

T.C  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**GEBE SIÇANLARDA KULLANILAN ANTİEPİLEPTİK  
İLAÇLARIN YAVRULARIN CEREBELLUM'LARI  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**Dr. Mahmut GÜNER**

**Anatomi Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR**

**2019**



**T.C**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**GEBE SIÇANLARDA KULLANILAN ANTİEPİLEPTİK**  
**İLAÇLARIN YAVRULARIN CEREBELLUM'LARI**  
**ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**Dr. Mahmut GÜNER**

**Anatomi Anabilim Dalı**  
**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI**  
**Prof.Dr.Emel ULUPINAR**

**ESKİŞEHİR**

**2019**

**TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI**

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA,

Dr. Mahmut GÜNER'e ait "Gebe sıçanlarda kullanılan antiepileptik ilaçların yavruların cerebellum'ları üzerindeki etkileri" adlı çalışma jürimiz tarafından Anatomi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir.

Tarih:06.02.2019

Jüri Başkanı	Prof.Dr. Emel ULUPINAR Anatomi Anabilim Dalı
Üye	Prof.Dr. Hilmi ÖZDEN Anatomi Anabilim Dalı
Üye	Prof.Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fakülte Kurulu'nun .../...2018 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Ali ARSLANTAŞ  
Dekan

## TEŐEKKÖR

Engin deneyimi ve bilgisi ile yolumu aydınlatan değerli bilim insanı sayın Prof.Dr. Emel ULUPINAR'a, yaptığı herőey ve vicdanı için bölüm başkanımız sayın Prof.Dr. Hilmi ÖZDEN'e, tezimde benim kadar emeği olan sevgili dostum yüksek lisans öğrencisi Birce ERÇELEN'e, emekli patoloji teknikerimiz sayın Yücel OKATALI'ya, dostane muhabbetini ve yardımını esirgemeyen Anatomi Anabilim Dalı personeli sayın Ömer EŐEN'e, TİCAM personelimiz sayın Kurban DAĞDELEN'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Güner, M. Gebe sıçanlarda kullanılan antiepileptik ilaçların yavruların cerebellum'ları üzerindeki etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2019.**

Gebelikte kontrol edilemeyen konvülsif nöbetler yavruların gelişimi üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Bu çalışmada, gebelerde kullanımı daha güvenli bir antikonvülsan olan lamotrijin ile gelişimsel nörotoksisite bakımından daha fazla risk taşıyan fenobarbital'in deney hayvanlarının motor ve öğrenme becerileri üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Cerebellum yeni motor becerilerin öğrenilmesinde kritik bir öneme sahip olduğu ve çıktılarının kaynağı olan Purkinje nöronlarının gelişimi sıçanlarda embriyonik (E) 14. günden itibaren başladığı için ilaç uygulamaları E14-E21 arasında yapılmıştır. Deney gruplarına (n=7 her grup ve cinsiyet için) oral gavaj yoluyla lamotrijin ve fenobarbital (20 mg/kg), kontrol grubuna da serum fizyolojik uygulanmıştır. Yavrular postnatal 40. günden itibaren rota-rod, yükseltilmiş artı labirent, spontan lokomotor aktivite, açık alan, beceri gerektiren kavrama ve grip testlerine tabi tutulduktan sonra sakrifiye edilmiştir. Cerebellum'dan sistematik randomize örnekleme yöntemiyle alınan kesitler üzerinde nöronların ve liflerin bulunduğu tabakaların hacimsel oranları ile beyaz cevherdeki myelin dansiteleri ölçülmüştür. Aktivitemetrede lamotrijin uygulanan yavrularda cinsiyetten bağımsız olarak, fenobarbital uygulananlarda ise dişilerde olmak üzere kontrollere göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Rota-rod testinde de fenobarbital uygulanan erkeklerin motor becerilerinde anlamlı bir bozukluk saptanmıştır. Birim uzunluk başına düşen Purkinje hücre sayısı fenobarbital grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük iken; kortikal tabakalarının hacimsel oranlarında ve beyaz cevherdeki miyelin dansitesinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Purkinje, lamotrijin, fenobarbital, cerebellum, gelişim

**Destekleyen Kurumlar:** ESOĞÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu

Proje no: 2017-1602.

## ABSTRACT

**Güner, M. Effects of antiepileptic drugs used in pregnant rats on the cerebellum of offspring. Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine Department of Anatomy, Thesis in Medicine, Eskisehir, 2019.**

Uncontrolled convulsive seizures during pregnancy have negative effects on the development of offspring. In this study, we aimed to compare the effects of lamotrijin, which is a safer anticonvulsant drug in pregnant women, and phenobarbital, which has a higher risk of developmental neurotoxicity, on the motor and learning skills of the experimental animals. Since the cerebellum has critical importance in learning new motor skills and development of the Purkinje neurons, the main source of outputs, begin on the embryonic day (E) 14 in rats, drug applications were carried out between E14-E21. Experimental groups (n = 7 for each group and gender) were administered lamotrijin and phenobarbital (20 mg/kg) by oral gavage and saline was administered to the control group. From the postnatal 40th day onwards, the offspring were subjected to rota-rod, elevated plus maze, spontaneous locomotor activity, open field, grip and fine-skill required grip tests, and then sacrificed. Systematic randomized sampling method were applied on sections of the cerebellum to estimate the volumetric ratios of the cerebellar layers in which neurons and fibers are located, and then myelin densities were measured in the white matter. In activitymeter, a significant decrease was observed in the offspring treated with lamotrijin, and in female offspring treated with phenobarbital. Rota-rod test also showed a significant decrease in the motor skills of males treated with phenobarbital. The number of Purkinje cells per unit length was significantly lower in the phenobarbital group than in the other groups. No significant difference was observed in the volume proportions of the cortical layers and myelin density in the white matter.

**Key Words:** Purkinje, lamotrijin, phenobarbital, cerebellum, development

**Supporting Institutions:** ESOGU Scientific Research Projects Commission

Project no: 2017-1602

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Cerebellum'un Gelişimi	4
2.2. Cerebellum'un Fonksiyonel Anatomisi	5
2.3. Cerebellum'un Histolojisi	9
2.3.1 Serebellar Korteks'teki Hücre Tipleri	10
2.3.2. Serebellar Korteks Lifleri	11
2.4. Antiepileptik İlaçlar Hakkında Genel Bilgiler	14
2.4.1 Antiepileptik İlaçların Moleküler Mekanizmaları	15
2.5. Gebelikte Antiepileptik İlaç Kullanımı	16
2.6. Lamotrijin	17
2.7. Fenobarbital	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Deney hayvanları	23
3.2. Deney Hayvanlarının Çiftleştirilmesi ve Gebelik Tayini	23
3.3. İlaçlar ve Uygulamaları	23



	Sayfa
3.4. Davranış Testleri	25
3.4.1. Rota-rod Testi	26
3.4.2. Aktivitemetre Testi	26
3.4.3. Grip Testi	27
3.4.4. Plus-maze Testi	29
3.4.5. Açık Alan testi	29
3.4.6. Beceri Gerektiren Kavrama Testi	30
3.5. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonları ve Dokuların Hazırlanması	31
3.6. Histolojik Kesitlerin Hazırlanması ve Boyanması	32
3.7. Morfometrik Sayımlar	34
3.8. Myelin Dansitesinin Ölçümü	37
3.9. İstatiksel Analizler	38
4. BULGULAR	39
4.1 Rota-rod Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması	39
4.2 Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması	40
4.3 Grip Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması	41
4.4 Lokomotor Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması	41
4.5. Açık Alan Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması	45
4.6 Beceri Gerektiren Kavrama Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması	47
4.7. Birim Mesafeye Düşen Purkinje Hücre Sayılarının Karşılaştırılması	51
4.8. Serebellar Korteks Tabaka Oranlarının Karşılaştırılması	53
4.9. Myelin Dansitelerinin Karşılaştırılması	56
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	74

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

AMPA	Alfa-amino 3-hidroksi-5- metilisokzasole-4-propionik asit
Ca <sup>+</sup>	Kalsiyum
CBZ	Karbamazepine
E	Embriyonik
EEG	Elektroensefalogram
GABA	Gama-aminobütirik asit
LTG	Lamotrijin
MES	Maksimum elektroşok testi
MSS	Merkezi sinir sistemi
NMDA	N-Metil D-Aspartik asit
OXC	Oksakarbazepin
P	Postnatal
PBS	Fosfat-Buffer tampon solüsyonu
PBT	Triton X-100'lü Fosfat-Buffer tampon solüsyonu
PHB	Fenobarbital
TPM	Topiramat
VA	Valproat

## ŞEKİLLER

	Sayfa	
2.1	Cerebellum'un gelişimi	5
2.2	Cerebellum yüzeysel anatomisi	6
2.3	Nuclei cerebelli	7
2.4	Cerebellum tabakaları, hücre tipleri ve serebellar lifler	10
2.5	Yosunsu lif sinaptik rozeti (A) serebellar sinaptik glomerulus (B)	12
2.6	Cerebellar korteks ve derin serebellar çekirdeklerde eksitatör ve inhibitör bağlantılar	13
3.1	Oral gavaj uygulaması	24
3.2	Çalışma zaman çizelgesi	25
3.3	Rota-rod testi	26
3.4	Aktivitemetre test düzeneği	27
3.5	Grip testinde kullanılan düzenek ve deneklerin skorlamasında esas alınan hareketler	28
3.6	Plus-maze testi	29
3.7	Açık alan testinin uygulanması.	30
3.8	Beceri gerektiren kavrama testinin uygulanması	31
3.9	İntrakardiyak perfüzyon	32
3.10	Vital floresan boyama ile serebellar tabakaların mikroskopik görünümü	33
3.11	Toluidin mavisi ile boyanan kesitlerde cerebellum'un histolojik görünümü	34
3.12	Birim uzunluğa düşen Purkinje hücre sayısının hesaplanması	35
3.13	Stratum moleculare, stratum granulare ve beyaz cevher alan ölçümü	36
3.14	Myelin alanın dansite ölçümü	37
4.1	Rota-rod testlerinin karşılaştırılması	39
4.2	Yükseltilmiş artı labirent testlerinin karşılaştırılması	40
4.3	Grip testlerinin karşılaştırılması	41
4.4	Lokomotor aktivite düzeylerinin karşılaştırılması	44

	Sayfa
4.5 Açık alan testinde yavruların santral alanda geçirdikleri sürenin karşılaştırılması.	45
4.6 Açık alan testinde yavruların periferal alanda katettikleri mesafe ve yaptıkları vertikal hareket sayılarının karşılaştırılması.	46
4.7 Beceri gerektiren kavrama testlerinde yem tüketim miktarlarının karşılaştırılması	48
4.8 Beceri gerektiren kavrama testlerinde yemi ilk kavrama sürelerinin karşılaştırılması	49
4.9 Birim mesafeye düşen Purkinje hücre sayılarının karşılaştırılması	51
4.10 Birim mesafeye düşen Purkinje hücrelerinin hesaplanmasında kullanılan fotomikrograflar.	52
4.11 Cerebellum'da hacim oranlarının hesaplanması.	53
4.12 Alan oranlarının hesaplanması için grid atılmış serebellar kesitler	54
4.13 Moleküle alan/ Granüler alan ve Beyaz cevher alanı/ Gri cevher alanı oranlarının karşılaştırılması	55
4.14 Grupların myelin dansitelerinin karşılaştırılması	56
4.15 Myelin dansitelerinin ölçümü için seçilen alanların fotomikrografik görüntüleri	57

**TABLULAR**

	Sayfa
2.1 Cerebellum'un efferent (A) ve afferent (B) yolları	8
4.1 Spontan lokomotor aktivite düzeyleri	43
4.2 Beceri gerektiren kavrama testi sonunda tüketilen yem miktarlarının karşılaştırılması	50
4.3 Beceri gerektiren kavrama testinde yemi ilk kavrama sürelerinin karşılaştırılması	50

## 1. GİRİŞ

Epilepsi, beyinde nöronal aşırı uyarılmadan (hipereksitabilite) kaynaklanan, nöbetler oluşturmaya yatkınlık ile karakterize bir bozukluktur. Bu nöbetler gri cevherdeki artmış, hızlı ve yerel elektriksel aktiviteden köken alır ve klinikte belli bir süreye sınırlı olarak, bilinç, davranış, duygu, hareket veya algılama fonksiyonlarında ani başlayan, kısa süreli ve geçici stereotipik değişiklikler gözlenir.

Epilepsi patogenezinin N-Metil D-Aspartik asit (NMDA) reseptör aktivasyonu ve Alfa-amino 3-hidroksi-5-metilisokzasole-4-propionik asit- N-Metil D-Aspartik asit (AMPA-NMDA) sinaptik transmisyonundaki artış sonucu kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) akışında artma, Gama-aminobütirik asit (GABA) sinaptik inhibitör transmisyonunda azalma sonucunda eksitator etkide artışla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca nonsinaptik olarak gap-junction eşleşmesi, demir aracılı  $Ca^{+2}$  osilasyonunda veya glutamat salınımında değişimler, serbest oksijen radikallerinin yayılımı da etiopatogenezde rol oynayan diğer mekanizmalardır [1].

Epilepsinin yaşam boyunca prevalansı 1000 kişide 7,60 iken, yıllık kümülatif insidansının 100.000 kişide 67,77 olduğu gösterilmiştir. Yani genel olarak toplumun %1'ini etkileyebilen bir hastalıktır ve gebe kadınların da yaklaşık %0.3-0.7'si epilepsi hastasıdır [2]. Epilepsili kadınların üçte birinde gebelik sırasında nöbet aktivitesi artmaktadır. Gebelikte kontrol edilemeyen konvülsif nöbetler de en az antiepileptik ilaç tedavisi kadar teratojenik potansiyele sahiptir [3]. Bu nedenle epilepsili kadınların gebelik süresince ilaç tedavilerine devam etmeleri önerilmektedir. Gebelik sırasında antiepileptik ilaç kullanan kadınların oranı yaklaşık %0.3-0.4'dür.

Öte yandan antiepileptik ilaçlar, fetal malformasyonların en yaygın sebepleri arasındadır. Özellikle ilk trimesterde antiepileptik ilaca maruz kalanlarda konjenital malformasyon gelişme riski artar. Klinik çalışmalar intrauterin dönemde antiepileptik ajanlara maruz kalan yavruların beyinlerinde hacimsel azalmalar, zeka geriliği ve öğrenme güçlüğü gibi farklı düzeylerde kognitif bozukluklar ile davranış problemleri gibi pek çok olumsuz yan etkinin görülebildiğine dikkat çekmektedir [4].

Antiepileptik ilaçlar arasında valproat davranışsal anomaliler açısından en fazla teratojenik riske sahip olan ajanlardan birisidir. Fenobarbital ve topiramet için konjenital riskler orta düzeydeyken, lamotrijin ve levitirasetam gibi antiepileptiklerin hem konjenital hem de davranışsal açıdan düşük nörotoksik risk taşıdıkları bildirilmiştir [5]. Literatürdeki çalışmaların büyük bir çoğunluğunda malformasyon görülme oranının en düşük olduğu antikonvülzan ilacın lamotrijin (günde 300 mg'dan daha az dozda) olduğu, aksine valproat ve fenobarbital'in malformasyon oluşturma risklerinin ise diğer ilaçlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir [6].

Antikonvülzan ilaçlara maruziyet, tıpkı diğer olumsuz koşullarda olduğu gibi, beyin gelişiminin kritik periyotlarında gerçekleştiğinde sinir sistemi işlevlerinde kalıcı veya uzun süreli sonuçlar doğurabilir. Sıçanlarda, gebeliğin ikinci haftasından itibaren postnatal dönemin 2. haftasının sonlarına kadar olan dönem yaklaşık olarak insanlardaki kritik dönemlere (üçüncü trimester sonlarına) karşılık gelir. Fenobarbital ve lamotrijin neonatolojide en yaygın kullanılan antikonvülzan ilaçlardan olmalarına rağmen prenatal dönemde bu ilaçlara maruz kalan yavruların sinir sistemi gelişimi tamamlandıktan sonraki dönemlerinde beyinlerinde ve özellikle de beceri gerektiren motor davranış merkezlerinde meydana gelen değişiklikler üzerinde kapsamlı bir morfolojik çalışmaya rastlanmamıştır.

Cerebellum merkezi sinir sisteminin en erken gelişen bölümlerinden biridir. Kas tonusunun ve dengenin korunmasında, amaca yönelik hareketlerin hatasız bir şekilde gerçekleştirilmesinde ve yeni motor becerilerin öğrenilmesinde önemli rol oynar. Aynı zamanda otonom sinir sisteminin kontrolü, emosyonel durum, ilişkisel öğrenme ve kognitif beceriler de dâhil olmak üzere pek çok işleve sahiptir. Aynı zamanda otonom sinir sisteminin kontrolü, emosyonel durum, ilişkisel öğrenme ve kognitif beceriler de dâhil olmak üzere pek çok işleve sahiptir. Bu kadar geniş bir yelpazede yer alan işlevlerin yerine getirilebilmesi için cerebellum'a gerek duyuşal sistemlerden, gerekse MSS'nin farklı bölgelerinden çok sayıda uyaran gelmektedir [7, 8]. Makroskobik olarak incelendiğinde cerebellum'un ağırlığı beyin yaklaşık onda biri kadar olmasına rağmen, yüzey alanı beyin beşte

biri kadardır. Bu nöronlardan özellikle granüler tabakada bulunan küçük soma çaplı mikronöronlar birbirleriyle temas edecek sıklıkta bulunurlar. Bu nedenle memelilerde serebellar korteksde bulunan nöron sayısı merkezi sinir sisteminin geri kalan kısımlarındaki nöron sayısından daha fazladır [8, 9]. Bu durum cerebellum'u beynin diğer bölgelerine kıyasla hem gelişimsel hem de çevresel faktörlere karşı çok daha hassas hale getirmektedir.

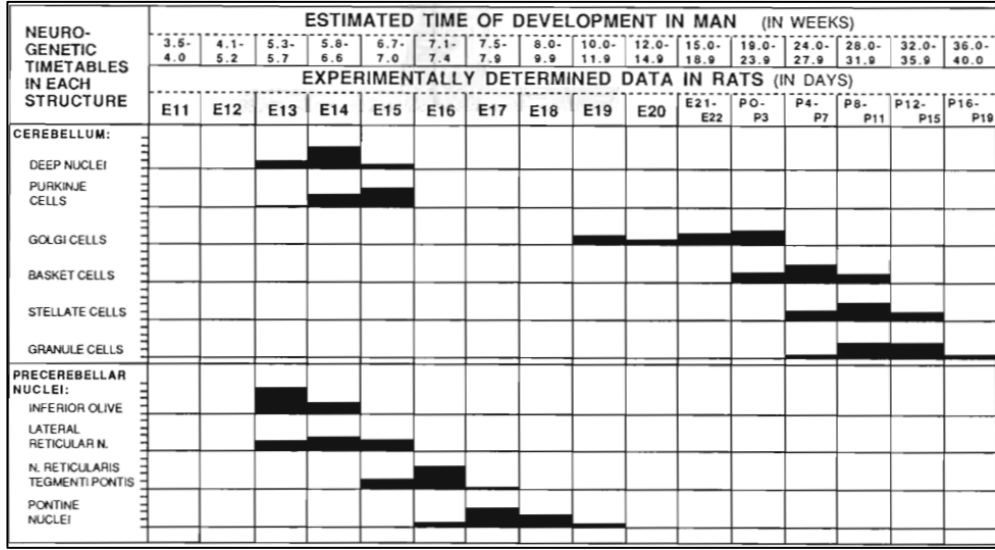


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Cerebellum'un Gelişimi

Cerebellum, amaca uygun ve beceri gerektiren kas hareketlerinin ayarlandığı ve koordine edildiği bir merkezdir. Merkezi sinir sisteminde en erken gelişen bölümlerinden biri olan cerebellum filogenetik açıdan gelişim dönemlerine göre 3 bölüme ayrılır. Archicerebellum evrimsel süreçte ilk gelişen bölüm olup vücudun dengesi, başın uzaysal konumu ve göz hareketlerinin koordinasyonunu sağlar. Paleocerebellum ikinci sırada gelişen bölgedir; ekstremitelerdeki kas içciklerinden ve proprioseptörlerden gelen uyarıları iç kulak ve gözden gelen uyarılarıyla eşleştirerek kas tonüsü ve hareketlerinin koordinasyonunda görev alır. Neocerebellum ise evrimsel süreçte en son gelişen bölgedir ve beceri gerektiren, ancak otomatik bir şekilde yapılan istemli mental ve motor aktivitelerin pek çoğunun düzenlenmesinden sorumludur. Böylece cerebellum vücut pozisyonu, kas tonusu, vestibüler duyu ve çevre ile ilgili bilgileri alarak bunları korteksten gelen hareket planları ile karşılaştırır. Hareketin ileriye dönük sonucunu öngörebilir ve devam eden hareketi düzenleyebilir. Hareketin etkilerini, sadece kişinin kendisi açısından değil, aynı zamanda çevreye etkisi açısından da öngörür. Örneğin kalabalık bir caddede birbirimize çarpmadan yürüyebilmemiz cerebellum sayesinde gerçekleşir [10].

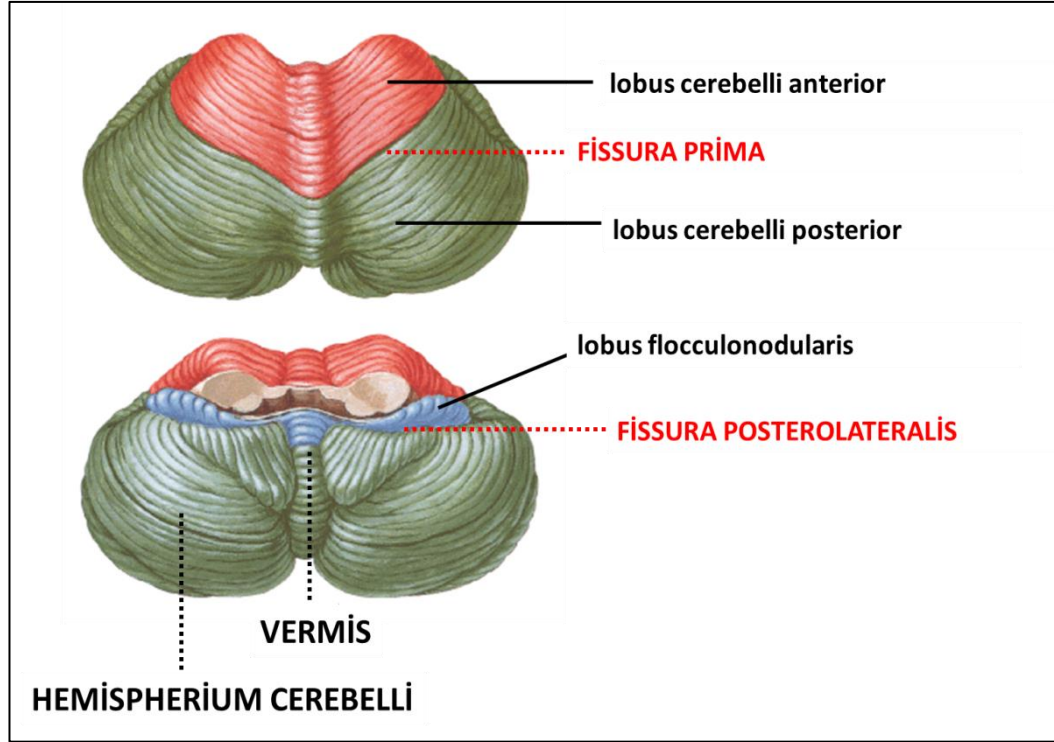
Hem insanlarda hem de deney hayvanlarında yapılan anatomik çalışmalar, cerebellum'un, hippocampus, corpus amygdaloideum, hypothalamus, bazal ganglionlar, thalamus, beyin sakı ve medulla spinalis dahil olmak üzere pek çok merkezle milyonlarca bağlantıya sahip olduğunu göstermektedir [11]. Bu bağlantılar cerebellum'daki başlıca iki ana hücre grubu ile sağlanır. Bunlardan makronöronlar, yani Purkinje nöronları, ve nuclei cerebelli'nin GABAerjik nöronları prenatal dönemde ventriküler bölgeden gelişirken; granül hücreleri gibi glutamaterjik mikronöronlar, postnatal yaşamın erken döneminde rombik dudaklarının lateral kısmından gelişir [12] (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Cerebellum'un gelişimi- Bayer ve ark.[13]'ndan alınmıştır.

## 2.2. Cerebellum'un Fonksiyonel Anatomisi

Cerebellum, fossa cranii posterior'da bulunur ve beyinden tentorium cerebelli ile ayrılır. Ventriculus quartus üzerinde uzanır. Cerebellum, sağ ve solda olmak üzere iki adet hemispherium cerebelli ve iki hemisferin ortasında bulunan vermis cerebelli bölümlerinden oluşur. Cerebellum'da folia cerebelli adı verilen yoğun katlantılar bulunur. Cerebellum, üç loba ayrılmıştır. Bunlardan lobus cerebelli anterior ve lobus cerebelli posterior fissura prima ile birbirinden ayrılır. Lobus flocculonodularis ise vermis cerebelli'nin en alt kısmında bulunan nodulus ile hemispherium cerebelli'nin flocculus kısımlarının birleşmesiyle oluşur ve fissura secunda ile lobus cerebelli posterior'dan ayrılır (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Cerebellum yüzeyel anatomisi- Netter [14]'den alınmıştır.

Serebellar korteksten kaynaklanan çıktıların işlendiği dört adet nuclei cerebelli vardır. Bu çekirdekler lateralden mediale doğru; nucleus dentatus, nucleus emboliformis, nucleus globosus ve nucleus fastigii olarak sıralanırlar. Derin serebellar çekirdeklerin en büyüğü nucleus dentatus'tur. Nuclei cerebelli aynı zamanda, cerebellum'a gelen afferent girdileri de alır. Bu durum cerebellum'dan çıkan uyarıların amaca uygun olarak daha iyi koordine edilmesini ve düzenlenmesini sağlar (Şekil 2.3).

Cerebellum beyin sakına üç adet pedunculi cerebelli aracılığı ile bağlanır. Bunlar pedunculus cerebellaris superior, pedunculus cerebellaris medius ve pedunculus cerebellaris inferior' dur. Cerebellum'a gelen ve giden tüm aksonal lifler bu pedunculi cerebelli içerisinde taşınır. Pedunculus cerebellaris superior mesencephalon ile cerebellum'u birbirine bağlar. Bu yol ile cerebellum'a gelen başlıca afferent yollar tractus spinocerebellaris anterior, cerebellumdan çıkan efferent yollar ise tractus dentatorubrothalamicus ve tractus dentatothalamicus'tur. Pedunculus

cerebellaris medius pons ile cerebellum'u bağlar. Bu yolla gelen afferent yollara tractus pontocerebellaris adı verilir ve bu pedunculus içerisinde efferent lif bulunmaz. Pedunculus cerebellaris inferior ise medulla oblongata ile cerebellum'u bağlar. Bu yolla gelen başlıca afferent yollar tractus vestibulocerebellaris, tractus olivocerebellaris ve tractus spinocerebellaris posterior iken; cerebellum'dan çıkan efferent yollar, tractus cerebellovestibularis ve tractus cerebelloolivaris'dir (Tablo 2.1).



**şekil 2.3.** Nuclei cerebelli: D=Nucleus dentatus, E=Nucleus embeliformis, N=nucleus globosus, F=Nucleus fastigii- Erzurumlu ve ark. [15]'ndan alınmıştır.

