



İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA KAINİK ASİT İLE OLUŞTURULMUŞ TEMPORAL LOB
EPİLEPSİNİN HİPOTALAMİK KİSSPEPTİN NÖRONLARI ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Cansu BİLİSTER EĞİLMEZ
ORCID: 0000-0003-3644-1433
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet KOYU

2024-İZMİR

T.C.

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA KAINİK ASİT İLE OLUŞTURULMUŞ TEMPORAL LOB
EPİLEPSİNİN HİPOTALAMİK KİSSPEPTİN NÖRONLARI ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Cansu BİLİSTER EĞİLMEZ
ORCID: 0000-0003-3644-1433
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahmet KOYU

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim birimi tarafından 2022-TDR-SABE-0003 numaralı proje ile desteklenmiştir.

2024-İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Nörofizyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/01/2024

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet Koyu, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 0000-0002-5427-3130

Üye: Prof. Dr. Eser Öz Oyar, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 0000-0003-1805-4149

Üye: Prof. Dr. Meltem Kuruş, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 0000-0002-2455-9605

Üye: Prof. Dr. Nuran Ekerbiçer, İzmir Tınaztepe Üniversitesi Tıp Faköltei Fizyoloji Anabilim Dalı, 0000-0001-5969-923X

Üye : Prof. Dr. Gökhan Cesur, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Faköltei Fizyoloji Anabilim Dalı, 0000-0002-6943-7521

ONAY: Bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Hatice Yıldırım Sarı

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir şekilde kullanıma açma iznini İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır. Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

17/01/2024

Cansu BİLİSTER EĞİLMEZ

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, ‘Ratlarda Kainik Asit İle Oluşturulmuş Temporal Lob Epilepsinin Hipotalamik Kissseptin Nöronları zerine Etkisinin Araştırılması’ başlıklı çalışmamın, Tez Danışmanım Prof. Dr. Ahmet Koyu danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip elebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

17/01/2024

Cansu BİLİSTER EĞİLMEZ

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını 2022-TDR-SABE-0003 Projesi kapsamında destekleyen *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne*,

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca anlayışını ve sabrını benden esirgemeyen, kimi zaman bana benden daha çok güvenerek her zaman destek olan ve bu süreci başarı ile tamamlama imkân veren danışmanım *Sayın Prof. Dr. Ahmet KOYU'ya*,

İster yanımda ister telefonun ucunda ama ne olursa olsun hep orada olan, aynı meslekte yol almaktan ve ekip arkadaşı olmaktan onur duyduğum, uykusuz laboratuvarında geçirdiğimiz gecelere de stresle projeleri tamamladığımız günlere de beraber katlandığımız, bakış açısı ile yoluma ışık tutan, bildiklerini bildiklerim yapan biricik can dostum *Arş. Gör. Dr. Burcu AZAK PAZARLAR'a*,

Doktora eğitimim ve tezimi hazırlama süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR ve Sayın Doç. Dr. Mümin Alper ERDOĞAN'a*,

Kimi zaman benden daha çok beni düşünen ve her işime kendi işi gibi koşan, ayrı Anabilim Dallarında olsak bile elinden gelenin fazlasını benim için ortaya koyan, bu süreçte desteğini hep hissettiğim canım arkadaşım *Arş. Gör. Dr. Gizem ÇİZMECİ'ye*,

Doktora tezim sırasında bunu nasıl yapacağız diye kapısını çalmama neden olan düğümleri tek tek çözerek yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatma Ezgi CAN'a*,

Bu tezin gerçekleşebilmesi ve bilime katkı sağlayabilmem için hayatlarını feda eden, tüm doktora tez sürecimin belki de en yakın şahitleri olan *Deney Hayvanları'na*,

Beni laboratuvara taşımaktan yorulmayıp tüm kahrımı çeken, yüzümü güldüren, maddi-manevi hep yanımda olup düşmeme izin vermeyen, hayatıma renk katan biricik yeğenim *Cansu KOÇER* ve kardeşlerim *Ekin ve Atıl KOÇER*'e,

Bu yaşıma kadar yapmak istediğim her şeyde olduğu gibi Doktora sürecimi de sonsuz bir özveri ile destekleyen, çalışma disiplinimi ve iş ahlakımı bana aşıl原因, akademinin olmazsa olmazı dürüstlük ilkesinin iliklerime kadar işlemlerini sağlayan canım *Annem ve Babama*,

Ve araştırmaya olan aşkımı hep anlayışla karşılayıp beni böyle kabul eden, gecem gündüzüm olmadığında bile laboratuvarın kapısında beni bekleyen, yorulduğumda omuzunda dinlendiğim ve hep elimi tutan biricik eşim *Can EĞİLMEZ*'e,

İçtenlikle minnet dolu teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

RATLARDA KAINİK ASİT İLE OLUŞTURULMUŞ TEMPORAL LOB EPILEPSİNİN HİPOTALAMİK KISSPEPTİN NÖRONLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Cansu BİLİSTER EĞİLMEZ

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim
Dalı Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 2024

Amaç: Epilepsi, serebral nöronların aşırı aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkan, tekrarlayan nöbetlerle seyreden yaygın ve kronik nörolojik bir hastalıktır ve üreme sistemi komorbiditelerine neden olmaktadır. Tez çalışmamızda epilepsinin hem hipotalamik kisspeptin nöron grubuna hem de östrus siklusuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: İntrahipokampal olarak kainik asit enjeksiyonu ile epilepsi modeli oluşturulmuştur. Zamansal uygulama grupları (7-30-60-90 gün) ve kontrol grupları oluşturulmuş ve vajinal sitolojik örnekler toplanarak siklus süreleri elde edilmiştir. Serum östradiol ve progesteron düzeyleri ölçülmüştür. Beyinlerde kisspeptin nöron grubu ve over kisspeptin düzeyi immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ayrıca overler histolojik olarak incelenmiştir.

Bulgular: 60 ve 90 gün kainik asit uygulama gruplarında siklus süresinde artış saptanmıştır. Östradiol düzeyi kontrol 7 grubunda artarken diğer kainik asit ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Progesteron düzeyi tüm gruplarda anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Hipotalamik kisspeptin nöron gruplarında epilepsi modeli oluşturulmuş hayvanlarda kontrollerine göre kisspeptin immunreaktivitesinde azalma olduğu ortaya konulmuştur. Over kisspeptin immunreaktivitesi ve kistik foliküler sayılarında gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sonuçlar: Bu veriler hipotalamik kisspeptin nöron grubunun epileptik süreçlerden etkilendiğini ve epilepsi ile ilişkili reproduktif-endokrin komorbiditelerin altında yatan nedenlerden biri olabileceğini göstermektedir. Bu komorbiditelerin teşhis ve tedavisi için yapılacak araştırmalar için de kılavuz olacağı umulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Temporal lob epilepsi, Kisspeptin, Arkuat nukleus, Anteroventral periventriküler nukleus, Östrus siklus

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF KAINIC ACID-INDUCED TEMPORAL LOBE EPILEPSY ON HYPOTHALAMIC KISSPEPTIN NEURONS IN RATS

Cansu BİLİSTER EĞİLMEZ

Izmir Katip Celebi University, Graduate School of Health Sciences, Department
of Physiology Doctoral Degree Thesis, Izmir, Turkey, 2024

Aim: Epilepsy is a common and chronic neurological disease characterized by recurrent seizures due to overactivity of cerebral neurons and causes reproductive system comorbidities. In our thesis study, we aimed to investigate the effect of epilepsy on both hypothalamic kisspeptin neuron group and estrous cycle.

Methods: An epilepsy model was established by intrahippocampal injection of kainic acid. Temporal treatment groups (7-30 60-90 days) and control groups were designed and vaginal cytologic samples were collected and cycle durations were obtained. Serum estradiol and progesterone levels were measured. Kisspeptin neuron group and ovarian kisspeptin levels in the brains were evaluated immunohistochemically and ovaries were examined histologically.

Results: In 60 and 90 days kainic acid treatment groups, there was an increase in cycle duration. While estradiol level increased in the control 7 group, no significant difference was found between the other kainic acid and control groups. Progesterone level was not significantly different in all groups. In hypothalamic kisspeptin neuron groups, it was revealed that there was a decrease in kisspeptin immunoreactivity in epilepsy model animals compared to controls. There was no significant difference between the groups in ovarian kisspeptin immunoreactivity and cystic follicular count.

Conclusions: These data suggest that the hypothalamic kisspeptin neuron group is affected by epileptic processes and may underlie reproductive-endocrine comorbidities associated with epilepsy. It is hoped that it will also be a guide for future research for the diagnosis and treatment of these comorbidities.

Keywords: Temporal lob epilepsy, Kisspeptin, Arcuate nucleus, Anteroventral periventricular nucleus, Estrous cycle

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epilepsi.....	4
2.1.1. Tanımı	4
2.1.2. Sınıflandırılması.....	5
2.1.3. Epilepsinin Etiyolojisi.....	8
2.2. Epileptogenezin Patofizyolojisi	9
2.3. Hayvanlarda Uygulanan Epilepsi Modelleri.....	11
2.3.1. Kainik Asit Modeli.....	12
2.4. Epilepsi ve Üreme Sistemi Disfonksiyonları.....	13
2.5. Kisspeptin.....	14
2.5.1. Kisspeptinin Yapısal Özellikleri	14
2.5.2. Kisspeptinin Üreme Sistemindeki Rolü.....	15
2.5.3. Kisspeptinin Beyindeki Haritalandırılması.....	17
2.5.4. Kisspeptin-Epilepsi İlişkisi	19
3. GEREÇ-YÖNTEM	20

3.1.	Deney Hayvanlarının Temini ve Gruplara Ayrılması.....	20
3.2.	İntrahipokampal Kainik Asit Enjeksiyonu ile Epilepsi Modelinin Oluşturulması.....	20
3.3.	Nöbet Derecelerinin Racine's Skalasına Göre Değerlendirilmesi.....	25
3.4.	Grupların Zamansal Olarak İzlenmesi, Östrus Siklus Takibinin Yapılması ve Deneylerin Sonlandırılması:.....	26
3.4.1.	Grupların Zamansal Olarak Takibinin Yapılması.....	26
3.4.2.	Vajinal Smear Alınması ve Östrus Siklus Fazlarının Belirlenmesi	27
3.4.3.	Terminal Kan Örneklerinin Alınması ve Deneylerin Sonlandırılması	30
3.5.	Serum Östradiol ve Progesteron Düzeylerinin Belirlenmesi	31
3.5.1.	Total Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	31
3.5.2.	ELISA Yöntemi ile Serum Östradiol Düzeylerinin Belirlenmesi.....	32
3.5.3.	ELISA Yöntemi ile Serum Progesteron Düzeylerinin Belirlenmesi.....	34
3.6.	Beyin ve Over Dokusunda Histolojik Analizler	35
3.6.1.	Hipotalamus Kisspeptin İmmunreaktivitesinin Belirlenmesi	35
3.6.2.	Over Dokusunda Kisspeptin İmmunreaktivitesinin Belirlenmesi ve Hematoksilen&Eozin Boyaması ile Morfolojik Değerlendirilmesi.....	37
3.7.	İstatistiksel Analizlerin Gerçekleştirilmesi	38
4.	BULGULAR.....	39
4.1.	Hayvanlarda Racine Skalasına Göre Davranışsal Değerlendirme.....	39
4.2.	İntrahipokampal Kainik Asit Mikroenjeksiyon Bölgesinin Doğrulanması	40
4.3.	Östrus Siklus Süresindeki Değişimin Değerlendirilmesi.....	40
4.3.1.	7 Günlük Zamansal Gruplara Ait Siklus Süresindeki Değişim Bulguları .	40
4.3.2.	30 Günlük Zamansal Gruplara Ait Ait Siklus Süresindeki Değişim Bulguları	41
4.3.3.	60 Günlük Zamansal Gruplara Ait Ait Siklus Süresindeki Değişim Bulguları	42
4.3.4.	90 Günlük Zamansal Gruplara Ait Ait Siklus Süresindeki Değişim Bulguları	42

4.3.5.	7-30-60 ve 90 Günlük İntrahipokampal Kainik Asit Uygulama Grupları Arasındaki Siklus Süresi Değişimleri	43
4.3.6.	7-30-60 ve 90 Günlük Kontrol Grupları Arasındaki Siklus Süresi Değişimleri.....	44
4.4.	Serum Östradiol Düzeylerine Ait ELISA Sonuçları.....	45
4.4.1.	7 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Östradiol Sonuçları	45
4.4.2.	30 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Östradiol Sonuçları	45
4.4.3.	60 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Östradiol Sonuçları	46
4.4.4.	90 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Östradiol Sonuçları	47
4.4.5.	7-30-60 ve 90 Günlük İntrahipokampal Kainik Asit Uygulama Grupları Arasındaki Serum Östradiol Seviyesi Değişimi.....	47
4.4.6.	7-30-60 ve 90 Günlük Kontrol Grupları Arasındaki Serum Östradiol Seviyesi Değişimi.....	48
4.5.	Serum Progesteron Düzeylerine Ait ELISA Sonuçları.....	49
4.5.1.	7 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Progesteron Sonuçları.....	49
4.5.2.	30 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Progesteron Sonuçları.....	49
4.5.3.	60 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Progesteron Sonuçları.....	50
4.5.4.	90 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Progesteron Sonuçları.....	51
4.5.5.	7-30-60 ve 90 Günlük İntrahipokampal Kainik Asit Uygulama Grupları Arasındaki Serum Progesteron Seviyesi Değişimi	51
4.5.6.	7-30-60 ve 90 Günlük Kontrol Grupları Arasındaki Serum Progesteron Seviyesi Değişimi.....	52
4.6.	Hipotalamik Kisspeptin Nöronlarının İmmundansite Sonuçları.....	53
4.6.1.	Arkuat Nukleus Kisspeptin İmmundansite Sonuçları.....	53
4.6.2.	Anteroventral Periventriküler Nukleus Kisspeptin İmmundansite Sonuçları	56
4.7.	Hipotalamik Kisspeptin Nukleuslarındaki İmmundansite Değişimin Östrus Siklus Süreleri ile İlişkilendirilmesi.....	60
4.8.	Overlerde Kisspeptin İmmundansitesi Sonuçları.....	63
4.9.	ARC ve AVPV Kisspeptin İmmundansiteleri ile Over Kisspeptin İmmundansitelerinin İlişkilendirilmesi.....	65

4.10.	Overlerin Morfolojik Değerlendirme Sonuçları.....	66
5.	TARTIŞMA	70
5.1.	İntrahipokampal Kainik Asit Enjeksiyonu ile Oluşturulan Epilepsi Modeline Dair Tartışma	70
5.2.	Racine Skalasına Göre Davranışsal Değerlendirmeye Dair Tartışma	72
5.3.	Östrus Siklus Süresindeki Değişimin Değerlendirilmesine Dair Tartışma	72
5.4.	Serum stradiol ve Progesteron Düzeylerine Ait ELISA Sonuçlarına Dair Tartışma	75
5.5.	Hipotalamik Kisspeptin Nöronlarının İmmunreaktivite Sonuçlarına Dair Tartışma	77
5.6.	Overlerde Kisspeptin İmmunreaktivitesi Sonuçlarına Dair Tartışma.....	79
5.7.	Overlerin Morfolojik Değerlendirme Sonuçlarına Dair Tartışma	80
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
7.	KAYNAKLAR	84
	EKLER.....	95
	ÖZGEÇMİŞ	96

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

- 3V:** 3. Ventrikül
4-AP: 4-aminopiridin
Ab: Tespit antikoru
ABC-P: Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi
AED: Antiepileptik ilaç
AF: Antral folikül
AMPA: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
AP: Anterior-posterior
ARC: Arkuat çekirdek
AtF: Antral folikül
ATPaz: Adenozin trifosfataz
AVPV: Anteroventral periventriküler çekirdek
BCA: Bikinkoninik asit
BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BSA: Sığır serum albümin
Ca: Kalsiyum
CA: Kornu Ammonis
CF: Kistik folikül
DAB: Diaminobenzidin
DG: Dentat girus
DV: Dorsoventral
E2: Östradiol
EEG: Elektroensefalografi
ELISA: Enzim bağlantılı immunosorbent testi
EtHO: Etanol
FSH: Folikül stimüle edici hormon
GABA: γ -aminobütirik asit
GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GPR54: G proteine bağlı reseptör 54
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HCl: Hidroklorik asit

HPG: Hipotalamik-pitütier (hipofizer)-gonadal
HRP: Horseradish peroksidaz
ILAE: Uluslararası Epilepsiye Karşı Lig
KA: Kainik asit
KAR: Kainik asit reseptörü
LH: Luteinizan hormon
M3: Muskarinik reseptör 3
ME: Median eminens
ML: Mediolateral
ml: mililitre
mRNA: messenger RNA
ng: nanogram
NMDA: N-metil-D-aspartat
ns: not significant (önemli /anlamli değil)
NSS: Normal domuz serumu
OCT: Optimum kesme sıcaklığı bileşimi
OHSS: Over hiperstimülasyon sendromu
OVL: Organum vaskulozum lamina terminalis
PBS: Fosfat tamponlu salin
PCOS: Polikistik over sendromu
pg: pikogram
Pg: Progesteron
SE: Status epileptikus
SS: Durdurma solüsyonu
TLE: Temporal lob epilepsi
Tris HCl: Tris Hidroklorid
TX: Triton 100X
ul: mikrolitre
WB: Yıkama tampon solüsyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Epilepsi Sınıflandırılması (38).....	7
Şekil 2. Epileptogenez (61).....	11
Şekil 3. <i>In vivo</i> epilepsi modelleri (62).....	12
Şekil 4. İnsanda Kisspeptin ve GPR54 protein yapısı A) Pre-pro-kisspeptin ve diğer aktif kisspeptinler B) GPR54 yapısı C) Plazma membranında GPR54 yapısı (83, 84)	15
Şekil 5. Menstruel sıklusta Kisspeptin/GPR54 sinyalizasyonu ve fizyolojik rolünün gösterilmesi A) GPR54 ve hücre içi sinyalizasyonu B) LH pikinde kisspeptinin rolü (84).....	16
Şekil 6. Menstruel siklus sırasında kisspeptin düzeyleri (84).....	17
Şekil 7. Kisspeptin nöronlarının merkezi sinir sistemindeki dağılımları (107).....	18
Şekil 8. Stereotaksi cihazı ve kayıt alanı	21
Şekil 9. Kemirgenlerdeki kafatası kemiklerinin bileşim noktaları ve suturların yaklaşık sınırlarının gösterilmesi. a) Frontal veya koronal sutur b) Bregma c) Sagittal sutur d) Lambdoidal veya oksipital sutur e) İntraaural çizgideki Lambda noktası (115)	22
Şekil 10. Stereotaksik cerrahi girişim ön hazırlık aşamaları. A) Kafa derisi tüylerinin traşlanması B) Bistüri ile kafa derisinin açılması C) Periost ve bağ dokusunun temizlenmesi D) Ön dişlerin stereotaksi cihazı çerçevesine yerleştirilmesi E) Kulak barlarının takılması F) Bregma ve Lambda'nın işaretlenmesi.....	23
Şekil 11. Stereotaksik cerrahi girişim aşamaları. A) Bregma ve Lambda'nın drill ve mikroenjektöre tanımlanması B) Drill ile kafatasının açılması C) Mikroenjektör ile kainik asit/ saline enjeksiyonu D) Otomatize stereotaksi cihazına uyumlu atlasta enjeksiyon yapılan alanın gösterilmesi E) Kafa derisine dikiş atılması F) Post-operatif olarak tekli kafeslerde hayvanların bakımı	25
Şekil 12. Stereotaksik girişim sonrası hayvanların gözlemlenmesi ve video-kayıtlarının alınması.....	26
Şekil 13. Deneysel dizayn şeması (BioRender.com'da tasarlanmıştır).....	27
Şekil 14. Vajinal smear örneğinin alınması ve Giemsa boyaması yapılmış preparatlar	28
Şekil 15. Östrus siklus evrelerine ait vajinal smear görüntüleri (40X) A)Proöstrus B)Östrus C)Metöstrus D)Diöstrus, Oklar: Nukleuslu epitel hücresi, Okbaşı: Nötrofil, Yıldız: Kümeleşmiş kornifiye hücreler (Ölçek çubuğu: 20 µm).....	29
Şekil 16. Phytton yazılımı ile elde edilen temsili siklus grafiğini göstermektedir. Siyah çizelge enjeksiyon öncesini, kırmızı çizelge enjeksiyon sonrası temsil etmektedir. X eksenini zaman aralıklarını, Y eksenini siklus dönemlerini yansıtmaktadır. P: Proöstrus, D: Diöstrus, M: Metöstrus, E: Östrus.....	30
Şekil 17. Total protein ölçümü basamakları (BioRender.com'da tasarlanmıştır)	32
Şekil 18. ELISA yöntemi basamakları (BioRender.com'da tasarlanmıştır).....	33

Şekil 19. İmmunohistokimyasal çalışma aşamaları (BioRender.com'da tasarlanmıştır)	36
Şekil 20. İntrahipokampal KA enjeksiyonu sonrası Racine skalasına göre değerlendirilen sıçanlarda görülen konvulzif semptomlar A) Hareketsizleşme B) Ön ekstremitte myoklonusu C) Ön ekstremitte klonusu D-E-F) Generalize konvulzyonlar, şahlanma ve denge kaybı G) Postür kaybı ve düşme H) Gözlerin kısılması ve ajitasyon durumu	39
Şekil 21. Enjeksiyon bölgesinin doğrulanması (133)	40
Şekil 22. 7. gün İntrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu siklus sürelerini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil)	41
Şekil 23. 30. gün İntrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu siklus sürelerini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil)	42
Şekil 24. 60. gün İntrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu siklus sürelerini gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Mann-Whitney U testine göre kontrole kıyasla anlamalı farklılığı temsil eder, * $p=0,016$	42
Şekil 25. 90. gün İntrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu siklus sürelerini gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Mann-Whitney U testine göre kontrole kıyasla anlamalı farklılığı temsil eder, ** $p=0,008$	43
Şekil 26. 7-30-60 ve 90 gün İntrahipokampal kainik asit gruplarının siklus sürelerinin karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Kruskal-Wallis testine göre gruplar arası anlamalı farklılığı temsil eder, ** $p =0,002$	44
Şekil 27. 7-30-60 ve 90 gün Kontrol gruplarının siklus sürelerinin karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Kruskal-Wallis testine göre gruplar arası anlamalı farklılığı temsil eder, * $p =0,017$	44
Şekil 28. 7. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu E2/Total Protein (pg/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Mann-Whitney U testine göre anlamalı farklılığı temsil eder, ** $p =0,016$	45
Şekil 29. 30. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu E2/Total Protein (pg/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil)	46
Şekil 30. 60. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu E2/Total Protein (pg/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil)	46
Şekil 31. 90. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu E2/Total Protein (pg/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil)	47
Şekil 32. 7-30-60 ve 90 gün intrahipokampal kainik asit gruplarının E2/Total Protein (pg/ml) seviyeleri karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Kruskal-Wallis testine göre gruplar arası anlamalı farklılığı temsil eder, * $p =0,023$	48
Şekil 33. 7-30-60 ve 90 gün kontrol gruplarının E2/Total Protein (pg/ml) seviyeleri karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Kruskal-Wallis testine göre gruplar arası anlamalı farklılığı temsil eder, ** $p =0,007$	49
Şekil 34. 7. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu Pg/Total Protein (ng/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil)	49

Şekil 35. 30. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu Pg/Total Protein (ng/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil).....	50
Şekil 36. 60. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu Pg/Total Protein (ng/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil).....	50
Şekil 37. 90. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu Pg/Total Protein (ng/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil).....	51
Şekil 38. 7-30-60 ve 90 gün intrahipokampal kainik asit gruplarının Pg/Total Protein (ng/ml) seviyeleri karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil).....	52
Şekil 39. 7-30-60 ve 90 gün kontrol gruplarının Pg/Total Protein (ng/ml) seviyeleri karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil)	52
Şekil 40. KA ve Kontrol zamansal gruplarındaki Arkuat çekirdek Kisspeptin immunreaktivitesinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri (10X, ölçek çubuğu 200 µm) ARC, arkuat nukleus; 3V, 3. Ventrikül; ME, median eminens; ok işareti intrahipokampal enjeksiyon yapılan hemisferi göstermektedir.	54
Şekil 41. Arkuat nukleus (ARC) kisspeptin immundansitesini gösteren kutu grafikleri * (yıldız işareti): t testi ve One-way ANOVA testine göre gruplar arası anlamlı farklılığı temsil eder, * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$	56
Şekil 42. KA ve Kontrol zamansal gruplarındaki Anteroventral periventriküler çekirdek Kisspeptin immunreaktivitesinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri (10X, ölçek çubuğu 200 µm) AVPV, Anteroventral periventriküler çekirdek; 3V, 3. Ventrikül; ok işareti intrahipokampal enjeksiyon yapılan hemisferi göstermektedir.	58
Şekil 43. Anteroventral periventriküler nukleus (AVPV) kisspeptin immundansitesini gösteren kutu grafikleri * (yıldız işareti): t testi ve One-way ANOVA testine göre gruplar arası anlamlı farklılığı temsil eder, * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$	60
Şekil 44. KA ve Kontrol grupları için ARC kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süre ortalamaları arasındaki ilişki	60
Şekil 45. KA 60 ve 90 gün grupları için ARC kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süre ortalamaları arasındaki ilişki.....	61
Şekil 46. KA ve Kontrol grupları için AVPV kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süre ortalamaları arasındaki ilişki.....	62
Şekil 47. KA 60 ve 90 gün grupları için AVPV kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süre ortalamaları arasındaki ilişki.....	62
Şekil 48. Over kisspeptin immunreaktivitesini gösteren histolojik kesitler, kutu grafikleri ve korelasyon değerlendirmesi A) Kontrol ve KA 7, 30, 60 ve 90 gün gruplara ait kisspeptin immunohistokimya boyama görüntüleri (10X, ölçek çubuğu: 200 µm), oklar kisspeptin immunreaktivitesini işaret etmektedir B) Overdeki kisspeptin immundansitesine ait kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil) C) Siklus süresindeki değişim ile % Kisspeptin immunreaktivitesi arasındaki korelasyonu gösteren grafik.....	64
Şekil 49. KA ve Kontrol grupları için ARC kisspeptin immundansitesi ile over kisspeptin immundansitesi arasındaki ilişki.....	65

Şekil 50. KA ve Kontrol grupları için AVPV kisspeptin immundansitesi ile over kisspeptin immundansitesi arasındaki ilişki.....66

Şekil 51. Overlerdeki kistik folikül sayıları A)7 günlük KA ve kontrol grubuna ait kistik folikül sayılarının karşılaştırmasını gösteren kutu grafiği B) 30 günlük KA ve kontrol grubuna ait kistik folikül sayılarının karşılaştırmasını gösteren kutu grafiği C) 60 günlük KA ve kontrol grubuna ait kistik folikül sayılarının karşılaştırmasını gösteren kutu grafiği D) 90 günlük KA ve kontrol grubuna ait kistik folikül sayılarının karşılaştırmasını gösteren kutu grafiği, ns: not-significant (anlamli değil)67

Şekil 52. Over fotomikroskopisi, Hematoksilen-Eozin boyaması (10X) A-B) Kontrol grubuna ait H&E boyamasının histolojik görüntüleri, ovaryan yapıların kompaktlığı ve stroma yapısının bütünlüğü C-D) KA grubuna ait H&E boyamasının histolojik görüntüleri. Yıldız işaret, stroma yapısındaki dağılma; AF, antral folikül; AtF, atretik folikül; CF: Kistik folikül.....68

Şekil 53. 7, 30, 60 ve 90 gün KA ve Kontrol uygulama gruplarının overlerdeki kistik folikül sayıları A) KA asit uygulama gruplarının overdeki kistik folikül sayılarının karşılaştırıldığı kutu grafikleri B) Kontrol gruplarının overdeki kistik folikül sayılarının karşılaştırıldığı kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)..... 69

1. GİRİŞ

Epilepsi, serebral nöronların aşırı aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkan, tekrarlayan nöbetlerle seyreden yaygın ve kronik nörolojik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (1). Temporal lob epilepsisi (TLE) ise, genellikle hipokampal skleroz, nörodejenerasyon ve hipokampal devrelerin yeniden organizasyonunun eşlik ettiği yetişkinlerde en yaygın görülen epilepsi şeklidir (2). TLE genellikle travmatik beyin hasarı, felç, beyin enfeksiyonları, uzamış status epileptikus (SE) veya kompleks ateşli nöbetler gibi beyin hasarlarının bir sonucu olarak meydana gelebilmektedir ve bu geçici hasardan sonra normal bir beyni epileptik bir beyne dönüştüren hücresel ve yapısal mekanizmalar "epileptogenez" terimiyle ele alınmaktadır (3-5). Bu süreç nöronal kaybı, voltaj kapılı kanal reseptörlerinin ekspresyonundaki değişiklikleri, metabolik değişiklikleri, immünolojik süreçleri ve gliozisi içerebilmektedir (6-8).

Epileptogenez patofizyolojisinin hala tam olarak anlaşılmasına ek olarak, yapılan gözlemler epilepsinin sadece nörolojik bir durum olmayabileceğini öne sürmektedir. Bu durumun sadece nedensiz nöbet geçirme eğilimi ile tanımlanamayacağı, daha karmaşık bir mekanizmayı içerdiği ve aynı zamanda sistemik bileşenlere de sahip olduğu düşünülmektedir (9). Çalışmalar komorbid ilişkilerinde varlığını göstermektedir. Epilepsi hastalarında psikiyatrik ve somatik değişikliklerin, epilepsi olmayan kişilere göre daha yaygın olduğu gösterilmiştir. İnme, demans ve migren gibi merkezi sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel hastalıklarının yanında nörolojik olmayan bozuklukların da epilepsi hastalarında insidansının arttığı görülmüştür. Örneğin, kalp hastalığı, hipertansiyon, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve neoplazma gibi nörolojik olmayan hastalıkların epilepsili kişilerde genel popülasyona göre görülme olasılığının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (10).

Diğer sistemlerde olduğu gibi reproduktif fonksiyonların da epilepsiye bağlı olarak etkilenebileceği düşünülmektedir. Epileptik kişilerde görülen bu etkilere, bireyin üreme hayatı boyunca çeşitli şekillerde ve çeşitli zamanlarda rastlanabilmektedir. Ergenlik, döngüsel menstrual fonksiyonlar ve menopoz, epileptik nöbetlerden ve/veya bunları tedavi etmek için kullanılan antiepileptik ilaçlardan etkilenebilir. Öte yandan, ergenlik ve menopoz gibi üreme döneminin dönüm noktaları

olarak kabul edilebilecek durumların da epileptik nöbetlerin başlangıcı, sıklığı ve şiddeti üzerinde etkileri bulunmaktadır. Hem antiepileptik ilaçlar hem de nöbetler endokrin sekresyonunu etkileyebileceğinden, spermatogenez, doğurganlık ve kontraseptif steroidlerin etkinliğinde değişiklikler olabilmektedir (11).

