



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANATOMİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE İNDÜKLENEN OTİZM
MODELİNDE CEREBELLUM MORFOLOJİSİNİN
STEREOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

MELTEM ALPAY

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. FERRUH YÜCEL

Eskişehir

2021



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANATOMİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE İNDÜKLENEN OTİZM
MODELİNDE CEREBELLUM MORFOLOJİSİNİN
STEREOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

MELTEM ALPAY

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. FERRUH YÜCEL

Eskişehir

2021

TEŞEKKÜR SAYFASI

Bu tez çalışmasının planlanması ve gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, ortaya çıkan aksaklıkları gidermemde yardımcı olan, her türlü desteğini benden esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Ferruh YÜCEL'e, tezimin geliştirilmesinde ve deneyimi gerçekleştirebilmem için gerekli bilgiyi, beceriyi kazanmamda bana büyük katkı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Emel ULUPINAR'a sabır ve ilgileri için şükranlarımı sunarım. Tezimin deney aşamasında yaptığı katkılardan ve desteğinden ötürü sayın Dr. Öğr. Üyesi Bengi YEGİN'e teşekkür ederim. Yine kıymetli zamanlarını ayırıp çalışmamıza katkıları dokunan başta ESOGÜ Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Bölüm Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN olmak üzere tüm Anatomi Anabilim Dalı ailesine teşekkür ederim. Ayrıca Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Anabilim Dalı Bölüm Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Ali ZEYBEK ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Mazhar ÖZKAN'a doktora tez çalışmamı gerçekleştirebilmem için yarattıkları zaman, verdikleri destek ve gösterdikleri sabra teşekkürü bir borç bilirim.

Ve son olarak beni bilim insanı olma yönünde cesaretlendiren ve attığım her adımda yanımda olduklarını hissettiren bu hayattaki en büyük şansım olan, doğduğumda sahip olduğum ve sonradan edindiğim tüm aile bireylerime sonsuz teşekkürler.

Meltem ALPAY

ÖZET

SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE İNDÜKLENEN OTİZM MODELİNDE CEREBELLUM MORFOLOJİSİNİN STEREOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Amaç: Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal etkileşim, sözlü ve sözlü olmayan iletişim eksiklikleri, sınırlı ilgi alanları ve tekrarlayan davranışlarda meydana gelen bozulma ile ilgili cerebellum'u da etkileyen davranışsal bir sendromdur. Valproik asit (VPA) embriyonal gelişim sırasında uygulandığında OSB'ye neden olan teratojen bir maddedir. Bu çalışmada, embriyonal ve postnatal dönemlerde uygulanan VPA'nın sıçanların cerebellum'u üzerindeki histopatolojik etkilerinin stereolojik metotlarla kantitatif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Kapsam: Bu çalışma son dönemde deneysel olarak geliştirilmiş olan VPA ile indüklenen otizm modeli kullanılarak otizmin cerebellum üzerindeki etkilerinin araştırılmasını içermektedir.

Yöntem: Çalışmamızda iki kontrol [embriyonal 11. günde serum fizyolojik uygulanmış sıçanlar (K1), hem embriyonal 15. günde hem de postnatal 11. günde serum fizyolojik uygulanmış sıçanlar (K2)] ve iki deney [(embriyonal 11. günde VPA uygulanmış sıçanlar (D1), hem embriyonal 15. günde hem de postnatal 11. günde VPA uygulanmış sıçanlar (D2)] olmak üzere toplam dört erkek sıçan grubu oluşturulmuştur. Enjeksiyonlar intraperitoneal olarak gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar postnatal 30. günde anestezi altında, kardiyak perfüzyon sonrasında cerebellum'ları alınmıştır. VPA'nın cerebellum'daki etkisini ortaya çıkarmak için, ışık ve elektron mikroskop görüntüleri üzerinde farklı parametreler uygun stereolojik metotlarla araştırılmıştır.

Bulgular: VPA verilen sıçanlarda beyin ağırlığı, cerebellum ağırlığı, cerebellar substantia alba / cortex cerebelli hacim oranı, granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranı ve granül hücresi nükleusları / granüler tabaka hacim oranı kontrol yaşlılarına göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Buna karşın, Purkinje hücresi ve granül hücresi numerik densiteleri ve bu nöronların ortalama nükleus çapları kontrol yaşlılarına göre anlamlı derecede değişmiştir. Buna göre; deney grubu sıçanlarda Purkinje hücresi numerik densitesi, Purkinje

hücre hattında birim uzunluğa düşen Purkinje hücre sayısı ile birlikte azalırken; granül hücresi numerik densitesi artış göstermiştir. Diğer taraftan, granül hücresi ortalama nükleus çapı her iki deney grubunda, Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı ise D2 grubunda azalmıştır. Bu iki parametreden yola çıkarak hesaplanan Granül hücresi / Purkinje hücresi (G/P) oranı deney grubu sıçanlarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Deney grubu sıçanların cerebellum'larının granüler tabakasındaki sinapsların numerik densiteleri ve ortalama sinaptik disk çapları kontrol yaşlılarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. İnternöronal konnektiviteyi gösteren bir parametre olan sinaps/nöron oranı da deney grubu sıçanlarda kontrol yaşlılarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda VPA'nın sıçan cerebellum'unda meydana getirdiği hasarın cerebellar fonksiyon, dolayısıyla beyin fonksiyonu açısından bir kayba neden olacağı ve bu veriler ışığında otizmde cerebellum'un rolünün tahmin edilenden daha fazla olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Otizm, valproik asit (VPA), cerebellum, stereoloji

SUMMARY

STEREOLOGICAL INVESTIGATION OF CEREBELLUM MORPHOLOGY IN AUTISM MODEL INDUCED BY VALPROIC ACID IN RATS

Aim: Autism spectrum disorder (ASD) is a behavioral syndrome that also affects the cerebellum, which is related to social interaction, verbal and non-verbal communication deficiencies, limited interests, and impairment in repetitive behaviors. Valproic acid (VPA) is a teratogenic substance that causes ASD when applied during embryonal development. This study, it was aimed to quantitatively investigate the histopathological effects of embryonal VPA administered and postnatal periods on the cerebellum of rats by stereological methods.

Content: This study includes the investigation of the effects of autism on the cerebellum using the VPA-induced model of autism, which has been experimentally developed recently.

Method: In our study, a total of four male rats groups, two control [rats treated with saline on embryonal day 11th (K1), rats treated with saline on both embryonal days 15th and postnatal day 11th (K2)] and two experiments [rats treated with VPA on embryonal 11th day (D1), rats treated with VPA on both embryonal days 15th and the postnatal 11th (D2)], were formed. Injections were applied intraperitoneally. The cerebellum of the rats was removed under anesthesia on the postnatal 30th day, after cardiac perfusion. To revealed the effect of VPA on the cerebellum, different parameters were investigated on light and electron microscope images with appropriate stereological methods.

Result: There was no significant difference in brain weight, cerebellum weight, cerebellar substantia alba / cortex cerebelli volume ratio, granular layer / cortex cerebelli volume ratio, and granule cell nuclei / granular layer volume ratio in VPA-treated rats compared to age matched controls. Otherwise, the Purkinje cell and granule cell numerical density and the mean nucleus diameters of these neurons differed significantly compared to their age-matched controls. Hereunder: while the Purkinje cell numerical density in the

experimental group rats decreased with the Purkinje cell number per unit length in the Purkinje cell line, granule cell numerical density increased. On the other hand, the mean nucleus diameter of granule cell decreased in both experimental groups, while Purkinje cell mean nucleus diameter decreased in the D2 group. Granule cell / Purkinje cell (G / P) ratio calculated based on these two parameters increased statistically significantly in experimental group rats compared to controls. The numerical density and mean synaptic disc diameters of the synapses in the cerebellar granular layer of the experimental group rats decreased statistically significantly compared to their age-matched controls. Synapse/neuron ratio, which is a parameter that shows interneuronal connectivity, was statistically significantly decreased in experimental group rats compared to their age-matched controls.

Conclusion: In our study, it is thought that the damage caused by VPA in the rat cerebellum causes a loss in terms of cerebellar function, hence brain function, and in light of this data, the cerebellum's role in autism may be more than expected.

Key words: Autism, valproic acid (VPA), cerebellum, stereology

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Otizm.....	3
2.1.1. <i>Otizm nedir?</i>	3
2.1.2. <i>Otizmin prevalansı</i>	3
2.1.3. <i>Otizme neden olan etmenler</i>	4
2.1.4. <i>Otizmin tedavisi</i>	6
2.2. Valproik Asit	6
2.3. Cerebellum	8
2.3.1. <i>Cerebellum embriyolojisi</i>	8
2.3.2. <i>Cerebellum anatomisi</i>	9
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	27
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney İçin Hazırlanması	27
3.2. Deney Esnasında Kullanılan Diğer Kimyasalların Hazırlanması.....	27
3.2.1. <i>Valproik asit</i>	27
3.2.2. <i>Anestezikler</i>	28
3.2.3. <i>Deney gruplarına SF ve VPA enjeksiyonu</i>	28
3.3. Fiksatif ve Boyaların Hazırlanması	29
3.3.1. <i>Primer fiksatifin hazırlanması</i>	29
3.3.2. <i>Sekonder fiksatifin hazırlanması</i>	29
3.3.3. <i>Bloklama solüsyonunun hazırlanması</i>	29
3.3.4. <i>Toluidin blue hazırlanması</i>	30
3.3.5. <i>Uranil asetat boyasının hazırlanması</i>	30
3.3.6. <i>Kurşun sitrat boyasının hazırlanması</i>	30

3.4.	Cerrahi İşlemler	30
3.5.	Elektron Mikroskop Doku Takip Prosedürü	32
3.5.1.	<i>Dokuların küçültülmesi</i>	32
3.5.2.	<i>Dokuların yıkanması</i>	33
3.5.3.	<i>Osmium tetroksit (OsO₄) fiksasyonu</i>	33
3.5.4.	<i>Dehidratasyon</i>	33
3.5.5.	<i>Şeffaflaştırma</i>	33
3.5.6.	<i>Resin- propilen oksit uygulaması</i>	33
3.5.7.	<i>Bloklama</i>	33
3.5.8.	<i>Etiketleme</i>	33
3.5.9.	<i>Yarı ince kesitlerin hazırlanması</i>	34
3.5.10.	<i>Elektron mikroskopu için ultra-ince kesitlerin alınması</i>	34
3.6.	Morfometrik Analizler	35
3.6.1.	<i>Vücut ağırlıklarının ölçülmesi</i>	35
3.6.2.	<i>Beyin ağırlıklarının ölçülmesi</i>	36
3.6.3.	<i>Cerebellum ağırlıklarının ölçülmesi</i>	36
3.6.4.	<i>Cerebellar substantia alba / cortex cerebelli hacim oranının (V_v) hesaplanması</i>	36
3.6.5.	<i>Cerebellar granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranının (V_v) hesaplanması</i>	37
3.6.6.	<i>Granül hücresi nükleusları / granüler tabaka hacim oranının (V_v) hesaplanması</i>	37
3.6.7.	<i>Granül hücresi ortalama nükleus çapının hesaplanması</i>	38
3.6.8.	<i>Granül hücresi numerik densitesinin (N_{vg}) hesaplanması</i>	39
3.6.9.	<i>Purkinje hücresi ortalama nükleus çapının hesaplanması</i>	40

3.6.10.	<i>Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısının (N_{BP}) hesaplanması.....</i>	41
3.6.11.	<i>Purkinje hücresi numerik densitesinin (N_{VP}) hesaplanması.....</i>	42
3.6.12.	<i>Granül hücresi / Purkinje hücresi oranının hesaplanması.....</i>	42
3.6.13.	<i>Birim alana düşen sinaps sayısının (N_{AS}) hesaplanması</i>	42
3.6.14.	<i>Sinaptik disklerin görüntüye düşen ortalama yükseklik değerlerinin (nm) hesaplanması</i>	43
3.6.15.	<i>Sinapsların numerik densitesinin (N_{VS}) hesaplanması.....</i>	43
3.6.16.	<i>Sinaps/nöron oranı (granüler tabakaya göre N_{VS} / granüler tabakaya göre N_{Vg})</i>	44
3.7.	İstatistiksel Analiz	44
4.	BULGULAR	45
4.1.	Ortalama Vücut Ağırlığı	45
4.2.	Ortalama Beyin Ağırlığı	46
4.3.	Ortalama Cerebellum Ağırlığı.....	46
4.4.	Cerebellar Substantia alba / Cortex cerebelli Hacim Oranı (V_V)	55
4.5.	Cerebellar Granüler Tabaka / Cortex cerebelli Hacim Oranı (V_V).....	56
4.6.	Granül Hücresi Nükleusları / Granüler Tabaka Oranı (V_V)	56
4.7.	Granül Hücresi Ortalama Nükleus Çapı (μm).....	57
4.8.	Granül Hücresi Numerik Densitesi (N_{Vg} , mm^{-3}).....	58
4.8.1.	<i>Granüler tabakaya göre.....</i>	58
4.8.2.	<i>Cortex cerebelli'ye göre</i>	59
4.9.	Purkinje Hücresi Ortalama Nükleus Çapı (μm).....	60
4.10.	Purkinje Hücre Hattında Birim Uzunluğa Düşen Ortalama Purkinje Hücre Sayısı (N_{BP})	61
4.11.	Purkinje Hücresi Numerik Densitesi (N_{VP} , mm^{-3}).....	62
4.12.	Granül Hücresi / Purkinje Hücresi Oranı	63

4.13.	Ortalama Sinaptik Disk Çapı (nm).....	64
4.14.	Sinapsların Numerik Densitesi (N_{Vs} , mm^{-3})	65
4.14.1.	<i>Nöropil alanına göre</i>	65
4.14.2.	<i>Granüler tabakaya göre</i>	66
4.15.	Sinaps/Nöron oranı (Granüler tabakaya göre N_{Vs} /Granüler tabakaya göre N_{Vg})	67
5.	TARTIŞMA	69
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	79
	KAYNAKLAR DİZİNİ	81

TABLO DİZİNİ

Tablo 4.1. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama vücut ağırlıkları (g).....	45
Tablo 4.2. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama beyin ağırlığı (mg).....	46
Tablo 4.3. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama cerebellum ağırlıkları (mg).....	46
Tablo 4.4. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait cerebellar substantia alba / cortex cerebelli oranı.....	56
Tablo 4.5. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait cerebellar granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranı.....	56
Tablo 4.6. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granül hücresi nükleusları / granüler tabaka hacim oranı	57
Tablo 4.7. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granül hücresi ortalama nükleus çapı (µm)	57
Tablo 4.8. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi (mm ⁻³)	59
Tablo 4.9. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait cortex cerebelli'ye göre granül hücresi numerik densitesi (mm ⁻³)	60
Tablo 4.10. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı (µm)	61
Tablo 4.11. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı.....	62
Tablo 4.12. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücresi numerik densitesi (mm ⁻³)	63
Tablo 4.13. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granül hücresi / Purkinje hücresi oranı ..	64
Tablo 4.14. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama sinaptik disk çapı (nm)	65
Tablo 4.15. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait nöropil alanına göre sinapsların numerik densitesi (mm ⁻³)	66
Tablo 4.16. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi (mm ⁻³)	67
Tablo 4.17. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait sinaps/nöron oranı	68

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Cerebellum embriyolojisi	8
Şekil 2.2. Cerebellum'un yerleşimi	10
Şekil 2.3. Cerebellar loblar ve fissura'ların terminolojisi	11
Şekil 2.4. Cerebellum filogenetik bölümleri ve nuclei cerebelli	13
Şekil 2.5. Cortex cerebelli'nin genel organizasyonu	15
Şekil 2.6. Pedunculi cerebellares	20
Şekil 2.7. Cerebellum'un beslenmesi	22
Şekil 2.8. Cerebellum'un iç bağlantılarının şematik gösterimi	25
Şekil 3.1. E15. günde sıçan enjeksiyonu	28
Şekil 3.2. Postnatal 11. günde yavru sıçanlar	29
Şekil 3.3. Cerrahi işlemler	31
Şekil 3.4. Cerebellum'un beyinle birlikte kafatasından çıkarılması.....	32
Şekil 3.5. Yarı ince kesitlerin alınmasında kullanılan Leica EM UC7 model ultramikrotom.....	34
Şekil 3.6. Elektron mikroskop boyama prosedürü	35
Şekil 3.7. Hayvan tartımı.....	35
Şekil 3.8. Beyin ağırlığı tartımı	36
Şekil 3.9. Cerebellar substantia alba / cortex cerebelli oranı (V_V)	37
Şekil 3.10. Granül hücresi nükleusları / granüler tabaka oranı (V_V).....	38
Şekil 3.11. Granül hücresi ortalama nükleus çapı hesabı	39
Şekil 3.12. Sayımlarda kullanılan tarafsız sayım çerçevesi.....	40
Şekil 3.13. Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı hesaplanması	41
Şekil 3.14. Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı (N_{BP})	41
Şekil 3.15. Birim alana düşen sinaps sayısının hesaplanması	42
Şekil 4.1. Kontrol ve deney grubu sıçanlarına ait vücut ağırlığı (g) grafiği	45
Şekil 4.2. Kontrol grubu 1'e ait yavru sıçanların cerebellum'larının farklı büyütmelerdeki yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri	48
Şekil 4.3. Kontrol grubu 1'e ait TEM görüntüsü.....	49

Şekil 4.4. Deney grubu 1'e ait yavru sıçanların cerebellum'larının farklı büyültmelerdeki yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri	50
Şekil 4.5. Deney grubu 1'e ait TEM görüntüsü.....	51
Şekil 4.6. Kontrol grubu 2'ye ait yavru sıçanların cerebellum'larının farklı büyültmelerdeki yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri	52
Şekil 4.7. Kontrol grubu 2'ye ait TEM görüntüsü.....	53
Şekil 4.8. Deney grubu 2'ye ait yavru sıçanların cerebellum'larının farklı büyültmelerdeki yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri	54
Şekil 4.9. Deney grubu 2'ye ait TEM görüntüsü.....	55
Şekil 4.10. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granül hücresi ortalama nükleus çapı (μm) grafiği	58
Şekil 4.11. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi (mm^{-3}) grafiği.....	59
Şekil 4.12. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi (mm^{-3}) grafiği.....	60
Şekil 4.13. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı (μm) grafiği	61
Şekil 4.14. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı grafiği	62
Şekil 4.15. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücresi numerik densitesi (mm^{-3}) grafiği	63
Şekil 4.16. Deney ve Kontrol grubu sıçanlara ait granül hücresi / Purkinje hücresi oranı grafiği	64
Şekil 4.17. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama sinaptik disk çapı (nm) grafiği .	65
Şekil 4.18. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait nöropil alana göre sinapsların densitesi (mm^{-3}) grafiği	66
Şekil 4.19. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi (mm^{-3}) grafiği.....	67
Şekil 4.20. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama sinaps/nöron oranı grafiği	68

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

VPA	:	Valproik asit
E	:	Embriyonal
PN	:	Postnatal
OSB	:	Otizm spektrum bozukluğu
SF	:	Serum fizyolojik
K1	:	Kontrol grubu 1, Embriyonal 15. günde tek doz serum fizyolojik verilen sıçanlar
K2	:	Kontrol grubu 2, Hem embriyonal 15. günde hem de postnatal 11. günde tek doz serum fizyolojik verilen sıçanlar
D1	:	Deney grubu 1, Embriyonal 15. günde tek doz valproik asit verilen sıçanlar
D2	:	Deney grubu 2, Hem embriyonal 15. günde hem de postnatal 11. günde tek doz valproik asit verilen sıçanlar
fMRI	:	Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme
DSM-V	:	Amerikan Psikiyatri Birliği Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı V
Nuc., nuc.	:	Nucleus
Tract., tract.	:	Tractus
N., n.	:	Nervus
A., a.	:	Arteria
PICA	:	Arteria cerebelli posterior inferior
AICA	:	Arteria cerebelli anterior inferior
SCA	:	Arteria. cerebelli superior
GABA	:	Gama aminobütirik asit

HADYEK	:	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
UNESCO	:	Birleşmiş Milletler Eğitim, Bilim ve Kültür Örgütü
TİCAM	:	Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
PBS	:	Phosphate buffer saline
NaOH	:	Sodyum hidroksit
Kg	:	Kilogram
g	:	Gram
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
μm	:	Mikronmetre
nm	:	Nanometre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöronlarda meydana gelen morfolojik ve yapısal değişiklikler genellikle beyindeki patolojik durumlarla ilişkilidir. Bu değişiklikler otizm spektrum bozukluğunun da dahil olduğu nörogelişimsel kusurlarda farklı düzeylerde gözlenen nöroanatomik anomalilere yol açmaktadır (Rapin & Katzman, 1998).

İnsanda OSB'ye neden olan birçok teratojen vardır (Dietert, Dietert, & DeWitt, 2011; Strömland, Nordin, Miller, Akerström, & Gillberg, 1994). Bunlardan biri de valproik asit (VPA)'tir. VPA'nın gebelikte kullanılması fetal valproat sendromu denilen fetüste tipik yüz görünümü (epikantus, basık burun kökü, üst dudak dermo-mukozal sınırında incelme vb.), önemli veya hafif malformasyonlar ve nöromotor gelişme geriliği ile beliren nöral tüp defektleri, ekstremitte defektleri, kalp ile ilgili anomaliler ve ürogenital sistem anomalilerinin de sıklıkla eşlik ettiği bir bozukluğa neden olur (Arndt, Stodgell, & Rodier, 2005; Kayaalp, 2009).

VPA; insanlarda nöral tüpün kapandığı kritik dönemde uygulandığında OSB'ye neden olur. Bu özelliği nedeniyle OSB'nin hayvan modelinin oluşturulmasında sıklıkla kullanılan bir madde halini almıştır. Oluşturulan deney modelleri üzerinden yapılan çalışmalarda, cerebrum'da kütlece azalma, prefrontal kortekste nöron sayısında anormal artma, amygdala'da nöron sayısında azalma, hippocampus'a ait nöron sayısında azalma, cerebellum'da ise Purkinje hücre sayısında azalma gibi veriler elde edildiği bildirilmiştir (Arndt vd., 2005; Avino vd., 2018; Courchesne vd., 2011; Ergaz, Weinstein-Fudim, & Ornoy, 2016; K. C. Kim vd., 2011). Beyindeki bu nöromorfolojik değişikliklerin ne kadar kalıcı olduğu ve bu tür değişikliklerin geri dönüşümlü olup olmadığı konusunda tartışmalar hala devam etmektedir (El Falougy, Filova, Ostatnikova, Bacova, & Bakos, 2019).

Nöromotor sistemin elemanlarından biri olan cerebellum istemli hareketler ve postürün ayarlanmasında önemli rol oynar. Şuuraltı istemli kasların kontraksiyonları üzerinde etkili olur ve antagonistlerinin gevşemesi ile birlikte hareketleri dikkatle koordine eder (Taner, Atasever, & Durgun, 2010).

Cerebellum'un bu özellikleri dışında son zamanlarda yapılan çalışmalar da motor dışı kritik fonksiyonlara da sahip olduğu ortaya konulmuştur. OSB, bilişsel duygusal sendrom, şizofreni gibi zihinsel bozukluklarda ve bağımlılık davranışlarında cerebellar

disfonksiyon görülmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) çalışmaları, bağımlılık (Miquel, Toledo, García, Coria-Avila, & Manzo, 2009; Moulton, Elman, Becerra, Goldstein, & Borsook, 2014; Volkow vd., 2003), sosyal biliş (Van Overwalle, Baetens, Mariën, & Vandekerckhove, 2014) ve hatta duygusal işleme (Schmahmann & Caplan, 2006) ile ilişkili güçlü cerebellar aktivasyonların olduğunu göstermektedir (Carta, Chen, Schott, Dorizan, & Khodakhah, 2019). Yine VPA uygulanıp OSB modeli oluşturulan hayvanların cerebellum'larında cerebellar hemisferlerin boyutunda ve Purkinje hücre sayısında azalma olduğu bildirilmiştir (Altman, 1972; Ingram, Peckham, Tisdale, & Rodier, 2000; Markram, Rinaldi, La Mendola, Sandi, & Markram, 2008).

Cerebellum gelişimi insanlarda embriyonal (E) 3. haftada başlayıp, doğumdan sonra da devam eder (TW, 2011). Farelerde ise cerebellum gelişimi E7. gün ile postnatal (PN) 30. gün arasında 6 haftalık bir zaman diliminde gerçekleşir (Altman & Bayer, 1985). Cerebellum gelişimi esas olarak granül hücreleri üreten dış granüler tabaka ve Purkinje hücrelerini üreten ventriculus quartus'un ventriküler zonu olmak üzere iki germinal epitelin etkileşimiyle kontrol edilir (Voogd & Glickstein, 1998; Yuasa, Kawamura, Ono, Yamakuni, & Takahashi, 1991). Sıçan cerebellar korteksinde bu farklı nöron gruplarının oluşum zamanları büyük farklılık gösterir. Purkinje hücreleri ya da nuclei cerebelli gibi makronöronlar prenatal; granül, stellat ya da basket hücresi gibi mikronöronlar postnatal olarak gelişim gösterir. Purkinje hücrelerinin prenatal gelişimi E13-16. (E15. günde nörogenezi pik yapar) günler arasında tamamlanır. Granül hücrelerinin değişikliğe uğramaları ise postnatal 2.-3. hafta (10-11. günler arasında en fazla) arasında tamamlanmaktadır (Altman & Bayer, 1985, 1990)

Bu çalışmada, cerebellum gelişimi için kritik olan günlerde anne sıçanlara (prenatal) ve bunlardan doğan yavru sıçanlara (postnatal) uygulanan VPA'nın yavru sıçanların cerebellum'u üzerindeki histopatolojik etkilerinin stereolojik metodlarla kantitatif olarak araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilecek verilerin, merkezi sinir sisteminde, nöronal dejenerasyona yol açan hastalıkların etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve tedavisi için geliştirilebilecek yöntemlere katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Otizm

2.1.1. Otizm nedir?

Otizm spektrum bozukluğu, 3 yaşına kadar olan, sosyal etkileşimde, sözlü ve sözlü olmayan iletişim eksikliklerinde, sınırlı ilgi alanlarında ve tekrarlayan davranışlarda görülen bozulma ile ilgili davranışsal bir sendromdur (Brambilla vd., 2003; Rapin, 1999; Rapin & Katzman, 1998). Amerikan Psikiyatri Birliği Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı V (DSM-V)'e göre, OSB tanısında yaşamın erken dönemlerinden itibaren var olan, sosyal ve/veya mesleki ilişkilere önemli ölçüde müdahale eden iki ana klinik kriter (sosyal iletişim eksiklikleri ve tekrarlayan davranışlar) karşılaştırılır. Klinik özellikler ve bilişsel bozukluklar yaşam boyu devam eder ve hastaların çoğu zihinsel engellilik, epilepsi, motor ve duysal anomaliler ve / veya dikkat eksikliği / hiperaktiviteyi kapsayan bir veya daha fazla komorbiditeye sahip olabilir (Gillberg & Fernell, 2014; Minshew & Payton, 1988).

2.1.2. Otizmin prevalansı

Tüm otizm vakalarının sadece küçük bir yüzdesi (%1'den az) genetik olarak açıklanabilirken, vakaların %50'den fazlası için herhangi bir genetik neden yoktur (Heavner & Smith, 2020). Erkeklerde kızlara oranla daha fazla görülür (3-4 erkeğe 1 kız) (Rutherford vd., 2016). Ayrıca OSB fenotipi de etkilenen kişiler arasında farklılık gösterir (El Falougy vd., 2019). Hastalığın ilerlemesinin heterojenliği, semptomlarının ciddiyeti ve ilişkili olduğu çeşitli komorbid hastalıklar, otizmin değişken nöropatolojik alt yapılarının olduğu inancına yol açmaktadır (El Falougy vd., 2019).

OSB'nin yüksek prevalansına rağmen (Amerika'da 8 yaşındaki her 59 çocuktan birine teşhis konmaktadır (D. L. Christensen vd., 2018)), her bir gen tipik olarak az sayıda vakadan sorumludur. Bu nedenle OSB, farklı etiyojilere sahip birçok nadir bozukluğun klinik davranış fenotipini tanımlayan genel bir terimdir (Heavner & Smith, 2020).

Son yirmi yılda, OSB kapsamına giren koşullarda önemli gelişmeler gerçekleşmiştir (Heavner & Smith, 2020). Bu da OSB'nin prevalansını değiştirmiştir. OSB prevalansı 1980'lerde 10.000 çocukta 3,3 iken, 1996'da 1000 çocukta 3,4'e ve 2000'lerde 100 çocukta 1'e yükselmiştir (M. J. Taylor vd., 2020). Daha yeni çalışmalar %2'den fazla yaygınlık oranları bildirmektedir (Baio, 2014; K. C. Kim vd., 2011;

Schendel & Thorsteinsson, 2018). Ülkemizde ise bu oran 2006 yılında her 7/1000, 2008 yılında 11/1000, 2012 yılında 15/1000 ve 2014 yılında 22/1000 olarak bildirilmiştir. Sağlık bakanlığının 19.07.2019 tarihli ve 29542975-045.99-E.6 sayılı yazısına göre güncel veriler ışığında 38.661 otizmlili birey bulunmaktadır (Tohum Otizm Vakfı, 2020). Yine ülkemizde erkelerde 5 kat daha fazla görülmektedir (Doğangün, 2008).

Prevalanstaki bu artışa; tanısal artış, vaka kayıtlarının daha iyi tutulması, bozukluğun daha fazla tanınması gibi gelişmeler neden olmuş olabilir. Bununla birlikte, enfeksiyon ve bağışıklık gibi diğer faktörlerin yanı sıra çevresel toksik maddelere ve diğer çevresel faktörlere maruz kalma da yaygınlığın artmasında rol oynayabilir (Hallmayer vd., 2011).

2.1.3. Otizme neden olan etmenler

Otizm hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen nörobiyolojik bir bozukluktur. Ancak yapılan çalışmalar henüz bu iki faktör arasındaki bağlantıyı açıklayabilecek düzeye ulaşmamıştır.

Nöropatolojik çalışmalar yeterli olmamakla birlikte, prefrontal korteks'te nöron sayısında anormal artış (Courchesne vd., 2011) ve amygdala'da nöron sayısında azalma (Avino vd., 2018) gibi bulgular elde edilmiştir. Beyindeki bu nöromorfolojik değişikliklerin ne kadar kalıcı olduğu ve bu tür değişikliklerin geri dönüşümlü olup olmadığı konusunda tartışmalar hala devam etmektedir (El Falougy vd., 2019).

Genetik faktörler OSB yatkınlığına neden olur, OSB hastalarının kardeşleri popülasyon normlarına oranla daha yüksek tanı riski taşır ve monozigotik ikizlerde bu durum (kesin olmamakla birlikte) çok daha yüksektir (Ecker, Schmeisser, Loth, & Murphy, 2017; Hallmayer vd., 2011; H. Kim vd., 2019).

Genomik bağlantı çalışmaları ve tüm ekzon dizileme yöntemleri, OSB duyarlılık genlerine ilişkin anlayışı genişletmiştir. Bu genlerin işlevi hakkında daha fazla bilgi edinmek, potansiyel biyolojik mekanizmalara ışık tutabilir (Walsh, Morrow, & Rubenstein, 2008). OSB ile bağlantılı genetik kusurların çoğu, nöronal sinapslar ile ilgili olan veya nöronlardaki aktiviteye bağlı değişikliklere dahil olan proteinleri kodlar (H. Kim vd., 2019; Rubenstein & Merzenich, 2003; Walsh vd., 2008). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, OSB ile ilişkili, yeni potansiyel mekanizmaları ortaya çıkaran 16 yeni geni tanımlamaktadır (Ruzzo vd., 2019). Sonuç olarak, genetik olarak en heterojen

nöropsikiyatrik bozukluklardan biri olmaya devam etmektedir (Dias & Walsh, 2020; Ruzzo vd., 2019).

Genetik, OSB'nin etiyolojisinde açıkça bir rol oynasa da genetik yatkınlığın fenotipik ifadesi OSB içinde değişkenlik göstermeye devam etmektedir (Veenstra-VanderWeele, Christian, & Cook, 2004). Genetik risk, bazı hastalarda prenatal, perinatal ve postnatal çevresel faktörler tarafından değiştirilebilir (Guinchat vd., 2012; Hallmayer vd., 2011; Nicolini & Fahnstock, 2018; C. Wang, Geng, Liu, & Zhang, 2017). İleri yaşta anne ve baba olmanın da OSB'li çocuk sahibi olma riskinin arttığı gösterilmiştir (Croen, Najjar, Fireman, & Grether, 2007). Hamilelik sırasında maternal enfeksiyon veya immün aktivasyon da son araştırmalara göre potansiyel bir risk faktörü olabilir (Lee vd., 2015; Zerbo vd., 2015). Preterm bebeklerin, diğer nörogelişimsel bozukluklara ek olarak OSB için daha yüksek risk taşıdığı gösterilmiştir (Agrawal, Rao, Bulsara, & Patole, 2018).

Düşünülenin aksine aşılardan, timerosalin veya civanın OSB ile ilişkili olduğuna dair hiçbir kanıt yoktur (Modabbernia, Velthorst, & Reichenberg, 2017; L. E. Taylor, Swerdfeger, & Eslick, 2014). Bugüne kadarki en büyük çalışmada, Danimarka da çocuklar üzerinde yapılan bir grup çalışmasında kızamık, kabakulak ve kızamıkçık (MMR) aşılardan sonra risk artışı olmadığını bildirilmiştir (Hviid, Hansen, Frisch, & Melbye, 2019).