**Tablo 2.1.** Cerebellum'un efferent (A) ve afferent (B) yolları

BÖLGE A	BAŞLANGIÇ	SONLANMA	PEDUNCULUS CEREBELLI (P.C.)
LATERAL CEREBELLAR HEMİSFER	Nucleus dentatus	Thalamus (nucleus ventrolateralis) → Kortikal motor sahalar Nucleus ruber (pars parvocellularis) → Tr. tegmentalis centralis	PC. superior
PARAVERMIS	Nucleus globosus ve Nucleus emboliformis	Thalamus (Nucleus ventrolateralis) → Kortikal motor sahalar Nucleus ruber (pars magnocellularis) → Tr. rubrospinalis	PC. superior
VERMIS	Nucleus fastigii	Thalamus (nucleus ventrolateralis) → Kortikal motor sahalar Tectum Nuclei vestibulares Formatio reticularis	PC. superior (Fasciculus uncinatus) PC. inferior (Corpus juxtarestiforme)
LOBULUS FLOCCULONODULARIS	Nuclei vestibulares	Fasciculus longitudinalis medialis	PC. inferior (Corpus juxtarestiforme)

TRACTUS B	BAŞLANGIÇ	SONLANMA	PEDUNCULUS CEREBELLI (P.C.)
PONTOCEREBELLAR	Cortex cerebri → Nuclei pontis (Yosunsu lifler)	Nodus hariç tüm kontralateral zonlar	PC. medius
SPINOCEREBELLAR Tr. spinocerebellaris anterior Tr. spinocerebellaris rostralis Tr. spinocerebellaris posterior Tr. cuneocerebellaris	Alt ekstremité → Omurilik gri cevheri Üst ekstremité → Omurilik gri cevheri Alt ekstremité proprioseptörleri → Nucleus dorsalis (Clarke sütunu) Üst ekstremité proprioseptörleri → Nucleus cuneatus accessorius	(çift çapraz)  Vermis ve paravermis (genellikle ipsilateral)	PC. superior PC. superior ve inferior PC. inferior PC. inferior
vestibulocerebellar	Nuclei vestibulares	Lobulus flocculonodularis ve vermis	PC. inferior (Corpus juxtarestiforme)
OLIVOCEREBELLAR	Nuclei olivares inferiores (→Tırmanıcı lifler)	Tüm kontralateral zonlar	PC. inferior
TRIGEMINOCEREBELLAR	Nucleus principalis nervi trigemini ve Nucleus spinalis nervi trigemini	Vermis ve paravermis (genellikle ipsilateral)	PC. inferior
RETICULOCEREBELLAR	Nuclei reticulares tegmentalis Nuclei reticulares laterales ve paramedianes	Vermis ve paravermis (genellikle ipsilateral)	PC. superior PC. inferior
TECTOCEREBELLAR	Colliculus superior ve inferior	Lobus anterior ve posterior (genellikle ipsilateral)	PC. superior

Cortex cerebelli'de olduğu gibi, vücut bölgelerinin temsilleri cerebellar korteks üzerinde haritalanabilir. Homonculus olarak adlandırılan bu haritada, gövde vermis cerebelli üzerinde orta hatta, ekstremiteler ise hemispherium cerebelli'de yerleşmiştir. Lobus cerebelli anterior'da, ekstremitelerin ve başın temsili vardır ve lobus cerebelli posterior'da ise hem başın hem de ekstremitelerin ayna görüntüsü vardır. Gövde her zaman orta hattadır.

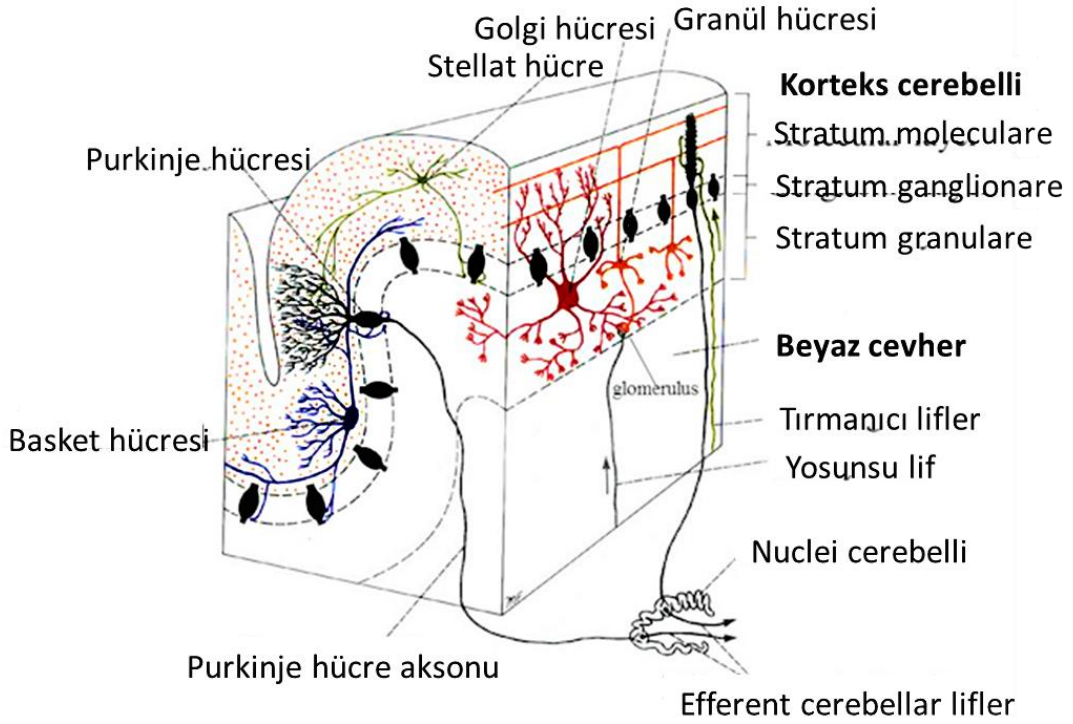
Cerebellum proprioseptif bilgiyi alır ve yorumlar. Nuclei vestibulares ile olan bağlantıları sayesinde dengenin koordinasyonunda rol oynar. Ön beyin ile olan bağlantıları, ekstremiteler hareketlerinin koordinasyonunun yanı sıra ince hareket ve el-göz koordinasyonunun sağlanmasına katkıda bulunur. Cerebellum, vestibüler sistemden denge ile ilgili girdiler, medulla spinalis' den proprioseptif bilgiler ve nuclei pontinus aracılığıyla da korteks cerebri'den girdiler alır. Bu bilgiler, serebellar korteksde bulunan nöronlara yosunsu lifler aracılığıyla taşınır. Nucleus olivares inferiores kompleksinden gelen girdiler ise serebellar kortekste Purkinje hücrelerine ulaşan tırmanıcı lifleri oluşturur. Bu liflerin çoğunluğu kontralateral, bazıları ise bilateral olarak cerebellum'da sonlanır ve serebellar korteksin çıktılarının modülasyonunda görev alırlar. Olivocerebellar liflerin büyük çoğunluğu pedunculus cerebellaris inferior'dan geçer [16].

### 2.3. Cerebellum'un Histolojisi

Cerebellum'un histolojik kesitlerinde dışta korteks adı verilen bir gri cevher tabakası, içte cerebellum'a giren ve çıkan lif demetlerinden oluşan beyaz cevher tabakası ve bu tabakanın içinde de nuclei cerebelli adı verilen nöron kümeleri görülür (Şekil 2.4).

Serebellar korteksi oluşturan tabakalar beynin kortikal tabakaları ile karşılaştırıldığında daha basit ve altı yerine üç tabakalı bir yapıdadır: yüzeye en yakın tabakaya stratum moleculare, altında düz bir hat şeklinde dizili olan tabakaya Purkinje hücre tabakası ve Purkinje hücrelerinin altındaki tabakaya stratum granulare adı verilir. Cerebellum'un yosunsu ve tırmanıcı lifler olarak sınıflandırılan afferentleri ve Purkinje hücrelerinden kaynaklanan efferentleri substantia alba boyunca uzanırlar. Nuclei cerebelli ise substantia alba'nın derininde gömülü olarak bulunan 4 çift çekirdekten meydana gelir.

Cerebellum'un beyaz cevherinde bulunan lif demetlerinin büyük bir çoğunluğu afferent, geri kalan kısmı ise efferent lifler (yaklaşık 40:1 oranında) tarafından oluşturulur.



**Şekil 2.4.** Cerebellum tabakaları, hücre tipleri ve serebellar lifler- Snell [17]'den alınmıştır.

### 2.3.1 Serebellar Korteks'teki Hücre Tipleri

Serebellar korteks başlıca beş hücre tipi içerir: granül, Golgi, Purkinje, sepet ve stellat hücreleri.

**Granül hücresi:** Granül hücreleri çok boldur ve granüler tabakada bulunurlar. Serebellar glomerulus içindeki yosunsu liflerden afferent girdi alırlar. Aksonları, paralel lifleri oluşturmak üzere, stratum moleculare'de "T" harfine benzer şekilde dallarına ayrılır.

**Golgi hücresi:** Golgi hücreleri de granüler tabakada bulunur ve uzantıları diğer tüm katmanlara yayılır. Bunlar, serebellar glomerulus'un yanı sıra paralel lifler, yosunsu lifler ve tırmanıcı lifler ile sinaps yapan inhibitör tipteki ara nöronlardır.

**Purkinje hücresi:** Purkinje hücresi, serebellar korteksdeki en büyük hücredir. Paralel lifler vasıtasıyla granül hücrelerinden ve tırmanıcı lifler vasıtasıyla da nucleus olivares inferiores kompleksinden girdiler alır. Purkinje hücrelerinin aksonları derin serebellar çekirdekler aracılığıyla cerebellum'un ana çıktı yolunu oluşturur. Purkinje nöronları Purkinje hücre tabakasında bulunur. Sagittal düzlemde yaygın olarak dağılmış vaziyette görülebilen dendritleri, moleküler tabakaya ulaşan tırmanıcı lifler ve paralel lifler ile eksitator tipte sinapslar oluştururlar.

**Basket ve stellat hücreleri:** Bu inhibitör GABAerjik nöronlar moleküler tabakada yer alırlar. Bu hücreler de yosunsu ve tırmanıcı liflerden girdi alırlar ve dalları Purkinje hücrelerinin dendritik ağacına dik olarak uzanır. Bir basket hücresi yaklaşık 70 Purkinje hücresi ile sinaps yapabilir.

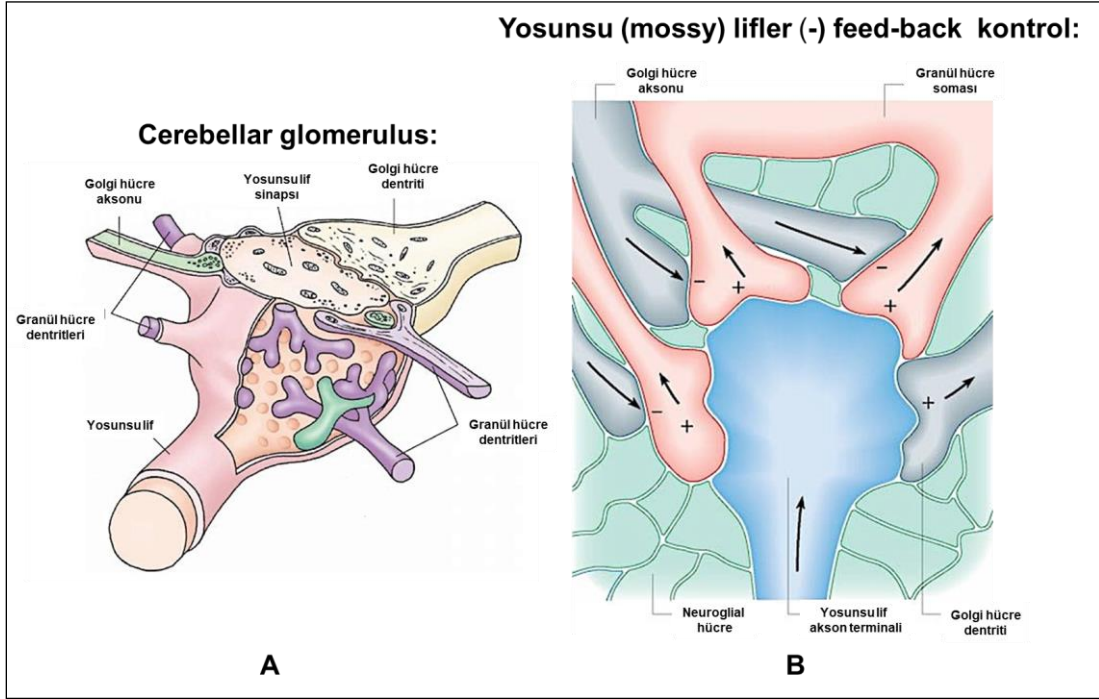
### 2.3.2. Serebellar Korteks Lifleri

Serebellar korteks'e yosunsu ve tırmanıcı olmak üzere başlıca iki ana kaynaktan lifler gelir.

**Yosunsu lifler:** Yosunlu lifler nucleus olivarius inferior kompleksi dışındaki tüm kaynaklardan köken alan serebellar afferentlerdir. Bunlar medulla spinalis'den, columna posterior çekirdeklerinden, trigeminal sistemden, nuclei pontinus'dan ve nuclei vestibulares'den kaynaklanan afferentleri içerir. Serebellar glomerulus'da Golgi hücresi ve granül hücre dendritleri ile sinaps yaparlar (Şekil 2.5).

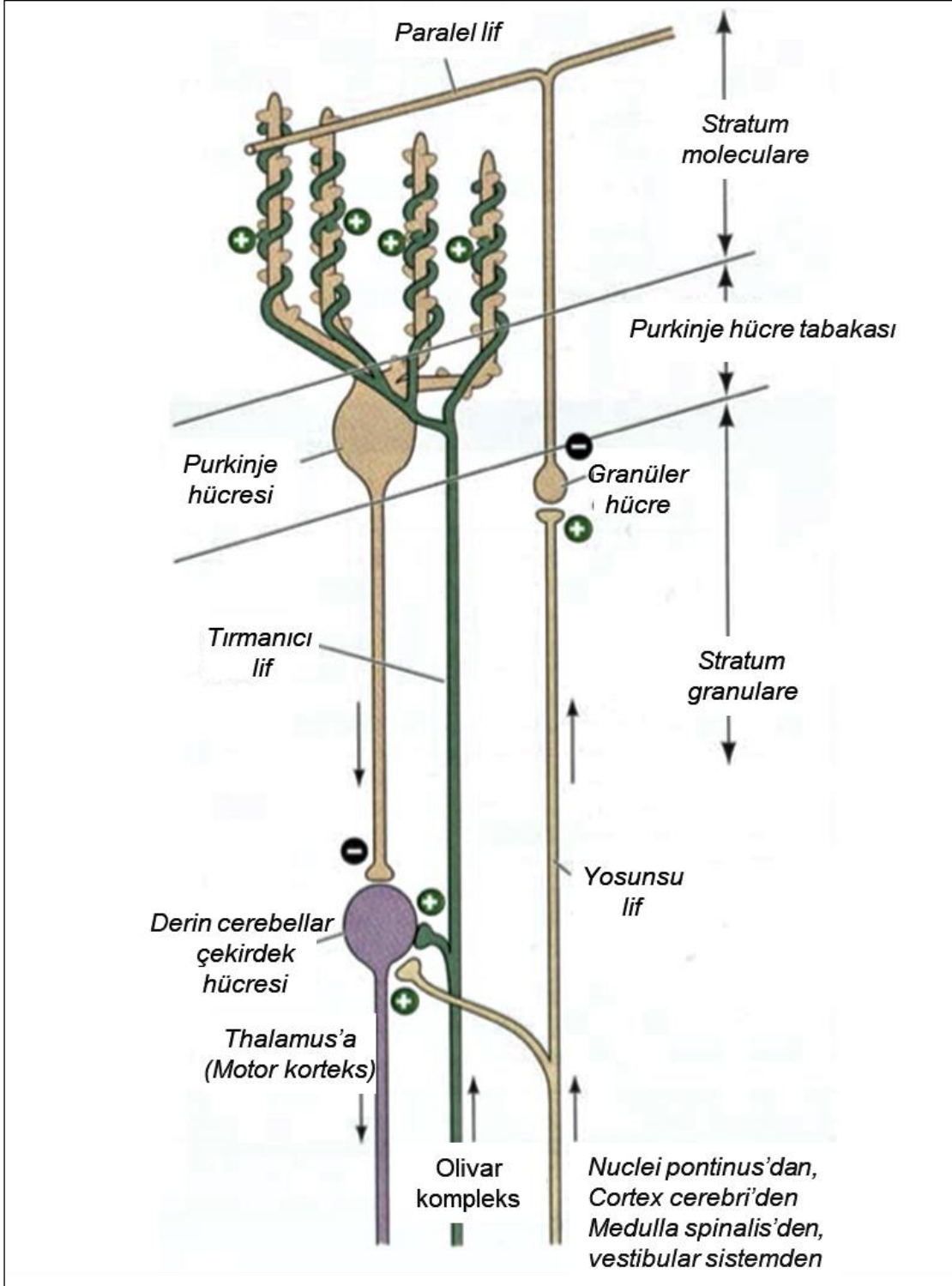
Granül hücrelerinin aksonları ise moleküler tabaya uzanarak burada "T" harfine benzer şekilde ikiye ayrılır ve paralel lifleri oluştururlar. Bu lifler Purkinje hücre dendritleri Purkinje hücrelerinin dendritik ağacının düzlemine dik olarak uzanarak yolu boyunca birçok Purkinje hücresinin dendritleriyle sinaps yaparlar (Şekil 2.6).





**Şekil 2.5.** Yosunsu lif sinaptik rozeti (A) – [www.medicalexpress.com](http://www.medicalexpress.com) [18]'dan alınmıştır. Santral aksonal bir düğüm etrafında eksitator (+) ve inhibitör (-) sinapsların etkileştiği bir serebellar sinaptik glomerulus (B) - [www.clinicalgate.com](http://www.clinicalgate.com) [19]'dan alınmıştır.

**Tırmanıcı lifler:** Tırmanıcı lifler nucleus olivarius inferior kompleksinden orijin alır. Her bir tırmanıcı lif spesifik bir Purkinje hücresi ile uyarıcı tipte sinaps yapar. Bu bire bir ilişki serebellar döngüde güçlü bir sinaptik uyarıcı görevi görür. Nucleus olivarius inferior kompleksindeki her bir nöron yaklaşık 10 tırmanıcı lif doğurur. Tırmanıcı lifler, hareket esnasında herhangi bir motor bozukluk olması durumunda duyuşsal bir geri besleme döngüsü oluştururlar. Bu sinapslar motor öğrenmede anahtardır [20] (Şekil 2.6).



**Şekil 2.6.** Serebellar korteks ve derin serebellar çekirdeklerdeki eksitator ve inhibitör bağlantılar- Purves ve ark. [21]'dan alınmıştır.

## 2.4. Antiepileptik İlaçlar Hakkında Genel Bilgiler

Epilepsi dünya nüfusunun yaklaşık %1'inde görülen ve tekrarlayan nöbetlerle karakterize kronik bir hastalıktır. Nörolojik bozukluklar içinde serebrovasküler inme'den sonra ikinci sıklıkta görülür. Standart antiepileptik ilaç tedavisi ile nöbetlerin ancak %80'i kontrol altına alınabilir. Nöbetler beyindeki nöronların anormal deşarjlarından kaynaklanır. Nöbetlerin etiolojisinde elektrolit bozukluğu, infeksiyon, maligniteden kafa travmasına kadar birçok patolojik durum rol alabilir. Bazı alt tiplerinde kalıtımın baskın rolü kanıtlanmıştır. Genellikle voltaj-bağımlı iyon kanalı ya da GABA<sub>A</sub> reseptörlerini kodlayan genlerin otozomal dominant karakterdeki tek gen defektlerinin, ailevi jeneralize epilepsilerin küçük bir kısmından sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Uzunca bir süreyle, epilepsinin tüm formlarının tedavisi için tek bir antiepileptik ilaç kullanılabileceği kabul edilmiştir. Ancak epilepsinin etiolojisi çok çeşitlidir. Şimdiye kadar uygulanan ilaç tedavilerinin çok azı, etiyojjiye yönelik olarak özgünlük göstermiştir. Bunlar arasında nöbet tipine özgünlük en fazla absans tip jeneralize nöbetlerde görülmektedir. Absans nöbetler elektroensefologramda (EEG) tipik olarak etosüksimid ve valproat'a yanıt veren, fakat fenitoin ve karbamazepin ile şiddetlenebilen, 2-3 Hz'lik diken-dalga formasyonu şeklinde görülürler.

Epilepsi nöbetleri üzerinde selektif etkili ilaçların etkinliğini saptamak amacıyla, absans benzeri ataklar gösteren mutant fare modelleri ya da pentilentetrazol gibi kimyasal ajanlar ile nöbetin tetiklenebildiği deneysel modeller kullanılarak tarama testleri yapılabilir. Buna ek olarak deney hayvanlarında maksimum şiddette elektriksel uyaran kullanmak suretiyle de deneysel epilepsi modelleri oluşturulabilir. Bu amaçla kullanılan maksimal elektroşok testi [22], kimyasal bir bileşiğin jeneralize tonik-klonik nöbetler ile parsiyel kompleks nöbetlere karşı etkin olup olmadığının araştırılmasında kullanılan bir ayırıcı testtir. Fenitoin, karbamazepin ve lamotrijin gibi ilaçların etkinliği nöbetin başlangıcındaki fleksiyon süresini uzatması ve tonik ekstensiyonu kısaltması ya da önlemesine göre değerlendirilir. Önemli bir tarama testi olan maksimal elektroşok testi, özellikle voltaj bağımlı Na<sup>+</sup>

kanallarının inaktivasyonunu uzatan bir etki mekanizmasına sahip ilaçların tanımlanmasında kullanılmaktadır. Elektriksel kindling yöntemiyle sıçanlarda uyarılan limbik nöbetler ise, kompleks parsiyel nöbetlerde etkinliği öngörmeye daha iyi bir tarama sağlar.

Mevcut antiepileptik ilaçlar hastaların %60'ında yeterli nöbet kontrolü sağlar. İlaç direnci tedavinin başlangıcında veya nispeten başarılı bir tedavi periyodundan sonra da gelişebilir. Bu durum ilaçların hedef bölgelere erişimindeki bozukluklar veya hedef moleküllerin duyarsızlığına bağlı olarak ortaya çıkabilir. Çocuklarda ilerleyici beyin hasarına bağlı nöbetlerin tedavisi çok zordur. Erişkinlerde bazı fokal özellikli nöbetler tedaviye dirençlidir. İlaça karşı dirençli hastaların bazıları vagus sinir uyarısına cevap verebilir. Bu nedenle vagal uyarı parsiyel nöbetleri olan epilepsi hastalarında non-farmakolojik bir yöntem olarak onaylanmıştır. Vagus sinir uyarısı ilaca dirençli veya antiepileptik ilaçları iyi tolere edemeyen vakalarda da endikedir. Uyarıcı elektrotlar sol nervus vagus üzerine ve pace-maker da göğüs duvarı veya aksilla'ya implante edilerek uygulanabilir.

#### **2.4.1 Antiepileptik İlaçların Moleküler Mekanizmaları**

Yeni antiepileptik ilaçların geliştirilmesinde yukarıda belirtilen tarama testlerine ilaveten hedefe yönelik moleküler yaklaşımlar da kullanılmaktadır. Bu amaçla temel olarak üç ana mekanizmadan birini hedef alan bileşikler kullanılmaktadır. Bu temel mekanizmalar:

- i) İnhibitör (genellikle GABAerjik) iletinin arttırılması
- ii) Eksitator (genellikle glutamaterjik) iletinin zayıflatılması
- iii) İyonik geçirgenliğin değiştirilmesi

Mevcut antiepileptik ilaçlar genel olarak hastalığı tedavi etmekten ziyade semptomatik olarak etki göstermektedir. Hastalığın seyrini değiştiren veya altta yatan nedeni bertaraf edecek başarılı tedavi stratejilerinin geliştirilmesi güçtür. Potansiyel antiepileptik ilaçların geliştirilmesinde eksitator ve inhibitör sinapsların her ikisinin birden hedeflenmesi de amaçlanmaktadır.

1990 yılına kadar, yaklaşık 16 antiepileptik ilaç kullanılmıştır ve bunlar birbirine çok benzeyen beş kimyasal grupta sınıflandırılabilir: Barbitüratlar, hidantoinler, oksazolidindionlar, süksinimidler, asetilüreler. Bu basit yapıdaki ilaçlar için, heterosiklik halka üzerindeki eklere göre farmakolojik sınıfı anti-MES (maksimal elektroşok nöbet) ya da anti-pentilentetrazol olarak belirlenmektedir. Yapıdaki küçük değişiklikler, etki mekanizmasını ve bileşiğin klinik özelliklerini dramatik bir şekilde değiştirebilmektedir. Bu eski grupta kalan ilaçlar (karbamazepin, valproik asid, benzodiazepinler gibi) yapısal olarak 1990 yılından beri pazarlanan yeni bileşiklerden (eslikarbazepin, felbamat, gabapentin, lakosamid, lamotrijin, levatirasetam, okskarbazepin, pregabalin, retigabin, rufinamid, stiripentol, tiagabin, topiramet, vigabatrin ve zonisamid gibi) farklıdır [23].

Antiepileptik ilaçlar, yapısal ve kimyasal özellikleri çok farklı olsa bile, birçok benzer farmakokinetik özellik gösterirler. Çoğu oral etkinlik sağlamak üzere seçilmişlerdir ve tümü santral sinir sistemine girmek zorundadır. Bu bileşiklerin çoğu çok az çözünabilir olmasına rağmen emilimleri genelde iyi olup, dozun %80-100'ü dolaşıma ulaşır. Antiepileptik ilaçların çoğu (fenitoin, tiagabin ve valproik asid hariç) plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmaz.

Düşük ekstraksiyon oranlarına sahip olmalarına rağmen, antiepileptik ilaçlar esas olarak hepatik mekanizmalar tarafından temizlenir. Çoğu yine karaciğer tarafından metabolize edilen aktif metabolitlere dönüştürülürler. Bu ilaçlar öncelikle total vücut sıvısına dağılırlar. Plazma klerensleri görece yavaştır, bu nedenle antiepileptik ilaçların büyük bir kısmı orta-uzun etkili olarak kabul edilir. Bazılarının yarılanma ömrü 12 saatten uzundur. Eski antiepileptik ilaçların çoğu, karaciğer mikrozomal enzim aktivitesinin güçlü indükleyicileridir [24].

## **2.5. Gebelikte Antiepileptik İlaç Kullanımı**

Gebelikte antiepileptik ilaç kullanımında temel yaklaşım nöbet kontrolünü en az ilaçla ve en düşük dozla sağlamak şeklindedir [25]. Antiepileptik ilaç kullanan gebeler üzerinde yapılan en geniş çaplı

çalışmalardan birisi, 1999'dan beri uluslararası düzeyde 44 farklı ülkeden araştırmacıların verilerini inceleyen bir topluluk olan EURAP (International Registry of Antiepileptic Drugs and Pregnancy) tarafından yürütülmektedir. Bu çalışmada izlenen hastalar nöbet sıklığına (hiç nöbet geçirmeyen, günlük nöbet, haftada bir, birden fazla, ayda bir, ayda birden fazla gibi) ve nöbet şekillerine göre (jeneralize tonik klonik veya sekonder jeneralize nöbet gibi) alt gruplara ayrılarak takip edilmiştir. İzlenen yaklaşık 2000 kadar gebenin %11.2'sinde prematür doğumlar olduğu bildirilmiştir. Bu gebelerin değişik oranlarda, monoterapi (% 78.7) veya politerapi (% 21.3) şeklinde, antiepileptik ilaç kullandıkları bildirilmiştir. Bunlar sıklık sırasına göre karbamazepin, lamotrijin, okskarbazepin, fenobarbital ve valproat şeklindedir [26]. Politerapinin nöbet sıklığınının artmasında bağımsız bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Olguların %16'sında ikinci ve üçüncü trimesterde daha belirgin iyileşme saptanırken, %17'sinde ikinci ve üçüncü trimesterde kötüleşme olduğu, olguların %2'sinde de, daha çok üçüncü trimesterde olmak üzere, her üç trimesterde de konvülsif tipde nöbet olduğu bildirilmiştir [27].

## 2.6. Lamotrijin

Lamotrijin (LTG), Na<sup>+</sup> kanal inaktivasyonunu uzatarak hızlı tekrarlayıcı ateşlemeleri engelleyen bir ilaçtır. Bu mekanizma ilacın fokal epilepsideki etkinliğini açıklar. LTG aynı zamanda voltaj bağımlı Ca<sup>+2</sup> kanallarını da inhibe ederek etki eder. Bu sayede, ilaç absans nöbetler de dahil olmak üzere çocukluk çağı primer jeneralize nöbetlerde de etkilidir. Parsiyel nöbetlerde, çocukluk çağı absans, myoklonik nöbetler ve Lennox-Gastaut sendromunda da etkinliği onaylanmıştır. Ayrıca bipolar bozuklukta da etkili olduğu gösterilmiştir. Advers etkileri baş dönmesi, baş ağrısı, bulantı, uyuklama ve cilt döküntüsüdür. Döküntü tipik bir hipersensitivite reaksiyonu olarak kabul edilmektedir. Döküntü riski ilaç yavaş verilmesi ile azaltılabilesine karşın, pediatrik hastalar büyük risk altındadır; çünkü bazı çalışmalar yaşamı tehdit eden dermatitin potansiyel olarak pediatrik hastaların %1-2'sinde gelişebileceğini ortaya koymaktadır.

LTG neredeyse tamamen emilir ve dağılım hacmi 1-1,4 l/kg aralığındadır. Proteinlere %55 oranında bağlanır. İlaç lineer kinetiğe sahiptir ve birincil olarak glukuronidasyonla 2-N-glukuronide dönüştürülerek metabolize edilir ve idrara atılır. LTG normal bireylerde yaklaşık 24 saatlik bir yarılanma ömrüne sahiptir; bu süre, enzim indükleyici ilaç alan hastalarda 13-15 saate kadar düşmektedir. LTG, tipik olarak 100-300 mg/gün aralığında kullanılan dozajlarında ve terapötik kan düzeyi 3mcg/ml civarında iken erişkinlerde parsiyel nöbetlere karşı etkilidir [24].