Epidemiyolojik çalışmalar, erkeklerde ve kadınlarda epilepsi insidansında herhangi bir farklılık göstermezken, durumun her yaştaki erkek ve kadınlar arasında yaratabileceği etkilerde de önemli farklılıklar olabilmektedir (12). Ancak seks hormonlarının özellikle östradiol ve progesteronun epileptik süreçlerdeki etkileri, katamenial epilepsi olarak tanımlanan ve kadınlarda menstrual siklus ile zamansal ilişkisi olan bir epilepsi modelinin tanımlanmış olması bu konuya önem kazandırmaktadır (13, 14). Epileptik süreçlerin ve/veya antiepileptik ilaçların (AED) hipotalamus-hipofiz-gonadal aksta meydana getirdiği değişikliklerin ve bunların yansımalarının hala tam olarak aydınlatılamamış olması dikkat çekicidir.

Hipotalamus-hipofiz-gonadal aksın fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerdeki etkileri araştırılırken çıkış sinyalinin, gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) hipofiz portal kanına salınması olduğu düşünülmektedir. Ancak bunun öncesinde GnRH salgılanmasını etkileyen çeşitli faktörlerin, GnRH nöronlarının öncesinde/yukarısında entegrasyonunun gerçekleştiği hipotezi öne çıkmıştır. Nitekim GnRH aktivitesini düzenleyen geniş bir dizi farklı nöronların işlevlerine dair çalışmalar bu hipotezi desteklemektedir. Ancak tüm bunların içerisinde özel bir nöron grubu olan Kisspeptin nöronları ön plana çıkmaktadır (15).

Kisspeptinler, ilk olarak metastaz baskılayıcı peptidler olarak tanımlanmıştır (16) ve 1q32 kromozom yerleşimli Kiss1 geni ürünleridir (17). Kiss1 geninin birincil ürünü, esas olarak plasentadan salgılanan kisspeptin-54 adındaki 54-aminoasitli bir peptiddir (18). Bunun dışında başka Kiss1 ürünleri de tanımlanmıştır (19). *Kiss1r* geninin baskılanması ve mutasyonu insan ve farede idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm, hipogonadizm ve infertiliteyle sonuçlanmaktadır (20). Bu bulgular, kisspeptin / *kiss1r* sinyalizasyonunun cinsel olgunlaşma için önemli olduğunu ve böyle bir sistemin üreme aksı, özellikle de GnRH salgısı ve puberte başlangıcı üzerindeki rolü ve işlevlerine katıldığını göstermektedir (21). Bugüne kadar incelenen memeli türlerinde, kisspeptin nöronal hücre gövdeleri iki büyük hipotalamik bölgede bulunmaktadır (22). Memelilerde kisspeptin sentezleyen nöronlar anteroventral

periventriküler(AVPV) ve arkuat çekirdek (ARC) olmak üzere iki büyük bölgede yoğunlaşmaktadır (23). Arkuat çekirdekteki nöron popülasyonunun pulsatil GnRH salınımının kontrolünden sorumlu olduğu gösterilmiştir (24). AVPV'deki kisspeptin nöronlarının ise anterior GnRH salınımının ve ardından ovulasyonun kontrolünde yer aldığı belirtilmektedir (25).

Epilepsi ile gelişen üreme sistemi bozukluklarına sebep olabilecek patolojik değişikliklerin neden ve süreçleri hala araştırılmaya ihtiyaç duymaktadır. Kisspeptin nöronlarının epileptogenez sürecinden ne şekilde veya ne derece etkilendiği de tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca kainik asitle oluşturulan hayvan modelinde kisspeptin nöronlarının işlevi ve bunun siklusa yansımaları hakkında literatürde ulaşılabildiğimiz üzere henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Hipotalamusta bulunan ve hipotalamohipofizer aksta önemli rolü kabul edilmiş olan iki büyük kisspeptin nöron popülasyonlarının (ARC ve AVPV çekirdek) epilepsiden etkilendiği ortaya konulursa hastalığın seyrinde görülen üreme disfonksiyonlarına dair soru işaretlerinin de kısmen aydınlatılacağı düşünülmektedir. Bu amaçla çalışmamızda intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu ile oluşturulan epilepsi modelinde östrus siklusu takip edilmiş, hipotalamik kisspeptin nöron grubundaki değişimler saptanmış ve overlerdeki kisspeptin ekspresyonu değerlendirilmiştir.

Bu çalışma ile büyük hipotalamik kisspeptin nöron gruplarında değişimin gösterilmesi hem epileptik süreçlerdeki reproduktif disfonksiyonların altında yatan nedenlerin aydınlatılmasının hem de daha ileri çalışmalarda epilepsi ile gelişen üreme disfonksiyonlarının ekstrapotalamik alanlardaki etkilerinin araştırılmasının da önünü açacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Epilepsi

2.1.1. Tanımı

Epilepsi, serebral nöronların aşırı aktivitesine bağlı olarak tekrarlayan nöbetlerle seyreden yaygın ve kronik bir beyin hastalığı olarak tanımlanmaktadır (26). Fakat epilepsiyi tek bir hastalık olarak tanımlamak doğru değildir; birçok farklı nedenden kaynaklanabilen ve altta yatan beyin fonksiyon bozukluğunu işaret eden birçok bozukluğu yansıtmaktadır (27). Her yaşta insanı etkilemektedir ve hem hastalar hem de aileleri üzerinde sağlıksal, davranışsal ve sosyoekonomik sonuçlar doğurmaktadır. Dünya çapında 50 milyondan fazla insanın epilepsi hastalığından etkilendiği tahmin edilmektedir (28).

Nöbet ve epilepsi terimleri genel olarak beraber kullanılmasına karşın tanımlamaları ve süreci ifade etmeleri açısından aralarında farklılık bulunmaktadır. Kelime olarak kriz/nöbet; Yunanca “ele geçirmek” anlamından türemiştir. Modern terminoloji, nöbet kelimesini herhangi bir ani ve şiddetli olay için kullanmaktadır (örneğin, kalp krizi gibi). Bazıları patolojik bile olmayan birçok fiziksel veya psikolojik ani olay, bazı yönlerden epileptik nöbetlere benzemektedir. Dolayısıyla epilepsi için kullanım epileptik nöbetler şeklinde olmaktadır. Böylece anormal nöronal ateşlemenin neden olduğu bir nöbet ile psikojenik nöbet gibi epileptik olmayan bir olay ayırt edilebilmektedir (27).

Epileptik nöbet, beyindeki anormal aşırı veya senkron nöronal aktiviteye bağlı olarak geçici belirti ve/veya semptomların ortaya çıkmasıdır. Epilepsi ise, tekrarlayan, provoke edilmemiş nöbetlerin meydana getirdiği durumdur. Epilepsi, her biri altta yatan beyin fonksiyon bozukluğunu yansıtan çok sayıda nedeni içermektedir. Örneğin ateş veya hipoglisemi tarafından tetiklenen bir nöbet, kronik bir durum değil, kısa süreli ikincil bir durum olduğu için epilepsi tanımına girmemektedir (29, 30).

Farklı tanımlar epileptik nöbetin farklı özelliklerini vurgulamaktadır; Bu özellikler;

- Başlangıç ve bitişinin doğası,
- Klinik belirtiler,
- Anormal gelişen nöronal senkronizasyon

Başlangıç ve bitişinin doğası: Bir epileptik nöbet, net bir başlangıç ve bitiş zamanıyla sınırlanmış “geçici” bir durumdur. Bir epileptik nöbetin sona ermesi, genellikle başlangıcından daha az belirgindir, çünkü postiktal durumun semptomları nöbetin sonunu bulanıklaştırabilmektedir. Status epileptikus ise, uzun süreli veya tekrarlayan nöbetlerin olduğu özel bir durumdur. Klinik ve elektroensefalografi (EEG) analizi genellikle status epileptikusun tanısına izin vermektedir. Bir epileptik nöbetin başlangıcı ve bitişini davranışsal olarak veya EEG ile belirlenebiliyor olsa bile bu iki kriterin her zaman örtüşmediği de kabul edilmektedir.

Klinik belirtiler: Epileptik nöbet klinik bir olaydır; bu nedenle semptomlar tanımda belirgin bir şekilde yer almaktadır. Nöbet görülmesi; beyindeki başlangıç yerine, yayılma paternlerine, beynin olgunluğuna, karışık hastalık süreçlerine, uyku-uyanıklık döngüsüne, ilaçlara ve çeşitli diğer faktörlere bağlıdır. Nöbetler duyuşal, motor ve otonomik işlevi etkileyebilir. Tüm nöbetler bu faktörlerin hepsini etkilemez, ancak en az birini etkiler. Bu bağlamda, duyuşal belirtiler, somatosensoriyel, işitsel, görsel, koku alma, tat alma ve vestibüler duyuşları kapsayabilmektedir.

Anormal gelişen senkronizasyon: Bu tanımın pratikte uygulanması en zor özelliğidir, çünkü elektriksel deşarj sadece bazı test koşulları altında görülebilir. Tekrarlayan nöbetleri olan hastalarda, nöbetler arasında ve hatta nöbetler sırasında EEG alınabilir. Böylece anormal elektriksel boşalmanın tespit edilebileceği varsayılmaktadır (27).

Tüm bu tanımlamalar ışığında nöbetler ve epilepsiler sınıflandırılarak ortak bir terminolojik yaklaşım benimsenmiştir.

2.1.2. Sınıflandırılması

Nöbetlerin ve epilepsilerin en son sınıflandırması, Mart 2017'de yayınlanan Uluslararası Epilepsiye Karşı Lig (ILAE) tarafından yapılmıştır. Bu yeni sınıflandırma, terminolojilerin net bir şekilde açıklanmasıyla daha iyi organize edilmiştir ve bazı yeni nöbet türleri eklenmiştir (31). ILAE'nin bu güncel sınıflandırmasında, epilepsinin klinik özellikleri üç düzeyde kategorize edilmiştir: Nöbetler, Epilepsiler ve Epilepsi sendromları. Ayrıca etiyoloji ve komorbiditelerin her düzeyde dikkate alınması vurgulanmıştır (32).

Nöbetler: Fisher ve arkadaşları yeni nöbet tiplerinin tanımlandığı ve eski terminolojilerin yenileriyle değiştirildiği, nöbetlerin revize edilmiş sınıflandırması ile ilgili yayınladıkları çalışmalarında nöbet sınıflandırması temel ve genişletilmiş sınıflandırma olmak üzere iki kategoride yapılmıştır (33). Temel sınıflandırma hem sağlık profesyonelleri hem de genel halk tarafından genel kullanım için tanımlanırken, genişletilmiş sınıflandırma nörologlar, psikiyatristler, beyin cerrahları gibi uzmanlar veya epilepsi konusunda özel uzmanlığa sahip olan kişiler için tanımlanmıştır (34).

Bu revize edilmiş sınıflandırmada, nöbetler üç özelliğe göre sınıflandırılır:

- Nöbetin beyindeki başlangıç noktasına
- Nöbet süresince bireyin farkındalık düzeyine
- Beden hareketinin düzeyine

İlk özelliğe dayanarak, bir nöbet fokal başlangıçlı veya genel başlangıçlı olabilmektedir. İkinci özellik ise farkındalığın (kendinin ve çevrenin bilgisi) bozulmamış veya farkındalığın bozulmuş olduğu anlamına gelirken, son özellik, nöbetin motor veya motor olmayan başlangıçlı olabileceği anlamına gelmektedir. Bu yapılara göre nöbetler üçe ayrılmaktadır:

1) Fokal başlangıçlı nöbetler:

- a) Kalıcı farkındalık/bozulmuş farkındalık
- b) Motor/motor dışı başlangıç
- c) Fokalden bilaterale tonik-klonik

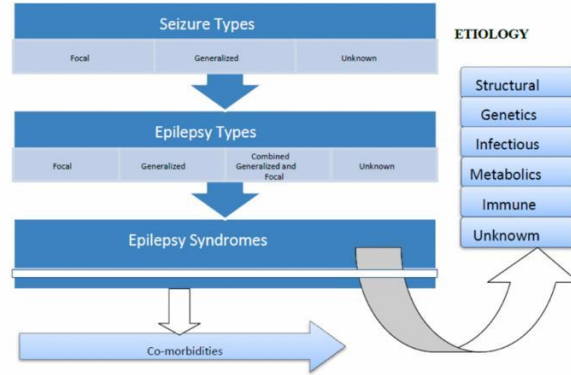
2) Jeneralize başlangıçlı nöbetler (motor veya motor olmayan)

3) Bilinmeyen başlangıçlı nöbetler (motor veya motor olmayan) (35).

Fokal başlangıçlı nöbetler, serebral hemisferin tek tarafındaki anormal elektriksel aktiviteden kaynaklanmaktadır ancak başladıktan sonra ilerleyerek diğer hemisfere de geçebilmektedir. Farkındalık fokal nöbette değişkenlik gösterebilmektedir. Kimi fokal nöbetlerde kişi kendinin ve çevresinin farkındayken çoğu nöbette bu farkındalık kaybolmaktadır. Tek bir vücut uzvunda başlayan sarsıntı veya seyirme diğer tarafın uzvunu da etkileyecek şekilde yayılarak fokalden bilateral tonik klonik nöbete dönüşebilmektedir.

Jeneralize nöbetler, anormal elektriksel aktivitelerin hem sağ hem de sol serebral hemisferlerden eşzamanlı olarak başladığı ve hastanın klinik semptomları veya EEG kayıtları ile diğer beyin bölgelerine yayıldığı gösterilen nöbetlerdir (36). Jeneralize nöbetler motor semptom gösteren veya göstermeyen nöbetler şeklinde olabilmektedir. Motor nöbetler tonik-klonik, klonik, tonik, miyoklonik, miyoklonik-tonik-klonik, miyoklonik-atonik, atonik veya epileptik spazmları içerirken, motor olmayan nöbetler tipik veya atipik absans nöbetleri, miyoklonik aktivite veya göz kapağı miyoklonisini içeren nöbetlerdir. Jeneralize nöbetlerin çoğunda, farkındalık bozulmaktadır (32, 36, 37).

Başlangıcı bilinmeyen nöbetler, uykuda, hastanın tek başına olduğu ya da nöbeti gören kişinin düzgün tanımlayamadığı durumlarda ortaya çıkan nöbetlerdir. Buna ek olarak, klinisyenin verilen bilgiler ile olayın bir nöbet olduğundan emin olduğu ancak eksik bilgi nedeniyle tanımlayamadığı durumlarda da sınıflandırılmamış bir nöbet olarak kabul edilmektedir (31).



Şekil 1. Epilepsi Sınıflandırılması (38)

Epilepsiler: Gözden geçirilerek yeniden tanımlanan sınıflandırmada epilepsi dört ana tipte sınıflandırılmaktadır:

- 1) Fokal
- 2) Jeneralize
- 3) Kombine jeneralize ve fokal
- 4) Bilinmeyen

Fokal epilepsi, bir hemisferle sınırlı olan, tek odaklı veya çok odaklı her türlü fokal nöbetle ortaya çıkan epilepsilerdir ve klinik olarak teşhis edilebilirler. Jeneralize epilepsi ise motor veya motor olmayan birçok nöbet tipinden oluşmaktadır ve EEG'deki yayılmış sivri dalga aktivitesine ve daha da önemlisi klinik semptomlarla tanısı yapılabilmektedir. Nöbetlerin fokal veya jeneralize olarak kategorize edilemediği durumlarda ise bilinmeyen olarak adlandırılmaktadır (36, 39).

Epilepsi sendromları: Edinsel veya konjenital bir lezyonun neden olduğu fokal beyin bölgesinde nöbetlerin ortaya çıktığı sendromlardır. Etiyolojiler arasında tümör, skar (örneğin hipokampal skleroz), kortikal displazi, porenselalik kist ve vasküler malformasyon bulunmaktadır (30).

2.1.3. Epilepsinin Etiyolojisi

İlk epileptik nöbetin ortaya çıktığı andan itibaren epilepsinin etiyolojisini belirlemek en önemli unsurlardan biridir. Bir dizi etiyolojik grup tanı yöntemleri kullanılarak tanımlanmıştır. Kişinin epilepsisi için yapısal bir etiyolojiye ek olarak beş ek grup tanımlanmış olup bunlar; genetik, enfeksiyöz, metabolik, immün ve bilinmeyen şeklindedir. Epilepsi birden fazla etiyolojik kategoriyi içerebilir ve etiyolojiler hiyerarşik değildir (39).

Yapısal etiyoloji: Yapısal bir anormalliğe bağlı olarak epilepsi görülme oranının önemli ölçüde artmış olmasıdır. İnme, travma veya kortikal gelişimin malformasyonuna bağlı olarak gelişebilmektedir (40).

Genetik etiyoloji: Epilepsinin doğrudan genetik bir mutasyondan kaynaklanmasıdır. Genetik bir etiyojinin rol oynadığı epilepsiler oldukça çeşitlidir ve çoğu durumda altta yatan genler hala tam olarak bilinmemektedir (39).

Enfeksiyöz etiyoloji: Dünya çapında en yaygın etiyoloji, epilepsinin bir enfeksiyonun sonucu olarak ortaya çıkmasıdır. Nöbetler doğrudan bir enfeksiyondan kaynaklanmaktadır. Enfeksiyöz bir etiyoloji, menenjit veya ensefalit gibi akut enfeksiyon ortamında meydana gelen nöbetlerden ziyade epilepsili bir hastayı ifade eder. Yaygın örnekler arasında nörosistiserkoz, tüberküloz, HIV, serebral sıtma, subakut sklerozan panensefalit, serebral toksoplazmoz bulunmaktadır (39, 41).

Metabolik etiyoloji: Bir dizi metabolik bozukluk epilepsi ile ilişkili olabilmektedir. Nöbetler doğrudan bir metabolik bozukluktan kaynaklanmaktadır. Porfiri, üremi, aminoasidopatiler metabolik etiyolojiler arasında sayılmaktadır.

Immun etiyoloji: Nöbetler bir immun sistem bozukluğundan kaynaklanmaktadır. Anti-N-metil-D-aspartat (Anti-NMDA) reseptör ensefaliti ve anti-LGI1 ensefaliti bu etiyolojilere örnek verilebilir.

Bilinmeyen etiyolojiler: Epilepsinin nedeninin henüz bilinmediği anlamına gelmektedir. Etiyolojinin bulunabilme derecesi, hastaya sunulan değerlendirmenin kapsamına bağlı olabilmektedir. Sağlık hizmetlerine erişim ve ülkeler arasındaki farklılıklara bağlı olarak etiyolojilerinin kaynağının belirlenememesinin oranı da değişmektedir (39).

2.2.Epileptogenezin Patofizyolojisi

Epileptogenez, genel olarak, etiyolojilerden biri veya birkaçına bağlı olarak spontan tekrarlayan nöbetlerin gelişiminden sorumlu biyolojik süreç olarak tanımlanmaktadır. Bu süreçte moleküler, hücresel ve sistem düzeyinde mekanizmalar devreye girmektedir. Epileptogenez sürecinin anlaşılabilmesi için nöbetlerin nasıl başladığını, oluşumunu, meydana gelen transmembran potansiyelindeki değişimleri ve en önemlisi sinaptik plastisiteyi kavramak gerekmektedir (42).

Nöbetlere birden fazla mekanizma neden olabilmektedir, bununla birlikte, sıklıkla tartışılan ilk mekanizma, normal eksitasyon-inhibisyon dengesinin bozulmasıdır. Fizyolojik koşullarda nöronları aşırı aksiyon potansiyeli deşarjından koruyan kontrol mekanizmaları ve sinir sisteminin uygun şekilde çalışabilmesi için nöronal ateşlemeyi kolaylaştıran mekanizmalar bir arada bulunmaktadır. Deşarjı engelleyen mekanizmaların bozulması veya uyarmayı kolaylaştıran mekanizmaların aşırı tetiklenmesi nöbetlere yol açabilmektedir (43).

Normalde bir nöronda hücre içerisinde yüksek konsantrasyonda potasyum; hücre dışında ise yüksek sodyum konsantrasyonu bulunmaktadır, bu da -60 mV net transmembran potansiyeline yol açmaktadır. Sodyum-potasyum adenosin trifosfat (ATPaz) gibi kimyasal ve elektriksel gradyanları korumak için ise plazma zarında pompalar bulunmaktadır. Tüm bu yapılardan birinde meydana gelebilecek dengesizlik veya defektler nöronların uyarılabilirliğini değiştirmekte ve böylece nöbet oluşumunu

kolaylaştırma olasılığını artırmaktadır. Bunlara ek olarak, glialar gibi hücre dışı iyon konsantrasyonu üzerinde önemli rolleri olan diğer hücre ve yapılarda homeostazisin korunmasında etkilidir (44-46).

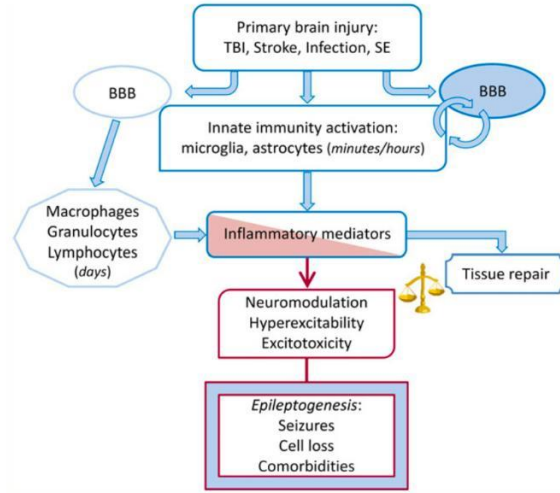
Eksitasyon ve inhibisyon arasındaki dengedeki diğer önemli unsur ise sinaptik iletimdir. Sinaptik iletimin moleküler mekanizmalarını tanımladıkça, hemen hemen her adımda meydana gelebilecek defektlerin nöbetlere yol açabileceği anlaşılmıştır. Sinir sisteminin başlıca eksitatorik ve inhibitörük transmitterleri olan glutamaterjik ve γ -aminobütirik asit (GABA)-ergik yollar üzerinde durulmaktadır. GABAerjik internöronların kaybı veya kronik baskılanması ile nörogenez ile yeni ve tekrarlayan glutamaterjik uyarıcı devrelerin oluşumuna bağlı olarak denge bozulmaktadır (42, 47-49).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki nöronal hasarı olan alanlar tipik olarak, temporal lobda bulunan hipokampus cornu ammonis 1(CA1), CA3 ve dentat girus (DG) içermektedir, ancak hasar aynı zamanda entorinal ve piriform korteks veya amigdala gibi ekstrapokampal bölgelere de uzanmaktadır. Hipokampusun CA1 bölgesinin hem önemli nöronal kaybın hem de nöbet duyarlılığının arttığı bir bölge olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (50-53).

Hemen hemen tüm hayvan modellerinde ve insan doku çalışmalarında, bazı GABAerjik internöronların dejenere olduğu, özellikle dış moleküler tabakadaki somatostatin içeren internöronların en savunmasız olanlar arasında olduğu ortaya konulmuştur (54). Dentat granül hücrelerden ve CA1 piramidal hücrelerden alınan tüm hücre kayıtları, status epileptikus, kindling ve diğer modellerden sonra minyatür inhibitörük postsinaptik potansiyellerin sıklığında bir azalma olduğu göstermiştir (54-58).

Dentat granül hücreleri yosunsu liflerinin ise aksonal filizlenme ile yeni ve anormal sinapslar oluşturdukları ortaya konulmuştur (42, 49, 51, 52). Bu yeni bağlantıların, normalde innerve etmedikleri nöronlar üzerinde uyarıcı sinapslar oluşturması ise anormal uyarılmanın sebepleri arasında gösterilmektedir (7, 59).

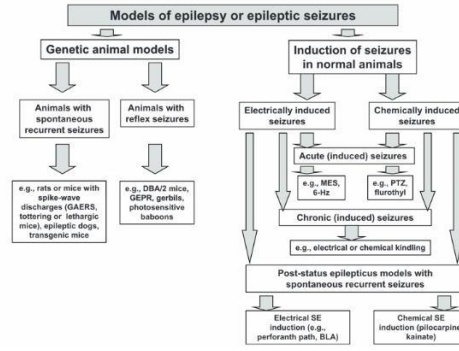
Bunlara ek olarak kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazisi, glutamat/GABA reseptör sentez veya yıkımı, glial hücre transport mekanizmalarındaki değişiklikler de araştırılmaya devam etmektedir (60).



Şekil 2. Epileptogenez (61)

2.3. Hayvanlarda Uygulanan Epilepsi Modelleri

Epilepsi ve epileptogenez tanı ve tedavilerine dair çalışmalarda, yaygın olarak toplumlarda görülen temporal lob epilepsi hastalarından alınan epileptojenik odak doku örnekleri kullanılmasına rağmen, yeterli sayıda epileptik olan ve olmayan beyin dokusunun elde edilememesi, ayrıca bu dokulara erişimdeki kısıtlayıcı faktörlerde göz önüne alındığında prelinik olarak hayvan çalışmaları ön plana çıkmaktadır. Epileptojenik hasarların ve epileptogenez mekanizmalarının oluşturulması açısından genetik hayvan modellerinin yanı sıra, nöbetlerin indüklenmesi yoluyla (eksitotoksik epilepsi modelleri-kainik asit, pilokarpin-, kindling, travmatik beyin hasarı, inme veya inflamasyon) modeller oluşturulabilmektedir (3, 60, 62).



Şekil 3. *In vivo* epilepsi modelleri (62)

2.3.1. Kainik Asit Modeli

Deneyssel temporal lob epilepsi modellerinin, insanlarda görülen patolojik, elektroensefalografik ve davranışsal değişikliklerin aynısını yansıtacak özelliklerin hepsine sahip olması beklenmemektedir. Ancak araştırma sonuçlarının doğruyu yansıtabilmesi için en yakın modele ihtiyaç duyulmaktadır. Kainik asit modeli, daha önceki yapılan çalışmalar ile epilepsinin altında yatan farmakolojik, moleküler ve hücresel temelli değişiklikleri yansıtabildiği gösterilmiş modellerden bir tanesidir (63).

Kainik asit (KA) L-glutamatın siklik analogu ve iyonotropik KA reseptörlerinin agonistidir. Güçlü bir glutamat analogu olarak depolarizasyonlara neden olabileceği ve hücre ölümünü indükleyebileceği, insanlarda görülen TLE'yi karakterize edecek şekilde spontan nöbetlerle son bulan ve latent periyot olarak da adlandırılan süreci oluşturduğu çalışmalar ile ortaya konmuştur (51, 62, 64).

KA reseptörleri (KAR) ise; amigdala (65), entorinal korteks (66), bazal gangliyonlar (67) ve serebellumun (68) yanı sıra hipokampusta de hem presinaptik hem de postsinaptik olarak yüksek oranda eksprese edilmektedir. KA1 VE KA2 reseptörlerinin glutamata yüksek affinitesi ve CA3 bölgesindeki yüksek ekspresyonu göz önüne alındığında KA ile indüklenmiş eksitotoksik hasara bu bölgenin daha duyarlı olabileceği ön görülmektedir (63, 64). Ayrıca yapılan çalışmalar epileptik hastaların ve epileptik hayvanların beyinlerinden alınan örneklerde histolojik olarak NMDA ve AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit) reseptörlerinin yosunlu lif filizlenmesine katkısının gözlemlenmesine ek olarak

KAR'ların da bu olaya etkisi olduğunu ileri sürmektedir (69-71). KAR'ların yeni oluşan ve anormal bir işleyişi olan sinaptik bağlantılarda elde edilen epileptiform aktivitenin meydana gelmesinde yer aldığını gösterilmesi ve tüm yukarıdaki veriler ele alındığında kainik asit modelinin temporal lob epilepsi modeli için hayvanlarda uygulanabilecek uygun bir model olduğunu ortaya koymaktadır.

2.4.Epilepsi ve Üreme Sistemi Disfonksiyonları

Üreme fonksiyon bozukluğu, epilepsili hem erkek hem de kadınlarda yaygın olarak görülen bir komorbiditedir (72). Temporal lob epilepsili hastalarda üreme bozuklukları gelişme oranı genel popülasyondan çok daha yüksektir ve bu değişiklikler kadınlarda düzensiz adet döngüleri, polikistik over sendromu (PCOS), hipotalamik amenore, ve hiperandrojenizm sıralanabilmektedir (73, 74). Bu komorbidite sadece üremeyi etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda epilepsi hastalarının genel sağlığını da etkilemektedir çünkü seks steroidleri yumurtalık, meme, prostat, testis, kardiyovasküler, kemik ve beyin dahil olmak üzere birçok fizyolojik sistem ve doku üzerinde geniş kapsamlı etkilere sahiptir (75).

TLE'li hastalarda üreme sistemi komorbiditelerine ilişkin veriler *in vivo* hayvan modellerinde yapılan araştırmalar ile de desteklenmektedir. Fawley ve ark.'nın yaptığı pilokarpin ile indüklenen status epileptikus modelinde GnRH pozitif nöronlarda bir azalma saptanmamış ancak östrus siklusunun bozulduğu belirtilmiştir (76). Östrus siklusundaki bozulmalar pilokarpin modelinin yanısıra kindling (77) ve intrahipokampal KA (78) modellerinde de ortaya konulmuştur.

Li ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise intrahipokampal kainik asit enjeksiyonunun, dişi farelerde östrus siklusunu uzattığı ve bunu overlerde herhangi bir patoloji gözlemlenmeden gerçekleştiği gösterilmiştir (72). Reprodüksiyonun hipotalamik kontrolünün bozulması hipotezinden yola çıkarak yaptıkları ileri araştırmalarında da epileptik farelerde GnRH nöronlarının diöstrus sırasında spontan ateşleme hızının arttığı, östrus sırasında ise azaldığı ortaya konulmuştur (79). Son yıllarda yaptıkları çalışmalarında ise epilepsinin şiddeti ile ilişkili olarak GnRH nöron fonksiyonunu değerlendirmiş ancak nöbet yükü ile GnRH ateşleme hızları arasında bir korelasyon bulunmamıştır (80). Komorbiditelerin gelişiminin sadece nöbet şiddeti ile

ilişkilendirilemeyeceği, bireysel farklılıklara bağlı komorbidite eğilimi oluşması, limbik ve hipotalamik yapılar arasındaki etkileşim, hipotalamus içerisindeki devre işlevlerindeki değişiklikler gibi faktörlerinde göz önüne alınması gerektiği düşünülmektedir. GnRH nöronlarından çıkan bilginin, hipotalamik-pitüiter-gonadal (HPG) eksenini yoluyla gerçekleşecek üremenin nöronal kontrolünde üst merkez ve ortak çıktı olduğu göz önüne alındığında, komorbiditelerin anlaşılabilmesi amacı ile daha fazla araştırmaya ihtiyacın olduğu netlik kazanmıştır.