Maternal immün aktivasyon, maternal otoantikolar veya valproik asit ve pestisitler dahil olmak üzere belirli kimyasal maruziyetler gibi çeşitli çevresel faktörler de riske katkıda bulunmaktadır (Heavner & Smith, 2020). İkizler üzerinde yapılan çalışmalar genetik ve çevresel etkilerin büyüklüğünü karşılaştırmayı mümkün kılar. Zaman içinde çevresel değişiklikler bir özelliğin yaygınlığının değişiminden sorumluysa, çevresel çeşitliliğin zaman içinde artması beklenecektir. Altta yatan genetik çeşitlilik çok az değişiklik gösteriyor veya hiç değişiklik göstermiyorsa, yine bu özelliğin kalıtsallığının da azalması beklenecektir. Bilindiği kadarıyla, daha önceki ikiz çalışmalarında bunun OSB için doğru olup olmadığı araştırılmamıştır (Hallmayer vd., 2011; M. J. Taylor vd., 2020).

Nihayetinde, araştırmalar OSB riskiyle ilişkili faktörleri ortaya çıkarmaya devam etmektedir, ancak henüz nedensel bir belirleme yapılmamıştır. Bu durum, genetik risk taşıyan yeni varyantları veya daha fazla çalışma gerektiren yeni çevresel bağıntıların açıklanabilmesi için pek çok araştırma alanı sağlamaktadır (Ruzzo vd., 2019).

2.1.4. Otizmin tedavisi

Otizm günümüz şartlarında tedavi edilemeyen, hayat boyu devam eden bir bozukluktur. Ancak psikiyatrik ilaç tedavisi, glüten/kazein diyeti, ketojenik diyet, vitamin-mineral desteği, ağır metallere arındırma, mantar tedavisi, hiperbarik oksijen tedavisi, neuro-feedback, tedavi protokolleri olmak üzere alternatif destekleyici yöntemler uygulanmaktadır (Elder vd., 2006; Jepson vd., 2011; Kouijzer, van Schie, de Moor, Gerrits, & Buitelaar, 2010; Napoli, Dueñas, & Giulivi, 2014; Richler vd., 2006). Yine erken tanı ile uygun bir eğitime başlanması adaptasyon yeteneklerini artırabilir. Otistik çocuklarda çeşitli bilişsel ve davranış terapilerinin yanı sıra, öğrenme, dil ve konuşma sorunlarına yönelik tedaviler uygulanır; alternatif tedavilerin bilimsel açıdan etkinlikleri oldukça tartışmalıdır (Korkmaz, 2010).

Risperidon, aripiprazol ve olanzapin otizmlili çocuklarda ve ergenlerde saldırganlık, kendine zarar verme ve öfke nöbetleri dahil olmak üzere sinirlilik ve ajitasyonu tedavi etmek için kullanılmaktadır (Hesapcioglu, Ceylan, Kasak, & Sen, 2020; McCracken vd., 2002; McPheeters vd., 2011; Nicolson, Awad, & Sloman, 1998; Owen vd., 2009)

2.2. Valproik Asit

Valproik asit veya 2-propilpentanoik asit, bir antiepileptik ilaç (Löscher, 2002) kanser ve duygu durum dengeleyici olarak yaygın şekilde kullanılan kısa zincirli bir yağ asididir (Emrich, Zerssen, Kissling, Möller, & Windorfer, 1980; Lambert, Carraz, Borselli, & Bouchardy, 1975). Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser tedavisi için umut verici bir ajan olduğu bildirilmiştir (Terbach & Williams, 2009). VPA, nörotransmisyonu modüle eder (Gobbi & Janiri, 2006; Johannessen & Johannessen, 2003; Löscher, 1999; Owens & Nemeroff, 2003) ve histon deasetilaz (HDAC) aktivitesinin inhibisyonuyla (epigenetik) kromatini yeniden biçimlendirerek gen ekspresyonunu düzenler (Phiel vd., 2001). VPA ayrıca gamma aminobütirik asit (GABA) bozunmasına katılan enzimleri inhibe ederek GABA sinyalini kuvvetlendirir (Löscher, 2002).

VPA güçlü bir teratojendir. Birçok raporda, hamileliğin ilk üç ayında VPA maruziyetinin nöral tüp defektlerine ve atrial septal defekt, yarık damak, hipospadias, polidaktili ve kraniyosinoz gibi diğer konjenital malformasyon oluşum riskini arttırdığı bildirilmiştir (Jentink vd., 2010; Nau, Hauck, & Ehlers, 1991). Ayrıca, embriyonal dönemde VPA'ya maruz kalma, artan bilişsel işlev bozukluğu riski ile ilişkilidir. Meador

ve arkadaşları (2009) Amerika Birleşik Devletleri ve Birleşik Krallık'ta VPA monoterapisine maruz kalan kadınların çocuklarının, diğer yaygın antiepileptik ilaçlara maruz kalan çocuklara kıyasla üç yaşında entelektüel zeka (IQ) puanlarının daha düşük olduğunu bulmuşlardır (Meador vd., 2009). Benzer sonuçlar Eriksson ve ark. (2005) ve Nadebaum ve ark. (2011) tarafından da bildirilmiştir (Nadebaum vd., 2011). Meador ve ark. (2011), uterin dönemde VPA'ya maruz kalmanın, üç yaşında değerlendirilen hem sözel hem de sözel olmayan yetenekler üzerinde zararlı etkileri olduğunu gösterirken, Nadebaum ve ark. (2011) ayrıca, prenatal dönemde VPA'ya maruz kalan okul çağındaki çocuklarda sözel entelektüel yetenekleri olumsuz yönde etkilediğini bulmuştur (Rebecca L. Bromley vd., 2010; Cummings, Stewart, Stevenson, Morrow, & Nelson, 2011; Meador vd., 2011; Nadebaum vd., 2011; Nicolini & Fahnestock, 2018; Shallcross vd., 2011)

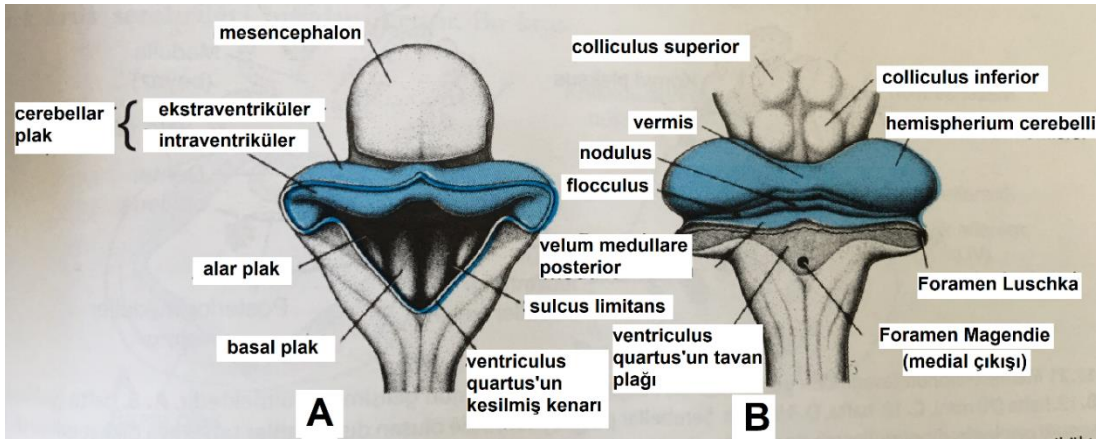
VPA ayrıca otizm için bir risk faktörüdür. Gebeliğin ilk üç ayında VPA'ya maruz kalma, başlangıçta, VPA'nın neden olduğu embriofetopatinin fetal valproat sendromu (FVS) olan çocuklarda yüksek otistik semptom insidansını gösteren çalışmalara ilişkilendirilmiştir (Clayton-Smith & Donnai, 1995; DiLiberti, Farndon, Dennis, & Curry, 1984). FVS hastalarının otizm ile uyumlu kraniyofasiyal anomaliler, organ malformasyonları, nörogelişimsel gecikme ve sosyal işlevsel eksiklikler gösterdiği bildirilmiştir (Christianson, Chester, & Kromberg, 1994; P. G. Williams & Hersh, 1997; G. Williams vd., 2001). İntrauterin dönem VPA maruziyeti ile otizm arasındaki ilişki daha geniş çaplı çalışmalarla doğrulanmıştır (Rebecca L. Bromley, Mawer, Clayton-Smith, & Baker, 2008; Dean vd., 2002; S. Moore vd., 2000; Rasalam vd., 2005); çalışılan çocukların %8,9'u VPA otizm veya Asperger sendromuna maruz kalmıştır (Rasalam vd., 2005). Daha yakın zamanlarda, iki çalışma doğum öncesi valproat maruziyetinin otizm riski artışıyla ilişkili olduğunu kanıtlamıştır. Danimarka'da yapılmış geniş bir popülasyon çalışması, hamilelik sırasında VPA'nın maternal kullanımının yavrularda OSB riskini önemli ölçüde arttırdığını (%4,42) göstermiştir (J. Christensen vd., 2013). On bir yıllık prospektif bir çalışma, VPA monoterapisine doğum öncesi maruz kalan çocuklarda nörogelişimsel bozuklukların prevalansında 6 kat, VPA politerapisine maruz kalanlarda 10 kat artış olduğunu ve OSB'nin 6 yaşında her iki grupta en sık görülen nörogelişimsel bozukluk olduğunu bildirmiştir (Rebecca Louise Bromley vd., 2013; Nicolini & Fahnestock, 2018).

Klinik çalışmalarda, insanlarda hamilelik sırasında VPA tüketimi neticesinde görülen otizmde dahil olduğu riskler (Rebecca L. Bromley vd., 2008; Meador vd., 2009;

Nadebaum vd., 2011; Nau vd., 1991; Ornoy, 2009; Rasalam vd., 2005; Shallcross vd., 2011) benzer şekilde, doğum öncesi VPA'ya maruz kalan kemirgenlerde de görülmüştür. Bu nedenle, kemirgenlerde VPA ile yapılan maternal model, otistik davranışların altında yatan nörobiyoloji anlayışını arttırmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Diğer hayvan modelleri gibi, VPA'ya maruz kalan kemirgenler insan otizmini tamamen kopyalamazlar, ancak yine de etiyojisini, biyolojisini, maternal etkilerini ve çevresel faktörlerini ve ayrıca temel işaretlerini iyileştirmeyi hedefleyen tedavileri araştırmak için mükemmel bir araçtır (Nicolini & Fahnstock, 2018).

2.3. Cerebellum

2.3.1. Cerebellum embriyolojisi



Şekil 2.1. Cerebellum embriyolojisi

A, 8 haftalık ve B, 16 haftalık bir embriyoda truncus encephali'nin posterior görünümü (4. ventrikül tabanının görülebilmesi için kaldırılmıştır) (TW, 2011)

Merkezi sinir sisteminin bir elemanı olan cerebellum, embriyonal hayatın 3. haftasında gelişmeye başlar. Diencephalon'un lateral duvarını oluşturan alar plakların postero-lateral parçaları içe doğru kıvrılarak ventriculus quartus'un içine uzanan rombik dudakları oluşturur. Rombik dudaklar, mesencephalon'un altından itibaren orta hatta birbirlerine yaklaşırlar. Pontin fleksur derinleştikçe, bu dudaklar cephalocaudal yönde sıkışarak cerebellar plağı oluştururlar. Sonraki aşamada, cerebellum'da ekstroversiyon meydana gelir, intraventriküler çıkıntısı azalır ve dorsal ekstraventriküler çıkıntısı artar (Şekil 2.1). Embriyonal hayatın 12. haftasında, bu plağın orta hattında vermis ve bunun iki yanında hemisferler yer alır. Kısa süre sonra ortaya çıkan horizontal bir fissür nodulus'u vermis'ten ve flocculus'ları da hemisferlerden ayırır. Böylece cerebellum'un en ilkel parçası olan lobus flocculonodularis (archicerebellum) ortaya çıkar. Sonrasında

ise sırasıyla paleocerebellum ve neocerebellum kısımları gelişir (Standring, 2016; TW, 2011).

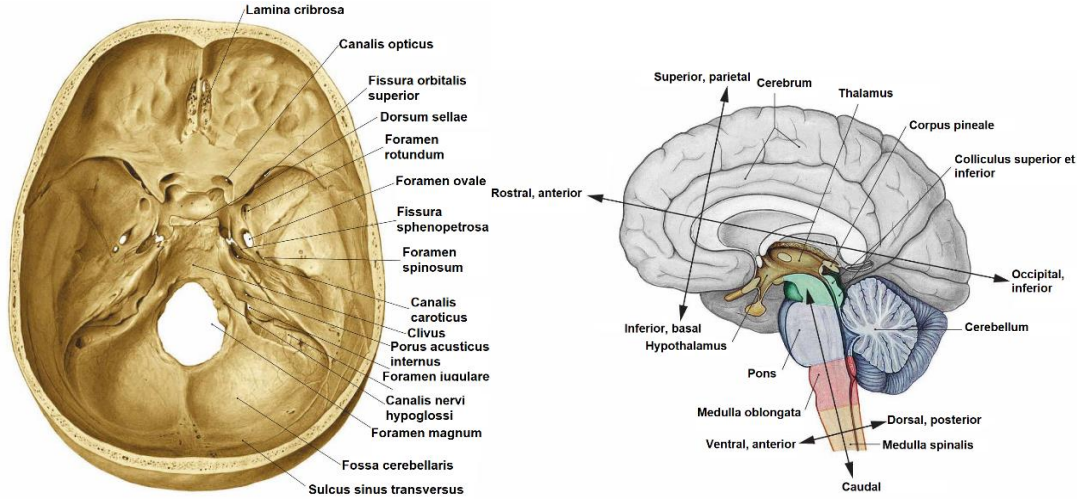
Başlangıçta cerebellar plağın muhteviyatını nöroepitelyal, manto ve marjinal tabakalar oluşturur. Alar plak'taki nöroblastlardan bazıları marjinal tabakaya göç edip cortex cerebri nöronlarına farklılaşırlar. Cerebellum gelişimi devam ettikçe nöroepitelyal tabakada yer alan bazı hücreler granüler tabakayı oluşturmak üzere yüzeye doğru göç ederler. Bu hücreler bölünme yeteneklerini kaybetmeyerek cerebellum yüzeyinde proliferatif bir bölge oluştururlar (K. Moore & Persaud, 2009; TW, 2011).

Embriyonal hayatın 6. ayında granüler tabakada farklı hücre tipleri ortaya çıkmaya başlar. Bu hücreler Purkinje hücre tabakasına doğru göç ederler, cerebellar substantia alba'da basket, granül ve stellat hücrelerini oluştururlar. Bu hücreler mikronöron olarak adlandırılır ve gelişimleri postnatal dönemde tamamlanır. Makro nöron adını verdiğimiz Purkinje hücreleri, tip II golgi hücreleri ve alar plaktaki diğer nöroblastlar tarafından oluşturulan nucleus (nuc.) dentatus gibi derin yerleşimli yapılar son şekillerini doğumdan önce alırlar (Altman & Bayer, 1985; K. Moore & Persaud, 2009; TW, 2011).

2.3.2. Cerebellum anatomisi

2.3.2.1. Cerebellum'un genel yapısı ve fonksiyonel bölümleri

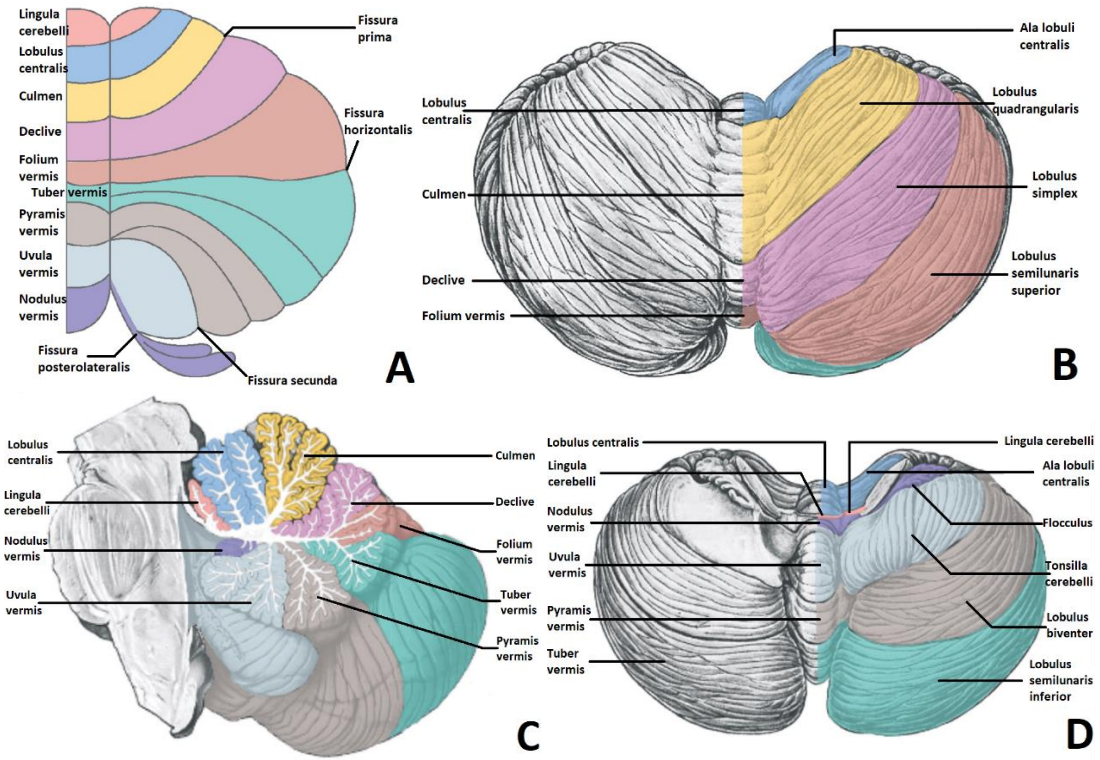
Fossa cranii posterior'da yer alan cerebellum, tentorium cerebelli ile lobus occipitalis'ten ayrılır (Şekil 2.2). Erişkinlerde cerebellum'un cerebrum'a oranı ortalama 1/10; bebeklerde ise 1/20 olmakla birlikte yaklaşık 150g ağırlığıyla rhombencephalon'un en büyük parçasıdır. Cerebellum ventriculus quartus vasıtasıyla ayrıldığı pons ve medulla oblongata'nın dorsal'inde yer alır. Truncus encephali'ye 3 çift bilateral pedunculus aracılığıyla bağlanır. Bu bağlantılar cerebellum ile ilgili tüm afferent ve efferent lifleri içerir (Standring, 2016).



Şekil 2.2. Cerebellum'un yerleşimi
A, Kafa tabanının üstten görünümü ve B, Cerebellum'un merkezi sinir sisteminin diğer elemanlarına göre konumu (Paulsen & Waschke, 2013)

Ovalimsi bir şekle sahip olmakla birlikte lateral'lerde iki adet hemisfer ve bu yapıların tam ortasında yer alan bir adet vermis cerebelli'den meydana gelir. Hemisferler ile vermis arasında sulcus paramedianus'lar yer alır. Anterior ve posterior'unda incisura cerebelli anterior ve posterior olmak üzere 2 adet çentik yapı bulunmaktadır. Incisura cerebelli posterior'da dura mater'in lamina interna'sının bir katlantısı olan falx cerebelli yerleşmiştir (Standring, 2016).

Cerebellum'a inferior'dan bakıldığında ise iki hemisfer arasında vallecula cerebelli adı verilen geniş bir çukur yer almaktadır. Hemisferlerin external yüzlerini folia cerebelli olarak adlandırılan fazla sayıdaki yapraklar kuşatır (Standring, 2016; Taner vd., 2010). Folia'ların üç tabakalı korteks ve aksonları içeren medulla yapısı tüm cerebellum'da aynıdır (Balaei, Ashtari, & Bergen, 2017). Folia'lar fissurae cerebelli denilen yarıklarla birbirlerinden ayrılmıştır. Bu yarıklardan en derinleri cerebellum'u lob ve lobulus'lara böler (Standring, 2016; Taner vd., 2010).



Şekil 2.3. Cerebellar loblar ve fissura'ların terminolojisi

A, Açılmış haldeki cortex cerebelli. Vermis'in bölümleri sayılarla ifade edilmiş ve önemli fissura'ların isimleri belirtilmiştir. B, Cerebellum'un üstten görünümü. C, Cerebellum'un mid-sagittal kesiti. Vermis'in bölümleri sayılarla ifade edilmiştir. D, Cerebellum'un alttan görünümü (Standring, 2016)

Cerebellum rostro-caudal düzlemde fissura prima ve fissura posterolateralis vasıtasıyla lobus cerebelli anterior, lobus cerebelli posterior ve lobus flocculonodularis olmak üzere 3 loba ayrılırlar (Arıncı & Elhan, 2006). Cerebellum'un superior'unda yer alan fissura prima lobus anterior'la lobus posterior'u; cerebellum'un inferior'unda yer alan fissura posterolateralis ise lobus posterior ile dar ve nispeten daha küçük olan lobus flocculonodularis'i birbirinden ayırır (Balaei vd., 2017). Bunların dışında fissura horizontalis, facies cerebellaris superior ve inferior'u ayırır (Standring, 2016).

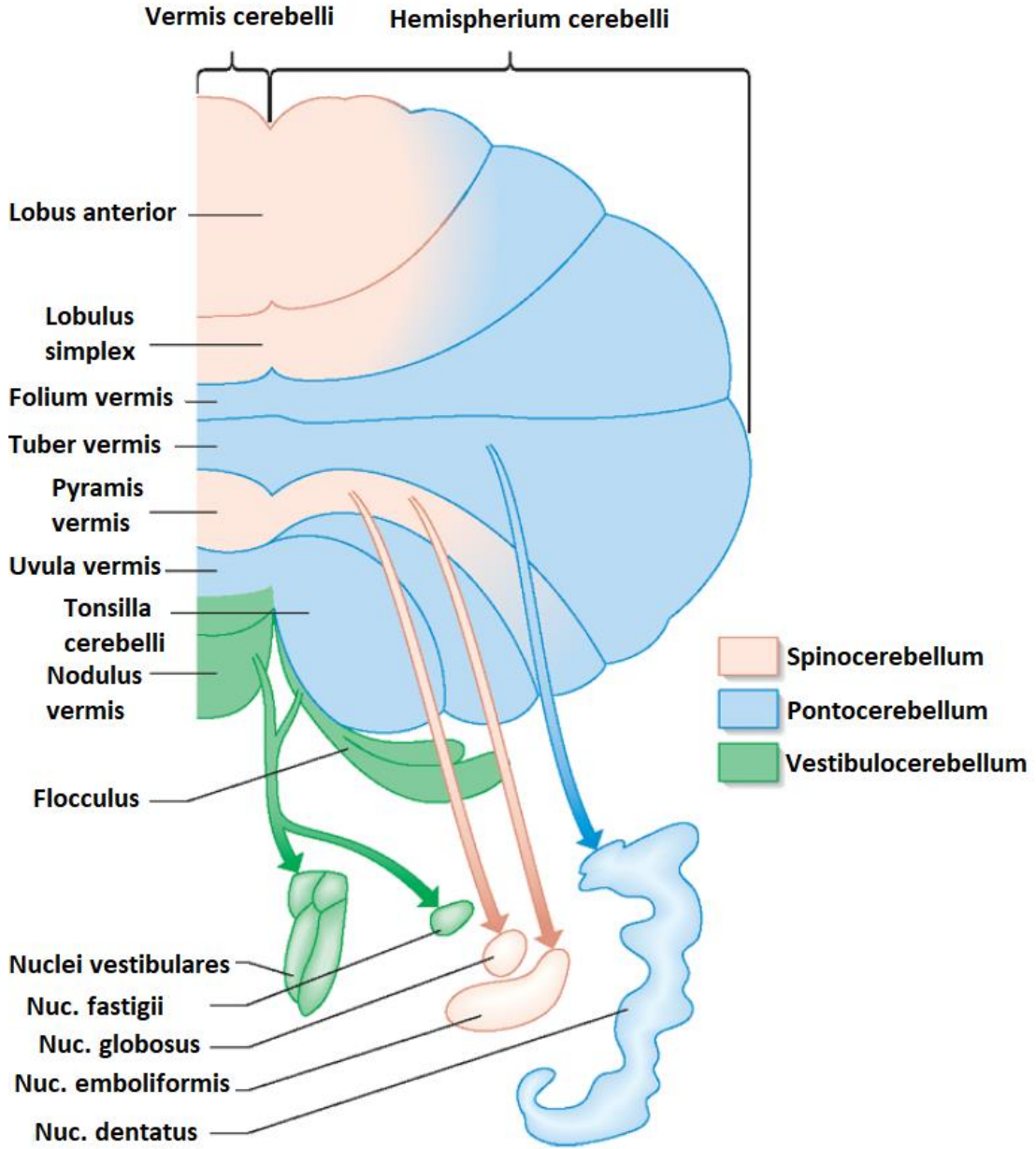
Larsell 1972 de yayınladığı makalesinde, vermis'i 10 bölüme ayırıp Romen rakamları ile numaralandırmış ve hemisferlerin karşılık gelen lobulus'larına da H ön ekini koyarak aynı numaraları vermiştir (Şekil 2.3) (Larsell & Jansen, 1972; Taner vd., 2010). Buna göre; lobus cerebelli anterior'la bağlantılı vermis lobul'leri lingula cerebelli (I), lobulus centralis (II, III) ve culmen (IV, V); hemisferlerin lobülleri ise ala lobuli centralis (HII, HIII) ve lobulus quadrangularis anterior (HIV, HV)'dir. Lobus cerebelli anterior ve posterior'un ayrımını yapan fissura prima vermis'in culmen ve declive kısımları ile; hemisferlerin lobulus quadrangularis'leri ile lobulus simplex'leri arasına girer. Substantia

alba'sı velum medullare superior'la devam eden lingula'nın hemisferlerdeki karşılığı vincingulum ligulae'dır. Lingula dört veya beş folia'nın bir araya gelmesiyle oluşur ve fissura precentralis vasıtasıyla lobulus centralis'ten ayrılır. Lobulus centralis, fissura preculminare tarafından culmen'den ayrılır. Culmen (lobulus quadrangularis anterior ile birlikte) fissura preculminare ve prima arasında yer alır (Standring, 2016; Taner vd., 2010).

Lobus cerebelli posterior'la bağlantılı, vermis lobul'leri declive (VI), folium vermis (VII-A), tuber vermis (VII-B), pyramis vermis (VIII) ve uvula (IX) vermis; hemisferlerin lobülleri ise lobulus simplex (VI) (HVII-A), lobulus semilunaris superior, lobulus semilunaris inferior (HVII-B), lobulus paramedianus (HVII-B), lobulus biventer (HVIII) ve tonsilla cerebelli (HIX)'dir. Facies superior ve inferior cerebelli'yi ayıran fissura horizontalis vermis'in folium ve tuber kısımları ile hemisferlerin karşılık gelen lobulus semilunaris superior ve inferior'larını birbirinden ayırır. Tuber cerebelli fissura lunogracilis cerebelli ile pyramis cerebelli'den; pyramis cerebelli ise fissura secundaria ile uvula ve tonsilla cerebelli'den ayrılır. Tonsilla cerebelli'ler kabaca küresel şekilli olup, medulla oblongata'nın her iki yanında foramen magnum'un üzerine doğru sarkar (Standring, 2016; Taner vd., 2010).

Lobus flocculonodularis'i ise vermis'in nodulus'u (X) ile hemisferlerin pedunculus flocculi ve flocculus (HX) kısımları oluşturur. Vermis'in uvula cerebelli ve nodulus kısımlarını ayıran fissura posterolateralis hemisferlerin de tonsilla cerebelli'sini pedunculus flocculi ve flocculus'tan ayırır. Lobus flocculonodularis, nuclei vestibulares ile tamamen birbirine bağlıdır (Standring, 2016; Taner vd., 2010).

Cerebellum, diğer beyin bölgeleri ile bağlantıları, hareket ve diğer motor dışı hareketlerin düzenlenmesindeki rolü bakımından 3 fonksiyonel bölüm halinde düzenlenmiştir (Şekil 2.4). Filogenetik bakımdan en eski fonksiyonel bileşeni vestibulocerebellum (lobus flocculonodularis)'dur. Vestibulocerebellum'un korteksi hem ipsilateral vestibüler aparatından hem de nuclei vestibulares'ten input alır. Vestibüler korteksin nuclei vestibulares ile olan bağlantıları karşılıklıdır ve vestibulocerebellum'un korteksi, cortex cerebelli'nin cerebellum dışına doğrudan bağlantı gönderen tek bileşenidir. Vestibulocerebellum dengeyi ve göz hareketlerini kontrol eder (Balaei vd., 2017).



Şekil 2.4. Cerebellum filogenetik bölümleri ve nuclei cerebelli (Standring, 2016)

Cerebellum'un ikinci fonksiyonel bileşeni, lobus anterior'un vermis'inin orta hattı ve vermis'in her iki tarafındaki dar bir korteks bölümünden oluşur. Bu bölüm input'unun medulla spinalis'teki çıkan yollarla sağlanmasından ötürü spinocerebellum olarak adlandırılır. Spinocerebellum ipsilateral alt ekstremitenin proprioseptif, kutanöz ve basınç bilgilerini ileten tractus (tract.) spinocerebellaris posterior'dan input alır. Ayrıca üst ekstremiteden somatosensörük bilgileri taşıyan tract. cuneocerebellaris'ten de input alır. Spinocerebellum'un son ana input yolu ise tract. spinocerebellaris anterior'dur. Bu yol motor aktivitenin düzenlenmesinde rol oynayan medulla spinalis'teki döngülerin

aktivitesi hakkında bilgi verir. Ayrıca spinocerebellum formatio reticularis'i de içeren beyin sapındaki bazı nükleus'lardan input alır. Denge, postür ve hareketin gerçekleştirilmesini sağlayan axial ve appendicular ekstremiteler kaslarının hareketlerinin düzenlenmesinde de rol oynar (Balaei vd., 2017).

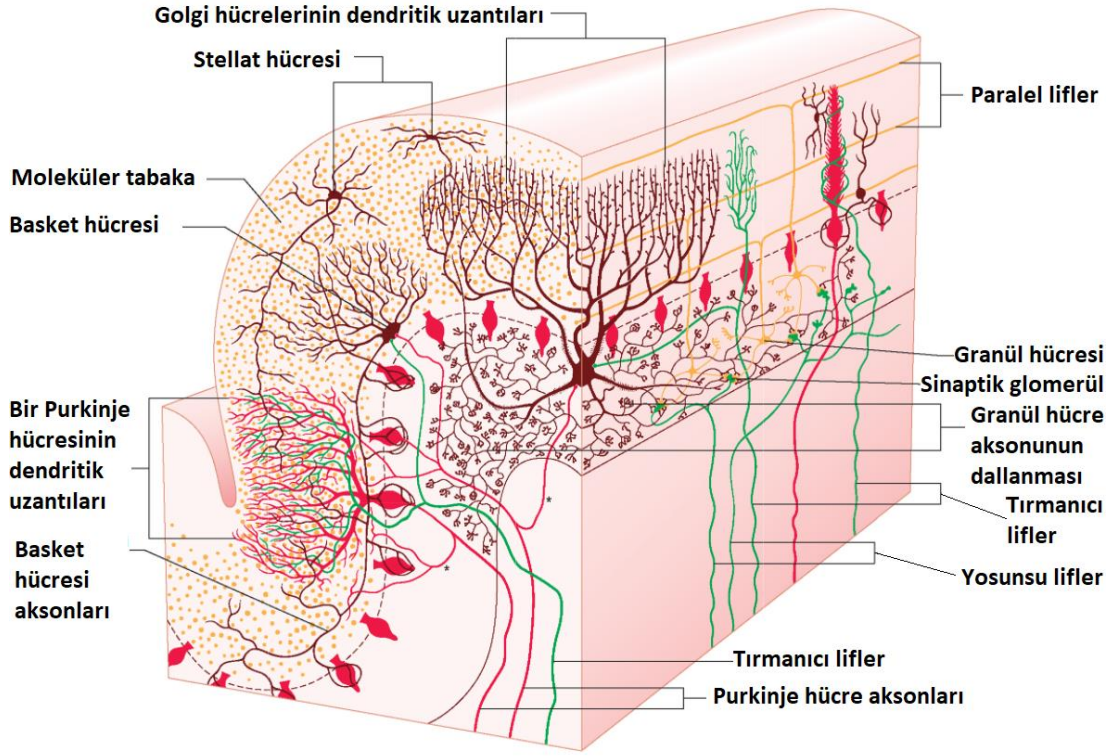
Cerebellum'un üçüncü ve en büyük fonksiyonel bileşeni cerebrotocerebellum olarak da bilinen pontocerebellum'dur. Ayrıca cerebellum'un filogenetik olarak en yeni bölümüdür. Spinocerebellum'un hemen lateral'inde olan büyük hemisferlerinden oluşur ve esas olarak kontralateral cerebrum'dan pons yoluyla input alır. Cortex cerebri'nin (özellikle lobus frontalis ve parietalis) pek çok alanından inen corticopontin lifler pars basalis pontis'in nuclei pontis'lerine uzanır. Bu nükleus'ların nöronları, pontocerebellum'un korteksine bağlanmak için uzantılarını gönderirler. Pontocerebellum özellikle yüksek memelilerde iyi gelişmiştir ve distal ekstremiteler kas sisteminin koordinasyonunu düzenlemenin yanı sıra motor öğrenmede de rol oynar (Balaei vd., 2017).

Cerebellum periferik reseptörlerden spinal, trigeminal ve vestibulocerebellar yollarla; cortex cerebri ve tectum'dan ise nuclei pontis aracılığıyla bilgi alır. Cerebellum'un output'u genelde thalamus'a, oradan motor kortekse, ayrıca truncus encephali'de bulunan nuc. ruber, nuclei vestibulares ve nuclei reticulares gibi merkezlere yönlendirilir (Standring, 2016).

2.3.2.2. Cerebellum'un iç yapısı

Cortex cerebelli

Cortex cerebelli, homojenliği bakımından oldukça dikkat çekicidir. Moleküler tabaka (stratum moleculare), Purkinje hücre tabakası (stratum purkinjense) ve granüler tabaka (stratum granulosum) olmak üzere üç tabakaya ayrılır (Şekil 2.5) (Marzban vd., 2015).



