

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMPORAL LOB EPİLEPSİ MODELİNDE GRUP I
METABOTROPİK GLUTAMAT RESEPTÖR
EKSPRESYONU ÜZERİNE LAKOZAMİD'İN ETKİSİ**

Doç. Dr. Burçak BİLGİNER

**İleri Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2016**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMPORAL LOB EPİLEPSİ MODELİNDE GRUP I
METABOTROPİK GLUTAMAT RESEPTÖR
EKSPRESYONU ÜZERİNE LAKOZAMİD'İN ETKİSİ**

Doç. Dr. Burçak BİLGİNER

**İleri Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa BERKER**

**ANKARA
2016**

Anabilim Dalı :Klinik Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri
 Program :İleri Nörolojik Bilimler - Doktora
 Tez Başlığı :Temporal lob epilepsi modelinde grup 1 metabotropik glutamat reseptör ekspresyonu üzerine lakozamid'in etkisi

Öğrenci Adı-Soyadı :Burçak Bilginer
 Savunma Sınavı Tarihi :03.06.2016

Bu çalışma jürimiz tarafından [REDACTED] s/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve Tez Danışmanı : Prof.Dr.Mustafa Berker



Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof.Dr.Atilla Akbay



Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof.Dr.Fadime İrsel Filik Tezer



Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof.Dr.Nejat Akalan



Medipol Üniversitesi

Üye:

Doç.Dr.Hakan Emmez



Gazi Üniversitesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof.Dr. Diclehan ORHAN

Müdür

ÖZET

Bilginer, B. Temporal lob epilepsi modelinde grup I metabotropik glutamat reseptör ekspresyonu üzerine lakozamid'in etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İleri Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, 2016. Epilepsi bir hastalık ya da sendrom olmaktan çok beyin fonksiyonlarını etkileyen semptomlar kompleksidir. Gelişmiş ülkelerde oldukça sık rastlanan bir tablo olup, 100.000'de 20-70 arasında görülmektedir. Epilepsinin en sık görülen formu olan mesial temporal lob epilepsisi (mTLE) genellikle hipokampal sklerozla birlikte. Bu hastalardan alınan örneklerde hipokampal hücre yoğunluğunun hipokampal odaklı olmayan epilepsi hastalarına göre daha az olması hipokampal skleroz ve temporal lob epilepsi arasında bir ilişki olduğunu destekler bulgulardır. Glutamatla oluşan yaygın sinaptik uyarılma sonucu iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri ile etkileşim TLE patofizyolojisinde önemli etken olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı oluşturulan temporal lob epilepsi modelinde grup I metabotropik glutamat reseptör ekspresyonu üzerine bir antiepileptik ajan olan lakozamid'in etkilerini incelemektir. Böylece TLE etyopatogenezinin anlaşılmasına ve tedavi edilmesine katkı sağlanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada denekler 4 gruba ayrılmışlardır. Bunlar; Grup 1 Sham grubu (n=8): Sadece burr hole açılan, intrahipokampal enjeksiyon yapılmayan grup; Grup 2 Kontrol grubu (n=8): Burr hole açılarak, intrahipokampal serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılan ancak intrahipokampal kainik asit ve lakozamid uygulanmayan grup; Grup 3 Kainik asit (KA) grubu (n=8): Burr hole açılarak, intrahipokampal KA enjeksiyonu yapılan, ancak lakozamid tedavisi yerine 2 hafta boyunca intraperitoneal SF uygulanan grup; Grup 4 Lakozamid (LCS) grubu (n=8): Burr hole açılarak, intrahipokampal KA enjeksiyonu yapılan ve 2 hafta boyunca 50 mg/kg dozunda intraperitoneal LCS tedavisi uygulanan grup. Bu deneklere anestezi uygulandıktan sonra Rat Brain Atlas'tan faydalanılarak dorsal hipokampus hedeflenmiş ve sterotaksik çerçeve kullanılarak hamilton iğnesi yardımı ile hipokampal enjeksiyon yapılmıştır. Daha sonra denekler dekapite edilerek histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Histopatolojik olarak bakıldığında kontrol grup olarak kullanılan 2. Grup deneklerde hipokampusta skleroz görülmezken, grup 3 ve grup 4 deneklerde sklerozun olduğu gözlenmiştir. Enjeksiyonun yapıldığı taraf hipokampuslarda mGluR1 ve mGluR5 miktarları yüksek olarak bulundu. Lakozamid enjekte edilen grupta grup 1 mGluR ekspresyonu üzerine etki görülmedi. İntrahipokampal olarak enjekte edilen kainik asit sonrasında TLE modeli oluşturuldu. Yapılan immünohistokimya ve Western Blot çalışmaları sonucunda grup 1 mGluR ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmedi. Yine yeni bir antiepileptik ajan olan Lakozamid'in grup 1 mGluR ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisi görülmedi.

Anahtar Kelimeler: Kainik asit, lakozamid, epilepsi, temporal lob epilepsi, glutamate

ABSTRACT

Bilginer, B. The effect of lacosamide on expression of group 1 metabotropic glutamate receptors at temporal lobe epilepsy model. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Advanced Program in Neuroscience PhD Thesis, 2016. Rather than being a disease or a syndrome, epilepsy is conglomerate of symptoms that effect brain functions. It is a frequent condition with a prevalence of 20-70 per 100.000 population in developed countries. Hippocampal sclerosis accompanies the most common form of epilepsy – the mesial temporal epilepsy (mTLE). Histologic examinations of hippocampal specimens in patients with temporal lobe epilepsy shows a decreased cellular density compared to that of extrahippocampal epilepsy patients; this finding suggests a relation between hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy. It is accepted that interaction with ionotropic and metabotropic glutamate receptors due to widespread synaptic stimulation with glutamate, is an important factor in temporal lobe epilepsy. Our aim is to investigate the effects of lacosamide – an antiepileptic agent – on group I metabotropic glutamate receptor expression in a temporal lobe epilepsy model. Thus this study is thought to contribute the understanding of TLE etiopathogenesis and treatment. Subjects were divided into 4 groups. These are: Group 1 Sham (n=8): Only burr hole was performed without intrahippocampal injection; Group 2 Control (n=8): Burr hole and intrahippocampal saline injection without kainic acid and LCS; Group 3 Kainic acid (KA) group (n=8): Burr hole, intrahippocampal kainic acid injection and 2 weeks of intraperitoneal saline treatment without LCS; Group 4 Lacosamid (LCS) group (n=8): Burr hole, intrahippocampal KA injection and 50mg/kg intraperitoneal LCS treatment for 2 weeks. After anesthetizing animals, they were fixated in stereotactic frame. With the aid of coordinates shown in Rat Brain Atlas, injection was performed at dorsal hippocampus using a Hamilton needle. Soon animals were decapitated and histopathologic examination were performed. There was no hippocampal sclerosis in group 2 (control); however sclerosis was visualized in group 3 and 4. Measurements shows increased expressions of mGluR1 and mGluR5 on the side of injection. There was no effect of lacosamide injection on group 1 mGluR expression. We have performed a rat model of TLE with intrahippocampal kainic acid injection. Immunohistochemical and Western Blot studies shows that there is no significant increase in group 1 mGluR expression. Similarly the new antiepileptic drug lacosamide has no effect on group 1 mGluR expression.

Key Words: Kainic acid, lacosamide, epilepsy, temporal lobe epilepsy, glutamate

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| TABLolar DİZİNİ | xii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Epilepsi Tarihçesi | 3 |
| 2.2. Epilepsi Tanımı | 3 |
| 2.3. Epilepsi İnsidans ve Prevalansı | 4 |
| 2.4. Epilepside Etiyoloji | 4 |
| 2.5. Epilepsi Sınıflaması | 5 |
| 2.6. Epilepsi ve Genetik | 10 |
| 2.7. Epilepsinin Biyokimyası | 13 |
| 2.8. Hipokampus Anatomisi | 13 |
| 2.9. Hipokampal Skleroz | 16 |
| 2.10. Temporal Lob Epilepsisi | 19 |
| 2.11. Antiepileptik İlaçlar | 19 |
| 2.12. Lakozamid | 20 |
| 2.13. Deneysel Epilepsi Modelleri | 22 |
| 2.14. Temporal Lob Epilepsi Modelleri | 22 |
| 2.15. Glutamat Reseptörleri | 23 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 28 |
| 3.1. Deney Hayvanları ve Gruplar | 28 |
| 3.2. Anestezi | 29 |
| 3.3. Deneysel Epilepsi Modelinin Oluşturulması | 29 |
| 3.4. Lakozamid (LCS) Verilmesi | 32 |
| 3.5. Sakrifikasyon ve Dokuların Elde Edilmesi | 32 |

| | |
|---|----|
| 3.6. Histopatolojik Değerlendirme | 33 |
| 3.7. İmmünohistokimyasal Değerlendirme | 34 |
| 3.8. Western Blot (İmmunblotting) | 35 |
| 4. BULGULAR | 37 |
| 4.1. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular | 37 |
| 4.2. Western Blot | 49 |
| 5. TARTIŞMA | 52 |
| 6. SONUÇ | 59 |
| KAYNAKLAR | 60 |
| EKLER | |
| EK 1: Etik Kurul İzni | |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|------------------|---|
| ABC | Avidin-Biyotin Complex |
| AMPA | α -amino-3-hidroksi-5metil-4izoazolepropionik asit |
| CA | Cornu ammonis |
| Ca ²⁺ | Kalsiyum iyonu |
| DAB | 3,3',- diaminobenzidintetrahidroklorid |
| DG | Dentat girus |
| EC | Enthorinal cortex |
| EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit |
| EEG | Elektroensefalografi |
| ELİSA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| GABA | γ -amino-butirik asit |
| GAD | Glutamik asit dekarboksilaz |
| GFAP | Glial fibriler asidik protein |
| HE | Hematoksilen eozin |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HS | Hipokampal skleroz |
| Hz | Herz |
| ILAE | International League Against Epilepsy |
| iGluR | İyonotropik glutamat reseptörü |
| İH | İntrahipokampal |
| İHK | İmmünohistokimya |
| İP | İntraperitoneal |
| K ⁺ | Potasyum iyonu |
| KA | Kainik asit |
| LCS | Lakozamid |
| mGluR | Metabotropik glutamat reseptörü |
| M.Ö. | Milattan Önce |
| MRG | Manyetik rezonans görüntüleme |
| MTLE | Mezial temporal lob epilepsisi |
| Na ⁺ | Sodyum iyonu |

| | |
|-------|--|
| NMDA | N-metil-d-aspartat |
| PAGE | Poliakrilamid gel elektroforezi |
| PFA | Paraformaldehit |
| PLC | Fosfolipaz C |
| PMSF | Fenil metil sulfonil florür |
| PTZ | Pentilentetrazol |
| PVDF | Polivinilidin diflorür |
| RIPA | Radio Immuno Precipitation Assay |
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| SF | Serum fizyolojik |
| SPECT | Single Photon Emission Computed Tomography |
| TLE | Temporal lob epilepsisi |
| WB | Western blot |

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1. Hipokampusun kesitsel görüntüsü. | 15 |
| 2.2. Hipokampal formasyon. İmmunhistokimya boyama sonrasında hipokampus iç yapısının görünümü. Sağ taraf normal iç yapı, sol taraf sklerotik hipokampus görünümü. | 17 |
| 2.3. Lakozamidin olası etki mekanizması. | 21 |
| 2.4. Glutamat reseptör tipleri ve etkileri. | 23 |
| 2.5. Glutamat reseptör alt tipleri, transmembran yapıları ve etki mekanizmaları. | 25 |
| 2.6. Eksitator sinapslarda metabotropik glutamat reseptörlerinin dağılımı ve sinaptik modülatör işlevleri. | 26 |
| 2.7. Glutamat reseptörleri, sinaptik dağılımı ve etkileşimi. | 27 |
| 3.1. İntrahipokampal kainik asit enjeksiyonu. A) Sıçan beyinde hipokampusun izdüşümü ve intrahipokampal enjeksiyon rotası. B) Kainik asitin kimyasal formülü. | 30 |
| 3.2. Sıçan beyin atlasında dorsal hipokampus ve enjeksiyon bölgesinin koordinatları. | 31 |
| 3.3. Stereotaksik çerçeveye yerleştirilen sıçanda intrahipokampal enjeksiyon düzeneği. | 32 |
| 3.4. Torakotomi ve intrakardiyak perfüzyon. | 33 |
| 3.5. İmmünhistokimyasal boyama aşamaları. | 34 |
| 3.6. Western blot aşamaları. | 36 |
| 4.1. Kontrol grubu, normal hipokampus, HE boyası (A, Aa), mGluR-1 (B, Bb) ve mGluR-5 antikorlarıyla (C, Cc) boyalı kesitler (A, B ve C 4X; Aa, Bb ve Cc 10X büyütme). | 38 |
| 4.2. İmmünohistokimya - Kontrol Grubu (normal hipokampus); mGluR - 1 (A (4x) ve B (10x)) ve mGluR - 5 antikorlarıyla (C (4x) ve D (10x)) boyanma paternleri. | 39 |
| 4.3. Kainik asit enjeksiyonu sonrası hipokampal skleroz. HE boyalı kesitler. A) 4x B) 10x C) 40x. | 41 |

- 4.4. Kainik asit enjeksiyonu sonrası hipokampal skleroz. A-C lezyonun karşı tarafı, B-D lezyon tarafı (hipokampal skleroz). 41
- 4.5. Kainik asit enjeksiyonu ile oluşturulan hipokampal sklerozun HE boyası (A, Aa), mGluR-1(B, Bb) ve mGluR-5 (C, Cc) antikorlarıyla boyanma paterni. 42
- 4.6. Lakozamid grubunda hipokampusların HE boyaması. A) enjeksiyonun karşı tarafı (normal hipokampus); B) enjeksiyon tarafı (hipokampal skleroz). 44
- 4.7. Lakozamid uygulaması sonrası hipokampal sklerozdaki değişim. HE boyalı kesitler. A) 4x B) 10x C) 40x D) 100x. 45
- 4.8. Lakozamid uygulanması sonrasında hipokampusta immünohistokimyasal boyama. mGluR-1 (A-C) ve mGluR-5 (B-D) antikorlarıyla boyanma paterni. 46
- 4.9. Hipokampus örneklerinde Western Blot membranlarının görüntüsü. 51
- 4.10. Korteks örneklerinde Western Blot membranlarının görüntüsü. 51

TABLOLAR

| | Sayfa |
|--|-------|
| 2.1. Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması (ILAE 1981). | 6 |
| 2.2. Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması (ILAE 1989). | 8 |
| 2.3. Epilepsi ile ilişkili genler. | 11 |
| 2.4. Mendelyan kalıtmılı epilepsilerde tanımlanan genler. | 12 |
| 2.5. Hipokampal skleroz sınıflaması (ILAE 2013). | 18 |
| 4.1. Histopatolojik değerlendirmede etkilenen hipokampus bölgelerinin skleroz derecesinin dağılımı ve antikorlarla boyanma derecesi. | 48 |
| 4.2. Hipokampus ve korteks örneklerinin mGluR1 ve 5 içeriğine dair Western Blot ile elde edilen normalize edilmiş değerler. | 50 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Temporal lob epilepsisi, lokalizasyonla ilişkili epilepsilerin yaklaşık üçte ikisini oluşturmaktadır. Gerek klinik, gerekse de elektrofizyolojik ve radyolojik özellikleri oldukça iyi anlaşılmış olan bu epilepsi türüne erişkin çağda çok daha sıklıkla rastlanmaktadır. Febril konvülsiyonlar temporal lob epilepsisinde en sık görülen risk faktörleri arasındadır. Nöbetler bu formda genellikle erken erişkin çağda ortaya çıkar. Uzun süreli elektroensefalografi (EEG) monitörizasyonunda temporal lob başlangıçlı nöbetler %90 oranında kaydedilebilir. Manyetik rezonans görüntüleme, hipokampal atrofinin yanı sıra saptanan hipokampal intensite artışı önemlidir. Cerrahi girişim sonrası alınan hipokampal dokuların patolojik incelemesinde hipokampusta CA1, CA3, CA4 ve dentat granül hücrelerinde nöronal kayıp dikkati çeker.

Elektrofizyolojik, radyolojik ve patolojik gelişmelerin hipokampal skleroz ve epilepsi ilişkisinin aydınlatılmasında önemli katkılar sağladığı ortadadır. Ancak temporal lob epilepsilerine yol açan moleküler mekanizmalar bugün halen tam olarak aydınlatılamamıştır. İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerinin temporal lob epilepsisinin patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda temporal lob epilepsi hastalarından alınan hipokampal rezeksiyon materyallerinde ve hayvan deneylerinde iyonotropik glutamat reseptörleri olan NMDA, AMPA ve kainat reseptörlerindeki değişiklikler ayrıntılı olarak çalışılmıştır ancak literatürde epilepside metabotropik glutamat reseptör ekspresyonunu ve fonksiyonunu araştıran çalışma sayısı son derece kısıtlıdır. Bununla birlikte metabotropik glutamat reseptörlerinin modülasyonunun epileptogenezde ve nöbetlerin indüksiyonunda ve önlenmesinde rolü olabileceğine dair kanıtlar son yıllarda ortaya konulmaktadır. Özellikle yan etki profilinin düşük olması nedeniyle klasik antiepileptik ajanlara alternatif olabileceği düşünülen mGluR agonist ve antagonistleri giderek daha çok ilgi görmektedir.

Metabotropik glutamat reseptörleri, G-proteinleri ile ilişkiye girerek presinaptik inhibisyon ve postsinaptik eksitasyona yol açarlar. Bu

reseptörlerin birinci grubu içinde yer alan mGluR1 ve mGluR5 alt grupları hipokampal CA1 ve CA2 sektörlerinde bulunurlar. Modölatör etkilerinin olduğu bilinen ve beyinde yaygın olarak bulunan grup 1 metabotropik glutamat reseptörlerinin nöbet fizyopatolojisinin ortaya konması açısından önemli biyokimyasal parametreler olduklarını düşünmekteyiz.