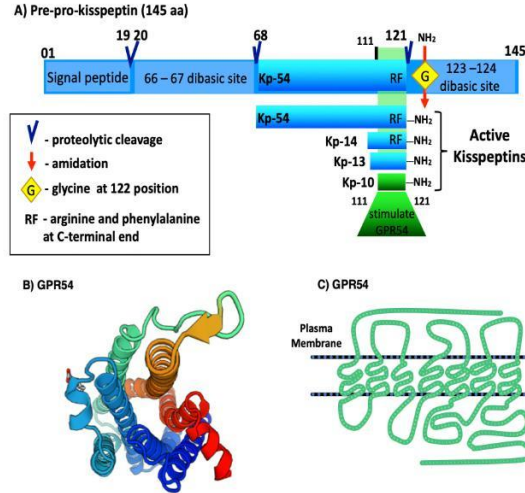
2.5.Kisspeptin

Kisspeptin, kromozom 1q32 yerleşimli KISS1 geninin ürünü olan peptitlerden oluşan bir ailedir (17). Literatürde ilk olarak metastaz baskılayıcı peptidler olarak tanımlanmıştır (16).

2.5.1. Kisspeptinin Yapısal Özellikleri

KISS1 geninin 145 aminoasitlik bir preküsörden türeyen -54, -14, -13 ve -10 amino asitli, N-terminallerinden kesilmiş ve C-terminalleri amidli, dört adet peptidi kodladığı belirlenmiştir. İnsanlarda plasenta içindeki hücre popülasyonlarında ve daha sonra testislerde, yumurtalıklarda, pankreasta ve ince bağırsakta eksprese edildiği bulunmuştur (19).

Kisspeptin reseptörü, GPR54 (Kiss1r) olarak bilinen ve bu peptide güçlü bir affinite ile bağlanan bir reseptördür (18, 19, 81). Kisspeptin hücre membranındaki kisspeptin reseptörü ile bağlandığında fosfolipaz C aktifleşmekte ve inositol trifosfat ve diaçilgliserol ikincil haberci yolağı devreye girmektedir. Bunu takiben kalsiyum salınımı ve protein kinaz C aktivasyonunun tetiklenmesi ve kisspeptin fonksiyonu başlamaktadır (81, 82).



Şekil 4. İnsanda Kisspeptin ve GPR54 protein yapısı A) Pre-pro-kisspeptin ve diğer aktif kisspeptinler B) GPR54 yapısı C) Plazma membranında GPR54 yapısı (83, 84)

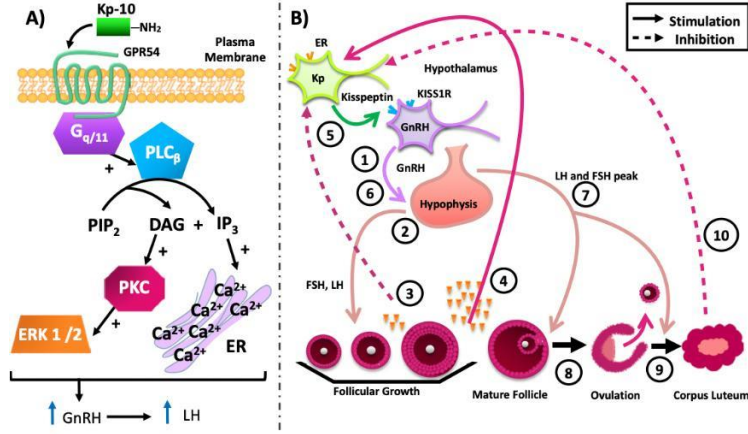
2.5.2. Kisspeptinin Üreme Sistemindeki Rolü

Periferdeki dokularda belirlenmesinden sonra belirgin şekilde beyinde eksprese edildiğinin keşfedilmesinin ardından fizyolojik süreçlerdeki rolü daha etkin araştırılmaya başlanmıştır. Rodentlerin hipotalamusunda özellikle Arkuat nükleus ve Anteroventral periventriküler nükleustaki lokalizasyonu belirlenmiş (85); insanlarda ise Infundibular nükleus ve Preoptik alanda yerleşimi ortaya konulmuştur (86).

Reproduktif aks nöronal ve hormonal olarak birbiri ile iletişimdeki 3 ana kaynaktan oluşmaktadır. Bunlardan ilki GnRH'nin sentezlendiği ve salgılandığı anterior hipotalamustur. Bir diğeri FSH ve LH'nin salgılandığı anterior hipofizdir. Bunlara son olarak katılan gametlerin üretiminden ve seks steroidlerinin salgılanmasından sorumlu gonadlardır (24, 87). Bu aksta etkili olduğu anlaşılması ile beraber kisspeptin/*Kiss1r* sinyalizasyonu yoğun olarak araştırılmaya başlanmıştır.

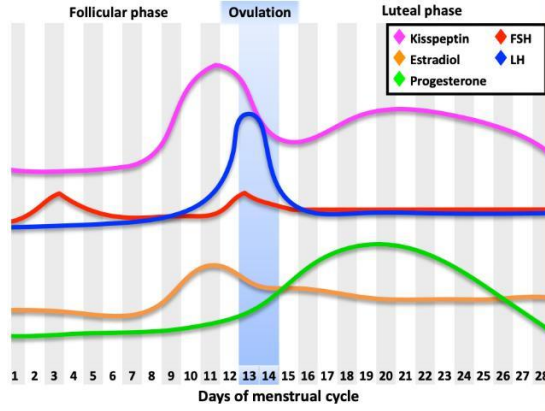
Yapılan çalışmalarla *Kiss1r* geninin baskılanmış veya mutasyona uğratılmış ve bunun sonucunda insan ve farede idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm, hipogonadizm ve infertilite meydana geldiği gösterilmiştir (88, 89). Bu bulgular, kisspeptin / *kiss1r* sinyalizasyonunun üreme aksında özellikle de GnRH salgısı ve puberte başlangıcı

üzerindeki rolü ve işlevlerine katıldığını göstermektedir (21). Kisspeptine yanıt olarak GnRH nöronlarının elektrofizyolojik özellikleri incelendiğinde, yetişkin erkek ve dişi farelerde kisspeptin uygulamasını takiben GnRH nöronlarının %90'ından fazlasının depolarizasyon gösterdiği ve bu oranın *Kiss1r* mRNA'yı eksprese eden benzer GnRH nöron yüzdesi ile uyumlu olduğu ortaya konulmuştur (90).



Şekil 5. Menstruel siklusta Kisspeptin/GPR54 sinyalizasyonu ve fizyolojik rolünün gösterilmesi A) GPR54 ve hücre içi sinyalizasyonu B) LH pikinde kisspeptinin rolü (84)

Santral sinir sisteminde kisspeptin-GnRH nöronları ilişkisi, kisspeptinin santral ve sistemik enjeksiyonları sonrası gonadotropinler üzerindeki potansiyel etkileri de tespit edilmiştir. Düşük doz kisspeptinin intraserebroventriküler enjeksiyonu sonrası FSH ve LH sekresyonundaki belirgin artış ortaya konulmuştur (85, 91, 92). Ayrıca preovulator LH pikinin oluşumunda önemli stimulator rolü olduğu ki bu stimülasyonun da dişilerde ovulasyonun gerçekleşmesine katıldığı gösterilmiştir (93, 94).



Şekil 6. Menstruel siklus sırasında kisspeptin düzeyleri (84)

Kisspeptinin yukarıda bahsedilen tüm fizyolojik süreçlere katkısına ek olarak dişilerde implantasyonun gerçekleşmesi ve gebeliğin sürdürülmesi için de önemli bir eleman olduğu tespit edilmiştir. İzole edilmiş ilk trimester trofoblastlarında Kisspeptin-10'un parakrin veya endokrin regülatör gibi etki ederek intraselüler Ca^{+2} düzeyini arttırdığı ve trofoblastların invazyonunda düzenleme gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Bu bulgularla paralel olarak gebe köpek uterusunda ve trofoblast hücrelerinde de aynı sonuçlar bulunmuştur (95, 96). Over hiperstimülasyon sendromu (OHSS) (97) ve PCOS (98) gibi üreme sistemi hastalıklarının patofizyolojisine katkıları ve in vitro fertilizasyon gibi tedavi süreçlerindeki etkileri hala araştırılmaya devam etmektedir (99).

2.5.3. Kisspeptinin Beyindeki Haritalandırılması

Kisspeptin-immunreaktif liflerin beyindeki dağılımı birçok memelide haritalandırılmıştır fakat bu dağılımla ilgilerin çoğu sıçan ve fare gibi deney hayvanlarından elde edilmiştir (100-104). Yukarıda belirtildiği gibi kisspeptin lifleri yoğun olarak hipotalamus ve preoptik alanda yer almaktadır. Preoptik alan sub-nukleusları, dorsomedial, paraventriküler ve özellikle arkuat nukleus gibi birçok nukleusu içermektedir. Hipotalamus dışında ise septum, subfornikal organ, stria terminalisin bed nukleusu, medial amigdala, talamusun anterior ve paraventriküler

Kisspeptinler ve Kisspeptin Nöronları Üzerine Etkileri ve Hipotalamik Yerleşimleri [391578]-420987.pdf - Adobe Acrobat Reader DC

Dosya Düzenle Görünüm Pencere Yardım

Ana Sayfa Araçlar Kisspeptinler ve Kıs... x

nükleusu, beyin sapının preaquaduktal gri cevher ve lokus soeruleusunda da kisspeptin lifleri gözlemlenmiştir (100-103, 105, 106). Anterograd ve retrograd izleme çalışmaları sonucunda hem preoptik alanda hem de arkuat nükleusta bulunan kisspeptin liflerinin ana popülasyonu olduğu ve özellikle arkuat nükleustan projekte olan liflerin beyin boyunca geniş alanlara yayıldığı ortaya konulmuştur.

Tür-Cins	Teknik	İsaretleyici	Kisspeptin nöron pozitifliği görülen alanlar	Referans
At-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC 566) (KP 43-52)	Arc, (DM)	41
Fare-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC 566) (KP 43-52)	RP3V, Arc, DM, PH	38
Fare-dişi	ISH		Arc, AVPV, PVN, (POA, amigdala, BnST)	47
Hamster-erkek	IHK	Tavşan anti insan (KP 4-13) (T-4771-Peninsula Lab. Inc.)	Arc, AVPV, DM	48
Hamster-erkek	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC 564)	Arc	49
Hamster-erkek	ISH		Arc	49
Koyun-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC 566) (KP 43-52)	AVPV, Arc, POA, DM	32
Koyun-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC) (KP 43-52)	Arc, POA	50
Koyun-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti insan KP-10 (KP 45-54) (Phoenix Pharmaceuticals-Inc.)	POA, PVN, Arc, (DM, VMH)	40
Sıçan-dişi	IHK	Monoklonal anti sıçan metastin (KP 1-52) (No:254)	Arc	51
Sıçan-erkek/dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti insan KP-10 (KP 45-54) (Phoenix Pharmaceuticals-Inc.)	DM, LRT, Arc, PVN, VMH, CVL, Sol, Sp5	43
Sıçan-erkek/dişi	RT-PCR		Hipotalamus, beyin sapı, medulla spinalis, serebral korteks	43
Sıçan-erkek/dişi	WB	Poliklonal tavşan anti insan KP-10 (KP 45-54) (Phoenix Pharmaceuticals-Inc.)	Hipotalamus, beyin sapı, medulla spinalis	43
Sıçan-erkek/dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti insan KP-10 (KP 45-54) (Phoenix Pharmaceuticals-Inc.)	Sol, CVL, (RVL, medulla spinalis)	52
Sıçan-erkek/dişi	IHK	Anti fare KP	Arc, AVPV	53
Sıçan-erkek/dişi	ISH		AVPV, Arc	46

57

Aramak için buraya yazın

Skype

Kisspeptin Siste...

Kisspeptinler ve ...

Distribution of K...

22:26
6.01.2020

Şekil 7. Kisspeptin nöronlarının merkezi sinir sistemindeki dağılımları (107)

Kisspeptin-GPR54 sistemi hipotalamusta araştırılması ve haritalandırılması yanında *in-situ* hibridizasyon çalışmaları limbik sistemin diğer alanlarında da eksprese edildiğini göstermiştir (19, 81, 108). Özellikle hipokampus ve amigdala bu alanlar içerisinde öne çıkmaktadır.

Hipokampusta GPR54 dansitesi DG granül hücre tabakasında yüksek saptanırken CA1 ve CA3'ün pyramidal hücre tabakasında çok daha az olarak tespit edilmiştir (108). Arai ve arkadaşlarının sıçan hipokampusunda gerçekleştirdikleri çalışmalarında kisspeptinin nöronal eksitabilite üzerine etkileri araştırılmış ve kisspeptinin granül hücrelerinde AMPA reseptör aracılı postsinaptik akımların amplitüdünü arttırdıkları ortaya konulmuştur. Ancak granül hücrelerinin üzerinde herhangi bir başka etkisi bulunmamıştır (109).

Kiss1r mRNA'nın, hipotalamusa göre hipokampusta 50 kat daha az olduğu belirlenmesine rağmen (81, 109-111) immunohistokimyasal çalışmalarda kisspeptin

immunreaktivitesi saptanamamıştır (100, 112). Bu da hipokampusun düşük düzeydeki kisspeptini kendi üretebileceği ve nöbet aktivitesi durumunda artabileceği hipotezini ortaya çıkarmaktadır (110). Dikkat çekici bir şekilde, organotipik hipokampal kesit kültürlerinde yüksek doz kisspeptinin (10 µM) beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) mRNA düzeyini yükselttiği ve BDNF'nin ise dentat girusta sinaptik transmisyonu arttırdığı ortaya konulmuştur (113). Tüm bu bilgiler kisspeptinin hipokampusta bir nöropeptid nöromodülatör olarak rol aldığını işaret etse dahi buradaki fonksiyonu hala tam olarak bilinmemektedir (114).

2.5.4. Kisspeptin-Epilepsi İlişkisi

Epilepside görülen üreme sistemi komorbiditeleri ile ilgili araştırmalarda genellikle GnRH nöronları üzerinde durulmaktadır. Fawley ve arkadaşları pilokarpın ile indükledikleri status epileptikus modelinde GnRH nöron sayılarındaki değişimi araştırmış; 1 hafta ve 3 aylık periyotlarda nöronlarda sayısal bir değişiklik gözlemlenmediğini belirtmişlerdir (76). Li ve arkadaşları ise intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu ile oluşturdukları epileptik farelerde overlerde morfolojik değişim izlenmeden östrus siklusun özellikle diöstrus döneminde uzamaların varlığını ortaya koymuşlardır (72). Yine aynı modelde GnRH nöron ateşleme ve uyarılabilirliği ile ilgili yaptıkları araştırmada KA grubunda GnRH nöron ateşleme hızında artış gösterilmiştir (79). Komorbiditelerin altında yatan nedenlerin aydınlatılmaya çalışılması esnasında GnRH nöronlarının uyarılmasında etkisi ortaya konulmuş kisspeptin nöron grupları ile ilgili bilgiler ise yok denecek kadar az sayıdadır. Bu patofizyolojik süreç içerisinde kisspeptin nöronlarının ne şekilde veya ne derece etkilendiği ise hala bilinmezliğini korumaktadır.

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Gruplara Ayrılması

Çalışmamızın deneysel prosedürlerinin yapılabilmesi amacı ile Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'dan 22.12.2021 tarih ve 2021-096 protokol numarası ile Etik Kurul Onay'ı alınmıştır (Ek-1). Deneylerde 200-220 gr ağırlığında dişi Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından temin edilmiştir. Hayvanlar 12 saat gece- 12 saat gündüz döngüsünde ve sıcaklığın sıçanlar için optimal olarak kabul edilen derecelerde olduğu odalarda kontrollü bir şekilde tutulmuşlardır. Suya ve gıdaya ad-libitum olarak erişebilmeleri sağlanmıştır.

Sıçanların deneysel süreç boyunca takip edilmeleri için her biri kuyruklarından işaretlenmişlerdir. Belirli periyotlarla kilo ölçümleri yapıp kaydedilmiştir. Tüm uygulamalar Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Hayvanların temininden sonra handling uygulaması ile hayvanların habituasyonu sağlanmış ardından rastgele olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hayvanlar, uygulamalar ve günlere göre kategorize edilmiştir. Kainik asit enjeksiyonu yapılan gruplar KA 7 gün (KA 7), 30 gün (KA 30), 60 gün (KA 60) ve 90 gün (KA 90) (her grup için n=5) olarak isimlendirilirken; salin enjeksiyonu yapılan gruplar kontrol 7, kontrol 30, kontrol 60 ve kontrol 90 (her grup için n=5) şeklinde isimlendirilmiştir.

3.2. İntrahipokampal Kainik Asit Enjeksiyonu ile Epilepsi Modelinin Oluşturulması

Yapılan çalışmalara göre intraserebral kainik asit uygulaması nöronlarda aşırı uyarılmaya ve eksitotoksisteye sebep olan iyi bir epilepsi modeli oluşturmaktadır. Hipokampus, kainik asit eksitotoksistesi için en savunmasız bölge olarak bilinmekte ve epilepsi patolojisi için nöbet başlangıç noktası olarak adlandırılmaktadır. Kainik asidi intrahipokampal yolla uyguladığımızda, bu model temporal lob epilepsisini histopatolojik, davranışsal ve elektroensefalografik olarak insanlardakine çok benzer

şekilde taklit ederek eksitotoksisite özellikle hipokampus bölgesinde meydana gelecektir (63).

İntrahipokampal enjeksiyon için stereotaksi cerrahi prosedürü uygulanmıştır (Şekil 8). Bu amaçla, ilk olarak hayvanların vücut ağırlıkları belirlenmiş ve 75-100 mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Ksilazin dozlarında anestezi intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Derin anesteziye girip girmedikleri ağrı duyusunun kontrolü ile tespit edilmiştir. Bu yöntemde ayak tabanı bir pens yardımı ile sıkıştırılarak ağrı duyusu olup olmadığı gözlemlenmektedir.



Şekil 8. Stereotaksi cihazı ve kayıt alanı

Reaksiyon göstermeyen hayvanların anesteziye girdikleri kabul edilerek kafa üzerindeki tüyler traş edilmiş ve batikonla temizlenerek bistüri ile tek seferde ortalama 1 cm uzunluğunda düz bir kesi atılmıştır. Alandan kanın uzaklaştırılması sonrası aponöroz doku bistüri yardımı ile temizlenmiştir. Steril ped ile bölge temizlenerek kuru hale getirilmiştir. Bu aşamada kafatası üzerindeki referans noktaları olan Bregma ve Lambda net olarak görülmüştür (Şekil 9).

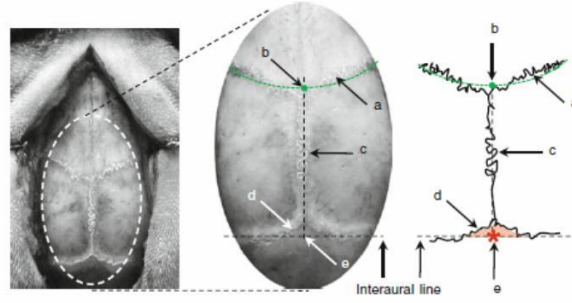


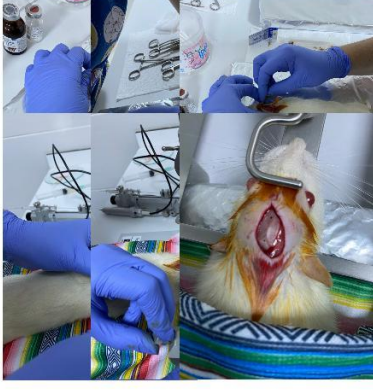
Fig. 5.25 The different bone plates of the rodent skull and their lines of approximation (*suture lines*). In this example, lambda (*red asterisk*) is situated on the interaural line. The triangle formed by the lambdoidal and sagittal suture lines is shown in *light red*. *a* Frontal or coronal suture. *b* Bregma. *c* Sagittal suture. *d* Lambdoidal or occipital suture. *e* Lambda located on the interaural line

Fig. 5.26 Diagram showing the different bone suture lines on the skull and plates (Fig. 11). In this example, lambda (*red asterisk*) is located rostral to the triangle formed by the lambdoidal and sagittal suture lines is shown in *light red*. *a* Frontal or coronal suture. *b* Bregma. *c* Sagittal suture. *d* Lambdoidal or occipital suture. *e* Lambda, located on the interaural line

Şekil 9. Kemirgenlerdeki kafatası kemiklerinin birleşim noktaları ve suturların yaklaşık sınırlarının gösterilmesi. a) Frontal veya koronal sutur b) Bregma c) Sagittal sutur d) Lambdoidal veya oksipital sutur e) İntraaural çizgideki Lambda noktası (Ş.15)

Sonrasında hayvan stereotaksi cihazına (Neurostar Drill and Injection Robot,

Tubingen, Germany) yerleştirilmiştir. Ön dişleri stereotaksik çerçeveye ait aparata yerleştirilmiş ve kulak barları dış kulak yoluna oturacak şekilde konumlandırılarak kafa düz bir biçimde sabitlenmiştir. İşlemler sırasında hayvanın dilinin hava yolunu kapatmaması ve kulak barlarının aşırı sıkıştırmamasına azami özen gösterilmiş ve her aşamada kontrol edilmiştir. Anestezi ile gelişen hipoterminin önüne geçmek için ise sıcak su pedleri hazırlanmış ve hayvanın yanına yerleştirilmiştir. Referans noktalarının hem drill hem de enjektörü için hep aynı noktayı tanımlatabilmek amacı ile bu noktalar stabilo kalem yardımı ile işaretlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Stereotaksik cerrahi girişim ön hazırlık aşamaları. A) Kafa derisi tüylerinin traşlanması B) Bistüri ile kafa derisinin açılması C) Periost ve bağ dokusunun temizlenmesi D) Ön dişlerin stereotaksi cihazı çerçevesine yerleştirilmesi E) Kulak barlarının takılması F) Bregma ve Lambda'nın işaretlenmesi

Bregma ve Lambda noktalarının drill ve mikroenjektör tarafından tanımlanabilmesi ve aynı noktayı kabul etmesi amacı ile bu noktalar her iki aparata da tanımlatılmıştır. Hedef bölge olarak hipokampus CA3 alanı koordinat olarak seçilmiştir. Bölgenin koordinatları sistem içerisine yerleştirilmiş Paxinos and Watson'ın sıçan beyin atlası referans alınarak tespit edilmiştir (116). CA3 bölgesine girişim için Bregma referans noktası tercih edilmiştir. Mikroenjektörün girişi sırasında en az hasarın meydana gelmesi, ana arterlerden uzak olması ve kainik asidin etkili olacağı için CA3'ün rostral olarak en uç bölgesi olan anterior posterior (AP) -2.04 mm; mediolateral (ML) -1.10 mm; dorsoventral (DV) 3.81 mm koordinatları hedef olarak tespit edilmiş ve cihaza hedef koordinat olarak tanımlanmıştır ve tek taraflı (unilateral) işlem yapılmıştır.

Bregmanın tanımlanmasının ardından drill hedef bölgenin üzerine götürülmüş, kafatasına değdiği nokta belirlenmiş ve ardından kafatası kemiği kademeli olarak kontrollü bir şekilde delinmiştir. Hayvandan hayvana yapısal farklılıklardan kaynaklı olarak 0.5 ile 1 mm arasındaki derinliklerde delme işlemi yapılmıştır. Kortikal hasarın

önüne geçebilmek için delme derinliği 50 µm olarak ayarlanmış ve kemikten gelen ses farklılıkları da gözetilmiştir. Kafatasına girildiğinin düşünüldüğü noktada insülin enjektörü ile açıklık kontrol edilerek duramatere zarar verilmeden girişimin yapıldığı tespit edilmiştir. Drill sırasında ortaya çıkan kemik tozları salin ile temizlenerek bölge enjeksiyona hazırlanmıştır.

Otomatik stereotaksik robot ile aynı delme işleminde olduğu gibi mikroenjektörün de hedef bölge koordinatlarına götürülmesi sağlanmıştır. 10 µl'lik Hamilton enjektörü kalibrasyonlar sırasında hazırlanmış ve enjeksiyonu yapılacak kainik asit/salin solüsyonları enjeksiyona hazır hale getirilmiştir. Bu amaçla belirlenen koordinata steril salin içinde çözündürülmüş 0.8 ug/2 ul (1.875 mM) kainik asit enjekte edilmiştir (79, 117, 118). Akış hızı 0.2 µl/dk olacak şekilde toplam 10 dakikada verilmiştir. Süresinin uzun ve dakikadaki veriliş miktarının düşük tutulması kainik asit gibi glutaminerjik sistemi uyarıcı ajanlar için önem teşkil etmektedir. Ketamin-kisilezin anestezisi NMDA reseptör blokajı yoluyla anestezi sağlamaktadır. Ancak hızlı bir şekilde enjekte edilen kainik asit NMDA reseptörlerine bağlanarak antagonistik bir etki oluşturmaktadır (119). Bunun önüne geçebilmek amacı ile veriliş hızı minimumda tutulmuştur. Buna ek olarak verilen sıvının geri tepmesini önlemek amacı ile enjeksiyonun bittiği andan itibaren 5 dakika daha beklenmiştir. Kontrol grubuna da intrahipokampal enjeksiyon için yapılan tüm basamaklar aynı şekilde uygulanmış ve 2 µl steril %0,9'luk izotonik salin solüsyonu aynı koordinatlara enjekte edilmiştir. Kafatası üzerinde açılan delik polimerize olurken ısı çıkartmayan dental akrilik kullanılarak; deri ise 4/0 ipek iplik kullanılarak tek ve devamlı sutur tipi ile dikilerek kapatılmıştır. Operasyon bölgesi tekrar batikon ile temizlenmiştir. Hayvanlar ortalama 7 gün yani dikişleri iyileşene kadar tekli kafeslerde tutulmuştur (Şekil 11). Bu süre zarfında post-operatif bakımları günlük olarak yapılmıştır.



Şekil 11. Stereotaksik cerrahi girişim aşamaları. A) Bregma ve Lambda'nın drill ve mikroenjektöre tanımlanması B) Drill ile kafatasının açılması C) Mikroenjektör ile kainik asit/ saline enjeksiyonu D) Otomatize stereotaksi cihazına uyumlu atlasta enjeksiyon yapılan alanın gösterilmesi E) Kafa derisine dikiş atılması F) Post-operatif olarak tekli kafeslerde hayvanların bakımı

3.3.Nöbet Derecelerinin Racine's Skalasına Göre Değerlendirilmesi

Nöbet değerlendirilmesi, Racine's skalasına dayanılarak yapılmıştır (120). Değerlendirmeler aşağıdaki şu belirtiler göz önüne alınarak gerçekleştirilmiştir:

- Reaksiyon yok: 0
- Stereotipik ağız hareketleri, göz kırpması ve hafif fasiyal klonuslar var : 1
- Kafa sallama ve çoklu fasiyal klonuslar var: 2
- Ön ekstremitelerde ani myoklonik refleksler ve seyirmeler gözlenmesi: 3
- Ön ekstremitelerde klonik konvülsiyonlar ve ayağa kalkma hareketleri meydana gelmesi: 4
- Genel klonik konvülsiyonlar ve denge kaybı gözlenmesi: 5 olarak değerlendirilmiştir.

Nöbetler hem araştırmacı tarafından gözlemlenmiş hem de video-kayıt altına alınmıştır (Şekil 12). Tüm video kayıtları incelenerek nöbet dereceleri tespit edilmiştir. 4 ve 5. Nöbet derecesine ulaşamayan hayvanlar çalışmaya dahil edilmemiştir (121).

EEG ile epileptiform aktivitenin her aşamada saptanması ve analiz edilebilir olmasının önemi de göz ardı edilmemelidir. EEG ile konvulsif ve non-konvulsif nöbetleri tespit ederek deney grupları kategorize edilebilir böylece hayvanların çalışmaya dahil edilmemesi durumu engellenebilir. Yine de çalışmamızda nöbetleri derecelendirmek için kullandığımız davranışsal değerlendirme de hala geçerli ve yoğun olarak kullanılan bir yöntemdir.

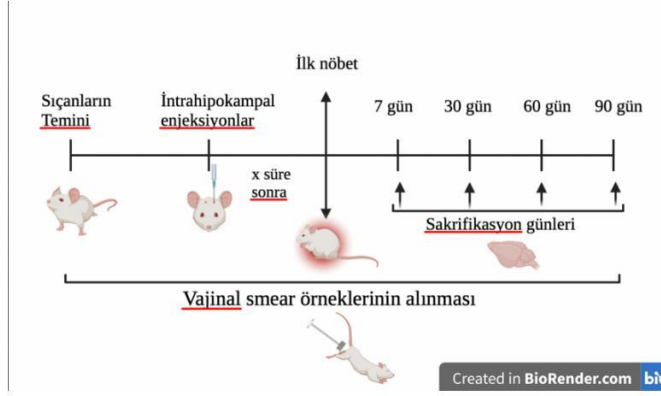


Şekil 12. Stereotaksik girişim sonrası hayvanların gözlemlenmesi ve video-kayıtlarının alınması

3.4.Grupların Zamansal Olarak İzlenmesi, Östrus Siklus Takibinin Yapılması ve Deneylerin Sonlandırılması:

3.4.1. Grupların Zamansal Olarak Takibinin Yapılması

Zamansal takibin yapılabilmesi için gruplar Kainik asit gün 7 (KA 7), KA 30, KA 60 ve KA 90 olarak ayrılmış ve o günlerde hayvanların sakrifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 13). Belirtilen günlere ait tüm gruplarda düzenli kilo ve östrus siklusu takibi yapılmıştır. Zamansal süreç hem akut hem de kronik yani epileptogenez sürecini de kapsayacak şekilde dizayn edilmiştir (72, 76, 79).



Şekil 13. Deneysel dizayn şeması (BioRender.com'da tasarlanmıştır)

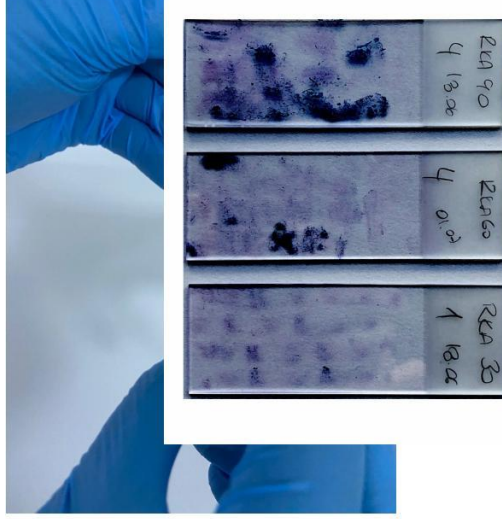
3.4.2. Vajinal Smear Alınması ve Östrus Siklus Fazlarının Belirlenmesi

Vajinal epiteldeki döngüsel değişiklikler hipotalamus- hipofiz- over aksının işlevinin ortaya konulması için kolay, girişimsel olmayan ve ayırıcı bir yöntem olarak kabul edilmektedir (122). Nöbetlerin östrus siklusuna yansımalarının takibi amacıyla zamansal olarak takip edilen gruplarda vajinal örnekler alınmış, boyanarak değerlendirilmiştir.