Sıçanlarda yüksek dozlarda uygulandığında yaygın nöronal ölümle sonuçlandığı rapor edilmiştir [28]. PHB ile LTG kombinasyonu PHB'nin proapoptotik aktivasyonunu belirgin olarak artırır. LTG ile sağlanan proapoptotik aktivasyondaki bu potansiyalizasyonun özel, bağımsız bir mekanizma ile meydana geldiği düşünülmektedir. Bunun, gelişimsel dönemin kritik periyodu esnasında gözlenen apoptotik mekanizmalara benzer bir alt aktivasyon sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Böyle bir nöronal aktivite baskılanması, NMDA tip glutamat reseptör inhibisyonu ve GABAerjik sistemin aşırı aktivasyonu sonucu gelişebilir [29]. İlginç bir durum da, düşük doz LTG'nin PHB'nin tetiklediği apoptozisten koruyucu etkisinin olmasıdır [28]. Bu koruyucu aktivitenin, neonatal nöronal apoptozise katkıda bulunduğu bilinen [30, 31] kalsiyum kanalları üzerinden sağlandığı düşünülmektedir [32]. Daha yüksek dozlarda ise, muhtemelen sodyum kanalları üzerinden, nöronal aktivasyonu artırarak da PHB'nin indüklediği hücre ölümünü artırır [28].

Forcelli ve arkadaşları nöronal apoptozisi tetikleyen dozdan daha düşük dozda LTG maruziyetinin sinaptik olgunlaşmada gecikmeye neden olduğunu rapor etmişlerdir [33]. Bu bulgu fonksiyonel toksisite için eşik ilaç dozunun, sinaptik matürasyon bozukluğuna yol açarak geri dönüşümsüz ölümü ve apoptotik aktivasyona yol açan dozdan daha düşük olduğu görüşü ile uyumludur.

LTG'nin çocuk gelişimi [34] ve dil becerileri [35] üzerinde üzerinde olumsuz etkilere sahip olmadığı öne sürülmektedir. Gerçekten de, LTG'ye maruz kalan 3 ve 4.5 yaşlarındaki çocukların CBZ veya PHB'ye maruz kalan çocuklardan farklı olmadıkları; valproat'a maruz kalanlardan ise daha iyi IQ

skorlarına sahip oldukları bildirilmiştir [26, 36]. Bu bulguların aksine, LTG veya valproat alan annelerden doğan çocukların ilaç almayan çocuklarla karşılaştırıldığı prospektif bir gözlem çalışmasında, çocukların motor becerilerinde, duyu hassasiyet ölçeklerinde, davranış özelliklerinde, dikkatlerini odaklamada ve ebeveyn tarafından bildirilen yürütücü fonksiyonlarında bozukluk olduğu bildirmiştir. Özellikle, valproat grubunun genel olarak LTG grubundan daha fazla defisitlere sahip olduğu gösterilmiştir [37].

## 2.7. Fenobarbital

Fenobarbital (PHB) halen kullanılmakta olan en eski antiepileptik ilaçlardan biridir. Uzun süre en güvenilir antiepileptiklerden biri olarak kabul edilmesine rağmen, günümüzde daha az sedatif etkili diğer ilaçların kullanımı önerilmektedir. Barbitüratlar çoğu hekimlerce sadece çocuklardaki nöbetler için tercih edilen ilaçlar olarak düşünülmektedir. Barbitürik asidin antiepileptik ilaç olarak klinikte yararlanılan dört türeği; fenobarbital, mefobarbital, metabarbital ve primidon'dur. Bunların ilk üçü birbirlerine çok benzediklerinden birlikte ele alınacaktır. Metabarbital metilli barbitaldır, mefobarbital ise metilli fenobarbitaldir, ikisi de *in vivo* metillenirler. Bu üç zayıf asidin  $pK_a$  değerleri 7,3-7,9 aralığındadır. Bu yüzden normal asit-baz dengesindeki küçük değişiklikler dahi iyonize olan ve olmayan formlarının oranında önemli dalgalanmalara neden olabilir. Bu özellik,  $pK_a$  değeri 7,4 plazma pH değerine yakın olan ve en sık olarak kullanılan barbitürat fenobarbital için önemlidir. PHB ve *N*-metilfenobarbital moleküllerinin üç boyutlu yapısı fenitoin ile benzerdir. İki bileşik de fenil halkasına sahiptir ve parsiyel nöbetlerde etkilidirler.

PHB'nin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir, fakat inhibitör süreçleri kolaylaştırması ve eksitator iletimi zayıflatmasının önemli rolü vardır. Yeni veriler, epileptik odaktan dağılımı engelleyerek ve ateşlemeyi bastırmak suretiyle anormal nöronları selektif olarak baskılayabildiğini göstermektedir. Fenitoin'e benzer şekilde PHB, nöron kültüründe (yalnızca yüksek



konsantrasyonlarda),  $\text{Na}^+$  geçirgenliği üzerinde etki göstererek yüksek frekanslı tekrarlayan ateşlemeyi baskılamaktadır. Yine yüksek konsantrasyonlarda, barbitüratlar bazı  $\text{Ca}^+$  akımlarını (L-tipi ve N-tipi) bloke etmektedir. PHB  $\text{GABA}_A$  reseptörünün allosterik düzenleyici bölgesine bağlanır ve GABA reseptörünün aracılık ettiği akımı,  $\text{Cl}^-$  kanallarının açık kalmasını uzatarak kuvvetlendirir. Glutamat salıverilmesi üzerine olan etkisi, muhtemelen AMPA yanıtlarının blokajından daha önemlidir. Hem GABA aracılıklı inhibisyonu kuvvetlendirmesi hem de glutamat aracılı eksitasyonu azaltması PHB'nin terapötik konsantrasyonlarında görülür.

PHB, her türlü nöbet tipinde sıklıkla denenmesine rağmen, özellikle nöbetlerin kontrol edilmesinin zor olduğu parsiyel nöbetler ile tonik-klonik nöbetlerin tedavisinde yararlıdır. Absans, atonik nöbetler ve infantil spazmlar gibi jeneralize nöbetlerde etkili olduğunu gösteren pek az kanıt vardır; hatta bu nöbet tipleri olan bazı hastaları kötüleştirdiği bildirilmiştir.

Çoğu hastada PHB'nin terapötik düzeyi 10 mcg/ml ile 40 mcg/ml aralığındadır. PHB'nin etkinliğini belirleyen en iyi örnek febril nöbetlerdir ve febril nöbetlerin tekrarının önlenmesi için 15 mcg/ml'nin altındaki düzeyler yetersiz görünmektedir. Pek çok hasta 40 mcg/ml üzerindeki düzeyleri uzun süre tolere edebildiği için, tedavi üst sınırını belirlemek daha zordur [24].

Farklı hayvan çalışmaları PHB'nin gelişimsel toksisiteye sebep olduğunu açıkça göstermiştir. Schain ve Watanabe 1975'de PHB kronik alımının infantil sıçanlarda beyin gelişiminde gerilemeye sebep olacağını varsaymışlar ve yaşamın ilk 3 haftasında uygulanmasının, bu dönemde büyüme ve beyin gelişimi gerilemesine neden olduğunu göstermişlerdir [38]. Perinatal PHB maruziyeti hippocampus'daki piramidal ve granüler hücrelerde [39], cerebellum'daki Purkinje ve granüler hücrelerde [40] ve beyin hacminde azalmaya [38, 41] yol açabilir. Prenatal ve neonatal dönemde PHB'ye maruz kalan farelerden elde edilen verilerden hareketle; erken dönem PHB maruziyetinin hippocampus'da kolinerjik nörotransmisyonunda bozulmaya ve hippocampus kaynaklı davranış bozukluklarına neden olduğu düşünülmektedir [42]. PHB'nin neonatal dönemde sıçanlara uygulanması, bu bileşimin GABA benzeri etkisi nedeniyle apoptotik nörodejenerasyonu

indüklediği bulunmuştur [41, 43]. Forcelli ve arkadaşları neonatal dönemde sıçan yavrularına uygulanan PHB'nin bütün limbik bölgelerde artmış hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir [44]. Başka bir çalışmada, neonatal dönemde PHB'ye maruz kalmış farelerde cerebellum alanının %14-20 oranında küçüldüğü, Purkinje hücrelerinde %32'ye, granüler hücrelerde ise %34'ye varan düzeylerde azalma olduğu, yine hippocampal alanda da %14-18 küçülme olduğu, piramidal hücrelerde %17 oranında azalma olduğu, cortex cerebri'de %18 küçülme ve kortikal hücrelerde de %22 oranında azalma olduğu gösterilmiştir [39]. Gebe ve yenidoğan farelerde yapılan çift-kör bir çalışmada, PHB verilen farelerin serebellar nöronlarında kontrol grubuna göre %155-300 azalma olduğu tespit edilmiştir. En sık görülen hücresel anormallikler arasında fokal mitokondriyal dejenerasyon (şişme, krista sönmesi, vakuolizasyon ve total granülasyon), sitoplazmada lameller cisimler, miyelin kılıf dejenerasyonu sayılabilir [40]. Hayatın erken dönemlerinde kronik PHB maruziyetinin limbik sistem kaynaklı erişkin davranışlarında, yükseltilmiş artı labirent testinde artmış anksiyete, bozulmuş prepulsif inhibisyon ve korku koşullanmasında bozukluk gibi anormalliklere sebep olduğu gözlenmiştir [44, 45]. Erken PHB maruziyetinin hippocampal kolinerjik sistemde değişiklikleri tetiklediği ve eşlik eden davranış bozuklukları olduğu gösterilmiştir. Roger-Fuchs ve arkadaşlarının yaptığı iki çalışma [42]; bu gözlemi, farelerin erken PHB maruziyetinde, Morris su tankı performansında ve septo-hippocampal sisteme bağlı davranışlarda bozukluklar olduğu gösterilerek doğrulamıştır. Dahası, rodentlerde perinatal dönem PHB maruziyetinin davranış testlerinde ve çeşitli üç boyutlu öğrenme becerilerinde meydana getirdiği defektlere, morfolojik ve nörokimyasal değişikliklerin de eşlik ettiği gösterilmiştir [41].

PHB'nin çocukların nörogelişimi üzerindeki potansiyel etkisi hem prospektif hem de retrospektif çalışmalarla da değerlendirilmiştir. PHB'ye prenatal olarak maruz kalan ancak psikiyatrik bir bozukluğu olmayan ve gebelik sırasında başka herhangi bir psikofarmakolojik ilaç almayan annelerden doğan erkek çocuklar üzerinde yapılan çift kör bir çalışmada, bu çocukların yetişkinlik döneminde daha düşük sözel zeka skorlarına sahip

oldukları gösterilmiştir [46]. Benzer şekilde, hamilelik sırasında PHB'ye maruz kalan çocuklarda, küresel entellektüel fonksiyonlarda (tam IQ ölçeği) bir düşüş olduğu izlenmiştir [22]. PHB'ye in utero maruz kalmak öğrenme [47] ve motor yetenekler [48] açısından defisit ve yetmezliklere yol açmaktadır. Öte yandan bazı çalışmalar ise PHB monoterapisi veya politerapisinin çocukların nörogelişimi üzerindeki olumsuz etkilerini doğrulamamıştır [49, 50].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney hayvanları

Bu tez çalışmasına başlamadan önce Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) 584/2017 kayıt numarası ile gereken etik kurul izini alınmıştır. Çalışmamızda kullanılan deney hayvanlarının temini ve bakımı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (TİCAM) tarafından sağlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan 3 aylık, dişi Spraque-Dawley cinsi sıçanlar ( $250\pm 50$  gram ağırlıkta) ve 20 aylık erkek Spraque-Dawley cinsi sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışıklandırması olan, ısı ( $21\pm 1$  °C) ve nemi (%45-65) otomatik olarak ayarlanmış odalarda barındırıldılar. Deney boyunca tüm sıçanlar polikarbon şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

#### 3.2. Deney Hayvanlarının Çiftleştirilmesi ve Gebelik Tayini

Ayrı kafeslerde barındırılan dişi (n=8) ve erkek sıçanlar (n=4), çiftleştirme işlemi için saat 18:00'da, bir kafeste iki erkek, bir dişi olacak şekilde aynı kafese alındı ve ertesi sabah 09:00'da ayrıldılar. Dişi sıçanlarda vajinal tıkacı olanlar inspeksiyonla tespit edildi, olmayanlardan da 3 ml'lik pastör pipeti yardımıyla 1ml serum fizyolojik kullanılarak vajinal sıvı örnekleri alındı. Alınan örnekler 76x26 mm'lik bir lama (ISOLAB) aktarılarak ışık mikroskopunda (OLYMPUS CH40) 10'luk ve 40'luk objektif altında dikkatli bir şekilde tarandı. Sperm pozitif olan veya sperm negatif olup vajinal tıkacı olanlar gebe olarak kabul edildi. Vajinal sıvıdaki sperm mevcudiyetinin tespit edildiği gün embriyonik 0. gün (E0) olarak kaydedildi.

#### 3.3. İlaçlar ve Uygulamaları

Gebe hayvanlar; kontrol grubu, PHB ve LTG uygulananlar olmak üzere 3 gruba ayrıldı. İlaç uygulamaları E14-21 günleri arasında oral gavaj yoluyla gerçekleştirildi (Şekil 3.1). PHB [13] ve LTG (GlaxoSmithKline) [13]

dozları pilot çalışmalarla belirlendikten sonra 20 mg/kg dozunda uygulandı. Bu ilaçlar 1ml serum fizyolojik içerisinde çözünerek verildiği için kontrol grubuna da, aynı günlerde, oral gavaj yoluyla 1ml serum fizyolojik verildi.

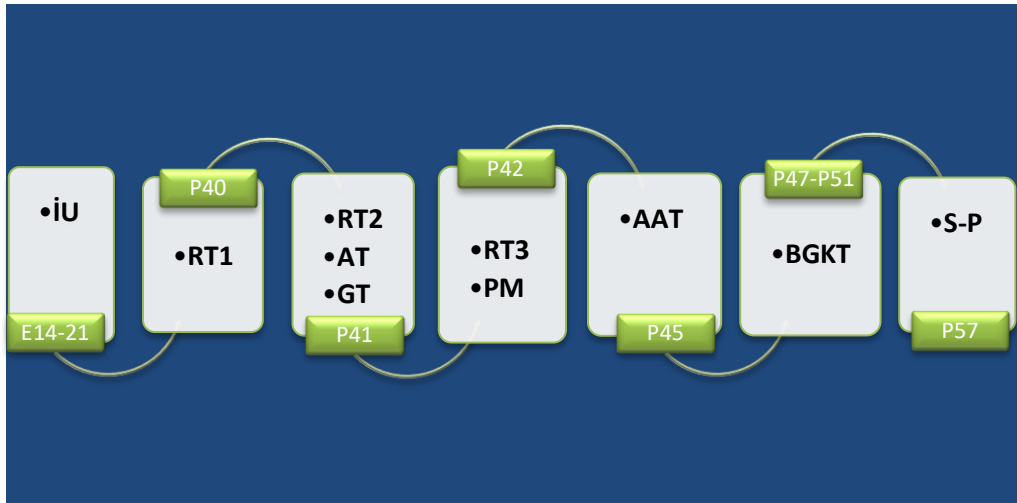


**şekil 3.1.** Oral gavaj uygulaması.

### 3.4. Davranış Testleri

İlaç uygulaması yapılan gebe sıçanlardan doğan yavrular sütten kesilene kadar anneleriyle birlikte barındırıldıktan sonra postnatal (P) 30. günde annelerinden ayrıldı. Dölden kaynaklanabilecek hata payını en aza indirmek için en az iki farklı anneden doğan yavrular cinsiyetlerine göre gruplandırıldı. Yavrular deney süresince erkek ve dişiler ayrı kafeslerde olmak üzere ve her bir kafeste en fazla 4-5 adet olacak şekilde barındırıldı. Her koşuldaki denek sayısı ve cinsiyetinin benzer olmasını sağlayabilmek için deneylerde her grup ve cinsiyetten 7'şer hayvan olmak üzere toplam 42 hayvan kullanıldı.

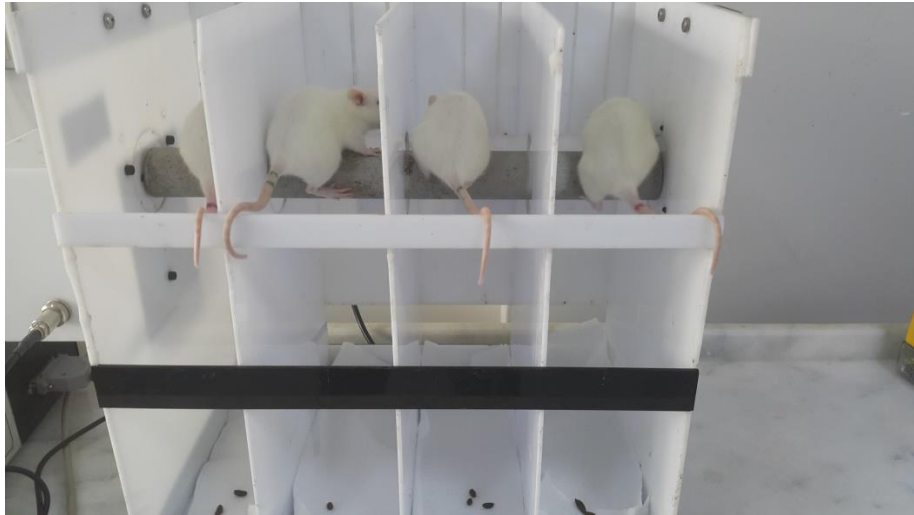
Davranış testleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın Davranış Laboratuvarlarında yapıldı. Davranış deneylerine başlamadan önce, bir hafta süre ile deney hayvanlarının testin yapılacağı ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Tüm davranış testleri bütün gruplarda eşit zaman aralıklarında, aynı ekip ve ekipmanla, saat 10:00- 14:00 arasında uygulandı. Test yapılan ortam ile dış ortam arasındaki ses yalıtımı optimaldi. Test öncesi hayvanların kuyruklarına kırmızı, mavi ve siyah kalemlerle yapılan işaretlemelerle hayvanlar numaralandırıldı.



**Şekil 3.2.** Çalışma zaman çizelgesi (E:Embriyonik, P:Postnatal, İU: İlaç uygulaması, RT:Rota-rod testi, AT:Aktivite testi, GT: Grip testi, PM:Plus-maze testi, AAT:Açık alan testi, BGKT:Beceri gerektiren kavrama testi, S-P:Sakrifikasyon ve perfüzyon).

### 3.4.1. Rota-rod Testi

Deney hayvanlarının denge ve motor koordinasyon düzeylerini değerlendirmek amacıyla rota-rod testi kullanıldı (Şekil 3.3). Bu test; sabit hızda dönen bir çubuk üzerinde, deney hayvanının düşmeden kalış süresinin ölçülmesi esasına dayanmaktaydı. Mekanizma; 70 mm çapındaki bir silindir, aynı anda dört hayvanı test edebilmeyi sağlayacak şekilde üç beyaz renkli sert plastik duvar ile bölünmüş dört bölme ve silindirik rotu döndüren bir ana motordan oluşuyordu (MAY, Commat, Ankara). Deneyler üç gün süreyle uygulandı ve ilk iki gün alıştırma olarak kabul edildi. Silindirin hızı sabit ve 200 rpm olacak şekilde ayarlandı ve test (cut-off) süresi 300 saniye olarak belirlendi. Üçüncü gündeki testte hayvanların dönen çubuk üzerindeki kalış süreleri kayıt edilerek deney tamamlandı [9].



Şekil 3.3. Rota-rod testi.

### 3.4.2. Aktivitemetre Testi

Deney hayvanlarının spontan lokomotor aktivitelerini ölçmek için aktivite kafesi cihazı kullanıldı (May-AMS 02 Animal Activity Monitoring System). Düzenek; 40 cm x 40 cm x 40 cm boyutlarında dört tarafı şeffaf pleksiglas malzemeden yapılmış, üzerinde kızılötesi sensörleri olan ve bu sensörlere gelen ışın demetlerini hayvanın hareketlerinin eşzamanlı kesmesi ile oluşan verileri bir bilgisayar programı (MAY 9803 Activity Monitor,

Commat İletişim Ltd. May Pentium Computer) ile vertikal hareket, horizontal hareket ve ambulatuvar hareket olarak analiz eden bir aletti (Şekil 3.4). Her hayvan için 10 dakikalık ölçüm alındı. Kafes içinde hayvanın yer değiştirme ve dikilme haricinde olduğu yerde yaptığı her hareket horizontal hareket, dikilme hareketi vertikal hareket, dikilme haricinde yaptığı her türlü yer değiştirme hareketi ambulatuvar hareket olarak değerlendirildi [51].

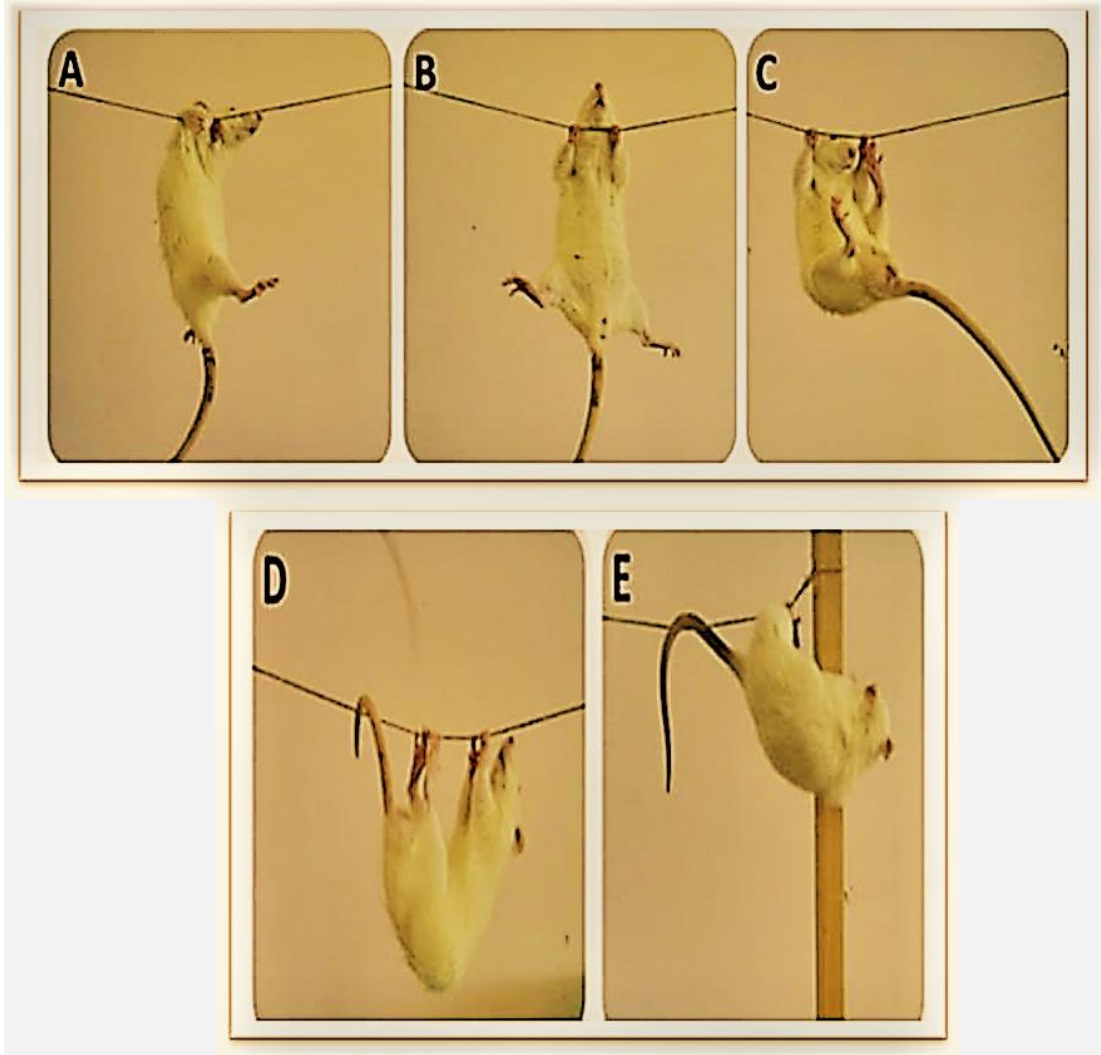


**Şekil 3.4.** Aktivitemetre test düzeneği.

### 3.4.3. Grip Testi

Grip (ipe asılma) testi de yavruların kavrama ve direnme gücünü ve motor koordinasyon düzeyini belirlemek için kullanıldı. Bu testte, yerden 45 cm yükseklikte iki vertikal destek barı arasında gerilmiş 50 cm. uzunluğunda, 3 mm çapında ipten oluşan bir düzenek kullanıldı (Şekil 3.5). Ahşap bloklar, deney hayvanlarının zarar görmemesi için dört kat pamuklu örtü ile sarıldı. Sıçanlar ön pençeleriyle ipin orta noktasına tutundurulularak test süresi başlatıldı [9].





**Şekil 3.5.** Grip testinde kullanılan düzenek ve deneklerin skorlamasında esas alınan hareketler; Her iki ön pençeyle asılı kalma (A), ön pençelere ek olarak ipe tırmanmaya çabalama (B), her iki ön pençeyle asılı kalma ve arka pençelerden biri veya ikisi ile tutunma(C), ön ve arka pençelere ek olarak kuyruk yardımıyla ipe tırmanma (D) ve kaçma (E).

Hayvanlara aşağıdaki kriterlere göre 0-10 arasında skor verildi ve skorlama çift kör deney metodu ile yapıldı.

0= İpten ilk 10 sn. de düşme, 1= Her iki ön pençelerle asılı kalma, 2= Ön pençelere ek olarak ipe tırmanmaya çabalama, 3= Her iki ön pençelerle asılı kalma ve arka pençelerden biri veya ikisi ile tutunma, 4=Ön ve arka pençelere ek olarak kuyruk yardımıyla ipe tırmanma, 5= İpte 150 sn.den

uzun süre asılı kalma veya düzeneden 50 sn.den sonra kaçma, 6= Düzeneden 40 sn.den sonra kaçma, 7= Düzeneden ilk 31-40 sn. içinde kaçma, 8=Düzeneden ilk 21-30 sn. içinde kaçma, 9=Düzeneden ilk 10-21 sn. içinde kaçma; 10= Düzeneden ilk 10 sn. içinde kaçma.

Bu test 1 saat arayla iki defa tekrarlanarak, her hayvan için ortalama skor belirlendi.

#### 3.4.4. Plus-maze Testi

Sıçanlar, yerden yüksekliği 50 cm olan, iki tane açık (50cm×10cm), iki tane de kapalı kolu (50cm×10cm×50cm) ve ortada bu dört kolu bağlayan 10 cmx10 cm boyutlarında bir alanı olan bir labirent düzeneğine 5 dakika süresince bırakıldı (Şekil 3.6). Açık kolun dış ucundan düzeneğe bırakılan sıçanların kapalı kolda ve açık kolda geçirdikleri süreler ile kapalı kollara giriş-çıkış sayıları ölçüldü [52].



**Şekil 3.6.** Plus-maze testi.

#### 3.4.5. Açık Alan testi

Düzeneç, dört tarafı 40 cm yüksekliğinde şeffaf pleksiglas ile çevrili 90 cm x 90 cm boyutlarında beyaz renkli ahşap zemin ve ahşap zemini 30

cm x 30 cm boyutlarında 9 kareye bölen 3 mmlik çizgilerden oluşmaktaydı (Şekil 3.7). Zeminin bir ucundan bırakılan hayvanın 5 dakika süreyle yer değiştirme mesafesi çizilen kareler yardımıyla hesaplandı ve tam ortadaki karede bulunma süresi hesaplandı [53].



**Şekil 3.7.** Açık alan testinin uygulanması.

#### **3.4.6. Beceri Gerektiren Kavrama Testi**

En ilkel içgüdüsel davranışlardan biri olan beceri gerektiren uzanma hareketi; yenilebilir bir objenin kavrandıktan sonra ağıza götürülmesi davranışına karşılık geldiği için, deney hayvanlarının bu davranışını test etmek amacıyla tüm hayvanlar bir gün boyunca aç bırakıldı. Testler esnasında da barınma ortamlarındaki yiyecek erişimine; günlük yem tüketiminin %20'si verilecek şekilde kısıtlama getirildi. Test kafesi ön duvarında 10 cm x10 cm boyutlarında bir pencere bulunduran, 40 lt hacmindeki şeffaf plastik bir kafesten oluşmaktaydı. Kafesin önünde bulunan pencereye 1 cm genişliğinde vertikal açıklıklar içeren bir tel ızgara monte edildi. Test kafesinin önüne, yerden 5 cm yükseklikte olacak şekilde, 50 mm x 26 mm boyutlarında bir kutu yerleştirildi ve kutunun içine de her biri en az 2

cm uzunlukta ve 5 mm çapında olan silindir biçimli yem pelletleri yatay düzlemde dizildi (Şekil 3.8).