Biz yaptığımız çalışmada deneklerin hipokampusuna direk olarak enjekte ettiğimiz kainik asit sonrasında oluşturduğumuz hipokampal skleroz modelinde; grup 1 metabotropik glutamat reseptörleri olan mGluR1 ve mGluR5'in ekspresyonu üzerine yeni bir antiepileptik ajan olan lakozamid'in etkilerini incelemeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsinin Tarihçesi

Kelime olarak “epilepsi”, tarihi insanlığın başlangıcına kadar giden ve Yunanca tutukluk yapmak anlamında kullanılan “Epilambanein” kelimesinden türemiş bir sözcüktür. Epilepsi ile ilgili ilk bilgilere M.Ö. 2080 yılında yayımlandığı düşünülen Hammurabi kanunlarında rastlanmaktadır. Bu yazıda nöbet ile ateş arasında bir ilişki olduğundan bahsedilmektedir. Yine M.Ö. 1067 yıllarında Akatlar tarafından kaleme alınan Sakikku metninde epilepsiden bahsedilmektedir. Hipokrat M.Ö. 460 yılında yazdığı “On the sacred disease” adlı eserinde epilepsinin beyin dokusundan kaynaklandığını belirtmiş ve epilepsiye “mal caduque” adını vermiştir. Kaşgarlı Mahmut yazdığı “Divan’ü Lügat-it Türk” adlı eserinde nöbet kelimesi yerine kullanılan “talgan” kelimesinden sıkça bahsetmiştir (1).

Çağdaş anlamda epilepsinin tanımlanmasındaki en önemli adım 19. yüzyılda İngiliz bilim adamı John Huglins Jackson tarafından atılmış ve epilepsiyi beynin gri cevherinin akut ve lokal deşarjları olarak tariflemiştir. Daha sonra Gowers epilepsi ile ilgili ilk sınıflamayı yapmış ve Hans Berger de ilk kez insanlarda EEG çekerek beyin dalgalarını göstermiştir. Epilepsi ile ilgili ilk beyin ameliyatı ise yine İngiliz beyin cerrahı Victor Horsley tarafından 1886 yılında başarı ile uygulanmıştır (1).

2.2. Epilepsi Tanımı

Epileptik nöbet beyindeki nöronların aşırı ve hipersenkron aktivitesi sonucu ortaya çıkan nörolojik bir işlev bozukluğudur. Özellikle 1929 yılında Hans Berger’in beyinde oluşan aksiyon akımlarını kaydetmesinden sonra fizyopatolojik anlamda epilepsi çok farklı boyutlara taşınmıştır. Bugünkü çalışmaların ışığında epilepsinin; inhibisyonun azalıp, dengenin eksitasyon lehine bozulması sonucu oluşan uzamış nöronal senkron deşarjlarına bağlı olduğu söylenmektedir. Hücresel düzeyde oluşan bu hipereksitabilite ve hipersenkronizasyon sonucu görülen biyokimyasal değişiklikler epilepside altta yatan anormal elektriksel aktiviteye neden olmaktadır (2). Ancak bir nöronun anormal deşarjı her zaman klinik nöbet oluşturmak için yeterli

değildir. Bu anormal deşarjlar geniş bir nöronal ağ içerisinde ise klinik nöbete neden olurlar. İnhibitör transmitter maddeler hücrede hiperpolarizasyona neden olup hücre zarının daha zor deşarj olmasını sağlarken, eksitatör olan maddeler hücre zarındaki potansiyel farkını azaltarak daha kolay depolarizasyona neden olurlar. Dolayısıyla oluşan sinaptik etki eksitatör ise, deşarjların ard arda yinelenmesine neden olarak komşu nöronlarla senkronizasyon sonucu epileptik nöbetin temelini oluşturur (2,3).

2.3. Epilepsi İnsidans ve Prevalansı

Toplumlara ve yapılan istatistiksel çalışmaların yöntemlerine göre değişmekle birlikte epilepsinin gelişmiş ülkelerdeki insidansı 100.000 de 20-70 arasında değişmektedir. Erkeklerde görülme oranı kadınlara göre biraz daha fazladır. Bunun nedeni olarak erkeklerin travmaya daha fazla maruz kaldıkları gibi etkenler gösterilmiştir. Dünya Sağlık Örgütünün yaptığı çalışmalarda epilepsi prevalansı 1000 de 6 olarak belirtilmiştir (4,5).

Genel anlamda bakıldığında parsiyel nöbetler, tüm yaş gruplarında en yaygın nöbet tipidir ve bu nöbetler çocukluk çağı nöbetlerinin %50'sinden daha fazlasını oluşturur. Kompleks parsiyel nöbetler ise en yaygın alt tiptir. Jeneralize nöbetler çocuklarda erişkinlere nazaran daha siktir (4).

2.4. Epilepside Etyoloji

Epilepsi, altında yatan nedenler göz önüne alındığında oldukça heterojen bir tablodur. Özellikle iyonik kanallarda iletim bozukluğuna yol açabilecek moleküler kanal değişiklikleri, inhibitör nörotransmitterlerde yetersizliğe yol açabilecek tablolar ve iyon pompalama ve repolarizasyonunu düzenleyen enzimlerin yetersizliği gibi durumlarda nöbet görülme sıklığı artar.

Edinsel nedenler içinde kafa travmaları, enfeksiyonlar, santral sinir sistemi tümörleri, damar hastalıkları, iskemik inme ve beyin kanamaları en sık nedenler arasındadır. Bunların dışında Lafora, MERRF, Lipofuksinozlar, Tuberoskleroz, Angelman, MELAS ve Aicardi gibi bir takım metabolik hastalıklar özellikle çocukluk çağında nöbetlere neden olabilirler (3,4).

2.5. Epilepsi Sınıflaması

Oldukça karmaşık bir semptomlar topluluğu şeklinde karşımıza çıkan epilepsinin sınıflandırılması çalışmaları ilk olarak 1954 yılında Penfield ve Jasper tarafından yapılmıştır. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği'nin (International League Against Epilepsy, ILAE) 1981'de yayınladığı epilepsi sınıflaması (Tablo 2.1) günümüzde halen geçerliliğini koruyan bir sınıflamadır (6,7).

Günümüzde gerek görüntüleme, gerek moleküler düzeyde yapılan çalışmalar ve gerekse de cerrahideki gelişmelerin ışığında Lüders ve arkadaşları 1998 yılında semiyolojik bir nöbet sınıflaması önermişlerse de uzun tartışmaların ardından ILAE 2010 yılında epilepsi sınıflamasını güncellemiştir (8).

Epileptik sendromlara bakıldığında ise karşımıza daha tipik nöbet tipleri ile giden ve belli bir yaş grubunda görülen tablolar çıkmaktadır. 1989 yılında ILAE tarafından epilepsi ve epileptik sendromlar başlığı altında yeni bir sınıflandırma yapılmıştır (Tablo 2.2). Bugün halen ILAE'nin 1981 nöbet sınıflaması ve 1989 epilepsi sendrom sınıflaması ana sınıflamalar olarak geçerliliklerini korumaktadır (6).

Tablo 2.1. Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması (ILAE 1981).

| |
|---|
| <p>PARSİYEL (lokal, fokal) NÖBETLER</p> <p>1. Basit Parsiyel Nöbetler (bilinç durumunda bozulma olmaksızın)</p> <p>a) Motor bulgularla seyreden</p> <ul style="list-style-type: none"> Yaygınlaşmayan fokal motor Yaygınlaşan fokal motor (jacksonien) Versiv Postural Fonotubar <p>b) Somatosensoryel veya spesifik duyuşsal semptomlu</p> <ul style="list-style-type: none"> Somatosensoryel Vizüel Oditubar Olfaktör Gustatör Vertijinjöz <p>c) Otonomik semptom ve bulguları olan (epigastrik his, korku, terleme, pupil dilatasyonu vb.)</p> <p>d) Psişik belirtilerle seyreden (yüksek kortikal fonksiyonlarda bozulma)</p> <ul style="list-style-type: none"> Disfazik Disamnezik (deja vu) Kognitif (düşsel hal, zaman duyumunun bozulması) Affektif (korku, öfke) İlüzyon (makropsi) Biçimlenmiş halusinasyonlar (müzik, manzara) <p>2. Kompleks Parsiyel Nöbetler (bilinç bozukluğu ile giden)</p> <p>a) Basit parsiyel başlangıcı bilinç bozukluğunun izlediği</p> <ul style="list-style-type: none"> Basit parsiyel nöbeti bilinç bozukluğunun izlemesi ile Otomatizm ile <p>b) Bilinç durumunun başlangıçtan itibaren bozulduğu</p> <ul style="list-style-type: none"> Yalnız bilinç bozukluğu ile Otomatizm ile |
|---|

Tablo 2.1. (Devam) Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması (ILAE 1981).

| |
|---|
| <p>3. Sekonder jeneralize olan parsiyel nöbetler</p> <p>Jeneralize nöbete dönüşen basit parsiyel nöbetler</p> <p>Jeneralize nöbete dönüşen kompleks parsiyel nöbetler</p> <p>Basit parsiyelden, kompleks parsiyele ve jeneralize nöbetlere dönüşenler</p> |
| <p>JENERALİZE NÖBETLER (Konvülsif ve Konvülsif olmayan)</p> <p>1. Absans Nöbetleri</p> <p>a) Tek veya diğerleri ile birlikte</p> <p>Yalnız bilinç bozukluğu ile</p> <p>Hafif derecede klonik özelliği olan</p> <p>Atonik özellikleri olan</p> <p>Tonik özellikleri olan</p> <p>Otomatizm ile</p> <p>Otonomik özellikleri olan</p> <p>b) Atipik absanslar</p> <p>Motor semptomlu, basit parsiyel nöbetlerden daha az belirgin olanlar</p> <p>Ani başlamayan ataklar</p> <p>c) Miyoklonik Nöbetler (tek veya multipl jerkler)</p> <p>d) Klonik Nöbetler</p> <p>e) Tonik Nöbetler</p> <p>f) Tonik-klonik Nöbetler</p> <p>g) Atonik Nöbetler (Astatik)</p> |
| <p>SINIFLANDIRILAMAYAN EPİLEPTİK NÖBETLER</p> |

Tablo 2.2. Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması (ILAE 1989).

| |
|---|
| <p>LOKALİZASYONLA İLGİLİ (Fokal, Lokal, Parsiyel)</p> <p>a) İdiyopatik (yaşla ilgili ataklar)</p> <p>Sentro temporal dikenli benign çocukluk epilepsisi Oksipital paroksizmlerle giden çocukluk epilepsileri Primer okuma ile giden epilepsi</p> <p>b) Semptomatik</p> <p>Çocukluk çağının progresif epilepsia parsialis kontinuası (Kojewnikow Sendromu) Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar Temporal, frontal, parietal, oksipital lob epilepsileri</p> <p>c) Kriptojenik (semptomatik ama etiyojisi bilinmeyen)</p> <p>Temporal, frontal, parietal, oksipital lob epilepsileri</p> |
| <p>JENERALİZE EPİLEPSİ VE SENDROMLAR</p> <p>a) İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç)</p> <p>Bebeklik dönemi benign miyoklonik epilepsisi Benign neonatal familyal konvulsiyonlar Benign neonatal konvulsiyonlar Çocukluk çağında görülen absans tipi epilepsisi (piknolepsi) Juvenil çağ absans epilepsisi Juvenil çağ myoklonik epilepsisi (impulsif petit mal) Uyanma sırasında ortaya çıkan jeneralize tonik-klonik nöbetler Uyarıcı spesifik durumlarla çabuklaştırılmış epilepsiler</p> <p>b) Kriptojenik veya semptomatik epilepsiler (yaşa göre)</p> <p>West sendromu (infantil spazmlar, Blitz-Nick-Salaam Kraempfe) Lennox Gastaut Miyoklonik astatik nöbetli epilepsi Miyoklonik absansla karakterize epilepsiler</p> <p>c) Semptomatik (Non-spesifik etyolojili)</p> <p>Erken miyoklonik ensefalopati Süpresyon burst ile bebekliğin erken epileptik ensefalopatisi Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler Spesifik nörolojik hastalıklara bağlı semptomatik epilepsiler</p> |

Tablo 2.2. (Devam) Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması (ILAE 1989).

| |
|---|
| <p>FOKAL VEYA JENARALİZE OLUP OLMADIKLARI BELİRLENEMEYEN EPİLEPSİLER VE SENDROMLAR</p> <p>a) Jeneralize ve fokal nöbetler birlikte</p> <ul style="list-style-type: none">Neonatal nöbetlerBebeklik dönemi ciddi miyoklonik epilepsiYavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken dalgalı epilepsiKazanılmış epileptik afazi(Landau-Klefner Sendromu)Diğer belirlenemeyen epilepsiler <p>b) Belirli fokal veya jeneralize bulgusu olmayanlar</p> |
| <p>ÖZEL SENDROMLAR</p> <p>a) Belirli durumlarla ilgili nöbetler</p> <ul style="list-style-type: none">Febril konvülsiyonlarİzole nöbetler veya izole status epileptikusAkut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler |

2.6. Epilepsi ve Genetik

Epilepsi ile ilgili genetik çalışmalar 1990'lı yıllarda başlamış ve 1995 yılında CHRNA4 gen mutasyonunun otozomal dominant noktural epilepsiye neden olduğu bulunmuştur. Daha sonra SCN1A, SCN1B ve GABRB2 gibi genlerdeki mutasyonların monogenik epilepsiye neden oldukları gösterilmiştir. 2009 yılında epilepsi ile ilişkili mikrodelsyonların tanımlanmasıyla epilepsi alanında genetik anlamda büyük gelişmelerin önü açılmıştır. Epilepsi ile ilişkili bazı genler tablo 2.3'de verilmiştir.

Epilepsi ile gelen hastaların yaklaşık %40'ında multifaktöryel bir kalıtımın olduğu bilinmektedir. Epileptik hastaların birinci derece yakınlarında nöbet riski %12'lere kadar çıkmakta iken bu oran normal popülasyonda yaklaşık %0,5 civarındadır. Mendelyan kalıtım gösteren 200'den fazla hastalığa bugün nöbetlerin eşlik ettiği bilinmektedir (Tablo 2.4).

Çocukluk çağında görülen idiopatik jeneralize epilepsilerin çok büyük bir kısmında pozitif aile hikayesi vardır. Bu oran monozigotik ikiz çalışmalarında %95'lere kadar çıkmaktadır ki bu da jeneralize epilepsi etyolojisinde genetik bir neden olduğunu destekler.

Yapılan epileptogenetik çalışmalar epilepsinin X'e bağlı, otozomal, multifaktöryel ve kompleks kalıtım modelleri gibi pek çok genetik geçiş yollarının olduğunu göstermiştir. Tüm gen DNA dizi analizleri bu hastalık ile ilgili kompleks genetik mekanizmaları ortaya koymaktadır (8).

Tablo 2.3. Epilepsi ile ilişkili genler.

| İlişkili Sendrom | Genler |
|--|----------------------------|
| Absans | CACNA1A |
| Ailesel infantil myoklonik epilepsi | TBC1D24 |
| Benign ailesel infantil konvülsiyon | ATP1A2 |
| Benign neonatal ailesel konvülsiyon | KCNQ2- KCNQ3-SCN2A |
| Çocukluk çağı absans epilepsi | CLCN2- GABRG2 |
| Dravet sendromu | SCN1A |
| Erken infantil epileptik ensefalopati | ARX-STXBP1 |
| Erken başlangıçlı absans epilepsi | SLC2A1 |
| Febril nöbetle birlikte genetik epilepsi | GABRD- SCN1A-SCN1B-SCN2A |
| Gelişim bozukluğuyla birlikte fokal epilepsi | TBC1D24 |
| İnfanıl spazm | ARX |
| Juvenil myoklonik epilepsi | CACNB4-CHNRA7-EFHC1-GABRA1 |
| Otozomal dominant noktürnal frontal lob epilepsisi | CHRNA4- CHRNB2 |
| Otozomal dominant işitsel özellikli parsiyel epilepsi | LGI1 |
| Paroksizmal diskenezi ile birlikte jeneralize epilepsi | KCNMA1 |

Tablo 2.4. Mendelyan kalıtlı epilepsilerde tanımlanan genler.

| Alt grup | Fenotip | Gen |
|--|---|-------------------|
| <i>a) İdiyopatik epilepside iyon kanal genleri</i> | | |
| Sodyum kanalları | Febril nöbetle birlikte jeneralize epilepsi | SCN1A-SCN1B-SCN2A |
| Potasyum kanalları | Benign neonatal ailesel konvülsiyon | KCNQ2- KCNQ3 |
| Klor kanalları | İdiyopatik Jeneralize epilepsi | CLCN2 |
| Nikotinik asetilkolin reseptörleri | Otozomal dominant noktürnal frontal lob epilepsisi | CHRNA4- CHRNB2- |
| GABA A reseptörleri | İdiyopatik Jeneralize epilepsi Febril nöbetle birlikte jeneralize epilepsi | GABRG2/GABRA1 |
| <i>b) İdiyopatik epilepside iyon kanalı olmayan genler</i> | | |
| Fonksiyonu bilinmeyen | Otozomal dominant lateral temporal epilepsisi | LG11 |
| G-proteinine bağlı reseptörler | Febril nöbet | MASS1/VLGR1 |
| <i>c) Progresif myoklonik epilepsiler</i> | | |
| Poliglikozan metabolizması | Lafora hastalığı | EPM2A/EPM2B |
| Respiratuar zincir | Myoklonik epilepsi ve 'ragged red fibers' | MTTK /MTTL1 |
| Sistein proteaz inhibisyonu | Lundborg hastalığı | CSTB |
| Glikopeptit/ oligosakkarit | Sialidozis metabolizması | NEU1 |
| Lipidozis | İnfanıl nöronal seroid lipofuksinozis | PPT |
| | Geç infanıl nöronal seroid lipofuksinozis | CLN2 |
| | Jüvenil nöronal seroid lipofuksinozis | CLN3 |
| | Geç infanıl nöronal seroid lipofuksinozis | CLN5 |
| | Geç infanıl nöronal seroid lipofuksinozis | CLN6 |

2.7. Epilepsinin Biyokimyası

Merkezi sinir sisteminin en önemli eksitatör nörotransmitteri glutamattır. Bu eksitatör yolların aşırı aktivasyonu epileptik aktiviteden ölüme kadar giden bir takım yolları aktive eder (4).

Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik olarak iki gruba ayrılırlar. İyonotropik reseptörler AMPA, kainat ve NMDA olmak üzere 3 alt tipe ayrılırlar. AMPA reseptörleri merkezi sinir sisteminde oldukça yaygındırlar ve hızlı eksitatör iletimden sorumludurlar. NMDA reseptörleri Na^+ ve Ca^{+2} 'un hücre içine K^+ 'un ise hücre dışına akışını sağlarlar. Kainat reseptörleri de hipokampus bölgesinde bulunurlar ve düşük ile yüksek affiniteli olmak üzere değişik alt grupları vardır.

Metabotropik reseptörler G-proteinleriyle ilişkiye girerek presinaptik inhibisyon ve postsinaptik eksitasyona yol açarlar. Bu reseptörler üç gruba ayrılmışlardır. Birinci grup (mGluR1-5) hipokampal CA1 ve CA2'de bulunurlar. İkinci grup (mGluR2,3,8) serebellar golgi, neokorteks ve hipokampusta bulunur. Üçüncü grup (mGluR 4,6,7) ise serebellumda bulunur.

Glutamaterjik sinapslar epilepside kritik öneme sahiptirler ve hem ionotropik hem de metabotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu prokonvulsan etki gösterir.

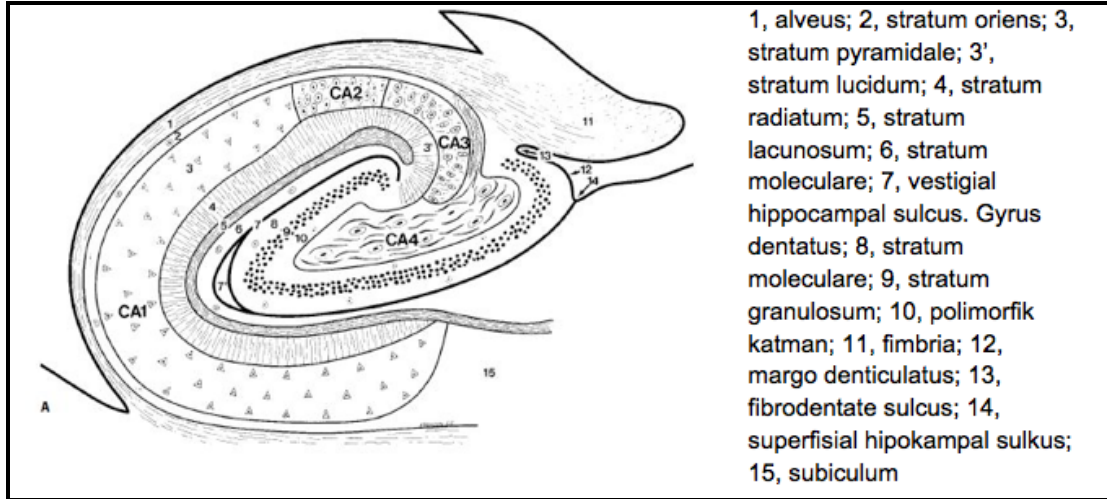
2.8. Hipokampus Anatomisi

Hipokampus anterioru daha geniş posteriora doğru gidildikçe daha daralan bir yapı olarak genellikle deniz atına benzetilir (Şekil 2.1). Baş gövde ve kuyruk olmak üzere üç ana yapıdan oluşur. Yaklaşık olarak uzunluğu 4,5 cm civarındadır. Cornu ammonis ve gyrus dentatus adı verilen ve birbirine sarılan iki kortikal laminadan oluşur. Ön tarafına "pes hippocampi" adı verilir. Bu bölgedeki pençeye benzer çıkıntılara "digitationes hippocampi" adı verilir.

Hipokampus'un bütün yüzeyi alveous adı verilen bir tabaka ile örtülüdür. Bu tabakanın lifleri medialde birbirine yaklaşarak fimbria hipokampiyi meydana getirirler. Fimbria'nın ön ucu uncusta sonlanırken, arka ucu alveous ile birlikte crus forniksi oluşturur. Hipokampus hücre yapısındaki değişiklikler nedeniyle CA1, CA2, CA3, CA4 gibi farklı alanlara ayrılmıştır (10).

- **CA1** İnsanda en geniş hipokampal bölgeyi kaplayan sektördür. Hipokampus ile subikulum arasındaki bağlantıyı sağlayan bölgedir. Sommer sektörü olarak ta adlandırılır. Anoksi ve iskemiye oldukça duyarlı bir bölgedir.
- **CA2** Hipokampusun inferior kısmını oluşturur. Hipoksiye daha dayanıklı bir bölgedir. Dolayısıyla dirençli sektör olarak ta bilinir.
- **CA3** Spielmeyer sektörü olarak ta bilinir. Burası da CA2 gibi hipoksiye dayanıklıdır. Hipokampusun inferiorunda yerleşmiştir ve miyelinsiz yosunsu lifler içerir.
- **CA4** Bratz sektörü olarak bilinir. Hipokampus ile dentat girus arasında geçiş bölgesidir. Hipoksiye orta derecede duyarlıdır. Buradaki yosunsu lifler myelinlidir.

Hipokampus temel olarak posterior serebral arter dallarından beslenir. Ayrıca anterior koroidal arter de hipokampusa dallar verir. Venöz drenajı ise sulkal ve subepandimal venler yolu ile superfizyal hipokampal venlere olur. Bu venler önde inferior ventriküler ven arkada ise medial atrial venler yolu ile bazal vene dökülürler.



Şekil 2.1. Hipokampusun kesitsel görüntüsü.

Histolojik olarak ise hipokampus 7 farklı tabakadan meydana gelmiştir.

Bunlar;

1. Alveus: En derin tabaka
2. Oriens tabakası
3. Piramidal tabaka
4. Lusidum tabakası
5. Radiatum tabakası
6. Lakünozum tabakası
7. Moleküler tabaka: En yüzeysel dış tabaka

Bunların dışında hipokampusa gelen afferent ve hipokampustan çıkan efferent liflerde vardır. Bunlar;

A) Afferent yollar

1. Singulat girustan başlayıp hipokampusa giden lifler
2. Septal nükleustan başlayıp posteriordan hipokampusa gelen lifler
3. Bir taraf hipokampustan başlayıp orta hattın fornix yolu ile diğer hipokampusa giden lifler
4. İndusium griseum'dan başlayıp posteriordan longitudinal striayı kullanarak hipokampusa gelen lifler
5. Entorinal alandan hipokampusa gelen lifler

6. Dentat girus ve parahipokampal girustan başlayıp hipokampusu gelen lifler

B) Efferent yollar

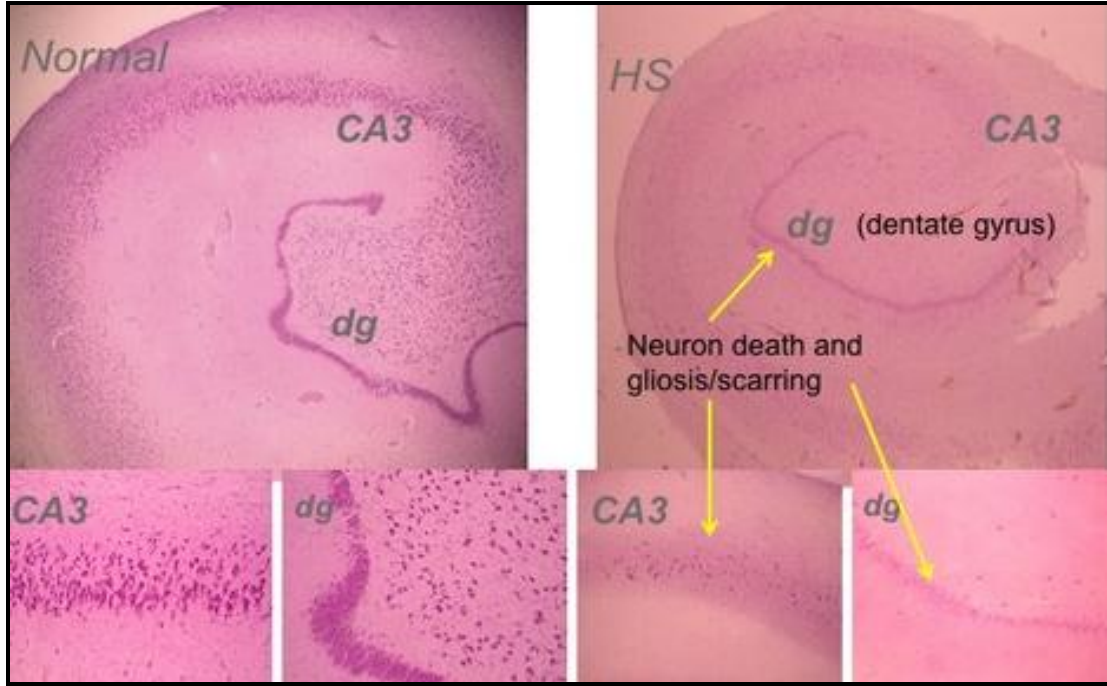
1. Anterior kommissür posteriorundan geçerek mamiller bodilere gelen lifler
2. Anterior kommissür posteriorundan geçerek talamus anterior nükleuslarına gelen lifler
3. Anterior kommissür posteriorundan geçerek tegmentuma gelen lifler
4. Anterior kommissür posteriorundan geçerek septal nükleus, lateral preoptik alan ve hipotalamusun ön tarafında sonlanan lifler
5. Habenular nükleusa gitmek üzere stria medüllaris talami ile birleşen lifler

2.9. Hipokampal Skleroz

Hipokampal skleroz ve epilepsi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar çok eski dönemlere dayanmaktadır. İlk zamanlar da hipokampal skleroz ile ilgili deneyimler sadece post mortem çalışmalara ait iken 20. Yüzyılın ortalarına doğru yapılan epilepsi cerrahisi sonrası çıkarılan dokular, skleroz ile ilgili çok önemli bilgilere ışık tutmuştur (3,4,10,11).

Hipokampal skleroz ilaca dirençli mesial temporal lob epilepsi sendromu'nun en önemli patolojik bulgusudur. Histolojik olarak hipokampal skleroz CA1 nöronlarda piramidal hücre kaybı, reaktif gliozis, dentat gyrusta granüler hücreler de yaygın inflamasyon ve yosunsu hücrelerde reorganizasyon ile karakterizedir. Hipokampal sklerozda CA1 ve CA4 nöronal kaybın en yoğun olduğu bölgeler olarak göze çarparken, CA2 ve dentat girus hücre ölümüne karşı dirençli olan bölgelerdir (Şekil 2.2) (10-12).

Epilepsi cerrahisi sonrası çıkarılan hipokampal dokuların incelenmesinde ILAE'nin 2013 hipokampal skleroz klasifikasyonu bugün yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.5) (13).



Şekil 2.2. Hipokampal formasyon. İmmunhistokimya boyama sonrasında hipokampus iç yapısının görünümü. Sağ taraf normal iç yapı, sol taraf sklerotik hipokampus görünümü.

Tablo 2.5. Hipokampal skleroz sınıflaması (ILAE 2013).

| Sınıflama | Nöronal hücre kaybı ve gliozis paterni (Bütün halinde rezeke edilebilmiş materyal) | | | | Nöronal hücre kaybı ve gliozis paterni (inkomplet örnek) | | |
|-----------|---|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|---------------------------|----------------|
| | ILAE tip 1a (Klasik HS) | ILAE tip 1b (Ağır HS) | ILAE tip 2 (CA1- sklerozisi) | ILAE tip 3 (CA4- sklerozisi) | HS yok | Büyük olasılıkla HS | Muhtemel HS |
| SUB | 0-1 | 0-1 | 0-1 | 0 | 0 | 0-1 | n.a. |
| CA1 | 2 | 2 | 2 | 0-1 | 0 | 1-2 | n.a. |
| CA2 | 0-1 | 1-2. | 0-1 | 0-1 | 0 | n.a. | n.a. |
| CA3 | 0-1 | 2 | 0-1 | 0-1 | 0 | n.a. | n.a. |
| CA4 | 2 | 2 | 0-1 | 1-2 | 0 | n.a. | 1-2 |
| DG | 0-2 | 1-2 | 0-2 | 0-2 | 0-1 | n.a. | 0-2 |

0: Saptanabilen nöronal kayıp yok/sadece gliozis;

1: Kısmen-orta nöronal kayıp ve/veya gliozis;

2: Ağır nöronal kayıp (nöronların büyük bölümü) ve fibriler gliozis.

HS'nin değerlendirmesinde önem taşıyan temel noktalar:

a: Formalin fikse parafine gömülmüş cerrahi materyalden elde edilen 4-7 µm lik kesitlerin H+E, CV/LFB, NeuN ve GFAP boyaları ile değerlendirilmesi;

b: Fasia dentataya ait granül hücreler normale (0), dispersiyon varsa (1), ağır kayıp içeriyorsa (2) olarak skorlanması (bu bulgu fokal de olabilir);

c: Eğer cerrahi olarak hipokampus "en bloc" çıkarıldıysa "en bloc" koronal doku takibi önerilir.

d: Eğer CA1 ile subikulum geçişi cerrahi materyalde mevcut ise subikulum piramidal hücre kaybı içermeyişiyle tanınır.

Tayin edilemeyen HS: materyal inkomplet çıkarılmış ise yada patolojik prosedür doğru uygulanmadığında hipokampusun anatomisi tam değerlendirilemez ise skora yapılamadığı durumlar için kullanılacak tanım.

n.a.: Histolojik incelemeye uygun değil.

2.10. Temporal Lob Epilepsisi

Temporal lob epilepsileri, lokalizasyonla ilişkili epilepsilerin oldukça önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Mesial ve neokortikal olmak üzere kendi içinde iki farklı tipi vardır. Mesial temporal epilepsi erişkin çağda en sık tanımlanan semptomatik parsiyel epilepsi tipidir. Çocukluk çağında geçirilen febril konvulsiyonlar buradaki en önemli risk faktörüdür. Yine çocukluk çağında maruz kalınan kafa travmaları ve santral sinir sistemi enfeksiyonları önemli risk faktörleri arasındadır. Klinik bulgular, elektroensefalografi (EEG) bulguları, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve SPECT (single photon emission computed tomography) çalışmaları sayesinde tanı konulur.

Bu hastaların yaklaşık %80'inde skalp üzerinden alınan EEG kayıtları tanıda yeterlidir. Tetkikler arasında tutarsızlıklar olduğunda intrakranyal olarak konulan elektrotlarla kayıtlar almak gerekebilir (5,11,12).

Mesial temporal lob epilepsi (MTLE) tanısı konulan ve ameliyat olan hastaların patolojilerinde CA1, CA3, CA4 ve dentat granül hücrelerinde nöronal kayıp dikkat çekerken, CA2 hücreleri genellikle korunmuştur. MTLE'li hastaların cerrahi örneklerinde hipokampal sklerozun yanı sıra %15-20 oranında tümör, gelişimsel ya da vasküler malformasyonlar gibi ek patolojilere rastlanılabilir (11,12).

Neokortikal temporal lob epilepsisindeki gerek klinik gerekse de radyolojik ve elektrofizyolojik özellikler daha düşük oranda tanımlanabilmiştir. Burada nöbetler genellikle üçüncü dekattan sonra başlar ve ön planda risk faktörü olarak kafa travmaları ve santral sinir sistemi enfeksiyonları bulunur (8).

2.11. Antiepileptik İlaçlar

Hücreler arası etkileşim, iyon kanalları ve bunlardaki voltaj duyarlı sapsmalar ile eksitatör ve inhibitör nörotransmitterlerin post sinaptik etkileri epilepsi ile bağlantılı klinik bulguları ortaya çıkardığına göre, antiepileptik ilaçların da bu noktalara etkili olmaları gerektiği muhakkaktır. Örneğin difenilhidantoin voltaja duyarlı Na⁺ kanallarını etkileyerek glutamat gibi eksitatör nörotransmitterlerin salınımını azaltırken, vigabatrin ve tiagabin

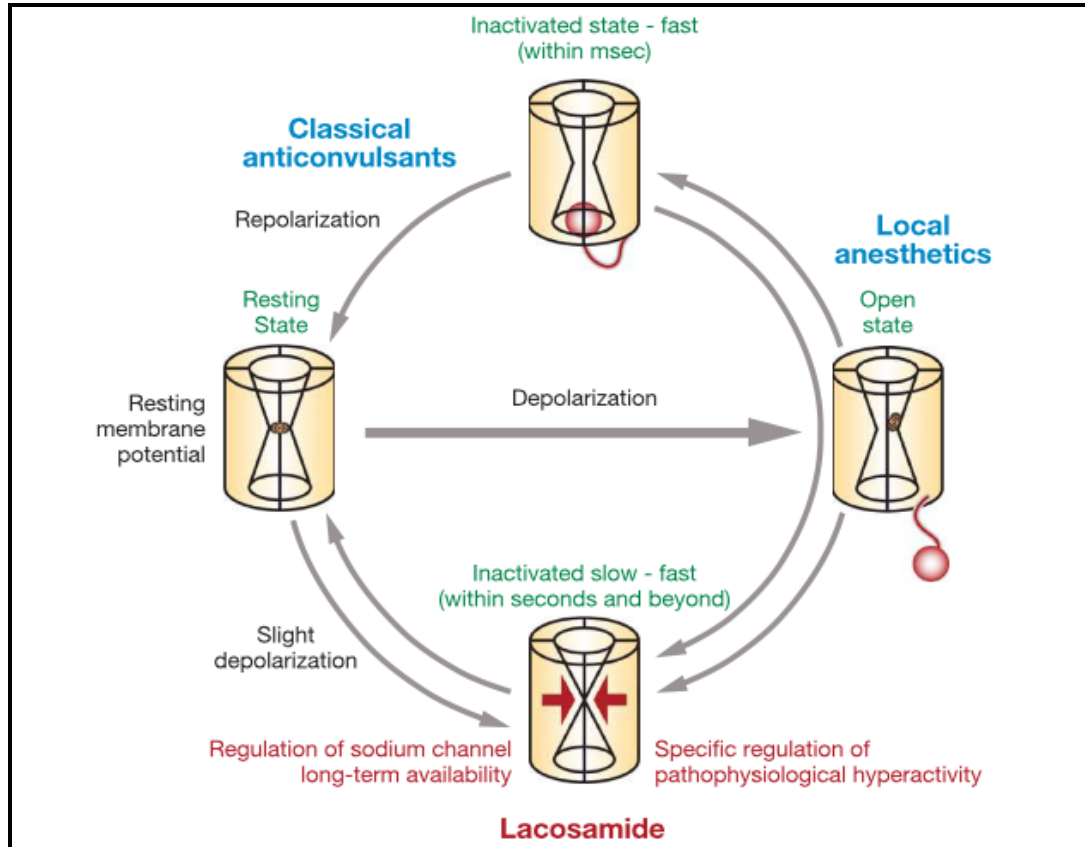
GABA metabolizmasını ve GABA geri alınımını inhibe ederler. Benzodiazepinler klorid kanallarının açılmasını uyararak etkilerini gösterirler.