Erişkin dişi sıçanlar, mevsime bağlı olmaksızın 4-5 günde bir siklik aktivite gösteren poliöstrik hayvanlardır. Östrus siklusu farklı sürelerle kendini gösteren ve proöstrus (12-14 saat); östrus (24-48 saat); metöstrus (6-8 saat) ve diöstrus (48-72 saat) olarak adlandırılan dört dönemden oluşmaktadır (123)

Farklı siklus evrelerinde vajinal sitolojide gözlenen hücre tipleri farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar belirlenerek sıçanın hangi dönemde olduğu ortaya konulabilmektedir. Vajinal smear örnekleri alınırken sıçanlar kuyruk kökünden tespit edilmiş ve arka ayaklar havada olacak şekilde kaldırılarak tutulmuştur. Nemlendirilmiş bir swap çubuğu vajinaya yerleştirilerek tam bir tur döndürülmüş ve hücreler toplanmıştır. Önceden etiketlenerek grup-hayvan numaraları ve tarihi yazılmış lam üzerine swap üzerindeki hücreler yayılmıştır (Şekil 14). Preperatların havada kuruması sağlanmış ve ardından Giemsa boyaması yapılmıştır (Sigma-Aldrich; Giemsa stain, Procedure No: GS-10). Bu prosedürde öncelikle havada

kuruyan lamalar Methanol dolu cam şale içerisine yerleştirilmiş ve 5-7 dakika fikse olması sağlanmıştır.



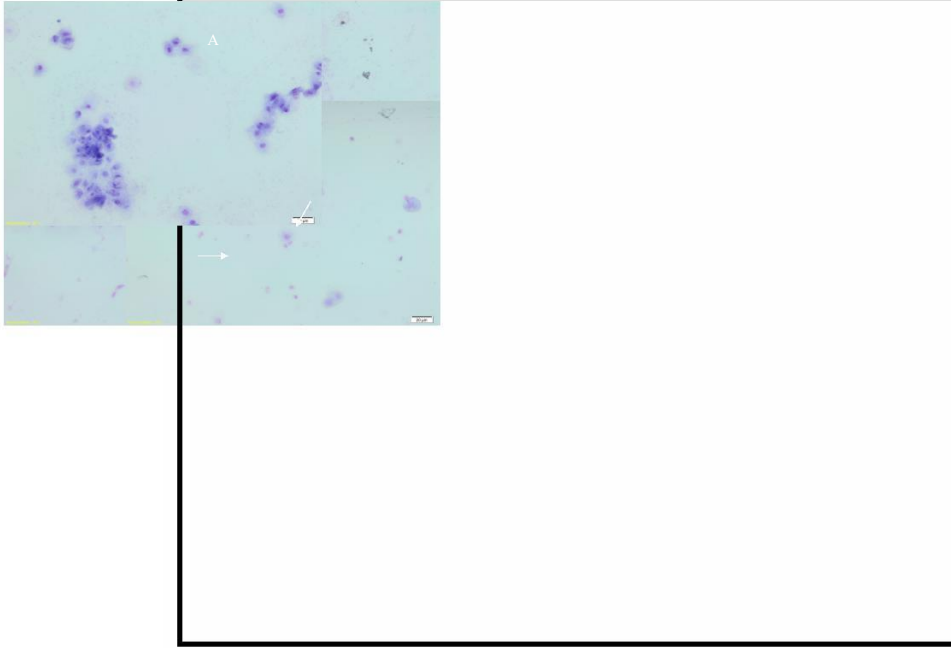
Şekil 14. Vajinal smear örneğinin alınması ve Giemsa boyaması yapılmış preparatlar

Lamlar tekrar havada kurutulmuş ve sonrasında ise 1:20 oranında distile su ile seyreltilmiş Giemsa boyası içerisine yerleştirilmiştir. Giemsa boyasında örnekler 15-20 dakika bekletilmiştir. Boyamadan çıkan preparatlar akar su altında tüm şaledeki su şeffaflaşana kadar bekletilmiş ve son olarak tekrar havada kurutularak mikroskopta (BX 43 Olympus) incelenmiştir (Şekil 15). Ancak hayvanlarda uzun süreli sürüntü alımlarında vajinal hassasiyet ve yalancı gebelik oluşması durumları göz önüne alınarak siklik takip yapılmış, son alınan örneğin günü tayin edilmiş ve 4.-5. günde smear alınarak siklus kaymaları kaydedilmiştir. Vajinal sürüntüye ek olarak görsel değerlendirme de yapılmış vajinal açıklık durumu, şişlik ve nemlilik durumları takip edilmiştir (123). Zamansal değişikliklerin saptanması amacı ile oluşturulan günlere ait hayvanlar hangi dönemde olduğu göz önüne alınmaksızın o gün kurban edilmiştir.

Smeardeki hücrelerin sayısı ve morfolojisine göre östrus siklus evreleri ise şu parametrelere göre belirlenmiştir (72).

- Proöstrus: Bu dönemin histolojik olarak en önemli özelliği nötrofil görülmemesidir. Küçük, yuvarlak ve nükleuslu epitel hücreleri sıkı kümeler halinde kendini göstermektedir (122).

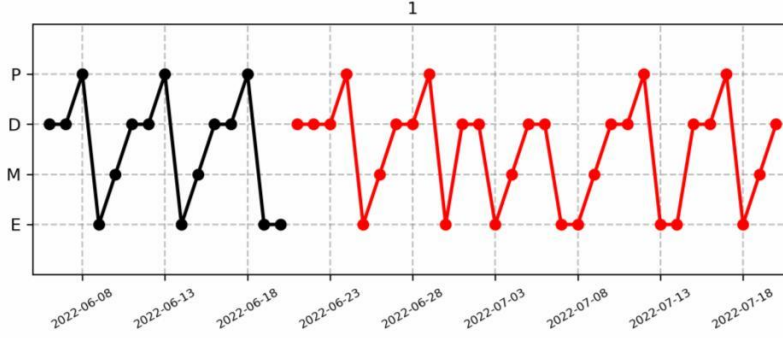
- Östrus: Histolojik olarak nükleussuz keratinize epitel hücrelerle karakterizedir. Özellikle ovulasyona yaklaştıkça büyük ve kümeleşmiş kornifiye hücreler görülmeye başlamaktadır (124).
- Metöstrus: Çekirdekli keratinize epitel hücreleri ve nötrofillerin beraber görüldüğü bir dönemdir. Özellikle dönemin ilerlemesi ile nötrofil baskınlığı artmaktadır (124).
- Diöstrus: Hücre sayısı bakımından düşük olarak nitelendirilebilen sakin bir dönemdir. Mukus varlığı saptanabilir. Nükleuslu ve nükleussuz epitel hücreler, keratinize hücreler ve nötrofiller gözlemlenebilmektedir (122, 124).



Şekil 15. Östrus siklus evrelerine ait vajinal smear görüntüleri (40X) A)Proöstrus B)Östrus C)Metöstrus D)Diöstrus, Oklar: Nükleuslu epitel hücresi, Okbaşı: Nötrofil, Yıldız: Kümeleşmiş kornifiye hücreler (Ölçek çubuğu: 20 µm)

Mikroskopta incelenen her bir preparatın hangi siklus döneminde olduğu bilgisi daha önceden hazırlanmış bir excel dosyasına kaydedilmiştir. Bu dosyada her bir gruptaki hayvanın numarası, smearin alındığı tarih, hangi dönemde olduğu ve örnekleme için kainik asit/salin enjeksiyonları öncesi ya da sonrası olduğuna dair kayıtlar yer almaktadır. Siklus dönemleri proöstrus için “P”; östrus için “E”; metöstrus için “M” ve diöstrus için “D” ile belirtilmiştir. Bu verilerin analiz edilebilir hale getirilmesi için ise Pantier ve arkadaşlarının fonksiyonunu oluşturduğu yüksek seviyeli

bir programlama dili olan Phyton yazılımı kullanılmıştır (Pyhton software 3.12.0., ABD). “<https://github.com/ChristianLabUIUC/EstrousCycle>” fonksiyonunu kayıt altına aldığımız excel dosyamız ile çalıştırmış ve her bir hayvana ait siklus grafikleri elde edilmiştir (Şekil 16) (125).



Şekil 16. Phyton yazılımı ile elde edilen temsili siklus grafiğini göstermektedir. Siyah çizelge enjeksiyon öncesini, kırmızı çizelge enjeksiyon sonrası temsil etmektedir. X eksen zaman aralıklarının, Y eksen siklus dönemlerini yansıtmaktadır. P: Proöstrus, D: Diöstrus, M: Metöstrus, E: Östrus

Grafikler toplanarak manuel şekilde siklus süreleri belirlenmiştir. En uzun ve yakalanabilir siklus evreleri östrus ve diöstrustur. Östrus-östrus / diöstrus-diöstrus arasındaki süreler hesaplanmıştır. Görsel değerlendirme bulguları da hesaplamalarda göz önünde bulundurulmuştur. Tek bir hayvan için sikluslara ait bir veri havuzu oluşturulmuş ve ortalama siklus uzunluğu hesaplanmıştır.

3.4.3. Terminal Kan Örneklerinin Alınması ve Deneylerin Sonlandırılması

Uygulamaların ardından zamansal değişim sürecinin incelenmesi için sıçanların sakrifikasyonları farklı günlerde gerçekleştirilerek beyin ve over dokuları örneklenmiştir. Bu örneklendirmeler ilk nöbetin görülmesinden itibaren 7, 30, 60 ve 90. günlerde gerçekleştirilmiştir. Deneylerin sonlandırılacağı günlerde hormon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere intrakardiyak kan alınmıştır. İntraperitoneal olarak yüksek doz anestezik ilaç enjeksiyonu sonrası abdomen bölgesi açılarak kalpten enjektör ile jelli serum ayırma tüplerine kan alınmıştır. Bu yöntemle

deney sonlandırılmış ve sıçanlar dekapite edilmiştir. Beyin ve over dokusu çıkarılarak immunohistokimya çalışması için %10'luk formalin çözeltilisine konulmuştur.

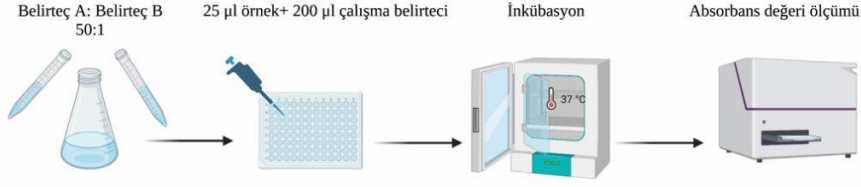
3.5.Serum Östradiol ve Progesteron Düzeylerinin Belirlenmesi

3.5.1. Total Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Toplanan kan örnekleri aynı gün 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilerek serumları toplanmış ve -20°C'de laboratuvar analizleri yapılana kadar saklanmıştır. Hormon seviyeleri Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Testi (ELISA) yöntemiyle tespit edilmiştir. İlk basamak olarak ise hormon seviyelerinin konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi amacı ile total protein tayini yapılmıştır. Total protein ölçümü için bikinkoninik asit (BCA) bazlı bir tayin kiti (Thermo Scientific, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, USA) kullanılmış ve kit içerisinde belirtilen prosedür takip edilmiştir (Şekil 17). Bu prosedüre göre; öncelikle 1 ml'lik Sığır Serum Albumin (BSA) solüsyon stoğundan konsantrasyon aralığı 20-2000 µg/ml olan seri dilüsyonlar halinde standartlar hazırlanmıştır. Çalışma belirteci solüsyonun toplam hacminin hazırlanması sırasında standart, örnek sayısı ve bunların tekrarları göz önüne alınmıştır. Bu amaçla aşağıdaki formülasyon izlenmiştir:

(‘n’ standart + ‘n’ örnek) x (‘n’ örnek tekrarı) x (çalışma belirteci hacmi/tek örnek)

Yukarıdaki formülasyona göre belirlenen hacim kitte bulunan Belirteç A ve Belirteç B'nin 50:1 oranında karıştırılması ile hazırlanmıştır. 96'lık mikrolaka kuyucuklarına 25 µl standart ve örnekler (tekrarları ile birlikte) (1/10 ve 1/20 dilüsyonlar) pipet ile koyulmuş ve ardından her bir kuyucuğa 200 µl çalışma belirteci eklenmiştir. Mikrolakanın üzeri şeffaf jelatin ile kapatılmış ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda oda sıcaklığında soğutulmuş ve 562 nm absorbans değerinde plaka okuyucuda absorbans değeri ölçülmüştür.



Şekil 17. Total protein ölçümü basamakları (BioRender.com’da tasarlanmıştır)

Plaka okuyucusunun verdiği absorbans değerlerinden konsantrasyon düzeyleri hesaplanmıştır. İlk olarak konsantrasyonları bilinen standartların absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve standart eğrisi elde edilmiştir. Bulunan linear regresyon eğrisinden eğim-kesim noktası denklemine göre örneklerin konsantrasyon hesaplamaları yapılmıştır.

$$\text{Denklem: } Y = mx+b$$

Bu denkleme göre m , eğimi değerini; y , absorbans değerlerini; b , kesim değerini; x ise bilinmeyen konsantrasyonu temsil etmektedir. Ulaşmaya çalıştığımız “ x ” sonucu için denkleminiz:

$$X = (y-b) / m$$

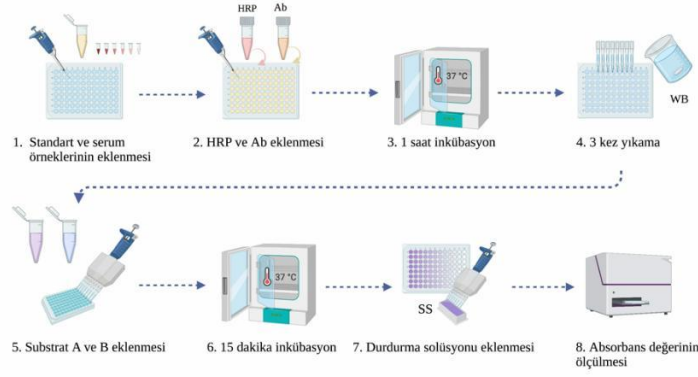
şeklinde elde edilmiş ve her bir örneğin absorbans değerinden konsantrasyonları hesaplanmıştır. 1/20 dilüsyon ile hazırlanmış örnekler temel alınmış ve hesaplanan konsantrasyonlar bu dilüsyon faktörü ile çarpılmış ve sonraki ELISA basamaklarında da bu dilüsyon oranı kullanılmıştır.

3.5.2. ELISA Yöntemi ile Serum Östradiol Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum östradiol (E2) düzeyi, *in vitro* kantitatif olarak serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılardaki E2’nin tespitini sağlayan ELISA kiti (Elabscience E2 ELISA Kit, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Kit içerisinde belirtilen prosedür takip edilmiştir (Şekil 18). Bu amaçla ilk olarak kit içerisindeki tüm malzemeler oda sıcaklığına getirilmiştir. Yıkama tampon solüsyonu (WB) iki kere distile edilmiş su ile 1:20 oranında seyreltilerek kullanıma hazır hale gelmiştir. 0 pg/mL, 40 pg/mL, 120 pg/mL,

250 pg/mL, 800 pg/mL, 1500 pg/mL konsantrasyondaki standartlar ise 1000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. 96'lık mikro-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 50 µl standart (iki kuyucuk boş bırakılarak kör kontrol amaçlanmıştır) ve serum örnekleri eklenmiştir. Hemen ardından her bir kuyucuğa 50 µl Horseradish peroksidaz (HRP) işaretli östradiol ve onu izleyecek şekilde 50 µl Tespit Antikoru (Ab) eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Sürenin sonunda her kuyucuktan solüsyonlar aspire edilmiş ve 350 µL yıkama tamponu ile 1-2 dakika yıkanmış ve bu işlem 3 kez tekrar etmiştir. Yıkamaların ardından 50µL Substrat A ve Substrat B eklenmiş ve karıştırılmıştır. 37°C'de yaklaşık 15 dakika ışıktan korunacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitmesi ile 50 µL Durdurma Solüsyonu (SS) eklenerek 450 nm dalga boyunda plaka okuyucuda absorban değeri ölçülmüştür.



Şekil 18. ELISA yöntemi basamakları (BioRender.com'da tasarlanmıştır)

Plaka okuyucusundan alınan verilerden standart ve örneklerin ortalama absorban değerleri hesaplanmıştır. E2 konsantrasyonlarının hesaplanması için 4 parametrelili logistik eğri elde edilmiştir. Eğri için denklem şöyledir:

$$Y = d + (a-d) / (1 + (x/c)^b)$$

Bu denkleme göre a, sıfır konsantrasyonda tahmini yanıtı; b, eğim değerini; c, orta aralık konsantrasyonunu; d, sonsuz konsantrasyondaki tahmini yanıtı; y,

absorbans değerini; x ise bilinmeyen konsantrasyonu vermektedir. E2 hesaplaması için GainData (Arigo Biolaboratories, Tayvan) ELISA analiz programı kullanılmıştır (126, 127). Hesaplanan konsantrasyonlar dilüsyon faktörü ile çarpılmış ve Total protein düzeyine bölünerek veriler elde edilmiştir.

3.5.3. ELISA Yöntemi ile Serum Progesteron Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum progesteron (Pg) düzeyi, *in vitro* kantitatif olarak serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılardaki Pg'nin tespitini sağlayan ELISA kiti (Elabscience Pg ELISA Kit, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Kit içerisinde belirtilen prosedür takip edilmiştir (şekil 18). Bu amaçla ilk olarak kit içerisindeki tüm malzemeler oda sıcaklığına getirilmiştir. Yıkama tampon solüsyonu iki kere distile edilmiş su ile 1:20 oranında seyreltilerek kullanıma hazır hale gelmiştir. 0 ng/ mL, 0.5 ng/ mL, 2 ng/ mL, 6 ng/ mL, 15 ng/ mL ve 30 ng/ mL konsantrasyondaki standartlar ise 1000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. 96'lık mikro-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 50 µl standart (bir kuyucuk boş bırakılarak kör kontrol amaçlanmıştır) ve serum örnekleri eklenmiştir. Hemen ardından her bir kuyucuğa 50 µl HRP işaretli progesteron ve onu izleyecek şekilde 50 µl Tespit antikoru eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Sürenin sonunda her kuyucuktan solüsyonlar aspire edilmiş ve 350 µL yıkama tamponu ile 1-2 dakika yıkanmış ve bu işlem 3 kez tekrar etmiştir. Yıkamaların ardından 50 µL Substrat A ve Substrat B eklenmiş ve karıştırılmıştır. 37°C'de yaklaşık 15 dakika ışıktan korunacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitmesi ile 50 µL Durdurma Solüsyonu eklenerek 450 nm dalga boyunda plaka okuyucuda absorbans değeri ölçülmüştür.

Plaka okuyucusundan alınan verilerden standart ve örneklerin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. Pg konsantrasyonlarının hesaplanması için 4 parametrelili logistik eğri elde edilmiştir. Eğri için denklem şöyledir:

$$Y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$$

Bu denkleme göre a, sıfır konsantrasyonda tahmini yanıtı; b, eğim değerini; c, orta aralık konsantrasyonunu; d, sonsuz konsantrasyondaki tahmini yanıtı; y,

absorbans değerini; x ise bilinmeyen konsantrasyonu vermektedir. Pg hesaplaması için GainData (Arigo Biolaboratories, Tayvan) ELISA analiz programı kullanılmıştır (126, 127). Hesaplanan konsantrasyonlar dilüsyon faktörü ile çarpılmış ve Total protein düzeyine bölünerek veri havuzu elde edilmiştir.

3.6.Beyin ve Over Dokusunda Histolojik Analizler

Kainik asit ile oluşturulan epilepsi modelinde hipotalamustaki kisspeptin nöron gruplarındaki değişiminin ve overlerdeki yapısal farklılıkların gösterilmesi amacı ile histolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle dokular uygun şekilde kesit alınabilmesi ve saklanabilmesi için belirli işlemlerden geçmiştir. En optimal boyamanın sağlanması ve antijenite kaybının daha az olması sebebi ile dokular dondurularak kesitler alınmıştır (128). %10'luk formalin çözeltisinde tutulan dokular fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu içerisine alınarak bekletilmiştir. Sukroz solüsyonu eklenmesinden önce doku 3 kez PBS'de yaklaşık 5'er dakika olacak şekilde sallanarak yıkanmıştır. Ardından %30 sukroz solüsyonuna yerleştirilmiştir. İlk aşamada dokunun batmadığı gözlemlenmiştir. Doku solüsyon içerisinde çökene kadar gece boyunca 4°C'de bekletilmiştir. Uygun boyutlardaki kriyo-kalıp seçilerek etiketlenmiş ve optimum kesme sıcaklığı bileşimi (OCT) ile doldurulmuştur. Doku OCT ile doldurulmuş kalıp içerisine yerleştirilmiş, uygun pozisyona gelmesi sağlanmış ve tamamen OCT içerisine gömülmüştür. Kriyo-kalıp içindeki doku -80°C'e yerleştirilerek OCT'nin katı, beyaz hal alması sağlanmış ve kesit almaya hazır hale getirilmiştir (129). Kriyotom ile 20 µm kalınlığında koronal kesitler alınarak boyama prosedürüne geçilmiştir.

3.6.1. Hipotalamus Kisspeptin İmmunreaktivitesinin Belirlenmesi

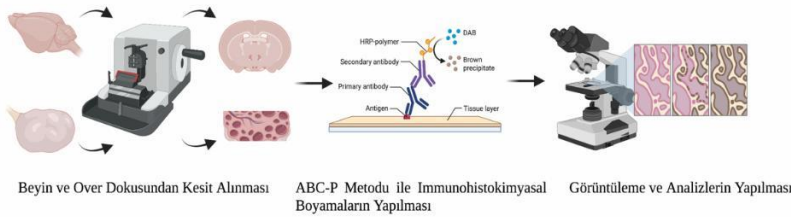
Hipotalamusta kisspeptin nöron gruplarının lokalize olduğu ARC ve AVPV nöron gruplarının incelenmesi amacı ile hipotalamusta immunohistokimyasal boyama yapılmıştır (şekil 19).

Alınan kesitler 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez 10 nM PBS'de yıkanmıştır. %1 hidrojen peroksit (H₂O₂)içerisinde 10 dakika bekletilerek endojen peroksidazlar bloke edilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak için PBS ve %0.3

Triton 100X (TX) içerisinde hazırlanmış %5 Normal Domuz Serumumu (NSS) ve %1 BSA'da 20 dakika bekletilmiş ve ardından PBS içinde %1 BSA, %0.3 TX ile seyreltilmiş kisspeptin primer antikorunu (Anti-KISS antikor, Sigma-Aldrich, HPA035542) ile 4°C'de gece boyunca (18-24 saat) inkübe edilmiştir.

Ardından PBS ve %0.1 TX içerisinde 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez yıkanmıştır. PBS ile hazırlanmış %1 BSA, %0.3 TX içerisinde biyotinlenmiş poliklonal goat anti rabbit sekonder antikorunu (F(ab')₂ fragmanı-HRP konjuge, DAKO) ile 60 dakika inkübasyona bırakılmış, PBS ve %0.1 TX içinde 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez durulanmıştır. PBS ve %0.1 TX içinde 60 dakika boyunca Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi (ABC-P) (Vectastain Elite ABC HRP Kit, USA) ile bekletilmiştir. Sırasıyla hepsinde 10 dakika olacak şekilde yıkama yapılmıştır: PBS ve %0.1 TX; sadece PBS ve Tris-Hidroklorid (Tris-HCl) (pH 7,6).

Takip eden süreçte kromojen solüsyon olan Diaminobenzidine (DAB) (10 mg/ml DAB + %3 Nickelsulfat + Tris-HCl + imidazole + %30 H₂O₂ + PBS) içerisinde 2-20 dakika bekletilmiştir. Ardından 10 nM PBS ile 3 kez 10'ar dakika olacak şekilde yıkanmıştır. Kesitler %0,5 jelatin ve %0,05 kromalun içerisinde lamlara alınıp kurutulmuş ve pertex ile kaplanarak saklanmıştır. Görüntüler Leica DM5000B mikroskobunda incelenmiş ve yine aynı mikroskoba bağlı Canon EOS1200D kamera ile görüntüler toplanmıştır. Görüntülerin analizi digitalcam ve Leica CTR5000 sistemi ile analiz edilmiştir. Kesitlerdeki hipotalamik kisspeptin immunreaksiyonlarının optik yoğunluklarını ölçmek için önce mm² başına düşen kisspeptin pozitif hücre sayısı sayılmış daha sonra bu değerler % immundansite olarak verilmiştir.



Şekil 19. İmmunohistokimyasal çalışma aşamaları (BioRender.com'da tasarlanmıştır)

3.6.2. Over Dokusunda Kisspeptin İmmunreaktivitesinin Belirlenmesi ve Hematoksilen&Eozin Boyaması ile Morfolojik Değerlendirilmesi

Over dokusundaki değişikliklerin araştırılması amacı ile overde de immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilmiştir (Şekil 19).

Hipotalamusta izlenen immunohistokimyasal basamaklarla aynı şekilde kesitler 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez 10 nM PBS'de yıkanmıştır. %1 H₂O₂ içerisinde 10 dakika bekletilerek endojen peroksidazlar bloke edilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak için PBS ve %0.3 TX içerisinde hazırlanmış %5 NSS ve %1 BSA'da 20 dakika bekletilmiş ve ardından PBS içinde %1 BSA, %0.3 TX ile seyreltilmiş kisspeptin primer antikoruna (Anti-KISS antikor, Sigma-Aldrich, HPA035542) ile 4°C'de gece boyunca (18-24 saat) inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra PBS ve %0.1 TX içerisinde 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez yıkanmıştır. PBS ile hazırlanmış %1 BSA, %0.3 TX içerisinde biyotinlenmiş poliklonal goat anti rabbit sekonder antikoruna (F(ab')₂ fragmanı-HRP konjuge, DAKO) ile 60 dakika inkübasyona bırakılmış, PBS ve %0.1 TX içinde 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez durulanmıştır. PBS ve %0.1 TX içinde 60 dakika boyunca ABC-P ile bekletilmiştir. Sırasıyla PBS ve %0.1 TX; sadece PBS ve Tris-HCl (pH 7,6) de 10 dakika olacak şekilde yıkama yapılmıştır.

Bir sonraki basamakta kromojen solüsyon olan Diaminobenzidine (DAB) (10 mg/ml DAB + %3 Nickelsulfat + Tris-HCl + imidazole + %30 H₂O₂ + PBS) içerisinde 2-20 dakika bekletilmiştir. Ardından 10 nM PBS ile 3 kez 10'ar dakika olacak şekilde yıkanmıştır. Kesitler %0,5 jelatin ve %0,05 kromalun içerisinde lamlara alınıp kurutulmuş ve hemen ardından ise hematoksilen-eozin boyaması gerçekleştirilmiştir.

Kesitler 2şer dakika olacak şekilde 2 kere ayrı taze ksilenlerde bekletilmiştir. Ardından aynı ksilende olduğu gibi 2 kere ayrı %100 Etanol (EtOH) ve bir kez %95 EtOH serisinden 2 dakika olacak şekilde geçirilmiştir. 2 dakika su ile yıkanan kesitler 3 dakika Hematoksilen boyasında tutulmuş ve sonrasında 1 dakika akan suda yıkanmıştır. %1 hidroklorik asit (HCl) içeren %70 EtOH'de 1 dakika bekletilip 1 dakika daha suda yıkanmıştır. 1 dakika lityum karbonatta bekletilen kesitler 1 dakika su ile yıkanmış ve %45 EtOH ile muamele edilmiştir. 45 saniye Eozin boyaması

yapılan kesitler artan EtOH serisinden geçirilmiştir (1 kez 1 dakika %95 EtOH; 1'er dakika 2 kez %100 EtOH). 2 kez ayrı taze ksilende 2 dakika tekrar bekletilmiş ve pertex ile kaplanarak saklanmıştır. Görüntüler Leica DM5000B mikroskobunda incelenmiş ve yine aynı mikroskoba bağlı Canon EOS1200D kamera ile görüntüler toplanmıştır. Görüntülerin analizi digitalcam ve Leica CTR5000 sistemi ile analiz edilmiştir. Kesitlerdeki over kisspeptin immunreaksiyonlarının optik yoğunluklarını ölçmek için önce mm² başına düşen kisspeptin pozitivitesi sayılmış daha sonra bu değerler % immundansite olarak verilmiştir. Morfolojik değerlendirmede ise asimetrik bir patolojiye rastlanmadığı için tek bir overdeki kistik foliküller değerlendirilmiştir. Overlerdeki kistik foliküller oosit içermeyen ince granuloza hücre tabakası ile çevrili büyük sıvı dolu boşluklar şeklinde görülmüştür (130-132).

3.7.İstatistiksel Analizlerin Gerçekleştirilmesi

Veriler IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) ve Graphpad Prism v.10.1.0 (deneme sürümü) istatistiksel paket programlarında işlenmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ve Q-Q grafikleri ile değerlendirilmiştir. Siklus süreleri ve serum hormon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, Kruskal-Wallis testi ve Dunn-Bonferroni testleri kullanılmıştır. Beyin ve overlerin immunohistokimyasal değerlendirilmesi ve overdeki kistik folikül sayılarının normal dağılıma uygunluğuna göre ikili grup karşılaştırmalarında student t testi ve Mann-Whitney U testi, çoklu grup karşılaştırmalarında ise One-way ANOVA ve Kruskal-Wallis testi kullanılarak sonuçlar elde edilmiştir. Siklus sürelerindeki değişim ile over ve beyindeki kisspeptin immunreaktivitesi arasındaki korelasyon Pearson (r) korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılan veriler ortalama \pm standart sapma, normal dağılmayan veriler median ve çeyreklikler arası uzaklık değerleri olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel sonuçlar kutu grafikleri (Box plot) ile görselleştirilmiştir. Bütün karşılaştırmalar için $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hayvanlarda Racine Skalasına Göre Davranışsal Değerlendirme

İntrahipokampal KA uygulanan sıçanlarda ilk status epileptikus, enjeksiyondan sonra 103 ± 32 dakikada gözlenmiştir. Sıçanların geçirdiği nöbetler Racine skalasına göre değerlendirilmiştir (120):

- Derece 1: Stereotipik ağız hareketler, hafif fasiyal klonuslar
- Derece 2: Kafa sallama ve çoklu fasiyal klonuslar
- Derece 3: Ön ekstremitelerde ani myoklonik hareketler
- Derece 4: Ön ekstremitelerde klonik konvulsiyonlar ve şahlanma
- Derece 5: Genel klonik konvülsiyonlar, şahlanma ve denge kaybı (Şekil 20)

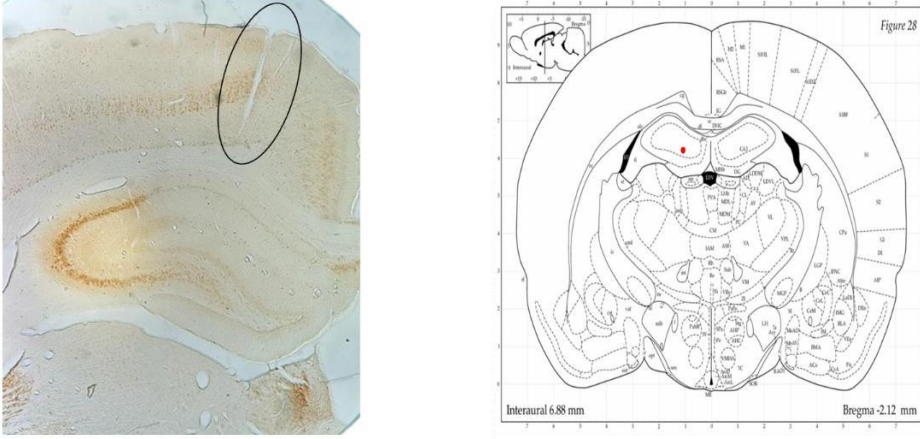
3 ve daha az nöbet derecesi gösteren hayvanlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Özellikle 4 ve 5. Derece semptomlar gösteren hayvanlarda sıçrama veya zıplama hareketleri de görülmüş, aşırı uyarılabilirlikleri devam etmiştir. Elle manuplasyon gerektiren işlemlerde ajite duygu durumu ve dokunma ile tetiklenen nöbetler de



Şekil 20. İntrahipokampal KA enjeksiyonu sonrası Racine skalasına göre değerlendirilen sıçanlarda görülen konvulzif semptomlar A) Hareketsizleşme B) Ön ekstremitelerde myoklonusu C) Ön ekstremitelerde klonik konvulsiyonlar, şahlanma ve denge kaybı D-E-F) Genelize klonik konvulsiyonlar, şahlanma ve denge kaybı G) Postür kaybı ve düşme H) Gözlerin kısılması ve ajitasyon durumu

4.2.İntrahipokampal Kainik Asit Mikroenjeksiyon Bölgesinin Doğrulanması

İmmunohistokimyasal boyamalar sırasında kesitlerde mikroenjektör giriş noktası ve geçerken hasarladığı alanlar doğrulanmıştır (Şekil 21) Hastalık modelinin oluşturulması için yapılan intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu için teknik optimizasyon sağlanmıştır.