Şekil 2.5. Cortex cerebelli'nin genel organizasyonu
(Standring, 2016)

- ***Moleküler tabaka (Stratum moleculare)***

Korteksin en dışında yer alan moleküler tabaka ortalama 300-400 µm kalınlıktadır. Az sayıda nöron (stellat ve basket hücreleri), dendritik dal, miyelinsiz akson ve glial lif içerir (Ito, 2011; Standring, 2016; Voogd & Glickstein, 1998). Moleküler tabaka, 'tırmanıcı lifler' olarak adlandırılan nöron uzantıları vasıtasıyla medulla oblongata da bulunan nuc. olivaris inferior'dan ve cortex cerebelli'nin granül hücrelerinden bol miktarda uyarıcı input alır (Apps & Garwicz, 2005; Standring, 2016; Voogd & Glickstein, 1998; Wright, Skaggs, & Nielsen, 2016).

Moleküler tabakada yer alan hem basket hem de stellat hücreleri GABA'yı bir nörotransmitter olarak kullanan inhibitör internöronlardır ve dendritik dallarına doğru ilerleyen paralel liflerle uyarıcı sinaps yaparlar. Stellat hücreleri moleküler tabakanın yüzeyinde yerleşmiştir ve aksonları Purkinje hücre dendritlerinin uzantılarıyla sinaps yapar. Basket hücreleri moleküler tabakanın iç kısmında; 1/3'ünde bulunur. Gövdeleri, Purkinje hücresi rekürrent kollateralleri, tırmanıcı ve yosunsu liflerin yanı sıra paralel liflerle de sinaps yaparlar. Basket hücrelerinin akson büyüklüğü gövdelerinden uzaklaştıkça artar ve Purkinje hücrelerinin hemen üzerinde moleküler tabakada yerleşir.

Stellat ve basket hücreleri Purkinje hücreleri ile doğrudan sinaps yaparlar (Consalez & Hawkes, 2013; King, Chen, & Bishop, 1993; Standring, 2016; Wright vd., 2016).

- ***Purkinje hücre tabakası (Stratum purkinjense)***

Purkinje hücre tabakası, Purkinje hücrelerinin armut şekilli gövdeleri ve Bergmann glia'larının Purkinje hücrelerine oranla daha küçük gövdelerini içerir. Granül hücresi kümeleri ve nadiren Golgi hücreleri Purkinje hücre gövdeleri arasına nüfuz edebilir (Apps & Garwicz, 2005; Balaei vd., 2017; Wright vd., 2016).

Purkinje hücreleri, tüm omurgalılar sınıfında korunan özel bir geometriye sahiptir. Moleküler ve granüler tabakalar arasında tek bir tabaka halinde düzenlenmiştir (Standring, 2016). Neurotransmitter olarak GABA'yı kullanır. Cortex cerebelli'nin tek output'u olduğu için özel bir öneme sahiptir. Liflerinin hemen hemen hepsi nuclei cerebelli'ye bağlanır (Apps & Garwicz, 2005; Balaei vd., 2017; Standring, 2016; Wright vd., 2016).

Bu hücrelerin üst kutbundan bir bazen iki dentrit çıkar ve bu dentrit'lerden oldukça fazla miktarda dal moleküler tabakaya doğru uzanır (Standring, 2016). Her bir nöronun dentritik dalları folium'un uzun eksenine dik uzanan dar bir tabaka ile sınırlanır. Proksimal primer ve sekonder grup dentritler kısa, güdük spine'ları olan pürüzsüz yüzeylere sahiptir ve tırmanıcı liflerle bağlantılıdır. Distal dallar ise bir dizi yoğun dentritik spine'a sahiptir. İnhibitör sinapslar basket hücreleri, stellat hücreler ve Purkinje hücre aksonlarının tekrarlı kolleterallerinden alınır (Standring, 2016; Wright vd., 2016).

Purkinje hücrelerinin akson'ları gövdenin alt kutbundan ayrılır ve substantia alba'ya girmek için granüler tabakayı geçer. Primer akson segmentinin, basket hücrelerinin aksonlarının distal dallarıyla akso-aksonik sinaptik bağlantıları vardır. Primer segment, biraz ilerledikten sonra akson genişler, miyelinlenir ve kolleteral dallar verir. Böylece ana akson nuclei cerebelli veya vestibulares'te bir plexus oluşturur. Aksondan ayrılan rekürrent kolleteraller bir diğer Purkinje, basket ve Golgi hücresinde sonlanır (Standring, 2016; Wright vd., 2016).

Bergmann glia'ları Purkinje hücrelerinin arasında yer alan benzersiz morfolojiye sahip astrositlerdir. Lifleri Purkinje hücrelerinin arasında moleküler tabakaya doğru uzanır. Bu hücrelerin lifleri, paralel lifler tarafından salınan glutamat'ın Purkinje hücrelerine geçişinde rol oynar (Wright vd., 2016).

- ***Granüler tabaka (Stratum granulosum)***

Granüler tabaka fissürlerde yaklaşık olarak 100 µm ve folia tepelerinin üzerinde ise 400–500 µm kalınlıktadır (Standring, 2016). Granüler tabaka, korteksin en iç tabakasıdır ve granül hücreleri, Golgi hücreleri, unipolar fırçamsı hücreler ve Lugaro hücrelerinden oluşur (Balaei vd., 2017; Lainé & Axelrad, 2002; Wright vd., 2016).

Granül hücreleri, insan sinir sisteminde en bol miktarda bulunan nöronlardır ve granüler tabaka içinde sıkıca paketlenirler (Balaei vd., 2017; Lainé & Axelrad, 2002). Her bir granül hücresi birkaç küçük mitokondri, ribozom ve Golgi kompleksi içeren sitoplazmanın kabuğuyla, 5-8 µm çapında küre şekilli bir çekirdeğe sahiptir. Sinaptik glomerülde pençe benzeri terminallerde sonlanan 3-5 kısa dentrit meydana getirir. Cerebellum için temel input olan yosunsu liflerden uyarıcı input alırlar. Bir nörotransmitter olarak glutamat kullanan granül hücrelerinin akson terminalleri, “T” şeklinde ikiye ayrılarak paralel lifler adı verilen uzantıları oluşturur. Paralel lifler moleküler tabaka içerisinde yer alır ve burada Purkinje, stellat, basket ve Golgi hücrelerinin dentritleriyle sinaps yapar. En çok Purkinje dentritik spine’larıyla sinaps yaptığı için granül hücrelerinin aktivitesi, Purkinje hücrelerinin aktivitesinin belirlenmesinde kritik bir rol oynar. Ek olarak, granül hücrelerinin paralel lifleri, Golgi, stellat ve basket hücreleri dahil olmak üzere diğer cortex cerebelli hücre tiplerinin aktivitesini de şekillendirir (Apps & Garwicz, 2005; Balaei vd., 2017; Standring, 2016; Wright vd., 2016).

Golgi hücreleri, granüler tabakanın üst bölümünde, Purkinje hücre tabakasına daha yakın olan nispeten büyük hücrelerdir. Bunlar ayrıca GABA-erjik nöronlardır ve dendritlerini, granül hücrelerinin paralel liflerinden sinaptik input aldıkları moleküler tabakaya radial olarak uzatırlar. Golgi hücrelerinin dentritik dalları folia’ların hem transvers hem de longitudinal kesitlerinde çok benzer görünür. Her iki düzlemde de birkaç komşu Purkinje ve Golgi hücresine ait bölge üst üste biner. Bununla birlikte bazı Golgi dentritleri granüler tabakada dallanırlar ve cerebellar glomerüle katılırlar. Golgi hücrelerinin aksonları hücre gövdesinin tabanından çıkar ya da proksimal dentritten oluşur ve hemen hemen tüm granüler tabaka boyunca uzanan birçok dala ayrılır. Ana sinaptik input’u moleküler tabakadaki paralel liflerden gelir. Ayrıca, granül hücrelerinin dendritleriyle kurduğu sinaptik bağlantılar sayesinde bu hücrelere bir inhibisyon kaynağı sağlar. Golgi hücreleri yosunsu liflerin inhibisyonuyla ateşlemeyi düzenler ve dolayısıyla

Purkinje hücre aktivitesinin bir idarecisi ya da nispeten sınırlayıcısı olarak işlev görür (Balaei vd., 2017; Standring, 2016; Wright vd., 2016).

Unipolar fırçamsı hücreler, granüler tabakanın yüzeysel bölümünde yer alır ve granül hücreleri gibi nörotransmitter olarak glutamat kullanırlar. Bu hücreler vestibulocerebellum'da cerebellum'un diğer bölümlerinden daha fazla miktarda bulunur ve yosunsu liflerle yakın ilişkilidir. Granül hücrelerine ve diğer unipolar fırçamsı hücrelere bağlanır (Balaei vd., 2017; Wright vd., 2016).

Cortex cerebelli'ye özgü son hücre Lugaro hücresidir. Granüler tabakanın yüzeysel kısmında bulunan GABA-erjik nöronlardır. Dendritleri moleküler tabakaya uzanabilirken, aksonları Golgi hücreleriyle bağlantı kurdukları granüler tabakayla sınırlıdır (Balaei vd., 2017; Lainé & Axelrad, 2002; Standring, 2016; Wright vd., 2016).

Nuclei cerebelli

Hemisferlerin substatia alba'larının içerisine gömülü şekilde yan yana dört adet nuclei cerebelli bulunur. Bunlar nuc. dentatus, emboliformis, globosus ve fastigii'dir (Şekil2.4) (Standring, 2016; Uusisaari & De Schutter, 2011). İlk oluşan cerebellar nöronlar nuclei cerebelli'nin nöronlarıdır. Bu hücreler rombik dudaktan köken alır ve nükleer geçiş bölgesine teğetsel olarak göç eder. Nuclei cerebelli, korteksten bilgiyi Purkinje hücreleriyle alır ve cerebellum'un tek output'unu (vestibulocerebellum'a ait bazı Purkinje hücreleri hariç) oluşturur. Purkinje hücrelerinden gelen inhibe edici input'lara ek olarak, nuclei cerebelli, yosunsu liflerden ve kortekse uzanan tırmanıcı liflerden kolleteral uyarıcı input'lar alır. Nuclei cerebelli nöronlarının çoğu thalamus, nuc. ruber, formatio reticularis ve nuclei vestibulares de dahil olmak üzere cerebellum dışındaki bölgelere bağlanan uyarıcı nöronlardır. Bununla birlikte, nuc. olivaris inferior'a bağlanan küçük bir nuclei cerebelli nöron popülasyonu GABA-erjiktir (Balaei vd., 2017).

Nuc. dentatus, nuclei cerebelli'nin en büyük ve en lateral de yer alan çıplak gözle kolayca görülebilen tek nükleus'udur (Balaei vd., 2017; Standring, 2016). Bu nükleus, esasen dentat nöronlardan gelen liflerin geçtiği ve pedunculus cerebellaris superior' un bulbus'unu oluşturan medial'e yönelmiş bir hilum'a sahiptir ve nöronal hücre gövdelerinin düzensiz olarak katlanmış bir yaprağı şeklindedir. Lateral hemisferlerin Purkinje nöronlarından inhibe edici, sırasıyla tırmanıcı ve yosunsu liflerin kolleterallerinden de uyarıcı input alır. Nuc. dentatus'un nöronları, nuc. ruber'e ve nuc. ventralis lateralis thalami'ye bağlanır (Balaei vd., 2017; Standring, 2016).

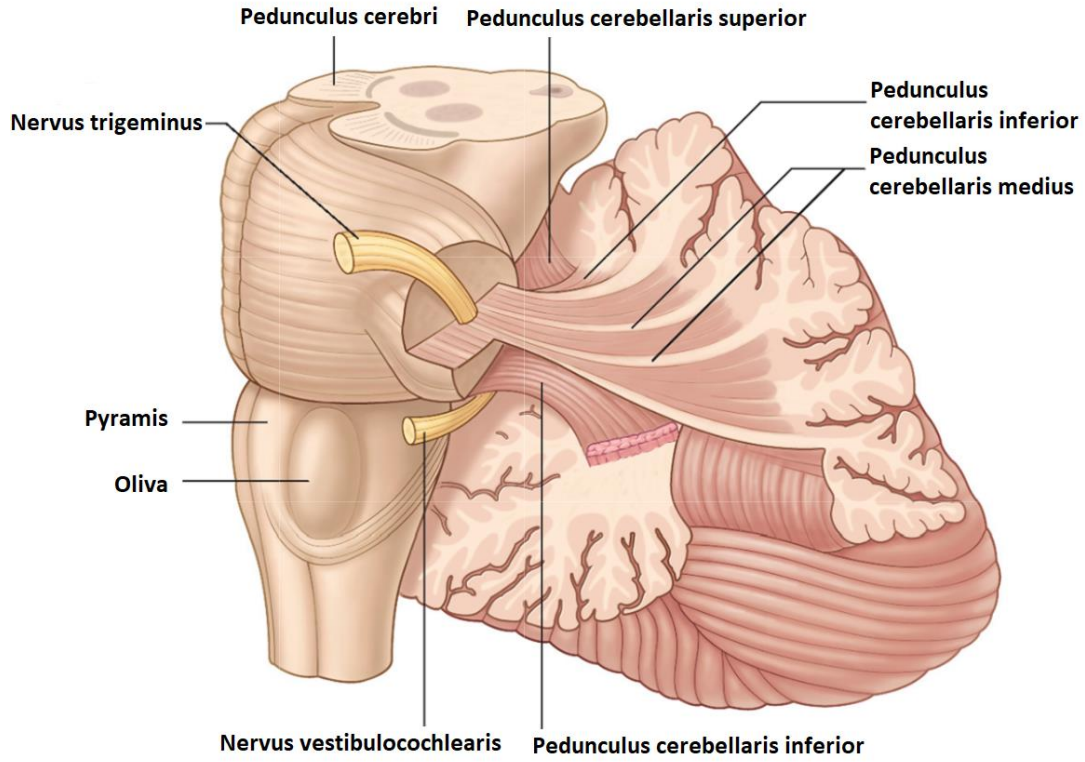
Nuc. emboliformis ve globosus, nuc. dentatus'un medial'inde uzanır. Daha ilkel türlerde nuc. interpositus olarak ifade edilir. Nuc. emboliformis ve globosus bazen sırasıyla nuc. interpositus anterior ve posterior olarak da adlandırılabilir (Standring, 2016). Bu nükleus'lar, cerebellum'un lobus anterior'unun paravermal alanları ve vermis'in Purkinje hücrelerinden input alır. Nuc. interpositus, esas olarak nuc. ruber ve nuc. ventralis lateralis thalami'ye bağlanır (Balaei vd., 2017)..

Nuc. fastigii, nuclei cerebelli'nin en küçüğü ve en ortada yerleşimli olanıdır. Bu nükleus'un nöronları, vestibulocerebellum'un Purkinje hücrelerinden (yani, lobus flocculonodularis) input alır. Ayrıca, nuc. fastigii, vestibüler vermis'in Purkinje hücrelerinden input alır. Nuc. fastigii'nin nöronları, beyin sapındaki vestibüler ve retiküler çekirdeğe projekte olur (Balaei vd., 2017).

Efferent liflerin büyük bir kısmı cerebellum içinde çapraz yapar ve ardından kontralateral nuclei vestibulares'e girmek için pedunculus cerebellaris superior'un dorsal'inden geçen fasciculus uncinatus'u oluşturur. Çapraz yapmayan fastigobulbar lifler ventriculus quartus'un lateral köşesi boyunca ilerleyip nuclei vestibularis'e girer. Nuc. fastigii'nin bazı lifleri ise pedunculus cerebellaris superior'da yükselir (Standring, 2016)

Pedunculi cerebellares

Cerebellum mesencephalon, pons ve medulla oblongata'ya sırasıyla pedunculus cerebellaris superior, medius ve inferior vasıtasıyla bağlanır (Şekil 2.6) (Uusisaari & De Schutter, 2011). Pedunculus cerebellaris superior nuc. fastigii'nin küçük bir lif demetini, nuc. dentatus, emboliformis ve globosus'un ise tüm efferent liflerini içerir. Bu lifler kontrolateral nuc. ruber ve thalamus'ta sinaps yapmak üzere mesencephalon'un alt kısmında çapraz yapar. Formatio reticularis'in nükleus'una bağlanan spinocerebellum'un cerebellar efferentleri de yine bu pedunculus'tan geçer. Pedunculus cerebellaris superior'un içinde yer alan cerebellar afferentler, öncelikle, spinocerebellum'un granüler tabakasına bağlanan yosunsu lifler ve nuc. interpositus'a dallar gönderen tract. spinocerebellaris anterior'un lifleridir (Balaei vd., 2017; Standring, 2016). Tract. spinocerebellaris anterior, pedunculus içine dönmeden önce tegmentum pontis'in üst kısmına ulaşır (Standring, 2016).



Şekil 2.6. Pedunculi cerebellares
(Standring, 2016)

Pedunculus cerebellaris medius üç pedunculus'un en büyüğü olmakla birlikte anatomik olarak da en lateral yerleşimlidir. Pons'un bazalinden cerebellum'a oblik olarak geçer. Oldukça büyük bir kısmı kontrolateral nuclei basales pontis'ten gelen lifler tarafından oluşturulur (Standring, 2016). Bu lifler, büyük lateral hemisferlerin granüler tabakasına yosunsu lifler olarak bağlanır ve nuc. dentatus'a kollateral dallar gönderir (Balaei vd., 2017).

Pedunculus cerebellaris inferior, cerebellum'u medulla oblongata ile birleştiren lifleri içerir. Dışta corpus restiforme ve içte ise juxtarestiforme kısımlarından oluşur. Corpus juxtarestiforme öncelikle cerebellum ve nuclei vestibulares'lerin karşılıklı bağlantılarından oluşur. Corpus juxtarestiforme içindeki afferent lifler, vestibulocerebellum'un granüler tabakasına bağlanan yosunsu lifleri oluşturur ancak esasında efferent bir sistemdir. Corpus juxtarestiforme'nin efferent lifleri, vestibulocerebellum'un Purkinje hücre aksonlarını ve nuc. fastigii'nin, nuclei vestibulares ve reticulares'lerine bağlantılarını içerir. Corpus restiforme, tamamen afferent olmakla birlikte truncus encephali ve medulla spinalis'ten cerebellum'un geniş alanlarına yayılan lifler içerir. Bu, nuc. interpositus'tan kolleteral bağlantılar alan yosunsu

lifler gibi spinocerebellar kortekse bağlanan tract. cuneocerebellaris ve spinocerebellaris posterior'un liflerini içerir. Ek olarak, tırmanıcı lifler gibi cortex cerebelli'nin moleküler tabakasına bağlanan nuc. olivaris inferior'dan çıkan lifler de corpus restiforme içinde bulunur. Nuc. olivaris inferior spinal, vestibüler, kranial ve kortikal inen sinyallerden input alır. Nuc. olivaris inferior'un tek bir tırmanıcı lifi birkaç Purkinje hücresine bağlanırken, her bir Purkinje hücresi sadece bir tırmanıcı lif ile sinaptik bağlantı yapar (Balaei vd., 2017; Standring, 2016).

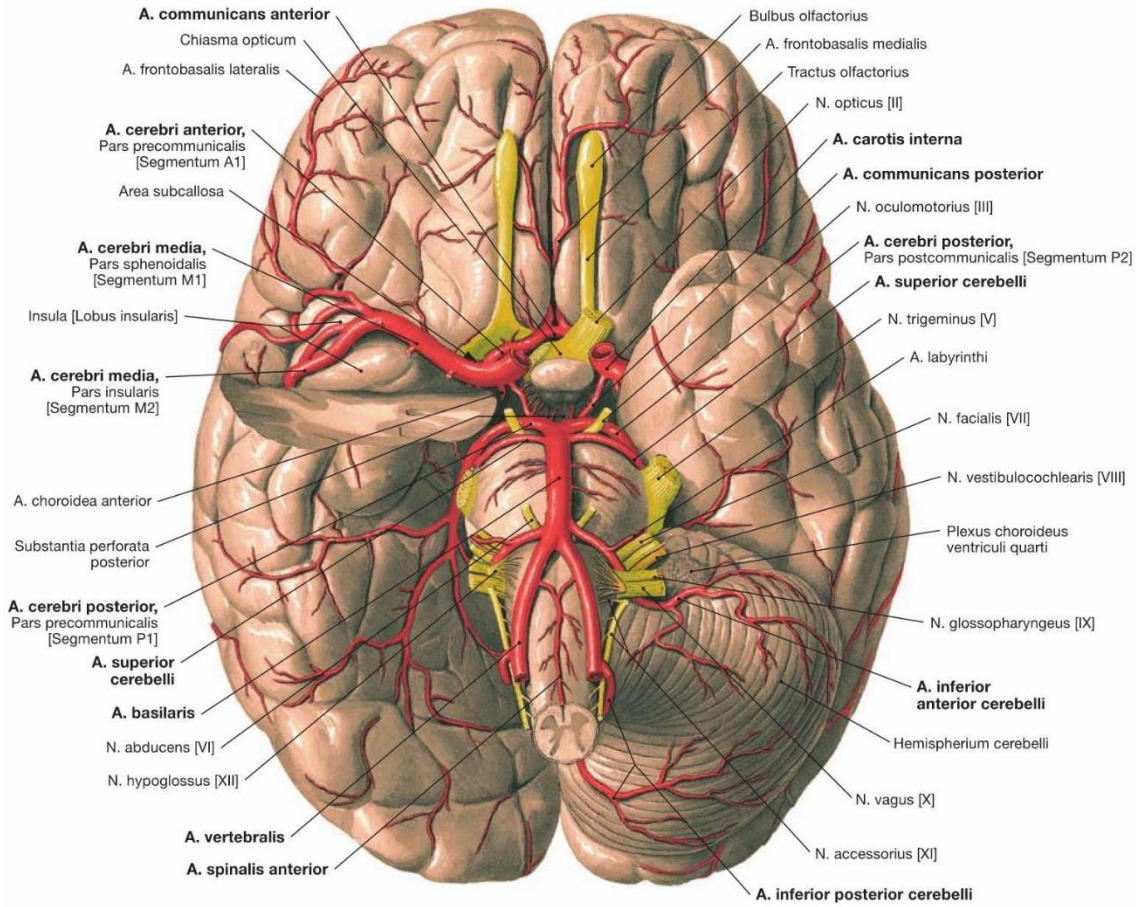
Cortex cerebelli ayrıca, locus coeruleus (noradrenerjik lifler), nuclei raphe (serotonerjik lifler), tegmentum mesencephali (dopaminerjik lifler) ve hypothalamus (histaminerjik lifler) da dahil olmak üzere beynin çeşitli alanlarından bağlantılar alır. Cerebellum için bu input'lar, nuclei cerebelli'nin yanı sıra cortex cerebelli'nin her üç tabakasında da sonlanır (Balaei vd., 2017).

2.3.2.3. Cerebellum'un Beslenmesi

Cerebellum, üç cerebellar arter yoluyla beslenir: arteria (a.) cerebelli posterior inferior (PICA), a. cerebelli anterior inferior (AICA) ve a. cerebelli superior (SCA) (Şekil 2.7) (Tatu, Moulin, Bogousslavsky, & Duvernoy, 1996). Bu arterler, beynin arka kısmının dolaşımını sağlayan vertebrobasiler sistemden kaynaklanır. İki taraflı a. vertebralis foramen magnum'dan geçer ve kısa sürede kafatasına girdikten sonra PICA a. vertebralis'ten ayrılır. PICA, inferior cerebellum'un arka kısmını ve burada bulunan substantia alba'yı besler. Aynı zamanda pedunculus cerebellaris inferior'un liflerini besler. A. vertebralis'ler orta hatta birleşir, pons ve medulla oblongata'nın birleştiği yere yakın a. basilaris'i oluştururlar ve bu birleşmenin gerçekleştiği yerin hemen yakınında AICA, a. basilaris'ten ayrılır. AICA, inferior cerebellum'un ön kısmının ve burada bulunan substantia alba'nın beslenmesini sağlar. AICA'nın distal dalları, nuc. dentatus'un yan kısmına uzanabilir. AICA ayrıca pedunculus cerebellaris medius'un arka kısmını da beslerken, a. basilaris'in çevresel dalları ise pedunculus cerebellaris medius'un ön kısmını besler. Cerebellum'un alt yüzeyinin en lateral kenarı genellikle PICA ve AICA'nın cisterna alanıdır (Balaei vd., 2017; Rhoton & Albert, 2000).

SCA, hemen hemen a. basilaris'in ikiye ayrılarak a. cerebri posterior'ları oluşturduğu yere bulunur. SCA, cerebellum'un üst yüzeyini ve substantia alba kısmını besler. Ayrıca, AICA tarafından beslendiği düşünülen nuc. dentatus'un lateral kısmı dışında nuclei cerebelli'yi de besler. SCA ayrıca a. cerebri posterior'un dalları ile birlikte

pedunculus cerebellaris superior'un beslenmesini sağlar (Balaei vd., 2017; Rhoton & Albert, 2000).



Şekil 2.7. Cerebellum'un beslenmesi
(Paulsen & Waschke, 2013)

2.3.2.4. Cerebellar fonksiyon

Cerebellum'un işlevi, yukarıda açıklanan üç fonksiyonel bölüm tarafından belirlenen üç kategoriye ayrılabilir (Balaei vd., 2017).

Vestibulocerebellum orta hatta yer alan nodulus ve iki taraflı flocculus'tan oluşur (Uusisaari & De Schutter, 2011). Kortekse bağlanan yosunsu lifler, ganglion vestibulare ve nuclei vestibulares'den kaynaklanır. Cortex cerebelli'nin Purkinje hücreleri, nuclei fastigii'ye ve ipsilateral nuclei vestibulares'e inhibe edici bağlantılar gönderir. Nuc. fastigii de nuclei vestibulares'e uyarıcı bilateral bağlantılar gönderir. Nuclei vestibulares'e giden bağlantılar pedunculus cerebellaris inferior'dan geçer. Bu bağlantılar, vestibüler feedback'e yanıt olarak fasciculus longitudinalis medialis (FLM) içerisinde bulunan çıkan nuclei vestibulares bağlantıları yoluyla vestibüler oküler

refleksin koordinasyonunda önemli bir rol oynar. Nuclei vestibulares ayrıca medulla spinalis'e tract. vestibulospinalis yoluyla lifler gönderir. Bu lifler, gövdenin alt kısmının anti-yer çekimi kaslarının aktivasyonu yoluyla dengenin korunmasında kritik bir rol oynar. Nuc. fastigii ayrıca, kontralateral nuc. ventralis lateralis thalami'ye pedunculus cerebellaris superior'la çıkan bağlantılar gönderir. Bu bilgi daha sonra, axial kas sisteminin aktivasyonu ile duruş ve dengenin korunmasında görev alan tract. corticospinalis anterior'un (medial motor sistemi) kortikospinal nöronlarına iletilir (Balaei vd., 2017; Standring, 2016).

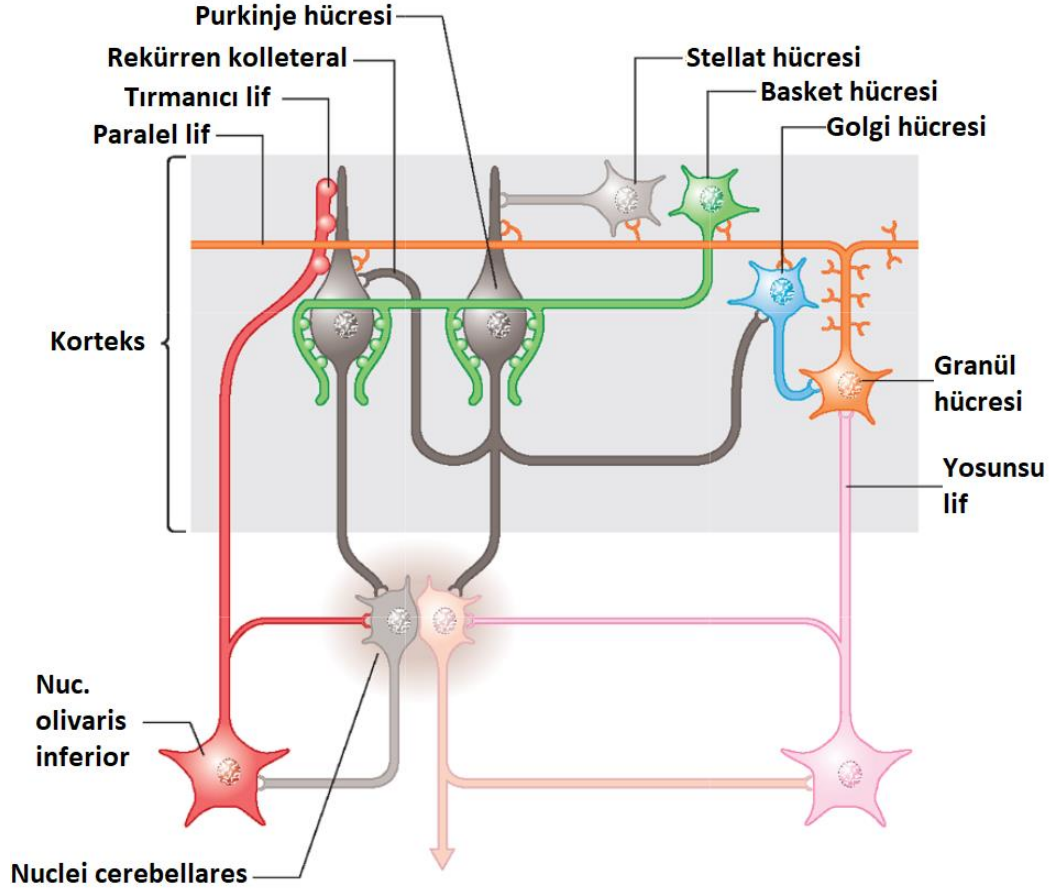
Spinocerebellum orta hatta yer alan vermis ve cerebellum'un paravermal alanlarından oluşur (Apps & Garwicz, 2005). Kortekse yansıyan yosunsu lifler, büyük ölçüde, tract. spinocerebellaris ve cuneocerebellaris'in lifleridir. Ayrıca spinocerebellum, nuc. reticularis, vestibularis ve pontis'ten de daha az oranda olmakla birlikte input alır (Balaei vd., 2017).

Nuc. interpositus, spinocerebellar kortekse çıkan input'lardan türetilen kolleteral lifler alırken, nuc. fastigii de bu kollateralleri alır. Benzer şekilde, spinocerebellar korteksin paravermal alanlarının Purkinje hücre aksonları, esas olarak nuc. interpositus'a, vermal alanlarının Purkinje hücre aksonları ise nuc. fastigii'ye bağlanır. Nuc. interpositus'tan çıkan lifler cerebellum'u pedunculus cerebellaris superior vasıtasıyla terk ederler. Bu liflerin çoğu, kontralateral nuc. ventralis lateralis thalami'ye bağlanır ve bu bilgi, ekstremiteler kasının düzenlenmesinde rol oynayan suplementer motor, premotor ve primer motor kortekse iletilir. Bu kortikal alanların inen lifleri, öncelikle tract. corticospinalis lateralis'i (yani, lateral motor sistem) oluşturacaktır. Nuc. interpositus ayrıca, üst ve alt ekstremiteler'ye bağlanan medulla spinalis'in motor nöronlarının aktivitesinin düzenlenmesinde rol alan rubrospinal ve reticulospinal liflerdeki değişiklikleri etkilemek için nuc. ruber ve nuclei reticulares'e lifler gönderir. Spinocerebellum'un nuc. fastigii'ye bağlanan vermal bölgeleri temel olarak axial kas sisteminin düzenlenmesinde rol oynar. Yukarıda tarif edildiği gibi, nuc. fastigii, nuclei reticulares, nuclei vestibulares'e ve nuc. ventralis lateralis thalami'ye bağlanır. Spinocerebellum'un vermal kısmının lezyonları axial kas instabilitesi ile karakterize edilirken, spinocerebellum'un paravermal kısımlarının lezyonları üst ve alt ekstremiteleri etkileyen ataksi üretir (Balaei vd., 2017; Standring, 2016).

Pontocerebellum cerebellum'un lateral hemisferlerinden oluşur ve cerebellum'un üç fonksiyonel bileşeninden en büyüğünü oluşturur. Pontocerebellar kortekse bağlanan yosunsu lifler neredeyse tüm pontocerebellar lifleri geçmektedir. Bu lifler kontralateral pars basilaris pontis'lerin nuclei pontis'ten kaynaklanır ve pedunculus cerebellaris medius'tan cerebellum'a girerler. Bu lifler, yalnızca, pontocerebellum'un Purkinje liflerinden input alan nuc. dentatus'a kolleteraller gönderir. Nuc. dentatus'un lifleri cerebellum'u pedunculus cerebellaris superior'dan terk eder. Bu lifler, caudal mesencephalon tegmentum'undaki orta hattı geçer ve bazı liflerin nuc. ruber'e girdiği yerde rostral olarak devam eder. Nuc. ruber'in nöronları, da cerebellum'a bir feedback döngüsü oluşturan pontocerebellum'a ve nuc. dentatus'a geri dönen medulla oblongata'nın nuc. olivaris inferior'una bağlanır. Nuc. dentatus'tan köken alan liflerin çoğu nuc. ruber'den thalamus'a kadar devam eder. Lifler, nuc. ventralis lateralis thalami ve daha az olmakla birlikte nuc. ventralis anterior'unda sonlanır. Nuc. dentatus'un nöronlarıyla bağlantılı talamik nöronlar, cortex cerebri'nin primer motor saha ağırlıklı olmak üzere motor sahalarının büyük bir kısmına rostral olarak bağlanır. Primer motor sahadan inen nöronlar, lateral motor sistemin büyük bir bileşenini oluşturur. Bu lifler, distal ekstremitelerin, özellikle üst ekstremitenin ince motor becerileri gerçekleştirebilmesi için gerekli kas aktivitesinin koordine edilmesinde kritik bir rol oynarlar. Nuc. dentatus'un talamik bağlantılar tarafından düzenlenmesi, motor aktivitenin planlanmasında da önemli bir rol oynamaktadır (Balaei vd., 2017; Standing, 2016).