Epilepsi ile gelen bir hastada kullanılacak ilaç genellikle nöbet tipine göre belirlenir. Klasik olarak bilinen tüm epilepsi ilaçları birinci basamak ilaçlardır ve tedaviye genellikle bunlarla başlanır. Birinci basamak ilaçların uygun doz ve sürede kullanılmalarına rağmen nöbetler devam ediyorsa ikili ya da üçlü tedaviler denenebilir. Ancak ikili tedavi kullanılmasına rağmen nöbetlerin devam ettiği hastalarda üçüncü ilacın nöbetleri durdurma şansı oldukça düşüktür (8,14).

2.12. Lakozamid

Lakozamid, kimyasal adıyla 2-asetamido-*N*-benzil-3-metoksipropionamid, 2,3-diaminomaleonitrilin *R*-enantiomeri, (Vimpat®), 2008 yılında erişkinlerde parsiyel başlangıçlı nöbetlerin tedavisi için onaylanmış olan yeni nesil bir antiepileptik ilaçtır. İşlevselleştirilmiş aminoasit yapısında olan lakozamid, klasik sodyum kanal blokerlerinden farklı olarak voltaj bağımlı sodyum kanallarının hızlı aktivasyonunu değil yavaş aktivasyonunu artırmaktadır. Bu etki mekanizması; aşırı uyarılabilir durumdaki nöronal membranların stabilizasyonu, nöronal ateşlemenin inhibisyonu ve fizyolojik işlevleri etkilemeksizin uzun dönemde kanalların azalması ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.3). Yakın zamanda yapılan çalışmalar jeneralize veya kompleks parsiyel nöbetlerde, status epileptikusta etkili olduğunu göstermiştir (14-17). Bunun yanında lakozamidin periferik diyabetik nöropati tedavisinde sınırlı etkisi de hem deneysel hem klinik çalışmalarda gösterilmiştir.

Lakozamid iyi tanımlanmış ve arzu edilen bir farmakolojik profile sahiptir. Gastrointestinal sistemden hızlı absorbe edilmekte, sitokrom p-450 izoenzimleriyle neredeyse hiç etkileşime girmemekte ve ilaç etkileşimleri açısından düşük potansiyel taşımaktadır. Hayvan deneklerle yapılan toksikoloji ve güvenlilik çalışmaları da lakozamidin iyi tolere edilebilen, yalnızca minör yan etkilere sebep olan, güvenli bir ilaç olduğu göstermiştir (18).



Şekil 2.3. Lakoamidin olası etki mekanizması.

2.13. Deneysel Epilepsi Modelleri

Deneysel epilepsi modeli seçilirken akılda bulundurulması gereken en önemli nokta hiçbir modelin bu hastalığın kompleks yapısını tam olarak karşılayamadığıdır. Bu olay, epilepsinin karmaşık orijini, genetik çeşitliliği, davranışsal yapısı, EEG tipi, farmakolojik ve histopatolojik profili düşünüldüğünde doğru bir varsayım olarak karşımıza çıkmaktadır.

Hipotetik olarak bakıldığında mükemmel bir model şu üç kriteri karşılamalıdır;

1. İnsanla benzer etyolojiye sahip olmalıdır,
2. Aynı fizyolojik, davranışsal ve genetik fenotipi olmalıdır,
3. Aynı tedaviye cevap vermelidir.

Basitçe literatürde kullanılmış olan nöbet modelleri şu şekilde sınıflandırılabilir;

- Basit parsiyel nöbetler
- Kompleks parsiyel nöbetler
- Jeneralize absans nöbetleri
- Jeneralize tonik-klonik nöbetler
- Status epileptikus (19).

2.14. Temporal Lob Epilepsi Modelleri

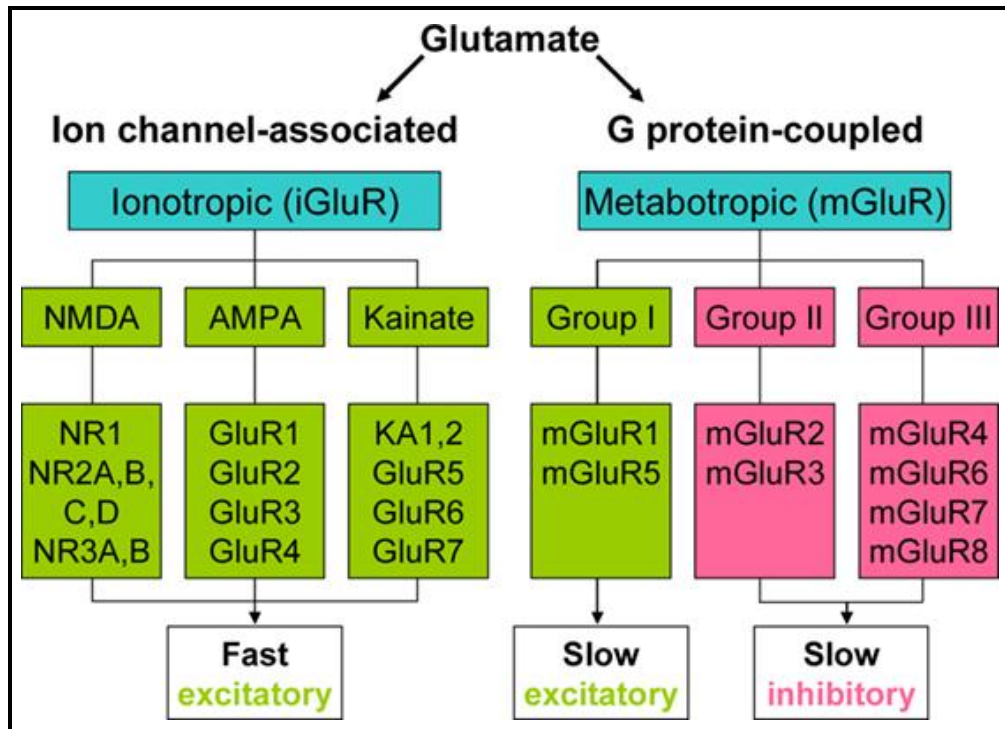
Temporal lob epilepsi modelleri genellikle kainik asit ve pilokarpin gibi ekzitotoksik maddelerin verilmesi veya kindling model denilen elektrikle uyarılmış kronik tekrarlayan nöbetler oluşturulması şekliyle yapılan modellerdir. Kainik asit'in intraperitoneal olarak uygulanması temporal lob epilepsi modelinin en sık kullanılan şeklidir. Ancak bu model bilateral hipokampal değişikliklere neden olması ve temporal lob dışında yaygın beyin hasarına neden olarak jeneralize tonik klonik nöbetlere yol açması nedeniyle eleştirilmektedir (19).

Bunun yerine bizimde çalışmamızda kullandığımız deneğin hipokampusuna direk olarak enjekte edilen kainik asit modeli, insan temporal lob epilepsisinde görülen değişikliklere benzer histopatolojik değişiklikleri ortaya koyan bir epilepsi modeli olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sistemik enjeksiyonun aksine burada oluşan yapısal hipokampal değişiklikler tek taraflıdır ve fokal parsiyel nöbetler açığa çıkmaktadır (20, 21).

2.15. Glutamat Reseptörleri

Glutamat merkezi sinir sisteminin en önemli nörotransmitterlerindedir ve reseptörlerinin aşırı uyarılması epilepsiye neden olabilecek değişikliklere yol açabilir. Glutamat taşıyıcı proteinleri sodyum bağımlıdır ve nöronlar ile glial hücrelerde lokalizedirler (22).



Şekil 2.4. Glutamat reseptör tipleri ve etkileri.

Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Şekil 2.4). İyonotropik reseptörler AMPA, kainat ve NMDA olmak üzere üç alt tipte incelenirler. AMPA reseptörleri santral sinir sisteminde oldukça yaygındır ve hızlı eksitator iletimden sorumludurlar. L-glutamat affinitesi NMDA reseptörlerinden daha azdır. Dört alt ünitesi (GluR 1-4) ve her alt ünitenin iki tipi (flip, flop) vardır.

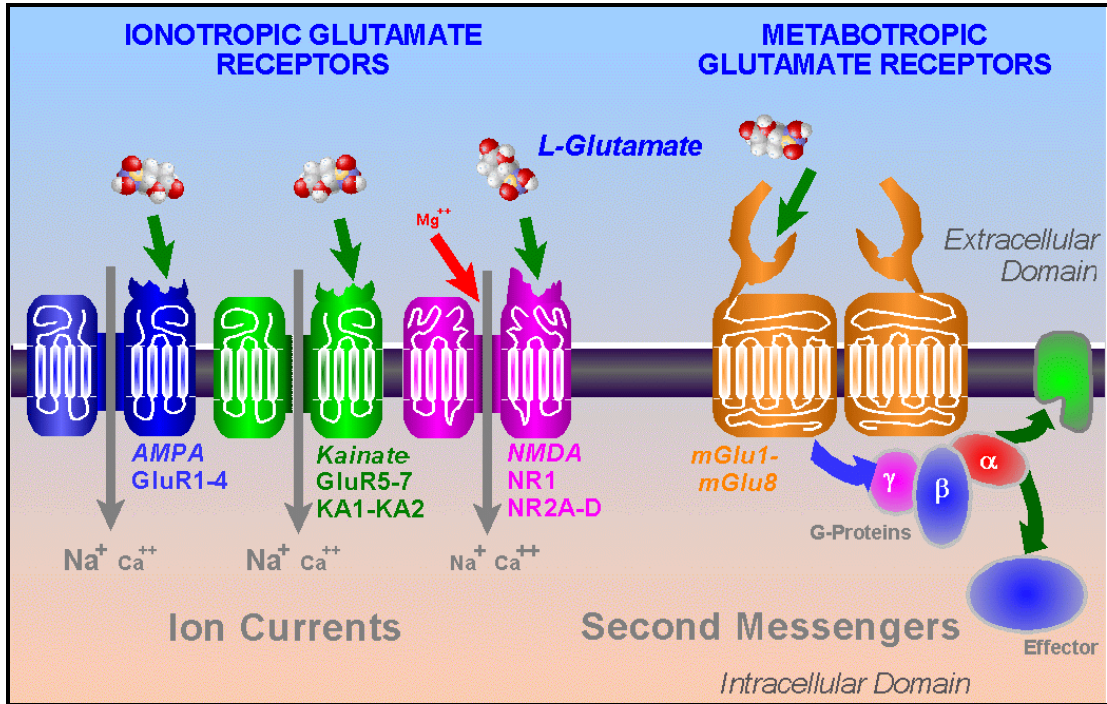
Kainat reseptörleri hipokampal bölgede bulunur ve düşük (GluR 5-7) ve de yüksek affiniteli alt üniteleri vardır (KA1, KA2) (21).

NMDA reseptörleri ise Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} iyon kanallarına bağlanarak Na ve Ca 'un hücre içine K 'un ise hücre dışına akışını sağlarlar. NMDA glisin'e gereksinim duyan tek aminoasit reseptörüdür. Ortamda glisin olmazsa kanal inaktif durumdadır. NMDA reseptörlerinin NMDA R1 (sekiz alt üniteli) ve NMDA R2 (dört alt üniteli) olmak üzere iki alt ünitesi vardır.

Metabotropik reseptörler ise bir ligandın bağlanmasıyla kanallarda yapısal değişiklik oluşturmayan reseptörlere denir. G-proteinleriyle ilişkiye girerek presinaptik inhibisyon ve postsinaptik eksitasyona neden olurlar. Doğrudan membran kanallarını etkileyerek enzimlerin aktivasyonuna ve ikincil ileticilerin üretimine yardımcı olurlar. Bu reseptörler üç gruba ayrılmışlardır (Şekil 2.5) (22-24);

1. Grup (mGluR 1-5): Reseptör aktivasyonu ile inositol trifosfat yapımı artar, hücre içi Ca^{+2} mobilize olur.
2. Grup (mGluR 2,3,8): Aktivasyonu GABA ve glutamat geçişinde azalma sonucu uzun süreli potansiyasyon ve depresyona neden olur.
3. Grup (mGluR 4,6,7): Etkileri genellikle ikinci grup gibidir.

Retinada yerleşim gösteren mGluR6 dışında diğer tüm metabotropik glutamat reseptör ailesi memeli merkezi sinir sisteminde hem glial hem de nöronal hücrelerde bulunurlar. Grup 1 metabotropik glutamat reseptörleri somatodendritik postsinaptik alanlarda yerleşirken, grup 2 ve grup 3 reseptörler aksonal alanlarda yer almaktadırlar (24).

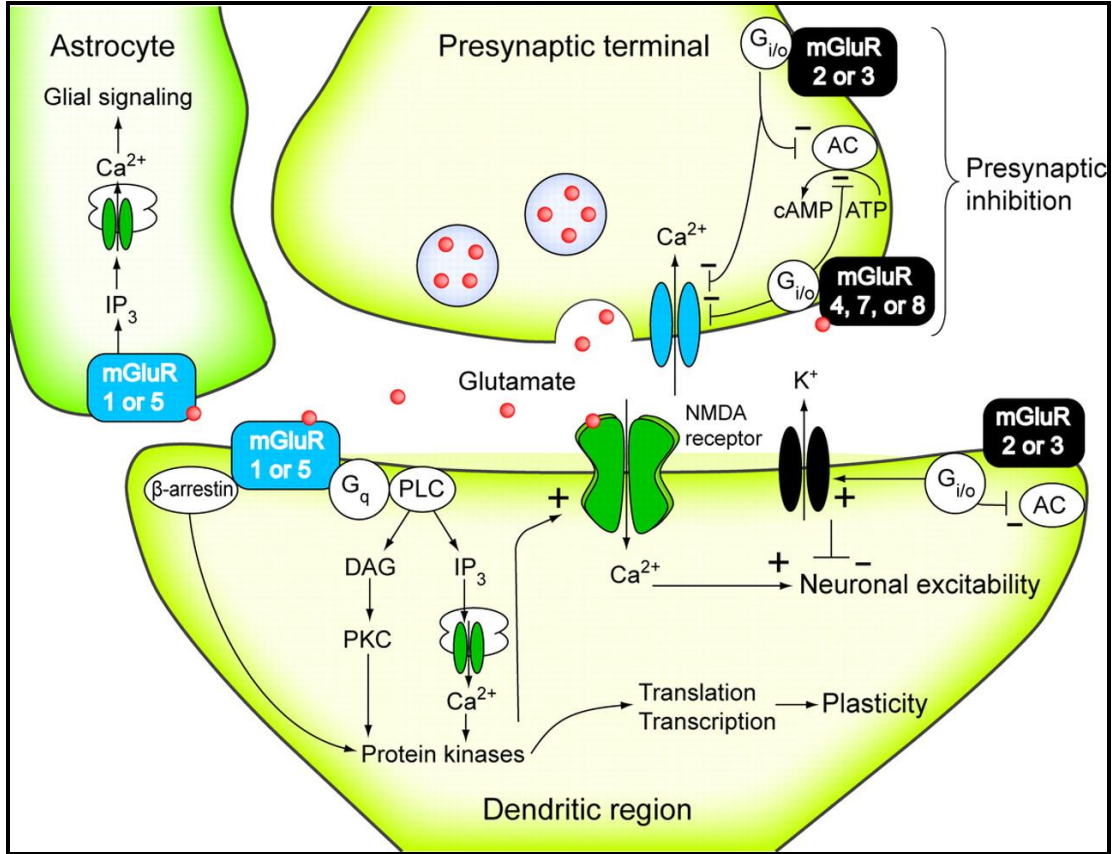


Şekil 2.5. Glutamat reseptör alt tipleri, transmembran yapıları ve etki mekanizmaları.

Temporal lob epilepsilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar bugün halen tam olarak bilinmemektedir. Hem ionotropik hem de metabotropik glutamat reseptörlerince oluşturulan yaygın sinaptik eksitasyon temporal lob epilepsilerinin patofizyolojisinde önemli role sahiptir (Şekil 2.6).

mGluR reseptör ailesi G protein-coupled reseptörler olup çeşitli iyon kanallarını ve hücre içi ikincil mesajcı sistemleri aktive ederek nöronal uyarılabilirliği ve sinaptik geçişi arttırmaları. Genel olarak bakıldığında grup 1 mGluR'lar eksitatör, grup 2 ve 3 ise inhibitör etkiye sahiptirler. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda hipokampal grup 1 mGluR'lerin epileptogenezde oldukça önemli rollerinin olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 2.7) (23,24).

Bugüne kadar insan temporal lob epilepsilerinde grup 1 mGluR'lerin ekspresyonu ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Özellikle ilaca dirençli epilepside grup 1 mGluR'ler tedavide önemli farmakolojik hedeflerdir (23-27).



Şekil 2.6. Eksitator sinapslarda metabotropik glutamat reseptörlerinin dağılımı ve sinaptik modülatör işlevleri.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplar

Planlanan araştırma Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Araştırmada erkek Sprague-Dawley albino sıçanlar (n=32, 200-250 gram) kullanılmıştır. Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında (polikarbon kafesler içerisinde, nem aralığı %50-60, ortam sıcaklığı 20-25°C, 12 saatlik karanlık – aydınlık döngüsünde olacak şekilde) tutulmuş ve serbestçe ulaşabilecekleri su ve yemle (ad libitum) beslenmiştir. Haftada bir kez talaş ve yem değişimi yapılmış ve kafesler temizlenmiştir. Sıçanlar üzerinde uygulanan tüm deney paradigmaları **Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 21.03.2014 tarih ve 2013/57-01 karar numarası** ile onaylanmıştır.

Araştırma için sıçanlar 4 ayrı gruba bölünmüştür.