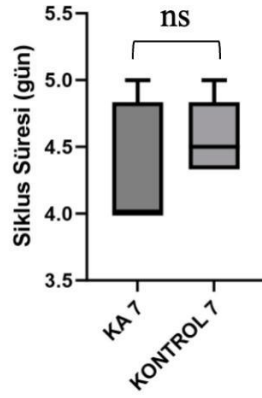


Şekil 21. Enjeksiyon bölgesinin doğrulanması (133)

4.3.Östrus Siklus Süresindeki Değişimin Değerlendirilmesi

4.3.1. 7 Günlük Zamansal Gruplara Ait Siklus Süresindeki Değişim Bulguları

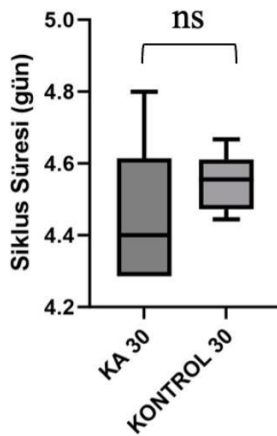
İntrahipokampal kainik asit ve salin uygulanan ve 7. günde sakrifiye edilen hayvanlara ait siklus süreleri karşılaştırıldığında KA ve Kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p=0,421$) (Şekil 22).



Şekil 22. 7. gün İntrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu siklus sürelerini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamalı değil)

4.3.2. 30 Günlük Zamansal Gruplara Ait Ait Siklus Süresindeki Değişim Bulguları

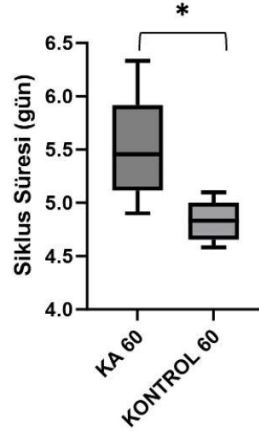
İntrahipokampal kainik asit ve salin uygulanan ve 30. günde sakrifiye edilen hayvanlara ait siklus süreleri karşılaştırıldığında KA ve Kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p=0,151$) (Şekil 23).



Şekil 23. 30. gün İntrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu siklus sürelerini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)

4.3.3. 60 Günlük Zamansal Gruplara Ait Ait Siklus Süresindeki Değişim Bulguları

İntrahipokampal kainik asit ve salin uygulanan ve 60. günde sakrifiye edilen hayvanlara ait siklus süreleri karşılaştırıldığında önceki gruplardan farklı olarak KA ve Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmektedir ($p=0,016$). 60 günlük zamansal gruplarda KA grubunun siklus süresinin kontrol grubuna göre uzadığı tespit edilmiştir (Şekil 24).

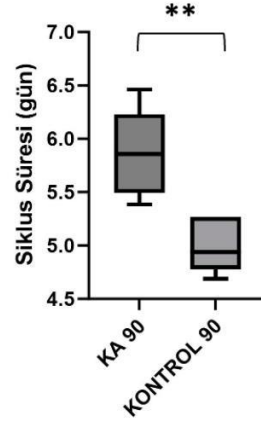


Şekil 24. 60. gün İntrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu siklus sürelerini gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Mann-Whitney U testine göre kontrole kıyasla anlamlı farklılığı temsil eder, $p=0,016$

4.3.4. 90 Günlük Zamansal Gruplara Ait Ait Siklus Süresindeki Değişim Bulguları

İntrahipokampal kainik asit ve salin uygulanan ve 90. günde sakrifiye edilen hayvanlara ait siklus süreleri karşılaştırıldığında ise 60 günlük gruba benzer şekilde KA ve Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu

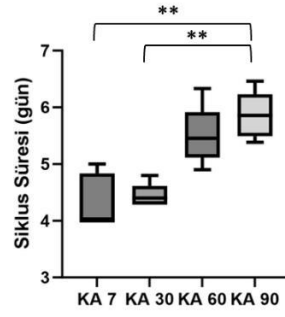
görülmektedir ($p=0,008$). 90 günlük zamansal gruplarda KA grubunun siklus süresinin kontrol grubundan daha uzun olduğu belirlenmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. 90. gün İntrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu siklus sürelerini gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Mann-Whitney U testine göre kontrole kıyasla anlamlı farklılığı temsil eder, ** $p=0,008$

4.3.5. 7-30-60 ve 90 Günlük İntrahipokampal Kainik Asit Uygulama Grupları Arasındaki Siklus Süresi Değişimleri

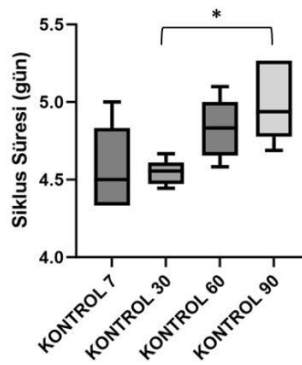
KA grubu içinde 7., 30., 60. ve 90. gün süre ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmektedir ($p=0,002$). Bu farklılık 7- 90 günlük ve 30- 90 günlük grupların karşılaştırmaları arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. 90 günlük KA grubunun siklus süre ortalaması medyanının hem 7 hem de 30 günlük gruplardan daha uzun olduğu görülmektedir. Ancak 60 günlük grup ile arasında istatistiksel olarak önemli bir fark kaydedilmemiştir (Şekil 26).



Şekil 26. 7-30-60 ve 90 gün İntrahipokampal kainik asit gruplarının siklus sürelerinin karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Kruskal-Wallis testine göre gruplar arası anlamlı farklılığı temsil eder, ** $p = 0,002$

4.3.6. 7-30-60 ve 90 Günlük Kontrol Grupları Arasındaki Siklus Süresi Değişimleri

Kontrol grubu içinde 7., 30., 60. ve 90. gün süre ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmektedir ($p=0,017$). Bu farklılık 30-90 günlük grupların karşılaştırması arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. 90 günlük kontrol grubunun siklus süre ortalaması medyanının 30 günlük gruptan daha uzun olduğu görülmektedir (Şekil 27).

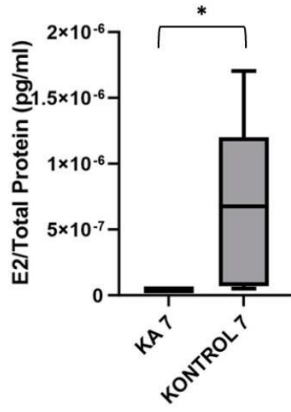


Şekil 27. 7-30-60 ve 90 gün Kontrol gruplarının siklus sürelerinin karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Kruskal-Wallis testine göre gruplar arası anlamlı farklılığı temsil eder, * $p = 0,017$

4.4.Serum Östradiol Düzeylerine Ait ELISA Sonuçları

4.4.1. 7 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Östradiol Sonuçları

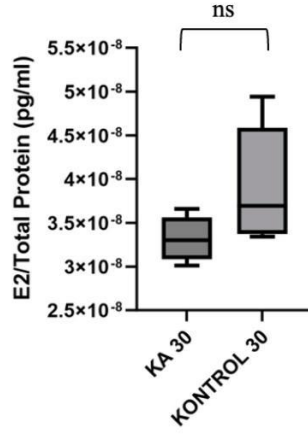
7. gün deneyin sonlandırılması ile alınan kanlara ait serum örneğinde KA ve kontrol grupları arasında E2/Total Protein değerlerinde (pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlenmiştir ($p=0,016$). Kontrol grubunun E2/Total Protein düzeyi KA grubuna göre daha yüksek tespit edilmiştir (Şekil 28).



Şekil 28. 7. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu E2/Total Protein (pg/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Mann-Whitney U testine göre anlamlı farklılığı temsil eder, ** $p = 0,016$

4.4.2. 30 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Östradiol Sonuçları

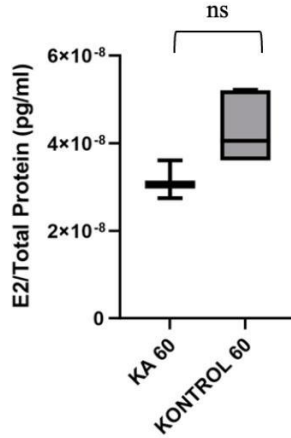
30. gün deneyin sonlandırılması ile alınan kanlara ait serum örneğinde KA ve kontrol grupları arasında E2/Total Protein değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p= 0,095$) (Şekil 29).



Şekil 29. 30. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu E2/Total Protein (pg/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)

4.4.3. 60 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Östradiol Sonuçları

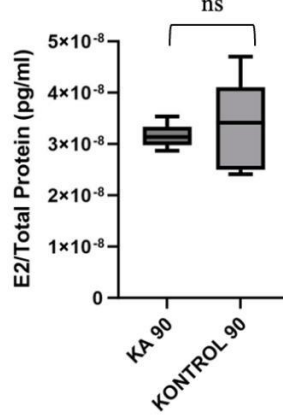
60. gün deneyin sonlandırılması ile alınan kanlara ait serum örneğinde 30 günlük gruplara benzer şekilde KA ve kontrol grupları arasında E2/Total Protein değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0,071$) (Şekil 30).



Şekil 30. 60. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu E2/Total Protein (pg/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)

4.4.4. 90 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Östradiol Sonuçları

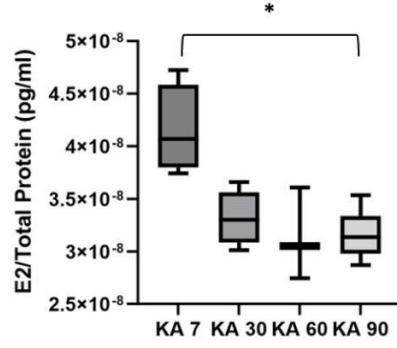
90. gün deneyin sonlandırılması ile alınan kanlara ait serum örneğinde 30 ve 60 günlük gruplara benzer şekilde KA ve kontrol grupları arasında E2/Total Protein değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p= 1,000$) (Şekil 31).



Şekil 31. 90. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu E2/Total Protein (pg/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamlı değil)

4.4.5. 7-30-60 ve 90 Günlük İntrahipokampal Kainik Asit Uygulama Grupları Arasındaki Serum Östradiol Seviyesi Değişimi

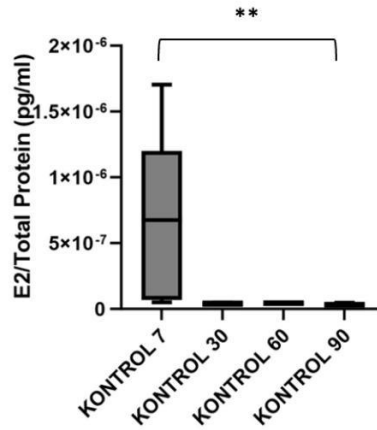
KA grupları içinde 7., 30., 60. ve 90. gün E2/Total Protein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmektedir ($p=0,023$). Bu farklılık 7-90 günlük grupların karşılaştırması arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır (Şekil 32).



Şekil 32. 7-30-60 ve 90 gün intrahipokampal kainik asit gruplarının E2/Total Protein (pg/ml) seviyeleri karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Kruskal-Wallis testine göre gruplar arası anlamlı farklılığı temsil eder, * $p = 0,023$

4.4.6. 7-30-60 ve 90 Günlük Kontrol Grupları Arasındaki Serum Östradiol Seviyesi Değişimi

Kontrol grupları içinde 7., 30., 60. Gün ve 90. Gün E2/Total Protein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmektedir ($p=0,007$). Bu farklılık 7-90 günlük grupların karşılaştırması arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır (Şekil 33).

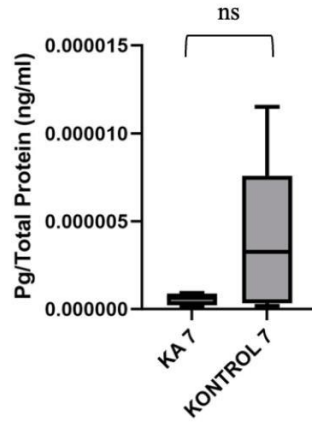


Şekil 33. 7-30-60 ve 90 gün kontrol gruplarının E2/Total Protein (pg/ml) seviyeleri karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, * (yıldız işareti): Kruskal-Wallis testine göre gruplar arası anlamlı farklılığı temsil eder, ** $p=0,007$

4.5.Serum Progesteron Düzeylerine Ait ELISA Sonuçları

4.5.1. 7 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Progesteron Sonuçları

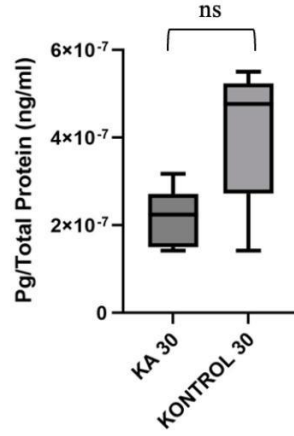
7. gün deneyin sonlandırılması ile alınan kanlara ait serum örneğinde KA ve kontrol grupları arasında Pg/Total Protein değerlerinde (ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0,413$) (Şekil 34).



Şekil 34. 7. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu Pg/Total Protein (ng/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamlı değil)

4.5.2. 30 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Progesteron Sonuçları

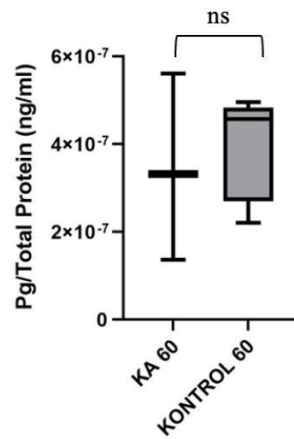
30. gün deneyin sonlandırılması ile alınan kanlara ait serum örneğinde KA ve kontrol grupları arasında Pg/Total Protein değerlerinde (ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0,095$) (Şekil 35).



Şekil 35. 30. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu Pg/Total Protein (ng/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)

4.5.3. 60 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Progesteron Sonuçları

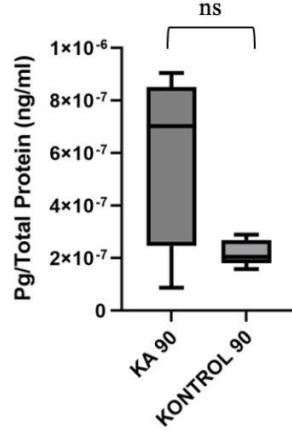
60. gün deneyin sonlandırılması ile alınan kanlara ait serum örneğinde KA ve kontrol grupları arasında Pg/Total Protein değerlerinde (ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=1,000$) (Şekil 36).



Şekil 36. 60. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu Pg/Total Protein (ng/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)

4.5.4. 90 Günlük Zamansal Gruplara Ait Serum Progesteron Sonuçları

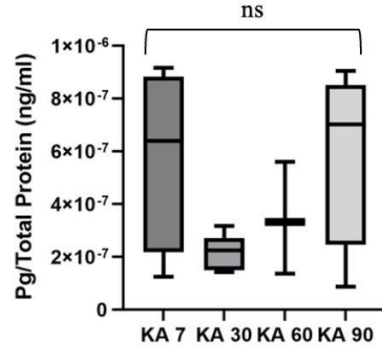
90. gün deneyin sonlandırılması ile alınan kanlara ait serum örneğinde KA ve kontrol grupları arasında diğer gruplardaki sonuçlara benzer şekilde Pg/Total Protein değerlerinde (ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0,151$) (Şekil 37).



Şekil 37. 90. gün intrahipokampal kainik asit ve kontrol grubu Pg/Total Protein (ng/ml) düzeyini gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamlı değil)

4.5.5. 7-30-60 ve 90 Günlük İntrahipokampal Kainik Asit Uygulama Grupları Arasındaki Serum Progesteron Seviyesi Değişimi

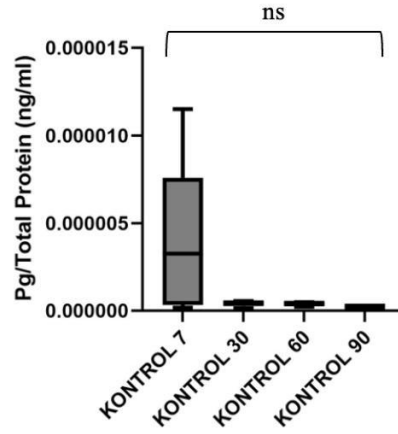
KA grupları içinde 7., 30., 60. ve 90. gün Pg/Total Protein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görülmektedir ($p=0,348$) (Şekil 38).



Şekil 38. 7-30-60 ve 90 gün intrahipokampal kainik asit gruplarının Pg/Total Protein (ng/ml) seviyeleri karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)

4.5.6. 7-30-60 ve 90 Günlük Kontrol Grupları Arasındaki Serum Progesteron Seviyesi Değişimi

Kontrol grupları içinde 7., 30., 60. Gün ve 90. Gün Pg/Total Protein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p=0,080$) (Şekil 39)



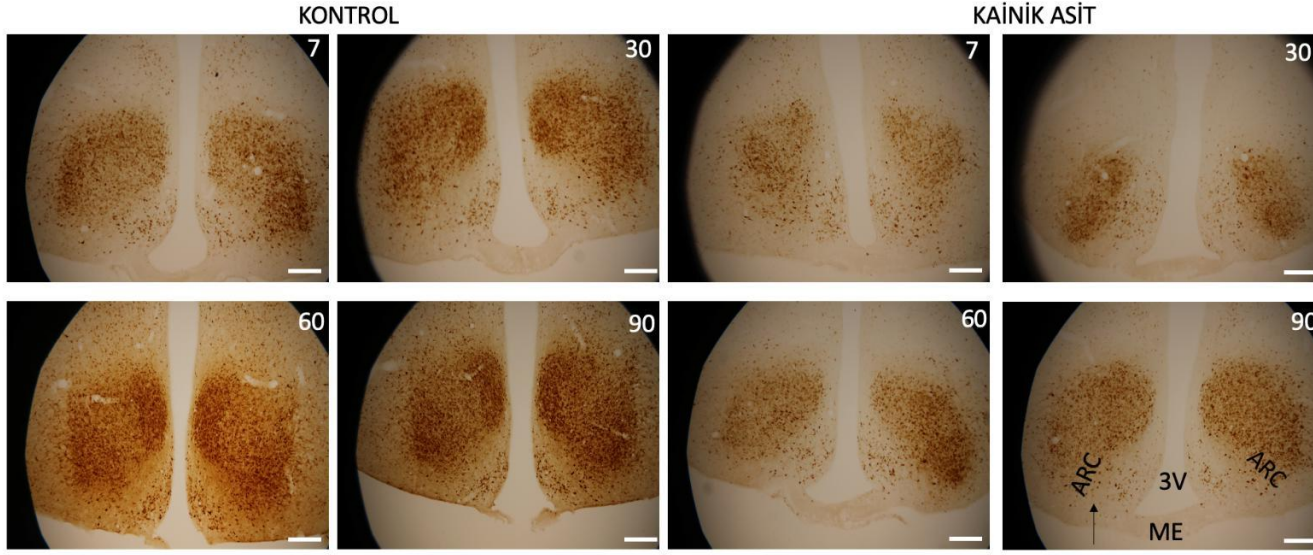
Şekil 39. 7-30-60 ve 90 gün kontrol gruplarının Pg/Total Protein (ng/ml) seviyeleri karşılaştırmasını gösteren kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)

4.6.Hipotalamik Kisspeptin Nöronlarının İmmundansite Sonuçları

4.6.1. Arkuat Nukleus Kisspeptin İmmundansite Sonuçları

Arkuat nukleus kisspeptin nöronlarındaki nöbetler ve epileptik süreçlerin etkisine bağlı değişimin incelenmesi sırasında intrahipokampal enjeksiyonun yapıldığı ipsilateral taraf (sol) ve kontralateral (sağ) nukleus alanı ayrıca değerlendirilmiştir. Histolojik görüntüler incelendiğinde tüm kainik asit uygulama gruplarında kisspeptin immunreaktivitesindeki azalmanın varlığı dikkat çekmektedir (Şekil 40). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde de sağ ve sol taraf KA7 ve kontrol 7 arasında; sağ ve sol KA30 ve kontrol 30 arasında; sağ ve sol KA60 ve kontrol 60 arasında; sağ ve sol KA90 ve kontrol 90 grupları arasında anlamlı bir fark olduğu ortaya konulmuştur (tüm gruplar için $p<0,0001$).

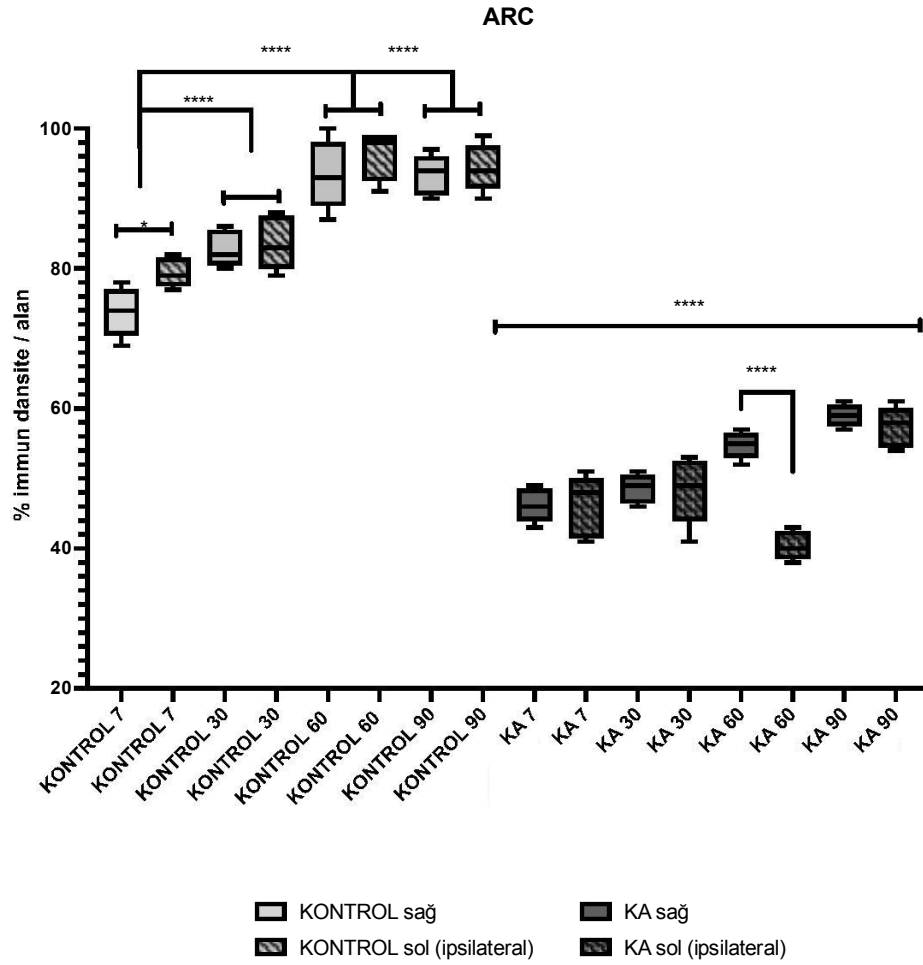
Kontrol grupları kendi içerisinde değerlendirildiğinde sağ ve sol hemisferdeki ARC nukleus kisspeptin immunreaktivitesinde sadece 7 günlük kontrol grubunda ipsilateral tarafa göre kontralateral tarafta anlamlı bir değişim saptanmıştır ($p=0,051$). Diğer zamansal kontrol gruplarında sağ ve sol ARC kisspeptin immundansitesinde fark bulunmamıştır. Gruplar arasında ise ipsilateral yani enjeksiyon yapılan hemisferde 7 günlük gruba göre 60 ve 90 günlük gruplarda ARC kisspeptin immundansitesinde anlamlı bir artma tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Buna ek olarak kontrol 30 gün grubuna göre de 60 ve 90 günlük gruplarda istatistiksel önemli bir fark bulunmuştur (sırası ile $p<0,0001$; $p=0,0005$). Kontrol 7 ile 30 günler arasında ($p=0,2207$) ve Kontrol 60 ile 90 gün grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,8216$). Kontralateral hemisferde ise zamansal gruplarda 60 ve 90 günlük grupta arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,999$); 30-60 ve 90 günlük gruplarda 7 günlük gruba göre güçlü bir artış izlenmiş (sırası ile $p=0,0055$; $p<0,0001$; $p<0,0001$), ve bu artış 60 ve 90 günlük gruplarda 30 günlük gruba göre de anlamlı bir fark yaratmıştır (sırası ile $p=0,0013$; $p=0,0013$) (Şekil 41).



Şekil 40. KA ve Kontrol zamansal gruplarındaki Arkuat çekirdek Kisspeptin immunreaktivitesinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri (10X, ölçek çubuğu 200 µm) ARC, arkuat nukleus; 3V, 3. Ventrikül; ME, median eminens; ok işareti intrahipokampal enjeksiyon yapılan hemisferi göstermektedir.

KA grupları kendi içerisinde değerlendirildiğinde sağ ve sol hemisferdeki ARC nukleus kisspeptin immunreaktivitesinde sadece 60 günlük uygulama grubunda anlamlı bir değişim görülmüştür ($p<0,0001$). Diğer zamansal KA gruplarında sağ ve sol ARC kisspeptin immundansitesinde fark bulunmamıştır. Gruplar arasında ise ipsilateral yani enjeksiyon yapılan hemisferde 7 ve 30 gün grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,7856$). 30 ve 60 günlük gruplar incelendiğinde ise 60 gün grubunda 30 günlük KA grubuna göre anlamlı bir immunreaktivite azalması görülmüştür ($p=0,017$). 90 gün KA grubunda ise 30 ve 60 gün gruplarına göre anlamlı bir artış izlenmiştir (sırası ile $p=0,0072$; $p<0,0001$).

Kontralateral hemisferde ise zamansal gruplarda ipsilateraldekine benzer şekilde 7 ve 30 günlük KA gruplarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,2727$). Farklı olarak ise zamansal olarak gruplar arasında anlamlı bir artış eğilimi görülmektedir. 60 ve 90 gün KA gruplarında 7 gün (sırası ile $p<0,0001$; $p<0,0001$) ve 30 gün grubuna göre (sırası ile $p=0,0009$; $p<0,0001$), 90 gün grubunda ise 60 gün grubuna göre anlamlı bir fark oluşturacak şekilde artış saptanmıştır ($p=0,0211$) (Şekil 41).



Şekil 41. Arkuat nukleus (ARC) kisspeptin immünoansitesini gösteren kutu grafikleri * (yıldız işareti): t testi ve One-way ANOVA testine göre gruplar arası anlamlı farklılığı temsil eder, $*p < 0,05$; $***p < 0,0001$

4.6.2. Anteroventral Periventriküler Nukleus Kisspeptin İmmünoansite Sonuçları

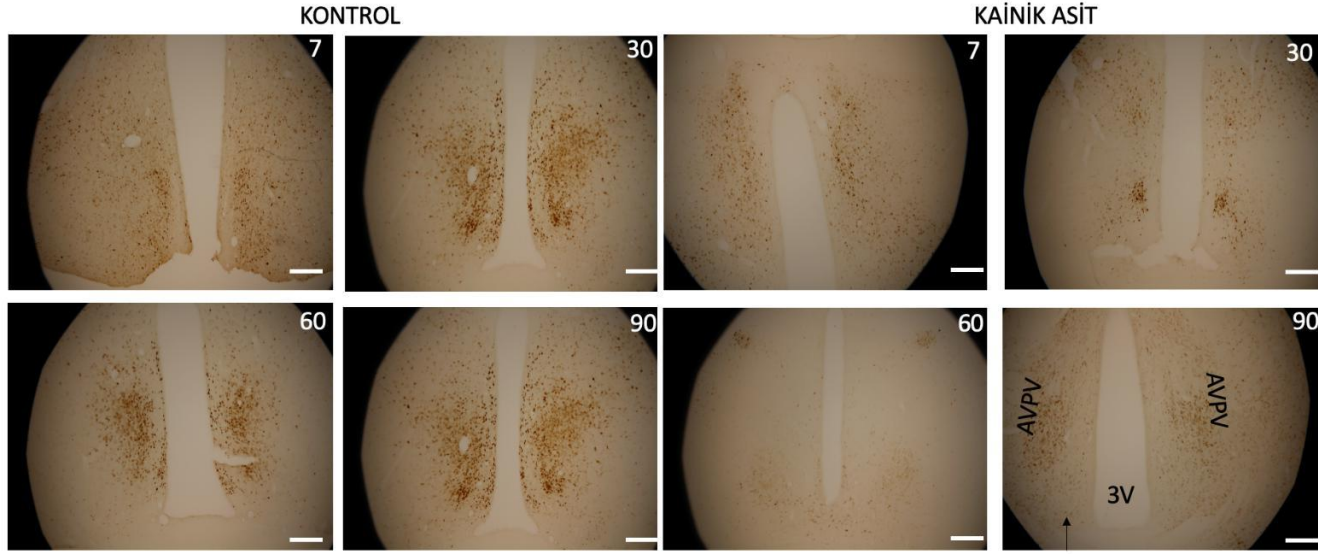
Anteroventral periventriküler nukleus kisspeptin nöronlarındaki nöbetler ve epileptik süreçlerin etkisine bağlı değişimin incelenmesi sırasında intrahipokampal enjeksiyonun yapıldığı ipsilateral (sol) ve kontralateral (sağ) nukleus alanı ayrıca değerlendirilmiştir. Histolojik görüntüler incelendiğinde tüm kainik asit uygulama gruplarında ARC'dekine benzer şekilde kisspeptin immünoaktivitesindeki azalma dikkat çekmektedir (Şekil 42).