Yem kısıtlamasını takip eden günden başlayarak 5 ardışık gün boyunca; her hayvan için, test kafesinin önünde bulunan platformdaki yem pelletlerinin ön pençe yardımıyla ilk olarak kavranması için geçen süre ve bir saatlik test periyodu süresince tüketilen toplam yem miktarı ölçüldü. Hayvanın yemi ön pençesi ile yatay konumdan dikey konuma getirmek için yapmış olduğu ilk başarılı supinasyon hareketinin zamanını tespit edebilmek amacıyla tüm testler kamera ile kayıt altına alındı. Tüketilen yem miktarı ise test öncesi ve sonrası yemlerin ağırlıkları hassas terazi (Precisa 310 M) ile tartılarak hesaplandı [9].

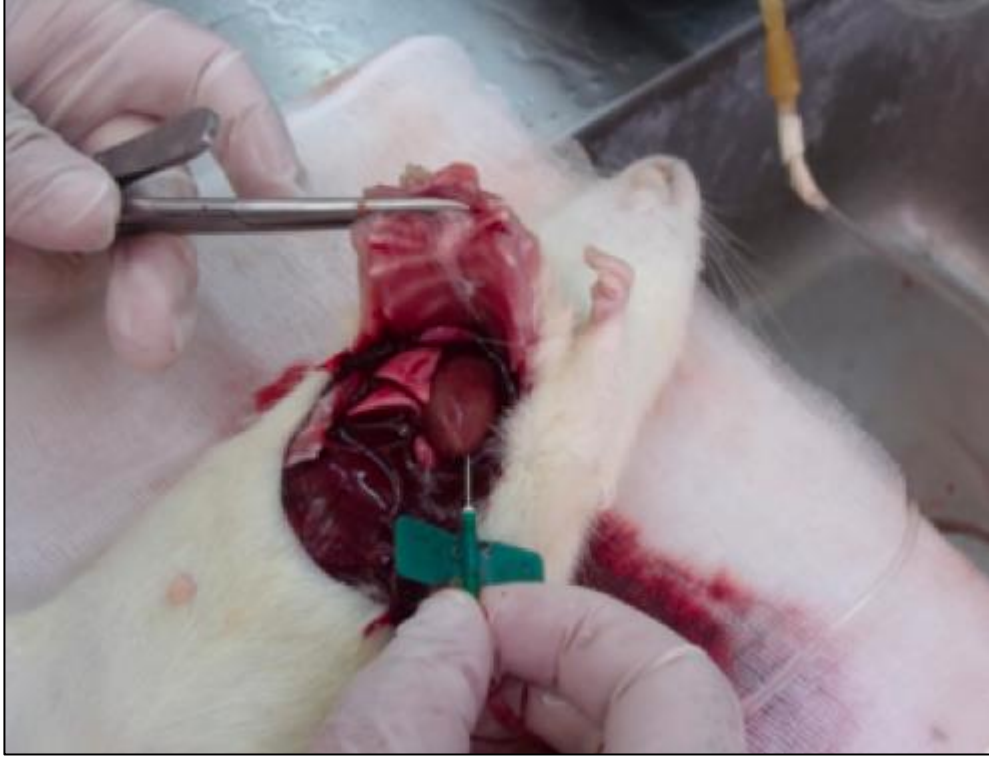


**Şekil 3.8.** Beceri gerektiren kavrama testinin uygulanması.

### **3.5. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonları ve Dokuların Hazırlanması**

Davranış testleri tamamlandıktan sonra P57. günde 0,9 ml/kg ketamin (%10)+ 0,4ml/kg xylazine (%2) uygulanarak anestezisi yapılan hayvanlar, önce tampon solüsyonla, ardından % 4'lük paraformaldehit solüsyonu ile intrakardiyak yoldan perfüzyon pompası (Peristar) ile perfüze

edildi (Şekil 3.9). Fikse edilen hayvanların cerebellum'ları dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Sağ serebellar hemisferler %30'luk sükroz tamponlu solüsyonda bekletildikten sonra dondurulmuş kesitlerin elde edilmesinde kullanıldı. Sol serebellar hemisferler ise %4'lük paraformaldehit solüsyonunda bekletildikten sonra parafin blokların hazırlanmasında kullanıldı.

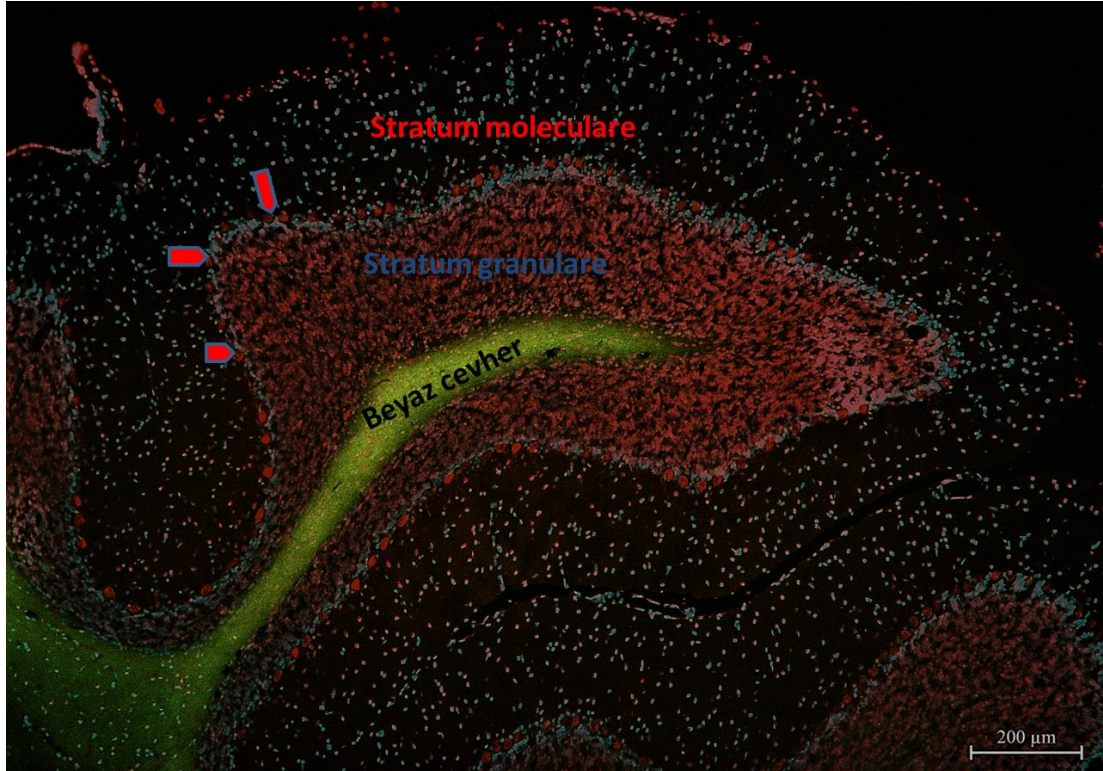


**Şekil 3.9.** İntrakardiyak perfüzyon.

### 3.6. Histolojik Kesitlerin Hazırlanması ve Boyanması

Tamponlu %30'luk sükroz solüsyonuna konan sağ loblar sıvı içerisinde çökünce  $-30^{\circ}\text{C}$ 'de kriyostat'ta (Shandon) 12  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesitler alınıp, lamlara (Isotherm pozitif charge) dizildi ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Kesitler myeline seçici FluoroMyelin<sup>TM</sup> yeşil floresan boyası, Nissl cisimciklerine (endoplazmik retikulum) duyarlı NeuroTrace<sup>R</sup>530/615 kırmızı floresan boyası ve DNA'yı tespit eden mavi floresan boyası (DAPI)'den oluşan üçlü bir vital boyama kiti (BrainStain<sup>TM</sup> Imaging Kit, Molecular Probes) ile boyandı. Boyaların çözündürüldüğü ve dilüe edildiği nötral pH'lı (pH 7.4) fosfat tamponlu salin

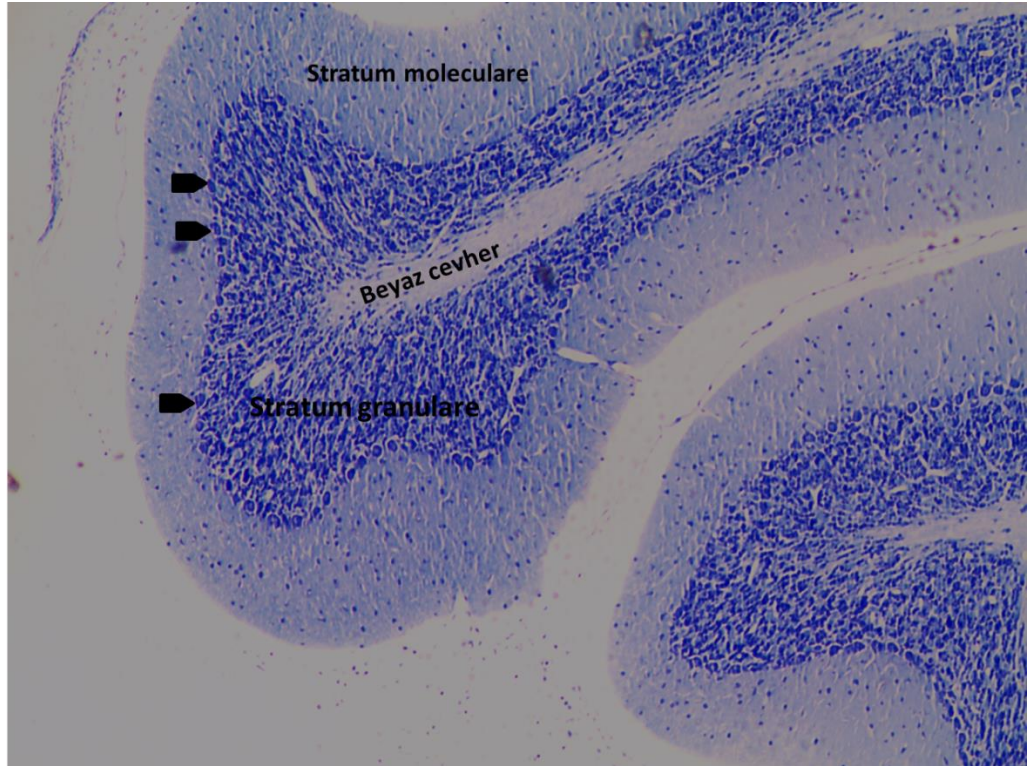
(PBS) solüsyonunun hazırlanmasında; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl ve 10mM phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck) kullanıldı. Karanlık bir ortamda oda sıcaklığına getirilen kesitler önce hidrofobik kalem (PAP PEN, Patolab) ile çerçeveye alındı. Kesitler en az 20 dakika süreyle Triton X-100'lü (%0,2 tritonX-100 (Merck) PBS solüsyonu ile permeabilize edildi. Uygun konsantrasyonlarda dilüe edilen boyalar dokular üzerine pastör pipeti yardımıyla eklendi. Oda sıcaklığında 20 dakika beklendikten sonra kesitler bu solüsyon ile üç defa 10'ar dakika süreyle yıkandı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen dokular floresan boyalara özgün su bazlı kapama solusyonu (Vising Mount, Thermo Scietific) ile kapatıldı (Şekil 3.10) [54].



**Şekil 3.10.** Vital floresan boyama ile serebellar tabakaların mikroskobik görünümü (Ok başı; Purkinje hücreleri).

Sol serebellar hemisferler %4'lük paraformaldehid fiksatifinde 24 saat süre ile postfikse edildikten sonra 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Dokular kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidrate edildi. Şeffaflaştırma aşamasında 2 kez

20'şer dakika ksilol'de bekletildi ve etüv içindeki 65<sup>0</sup>C' de eritilmiş parafinlere alınarak bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan seri kesitler, 45<sup>0</sup>C'de su banyosunda açıldıktan sonra daha önceden iki kez poli-lizin ile kaplanmış temiz lamlara yapıştırıldı. Lamlar etüvde deparfinize edildi. Distile suda yıkandı. Toludin mavisi ile 5 dakika boyandı. % 80'lik, %90'lık ve %96'lık ve absolü alkol serilerinde dehidrate edilen lamlar ikişer kez 3'er dakika ksilol'den geçirildi. Son olarak lamlar entellan ile kapatıldı (Şekil 3.11).



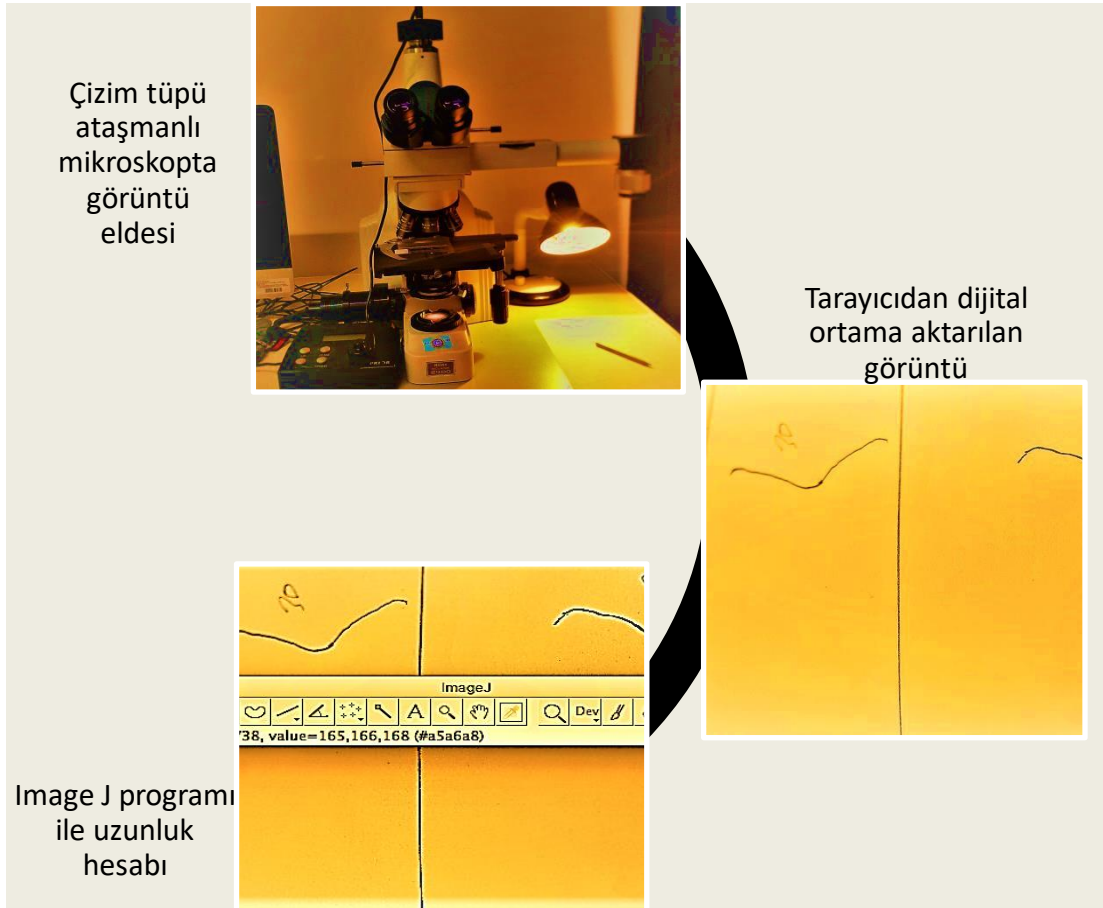
**Şekil 3.11.** Toluidin mavisi ile boyanan kesitlerde cerebellum'un histolojik görünümü (Ok başı;Purkinje hücreleri).

### 3.7. Morfometrik Sayımlar

Tüm stereolojik yöntemlerin uygulamasında örnekler seçilirken sistematik randomize örnekleme metodu kullanıldı ve hesaplamalarda mikroskobik

kalibrasyon skalası kullanılarak magnifikasyon faktörüne göre belirlenen gerçek uzunluklar ölçüldü.

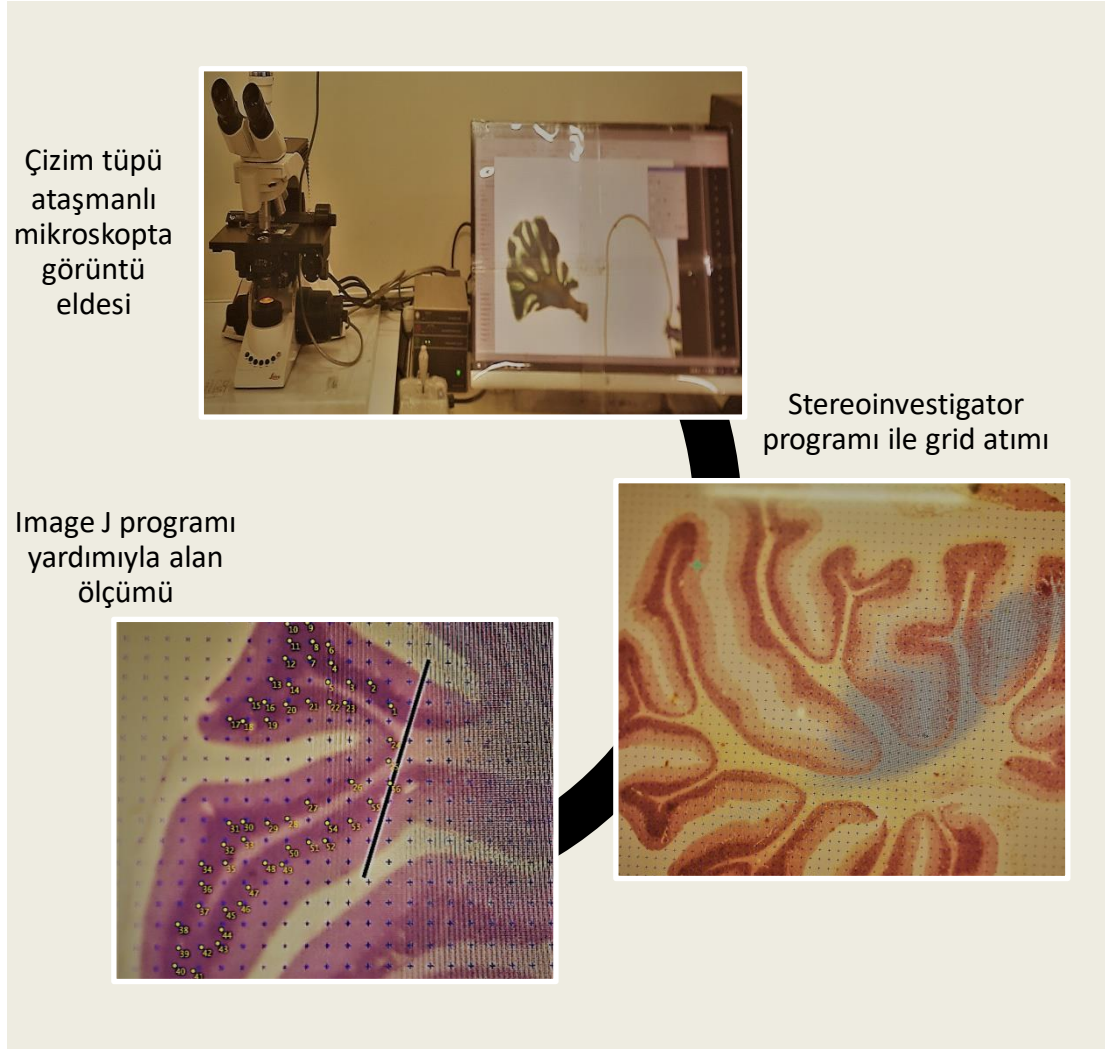
Toluidin mavisi ile boyanmış kesitlerdeki Purkinje hücre nükleuslarının ortasından geçen Purkinje hücre hattı (Şekil 3.11); çizim tüpü ataşmanlı Nikon E400 ışık mikroskobu aracılığıyla çizildi. Cerebellum'un 5. ve 6. folyolarından elde edilen görüntüler dijital ortama aktarıldıktan sonra, kalibrasyon skalası uzunluğu baz alınarak, Purkinje hücre hattının gerçek uzunluğu Image J görüntü analiz programı ile ölçüldü. Bu hat boyunca bulunan Purkinje hücre nükleusları sayılarak birim uzunluğa düşen Purkinje hücre sayısı hesaplandı (Şekil 3.12).



**Şekil 3.12.** Birim uzunluğa düşen Purkinje hücre sayısının hesaplanması.



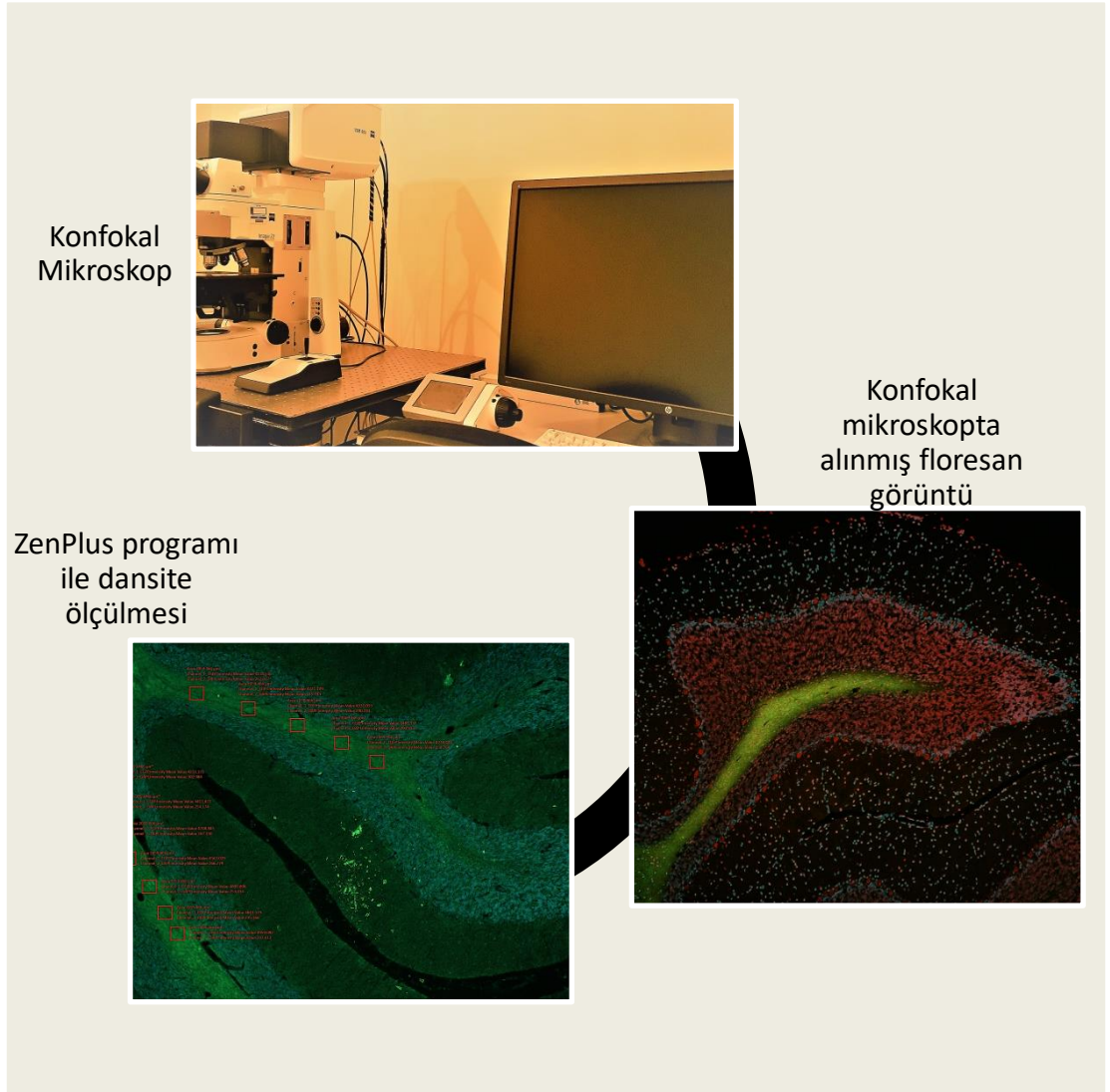
Moleküler ve granüler tabakalarının hacimleri ile beyaz cevher hacimlerinin hesaplanmasında StereoInvestigator yazılım programının (Micro Bright Field, ABD) Cavalieri estimator probu kullanıldı. Her hayvandan 3 adet kesit seçilerek, bu kesitlerde 6. folia'dan elde edilen görüntüler üzerine  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  boyutlarında grid atıldı (Şekil 3.13). Grid üzerindeki çizgilerin kesişme noktalarına rastgelen hücre nükleusları her kesit için 3 farklı bölgede sayıldı ve ortalaması alındı. Ortalama olarak bulunan bu değer; çerçevedeki toplam nokta sayısına bölünerek granüler tabakadaki hücre nükleuslarının hacim oranı (volume proportion = **Vvg**) hesaplandı.



**Şekil 3.13.** Stratum moleculare, stratum granulare ve beyaz cevher alan ölçümü.

### 3.8. Myelin Dansitesinin Ölçümü

Karanlık ortamda BrainStain™ Imaging Kit ile boyanan kesitler korunmak için alüminyum folyo ile sarılarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ARUM) analiz edildi. ZEISS LSM 800 marka konfokal mikroskop ile alınan görüntülerde cerebellum'un beyaz cevher kısmındaki miyelinli liflerin yoğunlukları ZEISS- ZEN Digital İmaging (Germany) programı yardımıyla densitometrik yöntemle ölçüldü. Bu ölçümlerde her bir deney grubundaki hayvana ait cerebellum kesitlerinde 10 farklı alanda dansite ölçümü yapıldıktan sonra, ölçümlerin ortalama değerleri hesaplandı (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14.** Myelin alanın dansite ölçümü.