2.3.2.5.Cerebellar Mikrodevre

Cerebellum, ana uyarıcı input'larını yosunsu ve tırmanıcı lifler olmak üzere 2 ana yoldan alır (Şekil 2.8): Tırmanıcı lifler, yalnızca kontrolateral nuc. inferior kompleksinden çıkar ve cortex cerebelli'de doğrudan Purkinje hücreleri ile sinaps yapar. Bunun aksine, yosunsu lifler Purkinje hücre tabakasına dolaylı olarak input'lar sağlar ve bu input'lar nuclei pontis, medulla spinalis, nuclei vestibulares ve formatio reticularis dahil olmak üzere çeşitli yapılardan kaynaklanır. Hem yosunsu hem de tırmanıcı lifler, nuclei cerebelli'ye kolleteraller gönderir. Bu ana yolların yanı sıra, aminerjik ve kolinerjik input'lar muhtemelen cerebellar aktivitenin global modülatörleri olarak işlev görür (Roostaei, Nazeri, Sahraian, & Minagar, 2014).



Şekil 2.8. Cerebellum'un iç bağlantılarının şematik gösterimi (Standring, 2016)

Yosunsu lifler, nuclei cerebelli'lerdeki ve granül hücrelerindeki nöronlarla uyarıcı sinapslar oluşturur. Granüler tabakada, yosunsu bir lif, cerebellar glomerüller oluşturmak için granül hücrelerin dentritik genişlemesi (dentritik pençe) ile temas eden rozetler adı verilen bir dizi genişlemeye yol açar. Golgi hücrelerinden gelen terminaller de bu yapıların içine süzülür ve granül hücre dendritleri ile inhibe edici sinaptik temaslar yapar. Bir glial hücre kılıfı tüm kompleksi kaplar. Her bir yosunsu lif, her bir kollateral birden fazla rozet oluşturacak şekilde, birkaç cerebellar folia'ya kollateral dallar göndererek granüler tabakaya ulaştıkça büyük ölçüde ayrışır. Granül hücreleri, paralel lifleri yayan uyarıcı nöronlardır. Bu lifler ayrıca moleküler tabakadaki çeşitli Purkinje hücrelerinin dentritik ağaçlarından geçerken ve bunlarla sinaptik temaslar kurarken önemli ölçüde farklılaşma gösterirler. Bu liflerin aktivitesi, Purkinje hücrelerinde basit spine'lar oluşturabilir. Granül hücreleri ayrıca Golgi hücrelerini ve diğer inhibe edici internöronları (stellat hücreleri ve basket hücreleri) hedefler. Stellat ve basket hücreleri sırasıyla

Purkinje hücre dendritleri ve hücre gövdeleri üzerinde inhibe edici sinapslar (GABAerjik) oluşturur (Roostaei vd., 2014).

Purkinje hücreleri ayrıca nuc. olivaris inferior'dan tırmanıcı lifler yoluyla input alır. Cortex cerebelli'de, her bir tırmanıcı lif, yaklaşık 10 Purkinje hücrelerini inerve eder. Bununla birlikte, paralel liflerin tam aksine, her Purkinje hücresi yalnızca tek bir tırmanıcı lif terminali tarafından inerve edilir. Tırmanıcı lifler Purkinje hücrelerinin dentritik ağacına tırmanarak yüzlerce sinaptik bağlantı kurar. Tırmanıcı liflerden gelen input o kadar güçlüdür ki, tek bir liften gelen tek bir hareket potansiyeli Purkinje hücresinde uzatılmış bir kompleks depolarizasyon dalga biçimi oluşturabilir (Roostaei vd., 2014).

Purkinje hücreleri, GABA nörotransmisyonu ile hedefleri üzerinde inhibe edici etkiler oluştururlar ve aksonları, cortex cerebelli'nin tek output'unu oluşturur. Aksonlar, cortex cerebelli'nin yakın kısımlarını inerve eden kolleterallere projekte olduktan sonra nuclei cerebelli'ye doğru ilerler. Nuclei cerebelli'den çıkan cerebellar efferentler (nükleofugal lifler) pedunculus cerebellaris superior ve inferior'dan geçerek, nükleo-olivary projeksiyonlar dışında hedefleri ile uyarıcı sinapslar yaparlar. Cerebellar mikrodere (Purkinje-nuclei cerebelli yolu) bu genel kuralın tek istisnası, doğrudan Purkinje hücrelerinden vestibüler çekirdeklere projekte olan liflerdir (Roostaei vd., 2014).

Cerebellar mikrodere'nin önemli bir ayırt edici özelliği, inhibe edici ve uyarıcı input'ların hem cortex cerebelli'de hem de nuclei cerebelli'de karşılaştırılmasıdır. Nuclei cerebelli seviyesinde, yosunsu ve tırmanıcı lif kolleterallerinden gelen uyarıcı input'lar, Purkinje hücrelerinden gelen engelleyici input'larla birleşir. İkincisinden gelen engelleyici input'lar, ilkinden gelen uyarıcı sinyali şekillendirir. Cortex cerebelli'de, paralel liflerden gelen sinyaller, Purkinje hücrelerini doğrudan aktive eder, ancak aynı zamanda, inhibe edici internöronların (stellat, basket ve Golgi internöronları) aktivasyonu yoluyla bu hücreleri inhibe eder. Stellat hücreler, paralel lifler tarafından aktive edilen aynı Purkinje hücrelerinin aktivitesini modüle ederken, basket hücrelerden gelen aksonlar paralel liflere dik olarak uzanır ve çevreleyen Purkinje hücreleri üzerinde inhibe edici etkiler (lateral inhibisyon) oluştururlar (Roostaei vd., 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu doktora tez çalışması için gerekli izinler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) (23.05.2017 kayıt tarihli ve 596 karar numarası) alındı. Çalışmanın her aşamasında deney hayvanlarına 15 Ekim 1978 tarihinde Paris'teki Birleşmiş Milletler Eğitim, Bilim ve Kültür Örgütü (UNESCO) Merkezi'nde kabul edilen Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesi ve 12.05.2006 tarih ve 26166 sayılı Resmî Gazete'de yayımlan Hayvanların Korunmasına Dair Uygulama Yönetmeliği gereğince muamele edildi.

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney İçin Hazırlanması

Deney için gerekli olan Sprague-Dawley ırkı dişi sıçanlar Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (TİCAM) temin edildi. Sıçanlar yine ameliyat gününe kadar bu merkezin tecrübeli personeline hayvanların yaşamı için en uygun koşullar gözetilerek bakıldı (Her günü ortalama $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 12 saat karanlık / 12 saat aydınlık döngüler halinde geçirdiler. Döllenmenin ardından her bir hamile sıçan optimum hijyen koşullarında, yem ve suya rahatça ulaşabileceği ayrı bir polikarbon kafese alındı. Doğum sonrasında ise her bir anneye yavrularıyla birlikte aynı kafes ve koşullarda ameliyat gününe kadar bakılmaya devam edildi.).

Gruplar oluşturulurken aynı yaş grubundan hiç çiftleştirilmemiş 200-250 g ağırlığında erişkin yirmi (20) adet dişi Sprague-Dawley ırkı sıçan kullanıldı. Bu sıçanlar damızlık erkek sıçanlarla 1 gece (2 erkek sıçana 3 dişi sıçan olacak şekilde) bir arada tutularak çiftleşmenin gerçekleşmesi beklendi. Çiftleşmenin gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak üzere ertesi gün vajinal "smear testi" yapıldı. Bu teste göre döllendikleri düşünülen sıçanlar ayrı kafeslere alındı ve her kafesin üzerine döllenme tarihleri yazıldı. Döllenmenin olduğu gün E0. gün olarak kabul edildi (Smear testinde sperm görülen tüm sıçanlar gebe değildi. Bu durum öngörüldüğü için sıçan sayısı fazla tutulmuştur.).

3.2. Deney Esnasında Kullanılan Diğer Kimyasalların Hazırlanması

3.2.1. Valproik asit

Toz formundaki Sigma-Aldrich Valproik asit sodyum tuzu (Sodium valproate $\geq 98\%$ 10 g) %9'luk serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülerek her hayvan için 600 mg/kg doz hazırlandı.

3.2.2. Anestezikler

Cerrahi işlemler öncesinde anestezik madde olarak ketamine ve xylazin kullanıldı. 100 g hayvan için 0,1 ml ketamine'e 0,05 ml xylazin oranında hazırlandı.

3.2.3. Deney gruplarına SF ve VPA enjeksiyonu

E15 günde gebe sıçanlar önce Deney grubu ve Kontrol grubu olarak iki ana gruba ayrıldı. Deney grubu anne sıçanlarına E15. günde tek doz 600mg/kg VPA (Sigma-Aldrich); Kontrol grubu anne sıçanlarına ise E15. günde aynı hacimde tek doz SF verildi (Şekil 3.1). Hayvanlar doğum yapacakları güne kadar gözlemlendi. Bu süreçte bazı hayvanlar erken doğum yaptı. Bazıları ise doğumun hemen ardından ya da doğumdan sonraki birkaç gün içerisinde kanibalizm (yamyamlık) davranışı gösterdi.



Şekil 3.1. E15. günde sıçan enjeksiyonu

Doğumun gerçekleştiği gün PN0. gün olarak kaydedildi ve yeniden gün sayımına başlandı. PN11. güne gelindiğinde hayvanlar alt gruplara ayrıldı. Deney grubu 1'deki hayvanlar sadece E15. günde tek doz 600mg/kg enjeksiyon yapılan erkek sıçanlardan oluşturulurken; Deney Grubu 2 hem E15. günde hem de PN11. günde tek doz 600mg/kg VPA enjeksiyonu yapılan erkek sıçanlardan oluşturuldu. Benzer şekilde Kontrol grubu 1'deki hayvanlar sadece E15. günde tek doz SF enjeksiyonu yapılan erkek sıçanlardan oluşturulurken; Kontrol Grubu 2 hem E15. günde hem de PN11. günde tek doz SF enjeksiyonu yapılan erkek sıçanlardan oluşturuldu (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Postnatal 11. günde yavru sıçanlar

Makronöron gelişimlerinin tamamlanması beklenen hayvanlar PN30. günde cerrahi işlemlerin gerçekleştirilmesi için ESOGÜ Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Deney Laboratuvarına getirildi.

3.3.Fiksatif ve Boyaların Hazırlanması

3.3.1. Primer fiksatifin hazırlanması

Elektron mikroskop prosedürü için ilk olarak tamponlanmış gluteraldehit hazırlandı. Bunun için tablet formundaki phosphate buffer saline (PBS) kullanıldı. Her bir tablet 200 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Çözdürme işleminin ardından PBS +4°C buzdolabında soğumaya bırakıldı. Soğuyan PBS'in içerisine 20 ml PBS'e 3 ml gluteraldehit olacak şekilde gluteraldehit eklenerek PBS+ gluteraldehit solüsyonu (primer fiksatif) hazırlandı. Bu fiksatif hem perfüzyonda hem de dokuların elektron mikroskop incelemesi için hazırlanmasında kullanıldı.

3.3.2. Sekonder fiksatifin hazırlanması

Koyu renk bir şişenin içerisine 5 ml distile su ve ampul formundaki osmium tetroksit eklendi. Şişe, içerisindeki ampul kırıldıktan sonra 1 gece +4°C buzdolabında bekletildi. Ertesi gün şişeye 5 ml PBS eklenerek sekonder fiksatif (PBS+osmium tetroksit solüsyonu) hazırlandı.

3.3.3. Bloklama solüsyonunun hazırlanması

20 ml Araldit CY212 ile 20 ml DDSA (sertleştirici) birlikte 15-20 dk su gibi bir kıvamaya gelinceye kadar karıştırıldı. Bu karışıma 1 ml dibütil fitalat eklendi ve 15 dk daha karıştırıldı. Son olarak 0,6 ml BDMA eklendi.

3.3.4. Toluidin blue hazırlanması

Bu boya 1 g Toluidin, 1 g borax (Sodium tetraborate decahydrate) ve 100 ml distile su karıştırılarak hazırlandı.

3.3.5. Uranil asetat boyasının hazırlanması

Koyu renkli bir şişenin içerisinde 50 ml metanol, 50 ml distile su ve 7 g Uranil asetat karıştırılarak boya hazırlandı. Hazırlanan boya enjektöre alınıp, ucuna filtre ve en ucuna da iğnesi takılarak buzdolabına konuldu.

3.3.6. Kurşun sitrat boyasının hazırlanması

Boya hazırlanırken 0,02 g Kurşun sitrat ve 10 ml distile su karıştırıldı. İçine 2 g 10 N NaOH (sodyum hidroksit) + 5 ml distile su karışımı eklendi. Ardından hazırlanan boya enjektöre alındı.

3.4. Cerrahi İşlemler

Hayvanlar PN30. günde, 0,1 ml ketamine'e 0,05 ml xylazin (100 g hayvan için) oranında anestezi madde intramüsküler enjeksiyon ile uygulanarak anesteziye alındı. Anestezi madde uygulama sonrası anestezinin derinliği ölçüldü [Bunun için hayvanın ayağı pensetle hafifçe sıkıştırılarak refleksif hareketleri kontrol edildi. Ayrıca bıyıklarının pozisyonu (dik olması hayvanın hala derin anesteziye girmediğini gösterir) da takip edildi.]. Derin anesteziye giren hayvan kardiyak perfüzyon için bir küvete alındı. Burada önce karın derisi penset yardımıyla kaldırılarak makasla minik bir açıklık oluşturuldu. Ardından bu açıklıktan penset sokularak hayvanın processus xiphoideus'u bulundu. Pensetle bu çıkıntıdan tutarak, çıkıntının hemen arkasında kalan diyafram kesilip göğüs kafesinin içine girildi (Diyafram kesildiği için akciğerler büyük oranda sönmüş, göğüsün üst kısmına doğru çıkar.). Ardından kaburga makasıyla hayvanın kaburgaları her iki taraftan sternuma paralel, mid-clavicular hattı takiben kesildi. Proc. xiphoideus bu aşamada bir klemp yardımıyla sıkıştırıp göğüs kafesi hayvanın kafa kısmına doğru kaldırılarak kalp ortaya çıkarıldı. Perfüzyon cihazının iğnesi hayvanın ventriculus sinister'inden (apex cordis'e yakın olacak şekilde) kalbe sokuldu ve organlardaki kanın uzaklaştırılması için SF verilmeye başlandı. Birkaç saniye bekledikten sonra kalbin atrium dextrum'u kesilerek sıvının tekrar kalbe dönmesi ve damar basıncını artırmak suretiyle organlara zarar vermesi engellendi. Dolaşım sonrasında kalpten çıkan sıvının renginin saydamlaşması ve karaciğerdeki solma gözlemlenerek perfüzyon sıvısı

değiştirildi. Bu kez de organların fiksasyonunu sağlamak üzere gluteraldehit+PBS solüsyonu (primer fiksatif) verildi. Hayvandaki kas seğirmeleri; vücutta sararma; boyun, ekstremiteler ve kuyruktaki sertlik gözlemlenerek sıvı verme işlemi tamamlandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Cerrahi işlemler

- A.** Anestezi derinliğinin kontrolü, **B.** Deriye ilk kesinin atılması, **C.** Perfüzyon sırasında kalbe intraket ile girilmesi, **D.** Perfüzyonun ardından gerçekleştirilen dekapitasyon

Bu aşamadan sonra hayvan dekapite edilerek cerebellum'un çıkarılması işlemine geçildi. Kafa derisi bir makas yardımıyla kesildi. Kafatası etrafındaki kas ve fascia'lar temizlendi. Kafanın arka kısmında yer alan foramen magnum'dan küçük bir penset yardımıyla girilerek kafa kemikleri yavaşça ve cerebellum hasarlandırılmadan açıldı. Kafa kemikleri açıldıktan sonra kranial sinir bağlantıları spatül yardımıyla kesilerek cerebellum beyin ile birlikte çıkarıldı. Total beyin tartımı yapıldıktan sonra cerebellum'un beyin ve beyin sapı ile bağlantısı kesilip ayrı olarak tartımı yapıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Cerebellum'un beyinle birlikte kafatasından çıkarılması

3.5. Elektron Mikroskop Doku Takip Prosedürü

3.5.1. Dokuların küçültülmesi

Yapısının bozulmaması için içerisinde gluteraldehit+PBS solüsyonu bulunan petriye alınan cerebellum mid-sagittal bir hat vasıtasıyla iki eşit parçaya ayrıldı. Sağ cerebellum elektron mikroskop çalışması için hazırlandı.

Bunun için sağ yarı medial'den başlanarak arbor vitae görüntüsünü içeren ortalama 1 mm kalınlığında sagittal planda 4 parça kesildi. Kesilen her bir parça tekrar 4 parçaya bölündü ve I-V. lobülleri içeren kısım kesilip elektron mikroskop için 4 şeride ayrılarak küçültüldü.

Hazırlanan şeritler daha sonrasında 20 ml gluteraldehit+PBS solüsyonu bulunan şişelere aktarıldı. Ardından şişeler buzdolabında +4°C'de bir gün bekletildi.

3.5.2. Dokuların yıkanması

Ertesi gün örneklerdeki glutaraldehit'i uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem sırasında fiksatif şişeden boşaltılıp yerine PBS eklendi. 15 dk +4°C buzdolabında beklendi. Bu işlem üst üste 3 kez tekrarlandı.

3.5.3. Osmium tetroksit (OsO_4) fiksasyonu

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra organ şişelerinde bulunan PBS boşaltıldı; ardından şişeye 1 ml osmium tetraoksit solüsyonu eklendi. Sonra karanlık bir ortamda şişeler rotator'a konarak 2 saat boyunca osmium tetroksit solüsyonunun doku içine nüfuz etmesi sağlandı. 2 saat sonunda yine 3 kez PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Son olarak şişelere bol miktarda PBS eklenerek +4°C buzdolabına kaldırıldı.

3.5.4. Dehidratasyon

Suyun uzaklaştırılması için dokular alkol serilerinden (sırasıyla; %30'luk etil alkol'de 2 kez 15 dk., %70'lik etil alkol'de 2 kez 15 dk., %90'lık etil alkol'de 2 kez 15 dk., %96'lık etil alkol'de 2 kez 30 dk., absolu etil alkol'de 2 kez 30 dk.) geçirildi.

3.5.5. Şeffaflaştırma

Bu aşamada dokular oda sıcaklığındaki propilen oksitte ikişer kez 30'ar dk. bekletildi.

3.5.6. Resin- propilen oksit uygulaması

Dokular 1'er ml araldit ve propilen oksit karışımında 2'şer saat süreyle rotator yardımıyla döndürülülerek bütünleşmesi sağlandı.

3.5.7. Bloklama

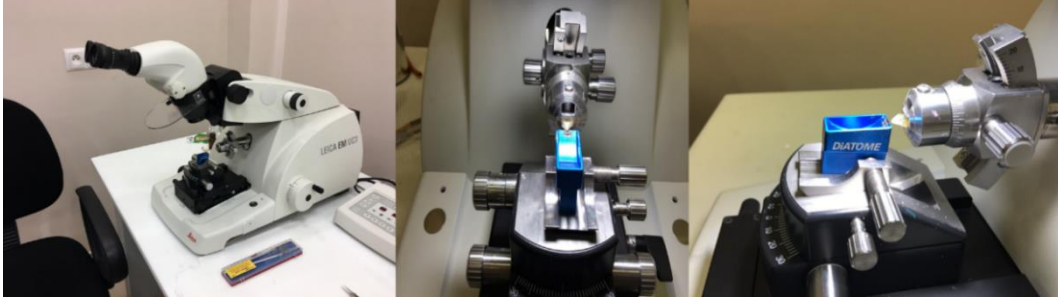
Bloklama işlemi taze hazırlanmış resin ve araldit ile gerçekleştirildi. Bloklama için hazırlanan solüsyon enjektöre çekilerek kalıplara dolduruldu.

3.5.8. Etiketleme

Etiketleme yapılırken kodlar kurşun kalem ile yazıldı. Etiket araldit karışımına batırılmış diseksiyon iğnesiyle alınıp kalıbın orta kısmının altına yerleştirildi. 60°C 48 saat polimerizasyona bırakıldı. Süre bitince 1 saat daha beklendi.

3.5.9. Yarı ince kesitlerin hazırlanması

İlk olarak Araldit blokları dokuya ulaşmak için tıraşlandı. Dokuya ulaşılnca Leica EM UC7 model ultramikrotomda cam bir bıçak yardımıyla 0,5 µm kalınlığında kesitler alınıp içinde distile su bulunan bir havuza alındı (Şekil 3.5). Tek bir saç telinden yapılmış fırça yardımıyla havuzdan alınıp Toluidin blue ile boyandı. Boyamanın ardından lam üzerine alınıp preparat haline getirildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Yarı ince kesitlerin alınmasında kullanılan Leica EM UC7 model ultramikrotom

Toluidin blue boyama

Tortu kalmaması için filtre edilen boyanın birazı petriye koyularak ısıtıldı. Havuzdan alınan yarı ince kesitler boyaya aktarıldı. Kesitlerin boyanması için 5 dk. beklendi. Ardından kesitlerdeki fazla boyanın giderilmesi için sırayla içinde distile su olan 3 petriden geçirildi. Kesit petriden alınarak üzerinde 1 damla distile su bulunan ısıtılmış bir lam üzerine alındı (Sıcaklık sayesinde kesit lama fikse olur).

3.5.10. Elektron mikroskopu için ultra-ince kesitlerin alınması

Işık mikroskopunda incelenecek bölgeler belirlendikten sonra aynı bloklar tıraşlanarak küçültüldü. 60 nm kalınlığında ultra ince kesitler alındı.

Kesitlerin alınması için grid parlak yüzeyi üstte olacak şekilde pensle tutularak suya daldırıldı. Grid aşağıdan yukarıya doğru hareket ettirilerek su yüzeyinde bulunan kesit alındı. Bu aşamadan sonra kurutma kâğıdı üzerine alınan gridin suyunun kuruması beklendi.

Uranil asetat boyama

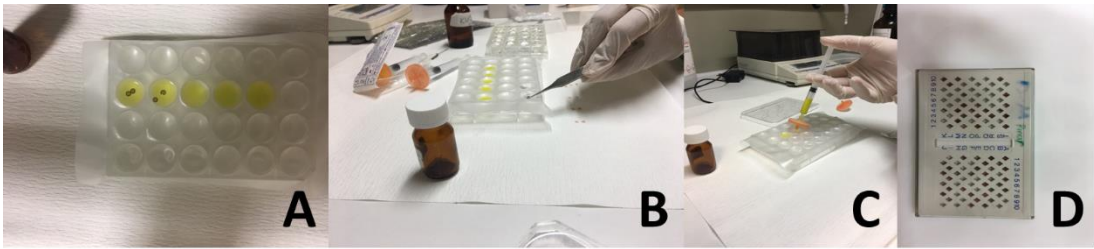
Boyama öncesi uranil asetat filtreden geçirildi. Bu sırada yip racks'ın üzerine stretch film gerilerek kuyucuklar oluşturuldu. Bu kuyucukların içerisine filtrelenmiş uranil asetat dolduruldu. Ortamın nemini almak üzere boya kutusunun dışına birkaç tane NaOH

koyuldu. Kesitler pensle kenarından tutulup gridin mat yüzü boyaya girecek şekilde yerleştirildi. Üstü kapatılıp, karanlıkta 1 saat bekletildi (Şekil 3.7 A, C).

Boyama işleminin ardından grid bu kuyucuktan alınıp boya fazlasının giderilmesi için kurutma kâğıdı üzerinde biraz bekletildi. Sonra grid kenarından tutulup 10-15 kez distile suya daldırıp çıkarmak suretiyle yıkandı.

Kurşun sitrat boyama

Oda sıcaklığında bekletilen boya filtreden geçirilerek süzüldü. 2 dk'lık boyama işlemi sonrası grid distile suda yıkandı ve kurutma kağıdına alındı. Boyama işleminin ardından grid kutusuna yerleştirildi (Şekil 3.7 (A, B, C, D)).



Şekil 3.6. Elektron mikroskop boyama prosedürü
A. Uranil asetat boyama, B. Kurşun sitrat boyama, C. Boyaların filtrelenmesi, D. Boyanan kesitlerin muhafazası

3.6.Morfometrik Analizler

3.6.1. Vücut ağırlıklarının ölçülmesi



Şekil 3.7. Hayvan tartımı

Sprague-Dawley sıçanlar enjeksiyon ve cerrahi işlem öncesinde tartılıp ağırlıkları kaydedildi (Şekil 3.7).

3.6.2. *Beyin ağırlıklarının ölçülmesi*

Sıçanların beyni tüm bağlantılar kesilip kafatasından çıkarıldıktan sonra hassas terazide tartılıp ağırlıkları kaydedildi (Şekil 3.8).



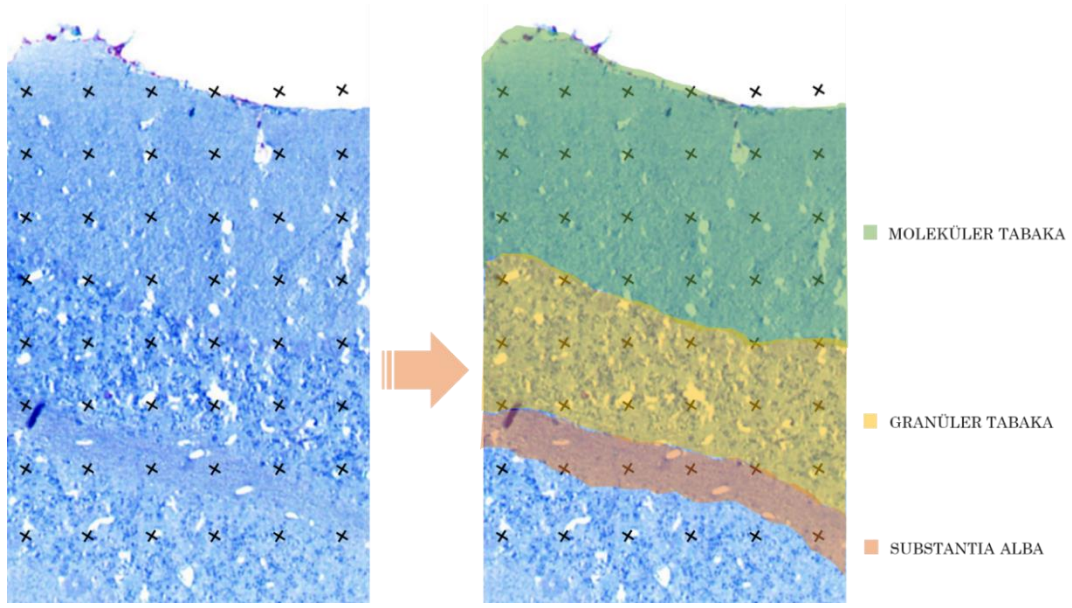
Şekil 3.8. Beyin ağırlığı tartımı

3.6.3. *Cerebellum ağırlıklarının ölçülmesi*

Sıçanların beyin tartımının ardından cerebellum'larının diğer dokularla bağlantısı kesildi ve ağırlıkları tartılıp kaydedildi.

3.6.4. *Cerebellar substantia alba / cortex cerebelli hacim oranının (V_V) hesaplanması*

Bu hesaplama Nikon Eclipse E400 çizim tüpü ataşmanlı mikroskopta cerebellum'un I-V. lobüllerini içeren yarı ince kesitler incelenerek yapıldı. Kesitler 20x objektif kullanılarak; cerebellum'un folium'larındaki tüm yapıların görüntülenmesi sağlandı ve örneklenen alanlara noktalı grid rastgele bir şekilde atıldı. Folia'nın substantia alba tabakasına düşen toplam nokta sayısı, cortex cerebelli'ye düşen toplam nokta sayısına bölünerek, cerebellar substantia alba / cortex cerebelli hacim oranı (V_V) hesaplandı (Şekil 3.9).



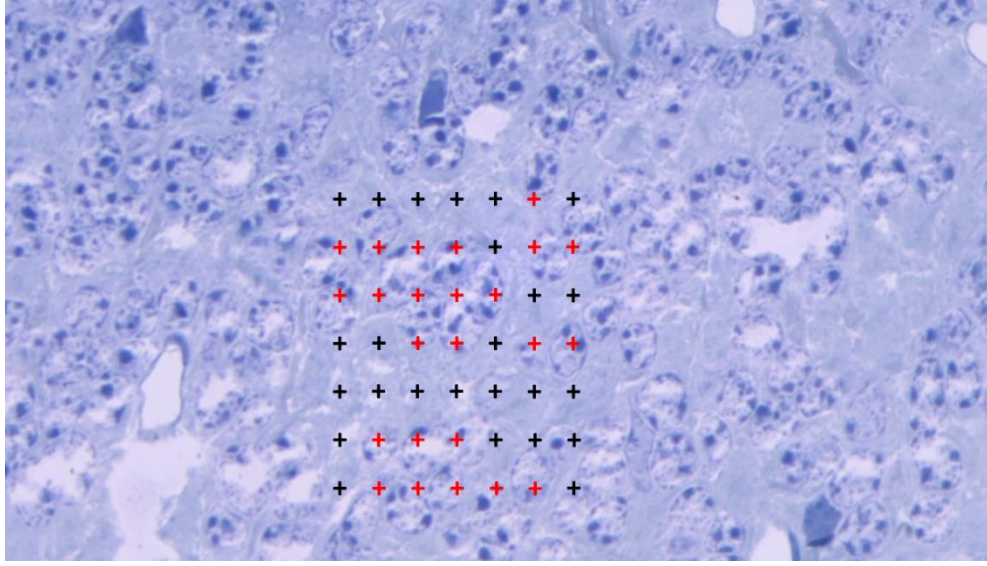
Şekil 3.9. Cerebellar substantia alba / cortex cerebelli oranı (V_v)
(Burada substantia alba ve tüm cortex cerebelli'ye düşen nokta sayıları sırasıyla, 5, 35'tir.)

3.6.5. *Cerebellar granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranının (V_v) hesaplanması*

Bu hesaplama Nikon Eclipse E400 çizim tüpü atışmanlı mikroskopta cerebellum'un I-V. lobüllerini içeren yarı ince kesitler incelenerek yapıldı. Kesitler 20x objektif kullanılarak; cerebellum'un folium'larındaki tüm yapıların görüntülenmesi sağlandı ve örneklenen alanlara noktalı grid rastgele bir şekilde atıldı. Folia'nın granüler tabakasına düşen toplam nokta sayısı, cortex cerebelli'ye düşen toplam nokta sayısına bölünerek; cerebellar granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranı (V_v) hesaplandı (Şekil 3.9).

3.6.6. *Granül hücresi nükleusları / granüler tabaka hacim oranının (V_v) hesaplanması*

Hesaplama için yarı ince kesitler Nikon Eclipse E400 çizim tüpü atışmanlı mikroskopta 100x objektifte incelendi. Bunun için 7x7'lik grid kullanıldı ve nokta sayımları sistematik örnekleme yöntemiyle 10 farklı alanda gerçekleştirildi. Toplam 49 noktanın kaç tanesinin granül hücrelerinin üzerine düştüğü sayıldı ve sonuçta bu sayı 49'a bölünerek granül hücresi nükleusları / granüler tabaka hacim oranı saptandı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Granül hücresi nükleusları / granüler tabaka oranı (V_V)
 ($V_V = 24/49 = 0,49$. Burada, granül hücresi üzerine düşen noktalar kırmızıyla gösterilmiştir. 100x objektif)

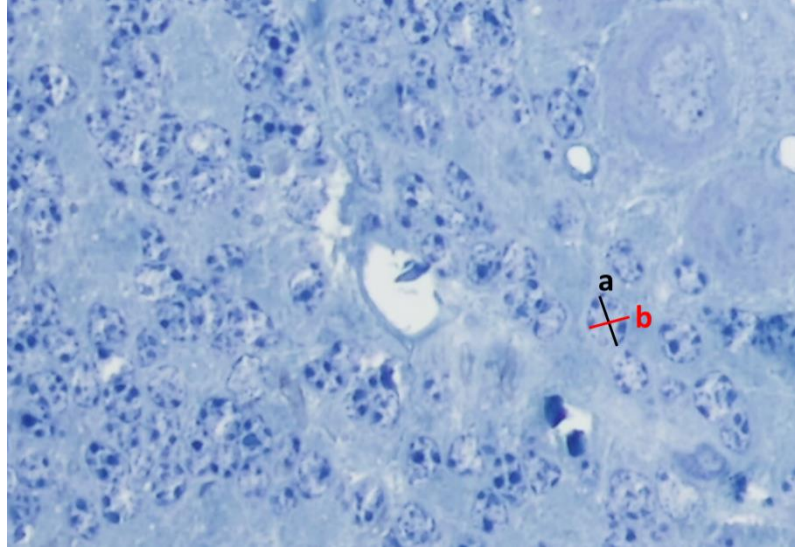
3.6.7. Granül hücresi ortalama nükleus çapının hesaplanması

Nicon Eclipse E400 çizim tüpü ataşmanlı mikroskopta yarı-ince kesitlerde 100x büyütmede, yaklaşık 200-300 adet granül hücrelerinin nükleus'ları tarafsız sayım çerçevesi kullanarak; sistematik random sampling yoluyla kâğıda çizildi. Çizilen hücrelerin nükleus'larının uzun ve kısa (a ve b) eksenleri bir cetvel yardımıyla ölçüldü (Şekil 3.12). Her bir uzunluğun gerçek değerinin bulunabilmesi için büyütme değerine bölündü. Daha sonra ortalama çap formülü kullanarak ortalama nükleus çapları hesaplandı (Şekil 3.11) (Gundersen, 1977).

$$\bar{D} = \sqrt{axb}$$

- \bar{D} = Granül hücresi ortalama nükleus çapı
- a = Uzun eksen
- b = Kısa eksen

Hesaplanan değer mm cinsinden olduğu için μm 'ye çevrildi (1 mm = 1000 μm).

