiology*. 2013;34:1925-1927.
- Siu KL, Lee WH. Maternal diclofenac sodium ingestion and severe neonatal pulmonary hypertension. *J Paediatr Child Health*. 2004;40:152-153.
- Siu SS, Yeung JH, Lau TK. A study on placental transfer of diclofenac in first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod*. 2000;15:2423-2425.
- 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.
- Sluyter F, Jamot L, Bertholet JY, Crusio WE. Prenatal exposure to alcohol does not affect radial maze learning and hippocampal mossy fiber sizes in three inbred strains of mouse. *Behav Brain Funct*. 2005;1:5.
- Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2001;21:427- 431.
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984;134:127-136.
- Süzer Ö. Süzer Farmakoloji, 3. Baskı, Ankara, Klinisyen Tıp Kitabevi, 2005;515-516.
- Takahashi Y, Harada K, Ishida A, Tanaka T, Tsuda A, Takada G. Doppler echocardiographic finding of indomethacin induced occlusion of the fetal ductus arteriosus. *Am J Perinatol*. 1996;13:15-18.
- Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi. 5. Baskı, Ankara, ODTU Yayıncılık, 2005;229.
- Ünal B, Aslan H, Canan S, Şahin B, Kaplan S. Biyolojik ortamlardaki objelerin sayımı yapılarak kullanılan eski (taraf) metotların önemli hata kaynakları ve çözüm önerileri. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2002a;22:1-6.
- Ünal B, Canan S, Aslan H, Şahin B, Çataloluk O, Kaplan S. Doku örneklerindeki obje sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metotlar: fiziksel disektör. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2002b;22:15-24.
- 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.
- Weissmann G. Aspirin. *Sci Am*. 1991;264:84-90.
- West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*. 1993;14:275-285.

West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 1999;22:51-61.

Zengin H, Kaplan S, Tumkaya L, Altunkaynak BZ, Rağbetli MÇ, Altunkaynak ME, Yılmaz O. Effect of prenatal exposure to diclofenac sodium on the male rat arteries: a stereological and histopathological study. *Drug Chem Toxicol.* 2013;36:67-78.

Zenker M, Klinge J, Krüger C, Singer H, Scharf J. Severe pulmonary hypertension in a neonate cause by premature closure of ductus arteriosus following maternal treatment with diclofenac: A case report. *J Perinat Med.* 1998;26:231-234.

<http://www.rxlist.com/voltaren-xr-drug.htm>, 2014.



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : HADYEK/16
Konu : Araştırma projeniz hk.

01/03/2011

Yrd. Doç. Dr. Berrin Zuhâl ALTUNKAYNAK
Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalı

2011/11 numaralı "Prenatal dönemde farklı dozlarda uygulanan diklofenak sodyumun merkezi sinir sistemi gelişimi üzerine toksik etkisinin araştırılması" konulu başlıklı Projeniz; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28.02.2011 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açısından uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılara ait olmak kaydıyla ve 6 aylık dönemler halinde Çalışma Raporu verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ferişt KOLBAKIR
HADYEK Başkan

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ebru ELİBOL

Doğum Yeri: Amasya

Doğum Tarihi: 1980

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans, OMÜ Fen- Edebiyat Fak.- 2001

Yüksek Lisans , OMÜ Sağlık Bil. Ens.- 2009

Doktora, OMÜ Sağ. Bil. Ens. - 2014

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi 2004 - 2014

E-posta: ebraelibol155@gmail.com