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise AVPV'de sağ ve sol taraf KA7 ve kontrol 7 arasında; sağ ve sol KA30 ve kontrol 30 arasında; sağ ve sol KA60 ve kontrol

60 arasında; sağ ve sol KA90 ve kontrol 90 grupları arasında anlamlı bir fark olduğu ortaya konulmuştur (tüm gruplar için $p<0,0001$).

Kontrol ve KA grupları kendi içerisinde değerlendirildiğinde sağ ve sol hemisferdeki AVPV nukleus kisspeptin immunreaktivitesinde hiçbir grupta anlamlı bir fark görülmemiştir.

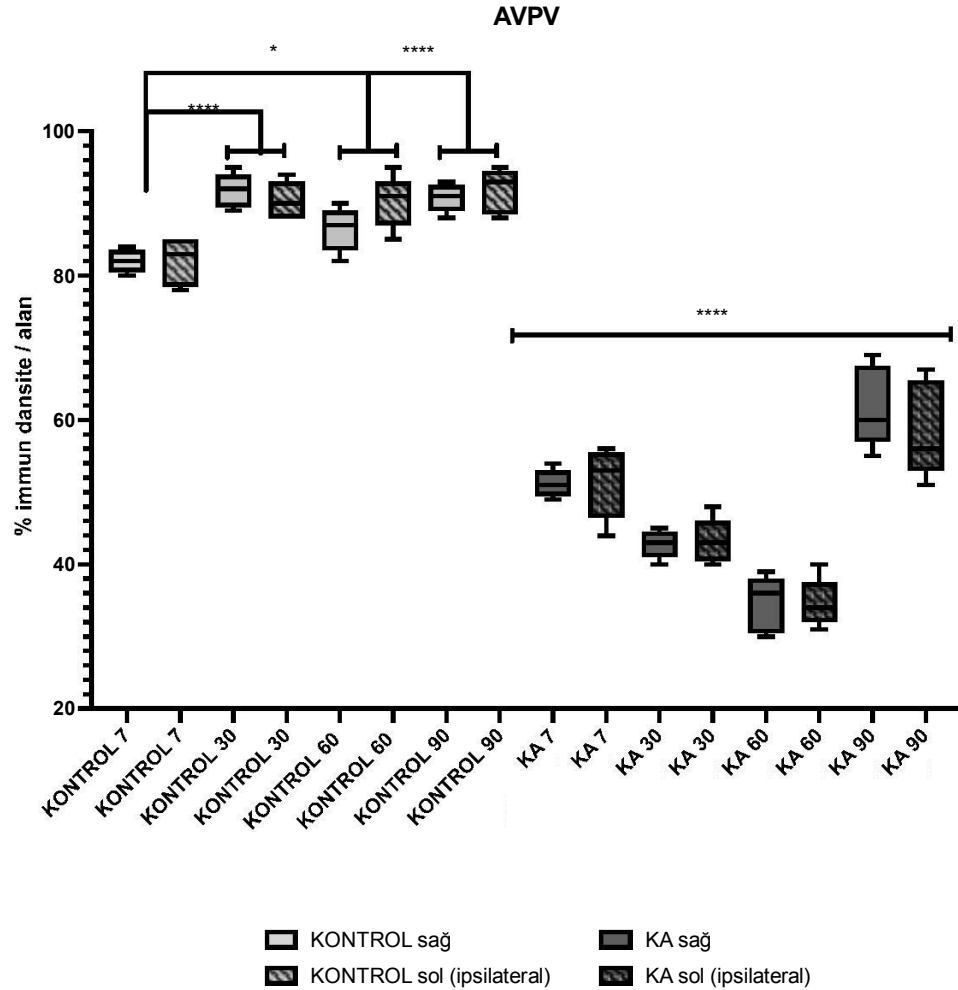
Kontrol grupları arasında ipsilateral hemisfer AVPV kisspeptin immundansitesinin 7 günlük gruba göre 30 ($p=0,0037$), 60 ($p=0,0045$) ve 90 günlük ($p=0,0009$) gruplarda artış gösterdiği saptanmıştır. Diğer günlük gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontralateral hemisferde ise zamansal gruplarda ipsilateraldekine benzer şekilde 7 günlük gruba göre 30 ($p<0,0001$), 60 ($p=0,0366$) ve 90 günlük ($p<0,0001$) gruplarda artış görülmüştür. Buna ek olarak 60 gün grubunda 30 ($p=0,0093$) ve 90 günlük gruplara ($p=0,0366$) göre bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 43).



Şekil 42. KA ve Kontrol zamansal gruplarındaki Anteroventral periventriküler çekirdek Kisspeptin immunreaktivitesinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri (10X, ölçek çubuğu 200 µm) AVPV, Anteroventral periventriküler çekirdek; 3V, 3. Ventrikül; ok işareti intrahipokampal enjeksiyon yapılan hemisferi göstermektedir.

KA grupları arasında ipsilateral AVPV nukleus kisspeptin immunreaktivitesinde 7 günlük grup ile 30 (p=0,063) ve 90 günlük gruplar (p=0,1161) arasında anlamlı bir fark bulunmazken, 60 günlük grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın izlendiği görülmektedir (p=0,0002). Benzer şekilde 60 günlük gruptaki bu azalma 30 (p=0,0489) ve 90 gün grupları (p=0,0001) ile de arasında bulunmuştur. Bu azalan eğride 30 gün grubu ile 90 gün grubu arasında da anlamlı bir fark ortaya konulmuştur (p=0,0005).

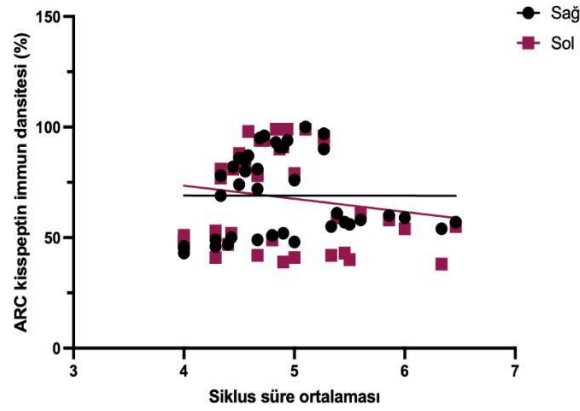
Kontralateral hemisferde ise zamansal gruplarda ipsilateraldekine benzer şekilde 7 günlük gruptan 30 (p=0,0115) ve 60 günlük gruba (p<0,0001) doğru kademeli bir azalma göze çarpmaktadır. Sonrasında ise 90 günlük grupta 7, 30 ve 60 günlük gruplara göre anlamlı bir artışın varlığı ortaya konulmuştur (sırası ile p=0,0017; p<0,0001; p<0,0001) (Şekil 43).



Şekil 43. Anteroventral periventriküler nukleus (AVPV) kisspeptin immundansitesini gösteren kutu grafikleri * (yıldız işareti): t testi ve One-way ANOVA testine göre gruplar arası anlamlı farklılığı temsil eder, * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$

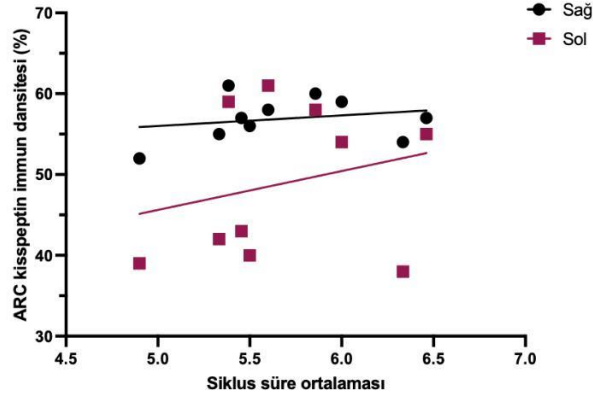
4.7. Hipotalamik Kisspeptin Nukleuslarındaki İmmundansite Değişimin Östrus Siklus Süreleri ile İlişkilendirilmesi

Siklus sürelerinde görülen değişimin kisspeptin nöron grupları ile ilişkisi olup olmadığının ortaya konulabilmesi için korelasyon analizleri yapılmıştır. Kontrol ve KA gruplarının hem sağ hem de sol ARC Kisspeptin immunreaktivitesi sonuçları ile siklus sürelerinde meydana gelen değişimler arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir (sağ için, $r = -0,0012$, $p = 0,9938$; sol için $r = -0,1636$, $p = 0,3131$) (Şekil 44).



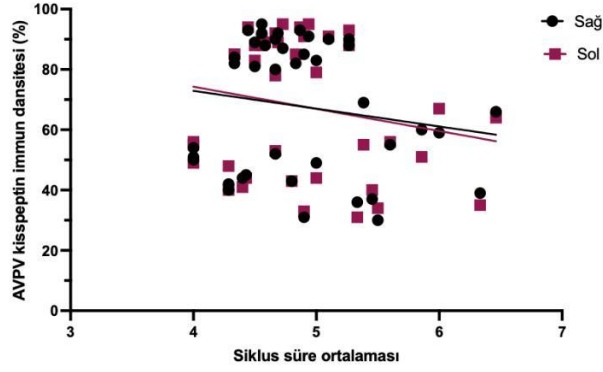
Şekil 44. KA ve Kontrol grupları için ARC kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süre ortalamaları arasındaki ilişki

Siklus sürelerindeki uzamanın 60 ve 90 günlük KA gruplarında meydana gelmesi sebebi ile bu iki grup için immunreaktivite değişimi ilişkili korelasyon analizi uygulanmıştır. Ancak bu gruplarda da ARC kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süresinin uzaması arasında bir korelasyon bulunmamıştır (sağ için, $r=0,2279$, $p=0,5266$; sol için $r= 0,2492$, $p=0,4875$) (Şekil 45).



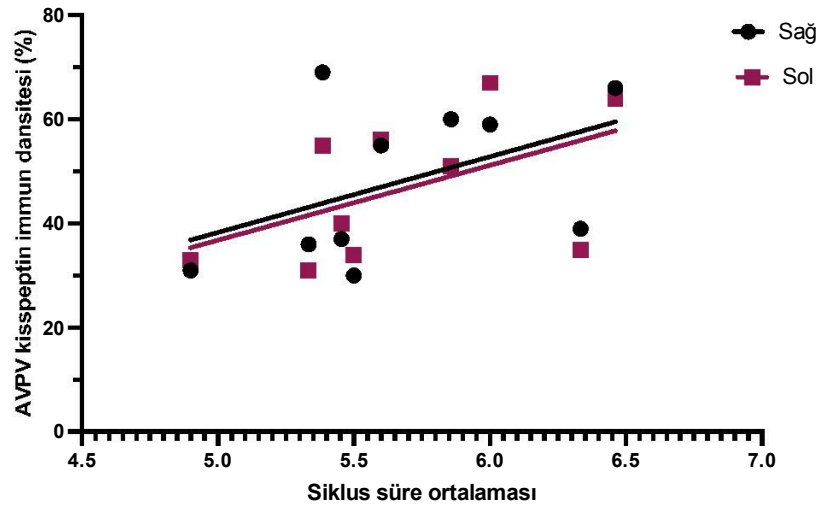
Şekil 45. KA 60 ve 90 gün grupları için ARC kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süre ortalamaları arasındaki ilişki

AVPV 'de saptanan kisspeptin immundansiteleri ile östrus siklus süreleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde de Kontrol ve KA gruplarının hem sağ hem de sol hemisferdeki alanlar için bu iki parametre arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir (sağ için, $r= -0,1609$, $p=0,3213$; sol için $r= -0,1948$, $p=0,2284$) (Şekil 46).



Şekil 46. KA ve Kontrol grupları için AVPV kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süre ortalamaları arasındaki ilişki

Siklus sürelerindeki uzamanın 60 ve 90 günlük KA gruplarında meydana gelmesi sebebi ile bu iki grup için AVPV'deki immunreaktivite değişimi ilişkili korelasyon analizi yapılmıştır. Bu gruplarda da AVPV kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süresinin uzaması arasında bir korelasyon bulunmamıştır (sağ için, $r=0,4643$, $p=0,1764$; sol için $r=0,5083$, $p=0,1336$) (Şekil 47).

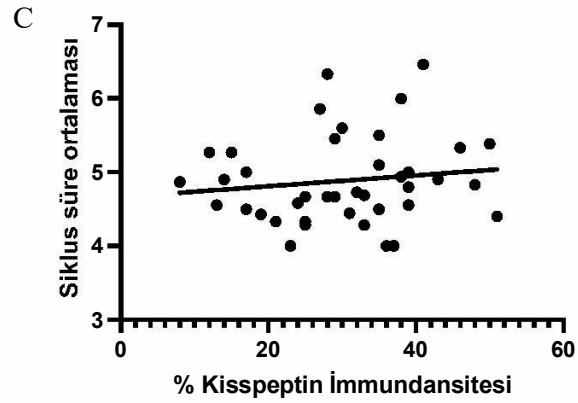
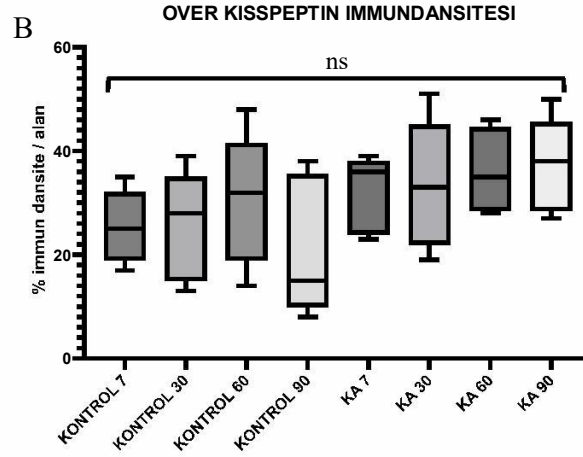
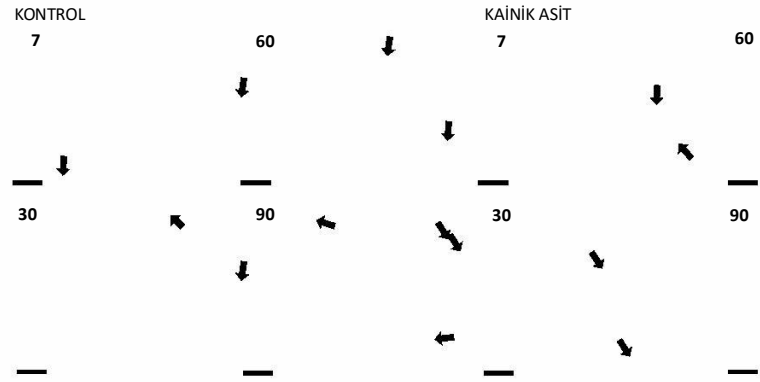
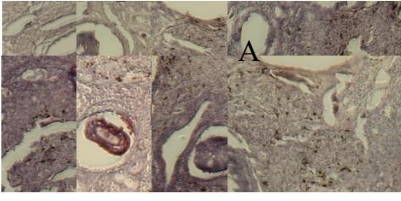


Şekil 47. KA 60 ve 90 gün grupları için AVPV kisspeptin immundansitesi ile östrus siklus süre ortalamaları arasındaki ilişki

4.8.Overlerde Kisspeptin İmmundansitesi Sonuçları

Overlerde kisspeptin immunreaktivitesi hem KA zamansal gruplarında hem de kontrol zamansal gruplarda değerlendirilmiştir. 7, 30, 60 ve 90 gün KA ile kontrol grupları karşılaştırıldığında kisspeptin immunreaktivitesi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırası ile $p=0,18$; $p=0,31$; $p=0,42$; $0,058$). Zamansal gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde de Kontrol grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0,59$). KA gruplarında zamansal olarak görece bir artış eğilimi gösterse bile anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,324$) (Şekil 50A ve B).

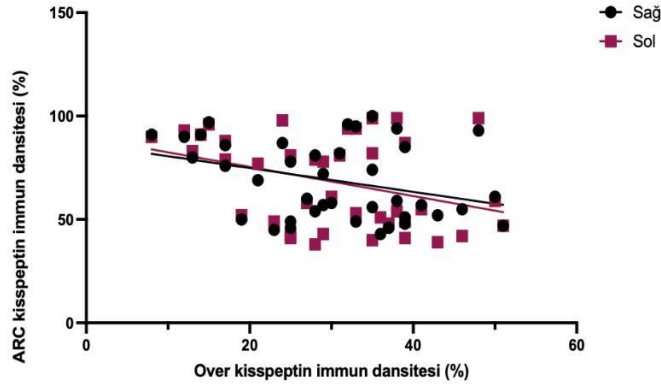
Siklus sürelerinin KA 60 ve 90 gün gruplarında artış göstermesinin kisspeptin immundansitesi ile arasında bir ilişki olup olmadığının ortaya konulması amacı ile korelasyon değerlendirilmesi yapılmıştır. Ancak siklus süresindeki değişim ile overdeki kisspeptin immunreaktivitesi arasında bir korelasyon bulunmadığı saptanmıştır ($r=0,1332$; $p=0,4125$) (Şekil 50C)



Şekil 48. Over kisspeptin immunreaktivitesini gösteren histolojik kesitler, kutu grafikleri ve korelasyon değerlendirmesi A) Kontrol ve KA 7, 30, 60 ve 90 gün gruplara ait kisspeptin immunohistokimya boyama görüntüleri (10X, ölçek çubuğu: 200 µm), oklar kisspeptin immunreaktivitesini işaret etmektedir B) Overdeki kisspeptin immundansitesine ait kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil) C) Siklus süresindeki değişim ile % Kisspeptin immunreaktivitesi arasındaki korelasyonu gösteren grafik

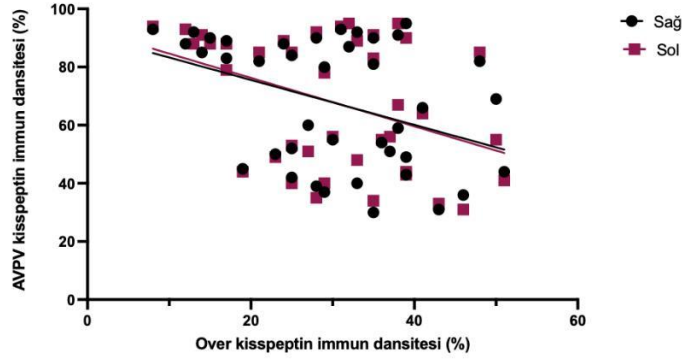
4.9.ARC ve AVPV Kisspeptin İmmundansiteleri ile Over Kisspeptin İmmundansitelerinin İlişkilendirilmesi

Hipotalamo-hipofizer ve gonadal aksın etkileşimi ve fizyolojik süreçlere katkısı göz önünde bulundurularak hipotalamik kisspeptin nöron gruplarındaki değişimin overlerdeki kisspeptin immunreaktivitesi ile ilişkisi olup olmadığının ortaya konulabilmesi için korelasyon analizleri yapılmıştır. Kontrol ve KA gruplarının her iki hemisfer için ARC nukleus ve over kisspeptin immunreaktivitesi arasında negatif bir korelasyonun olduğu tespit edilmiştir (sağ için, $r = -0,3345$, $p = 0,0349$; sol için $r = -0,3512$, $p = 0,0263$) (Şekil 48).



Şekil 49. KA ve Kontrol grupları için ARC kisspeptin immundansitesi ile over kisspeptin immundansitesi arasındaki ilişki

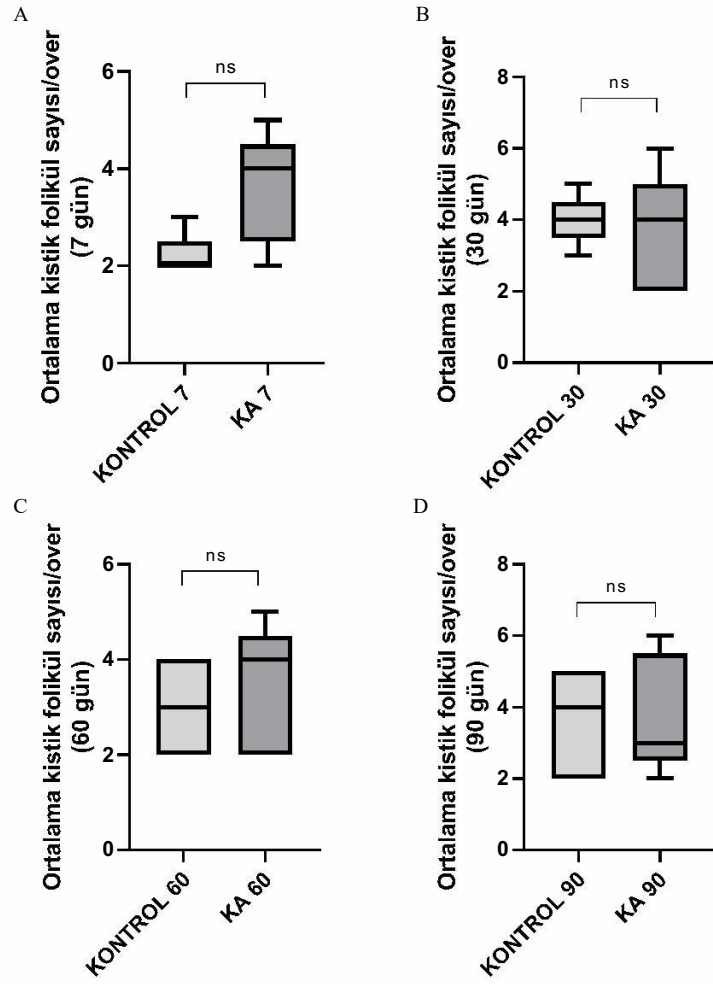
AVPV nukleus için over kisspeptin immundansite değişimleri ilişkisi incelendiğinde ise ARC nukleustakine benzer şekilde aralarında negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır (sağ için, $r = -0,3806$, $p = 0,0154$; sol için $r = -0,4004$, $p = 0,0105$) (Şekil 49).



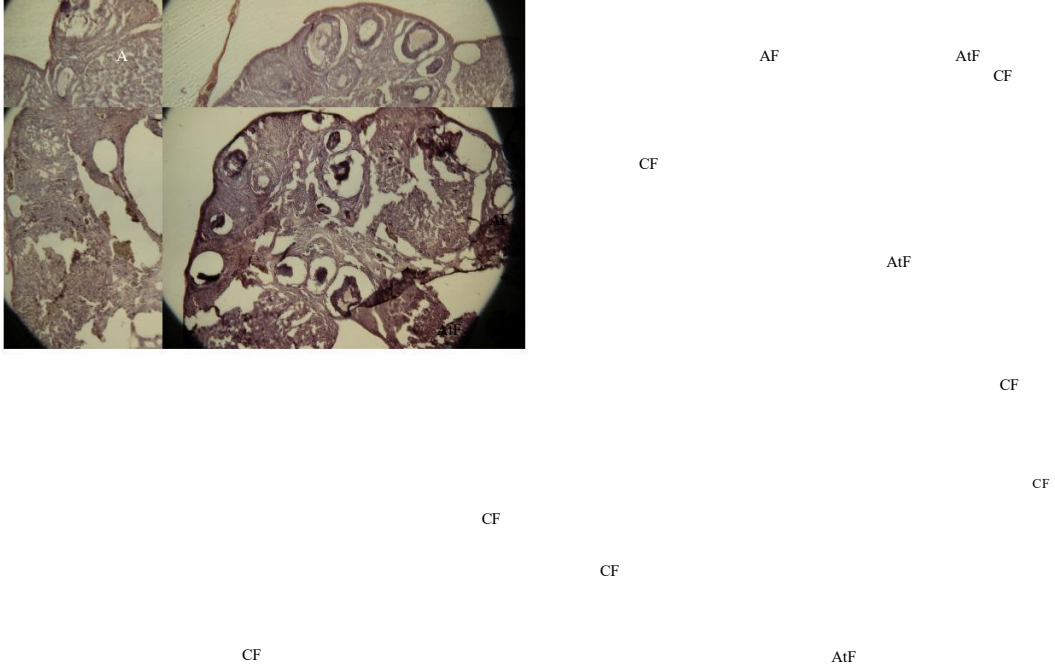
Şekil 50. KA ve Kontrol grupları için AVPV kisspeptin immundansitesi ile over kisspeptin immundansitesi arasındaki ilişki

4.10. Overlerin Morfolojik Değerlendirme Sonuçları

Overlerdeki kistik folikül sayıları 7, 30, 60 ve 90 günlük grupların KA ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmış ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırası ile $p=0,0873$; $p=0,0635$; $p=0,607$; $p=8465$) (Şekil 51) Ancak KA ile kontrol grubu arasında sayısal olarak kistik folikül düzeyinde anlamlı bir fark belirlenmemesine rağmen KA gruplarında over stromasındaki dağılım ve kistik foliküllerin duvarının daha ince ve kırılabilir bir yapı gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 52).

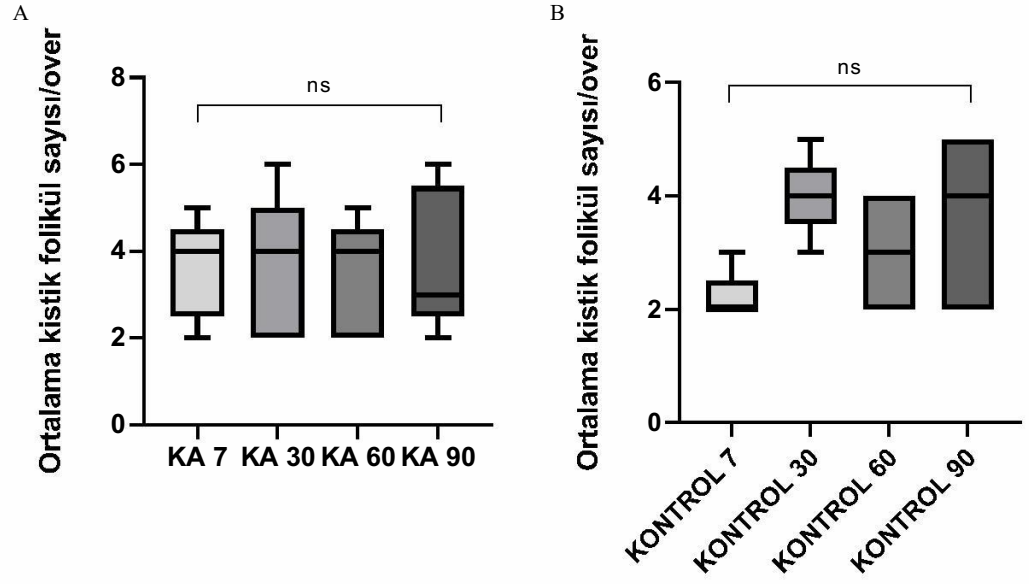


Şekil 51. Overlerdeki kistik folikül sayıları A)7 günlük KA ve kontrol grubuna ait kistik folikül sayılarının karşılaştırmasını gösteren kutu grafiği B) 30 günlük KA ve kontrol grubuna ait kistik folikül sayılarının karşılaştırmasını gösteren kutu grafiği C) 60 günlük KA ve kontrol grubuna ait kistik folikül sayılarının karşılaştırmasını gösteren kutu grafiği D) 90 günlük KA ve kontrol grubuna ait kistik folikül sayılarının karşılaştırmasını gösteren kutu grafiği, ns: not-significant (anlamalı değil)



Şekil 52. Over fotomikroskopisi, Hematoksilen-Eozin boyaması (10X) A-B) Kontrol grubuna ait H&E boyamasının histolojik görüntüleri, ovaryan yapıların kompaktlığı ve stroma yapısının bütünlüğü C-D) KA grubuna ait H&E boyamasının histolojik görüntüleri. Yıldız işaret, stroma yapısındaki dağılıma; AF, antral folikül; AtF, atretik folikül; CF: Kistik folikül

KA ve kontrol gruplarının kendi içindeki ovaryan değişikliklerinin zamansal yansıması da değerlendirilmiştir. 7, 30, 60 ve 90 gün KA grupları arasında ($p=0,9791$) ve aynı şekilde 7, 30, 60 ve 90 gün kontrol grupları arasında ovaryan kistik folikül sayıları açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0,0732$) (Şekil 53)



Şekil 53. 7, 30, 60 ve 90 gün KA ve Kontrol uygulama gruplarının overlerdeki kistik folikül sayıları A) KA asit uygulama gruplarının overdeki kistik folikül sayılarının karşılaştırıldığı kutu grafikleri B) Kontrol gruplarının overdeki kistik folikül sayılarının karşılaştırıldığı kutu grafikleri, ns: not-significant (anlamli değil)

5. TARTIŞMA

5.1.İntrahipokampal Kainik Asit Enjeksiyonu ile Oluşturulan Epilepsi Modeline Dair Tartışma

Temporal lob epilepsinin iyi karakterize edilmiş hayvan modeli için, kemirgenlerde eksitotoksik glutamat analogu olan kainik asidin intrahipokampal tek taraflı enjeksiyonu yapılmaktadır. Bu model, kimyasal olarak indüklenen bir status epileptikustan sonra epilepsinin geliştiği bir “post status” modelidir (134). Hipokampusun CA3 bölgesine intraserebral kainik asit enjeksiyonu epileptik nöbetlerin gelişmesine neden olmaktadır. Bu nöbetleri, TLE'den muzdarip hastalarda görülene benzer bir hücre kaybı paterni takip etmektedir. Bu nedenle, KA kaynaklı beyin hasarı, TLE ve eksitotoksik nörodejeneratif bozuklukları modellemek için rutin olarak kullanılmaktadır (64).

