

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**LİTYUM-PILOKARPİN İLE İNDÜKLENMİŞ STATUS
EPİLEPTİKUS SONUCU SIÇAN HİPOKAMPUSUNDA
OLUŞAN MİKROGLİA AKTİVASYONUNUN SERUM
S100B DÜZEYİ İLE İLİŞKİSİ VE BİR GLP-1
ANALOĞU OLAN LİRAGLUTİDİN BU
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Arş. Gör. MURAT KIZILTAŞ**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SÜREYYA BARUN**

**ANKARA
MART 2015**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**LİTYUM-PILOKARPİN İLE İNDÜKLENMİŞ STATUS
EPİLEPTİKUS SONUCU SIÇAN HİPOKAMPUSUNDA
OLUŞAN MİKROGLİA AKTİVASYONUNUN SERUM
S100B DÜZEYİ İLE İLİŞKİSİ VE BİR GLP-1
ANALOĞU OLAN LİRAGLUTİDİN BU
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Arş. Gör. MURAT KIZILTAŞ**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SÜREYYA BARUN**

**ANKARA
MART 2015**

KABUL VE ONAY

TEŞEKKÜR

Öncelikle tezimin bütün aşamalarında önemli katkılarını benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Süreyya Barun’a, teşekkür ederim.

Ayrıca, histolojik incelemelerdeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu ve Prof. Dr. Pergin Atilla’ya teşekkür ederim. Biyokimyasal incelemelerdeki destekleri için Doç. Dr. Turan Turhan’a, cerrahi işlemlerdeki emeği için Dr. Şahin Hanoğlu’na ve istatistiksel hesaplamalardaki katkısı için Dr. Önder Aydemir’e teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında arkadaşlıkları ile bana yardımda bulunan Arş. Gör. İsmail Türkoğlu, Arş. Gör. Erdinç Beşikçioğlu ve Recep Orhan’a teşekkür ederim.

Son olarak anneme, rahmetli babama ve nişanlım Türlan Kılıç’a günlere gelmemdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimi Türkan Kılıç’a ithaf ediyorum...

KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AEİ	Antiepileptik İlaçlar
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
AMPA	Alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoazol Propionik Asit
CD	<i>Cluster Determinant</i>
DPP-IV	Dipeptidil Peptidaz IV
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DG	Dentat Girus
EEG	Elektroensefalografi
EPSP	Eksitator Postsinaptik Potansiyel
GABA	Gamma Amino Butirik Asit
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptid-1
GLP-1R	Glukagon Benzeri Peptid-1 Reseptörleri
HİV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
ICAM-1	İntraselüler Adezyon Molekülü
ILAE	International League Against Epilepsy (Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği)
IL-1β	İnterlökin 1-beta
IL-6	İnterlökin 6

IPSP	İnhibitör Postsinaptik Potansiyel
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LTP	Uzun Süreli Potansiyelizasyon
MHC	Major Doku Uygunluk Kompleksi
mGluR3	Metabotropik Glutamat Reseptörleri-3
MS	Multipl Skleroz
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
PDK	Paroksizmal Depolarizasyon Kayması
RAGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri İçin Reseptör
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SE	Status Epileptikus
SF	Serum Fizyolojik
SSS	Santral Sinir Sistemi
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-alfa
TPN	Total Parenteral Beslenme

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
KABUL ve ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTMALAR	iii
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Epilepsi	5
2.1.1. Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırması	6
2.1.2. Epidemiyoloji	7
2.1.3. Etiyoloji	10
2.1.4. Mortalite	11
2.1.5. Hipokampus	11
2.1.6. Epileptogenez	13
2.1.7. Fizyopatoloji	14
2.1.8. İlaç Tedavisi	19
2.1.9. Deneysel Epilepsi Modelleri	20
2.1.9.1. Lityum-Pilokarpin Epilepsi Modeli	21
2.2. Glial Hücreler	23

2.2.1. Mikroglia	24
2.3. S100 Proteinleri	27
2.3.1. S100B	29
2.4. Glukagon Like Peptid-1	32
2.5. Liraglutid	34
2.6. GFAP	35
2.7. OX-42	36
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	37
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	37
3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem	40
3.2.1. İndirekt ABC Yöntemi	40
3.3. İstatistiksel Yöntem	42
3.3.1. İstatistiksel Değerlendirme	42
4. BULGULAR	43
4.1.1 Çalışma Gruplarında S100B'nin Kan Düzeyleri	43
4.1.2. Çalışma Gruplarında DG'ta OX-42(+) Astrosit Sayıları	44
4.1.3. Çalışma Gruplarında CA1'de OX-42(+) Astrosit Sayıları	45
4.1.4. Çalışma Gruplarında DG'ta GFAP(+) Mikroglia Sayıları	46
4.1.5. Çalışma Gruplarında CA1deki GFAP(+) Mikroglia Sayıları	47
4.1.6. Her Bir Çalışma Grubunun Kendi İçinde OX-42(+) ve GFAP(+) Hücre Sayılarının Kan S100B Düzeyleri ile Arasındaki Korelasyonun Araştırılması	48
4.1.7. Çalışma Gruplarında DG'ta ve CA1'deki GFAP(+) ve OX-42(+) Hücre Sayısının ve Kandaki S100B Değerlerinin Dağılımı	52
4.2. İmmünohistokimyasal bulgular	54

4.2.1. Kontrol grubu	54
4.2.2. Sham grubu	56
4.2.3. SE grubu	58
4.2.4. SE + Liraglutid grubu	60
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ	65
7. KAYNAKLAR	66
8. ÖZET	104
9. SUMMARY	106
10. EKLER	108
10.1. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Onayı	108
10.2. Deney Hayvanları Kursu Katılım Sertifikası	109
10.3. Tıpta İletişim Becerileri Temel Eğitim Katılım Belgesi	110
11. ÖZGEÇMİŞ	111

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Epilepsilerin Klinik ve Elektroensefalografik Sınıflaması (ILAE 1981)	8
Tablo 2. Epilepsi ve Epileptik Sendromların Sınıflaması (ILAE 1989)	8
Tablo 3. Kullanılan primer antikorların özellikleri ve seyreltme oranları	41
Tablo 4. Kontrol Grubunda DG ve CA1’de GFAP(+), OX-42(+) Hücreler ve Kan S100B Düzeyleri Arasındaki Korelasyon	50
Tablo 5. Sham Grubunda DG ve CA1’de GFAP(+), OX-42(+) Hücreler ve Kan S100B Düzeyleri Arasındaki Korelasyon	50
Tablo 6. SE Grubunda DG ve CA1’de GFAP(+), OX-42(+) Hücreler ve Kan S100B Düzeyleri Arasındaki Korelasyon	51
Tablo 7. SE+Liraglutid Grubunda DG ve CA1’de GFAP(+), OX-42(+) Hücreler ve Kan S100B Düzeyleri Arasındaki Korelasyon	51
Tablo 8. Çalışma Gruplarına Göre DG ve CA1’deki GFAP(+) ve OX-42(+) Hücre Sayısının ve Kandaki S100B Değerlerinin	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hipokampus	12
Şekil 2. Hipokampus, denizati ve Ammo	12
Şekil 3. Beyin hücrelerinin şematik resmi	24
Şekil 4. Mikroglıların fonksiyonel rolleri	26
Şekil 5. S100 protein sekonder yapısı, L1-L2 kalsiyum bağlama bölgeleri, tersiyer yapıda katlanacak olan heliksler	28
Şekil 6. S100 proteini ve hedef protein	29
Şekil 7. S100B'nin intraselüler ve ekstraselüler fonksiyonları	31
Şekil 8. Çalışma Gruplarına Göre S100B'nin Kan Düzeyleri	43
Şekil 9. Çalışma Gruplarında DG'ta OX-42(+) Astrosit Sayıları	44
Şekil 10. Çalışma Gruplarında CA1'de OX-42(+) Astrosit Sayıları	45
Şekil 11. Çalışma Gruplarında DG'taki GFAP(+) Mikroglia Sayıları	46
Şekil 12. Çalışma Gruplarında CA1'deki GFAP(+) Mikroglia Sayıları	47
Şekil 13. SE + Liraglutid Grubunda DG ile CA1 deki GFAP (+) Astrosit Sayısı Arasındaki Korelasyon	48
Şekil 14. SE Grubunda S100B Kan Düzeyleri ile CA1deki OX-4(+) Mikroglia Sayısı Arasındaki Korelasyon	49

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1:** Kontrol grubunda histolojik değerlendirme; A: DG’ta minimal ödem ve az sayıda bazofilik, kondanse nöron, B: CA1’de sağlıklı nöronlar ve damar çevresinde minimal ödem (Hematoksilen-Eozin AX200, BX200) 54
- Resim 2:** Kontrol Grubunda GFAP İmmünoreaktivitesi; A: DG’ta GFAP(+) astrositler. B: CA1’de özellikle piamatere yakın alanda GFAP(+) astrositle (HRP/ABC–Hematoksilen AX200, BX200) 55
- Resim 3:** Kontrol Grubunda OX-42 İmmünoreaktivitesi; A: DG’ta zayıf OX-42 İmmünoreaktivitesi gösteren mikroglialar. B: CA’1 de piamatere yakın alanda zayıf immunorektivite gösteren mikroglialar (HRP/ABC–Hematoksilen AX200 inset: X400, BX400) 55
- Resim 4:** Sham grubunda histolojik değerlendirme; A: DG’ta ödeme bağlı açılmalar, B: CA1’de damar çevresinde minimal ödem(Hematoksilen-Eozin, AX200, BX200) 56
- Resim 5:** Sham Grubunda GFAP İmmünoreaktivitesi; A: DG’ta GFAP(+) astrositler, B: CA1’de GFAP(+)astrositler (HRP/ABC–Hematoksilen, AX200, BX200)

Resim 6: Saham Grubunda OX-42 İmmünoreaktivitesi; A: DG'ta granüler nöron topluluğu komşuluğunda OX-42 immunoreaktif mikroglialar. B: CA1'de damar yakınında OX-42 immunoreaktif mikroglialar.(HRP/ABC-Hematoksilen AX200,BX200) 57

Resim 7: SE grubunda histolojik değerlendirme; A: DG'ta normal granüler nöronların arasında piknotik nöronlar, inset: DG içinde lokalize alanlarda nöronlar B: CA1'de sağlıklı nöronlar ve damar çevresinde ödem (Hematoksilen-Eozin, AX200, inset: X200, BX200) 58

Resim 8: SE Grubunda GFAP İmmünoreaktivitesi; A: DG'ta güçlü GFAP İmmünoreaktivitesi gösteren ağ yapmış astrositler, B: CA1'de GFAP(+) Astrositler (HRP/ABC–Hematoksilen, AX200, BX200) 59

Resim 9: SE Grubunda OX-42 İmmünoreaktivitesi; A: DG'ta OX-42(+) mikroglialar, B: CA1'de OX-42(+) mikroglialar (HRP/ABC–Hematoksilen,AX200, BX200) 59

Resim 10: SE + Liraglutid grubunda histolojik değerlendirme; A: DG'ta piknotik nöronlar ve nöron topluluğu bazal kısımlarında hafif ödem, B: CA1'de sağlıklı nöronlar ve damarlar (Hematoksilen-Eozin, AX200, BX200) 60

Resim 11: SE + Liraglutid grubunda GFAP immünoreaktivitesi; A: DG'ta GFAP

immunoreaktif hücreler hücreler, B: CA1'deGFAP(+) hücreler

(HRP/ABC Hematoksilen, AX400, BX200)

61

Resim 12: SE+Liraglutid grubunda OX-42 immünoreaktivitesi; A: DG'ta nöron

topluluğu komřuluđuunda OX-42(+) mikroglialar, B: CA1'de

damar komřuluđuunda OX-42(+) mikrogli İnetler: büyük

büyütmede OX-42(+) mikrogli (HRP/ABC–Hematoksilen, AX200,

inset: X400, BX200, inset: X400)

61

1. GİRİŞ

Epilepsi en sık görülen nörolojik hastalıktır ve populasyonun % 3'ünü etkiler. Dünyada yaklaşık 50 milyon epilepsi hastası vardır¹. Epilepsi, status epileptikus (SE) veya tek bir nöbet sırasında ortaya çıkan eksitotoksisite hipokampus ve korteks gibi yapılarda inflamatuvar hasara yol açar². Nöbetler nöroinflamasyonun bir göstergesi olan mikrogliyal aktivasyonu tetiklemektedir³. Mikrogliyal aktivasyon ve proliferasyonun aşırı olması ise nöronal hücre ölümüne, disfonksiyona ve anormal nörotransmisyonu neden olabileceği gibi yeni nöbet oluşumunu da tetiklemekte ve hatta sonraki nöbetlere karşı duyarlılığı artırmaktadır⁴. Nöbet sonrası hipokampal dokuda meydana gelen astroglial değişiklikler nörodavranışsal ve kognitif bozukluklara da yol açabilmektedir⁵. Bu nedenle, nöbetler tarafından indüklenen nöroinflamasyon hem hastalığın fizyopatolojisi hem de epileptik hastalarda mevcut olan ko-morbid durumların ortaya çıkmasında büyük önem taşımaktadır. İnflamatuvar olayların sadece deneysel nöbet ve epilepsi modellerinde değil aynı zamanda epileptik hastalarda da meydana geldiği gösterilmiştir^{3,6}.

Mikrogliyal, mezoderm kaynaklı hücreler olup makrofajların santral sinir sistemi (SSS)'ndeki karşılığı olan fagositoz hücreleridir. Pro-inflamatuvar moleküllerin başlıca kaynağı mikrogliyal ve astrositlerdir. Bu moleküller SSS'de oluşan inflamasyonun yaygınlığının belirlenmesinde, nöronal fonksiyonlar ve nöronal sağkalım üzerinde önemli etkiye sahiptirler^{7,8}. Pro-inflamatuvar moleküller Alzheimer, Parkinson, epilepsi gibi hastalıkları içine alan pek çok hastalık sırasında oluşan inflamatuvar cevabın meydana gelmesinde kritik rol

oyunlar⁹. Mikroglial aktivasyonun aşırı ya da kronik olması destrüktif kaskadları indükleyerek nöronal hücre ölümüne neden olur. Bu olayda, aktive olmuş mikroglialardan salıverilen proinflamatuvar sitokinlerin (İnterlökin 1-beta (IL-1 β), İnterlökin 6 (IL-6), Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α)), serbest radikallerin, Major Doku Uygunluk Kompleksi (MHC) antijenlerinin, Fc reseptörlerinin, kompleman reseptörlerinin, beta 2 integrin ve İntraselüler Adezyon Molekülerinin (ICAM-1) önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Aktive olmuş mikroglialar Glial fibriler asidik protein (GFAP), S100B, Iba1 ve Cluster Determinant (CD) CD 68 gibi spesifik belirteçlerin ekspresyonuna bakılarak tespit edilebilmektedir^{10,11}.

S100B kalsiyum bağlayan bir proteindir ve özellikle glial hücreler ve Schwann hücreleri tarafından sentez edilir^{12,13}. Nörobilim çalışmaları yaygınlaştıkça S100B proteinin fizyolojik ve patolojik durumlar ile ilgili güvenilir ve erken dönemde beliren bir belirteç olduğu ortaya çıkmıştır^{14,15,16}. S100B düzeyinin, psikiyatrik hastalıklar, travmatik beyin hasarları, serebrovasküler patolojiler ve nörodejeneratif hastalıklarda anlamlı olarak yükseldiği gösterilmiştir^{17,18,19,20,21}. S100B düzeylerinin normal bulunması ise SSS'ne ait majör bir patolojiyi güvenilir bir şekilde elimine etmektedir²². S100B, ekstraselüler sıvıya salıverildiğinden serumda da bulunur ve böylece parakrin, otokrin ve endokrin etkiler oluşturur²³. Normal koşullarda beyindeki ekstraselüler S100B konsantrasyonu nanomolar veya subnanomolar düzeydedir ve sitotoksik glutamatin astrositler tarafından "reuptake" ini artırır. Bu nedenle S100B beyin gelişimi ile beyin travmalarının başlangıç fazında nörotrofik ve nöroprotektif bir faktör olarak fonksiyon yapar^{24,25,26}. Ancak, S100B'nin ekstraselüler ortamda

birikmesi hem nöron hem de astrositlerde apoptozise neden olarak zararlı bir etki ortaya çıkarır^{13,27,28}. Epilepsi, Alzheimer hastalığı, Down Sendromu ve beyindeki diğer patolojilerde de beyin S100B düzeyinde artış olduğu gösterilmiştir^{13,23,28,29}.

S100B'nin nöroinflamasyon durumunda astrositlerdeki ekspresyonunda belirgin artış olduğu bulunmuştur³⁰. İnflamasyon sürecinde rol oynayan en önemli hücreler mikrogliya ve astrositler olup, S100B bu hücrelerden TNF- α , IL-1 β , İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS), IL-6 gibi inflamamatuvar moleküllerin sentezi ve salıverilmesine neden olur^{27,31,32}. Ancak, ekstraselüler ortamda yüksek konsantrasyonda bulunan S100B'nin inflamatuvar cevapta artışa mı yoksa azalmaya mı neden olduğu açık değildir. Mikroglial ve astrositik aktivasyon yaparak SSS'deki dejenerasyon süreçlerinde rol oynayabileceği gibi trofik faktörlerin sentez ve salıverilmesini inhibe ederek de fizyopatolojik süreçlere katkıda bulunabilmektedir^{33,34}.

Glukagon Benzeri Peptid-1 (GLP-1), glukoza bağımlı insülin sekresyonu üzerine etki ederek postprandial glukoz düzeyini regüle eden bir inkretin hormondur³⁵. GLP-1 agonistleri (exendin-4 ve liraglutid) tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılmak üzere onay almışlardır³⁶. Ancak, GLP-1 beyindeki nöronlarda da eksprese edilir ve nörotransmitter olarak rol oynar³⁷. Nöronlar üzerinde GLP-1 reseptörleri (GLP-1R) de mevcuttur³⁸. Çalışmalar GLP-1'in trofik etkilerinin olduğunu ve nörotoksik etkilere karşı nöroprotektif özellikler sergilediğini göstermektedir^{39,40,41}. Hipokampal nöronlarda indüklenen apoptozisi inhibe ettiği, uzaysal ve asosiyatif öğrenme üzerine olumlu etkiler oluşturduğu da gösterilmiştir^{39,42}. GLP-1 ve analogları yaygın olarak nörojenezi stimüle

etiklerinden bu ajanların Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve inme gibi nörodejeneratif hastalıklarda faydalı olabileceği öngörülmüştür. Ayrıca bu hastalıklar Tip 2 diyabette belirgin olarak daha sık görüldüklerinden, ortak fizyopatolojik mekanizmaların söz konusu olması muhtemeldir^{43,44}.

GLP-1, proglukagondan köken alan bir peptiddir⁴⁵. SSS'de oluşan inflamatuvar durumlarda mikrogial proglukagon mRNA ve GLP-1 protein ekspresyonunun etkilendiği ve bu durumun nörodejeneratif süreçlerden sorumlu olabileceği gösterilmiştir⁴⁶. Ancak GLP-1 ve analogları SSS'de antiinflamatuvar etkiye neden olmaktadır^{47,48}. Ekzentin-4 (exendin-4) stabil bir GLP-1 analogudur ve kan beyin bariyerini geçebilmektedir^{49,50}. Bu molekülün mikrogia aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir^{48,51}.

Liraglutid GLP-1'in sentetik analogudur ve GLP-1 ile %97 homoloji göstermektedir^{52,53,54}. Tip 2 diyabet tedavisinde kan glukoz düzeyinin regülasyonu için kullanılmak üzere onay almıştır^{55,56,57,58}. GLP-1 ve liraglutidi de içeren GLP-1 analogları kan beyin bariyerini geçebilmekte, nöronal progenitor hücrelerde proliferasyona neden olmakta ve apoptozisi inhibe edebilmektedir^{59,60,61,62}. Liraglutid gibi GLP-1 analoglarının Alzheimer ve Parkinson modellerinde nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir^{61,63,64,65}. GLP-1 analogu liraglutid deneysel Alzheimer modelinde plak formasyonunu azaltmakta, bellek ve sinaptik plastisiteyi korumakta ve inflamasyonu azaltmaktadır⁶¹. Epileptik nöbetlerin de SSS'de nöronal hasara yol açtığı kanıtlanmış olmakla beraber, GLP-1 veya analoglarının nöroprotektif etkisi bu alanda hiç incelenmemiştir.

Tez çalışmasında, yukarıda belirtilen bilgiler ışığında, lityum-plokarpin ile sıçanlarda SE modeli oluşturuldu ve oluşan mikroglia aktivasyonu deneyin 8. gününde dorsal hipokampusta OX-42 ve GFAP ekspresyonuna bakılarak değerlendirildi. Ayrıca deneylerin 8. gününde hayvanlar sakrifiye edilmeden önce periferik kan alınarak S100B düzeyi değerlendirildi. Aynı deney protokolü ayrıca liraglutid varlığında tekrarlandı. Veriler toplandıktan sonra mikroglia aktivasyonu ile S100B arasında olası bir korelasyonun varlığı ve liraglutidin etkileri matematiksel yöntemlerle değerlendirildi.

Nöbetlerce indüklenen mikroglial aktivasyonun patolojik süreçlerde oynadığı rolün ve S100B ile ilişkisinin ortaya çıkarılması ve bu süreçte oluşturulan değişikliklerin yaratacağı sonuçların değerlendirilmesi, hem patolojik süreçlerin anlaşılmasına hem de yeni tedavi stratejilerinin geliştirilerek hastaların yaşam kalitesinin yükseltilmesine yönelik olarak bilime katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Ülkemizde halk arasında ‘sara’ ya da ‘tutarık’ olarak adlandırılan epilepsi, nöbet geçirme anlamında olup antik çağlardan itibaren bilinen bir hastalıktır ve eski Yunanca’da yakalama, tutma, kavrama anlamlarına gelen ‘epilambanein’ kelimesinden türetilmiştir⁶⁶.

Milattan önce (MÖ) 2080 yılında yayınlanan ‘Hammurabi Kanunları’nda epilepsi ile ilgili ilk bilgilere rastlanmaktadır ve hastalarda ateş ile konvulsiyon arasında bir ilişkiye dikkat çekilmektedir⁶⁷. Epilepsi konusunda ilk gerçek

tanımlamayı bundan yaklaşık yirmi beş asır önce Hipokrat'ın yaptığı görülmektedir. Hipokrat epilepsinin kaynağının beyinden geldiğini saptamış, 'Kutsal Hastalık' anlamına gelen 'On the Sacred Disease' olarak tanımlamış ve epilepsinin diyet ve ilaçların yardımı ile tedavi edilebileceğini söylemiştir⁶⁸.

Nöbet, beyindeki nöronların fonksiyon bozukluğu olarak ortaya çıkan, nöronların ani ve anormal deşarjları sonucu oluşan klinik bir durumdur^{69,70}. Epilepsi, tüm kortekste ya da lokalize beyin bölgelerindeki sinir hücrelerinin aşırı uyarımı sonucu istemsiz olarak tekrarlayan nöbetlerle karakterize sinir sistemine ait bir bozukluktur⁷¹. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) epilepsiyi aralarında en az yirmi dört saat olmak üzere, en az iki provokasyonsuz nöbetin olması durumu olarak da belirlemektedir⁷². ILAE epilepsiyi beyindeki bir bozukluk sonucu meydana gelen nöbetler ve bu nöbetlerin nörobiyolojik, kognitif, psikolojik ve sosyal sonuçları olarak da tanımlamıştır⁷³. Epileptik nöbetler sırasında bilinç kaybı ile birlikte ya da bilinç kaybı olmaksızın motor, duyuşal, otonomik ya da psikişik semptomlar görülebilir. Epilepsi bilişsel, davranışsal emosyonel, motor, veya duyuşal bozukluklara neden olabilir⁷⁴.

2.1.1. Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırılması

İlk olarak 1960' larda ILAE tarafından epilepsi uzmanlarının bir araya gelmesi ile epileptik nöbetlerin sınıflamasının temelleri atılmıştır. Son kez 1981 yılında epilepsinin klinik ve elektroensefalografik (EEG) sınıflaması yapılmış ve günümüzde halen bu sınıflandırma kullanılmaktadır⁷⁵ (Tablo 1). Bununla birlikte epilepsilerde klinik seyir, prognoz, etiyoloji ve dolayısıyla tedavi yöntemleri çok

farklı olabileceğinden, sadece nöbet semiyolojisi ve EEG ile yapılan nöbet sınıflamasının yetersiz kaldığı düşünülmüş ve ILAE, 1989 yılında epileptik sendromları bir arada toplayan uluslararası epilepsi ve epileptik sendrom sınıflaması hazırlamıştır⁷⁵ (Tablo 2).

Son yıllardaki gelişmeler ile birlikte bu sınıflandırmalar için güncellemeler^{76,77} önerilmekle birlikte, söz konusu sınıflandırmalar yaygın olarak kullanılmakta ve halen geçerliliklerini sürdürmektedirler.

2.1.2. Epidemiyoloji

Epilepsi SSS'in en sık görülen kronik hastalığı olup çocukluk ve ergenlik döneminde en sık karşılaşılan nörolojik hastalıktır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) geliştirmekte olan ülkelerde epilepsinin önlenmesi ve kontrolü için projeler oluşturmuştur⁷⁸.

Epilepsi insidansı az gelişmiş ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha sıktır. Kotsopoulos ve arkadaşlarının çalışmasına göre ortalama epilepsi insidansı gelişmiş ülkelerde yılda 43,4/100.000 iken az gelişmiş ülkelerde yılda 68,7/100.000 olarak gösterilmiştir⁷⁹.(79) Doğum öncesi ve doğum sırasında yaşanan sorunların, kafa travmalarının ve infeksiyon hastalıklarının az gelişmiş ülkelerdeki sıklığı yüksek insidansın sorumlusu olarak gösterilmiştir. Bunların yanında gelişmemiş ülkelerde nörosistiserkoz, Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (AIDS) ve sıtma gibi hastalıklar da epilepsi sıklığını arttırmaktadır^{80,81}.