- **I. Grup (Sham Grubu) (n=8 adet):** Skalp insizyonu yapılan, kraniyuma yalnızca burr hole açılan ancak hiçbir enjeksiyon yapılmayan grup
- **II. Grup (Kontrol Grubu) (n=8 adet):** Skalp insizyonu yapılan, kraniyuma burr hole açılıp intrahipokampal (i.h.) serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılan ancak i.h. KA ve LCS uygulanmayan grup
- **III. Grup (Kainik Asit (KA) Grubu) (n=8 adet):** Skalp insizyonu yapılan, kraniyuma burr hole açılıp intrahipokampal (i.h.) kainik asit enjeksiyonu yapılan, ancak LCS yerine 2 hafta boyunca intraperitoneal (i.p.) SF uygulanan grup
- **IV. Grup (Lakozamid (LCS) Grubu) (n=8 adet):** Skalp insizyonu yapılan, kraniyuma burr hole açılıp intrahipokampal (i.h.) kainik asit enjeksiyonu yapılan ve 2 hafta boyunca 50 mg/kg dozunda i.p. LCS tedavisi uygulanan grup

İşlemden 14 gün sonra histopatolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için sakrifiye edilmiş ve beyinler çıkartılmıştır.

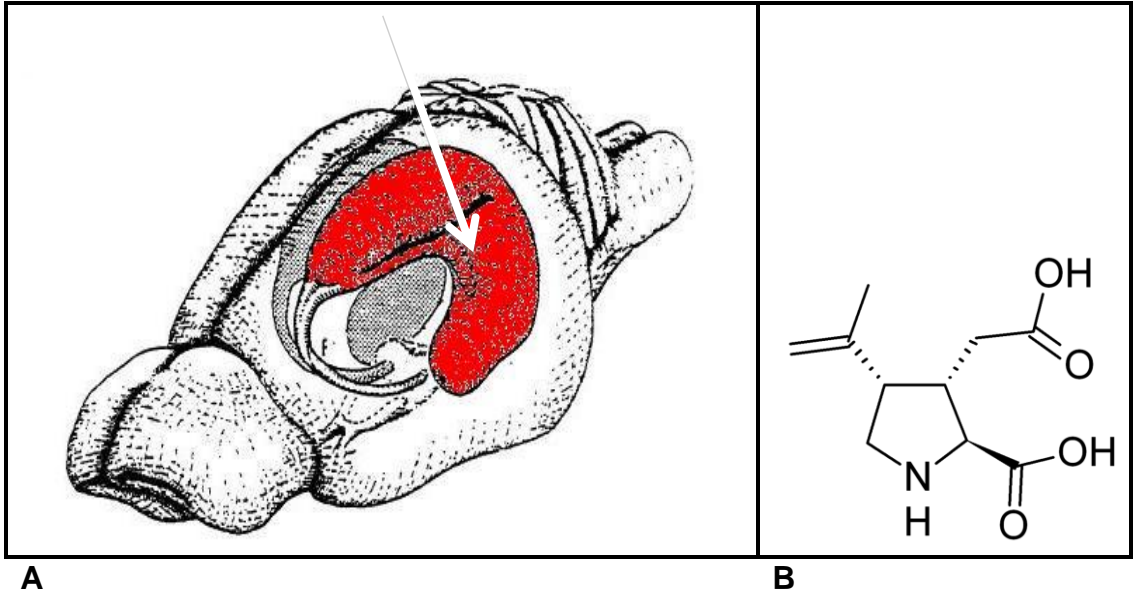
Sonuçlar hematoksilen eozin boyaması, immünohistokimya (İHK) ve Western Blot (WB) ile değerlendirilmiştir.

3.2. Anestezi

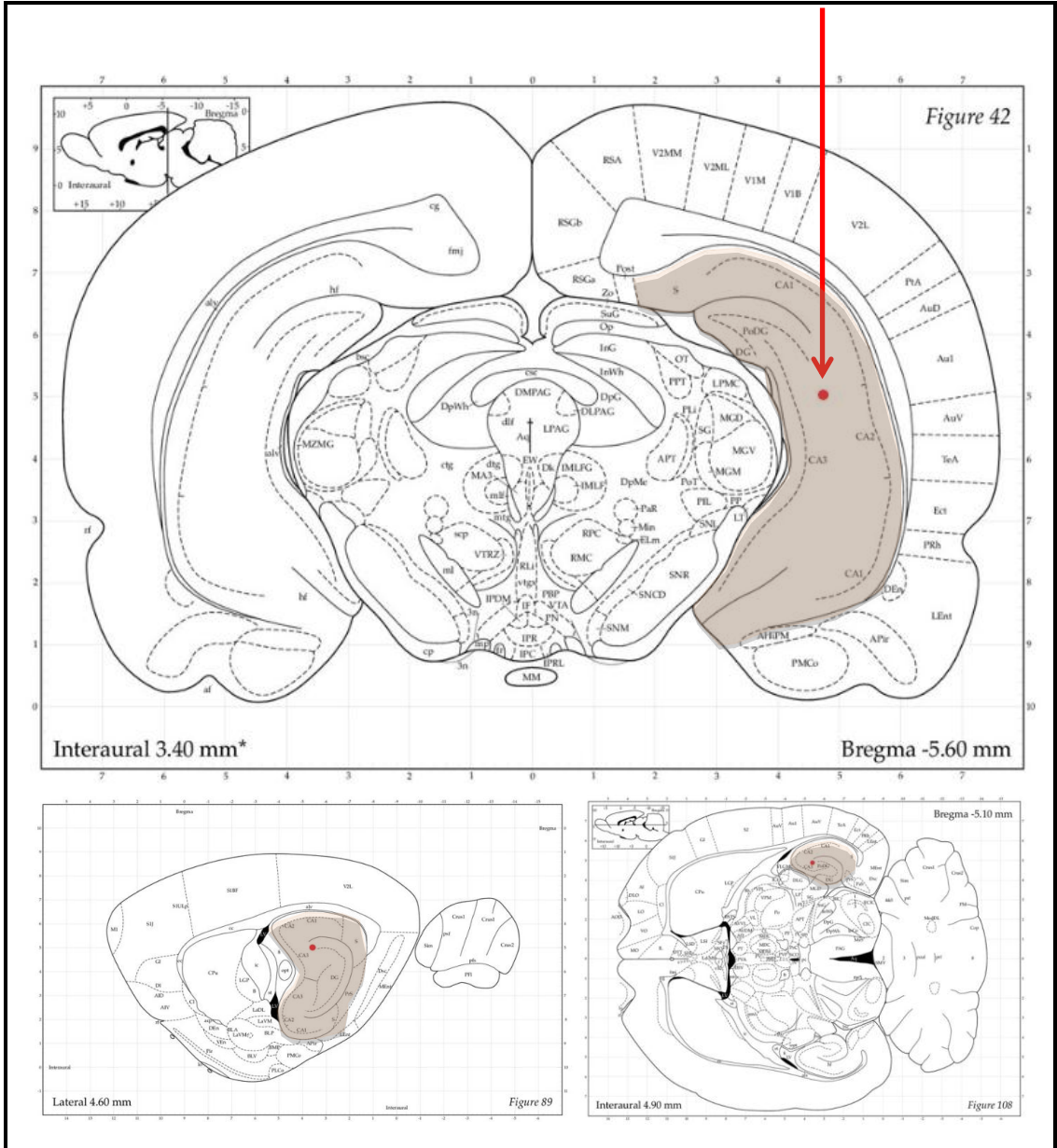
Deneklere intraperitoneal olarak 1 mg/kg ketamin (Ketalar, Pfizer) ve 1mg/kg ksilazin (Alfazyne, Alfasan) uygulanarak genel anestezi sağlandı. Anestezi derinliği parmak kısırtma yöntemi ile kontrol edildi. Deneklere deney boyunca %100 O₂ desteği verildi.

3.3. İntrahipokampal Kainik Asit Enjeksiyonu ile status epileptikus oluşturulması

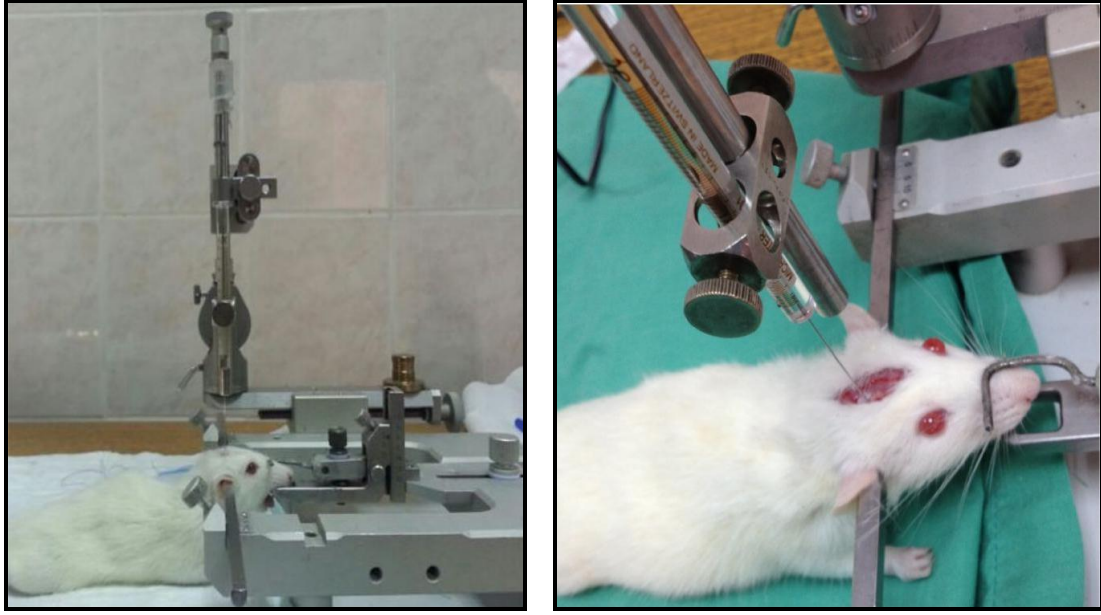
Sıçanlara anestezi uygulandıktan sonra, her iki dış kulak yolu ve çeneden sabitlenecek şekilde stereotaksik çerçeveye yerleştirildi. Orta hattan lineer skalp insizyonu yapılarak cilt her iki yana ekarte edildi ve kranyum ortaya kondu. Periost da kemik üzerinden sıyrıldı. Diseksiyon sonrasında Sıçan Beyin Atlası'ndan yararlanarak dorsal hipokampusu (Şekil 3.1 ve 3.2) hedefleyecek şekilde kranyuma burr hole açıldı (koordinatlar: bregmaya göre 5,5 mm posterior, 4,8 mm lateral). Hamilton enjektörü ile burr hole'den girilerek 90 derece açı ile vertikal olarak 5 mm derinliğe, dorsal hipokampusun CA3 alanına yavaş olarak, toplam 2 dakika süreyle 0,2 µL hacimde kainik asit (0,4 µgr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) enjeksiyonu yapıldı. Kainik asit enjeksiyonu, 0,1 µL/dk hızla uygulandı (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3). Tüm deneklerin enjeksiyonu takiben status epileptikus geçirdikleri gözlemlendi. Kendiliğinden durmayan nöbetler en fazla 10 dk sonra 0.2 mg/kg diazem (i.p.) uygulaması ile durduruldu.



Şekil 3.1. İntrahipokampal kainik asit enjeksiyonu. A) Sıçan beyninde hipokampusun izdüşümü ve intrahipokampal enjeksiyon rotası. B) Kainik asitin kimyasal formülü.



Şekil 3.2. Sıçan beyin atlasında dorsal hipokampus ve enjeksiyon bölgesinin koordinatları.



Şekil 3.3. Stereotaksik çerçeveye yerleştirilen sıçanda intrahipokampal enjeksiyon düzeneği.

3.4. Lakozamid (LCS) Verilmesi

Çalışmada deneklerin bir grubuna (4. Grup) yeni bir antiepileptik olan LCS tedavisi uygulandı. Bunun için sıçanlara ilk doz intrahipokampal enjeksiyonu takiben 30. dakikada olmak üzere 14 gün süreyle intraperitoneal olarak her gün tek doz 50 mg/kg LCS (Vimpat 500 mg, Union Chimique Belge (UCB); 5 ml SF içerisinde çözülerek) verildi. 3.Gruptaki deneklere ise LCS çözücüsü olarak kullanılan serum fizyolojik (SF) aynı hacimde aynı süreyle uygulandı.

3.5. İntrakardiyak perfüzyon ve beyinlerin çıkartılması

14 gün sonunda denekler yüksek doz kloralhidrat anestezi uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek beyinler çıkarıldı. Bunun için şu aşamalar uygulandı: i) torakotomi, ii) sağ atriyumun kesilerek venöz kanın boşaltılması, iii) sol ventrikülün kanüle edilerek önce heparinli serum fizyolojik ardından %4'lük paraformaldehid (0,1 M PBS içinde, pH: 7,4) ile perfüzyon (Şekil 3.4), iv) Karaciğer ve ekstremitelerin beyazlaşınca ve vücut sertleşinceye kadar (yaklaşık 2-3 dk) perfüze edilen hayvanın dekapite edilerek, forseps, beyin kaşığı ve makas yardımıyla kranyumunun açılarak

beynin zarar verilmeden çıkarılması. v) Çıkarılan beyinlerin %4'lük paraformaldehit solüsyonu içerisinde fiksasyonu (24-48 saat). İmmünohistokimyasal boyamalar için bu şekilde elde edilen beyinlerden alınan kesitler kullanılırken, Western Blot için ise intrakardiyak perfüzyon yapılmaksızın anestezi altındaki hayvan dekapite edilerek beyin dokusu çıkarıldı ve homojenizasyon işlemine kadar – 80°C derin dondurucuda saklandı.



Şekil 3.4. Torakotomi ve intrakardiyak perfüzyon.

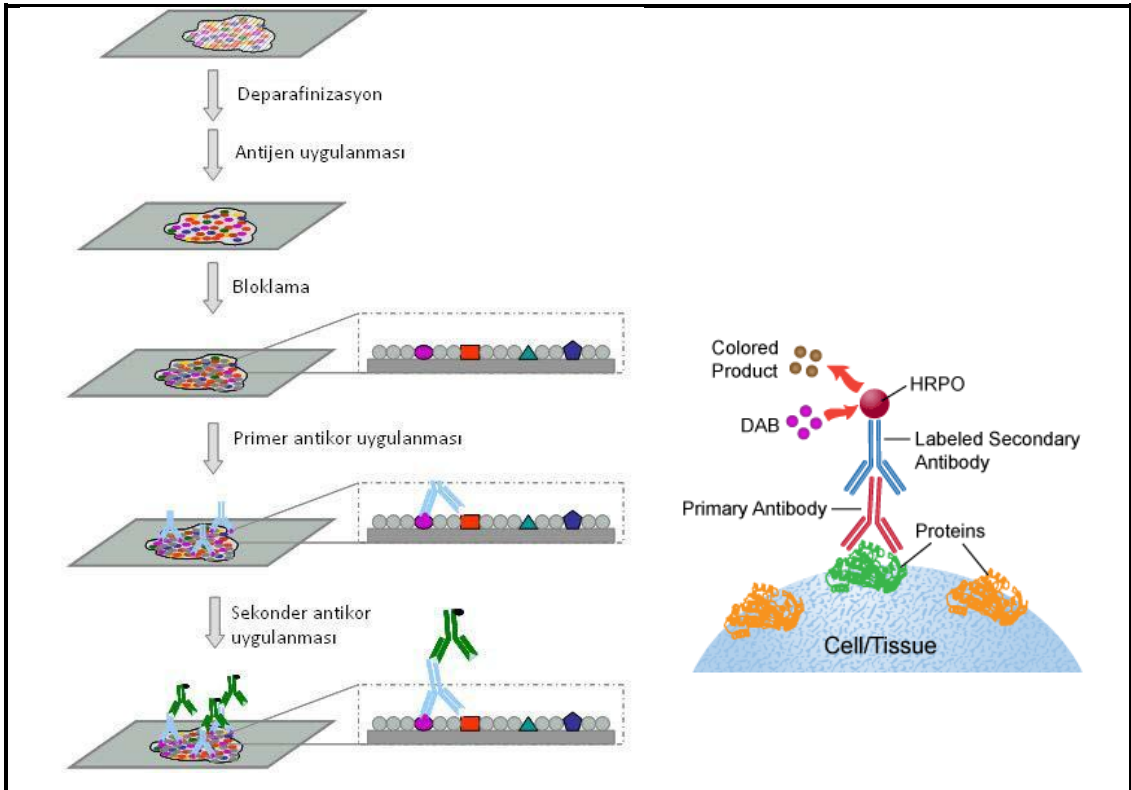
3.6 Hematoksilen-Eozin ile Histopatolojik İnceleme

Deneklerin beyininde intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu ile geç dönemde (2 hafta) ortaya çıkan histolojik değişikliklerin ve LCS'in bu değişikliklere olan etkisinin değerlendirilmesi için histopatolojik çalışma yapılmıştır. Paraformaldehit solüsyonunda fikse edilen beyinlerden hipokampus kesitlerini içerecek şekilde 3 mm'lik koronal dilim kesilerek ayrıldı. Elde edilen dilimler parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom cihazı ile 6 µm kalınlığında koronal kesitler lama alındı. Kesitler hematoksilen-eozin ile boyanarak çeşitli büyütme oranlarında ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

3.7. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Dokulardan alınan kesitlerde proteinleri ve bunların hücrelerde ve hücrealtı yapılarıdaki dağılımını göstermek için immünohistokimya yöntemi (İHK) kullanılır. Bu çalışmada, mGluR-1 ve mGluR-5 reseptör alt tiplerinin dokudaki ekspresyonunu göstermek amacıyla spesifik antikorlar (anti-mGluR-1 (Abcam, ab82211) ve anti-mGluR-5 (Abcam, ab76316)) kullanılmıştır.

İHK yönteminin; Western Blot ve ELİSA gibi diğer immünojenik yöntemlere kıyasla niceliksel hassasiyeti daha düşüktür. Proteine özgü antikorlar kullanıldığı için doku örneklerinde sadece hedeflenen proteinlere bağlanırlar. Bu yüzden spesifiklerdir.