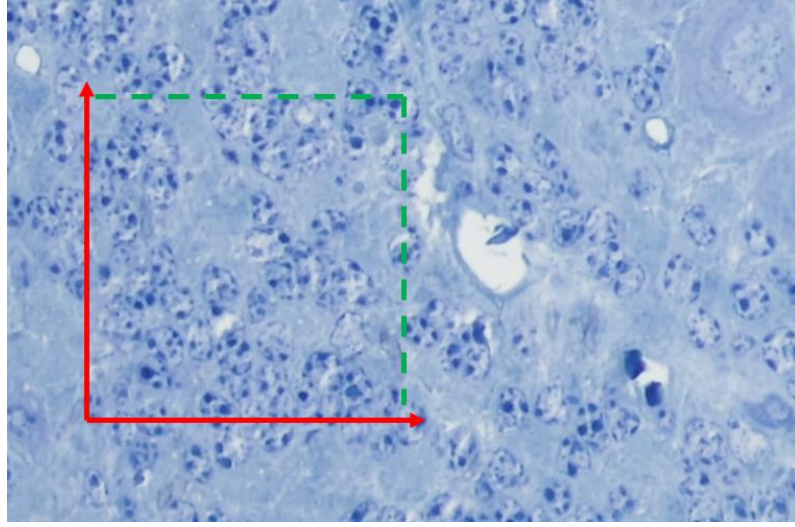


Şekil 3.11. Granül hücresi ortalama nükleus çapı hesabı
(a ve b: ölçüm yapılan eksenler; 40x objektifte çekildi)

3.6.8. *Granül hücresi numerik densitesinin (N_{Vg}) hesaplanması*

3.6.8.1. *Granüler tabakaya göre*

Granüler tabakaya göre granül hücrelerinin numerik densitesini hesaplamak için öncelikle birim alana düşen granül hücresi nükleus sayısı (N_{Ag}) hesaplandı. Bunun için ebatları belirli bir tarafsız sayım çerçevesi kullanıldı. Çerçevenin birim alanı hesaplanırken, büyütme faktörü dikkate alınır. Daha sonra sistematik örnekleme yöntemiyle bu çerçeve alana düşen granül hücresi nükleusları sayıldı. Sayımlarda kural olarak, çerçevenin sağ ve üst kenarları üzerine düşen nükleus'lar sayıma dahil edilirken; sol ve alt kenarlara düşen nükleus'lar sayıma dahil edilmez. Farklı çerçeve alanlarda sayılan nükleus'ların ortalaması alınarak; birim çerçeve alanına düşen nükleus sayısı hesaplanmış olur. Bu değerden yola çıkarak; basit bir oranlama ile mm^2 alana düşen nükleus sayısı (N_{Ag}) ortaya kondu. Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak granül hücrelerinin granüler tabakaya göre numerik densitesi saptandı (Underwood, 1970).



Şekil 3.12. Sayımlarda kullanılan tarafsız sayım çerçevesi
(40x objektif)

$$N_{Vg} = N_{Ag} / (\bar{D} + t)$$

Burada:

- N_{Vg} = Granül hücresi numerik densitesi
- N_{Ag} = Birim alana düşen granül hücresi nükleus sayısı
- \bar{D} = Granül hücresi ortalama nükleus çapı
- t = kesit kalınlığı

3.6.8.2- *Cortex cerebelli*'ye göre

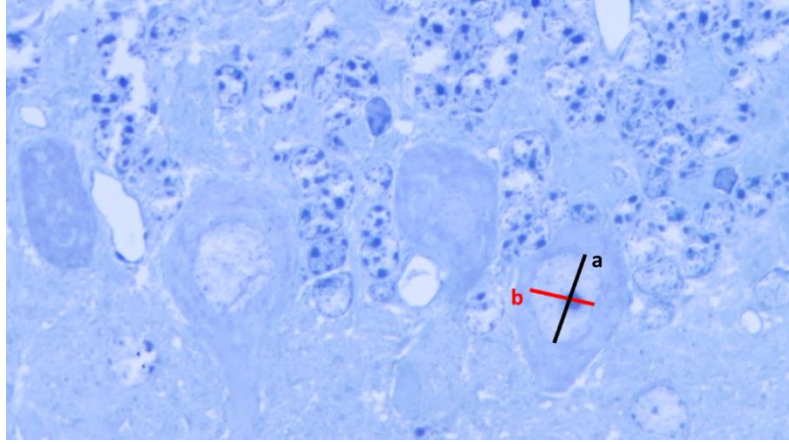
Bu değeri elde etmek için daha önce hesaplanmış olan granüler tabakaya göre granül hücrelerinin numerik densitesi, granüler tabakanın cortex cerebelli'ye olan hacim oranı (V_v) ile çarpıldı.

3.6.9. *Purkinje hücresi ortalama nükleus çapının hesaplanması*

Granül hücre nükleus hesabında olduğu gibi 100x büyütmede çizim tüpü ataşmanlı mikroskopta yarı-ince kesitler üzerinde yapıldı. Purkinje hücre hattında bulunan ve nükleolus'u görünen hücre nükleus'ları sayıma dahil edildi. Purkinje hücresi nükleus'larının uzun (a) ve kısa (b) eksenleri ölçüldü ve bu değerler büyütmeye bölünerek gerçek değerleri saptandı ve aşağıdaki formülle ortalama nükleus çapları hesaplandı (Şekil 3.13).

Formül; $\bar{D} = \sqrt{axb}$

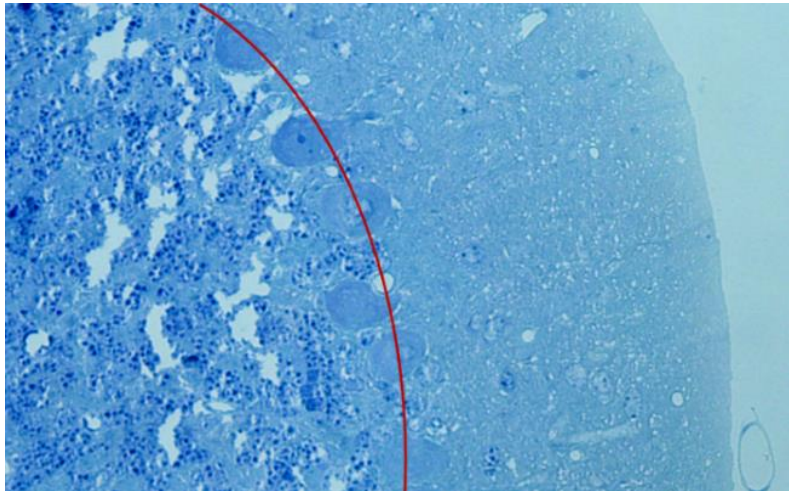
- \bar{D} = Ortalama Purkinje hücre çapı
- a = Büyük eksen
- b = Küçük eksen



Şekil 3.13. Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı hesaplanması
(a: uzun eksen, b kısa eksen, 100x objektif)

3.6.10. Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısının (N_{BP}) hesaplanması

Nicon Eclipse E400 çizim tüpü ataşmanlı mikroskopta 20x büyütmede Purkinje hücrelerinin nükleus'larının tam ortasından geçen Purkinje hücre hattı kâğıda çizildi ve bu hat üzerine düşen Purkinje hücreleri sayıldı (Şekil 3.14). Bu hattın uzunluğu kullanılan mikrometre yardımıyla bulunan, büyütme dikkate alınarak hesaplandı. Daha sonra birim uzunluğa (mm) düşen Purkinje hücre sayısı basit orantı kurularak bulundu.



Şekil 3.14. Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı (N_{BP})
(20x objektif)

3.6.11. Purkinje hücresi numerik densitesinin (N_{VP}) hesaplanması

Purkinje hücresi numerik densitesi hesabında granül hücresi numerik densitesi'nde kullanılan aynı formül uygulanır.

$$N_{VP} = N_{AP} / (\bar{D} + t)$$

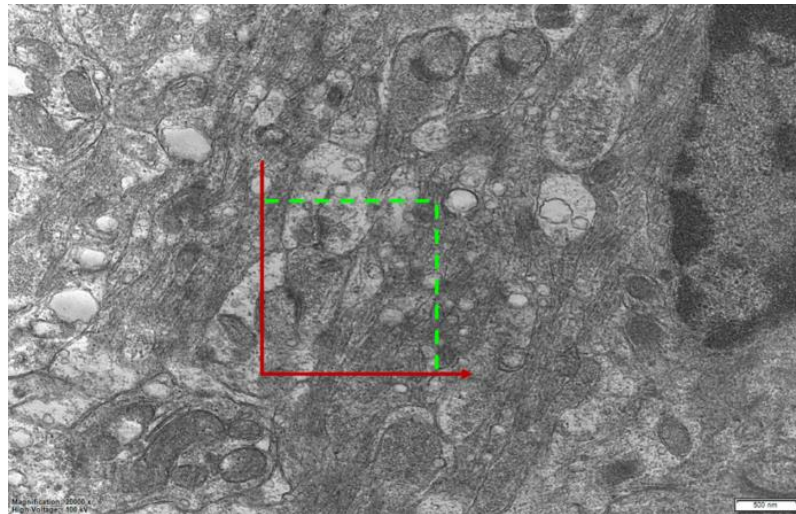
- N_{VP} = Purkinje hücresi numerik densitesi
- N_{AP} = Birim alana düşen Purkinje hücre sayısı
- \bar{D} = Ortalama Purkinje hücresi nükleus çapı
- t = kesit kalınlığı

3.6.12. Granül hücresi / Purkinje hücresi oranının hesaplanması

Bu oran cortex cerebelli'ye göre granül hücresi numerik densitesinin Purkinje hücresi numerik densitesi'ne bölünmesiyle elde edildi.

3.6.13. Birim alana düşen sinaps sayısının (N_{As}) hesaplanması

Bu hesaplama için ultra-ince kesitlerden elde edilen elektron mikroskop görüntüleri üzerinde çalışıldı. Bilgisayar ekranında yer alan görüntü üzerine $7 \times 7 \text{ cm}^2$ ebatlarındaki tarafsız sayım çerçevesi sistematik rastgele örnekleme yöntemine göre görüntünün üzerine atıldı (Şekil 3.15). Bu çerçevenin içerisine düşen ya da serbest kenarına değen sinapslar sayıldı. Büyütme hesaba katılarak çerçevenin bir kenarının gerçek uzunluğu saptandı. Ardından gerçek uzunluğun karesi alınarak alanı hesaplandı. Yapılan her sayım için sinaps sayısı çerçeve alanına bölünmek suretiyle birim alana düşen sinaps sayısı ortaya kondu.



Şekil 3.15. Birim alana düşen sinaps sayısının hesaplanması

3.6.14. Sinaptik disklerin görüntüye düşen ortalama yükseklik değerlerinin (nm) hesaplanması

Sinapsların disk şeklinde olması sebebiyle; TEM görüntüleri üzerinden daha önce ($\bar{D} = \sqrt{axb}$) formülüyle hesaplanan sinaptik disklerin ortalama çapı ($\bar{D} = \sqrt{axb}$) $\frac{\pi}{4}$ ile çarpılarak; sinaptik disklerin görüntüye düşen ortalama yükseklik değerleri (H) hesaplandı (Underwood, 1970).

3.6.15. Sinapsların numerik densitesinin (N_{Vs}) hesaplanması

3.6.15.1. Nöropil alana göre

Nöropil alana göre sinapsların numerik densite'lerini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Underwood, 1970).

Buna göre:

$$N_{Vs} = N_A / (H^- + t)$$

- N_{Vs} = Sinapsların numerik densitesi
- N_A = Birim alana düşen sinaps sayısı
- H^- = Ortalama sinaptik disk yüksekliği ($\bar{D} \times \frac{\pi}{4}$)
- \bar{D} = Ortalama disk çapı
- t = kesit kalınlığı

3.6.15.2. Granüler tabakaya göre

Cerebellum'da daha önce sayılan sinapsların nöropil alanında olması, buna karşın sinaps / nöron oranında kullanılacak granül hücresi nükleuslarının numerik densitelerinin granüler tabakaya göre hesaplanmış olması sebebiyle; sinapsların numerik densitelerinin de granüler tabakaya göre hesaplanmasını gerektirdiğinden; granül hücresi nükleuslarının granüler tabakaya olan V_v değerlerinin, granüler tabakanın tamamının 1 olarak kabul edilip, 1'den çıkarılmasını ve çıkan sonucun nöropil alana göre elde etmiş olduğumuz değerlerle çarpılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu durumda, öncelikle granül hücresi nükleuslarının granüler tabakaya olan V_v değerleri 1'den çıkarıldı. Çıkan sonuç nöropil alana göre elde etmiş olduğumuz sinapsların numerik densitesi değerleri ile çarpılarak; granüler tabakaya göre sinapsların numerik densiteleri (N_{Vs}) hesaplandı.

3.6.16. Sinaps/nöron oranı (granüler tabakaya göre N_{Vs} / granüler tabakaya göre N_{Vg})

Cerebellum'da sayımı gerçekleştirilmiş olan granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesinin yine granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesine oranlanmasıyla hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi için "GraphPad Prism 5" istatistik programı kullanılarak nonparametrik "t testi" %95 güven aralığında uygulandı. Anlamlılık değerlendirmesinde " $p < 0,05$ = istatistiksel olarak anlamlı", " $p < 0,005$ = istatistiksel olarak oldukça anlamlı", " $p < 0,001$ = istatistiksel olarak çok anlamlı" ifadeleri kullanıldı. Tüm veriler "ortalama \pm standart sapma" şeklinde verilmiştir.

4. BULGULAR

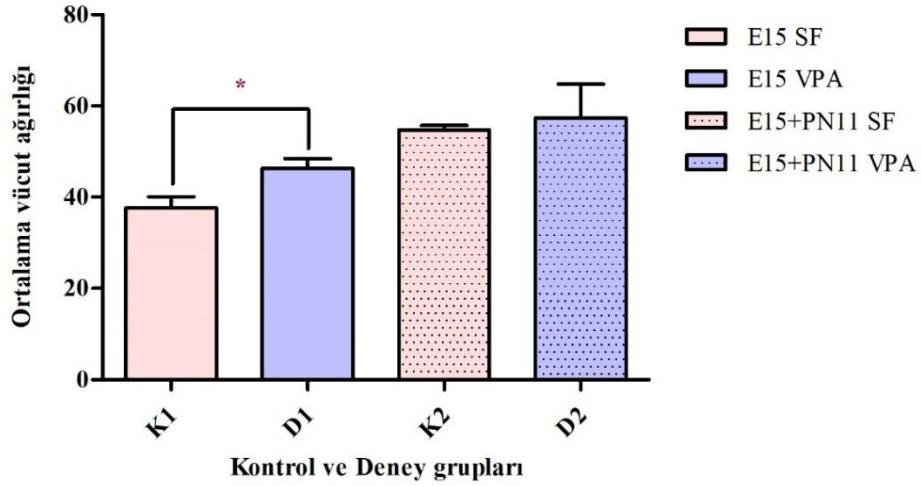
4.1. Ortalama Vücut Ağırlığı

Çalışmamızda embriyonal 15. günde (E15) tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) ortalama vücut ağırlıkları E15. günde aynı miktar bir kez SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %23 oranında arttı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=1,30; p<0,05). Buna göre K1 grubu sıçanların ortalama vücut ağırlığı 37,64±2,46 g iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda 46,28±2,16 g olarak hesaplandı. Buna karşın, E15. ve PN11. günlerde (PN11) birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda ortalama vücut ağırlığı E15. ve PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi (F=61,63; p=0,93). Bu grupta ortalama vücut ağırlığı 55,38±8,17 g iken, yaşıt kontrollerinde bu değer 54,69±1,04 g olarak saptandı (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama vücut ağırlıkları (g)

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	8	37,64 ± 2,46	8	46,28 ± 2,16	%23*
E15+PN 11	8	54,69 ± 1,04	8	55,38 ± 8,17	%1

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı. *p<0,05)



Şekil 4.1. Kontrol ve deney grubu sıçanlarına ait vücut ağırlığı (g) grafiği (*=p<0,05)

4.2. Ortalama Beyin Ağırlığı

Çalışmamızda ortalama beyin ağırlıkları E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) ve hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanların E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup yaşıtlarına (K2 grubu) göre karşılaştırıldı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (K1-D1; F=3,16; p=0,06; K2-D2; F=9,25; p=0,44) Buna göre ortalama beyin ağırlıkları K1 grubu sıçanlarında $1279 \pm 14,19$ mg, D1 grubu sıçanlarında $1338 \pm 25,22$ mg, K2 grubu sıçanlarında $1336 \pm 24,61$ mg ve D2 grubu sıçanlarında $1399 \pm 74,84$ mg olarak hesaplandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama beyin ağırlığı (mg)

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	8	$1279 \pm 14,19$	8	$1338 \pm 25,22$	%5
E15+PN 11	8	$1336 \pm 24,61$	8	$1399 \pm 74,84$	%5

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı)

4.3. Ortalama Cerebellum Ağırlığı

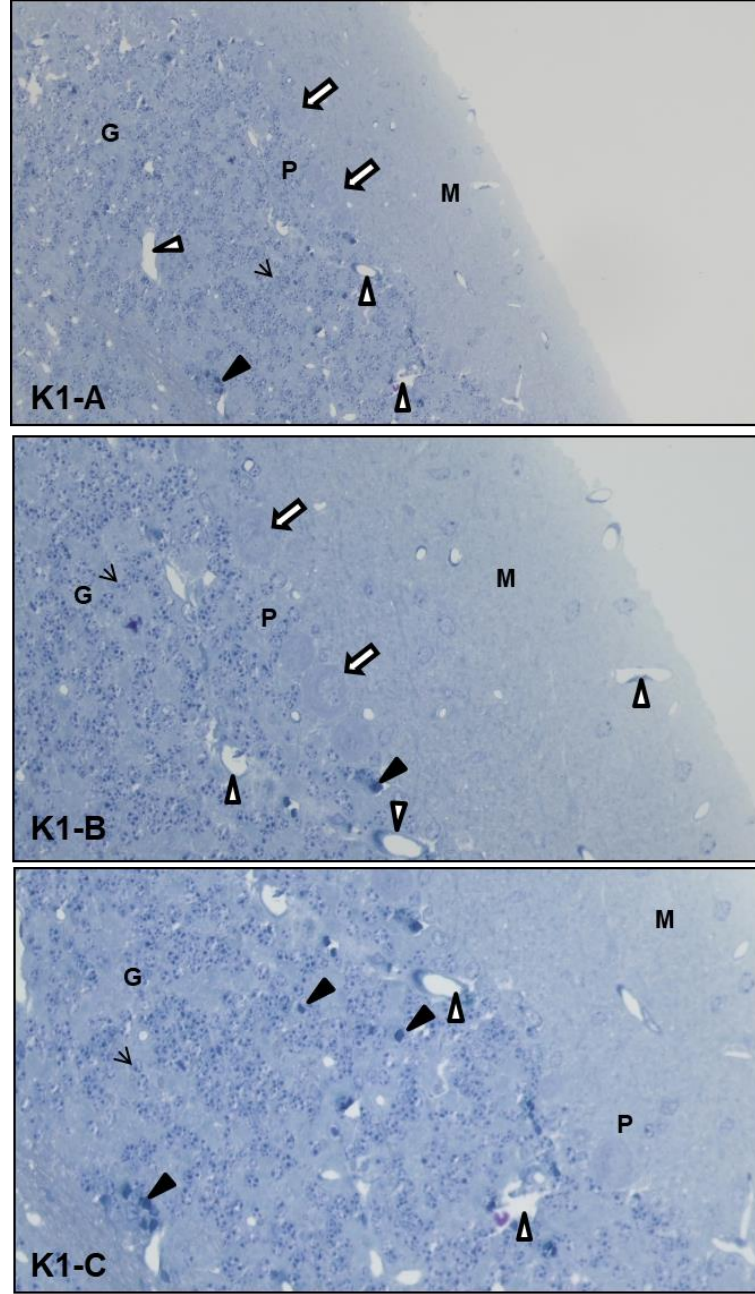
Çalışmamızda ortalama cerebellum ağırlıkları E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) ve hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanların E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup yaşıtlarına (K2 grubu) göre karşılaştırıldı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (K1-D1; F=1,07, p= 0,10; K2-D2; F=1,40, p=0,32) Buna göre ortalama cerebellum ağırlığı K1 grubu sıçanlarında $177,10 \pm 4,97$ mg, D1 grubu sıçanlarında $189,40 \pm 4,80$ mg, K2 grubu sıçanlarında $191,60 \pm 5,56$ mg ve D2 grubu sıçanlarında $182,80 \pm 6,57$ mg olarak hesaplandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama cerebellum ağırlıkları (mg)

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	8	$177,10 \pm 4,97$	8	$189,40 \pm 4,80$	%7
E15+PN 11	8	$191,60 \pm 5,56$	8	$182,80 \pm 6,57$	%5

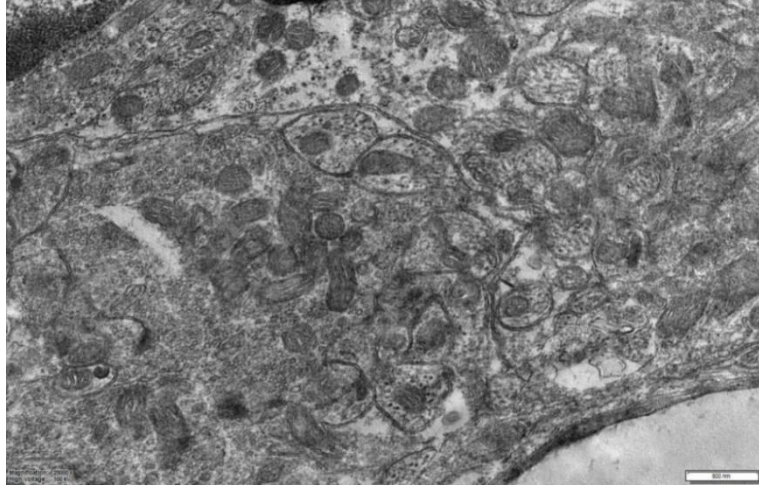
(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı)

E15. günde tek doz SF verilen ve PN30. günde cerebellum'ları alınarak yarı ince kesitleri incelenen grupta (K1) cortex cerebelli normal histolojik yapısında gözlemlendi. Yapılan ışık mikroskopu incelemelerinde: Purkinje hücrelerinin normal morfolojik görünümünü korudukları, buna karşın granüler tabakada yer alan granül hücreleri arasında birkaç nekrotik hücre görüldü. Ayrıca, moleküler ve granüler tabakalarda damar dilatasyonu izlendi (Şekil 4.2).



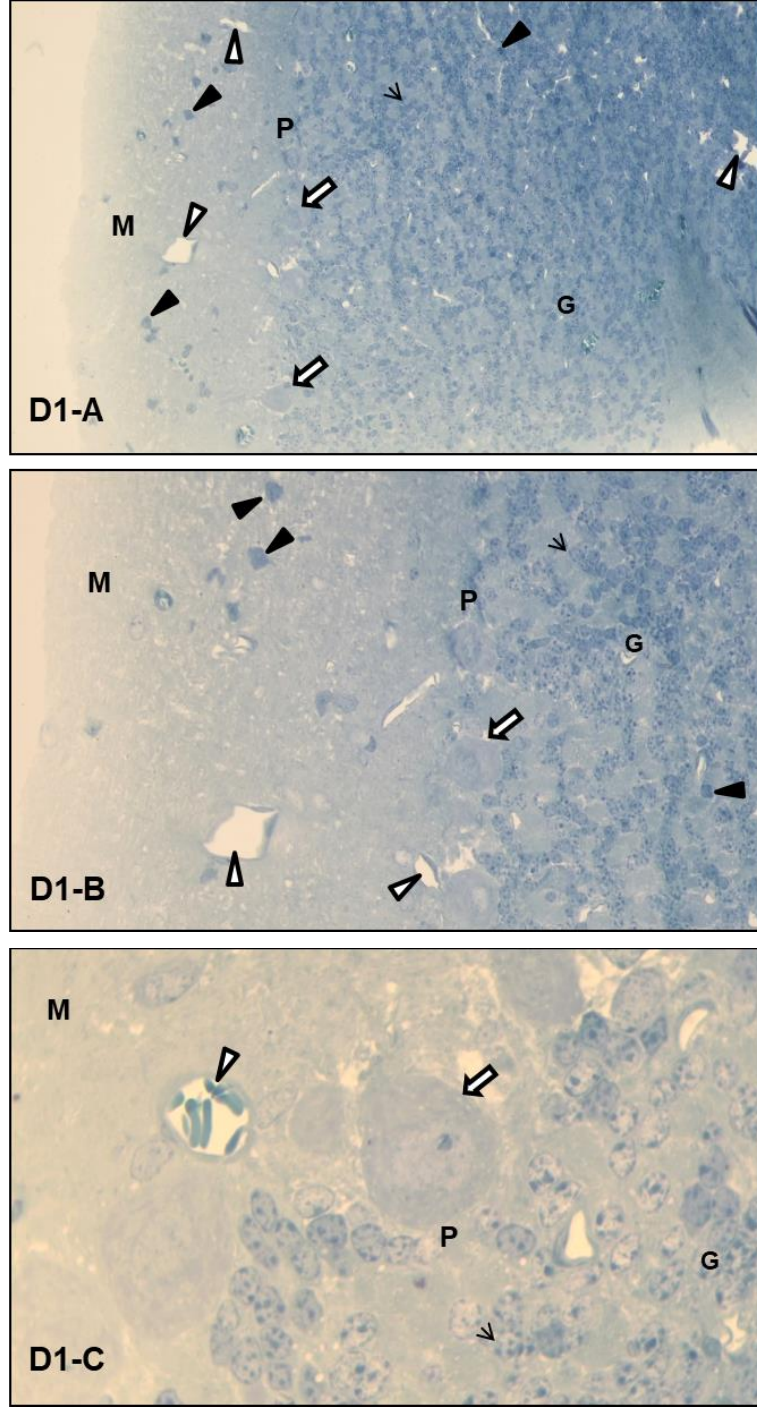
Şekil 4.2. Kontrol grubu 1'e ait yavru sıçanların cerebellum'larının farklı büyültmelerdeki yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri
(Toluidin blue. Her bir grup için 1. resim 20x, 2. Resim 40x ve 3. resim 100x objektifte çekilmiştir. Purkinje hücre tabakası; P, Purkinje hücre; ⇨, Moleküler tabaka; M, Granüler tabaka; G, damar dilatasyonu; ▽, nekrotik hücre; ▲;Granül hücresi; →)

Bu grubun TEM görüntüleri incelendiğinde: granüler tabakanın genel olarak düzenli bir görünüme sahip olduğu ve bu tabakada bulunan granül hücre nükleus'larının düzenli ve ökromatik oldukları ve stoplazmalarında bol miktarda düzenli şekilli mitokondri içerdikleri gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kontrol grubu 1'e ait TEM görüntüsü

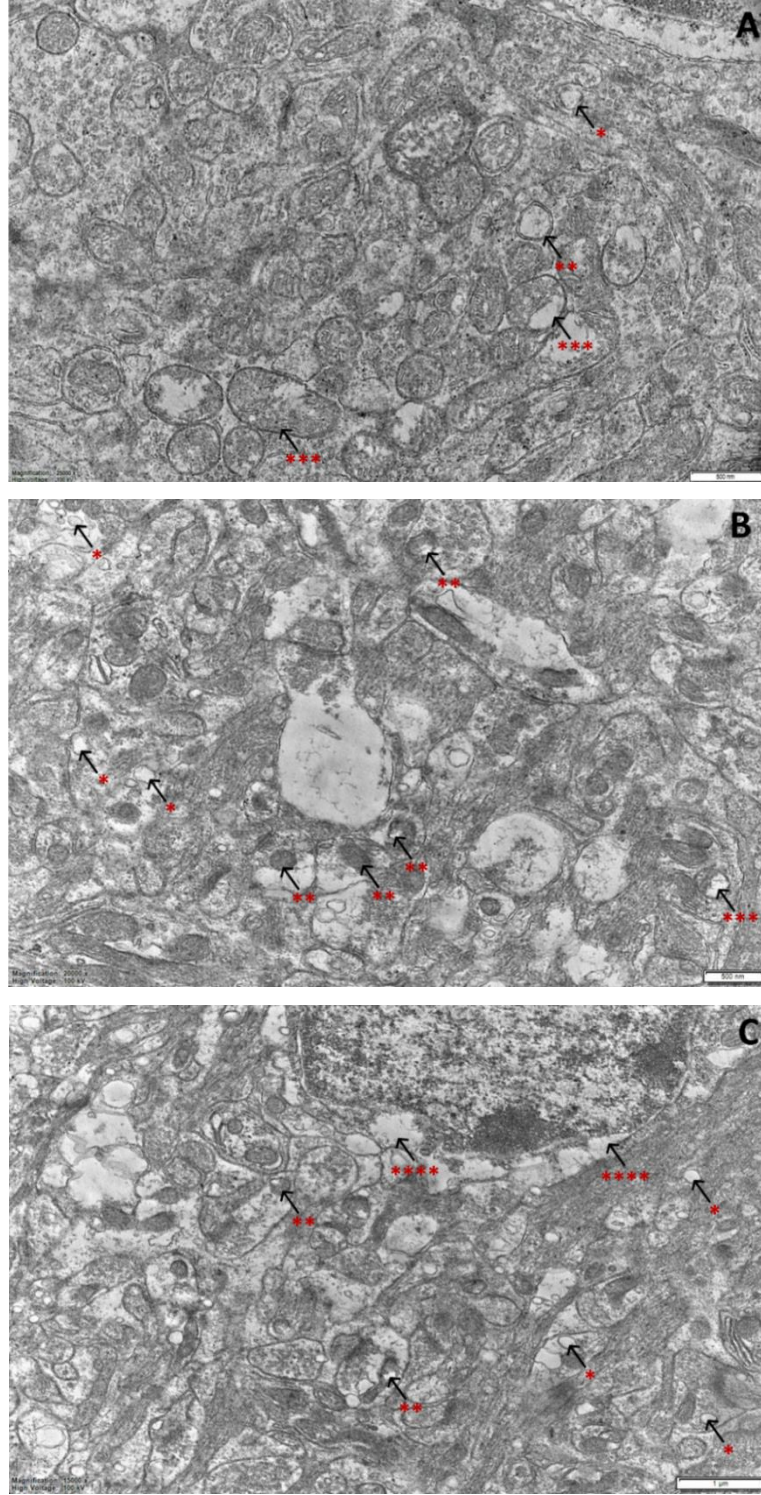
E5. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen yavru sıçanların bulunduğu bu grupta (D1) sıçan cerebellum'larında Purkinje hücreleri normal morfolojide görüldü. Moleküler ve granüler tabakalarda yoğun damar dilatasyonu ile çok sayıda nekrotik hücre izlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Deney grubu 1'e ait yavru sıçanların cerebellum'larının farklı büyültmelerdeki yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri (Toluidin blue. Her bir grup için 1. resim 20x, 2. Resim 40x ve 3. resim 100x objektifte çekilmiştir. Purkinje hücre tabakası; P, Purkinje hücresi; ⇨, Moleküler tabaka; M, Granüler tabaka; G, damar dilatasyonu; ▷, nekrotik hücre; ►;Granül hücresi; →)

Bu grubun TEM görüntüleri incelendiğinde: bu gruptaki hayvanların cerebellum'larının granüler tabakasında mitokondriyal erime, veziküler yapılar da dejeneratif görünüm, atipik mitokondri görünümü, mitokondriyal yırtılma ve kopmalar,

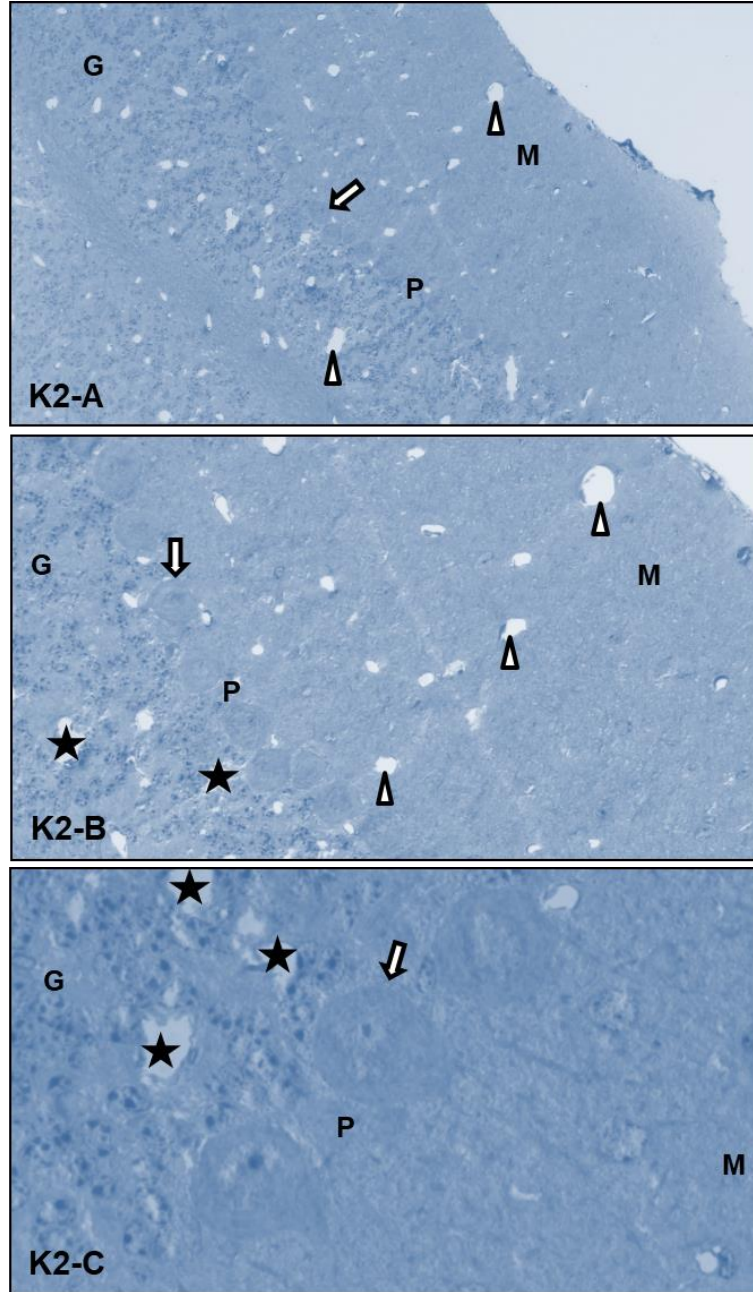
koful yapıları, mitokondri hasarları, nekrotik görünümlü alanlar, mitokondri boyutlarında küçülme, çekirdek zarında bozulma ve erimeler görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Deney grubu 1'e ait TEM görüntüsü

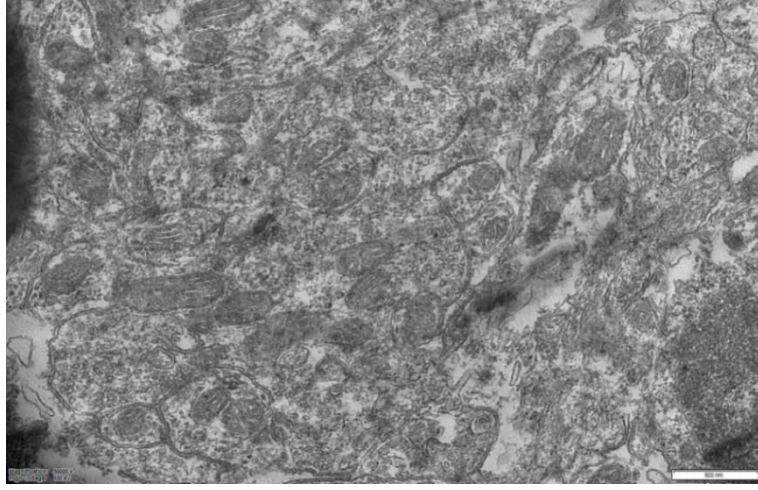
(A) Koful oluşumu, mitokondrinin iç yapısını tamamen ortadan kaldıracak şiddette mitokondriyal hasar ve mitokondriyal erimeler; (B) bol miktarda koful oluşumu, mitokondriyal hasar ve erimeler, (C) koful oluşumu, yırtılma benzeri mitokondriyal hasar ve erimelere ek olarak çekirdek zarı erimesi görülmektedir (*= koful, **= mitokondri hasarı, ***= mitokondri erimesi, ****= çekirdek zarı erimesi).