Tablo 1: Epilepsilerin Klinik ve Elektroensefalografik Sınıflaması (ILAE 1981)

- I. Parsiyel (fokal, lokal) nöbetler
 - A. Basit parsiyel nöbetler (bilinç durumu bozulmaksızın)
 - 1. Motor semptomlu
 - 2. Somatosensoryal veya özel duyuşsal semptomlu
 - 3. Otonomik semptomlu
 - 4. Psikiş semptomlu
 - B. Kompleks parsiyel nöbetler (bilinç bozukluğu ile giden)
 - 1. Basit parsiyel başlangıcı izleyen bilinç bozukluğu
 - 2. Bilinç durumunun başlangıçtan itibaren bozulması
 - C. İkincil jeneralize nöbete dönüşen
 - 1. Jeneralize nöbetlere ilerleyen basit parsiyel nöbetler
 - 2. Jeneralize nöbetlere ilerleyen kompleks parsiyel nöbetler
 - 3. Jeneralize nöbetlere ilerleyen kompleks parsiyel nöbetlere ilerleyen basit parsiyel nöbetler
- II. Jeneralize nöbetler (konvülsif veya nonkonvülsif)
 - A. Absans nöbetleri
 - 1. Tipik absans nöbetleri
 - 2. Atipik absans nöbetleri
 - B. Myoklonik nöbetler
 - C. Klonik nöbetler
 - D. Tonik nöbetler
 - E. Tonik-klonik nöbetler
 - F. Atonik nöbetler (astatik)
- III. Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler

Tablo 2: Epilepsi ve Epileptik Sendromların Sınıflaması (ILAE 1989)

- I. Lokalizasyona bağlı (fokal, lokal, parsiyel) epilepsi ve sendromlar
 - A. İdiopatik (başlangıç yaşına göre)
 - B. Semptomatik
 - C. Kriptojenik epilepsiler
- II. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar
 - A. İdiopatik epilepsiler
 - B. Kriptojenik veya semptomatik epilepsiler
 - C. Semptomatik epilepsiler
 - 1. Non-spesifik etyolojili
 - 2. Spesifik nörolojik hastalıklara bağlı epilepsiler
- III. Fokal veya jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsi ve sendromlar
 - A. Hem jeneralize hem fokal olan nöbetler
 - B. Fokal veya jeneralize görünüşün belirgin olmadığı durumlar
- IV. Özel duruma bağlı epilepsiler
 - A. Febril konvülsiyonlar
 - B. İzole nöbetler veya izole status epileptikus
 - C. Akut toksik veya metabolik nedenlere bağlı nöbetler

Epilepsi yaş insidansı U şeklinde bir eğri çizer, insidans çocukluk çağında yüksekken erişkin yaşlarda azalmakta ve yaşlanmayla birlikte tekrar yükselmektedir⁸². Yaşlılarda görülen yüksek insidansın sebebi bu yaş grubunda epilepsiyle ilişkili risk faktörlerinin çoğalmasına bağlı olabilir. Epilepsiye eğilim en sık damar hastalıklarında (beyin enfarktüsü ve hematom) artmaktadır⁸³. Diğer sebepler arasında beyin tümörleri, metabolik hastalıklar ve Alzheimer gibi dejeneratif hastalıklar bulunmaktadır⁸³.

Son 5 yıl içinde tedavi alıp almadığına bakılmaksızın en az bir nöbet geçirmiş olan epilepsili bireylerde hesaplanan prevalans ‘Aktif Epilepsi prevalansı’ olarak isimlendirilmektedir. Aktif epilepsi prevalansı için gelişmiş ülkelerde 4-10/1000, gelişmekte olan ülkelere ise 1,3-46/1000 arasında değişen sonuçlar bildirilmektedir⁸⁴. Çok farklı sonuçlar olmasına karşın gelişmiş ülkelere ortalama epilepsi prevalansı 6/1000 iken, gelişmekte olan ülkelere bu oranın 18,5/1000 olduğu bildirilmiştir⁸⁵. Çalışmaların çoğunda insidansta cinsiyete göre farklılık saptanamazken prevalansın erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir⁸⁶.

En sık parsiyel nöbetler görülür. Hastaların bir kısmında bu tabloyu jeneralize tonik-klonik nöbetler takip eder. Diğer nöbet tipleri daha seyrektrir⁸⁷. Kırk yaşından küçük epilepsi hastalarının ortalama %50’si parsiyel, %50’si jeneralize kaynaklı iken, kırk yaşından büyük epilepsi hastalarında parsiyel epilepsi oranı %70’lere ulaşır⁸⁸.

2.1.3. Etiyoloji

ILAE tarafından 1989'da yapılan sınıflandırmada nöbetler altta yatan nedene göre, semptomatik, idiyopatik ve kriptojenik olarak sınıflandırılmıştır⁸⁹.

İdiyopatik epilepsilerde altta yatan nörolojik hasar veya yapısal beyin lezyonu yoktur ve nöbetin nedeni genetik yatkınlık veya olası biyokimyasal bir bozukluktur. Beyindeki belirli bazı kimyasalların (nörotransmitterlerin) dengesizliğinin konvülsiyon eşiğini düşürdüğü yönünde bir teori geliştirilmiştir⁸⁹.

Kriptojenik epilepsiler idiyopatik epilepsilerin bilinen özelliklerine uyduklarından semptomatik gibi görünen fakat mevcut araştırma yöntemleri ile etiyolojik bir sonuca varılamayan durumları adlandırmak için kullanılır⁸⁹.

Geçmişte olan bir olay epilepsi gelişim risk artışına sebep oluyorsa semptomatik epilepsi olarak değerlendirilir. Semptomatik faktörlerin başlıcaları inme öyküsü, beyin malformasyonları, serebral palsi gibi nörogelişimsel anormallikler, bakteriyel menenjit veya viral ensefalit geçmişi, çeşitli genetik faktörler ve tümörlerdir⁹⁰.

Yetişkin epilepsi hastalarının önemli bir kısmında epilepsinin nedeni bilinmemektedir⁹¹. Çalışmalarda epilepsinin en sık görülen sebepleri arasında serebrovasküler hastalıklar, kafa travmaları, intrakranyal hemorajiler, serebral tümörler ve nörodejeneratif hastalıklar sayılmaktadır^{92,93,94,95}. Çocuklarda metabolik bozukluklar, konjenital malformasyonlar, enfeksiyonlar ve genetik hastalıklar sıkça rastlanan etiyolojik sebeplerdir⁹¹. Bazı çalışmalarda yaşamın erken safhalarında epilepsiye sıklıkla genetik, gelişimsel ve konjenital faktörlerin eşlik ettiği belirtilirken, serebrovasküler hastalıkların, kafa travmalarının,

enfeksiyon veya tümörlerinde daha sonraki yıllarda epilepsiye sebep olabileceği bildirilmiştir^{96,97}.

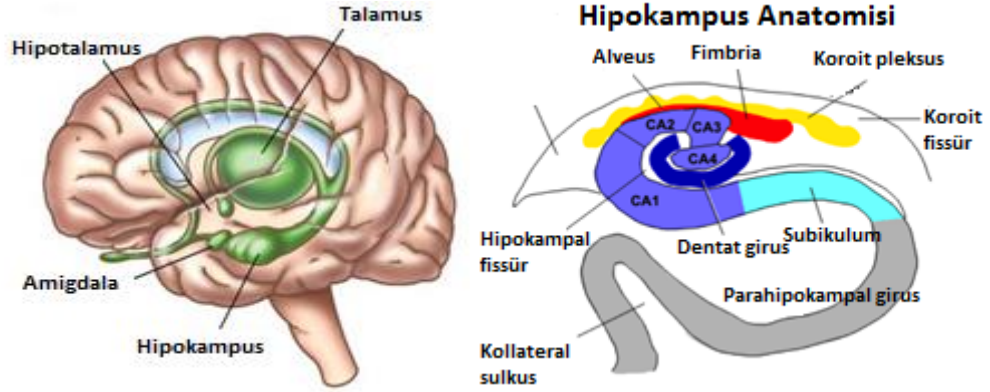
2.1.4. Mortalite

Topluma dayalı çalışmalar epilepsili hastalardaki ölüm oranının genel populasyondan 2-3 kat daha fazla olduğunu ortaya çıkartmaktadır⁹⁸. Nöbetlerin tipi ile mortalite oranları arasında da ilişki vardır. Jeneralize tonik-klonik ve myoklonik nöbetlerde mortalite oranları yüksek iken absans nöbetlerde mortalite oranı yüksek değildir⁹⁹. Epilepsi cerrahisinden sonra nöbetleri düzelen hastaların mortalite oranı genel populusyona eşitlenirken, cerrahi sonrası nöbetleri düzelmeyen hastalarda yüksek ölüm oranı devam etmektedir. Bu bakımdan kontrol altına alınamayan nöbetler epilepsideki ölümlerin en önemli risk faktörü olabilir¹⁰⁰. Seçilmiş epileptik hasta populusyonlarında yapılan çalışmalarda sık ve şiddetli nöbeti olan hastaların mortalite oranı diğer epilepsili hastalardan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca en yüksek ölüm oranı doğumdan itibaren nörolojik bozukluğu (mental retardasyon, serebral palsy) olan epilepsili hastalarda görülmüştür¹⁰¹.

2.1.5. Hipokampus

Hipokampus, ventriküler yapının temporal boynuzunun medial tabanı boyunca uzanan, kıvrılmış, yaklaşık 5 cm uzunluğunda gri cevher bir yapıdır^{102,103} (Şekil 1). On altıncı yüzyılın sonlarında anatomist Arantius tarafından, koronal kesitlerinde denizatına benzerliğinden dolayı, Latince denizatı anlamına gelen

‘hippocampus’ olarak adlandırılmıştır. Yaklaşık iki yüzyıl sonra Mısırlı anatomistler tarafından ‘Ammon’s horn’ veya ‘Cornu Ammonis’ olarak yeniden isimlendirilmiştir¹⁰⁴ (Şekil 2).



Şekil 1. Hipokampus¹⁰²



Şekil 2. Hipokampus, denizati ve Ammo¹⁰⁴

‘Hipokampal formasyon’, dentat girus (DG), hipokampus ve subikulumun oluşturduğu, parahipokampal girus tarafından çevrelenen, temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösteren, primitif bir kortikal yapıdır. Bu bağlantılar sayesinde hipokampus, dikkat, uyanıklık, kısa dönem hafıza, davranış ve endokrin fonksiyonlar üzerinde önemli roller oynar¹⁰⁴. Hareket, yürüme ve diğer motor işlerde de majör rol oynamaktadır¹⁰⁴. Bu işlevler sırasında

hipokampustaki ritmik yavaş dalga EEG aktivitesi (teta dalgaları) değişmektedir. DG hipokampusa bilgilerin girdiği bir istasyon vazifesi görürken, subikulum içinde bulunan piramidal nöronlar ile hipokampustan asıl çıktı istasyonudur¹⁰⁴.

Hipokampus mikroskobik ve sinaptik bağlantıların organizasyonuna göre 4 bölgeye ayrılır. “Cornu Ammonis”ten esinlenerek CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak isimlendirilmiştir. Hipokampus iki çeşit nöron yapısı ile organize olmuştur. Esas nöronlar piramidal nöronlardan oluşur ve veri çıkışından sorumludur. İntrinsik nöronlar ise, gamma amino butirik asit (GABA)’erjik aktivite gösteren düzensiz şekilli nöronlardır ve sayıları piramidal nöronlara göre çok daha azdır^{102,104,105}.

Epilepsi hastalarında hipokampus piramidal hücrelerin CA nöronlarının ‘pacemaker’ merkezler olabileceği belirtilmiştir¹⁰⁶. Bu nedenle bu bölgelere yoğunlaşmıştır. Hipokampus epileptik nöbet için düşük eşik değere sahip olmasına rağmen, temporal bölgeden başlayan nöbetler genelde jeneralize olmamaktadır¹⁰⁶. Çalışmalarda hipokampus ve temporal lob yapılarının nöbet sonrası oluşan nöronal hasar ve hipoksiye en duyarlı bölgeler oldukları gösterilmiştir^{107,108,109}.

2.1.6. Epileptogenez

Epileptogenez, normal bir beyin dokusunun aşırı uyarılabilir hale gelerek tekrarlayan spontan nöbetler oluşturmaya kadar geçen progresif süreçtir¹¹⁰. Bütün epilepsiler genellikle benzer bir şekilde gelişim gösterirler. Epilepsili hastalarda ve deneysel hayvan modellerinde, başlangıçta tetikleyici bir hasar ile oluşan nöbet ve kronik epilepsiye dönüşüm arasında nöbetlerin görülmediği latent

bir periyot gösterilmiştir^{111,112,113}. Latent periyot boyunca, nöron kaybı ve anormal sinaptik reorganizasyon gibi hücrel ve moleküler seviyede önemli değişiklikler meydana gelmektedir^{114,115}.

Epileptogenezin hücrel mekanizmaları çok fazladır; hücre kaybı, gliosis, büyüme faktörlerinin artışı, nörogenez, sinaptogenez, glutamat ve GABA sinyalizasyonunda farklılaşmalar, voltaj kapılı iyon kanallarında değişiklikler ve inflamatuvar araçlar bunlardan bazılarıdır. Beyin epileptik duruma geldiğinde anormal uyarılabilirlik ve anormal döngüsel oluşumların kombinasyonu meydana gelir^{111,112}.

Kullanılmakta olan farmakolojik ajanlar sadece nöbetleri baskıladıklarından dolayı anti-epileptik olarak olarak isimlendirilmektedir. Antiepileptojenik bir farmakolojik ajan henüz bulunmamaktadır¹¹⁶.

2.1.7. Fiziopatoloji

Epileptik nöbetlerin başlamasına, yayılmasına ve durmasına neden olan ayrıntılı mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, bazı görüşler öne sürülmüştür. ‘İyonik iletide bozukluğa yol açabilecek intrinsik nöronal membran ve moleküler kanal değişiklikleri’, ‘inhibitör nörotransmitterlerde yetersizlik ya da eksitator nörotransmitterlerde fazlalığa yol açacak anormal nörotransmitter sentezi’ ve ‘nöronların ve glial hücrelerin iyon pompalama ve repolarizasyonlarını düzenleyen genetik kontrollerdeki bozukluklar’ genel olarak öne sürülen görüşlerdir. Tüm epilepsi türlerinde aynı mekanizmadan bahsetmek mümkün olmasa da hepsinde artmış nöronal uyarılabilirlik ve senkronizasyon gibi

özellikler mevcuttur⁶⁹. Beyindeki ana inhibitör nörotransmitter GABA aktivitesinin azalması ve/veya ana eksitator glutamat aktivitesinin artması nöbet oluşumunda rol oynayan başlıca faktörlerdendir^{69,70,117}.

Eksitator sinapslarda (glutamaterjik) postsinaptik alanda Na^+ kanallarının açılması ile oluşan depolarizasyona eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP), inhibitör sinapslarda (GABA'erjik) postsinaptik alanda Cl^- kanallarının açılması ile oluşan hiperpolarizasyona ise inhibitör postsinaptik potansiyel (İPSP) denir. Ritmik bir şekilde oluşan EPSP ve İPSP'lerin birleşmesi ve senkronizasyonu EEG'de kaydedilen normal zemin ritminin temelini oluşturur¹¹⁸. Hayvan deneylerinde ve insanlarda yapılan çalışmalarda, epilepside kortikal nöronların membran potansiyellerinde ve uyarılma eşiklerinde karakteristik değişiklikler gözlenmiştir. Paroksizmal Depolarizasyon Kayması (PDK) olarak tanımlanan bu olayda membranı depolarize eden postsinaptik potansiyelde anormal şekilde uzama ve büyüme olur¹¹⁸. Normal fizyolojik durumda piramidal nöronların alt grubu olan korteksin V. tabakası ve hipokampusun CA3 alanı kısa depolarizasyona ani patlama yanıtı oluşturabilmektedir. Epileptik beyinde PDK ilk olarak bu bölgelerde oluşmaya yatkındır¹¹⁸. Anormal elektriksel aktivite odakla sınırlı kaldığı sürece klinik nöbet ortaya çıkmaz sadece interiktal EEG'de fokal diken aktivitesi olarak saptanabilir¹¹⁹. Parsiyel nöbet gelişiminde odağın etrafındaki inhibisyon aşılar ve ard-hiperpolarizasyon gittikçe azalarak anormal elektriksel aktivite odağın dışına yayılır¹²⁰. Eğer nöbet aktivitesi yeterince şiddetli ise normal kortikal aktivitenin izlediği yollardan diğer beyin bölgelerine yayılabilir¹¹⁹. PDK'nın eksitator nörotransmitterler olan glutamat ve aspartat ile

inhibitör nörotransmitter GABA sistemleri arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bununla birlikte membranlardaki iyon kanallarındaki bozuklukların da PDK'nın oluşmasında etkili olduğu düşünülmektedir. PDK büyük olasılıkla epileptik odak içindeki nöronlar arası eksitator bir geri besleme sonucudur ve tüm nöronun somatodendritik alanını kaplar. PDK nöbet öncesi oluşur, PDK'nın yarattığı ardışık yüksek frekanslı impulslar nörondan nörona yayılır ve epileptik nöbet aktivitesi oluşur^{120,121,122}.

Deneyssel yolla oluşturulmuş epileptik nöbetlerde GABA konsantrasyonlarının %50-60 azaldığı, GABA'erjik inhibitör sinapsların fonksiyon kaybının epileptik odağı oluşturduğu düşünülmüştür. GABA'nın iki mekanizma ile nöbetten sorumlu olduğu düşünülmektedir; birincisi sinapslardaki GABA konsantrasyonunun azalmasıyla nöronal inhibisyonda azalma olması, ikincisi ise GABA konsantrasyonunun normal olması fakat mevcut GABA'nın kullanılamamasıdır¹²³. Lityum-pilokarpin enjeksiyonu ile SE oluşturulmuş olan bir çalışmada beyinde GABA konsantrasyonlarının beklenmedik şekilde özellikle nöbetin şiddetlendiği durumda artmış olduğu, nöbetin başlangıcında ise azalmış olduğu gözlenmiştir¹²³. İkinci mekanizmayı destekleyen bu çalışmaya benzer bir çalışmada bikukulin ile yapılmış, oluşturulan nöbetlerde benzer sonuçlar elde edilmiştir¹²⁴. Nöroaktif aminoasitlerin konsantrasyonlarındaki azalma beklenen bir sonuçken, GABA miktarındaki artışı açıklamak güçtür. Sinaptik bölgede GABA'nın *reuptake*'i ya da metabolize olamaması nedeniyle GABA düzeyinin artmış olabileceğine dair bir açıklama araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür¹²⁵. Buna göre GABA sentezlenmekte fakat kullanılamamaktadır¹²⁵.

GABA’erjik nöronların metabolik hızlarının yüksek olmasından dolayı GABA’erjik nöron kaybının eksitasyon-inhibisyon dengesini eksitasyon lehine bozarak, nöbete yatkınlığı artıracakı öne sürölmüşür¹²⁶.

Nöbetler beyinde inhibitör sürece oranla, eksitatör sürece artma sırasında oluşurlar¹²⁰. Birçok epilepsi türünün aşırı glutamaterjik sinaptik ileti anomalisinden kaynaklanabileceğı belirtilmiştir¹²⁷. Glutamatın etkilerine N-metil-D- aspartat (NMDA), Alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoazol Propionik Asit (AMPA) ve Kainat reseptörleri aracılık etmektedir. Epilepsili hastalar ve hayvan modellerinde glutamat ve aspartat düzeylerinin arttığı gösterilmiştir¹²⁷.

Beyin dokusunda glial hücreler, nörotransmitter konsantrasyonunu ve hücre dışı iyon dengesini sağlarlar. Normal nöronal aktivitenin sürdürölebilmesi için hücre dışı sıvıdaki iyon dengesinin optimal olması gerekir⁶⁹. Sodyum ve potasyum kanallarındaki mutasyon veya değışiklikler nörotransmisyonu değıştirmektedir¹¹⁷. Membranların iyon kanallarındaki bozuklukların PDK’ya yol açabileceğı üzerinde durulmuştur^{128,129,130}. Bazı epilepsi türlerinde iyon kanallarının işlevlerini düzenleyen genlerde anormallikler gösterilmiştir, NMDA reseptörleri, kainat reseptörleri, Ca⁺² kanalları nöbet oluşumunda ayrı ayrı suçlanmıştır¹³¹. Ayrıca gen mutasyonları anormal iyonik kanal fonksiyonlarına neden olabilmekte ve anormal ağ bağlantılarına yol açabilmektedir¹³². İyon kanallarındaki mutasyonlar eksitatör ve inhibitör nörotransmisyon dengesini değıştirmekte, eksitatör nörotransmisyonun artmasına ya da inhibitör fonksiyonun kaybına neden olmaktadır¹³³.

Mitokondriyal düzeyde oluşan bozukluklar (enerji üretimi, apoptozis kontrolü, nörotransmitter üretimi) hem nöbet gelişiminde rol oynamakta hem de nöbet sonrası beyin dokusunda oluşan hücre hasarının artmasına neden olmaktadır^{134,135}. Moleküler seviyede proteinlerin konfigürasyonlarındaki değişiklikler presinaptik ve postsinaptik Ca^{+2} dengesini değiştirerek sinaptik bağlantıları etkiler. Böylece iyonik mikroçevrede değişen pH dengesi nöronal enerji metabolizmasını değiştirir. Buna eşlik eden glial doku değişimleri sonucu transmitterlerin aktivasyon-deaktivasyon'u bozulur ve nöronal ateşleme paternleri farklılaşır¹³⁶. Na^{+} - K^{+} pompası hücre içi Na^{+} ve Ca^{+2} miktarını düzenlemektedir. Hücre içi Ca^{+2} artışı hücre hasarının en önemli göstergesi olup, nörotransmitter salıverilmesini ve sinaptik iletiyi bozmaktadır¹³⁷. Epileptik nöbetlerin oluşumunda en önemli 'pacemaker' kabul edilen hipokampus CA3 piramidal hücrelerindeki Ca^{+2} artışının NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir¹³⁷.

Temporal lob yapılarından özellikle hipokampus, amigdala ve piriform korteks, nöbet oluşturan veya epileptogenezisi tetikleyen beyin hasarına en duyarlı olan bölgelerdir¹³⁸. Hipokampal kesitlerde muskarinik asetilkolin (ACh) reseptörlerinin uyarılmasıyla senkronize nöronal boşalım paterni olduğu gösterilmiştir. Nikotinik ACh reseptör aktivasyonunun ise hem eksitatör hem de inhibitör modulatorleri etkileyebileceği düşünülmektedir¹³⁹. Nörokimyasal kanıtlar presinaptik nikotinik ACh reseptörlerinin aktivasyonunun ACh, GABA ve glutamat gibi nörotransmitterlerin salıverilmelerini artırdığını göstermektedir¹³⁹. Kolinerjik modülasyondaki değişikliklerin epileptik temporal

kortekste nöbetleri tetikleyebileceği belirtilmiştir¹⁴⁰. Ayrıca kolinerjik baskılama sonrasında, nöbet hassasiyetinin ve hipokampal nöbet aktivitesinin de bildirilmiştir^{141,142}.

‘Pacemaker’ hücreler tam olarak bilinmeyen nedenlerle, artmış uyarılma ve anormal ateşlenme özelliği gösterirler, çevresindeki hücreleri de bu ateşlenmeye ortak edebilirler. Epileptojenik odak olarak adlandırılan bölgelerde ‘pacemaker’ hücreler yer almaktadır. Epilepsili hastaların beyinlerinde genellikle hipokampus piramidal hücrelerin CA nöronlarının ‘pacemaker’ merkezler olabileceği kabul edilmektedir¹⁴³.

2.1.8. İlaç Tedavisi

Antiepileptik ilaçlar (AEİ) epileptogenez süresince beyinde oluşan kronik hipereksitabilite üzerine etkilidirler. Bununla birlikte patolojik hücreler üzerinde inhibisyonu artırarak epileptik nöbetin ortaya çıkmasını önlerler. Bu nedenle AEİ tedavisi yalnızca semptomatik olmakta, hastalığın kendisini tedavi etmemektedir¹⁴⁴. AEİ tedavisinde monoterapi ile hastaların yaklaşık %60’ı nöbetsiz hale getirilebilir¹⁴⁵. Hastaların %30-40’ında monoterapi ile nöbet kontrolü sağlanamaz ve kombinasyon tedavisi gerekir^{146,147}.

AEİ’lerin başlıca etki mekanizmaları beş ana grupta toplanabilir:

1-Nöron membranında yer alan voltaja bağlı Na^+ kanallarını bloke ederek, yüksek frekanslı tekrarlayıcı aksiyon potansiyellerinin ateşlenmesini engellerler: karbamazepin, fenitoin, lamotrigin, okskarbazepin, valproat^{148,149}.

2- GABA’ya bağımlı inhibisyonu allosterik yolla arttırırlar: fenobarbital,

benzodiazepin, topiramat^{148,149}.

3- T-tipi kalsiyum kanallarını bloke ederek nöbeti engellediği düşünölen: etosüksimid^{148,149}.

4- GABA transaminaz inhibisyonu yapan: vigabatrin^{148,149}.

5- Eksitatör aminoasit olan glutamatın reseptörünü bloke ederek ya da bizzat glutamatın salıverilmesini inhibe ederek etki edenler: topiramat, lamotirigin^{148,149}.

2.1.9. Deneyisel Epilepsi Modelleri

Günümüze kadar geliştirilmiş birçok epilepsi modeli bulunmaktadır^{109,150}. Epilepsi modellerinin hiçbirisinin tam olarak klinik epilepsiyi yansıtmaması ve her nöbet için farklı bir model gerekmesinden dolayı çok sayıda model geliştirilmiştir. İdeal epilepsi modeli kolay ve etkili olarak üretilebilmeli (düşük ölüm oranı, yüksek oranda spontan nöbetli hayvan), epilepsinin davranışsal, elektrografik ve anatomik karakteristiklerine sahip olabilmelidir⁷¹. Hayvan epilepsi modelleri, nöbet hakkındaki soruların açıklanması, beynin elektriksel aktivitesinin hücresel ve moleküler boyutta incelenmesi, tedavi edici yöntem ve ilaçların denenip geliştirilebilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁵¹.

‘Kindling’, kimyasal ya da elektriksel uyaranların tekrarlı uygulanmasıyla konvülsiyon aktivitesinin oluşturulmasıdır. Epilepsi ve epileptogenezin deneyisel modelini oluşturur^{152,153}. Kimyasal uyaran olarak pentilentetrazol, kainik asit, pikrotoksin, pilokarpin, penisilin kullanılabilir. Elektriksel uyarıyla kompleks parsiyel nöbet modeli oluşturulurken, pentilentetrazol ile uygulanan doza bağımlı

olarak farklı nöbet tipleri oluşturulabilmektedir. Yüksek ve tek doz uygulanan kimyasal uyaranlarla da SE modeli elde edilebilmektedir^{154,155,156,157}.

2.1.9.1. Lityum-Pilokarpin Modeli

Pilokarpin, bir muskarinik asetilkolin reseptör agonistidir. Pilokarpin modeli ilk olarak sıçanlarda limbik nöbet oluşturmak için kullanılmıştır^{158,159}. Literatürde pilokarpin uygulamasıyla SE oluşturulması hakkında çeşitli protokoller kapsamlı olarak değerlendirilmiştir^{107,108,160}. Sistemik uygulama ile yetişkin sıçanlarda SE başlatmak için gerekli olan pilokarpin dozu i.p. 300-400 mg/kg'dır^{161,162,163}. Düşük pilokarpin dozları (100-200 mg/kg) nadiren kısa limbik nöbetlere neden olabilmesine rağmen SE oluşturamamaktadır¹⁵⁹. SE oluşturabilmek için uygulanan pilokarpin dozu nöbet gelişimini, hayatta kalmayı ve nöropatolojiyi önemli ölçüde etkilemektedir. SE oluşturmak için kullanılan yüksek doz pilokarpin aynı zamanda yüksek ölüm oranına sebep olmaktadır, bunun sebebi uygulanan yüksek dozun hayvanlarda daha güçlü konvülsif nöbet ve beyin hasarı oluşturması olabilir^{161,162}.