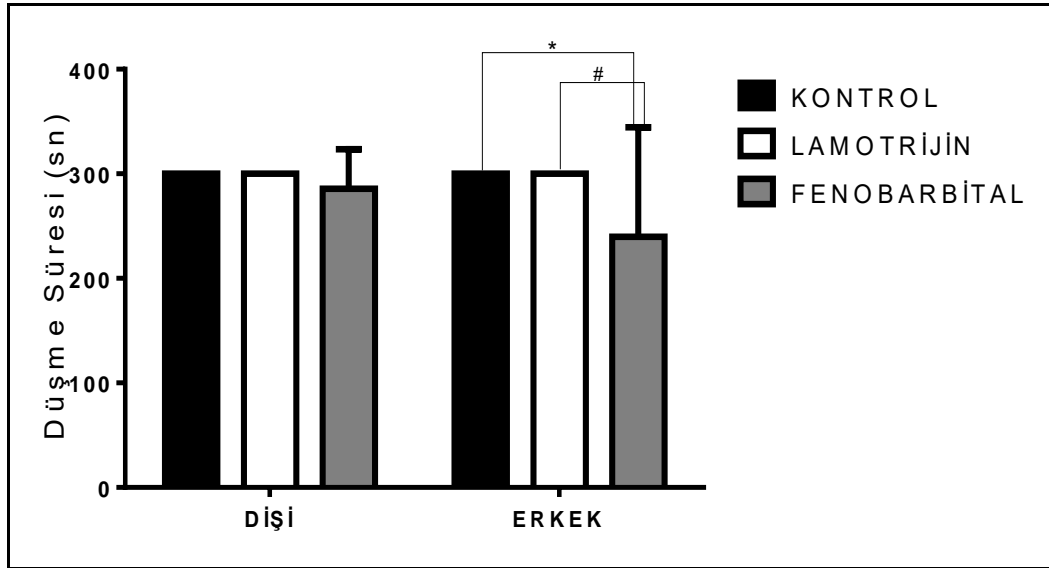
### 3.9. İstatiksel Analizler

Gruplardan elde edilen analiz verileri GraphPad Prism istatistik programı ile değerlendirildi. Çalışma verilerinden ortalama, standart sapma, standart hata ortalamaları hesaplandı. Test değerlerine öncelikle dağılım normalitesini belirleyen Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino Pearson, Shapiro-Wilk testleri uygulandı. Dağılımları normal olan değişkenlere parametrik testler, normal olmayan değişkenlere ise non-parametrik testler uygulandı. Gruplarda değişkenlerle beraber erkek, dişi farkı bakıldığında çift yönlü varyans analizi ile Sidak çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Gruplardaki değişkenler erkek, dişi farkına bakılmaksızın değerlendirildiğinde ise tek yönlü varyans analizi ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Rota-rod Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

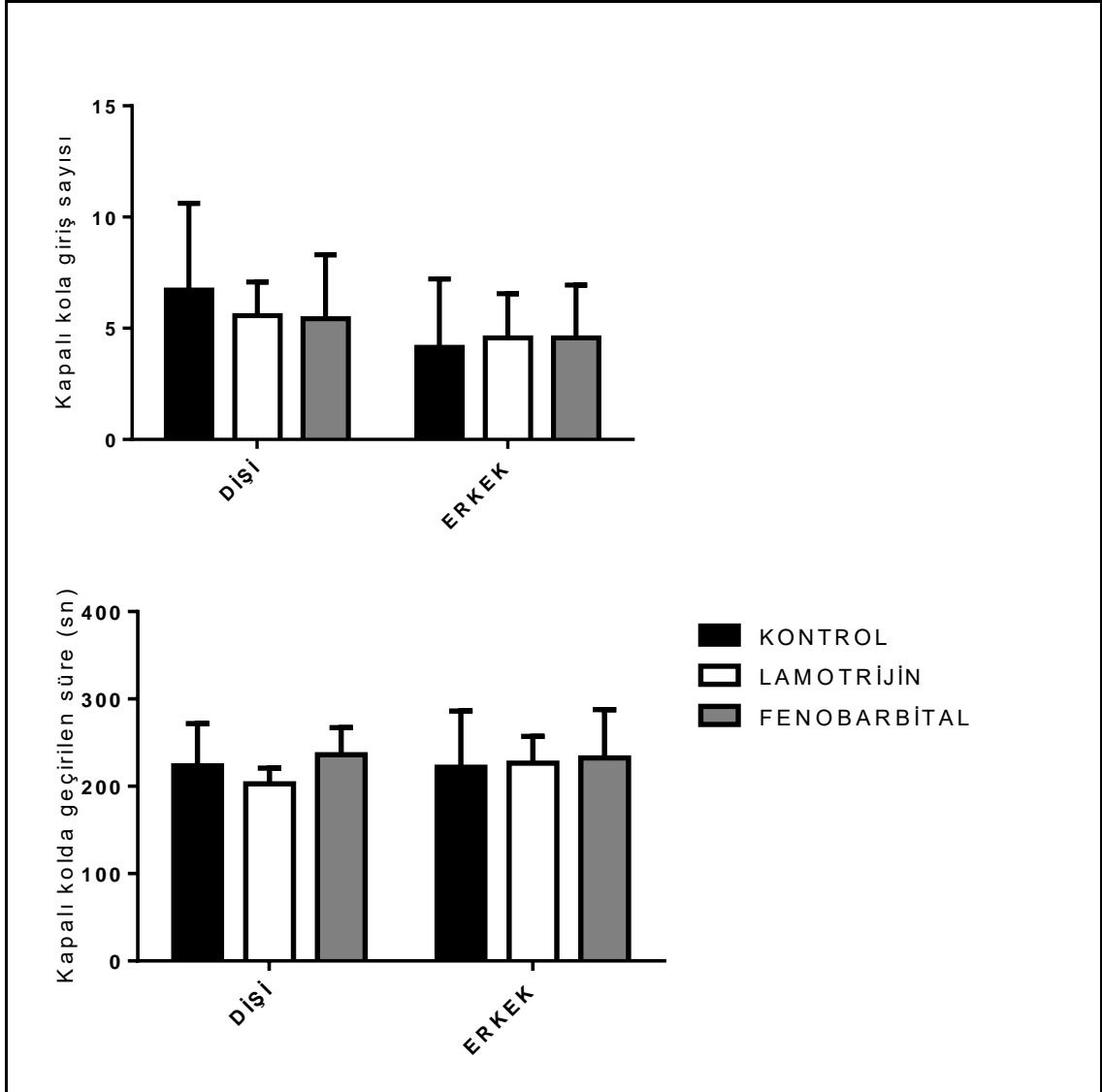
Rota-rod testinde gruplar arasındaki cinsiyete bağlı farklılıklar iki yönlü varyans analizi ve Sidak çoklu karşılaştırma testi ile incelendiğinde antiepileptik ilaç uygulanan annelerden doğan dişi yavruların rota-rod testindeki düşme süreleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.1). Fenobarbital uygulanan annelerden doğan erkek sıçanların performansları ise, kontrol grubu annelerden ve lamotrijin uygulanan annelerden doğan yavrulara göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.1.** Rota-rod testinde, lamotrijin ve fenobarbital uygulanan annelerden ve kontrol grubu annelerden doğan dişi ve erkek yavruların düşme sürelerinin karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini göstermektedir (Her iki cinsiyet ve grup için;  $n=7$ ). \*  $p < 0.05$  kontrol ile fenobarbital grubu arasında farklılık. #  $p < 0.05$  lamotrijin ile fenobarbital grubu arasında farklılık.

#### 4.2 Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

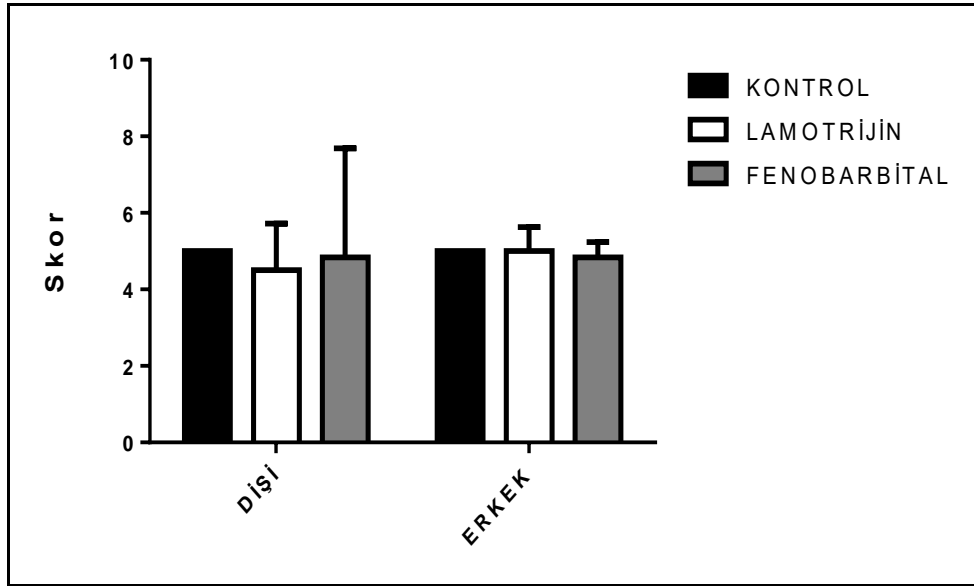
Yükseltilmiş artı labirent testinde kapalı kolda geçirilen süre ve kapalı kola giriş sayıları açısından gruplar arasındaki cinsiyete bağlı farklılıklar iki yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Yükseltilmiş artı labirent testinde, lamotrijin ve fenobarbital uygulanan annelerden ve kontrol grubu annelerden doğan dişi ve erkek yavruların kapalı kola giriş sayılarının ve kapalı kolda geçirdikleri sürelerinin karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler, ortalama ± standart hata değerlerini göstermektedir (Her iki cinsiyet ve grup için n=7).

### 4.3 Grip Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Grip testinde gruplar arasındaki cinsiyete bağlı farklılıklar iki yönlü varyans analizi ve Sidak çoklu karşılaştırma testi ile incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Grip testinde, lamotrijin ve fenobarbital uygulanan annelerden ve kontrol grubu annelerden doğan dişi ve erkek yavruların aldıkları skorların karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler, ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini göstermektedir (Her iki cinsiyet ve grup için; n=7).

### 4.4 Lokomotor Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması

Yavruların lokomotor aktivite testinde yaptıkları stereotipik, ambulatuvar, horizontal ve dikey hareketlerin sayısı, toplam hareket sayıları ve kat edilem toplam mesafeler cinsiyetlere göre iki yönlü varyans analizi ve Sidak çoklu karşılaştırma metodu ile karşılaştırıldı. Cinsiyetten bağımsız bir şekilde karşılaştırıldığında ise tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı.

Horizontal, vertikal ve stereotipik hareket sayıları ile test süresince yapılan ambulatuvar hareketlerin sayıları gruplar arasında karşılaştırıldığında gruplar ve cinsiyetler arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Toplam

hareket sayıları bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubundaki annelerden doğan dişi yavruların hareket sayıları fenobarbital uygulanan annelerden doğan yavrulara göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Benzer şekilde, kontrol grubundaki dişi sıçanların kat ettikleri mesafe fenobarbital uygulanan gruptakilerden anlamlı derecede fazlaydı ( $p<0.05$ ) (Tablo 4.1).

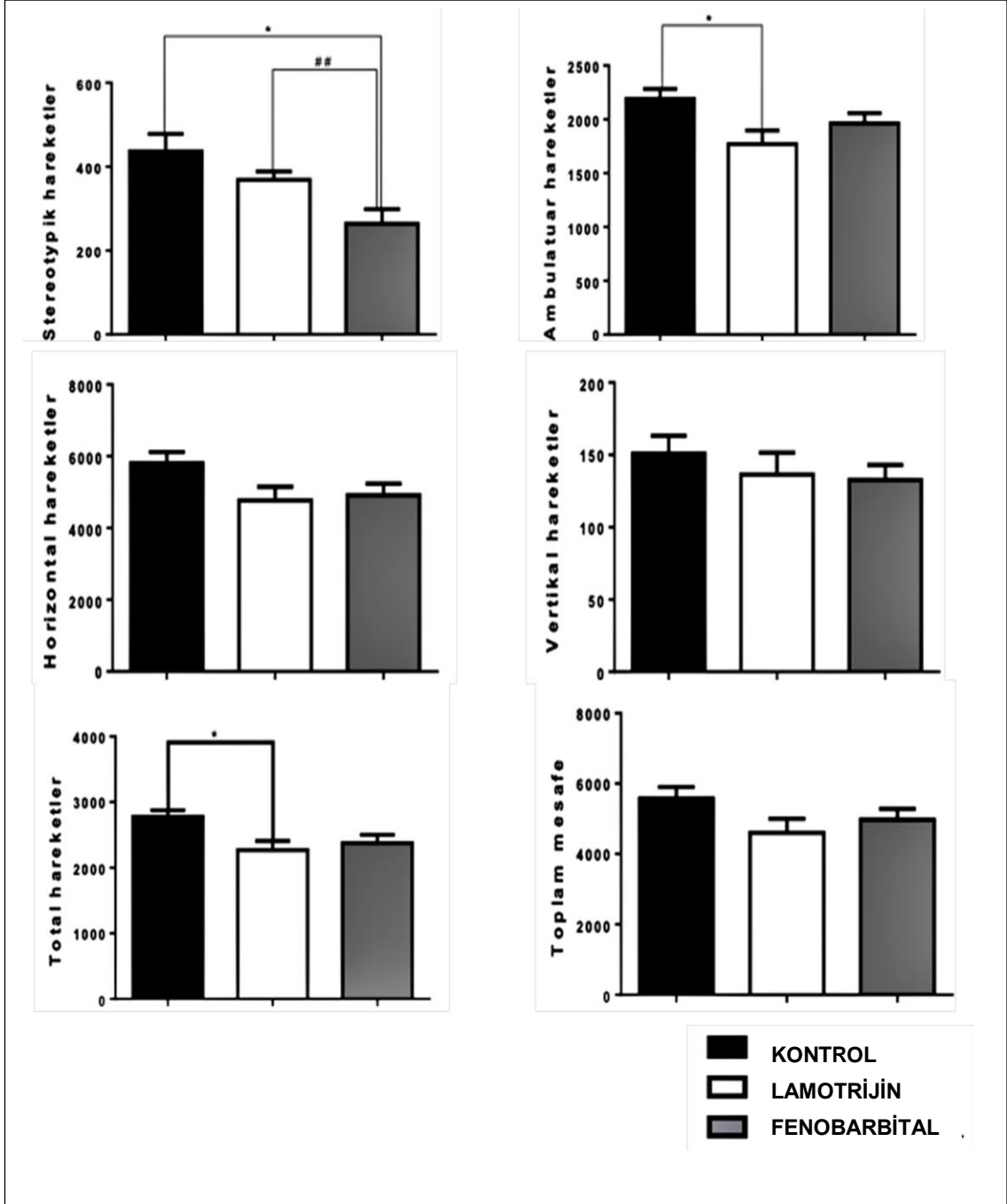
Gruplar cinsiyetten bağımsız olarak değerlendirildiğinde, horizontal hareketler, vertikal hareketler ve toplam mesafe bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Öte yandan kontrol grubu annelerden doğan yavrular ve lamotrijin verilen annelerden doğan yavrulara kıyasla daha çok ( $p<0.05$ ) ambulatuvar hareket yapmıştı. Toplam hareket sayısı da kontrol grubu annelerden doğan yavrularda lamotrijin verilen annelerden doğan yavrulara oranla anlamlı düzeyde ( $p<0.05$ ) yüksek bulundu. Fenobarbital uygulanan annelerden doğan yavrular ise kontrol grubu annelerden doğan yavrulardan ( $p<0.05$ ) ve lamotrijin uygulanan annelerden doğan yavrulardan ( $p<0.01$ ) daha az stereotipik hareketler yapmıştı (Şekil 4.4).

**Tablo 4.1.** Spontan lokomotor aktivite düzeyleri

Hareket		Kontrol (Kont, n=7)	Lamotrijin (Ltg, n=7)	Fenobarbital (Phb, n=7)	İstatistiksel anlamlılık
<i>Horizontal</i>	<i>Dişi</i>	6484±427	4970 ± 296	4616 ± 457	n.s.
	ERKEK	5126 ± 296	4574 ± 721	5212 ± 452	n.s.
	TOTAL(ORT)	5805 ± 312	4772 ± 378	4914 ± 320	n.s.
<i>Vertikal</i>	<i>Dişi</i>	160 ± 10	157 ± 8	121 ± 16	n.s.
	ERKEK	141 ± 22	115 ± 28	144 ± 11	n.s.
	TOTAL(ORT)	150 ± 12	136 ± 15	132 ± 10	n.s.
<i>Stereotipik</i>	<i>Dişi</i>	383 ± 50	319 ± 22	203 ± 30	n.s.
	ERKEK	490 ± 64	418 ± 21	324 ± 55	n.s.
	TOTAL(ORT)	436±41	368±20	264±34	kont-phb (p<0.05) ltg-phb (p<0.01)
<i>Ambulatuvar</i>	<i>Dişi</i>	2437 ± 73	1854 ± 31	1878 ± 137	n.s.
	ERKEK	1945 ± 103	1686 ± 256	2049 ± 126	n.s.
	TOTAL(ORT)	2191 ± 91	1770 ± 126	1964 ± 93	kont-ltg (p<0.05)
<i>Toplam hareket</i>	<i>Dişi</i>	2981 ± 90	2320 ± 40	2204 ± 171	kont-phb (p <0,05)
	ERKEK	2576 ± 133	2219 ± 281	2546 ± 177	n.s.
	TOTAL(ORT)	2779±95	2270±137	2375±127	kont-ltg (p<0.05)
<i>Toplam mesafe</i>	<i>Dişi</i>	6371 ± 402	4912 ± 313	4777 ± 457	kont-phb (p<0.05)
	ERKEK	4776 ± 312	4289 ± 761	5175 ± 421	n.s.
	TOTAL(ORT)	5574 ± 330	4601 ± 404	4977 ± 303	n.s.

Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata ortalaması değerlerini göstermektedir. n.s = anlamlı değil.

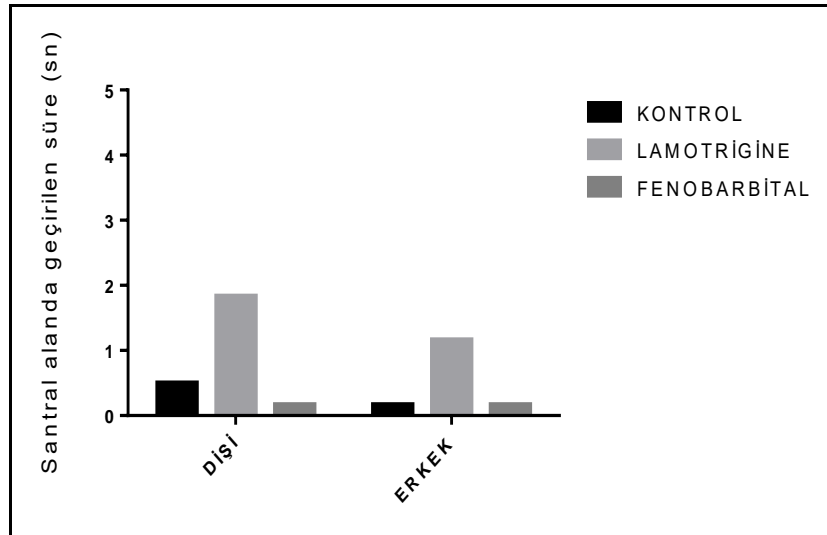




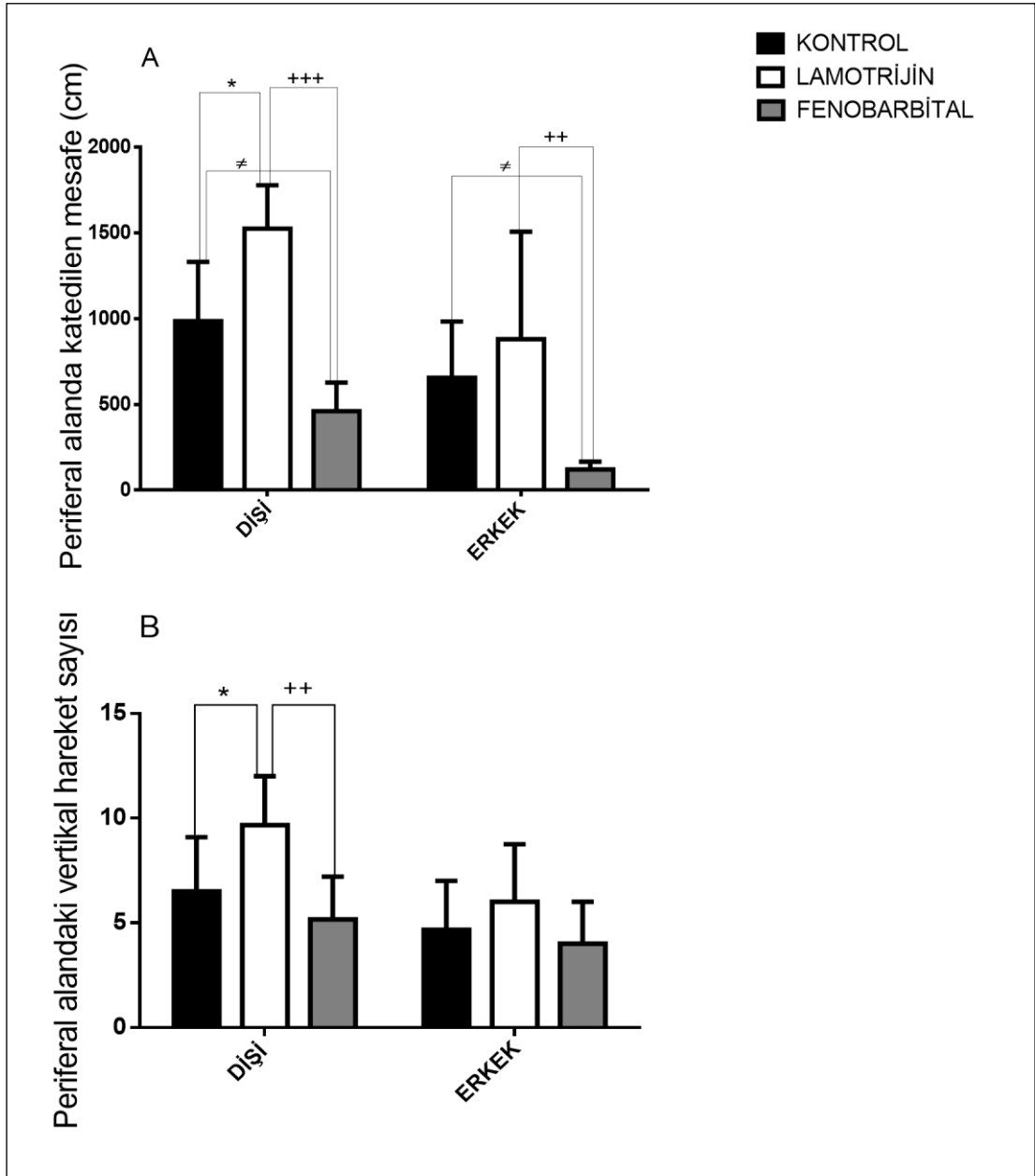
**Şekil 4.4.** Aktivitemetrede lamotrijin ve fenobarbital uygulanan anneler ile kontrol grubu annelerden doğan yavruların hareket sayılarının karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler, ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini göstermektedir (Her grup için; n=14). \* p<0.05 kontrol ile lamotrijin grubu arasında farklılık, <sup>s</sup>p<0.05 kontrol ile fenobarbital grubu arasında farklılık, <sup>##</sup>p<0.01 lamotrijin ile fenobarbital grubu arasında farklılık.

#### 4.5. Açık Alan Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Açık alan testinde gruplar arasındaki cinsiyete bağlı farklılıklar iki yönlü varyans analizi ve Sidak çoklu karşılaştırma testi ile incelendiğinde, her 3 gruptaki deney hayvanlarının santral alanda geçirdikleri süreler karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.5). Açık alan platformunun periferal kısmında geçirilen mesafe lamotrijin verilen annelerden doğan dişilerde fenobarbital verilen annelerden ( $p<0.001$ ) ve kontrol grubu annelerden doğan yavrulara ( $p<0.05$ ) göre daha fazlaydı (Şekil 4.6). Benzer şekilde kontrol gruplarının da periferik alanda katettikleri mesafe fenobarbital verilen annelerden doğan yavrulara göre daha fazlaydı ( $p<0.05$ ). Erkeklerde ise fenobarbital verilen annelerden doğan yavrular kontrol grubu annelerden ( $p<0.05$ ) ve lamotrijin verilen annelerden doğan yavrulara kıyasla ( $p<0.01$ ) anlamlı bir şekilde daha az mesafe kat etmişlerdi. Periferal alanda yavruların yaptıkları vertikal hareketler ise lamotrijin verilen annelerden doğan dişilerde kontrol grubu annelerden doğan yavrulardan ( $p<0.05$ ) ve fenobarbital verilen annelerden doğan dişilere ( $p<0.01$ ) göre fazlaydı. Erkeklerde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.6).



**Şekil 4.5.** Açık alan testinde yavruların santral alanda geçirdikleri sürenin karşılaştırılması.



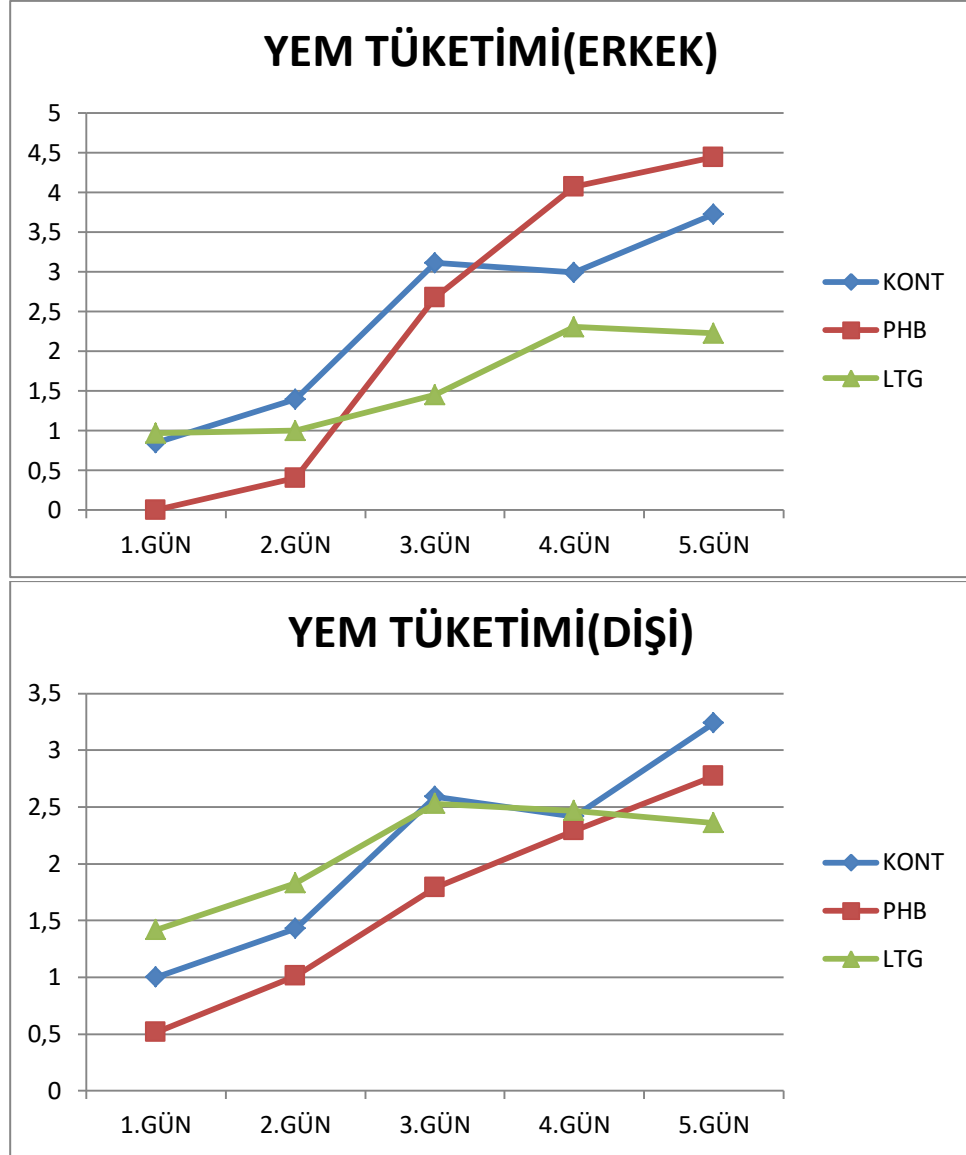
**Şekil 4.6.** Açık alan testinde yavruların periferik alanda katettikleri mesafe (A) ve yaptıkları vertikal hareket sayılarının (B) karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini göstermektedir (Her iki cinsiyet ve grup için; n=7). \* p<0.05 kontrol ile lamotrijin grubu arasında farklılık. # p<0.05 kontrol ile fenobarbital grubu arasında farklılık, ++ p<0.01 lamotrijin ile fenobarbital grubu arasında farklılık, +++ p<0.001 lamotrijin ile fenobarbital grubu arasında farklılık.