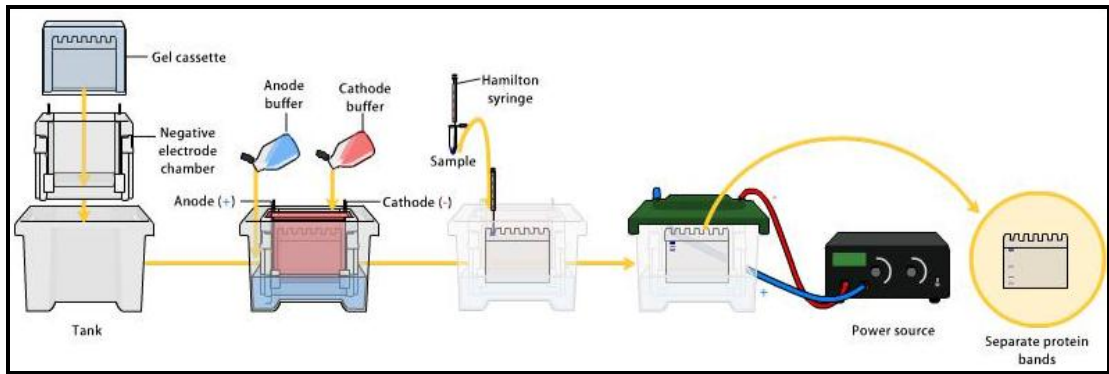
Şekil 3.5. İmmünohistokimyasal boyama aşamaları.

Çalışmamızda paraformaldehit (PFA) ile fiksasyon sonrası doku parafine gömülerek mikrotomla 5 mikrometre kalınlıkta kesildi. Boyama yapılmadan önce kesitler %100'lük Xylene ve %95'lik etanol ile deparafinleştirildi ve rehidrate edildi. Antijen uygulanana kadar camlar musluk suyunda saklandı. Formalinle fikse edilen dokulara İHK boyanmadan önce antijen retrieval için Tris/EDTA pH 9,0 solusyonu uygulandı. Daha sonra kesitler iki kez 5 dakika süreyle TBS ve %0,025 Triton X-100 ile yıkandı. Ardından %10'luk serum ve %1'lik bovine serum albümin kullanılarak bloklama yapıp TBS içinde iki saat 25°C'de tutuldu. Kesitlerin üzerindeki süpernatant alındıktan sonra TBS ve %1'lik bovine serum albümin ile dilüe edilmiş primer antikolar (metabotropik glutamat reseptörü 1 ve 5) uygulandı. Antikor ile muamele edilen kesitler gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. Sonrasında iki kez beşer dakika TBS ve %0,025 Triton ile, ardından ise 3 kez 5'er dk TBS ile durulandı. Horseradish peroksidaz (HRP) ile konjuge edilmiş sekonder antikor uygulamasını takiben 10 dk oda sıcaklığında kromogen (Peroksit/DAB) uygulandı. Counterstain (çapraz boyama) yapıldı. Sinyal kalitesini artırmak amacıyla avidin-biyotin kompleksi ile sinyal amplifiye edildi (Şekil 3.5).

3.8. Western Blot (İmmunblotting)

Niceliksel olarak protein ekspresyonunun değerlendirilmesi için Western Blot yöntemi kullanıldı. Bunun için öncelikle; sakrifikasyon sonrasında çıkarılan ve fiksasyon uygulanmayan beyin dokuları homojenize edildi. Homojenizasyon için hücre membranlarını parçalayacak lizis tamponu (RİPA tampon: 150 mM sodyum klorür, %0.1 Triton X-100, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 sodyum dodesil sülfat, 50 mM Tris-HCl, pH: 8.0 ve proteaz inhibitörleri) ve sonikasyon kullanıldı. Hücresel lizisi takiben meydana gelen proteoliz, defosforilasyon ve denaturasyonun engellenmesi için işlemler buz üzerinde yapıldı ve lizis tamponuna proteaz inhibitörleri eklendi. Parçalanmış hücrelerden oluşan lizat, +4 derecede yirmi dakika süreyle 12000 rpm'de santrifüj yapıldı ve ultrafiltrat hücresel bileşenden ayrıldı.

Örnekler, proteinlerin açılarak denatüre edilmesi için anyonik tampon (Laemmli 2X buffer) ve bir denatüre edici deterjan olan SDS ile 95-100°C'de 5 dk kaynatıldı. Daha sonra makromoleküller poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılarak ayrıştırıldı. Moleküler ağırlıklarına göre bantlara ayrılmış proteinler ikinci bir matrise (nitroselüloz membran) aktarıldı (transfer). Transfer (blotting) işlemi protein içeren poliakrilamid jel ile nitroselüloz membranın direkt teması ve sandwich modeli ile gerçekleştirildi. Membran üzerindeki spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin bloke edilmesi amacıyla süt tozu kullanıldı. İmmünoblotlama için primer (mGluR1 ve 5 antikoru) ve HRP ile konjuge sekonder antikoru uygulandı. Son olarak membranlar kemilüminesan madde (ECL WB Detection Reagent, Amerisham) ile muamele edilerek görüntüler elde edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Western blot aşamaları.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

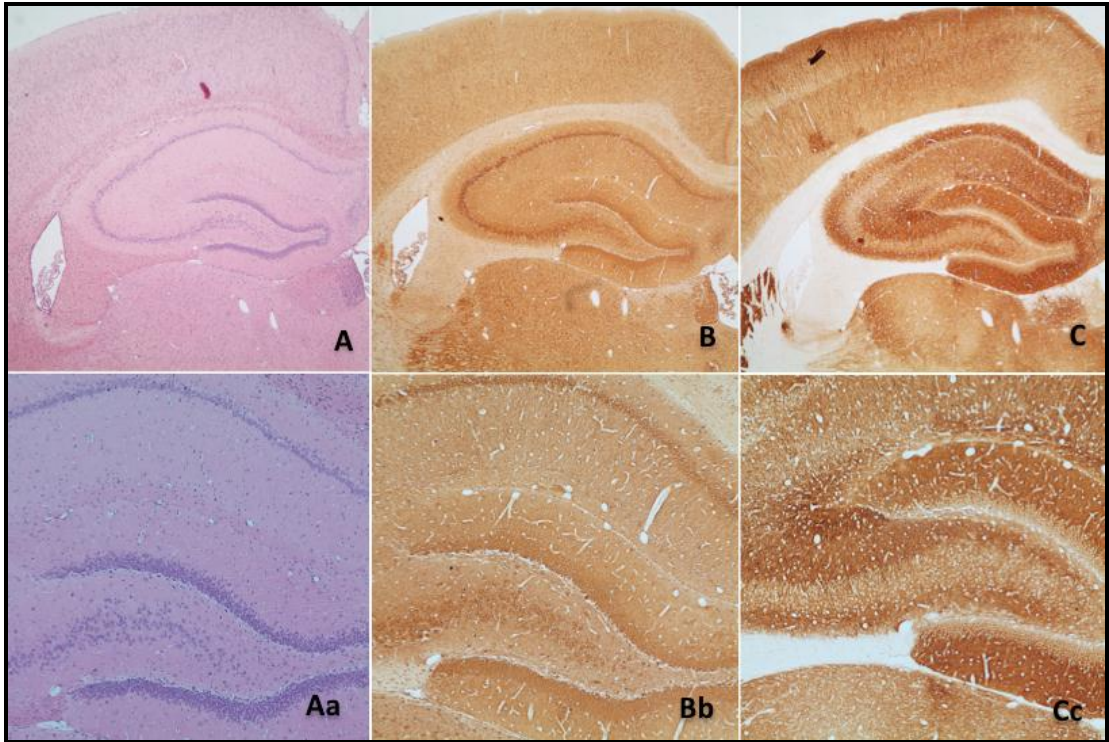
a) Sham Grubu: Toplam 4 denekten oluşmuştur. Bu deneklere sadece bir adet burr hole açılmış (sağ taraf) ve herhangi bir enjeksiyon yapılmamıştır.

- Bu gruptaki deneklerden elde edilen dokuların hemotoksilen eozin boyamasında, entorinal kortekste herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır. CA sektörü piramidal nöronlarında, nöronal kayıp ve gliosis izlenmemiştir. Dentat girus granüler nöronlarında herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır.
- mGluR 1 boyamasında;
 - Kortikal nöronlarda somatodendritik boyanma
 - Hipokampal piramidal nöronlarda somatodendritik boyanma
 - Dentat girustaki nöronlarda somatodendritik boyanma
 paternleri gözlenmiştir.
- mGluR 5 boyamasında;
 - Kortikal nöronlarda dendritik boyanma
 - Hipokampal piramidal nöronlarda dendritik boyanma
 - Dentat girustaki nöronlarda dendritik boyanma
 paternleri gözlenmiştir.

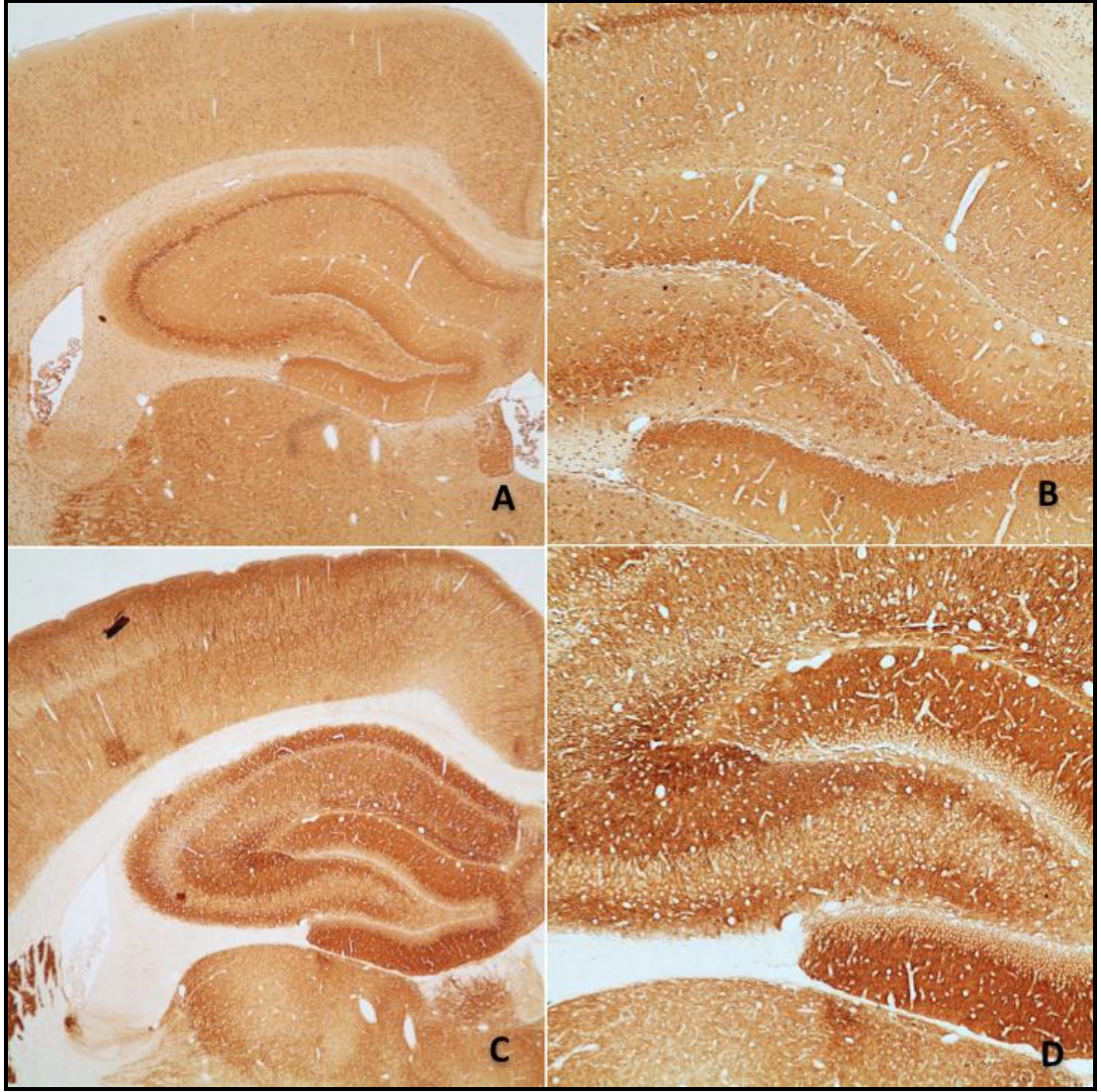
b) Kontrol Grubu: Toplam 4 denekten oluşmuştur. Bu deneklere intrahipokampal SF enjeksiyonu yapılmıştır (sağ taraf).

- Bu gruptaki deneklerin her iki tarafındaki hipokampustan elde edilen dokuların hemotoksilen eozin boyamasında, entorinal kortekste herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır. CA sektörü piramidal nöronlarında, nöronal kayıp ve gliosis izlenmemiştir. Dentat girus granüler nöronlarında herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 4.1).

- m GluR1 boyamasında;
 - Kortikal nöronlarda somatodendritik boyanma
 - Hipokampal piramidal nöronlarda somatodendritik boyanma
 - Dentat girus nöronlarında somatodendritik boyanma
 paternleri izlenmiştir (Şekil 4.2).
- m GluR 5 boyamasında;
 - Kortikal nöronlarda dendritik boyanma
 - Hipokampal piramidal nöronlarda dendritik boyanma
 - Dentat girus nöronlarında dendritik boyanma
 paternleri izlenmiştir (Şekil 4.2).



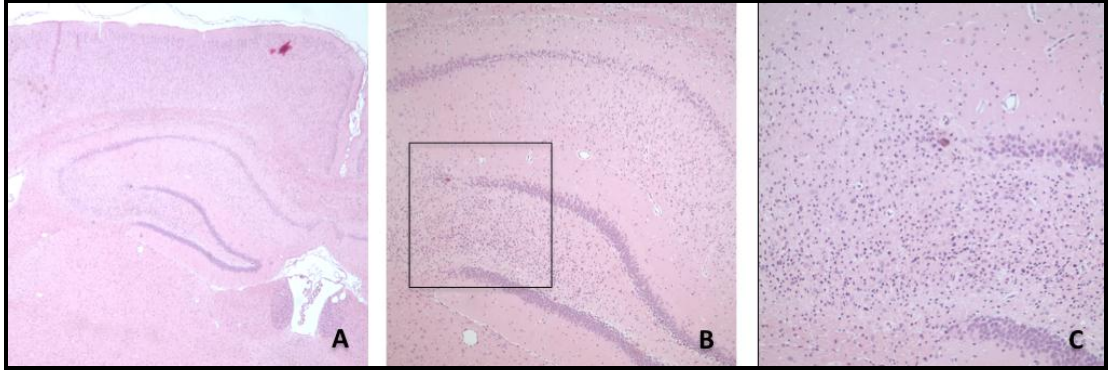
Şekil 4.1. Kontrol grubu, normal hipokampus, HE boyası (A, Aa), mGluR-1 (B, Bb) ve mGluR-5 antikorlarıyla (C, Cc) boyalı kesitler (A, B ve C 4X; Aa, Bb ve Cc 10X büyütme).



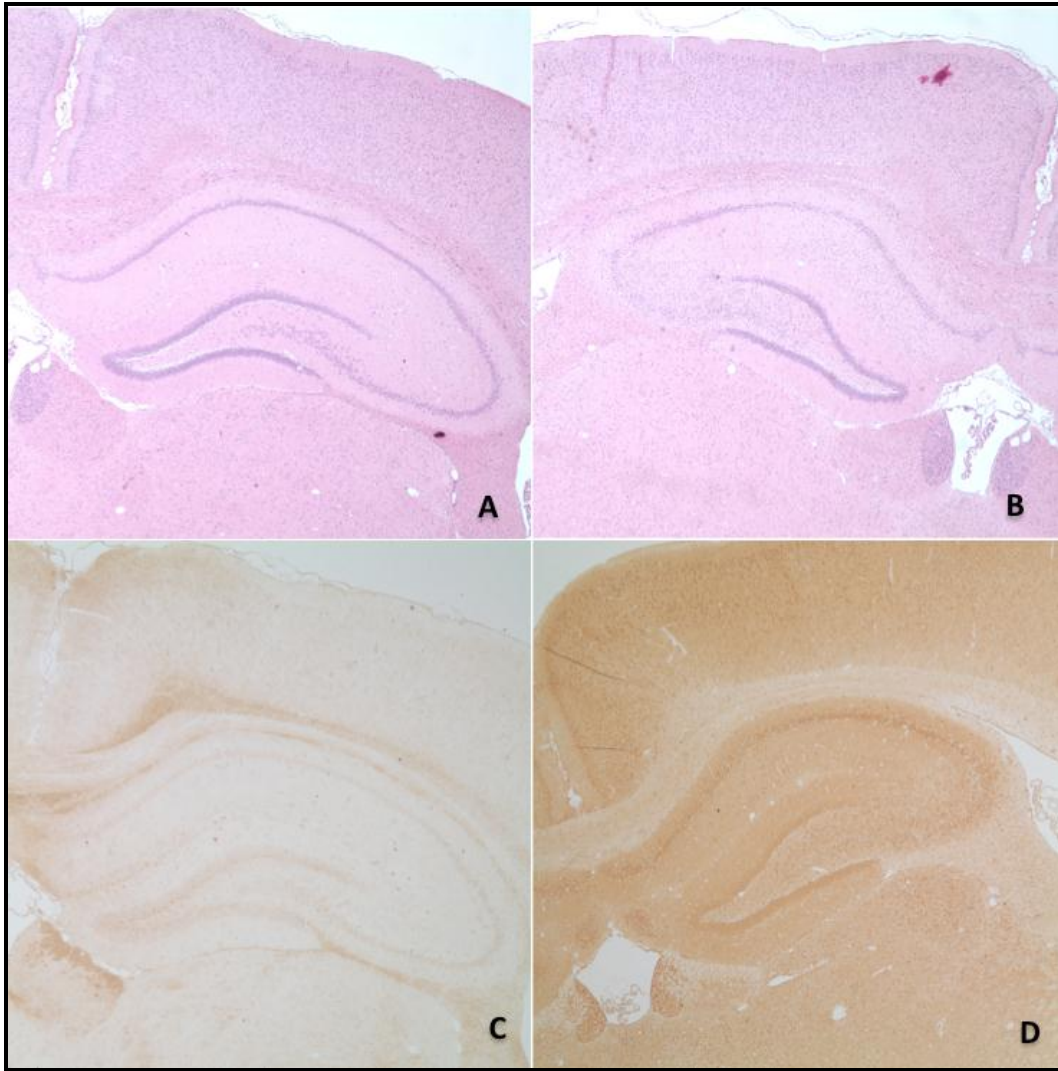
Şekil 4.2. İmmünohistokimya - Kontrol Grubu (normal hipokampus); mGluR - 1 (A (4x) ve B (10x)) ve mGluR - 5 antikorlarıyla (C (4x) ve D (10x)) boyanma paternleri.

c) Kainik Asit Grubu: Toplam 4 denekten oluşmuştur. Bu gruptaki deneklere intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu yapılmıştır.