Pilokarpin uygulamasından sonra SE'un başlamasında kolinerjik sistem etkili olmaktadır¹⁵⁸. Karbakol ve oksotremorin gibi diğer kolinomimetikler de nöbet indükleyebilmekte ve nöbetle indüklenmiş beyin hasarı yapabilmektedir^{158,164}. Daha sonraki çalışmalarda pilokarpinin SE oluşturmasının M₁ muskarinik reseptörlere bağımlı olduğu gösterilmiştir. Muskarinik M₁ reseptör 'knock-out' farelerde pilokarpin uygulaması nöbet oluşturmamaktadır¹⁶⁵. Ayrıca epileptik

aktivite pirenzepin (M_1 selektif antagonist) tarafından bloke edilebildiği gösterilmiştir¹⁶⁶.

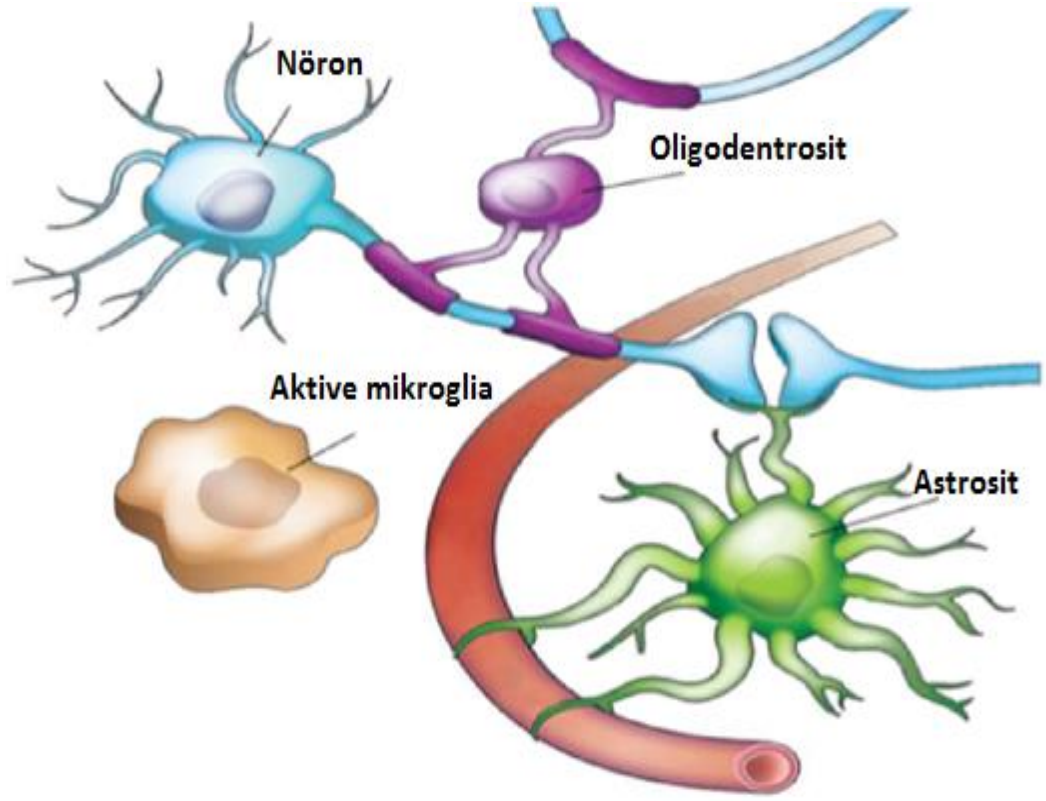
Hipokampal nöron kültürlerinde yapılan deneylerde muskarinik reseptörleri etkileyen pilokarpinin, eksitatör ve inhibitör transmisyonunda dengesizliğe yol açarak SE oluşturduğu gösterilmiştir¹⁶⁷. Ayrıca pilokarpin ile oluşan nöbetten sonra hipokampusta glutamat seviyelerinin yükseldiği de *in-vivo* mikrodializ çalışması ile gösterilmiştir^{168,169}. Sıçanlarda pilokarpinden önce i.p. lityum (127 mg/kg i.p.) uygulanması pilokarpin dozunu yaklaşık on kat azaltma olanağını sağlamıştır¹⁷⁰. Bu uygulama ile ölüm oranının düştüğü gösterilmiştir^{161,171}. Ne lityum (127 mg/kg i.p.) ne de pilokarpin (30 mg/kg i.p.) tek başlarına uygulandıklarında anormal EEG cevaplarına neden olurlar^{161,171}. Önceden lityum uygulanması yalnızca pilokarpinin 24 saat içinde uygulanması durumunda etkilidir. Eğer pilokarpin 24 saatten sonra uygulanırsa lityumun prokonvülsif etkisi daha az etkili olur. Pilokarpinin 48 saatten sonra uygulanması ise nöbet oluşturmaz¹⁶¹. Sıçanlarda lityum-pilokarpin ve pilokarpin modelleri benzer davranışsal, nöropatolojik ve EEG değişiklikleri oluşturmaktadır¹⁶¹. Lityum-pilokarpin modeli ilaveten modifiye edilmiştir; lityum uygulanan sıçanlara tek doz 30 mg/kg pilokarpin uygulandığında ölüm oranı %45 iken, 10 mg/kg pilokarpinin SE oluşana kadar 30 dakikalık aralıklarla uygulanması ölüm oranını 7%'ye düşürmüştür¹⁷³. Düşük ölüm oranı pilokarpinin titre edilerek uygulanmasına dayanmaktadır; sıçanların pilokarpinin konvülsif etkisine karşı bireysel farklılıkları titrasyon ile daha uygun hale gelmektedir. Lityum-pilokarpin modeli

ile titrasyonlu lityum-pilokarpin modeli arasında SE oluşturma bakımından anlamlı bir fark bulunmamaktadır¹⁷³.

Epilepsinin altında yatan hücresel olaylarda ACh işlevinin önemli olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir¹⁷⁴. Kolinerjik sistemin nöbet aktivitesini tetiklediği ve direkt eksitotoksik potansiyele sahip olmamasına rağmen, glutamat ve aspartat gibi nöronal hasar yapabilen eksitotoksik mekanizmaları uyararak nöbet aktivitesinin sürdürülmesinde rol oynamaktadır^{161,175,176}. Pilokarpinin sıçanlarda statusa dönüşen nöbetlere yol açtığı gösterilmiştir¹⁵⁸.

2.2. Glial Hücreler

SSS çeşitli hücrelerden oluşmuştur. Bunlar uyarılabilir nöronlar ve uyarılamaz glia hücreleri olarak iki ana gruba ayrılır. Nöronlar beyindeki toplam hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur¹⁷⁷. Geriye kalan glia hücreleri beyin gelişimi ve devamlılığı için önemli rol oynarlar^{178,179,180,181}. Yapısal destek, nöronların yalıtımı, immun sürveyans, metabolik destek ve gelişimin yönlendirilmesi gibi bir dizi önemli görevi yerine getirirler^{178,179,180,181,182}. Glial hücreler kendi aralarında mikrogia ve makrogia olarak sınıflandırılabilir. Mikroglialar beyin immun kompetan hücreleri iken makrogia hücreleri oligodendrositler, astrositler ve ependimal hücreler olarak gruplandırılmaktadır¹⁸⁰. Oligodendrositler nöron aksonlarının miyelin kılıflarını yaparken(183) ependimal hücreler beyin ventriküllerinin duvarını oluştururlar. Astrositlerin ise çeşitli yapısal ve metabolik fonksiyonları vardır^{177,184}.



Şekil 3. Beyin hücrelerinin şematik resmi²⁹¹

2.2.1. Mikrogliia

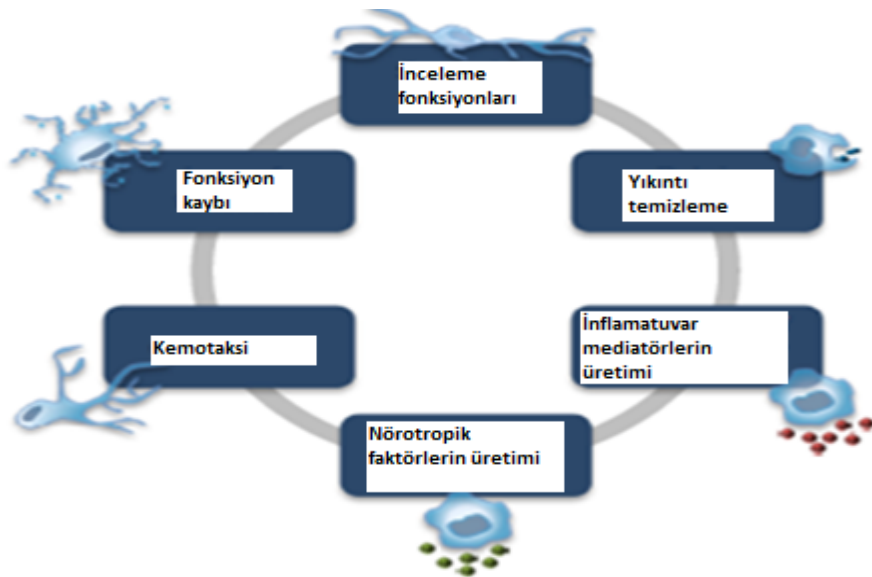
Beynin immun kompetan hücreleri olan mikroglialar ilk olarak 1932’de del Rio-Hortega tarafından tanımlanmıştır¹⁸⁰. Mikroglialar periferik makrofajların birçok özelliğine sahip olmalarına rağmen elektrofizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile farklıdır¹⁸⁵. Mikroglialar nörotropik faktörler ve anti-inflamatuvar sitokinleri salıvererek sinaptik plastisiteyi desteklerler^{180,186,187}. Beyin hasarı ya da immünolojik uyarılar ile aktif hale gelerek pro-inflamatuvar proteinler ve reaktif oksijen türlerini (ROS) sentez eder ve nöronal hasara yol açabilirler^{188,189,190}.

Sağlıklı beyinde mikrogliaların dallanmış morfolojide ‘dinlenme’ durumunda olduğu bildirilmiştir. Fakat bu ‘dinlenmekte’ olarak tanımlanmış mikroglialar

inaktif değildir ve sürekli olarak yakın çevrelerini izlemektedirler¹⁸⁰. Mikrogliaların membranları ekstrasellüler alandaki cisimleri ve parçacıkları algılayabilen ve sınıflandırabilen çeşitli reseptörlerle donatılmıştır¹⁸⁰. Aktive edilen reseptörün tipine göre farklı sinyal yolları ile cevap verirler. Mikrogliaların uyaranlara tepkisi aktivasyon olarak tanımlanır ve aktivasyonun derecesi normal cevaptan, nörotoksik aşırı aktivasyona kadar değişkenlik gösterebilir^{180,189}. Aktive olduklarında dallanmış morfolojiden amibimsi morfolojiye geçerek motilite ve fagositoz yapabilme özellikleri kazanırlar¹⁸⁹. Apoptotik hücreleri ya da hücre kalıntılarını fosfolipidlerin reseptörleri ile tanırlar ve bunları fagosite ederken eşzamanlı olarak TNF- β gibi anti-inflamatuvar sitokinleri salıverirler¹⁹¹. Bu işlem yararlı olan ölçülü aktivasyon olarak sınıflandırılabilir. Diğer yandan birçok patojen ‘*toll like*’ reseptörleri tetikleyerek TNF- α , IL-1 β , NO ve ROS gibi proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesine neden olurlar^{189,191}. Mikrogliaların regülasyonunda diğer bir yol da sürekli olarak çevresel hücrelerden gelen ve normal nöronal aktivite bilgisini ileten yatıştırıcı sinyallerdir. Çevresel hücrelerden salıverilen nörotransmitterler ya da proteinler mikroglialardaki uygun reseptörlerine bağlanarak mikrogliaların aktivasyonunu inhibe ederler^{7,189,192,193}. Nöronal bütünlükteki herhangi bir bozulma bu yatıştırıcı sinyallerde aksamaya neden olur ve mikroglia aktivasyonu meydana gelir⁷. Bu özellikleri, mikrogliaların herhangi bir kargaşada spesifik reseptörlerin aktivasyonuna gerek kalmadan tepki verebilmelerini sağlar^{7,180}.

Strese maruz kalındığında ya da diğer hücrelerden hasar sinyalleri algıladıklarında mikroglialar akut olarak aktive olur ve profilerasyona uğrarlar.

Ayrıca bu bölgelere göç ederek anti-inflamatuvar sitokinleri ve anti-inflamatuvar kemokinleri salıvererek nöroprotektif etkiye neden olurlar¹⁹⁴. Eğer mikroglialar tarafından sağlanan destek yeterli olmazsa ve hasarlı hücreler kurtarılamazsa mikroglialar fagositoz ile kalıntıları temizlerler¹⁹⁴. Eğer hasarlı hücrelerden aktive edici sinyaller devamlı olarak salıverilirse mikroglialar kronik olarak aktif hale gelirler. Bu aşırı aktivasyon durumunda mikroglialar TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar maddelerle birlikte çevresel nöronlara hasar verebilecek ROS ve NO gibi maddeleri de devamlı olarak üretilip salıverirler^{189,194}. Uzun süreli aşırı aktivasyon mikroglialarda yaşlanmaya neden olur ve arkasından mikroglial dejenerasyon gelişir¹⁹⁴. Bu özelliklerinden dolayı mikrogliaların birçok nörodejeneratif hastalıkta nedensel ve yaygınlaştırıcı rolleri vardır¹⁸⁹. Parkinson ve Alzheimer^{193,195,196}, Multipl Skleroz (MS) ve İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (HIV)'nın neden olduğu hastalıklara eşlik eden nörokognitif bozukluk^{188,193} yanında felç gibi durumlarda da rol oynarlar¹⁹⁷.



Şekil 4. Mikrogliaların fonksiyonel rolleri²⁹²

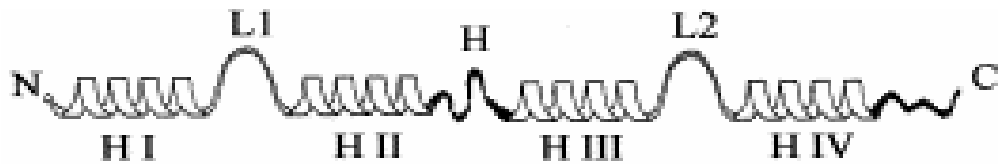
Kimyasallar ve elektriksel uyarılarla tetiklenen nöbetlerde beyinde glial hücrelerin zengin sitokin kaynağına dönüştüğü bilinmektedir^{117,118}. Epileptojenik süreçlerde beyinde glial hücrelerin inatçı bir şekilde aktive olduğu bildirilmiştir^{3,199}. Beynin yerleşik immun hücreleri olan mikroglialar deneysel epilepsi modellerindeki inflamatuvar süreçlerde de etkilidir^{197,198}. Çeşitli *in vitro* çalışmalarda glutamat, NMDA, kainik asit gibi eksitotoksinlerin mikroglial aktivasyonu ve proliferasyonu indüklediği bildirilmiştir^{200,201}. Mikroglial aktivasyon yüksek miktarda salıverilen IL-1 β ve TNF- α ile ilişkilendirilmiştir¹⁹⁸. Kainik asit, pilokarpin ya da elektriksel uyarı ile oluşturulan epilepsi modellerinde mikroglial aktivasyonun SE'den sonraki ilk 24 saatte ortaya çıktığı gösterilmiştir^{202,203,204}. Klinik kanıtlar epileptojenik beyin bölgelerinde kronik mikroglial aktivasyon olduğunu göstermektedir²⁰⁵. Mikroglial aktivasyonun seviyesi ile nöbetlerin sıklığı ve süresi arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur^{206,207}. Kemirgenlerde yapılan çalışmalar aktive olmuş mikrogliaların nöromodülatör özellikleri ve proinflamatuvar molekülleri salıvermeleri ile nöbet eşiğini düşürdüğünü göstermiştir¹⁹⁸.

2.3. S100 Proteinleri

S100 proteinleri Ca²⁺ modüle eden proteinlerden EF-el tipi multijenik bir protein ailesidir. İntraselüler ve ekstraselüler birçok düzenleyici aktivitesi vardır²⁰⁸. İlk olarak sığır beyninden saflaştırılan bu protein ailesi nötral pH'da amonyum sülfat solüsyonunda %100 çözünebilir olmasından dolayı S100 olarak isimlendirilmiştir²⁰⁹. S100 ailesindeki proteinler birçok efektör proteinle

etkileşime girerek enzim aktivitelerini düzenler, hücre iskeletinin yapısal dinamiklerini etkiler, hücre büyümesini-farklılaşmasını, motiliteyi ve hücre döngüsünü düzenler. Bunlarla birlikte Ca^{2+} hemostazını da sağlar²¹⁰. Ekstraselüler S100 proteinleri inflamatuvar hücrelerde, nöronlarda, astrositlerde, mikrogliyalarda, endotelial ve epitelyal hücrelerde regülatör etkilidir. RAGE (İleri glikasyon son ürünleri için reseptör), S100B ve S100A12 proteinlerinin inflamatuvar hücrelerde ve nöronlardaki etkisini artırıcı potansiyel bir reseptör olarak tanımlanmıştır²¹⁰. Bunun yanında, S100 proteinleri ile etkileşebilen başka hücre yüzey molekülleri de bulunmuştur. Sonuç olarak S100 proteinleri çeşitli hücrel aktivitelele düzenlenmesinde rol alan çok fonksiyonlu proteinlerdir^{208,211}.

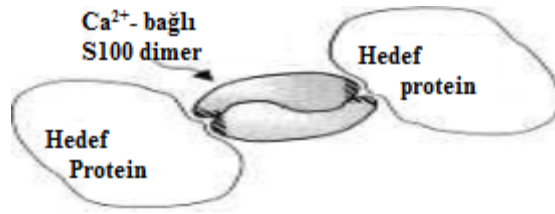
S100 proteinleri hücrelerde dimerler şeklinde bulunurlar ve iki tane Ca^{2+} bağlama bölgeleri vardır. Kalsiyum, C terminal bölgesine daha yüksek afinite ile bağlanırken N terminal bölgesine olan afinitesi daha azdır²¹².



Şekil 5. S100 proteininin sekonder yapısı, L1-L2 kalsiyum bağlama bölgeleri, tersiyer yapıda katlanacak olan heliksler²¹²

Bazı S100 protein ailesi üyeleri Ca^{2+} yanında Zn^{2+} da bağlarlar^{213,214}. Ayrıca S100B ve S100A5 Cu^{2+} bağlama özelliğine de sahiptir^{215,216}. Hücre içerisinde, S100 protein dimerleri, iki monomer şeklinde non-kovalent bağlı olarak bulunurlar²¹⁷. S100 proteinlerinin dimerizasyonu, biyolojik aktivitelerini göstermeleri bakımından önemlidir. Ca^{2+} bağlandığında heliks yapısı değişir^{218,219}.

Her bir S100 monomerinin Ca^{2+} bağlama bölgesi hedef protein için bağlama bölgesi barındırır ve S100 dimerleri hedef proteinleri bağlayabilir. S100 proteinlerine bu hedef proteinlerin bağlanması S100 proteininde güçlü bir indirgenme meydana getirir. Bu durum helikslerin yapısal değişimlerinden kaynaklanır^{214,220}.



Şekil 6. S100 proteini ve hedef protein²¹²

S100 proteinlerinin hedef proteinlerinin bazıları keşfedilmişken diğer fonksiyonel proteinlerle *in vivo* etkileşimleri halen araştırılmaktadır²¹⁴.

14 tane S100 geni kromozomal anomalilerin bir kısmının meydana geldiği insan 1q21 kromozomunda bir gen kümesi olarak bulunmuştur¹³. Bu durum bazı S100 proteinlerinin düzensiz salıverilmesi ile neoplaziler arasında ilişki olabileceğini düşündürmüştür¹³. Son zamanlarda akut inflamatuvar lezyonlar, kardiyomiyopati, Alzheimer ve nörodejeneratif hastalıkları da içeren hastalıklarla ilişkisi, dikkatleri bu protein ailesinin üzerine çekmiştir. Hastaların sağ kalımı, sonuçları ve klinik tedavinin tahmini belirteci olarak bu hastalıkların tanısında önemli oldukları bildirilmiştir¹³.

2.3.1. S100B

SSS'de S100 protein ailesinden en fazla S100B bulunmaktadır, insan beynindeki toplam S100 proteinlerinin %96'sı S100B'dir²²¹. S100B hücre içinde

bir Ca^{2+} reseptörü, hücre dışında ise bir nöropeptit gibi fonksiyon gösterir^{222,223}. S100B astrositler tarafından üretilip salıverilir ve nöronlar ve glial hücreler üzerinde otokrin ve parakrin etkiler gösterir^{23,224,225}. Hücre içinde hücre proliferasyonunu ve migrasyonu stimule ederken apoptozis ve farklılaşmayı inhibe eder. Bu durum beyin gelişimi ve onarımı için önemlidir²²⁶. Bazı enzimlerin regülasyonunda da işlev görür. Beyin hasarı ve nörodejeneratif hastalıklarda ise astrositleri aktive eder²²⁶. S100B hücre içi sinyal iletimini, hücreler arası iletişimi, enerji metabolizmasını ve hücre büyümesini düzenler²²⁷. Bunlarla birlikte astrositlerdeki Ca^{2+} hemeostazının regülasyonu diğer bir önemli hücre içi fonksiyonudur²²⁸.

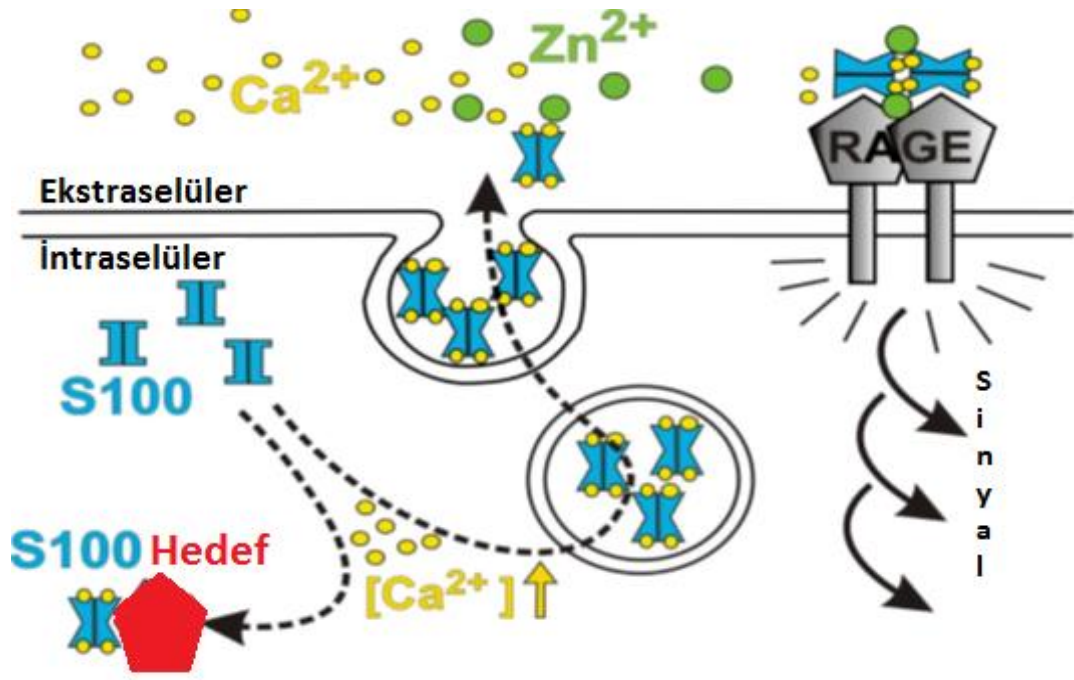
Hücre içi Ca^{2+} ile Zn^{2+} konsantrasyonlarındaki artış glial hücrelerden veziküler transport ile S100B'nin ekstraselüler ortama salıverilmesine neden olur. S100B, ekstraselüler ortamda sitokin benzeri fonksiyonlar gösterir²²⁹. Bu fonksiyonları çok güçlü bir şekilde konsantrasyon bağımlıdır; nanomolar seviyelerde nöroprotektif bir fonksiyon göstererek nöral sağ kalımı, dentrit ve aksonları stimule ederek destekler. Fakat mikromolar konsantrasyonlarda nöronal apoptozisi indükler, pro-inflamatuvar sitokinleri ve strese bağlı inflamatuvar enzimleri aktive eder^{230,231,232}. S100B'nin hücre dışı aktiviteleri nöronlar, astrositler, mikroglialar, makrofajlar ve diğer hücreler üzerine etkilidir²²⁸.

Ekstraselüler yüksek S100B konsantrasyonları Alzheimer, MS, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), şizofreni, epilepsi ve travmatik beyin hasarı gibi çeşitli nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir^{222,223,233}. Doz-bağımlı olarak nörotropik

veya nörotoksik etki gösterir. Bu etkiler beyinde RAGE vasıtasıyla gerçekleşir^{25,231,234}.

S100B, nörotoksik etkisini apoptozu indükleyerek oluşturur^{235,236}. S100B'nin mikromolar konsantrasyonları RAGE ile etkileşime girerek ROS'ların artmasına yol açar. Buna bağlı olarak da sitokrom-C salıverilmesi gerçekleşir ve kaspaz kaskadını indükleyerek apoptotik nöronal hücre ölümüne neden olur²⁵. L-tipi Ca^{2+} kanallarının geçirgenliğini arttırarak ve bir dizi apoptoz genini (c-fos, c-jun, bax, bcl-x) 'up-regüle' ederek de apoptozu indükler^{236,237}.

S100B'nin mikromolar konsantrasyonları mikroglia hücre kültüründe NO salıverilmesinin stimülasyonunda LipitA ve İF- γ ile birlikte çalışır. Bu bulgular S100B'nin mikroglialarla aktive olan nörodejenerasyon ve inflamatuvar beyin hastalıklarındaki nöropatolojik değişikliklerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir²³⁸.



Şekil 7. S100B'nin intraselüler ve ekstraselüler fonksiyonları²⁹³

Normal S100B seviyelerinin epileptojenezi zayıflatığı, yüksek S100B konsantrasyonları ile temporal lob epilepsisinin şiddeti arasında ise bir ilişkinin bulunduğu bildirilmiştir^{239,240}. İnatçı temporal lob epilepsisi bulunan hastaların cerrahi sonrasında neokorteks kesitlerinde S100B immünoaktif astrositlerin üç kat arttığı bildirilmiş ve S100B'nin epilepsi patofizyolojisinde rolü olabileceği düşünülmüştür²⁴¹. Sıçanlarda gelişim sırasında lityum-pilokarpin ile indüklenen SE ile uzun süren davranışsal anormalliklerin beyin omurilik sıvısında yükselen S100B seviyeleri ile ilişkili olabileceği de bildirilmiştir²⁴².