Bu çalışmada da hipokampusün CA3 bölgesine 0.8 ug/2 ul kainik asit enjeksiyonu yapılmıştır. CA3 bölgesine 0.4 ug kainik asit enjeksiyonu yapılmış, bunun sonucunda ise mortalitede azalma ve nöbet sıklığında artış görülen araştırmalar bulunmaktadır (135). Ancak çalışmamızdan farklı olarak Raedt ve ark. kanül uygulaması ile uyanık hayvanda kainik asit enjeksiyonu gerçekleştirmiş ve nöbetlerin varlığını da EEG kayıtları ile göstermişlerdir. 0,1-3 ug kainik asit dozlarının etkisini araştıran başka bir çalışmada 0,1-0,4 ug kainik asit dozunun akut etkileri olduğunu, 0,8-2 ug doz aralığının hem status epileptikus hem de spontan tekrarlayan nöbetlerinde görüldüğü prognozu daha ağır etkiler oluşturduğunu, 3 ug dozda ise ilk fazda ölüm gerçekleştiğini göstermişlerdir (117). Çalışmamızdaki semptomlara paralel şekilde farklı dozlarda kainik asitin etkilerini inceleyen Klee ve ark., 0.8 ug/0,2 ul dozda uygulanan kainik asitin şiddetli status epileptikus ve koşma/zıplama gibi davranışları oluşturduğunu ortaya koymuştur (136). Raedt ve ark.'ndan farklı olarak nöbetlerin sadece davranışsal olarak inceleyebilmemiz ve çalışmada kullanılan doz ve etkilerinin daha önceki araştırmamızla da validasyonu sağlanmış olduğu için 0.8 ug/2 ul kainik asit uygulanmıştır (137).

KA kaynaklı nöronal aşırı ve hipersenkron uyarım, özellikle hipokampusün CA1 ve CA3 bölgeleri gibi limbik yapılarda akut nöronal hücre ölümünü

tetiklemektedir (138, 139). Epilepsinin in vitro modellerinde, 4-aminopiridin (4-AP) ile yıkanan hipokampüsün farklı bölgelerinde patlamalar ve nöbetlerin ortaya çıktığı, bu patlamaların hipokampüsün CA3 bölgesinden kaynaklanırken (140), nöbetlerin CA1 bölgesinden kaynaklandığı ortaya konulmuştur (141). Veriler CA3'teki patlamaların 10 msn'den daha az sürelerde senkronize olan nöronal aktiviteden kaynaklanırken; CA1'de bu nöronal aktivitenin senkronize olmadığı gösterilmiştir (141, 142). CA3'ün CA1'den daha fazla tekrarlayan sinaptik bağlantıya sahip olması ve bu ağı tekrarlayan uyarım yoluyla hızla aktive olmasına bağlı olarak CA3'ün patlamaların kaynağı olduğu düşünülmektedir (143). Bu bilgiler, literatürdeki CA3 bölgesine uygulama yapmış birçok başka çalışma ve daha önce optimizasyonunu sağladığımız araştırmamız göz önünde bulundurularak CA3 bölgesi işlem bölgesi olarak tercih edilmiştir (136, 137, 144, 145). Buna ek olarak sıçan beyin atlasına göre enjeksiyon en rostral-dorsal CA3 bölgesine yapılmış ve en az derecede hasar vermek amaçlanmıştır (137).

Çalışmamızda sistemik enjeksiyon yerine intrahipokampal enjeksiyon tercih edilmiştir. Öncelikle sistemik uygulamaların ektrahipokampal alanlarda da hasar oluşturması ve hipotalamusunda etkilenebilecek olması sebebi ile bölgesel eksitotoksisite oluşturulmuştur (63, 146, 147). Bu işlem için stereotaksi cihazı kullanılmıştır. Stereotaksik enjeksiyon invaziv diğer tüm işlemlerde olduğu gibi yoğun emek gerektiren, zor ve pahalı bir yöntemdir. Dışarıdan tamamen kapalı şekilde korunan beyine delme ve enjektörle yapılan uygulamalarda çok çeşitli komplikasyonlarla da karşılaşılabilir. Özellikle deneyimli olmayan kişilerin hem hayvanın vital bulgularını düzenli takip etmesi hem de yanlış hedefleme yapmadan delme ve enjeksiyon işlemlerini hatasız yapabilmesi oldukça zordur (148). Çalışmamızda kullandığımız stereotaksi cihazının hem delme hem de enjeksiyon işleminin tamamen otomatize olması, cihaza entegre beyin atlaslarının bulunması ve uygulayıcıların deneyimi ile hatalar minimize edilmiş ve mikroenjektörün giriş yeri kesit üzerinde de belirlenerek doğrulanmıştır (Şekil 21).

5.2.Racine Skalasına Göre Davranışsal Değerlendirmeye Dair Tartışma

Temporal lob epilepsinin deney hayvanlarında KA ile oluşturulması literatürdeki çok sayıda çalışma ile kabul edilmiş ve validasyonu sağlanmış olmasına rağmen hayvanlar arasındaki bireysel farklılıkların da göz önünde bulundurulması gerekmektedir (149, 150). Bu bireysel farklılıklar dolayısı ile KA uygulanan tüm hayvanlar aynı şiddette nöbet geçirmemektedir. Çalışma gruplarımızda standardizasyonu sağlamak ve nöbet şiddetini eşit tutmak için Racine skalasına göre şiddeti 4 ve üzeri nöbet geçiren hayvanları çalışmamıza dahil ettik.

Çalışmamızdaki dışlama kriterine benzer şekilde Huang ve ark. EEG ile de takip ettikleri sıçanlarda intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu sonrası 5. derece konvulzif semptomlar görene kadar düşük dozda çoklu enjeksiyon yapmışlardır (151). Li ve ark. ise 3 ve üzeri nöbet derecelerinin videolar aracılığı ile gözlemlenebilir olması sebebi ile araştırmalarına bu şiddette nöbet gösteren hayvanları dahil etmişlerdir (72). Azak Pazarlar ve ark.'da sinaptik vezikül glikoproteinin zamansal değişikliklerini araştırdıkları çalışmalarında status epileptikusun şiddetini eşit tutmak ve hayvan modelinin optimizasyonunu sağlamak amacı ile Racine skalasına göre nöbet şiddeti 4 ve üzeri olan hayvanları çalışmalarına dahil etmişlerdir (137).

5.3.Östrus Siklus Süresindeki Değişimin Değerlendirilmesine Dair Tartışma

Sıçanlar 4-5 günde bir siklik aktivite gösteren hayvanlardır. Proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere 4 dönemden oluşmaktadır. Her bir dönem ise hormon dalgalanmasına bağlı olarak vajinal epitelyal değişiklik göstermektedir ve bu değişiklikler vajinal sitoloji yöntemi ile tespit edilebilmektedir (152). Siklus süresi veya yapısındaki değişiklikler siklus düzensizliği olarak tanımlanmaktadır. Literatür incelendiğinde siklik düzensizliği tanımlamak için farklı parametreleri göz önünde bulduran çalışmalar karşımıza çıkmaktadır. Döngü süresinden bağımsız olarak dominans herhangi bir hücre topluluğu görülmemesi veya daha fazla östrus görülmesi (130), döngünün kesilmesi (76), 7 günden daha uzun siklus göstermesi (72), 4 günlük modeli karşılamaması durumunda asiklik kabul edilmesi (153) gibi kriterler ile siklik aktivitenin bozulduğu ortaya konulmuştur. Çalışmamızda da siklus süresi 5 günden fazla olan hayvanların düzensiz siklus gösterdiği kabul edilmiştir.

Çalışmamızda intrahipokampal KA enjeksiyonunu takiben 7 gün, 30 gün, 60 gün ve 90 gün boyunca vajinal sitolojik değerlendirme ile sikluslarını takip ettiğimiz zamansal grupları içermektedir. Oluşturulan bu model ile 60 ve 90 gün KA gruplarında kontrole göre ortalama siklus sürelerinde uzama olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 23 ve 24). Mevcut bulgularımıza paralel şekilde Scharfman ve ark. sistemik pilokarpin ile oluşturdukları epilepsi modelinde konvulsif nöbet gösterebilir ya da göstermesin hayvanları 2-3 ay monitorize etmiş ve bu sürede siklus düzensizlikleri saptamıştır (130). Bir başka çalışmada da pilokarpin intraperitoneal uygulanarak epilepsi modeli oluşturulmuş, akut (1 hafta) ve kronik (3 ay) siklus değişikliklerini araştırılmıştır. 3 aylık grupta sadece 2 hayvan analiz edilmiş ancak sonuçlarımız gibi siklus bozuklukları tespit edilmiştir. İki çalışmanın sonuçları ise şu noktada ayrılmaktadır; bizim çalışmamızda 7 günlük grupta siklik aktivitede değişiklik saptanmamışken (Şekil 21), Fawley ve ark. status epileptikus gösteren 7 günlük gruplarında döngü görmediklerini bildirmişlerdir (76). Bu çalışma ile çalışmamız verileri arasındaki akut gruplardaki aykırılık ilk olarak cinsler arasından kaynaklı olabilir. Fawley ve ark. transgenik farelerde çalışırken, biz çalışmamızda Wistar sıçanlarla model oluşturduk. Bir diğer ve belki de en önemli unsurun ise lokal-sistemik ve kemokonvulzan maddelerin farklılıkları olduğunu düşünmekteyiz. Pilokarpin muskarinik reseptör (M3) agonistidir. Özellikle periferik etkileri de olduğu bilinen bu maddenin sistemik uygulamalarının overler üzerine etkileri olabileceğini düşünmekteyiz (154, 155). Overlerin morfolojik incelemesi veya steroid hormon ölçümlemesinin ise çalışmaya dahil edilmemiş olması sebebi ile siklik değişikliklere neden olan farklılığın buradan kaynaklandığı öne sürülebilir. 15-30-45-60 günlük periyotları inceleyen bir başka çalışmada da kontrol ile karşılaştırıldığında diöstrus süresinde artma ile karakterize siklus bozuklukları olduğu bildirilmiştir (156). Çalışmamızda 30 günlük KA gruplarında kontrole göre anlamlı fark olmaması (Şekil 22) ile de bu çalışmadan ayrışırken; 60 günlük gruplarda sonuçlarımız paralellik göstermektedir. Ancak yukarıda belirttiğimiz gibi bu çalışmada da pilokarpin intraperitoneal uygulanmış ve overe spesifik etkileri incelenmemiştir. Çalışmamızda sistemik enjeksiyondan kaçınarak lokal uygulama tercih etmemizin başlıca sebeplerinden biri hem lokal bir eksitotoksite oluşturmak istememiz hem de intraperitoneal uygulama alanının overlere olan yakınlığı ve sistemik etkilerini ayırıştırmanın zorluğudur. Pilokarpin

modelleri ile sonuçlarımız arasındaki farkın bu sebeplerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

İntrahipokampal KA modelinin reproduktif temelli çalışmalarda kullanılabilirliğini araştıran ve çalışmamızın sonuçları ile benzerlik gösteren bulgular ortaya koyan Li ve ark., deneylerinde enjeksiyondan sonra 2 ay içinde siklus düzensizlikleri gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Araştırma 15-75 günleri arasında değerlendirmiştir ve bizim gibi 30 günlük KA-kontrol gruplarında arasında fark olmaması da çalışma ile benzerdir (72). Aynı epilepsi modeli ile Li ve ark. nöbet yükünün östrus siklusu ile değişip değişmediğini araştırdıkları bir başka çalışmalarında da çalışmamız ile paralel şekilde 30 günlük gruplarında KA ile kontrol arasında siklus sürelerinde fark gözlemlenmezken, 60 günlük KA gruplarında siklus süresinin uzadığını ortaya koymuşlardır (157).

Aynı zamanda çalışmamızda KA grupları ve kontrol grupları da kendi arasında istatistiki olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 25 ve 26). Kontrol gruplarında 90 günlük grubun, 30 günlük gruba göre siklus süresi uzamıştır ancak diğer gruplarla istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Ayrıca 90 günlük kontrol grubunun siklus ortalaması da fizyolojik sınırlar içerisindedir. Hayvanların geçen 90 günlük süreçte pubertal dönemden genç erişkinliğe doğru ilerlemesi ve bunun hormonal yansımalarından kaynaklı bu değişimin olduğunu düşünmekteyiz (158, 159). Bunun yanısıra KA gruplarında 60 ve 90 günlük gruplar arasında fark bulunmazken, 7 ve 30 günlük ile 90 günlük gruplar arasında siklus süresinin belirgin uzadığı gösterilmiştir. Akut-latent periyot ile geç-kronik periyot arasındaki siklus süresi değişiminin epileptogenez süreci ile ilişkisi olabilir. Nöbetlerin hipokampuste anormal nöroplastik değişikliklere yol açması, sinapsların yeniden düzenlenmesi, ekstatorik-inhibitorik dengenin bozulmasına (160) bağlı olarak yeniden yapılanan beynin siklusları değiştirdiği öne sürülebilir. D'Amour ve ark.'nın CA3 elektrofizyolojik kayıtlarında interiktal diken dalgaların östrus döngüsü ile ilişkisini ortaya koymuş; östrus döngüsü düzensizleştikçe interiktal diken dalgaların düzleştiğini, nöbetler şiddetlendikçe ve interiktal diken dalgalar düzensizleştikçe östrus siklusunun da bozulduğunu ortaya koymuştur (153). Dolayısı ile epileptogenezin neden olduğu hipokampal formasyonun yeniden organizasyonunun östrus siklusları da etkilemesi hipotezi akla gelmektedir. Daha ileri elektrofizyolojik çalışmalar ile bu ilişkilerin araştırılması gerektiğine inanıyoruz.

5.4.Serum Östradiol ve Progesteron Düzeylerine Ait ELISA Sonuçlarına Dair Tartışma

Üreme çağına gelmiş hem kadınlar hem de dişi kemirgenler siklik bir şekilde seks steroidleri olarak tanımlanan östrojenler ve progesteron dalgalanması göstermektedir. Kadınlarda bu dalgalanma östradiol ve progesteron için 28 günlük bir süreci kapsamaktadır ve östradiol foliküler faz sırasında pike ulaşır (161). Sıçanlarda ise bu dalgalanma 4-5 günlük östrus siklusu boyunca gerçekleşmektedir (Farelerde 4-7 güne kadar değişebilir) (162). Östradiol seviyesi ise diöstrus fazında başlamak üzere kademeli şekilde artar ve proöstrus aşamasında pike ulaşır. Kadınlardan farklı olarak ise progesteron düzeyi sıçanlarda da östrojene benzer şekilde proöstrusta pik yapmaktadır (163, 164). Metöstrus ve diöstrusta ise östradiol ve progesteron düzeyleri bazal seviyeye dönmektedir (152).

İn vivo endokrin çalışmalarında özellikle kemirgen modellerinde östrus siklusunun incelenmesi için serum östradiol ve progesteron seviyeleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Sirkadiyen ritmin hormonlar üzerine etkisini en aza indirmek için ise gün saati sabit tutulur (165). Çalışmamızda da buna dikkat ederek sakrifikasyonlar sabah-öğle arası yapılmış ve kan örnekleri toplanmıştır.

Temporolimbik sistem ile hipotalamik-hipofizer-gonadal eksenini içeren nöroendokrin sistemi kontrol eden hipotalamus arasında çok yakın anatomik bağlantılar gösterilmiştir. Bu sebeple hormonlar ve epilepsi arasında karmaşık bir ilişki bulunmaktadır. Önce hormonların epilepsiyi etkilediği sonra ise ikincil olarak epilepsinin hormonları etkilediği düşünülmektedir. Epileptik süreçlerin kendisinin hipofiz hormonlarının salgılanmasını etkilediği ve bunun da periferik seks steroid hormonlarının salgılanma düzenini, ritmikliğini ve hormon seviyelerini değiştirdiği çalışmalarla gösterilmiştir (166).

Biz de çalışmamızda terminal dönemde aldığımız kan örneklerinden elde ettiğimiz serum örneklerinde östradiol ve progesteron düzeyini ELISA yöntemi ile araştırdık. Sonuçlarımızı hem normalize edebilmek için hem de dilüsyon oranımızı tespit etmek için ise total protein ölçümü yaptık ve tüm ELISA sonuçlarımızı kendi Total Protein düzeyine oranladık.

Östradiol verilerimize göre KA ile kontrol arasında sadece 7 günlük gruplarda fark ortaya çıkmış ve kontrol grubunun östradiol düzeyinin yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 27). Grupların kendi içerisinde değerlendirilmelerinde ise KA 7 grubunun diğer KA gruplarından, Kontrol 7 grubunun da diğer kontrol gruplarından daha yüksek östradiol seviyesine sahip olduğu karşımıza çıkmaktadır (Şekil 31 ve 32). Progesteron düzeylerinde ise KA ile kontrol ve gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 33-38). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında pilokarpin ile oluşturulmuş deney modelinde enjeksiyon sonrası 30-60 gün içinde nöbet gösteren hayvanlarda ölçüledikleri serum östradiol seviyesinin kontrole göre arttığını, progesteron düzeyinin ise azaldığını göstermişlerdir (156). Li ve ark.'da GnRH nöron aktivitesinde ve uyarılabilirliğindeki değişiklikleri araştırmayı hedefledikleri çalışmalarında östrus ve diöstrusta sakrifiye ettikleri hayvanlarda östradiol ve progesteron düzeyini incelemiştir. 60 günlük süreçte östrus siklusu da uzamış hayvanlar ile kontrol grubu arasında progesteron düzeylerinin östrus ve diöstrusta azaldığını, östradiol düzeyinin ise siklus süresi uzamış hayvanlarda arttığını ortaya koymuşlardır (79). Hum ve ark., nöbetlerin endokrin yansımalarını araştırdıkları çalışmalarında deneyleri hayvanların östrus ve diöstrus döneminde sonlandırmış ve alınan örneklerde östradiol seviyesinin elektriksel uyarım ile nöbet oluşturulan hayvanlarda daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (167). Öncelikli ve en önemlisi, çalışmaların sonuçları arasındaki ayrımın alınan siklus dönemlerin farklılığından kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda birincil amacımız zamansal noktalarda kisspeptin nöron grubundaki değişimi araştırmak olduğu için siklusun hangi döneminde olduğuna bakılmaksızın hayvanlar o günlü tarihte sakrifiye edilmişlerdir. Dolayısı ile kan örneği alındığında birbirinden farklı siklus döneminde bulunmaları ve sonuç olarak farklı hormon düzeyine sahip olmaları biyolojik gerçeklik ile uyumludur. Diğer çalışmalarda ise hayvanlar östrus/diöstrusta sakrifiye edilmiş ve buna göre değerlendirilmiştir. Araştırma hipotezlerimizdeki farklılıklardan kaynaklı farklı parametreler standardize edilmiştir. Serum östradiol ve progesteron seviyesi yorumlanırken dişiler arasındaki hormonal dalgalanmadaki bireysel farklar bile her bir siklusun aynı zaman dilimi için farklı olabilmektedir (165). Tüm bu bilgiler ışığında gruplardaki hayvanların farklı östradiol ve progesteron düzeyinde olmalarının kontrol

7 ve KA 7 de östradiol yükselmelerine, diğer gruplarda ise sonuçların normalize olmasına neden olduğuna inanmaktayız.

5.5.Hipotalamik Kisspeptin Nöronlarının İmmunreaktivite Sonuçlarına Dair Tartışma

Reproduktif fonksiyonun devam ettirilmesinde birincil sorumluluğun hipotalamik-hipofizer-gonadal aksın düzenli işleyişinin olduğu literatürde de kabul edilmektedir. Bu aksın işleyişinde de GnRH'ın regülatör rolü bulunmaktadır. GnRH'ın salgılanmasında birçok merkezi ve çevresel faktör rol almaktadır. Pozitif ve negatif feedbackin beraber görüldüğü bu fizyolojik süreçte GnRH'ın afferent elementlerinden olan kisspeptinin fizyolojik süreçlere katkısı yoğun olarak çalışılmaktadır (168, 169).

Epileptik süreçlerin reproduktif etkilerinin incelenmesi aşamasında da ilk basamak olan GnRH nöron grupları araştırılmış ve birbirinden farklı sonuçlar ortaya konmuştur. Amado ve ark., pilokarpin ile tedavi ettikleri dişi sıçanlarda septum-diagonal band alanında, periventriküler preoptik nukleusta, lateral ve medial preoptik alan ile lamina terminalis organum vaskulozum (OVLT) alanlarında GnRH immunreaktivitesindeki değişimi araştırmış ve 10-20 saatlik gruplarda epileptik hayvanlar ile kontrol arasında fark bulmazken, 10-15 gün ve 60-90 gün gruplarında epileptik sıçanlarda GnRH immunreaktivitesinde azalma saptamışlardır (170). Çalışma ile benzer sonuçları ortaya koyan Friedman ve ark. ise intraamigdaloid kainik asit enjeksiyonu ile oluşturdukları epilepsi modelinde reproduktif-endokrin regülasyon için oldukça önemli bir alan olan ventromedial nukleusa odaklanmışlar ve immunohistokimya ile ipsilateral olarak GnRH nöron sayısının kontrole göre azaldığını ortaya koymuşlardır (171). Ancak Fawley ve ark. bu iki çalışmadan farklı sonuçlar ortaya koymuştur. 1 hafta ve 3 aylık gruplarında OVLT, Broca diagonal bandı, septal alanlar, rostral ve kaudal preoptik alanlarda kontrol ve pilokarpin uygulanan hayvanlar arasında GnRH immunreaktivitesinde bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Sikluslarda bozulmalar görmelerine rağmen nöron sayısının değişmemiş olması GnRH nöronlarına gelen sinaptik iletilerdeki değişiklikleri düşündürmüştür (76).

Kisspeptin nöronları çıktısının, GnRH nöronlarına girdisi göz önüne alındığında kisspeptin nöron grubundaki değişimlerin araştırılması dikkat çekici hale

gelmektedir. Literatür incelendiğinde reproduktif aksta varlığı ve fonksiyonu ortaya konan kisspeptinin epilepsi ilişkili reproduktif komorbiditelerle ilişkisini araştıran ya da saptayan bir çalışma bulunmamıştır. Çalışmamızda hipotalamusta iki büyük bölgede bulunan-ARC ve AVPV- (22) kisspeptin nöron hücre gövdelerinin zamansal gruplardaki immunohistokimyasal değişiklikleri araştırılmış ve çalışmamız bu her iki büyük kisspeptin nöron grubunda epileptik hayvanlarda kisspeptin immunreaktivitesinde kontrollerine göre önemli bir azalma olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 41 ve 43). ARC ve AVPV, HPG aksında birbiri ile ilişkili ancak farklı fizyolojik süreçlere katılım gösteren nukleuslardır. ARC nukleus negatif feedback ile GnRH'nin pulsatil salınımında, AVPV nukleus ise pozitif feedback ile preovulator LH pikinin oluşmasında rol oynamaktadır (172). Reproduktif fonksiyonun gerçekleşmesi ile ilişkili bu önemli kisspeptin nöron gruplarında epileptik sürece bağlı olarak belirgin azalmanın gösterilmesi dikkat çekicidir. Farklı östrus siklus fazlarında bu nöronlarda meydana gelen ateşleme ve aksiyon potansiyeli frekansındaki değişimler, ekspresyonunda da farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir (173). Ancak çalışmamızda KA enjeksiyonu yapılan tüm gruplarda siklus evresinden bağımsız olarak hem ARC hem de AVPV kisspeptin nöronlarında güçlü bir azalma paterni gözlemlenmesi önemlidir. Bu açıdan epileptik nöbetlerin kisspeptin nöron gruplarındaki değişimini ortaya koyan çalışmamızın öncü olacağına ve epileptik süreçlerde kisspeptinin rolünün derinlemesine araştırılmasının önünü açacağına inanmaktayız.

Bir diğer dikkat çekici bulgumuz ise KA grupları içerisinde ARC nukleusta 60 günlük grupta ipsilateral hemisferde, kontralateral hemisfere göre kisspeptin immunreaktivesinde meydana gelen azalmadır. Pulsatil GnRH salınımı üreme fonksiyonunun sağlıklı şekilde devam etmesi için son derece önemli bir faktördür. Pubertanın başlaması ve ovulator siklusların gerçekleşmesi gibi üreme işlevindeki temel olaylar, pulsatil GnRH salınımının frekans ve genliğinin modülasyonu ile şekillenmektedir. Anormal GnRH pulsatil paternleri, polikistik over sendromu gibi çok sayıda reproduktif hastalığa yol açmaktadır (174). ARC nukleusun pulsatil GnRH salınımındaki rolü göz önüne alındığında siklus uzamalarının görülmeye başladığı 60 gün KA grubunda özellikle enjeksiyon yapılan hemisferdeki kisspeptin immunreaktivitesindeki azalma epileptogenez sürecinin etkisi olabileceğini

düşündürmektedir. Beynin sinaptik plastisitesindeki değişimin ve buna bağlı olarak hipokampal ve/veya hipotalamik nöronal reorganizasyonunun bu dönemde etkisini göstermeye başladığı hipotezine yol açmaktadır. Bunlara ek olarak AVPV nukleusta da KA uygulanan gruplarda ipsilateral ve kontralateral ayrımı görülmesinin ARC nukleusa benzer şekilde 60 gün gruplarına doğru ilerleyen bir azalma göze çarpmaktadır. Her iki nukleusta da KA 60 gün gruplarında azalmanın görülmesi ve sonrasında 90 güne doğru immunreaktivitenin tekrar artması epileptik süreçlerdeki nöronal yeniden yapılandırmayı düşündürmektedir. 60 ve 90 gün gruplarında ARC ve AVPV nukleuslarındaki kisspeptin immunreaktivitesi ile siklus süresinin uzaması arasında korelasyon tespit edilmemiş olmasına rağmen mevcut kisspeptin nöronlarının aksiyon potansiyeli frekansı ve uyarılabilirliklerindeki farklılıkların araştırılacağı ileri elektrofizyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz.

ARC ve AVPV nukleuslarda kisspeptin ekspresyonunda gelişimsel dönem boyunca değişiklikler meydana geldiği ve nöroendokrin sistemin olgunlaşmasında itici bir güç olduğu ortaya konulmuştur (175). Her iki kisspeptin nöronal topluluğunda da kontrol gruplarında zamansal olarak görülen kisspeptin immunreaktivitesinin kademeli yükselmesinin genç erişkinliğe doğru gelişen hayvanlarda fizyolojik bir sürecin yansımaları olduğuna inanmaktayız.

5.6.Overlerde Kisspeptin İmmunreaktivitesi Sonuçlarına Dair Tartışma

Kiss1 ve Kiss1r ve bunlarla ilişkili proteinlerinin kemirgenlerde overde eksprese edildiği bildirilmiştir. Sıçanlarda granuloza ve teka hücrelerinde ve korpus luteumda varlığı da ortaya konulmuştur (176). Kiss1 mRNA ekspresyonunun overlerde östrus siklusu ile değişim gösterebildiği ancak birçok farklı faktörün de bu süreçte etkili olduğu tespit edilmiştir. Özellikle gonadotropinler, foto-periyot, sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve metabolik etkilerin varlığı da göz ardı edilememektedir (176-178). Literatür incelendiğinde yapılan çalışmalar kisspeptinin reproduktif süreçlerdeki overdeki etkisini ve ekspresyonunu incelemiştir (177, 179) . Hipotalamusta kisspeptin immunohistokimyası değerlendirilmediği gibi epileptik süreçlerde overlerde kisspeptin ekspresyonundaki zamansal değişikliklerin de literatür incelendiğinde araştırılmadığı görülmüştür. Çalışmamız epileptik süreçte overdeki kisspeptin immunreaktivitesini araştıran ilk çalışma olma niteliğindedir. Zamansal

değişimin ve nöbetlerin 60 ve 90 günlük gruplarda siklus süresininin uzamasına yol açsa bile overde kisspeptin ekspresyonunu değiştirmedeği ortaya konulmuştur (Şekil 48).

Her ne kadar Kontrol ve KA gruplarında over kisspeptin immunreaktivitesinde bir farklılık gözlemlenmemiş olsa bile ARC ve AVPV nukleuslarda meydana gelen değişimin hipotalamik-gonadal akstaki ilişkisini değerlendirmek için korelasyon analizi yapılmıştır. Ve ilginç şekilde hem ARC hem de AVPV ile overlerdeki kisspeptin immunreaktivitesi arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar lokal (overler) ve merkezi (hipotalamus) kisspeptin sisteminde bir negatif feedback sürecini akla getirmektedir. Çalışmamızda östradiol düzeylerinin sadece gruplar arasında KA ve kontrol 7 gruplarında artış göstermesi, ARC ve AVPV kisspeptin nöronlarının ise seks steroidlerinden farklı şekillerde etkilendiklerinin bilinmesi sebebi ile epileptik süreçlerin gonadal steroidler ve bunlara bağlı olarak özellikle merkezi reseptörlerindeki değişimlerinin böyle bir etkiyi oluşturabileceğini ön görmekteyiz. Bireysel farklılıklar da göz önünde bulundurularak zamanlı ve düzenli olarak hormon seviyelerini ve ilişkili reseptör düzeylerini de içeren daha ileri ve kapsamlı araştırmaların yapılması ve çalışmamızda ortaya koyduğumuz bu önemli ilişkinin genişletilmesi gerektiğine inanıyoruz.

5.7.Overlerin Morfolojik Değerlendirme Sonuçlarına Dair Tartışma

Epilepsi ile ilişkili reproduktif-endokrin komorbiditeler birçok farklı yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ile ortaya çıkmaktadır. Temporal lob epilepsi ile yaşayan kadın hastalar nöbetlere neden olan odağın bulunduğu hemisfere göre farklı anomaliler yaşamaktadır. Özellikle sol temporal lob nöbet başlangıç odağına sahip kadınlarda PCOS görülme oranı artarken, sağ temporal lob nöbet odağına sahip kadınlarda ise hipotalamik amenorea ve hipogonadotropik hipogonadizm ortaya çıkma yüzdesinin daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (180-182). Bu lateralizasyonun varlığı ve çalışmamızda intrahipokampal kainik asit enjeksiyonunun sol CA3 bölgesine yapılması sebebi ile overler kistik foliküllerin varlığı açısından değerlendirilmiştir. Çalışmamızda morfolojik olarak KA gruplarında over stromasında değişimler izlense bile hem KA hem de kontrol gruplarında kistik folikül sayıları arasında anlamlı bir

fark bulunmamıştır (Şekil 51 ve 53). Sonuçlarımızdan farklı şekilde, Scharfman ve ark., pilokarpin ile oluşturdukları epilepsi modelinde status epileptikus görülmeyen hayvanlarda normal sayıda kistik foliküllerin varlığını gösterirken, status epileptikus izlenen hayvanlarda ise çok daha fazla sayıda kistik oluşumun olduğunu ortaya koymuşlardır (130). Bu bulguların tam tersine Li ve ark. ise intrahipokampal KA enjeksiyonu ile oluşturdukları epilepsi modelinde diöstrustaki hayvanlarda ovaryan folikül sayıları arasında epilepsi ve kontrol grubu arasında fark bulmadıklarını bildirmişlerdir (72). Lateralizasyona dayalı fenotipik farklılıkları araştırdıkları çalışmalarında Cutia ve ark. sağ ve sol taraf intrahipokampal kainik asit enjeksiyonlarında ovaryan folikül sayısında gruplar arasında bir farklılık saptamamışlardır (183). Sonuçlarımızın Scharfman ve ark.'dan farklı olmasının pilokarpin modelinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sistemik pilokarpin ile iki hemisferinde etkilenme olasılığının varlığını, sistemik pilokarpinin daha yüksek nöbet frekansına neden olabileceğini ve bu durumda daha ağır reproduktif disfonksiyona yol açabileceğini düşünmekteyiz. Epileptik nöbetlere bağlı olarak overlerde meydana gelebilecek morfolojik değişiklikleri araştıran çalışma sayısı da oldukça kısıtlıdır. Çalışmamızın daha ileri araştırmalara katkı sağlaması umulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 60 ve 90 günlük intrahipokampal kainik asit uygulanan gruplarda östrus siklus süresinin uzadığı ve hipotalamik kisspeptin nöron gruplarını içeren ARC ve AVPV nukleuslarında tüm epilepsi modeli oluşturulmuş hayvanlarda kontrollerine göre kisspeptin immundansitesinde azalma olduğu ortaya konulmuştur. Epileptik süreçlerde kisspeptin nöron grubunda meydana gelen değişimler ile ilgili literatüre katkı sağlanmıştır. Epilepsi gibi sık görülen bir nörolojik bozuklukta klinik olarak da karşımıza çıkan kadın reproduktif sistem bozukluklarının araştırılması ve kisspeptin nöron grubunun hedef alan olarak belirlenebileceği yeni araştırmalara yol açacağına inanmaktayız. Ancak komorbiditelerin meydana gelmesine katılan diğer hücrel ve moleküler mekanizmaların da aydınlatılmaya ihtiyaç duyduğunu düşünmekteyiz. İleri çalışmalarda klinik olarak kadınlarda kisspeptin ve benzeri nöropeptidlerde meydana gelen değişimlerin kan veya diğer vücut sıvılarında araştırılmasının da anlamlı olacağını da düşünmekteyiz.