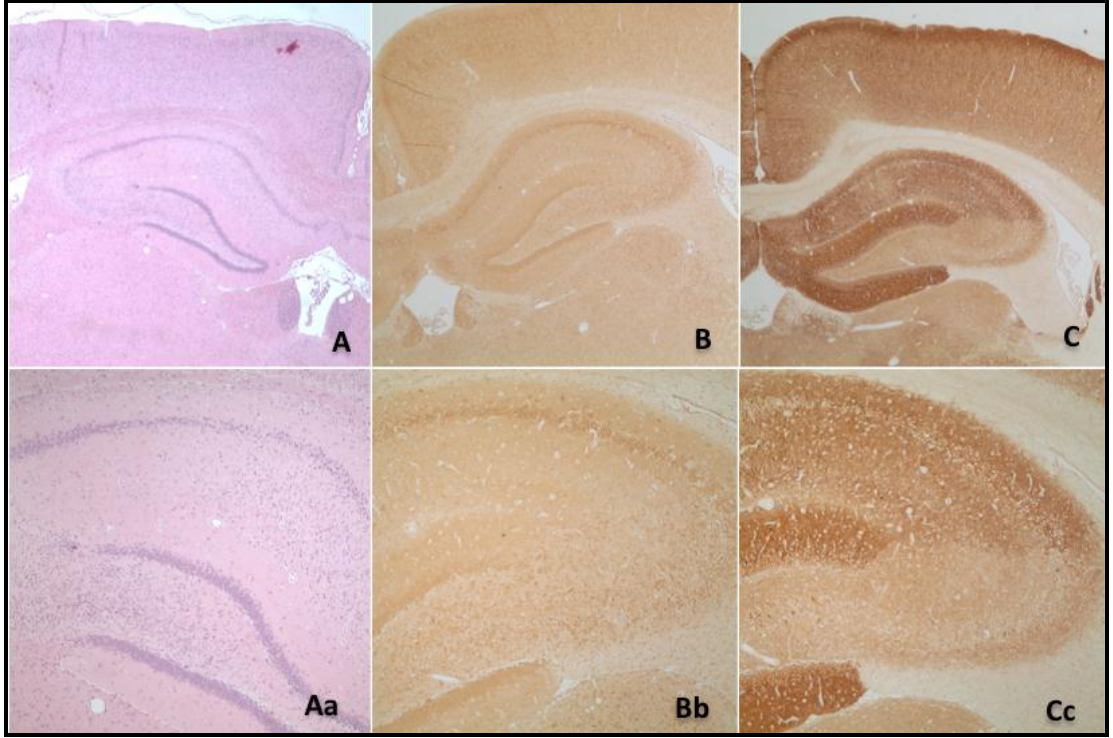
- Bu gruptaki deneklerin her iki tarafındaki hipokampustan elde edilen dokuların hemotoksilen eozin boyamasında; kainik asit enjeksiyonu sonrası her iki taraf dentat girus granüler nöronlarında değişim saptanmamıştır. Enjeksiyon tarafında (sağ) CA3 ve CA1 sektörlerinde skleroz oluşmuştur. CA2 ise kısmen korunmuştur. Yine enjeksiyon tarafında (sağ) entorhinal kortekste şiddetli iskemik değişiklikler meydana gelmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4).
- m GluR 1 boyamasında;
 - CA3 piramidal nöronlarında somato dendritik ekspresyon kaybı oluşmuştur.
 - CA1 piramidal nöronlarında somato dendritik salınımda kayıp izlenmiştir.
 - DG nöronlarında somato dendritik salınımda kayıp görülmemiştir. (Şekil 4.5).
- m GluR 5 boyamasında;
 - CA3 piramidal hücrelerinde dendritik salınım nöron kaybına sekonder olarak azalmıştır.
 - CA1 piramidal hücrelerinde dendritik salınım nöron kaybına sekonder olarak azalmıştır.
 - CA2 piramidal hücrelerinde ve DG nöronlarında dendritik salınım izlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. Kainik asit enjeksiyonu sonrası hipokampal skleroz. HE boyalı kesitler. A) 4x B) 10x C) 40x.



Şekil 4.4. Kainik asit enjeksiyonu sonrası hipokampal skleroz. A-C lezyonun karşı tarafı, B-D lezyon tarafı (hipokampal skleroz).



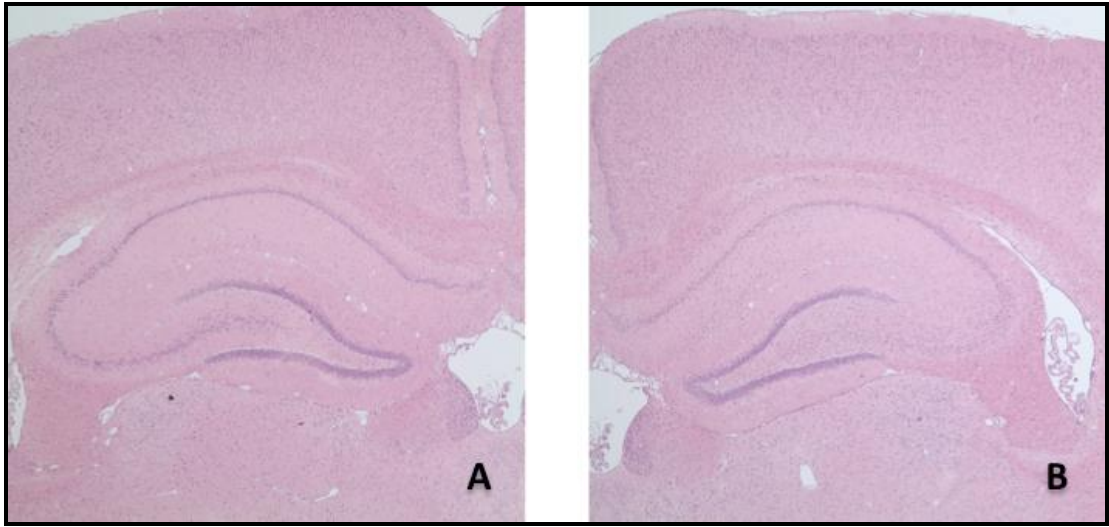
Şekil 4.5. Kainik asit enjeksiyonu ile oluşturulan hipokampal sklerozun HE boyası (A, Aa), mGluR-1(B, Bb) ve mGluR-5 (C, Cc) antikolarıyla boyanma paterni.

d) Kainik Asit + Lakozamid Grubu: Toplam 4 denekten oluşmuştur. Bu gruptaki deneklere intrahipokampal (sağ taraf) kainik asit enjeksiyonu yapıldıktan sonra 2 hafta boyunca intraperitoneal yolla lakozamid verilmiştir.

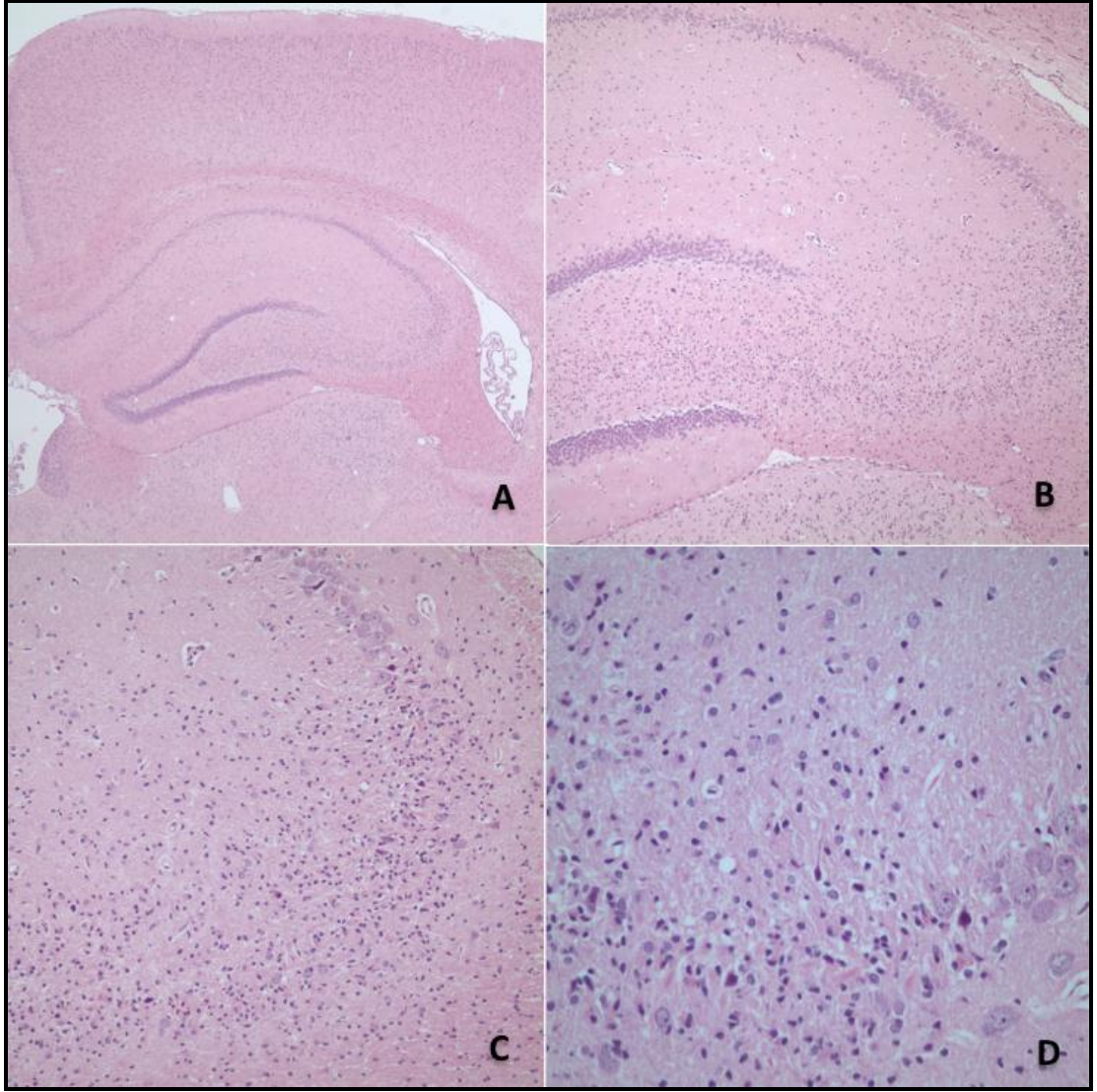
- Bu gruptaki deneklerin her iki tarafındaki hipokampustan elde edilen dokuların hemotoksilen eozin boyamasında; kainik asit enjeksiyonu sonrası her iki taraf DG granüler hücrelerinde farklılık saptanmamıştır. Kainik asit verilen tarafta (sağ) CA3 ve CA1 sektörlerinde skleroz oluşmuştur. CA2 ise kısmen korunmuştur. Enjeksiyon yapılan taraf (sağ) entorinal korteks iki denekte korunmuş olup kalan iki denekte iskemik değişiklikler oluşmuştur (Şekil 4.6 ve 4.7).
- m GluR 1 boyamasında;
 - CA3 piramidal nöronlarında somato dendritik ekspresyon kaybı oluşmuştur.
 - CA1 piramidal nöronlarında somato dendritik salınımda kayıp gözlenmiştir.
 - DG nöronlarında somato dendritik salınımda eksikliğe rastlanmamıştır. (Şekil 4.8).
- m GluR 5 boyamasında;
 - CA3 piramidal hücrelerinde dendritik salınım nöron kaybına sekonder olarak azalmıştır.
 - CA1 piramidal hücrelerde dendritik salınım nöron kaybına sekonder olarak azalmıştır.
 - CA2 piramidal hücrelerinde ve DG nöronlarında dendritik salınım izlenmiştir (Şekil 4.8).

Sonuç olarak immünohistokimyasal açıdan bakıldığında deneklerdeki mGluR1 boyanma paterni dentat girus nöronları, kortikal nöronlar ve hipokampal piramidal nöronlarda somatodendritik boyanma paterni şeklindedir. mGluR5 boyanma paterni ise aynı bölgelerde dendritik boyanma paterni şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

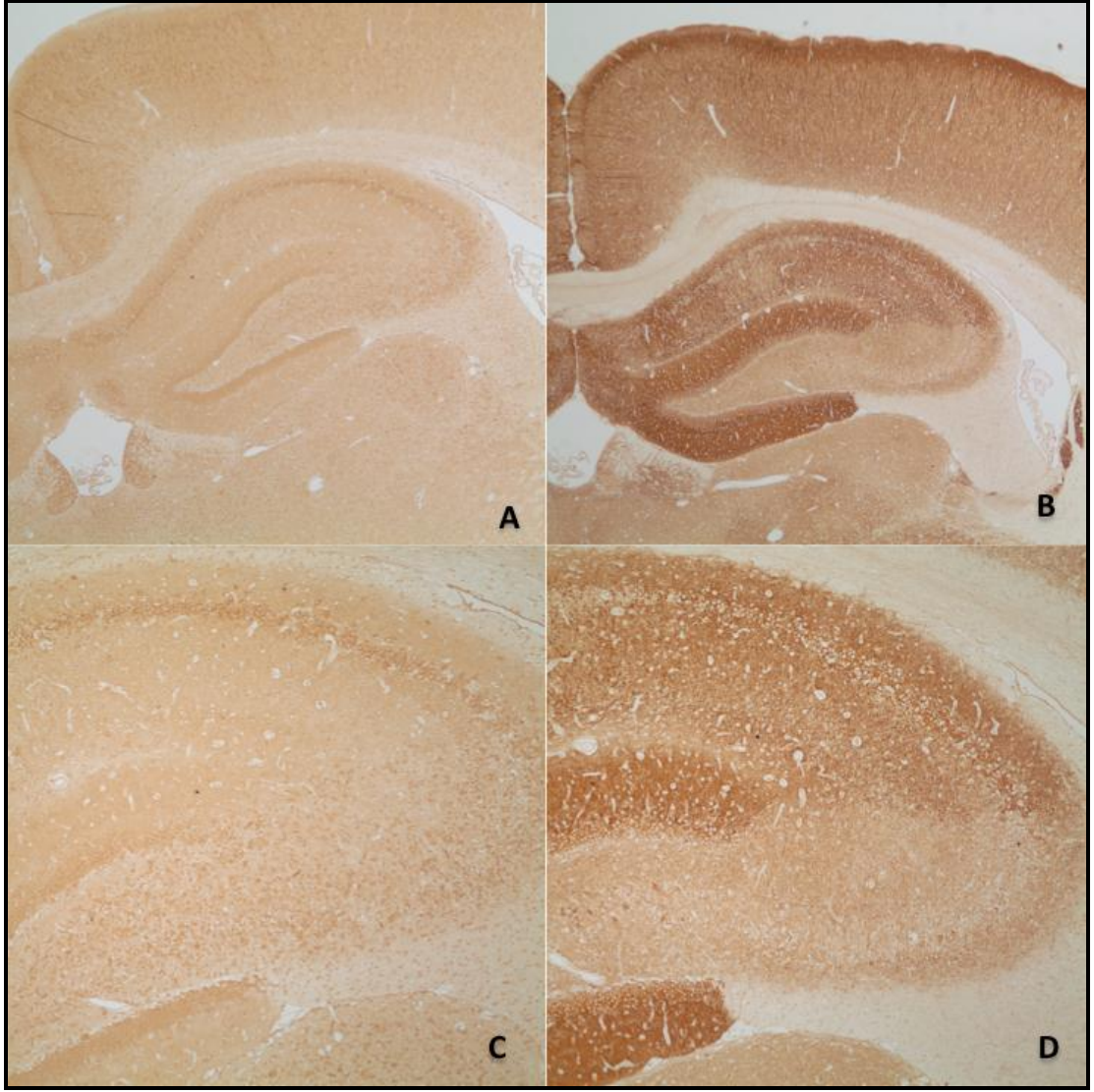
Kainik asit kullanılarak temporal lob epilepsi modeli oluşturulan deneklerin sklerotik alanlarında mGluR1 ve mGluR5 boyanma paterninde somatodendritik boyanmada azalma izlenmiştir. Bu boyamalarda izlenen ekspresyon kaybı muhtemelen hipokampal skleroz ve nöron kaybı nedeniyle meydana gelmiş olabilir. Aynı deneklerin beyinlerinin farklı bölgelerinden alınan örneklerde ise boyanma paterninde değişiklik izlenmemiştir.



Şekil 4.6. Lakozamid grubunda hipokampusların HE boyaması. A) enjeksiyonun karşı tarafı (normal hipokampus); B) enjeksiyon tarafı (hipokampal skleroz).



Şekil 4.7. Lakoamid uygulaması sonrası hipokampal sklerozdaki değişim. HE boyalı kesitler. A) 4x B) 10x C) 40x D) 100x.



Şekil 4.8. Lakoamid uygulanması sonrasında hipokampusta immünohistokimyasal boyama. mGluR-1 (A-C) ve mGluR-5 (B-D) antikorlarıyla boyanma paterni.