2.4. Glukagon Benzeri Peptid-1

GLP-1, bağırsak L-hücrelerinde üretilen pre-pro-glukagon gen ürünü bir peptid olup serbest yağ asitleri ve karbonhidrat gibi besinlere cevap olarak salıverilen ana inkretin hormonudur²⁴³. Dolaşımdaki yarılanma ömrü sadece 1-2 dakikadır, hızlı bir şekilde dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) enzimi ile de-aktive edilir²⁴⁴.

GLP-1R pankreas, beyin, kalp, böbrek, mide ve gastrointestinal sistem gibi çeşitli doku ve organlarda bulunmuştur²⁴⁵. Bu doku ve organlarda çeşitli etkiler oluşturur²⁴⁶. Hormonun ana etkisi glisemik kontrol üzerinedir. İnsülin sentezini ve glukozla bağlı salıverilmesini artırır. Ayrıca glukagon sentezini ve mide boşalmasını inhibe eder²⁴⁷. GLP-1'in pankreas beta hücrelerinde proliferasyonu indüklediği ve insülin sensitivitesinin restorasyonunu sağladığı bulunmuştur^{248,249}. GLP-1 agonisti ekzentin ve liraglutid klinikte tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadır²⁵⁰. Etkisinin kan glukoz konsantrasyonuna bağımlı

olması insüline göre avantaj sağlar. GLP-1'in hipotalamusta tokluk ve iştah kontrolü üzerinde rolü olduğu ve diyabet hastalarında aterosklerozun başlama noktası olan endotelial disfonksiyonu azalttığı gösterilmiştir^{251,252}.

SSS'de nükleus tractus solitarinin kaudal kısmında küçük bir nöron popülasyonunda GLP-1 sentez edilir ve salıverilir²⁵³. Öğrenme ve bellek ile ilgili mekanizmalarda GLP-1'in rol oynadığına dair bazı kanıtlar vardır²⁵⁴. Sıçanlarda GLP-1'in intraserebroventriküler infüzyonu öğrenme ve bellek oluşumunu kolaylaştırmaktadır²⁵⁴. Fare modellerinde de öğrenme ve bellek üzerinde olumlu etkileri vardır³⁹. Bazı çalışmalarda GLP-1'in nöroprotektif rolünün olduğu bildirilmiştir. Sıçan hipokampus nöronlarında β -amiloid seviyelerini azalttığı ve glutamatla indüklenen apoptozise karşı koruma sağladığı gösterilmiştir^{41,255}. Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile oluşan eksitotoksik nöron ölümü GLP-1 ile engellenebilmiştir²⁵⁵. Ayrıca fare nöbet modellerinde görülen eksitotoksik beyin hasarına karşı koruyucu etkisi gözlenmiştir²⁵⁶. Parkinson modellerinde nörogenezi uyardığı ve sıçan diyabet modelinde bir DPP-IV inhibitörü olan vildagliptinin nöron degenerasyonuna karşı koruyucu olduğu belirtilmiştir^{257,258}. Nöronlarda oksidatif stres kaynaklı apoptozisi de engellediği gösterilmiştir²⁵⁹. Sıçan ve fare Alzheimer modellerinde GLP-1 analoglarının sinaptik plastisiteyi korumada ve uzun süreli potansiyalizasyon (LTP)'un gelişmesinde olumlu etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir^{260,261}. Bu veriler nedeni ile GLP-1 nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için umut verici bir ajan olarak görülmektedir.

2.5. Liraglutid

Liraglutid GLP-1'in sentetik analogudur ve GLP-1 ile % 97 homoloji göstermektedir^{52,53,54}. Tip 2 diyabet tedavisinde kan glukoz düzeyinin regülasyonu için kullanılmak üzere onay almıştır^{55,56,57,58}. GLP-1 ve liraglutidi de içeren GLP-1 analogları kan beyin bariyerini geçebilmekte, nöronal progenitor hücrelerde proliferasyona neden olmakta ve apoptozisi inhibe edebilmektedir^{59,60,61,62}. GLP-1R'ü beyinde başlıca korteks ve hipokampustaki piramidal nöronlar ve serebellumdaki purkinje nöronları gibi büyük nöronlarda eksprese edilir²⁶². Glia hücreleri inflamasyona cevap olarak aktive olmadığı sürece GLP-1R eksprese etmezler⁴⁶. Liraglutid nöron kültürlerinde apoptozisi azaltabilmekte, hücre bölünmesini artırabilmekte ve stres etkenlerine karşı koruyucu olabilmektedir²⁶³. Liraglutidin farelerde öğrenme ve belleği geliştirdiği, fare Alzheimer modelinde nörodejenerasyona karşı koruma sağladığı, nörogenezi indüklediği ve sinaptik kaybı azalttığı bildirilmiştir²⁶⁴.

Liraglutidin yarılanma ömrü 13 saattir günde tek doz olarak uygulanabilmektedir²⁶⁵. Subkutanöz enjeksiyonla uygulandığında yavaş olarak absorbe edilir ve maksimum plazma konsantrasyonuna 10-12 saatte ulaşır. Kan dolaşımına geçtiğinde serumda albümine bağlanır ve DPP-4 ile renal klerensin eliminasyon etkisinden korunur²⁶⁶. Bulantı ve kusma en sık görülen yan etkisidir.

Epileptik nöbetlerin de SSS'de nöronal hasara yol açtığı kanıtlanmış olmakla beraber GLP-1 veya analoglarının nöroprotektif etkisi bu alanda hiç incelenmemiştir.

2.6. GFAP

GFAP astroglialara özgü Tip III ara filament proteinidir. Ara filament proteinler, ökaryotlarda bulunan 8-10 nm’lik fibröz proteinlerdir; hücre iskeletinin oluşması, sitoplazmik alan organizasyonu, mitoz ve hücre hareketinin sağlanmasında rol oynar. Astrositin şekil ve mekanik dayanıklılığını sağlar²⁶⁷. GFAP çeşitli uyarılara yanıt olarak fosforile olur²⁶⁸. Hücre yapı ve hareketi, sinyal iletimi, mitoz, kan-beyin bariyerinin fonksiyonel olması gibi birçok hücresel olayda rolü vardır. Olgun hücrelerdeki GFAP fonksiyonları ‘*knock-out*’ fare çalışmaları ile ortaya konmuştur. Bu farelerde hipokampus ve spinal kordun beyaz maddesi oluşmaz. Ayrıca, astrosit fonksiyonları bozuktur, miyelinizasyon anormaldir ve kan-beyin bariyeri bozulmuştur²⁶⁹. Antisens RNA çalışmalarında GFAP içermeyen astrositlerin nöronlar ile bağlantı oluşturmadıkları saptanmıştır, ayrıca Purkinje hücre iletiminin devamlılığında önemli olduğu gösterilmiştir²⁷⁰. Glial hücre hasarına yol açan birçok durumda GFAP regülasyonu bozulur. Akut serebral hasar sonrası GFAP salıverilir ve hasarlı olan kan-beyin bariyerini geçerek dolaşıma ulaşır. İskemik inme sonrasında serum GFAP düzeyleri yükselir, bu artış beyindeki infarkt alanı ile paralellik gösterir²⁷¹. İntraserebral kanama sonrası serum GFAP düzeyi hızla artar²⁷². Subaraknoid kanama sonrası akut dönemde serum GFAP konsantrasyonu ile beyin hasarının şiddeti arasında korelasyon saptanmıştır²⁷³. Astroglial tümörlerde serum GFAP’nin yükseldiği bildirilmiştir²⁷⁴. GFAP fokal beyin hasarının uzun süreli izlemi ve prognoz tayininde önemlidir²⁷⁵. Literatürde GFAP’ın epilepside yükseldiğini rapor eden çalışmalar mevcuttur^{3,6,107}.

2.7. OX-42

OX-42, mikrogliaların CD11b'lerine karşı bir antikordur²⁷⁶. OX-42 antikorları CD11b olarak da bilinen ve bir yüzey molekülü olan kompleman 3 reseptörünün ekspresyonundaki “*upregülasyonu*” tespit edebilmektedir. Bu molekül adezyon, migrasyon ve fagositoz ile ilişkilendirilmiştir²⁷⁷.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan 200-250 gram ağırlığında, 27 adet Spraque-Dawley ırkı, erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, laboratuvar ortamında 8 gün süresince 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde ve 20 ± 2 °C'lik sıcaklıkta tutuldular. Tüm sıçanların su ve besine serbest erişimi sağlandı.

SE grubunda lityum-pilokarpin ile SE indüklendi. Sıçanlara pilokarpin enjeksiyonundan 24 saat önce lityum klorür (127 mg/kg i.p.) uygulandı. Pilokarpin 30 dakika arayla (30 mg/kg i.p.) ve (10mg/kg i.p.) olarak iki doz uygulandı. Ayrıca pilokarpinden 30 dakika önce kolinerjik yan etkileri ortadan kaldırmak için sıçanlara metilskopolamin-bromür (1 mg/kg i.p.) verildi. SE oluşan sıçanlarda SE süresi diazepam (10 mg/kg i.p) ile kontrol altına alındı. SE+Liraglutid grubu için aynı deney protokolü liraglutid varlığında tekrarlandı.

Çalışmada kullanılan sıçanlar 4 gruba ayrıldı.

1- Kontrol grubu (n=6) : Bu gruptaki hayvanlara ilk yedi gün herhangi bir işlem uygulanmadı.

8. gün 0. Dakika: Tiyopental ile anestezi yapılan sıçanlardan intrakardiyak yoldan yaklaşık 5 ml kan alındı, 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilen kanların serumları alındı ve S100B tayini için -80 °C'de muhafaza edildi. Sakrifiye olan sıçanların hipokampusları çıkarılarak fiksatif solüsyona konuldu.

2- Sham grubu (n=6) :

1.gün 0. Dakika: Lityum klorür yerine çözücüsü olan SF (127 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 0. Dakika: Metilskopolamin-bromür (1 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 30. Dakika: Pilokarpin yerine çözücüsü olan SF (30 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 60. Dakika: Pilokarpin yerine çözücüsü olan SF (10 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 90. Dakika: Diazepam (10 mg/kg, i.p.) uygulandı.

3., 4., 5., 6., ve 7. günlerde herhangi bir işlem uygulanmadı.

8.gün 0. Dakika: Tiyopental ile anestezi yapılan sıçanlardan intrakardiyak yoldan yaklaşık 5 ml kan alındı, 10 dakika 2000 rpm’de santrifüj edilen kanların serumları alındı ve S100B tayini için -80 °C’de muhafaza edildi. Sakrifiye olan sıçanların hipokampusları çıkarılarak fiksatif solüsyona konuldu.

3- SE grubu (n=6):

1.gün 0. Dakika: Lityum klorür (127 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 0. Dakika: Metilskopolamin-bromür (1 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 30. Dakika: Pilokarpin (30 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 60. Dakika: İlk pilokarpin uygulamasından 30 dakika sonra (10 mg/kg, i.p.) dozunda ikinci bir pilokarpin dozu uygulandı.

2.gün 90. Dakika: Nöbetleri sonlandırmak için ilk pilokarpin dozundan 60 dakika sonra diazepam (10 mg/kg, i.p) uygulandı.

3., 4., 5., 6., ve 7. günlerde bütün sıçanlara ölüm oranını azaltmak için 09:⁰⁰-10:⁰⁰ ve 16:⁰⁰-17:⁰⁰ zaman dilimlerinde günde 2 defa 5 ml subkutan enjeksiyon ile SF ve gavaj ile yaklaşık 1 ml TPN solüsyonu verildi.

8.gün 0. Dakika: Tiyopental ile anestezi yapılan sıçanlardan intrakardiyak yolla yaklaşık 5 ml kan alındı ve 10 dakika 2000 rpm’de santrifüj edilerek serum elde edildi. S100B tayini için -80 °C’de muhafaza edildi. Sakrifiye olan sıçanların hipokampusları da çıkarılarak fiksatif solüsyona konuldu.

4- SE + Liraglutid grubu (n=6) :

1.gün 0. Dakika: Liraglutid (50 µg/kg, i.p.) uygulandı.

1.gün 60. Dakika: Lityum klorür (127 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 0. Dakika: Liraglutid (50 µg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 30. Dakika: Metilskopolamin-bromür (1 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 60. Dakika: Pilokarpin (30 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 90. Dakika: Pilokarpin (10 mg/kg, i.p.) uygulandı.

2.gün 120. Dakika: Nöbetleri sonlandırmak için ilk pilokarpin dozundan 60 dakika sonra diazepam (10 mg/kg, i.p.) uygulandı.

3., 4., 5., 6., ve 7. günlerde bütün sıçanlara tek doz liraglutid (50µgr/kg i.p.) uygulandı ve ölüm oranını azaltmak için 09:⁰⁰-10:⁰⁰ ve 16:⁰⁰-17:⁰⁰ zaman dilimlerinde günde 2 defa 5 ml subkutan enjeksiyon ile SF ve gavaj ile yaklaşık 1 ml TPN verildi.

8.gün 0. Dakika: Tiyopental ile anestezi yapılan sıçanlardan intrakardiyak yolla yaklaşık 5 ml kan alındı ve 10 dakika 2000 rpm’de santrifüj edilerek serum

elde edildi. S100B tayini için -80 °C’de muhafaza edildi. Sakrifiye olan sıçanların hipokampusları da çıkarılarak fiksatif solüsyona konuldu.

Bu grupta 2 ve 4 nolu sıçanlar, sırasıyla deneyin 3. ve 4. günlerinde öldü. Bu gruptaki deneyler 200-250 gram ağırlığında 2 adet Spraque-Dawley cinsi erkek sıçanlar temin edilerek tekrarlandı ve n=6’ya ulaşılmaya çalışıldı. Ancak 2 nolu sıçan deneyin 3. gününde öldü. 1 adet sıçan temin edilerek deneyler bir kez daha tekrarlandı ve n=6’ya ulaşıldı. 4 grup için toplam 27 sıçan kullanıldı. Bu grup için mortalite % 33.3 olarak hesap edildi. Diğer gruplarda ölüm gözlenmedi.

3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem

Kontrol, sham, SE ve SE + liraglutid gruplarına ait hipokampus örnekleri %10 tamponlu formalinde 72 saat tespit edildikten sonra ışık mikroskop doku takip yöntemine göre takip edilerek parafine gömüldü. Alınan 5 mikronluk seri kesitler histolojik inceleme için hematoksilen-eozinle boyandılar. Astrosit ve mikroglial hücre aktivasyonlarının saptanması için GFAP ve OX-42 immunohistokimyası yapıldı. Tüm örnekler Leica DM6000B ışık mikroskobunda değerlendirildi ve görüntüler DC 500 model Leica dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.2.1. İndirekt ABC Yöntemi

Kesitler indirekt ABC yöntemi ile boyandılar. 5 mikron kalınlığındaki parafin kesitler 60°C de etüvde bir saat deparafinize edildikten sonra 2X10 dakika ksilolde bekletildi. Dereceli alkol serilerinden (%96, %80, %70) geçirilerek

rehidrate edilen kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için %0.3' lük hidrojen peroksit solüsyonu ile nemli ve kapalı bir kutuda oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. EDTA tamponu kullanılarak düdüklü tencerede antijen açığa çıkarma işlemi uygulandı. PBS yıkama solüsyonu ile 3 kere 5' er dakika yıkanan kesitler IHC kitinin (Abcam Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit) Protein Block solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek protein blokajı yapıldı. Uygun şekilde dilüsyonu yapılmış primer antikorlar (Tablo 3) kesitlere damlatıldı ve nemli, kapalı bir kutuda 1 gece +4⁰C'de inkübasyon sonrasında PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı. IHC kiti sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-polyvalent) ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında PBS ile yıkandı. IHC kiti Streptavidin Peroxidaz'ı ile 10 dakika oda ısısında inkübasyon sonrasında PBS ile yıkandı. DAB kromojen damlatılan kesitler ışık mikroskopunda kontrol edilerek 5-10 dakika bekletildikten sonra, 45 saniye hematoxilen ile boyandılar. Dehidrate edilen kesitler ksilolde şeffaflandırıldıktan sonra entellan ile kapatıldılar.

Tablo 3. Kullanılan primer antikorların özellikleri ve seyreltme oranları

Antikor	Klon adı	Kaynak	İzotip	Seyreltme oranı
GFAP	Monoklonal	Abcam	Mouse IgG2b	1:250
OX-42 (Anti-CD11 b/c)	Monoklonal	Abcam	Mouse IgG2a	1:25

3.3. İstatistiksel Yöntem

Araştırma verisi “SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL)” aracılığıyla bilgisayar ortamında yüklenmiş ve değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler ortanca (minimum-maksimum) ile sunuldu. Üç ve daha fazla bağımsız grup arasındaki istatistiksel karşılaştırmada Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklarda farkın kaynağını saptamaya yönelik *post-hoc* bonferroni düzeltmesiyle yapılan ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U Testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon Testiyle değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

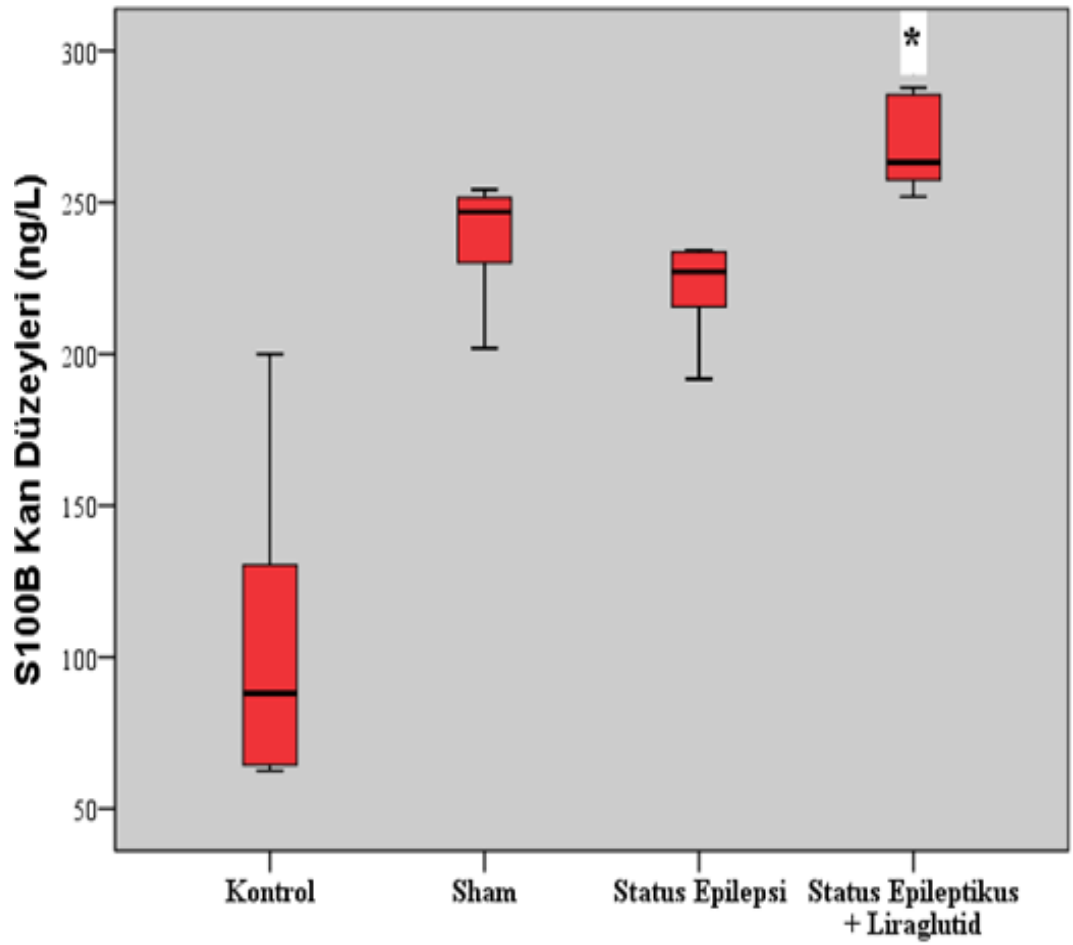
3.3.1. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için immunohistokimya yapılmış örneklerde GFAP immunoreaktivitesi gösteren çekirdekler ve uzantıları seçilen astrositler ile OX-42 immunoreaktivitesi gösteren çekirdekler ve uzantıları seçilen mikroglialar kör 2 histolog tarafından 40’lık mikroskop büyütmesinde 3 alanda sayıldı ortalama değerleri alındı. İmmunoreaktif hücreler DG ve CA1 bölgelerinde ayrı ayrı sayılarak değerlendirildiler.

4. BULGULAR

4.1.1 Çalışma Gruplarında S100B'nin Kan Düzeyleri

Çalışma grupları arasında kandaki S100B düzeyleri karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile SE + Liraglutid grubu arasında olduğu görüldü. SE + Liraglutid grubunun kan S100B düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,001$). (Şekil 8, Tablo 8.)

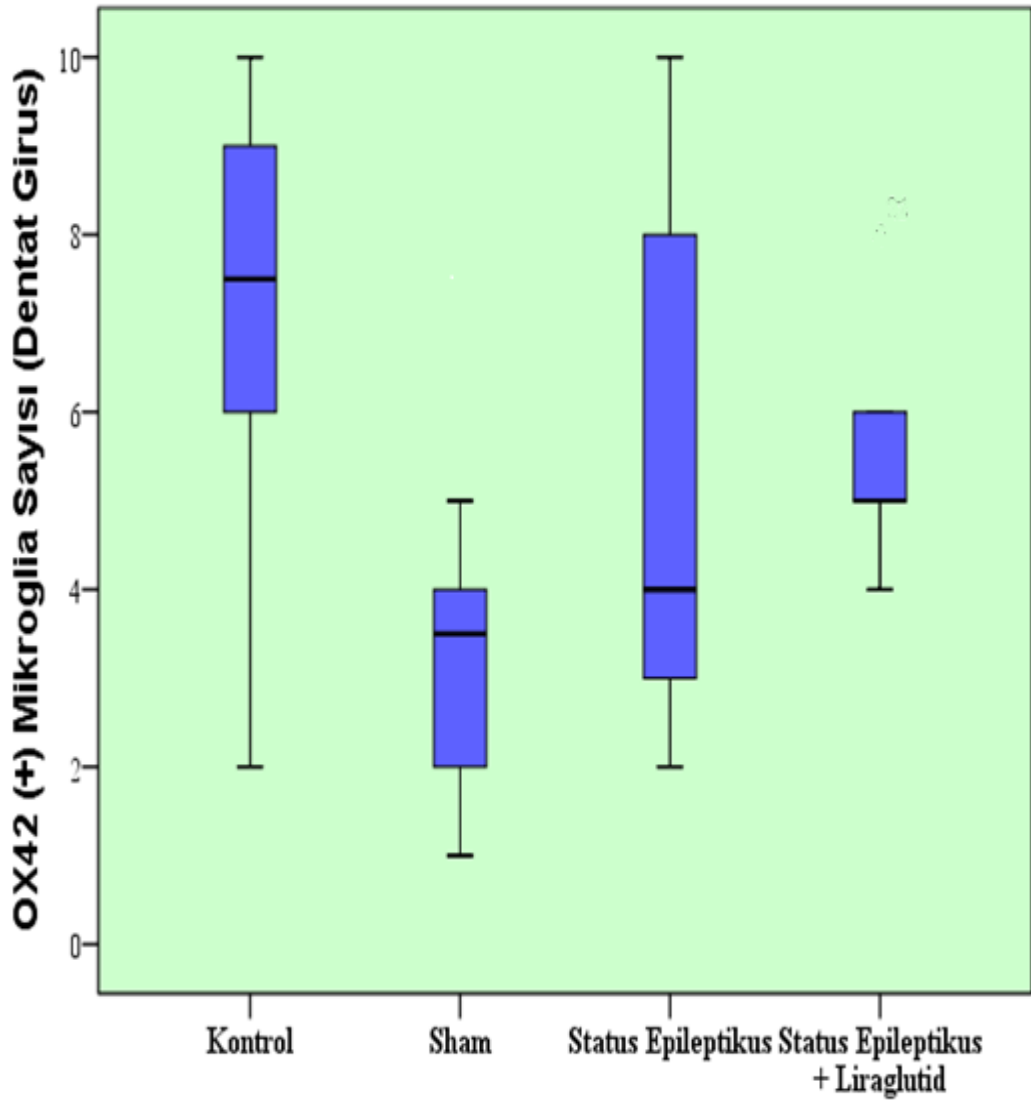


Şekil 8. Çalışma Gruplarında S100B'nin Kan Düzeyleri

*Kontrol grubu ile SE + Liraglutid grubu arasındaki fark, $p<0,001$

4.1.2. Çalışma Gruplarında DG'ta OX-42(+) Astrosit Sayıları

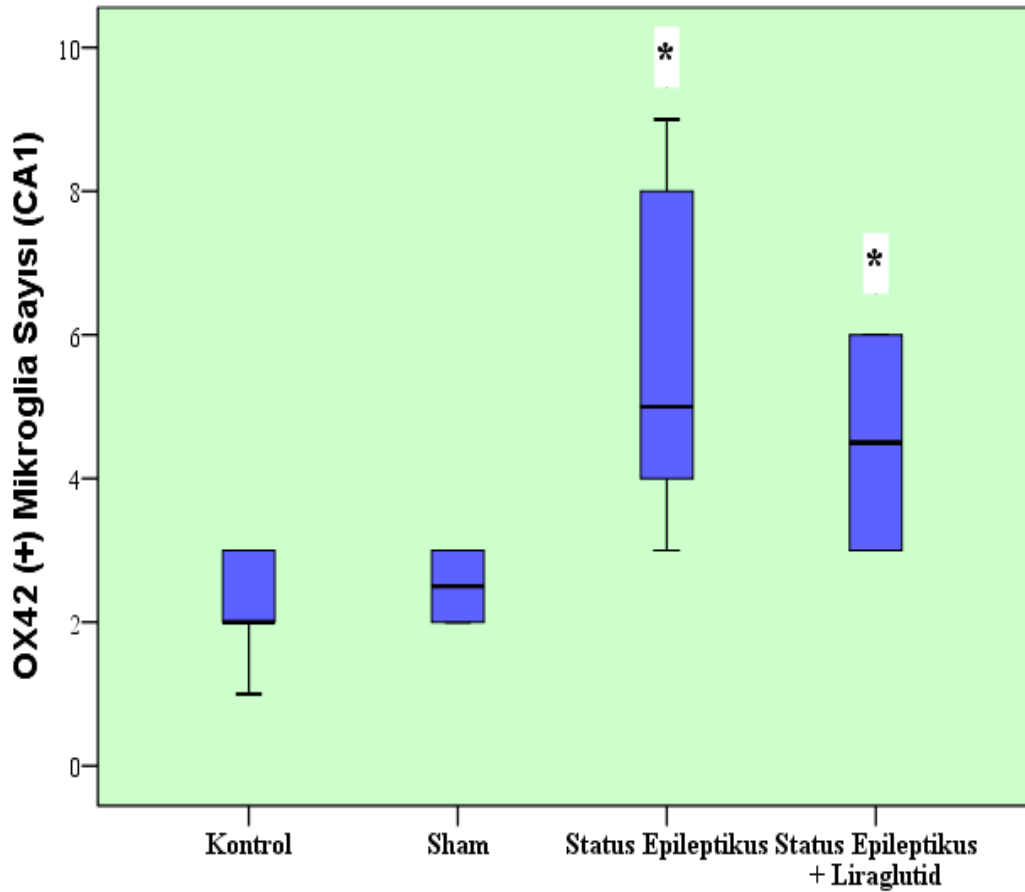
Çalışma grupları arasında DG'taki OX-42(+) astrosit sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 9).