Hem E15. gün hem de PN11. günde tek doz SF verilen sıçanlardan oluşan bu grubun (K2) cerebellum'larında Purkinje hücreleri normal morfolojide görüldü. Moleküler ve granüler tabakalarda damar dilatasyonu izlendi. Özellikle granüler tabakada nekrotik hücreler ve yine birçok granül hücrelerinin etrafında da yoğun hasar görüldü (Şekil 4.6).



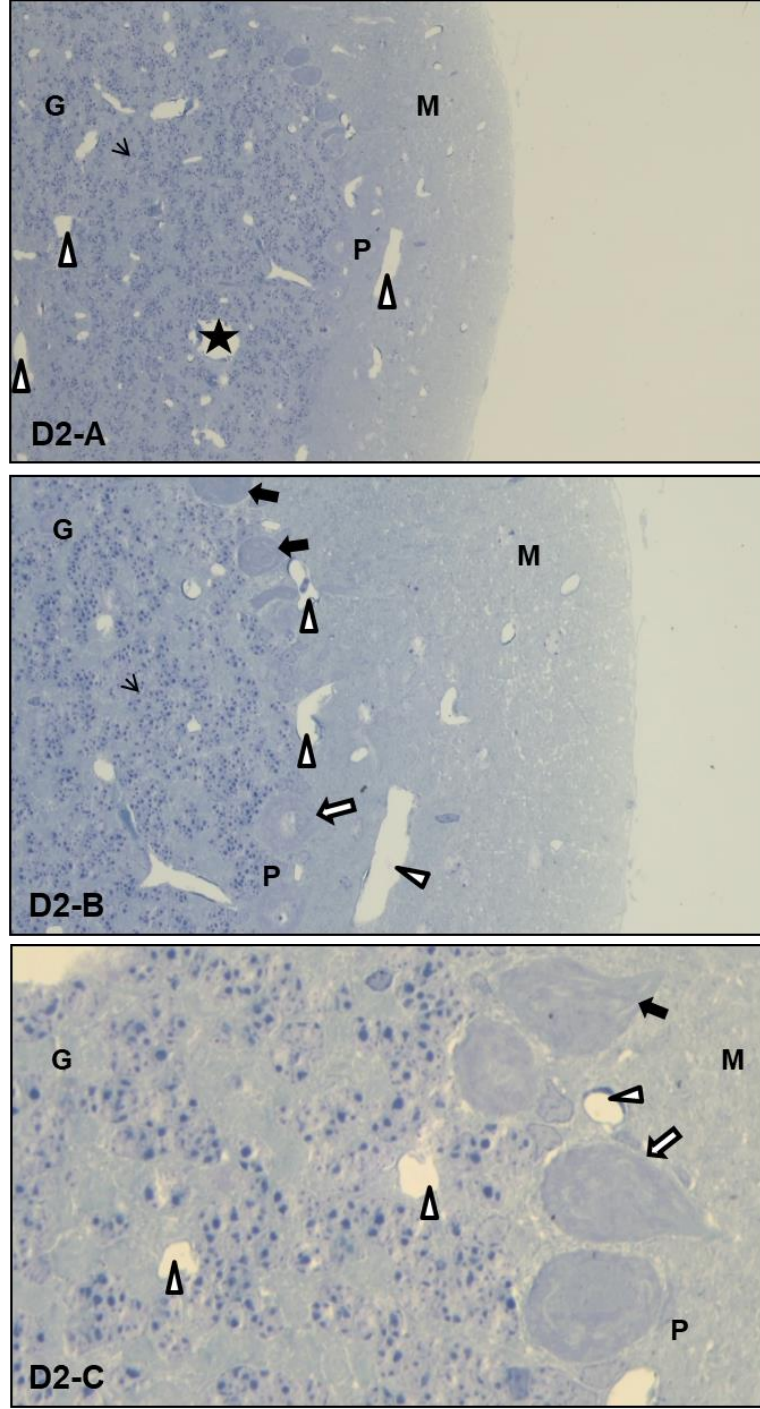
Şekil 4.6. Kontrol grubu 2'ye ait yavru sıçanların cerebellum'larının farklı büyültmelerdeki yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri (Toluidin blue. Her bir grup için 1. resim 20x, 2. Resim 40x ve 3. resim 100x objektifte çekilmiştir. Purkinje hücre tabakası; P, Purkinje hücresi; \Rightarrow , Moleküler tabaka; M, Granüler tabaka; G, damar dilatasyonu; \triangle , nekrotik hücre; \blacktriangle ; Granül hücresi; \rightarrow ; yoğun hasar \star)

Bu grubun TEM görüntüleri incelendiğinde: bu gruptaki hayvanların cerebellum'larının granüler tabakasında genel olarak düzenli ve ökromatik nükleus'lara sahip granül hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kontrol grubu 2'ye ait TEM görüntüsü

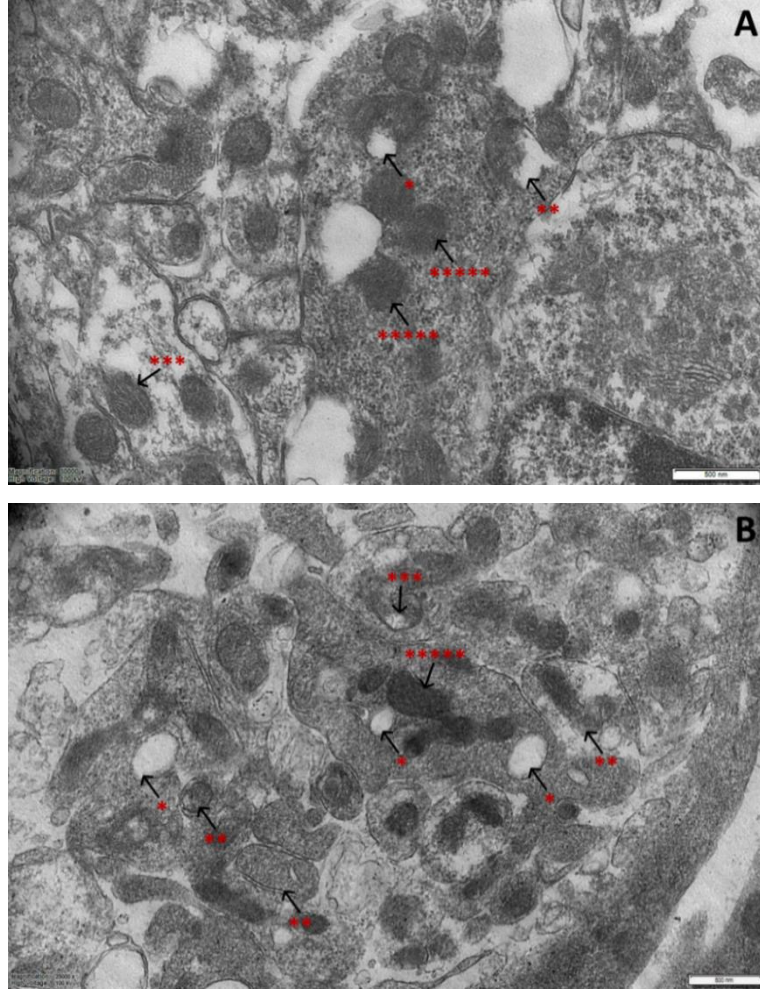
Hem E15. gün hem de PN11. günde tek doz 600 mg/kg VPA verilen sıçanlardan oluşan bu grubun (D2) cerebellum'larında Purkinje hücrelerinin bir kısmı normal morfolojide görülse de bazı Purkinje hücreleri nekrotik yapıda gözlemlendi. Granül hücreleri genel olarak normal görülse de birkaç hücre etrafında hasar görüldü. Cortex cerebelli tabakalarında damar dilatasyonu izlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Deneş grubu 2'ye ait yavru sıçanların cerebellum'larının farklı büyültmelerdeki yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri (Toluidin blue. Her bir grup için 1. resim 20x, 2. Resim 40x ve 3. resim 100x objektifte çekilmiştir. Purkinje hücre tabakası; P, Purkinje hücresi; ⇨, Moleküler tabaka; M, Granüler tabaka; G, damar dilatasyonu; ▽, nekrotik yapı Purkinje; →, nekrotik hücre; ▴; Granül hücresi, →; yoğun hasar ★)

Bu grubun TEM görüntüleri incelendiğinde: hayvanların cerebellum'larının granüler tabakasında genel olarak mitokondriyal hasar, mitokondriyal krista hasarı,

mitokondriyal zar da erimeler, kofullaşmış mitokondri gibi bulguların yanı sıra sinaptik vezikül hasarı, veziküler yapılarda artış ve koful oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Deney grubu 2'ye ait TEM görüntüsü

(A) Koful oluşumu, mitokondriyal hasar, mitokondriyal zar da erime ve elektronca yoğun görünümlü mitokondri, (B) çok sayıda koful oluşumu, krista şişmesi benzeri mitokondriyal hasar, mitokondriyal erimeler ve yine elektronca yoğun görünümlü mitokondri görülmektedir (*= koful, **= mitokondri hasarı, ***= mitokondri erimleri, *****= elektronca yoğun görünümlü mitokondri)

4.4. Cerebellar Substantia alba / Cortex cerebelli Hacim Oranı (V_v)

Çalışmamızda cerebellar substantia alba / cortex cerebelli hacim oranı E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) E15. günde aynı miktar bir kez SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) ve hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanların hem E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup yaşıtlarına (K2 grubu) göre karşılaştırıldı ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi (K1-D1; F=1,64, p=0,44; K2-D2; F=3,73, p=0,49). Buna göre K1 grubu sıçanlarının cerebellar substantia alba / cortex

cerebelli hacim oranı $0,033 \pm 0,0034$, D1 grubu sıçanlarının $0,038 \pm 0,0043$, K2 grubu sıçanlarının $0,034 \pm 0,0031$ ve D2 grubu sıçanlarının $0,039 \pm 0,0056$ olarak hesaplandı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait cerebellar substantia alba / cortex cerebelli oranı

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	8	$0,033 \pm 0,0034$	8	$0,038 \pm 0,0043$	%15
E15+PN 11	7	$0,034 \pm 0,0031$	8	$0,039 \pm 0,0056$	%15

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı)

4.5. Cerebellar Granüler Tabaka / Cortex cerebelli Hacim Oranı (V_v)

Çalışmamızda cerebellar granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranı E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) ve hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanların hem E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup yaşıtlarına (K2 grubu) göre karşılaştırıldı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (K1-D1; F=1,10, p=0,85; K2-D2; F=1,44, p=0,52). Buna göre cerebellar granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranı K1 grubu sıçanlarının $0,420 \pm 0,018$, D1 grubu hayvanlarında $0,415 \pm 0,020$, K2 grubu hayvanlarında $0,411 \pm 0,015$ ve D2 grubu hayvanlarında $0,424 \pm 0,012$ olarak hesaplandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait cerebellar granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranı

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	8	$0,420 \pm 0,018$	8	$0,415 \pm 0,020$	%1
E15+PN 11	7	$0,411 \pm 0,015$	8	$0,424 \pm 0,012$	%3

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı)

4.6. Granül Hücresi Nükleusları / Granüler Tabaka Oranı (V_v)

Çalışmamızda granül hücresi nükleusları / granüler tabaka hacim oranı E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre ve hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanların hem E15. hem de PN11. günde

birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup yaşıtlarına (K2 grubu) göre karşılaştırıldı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi (K1-D1; F=3,22, p=0,45; K2-D2; F=1,17, p=0,64). Buna göre granül hücresi nükleusları / granüler tabaka hacim oranı K1 grubu sıçanlarının $0,461 \pm 0,025$, D1 grubu hayvanlarında $0,484 \pm 0,015$, K2 grubu hayvanlarında $0,431 \pm 0,025$ ve D2 grubu hayvanlarında $0,449 \pm 0,027$ olarak saptandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granül hücresi nükleusları / granüler tabaka hacim oranı

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	8	$0,461 \pm 0,025$	7	$0,484 \pm 0,015$	%5
E15+PN 11	8	$0,431 \pm 0,025$	8	$0,449 \pm 0,027$	%4

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı)

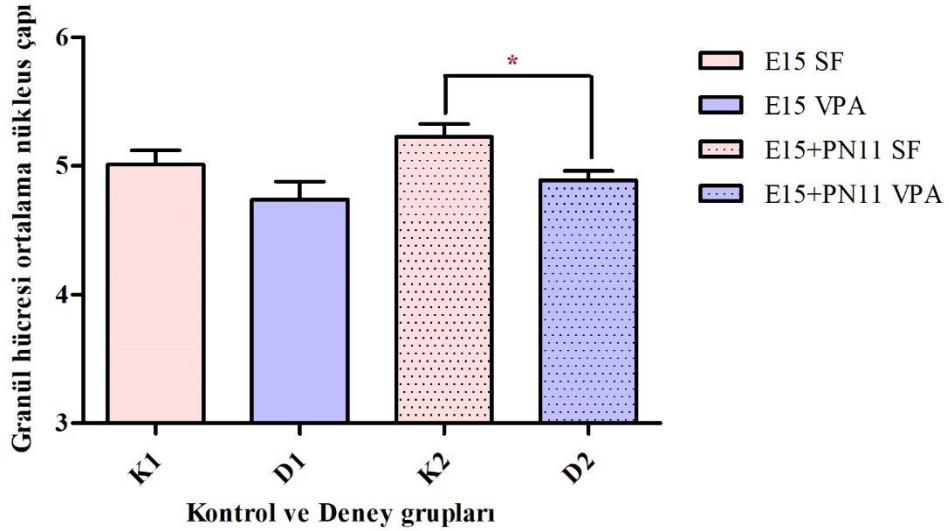
4.7. Granül Hücresi Ortalama Nükleus Çapı (μm)

Çalışmamızda hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D2 grubu) ortalama granül hücresi nükleus çapı E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K2 grubu) göre %7 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=1,61; p<0,05). Buna göre K2 grubu sıçanların ortalama granül hücresi nükleus çapı $5,23 \pm 0,10 \mu\text{m}$ iken, bu değer D2 grubu hayvanlarda $4,89 \pm 0,07 \mu\text{m}$ olarak bulundu. Buna karşın, E15. günde tek doz 600 mg/kg VPA verilen (D1 grubu) sıçanlarda ortalama granül hücresi nükleus çapı E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K1 grubu) yaşıtlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi (F=1,91, p=0,16. Bu grupta ortalama granül hücresi nükleus çapı $4,74 \pm 0,14 \mu\text{m}$ iken, yaşıt kontrollerinde bu değer $5,01 \pm 0,11 \mu\text{m}$ olarak saptandı (Tablo 4.7, Şekil 4.2).

Tablo 4.7. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granül hücresi ortalama nükleus çapı (μm)

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	6	$5,01 \pm 0,11$	7	$4,74 \pm 0,14$	%6
E15+PN 11	7	$5,23 \pm 0,10$	8	$4,89 \pm 0,07$	%7*

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı. *p<0,05)



Şekil 4.10. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granül hücresi ortalama nükleus çapı (µm) grafiği (*= $p<0,05$)

4.8. Granül Hücresi Numerik Densitesi (N_{Vg} , mm^{-3})

4.8.1. Granüler tabakaya göre

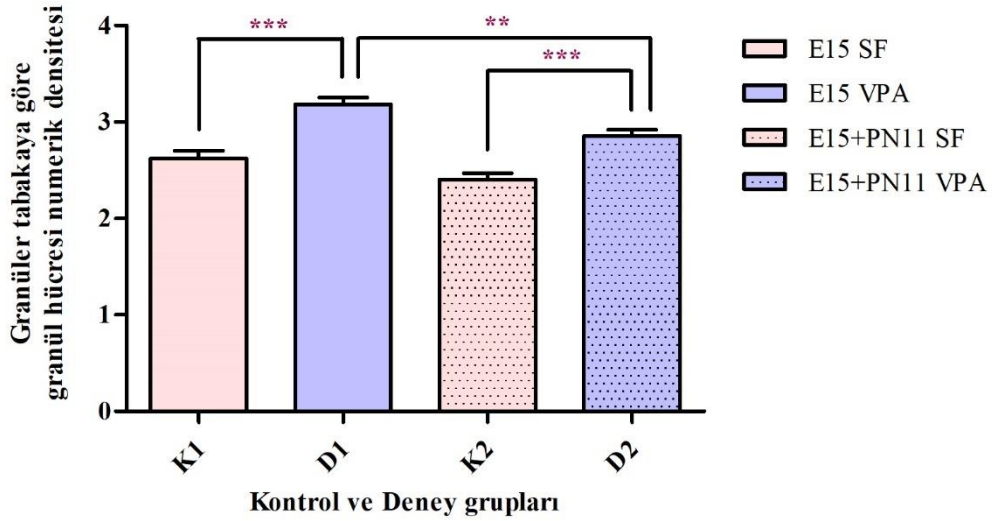
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %21 oranında arttı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=1,14$, $p<0,001$). Buna göre K1 grubu sıçanların granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi $2,62 \times 10^6 \pm 0,08 \text{ mm}^{-3}$ iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $3,18 \times 10^6 \pm 0,07 \text{ mm}^{-3}$ olarak saptandı. Bununla birlikte, hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi hem E15. hem de PN11. günde birer kez SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre %19 oranında arttı ve bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=1,12$, $p<0,001$). D2 grubunda granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi $2,86 \times 10^6 \pm 0,06 \text{ mm}^{-3}$ iken, K2 grubunda bu değer $2,41 \times 10^6 \pm 0,06 \text{ mm}^{-3}$ olarak belirlendi (Tablo 4.8, Şekil 4.3).

Ayrıca deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında D1 grubunun granüler tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi D2 grubununkinden daha fazla olduğu ve aradaki bu fark istatistiksel olarak bulundu ($F=1,138$; $p<0,005$) (Şekil 4.3).

Tablo 4.8. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüller tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi (mm^{-3})

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	6	$2,62 \times 10^6 \pm 0,08$	7	$3,18 \times 10^6 \pm 0,07$	%31***
E15+PN 11	7	$2,41 \times 10^6 \pm 0,06$	8	$2,86 \times 10^6 \pm 0,06$	%19***

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı; **p<0,005; ***p<0,001)



Şekil 4.11. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüller tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi (mm^{-3}) grafiği (**=p<0,005; ***p<0,001)

4.8.2. *Cortex cerebelli*'ye göre

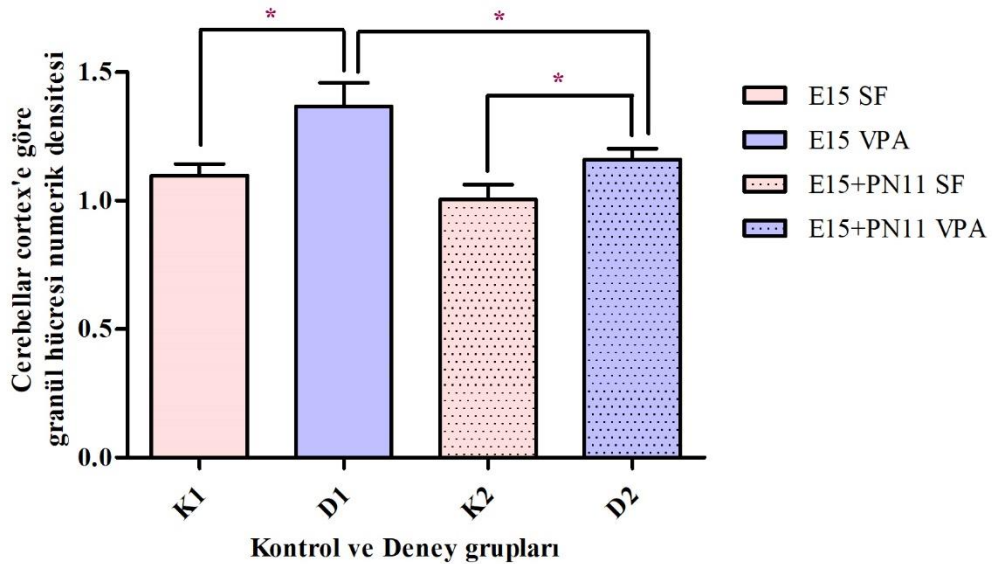
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) cortex cerebelli'ye göre granül hücresi numerik densitesi E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %25 oranında arttı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=4,37$, $p<0,05$). Buna göre K1 grubu sıçanların cortex cerebelli'ye göre granül hücresi numerik densitesi $1,37 \times 10^6 \pm 0,09 \text{ mm}^{-3}$ iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $1,57 \times 10^6 \pm 0,08 \text{ mm}^{-3}$ olarak bulundu. Bununla birlikte, hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda cortex cerebelli'ye göre granül hücresi numerik densitesi hem E15. hem de PN11. günde birer kez SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre %16 oranında artmış ve bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($F=1,72$, $p<0,05$). D2 grubunda cortex cerebelli'ye göre granül hücresi numerik densitesi $1,40 \times 10^6 \pm 0,05 \text{ mm}^{-3}$ iken, K2 grubunda bu değer $1,21 \times 10^6 \pm 0,07 \text{ mm}^{-3}$ olarak belirlendi (Tablo 4.8, Şekil 4.4).

Ayrıca deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında D1 grubunun cortex cerebelli'ye göre granül hücresi numerik densitesinin D2 grubundan fazla olduğu belirlendi. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=3,688$; $p<0,05$) (Şekil 4.4).

Tablo 4.9. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait cortex cerebelli'ye göre granül hücresi numerik densitesi (mm^{-3})

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	6	$1,10 \times 10^6 \pm 0,05$	6	$1,37 \times 10^6 \pm 0,09$	%25*
E15+PN 11	7	$1,00 \times 10^6 \pm 0,06$	8	$1,16 \pm 0,04$	%16*

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı; * $p<0,05$)



Şekil 4.12. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüller tabakaya göre granül hücresi numerik densitesi (mm^{-3}) grafiği (*= $p<0,05$)

4.9. Purkinje Hücresi Ortalama Nükleus Çapı (μm)

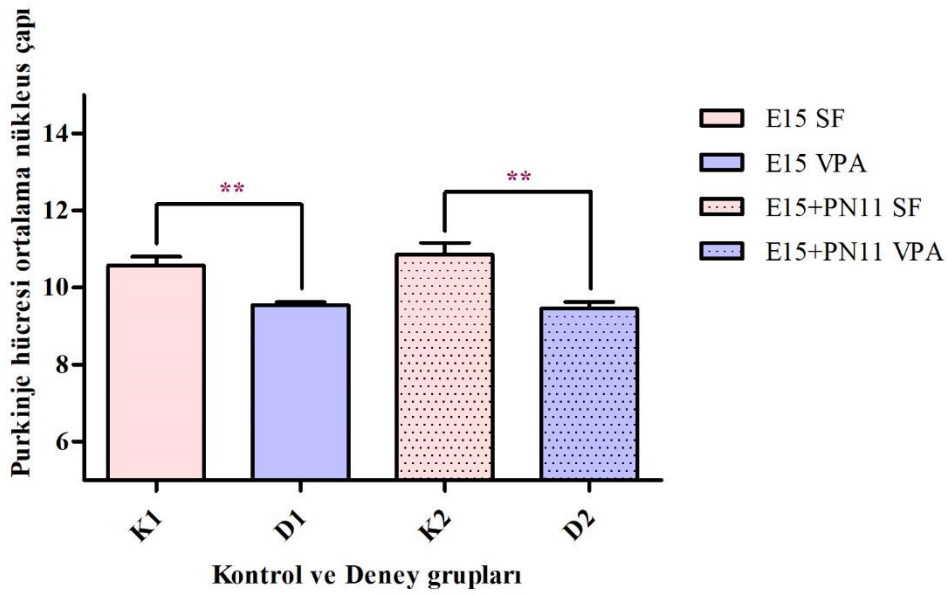
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı E15. günde tek doz aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %11 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=8,79$, $p<0,005$). Buna göre K1 grubu sıçanların Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı $10,57 \pm 0,23 \mu\text{m}$ iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $9,54 \pm 0,08 \mu\text{m}$ olarak saptandı. Bununla birlikte, hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı hem E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre

%15 azaldı ve yine bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=3,69$, $p<0,005$). D2 grubunda Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı $9,45 \pm 0,17 \mu\text{m}$ iken, K2 grubunda bu değer $10,85 \pm 0,31 \mu\text{m}$ olarak belirlendi (Tablo 4.10, Şekil 4.5).

Tablo 4.10. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı (μm)

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	6	$10,57 \pm 0,23$	6	$9,54 \pm 0,08$	%11**
E15+PN 11	8	$10,85 \pm 0,31$	7	$9,45 \pm 0,17$	%15**

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı; ** $p<0,005$)



Şekil 4.13. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı (μm) grafiği (**= $p<0,005$)

4.10. Purkinje Hücre Hattında Birim Uzunluğa Düşen Ortalama Purkinje Hücre Sayısı (N_{BP})

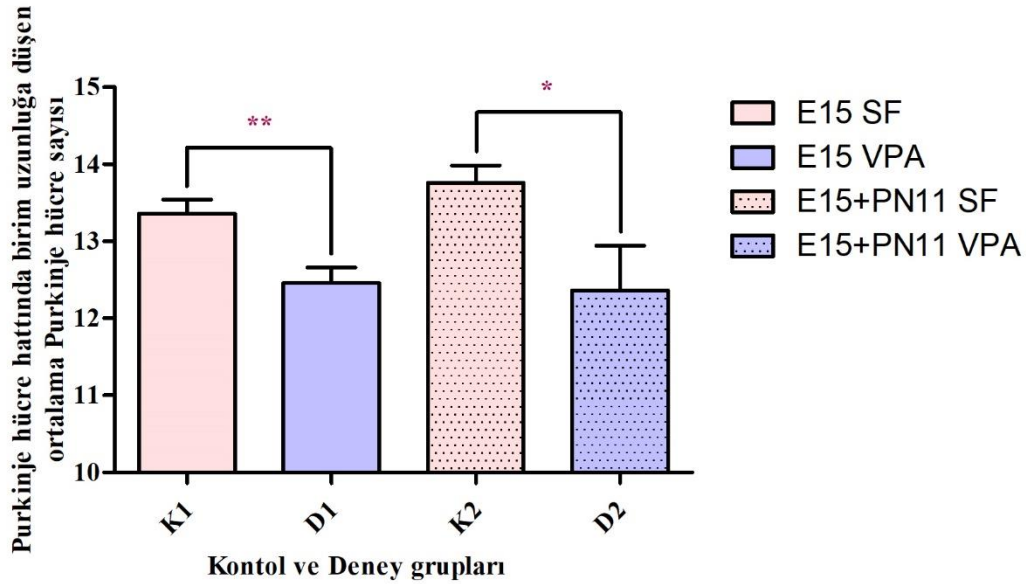
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı E15. günde yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %7 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=1,32$, $p<0,005$). Buna göre K1 grubu sıçanların Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı $13,36 \pm 0,18$ iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $12,46 \pm 0,20$ olarak saptandı. Bununla birlikte, E15. ve PN11. günde VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre %11 oranında

azaldı ve aradaki fark yine istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=6,59$, $p<0,05$). D2 grubunda Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı $12,36 \pm 0,58$ iken, K2 grubunda bu değer $13,76 \pm 0,23$ olarak hesaplandı (Tablo 4.11, Şekil 4.6).

Tablo 4.11. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	7	$13,36 \pm 0,18$	8	$12,46 \pm 0,20$	% 7**
E15+PN 11	8	$13,76 \pm 0,23$	8	$12,36 \pm 0,58$	% 11*

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı; * $p<0,05$; ** $p<0,005$)



Şekil 4.14. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücre hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı grafiği (*= $p<0,05$; **= $p<0,005$)

4.11. Purkinje Hücresi Numerik Densitesi (N_{VP} , mm^{-3})

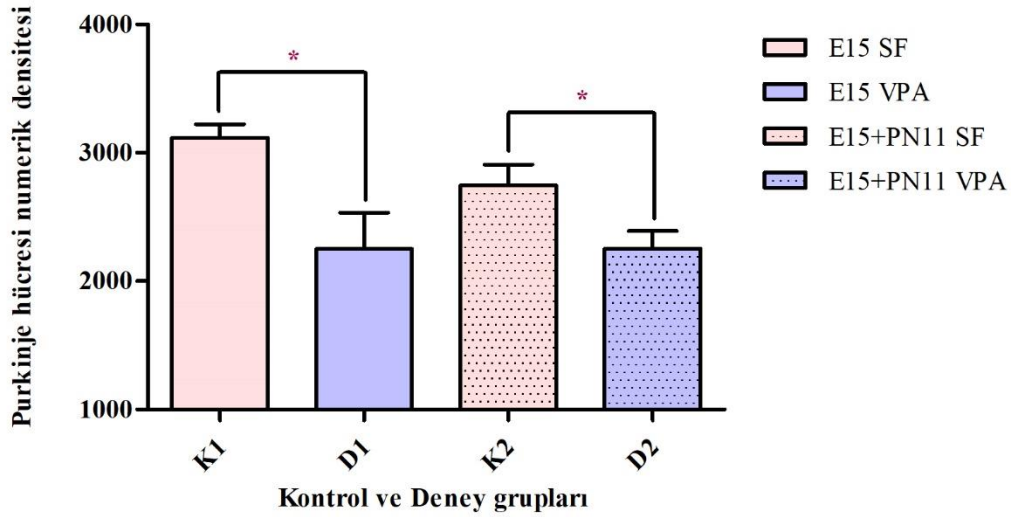
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) Purkinje hücresi numerik densitesi E15. günde bir kez aynı miktarda SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %38 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=8,37$, $p<0,05$). Buna göre K1 grubu sıçanların Purkinje hücresi numerik densitesi $3116 \pm 106 mm^{-3}$ iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $2251 \pm 284 mm^{-3}$ olarak hesaplandı. Bununla birlikte hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda Purkinje hücresi numerik densitesi hem E15.

hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşlılarına göre %22 oranında azaldı ve yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdi (F=1,63, p<0,05). Bu grupta Purkinje hücresi numerik densitesi $2253 \pm 137 \text{ mm}^{-3}$ iken, yaşıt kontrollerinde bu değer $2746 \pm 162 \text{ mm}^{-3}$ olarak saptandı (Tablo 4.12, Şekil 4.7).

Tablo 4.12. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücresi numerik densitesi (mm^{-3})

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	6	3116 ± 106	7	2251 ± 284	%38*
E15+PN 11	7	2746 ± 162	6	2253 ± 137	%22*

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı. *p<0,05)



Şekil 4.15. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait Purkinje hücresi numerik densitesi (mm^{-3}) grafiği (*=p<0,05)

4.12. Granül Hücresi / Purkinje Hücresi Oranı

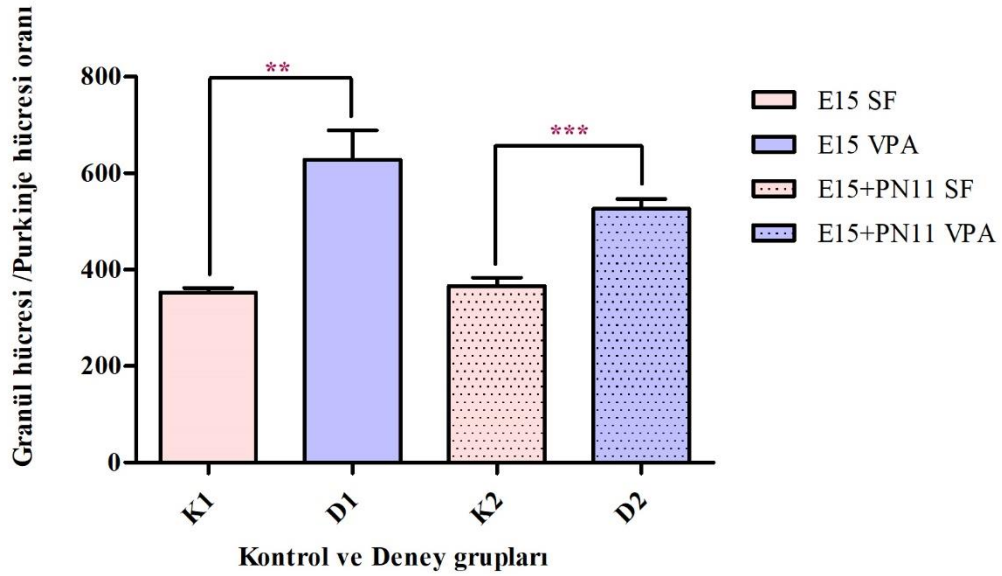
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) granül hücresi / Purkinje hücresi oranı E15. günde bir kez aynı miktarda SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %78 oranında arttı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=44,15, p<0,005). Buna göre K1 grubu sıçanların granül hücresi / Purkinje hücresi oranı 352 ± 10 iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda 628 ± 61 olarak hesaplandı. Bununla birlikte hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda granül hücresi / Purkinje hücresi oranı hem E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşlılarına göre %44 oranında arttı ve aradaki bu fark yine istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=1,70,

p<0,001). Bu grupta granül hücresi / Purkinje hücresi oranı 526 ± 20 iken, yaşıt kontrollerinde bu değer 366 ± 17 olarak saptandı (Tablo 4.13, Şekil 4.8).