#### 4.6 Beceri Gerektiren Kavrama Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

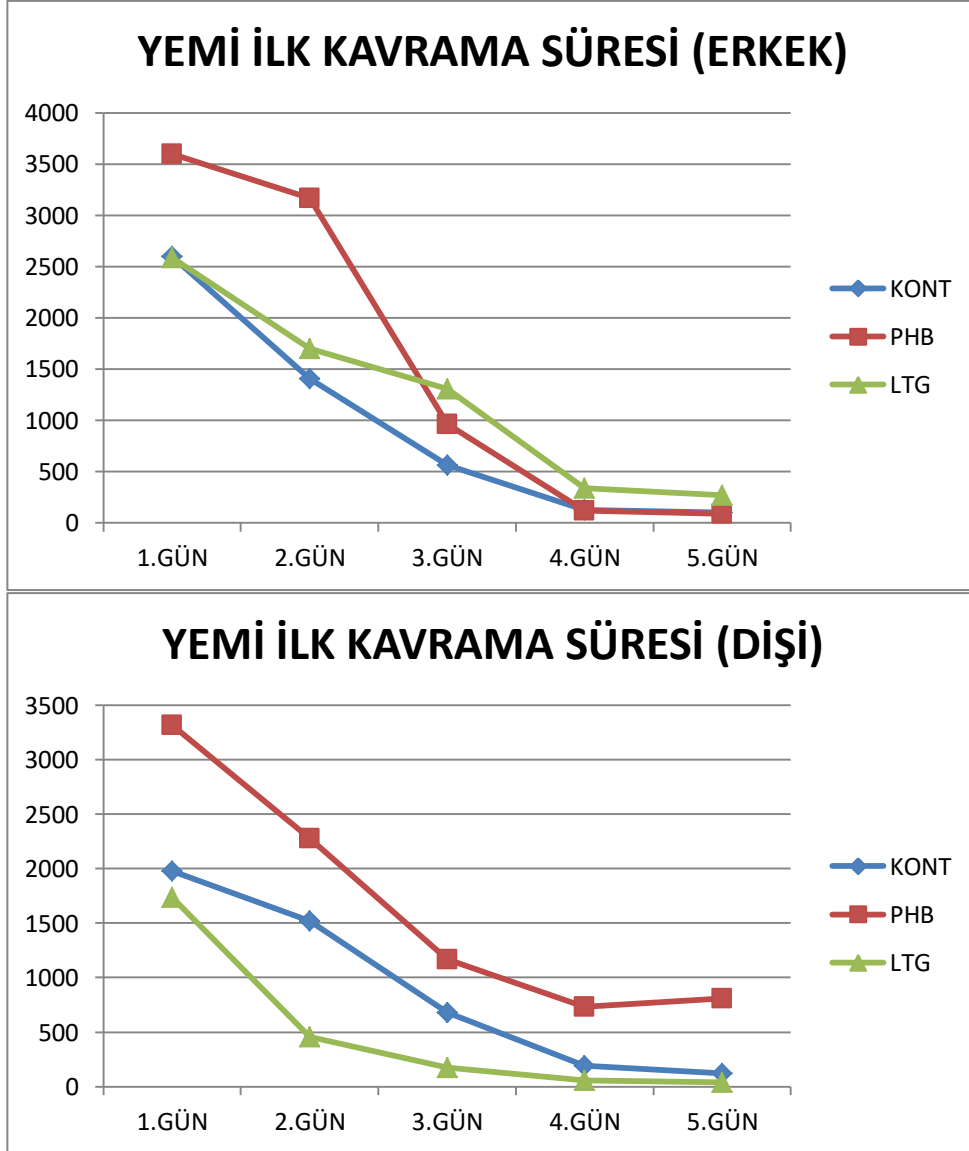
Beceri gerektiren kavrama testi; koklama ile yiyeceğin lokalize edilmesi, üst ekstremitenin hedefe doğru yönlendirilmesi, pençenin pronasyonu ve ekstensiyonu, yemi kavradıktan sonra pençenin fleksiyonu, akabinde ön ekstremitenin addüksiyonu ve bu hareket sayesinde pençe supinasyonu ve articulatio atlantooccipitalis'in fleksiyonu ile yem pelletinin çiğnenmesi gibi karmaşık ve ince beceri gerektiren hareketler bütünü değerlendiren kompleks bir testtir.

Bu test sonucunda yavruların 5 test günü boyunca tükettikleri yem miktarı ve yeme ilk erişim zamanı cinsiyete göre iki yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metoduna göre karşılaştırıldığında başlangıç günlerinde anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Ortalama yem tüketimleri yavruların test uygulamasını öğrenmelerine paralel olarak 2. ve 3. günden itibaren her iki cinsiyet için de artış gösterdi. Bu artış özellikle fenobarbital uygulanan annelerden doğan erkek yavrularda daha belirgindi (Şekil 4.7). Testin son günü olan 5. günde gruplar arasında en çok yem tüketimi erkeklerde fenobarbital grubu olurken, dişilerde kontrol grubuydu. 5. gün sonunda toplam yem tüketim ortalamalarına göre dişiler arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (Tablo 4.2).

Fenobarbital verilen annelerden doğan yavrular ve kontrol annelerden doğan yavruların yem pelletini ilk başarılı kavrama hareketini gerçekleştirme süreleri karşılaştırıldığında testin 2.günden itibaren erkeklerde kontrol grubunun, dişilerde ise kontrol ve lamotrijin grubunun, teste diğer gruplardan daha hızlı bir adaptasyon gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4.8). Hayvanlar arasında 5 günlük yemi ilk kavrama süreleri ortalamasına bakıldığında erkekler arasında bir fark tespit edilemedi. Dişiler arasındaki farka bakıldığında ise son iki günde lamotrijin grubu, fenobarbital grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0.01$ ) (Tablo 4.3).



**Şekil 4.7.** Beceri gerektiren kavrama testinde, lamotrijin ve fenobarbital uygulanan annelerden ve kontrol grubu annelerden doğan dişi ve erkek yavruların testin 1.günüden 5.gününe kadar tükettikleri ortalama yem miktarı Grafiklerde verilen değerler ortalama değerleri göstermektedir (Her iki cinsiyet ve grup için; n=6).



**Şekil 4.8.** Beceri gerektiren kavrama testinde, lamotrijin ve fenobarbital uygulanan annelerden ve kontrol grubu annelerden doğan dişi ve erkek yavruların testin 1.gününden 5.gününe kadar yemi ilk kavrama sürelerinin ortalamasının değişimi. Grafiklerde verilen değerler ortalama değerlerini göstermektedir (Her iki cinsiyet ve grup için; n=6).

**Tablo 4.2.** Test sonunda tüketilen yem miktarlarının karşılaştırılması

<b>Yem miktarı (gr)</b>		<b>1.gün</b>	<b>2.gün</b>	<b>3.gün</b>	<b>4.gün</b>	<b>5.gün</b>
<b>KONTROL (KONT)</b> n=12	<b>Dişi</b>	<b>0,99</b>	<b>1,42</b>	<b>2,59</b>	<b>2,41</b>	<b>3,23</b>
	<b>ERKEK</b>	<b>0,845</b>	<b>1,39</b>	<b>3,11</b>	<b>2,99</b>	<b>3,72</b>
<b>FENOBARBITAL (PHB)</b> n=12	<b>Dişi</b>	<b>0,51</b>	<b>1</b>	<b>1,78</b>	<b>2,29</b>	<b>2,77</b>
	<b>ERKEK</b>	<b>0</b>	<b>0,40</b>	<b>2,67</b>	<b>4,07</b>	<b>4,44</b>
<b>LAMOTRİJİN (LTG)</b> n=12	<b>Dişi</b>	<b>1,41</b>	<b>1,82</b>	<b>2,52</b>	<b>2,467</b>	<b>2,35</b>
	<b>ERKEK</b>	<b>0,97</b>	<b>1</b>	<b>1,45</b>	<b>2,3</b>	<b>2,22</b>
<b>İstatistiksel anlamlılık</b>	<b>Dişi</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>
	<b>ERKEK</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>PHB-LTG P&lt;0,01</b>	<b>PHB-LTG P&lt;0,01</b>

Tabloda verilen değerler ortalama değerlerini göstermektedir. n.s = anlamlı değil.

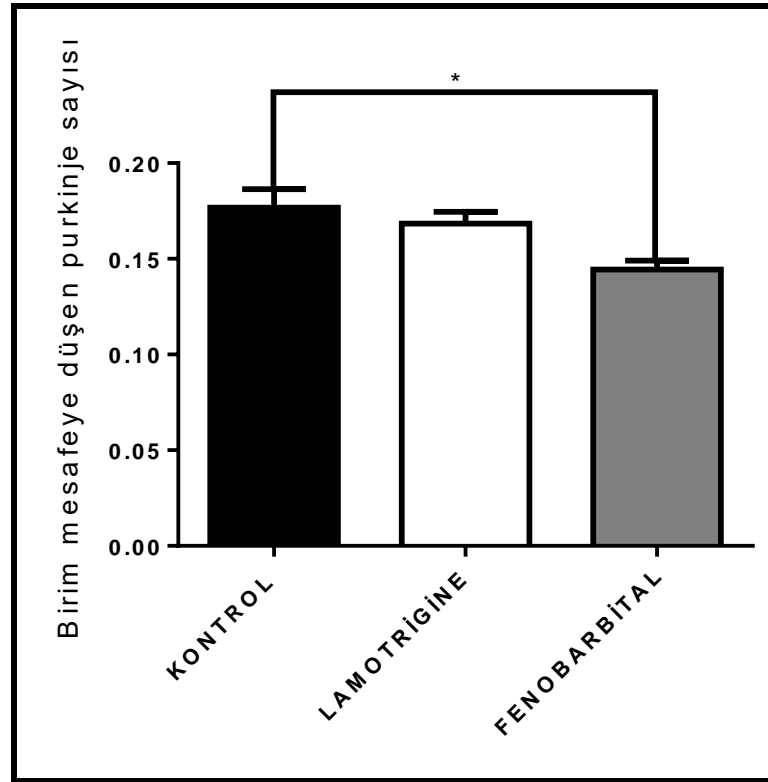
**Tablo 4.3.** Yemi ilk kavrama sürelerinin karşılaştırılması

<b>Kavrama süresi (sn)</b>		<b>1.gün</b>	<b>2.gün</b>	<b>3.gün</b>	<b>4.gün</b>	<b>5.gün</b>
<b>KONTROL (KONT)</b> n=12	<b>Dişi</b>	<b>1979</b>	<b>1517</b>	<b>682</b>	<b>191</b>	<b>124</b>
	<b>ERKEK</b>	<b>2602</b>	<b>1408</b>	<b>565</b>	<b>129</b>	<b>101</b>
<b>LAMOTRİJİN (LTG)</b> n=12	<b>Dişi</b>	<b>1736</b>	<b>457</b>	<b>175</b>	<b>57</b>	<b>42</b>
	<b>ERKEK</b>	<b>2586</b>	<b>1699</b>	<b>1308</b>	<b>340</b>	<b>269</b>
<b>FENOBARBITAL (PHB)</b> n=12	<b>Dişi</b>	<b>3319</b>	<b>2277</b>	<b>1166</b>	<b>730</b>	<b>808</b>
	<b>ERKEK</b>	<b>3600</b>	<b>3170</b>	<b>965</b>	<b>118</b>	<b>91</b>
<b>İstatistiksel anlamlılık</b>	<b>Dişi</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>
	<b>ERKEK</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>

Tabloda verilen değerler ortalama değerlerini göstermektedir.; n.s = anlamlı değil.

#### 4.7. Birim Mesafeye Düşen Purkinje Hücre Sayılarının Karşılaştırılması

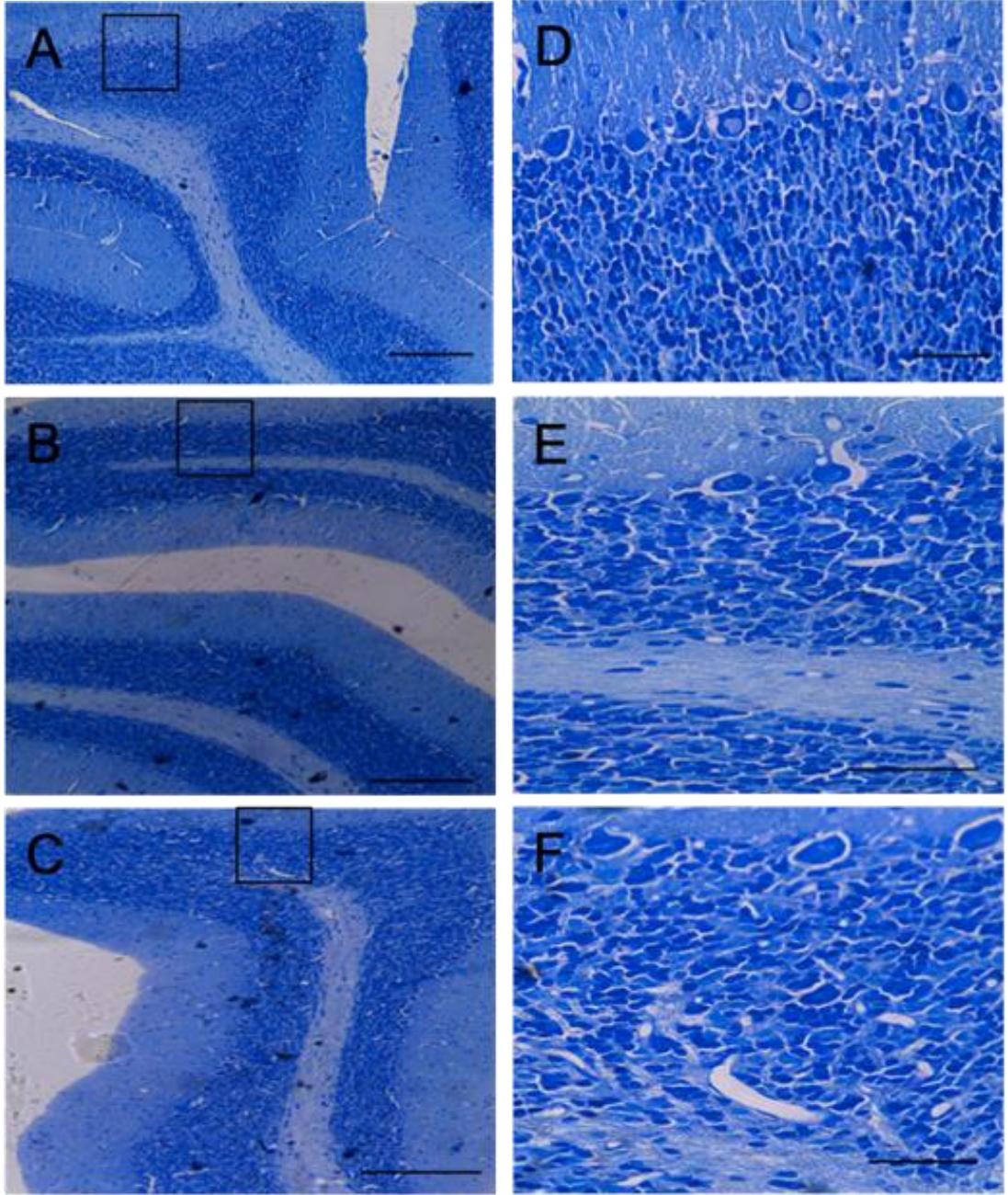
Birim mesafeye düşen Purkinje hücre sayısı tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu ile cinsiyet bağımsız bir şekilde karşılaştırıldığında fenobarbital verilen annelerden doğan yavrular kontrol grubu annelerden doğan yavrulara göre anlamlı derecede düşük Purkinje hücrelerine sahipti ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.9). Kantitatif olarak gözlenen bu farklılıklar de histolojik kesitlerden elde edilen fotomikrograflarda da (Şekil 4.10 A-C), özellikle büyük büyütmelerde, görülmekteydi (Şekil 4.10 D-F).



**Şekil 4.9.** Birim mesafeye düşen Purkinje hücre sayılarının karşılaştırılması.

Grafiklerde verilen değerler ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini göstermektedir (Her grup için;  $n=8$ ). \*  $p < 0.05$  kontrol ile fenobarbital grubu arasında farklılık.

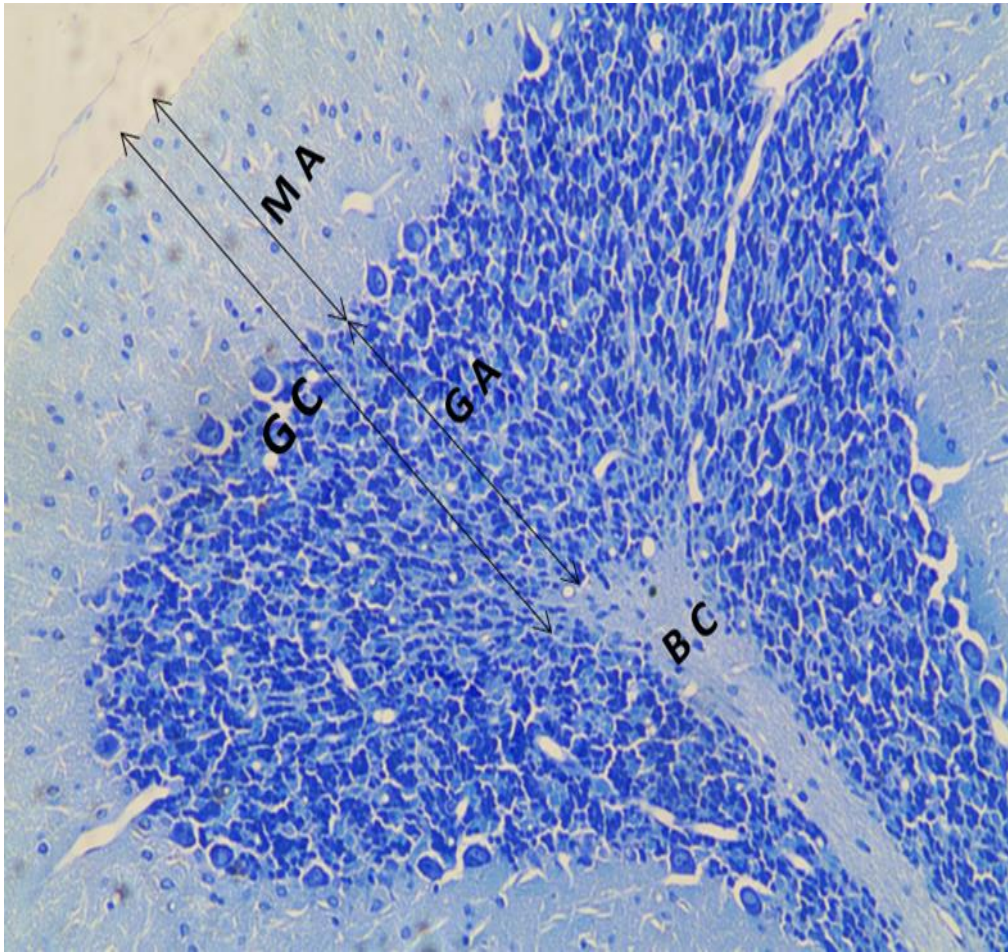




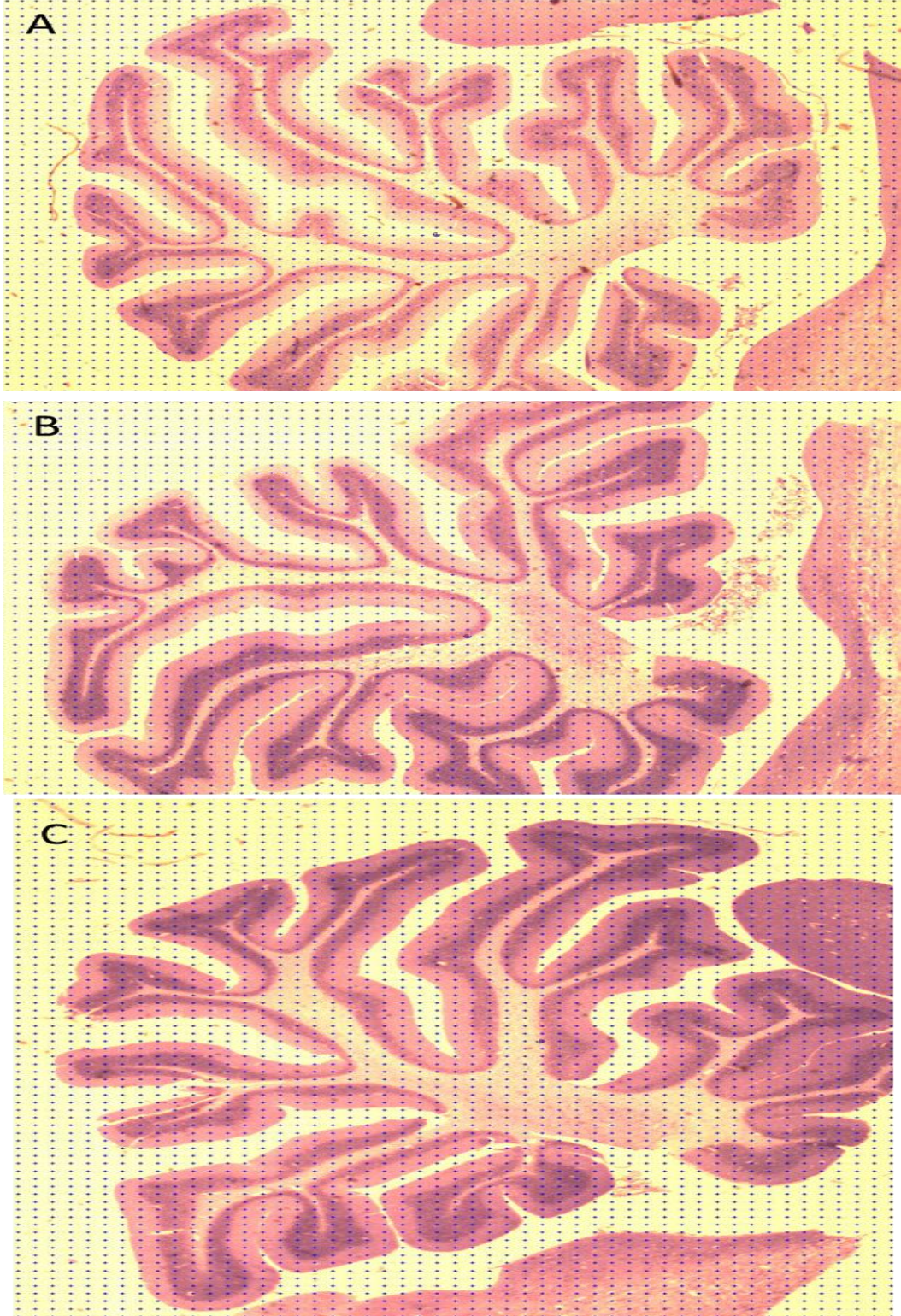
**Şekil 4.10.** Birim mesafeye düşen Purkinje hücrelerinin hesaplanmasında kullanılan fotomikrograflar. Kontrol (A-D), Lamotrijin(B-E), Fenobarbital(C-F). Toluidin mavisi, Ölçek=100 µm (A-B-C), ve 20 µm (D-E-F).

#### 4.8. Serebellar Korteks Tabaka Oranlarının Karşılaştırılması

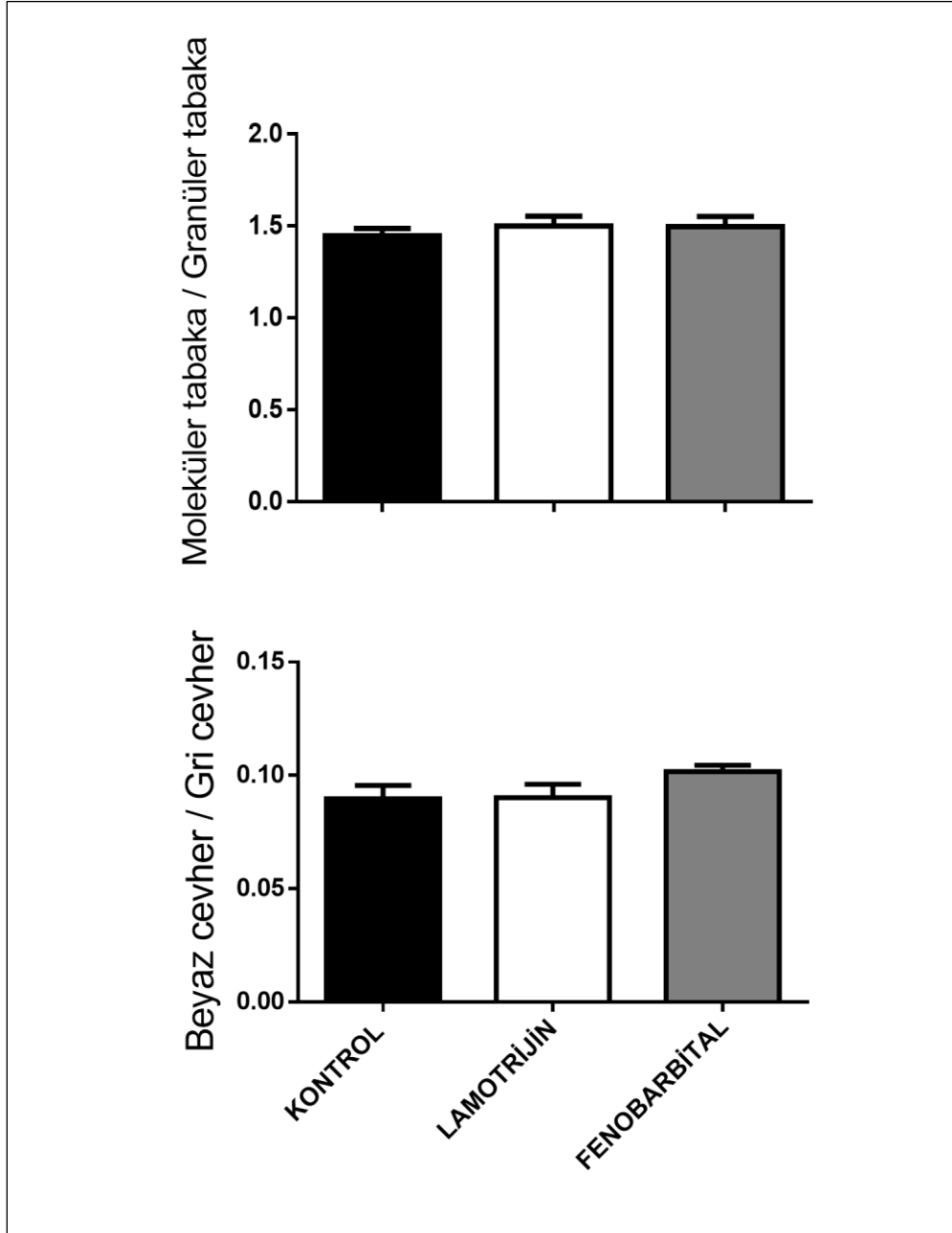
Deney ve kontrol gruplarından doğan yavrularda gri cevherin beyaz cevher hacmine oranlarının karşılaştırılmasında, kesit kalınlığı göz önünde bulundurularak ve noktali sayım cetveli kullanılarak, serebellar korteksin moleküler ve granüler tabakaları üzerine düşen nokta sayıları hesaplandı (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Her 3 gruptaki hacimsel oranlar tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.13).



**Şekil 4.11.** Cerebellum'da hacim oranlarının hesaplanması. Moleküler tabaka alanı (MA), granüler tabaka alanı (GA), gri cevher (GC) ve beyaz cevher (BC).



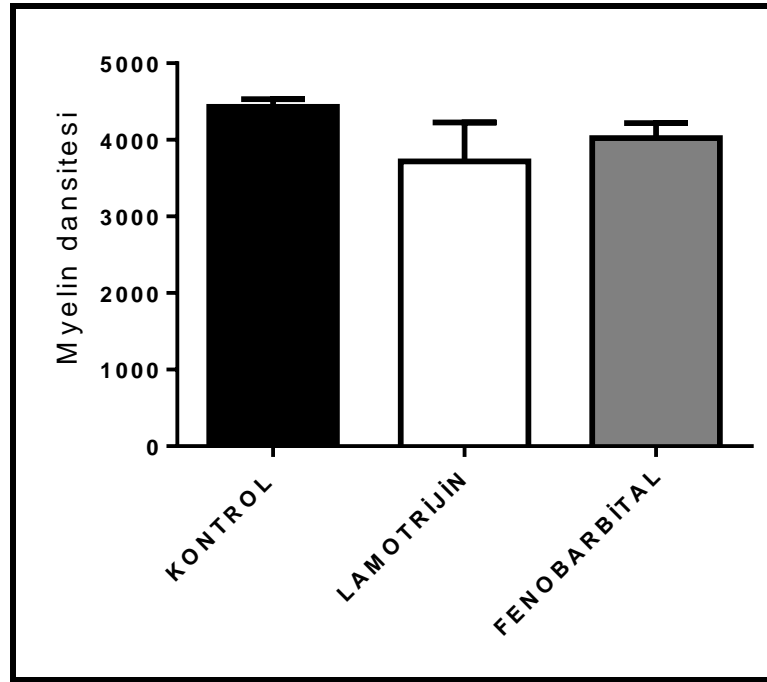
**Şekil 4.12.** Noktalı sayım cetveli uygulanarak kontrol (A), lamotrijin (B) veya fenobarbital (C) uygulanan annelerden doğan yavruların cerebellum kesitlerinde hacimsel oranların hesaplanması.



**Şekil 4.13.** Moleküler tabaka / Granüler tabaka ve Beyaz cevher / Gri cevher hacim oranlarına göre, lamotrijin ve fenobarbital uygulanan annelerden ve kontrol grubu annelerden doğan yavruların karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler, ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini göstermektedir (Her grup için; n=8).