Şekil 9. Çalışma Gruplarında DG'ta OX-42(+) Astrosit Sayıları

4.1.3. Çalışma Gruplarında CA1’de OX-42(+) Astrosit Sayıları

Çalışma grupları arasında CA1’de OX-42(+) mikroglia sayısı açısından istatistiksel karşılaştırma yapıldığında kontrol grubuyla SE grubu, kontrol grubuyla SE + Liraglutid grubu ve Sham grubuyla SE grubu arasında anlamlı fark olduğu saptandı ($p<0,001$). SE ve SE + Liraglutid grubunda CA1’deki OX-42(+) mikroglia sayısının Kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu. Ancak bu gruplar kendi arasında birbirinden farklı değildi ($p>0,01$) (Şekil 10).

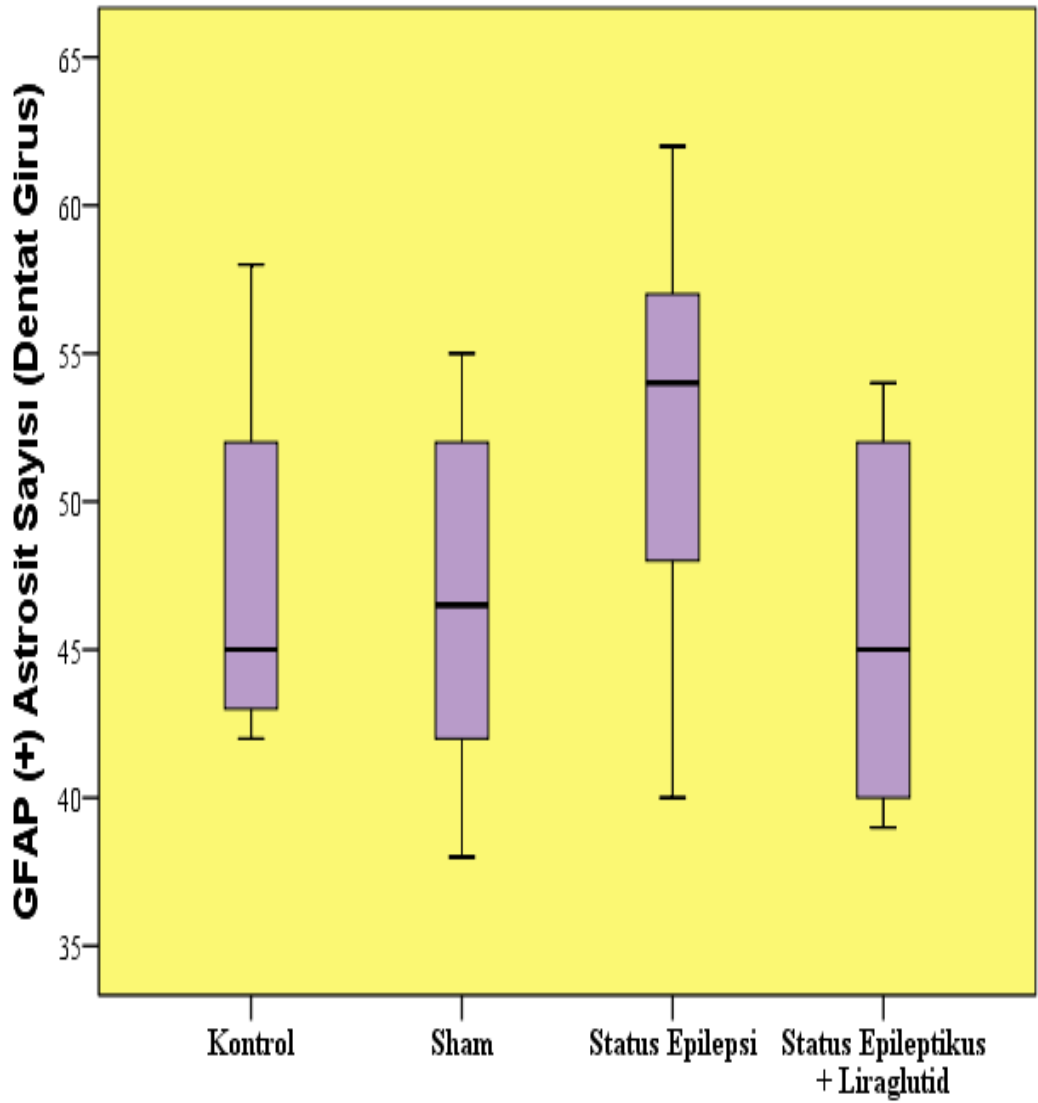


Şekil 10. Çalışma Gruplarında CA1’de OX-42(+) Astrosit Sayıları

*Kontrol grubu ile ve “SE” grubu ve “SE + Liraglutid” grubu arasındaki fark, $p<0,001$.

4.1.4 Çalışma Gruplarında DG'ta GFAP(+) Mikroglia Sayıları

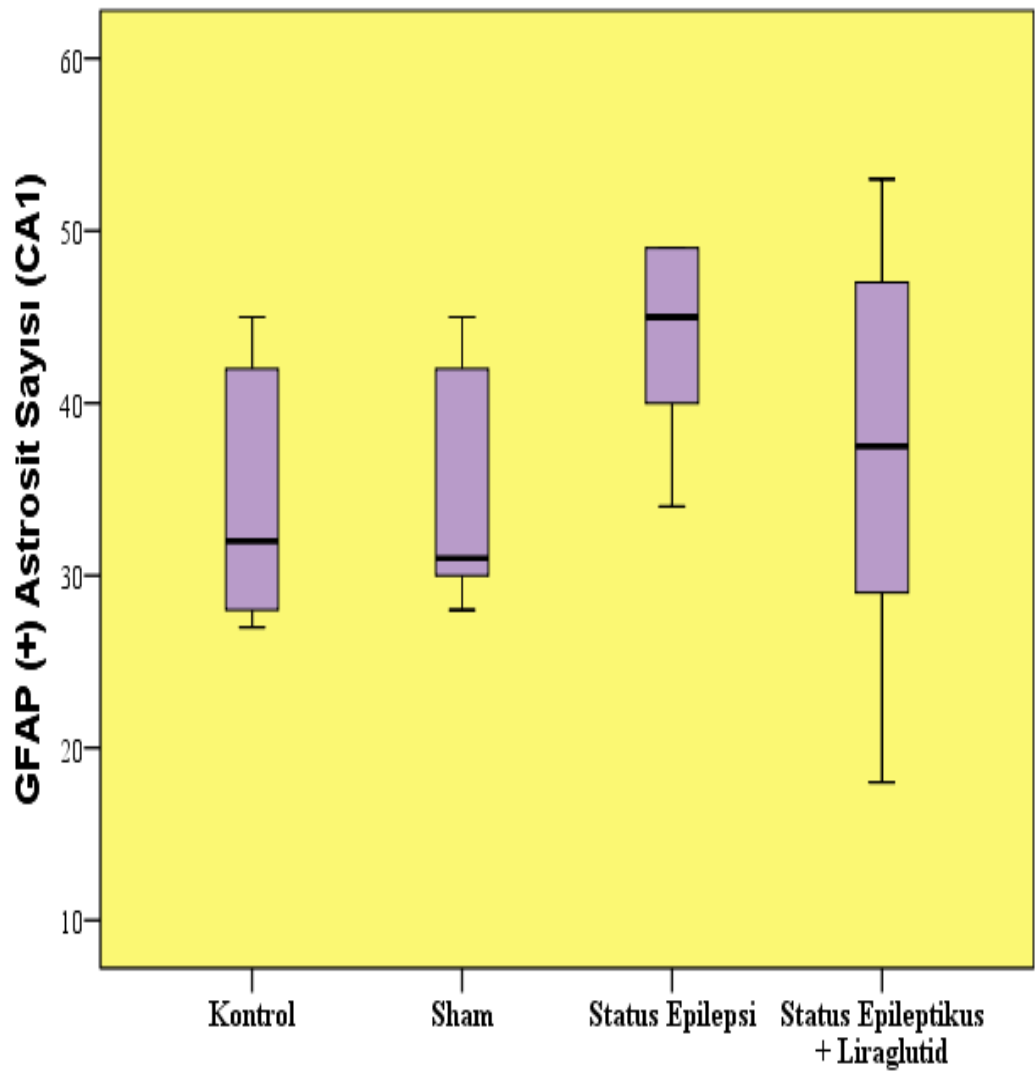
Çalışma grupları arasında DG'taki GFAP(+) mikroglia sayıları açısından istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 11).



Şekil 11. Çalışma Gruplarında DG'taki GFAP(+) Mikroglia Sayıları

4.1.5. Çalışma Gruplarında CA1'de GFAP(+) Mikroglia Sayıları

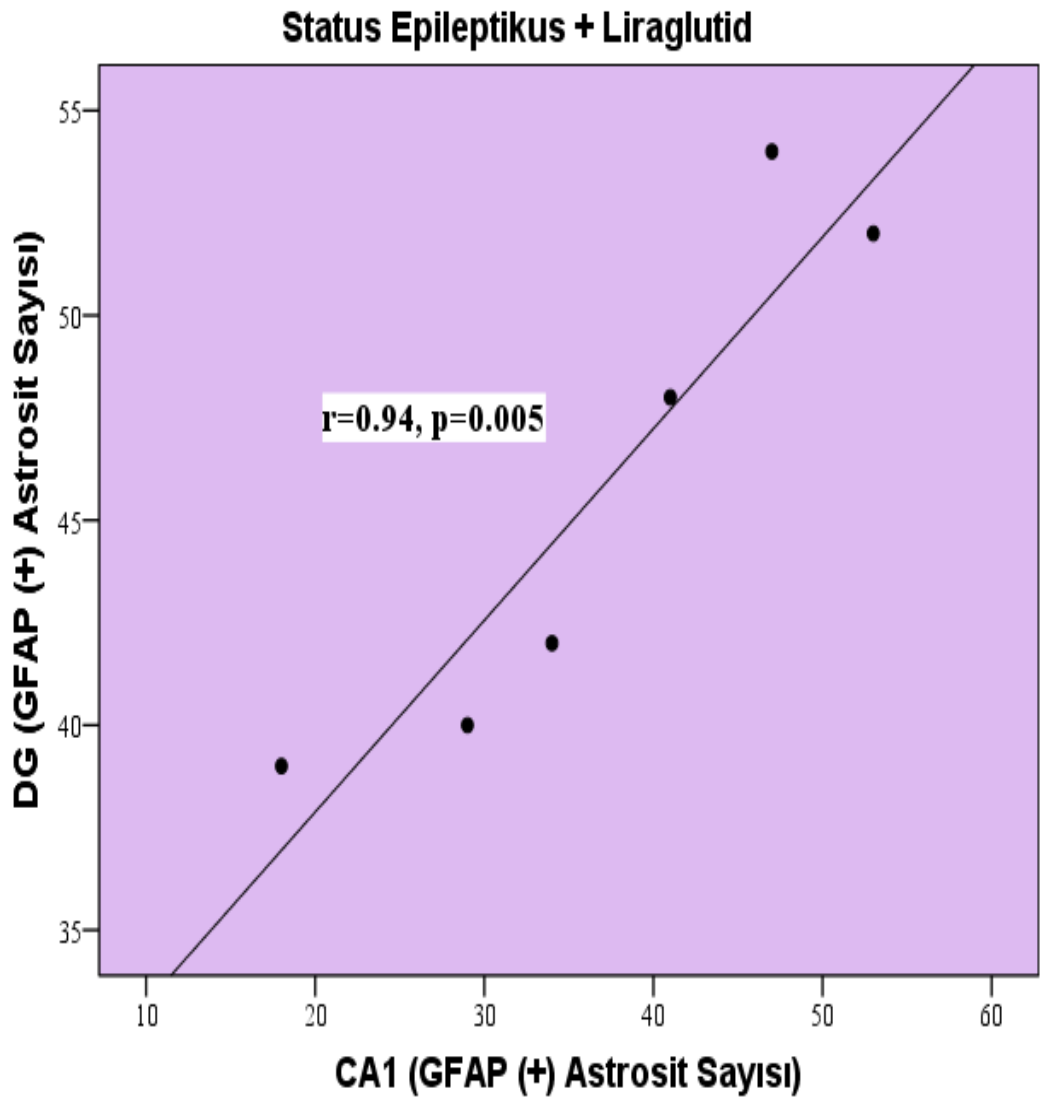
Çalışma grupları arasında CA1'deki GFAP(+) mikroglia sayıları açısından istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 12).



Şekil 12. Çalışma Gruplarında CA1'deki GFAP(+) Mikroglia Sayıları

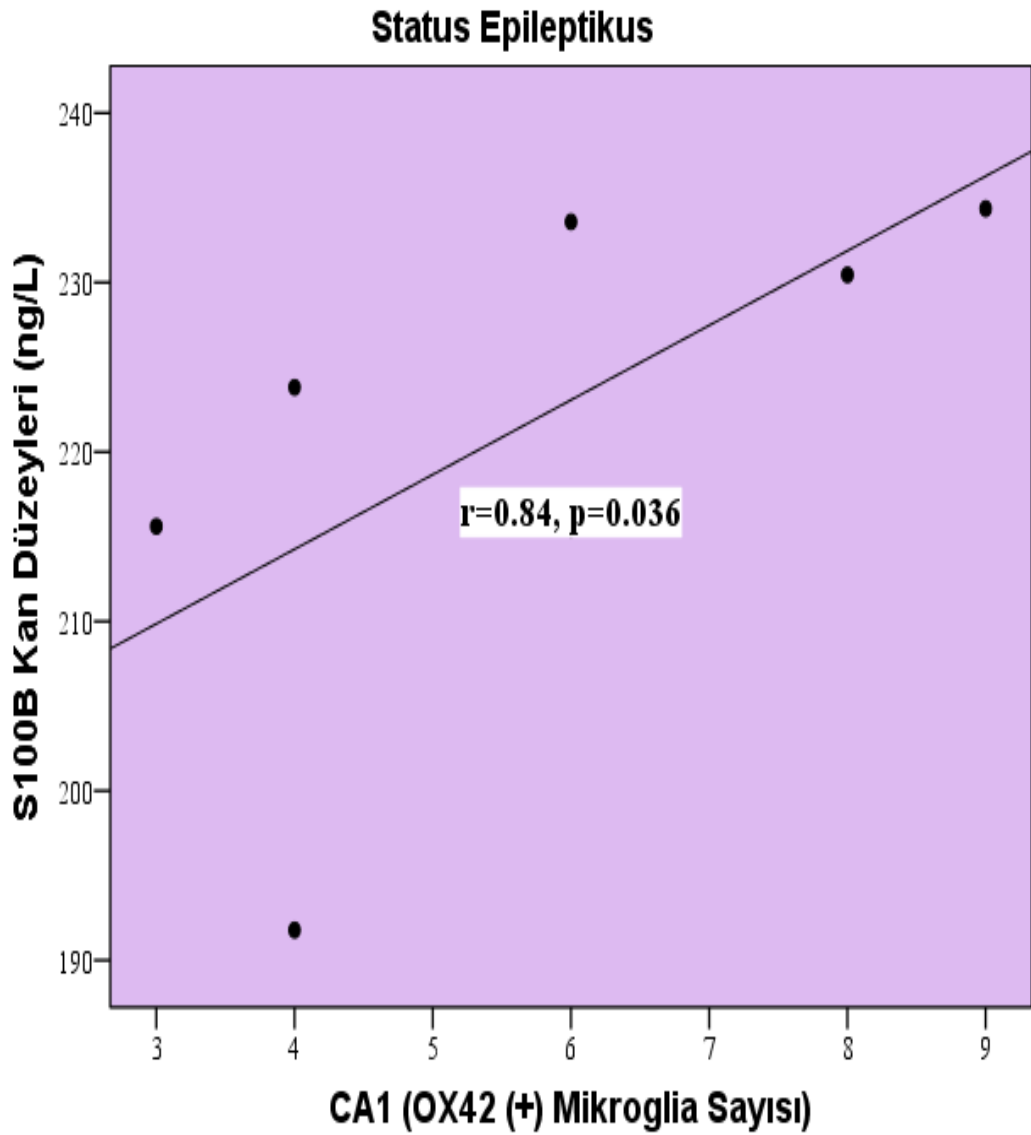
4.1.6. Her Bir Çalışma Grubunun Kendi İçinde OX-42(+) ve GFAP(+) Hücre Sayılarının Kan S100B Düzeyleri ile Arasındaki Korelasyonun Araştırılması

Sadece SE + Liraglutid grubunda DG ile CA1'deki GFAP(+) astrosit sayıları arasında pozitif yönde istatistiksel olarak önemli, yüksek düzeyde korelasyon saptandı (Şekil 13, Tablo 8).



Şekil 13. “SE + Liraglutid” Grubunda DG ile CA1'deki GFAP (+) Astrosit Sayısı Arasındaki Korelasyon

Diğer bir pozitif yönde, istatistiksel olarak önemli, yüksek düzeyde korelasyon SE grubunda CA1'deki OX-42(+) mikroglia sayısı ile S100B kan düzeyleri arasında bulundu (Şekil 14, Tablo 7).



Şekil 14. “SE” Grubunda S100B Kan Düzeyleri ile CA1'deki OX-42(+) Mikroglia Sayısı Arasındaki Korelasyon

Tablo 4. Kontrol Grubunda DG ve CA1’de GFAP(+), OX-42(+) Hücreler ve Kan S100B Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

Kontrol		GFAP(+)	GFAP(+)	OX-42(+)	OX-42(+)	S100B
		DG	CA1	DG	CA1	
GFAP(+)	r*	1,000				
	DG	p				
GFAP(+)	r*	0,406	1,000			
	CA1	p	0,425			
OX-42(+)	r*	-0,086	0,551	1,000		
	DG	p	0,872	0,257	-----	
OX-42(+)	r*	-0,093	-0,188	-0,278	1,000	
	CA1	p	0,862	0,722	0,594	
S100B	r*	-0,600	-0,232	-0,086	-0,309	1,000
	p	0,208	0,658	0,872	0,552	-----

*r: Spearman korelasyon katsayısı

Tablo 5. Sham Grubunda DG ve CA1’de GFAP(+), OX-42(+) Hücreler ve Kan S100B Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

Sham		GFAP(+)	GFAP(+)	OX-42(+)	OX-42(+)	S100B
		DG	CA1	DG	CA1	
GFAP(+)	r*	1,000				
	DG	p				
GFAP(+)	r*	-0,087	1,000			
	CA1	p	0,870			
OX-42(+)	r*	-0,232	-0,250	1,000		
	DG	p	0,658	0,633	.	
OX-42(+)	r*	-0,293	-0,396	0,891	1,000	
	CA1	p	0,573	0,437	0,017	
S100B	r*	0,800	0,300	-0,300	-0,289	1,000
	p	0,104	0,624	0,624	0,638	.

*r: Spearman korelasyon katsayısı

Tablo 6. SE Grubunda DG ve CA1’de GFAP(+), OX-42(+) Hücreler ve Kan S100B Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

SE		GFAP(+) DG	GFAP(+) CA1	OX-42(+) DG	OX-42(+) CA1	S100B
GFAP(+) DG	r*	1,000				
	p	.				
GFAP(+) CA1	r*	0,754	1,000			
	p	0,084	.			
OX-42(+) DG	r*	-0,493	-0,250	1,000		
	p	0,321	0,633	.		
OX-42(+) CA1	r*	-0,058	-0,235	0,456	1,000	
	p	0,913	0,654	0,364	.	
S100B	r*	0,086	-0,029	0,638	0,841	1,000
	p	0,872	0,957	0,173	0,036	.

*r: Spearman korelasyon katsıysı

Tablo 7. SE+Liraglutid Grubunda DG ve CA1’de GFAP(+), OX-42(+) Hücreler ve Kan S100B Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

SE+Liraglutid		GFAP(+) DG	GFAP(+) CA1	OX-42(+) DG	OX-42(+) CA1	S100B
GFAP(+) DG	r*	1,000				
	p	.				
GFA (+) CA1	r*	0,943	1,000			
	p	0,005	.			
OX-42(+) DG	r*	-0,577	-0,698	1,000		
	p	0,231	0,123	.		
OX-42(+) CA1	r*	0,147	-0,088	0,688	1,000	
	p	0,781	0,868	0,131	.	
S100B	r*	-0,143	0,143	0,030	-0,206	1,000
	p	0,787	0,787	0,954	0,695	.

*r: Spearman korelasyon katsıysı

4.1.7. Çalışma Gruplarında DG ve CA1'deki GFAP(+) ve OX-42(+) Hücre Sayısının ve Kandaki S100B Değerlerinin Dağılımı

Çalışma grupları arasında CA1'de OX-42(+) mikroglia sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Yapılan *post-hoc* ikili karşılaştırmalar sonucu anlamlı farkın kontrol grubuyla SE grubu, kontrol grubuyla SE + Liraglutid grubu ve Sham grubuyla SE grubu arasında olduğu görüldü. SE ve SE + Liraglutid grubunda CA1'deki OX-42(+) mikroglia sayısının Kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu. Ancak bu gruplar kendi arasında birbirinden farklı değildi ($p>0,01$).

Çalışma grupları arasında S100B kan düzeylerinin Kontrol grubu ile SE + Liraglutid grubu arasında anlamlı olarak farklı olduğu görüldü ($p<0,05$). SE + Liraglutid grubunda S100B kan düzeyleri Kontrol değerlerine göre anlamlı olarak daha yüksekti.

Diğer taraftan çalışma grupları arasında DG ve CA1'deki GFAP (+) astrosit ve DG OX-42(+) mikroglia sayıları açısından önemli bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Çalışma Gruplarına Göre DG ve CA1'deki GFAP(+) ve OX-42(+) Hücre Sayısının ve Kandaki S100B Değerlerinin Dağılımı

	KONTROL (n=6)	SHAM (n=6)	SE (n=6)	SE +LİRAGLUTİD (n=6)	p*
	Ortanca (min-maks)	Ortanca (min-maks)	Ortanca (min-maks)	Ortanca (min-maks)	
GFAP (+) Astrosit (DG)	45 (42-58)	46,5 (38-55)	54 (40-62)	45 (39-54)	0,375
GFAP (+) Astrosit (CA1)	32 (27-45)	31 (28-45)	45 (34-49)	37,5 (18-53)	0,188
OX-42(+) Mikroglia (DG)	7,5 (2-10)	3,5 (1-5)	4 (2-10)	5 (4-8)	0,074
OX-42(+) Mikroglia (CA1)	2 (1-3) ^{cd}	2,5 (2-3) ^c	5 (3-9)	4,5 (3-6)	0,002
Kandaki S100B (ng/L)	88,1 ^d (62,5-200)	246,8 (201,9-254,3)	227,1 (191,8-234,4)	263,3 (251,9-287,9)	0,001

*Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır.

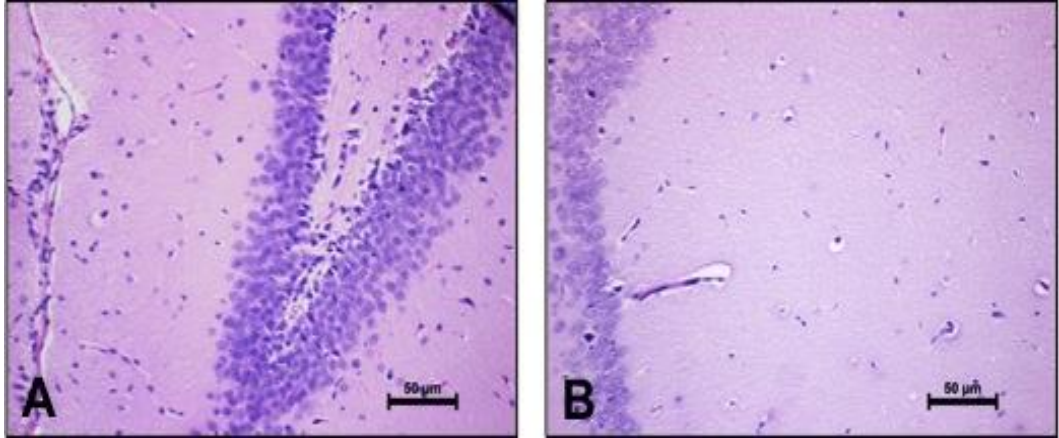
^cPost-Hoc ikili karşılaştırmada SE grubuyla arasındaki fark önemli.

^dPost-Hoc ikili karşılaştırmada SE + Liraglutid grubuyla arasındaki fark önemli.

4.2. İmmünohistokimyasal bulgular

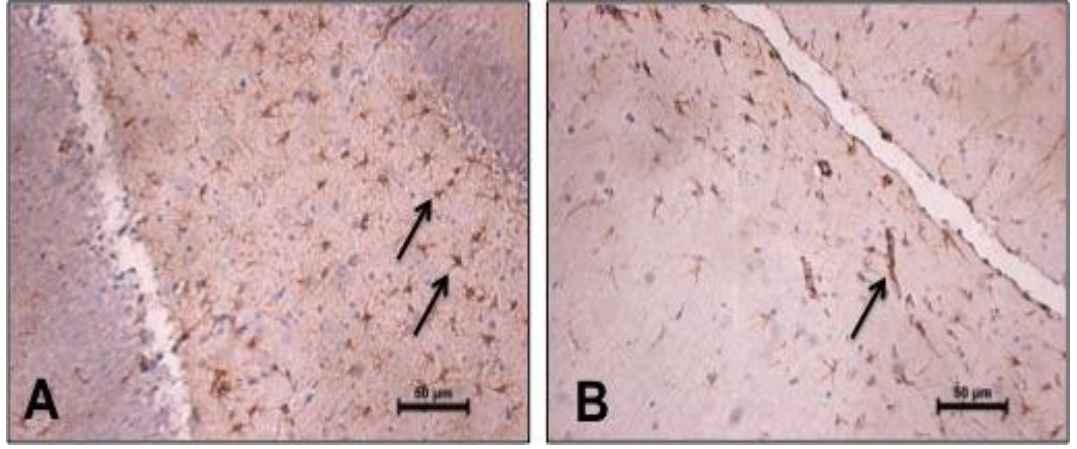
4.2.1. Kontrol grubu

Kontrol grubunda örnekleri incelendiğinde DG bölgesinde bulunan granüler nöron toplulukları komşuluğundaki bazı alanlarda ödeme bağlı minimal açılma izlendi (Resim 1). Nöronlar sağlıklı görünümdeydiler. DG bölgesinde az sayıda bazofilik sitoplazmalı kondanse görünümlü piknotik nöron dikkati çekti. CA1 bölgesinde ise nöronlar sağlıklı görünürken, damar çevrelerinde minimal ödem izlendi.