Tablo 4.13. Deney ve kontrol grubu Őıçanlara ait granül hücresi / Purkinje hücresi oranı

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	6	352 ± 10	7	628 ± 61	%78**
E15+PN 11	5	366 ± 17	6	526 ± 20	%44***

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı, **p<0,005; ***p<0,001)



Şekil 4.16. Deney ve Kontrol grubu Őıçanlara ait granül hücresi / Purkinje hücresi oranı grafiği (**p<0,005; ***p<0,001)

4.13. Ortalama Sinaptik Disk apı (nm)

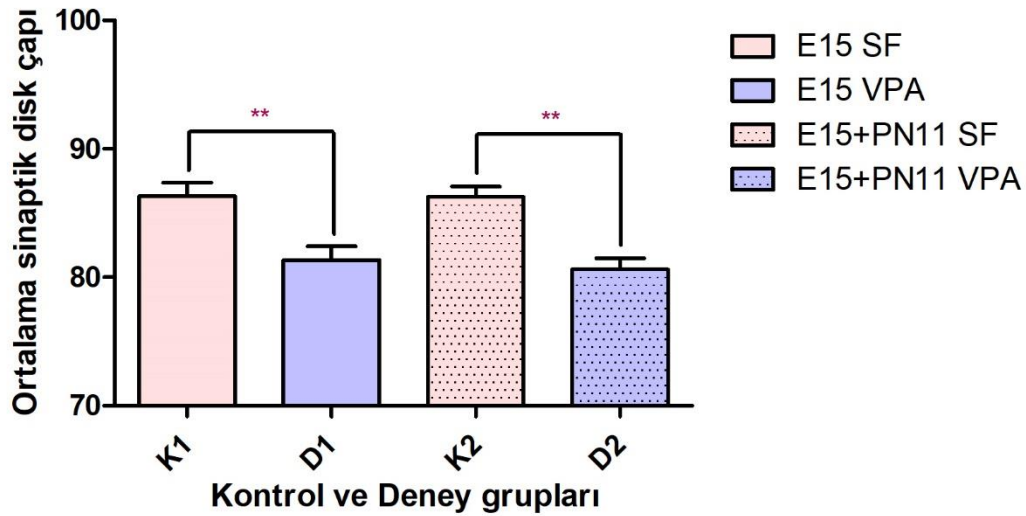
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen Őıçanların (D1 grubu) ortalama sinaptik disk apı E15. günde bir kez aynı miktarda SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %7 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=1,23, p<0,005). Buna göre K1 grubu Őıçanların ortalama sinaptik disk çapı $86,81 \pm 1,05$ nm iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $81,34 \pm 1,07$ nm olarak hesaplandı. Bununla birlikte hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600mg/kg VPA verilen Őıçanların (D2 grubu) ortalama sinaptik disk çapı hem E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K2 grubu) göre %7 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=1,11, p<0,005). Bu grupta

ortalama sinaptik disk çapı $80,62 \pm 0,87$ nm iken, yaşıt kontrollerinde bu değer $86,25 \pm 0,82$ nm olarak saptandı (Tablo 4.14, Şekil 4.9).

Tablo 4.14. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama sinaptik disk çapı (nm)

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	5	$86,81 \pm 1,05$	6	$81,34 \pm 1,07$	%7**
E15+PN 11	5	$86,25 \pm 0,82$	5	$80,62 \pm 0,87$	%7**

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı; **p<0,005)



Şekil 4.17. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama sinaptik disk çapı (nm) grafiği (**=p<0,005)

4.14. Sinapsların Numerik Densitesi (N_{Vs} , mm^{-3})

4.14.1. Nöropil alanına göre

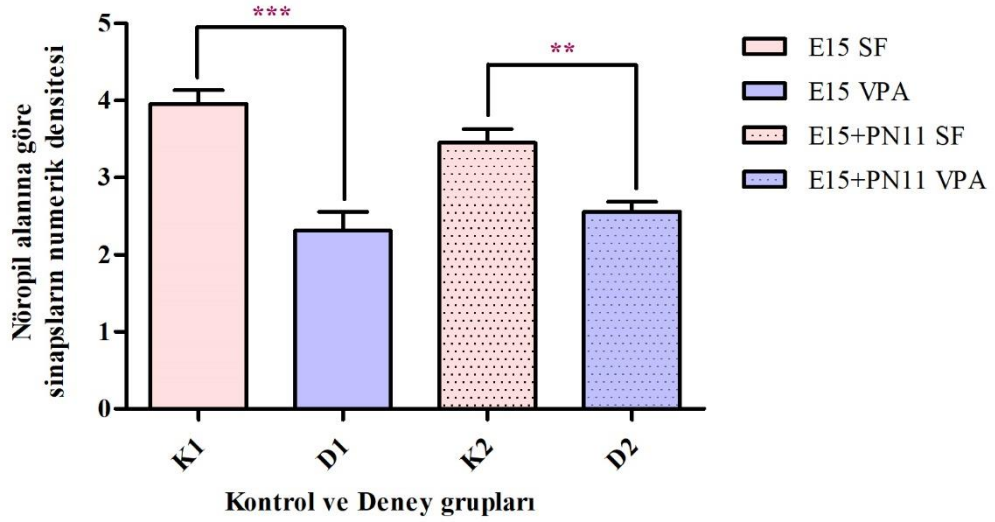
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) nöropil alanına göre sinapsların numerik densitesi E15. günde aynı miktar bir kez SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %71 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=2,27$, $p<0,001$). Buna göre K1 grubu sıçanların nöropil alanına göre sinapsların numerik densitesi $3,96 \times 10^9 \pm 0,18 \text{ mm}^{-3}$ iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $2,31 \times 10^9 \pm 0,25 \text{ mm}^{-3}$ olarak hesaplandı. Benzer şekilde hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda nöropil alanına göre sinapsların numerik densitesi E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre %35 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=1,89$, $p<0,005$). Bu grupta nöropil alanına göre

sinapsların numerik densitesi $2,56 \times 10^9 \pm 0,13 \text{ mm}^{-3}$ iken, yaşıt kontrollerinde bu değer $3,45 \times 10^9 \pm 0,18 \text{ mm}^{-3}$ olarak saptandı (Tablo 4.15, Şekil 4.10).

Tablo 4.15. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait nöropil alanına göre sinapsların numerik densitesi (mm^{-3})

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	5	$3,96 \times 10^9 \pm 0,18$	6	$2,31 \times 10^9 \pm 0,25$	%71***
E15+PN 11	5	$3,45 \times 10^9 \pm 0,18$	5	$2,56 \times 10^9 \pm 0,13$	%35**

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı; **p<0,005; ***p<0,001)



Şekil 4.18. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait nöropil alana göre sinapsların densitesi (mm^{-3}) grafiği (** = p<0,005; ***p<0,001)

4.14.2. Granüler tabakaya göre

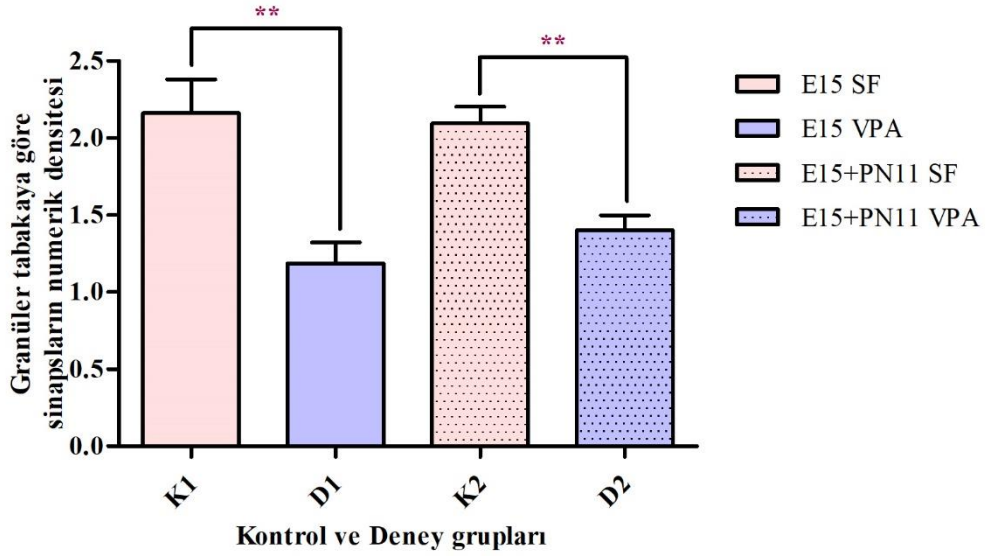
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %82 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=2,14, p<0,005). Buna göre K1 grubu sıçanların granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi $2,16 \times 10^9 \pm 0,22 \text{ mm}^{-3}$ iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $1,19 \times 10^9 \pm 0,14 \text{ mm}^{-3}$ olarak hesaplandı. Buna benzer şekilde hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi hem E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre %49 oranında azaldı ve aradaki bu fark yine istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=1,26, p<0,005). Bu grupta

granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi $1,40 \times 10^9 \pm 0,10 \text{ mm}^{-3}$ iken, yaşıt kontrollerinde bu değer $2,09 \times 10^9 \pm 0,11 \text{ mm}^{-3}$ olarak saptandı (Tablo 4.16, Şekil 4.11).

Tablo 4.16. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi (mm^{-3})

	n	Kontrol	N	Deney Grubu	% Farklılık
E15	5	$2,16 \times 10^9 \pm 0,22$	6	$1,19 \times 10^9 \pm 0,14$	%82**
E15+PN 11	5	$2,09 \times 10^9 \pm 0,11$	5	$1,40 \times 10^9 \pm 0,10$	%49**

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı; **p<0,005)



Şekil 4.19. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi (mm^{-3}) grafiği (** = p<0,005)

4.15. Sinaps/Nöron oranı (Granüler tabakaya göre N_{Vs} /Granüler tabakaya göre N_{Vg})

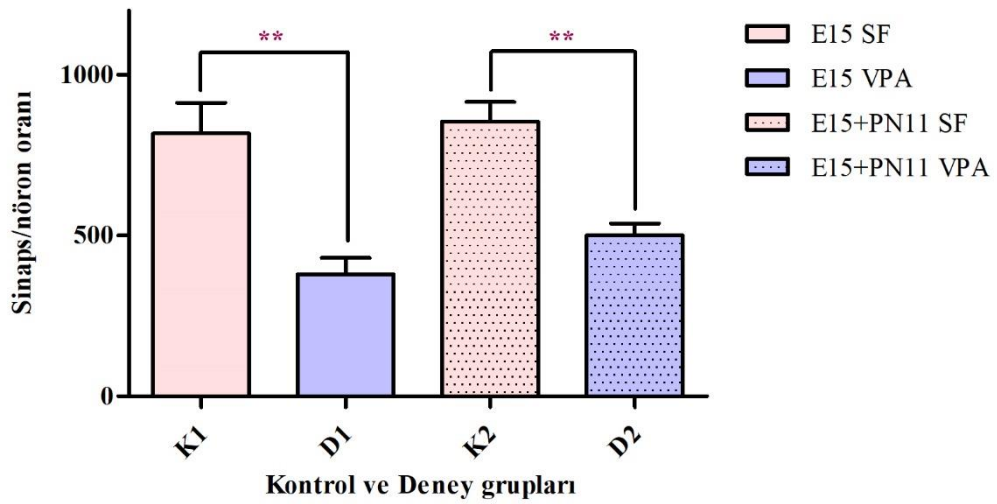
Çalışmamızda E15. günde tek doz 600mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) sinaps/nöron oranı E15. günde bir kez aynı miktar SF verilen yaşıt kontrollerine (K1 grubu) göre %115 oranında azaldı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=2,94$, $p<0,005$). Buna göre K1 grubu sıçanların sinaps/nöron oranı $817,70 \pm 95,25$ iken, bu değer D1 grubu hayvanlarda $379,70 \pm 50,70$ olarak hesaplandı. Buna benzer şekilde hem E15. hem de PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda sinaps/nöron oranı hem E15. hem de PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre %71 oranında azaldı ve aradaki bu fark

yine istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=2,64$, $p<0,005$). Bu grupta sinaps/nöron oranı $500,40 \pm 37,51$ iken, yaşıt kontrollerinde bu değer $854,90 \pm 60,91$ olarak saptandı (Tablo 4.17, Şekil 4.12).

Tablo 4.17. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait sinaps/nöron oranı

	n	Kontrol	n	Deney Grubu	% Farklılık
E15	5	$817,70 \pm 95,25$	6	$379,70 \pm 50,70$	%115**
E15+PN 11	5	$854,90 \pm 60,91$	5	$500,40 \pm 37,51$	%71**

(Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir. n = kullanılan hayvan sayısı; ** $p<0,005$)



Şekil 4.20. Deney ve kontrol grubu sıçanlara ait ortalama sinaps/nöron oranı grafiği (** $p<0,005$)

5. TARTIŞMA

İnsanda otizm spektrum bozukluğuna neden olan birçok teratojen vardır (Dietert vd., 2011; Strömland vd., 1994). Bunlardan biri de valproik asittir. (Arndt vd., 2005; Kayaalp, 2009). Gebelikte VPA kullanımı ile OSB arasındaki ilişki ilk olarak Christianson tarafından bildirilmiştir. Buna göre VPA kullanan annelerin çocuklarında genel olarak bilişsel işlevlerde azalma, dikkat eksikliği ve öğrenme güçlükleri gibi OSB'ye benzer belirtiler gözlenmiştir (Christianson vd., 1994). VPA bu etkisini embriyonal dönemde nöral tüpün kapandığı kritik zaman aralığında gerçekleştirir (Arndt vd., 2005).

Bu bağlamda VPA'nın fetüs üzerindeki etkilerinin araştırılması ve teratojenik etki mekanizmasını aydınlatılması için birçok araştırmacı tarafından hayvan modelleri kullanılmıştır (Ingram vd., 2000; Markram vd., 2008; Rubenstein & Merzenich, 2003). Bu amaçla kullanılan modellerden biri de OSB'nin davranışsal modelidir (Ergaz vd., 2016).

Oluşturulan deney modelleri üzerinden yapılan çalışmalarda anormal omurlar, kaburgalar ve kraniyofasiyal dismorfiyi içeren iskelet kusurlarının insidansında artma, kardiyak anomaliler, ventriküler septal defekt ile ilişkili veya ilişkili olmayan büyük damar malformasyonları, ürogenital defektler, cerebrum'da kütlece azalma, prefrontal kortekste nöron sayısında anormal artma, amygdala'da nöron sayısında azalma, hippocampus'a ait nöron sayısında azalma, mitokondriyal krista çözülmesi bildirilmiştir (Arndt vd., 2005; Avino vd., 2018; Binkerd, Rowland, Nau, & Hendrickx, 1988; Costa, Karmirian, & Rehen, 2018; Courchesne vd., 2011; Markram vd., 2008). Cerebellum'da ise hemisferlerin boyutunda ve Purkinje hücre sayısında azalma gibi veriler ortaya konmuştur (Arndt vd., 2005; Ingram vd., 2000; Massa, Cabrera, Menegola, Giavini, & Finnell, 2005).

Bunların yanı sıra Pierce ve Courchesne OSB olan çocukların OSB olmayan çocuklara oranla çevrelerini daha az keşfettiklerini ve azalan çevre ilgilerinin cerebellar vermis'in hipoplazisinin büyüklüğü ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Yapılan davranışsal araştırmalarla da cerebellum'un çevreyi keşfetme ve anlamada duyuşal sistemlere yardımcı olmak amacıyla duyuşal edinim, ayrımcılık ve modülasyon için önemli olduğu gösterilmiştir (Kelly vd., 2020; Pierce & Courchesne, 2001).

Cerebellum gelişimi insanlarda embriyonal 3. haftada başlayıp, doğumdan sonra da devam eder (TW, 2011). Farelerde ise cerebellum gelişimi E7. gün ile postnatal 30. gün arasında 6 haftalık bir zaman diliminde gerçekleşir. Biz de çalışmamızda VPA uygulama zamanını bu süreci göz önünde bulundurarak belirledik. İlk enjeksiyon zamanı olarak cerebellar gelişime etkisinin daha çok olacağını düşündüğümüz Purkinje hücrelerinin prenatal gelişiminin en fazla olduğu E15. günü; ikinci enjeksiyon zamanı olarak ise granül hücrelerin gelişiminin en fazla olduğu PN11. günü seçtik (Altman & Bayer, 1985; Ulupinar, Yucel, & Ortug, 2006).

Çalışmamızda, sıçan yavrularında otistik semptomları indüklemek için 600 mg / kg VPA kullandık. Çoğu araştırma makalesinde otistik sıçan modelini indüklemek için genellikle 350-500 mg / kg valproik asit kullanılmıştır. 600 mg / kg dozunun otistik etkileri fenotipte daha yoğun şekilde gözlemlendiğinden model oluşturmak için bu dozu tercih ettik (Ergaz vd., 2016; Ingram vd., 2000; Markram vd., 2008; Morakotsriwan, Wattanathorn, Kirisattayakul, & Chaisiwamongkol, 2016; Rodier, Ingram, Tisdale, Nelson, & Romano, 1996).

Çalışmamızda E15. günde tek doz 600 mg/kg VPA verilen sıçanların (D1 grubu) ortalama vücut, beyin ve cerebellum ağırlıkları E15. günde aynı miktar bir kez SF verilen yaşıt kontrolleriyle (K1 grubu) karşılaştırılmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. K1 grubu hayvanlarının vücut ağırlıkları daha düşük çıkmıştır. Buna karşın, E15. ve PN11. günde birer doz 600 mg/kg VPA verilen (D2 grubu) sıçanlarda ortalama beyin ve cerebellum ağırlıkları E15. ve PN11. günde birer kez aynı miktar SF verilen kontrol grup (K2 grubu) yaşıtlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Bunun nedeni diğer grupların enjeksiyon sayısının fazla olması ya da bir teratojen olan VPA'nın verilmesinin stres seviyesini arttırmasıyla kanibalizm davranışının daha fazla görülmesi olabilir. OSB'ye sahip bireylerin MRI görüntüleri üzerinden yapılan bir çalışmada, cerebellum'un vermis ve hemisfer hacimleri karşılaştırılmış; ancak gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir (Scott, Schumann, Goodlin-Jones, & Amaral, 2009). Benzer bir çalışmada cerebellum, vermis ve hemisferler hacimce karşılaştırılmış ve yine anlamlı bir fark elde edilememiştir (Hardan, Minshew, Harenski, & Keshavan, 2001).

Çalışmamızda, cerebellar substantia alba / cortex cerebelli hacim oranı, granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunamamıştır. Wegiel ve ark. (2010) otizmlı beyinler üzerinde yaptıkları bir postmortem çalışmada, moleküler ve granüler tabaka kalınlığında azalma olduğunu bildirmişlerdir (Wegiel vd., 2010). Buna karşın Wegiel ve ark. (2014) yaptıkları postmortem çalışmada otizmlı beyinlerde cerebellar substantia alba, moleküler ve granüler tabaka hacimlerinde anlamlı bir fark olmadığı bildirmiştir (Wegiel vd., 2014).

Diğer taraftan, Kazlauskas ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada E12,5. gün tek doz 600 mg/kg VPA uyguladıkları dişi farelerin postnatal 21. ve 67-77. günler arasında transkardiak perfüzyonla aldıkları cerebellum'larını incelemiş ve 7. lobüldeki moleküler tabaka kalınlığının arttığını ancak lobül alanının değişim göstermediğini bildirmişlerdir (Kazlauskas, Seiffe, Campolongo, Zappala, & Depino, 2019). Yapılan bir başka çalışmada ise beş ayrı otizm fare modeli kullanılmış ve sonuçta moleküler tabaka ve granüler tabaka kalınlığı bakımından gruplar arasında herhangi bir fark olmadığını bildirilmiştir (Kloth vd., 2015).

Çalışmamızda, granül hücresi numerik densitesi hem granüler tabakaya hem de cortex cerebelli'ye göre D1 ve D2 gruplarında kontrol yaşlılarına göre anlamlı olarak artış göstermiştir. Ayrıca, D1 ve D2 grubu sıçanlarda, granüler tabakanın cortex cerebelli'ye olan hacim oranında ve D1 grubu sıçanlarda granül hücresi ortalama nükleus çapında kontrol yaşlılarına göre anlamlı bir farkın olmaması; bize nümerik densitedeki bu artışın valproik asit verilmiş sıçanlarda hücre artışından kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Sıçanların cerebellum'larında granül hücrelerinin nörogenezinin postnatal dönemde 2-3. haftalar arasında olmasına (Altman & Bayer, 1985) karşın, D1 grubunda da bu nöronların numerik densitelerinin artmış olması; bize VPA'nın E15. günde verilmesinin bu nöronların nörogenezlerinin indüklendiğini göstermektedir. Diğer taraftan, VPA'nın Purkinje hücre sayısını azaltmasının bir sonucu olarak da granül hücre sayısının artışı uyarılarak, bu olumsuz etkinin telafi edilmesi söz konusu olabilir. Bu da bize nöroplastisitenin bu dönemde etkin olduğunu ortaya koymaktadır (Desarkar, Rajji, Ameis, & Daskalakis, 2015; T. Kim, Ryu, & Bahn, 2016; Singletary, 2015). Deney gruplarında granül hücrelerinin numerik densitelerinde gözlenen bu artışların cortex cerebelli'nin tabakalarındaki değişikliklerden kaynaklanmadığı da açıkça görülmektedir. Nitekim, çalışmamızda cerebellar substantia alba / cortex cerebelli hacim oranı, granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranlarında deney ve kontrol yaşlıları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ayrıca, granül hücresi ortalama nükleus çapları D1 grubu sıçanlarda, değişmezken, D2 grubu sıçanlarda kontrollere göre azalmıştır.

Sıçanlarda VPA'nın granül hücresi üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamış olmakla birlikte, farklı dönemlerde cerebellum gelişimini olumsuz etkileyebilecek farklı araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan birisinde sıçanlar hamileliğin 18. gününden itibaren postnatal 21., 75. ve 150. güne kadar üç farklı grup halinde yetersiz beslenmiştir. Bu hayvanların cerebellum'larındaki granül hücrelerinin nümerik densitesi sadece laktasyon periyodunun son günü olan 21. günde kontrol yaşlılarına göre artış gösterdiği ancak 75. ve 150. günlerde bu farkın görülmediği saptanmıştır (Warren & Bedi, 1988).

Prenatal stresin cerebellum üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, E7-14. günler arasında prenatal strese maruz bırakılan sıçanların cerebellum'larında, 30. gün sonunda, granül hücresi nümerik densitesinin gruplar arasında anlamlı bir fark göstermediği, buna karşın, granül hücresi ortalama nükleus çapının prenatal strese maruz bırakılan sıçanlarda azaldığı saptanmıştır (Ulupinar & Yucel, 2005). Aynı koşullarda yapılmış farklı bir çalışmada da yine benzer bulgular bildirilmiştir (Ulupinar vd., 2006).

Diğer taraftan, çalışmamızda D1 ve D2 grubu sıçanlarda Purkinje hücre hattında, birim uzunluğa düşen Purkinje hücresi sayısı ve Purkinje hücresi nümerik densitesi kontrol yaşlılarına göre anlamlı olarak azalmıştır. Buna ilaveten, D1 ve D2 gruplarında Purkinje hücresi ortalama nükleus çapları kontrol yaşlılarına göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Bailey ve ark. (1998) da otizmlili bireylerin beyinleri üzerinde yaptıkları postmortem çalışmada Purkinje hücresi nümerik densitesinin azaldığını bildirmişlerdir (Bailey vd., 1998).

Çalışmamızda özellikle E15. günde VPA verilen sıçanlarda Purkinje hücresi nümerik densitesinin kontrol yaşlılarına göre anlamlı olarak azalmış olması, bu nöronların nörogenezinin E13-16. günlerde gerçekleşmesi (Altman & Bayer, 1985) sebebiyle; verilen VPA'nın bu nöronların nörogenizini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Yine, çalışmamızda gözlemlemiş olduğumuz Purkinje hücrelerinin ortalama nükleus çaplarının da her iki deney grubunda kontrol yaşlılarına göre anlamlı derecede azalmış olması; bu dönemde verilen VPA'nın Purkinje hücrelerinin morfolojik görünümünü de etkilediğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda her iki deney grubu sıçanların cerebellum'larının Purkinje hücre hattında, birim uzunluğa düşen Purkinje hücresi sayısının (N_{NP}) kontrol yaşlılarına göre azalmış olması da VPA'nın bu dönemdeki olumsuz etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Hiç şüphesiz, Purkinje hücresi sayımlarında

nükleus'un esas alınması, bu hücre nükleus'larının VPA'nın etkisiyle küçülmüş olması sebebiyle hem Purkinje hücrelerinin numerik densitesinde hem de Purkinje hücre hattında, birim uzunluğa düşen Purkinje hücresi sayısında (N_{NP}) görülen azalmaları açıklayacak niteliktedir.

Yapılan bir çalışmada, gebeliğin başlangıcından postnatal 30. güne kadar yetersiz beslenmeye maruz bırakılan sıçanlarda, 30. günde toplam Purkinje hücre sayısının kontrol yaşıtlarına göre anlamlı olarak azaldığı, ancak bu azalmanın postnatal 60. günde 30-60. günler arasında uygulanan rehabilitasyonla ortadan kalktığı saptanmıştır (Bedi, Campbell, & Mayhew, 1992). Bu durum bize ya doğum sonrası uygulanan rehabilitasyon sürecinin Purkinje hücrelerinin nöroenez periyodunun dışında yapılmış olmasına karşın 30. günde gözlenen Purkinje hücresi kaybını ortadan kaldırdığını işaret etmekte ya da 30. günde gözlenen Purkinje hücre sayısındaki azalmanın bu hücrelerin morfolojisindeki değişikliklerden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Nitekim, bu çalışmada yetersiz beslenmiş sıçanların kontrol yaşıtlarına göre daha koyu boyanmış ve daha küçük nükleus'lu Purkinje hücrelerine sahip oldukları ifade edilmiştir. Aynı çalışmada, gebeliğin 18. gününden itibaren postnatal 30. güne kadar uygulanan yetersiz beslenmenin Purkinje hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı da ortaya konmuştur (Bedi vd., 1992).

Sıçanlarda yetersiz beslenmenin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, sıçanlar hamileliğin 18. gününden itibaren postnatal 21., 75. ve 150. güne kadar üç farklı grup halinde yetersiz beslenmiş; sonuçta 21. ve 150. günlerde Purkinje hücresi numerik densitesinin kontrol yaşıtlarına oranla arttığı bildirilmiştir (Warren & Bedi, 1988).

E7 ve E14. günlerde prenatal strese maruz bırakılmış sıçanlarda 30. gün sonunda, Purkinje hücresi ortalama nükleus çapının kontrol yaşıtlarına göre azaldığı, buna karşın hem Purkinje hücre hattında, birim uzunluğa düşen Purkinje hücresi sayısının hem de Purkinje hücresi numerik densitesinin artış gösterdiği saptanmıştır (Ulupinar vd., 2006).

Wang ve ark. (2018) erkek farelere E10,5. günde verdikleri tek doz 50 mg/mL VPA ile oluşturdukları otizm modeli çalışmalarında, postnatal 18-21. günler arasında cerebellum'ları incelenen hayvanlarda da çalışmamızdakine benzer şekilde deney grubunda Purkinje hücresi numerik densitesinin azaldığını bildirmişlerdir (R. Wang vd., 2018).

VPA'nın Purkinje hücreleri üzerindeki etkisini gösteren bir başka çalışmada, Roux ve ark. (2019) fareler üzerinde E12. günde intraperitoneal olarak tek doz 600 mg/kg

VPA uygulayarak gerçekleştirdikleri çalışmada, Purkinje hücresi lineer densitesinin PN13. günde her iki cinsiyette de anlamlı bir artış, PN40. günde ise dişi farelerde sadece paramedian lobda, erkek farelerde ise 6., 8., 9. ve paramedian loblarda azalma olduğunu bildirmişlerdir (Roux, Bailly, & Bossu, 2019).

Kloth ve ark. ise farklı otizm fare modellerini kullandıkları çalışmalarında, erkek farelerin cerebellum'larında Purkinje hücresi numerik densitesi bakımından deney ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (Kloth vd., 2015).

E7. ve 14. günlerde prenatal strese maruz bırakılarak; postnatal 30. günde cerebellum'ları incelenen sıçanlarda, Purkinje hücresi numerik densitesi ve birim uzunluğa düşen Purkinje hücresi sayısının kontrol yaşlılarına göre artış gösterdiği bulunmuştur (Ulupinar vd., 2006).

Diğer taraftan, Kazlauskas ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada E12,5. günde tek doz 600 mg/kg VPA uyguladıkları dişi farelerin postnatal 21. ve 67-77. günler arasında transkardiak perfüzyon sonunda aldıkları cerebellum'ları incelediklerinde: bulgularımızdan farklı olarak cerebellum'un 7. lobülündeki Purkinje hücre boyutlarının ve Purkinje hücresi numerik densitesinin SF verilen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında değişim göstermediğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada 5., 6. ve 7. lobüllerdeki Purkinje hücresi numerik densitesinin VPA uygulanan erkek sıçanlarda dişilere oranla daha fazla olduğu ifade edilmiştir (Kazlauskas vd., 2019). Aynı çalışmada deney grubu hayvanlarının hippocampus'larının gyrus dentatus'unda glial aktivasyon, cortex cerebelli'de astrosit ve mikroglia hücre densitesinde artış olduğunu bildirilmiştir. Deney grubu hayvanları arasında ise gyrus dentatus'larının hilus'larında astrosit hücre densitesinin dişilerde erkek farelere oranla daha yüksek olduğunu ve mikroglia hücre densitesinin de erkek farelerde dişi farelere oranla yüksek olduğunu ifade etmişlerdir (Kazlauskas vd., 2019).

Hayvan otizm modellerinin yanı sıra, otistik insan cerebellum'ları üzerinde yapılmış çok sayıda postmortem çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birisinde: Wegiel ve ark. (2014) yaşları 4-60 arasında değişen 39 (21 otistik, 18 kontrol) insan cerebellum'u üzerinde yaptıkları bir postmortem çalışmada, optik fractionator yöntemi ile hesapladıkları Purkinje hücresi numerik densitesinin ve toplam Purkinje hücre sayısının otistik bireylerde azaldığını bildirmişlerdir (Wegiel vd., 2014). Wegiel ve ark. (2010) daha önce yaptıkları bir başka çalışmada ise dişi ve erkek otistik çocuklara ait

cerebellum'lardan aldıkları kesitleri incelemiş ve bu çocuklarda Purkinje hücre hacminin kontrol yaşlılarına oranla daha küçük olduğunu saptamışlardır (Wegiel vd., 2010).

Bauman ve ark. (1991) da biri otistik diğeri kontrol bireye ait postmortem cerebellum'lar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, lobulus biventer, nucleus gracilis, tonsilla cerebelli ve lobulus semilunaris inferior'da Purkinje hücre kaybı olduğunu bildirmişlerdir (Bauman & Kemper, 1985).

Skefos ve ark. (2014) postmortem otistik insan beyinleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, kadın ve erkeklere ait cerebellum'lardaki Purkinje hücresi numerik densitesini optik dissektor yöntemi ile araştırdıklarında: bu değerin kadınlarda crus I ve II'de kontrollere göre oldukça düşük olduğunu, erkeklerde ise X. lobülde kontrollere göre daha düşük olma eğiliminde olduğunu göstermişlerdir (Skefos vd., 2014).

Wegiel ve ark. (2014) farklı yaşlardaki toplam 39 (21 otistik, 18 kontrol) insan beyni üzerinde yaptıkları bir postmortem çalışmada, nuc. caudatus ile nuc. accumbens'in hacimlerinin arttığını ve amygdala'nın lateral nükleus'larında nöron densitesinin azaldığını ifade etmişlerdir. Yine nuc. caudatus ve putamen'de nöronların numerik densitesinin azaldığını bildirmişlerdir (Wegiel vd., 2014).

Çalışmamızda cortex cerebelli'ye göre granül hücresi / Purkinje hücresi oranı D1 ve D2 gruplarında yaşıt kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir. Hiç şüphesiz, bu duruma, her iki deney grubunda hem granül hücresi numerik densitesinin, kontrol yaşlılarına göre artmış olması, hem de Purkinje hücresi numerik densitesinin kontrol yaşlılarına göre azalmış olması yol açmıştır.

E7. ve 14. günlerde prenatal strese maruz bırakılarak postnatal 30. günde cerebellum'ları incelenen sıçanlarda, granül hücresi / Purkinje hücresi oranının stres uygulanan grupta yaşıt kontrollerine göre daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Ulupinar vd., 2006). Benzer bulgular doğumdan itibaren 30. güne kadar yetersiz beslenmiş sıçanlarda da saptanmıştır (Bedi, Hall, Davies, & Dobbing, 1980).