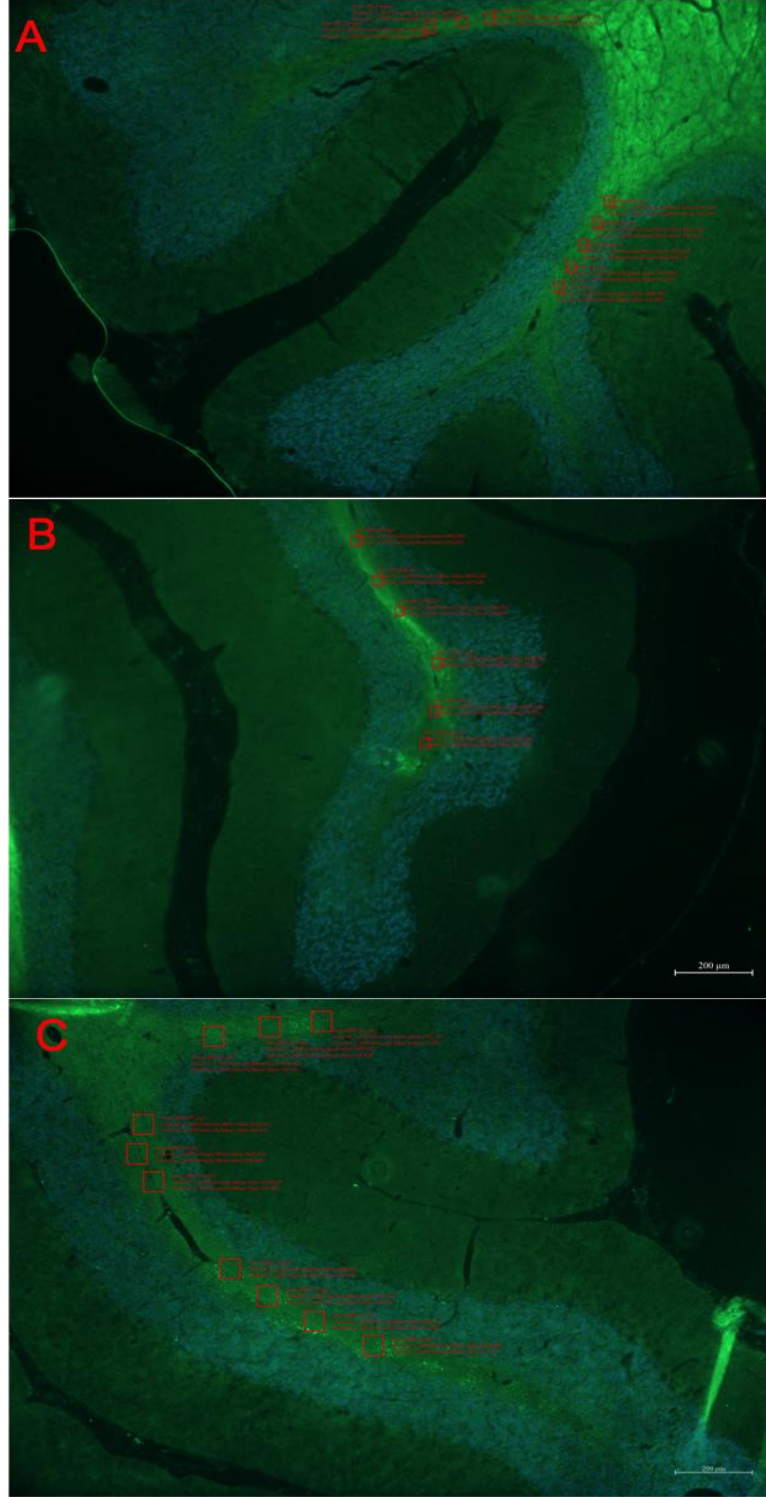
#### 4.9. Myelin Dansitelerinin Karşılaştırılması

Her 3 gruptaki yavruların myelin dansiteleri tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.14). Beyaz cevher bölgesinde myelin dansitesi ölçümü için sistematik randomize örnekleme yöntemiyle seçilen alanların fotomikrografik görüntüleri Şekil 4.15'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.14.** Myelin dansitesine göre lamotrijin ve fenobarbital uygulanan annelerden ve kontrol grubu annelerden doğan yavruların karşılaştırılması.

Grafiklerde verilen değerler ortalama  $\pm$  standart hata değerlerini göstermektedir (Her grup için; n=8).



**Şekil 4.15.** Kontrol grubu annelerden doğan yavrular (A) ile lamotrijin (B) ve fenobarbital (C) alan annelerden doğan yavrularda beyaz cevher bölgesinde myelin dansitesi ölçümü için sistematik randomize örnekleme yöntemiyle seçilen alanların fotomikrografik görüntüleri.

## 5. TARTIŞMA

Merkezi sinir sistemi büyüme ve gelişme düzeyinin en fazla hız kazandığı intrauterin dönem süresince çevresel koşullara ve toksik ajanlara karşı çok duyarlıdır. Nörogenezisi takiben gelişimin erken dönemlerinde kurulan sinaptik bağlantıların kalitesi ileri dönemlerdeki şekillenme aşamalarında da etkili olduğu için prenatal dönemde yaşanan deneyimler bireylerin davranışsal özelliklerinin ve duyarlılıklarının gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte hamile bireylerin maruz kaldığı toksik maddelerin veya ilaçların yavruların gelişimi üzerindeki etkilerini kontrollü bir şekilde test edebilmek son derece güçtür. Oysa deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalar, ilaç maruziyetinin süresi ve dozuna müdahale etmek suretiyle, yavrularda oluşabilecek bozuklukların sadece davranış düzeyinde değil, aynı zamanda anatomik olarak da incelenmesine imkân vermektedir [55]. Bu tez çalışmasında, literatürde gebelerde kullanımının daha güvenli olduğu bildirilen bir antikonvülsan olan lamotrijin ile gelişimsel nörotoksisite bakımından yüksek risk taşıyan bir ilaç olan fenobarbital'in deney hayvanlarının motor ve öğrenme becerileri üzerindeki etkileri hem davranışsal hem de morfometrik yöntemler kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Çalışmalarını 1999 yılından itibaren 44 ülkede sürdüren Uluslararası Antiepileptik İlaç ve Gebelik (EURAP) Kurumu'nun antiepileptik ilaç kullanan 716 gebenin kayıtlarından hareketle 2001 yılında yayınladığı ilk raporuna göre; gebelerde en sık kullanılan antiepileptik ilaç %48 oranı ile karbamazepin olurken, 2018 Mayıs ayında yayınlanan ve tek antiepileptik ilaç alan 10778 gebe ile birden çok antiepileptik alan 1614 gebeyi içeren rapora göre, monoterapi alanların %34'ünde, politerapi alanların ise %56'sında en sık kullanılan ilaç lamotrijin olmuştur [56, 57]. Bu nedenle bu tez çalışmasındaki deney gruplarından birinde klinikte epileptik veya non-epileptik sebeplerle gebelerde en sık kullanılmakta olan ve çalışmalarda en güvenilir antiepileptik ajanlardan biri olduğu belirtilen lamotrijin, literatürde en sık bildirilen doz aralığında (20 mg/kg) uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda, konjenital malformasyonlarla olan ilişkisi sebebiyle valproat ile birlikte en fazla rapor edilen ilaçlardan biri olan fenobarbital; neaktif kontrol

grubunda ise salin kullanılmıştır. Pilot çalışmalar esnasında 75 mg/kg dozda kullanılan fenobarbital, yavruların intrauterin dönemde rezorbsiyona uğraması nedeniyle, 40 mg/kg doza düşürülmesine rağmen bu dozda da yavruların ölü olarak doğması üzerine 20 mg/kg dozu denenmiş ve ancak bu sayede canlı doğum gerçekleşerek yavrular elde edilebilmiştir.

Epilepsi veya duyu durum bozukluğu, anksiyete, baş ağrısı, depresyon gibi sebeplerden dolayı antiepileptik ilaç kullanan 695 gebe ve antiepileptik ilaç kullanmayan 867 sağlıklı gebe ile yapılan bir çalışmaya göre spontan abortus veya major konjenital malformasyonlu bebek görülme oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, monoterapi alan ve major konjenital malformasyonlu bebek doğuran annelerin en sık kullandıkları ilaçlar arasında fenobarbital'in de içinde olduğu barbiturat grubu antiepileptik ilaçlar yer almaktadır [58]. Buna karşılık 2017'de yapılan bir başka çalışmada, 218 lamotrijin kullanan gebe ile 865 ilaç almayan gebelerden doğan yavrular düşük, ölü doğum, geç doğum, major anomaliler, kromozomal anomaliler, kardiyovasküler anomaliler, preterm doğum, düşük doğum ağırlığı, sezaryan ile doğum gibi parametreler bakımından karşılaştırıldığında lamotrijin kullanan annelerde sadece preterm doğum riskinin diğer gruplara göre artmış olduğu, diğer tüm parametreler açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ortaya konmuştur [59].

İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda antiepileptik ilaçlara intrauterin dönemde maruziyetin gelişimsel nörotoksositeye yol açtığı gösterilmiştir. Nörotoksosite biyolojik, kimyasal veya fiziksel bir ajan nedeniyle sinir sisteminde meydana gelen yapısal veya fonksiyonel değişikliklerin tamamını içeren bir tanımlamadır. Antiepileptik ilaç alan gebelerden doğan çocuklarda sinir sistemi ile ilgili olarak gözlenen değişikliklerin başında mental retardasyon, dil gelişiminde bozukluklar psikomotor gelişim geriliği ve davranış bozuklukları gelmektedir [60, 61]. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda da antiepileptik ilaçlara inutero dönemde maruziyetin hem anatomik hem de davranışsal düzeyde değişikliklere yol açtığını gösteren araştırmalar mevcuttur. Şimdiye dek



antiepileptik ilaçlarla yapılan deneysel çalışmalarda en sık kullanılan ajanların başında fenitoin, fenobarbital, valproat ve karbamazepin gelmektedir ve bu ilaçların hepsinin de prenatal dönemde uygulanması neticesinde yavrularda farklı düzeylerde davranışsal bozukluklar meydana geldiği bildirilmiştir [41]. Nöral tüp kapanma defektleri, beyinde hippocampus ve cerebellum başta olmak üzere farklı bölgelerde gözlenen apoptotik nörodejenerasyon, yine serebellar hemisferlerde küçülme ve gelişim geriliği ile migrasyon defektleri en sık görülen anatomik bozukluklar arasındadır [62].

Gebelikte lamotrijin kullanımının etkilerine ilişkin yapılan çalışmalar eski kuşak antiepileptik ilaçlara karşılaştırıldığında çok daha az sayıdadır. İnsanlarda yapılan araştırmalarda bu ilacın çocukların gelişimi ve dil kullanımı üzerinde olumsuz etkilere yol açmadığı bildirilmiştir [63]. İntrauterin dönemde lamotrijin'e maruz kalan çocukların bilişsel işlevlerini inceleyen bir başka çalışmada bu çocukların 3 ve 4.5 yaşlarına geldiklerinde valproat ile tedavi edilenlere göre daha yüksek IQ değerlerine sahip oldukları gösterilmişti [26, 60]. Öte yandan prospektif bir çalışmada gebeliklerinde lamotrijin veya valproat alan annelerden doğan yavrularda her iki ajanın da sözel olmayan iletişimde, motor becerilerde ve duyuşsal parametrelerde birbirlerine benzer düzeylerde yetersizliklere yol açtığı ve aileler tarafından rapor edilen iletişim, dikkat ve davranışsal bozukluklara sebep olduğu bildirilmiştir [37]. Ancak lamotrijin grubunda bu bozuklukların genel itibarıyla daha az görüldüğü ifade edilmektedir.

Sıçanlardaki uygulamalarda ise lamotrijin'in sadece insanlarda kullanılmayacak kadar yüksek olan dozlarda kullanıldığı zaman yaygın nöronal hücre ölümüne neden olabileceği bildirilmiştir Hatta lamotrijin'in fenitoin gibi diğer bir antiepileptik ajanla birlikte düşük dozlardaki (20mg/kg) kullanımının bu ilaç tarafından indüklenen apoptozis üzerinde, hücreye kalsiyum girişini bloke etmek suretiyle, koruyucu etkilere dahi sebep olduğu bildirilmiştir [28]. Forcelli ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise nöronal apoptozise yol açmayacak kadar düşük dozlarda

uygulanan lamotrijin'in sinaptik matürasyonda gecikmeye neden olduğu gösterilmiştir [33].

Literatürde yer alan bu çalışmalardan görüldüğü kadarıyla gebelikte lamotrijin kullanımının yavruların sinir sistemlerinin gelişimi üzerindeki etkileri yeterince detaylı olarak incelenmemiştir. Bu tez çalışmasında lamotrijin uygulamasının etkileri hem davranışsal hem de morfolojik açıdan ele alınırken yavruların özellikle de motor becerilerini değerlendiren davranış testleri kullanılmış ve morfolojik değerlendirmelerde de merkezi sinir sisteminde de bu işlevlerle yakından ilişkili bir bölge olan ilgili cerebellum üzerinde yoğunlaşmıştır. Zira cerebellum merkezi sinir sistemindeki nöronların yarısından fazlasını içeren bir bölge olması sebebiyle olumlu veya olumsuz çevresel koşullardan en fazla etkilenen bölgelerin de başında gelmektedir.

Yapılan davranış testlerinden elde edilen sonuçlar cinsiyet faktörü de göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde, yavruların motor fonksiyonlarını ve koordinasyon düzeylerini ölçmeye yönelik testlerde gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenirken; emosyonel değişiklikleri değerlendirmeye yönelik olan testlerde (yükseltmiş artı labirent ve açık alan testi gibi) benzer sonuçlar elde edilmiştir. Açık alan testinde santral zonda geçirilen süre göz önünde bulundurularak değerlendirilen anksiyete davranışı bakımından benzer sonuçlar gözlenirken, periferal alanda kat edilen mesafeler lamotrijin uygulanan annelerden doğan yavrular ile fenobarbital uygulanan annelerden doğan yavrular arasında anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur. İlginç bir şekilde lamotrijin grubunda, özellikle dişilerde daha belirgin olmak üzere, sadece periferik alanda kat edilen mesafe değil aynı zamanda iki ayak üzerinde dikilme, taranma, yalanma, süslenme davranışı gibi keşif davranışı ile ilişkili stereotipik hareket sayılarında da anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu gruptaki hayvanların spontan lokomotor aktivite düzeylerini inceleyen aktivitemetre ölçümlerinde ise toplam hareket sayısı ve test boyunca yapılan ambulatuvar hareketlerin süresi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar lamotrijin alan yavruların

açık alanda sergilemiş olduğu hareket sayılarındaki artışın spontan aktivite düzeyinden bağımsız olarak geliştiğine işaret etmektedir. Literatürde de lamotrijin'in hiperaktiviteye neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Satia ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada hamile sıçanlara E3. günden itibaren postnatal 11. güne kadar 3 farklı dozda (11.5, 23, ve 46 mg/kg) oral gavaj yoluyla uygulanan lamotrijin'in erkek yavrularda yükseltilmiş artı labirent testinde bir değişikliğe yol açmazken, dişilerde labirentin kollarına giriş-çıkış sayılarında anlamlı bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Yine dişilerde açık kolda geçirilen sürenin de kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir [53]. Bu çalışmada gebelik süresince 23 mg/kg dozunda uygulanan lamotrijin'in yavruların beyinlerinde GABA<sub>A</sub> mRNA ekspresyonunu anlamlı düzeyde azaltmak suretiyle hiperaktiviteye neden olduğu gösterilmiştir. Nitekim literatürdeki diğer çalışmalarda da sıçan beyinlerinde GABA<sub>A</sub> reseptör blokajının yükseltilmiş artı labirent testinde hipereksitabiliteye ve anksiyolitik davranışlara neden olduğu bildirilmiştir [64, 65]. Bizim çalışmamızda da aktivitemetre ve açık alan testlerinde özellikle dişilerde gözlenen stereotipik hareketlerdeki artışta bu inhibisyon mekanizmalarının rol oynadığı düşünülmektedir. Bu farklılığın dişilerde daha belirgin olarak gözlenmesi östrojenin GABA<sub>A</sub> reseptör ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkilerine [66] bağlı olarak GABA-aracılıklı inhibisyonun yavaşlatılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lamotrijin, presinaptik voltaj-kapılı sodyum kanallarını bloke etmek suretiyle eksitator özellikli glutamat ve aspartat salınımını azaltarak epileptik ataklara karşı koruyucu etki gösteren bir ajandır [67]. Bu farmakolojik özellikler fenobarbital'in etki mekanizmasıyla benzerlik göstermektedir. Fenobarbital de sinaptik iletide inhibitör süreçleri kolaylaştıran ve eksitator iletimi zayıflatan bir ajandır. GABA<sub>A</sub> reseptörünün allosterik düzenleyici bölgesine bağlanır ve GABA reseptörünün aracılık ettiği akımı, Cl<sup>-</sup> kanallarının açık kalmasını uzatarak kuvvetlendirir. Fenobarbital terapötik konsantrasyonlarında hem GABA aracılıklı inhibisyonu kuvvetlendirir hem de glutamat aracılı eksitasyonu azaltır [24]. Son yıllarda yapılan *in vitro* çalışmalarda fenobarbital'in, yalnızca yüksek konsantrasyonlarda, sodyum

geçirgenliği üzerinde etki göstererek yüksek frekanslı tekrarlayan ateşlemeyi bastırmak suretiyle anormal nöronları selektif olarak baskılayabildiği gösterilmiştir. Barbitüratlar yüksek konsantrasyonlarda  $Ca^{+}$  akımını (L-tipi ve N-tipi) da bloke etmektedir. Bu özellikleri nedeniyle nöronlarda proapoptotik mekanizmaları devreye sokarak ciddi nöron kaybına yol açmaları kuvvetle muhtemeldir. Nitekim bizim de pilot çalışmalarımızda yüksek dozlarda uyguladığımız fenobarbital fetal absorpsiyon veya abortus ile sonuçlanmıştır.

Açık alan testi anksiyete benzeri davranışların değerlendirilmesinde kullanılan bir test olmakla birlikte, testin ilk uygulaması çeşitli ilaçların lokomotor aktivite üzerindeki spesifik olmayan etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılabilir. Açık alan testine tekrar tekrar maruz kalınması üzerine, hayvanlar bu alana hızla adaptasyon göstererek hareketleri azalmaktadır. Kat edilen kutucuk sayısı ve arka ayaklar üzerindeki dikeme sıklığı genellikle lokomotor aktivitenin ölçüsü olarak kullanılır, ancak bunlar aynı zamanda keşif ve kaygı ölçütleridir. Bu tür davranışların sıklığı, artan hareket kabiliyetini ve keşif davranışını gösterir ve daha düşük bir anksiyete düzeyine işaret eder. Genel olarak kemirgenlerde arka ayaklar üzerinde dikeme davranışı emosyonel davranışların belirteci olarak kabul edilmektedir (artan davranış sıklığı keşif davranışıyla ilişkilendirilir). Santral alana girme süresinde gecikme ve bu alanda harcanan sürede ve sıklıktaki azalmalar keşif davranışı ve kaygı ölçütleri olarak kullanılmaktadır. Kemirgenler doğal olarak periferik alanda kalmayı santral alandaki etkinliklere tercih ettiklerinden dolayı santral alanda harcanan zamanın artması anksiyolitik belirtiler olarak kabul edilmektedir. Bakım ve süslenme davranışı bir yer değiştirme tepkisidir ve özellikle herhangi bir yeni ortamda gösterilmesi beklenir. Bu gibi stereotipik davranışlar stres durumundaki kaygıyı hafifletmeye hizmet edebilir. Yine yeni bir ortama girildiğindeki dışkılama (fekal boli) sayısı da anksiyete ölçüsü olarak da kullanılmaktadır [68, 69].

Zimcikova ve arkadaşlarının antiepileptik ilaçlara kronik olarak maruz bırakılan erişkin erkek Wistar cinsi sıçanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada açık alan testi kullanılmak suretiyle 8 farklı tipteki ilacın (lamotrijin, levetirasetam, fenitoin, topiramet, karbamazepin, gabapentin, pregabalin ve

zonisamid) etkileri karşılaştırılmıştır. Deney gruplarında santral alana girme sayı ve sürelerinde farklılık gözlenmiştir. Lokomotor aktivitenin, lamotrijin alan grupta gabapentin ve pregabalin grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı, topiramet uygulanan sıçanlarda da belirgin bir şekilde artan sayıda stereotipik davranış gözlemlendiği bulunmuştur. Dışkılama sayısının da gabapentin ve karbamazepin grubunda anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. [70]. Bu sonuçlar antiepileptik ilaçlar arasında davranış profilleri bakımından önemli farklılıklar olduğuna ve klinik uygulamalarda bu etkilerin göz önünde bulundurulması gerekliliğine dikkat çekmektedir

Fenobarbital, neonatolojide kullanılan en yaygın antikonvülsan ilaç olduğu için bu sınıftaki antiepileptik ilaçların sinir sistemi işlevleri üzerindeki uzun vadeli etkilerini inceleyen deneysel çalışmalar sıçanlarda genellikle doğumdan sonraki erken evrelerde yapılmaktadır. Sıçanlarda postnatal ikinci hafta yaklaşık olarak insanlarda gebeliğin üçüncü trimesterinin sonları ile neonatal dönemin başlarına karşılık gelmektedir. Bu süre zarfındaki fenobarbital maruziyetinin, erişkin dönemde öğrenme ve hafızada bozukluk, anksiyete benzeri davranış ve sosyal davranışlarda bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Frankel ve arkadaşları P7. ila P13. günler arasında intraperitoneal olarak uygulanan fenobarbital (75 mg/kg) ve yeni nesil bir antikonvülsan olan retigabin'in (30 mg/kg) erişkin sıçanlardaki motor, duyu, sosyal davranış ve öğrenme/bellek işlevlerini rota-rod, açık alan, yükseltilmiş artı labirent, aydınlık-karanlık kutu geçiş testi, pasif sakınma ve kuyruk çekme gibi testler kullanarak değerlendirmiştir [71]. Bu çalışma sonucunda her iki ilaca maruziyetin yetişkin sıçanlarda motor davranışlar üzerinde bir değişikliğe yol açmadığı ancak fenobarbital uygulamasının artmış anksiyete benzeri davranışa neden olduğu gösterilmiştir. Fenobarbital'in aynı zamanda öğrenme ve hafıza işlevlerini bozduğu ve sosyal etkileşim davranışları üzerinde de olumsuz etkilere yol açtığı belirtilmektedir.

Forcelli ve arkadaşlarının benzer bir dönemde (P7-P13. günler arasındaki) yenidoğan sıçanlara uyguladıkları antikonvülsan ilaçlardan fenobarbital (75 mg/kg), fenitoin (50 mg/kg) ve lamotrijin'in (20 mg/kg) erişkin dönemdeki davranışlar üzerindeki etkilerini inceledikleri bir başka çalışmada ise her üç

ilacın da Morris su tankı testi ile değerlendirilen mekansal öğrenme düzeylerinde ve sosyal keşif davranışında azalmaya neden oldukları gösterilmiştir [72]. Bu çalışmada fenobarbital uygulaması, korku koşullandırma, yükseltilmiş artı labirent ile test edilen risk değerlendirmesi ve pre-puls inhibisyonu ile ölçülen sensorimotor işlevlerde bozukluklara neden olurken, rota-rod ile değerlendirilen motor koordinasyon işlevinde herhangi bir bozukluğa yol açmamıştır. Buna karşılık, fenitoin ve lamotrijin uygulaması rota-rod performansında bozulmaya neden olurken, sensorimotor işlevlerde bir değişikliğe yol açmamıştır. Lamotrijin diğer iki ilaca kıyasla korku koşullandırma testi ile değerlendirilen öğrenme ve hafıza performansında herhangi bir azalmaya neden olmamıştır, ancak açık alandaki keşif davranışında fenitoin uygulamasına kıyasla daha az etkili olmuştur.

Bizim çalışmamızda ise fenobarbital uygulanan annelerden doğan erkek sıçanların rota-rod testindeki motor performansları kontrol grubu annelerden ve lamotrijin uygulanan annelerden doğan yavrulara göre daha düşük bulunmuştur. Anksiyete benzeri davranışların değerlendirildiği yükseltilmiş artı labirent testi ve açık alan testlerinde ise fenobarbital uygulanan annelerden doğan yavrular kontrol ve lamotrijin gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir. Tüm bu sonuçlar, ilaçlara maruziyet döneminin yavruların gelişimleri üzerinde farklı davranışsal etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Bu nedenle erişkin dönemdeki bilişsel ve psikiyatrik bozuklukların değerlendirilmesinde gelişim sırasında maruz kalınan ilaç uygulamalarının farklı etkileri mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Özellikle de neonatal dönemde uygulanan antikonvülsanların klinik kullanımında uzun vadede kalıcı bozukluk oluşturabilen ilaçlardan kaçınılmalıdır.

Rice ve Barone tarafından yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada, insanlarda ve sıçanlarda gelişmekte olan beyindeki kritik periyodlar karşılaştırıldığında, merkezi sinir sisteminde nörogenez periyodu en uzun süren yapının cerebellum olduğuna dikkat çekilmektedir. Bu sürecin insanda gestasyonel 4. haftadan başlayıp 40. haftaya kadar sürerken, sıçanlarda da E12'den başlayıp P19 kadar devam ettiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada

insan için hücre proliferasyonunun prenatal 2. ay ila postnatal 3.ay arasında, beyin ve omurilikteki migrasyonunun prenatal 2. ila 6. aylar arasında olduğu hatta cerebellum'un granüler tabakasındaki migrasyonunun postnatal dönemde ilk bir yıl boyunca sürdüğü, sinaptogenezin ağırlıklı olarak prenatal 7. ay ila postnatal 2. yıl olmak üzere uzun bir süre devam ettiği ve miyelinizasyonun da prenatal 6. aydan itibaren başlayan ve doğumdan sonra da uzun yıllar devam eden bir süreç olduğu gösterilmiştir. Bu gelişimsel süreçlere sıçanlarda karşılık gelen dönemler incelendiğinde; nörolasyonun E7-E11 günleri arasında, proliferasyon ve migrasyonun E7-P15 arasında olduğu, farklılaşma ve sinaptogenezin E12'de başlayıp postnatal dönemde uzun süreler devam ettiği, apoptozisin E7'den başlayıp P15'ten sonra da bir müddet devam ettiği, gliogenezis'in E7'de başlayıp P45'den sonra dahi uzun süreler devam ettiği, miyelinizasyonun da prenatal dönemin son günlerinde başlayıp postnatal dönemde uzun süreler devam ettiği gösterilmiştir [73]. Beynin nörotoksik ajanlara karşı en hassas olduğu dönem, bu gelişimsel periyotların önemli bir bölümünü kapsayacak şekilde, beyin büyümesinin pik yaptığı ("brain growth spurt") dönem olarak adlandırılan sürece karşılık gelmektedir. Bu dönem insanlarda perinatal dönemde pik yapmak üzere gebeliğin son trimesteri, sıçanlarda ise P7-P10'da pik yapmak üzere postnatal ilk 10 gün olarak tanımlanmıştır [74]. Antiepileptik ilaçlar tarafından indüklenen nöronal apoptozisin de en fazla bu dönemde gerçekleştiğini bildiren yayınlar mevcuttur [43, 75]. Ancak cerebellum gelişimi özelinde incelendiğinde, serebellar nöronların gelişiminin sıçanlarda E13. günden başlayarak P19. güne kadar sürdüğü gösterilmiştir. Bunlardan cerebellum'daki en önemli çıktı kaynağını oluşturan derin serebellar çekirdeklerdeki nöronların E14. günde pik yapmak üzere E13-E14'de, Purkinje hücrelerinin de E15. günde pik yapmak üzere E14-E15'de geliştiği gösterilmiştir. Yine Golgi hücrelerinin de E19-P3 günlerini kapsayan bir dönem süresince geliştiği, ancak serebellar afferentlerin sonlandığı granüler tabakadaki mikronöronların P8-P15'de pik yapmak üzere P4-P19 günleri arasında geliştiği, benzer şekilde sepet (basket) ve yıldızsı (stellat) hücrelerin de sırasıyla P4-P7'de ve P8-P11'de pik yapmak üzere P0-P11 günleri ve P4-

P15 günleri arasında geliştiği gösterilmiştir [13]. Görüldüğü üzere cerebellum'da bulunan ve hem fonksiyonel hem de morfolojik açıdan farklılık gösteren iki temel hücre grubunun gelişimsel dönemleri oldukça farklılık göstermektedir. Bu tez çalışmasında, özellikle beceri gerektiren motor işlevlerin değerlendirilmesi amaçlandığından, ilaç uygulamaları makronöronların gelişim dönemini kapsayacak şekilde E14-E21 günleri arasında yapılmıştır. Oysa literatürde lamotrijin'nin nörotoksik etkilerini sıçan modelleri üzerinde inceleyen çalışmaların çoğunluğunda ilaç uygulamaları 'brain growth spurt' dönemine karşılık gelen postnatal ilk 2 haftayı da içine alan bir dönem zarfında yapılmıştır ve genellikle hippocampus, cerebral korteks ve striatum gibi bölgelerdeki nöronlar incelenmiştir [28, 33, 71, 72, 76, 77].