Çalışmamızda epilepsinin dişi reproduktif sistemine etkileri araştırılmıştır fakat kisspeptinin erkek reproduktif sisteme olan etkileri de bilinmektedir. Dişiler ve ilişkili parametreler üzerine kurulu çalışmamızın erkek hayvanları da kapsayacak şekilde genişletilmesi cinsiyet farklılıklarını da göz önüne serecektir.

Merkezi sinir sisteminin nöronlar ve glial hücrelerden oluştuğu ve glial hücrelerin fizyolojik süreçlerdeki rolleri göz önüne alındığında nöronal etkileşime ek olarak glial hücrelerin de bu süreçteki etkilerinin araştırılması gerektiğine inanmaktayız. Çalışmamızı kapsayacak şekilde glial hücrelerinde biyobelirteçlerinin araştırılması ve ortaya konulan nöronal ağ ile değerlendirilmesinin faydalı olacağına inanmaktayız.

İmmunohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz hipotalamik kisspeptin nöron grubunun, reseptör düzeyindeki değişim de incelenerek *Kiss1r* gen ekspresyonunun da ileri çalışmalarda araştırılmasının sonuçlarımızı daha bütünsel hale getireceğini düşünmekteyiz. Gonadal hormonlardaki değişimin hipofizer hormonlardaki değişime yansımaları görebilmek adına FSH ve LH düzeylerinin de incelenmesinin fizyolojik parametrelerdeki değişimin daha geniş çaplı şekilde anlaşılmasına ve yorumlanmasına olanak verecektir.

Tüm bunlara ek olarak kisspeptin ailesinin nöronal uyarılabilirliğe, nörotransmitter transmisyonuna, inhibitör mekanizmalara ve en önemlisi epileptik süreçler üzerine etkisinin araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. Nöropeptidlerin nöbet şiddeti, nöbet sıklığı veya nöbet önleyici özellikleri üzerine çalışmaların oldukça kısıtlı olması, kisspeptinlerin bu alandaki araştırmalarını da daha anlamlı ve değerli hale getirmektedir. Çalışmamızın bu konu ile ilgilenen veya ilgilenecek olan bilim insanlarına ve bilim dünyasına katkısı olmasını temenni etmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Beghi E, Giussani G, Sander JW. The natural history and prognosis of epilepsy. *Epileptic Disord.* 2015; 17 (3): 243-53.
2. Jokeit H, Schacher M. Neuropsychological aspects of type of epilepsy and etiological factors in adults. *Epilepsy Behav.* 2004; 5(11): S14–S20.
3. Dichter MA. Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch Neurol.* 2009; 66: 443—447.
4. Löscher W, BraFndt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol. Rev.* 2010; 62: 668—700.
5. Becker AJ. Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018; 44: 112–129.
6. Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H, Johnston D. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science.* 2004; 305(5683): 532-535.
7. Epsztein J, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Crépel V. Recurrent Mossy Fibers Establish Aberrant Kainate Receptor-Operated Synapses on Granule Cells from Epileptic Rats. *J Neurosci.* 2005; 25(36): 8229 – 8239.
8. Vezzani A, Friedman A, Dingledine RJ. The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology.* 2013; 69: 16-24.
9. Blauwblomme T, Jiruskajj P, Huberfeld G. Mechanisms of Ictogenesis. *Int Rev Neurobiol.* 2014; 114: 155-85.
10. Keezer MR, Sisodiya SM, Sander JW. Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol.* 2016; 15: 106–15.
11. Cramer JA, Jones EE. Reproductive Function in Epilepsy. *Epilepsia.* 1991; 32(6): 19-26.
12. 2nd Gender Issues in Epilepsy Meeting. Gender issues in epilepsy – Difference in management of epilepsy. *Seizure.* 2015; 28: 1–2.
13. Morrell MJ, Montouris GD. Reproductive Disturbances In Patients With Epilepsy. *Cleve Clin J Med.* 2004; 71(2): 19-24.
14. Penovich PE, Helmers S. Catamenial Epilepsy. *Int Rev Neurobiol.* 2008; 83: 79-90.
15. Scott CJ, Rose JL, Gunn AJ, McGrath BM. Kisspeptin and the regulation of the reproductive axis in domestic animals. *J Endocrinology.* 2019; 240: R1–R16.
16. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88: 1731–7.
17. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics.* 1998; 54: 145–8.
18. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2001; 411: 613–7.
19. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural

- ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 2001; 276: 34631–6.
20. Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology.* 2017; 148: 4927-36.
 21. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev.* 2009; 30: 713–743.
 22. Skrapits K, Borsay BA, Herczeg L, Ciofi P, Liposits Z, Hrabovszky E. Neuropeptide co-expression in hypothalamic kisspeptin neurons of laboratory animals and the human. *Front Neurosci.* 2015; 9: 29.
 23. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology.* 2010; 151: 3479–3489.
 24. Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, Pinilla L, et al. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 300: 202–210.
 25. Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, et al. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci.* 2010; 30: 3124–3132.
 26. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008; 172:143–157.
 27. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005; 46(4): 470–472.
 28. World Health Organization. Atlas: Epilepsy care in the world. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2005.
 29. Shorvon SD, Andermann F, Guerrini R, editors. The causes of epilepsy. Cambridge University Press, Cambridge. 2012. P. 60-69.
 30. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5(6): a022426.
 31. Dhinakaran R, Devendra M. ILAE classification of seizures and epilepsies: an update for the pediatrician . *Indian Pediatr.* 2019; 56: 60-2.
 32. Zuberi SM, Brunklaus A. Epilepsy in 2017: precision medicine drives epilepsy classification and therapy . *Nat Rev Neurol.* 2018, 14(2): 67-8.
 33. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017; 58(4): 522–530.
 34. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy . *Epilepsy Res.* 2018; 139: 73-9.
 35. Auvin S. A common language of seizures and epilepsies: International League Against Epilepsy 2017 classifications. *Dev Med Child Neurol.* 2018; 60: 329.
 36. Brodie MJ, Zuberi SM, Scheffer IE, Fisher RS. The 2017 ILAE classification of seizure types and the epilepsies: what do people with epilepsy and their caregivers need to know? . *Epileptic Disord.* 2018; 20: 7787.

37. Modalsli Aaberg K, Surèn P, Lund Søråas C, Bakken IJ, Lossius MI, Stoltenberg C, et al. Seizures, syndromes, and etiologies in childhood epilepsy: The International League Against Epilepsy 1981, 1989, and 2017 classifications used in a population-based cohort. *Epilepsia*. 2017; 58(11): 1880–1891.
38. Sarmast ST, Abdullahi A, Jahan N. Current Classification of Seizures and Epilepsies: Scope, Limitations and Recommendations for Future Action . *Cureus*. 2020; 12(9): e10549.
39. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017; 58(4): 512–521.
40. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*. 2010; 51(4): 676–685.
41. Vezzani A, Fujinami RS, White HS, Preux PM, Blümcke I, Sander JW, et al. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol*. 2016 ; 131(2): 211–234.
42. Dudek FE, Sutula TP. Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Prog in Brain Res*. 2007; 163: 755-773.
43. Scharfman HE. The Neurobiology of Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007; 7(4): 348–354.
44. Duffy S, MacVicar BA. Modulation of neuronal excitability by astrocytes. *Adv Neurol*. 1999; 79: 573-581.
45. Somjen GG. Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. *Neuroscientist*. 2002; 8: 254–267.
46. Fellin T, Haydon PG. Do astrocytes contribute to excitation underlying seizures? *Trends Mol Med*. 2005; 11: 530–533.
47. Miles R, Wong RK. Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol*. 1987; 388: 611–629.
48. Christian EP, Dudek FE. Characteristics of local excitatory circuits studied with glutamate microapplication in the CA3 area of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 1988; 59: 90– 109.
49. Sutula TP, Dudek FE. Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: an emergent property of a complex system. *Prog Brain Res*. 2007; 163: 541-563.
50. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*. 1983; 9: 315–335.
51. Ben Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1985; 14: 375–403.
52. Nadler JV. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci*. 1991; 29: 2031–2042.
53. Dudek FE, Clark S, Williams PA, Grabenstatter HL. Kainate- induced status epilepticus: a chronic model of acquired epilepsy. In: *Models of Seizures and Epilepsy*. Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL, editors. Amsterdam: Elsevier, 2006: 415– 432.

54. Buckmaster PS, Dudek FE. Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol*. 1997; 385: 385–404.
55. Sloviter RS. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*. 1987; 235: 73- 76.
56. Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchán-Pérez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, et al. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nature Neurosci*. 2001; 4: 52–62.
57. Sayin U, Osting S, Hagen J, Rutecki P, Sutula T. Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J Neurosci*. 2003; 23: 2759–2768.
58. Kobayashi M, Buckmaster PS. Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2003; 23: 2440–2452.
59. Ben-Ari Y, Crepel V, Represa A. Seizures beget seizures in temporal lobe epilepsies: the boomerang effects of newly formed aberrant kainatergic synapses. *Epilepsy Curr*. 2008; 8: 68–72.
60. DeLorenzo RJ, Suna DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: The calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther*. 2005; 105(3): 229.
61. Klein P, Dingledine R, Aronica E, Bernard C, Blümcke I, Boison D, et al. Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: Do they translate? *Epilepsia*. 2018; 59: 37–66.
62. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011; 20: 359–368.
63. Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013; 37(10 Pt 2): 2887–2899.
64. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci*. 2000; 23: 580–587.
65. Rogawski MA, Gryder D, Castaneda D, Yonekawa W, Banks MK, Li He. GluR5 kainate receptors, seizures, and the amygdala. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 985:150–162.
66. Patel S, Meldrum BS, Collins JF. Distribution of [3H]kainic acid and binding sites in the rat brain: in vivo and in vitro receptor autoradiography. *Neurosci Lett*. 1986; 70:301–307.
67. Jin XT, Smith Y. Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. *Adv Exp Med Biol*. 2011; 717:27–37.
68. Wisden W, Seeburg PH. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1993; 13:3582–3598.
69. Ying Z, Babb TL, Comair YG, Bushey M, Touhalisky K. Increased densities of AMPA GluR1 subunit proteins and presynaptic mossy fiber sprouting in the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. *Brain Res*. 1998; 798:239–246.
70. Okazaki MM, Molnár P, Nadler JV. Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth. *J Neurophysiol*. 1999; 81:1645–1660.
71. Bernard A, Ferhat L, Dessi F, Charton G, Represa A, Ben-Ari Y, et al. Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence

- for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci*. 1999; 11:604–616.
72. Li J, Kim JS, Abejuela VA, Lamano JB, Klein NJ, Christian CA. Disrupted female estrous cyclicity in the intrahippocampal kainic acid mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia Open*. 2017; 2(1): 39–47.
 73. Herzog AG. Disorders of reproduction in patients with epilepsy: primary neurological mechanisms. *Seizure*, 2008; 17: 101–110.
 74. Bauer J, Cooper-Mahkorn D. Reproductive dysfunction in women with epilepsy: menstrual cycle abnormalities, fertility, and polycystic ovary syndrome. *Int Rev Neurobiol*. 2008; 83: 135–155.
 75. Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2013; 9: 699–712.
 76. Fawley JA, Pouliot WA, Dudek FE. Pilocarpine-Induced Status Epilepticus And Subsequent Spontaneous Seizures: Lack Of Effect On The Number of Gonadotropin-Releasing Hormone-Positive Neurons In A Mouse Model Of Temporal Lobe Epilepsy. *Neuroscience*. 2012; 203: 153–159.
 77. Edwards HE, Burnham WM, Ng MM, Asa S, MacLusky NJ. Limbic seizures alter reproductive function in the female rat. *Epilepsia*. 1999; 40: 1370–1377.
 78. Amado D, Verreschi IT, Berzaghi MP, Cavalheiro EA. Effects of intrahippocampal injection of kainic acid on estrous cycle in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1987; 20: 829–832.
 79. Li J, Robare JA, Gao L, Ghane MA, Flaws JA, Nelson ME, et al. Dynamic and sex-specific changes in gonadotropin-releasing hormone neuron activity and excitability in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *eNeuro*. 2018; 5(5): 1–21.
 80. Li J, Christian-Hinman CA. Epilepsy-associated increase in gonadotropin-releasing hormone neuron firing in diestrous female mice is independent of chronic seizure burden severity *Epilepsy Res*. 2022; 184: 106948.
 81. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*. 2001; 276: 28969–28975.
 82. Constantin S, Caligioni CS, Stojilkovic S, Wray S. Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology*. 2009; 150: 1400–12.
 83. SWISS-MODEL: Q969F8 (KISSR_HUMAN) Homo sapiens (Human). KiSS-1 receptor. URL: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot//Q969F8>.
 84. Trevisan CM, Montagna E, de Oliveira R, Christofolini DM, Barbosa CP, Crandall KA, et al. Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know About Its Role in Human Reproduction? *Review Cell Physiol Biochem*. 2018; 49: 1259-1276.
 85. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2004; 145: 4073–4077.
 86. Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 2744–2750.
 87. Clarke IJ, Campbell R, Smith JT, Prevot V, Wray S. Neuroendocrine control of reproduction. In *Handbook of Neuroendocrinology*. Fink G, Pfaff DW, Levine JE, editors. London: UK: Academic Press; 2011. pp 197–236.

88. Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F. Kiss1_{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54_{-/-} mice. *Endocrinology*. 2007; 148: 4927e36.
89. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1614–1627.
90. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*. 2005; 25: 11349–11356.
91. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, et al. Characterization of the Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54. *Endocrinology*. 2005; 146: 156–163.
92. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: Sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci*. 2010; 31: 1984–1998.
93. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, et al. Involvement of Central Metastin in the Regulation of Preovulatory Luteinizing Hormone Surge and Estrous Cyclicity in Female Rats. *Endocrinology*. 2005; 146: 4431–4436.
94. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 Neurons in the Forebrain as Central Processors for Generating the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge. *J Neurosci*. 2006; 26: 6687–6694.
95. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin- derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci*. 2004; 117: 1319–1328.
96. Schäfer-Somi S, Ay S, Kaya D, Sözmen M, Beceriklisoy H, Ağaoğlu A, et al. Kisspeptin-10 and the G protein-coupled receptor 54 are differentially expressed in the canine pregnant uterus and trophoblast cells. *Reprod Domest Anim*. 2016; 10: 1–7.
97. Bilister Egilmez C, Koyu A, Azak Pazarlar B, Keselik E, Oz Oyar E, Kurus M. Effects of intracerebroventricular and intravenous administration of Kisspeptin-54 and Gonadotropin-releasing hormone agonist in rats with ovarian hyperstimulation. *Neuropeptides*. 2022; 96: 102298.
98. Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Takeshi I, Munkhzaya M, Yanagihara R, Tokui T, et al. Kisspeptin mRNA expression is increased in the posterior hypothalamus in the rat model of polycystic ovary syndrome. *Endocr J*. 2017; 64: 7–14.
99. Abbara A, Clarke S, Islam R, Prague JK, Comninou AN, Narayanaswamy S, et al. A second dose of kisspeptin-54 improves oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a Phase 2 randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2017; 32: 1915–1924.
100. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol*. 2009; 21: 673-82.
101. Desroziers E, Mikkelsen J, Simonneaux V, Keller M, Tillet Y, Caraty A, et al. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol*. 2010; 22: 1101- 12.

102. Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE. Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience*. 2010;166: 680-97.
103. Xu Z, Kaga S, Mochiduki A, Tsubomizu J, Adachi S, Sakai T, et al. Immunocytochemical localization of kisspeptin neurons in the rat forebrain with special reference to sexual dimorphism and interaction with GnRH neurons. *Endocr J*. 2012; 59: 161-71.
104. Lehman MN, Hileman SM, Goodman RL. Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 784: 27-62.
105. Yeo SH, Herbison AE. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology*. 2011; 152: 2387-99.
106. Franceschini I, Yeo SH, Beltramo M, Desroziers E, Okamura H, Herbison AE, et al. Immunohistochemical evidence for the presence of various kisspeptin isoforms in the mammalian brain. *J Neuroendocrinol*. 2013; 25: 839-51.
107. Kafa İM, Eyigör Ö. Kisspeptinler ve Kisspeptin Nöronları: Üreme Sistemi Üzerine Etkileri ve Hipotalamik Yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2011; 37 (1): 53-60.
108. Lee DK, Nguyen T, O'Neil GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*. 1999; 446: 103-7.
109. Arai AC, Xia YF, Suzuki E, Kessler M, Civelli O, Nothacker HP. Cancer metastasis-suppressing peptide metastin upregulates excitatory synaptic transmission in hippocampal dentate granule cells. *J Neurophysiol*. 2005; 94: 3648-52.
110. Arai AC, Orwig N. Factors that regulate KiSS1 gene expression in the hippocampus. *Brain Res*. 2008; 1243: 10-8.
111. Arai AC. The role of kisspeptin and GPR54 in the hippocampus. *Peptides*. 2009; 30: 16-25.
112. Mikkelsen JD, Simonneaux V. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*. 2009; 30: 26-33.
113. Messaoudi E, Bardsen K, Srebro B, Bramham CR. Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 1998; 79: 496-9.
114. Liu X, Herbison AE. Kisspeptin Regulation of Neuronal Activity throughout the Central Nervous System. *Endocrinol Metab*. 2016; 31: 193-205.
115. Ferry B, Gervasoni D, Vogt C. Preparation of the Stereotaxic Surgical Procedure. In: *Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent*. Paris: Springer; 2014.
116. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6. Baskı) San Diego: Academic Press, 2007.
117. Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal La Salle G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1982; 53: 581-9.
118. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Coenzyme q10 ameliorates neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy in rat. *J Mol Neurosci*. 2013; 49: 194-201.

119. Fernández IS, Goodkin HP, Scott RC. Pathophysiology of convulsive status epilepticus Seizure. 2019; 68: 16–21.
120. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure”, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972; 32: 281-94.
121. Li TR, Jia YJ, Ma C, Qiu WY, Wang Q. The role of the microRNA-146a/complement factor H/interleukin-1beta-mediated inflammatory loop circuit in the perpetuate inflammation of chronic temporal lobe epilepsy. *Dis Model Mech*. 2018; 11(3): 031708.
122. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2007; 80(2): 84-97.
123. Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract*. 2020; 6: 5.
124. Cora MC , Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears *Toxicologic Pathology*. 2015; 43: 776-793.
125. Pantier LK, Li J, Christian CA. Estrous Cycle Monitoring in Mice with Rapid Data Visualization and Analysis. *Bio Protoc*. 2019; 9(17): e3354.
126. Tang XE, Tan SX, Hoon S, Yeo GW. Pre-existing adaptive immunity to the RNA-editing enzyme Cas13d in humans. *Nature Medicine*. 2022; 28: 1372–1376.
127. Ayloo S, Lazo CG, Sun S, Zhang W, Cui B, Gu C. Pericyte-to-endothelial cell signaling via vitronectin-integrin regulates blood-CNS barrier. *Neuron*. 2022; 110(10): 1641–1655.e6.
128. Hira VVV, Loncq de Jong A, Ferro K, Khurshed M, Molenaar RJ, Van Noorden CJF. Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry . *Acta Histochem*. 2019, 121(2): 125–134.
129. Currle DS, Monuki ES. Flash Freezing and Cryosectioning E12.5 Mouse Brain. *J Vis Exp*. 2007; 4: 198.
130. Scharfman HE, Kim M, Hintz TM, MacLusky NJ. Seizures and reproductive function: insights from female rats with epilepsy. *Ann Neurol*. 2008; 64(6): 687–697.
131. Atilgan R, Ozkan ZS, Kuloglu T, Kocaman N, Baspinar M, Can B. Impact of intracystic ethanol instillation on ovarian cyst diameter and adjacent ovarian tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014; 174: 133-6.
132. Morsi A, Mersal EA, Farrag ARH, Abdelmoneim AM, Abdelmenem AM, Salim MS. Histomorphological Changes in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome and the Contribution of Stevia Leaf Extract in Modulating the Ovarian Fibrosis, VEGF, and TGF- β Immunoexpressions: Comparison with Metformin. *Acta Histochem. Cytochem*. 2022; 55 (1): 9–23.
133. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online. Elsevier; 2006.
134. Loscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: innovative strategies. *Epilepsy Res*. 2006; 69:183–272.
135. Raedt R, Van Dycke A, Van Melkebeke D, De Smedt T, Claeys P, Wyckhuys T, et al. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurol. Scand*. 2009; 119: 293—303.

136. Klee R, Brandt C, Töllner K, Löscher W. Various modifications of the intrahippocampal kainate model of mesial temporal lobe epilepsy in rats fail to resolve the marked rat-to-mouse differences in type and frequency of spontaneous seizures in this model. *Epilepsy Behav.* 2017; 68:129–140.
137. Azak Pazarlar B, Madsen CA, Oz Oyar E, Egilmez CB, Mikkelsen JD. Temporal and spatial changes in synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) under kainic acid induced epileptogenesis: An autoradiographic study. *Epilepsy Res.* 2022; 183: 106926.
138. Steriade M. *Neuronal substrates of sleep and epilepsy.* New York: Cambridge UP; 2003.
139. Jin Y, Lim CM, Kim SW, Park JY, Seo JS, Han PL, et al. Fluoxetine attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *Brain Res.* 2009; 1281: 108–116.
140. Chesnut TJ, Swann JW. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in immature hippocampus. *Epilepsy Res.* 1988; 2(3): 187–195.
141. Netoff TI, Schiff SJ. Decreased neuronal synchronization during experimental seizures. *J Neurosci.* 2002; 22: 7297–7307.
142. Van Drongelen W, Koch H, Marcuccilli C, Pena F, Ramirez JM. Synchrony levels during evoked seizure-like bursts in mouse neocortical slices. *J Neurophysiol.* 2003; 90: 1571–1580.
143. Staley KJ, Longacher M, Bains JS, Yee A. Presynaptic modulation of CA3 network activity. *Nat Neurosci.* 1998; 1: 201–209.
144. Rattka M, Brandt C, Löscher W. The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: Epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. *Epilepsy Res.* 2013; 103: 135—152.
145. Kim JY, Kim JH, Lee HJ, Kim SH, Jung YJ, Lee HY, et al. Antiepileptic and anti-neuroinflammatory effects of red ginseng in an intrahippocampal kainic acid model of temporal lobe epilepsy demonstrated by electroencephalography. *Yeungnam Univ J Med.* 2018; 35(2): 192-198.
146. Sun Q, Pretel S, Applegate CD, Piekut DT. Oxytocin And Vasopressin Mrna Expression In Rat Hypothalamus Following Kainic Acid-Induced Seizures. *Neuroscience.* 1996; 71(2): 543-554.
147. Yoshimura M, Ohkubo JI, Hashimoto H, Matsuura T, Maruyama T, Onaka T, et al. Effects of a subconvulsive dose of kainic acid on the gene expressions of the arginine vasopressin, oxytocin and neuronal nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Neuroscience Res.* 2015; 99: 62–68.
148. Landeck N, Mazza MC, Duffy M, Bishop C, Sortwell CE, Cookson MR. Stereotaxic Intracranial Delivery of Chemicals, Proteins or Viral Vectors to Study Parkinson's Disease. *J Vis Exp.* 2021; 18(168): 10.3791/62128.
149. Lisgaras CP, Scharfman HE. Robust chronic convulsive seizures, high frequency oscillations, and human seizure onset patterns in an intrahippocampal kainic acid model in mice. *Neurobiol Dis.* 2022; 166: 105637.
150. Suha AJ, Sadr SS, Roghani M, Haftcheshmeh SM, Khamse S, Momtazi-Borojeni AA. Ferulic Acid Attenuates Kainate-induced Neurodegeneration in a Rat Poststatus Epilepticus Model. *Curr Mol Pharmacol.* 2023; 16(2): 178-187.

151. Huang L, van Luijtelaar G. The effects of responsive and scheduled subicular high frequency stimulation in the intra-hippocampal kainic acid seizure model. *Epilepsy Res.* 2013; 106: 326–337.
152. Köylü A, Ömeroğlu S, Akarca Dizakar SÖ, Demirel MA. Sıçanlarda Vajinal Yayma Örneklerinin Sitolojik Değerlendirilmesi. *MJAVL Sciences.* 2021; 11 (1): 94-99.
153. D'Amour J, Magagna-Poveda A, Moretto J, Friedman D, LaFrancois JJ, Pearce P, et al. Interictal spike frequency varies with ovarian cycle stage in a rat model of epilepsy. *Exp Neurol.* 2015; 269: 102–119.
154. Mayerhofer A, Fritz S. Ovarian Acetylcholine And Muscarinic Receptors: Hints Of A Novel Intrinsic Ovarian Regulatory System. *Microsc Res Tech.* 2002; 59: 503–508.
155. Garcia RCT, Dati LMM, Torres LH, da Silva MAA, Udo MSB, Abdalla FMF, et al. M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product. *Sci Rep.* 2015; 5: 17555.
156. Amado D, Cavalheiro EA. Hormonal and gestational parameters in female rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 1998; 32: 266–274.
157. Li J, Leverton LK, Naganatanahalli LM, Christian-Hinman CA. Seizure burden fluctuates with the female reproductive cycle in a mouse model of chronic temporal lobe epilepsy *Exp Neurol.* 2020; 334: 113492.
158. Wu D, Lin G, Gore AC. Age-related Changes in Hypothalamic Androgen Receptor and Estrogen Receptor α in Male Rats. *J Comp Neurol.* 2009; 512(5): 688–701.
159. Ghasemi A, Jeddi S, Kashfi K. The Laboratory Rat: Age And Body Weight Matter. *ECXLI J.* 2021; 20: 1431-1445.
160. Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol.* 2002; 1:173–81.
161. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod BioMed Online.* 2014; 28: 714–722.
162. Staley K, Scharfman H. A woman's prerogative. *Nat Neurosci.* 2005; 8(6): 697–699.
163. Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol. Pathol.* 2008; 36 (3): 375-384.
164. Proaño SB, Meitzen J. Estradiol decreases medium spiny neuron excitability in female rat nucleus accumbens core. *J Neurophysiol.* 2020; 123: 2465–2475.
165. Scharfman HE, MacLusky NJ. Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical Perspective. *Neurobiol Dis.* 2014; 72: 180–192.
166. Taubøll E, Sveberg L, Svalheim S. Interactions between hormones and epilepsy. *Seizure.* 2015; 28: 3–11.
167. Hum KM, Megna S, Burnham WM. The effects of right and left amygdala kindling on the female reproductive system in rats. *Epilepsia.* 2009; 50(4): 880–886.
168. Prashar V, Arora T, Singh R, Sharma A, Parkash J. Hypothalamic Kisspeptin Neurons: Integral Elements of the GnRH System. *Reproductive Sciences.* 2023; 30: 802–822.
169. Starrett JR, Moenter SM. Hypothalamic kisspeptin neurons as potential mediators of estradiol negative and positive feedback Peptides. 2023; 163: 170963.

170. Amado D, Cavalleiro EA, Bentivoglio M. Epilepsy and hormonal regulation: the patterns of GnRH and galanin immunoreactivity in the hypothalamus of epileptic female rats. *Epilepsy Res.* 1993; 14: 149-159.
171. Friedman MN, Geula C, Holmes GL, Herzog AG. GnRH-immunoreactive fiber changes with unilateral amygdala-kindled seizures. *Epilepsy Res.* 2002; 52: 73-77.
172. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of *Kiss1* Gene Expression in the Brain of the Female Mouse. *Endocrinology.* 2005; 146(9): 3686–3692.
173. Starrett JR, DeFazio RA, Moenter SM. Reciprocal Changes in Voltage-Gated Potassium and Subthreshold Inward Currents Help Maintain Firing Dynamics of AVPV Kisspeptin Neurons during the Estrous Cycle. *ENEURO.* 2021; 8(5): 1–18.
174. Terasawa E. Mechanism of Pulsatile GnRH Release in Primates: Unresolved Questions. *Mol Cell Endocrinol.* 2019; 498: 110578.
175. Semaan SJ, Tolson KP, Kauffman AS. The Development of Kisspeptin Circuits in the Mammalian Brain. *Adv Exp Med Biol.* 2013 ; 784: 221–252.
176. Wahab F, Atika B, Shahab M, Behr R. Kisspeptin signalling in the physiology and pathophysiology of the urogenital system. *Nat Rev Urol.* 2016; 13(1): 21-32.
177. Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology.* 2006; 147: 4852–4862.
178. Shahed A, Young KA. Differential ovarian expression of KiSS-1 and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Mol. Reprod. Dev.* 2009; 76: 444–452.
179. Cieleish ME, McGrath BM, Scott CJ, Norman ST, Stephen CP. The localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the canine ovary during different stages of the reproductive cycle. *Reprod Dom Anim.* 2017; 52 (2): 24–28.
180. Herzog AG, Seibel MM, Schomer DL, Vaitukaitis JL, Geschwind N. Reproductive endocrine disorders in women with partial seizures of temporal lobe origin. *Arch. Neurol.* 1986; 43 (4): 341–346.
181. Herzog AG A relationship between particular reproductive endocrine disorders and the laterality of epileptiform discharges in women with epilepsy. *Neurology.* 1993; 43 (10): 1907–1910.
182. Kalinin VV, Zheleznova EV. Chronology and evolution of temporal lobe epilepsy and endocrine reproductive dysfunction in women: relationships to side of focus and catameniality. *Epilepsy Behav.* 2007;11 (2): 185–191.
183. Cutia CA, Leverton LK, Ge X, Youssef R, Raetzman LT, Christian-Hinman CA. Phenotypic differences based on lateralization of intrahippocampal kainic acid injection in female mice *Exp Neurol.* 2022; 355: 114118.

EKLER

Ek 1. Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

ÖZGEÇMİŞ

1

1

1

1