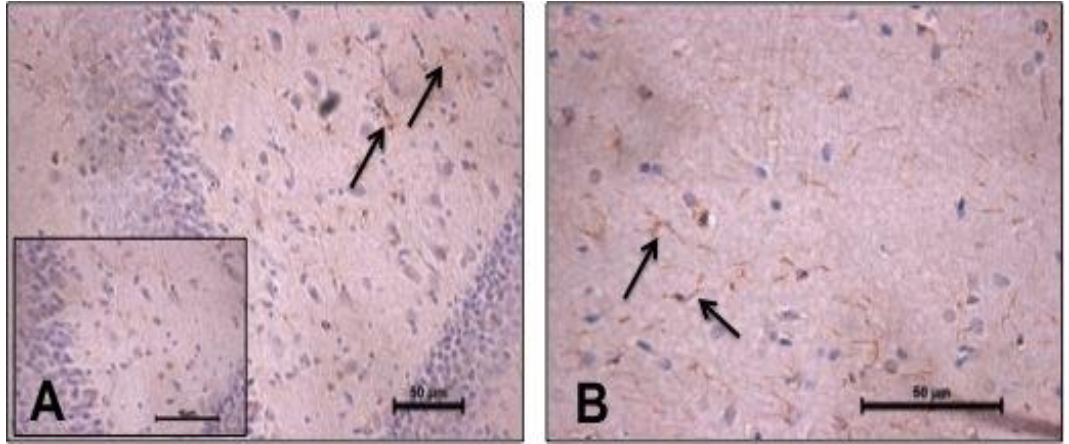
Resim 1: Kontrol grubunda histolojik değerlendirme; A: DG’ta minimal ödem ve az sayıda bazofilik, kondanse nöron, B: CA1’de sağlıklı nöronlar ve damar çevresinde minimal ödem (Hematoksilen-Eozin AX200, BX200)

Güçlü GFAP immunoreaktivitesi gösteren astrositler hipokampusun tüm bölgelerinde seçildiler (Resim 2). Özellikle DG bölgesinde daha çok sayıda immunoreaktif astrosit gözlemlendi. CA1 bölgesinde ise GFAP(+) astrositler özellikle piamater altında daha yoğun olarak bulunmaktaydılar.



Resim 2: Kontrol Grubunda GFAP İmmünoreaktivitesi; A: DG'ta GFAP(+) astrositler. B: CA1'de özellikle piamatere yakın alanda GFAP(+) astrositler (HRP/ABC–Hematoksilen AX200, BX200)

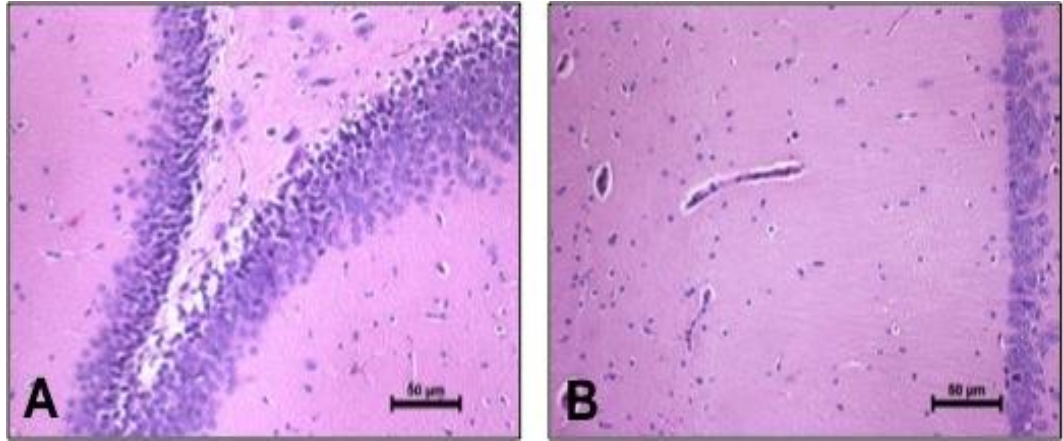
İncelenen örneklerin tümünde OX-42 immunoreaktivitesi hem DG hem de CA1 bölgesinde az sayıda hücrede izlendi (Resim 3). Ancak bu hücrelerde zayıf immunoreaktivite vardı.



Resim 3: Kontrol Grubunda OX-42 İmmünoreaktivitesi; A: DG'ta zayıf OX-42 immunoreaktivitesi gösteren mikroglialar. B: CA1'de piamatere yakın alanda zayıf immunoreaktivite gösteren mikroglialar (HRP/ABC–Hematoksilen AX200 inset: X400, BX400)

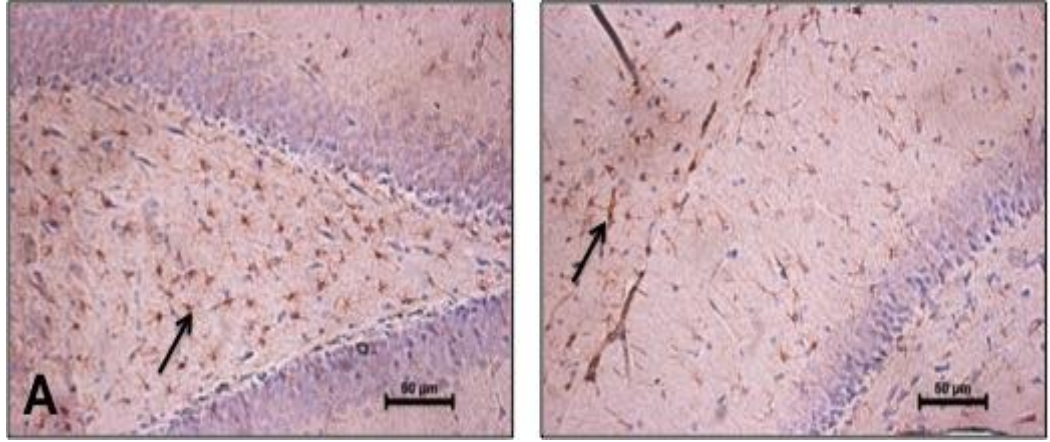
4.2.2. Sham grubu

İncelenen örneklerin hepsinde özellikle DG bölgesinde granüler nöron topluluğunun bazalinde lokalize alanlarda ödem vardı (Resim 4). CA1 bölgesinde ise nöronlara yakın alanlarda ödem gözlenmezken özellikle kan damarlarının çevresinde hafif ödem dikkati çekti. DG bölgesindeki granüler nöron topluluğunun özellikle bazal kısımlarında bazı nöronlar koyu sitoplazmalı ve kontrakte görünümlüydü. CA1 bölgesinde ise piknotik görünümlü nöron sayısı oldukça azdı.



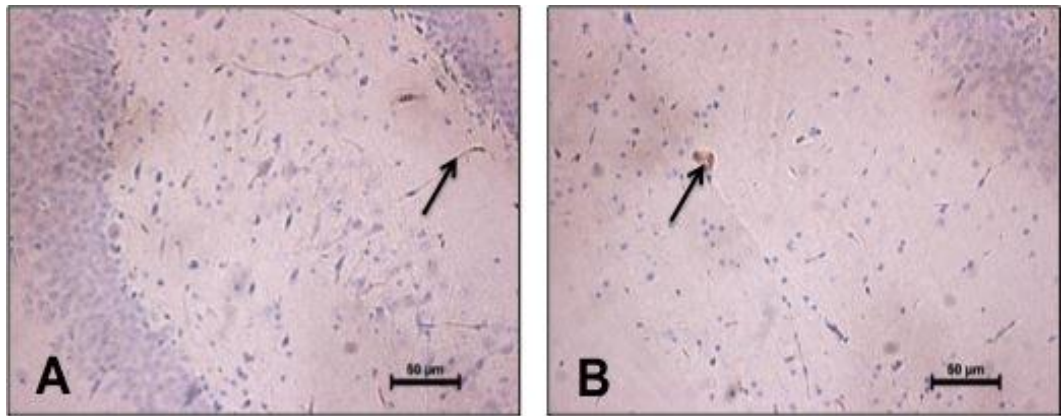
Resim 4: Sham grubunda histolojik değerlendirme; A: DG’te ödeme bağlı açılmalar, B: CA1’de damar çevresinde minimal ödem (Hematoksilen-Eozin, AX200, BX200)

Kontrol grubuna göre daha güçlü GFAP immunoreaktivitesi gösteren astrositler kontrol grubuna benzer şekilde hipokampusun tüm bölgelerinde seçildiler (Resim 5). GFAP(+) astrositler DG bölgesinde tüm örneklerde seçiliyordu ve bu hücreler kısa künt uzantıları ile ayırt edildiler. CA1 bölgesinde ise GFAP(+) astrositler tüm alanda bulunmalarına rağmen bir grup astrosit CA1 bölgesinin ortasında hipokampus boyunca uzanarak bir hat oluşturmaktaydı.



Resim 5: Sham Grubunda GFAP İmmünoreaktivitesi; A: DG'ta GFAP(+) astrositler, B: CA1'de GFAP(+) astrositler (HRP/ABC–Hematoksilen, AX200, BX200)

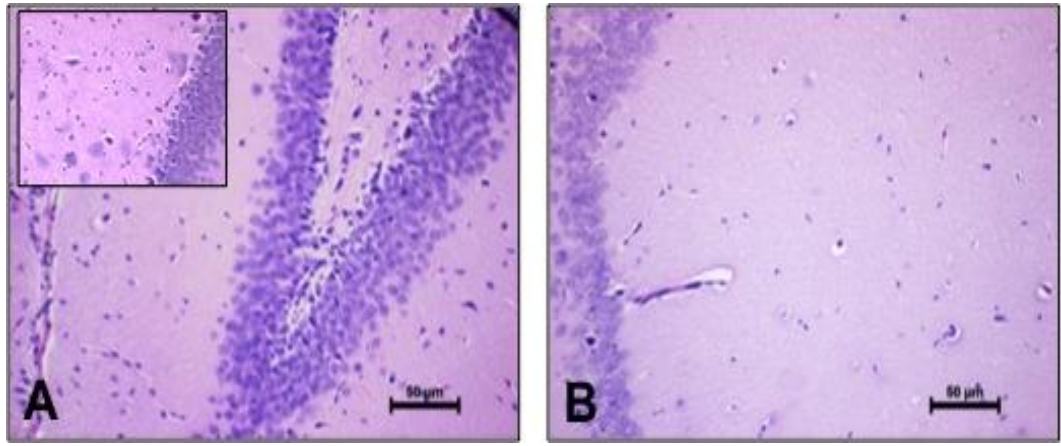
Sham grubunda da OX-42 immunoreaktivitesi gösteren az sayıda mikroglia vardı (Resim 6). CA1 bölgesinde özellikle orta hatta damar komşuluğunda bir kaç mikroglia seçildi. DG'ta ise immunoreaktivite gösteren mikroglialar granüler nöron topluluğunun komşuluğunda idi.



Resim 6: Saham Grubunda OX-42 İmmünoreaktivitesi; A: DG'ta granüler nöron topluluğu komşuluğunda OX-42 immunoreaktif mikroglialar. B: CA1'de damar yakınında OX-42 immunoreaktif mikroglialar (HRP/ABC–Hematoksilen, AX200, BX200)

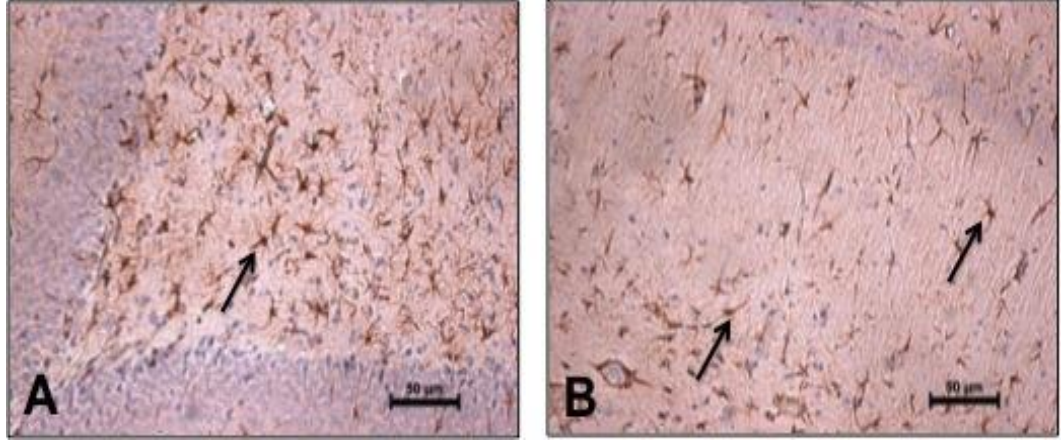
4.2.3. SE grubu

SE grubu örneklerinin tümünde DG içinde gruplar halinde nöronlar görüldü (Resim 7). DG'de bölgesinde piknotik görünümlü nöron sayısı kontrol ve sham gruplarına oranla daha fazlaydı. Hipokampusun tüm alanlarında damar çevrelerinde ödeme bağlı açılmalar vardı. CA1'de nöronlar sağlıklı görünümdeydi. Bu bölgede sadece damar çevrelerinde hafif ödem vardı.



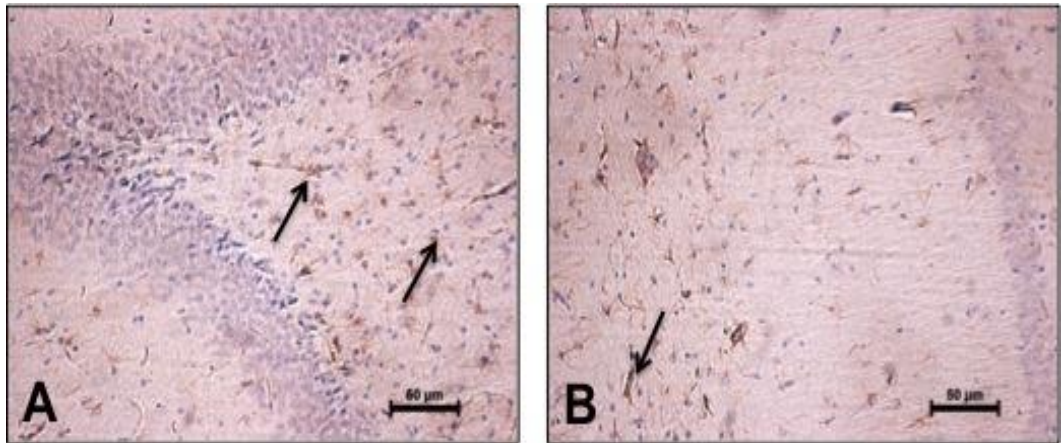
Resim 7: SE grubunda histolojik değerlendirme; A: DG'ta normal granüler nöronların arasında piknotik nöronlar, inset: DG içinde lokalize alanlarda nöronlar B: CA1'de sağlıklı nöronlar ve damar çevresinde ödem (Hematoksilen-Eozin, AX200, inset: X200, BX200)

Epilepsi grubu örneklerinin hepsinde özellikle DG ve CA1 bölgelerinde daha yoğun olmak üzere hipokampusta çok güçlü GFAP immunoreaktivitesi vardı (Resim 8). GFAP(+) astrositler DG'un özellikle uç bölgelerinde daha yoğun olarak bulunuyorlardı. Epilepsi grubunda astrosit uzantıları DG bölgesinde adeta bir ağ oluşturur şekilde birbirlerine bağlanmışlardı. CA 1 bölgesinde ise daha seyrek dağılmış GFAP(+) hücreler vardı. Sham grubuna benzer şekilde CA1 bölgesi ortalarında hat şeklinde daha fazla sayıda GFAP(+) hücre seçiliyordu.



Resim 8: SE Grubunda GFAP İmmünoreaktivitesi; A: DG’ta güçlü GFAP immunoreaktivitesi gösteren ağ yapmış astrositler, B: CA1’de GFAP(+) astrositler (HRP/ABC–Hematoksilen, AX200, BX200)

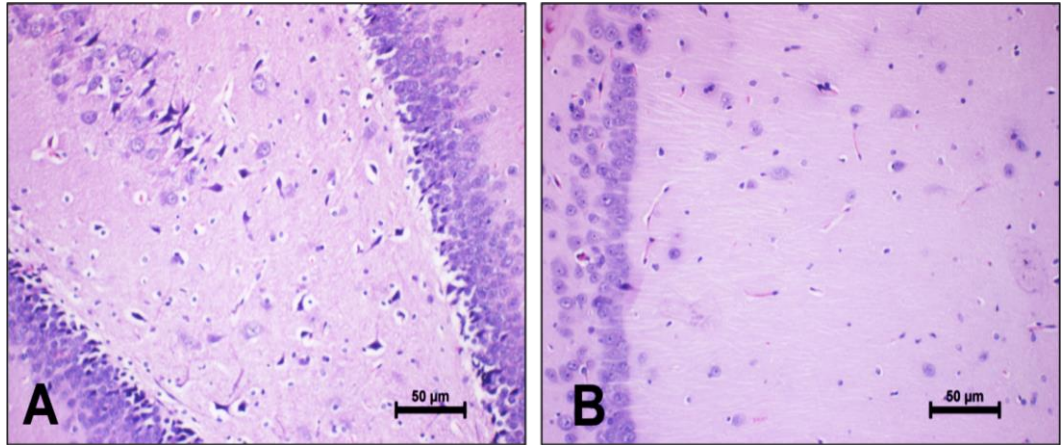
Örneklerde zayıf OX-42 immunoreaktivitesi vardı (Resim 9). DG’ta ve CA1’de az sayıda zayıf OX-42 immunoreaktivitesi gösteren mikroglialar vardı. Bu mikroglialar özellikle damar komşuluğunda seçildiler.



Resim 9: SE Grubunda OX-42 İmmünoreaktivitesi; A: DG’ta OX-42(+) mikroglialar, B: CA1’de OX-42(+) mikroglialar (HRP/ABC–Hematoksilen, AX200, BX200)

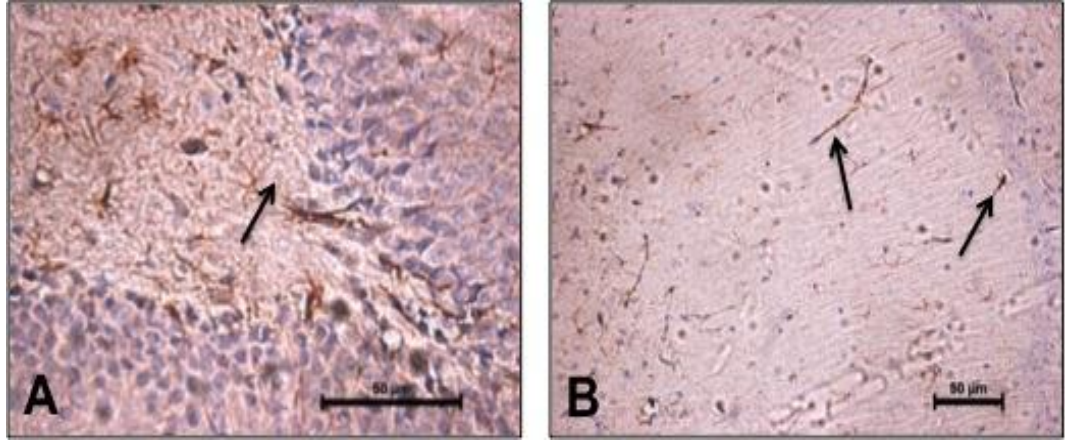
4.2.4. SE + Liraglutid grubu

Örneklerin tümünde DG bölgesinde yer yer piknotik görünümlü koyu boyanan nöronlar izlenmekle birlikte CA1 bölgesinde tüm nöronların sağlıklı olduğu dikkati çekti (Resim 10). DG bölgesinde piknotik nöron sayısı, epilepsi grubuna oranla daha az olup kontrol ve sham gruplarına yakındı. Piknotik görünümlü nöronların yoğun olduğu bölgelerde ve damar çevrelerinde SE grubuna benzer şekilde ödeme bağlı açılmalar vardı. Ancak CA1’de damar çevrelerinde ödem izlenmedi.



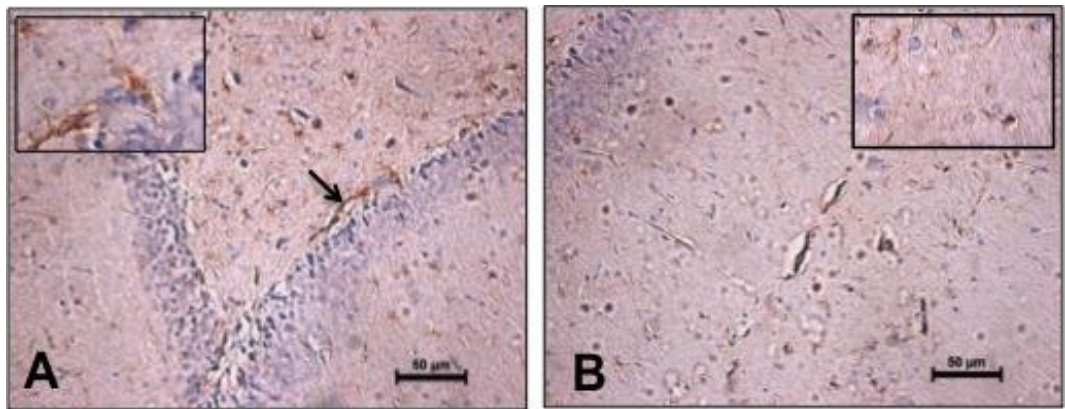
Resim 10: SE + Liraglutid grubunda histolojik değerlendirme; A: DG’te piknotik nöronlar ve nöron topluluğu bazal kısımlarında hafif ödem, B: CA1’de sağlıklı nöronlar ve damarlar (Hematoksilen-Eozin, AX200, BX200)

Hem DG hem de CA1’de SE grubuna göre daha az sayıda astrositte GFAP immunoreaktivitesi vardı (Resim 11). Epilepsi grubundan farklı olarak, GFAP(+) astrositler birbirleriyle ağ oluşturmuyorlardı. CA1’de nöron topluluğu grubuna yakın alanlarda daha çok GFAP(+) astrosit vardı.



Resim 11: SE + Liraglutid grubunda GFAP immünoaktivitesi; A: DG'ta GFAP immünoaktif hücreler, B: CA1'de GFAP(+) hücreler (HRP/ABC–Hematoksilen, AX400, BX200)

Kontrol ve sham gruplarından daha fazla ancak SE grubuna göre daha az sayıda OX-42 immünoaktivitesi gösteren mikroglialar DG ve CA1'de görüldü (Resim 12). Her iki bölgede de OX-42(+) hücreler damarlara yakın alanlarda daha çoktu.



Resim 12: SE+Liraglutid grubunda OX-42 immünoaktivitesi; A: DG'de nöron topluluğu komşuluğunda OX-42(+) mikroglialar, B: CA1'de damar komşuluğunda OX-42(+) mikroglialar. İnetler: büyük büyütmede OX-42(+) mikroglialar, (HRP/ABC–Hematoksilen, AX200, inset: X400, BX200, inset: X400)

5. TARTIŞMA

Epilepsi, SE veya tek bir nöbette inflamatuvar değişiklikler olur ve beyinde hasara yol açar². Beyinde oluşan hasarların belirlenmesi ve izlenmesinde kana geçebilen belirteçlerin tespit edilebilmesi hem tanı koyma hem de progresyonun ve tedaviye cevabın takibinde önemli avantajlar sağlayacaktır.

S100B, glialarda eksprese edilen ve Ca^{2+} bağlayan bir proteindir²²⁷. Bu protein her ne kadar Ca^{2+} sensörü ve tamponu olarak fonksiyon görse de ekstraselüler ortama da salıverilebilmektedir^{208,278}. Alzheimer ve şizofreni gibi patolojik durumlarda S100B'nin hem serum hem de beyin omurilik sıvısında düzeyinin arttığı gösterilmiştir^{29,279}. Bu nedenle S100B düzeyi SSS'deki fonksiyon bozukluğunun olası bir belirteci olmaya adaydır. Ancak SSS'deki inflamatuvar süreçler ile doğrudan ilişkisi hakkında literatürde bir bilgi mevcut değildir.

In-vitro çalışmalarda S100B'nin nanomolar konsantrasyonlarda nöral dallanmayı ve astrosit proliferasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir^{234,280}. Ancak, bu protein mikromolar konsantrasyonlarda toksik etki göstermektedir²⁸¹. Ayrıca S100B'nin sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda da rol oynadığı gösterilmiştir^{282,283}. S100B'nin ekstraselüler ortama salıverilmesi nöral ve sinaptik-plastisite bağımlı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Ancak salıverilme mekanizmaları ve yeri tam olarak aydınlatılmamıştır. Bununla beraber, ekstraselüler ortamdaki glutamat konsantrasyonundaki artışın metabotropik glutamat reseptörleri-3 (mGluR3) aracılığı ile S100B düzeyinde

artışa yol açabildiği gibi, salıverilmenin veziküler olarak da gerçekleşebildiği bildirilmiştir²⁸⁴. Daha önceki bir çalışmada da bu bulguyu destekler şekilde, hipokampal glial hücrelerde mGluR3 ekspresyonun oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir²⁸⁵. Epileptik hastalarda ve deney hayvanlarında da nöbet sonrasında S100B düzeyinin arttığı bildirilmiş. Bu nedenle sinaptik aralıkta artan glutamat düzeyinin mGluR3 aktivasyonu aracılığı ile S100B düzeyini artırdığı düşünülmektedir^{241,286}. Temporal lob epilepsisi olan hastalardan çıkarılan hipokampuslardaki astrositlerde mGluR2 ve 3'lerin yüksek miktarda eksprese olması bu hipotezi destekler niteliktedir²⁸⁷.

S100B'nin fonksiyonu tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, nöronal “sağkalımı destekler nitelikte etki ettiğine dair bazı çalışmalar literatürde mevcuttur^{25,230}. Bu nedenle, Alzheimer, epilepsi veya şizofreni gibi patolojik durumlarda koruyucu bir mekanizma olarak yükselmesi olasılık dahilinde gözükmemektedir^{241,288,289}. Bu çalışmada S100B düzeyi Kontrol ve SE grubu arasında farklı bulunmamıştır. Sadece SE + Liraglutid grubundaki S100B düzeyi kontrole göre anlamlı olarak yüksektir. Literatürde liraglutidin nöroprotektif özelliklere sahip olduğu belirtildiğinden, S100B değerindeki yüksekliğin bu ajanın söz konusu koruyucu özelliklerinden kaynaklanıyor olması mümkün gözükmemektedir. Ancak bu çalışmadaki deney tasarımı öncelikle S100B düzeyi ile astrosit ve mikrogliya aktivasyonunu belirlemeye yönelik olup nöroprotektif etki doğrudan araştırılmamıştır. Dolayısı ile liraglutidin nöroprotektif özellikleri konusunda kesin bir sonuca varmak mümkün değildir. Literatürdeki çalışmaların ışığında, S100B yüksekliği oluşan patolojinin ağırlığına karşın oluşan reaktif ve

koruyucu bir mekanizma gibi gözükmektedir. Bu görüşü destekler şekilde, S100B'nin eksitotoksik hasar sonucu glialar tarafından ortama salıverildiği ve sürmekte olan hasarı ve buna karşı gelişen glial reaktiviteyi yansıttığı iddia edilmiştir²⁹⁰.