Ralcewicz ve Persaud (1994) E17., 18., 19. ve 20. günlerde iyonize radyasyona maruz bıraktıkları sıçanlarla yaptıkları bir çalışmada, cerebellum'un pyramis'inde Purkinje ve granül hücresi dağılımının yaşıt kontrollerine oranla önemli oranda azaldığını, granül hücresi / Purkinje hücresi oranının ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olmadığını belirtmiştir (Ralcewicz & Persaud, 1994).

Doğumdan itibaren 21, 75, 150. güne kadar farklı sürelerle yetersiz beslenmiş sıçanlarda, granül hücresi / Purkinje hücresi oranı kontrol yaşlılarına göre 21. ve 75. gün sonunda değişmezken; 150. günde Purkinje hücresi numerik densitesindeki artışa paralel olarak azalma göstermiştir (Warren & Bedi, 1988).

Çalışmamızda gerek nöropil alana göre gerekse granüler tabakaya göre sinapsların numerik densitesi (Nv) D1 ve D2 gruplarında kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Diğer taraftan, her iki deney grubunda (D1 ve D2) ortalama sinaptik disk çapı da kontrol yaşlılarına göre anlamlı olarak azalmıştır. Buna karşın, E7-14. günler arasında prenatal stres uygulanmış sıçanlarda 30. gün sonunda, ortalama sinaptik disk çapının gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmadığını bildirmiştir (Ulupinar & Yucel, 2005).

D1 grubundaki sinapsların numerik densitesindeki azalmanın, D2 grubundaki sinapsların numerik densitesindeki azalmaya göre çok daha fazla olduğu görülmektedir. Yine, cerebellum'un granüler tabakasındaki sinaps/nöron oranına bakıldığında; deney ve kontrol grubu sıçanlar arasında bu oranda önemli kayıpların olduğu görülmektedir. Daha önce belirttiğimiz üzere D1 ve D2 grubu sıçanlarda granüler tabakadaki granül hücrelerinin nümerik densitesi anlamlı olarak artmıştır. Ayrıca, çalışmamızdaki deney ve kontrol grubu sıçanlar arasında hem granüler tabakada, granül hücrelerinin nümerik densitesinin artması, hem de granüler tabakada, sinapsların numerik densitesinin azalması; sinaps/nöron oranının düşmesine sebep olmuştur. Hiç şüphesiz, bu bulgu beyin fonksiyonu açısından bir kayba neden olacaktır.

Çalışmamızda E15. günde (D1) ya da E15+PN11. (D2) günlerde valproik asit verilen sıçanların cerebellum'larının ışık ve elektron mikroskopik görüntülerinde saptamış olduğumuz: moleküler ve granüler tabakalarda yoğun damar dilatasyonu, çok sayıda nekrotik hücre, mitokondri hasarları, kofullaşmış mitokondri, sinaptik vezikül hasarı, veziküler yapılarda artış, koful oluşumu ve nekrotik görünümlü alanlar bulguları, valproik asitin cerebellum'un ultrastrüktürel yapısında ortaya çıkarmış olduğu hasarı açıkça göstermektedir.

Sıçanlarda valproik asit ile oluşturulmuş otizm modelinde, cortex cerebelli'nin granüler tabakasında, nöron ve sinaps densitesi üzerinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Buna karşın, E7-14. günler arasında prenatal strese maruz bırakılan ve 30. gün sonunda cerebellum'ları incelenen sıçanlarda da sinaps/nöron oranı kontrol

yaşıtlarına göre anlamlı oranda azalmıştır. Bu çalışmada deney gruplarında gözlenen bu azalmanın, granül hücresi nümerik densitesinin değişmemesine karşın, sinapsların nümerik densitesinde saptanan azalmadan kaynaklandığı gözlenmiştir (Ulupinar & Yucel, 2005). Bu çalışmada saptanmış olan sinapsların nümerik densitesindeki azalma, bizim çalışmamızda da benzer şekilde bulunmuştur.

Yine, sıçanlarda yetersiz beslenme ve stresin cerebellum'daki interkonnektivite üzerindeki etkilerini araştıran bir başka çalışmada, bazı sıçanlar 105-134. günler arasında yetersiz beslenirken; bazı sıçanlar da 135-175. günler arasında rehabilite edilmiştir. Sonuçta, granüler tabakaya göre sinapsların nümerik densitesi deney ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Buna karşın, yaşa bağlı olarak 134 günlük ve 175 günlük kontrol ve deney grubu sıçanlar arasında sinapsların nümerik densitelerinde anlamlı artışlar olduğu gözlenmiştir. Bu durum bize sinapsların nümerik densitesinin yetişkin sıçanlarda da arttığını göstermektedir (Yucel, Warren, & Gumusburun, 1994). Aynı çalışmada, 134 günlük ve 175 günlük kontrol grubu sıçanların cerebellum'larının granüler tabakasında, interkonnektivite olarak değerlendirilen sinaps/nöron oranının da yaşla birlikte sinapsların nümerik densitesindeki artışa paralel olarak arttığı rapor edilmiştir (Yucel vd., 1994).

Sıçanların doğumdan hemen sonra 30 gün süreyle yetersiz beslenmiş olduğu bir başka çalışmada, yetersiz beslenmiş sıçanların kontrol hayvanlara göre cerebellum'larının granüler tabakasında, sinaps/nöron oranının %32 oranında azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada yetersiz beslenmiş sıçanlarda, kontrol yaşlılarına göre granül hücresi nümerik densitesi değişmezken, sinaps densitesi önemli derecede azalmıştır (Thomas, Bedi, Davies, & Dobbing, 1979). Sıçanların hamileliğin 18. gününden itibaren 21, 75 ve 150 gün süreyle yetersiz beslenmiş olduğu bir başka çalışmada, sinaps/nöron oranı 21. günde kontrol yaşlılarına göre yine anlamlı derecede azalmıştır. Bu orandaki düşüşün, sinapsların nümerik densitesinin değişmemesine karşın, granül hücresi nümerik densitesindeki artıştan kaynaklandığı vurgulanmıştır (Warren & Bedi, 1990). Bu çalışmada elde edilen granül hücresi nümerik densitesindeki artış bulgusu, bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir. Aynı çalışmada sinaps/nöron oranının 75. güne kadar yetersiz beslenip 75.-150. günler arasında normal beslenen grupta ise arttığı bildirilmiştir (Warren & Bedi, 1990).

Diğer taraftan, aynı çalışmada, sinapsların nümerik densitesinin sadece 150. güne kadar yetersiz beslenmiş sıçanlarda kontrol yaşıtlarına göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığını bildirmişlerdir. Sinaptik disk çapında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı rapor edilmiştir (Warren & Bedi, 1990).

Sonuç olarak D1 ve D2 grubu sıçanlarının cerebellum'larında kontrol yaşıtlarına göre önemli değişikliklerin meydana geldiği görülmektedir. Özellikle nörogenezinin E15. günde pik yaptığı Purkinje hücrelerinin nümerik densitesinin ve Purkinje hücre hattında, birim uzunluğa düşen Purkinje hücre sayısının deney grubu sıçanlarda kontrol yaşıtlarına göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Diğer taraftan, nörogenezleri postnatal dönemde olan granül hücrelerinin nümerik densitesinin ise kontrol yaşıtlarına göre artış göstermiş olduğu gözlenmiştir. Yine, VPA verilen sıçanlarda granül hücresi / Purkinje hücresi oranının anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Buna karşın, bir nöronal interkonnektivite göstergesi olarak kullanılan sinaps/nöron oranı, özellikle VPA verilen hayvanlarda, sinapsların nümerik densitelerinde görülen azalmaya ve granül hücresi nümerik densitesinde görülen artışa bağlı olarak, kontrol yaşıtlarına göre azalmıştır. İnsanda, antiepileptik ve duygu durum dengeleyici bir ilaç olarak yaygın şekilde kullanılan VPA'nın gebelik ve emzirme dönemlerinde kullanılmasının cerebellum'da ağır hasara neden olduğu görülmektedir. Ayrıca, teratojenik bir ajan olan VPA'nın bu dönemde alındığında, OSB'ye neden olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, insanda antiepileptik ve duygu durum dengeleyici bir ilaç olarak yaygın şekilde kullanılan valproik asit, deney grubu sıçanlara embriyonal E15. günde ve E15+PN11. günlerde tek doz (600 mg/kg) olarak verilerek; bu sıçanların cerebellum'ları kontrol yaşitlarıyla stereolojik olarak karşılaştırıldı ve aşağıdaki bulgular saptandı.

1) Ortalama beyin ağırlığı, ortalama cerebellum ağırlığı, substantia alba / cortex cerebelli hacim oranı, granüler tabaka / cortex cerebelli hacim oranı ve granül hücresi nükleusları/granüler tabaka hacim oranı bakımından deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

2) Deney grubu sıçanların cerebellum'larının ultrastrüktürel yapısında, moleküler ve granüler tabakalarda yoğun damar dilatasyonu, nekrotik hücre artışı, mitokondri hasarı, kofullaşmış mitokondri, sinaptik vezikül hasarı, veziküler yapılarda artış, koful oluşumu ve nekrotik görünümlü alanlar gibi pek çok kalitatif bulgular saptandı.

3) Deney grubu sıçanlarda, granül hücresi numerik densitesi D1 ve D2 gruplarında yaşıt kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken, granül hücresi ortalama nükleus çapı D2 grubunda yaşıt kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi.

4) Deney grubu sıçanlarda, Purkinje hattında birim uzunluğa düşen ortalama Purkinje hücre sayısı, Purkinje hücresi numerik densitesi ve Purkinje hücresi ortalama nükleus çapı yaşıt kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi.

5) Deney grubu sıçanlarda, granül hücresi/Purkinje hücresi hacim oranı yaşıt kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi.

6) Deney grubu sıçanlarda, sinapsların numerik densitesi ve ortalama sinaptik disk çapı yaşıt kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı.

7) Deney grubu sıçanlarda, cortex cerebelli'deki interkonnektiviteyi gösteren sinaps/nöron oranı yaşıt kontrollerine oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı.

Sonuç olarak D1 ve D2 grubu sıçanların cerebellum'larında kontrol yaşitlarıyla karşılaştırıldığında önemli değişikliklerin meydana geldiği görülmektedir. Elde ettiğimiz bu kantitatif bulgular cerebellar hasara işaret etmektedir. Birçok postmortem çalışma da her ne kadar yaptığımız çalışma kadar geniş kapsamlı olarak incelemese de benzer şekilde

cerebellum'da Purkinje hücre düzeyinde, cerebellar hacim ve mitokondriyal düzeyde çalışmamıza benzer sonuçlar bildirmiştir. Bu bulguların cerebellar fonksiyon, dolayısıyla beyin fonksiyonu açısından bir kayba neden olacağı ve bu veriler ışığında otizmde cerebellum'un rolünün tahmin edilenden daha fazla olabileceği düşünülmektedir.

Bu sebeple cerebellum'un otizmdeki rolünün daha iyi anlaşılması açısından gelecekte yapılacak çalışmalarda cerebellum'un diğer bölümlerinin ve kortikal alanlarla olan bağlantılarının araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agrawal, Rao, Bulsara, & Patole. (2018). Prevalence of autism spectrum disorder in preterm infants: a meta-analysis. *Pediatrics*, *142*(3), e20180134.
- Altman. (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of the components of the granular layer. *Journal of Comparative Neurology*, *145*(4), 465-513.
- Altman, & Bayer. (1985). Embryonic development of the rat cerebellum. I. Delineation of the cerebellar primordium and early cell movements. *Journal of Comparative Neurology*, *231*(1), 1-26.
- Altman, & Bayer. (1990). Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. *Experimental neurology*, *107*(1), 23-35.
- Apps, & Garwicz. (2005). Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(4), 297-311.
- Arıncı, & Elhan. (2006). *Anatomi. 2. cilt* (4. ed.). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Arndt, Stodgell, & Rodier. (2005). The teratology of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *23*(2-3), 189-199.
- Avino, Barger, Vargas, Carlson, Amaral, Bauman, & Schumann. (2018). Neuron numbers increase in the human amygdala from birth to adulthood, but not in autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(14), 3710-3715.
- Bailey, Luthert, Dean, Harding, Janota, Montgomery, . . . Lantos. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain: a journal of neurology*, *121*(5), 889-905.
- Baio. (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years- autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010.
- Balaei, Ashtari, & Bergen. (2017). The embryology and anatomy of the cerebellum. In *Development of the cerebellum from molecular aspects to diseases* (pp. 505): Springer.
- Bauman, & Kemper. (1985). Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology*, *35*(6), 866-866.
- Bedi, Campbell, & Mayhew. (1992). A fractionator study of the effects of undernutrition during early life on rat Purkinje cell numbers (with a caveat on the use of nucleoli as counting units). *Journal of anatomy*, *181*(Pt 2), 199.
- Bedi, Hall, Davies, & Dobbing. (1980). A stereological analysis of the cerebellar granule and Purkinje cells of 30-day-old and adult rats undernourished during early postnatal life. *Journal of Comparative Neurology*, *193*(4), 863-870.
- Binkerd, Rowland, Nau, & Hendrickx. (1988). Evaluation of valproic acid (VPA) developmental toxicity and pharmacokinetics in Sprague-Dawley rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, *11*(3), 485-493.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Brambilla, Hardan, Di Nemi, Perez, Soares, & Barale. (2003). Brain anatomy and development in autism: review of structural MRI studies. *Brain research bulletin*, 61(6), 557-569.
- Bromley, Mawer, Briggs, Cheyne, Clayton-Smith, García-Fiñana, . . . Baker. (2013). The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 84(6), 637-643.
- Bromley, Mawer, Clayton-Smith, & Baker. (2008). Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology*, 71(23), 1923-1924.
- Bromley, Mawer, Love, Kelly, Purdy, McEwan, . . . Baker. (2010). Early cognitive development in children born to women with epilepsy: a prospective report. *Epilepsia*, 51(10), 2058-2065.
- Carta, Chen, Schott, Dorizan, & Khodakhah. (2019). Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science*, 363(6424).
- Christensen, Braun, Baio, Bilder, Charles, Constantino, . . . Kurzius-Spencer. (2018). Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012. *MMWR Surveillance Summaries*, 65(13), 1.
- Christensen, Grønberg, Sørensen, Schendel, Parner, Pedersen, & Vestergaard. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Jama*, 309(16), 1696-1703.
- Christianson, Chester, & Kromberg. (1994). Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 36(4), 361-369.
- Clayton-Smith, & Donnai. (1995). Fetal valproate syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 32(9), 724-727.
- Consalez, & Hawkes. (2013). The compartmental restriction of cerebellar interneurons. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 123.
- Costa, Karmirian, & Rehen. (2018). Deformation of mitochondrial cristae in human neural progenitor cells exposed to valproic acid. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2), 2223-2232.
- Courchesne, Mouton, Calhoun, Semendeferi, Ahrens-Barbeau, Hallet, . . . Pierce. (2011). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *Jama*, 306(18), 2001-2010.
- Croen, Najjar, Fireman, & Grether. (2007). Maternal and paternal age and risk of autism spectrum disorders. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 161(4), 334-340.
- Cummings, Stewart, Stevenson, Morrow, & Nelson. (2011). Neurodevelopment of children exposed in utero to lamotrigine, sodium valproate and carbamazepine. *Archives of disease in childhood*, 96(7), 643-647.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Dean, Hailey, Moore, Lloyd, Turnpenny, & Little. (2002). Long term health and neurodevelopment in children exposed to antiepileptic drugs before birth. *Journal of Medical Genetics*, 39(4), 251-259.
- Desarkar, Rajji, Ameis, & Daskalakis. (2015). Assessing and stabilizing aberrant neuroplasticity in autism spectrum disorder: the potential role of transcranial magnetic stimulation. *Frontiers in psychiatry*, 6, 124.
- Dias, & Walsh. (2020). Recent Advances in Understanding the Genetic Architecture of Autism. *Annual review of genomics and human genetics*, 21.
- Dietert, Dietert, & DeWitt. (2011). Environmental risk factors for autism. *Emerging health threats journal*, 4(1), 7111.
- DiLiberti, Farndon, Dennis, & Curry. (1984). The fetal valproate syndrome. *American journal of medical genetics*, 19(3), 473-481.
- Doğangün. (2008). Özel eğitim gerektiren psikiyatrik durumlar. *Türkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi*, 62, 157-174.
- Ecker, Schmeisser, Loth, & Murphy. (2017). Neuroanatomy and neuropathology of autism spectrum disorder in humans. In *Translational Anatomy and Cell Biology of Autism Spectrum Disorder* (pp. 27-48): Springer.
- El Falougy, Filova, OSTATnikova, Bacova, & Bakos. (2019). Neuronal morphology alterations in autism and possible role of oxytocin. *Endocrine regulations*, 53(1), 46-54.
- Elder, Shankar, Shuster, Theriaque, Burns, & Sherrill. (2006). The gluten-free, casein-free diet in autism: results of a preliminary double blind clinical trial. *Journal of autism and developmental disorders*, 36(3), 413-420.
- Emrich, Zerssen, Kissling, Möller, & Windorfer. (1980). Effect of sodium valproate on mania. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 229(1), 1-16.
- Ergaz, Weinstein-Fudim, & Ornoy. (2016). Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*, 64, 116-140.
- Gillberg, & Fernell. (2014). Autism plus versus autism pure. *Journal of autism and developmental disorders*, 44(12), 3274-3276.
- Gobbi, & Janiri. (2006). Sodium-and magnesium-valproate in vivo modulate glutamatergic and GABAergic synapses in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 185(2), 255-262.
- Guinchat, Thorsen, Laurent, Cans, Bodeau, & Cohen. (2012). Pre-, peri-and neonatal risk factors for autism. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 91(3), 287-300.
- Gundersen. (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of microscopy*, 111(2), 219-223.
- Hallmayer, Cleveland, Torres, Phillips, Cohen, Torigoe, . . . Smith. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry*, 68(11), 1095-1102.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hardan, Minshew, Harenski, & Keshavan. (2001). Posterior fossa magnetic resonance imaging in autism. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 40*(6), 666-672.
- Heavner, & Smith. (2020). Resolving the Synaptic versus Developmental Dichotomy of Autism Risk Genes. *Trends in Neurosciences*.
- Hesapcioglu, Ceylan, Kasak, & Sen. (2020). Olanzapine, risperidone, and aripiprazole use in children and adolescents with Autism Spectrum Disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders, 72*, 101520.
- Hviid, Hansen, Frisch, & Melbye. (2019). Measles, mumps, rubella vaccination and autism: a nationwide cohort study. *Annals of internal medicine, 170*(8), 513-520.
- Ingram, Peckham, Tisdale, & Rodier. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicology and teratology, 22*(3), 319-324.
- Ito. (2011). *The Cerebellum: Brain for an Implicit Self*, ser. In. New Jersey: FT Press Science. Pearson Education.
- Jentink, Loane, Dolk, Barisic, Garne, Morris, & de Jong-van den Berg. (2010). Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *New England Journal of Medicine, 362*(23), 2185-2193.
- Jepson, Granpeesheh, Tarbox, Olive, Stott, Braud, . . . Allen. (2011). Controlled evaluation of the effects of hyperbaric oxygen therapy on the behavior of 16 children with autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders, 41*(5), 575-588.
- Johannessen, & Johannessen. (2003). Valproate: past, present, and future. *CNS drug reviews, 9*(2), 199-216.
- Kayaalp. (2009). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji* (K. SO Ed. 12 ed.). Ankara: Feryal Matbaacılık San. Ve Tic. Ltd. Şti.
- Kazlauskas, Seiffe, Campolongo, Zappala, & Depino. (2019). Sex-specific effects of prenatal valproic acid exposure on sociability and neuroinflammation: Relevance for susceptibility and resilience in autism. *Psychoneuroendocrinology, 110*, 104441.
- Kelly, Meng, Fujita, Morgado, Kazemi, Rice, . . . Sajadi. (2020). Regulation of autism-relevant behaviors by cerebellar–prefrontal cortical circuits. *Nature neuroscience, 23*(9), 1102-1110.
- Kim, Keifer, Rodriguez-Seijas, Eaton, Lerner, & Gadow. (2019). Quantifying the optimal structure of the autism phenotype: A comprehensive comparison of dimensional, categorical, and hybrid models. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 58*(9), 876-886. e872.
- Kim, Kim, Go, Choi, Yang, Cheong, . . . Ko. (2011). The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague–Dawley rats. *Toxicology letters, 201*(2), 137-142.
- Kim, Ryu, & Bahn. (2016). Brain stimulation and modulation for autism spectrum disorder. *Hanyang Medical Reviews, 36*(1), 65-71.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- King, Chen, & Bishop. (1993). An analysis of HRP-filled basket cell axons in the cat's cerebellum. *Anatomy and embryology*, 188(3), 299-305.
- Kloth, Badura, Li, Cherskov, Connolly, Giovannucci, . . . Piochon. (2015). Cerebellar associative sensory learning defects in five mouse autism models. *elife*, 4, e06085.
- Korkmaz. (2010). Otizm: Klinik ve nörobiyolojik özellikleri, erken tanı, tedavi ve bazı güncel gelişmeler. *Turkish Pediatrics Archive/Turk Pediatri Arsivi*, 45.
- Kouijzer, van Schie, de Moor, Gerrits, & Buitelaar. (2010). Neurofeedback treatment in autism. Preliminary findings in behavioral, cognitive, and neurophysiological functioning. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 4(3), 386-399.
- Lainé, & Axelrad. (2002). Extending the cerebellar Lugaro cell class. *Neuroscience*, 115(2), 363-374.
- Lambert, Carraz, Borselli, & Bouchardy. (1975). Dipropylacetamide in the treatment of manic-depressive psychosis. *L'Encephale*, 1(1), 25-31.
- Larsell, & Jansen. (1972). *The comparative anatomy and histology of the cerebellum: the human cerebellum, cerebellar connections, and cerebellar cortex* (Vol. 3): University of Minnesota Press.
- Lee, Magnusson, Gardner, Blomström, Newschaffer, Burstyn, . . . Dalman. (2015). Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain, behavior, and immunity*, 44, 100-105.
- Löscher. (1999). Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Progress in neurobiology*, 58(1), 31-59.
- Löscher. (2002). Basic pharmacology of valproate. *CNS drugs*, 16(10), 669-694.
- Markram, Rinaldi, La Mendola, Sandi, & Markram. (2008). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 33(4), 901-912.
- Marzban, Del Bigio, Alizadeh, Ghavami, Zachariah, & Rastegar. (2015). Cellular commitment in the developing cerebellum. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 450.
- Massa, Cabrera, Menegola, Giavini, & Finnell. (2005). Valproic acid-induced skeletal malformations: associated gene expression cascades. *Pharmacogenetics and Genomics*, 15(11), 787-800.
- McCracken, McGough, Shah, Cronin, Hong, Aman, . . . Hollway. (2002). Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. *New England Journal of Medicine*, 347(5), 314-321.
- McPheeters, Warren, Sathe, Bruzek, Krishnaswami, Jerome, & Veenstra-VanderWeele. (2011). A systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 127(5), e1312-e1321.
- Meador, Baker, Browning, Clayton-Smith, Combs-Cantrell, Cohen, . . . Pennell. (2009). Cognitive function at 3 years of age after fetal exposure to antiepileptic drugs. *New England Journal of Medicine*, 360(16), 1597-1605.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Meador, Baker, Browning, Cohen, Clayton-Smith, Kalayjian, . . . Privitera. (2011). Foetal antiepileptic drug exposure and verbal versus non-verbal abilities at three years of age. *Brain*, 134(2), 396-404.
- Minsheu, & Payton. (1988). New perspectives in autism, part I: The clinical spectrum of autism. *Current Problems in Pediatrics*, 18(10), 567-610.
- Miquel, Toledo, García, Coria-Avila, & Manzo. (2009). Why should we keep the cerebellum in mind when thinking about addiction? *Current drug abuse reviews*, 2(1), 26-40.
- Modabbernia, Velthorst, & Reichenberg. (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular autism*, 8(1), 13.
- Moore, & Persaud. (2009). *Klinik yönleriyle insan embriyolojisi* (H. Dalçık & M. Yıldırım Eds. 2. ed.). İstanbul: Nobel tıp kitabevleri.
- Moore, Turnpenny, Quinn, Glover, Lloyd, Montgomery, & Dean. (2000). A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *Journal of Medical Genetics*, 37(7), 489-497.
- Morakotsriwan, Wattanathorn, Kirisattayakul, & Chaisiwamongkol. (2016). Autistic-like behaviors, oxidative stress status, and histopathological changes in cerebellum of valproic acid rat model of autism are improved by the combined extract of purple rice and silkworm pupae. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Moulton, Elman, Becerra, Goldstein, & Borsook. (2014). The cerebellum and addiction: insights gained from neuroimaging research. *Addiction biology*, 19(3), 317-331.
- Nadebaum, Anderson, Vajda, Reutens, Barton, & Wood. (2011). The Australian brain and cognition and antiepileptic drugs study: IQ in school-aged children exposed to sodium valproate and polytherapy. *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS*, 17(1), 133-142.
- Napoli, Dueñas, & Giulivi. (2014). Potential therapeutic use of the ketogenic diet in autism spectrum disorders. *Frontiers in pediatrics*, 2, 69.
- Nau, Hauck, & Ehlers. (1991). Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacology & toxicology*, 69(5), 310-321.
- Nicolini, & Fahnestock. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental neurology*, 299, 217-227.
- Nicolson, Awad, & Sloman. (1998). An open trial of risperidone in young autistic children. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 37(4), 372-376.
- Ornoy. (2009). Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reproductive Toxicology*, 28(1), 1-10.
- Owen, Sikich, Marcus, Corey-Lisle, Manos, McQuade, . . . Findling. (2009). Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescents with autistic disorder. *Pediatrics*, 124(6), 1533-1540.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Owens, & Nemeroff. (2003). Pharmacology of valproate. *Psychopharmacology bulletin*, 37, 17-24.
- Paulsen, & Waschke. (2013). *Sobotta Atlas of Human Anatomy, Vol. 3, English: Head, Neck and Neuroanatomy*: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Phiel, Zhang, Huang, Guenther, Lazar, & Klein. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36734-36741.
- Pierce, & Courchesne. (2001). Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biological psychiatry*, 49(8), 655-664.
- Ralcewicz, & Persaud. (1994). Purkinje and granule cells distribution in the cerebellum of the rat following prenatal exposure to low dose ionizing radiation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 46(6), 443-452.
- Rapin. (1999). Autism in search of a home in the brain. *Neurology*, 52, 902-904.
- Rapin, & Katzman. (1998). Neurobiology of autism. *Annals of neurology*, 43(1), 7-14.
- Rasalam, Hailey, Williams, Moore, Turnpenny, Lloyd, & Dean. (2005). Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 47(8), 551-555.
- Rhoton, & Albert. (2000). The cerebellar arteries. *Neurosurgery*, 47(3), 29-68.
- Richler, Luyster, Risi, Hsu, Dawson, Bernier, . . . McMahon. (2006). Is there a 'regressive phenotype' of autism spectrum disorder associated with the measles-mumps-rubella vaccine? A CPEA study. *Journal of autism and developmental disorders*, 36(3), 299-316.
- Rodier, Ingram, Tisdale, Nelson, & Romano. (1996). Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 370(2), 247-261.
- Roostaei, Nazeri, Sahraian, & Minagar. (2014). The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurologic clinics*, 32(4), 859-869.
- Roux, Bailly, & Bossu. (2019). Regional and sex-dependent alterations in Purkinje cell density in the valproate mouse model of autism. *Neuroreport*, 30(2), 82-88.
- Rubenstein, & Merzenich. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*, 2(5), 255-267.
- Rutherford, McKenzie, Johnson, Catchpole, O'Hare, McClure, . . . Murray. (2016). Gender ratio in a clinical population sample, age of diagnosis and duration of assessment in children and adults with autism spectrum disorder. *Autism*, 20(5), 628-634.
- Ruzzo, Pérez-Cano, Jung, Wang, Kashef-Haghighi, Hartl, . . . Leventhal. (2019). Inherited and de novo genetic risk for autism impacts shared networks. *Cell*, 178(4), 850-866. e826.
- Schendel, & Thorsteinsson. (2018). cumulative incidence of autism into adulthood for birth cohorts in Denmark, 1980-2012. *Jama*, 320(17), 1811-1813.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Schmahmann, & Caplan. (2006). Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain*, 129(2), 290-292.
- Scott, Schumann, Goodlin-Jones, & Amaral. (2009). A comprehensive volumetric analysis of the cerebellum in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Autism Research*, 2(5), 246-257.
- Shallcross, Bromley, Irwin, Bonnett, Morrow, & Baker. (2011). Liverpool Manchester Neurodevelopment Group; UK Epilepsy and Pregnancy Register. *Child development following in utero exposure: levetiracetam vs sodium valproate. Neurology*, 76(4), 383-389.
- Singletary. (2015). An integrative model of autism spectrum disorder: ASD as a neurobiological disorder of experienced environmental deprivation, early life stress and allostatic overload. *Neuropsychanalysis*, 17(2), 81-119.
- Skefos, Cummings, Enzer, Holiday, Weed, Levy, . . . Bauman. (2014). Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. *PloS one*, 9(2), e81255.
- Standring. (2016). Gray's Anatomy - The Anatomical Basis of Clinical Practice. In *cerebellum* (41. ed., pp. 331-349). London: Elsevier.
- Strömland, Nordin, Miller, Akerström, & Gillberg. (1994). Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 36(4), 351-356.
- Taner, Atasever, & Durgun. (2010). *Fonksiyonel nöroanatomi* (D. Taner Ed. 9. ed.). Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı.
- Tatu, Moulin, Bogousslavsky, & Duvernoy. (1996). Arterial territories of human brain: brainstem and cerebellum. *Neurology*, 47(5), 1125-1135.
- Taylor, Rosenqvist, Larsson, Gillberg, D'Onofrio, Lichtenstein, & Lundström. (2020). Etiology of Autism Spectrum Disorders and Autistic Traits Over Time. *JAMA psychiatry*.
- Taylor, Swerdfeger, & Eslick. (2014). Vaccines are not associated with autism: an evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine*, 32(29), 3623-3629.
- Terbach, & Williams. (2009). Structure–function studies for the panacea, valproic acid. In: Portland Press Ltd.
- Thomas, Bedi, Davies, & Dobbing. (1979). A stereological analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and cerebellar cortex of weanling rats undernourished from birth. *Early human development*, 3(2), 109-126.
- TW. (2011). *Langman medikal embriyoloji* (H. Dalçık & M. Yıldırım Eds. 11. ed.). Ankara Palme Yayıncılık.
- Ulupinar, & Yucel. (2005). Prenatal stress reduces interneuronal connectivity in the rat cerebellar granular layer. *Neurotoxicology and teratology*, 27(3), 475-484.
- Ulupinar, Yucel, & Ortug. (2006). The effects of prenatal stress on the Purkinje cell neurogenesis. *Neurotoxicology and teratology*, 28(1), 86-94.
- Underwood. (1970). *Quantitative stereology*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Uusisaari, & De Schutter. (2011). The mysterious microcircuitry of the cerebellar nuclei. *The Journal of physiology*, 589(14), 3441-3457.
- Vakfi. (2020). *Otizm Spektrum Bozukluğu Özelinde Rapor Özeti*. Retrieved from https://www.tohumotizm.org.tr/wp-content/uploads/2020/06/TBMM_Komisyon_Raporu_yonetici-ozeti.pdf
- Van Overwalle, Baetens, Mariën, & Vandekerckhove. (2014). Social cognition and the cerebellum: a meta-analysis of over 350 fMRI studies. *Neuroimage*, 86, 554-572.
- Veenstra-VanderWeele, Christian, & Cook. (2004). Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 5, 379-405.
- Volkow, Wang, Ma, Fowler, Zhu, Maynard, . . . Wong. (2003). Expectation enhances the regional brain metabolic and the reinforcing effects of stimulants in cocaine abusers. *Journal of neuroscience*, 23(36), 11461-11468.
- Voogd, & Glickstein. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends in cognitive sciences*, 2(9), 307-313.
- Walsh, Morrow, & Rubenstein. (2008). Autism and brain development. *Cell*, 135(3), 396-400.
- Wang, Geng, Liu, & Zhang. (2017). Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism: a meta-analysis. *Medicine*, 96(18).
- Wang, Tan, Guo, Zheng, Han, So, . . . Zhang. (2018). Aberrant development and synaptic transmission of cerebellar cortex in a VPA induced mouse autism model. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 500.
- Warren, & Bedi. (1988). The effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the granule-to-Purkinje cell ratio in the rat cerebellum. *Journal of anatomy*, 159, 147.
- Warren, & Bedi. (1990). Synapse-to-neuron ratios in rat cerebellar cortex following lengthy periods of undernutrition. *Journal of anatomy*, 170, 173.
- Wegiel, Flory, Kuchna, Nowicki, Ma, Imaki, . . . Wisniewski. (2014). Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta neuropathologica communications*, 2(1), 141.
- Wegiel, Kuchna, Nowicki, Imaki, Wegiel, Marchi, . . . Bobrowicz. (2010). The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta neuropathologica*, 119(6), 755-770.
- Williams, & Hersh. (1997). A male with fetal valproate syndrome and autism. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 39(9), 632-634.
- Williams, King, Cunningham, Stephan, Kerr, & Hersh. (2001). Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 43(3), 202-206.
- Wright, Skaggs, & Nielsen. (2016). The cerebellum. *WikiJournal of Medicine*, 3(1), 1.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Yuasa, Kawamura, Ono, Yamakuni, & Takahashi. (1991). Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. *Anatomy and embryology*, 184(3), 195-212.
- Yucel, Warren, & Gumusburun. (1994). The effects of undernutrition on connectivity in the cerebellar cortex of adult rats. *Journal of anatomy*, 184(Pt 1), 59.
- Zerbo, Qian, Yoshida, Grether, Van de Water, & Croen. (2015). Maternal infection during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, 45(12), 4015-4025.