Morfometrik analiz sonuçlarımız prenatal dönemde uygulanan fenobarbital'in Purkinje hücre hattında yer alan nöron sayılarında kontrol ve lamotrijin uygulanan gruplara göre anlamlı bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Buna karşılık granüler tabakanın moleküler tabakaya hacimsel oranlarında ve yine beyaz cevherin gri cevhere oranlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar gebelikteki lamotrijin uygulamasının yavruların serebellar gelişimi üzerinde fenobarbital'e kıyasla daha az olumsuz etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. Son yıllarda yapılan davranış, genetik, postmortem ve nörogörüntüleme çalışmalarında cerebellum kognitif işlevlerdeki önemli rolü nedeniyle otizm spektrum hastalığı ve dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu gibi motor olmayan hastalıklarla ilişkisi yönüyle de öne çıkan bir bölgedir [78]. Bu nedenle nörogenesis periyodu prenatal döneme denk gelen Purkinje hücrelerinde meydana gelen sayısal ve morfolojik değişimlerin internöronal bağlantılarda anomalilere neden olarak nöropsikiyatrik bozuklukların etiyopatogenezinde rol oynaması muhtemeldir. Bath ve Scharfman'ın antiepileptik ajanlara maternal ya da erken postnatal dönemdeki maruziyetin yavrulardaki etkilerini inceledikleri bir çalışmada maternal fenobarbital maruziyetinin cerebellum ve hippocampus'taki hücre sayılarını düşürdüğü, motor aktive gelişiminde gecikmeye neden olduğu, yürütücü hafıza bozukluğuna neden olduğu



gösterilmiştir. Erken postnatal dönemdeki maruziyetin ise bu bulgulara ilaveten serebellar ve hipokampal nöronlarda apoptozisi arttırdığı, migrasyon defektlerine yol açtığı, hiperaktivite ve dikkat bozukluğuna yol açtığı, prepuls inhibisyonunda gecikmeye neden olarak otizm ve şizofreni benzeri durumlara neden olduğu rapor edilmiştir [79].

Prenatal dönemde strese maruz kalan sıçanlar üzerinde yapılan stereolojik çalışmalarda da granüler tabakanın moleküler tabaka hacmine oranlarında ve granül hücrelerinin sayısal yoğunluklarında değişiklik olmamasına rağmen, birim uzunluktaki Purkinje hücre sayılarında kontrol gruplarına göre farklılıklar olduğu bildirilmiştir [7, 8]. Bu araştırmalarda granüler tabakanın nöropil bölgesindeki sinaptik disk yoğunluklarının azaldığı ve sinaptofizin immunoreaktivitesinde de anlamlı bir düşüş (%41) olduğu da bildirilmiştir. Bu bulgular cerebellum gelişiminde prenatal dönemin de en az neonatal dönem kadar kritik bir öneme sahip olduğunu ve özellikle bu dönem zarfında gelişim gösteren Purkinje nöronlarının olumsuz çevresel koşullardan etkilenebildiğini göstermektedir.

Hem insanlar hem de sıçanlar, merkezi sinir sistemlerinin doğumda olgunlaşmamış olması sebebiyle "altrik" türler olarak kabul edilmektedir. Ancak bu iki tür arasında miyelinizasyon, sinaps oluşumu, nöronal ve sinaptik budanma gibi major nörogelişimsel olaylar bakımından önemli farklılıklar mevcuttur. Örneğin, insanlarda gyrus dentatus'taki yaklaşık granül hücre popülasyonunun yaklaşık %20'si hücre doğumdan sonra oluşurken bu oran sıçanlarda %80'in üzerindedir. İnsanlarda periferik sinirlerde, pons'ta ve serebellar pedunküllerdeki lifler doğumda oldukça iyi miyelinli iken sıçanlarda doğumdan önceki dönemde oldukça sınırlı düzeyde myelinizasyon görülür [80]. Bizim çalışmamızda da cerebellum'un beyaz cevherindeki miyelin yoğunlukları karşılaştırıldığında ilaç uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmemiş olması insanlarda prenatal dönemde nörotoksik potansiyele sahip maddelerin sıçanlarda ciddi bir etkiye yol açmayabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte insanlarda ve sıçanlarda lokomotor aktiviteler doğum sonrası dönemde rostrokaudal bir olgunlaşma paterni göstererek gelişmektedir. Buna göre servikal bölge gelişimi lumbal

bölgeye göre önce gerçekleştiği için juvenil toksisite çalışmalarında üst ve alt ekstremit motor gelişiminin değerlendirmesinde bu farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır. Bizim çalışmamızda, beceri gerektiren kavrama hareketinin değerlendirildiği testlerde, lamotrijin uygulanan annelerden doğan yavrular ile kontrol gruplarındaki yavruların yemi ilk kavrama süreleri testin özellikle ilk 3 günlük öğrenme periyodunda benzerlik gösterirken, fenobarbital uygulanan annelerden doğan yavruların bu süreçte geri kaldığı, bu gruptaki bireysel farklılıkların daha baskın olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte 5 günlük test periyodunun bitiminde genel olarak ince motor koordinasyon gerektiren beceriler bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmadığı tespit edilmiştir. Ancak gebelikte kullanılan ilaçların davranışa yansıyan etkilerinin değerlendirilmesinde bireysel farklılıklarla birlikte cinsiyet faktörü de mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır [81].

Bir feniltriazin türevi olan lamotrijin'in aynı zamanda bipolar duygudurum bozukluğunda da etkili olduğu bilinmektedir. Bu gruptaki lityum ve valproat gibi diğer ajanlara benzer şekilde lamotrijin de nöroprotektif özelliklere sahiptir. Lamotrijin'in bu etkisini serebellar nöronlar üzerinde hangi mekanizmalar aracılığıyla meydana getirdiğini inceleyen oldukça yeni bir *in vitro* çalışmada lamotrijin ile ön işleme tabi tutulmuş sıçan serebellar granül hücrelerine eksitotoksik bir glutamat dozu uygulanmıştır. Bu deneylerde lamotrijin hücre canlılığı ve morfolojisi üzerinde koruyucu etkilere sebep olarak, asetillenmiş histon H3 ve H4 seviyelerinin yanı sıra, doza ve zamana bağlı olarak anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 (B hücreli lenfoma-2) mRNA ve protein seviyelerinde de artışa neden olmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar önemli bir nöroprotektif protein olan Bcl-2 seviyesindeki düzensizliklerin duygudurum bozukluklarının davranışsal belirtileri ile bağlantılı olduğuna dikkat çekmektedir. Bu nedenle lamotrijin uygulamasının serebellar granül hücrelerindeki Bcl-2 promotorunun aktivasyonunu ve protein seviyelerini arttırdığının gösterilmesi bu ilacın perinatal dönemde kullanımının diğer antiepileptik ajanlara kıyasla daha güvenilir olduğunu destekler niteliktedir.

Özetle, gebelikte kontrol edilemeyen konvülsif nöbetler yavruların gelişimi üzerinde en az antiepileptik ajanlar kadar olumsuz etkilere sahiptir. Bununla birlikte gebelik süresince daha güvenilir antiepileptik ajanlar kullanıldığında yavrularda uzun vadeli davranış ve motor fonksiyon bozukluklarının gelişmediği de görülmektedir. Bu bulguların bundan sonra yapılacak ileri histopatolojik incelemeler ve moleküler düzeydeki ölçümlerle desteklenmesi uygun olacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Gebelikte kontrol edilemeyen konvülsif nöbetler fetal gelişim üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğundan, epilepsi hastalarının gebelik süresince ilaç tedavilerine devam etmeleri önerilmektedir. Gebelikleri sırasında antiepileptik ilaç kullanan kadınların oranı yaklaşık %0.3-0.4'dür. Öte yandan antiepileptik ilaç maruziyeti fetal malformasyonların en yaygın sebepleri arasındadır. Literatürdeki çalışmaların büyük bir çoğunluğunda malformasyon görülme riski en düşük olan antikonvülsan ilacın lamotrijin (günde 300 mg'dan daha az dozda) olduğu, aksine valproat ve fenobarbital'in malformasyon oluşturma risklerinin ise diğer ilaçlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir.
- Neonatolojide yaygın olarak kullanılan antikonvülsan ilaçlara prenatal dönemde maruz kalan yavruların sinir sistemi gelişimi tamamlandıktan sonraki dönemlerinde beyinlerinde ve özellikle de beceri gerektiren motor davranışlarında meydana gelen değişiklikler hakkında kapsamlı bir morfolojik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında gebe sıçanlara E14-21 günleri arasında 20 mg/kg dozda uygulanan lamotrijin ve fenobarbital'in postnatal dönemdeki etkileri motor becerileri değerlendiren davranış testleri kullanılarak incelenmiş ve morfolojik değerlendirmelerde de merkezi sinir sisteminde de bu işlevlerle yakından ilişkili bir bölge olan cerebellum üzerinde yoğunlaşmıştır. Zira cerebellum merkezi sinir sistemindeki nöronların yarısından fazlasını içeren bir bölge olması sebebiyle olumlu veya olumsuz çevresel koşullardan en fazla etkilenen bölgelerin de başında gelmektedir.
- Fenobarbital uygulanan annelerden doğan erkek yavrular, motor koordinasyon ve dengeyi değerlendiren rota-rod testinde düşük performans gösterirken, dişi yavrular aktivitemetre testinde düşük motor performans göstermişlerdir. Aynı gruptaki hayvanlar, her iki cinsiyette, anksiyete, motor performans, çevreyi keşfetme düzeylerini değerlendirmede kullanılan açık alan testinde diğer gruplara göre daha düşük motor performans sergilemiştir.

- Lamotrijin uygulanan annelerden doğan yavrularda ise cinsiyetten bağımsız olarak spontan lokomotor aktivite testinin ambulatuvar hareket periyodunda ve toplam hareket sayılarında düşüş gözlenirken, açık alan testinde dişilerde hem periferik alanda kat edilen mesafe hem de vertikal hareket sayılarında anlamlı düzeyde artış olduğu saptanmıştır. Bu bulgular prenatal dönemdeki lamotrijin maruziyetinin genç erişkin dönemde keşif davranışında artışa ve anksiyolitik etkilere neden olduğunu göstermektedir. Literatürdeki diğer çalışmalar baz alındığında, özellikle dişi sıçanlarda gözlenen bu farklılıkların östrojenin GABA<sub>A</sub> reseptör ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkilerine bağlı olarak GABA-aracılıklı inhibisyonun yavaşlamasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.
- Barbitüratlar yüksek konsantrasyonlarda Ca<sup>+</sup> akımını bloke etmekte ve nöronlarda proapoptotik mekanizmaları devreye sokarak ciddi nöron kaybına yol açmaktadır. Bizim de pilot çalışmalarımızda gebeliğin son haftası boyunca 75 mg/kg ve 40 mg/kg dozlarındaki fenobarbital uygulamalarının fetal absorpsiyon veya abortus ile sonuçlandığı gözlenmiştir.
- Morfometrik analiz sonuçlarımızda ise prenatal dönemde uygulanan fenobarbital'in Purkinje hücre hattında yer alan nöron sayılarında kontrol ve lamotrijin uygulanan gruplara göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık granüler tabakanın moleküler tabakaya hacimsel oranlarında ve yine beyaz cevherin gri cevhere oranlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar nörotoksik ajanların etkilerini spesifik olarak nörogenezis periyodunda olan Purkinje hücreleri üzerinde gösterdiğine ve gelişimleri postnatal dönemde tamamlanan granüler hücreler gibi mikronöronlar üzerinde önemli bozukluklara yol açmadıklarına işaret etmektedir. Purkinje hücrelerinde meydana gelen sayısal ve morfolojik değişimler, internöronal bağlantılarda anomalilere neden olarak, nöropsikiyatrik bozuklukların etiopatogenezine zemin hazırlamaları bakımından önem arz etmektedir.
- İnsanlarda periferik sinirlerde, pons'ta ve pedunculus cerebellares'teki lifler doğumda oldukça iyi miyelinli iken sıçanlarda doğumdan önceki dönemde

oldukça sınırlı düzeyde myelinizasyon görülmektedir. Bizim çalışmamızda da cerebellum'un beyaz cevherindeki miyelin yoğunlukları karşılaştırıldığında ilaç uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmemiş olması insanlarda prenatal dönemde nörotoksik potansiyele sahip maddelerin sıçanlarda ciddi bir etkiye yol açmayabileceğine işaret etmektedir.

- Çalışmamızda, beceri gerektiren kavrama hareketinin değerlendirildiği testlerde, lamotrijin uygulanan annelerden doğan yavrular ile kontrol gruplarındaki yavruların yemi ilk kavrama süreleri testin özellikle ilk 3 günlük öğrenme periyodunda benzerlik gösterirken, fenobarbital uygulanan annelerden doğan yavruların bu süreçte geri kaldığı, bu gruptaki bireysel farklılıkların daha baskın olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte 5 günlük test periyodunun bitiminde genel olarak ince motor koordinasyon gerektiren beceriler bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmadığı tespit edilmiştir. İnsanlarda ve sıçanlarda lokomotor aktiviteler doğum sonrası dönemde rostrokaudal bir olgunlaşma paterni göstererek gelişmektedir. Buna göre servikal bölge gelişimi lumbal bölgeye göre önce gerçekleştiği için juvenil toksisite çalışmalarında üst ve alt ekstremiteler motor gelişiminin değerlendirmesinde bu farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca gebelikte kullanılan ilaçların davranışa yansıyan etkilerinin değerlendirilmesinde, bireysel farklılıklarla birlikte cinsiyet faktörü de mutlaka dikkate alınmalıdır.
- Sonuç olarak, gelişim sırasında maruz kalınan ilaç uygulamaları yavruların gelişimleri üzerinde, cinsiyete de bağımlı olarak, farklı davranışsal etkiler oluşturabilmektedir. Bu nedenle klinik kullanımda özellikle de neonatal dönemde uygulanan antikonvülsanlardan uzun vadede kalıcı bozuklar oluşturabilenleri mümkün olduğunca tercih edilmemelidir.

## KAYNAKLAR

1. Clossen BL, Reddy DS. Novel therapeutic approaches for disease-modification of epileptogenesis for curing epilepsy. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2017;1863:1519-38.
2. Brosh K, Matok I, Sheiner E, Koren G, Wiznitzer A, Gorodischer R, Levy A. Teratogenic determinants of first-trimester exposure to antiepileptic medications. *Journal of population therapeutics and clinical pharmacology*. 2011;18:89-98.
3. Adab N, Tudur SC, Vinten J, Williamson P, Winterbottom J. Common antiepileptic drugs in pregnancy in women with epilepsy. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2004;CD004848.
4. Meador KJ, Loring DW. Developmental effects of antiepileptic drugs and the need for improved regulations. *Neurology*. 2016; 86:297-306.
5. Gerard EE, Meador KJ. An update on maternal use of antiepileptic medications in pregnancy and neurodevelopment outcomes. *Journal of pediatric genetics*. 2015; 4:94-110.
6. Turski CA, Ikonomidou C. Neuropathological sequelae of developmental exposure to antiepileptic and anesthetic drugs. *Frontiers in neurology*. 2012; 3:120.
7. Ulupinar E, Yucel F, Ortug G. The effects of prenatal stress on the Purkinje cell neurogenesis. *Neurotoxicology and teratology*. 2006; 28:86-94.
8. Ulupinar E, Yucel F. Prenatal stress reduces interneuronal connectivity in the rat cerebellar granular layer. *Neurotoxicology and teratology*. 2005;27:475-84.
9. Ulupinar E, Erol K, Ay H, Yucel F. Rearing conditions differently affect the motor performance and cerebellar morphology of prenatally stressed juvenile rats. *Behavioural Brain Research*. 2015; 278:235-43.
10. Claudia Krebs JW, Elizabeth A. In: Harvey RA, editor. *Lippincott's Illustrated Review of Neuroscience*. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.329.

11. Reeber SL, Loeschel CA, Franklin A, Sillitoe RV. Establishment of topographic circuit zones in the cerebellum of scrambler mutant mice. *Frontiers in neural circuits*. 2013;7:122.
12. Hashimoto M, Hibi M. Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Development, growth & differentiation*. 2012;54:373-89.
13. Bayer SA, Altman J, Russo R, Zhang XJN. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *NeuroToxicology*. 1993;14:83.
14. Netter FH, Hansen JT. İnsan anatomisi atlası:Nobel Tıp Kitabevleri; 2003.
15. Erzurumlu R, Şengül G, Ulupınar E. Nöroanatomi. Ankara:Güneş Tıp Kitapevi;2018.
16. Claudia Krebs JW, Elizabeth Akesson. In:Harvey RA,editör. *Lippincott's Illustrated Review of Neuroscience*. Baltimore, Maryland:Lippincott Williams & Wilkins;2011.p.329-39.
17. Snell RS. *Clinical and functional histology for medical students*.Little, Brown;1984.
18. John H. 2014. Ultrafast spikes carry supra-kilohertz signals in the cerebellum. [https://www.medicalxpress.com/news/ultrafast-spikes-supra-kilohertz-cerebellum/html\(09/2014\)](https://www.medicalxpress.com/news/ultrafast-spikes-supra-kilohertz-cerebellum/html(09/2014)).
19. Nervous system. [https://www.clinicalgate.com/nervous-system-3/2015/html\(2015\)](https://www.clinicalgate.com/nervous-system-3/2015/html(2015)).
20. Claudia Krebs JW, Elizabeth Akesson. In:Harvey RA,editör. *Lippincott's Illustrated Reviews of Neuroscience*. Baltimore, Maryland:Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p341-43.
21. Purves D, Cabeza R, Huettel SA, LaBar KS, Platt ML, Woldorff MG,Brannon EM. *Cognitive Neuroscience*.Sunderland,Sinauer Associates, Inc; 2008.
22. Adams J,Harvey E, Holmes J. Cognitive deficits following gestational monotherapy with phenobarbital and carbamazepine. *Neurotoxicol Teratol*. 2000;22:466.



23. Kayaalp O. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. İç:Kayaalp O,editör. Pelikan Kitapevi; 2007.
24. Roger J, Porter BSM. Temel ve Klinik Farmakoloji. İç: Katzung BG,editör. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2014: s403-27.
25. Guidelines for the care of women of childbearing age with epilepsy. Commission on Genetics, Pregnancy, and the Child, International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1993; 34:588-89.
26. Meador K, Baker G, Browning N, Cohen M, Bromley R, Clayton-Smith J, Kalayjian L, Kanner A, Liporace J, Pennell P. Effects of fetal antiepileptic drug exposure:Outcomes at age 4.5 years. *Neurology*. 2012;78:142-46.
27. Seizure control and treatment in pregnancy: observations from the EURAP epilepsy pregnancy registry. *Neurology*. 2006; 66:354-60.
28. Katz I, Kim J, Gale K, Kondratyev A. Effects of lamotrigine alone and in combination with MK-801, phenobarbital, or phenytoin on cell death in the nonatal rat brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;322:494-500.
29. Olney JW, Young C, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Ikonomidou CJ. Do pediatric drugs cause developing neurons to commit suicide? *2004;25:135-39*.
30. Turner CP, Debenedetto D, Ware E, Walburg C, Lee A, Stowe R, Swanson J, Lambert A, Lyle M, Desai P. MK801-induced activated caspase-3 exhibits selective co-localization with GAD67. *Neuroscience letters*. 2009;462:152-56.
31. Turner CP, Miller R, Smith C, Brown L, Blackstone K, Dunham SR, Strehlow R, Manfredi M, Slocum P, Iverson K. Widespread neonatal brain damage following calcium channel blockade. *Developmental neuroscience*. 2007;29:213-31.
32. Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels. *General physiology and biophysics*. 2005; 24:1-78.

33. Forcelli PA, Janssen MJ, Vicini S, Gale K. Neonatal exposure to antiepileptic drugs disrupts striatal synaptic development. *Annals of neurology*. 2012;72:363-72.
34. Cummings C, Stewart M, Stevenson M, Morrow J, Nelson J. Neurodevelopment of children exposed in utero to lamotrigine, sodium valproate and carbamazepine. *Archives of disease in childhood* 2011;96:643-47.
35. Nadebaum C, Anderson VA, Vajda F, Reutens DC, Barton S, Wood AG. Language skills of school-aged children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Neurology*. 2011;76:719-26.
36. Meador KJ, Baker GA, Browning N, Clayton-Smith J, Combs-Cantrell DT, Cohen M, Kalayjian LA, Kanner A, Liporace JD, Pennell PB. Cognitive function at 3 years of age after fetal exposure to antiepileptic drugs. *The New England journal of medicine*. 2009;360:1597-605.
37. Rihtman T, Parush S, Ornoy A. Developmental outcomes at preschool age after fetal exposure to valproic acid and lamotrigine: cognitive, motor, sensory and behavioral function. *Reproductive toxicology*. 2013;41:115-25.
38. Schain RJ, Watanabe KJ. Effect of chronic phenobarbital administration upon brain growth of the infant rat. *Experimental Neurology*. 1975;47:509-15.
39. Bergman A, Feigenbaum JJ, Yanai J. Neuronal losses in mice following both prenatal and neonatal exposure to phenobarbital. *Cells-Tissues-Organs*. 1982;114:185-92.
40. Fishman RH, Ornoy A, Yanai J. Ultrastructural evidence of long-lasting cerebellar degeneration after early exposure to phenobarbital in mice. *Experimental Neurology*. 1983;79:212-22.
41. Costa LG, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin O. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2004;44:87-110.
42. Rogel-Fuchs Y, Newman ME, Trombka D, Zahalka EA, Yanai J. Hippocampal cholinergic alterations and related behavioral deficits

- after early exposure to phenobarbital. *Brain Journal Bulletin*. 1992; 29:1-6.
43. Bittigau P, Genz K, Engelbrechten Sv, Hoerster F, Dikranian K, Olney J, Ikonomidou C. Antiepileptics which enhance GABAergic inhibition cause neuronal apoptosis in the developing CNS. *Soc Neurosci Abstr*. 2000;26:323.
  44. Forcelli PA, Kim J, Kondratyev A, Gale K. Pattern of antiepileptic drug-induced cell death in limbic regions of the neonatal rat brain. *Epilepsia*. 2011;52:207-11.
  45. Forcelli PA, Janssen MJ, Stamps LA, Weeney C, Vicini S, Gale K. Therapeutic strategies to avoid long-term adverse outcomes of neonatal antiepileptic drug exposure. *Epilepsia*. 2010;51:18-23.
  46. Reinisch JM, Sanders SA, Mortensen EL, Rubin D. In utero exposure to phenobarbital and intelligence deficits in adult men. *Jama*. 1995;274:1518-25.
  47. Dessens A, Cohen-Kettenis P, Mellenbergh G, Koppe J, van De Poll N, Boer K. Association of prenatal phenobarbital and phenytoin exposure with small head size at birth and with learning problems. *Acta Paediatrica*. 2000;89:533-41.
  48. Wide K, Winbladh B, Tomson T, Sars-Zimmer K, Berggren E. Psychomotor development and minor anomalies in children exposed to antiepileptic drugs in utero: a prospective population-based study. *Developmental medicine*. 2000;42:87-92.
  49. Dean J, Hailey H, Moore S, Lloyd DJ, Turnpenny P, Little J. Long term health and neurodevelopment in children exposed to antiepileptic drugs before birth. *Journal of medical genetics*. 2002;39:251-59.
  50. Shapiro S, Hartz S, Siskind V, Mitchell A, Slone D, Rosenberg L, Monson R, Heinonen O, Idänpään-Heikkilä J, Häró S. Anticonvulsants and parental epilepsy in the development of birth defects. *The Lancet*. 1976; 307:272-75.

51. Soztutar E, Colak E, Ulupinar E. Gender-and anxiety level-dependent effects of perinatal stress exposure on medial prefrontal cortex. *Experimental neurology*. 2016;275:274-84.
52. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley MJ. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1985;14:149-67.
53. Sathiya S, Ganesh M, Kalaivani P, Ranju V, Janani S, Pramila B, Saravana Babu C. Prenatal exposure to lamotrigine: effects on postnatal development and behaviour in rat offspring. *Neuroscience*. 2014;1:1634-59.
54. Pitts MW, Todorovic C, Blank T, Takahashi LK. The central nucleus of the amygdala and corticotropin-releasing factor: insights into contextual fear memory. *Journal of Neuroscience*. 2009;29:7379-88.
55. Ulupinar E. Effects of prenatal stress on developmental anatomy of the brain and adult behavioural pathology. *Anatomy*. 2009;3.
56. Tomson T. EURAP: an international pregnancy registry for the evaluation of the comparative teratogenic effects of antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 2001;42:293.
57. Dina Battino EB, John C, Dick L, Emilio Perucca AS, Sanjeev V, Torbjörn T, Frank V. EURAP Interim Report May-2018.
58. Cassina M, Dilaghi A, Di Gianantonio E, Cesari E, De Santis M, Mannaioni G, Pistelli A, Clementi M. Pregnancy outcome in women exposed to antiepileptic drugs: teratogenic role of maternal epilepsy and its pharmacologic treatment. *Reproductive Toxicology*. 2013; 39:50-7.
59. Diav-Citrin O, Shechtman S, Zvi N, Finkel-Pekarsky V, Ornoy A. Is it safe to use lamotrigine during pregnancy? A prospective comparative observational study. *Birth Defects Research*. 2017;109:1196-203.
60. Meador KJ, Baker GA, Browning N, Clayton-Smith J, Combs-Cantrell DT, Cohen M, Kalayjian LA, Kanner A, Liporace JD, Pennell PB. Cognitive function at 3 years of age after fetal exposure to antiepileptic drugs. *New England Journal of Medicine*. 2009;360:1597-605.

61. Nadebaum C, Anderson V, Vajda F, Reutens D, Barton S, Wood A. Language skills of school-aged children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Neurology*. 2011;76:719-26.
62. Verrotti A, Scaparrotta A, Cofini M, Chiarelli F, Tiboni G. Developmental neurotoxicity and anticonvulsant drugs: a possible link. *Reproductive Toxicology*. 2014;48:72-80.
63. Cummings C, Stewart M, Stevenson M, Morrow J, Nelson J. Neurodevelopment of children exposed in utero to lamotrigine, sodium valproate and carbamazepine. *Archives of Disease in Childhood*. 2011;96:643-7.
64. Bueno C, Zangrossi H, Viana M. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 2005;38:1697-701.
65. Sanders S, Morzorati S, Shekhar A. Priming of experimental anxiety by repeated subthreshold GABA blockade in the rat amygdala. *Brain Research*. 1995;699:250-9.
66. Morrell M. Epilepsy in women. *American Family Physician*. 2002;66:1489-94.
67. Lees G, Leach MJ. Studies on the mechanism of action of the novel anticonvulsant lamotrigine (Lamictal) using primary neuroglial cultures from rat cortex. *Brain Research*. 1993;612:190-9.
68. Smolinsky AN, Bergner CL, LaPorte JL, Kalueff AV. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. In: *Mood and anxiety related phenotypes in mice*. Springer; 2009.p.21-36.
69. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463:3-33.
70. Zimcikova E, Simko J, Karesova I, Kremlacek J, Malakova J. Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on

- mood and behavior detectable in open-field test? *Seizure*. 2017;52:35-40.
71. Frankel S, Medvedeva N, Gutherz S, Kulick C, Kondratyev A, Forcelli PA. Comparison of the long-term behavioral effects of neonatal exposure to retigabine or phenobarbital in rats. *Epilepsy Behaviour* 2016;57:34-40.
  72. Forcelli PA, Kozlowski R, Snyder C, Kondratyev A, Gale K. Effects of neonatal antiepileptic drug exposure on cognitive, emotional, and motor function in adult rats. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. 2012;340:558-66.
  73. Rice D, Barone Jr S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*. 2000;108:511-33.
  74. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*. 1979;3:79-83.
  75. Kim J, Kondratyev A, Gale K. Antiepileptic drug-induced neuronal cell death in the immature brain: effects of carbamazepine, topiramate, and levetiracetam as monotherapy versus polytherapy. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. 2007;323:165-73.
  76. Brown L, Gutherz S, Kulick C, Soper C, Kondratyev A, Forcelli PA. Profile of retigabine-induced neuronal apoptosis in the developing rat brain. *Epilepsia*. 2016;57:660-70.
  77. Gaskin PL, Toledo-Rodriguez M, Alexander SP, Fone KC. Down-regulation of hippocampal genes regulating dopaminergic, GABAergic, and glutamatergic function following combined neonatal phencyclidine and post-weaning social isolation of rats as a neurodevelopmental model for schizophrenia. *Internal Journal of Neuropsychopharmacology*. 2016;19:62.
  78. Bruchhage M, Bucci M, Becker E. Cerebellar involvement in autism and ADHD. *Handbook of Clinical Neurology*. 2018;155:61-72.

79. Bath KG, Scharfman HE. Impact of early life exposure to antiepileptic drugs on neurobehavioral outcomes based on laboratory animal and clinical research. *Epilepsy*. 2013;26:427-39.
80. Watson RE, DeSesso JM, Hurtt ME, Cappon D. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Research*. 2006;77:471-84.
81. Lackey EP, Heck D, Sillitoe R. Recent advances in understanding the mechanisms of cerebellar granule cell development and function and their contribution to behavior. *F1000Research*. 2018;26:7.