Epileptojenik odak olarak adlandırılan bölgelerde 'pacemaker' hücreler yer almaktadır. Epilepsili hastaların beyinlerinde genellikle hipokampustaki CA1 nöronlarının 'pacemaker' merkezler olabileceği kabul edilmektedir¹⁴³. Bu çalışmada, SE grubunda CA1'deki OX-42(+) mikroglia sayısı ile kan S100B düzeyleri arasında yüksek düzeyde pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu sonuç, S100B düzeyinin doğrudan patolojik odak ile ilgili mikroglia aktivasyonunu yansıtabileceğini düşündürmektedir. Dolayısı ile söz konusu ilişkiyi aydınlatmaya yönelik daha ileri düzey çalışmaların yapılması yerinde olacaktır.

OX-42 ekspresyonu DG'ta çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip değildir. Bu bulgu, nöroinflamasyonun söz konusu olduğu fizyopatolojik süreçlerde esas olarak CA1 bölgesinin önemli bir role sahip olduğunu telkin etmektedir. Bu çalışmada, OX-42 ekspresyonu SE ve SE + Liraglutid gruplarında CA1'de kontrol değerlerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgular da, CA1'in patolojik nöroinflamatuvar süreçlerde ön planda yer aldığını desteklemektedir. Liraglutidin SE grubunda oluşan OX-42 ekspresyonu üzerinde bir etkisi olmamıştır. Ancak bu grupta, CA1 ve DG'ta GFAP(+) hücre sayıları arasında yüksek düzeyde korelasyon olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, liraglutidin hem CA1 hem de DG'ta nöroinflamatuvar süreçleri uyardığı şeklinde yorumlanabilir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada lityum-pilokarpinle indüklenen SE’ta oluşan mikrogliyal aktivasyon ile S100B arasındaki olası korelasyon ve liraglutidin bu değişiklikler üzerine etkileri araştırılmıştır. Kontrole göre SE + Liraglutid grubundaki S100B’nin yüksekliğinin söz konusu ajanın litaretürde belirtilen nöroprotektif özelliklerinden kaynaklanması olasıdır. Ayrıca, SE grubunda CA1’deki OX-42(+) mikrogliya sayısı ile kan S100B düzeyleri arasında yüksek düzeyde pozitif korelasyon bulunması S100B’nin patolojik odakla ilgili mikrogliyal aktivasyonu yansıtabileceğini düşündürmektedir. Bu ilişki daha ileri düzey çalışmalarla aydınlatılmalıdır.

OX-42 ekspresyonu DG’ta çalışma grupları arasında istatistiksel olarak farklı bulunmaması nöroinflamasyonda esas olarak CA1 bölgesinin önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. OX-42 ekspresyonunun “SE” ve “SE + Liraglutid” gruplarında CA1’de kontrol değerlerine göre anlamlı olarak yüksek bulunması da CA1’in patolojik nöroinflamatuvar süreçlerde ön planda yer aldığını desteklemektedir.

Liraglutidin SE grubunda oluşan OX-42 ekspresyonu üzerinde bir etkisi olmamıştır. Ancak bu grupta, CA1 ve DG’ta GFAP(+) hücre sayıları arasında yüksek düzeyde korelasyonun olması, liraglutidin hem CA1 hem de DG’ta nöroinflamatuvar süreçleri uyardığı şeklinde yorumlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. N Engl J Med. 2003 Sep 25;349(13):1257-66.
2. De Bock F, Dornand J, Rondouin G. Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. Neuroreport 1996;7:1125-1129.
3. Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis. 2008 Jan;29(1):142-60.
4. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Inflammation and epilepsy. Handb Clin Neurol 2012;107:163-175.
5. Jansson L, Wennström M, Johanson A, Tingström A. Glial cell activation in response to electroconvulsive seizures. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2009 Oct 1;33(7):1119-28.
6. Ravizza T, Boer K, Redeker S, Spliet WG, van Rijen PC, Troost D, Vezzani A, Aronica E. The IL-1beta system in epilepsy-associated malformations of cortical development. Neurobiol Dis. 2006 Oct;24(1):128-43.
7. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci. 2007 Nov;10(11):1387-94.

8. Vesce S, Rossi D, Brambilla L, Volterra A. Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol.* 2007;82:57-71.
9. Rock RB, Peterson PK. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006Jun;1(2):117-26.
10. Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Sep;16(5):932-40.
11. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke.* 1997 Jun;28(6):1233-44.
12. Heizmann CW. Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res.* 1999 Sep;24(9):1097-100.
13. Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 2002 May 1;7:d1356-68.
14. Park ES, Park CI, Choi KS, Choi IH, Shin JS. Over-expression of S100B protein in children with cerebral palsy or delayed development. *Brain Dev.* 2004 Apr;26(3):190-6.
15. Rothermundt M, Ahn JN, Jörgens S. S100B in schizophrenia: an update. *Gen Physiol Biophys.* 2009;28 Spec No Focus:F76-81.

16. Amiri M, Astrand R, Romner B. Can S100B Predict Cerebral Vasospasms in Patients Suffering from Subarachnoid Hemorrhage? *Front Neurol*. 2013 Jun 6;4:65.
17. Falcone T, Fazio V, Lee C, Simon B, Franco K, Marchi N, Janigro D. Serum S100B: a potential biomarker for suicidality in adolescents? *PLoS One*. 2010 Jun 14;5(6):e11089.
18. Blyth BJ, Farhavar A, Gee C, Hawthorn B, He H, Nayak A, Stöcklein V, Bazarian JJ. Validation of serum markers for blood-brain barrier disruption in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2009 Sep;26(9):1497-1507.
19. Biberthaler P, Linsenmeier U, Pfeifer KJ, Kroetz M, Mussack T, Kanz KG, Hoecherl EF, Jonas F, Marzi I, Leucht P, Jochum M, Mutschler W. Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study. *Shock*. 2006 May;25(5):446-53.
20. Rothermundt M, Ponath G, Glaser T, Hetzel G, Arolt V. S100B serum levels and long-term improvement of negative symptoms in patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2004 May;29(5):1004-11.
21. Wilcock DM, Griffin WS. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation*. 2013 Jul 16;10:84.
22. Pham N, Fazio V, Cucullo L, Teng Q, Biberthaler P, Bazarian JJ, Janigro D. Extracranial sources of S100B do not affect serum levels. *PLoS One*. 2010 Sep 10;5(9).

23. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Jul;33(7):637-68.
24. Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol.* 1989 Dec;109(Pt 1):3063-71.
25. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agnietti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000 Dec 22;275(51):40096-105.
26. Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST, Gonçalves CA. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 2006 Feb;26(1):81-6.
27. Hu J, Van Eldik LJ. S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 11;1313(3):239-45.
28. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 2003;21(3-4):97-108.
29. Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease:

- the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol.* 1998 Jan;8(1):65-72.
30. Mori T, Koyama N, Arendash GW, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia.* 2010 Feb;58(3):300-14.
 31. Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem.* 1996 Feb 2;271(5):2543-7
 32. Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, Rothermundt M. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol.* 2007 Mar;184(1 2):214-22.
 33. Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2007 Dec;7(8):711-24.
 34. Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: implications for astrocyte development, activation, and tumor growth. *J Biol Chem.* 2009 Mar 27;284(13):8797-811.
 35. Gault VA, Flatt PR, O'Harte FP. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide analogues and their therapeutic potential for the treatment of obesity-diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Aug 22;308(2):207-13.

36. Lovshin JA, Drucker DJ. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 May;5(5):262-9.
37. Sarkar S, Fekete C, Legradi G, Lechan RM. Glucagon like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1) nerve terminals densely innervate corticotrophin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 2003;985:163-168.
38. Hamilton A, Hölscher C. Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. *Neuroreport*. 2009 Aug 26;20(13):1161-6.
39. During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med*. 2003 Sep;9(9):1173-9.
40. Biswas SC, Buteau J, Greene LA. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) diminishes neuronal degeneration and death caused by NGF deprivation by suppressing Bim induction. *Neurochem Res*. 2008 Sep;33(9):1845-51.
41. Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM, Greig NH. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *J Neurosci Res*. 2003 Jun 1;72(5):603-12.
42. Qin Z, Sun Z, Huang J, Hu Y, Wu Z, Mei B. Mutated recombinant human glucagon-like peptide-1 protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by amyloid-beta peptide (1-42). *Neurosci Lett*. 2008 Oct 31;444(3):217-21.

43. Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.* 2004 Mar;3(3):169-78.
44. Greig NH, Mattson MP, Perry T, Chan SL, Giordano T, Sambamurti K, Rogers JT, Ovadia H, Lahiri DK. New therapeutic strategies and drug candidates for neurodegenerative diseases: p53 and TNF-alpha inhibitors, and GLP-1 receptor agonists. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1035:290-315.
45. Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):24-32.
46. Kappe C, Tracy LM, Patrone C, Iverfeldt K, Sjöholm Å. GLP-1 secretion by microglial cells and decreased CNS expression in obesity. *J Neuroinflammation.* 2012 Dec 23;9:276.
47. Iwai T, Ito S, Tanimitsu K, Udagawa S, Oka J. Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1beta production in cultured rat astrocytes. *Neurosci Res.* 2006 Aug;55(4):352-60.
48. Kim S, Moon M, Park S. Exendin-4 protects dopaminergic neurons by inhibition of microglial activation and matrix metalloproteinase-3 expression in an animal model of Parkinson's disease. *J Endocrinol.* 2009 Sep;202(3):431-9.
49. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem.* 1992 Apr 15;267(11):7402-5.

50. Kastin AJ, Akerstrom V. Entry of exendin-4 into brain is rapid but may be limited at high doses. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Mar;27(3):313-8.
51. Darsalia V, Mansouri S, Ortsater H, Olverling A, Nozadze N, Kappe C, Iverfeldt K, Tracy LM, Grankvist N, Sjöholm A, Patrone C. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reduces ischaemic brain damage following stroke in Type 2 diabetic rats. *Clinical Science* 2012;122:473-483.
52. Lin F, Wang R. Molecular modeling of the three-dimensional structure of GLP-1R and its interactions with several agonists. *J Mol Model*. 2009 Jan;15(1):53-65.
53. Russell-Jones D. Molecular, pharmacological and clinical aspects of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Jan 15;297(1-2):137-40
54. Rossi MC, Nicolucci A. Liraglutide in type 2 diabetes: from pharmacological development to clinical practice. *Acta Biomed*. 2009 Aug;80(2):93-101.
55. Garber AJ. Novel GLP-1 receptor agonists for diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* 2012 Jan;21(1):45-57.
56. Drucker DJ, Dritselis A, Kirkpatrick P. Liraglutide. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Apr;9(4):267-8.
57. Parks M, Rosebraugh C. Weighing risks and benefits of liraglutide--the FDA's review of a new antidiabetic therapy. *N Engl J Med*. 2010 Mar 4;362(9):774-7.

58. Montanya E, Sesti G. A review of efficacy and safety data regarding the use of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther*. 2009 Nov;31(11):2472-88.
59. Hunter K, Hölscher C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC Neurosci*. 2012 Mar 23;13:33.
60. Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci*. 2002 Feb-Apr;18(1-2):7-14.
61. McClean PL, Parthsarathy V, Faivre E, Hölscher C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011 Apr 27;31(17):6587-94.
62. Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*. 2000 Dec;141(12):4600-5.
63. Harkavyi A, Abuirmeileh A, Lever R, Kingsbury AE, Biggs CS, Whitton PS. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2008 May 21;5:19.
64. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology*. 2011 Jul 19;77(3):212-8.

65. Parthasarathy V, Hölscher C. Chronic treatment with the GLP1 analogue liraglutide increases cell proliferation and differentiation into neurons in an AD mouse model. PLoS One. 2013;8(3):e58784.
66. Eşkazan E, Tarihte epilepsi ve Epileptolojinin kısa tarihçesi, Epilepsi, ed.Yeni, S.N., Bora, İ., Gürses, C., Nobel Tıp kitapevleri, 2008; 3-10.
67. Ozer IJ. Images of epilepsy in literature. Epilepsia, 1991; 32: 798- 809.
68. Griffin J., Wyles M. Epilepsy Towards Tomorrow. London, England: Office of Health Economics; 1991.
69. Anthony Hopkins, Simon Shorvon, Gregory Cascino; Epilepsy. Chapman and Hall medical publish, second edition. 1995
70. Bambal G, Çakıl D, Ekici F. Epilepsi oluşum mekanizmaları. Konuralp Tıp Dergisi 2011;3(3) :42-45.
71. Liu, X., Wen, F., Yang, J., Chen, L., Wei, YQ. 2010. A review of current applications of mass spectrometry for neuroproteomics in epilepsy. Mass Spectrom Rev., 29(2);197-246.
72. International League Against Epilepsy. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Epilepsia 1993; 34 (4): 592-6.
73. Fisher, RS., Boas,WvE., Blume, W., Elger, C, Genton, P., Lee, P., Engel, JJr. 2005. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Apr;46(4):470-2.
74. Binnie CD. Cognitive impairment during epileptiform discharges: is it ever justifiable to treat the EEG? Lancet Neurol. 2003 Dec;2(12):725-30.

75. Engel J. Classifications of the International League Against Epilepsy: time for reappraisal. *Epilepsia* 1998; 39: 1014-7.
76. Berg AT, Vickrey BG, Testa FM, Levy SR, Shinnar S, DiMario F, Smith S. How long does it take for epilepsy to become intractable? A prospective investigation. *Ann Neurol*. 2006 Jul;60(1):73-9.
77. Engel J Jr. Report of the ILAE classification core group. *Epilepsia*. 2006 Sep;47(9):1558-68.
78. Schoenberg BS. Recent studies of the epidemiology of epilepsy in developing countries: a coordinated program for prevention and control. *Epilepsia* 1987; 28:721-2.
79. Kotsopoulos,I.A.W., van Merode,T., Kessels,F.G.H., De Krom,M.C.T.F., Knottnerus,J.A., 2002. Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. *Epilepsia* 43, 1402-1409.
80. International League Against Epilepsy. Epilepsy in developing countries. *Epilepsia* 1997;38 (10): 1143-51.
81. Alem MA. Epilepsy in malaria. *Epilepsia* 2005; 46: 601.
82. Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res*. 2009 Jul;85(1):31-45.
83. Loiseau,J., Loiseau,P., Duche,B., Guyot,M., Dartigues,J.F., Aublet,B., 1990. A Survey of Epileptic Disorders in Southwest France - Seizures in Elderly Patients. *Annals of Neurology* 27, 232-237.
84. Jallon,P., 1997. Epilepsy in developing countries. *Epilepsia* 38, 1143-1151.

85. Yeni,S.N., Epilepsi insidansı prevalansı ve risk faktörleri, Epilepsi, ed. Yeni,S.N., Bora, İ., Gürses, C., Nobel Tıp kitapevleri, 2008; 65-71.
86. Engel, J., Pedley, T., Epilepsy: A Comprehensive Textbook. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2 th Ed. 2008; 45-54.
87. Breadley, W.G., Daroff, R.B., Finechel, G.M., Jankovic, J., Neurology in Clinical Practice. Butterworth Heinemann. 4 th Ed. 2004; 1954.
88. ILAE: Commission report. The epidemiology of the epilepsise: Future directions. Epilepsia 1997; 38(5): 614 -618.
89. Anonymous. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia1989 Jul-Aug;30(4):389-99.
90. Wyllie, E., Gupta, A., Lachhwani, D.K., The Treatment of Epilepsy. Principles&Practice. Lippincott Williams & Wilkins. 4 th Ed. 2006; 110, 243.
91. Beghi E (2004) Aetiology of epilepsy. In Shorvon S& et.al. (eds) The Treatment of Epilepsy, 2nd ed. Blackwell Science Ltpdp 50–63.
92. Sander JW, Hart YM, Johnson AL & Shorvon SD (1990) National General Practice Study of Epilepsy: newly diagnosed epileptic seizures in a general population. Lancet 336(8726): 1267–1271.
93. Forsgren L, Bucht G, Eriksson S & Bergmark L (1996) Incidence and clinical characterization of unprovoked seizures in adults: a prospective population-based study. Epilepsia 37(3): 224–229.

94. Olafsson E, Hauser WA, Ludvigsson P & Gudmundsson G (1996) Incidence of epilepsy in rural Iceland: a population-based study. *Epilepsia* 37(10): 951–955.
95. Oun A, Haldre S & Mägi M (2003) Incidence of adult epilepsy in Estonia. *Acta Neurol Scand* 108(4): 245–251.
96. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*. 1993 May-Jun;34(3):453-68.
97. Björkman ST, Miller SM, Rose SE, Burke C, Colditz PB. Seizures are associated with brain injury severity in a neonatal model of hypoxia-ischemia. *Neuroscience*. 2010 Mar 10;166(1):157-67.
98. Tomson T. Mortality in epilepsy. *J Neurol*. 2000 Jan;247(1):15-21.
99. Hauser WA, Annegers JF, Elveback LR. Mortality in patients with epilepsy. *Epilepsia*. 1980 Aug;21(4):399-412.
100. Sperling MR, Feldman H, Kinman J, Liporace JD, O'Connor MJ. Seizure control and mortality in epilepsy. *Ann Neurol*. 1999 Jul;46(1):45-50.
101. Forsgren L, Hauser WA, Olafsson E, Sander JW, Sillanpää M, Tomson T. Mortality of epilepsy in developed countries: a review. *Epilepsia*. 2005;46 Suppl 11:18-27.
102. Waxman S.G. *Correlative Neuroanatomy*. Lange Medical Books/McGraw-Hill. 2002.
103. Rhoton A.L. *Microanatomy of Brain: Supratentorial cranial space and Posterior cranial fossa*. *Neurosurgery*. 2002 Oct 51. Suppl 1.

104. Afifi A.K., Bergman R.A. Functional Neuroanatomy Text and Atlas. 2th Edition. 2005. Lange Medical Books/McGraw-Hill.
105. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1998 Apr;54(5):581-618.
106. Zaidel D.W, Esiri M., Oxbury J.M.: Regional differentiation of cell densities in the left and right hippocampi of epileptic patients. *J Neurol.*1993; 240: 322.
107. Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc.* 2009 Sep;81(3):345-65.
108. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008 Jul 30;172(2):143-57. Epub 2008 Apr 26.
109. Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2002 Jun;50(1-2):105-23.
110. Dupuis N, Auvin S. Inflammation and epilepsy in the developing brain: clinical and experimental evidence. *CNS Neurosci Ther.* 2015 Feb;21(2):141-51
111. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the

- brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 1991 Nov-Dec;32(6):778-82.
112. Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci*. 2001 Feb;13(4):657-69.
 113. Annegers JF, Grabow JD, Groover RV, Laws ER Jr, Elveback LR, Kurland LT. Seizures after head trauma: a population study. *Neurology*. 1980 Jul;30(7 Pt 1):683-9.
 114. Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol*. 1989 Sep;26(3):321-30.
 115. Gorter JA, da Silva FH. Abnormal plastic changes in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy: a short review. *Prog Brain Res*. 2002;138:61-72.
 116. Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol*. 2009 Jul;5(7):380-91.
 117. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci*. 2013 Jan 5.
 118. Badawy, R.A., A.S. Harvey, and R.A. Macdonell, Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy - part 1. *J Clin Neurosci*, 2009; 16(3):355-65.
 119. Yiğit, A., *Epilepsi*. Veri Medikal Yayıncılık, 2008; 10-3.

120. Subutay-Öztekin, N., Epilepsi Fizyopatolojisi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji*. 2004; 2(2):97-101.
121. Engle, J.Jr., Kuhl, D.E., Phelps, M.E., Chandall, P.H.: Comparative localization of epileptic foci in patial epilepsy by PCT and EEG. *An Neurol*.1982; 12:529
122. Green, J.D., Petsche, H.: Hippocampal electrical activity. IV. Abnormal electric activity. *Electroencephalogr. Clin Neurophysion*.1961;13:868
123. Walton, N.Y., Gunawan, S., Treiman, D.M.: Brain Amino acid Concentration Changes during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. *Experimental Neurology*.1990; 108:61
124. Chapman, A.G., Meldum, B.S., Siesjo, B.K.: Cerebral metabolic changes during prolonged seizures in rats. *J Neurochem*.1977; 28:1025 (1977).
125. Cain, D.H., Boon, P., Bevan, M.: Failure of Aspartame to Affect Seizure susceptibility in kindled rats. *Neuropharmacology*.1989; 28:433
126. Roberts E., GABA-related phenomena, models of nervous system functin, and seizures. *Ann Neurol*. 1984 16(suppl): 77-89
127. Alexander, GM., Godwin, DW. 2006. Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res.*, 71(1);1-22.
128. Arzimanoglou A. General aspect. In: Arzimanoglou A, Guerrini R, Aicardi J (Eds.). *Aicardi's Epilepsy in Children* 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins;2004. p. 1-396.

129. Henriksen O and Wallace SJ. Definitions and classification of epileptic seizures and epilepsies. In: Wallace SJ and Farrell K (Eds.). *Epilepsy In Children* 2th ed. London: Arnold; 2004. p. 1-470.
130. Baykan B, Gürses C, Gökyiğit A. *Epilepsi*. Öge AE (Editörler). *Nöroloji'de*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2004. s.279-308.
131. Carpio A, Escobar A, Hauser WA. Cysticercosis and epilepsy: a critical review. *Epilepsia* 1998; 39: 1025-40.
132. Stafstrom, CE. 2006. Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 26(8); 983-1004.
133. Kang, JQ., Macdonald, RL. 2009. Making sense of nonsense GABA(A) receptor mutations associated with genetic epilepsies. *Trends Mol Med.*, 15(9); 430-8.
134. Kudin AP, Kudina TA, Seyfried J, Vielhaber S, Beck H, Elger CE, Kunz WS. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2002 Apr;15(7):1105-14.
135. Nasseh IE, Amado D, Cavaleiro EA, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Tengan CH. Investigation of mitochondrial involvement in the experimental model of epilepsy induced by pilocarpine. *Epilepsy Res*. 2006 Mar;68(3):229-39.
136. Şahiner, T., *Epilepside temel mekanizmalar*, *Epilepsi*, ed. Yeni, S.N., Bora,İ., Gürses, C., Nobel Tıp kitapevleri, 2008; 29-34.

137. Durlach J.P., Rouhani S., Bara S., , Guet-Bara M.,: The control of central
neuro Hyperexcitability in Magnesium Deficiency. *Nutrients and Brain
Function. Central neuro Excitability and magnesium Deficiency* (1987), p.48.
138. Aroniadou-Anderjaska, V., Fritsch, B., Qashu, F., Braga, MF. 2008.
Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and
epilepsy. *Epilepsy Res.* 78(2-3);102-16.
139. Roshan-Milani, S., Ferrigan, L., Khoshnood, MJ., Davies, CH., Cobb, SR.
2003. Regulation of epileptiform activity in hippocampus by nicotinic
acetylcholine receptor activation. *Epilepsy Res.*, 56(1);51-65.
140. Zimmerman, G., Njunting, M., Ivens, S., Tolner, EA., Behrens, CJ., Gross,
M., Soreq, H., Heinemann, U., Friedman, A. 2008. Acetylcholine-induced
seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically
epileptic rats. *Eur J Neurosci.* 27(4); 965-75.
141. Jouvenceau, A., Billard, JM., Lamour, Y., Dutar, P. 1996. Persistence of
CA1 hippocampal LTP after selective cholinergic denervation. *Neuroreport.*,
7(4);948-52.
142. Jouvenceau, A., Billard, JM., Lamour, Y., Dutar, P. 1997. Potentiation of
glutamatergic EPSPs in rat CA1 hippocampal neurons after selective
cholinergic denervation by 192 IgG-saporin. *Synapse*, 26(3);292-300.
143. Fujita S, Toyoda I, Thamattoor AK, Buckmaster PS. Preictal activity of
subicular, CA1, and dentate gyrus principal neurons in the dorsal
hippocampus before spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe
epilepsy. *J Neurosci.* 2014 Dec 10;34(50):16671-87.

144. Loscher Wolfgang .New vision in the pharmacology of anticonvulsion . Eur J Pharmacol 1998; 342: 1-13.
145. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. N Engl J Med. 2000 Feb 3;342(5):314-9.
146. Czuczwar, S.J., Borowicz, K.K., Polytherapy in epilepsy: the experimental evidence. *Epilepsy Res*, 2002; 52(1):15-23.
147. Sander, J.W., The use of antiepileptic drugs-principles and practice. *Epilepsia*, 2004; 45(S6):28-34.
148. Bora İ., Taşkapıoğlu Ö. Epilepsi tedavisinde yeni yönelimler. *Epilepsi* 2003 ;9(2):91-102.
149. Deckers C.L, Genton P,Sills G.J; Schmidt D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. *Epilepsy Res* 2003;53:1-17.
150. A Zhang Y, Xu Y, Zhu Q, Zhao F, Luo J, Zhang X, Wang X. Upregulation of dysbindin in temporal lobe epileptic foci of human and experimental animals. *Synapse*. 2012 Jul;66(7):622-9.
151. Fisher R.S. : animal models of the epilepsies. *Brain Research Reviews*, 1989; 14: 245- 278.
152. Elmer E, Kokaia M, McIntyre DC, Londavall O. Epileptogenesis induced by rapidly recurring seizures in genetically fast-but not slow-kindling rats. *Brain Res*. 1998;789: 111-17.
153. Mason CR, Cooper RM. A permanent change in convulsive treshold in normal and braindamaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia*. 1972;13:663-674.

154. McNamara JO. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. *Ann neurol.* 1984;168(suppl):S72-76.
155. Ono J, Vieth RF, Walson PD. Electrocorticographical observation of seizures induced by pentylenetetrazol injections in rats. *Funct Neurol.* 1990;5:345- 52.
156. Rossi R. Sensitization induced by kindling and kindling related phenomena as a model for multiple chemical sensitivity. *Toxicology* 1996;111:87- 100.
157. Schmoll H, Badan I, Grecksch G, Walker L, Kessler C, Popa-Wagner A. Animal Model: Kindling status in sprague-dawley rats induced by pentylenetetrazole. *Am J Pathology.* 2003;162:1027-1034.
158. Turski WA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983a) Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *EXS* 39:1408-1411.
159. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983b) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9:315-335.
160. Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, Mello LE, Leite JP (2006) The pilocarpine model of seizures. In: *Models of seizures and epilepsy* (Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL, eds), pp433-448. Boston: Elsevier Academic Press.

161. Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF (1987) The functional anatomy and pathology of lithium/pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neurosci* 23:953-968.
162. Liu Z, Nagao T, Desjardins GC, Gloor P, Avoli M (1994) Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. *Epilepsy Res* 17:247.
163. Melloa LE, Mendez-Oterob R (1996) Expression of 9-O-acetylated gangliosides in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 213:17-2.
164. Olney JW, Collins RC, Sloviter RS (1986) Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv Neurol* 44:857-877.
165. Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13316.
166. Maslansky JA, Powelt R, Deimengiant C, Patelt J (1994) Assessment of the muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced seizures in mice. *Neurosci Lett* 168:225-228.
167. Priel MR, Albuquerque EX (2002) Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. *Epilepsia* 43:40-46.
168. Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: Characterization in freely moving rats by microdialysis. *B J Pharmacol* 121:1171-1179.

169. Meurs A, Clinckers R, Ebinger G, Michotte Y, Smolders I (2008) Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. *Epilepsy Res* 78:50-59.
170. Honchar MP, Olney JW, Sherman WR (1983) Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 220:323-325.
171. Sharma AK, Jordan WH, Reams RY, Hall DG, Snyder PW (2008) Temporal profile of clinical signs and histopathologic changes in an F-344 rat model of kainic acid-induced mesial temporal lobe epilepsy. *Toxicol Pathol* 36:932-943.
172. Jope RS, Gu X (1991) Seizures increase acetylcholine and choline concentrations in rat brain regions. *Neurochem Res* 16:1219-1226.
173. Glien M, Brandt C, Potschka H, Voigt H, Ebert U, Löscher W (2001) Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: Low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Res* 46:111.
174. Ditcher M.A, Ayala G.F, Cellular mechanism of epilepsy: A status report, *Science* 1987 ; 237: 157-164.
175. Olney JW. Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol.* 1986;203:631-45.
176. Bradford HF, Peterson DW. Current views of the pathobiochemistry of epilepsy. *Mol Aspects Med.* 1987;9(2):119-72.
177. Verkhratsky A and Butt A (2007) *Glial neurobiology: a textbook.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.

178. Araque A and Navarrete M (2010) Glial cells in neuronal network function. *Philos T Roy Soc B* 365, 2375-2381.
179. Verkhratsky A (2010) Physiology of neuronal–glial networking. *Neurochem Int* 57, 332-343.
180. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M and Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91, 461-553.
181. Pellerin L and Magistretti PJ (2012) Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1152-1166.
182. Sofroniew MV and Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35.
183. Miron VE, Kuhlmann T and Antel JP (2011) Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochim Biophys Acta* 1812, 184-193.
184. Kishimoto N and Sawamoto K (2012) Planar polarity of ependymal cilia. *Differentiation* 83, S86-S90.
185. Vilhardt F (2005) Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37,17-21.
186. Czeh M, Gressens P and Kaindl AM (2011) The yin and yang of microglia. *Dev Neurosci* 33, 199-209.
187. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA and Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement dependent manner. *Neuron* 74, 691-705.

188. Ransohoff RM and Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119-145.
189. Lull ME and Block ML (2010) Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7, 354-365.
190. Smith JA, Das A, Ray SK and Banik NL (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87, 10-20.
191. Napoli I and Neumann H (2009) Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158, 1030-1038.
192. Bessis A, Béchade C, Bernard D and Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55, 233-238.
193. Saijo K and Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11, 775-787.
194. Graeber M and Streit W (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 89-105.
195. Phani S, Loike JD and Przedborski S (2012) Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 18, Supplement 1, S207-S209.
196. Rubio-Perez JM and Morillas-Ruiz JM. (2012) A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012, 756357.
197. Thiel A and Heiss W-D (2011) Imaging of microglia activation in stroke. *Stroke* 42, 507-512.

198. Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ. Epilepsy and brain inflammation. *Exp Neurol*. 2013 Jun; 244:11-21.
199. Yang L, Li F, Ge W, Mi C, Wang R, Sun R. Protective effects of naloxone in two-hit seizure model. *Epilepsia*. 2010 Mar;51(3):344-53.
200. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci*. 2001 Apr 15;21(8):2580-8.
201. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7527-33.
202. De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De Luigi A, Garattini S, Vezzani A. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*. 2000 Jul;12(7):2623-33.
203. Shapiro LA, Wang L, Ribak CE. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia*. 2008;49 Suppl 2:33-41.
204. Zheng H, Zhu W, Zhao H, Wang X, Wang W, Li Z. Kainic acid-activated microglia mediate increased excitability of rat hippocampal neurons in vitro and in vivo: crucial role of interleukin-1beta. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(1):31-8.

205. Beach TG, Woodhurst WB, MacDonald DB, Jones MW. Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*. 1995 May 19;191(1-2):27-30.
206. Aronica E, Leenstra S, van Veelen CW, van Rijen PC, Hulsebos TJ, Tersmette AC, Yankaya B, Troost D. Glioneuronal tumors and medically intractable epilepsy: a clinical study with long-term follow-up of seizure outcome after surgery. *Epilepsy Res*. 2001 Mar;43(3):179-91.
207. Boer K, Spliet WG, van Rijen PC, Redeker S, Troost D, Aronica E. Evidence of activated microglia in focal cortical dysplasia. *J Neuroimmunol*. 2006 Apr;173(1-2):188-95. Epub 2006 Feb 17.
208. Rosaria Donato. Intracellular and Extracellular Roles of s100 proteins *Microscopy Research and Technique* 2003; 60: 540-551.
209. B.W. Moore, A soluble protein characteristic of the nervous system, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 19,739– 744,1965.
210. Heinzmann WC, Fritt G, Schoter WB S100 Proteins: Structure, Functions and Pathology. *Frontiers in bioscience Zurich* 2002; 7: 1356: 1368.
211. Simon J. I. Sandler, Anthony A. Figaji, P. David Adelson. Clinical applications of biomarkers in pediatric traumatic brain injury. *Childs Nerv Syst* 2010; 26:205–213.
212. R. Donato, S100 proteins, *Cell Calcium*. 7 ,123-145. 1986.
213. R. Donato, Perspectives in S100 protein biology, *Cell Calcium*. 12, 713 – 726,1991.

214. R. Donato, Functional roles of S100 proteins, calcium binding proteins of the EF-hand type, *Biochim. Biophys Acta.* 1450,191 – 231,1999.
215. T. Nishikawa, I.S.M. Lee, N. Shiraishi, T. Ishikawa, Y Ohta, M. Nishikimi, Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage, *J. Biol. Chem.* 272 ,23 037–23 041,1997.
216. B.W. Schäfer, J.M. Fritschy, P. Murmann, H. Troxler, I. Durussel, C.W. Heizmann, J.A. Cox, Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily, *J. Biol. Chem.* 275 ,30 623 –30 630,2000.
217. B.C.M. Potts, J. Smith, M. Akke, T.J. Macke, K Okazaki, H. Hidaka, D.A. Case, W.J. Chazin, The structure of calyculin reveals a novel homodimeric fold for S100 Ca binding proteins, *Nature Struct. Biol.* 2 binding proteins.790–796 ,1995.
218. H. Matsumura, T. Shiba, T. Inoue, S. Harada, Y. Kai, A novel mode of target recognition suggested by the 2.0 Å structure of holo S100B from bovine brain, *Structure* 6 ,233–241,1998.
219. Re'ity, D. Osterloh, J.-P. Arie', S. Tabaries, J. Seeman,F. Russo-Marie, V. Gerke, A. Lewit-Bentley, Structural basis of the Ca²⁺-dependent association between S100 (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I, *Structure* 8 ,175–184,2000.

220. G. Sorci, R. Bianchi, I. Giambanco, M.G. Rambotti, R. Donato, Replicating myoblasts and fused myotubes Express the calcium-modulated proteins S100A1 and S100B, *Cell Calcium* 25 ,93–106. 1999.
221. Gattaz, W.F., Lara, D.R., Elkis, H., Portela, L.V., Goncalves, C.A., Tort, A.B., Henna, J., Souza, D.O., 2000. Decreased S100-beta protein in schizophrenia: preliminary evidence. *Schizophrenia research* 43: 91-95.
222. DB Zimmer, J Chaplin, A Baldwin, and M Rast. S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases. *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France), 51:201, 2005.
223. LJ Van Eldik and MS Wainwright. The janus face of glial-derived s100b: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative neurology and neuroscience*, 21:97-108,2003.
224. Steiner, J., Bernstein, H.G., Biela, H., Berndt, A., Brisch, R., Mawrin, C., Keilhoff, G., Bogerts, B., 2007. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neuroscience* 8: 2.
225. Pinto, S.S., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Karl, J., Goncalves, C.A., Wofchuk, S., Rodnight, R., 2000. Immunoreactivity and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letter* 486: 203-207.
226. Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta* 1793: 1008-1022.

227. Zimmer, D.B., Cornwall, E.H., Landar, A., Song, W., 1995. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Research Bulletin* 37: 417-429.
228. R Donato, G Sorci, F Riuzzi, C Arcuri, R Bianchi, F Brozzi, C Tubaro, and I Giambanco. S100b's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Bio-physica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793:1008{1022, 2009.
229. GE Davey, P Murmann, and CW Heizmann. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of s100b in human glioblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276:30819, 2001.
230. E Leclerc, E Sturchler, and SW Vetter. The s100b/rage axis in alzheimer's disease. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2010.
231. MA Hofmann, S Drury, C Fu, W Qu, A Taguchi, Y Lu, C Avila, N Kambham, A Bierhaus, P Nawroth, et al. Rage mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for s100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97:889-901, 1999.
232. T Koppal, AG Lam, L Guo, and LJ Van Eldik. S100b proteins that lack one or both cysteine residues can induce inflammatory responses in astrocytes and microglia. *Neurochemistry international*, 39:401-407, 2001.
233. Kaciński M, Budziszewska B, Lasoń W, Zając A, Skowronek-Bała B, Leśkiewicz M, Kubik A, Basta-Kaim A. Level of S100B protein, neuron specific enolase, orexin A, adiponectin and insulin-like growth factor in serum of pediatric patients suffering from sleep disorders with or without epilepsy. *Pharmacol Rep*. 2012;64(6):1427-33.

234. RH Selinfreund, SW Barger, WJ Pledger, and LJ Van Eldik. Neurotrophic protein s100beta stimulates glial cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88:3554-3558, 1991.
235. Y. Li, S.W. Barger, L. Liu, R.E. Mrak, W.S.T. Griffin, S100b induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons, *J. Neurochem.* 74,143-150. 2000.
236. M.A. Mariggio, S. Fulle, P. Calissano, I. Nicoletti, G.Fano , The brain protein S100ab induces apoptosis in PC12 cells, *Neuroscience* 60 ,29–35. 1994.
237. S. Fulle, T. Pietrangelo, M.A. Mariggio, P. Lorenzon, L.Racanicchi, J. Mozrzymas, S. Guarnieri, G. Zucconi-Grassi, G. Fano, Calcium and fos involvement in brainderived Ca²⁺-binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells, *Exp. Physiol.* 85 243–253. 2000.
238. C. Adami, G. Sorci, E. Blasi, A.L. Agneletti, F. Bistoni,R. Donato, S100B expression in and effects on microglia.*Glia* 33 ,131–142,2001.
239. Lu C, Li J, Sun W, Feng L, Li L, Liu A, Li J, Mao W, Wei H, Gao L, Zhang X, Huang Z, Meng X, Wang Y. Elevated plasma S100B concentration is associated with mesial temporal lobe epilepsy in Han Chinese: a case-control study. *Neurosci Lett.* 2010 Oct 29;484(2):139-42.
240. Dyck RH, Bogoch II, Marks A, Melvin NR, Teskey GC. Enhanced epileptogenesis in S100B knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002 Oct 15;106(1-2):22-9.

241. Griffin WS, Yeralan O, Sheng JG, Boop FA, Mrak RE, Rovnaghi CR, Burnett BA, Feoktistova A, Van Eldik LJ. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem*. 1995 Jul;65(1):228-33.
242. de Oliveira DL, Fischer A, Jorge RS, da Silva MC, Leite M, Gonçalves CA, Quillfeldt JA, Souza DO, e Souza TM, Wofchuk S. Effects of early-life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. *Epilepsia*. 2008 May;49(5):842-52.
243. Badman, M. K. and J. S. Flier (2005). "The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars." *Science* 307(5717): 1909-14.
244. Kieffer, T. J., C. H. McIntosh, et al. (1995). "Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV." *Endocrinology* 136(8): 3585-96.
245. Bullock, B. P., Heller, R. S. & Habener, J. F. 1996. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology*, 137, 2968-78.
246. Grieve, D. J., Cassidy, R. S. & Green, B. D. 2009. Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? *Br J Pharmacol*, 157, 1340-51.

247. Kreymann, B., Williams, G., Ghatti, M. A. & Bloom, S. R. 1987. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 2, 1300-4.
248. Buteau, J., Foisy, S., Joly, E. & Prentki, M. 2003. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes*, 52, 124-32.
249. Zander, M., Madsbad, S., Madsen, J. L. & Holst, J. J. 2002. Effect of 6 week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*, 359, 824-30.
250. Edavalath, M. & Stephens, J. W. 2010. Liraglutide in the treatment of type 2 diabetes mellitus: clinical utility and patient perspectives. *Patient Preference Adherence*, 4, 61-8.
251. Flint, A., Raben, A., Astrup, A. & Holst, J. J. 1998. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest*, 101, 515-20.
252. Nystrom, T., Gutniak, M. K., Zhang, Q., Zhang, F., Holst, J. J., Ahren, B. & Sjöholm, A. 2004. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287, E1209-15.
253. Vrang N, Hansen M, Larsen PJ, Tang-Christensen M. Characterization of brainstem preproglucagon projections to the paraventricular and dorsomedial hypothalamic nuclei. *Brain Res*. 2007 May 29;1149:118-26.

254. Mattson MP, Perry T, Greig NH. Learning from the gut. *Nat Med*. 2003 Sep;9(9):1113-5.
255. Perry, T., Haughey, N. J., Mattson, M. P., Egan, J. M. & Greig, N. H. 2002. Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 881-8.
256. Li Y, Perry T, Kindy MS, Harvey BK, Tweedie D, Holloway HW, Powers K, Shen H, Egan JM, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK, Mattson MP, Hoffer BJ, Wang Y, Greig NH. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 27;106(4):1285-90.
257. Bertilsson, G., Patrone, C., Zachrisson, O., Andersson, A., DANNAEUS, K., Heidrich, J., Kortessmaa, J., Mercer, A., Nielsen, E., Ronnholm, H. & Wikstrom, L. 2008. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, 86, 326-38.
258. Jin, H. Y., Liu, W. J., Park, J. H., Baek, H. S. & Park, T. S. 2009. Effect of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor (Vildagliptin) on peripheral nerves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Med Res*, 40, 536-44.
259. Kimura, R., Okouchi, M., Fujioka, H., Ichiyanagi, A., Ryuge, F., Mizuno, T., Imaeda, K., Okayama, N., Kamiya, Y., Asai, K. & Joh, T. 2009. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) protects against methylglyoxal-induced PC12 cell apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR/GCLc/redox signaling pathway. *Neuroscience*, 162, 1212-9.

260. Mcclean, P. L., Gault, V. A., Harriott, P. & Holscher, C. 2009. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: A link between diabetes and Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*.
261. Gengler, S., Mcclean, P. L., Mccurtin, R., Gault, V. A. & Holscher, C. 2010. Val(8)GLP-1 rescues synaptic plasticity and reduces dense core plaques in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging*.
262. Heppner KM, Kirigiti M, Secher A, Paulsen SJ, Buckingham R, Pyke C, Knudsen LB, Vrang N, Grove KL. Expression and distribution of glucagon-like peptide-1 receptor mRNA, protein and binding in the male nonhuman primate (*Macaca mulatta*) brain. *Endocrinology*. 2015 Jan;156(1):255-67.
263. Sharma MK, Jalewa J, Holscher C (2014) Neuroprotective and antiapoptotic effects of liraglutide on SH-SY5Y cells exposed to methylglyoxal stress. *J Neurochem* 128:459–471.
264. McClean PL, Hölscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2014 Jan;76 Pt A:57-67.
265. Ryan GJ, Hardy Y. Liraglutide: once-daily GLP-1 agonist for the treatment of type 2 diabetes. *J Clin Pharm Ther*. 2011 Jun;36(3):260-74.
266. Giorda CB, Nada E, Tartaglino B. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of DPP-4 inhibitors and GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes mellitus and renal or hepatic impairment. A systematic review of the literature. *Endocrine*. 2014 Aug;46(3):406-19.

267. Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5178-82.
268. Inagaki M, Gonda Y, Nishizawa K, Kitamura S, Sato C, Ando S. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical head domain. *J Biol Chem* 1990; 265:4722-9.
269. Goss JR, Finch CE, Morgan DG. Age-related changes in glialfibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiol Aging* 1991; 12:165-70.
270. Weinstein DE, Shelanski ML, Liem RK. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neuron. *J Cell Biol* 1991; 112:1205-13.
271. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: a comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 2000;31:2670-7.
272. Foerch C, Curdt I, Yan B, Neumann-Haefelin T, Steinmetz H, Sitzer M. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77:181-4.
273. Vos PE, van Gils M, Beems T, Zimmerman C, Verbeek MM. Increased GFAP and S100beta but not NSE serum levels after subarachnoid

- haemorrhage are associated with clinical severity. *Eur J Neurol* 2006; 13:632-8.
274. Jung CS, Foerch C, Schanzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain* 2007; 12:1-6.
 275. Nylén K, Csajbok LZ, Ost M, Rashid A, Blennow K, Nellgard B. Serum glial fibrillary acidic protein is related to focal brain injury and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2007; 38:1489-94.
 276. Watkins LR, Maier SF. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(12):973–85.
 277. Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. *Trends Neurosci* 2005;28(2):101–7.
 278. Xiong Z, O'Hanlon D, Becker LE, Roder J, MacDonald JF, Marks A. Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. *Exp Cell Res*. 2000 Jun 15;257(2):281-9.
 279. Schmitt A, Bertsch T, Henning U, Tost H, Klimke A, Henn FA, Falkai P. Increased serum S100B in elderly, chronic schizophrenic patients: negative correlation with deficit symptoms. *Schizophr Res*. 2005 Dec 15;80(2-3):305-13.
 280. Kligman D, Marshak DR. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Oct;82(20):7136-9.

281. Sorci G, Riuzzi F, Agneletti AL, Marchetti C, Donato R. S100B causes apoptosis in a myoblast cell line in a RAGE-independent manner. *J Cell Physiol.* 2004 May;199(2):274-83.
282. Gerlai R, Wojtowicz JM, Marks A, Roder J. Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learn Mem.* 1995 Jan-Feb;2(1):26-39.
283. Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):4037-42.
284. Sakatani S, Seto-Ohshima A, Shinohara Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Itohara S, Hirase H. Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J Neurosci.* 2008 Oct 22;28(43):10928-36.
285. Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ. The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience.* 1996 Apr;71(4):949-76.
286. Oses JP, Leke R, Portela LV, Lara DR, Schmidt AP, Casali EA, Wofchuk S, Souza DO, Sarkis JJ. Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylenetetrazol. *Brain Res Bull.* 2004 Sep 30;64(3):237-42.
287. Tang FR, Lee WL, Yeo TT. Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurocytol.* 2001 May;30(5):403-11.

288. Van Eldik LJ, Griffin WS. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Sep 29;1223(3):398-403.
289. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Gonçalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res*. 2001 Jan-Feb;35(1):11-4.
290. Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Tubaro C, Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem*. 2013 Feb 26;4(1):1-12.
291. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009 Feb 5;457(7230):675-7.
292. Silva, S.L. 2010. Molecular mechanisms of microglia reactivity to bilirubin: evaluation of potential neurological effects.
293. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 1;322(4):1111-22.

8. ÖZET

Lityum-pilokarpin ile indüklenmiş SE sonucu sıçan hipokampusunda oluşan mikroglia aktivasyonunun serum S100B düzeyi ile ilişkisi ve bir GLP-1 analogu olan liraglutidin bu değişiklikler üzerine etkisi

Bu çalışmanın amacı lityum-pilokarpinle indüklenen SE sonucu sıçan hipokampusunda oluşan mikroglial aktivasyonun serum S100B düzeyi ile arasındaki olası korelasyonun ve liraglutidin bu değişiklikler üzerine etkilerinin incelenmesidir.

Bu amaçla 24 adet erkek Sprague-Dawley ırkı sıçan 4 gruba ayrıldı. Gruplar şöyle planlandı: 1) Kontrol: Sıçanlara bir işlem uygulanmadı 2) Sham: 1. gün SF (127 mg/kg i.p.) uygulandı. 2. gün 30 dakikalık aralıklarla sırasıyla metilskopolamin-bromür (1mg/kg i.p.), (30 mg/kg i.p.), (10 mg/kg i.p.) ve diazepam (10 mg/kg i.p.) uygulandı. 3., 4., 5., 6., ve 7. günlerde herhangi bir işlem uygulanmadı. 3) SE: SE grubunda lityum-pilokarpin ile SE indüklenmiş hayvanlar yer aldı. Deney hayvanlarına pilokarpin enjeksiyonundan 24 saat önce lityum klorür (127 mg/kg i.p.) uygulandı. Pilokarpin 30 dakika arayla (30 mg/kg i.p.) ve (10 mg/kg i.p.) olarak iki doz uygulandı. Ayrıca pilokarpinden 30 dakika önce kolinerjik yan etkileri ortadan kaldırmak için sıçanlara metilskopolamin-bromür (1 mg/kg i.p.) verildi. SE süresi diazepam (10 mg/kg i.p.) ile kontrol altına alındı. 3., 4., 5., 6., ve 7. günlerde ölüm oranını azaltmak için bütün sıçanlara SF ve TPN solüsyonu verildi. 4) SE + Liraglutid: SE grubu deney protokolü (50 µg/kg, i.p.) liraglutid varlığında tekrarlandı. 8. gün 4 gruptaki sıçanların tamamından S100B

taini için kan alındı ve GFAP ve OX-42 tespiti için hipokampusları çıkarılarak fiksatif solüsyona konuldu.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre Kontrole göre SE + Liraglutid grubundaki S100B'nin yüksekliğinin liraglutidin litaretürde belirtilen nöroprotektif özelliklerinden kaynaklanması muhtemeldir. Ayrıca, SE grubunda CA1'deki OX-42(+) mikroglia sayısı ile kan S100B düzeyleri arasında yüksek düzeyde pozitif korelasyon S100B'nin patolojik odakla ilgili mikroglial aktivasyonu yansıtabileceğini düşündürmektedir. Bu ilişki daha ileri düzey çalışmalarla aydınlatılmalıdır.

OX-42 ekspresyonunun DG'ta çalışma grupları arasında istatistiksel olarak farklı bulunmaması nöroinflamasyonda esas olarak CA1 bölgesinin önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. OX-42 ekspresyonunun SE ve SE + Liraglutid gruplarında CA1'de kontrol değerlerine göre anlamlı olarak yüksek bulunması da CA1'in patolojik nöroinflamatuvar süreçlerde ön planda yer aldığını desteklemektedir.

Liraglutidin SE grubunda oluşan OX-42 ekspresyonu üzerinde bir etkisi olmamıştır. Ancak bu grupta, CA1 ve DG'ta GFAP(+) hücre sayıları arasında yüksek düzeyde korelasyonun olması liraglutidin hem CA1 hem de DG'ta nöroinflamatuvar süreçleri uyardığı şeklinde yorumlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, mikroglial aktivasyon, S100B, liraglutid

9. SUMMARY

The relationship between serum S100B levels and microglial activation in rat hippocampus after lithium-pilocarpine-induced SE and the affect of liraglutide, a GLP-1 analogue, on these changes

The purpose of this study was to investigate the probable correlation between serum S100B levels and microglial activation in rat hippocampus after lithium-pilocarpine induced SE and the effect of liraglutide on these changes.

Twenty-four rats (male, 200-250 gr, Sprague-Dawley) were assigned to 4 groups. 1) Control: No operation is applied to rats 2) Sham: 1. day, SF (127 mg/kg i.p.) was administered. 2. day, with 30 minutes intervals, respectively methylscopolamine-bromide (1 mg/kg i.p.), SF (30 mg/kg i.p.), SF (10mg/kg i.p.) and diazepam (10mg/kg i.p) were administered. 3., 4., 5., 6., and 7. days not implemented any action. SE) Lithium-pilocarpine-induced SE animals took place in SE group. 24 hours before pilocarpine injection lithium chloride (127 mg / kg, ip) were administered to experimental animals. Pilocarpine with the interval of 30 minutes as (30 mg / kg, ip), (10 mg / kg, ip) in two doses were administered. Also, to eliminate cholinergic side effects of pilocarpin, 30 minutes before, methylscopolamine-bromide (1 mg/kg, i.p.) was administered to the rats. SE durations in rats were controlled by diazepam (10 mg/kg, i.p). SF and TPN solutions were given to all rats to reduce the mortality rate on 3., 4., 5., 6., and 7. days. 4) SE + Liraglutide: SE group experiment protocol was repeated in the precence of (50 µg/kg, i.p.) liraglutide. On 8. day, for the determination of S100B

blood was drawn from all of the rats in 4 groups and hippocampi were removed and placed in fixative solution for determination of GFAP and OX-42.

According to our results, high levels of S100B in SE + Liraglutide group compared with the control group may be resulted from neuroprotective properties of liraglutide which are stated in literature. Besides, there is a high level positive correlation between OX-42(+) microglia number in CA1 area and blood S100B levels at SE group. This finding suggests that S100B may reflect microglial activation at relevant pathological focus that has to be investigated further.

We found that statistically OX-42 expression in DG do not statistically different between the groups. This mainly suggest that CA1 area has an important role at neuroinflammation. Moreover, OX-42 expression in CA1 in SE and SE + Liraglutide groups were statistically higher than Control group which supports that CA1 is taking place at the forefront of neuroinflammatory pathological processes.

There was no affect of liraglutide on OX-42 ekspression which occurred in SE group. But, at this group there was a high level of correlation between CA1 and DG GFAP(+) cell numbers which suggest that liraglutide may trigger neuroinflammatory processes both in CA1 and DG.

Key Words: Epilepsy, microglial activation, S100B, liraglutide

10. EKLER

10.1. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı

10.2. Deney Hayvanları Kursu Katılım Sertifikası

10.3. Tıpta İletişim Becerileri Temel Eğitimi Katılım Belgesi

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Murat

Soyadı: Kızıлтаş

Doğum Yeri ve Tarihi: Samsun 13.12.1976

Eğitimi: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Uzmanlık Eğitimi 2010-Halen

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü 2005

Samsun 19 Mayıs Lisesi 1993

Samsun Bozkut İlköğretim Okulu

Yabancı Dil: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Farmakoloji Derneği

Bilimsel Etkinlik:

1. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Çalışma Grubunun 20 Aralık 2010 tarihinde Ankara’da Düzenlediği ‘Türkiye’de Klinik Farmakolojinin Yeri ve Geleceği Çalışma Toplantısı

2. Yirmidokuzuncu Uluslararası Epilepsi Kongresinde p168 koduyla yer alan ‘The Effects of ketamine and dantrolene on the spatial learning in rats exposed to electroconvulsive seizures as a model of epilepsy’ 28 Ağustos – 1 Eylül 2011 Roma/ İtalya

3. Aprepitant faz II çalışmasında katılımcı