İmmünohistokimyasal bulguları özetlemek gerekirse; hiçbir işlem yapılmamış, naive sıçan beyinlerinde mGluR 1 ve 5 antikoları ile yapılan boyamada kortekste yerleşen nöronlar ile hipokampusta yerleşen piramidal nöronlar ve DG nöronlarında boyanmanın olduğu görülmüştür. mGluR1 ile daha çok somatodendritik boyanma izlenirken mGluR5 ile ise özellikle dendritlerinde boyanma saptanmıştır. Bunun yanında intrahipokampal kainik asit enjeksiyonuyla oluşturulan epilepsi modelinde ise sıçanların enjeksiyon yapılan sklerotik alanlarında antikolarla yapılan boyamada soma ve dendritlerdeki boyamada azalma gözlenmiştir. Ancak beynin diğer bölgelerinde belirgin fark gözlenmemiştir. Örneklerdeki bu metabotropik glutamat reseptörü 1 ve metabotropik glutamat reseptörü 5 salınımının azalmasının büyük ölçüde hipokampus dokusundaki skleroz ve nöron kaybı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hipokampusun farklı bölgelerinde yapılan boyamalar sonucunda elde edilen veriler tablo 4.1' de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Histopatolojik değerlendirmede etkilenen hipokampus b6lgelerinin skleroz derecesinin dağılımı ve antikorlarla boyanma derecesi.

| | DG | | CA1 | | CA2 | | CA3 | | EC | | mGluR1 | | mGluR5 | |
|------------------------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|--------|----------------|--------|----------------|
| | n | Skleroz miktarı | n | Skleroz miktarı | n | Skleroz miktarı | n | Skleroz miktarı | n | Skleroz miktarı | n | Boyanma durumu | n | Boyanma durumu |
| Sham <i>n=4</i> | 4/4 | - | 4/4 | - | 4/4 | - | 4/4 | - | 4/4 | - | 4/4 | + | 4/4 | + |
| Kontrol <i>n=4</i> | 4/4 | - | 4/4 | - | 4/4 | - | 4/4 | - | 4/4 | - | 4/4 | + | 4/4 | + |
| KA <i>n=4</i> | 4/4 | - | 4/4 | ++ | 4/4 | - | 4/4 | ++ | 4/4 | ++ | 4/4 | - | 4/4 | - |
| KA+LCS <i>n=4</i> | 4/4 | - | 4/4 | + | 4/4 | - | 4/4 | ++ | 4/2 | ++ | 4/4 | - | 4/4 | - |

(-) – N6ron kaybı yok

(+) – Orta derecede n6ron kaybı ve gliozis mevcut

(++) – Ağır derecede n6ron kaybı ve gliozis mevcut

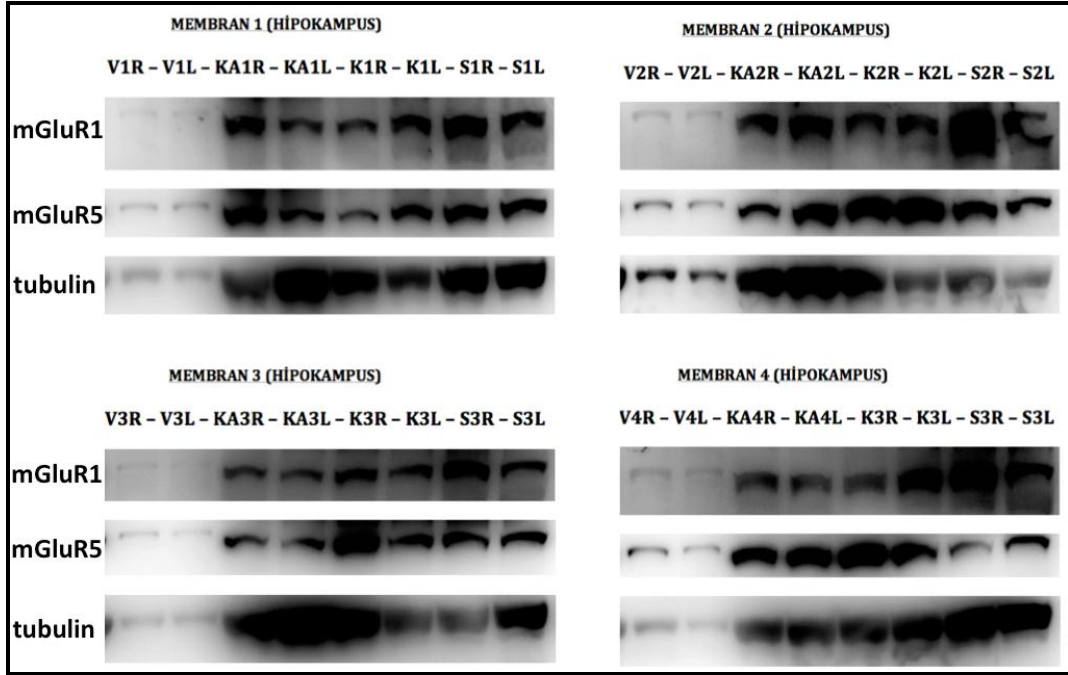
4.2. Western Blotlama

Beyinlerin sağ ve sol hemisferlerinden elde edilen hipokampus (Şekil 4.9) ve kortikal dokular (Şekil 4.10) ayrı ayrı incelendi. İntrahipokampal enjeksiyon yapılan sağ taraf ile sağlam olan sol taraf arasında mGluR1 ve 5 protein içerikleri açısından belirgin bir farklılık izlenmedi.

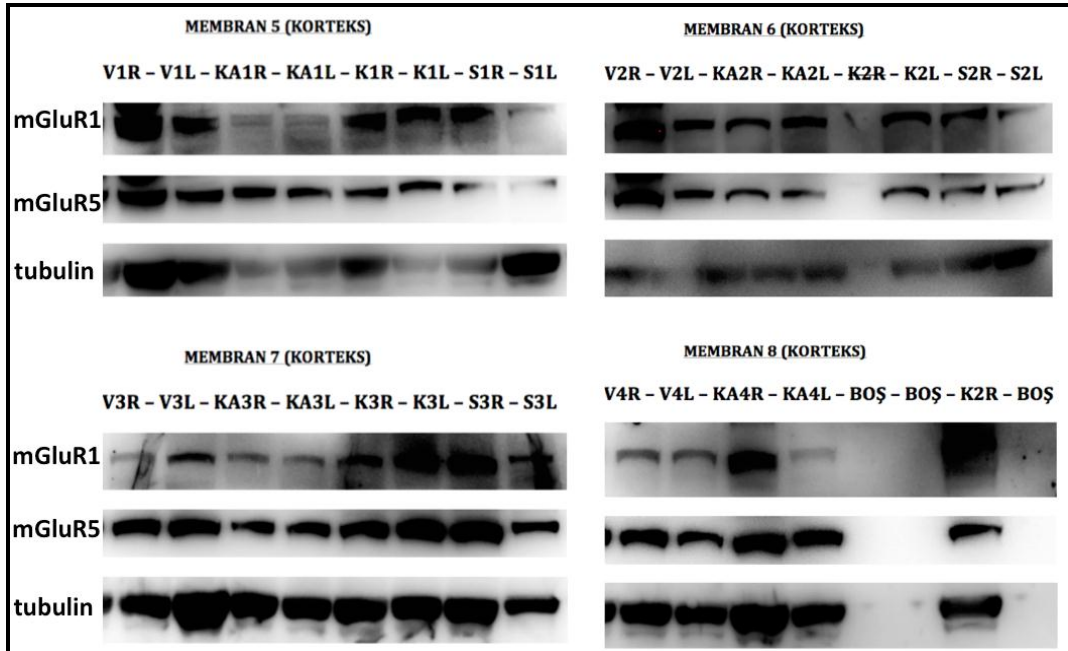
Her bir örneğin protein miktarının standardizasyonu için b-tubulin antikoları kontrol olarak uygulandı. Membranlarda mGluR1 ve mGluR5 antikoları ile 130 kDa civarında bantlar izlendi. Özel bir programla her bir banta ait intensite değerleri ölçüldü ve b-tubulin kontrolün intensitesine oranlanarak her bir örnek için (Lakozamid grubu 2. hayvan korteks-sol gibi) normalize edilmiş değerler hesaplandı (Tablo 4.2). Bu değerler kullanılarak gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. Hipokampal örneklerde ve korteks örneklerinde sağ-sol hemisferler arasında gerek grup içi gerekse gruplar arası anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 4.2. Hipokampus ve korteks örneklerinin mGluR1 ve 5 içeriğine dair Western Blot ile elde edilen normalize edilmiş değerler.

| HİPOKAMPUS | | | | |
|-----------------------------|------------|-----------|----------------|-------------|
| | LCS | KA | Kontrol | Sham |
| mGluR1- hipokampus-R | 0,39 | 0,30 | 0,25 | 0,77 |
| mGluR1- hipokampus-L | 0,46 | 0,19 | 0,49 | 0,44 |
| | | | | |
| | LCS | KA | Kontrol | Sham |
| mGluR5- hipokampus-R | 0,31 | 0,32 | 0,34 | 0,39 |
| mGluR5- hipokampus-L | 0,30 | 0,20 | 0,51 | 0,29 |
| | | | | |
| KORTEKS | | | | |
| | LCS | KA | Kontrol | Sham |
| mGluR1- korteks-R | 0,56 | 0,36 | 0,54 | 0,34 |
| mGluR1- korteks-L | 0,30 | 0,32 | 0,45 | 0,16 |
| | | | | |
| | LCS | KA | Kontrol | Sham |
| mGluR5- korteks-R | 0,49 | 0,50 | 0,39 | 0,33 |
| mGluR5- korteks-L | 0,34 | 0,36 | 0,70 | 0,20 |



Şekil 4.9. Hipokampus örneklerinde Western Blot membranlarının görüntüsü (V: Vimpat (Iakozamid); KA: Kainik asit; K: Kontrol; S: Sham; R: sağ; L: sol).



Şekil 4.10. Korteks örneklerinde Western Blot membranlarının görüntüsü (V: Vimpat (Iakozamid); KA: Kainik asit; K: Kontrol; S: Sham; R: sağ; L: sol).

5. TARTIŞMA

Temporal lob epilepsisinin en sık görülen formu olan mesial temporal lob epilepsisi (MTLE) hipokampus, amigdala, parahipokampal girus gibi beyin bölgelerinde histopatolojik bozukluklarla giden bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (7,9,50). Mezial temporal lob epilepsilerinin çoğuna eşlik eden hipokampal sklerozun; nöbetlerin hem nedeni hem de sonucu olduğu düşünülmektedir. Nöbet sonrasında özellikle hipokampusta skleroza ikincil olarak gelişen nöron kaybı, aksonlarda dallanma ve reaktif gliosis oluşumu göze çarpar. Öte yandan mesial temporal bölgeden kaynaklanan nöbetleri olan hastaların hipokampuslarının histopatolojik incelemesinde, hücre yoğunluğunun beynin diğer bölgelerinden orijin alan epileptik hastalara kıyasla daha az olması, hipokampal skleroz ve temporal lob epilepsili hastalar arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. İlaça dirençli mesial temporal sklerozu olan hastaların sklerotik hipokampuslarının çıkarılması sonucunda nöbetlerin azaldığı ya da tamamen kaybolduğu görülmektedir (28,29). Hipokampal skleroz ile nöbet arasındaki bağın ortaya konmasında en önemli parametreler deneysel modellerden elde edilmiştir. Hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, nöbet sonrası oluşan ağır hipokampal nöron kaybının sinyal iletiminde değişikliklere neden olarak epileptik nöbetleri oluşturduğu gösterilmiştir (30).

Travmatik beyin hasarı, enfeksiyonlar, hipoksik beyin hasarı, inme, tümör ve genetik sendromların TLE'ye neden olabildiği bilinse de patofizyolojideki asıl sorumlu olaylar tam olarak aydınlatılamamıştır. Glutamatın ortaya çıkardığı sinaptik uyarılma sonucu, gerek iyonotropik, gerekse de metabotropik reseptörler ile etkileşim mesial temporal lob epilepsisinin patofizyolojisinde önemlidir. MTLE hastalarında interiktal dönemde yapılan mikrodializ çalışmalarında epileptojenik hipokampusta karşı non-epileptojenik hipokampusa göre glutamat konsantrasyonunun 5 kat daha yüksek olduğu ve nöbet anında da bu artışın daha da belirgin hale geldiği tespit edilmiştir (31).

Mesial temporal lob epilepsili hastaların hipokampuslarından alınan örneklerde, alfa amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoazolepropionik asit (AMPA), N-metil-d-aspartat (NMDA) ve kainat reseptörlerinde meydana gelen değişiklikler ortaya konmuştur. Ancak mesial temporal lob epilepsisinde metabotropik glutamat reseptör salınımı ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Astrositik mGluR'ların ekstraselüler glutamat konsantrasyonunun ayarlanmasında aracı rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca yapılan hücre içi ve hücre dışı deneylerde hipokampustaki grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR1 ve mGluR5) nöbet fizyopatolojisinde etkin olduğu bulunmuştur. Temporal lob epilepside grup I metabotropik glutamat reseptör salınımını araştıran çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ameliyat sonrası hastalardan alınan doku örnekleri incelenmiş ve bu sayede kortekste yaygın olarak salınan grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin nöbet oluşumundaki etkileri daha net anlaşılmıştır. Bu nedenle bugün nöbetlerin tedavisinde bu reseptörler ciddi hedef olarak görülmektedir (32,33).

Bu çalışmada hipokampus içine direk olarak verilen kainik asit ile yapılan epilepsi modelinde grup I metabotropik glutamat reseptör salınımı ve lakozamidin bu salınım üzerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgular literatürdeki bulguları kısmen desteklemekle birlikte, lakozamidin grup 1 mGluR ekspresyonu üzerine anlamlı bir etki göstermediği görülmüştür.

Metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR) epileptik nöbetleri başlatmada ve başlayan epileptik deşarjların yayılmasında önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir. Metabotropik glutamat reseptörlerinin yapısal özelliklerinin ortaya konmasıyla yeni sentetik bileşikler geliştirilebilecektir. Geliştirilen bu sentetik bileşenler, ilgili reseptörler üzerinden etki ederek epileptik deşarjların kontrolünde alternatif olarak kullanılabilirler. (23).

Grup I metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR), glutamaterjik hipokampal ve kortikal hücreler ile GABAerjik internöronlar üzerinde postsinaptik olarak yerleşmiştir ve beyinde özellikle hipokampusun CA3 bölgesinde daha yaygındır.

Bu reseptörlerin aktivasyonu bazı potasyum kanalı türlerinin fosforilasyonu ve inaktivasyonuna neden olmakta ve sonuçta nöronların depolarizasyonuna yol açmaktadır. İnsan beyin dokusundan alınan örneklerde metabotropik glutamat reseptörleri incelenmiş ve bu reseptörlerin piramidal nöron gövdelerinde az, dendritlerinde ise çok sayıda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca hipokampal skleroz da bu reseptörlerin salınımında artış bildirilmiştir (32). Yapılan çalışmalarda grup I metabotropik glutamat reseptör agonistlerinin depolarizasyona neden olarak prokonvülzan etki gösterdikleri, antagonistlerinin ise deneysel modellerde antikonvülzan etki ortaya çıkardıkları gözlenmiştir. Bunun aksine grup II ve III mGluR agonistleri ise potansiyel antiepileptik ve nöroprotektif ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca metabotropik glutamat reseptörlerinin aynı zamanda non-konvülsif nöbetlerin regülasyonunda da rol oynadığı düşünülmektedir, zira bu reseptörlerin ligandları korteks ve talamustaki hiperaktif glutamaterjik sinaptik iletimi selektif olarak azaltarak nöbet aktivitesini baskılayabilmektedir (33,49).

Absans epilepsi genetik modeli olan WAG/Rij sıçanlarıyla yapılan bir çalışmada, kortiko-talamik ağda mGluR1 ve 5 ekspresyonu/aktivitesi azalmış olarak bulunmuştur. Bu hayvanlarda mGluR 1 ve 5 reseptörlerinin pozitif allosterik modülatörünün uygulanması ise ciddi anlamda diken-dalga deşarjlarında azalmayla sonuçlanmıştır (45).

Merlin ve ark. yaptıkları bir çalışmada pikrotoksin ile indüklenen kısa süreli interiktal uyarıların mGluR agonistleri tarafından uzun süreli uyarımlara dönüştürülebildiklerini gözlemlemişlerdir. Bu etki agonist ortadan kalktıktan sonra da belli bir süre daha devam etmekte ve antagonist ile de baskılanabilmektedir. Dolayısı ile grup 1 mGluR'ların bu özelliği nedeniyle epilepsinin indüksiyonuna yol açtığı fikrini ileri sürmüşlerdir. Buradan yola çıkarak grup 1 mGluR'ların nöbet uzamasında önemli rollerinin olduğu üzerinde durmuşlardır (40,41).

Yapılan diğer bir çalışmada Rutecki ve arkadaşları grup 1 mGluR'ların uyarılmasıyla ikincil haberci yolaklarının aktive olduğunu ve bu sayede in vitro epileptiform deşarjların ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Oluşan bu deşarjlar L-tipi kalsiyum kanallarının devre dışı bırakılması ile baskılanabilmektedir. (43).

Akbar ve ark. oluőturdukları deneysel model de 1. gün sakrifiye edilen hayvanların dentat giruslarında bilateral olarak mGluR1 artışı gözlemlerken, 28. günde sakrifiye ettikleri hayvanların dentat giruslarında tek taraflı mGluR1 artıőına rastlamıőlardır (46).

Yine Chapman ve ark. mGluR5 reseptörlerinin uyarılması sonucu oluşan epileptik aktivitenin yine aynı reseptörlerin antagonistleri tarafından engellendiğini gözlemlemişlerdir. Buradan yola çıkarak mGluR antagonistlerinin epilepsi tedavisinde alternatif olabileceği hipotezini ortaya atmıőlardır (44).

Otopsi örneklerinde yapılan bir çalışmada Notenboom ve ark. hipokampal sklerozu olan ve olmayan hastalarda grup 1 mGluR ekspresyonuna bakmıőlar ve epileptik olmayan hastalar ile karőılaőtırıldıđında, temporal lob epilepsi hastalarının hipokampuslarında mGluR5 ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada hipokampal sklerozu olan ve olmayan hastalardaki mGluR boyanma paterninin benzer olduğunu bulmuőlardır.

Yine Notenboom ve ark. hipokampal sklerozu olan ve olmayan grupta mGluR5 immünreaktivitesinin dentat girus dış moleküler tabakasında arttığını göstermiőlerdir. İ moleküler tabakaya bakıldığında ise hipokampal sklerozu olmayan grupta mGluR5 immünreaktivitesinde azalma tespit etmiőlerdir. Bu hastaların yıllar süren nöbet sorunları göz önüne alındığında, bu azalmanın hipokampal patoloji ile bağlantılı olduğu düşünölmüőtür (33,47).

Epilepsi hastalarının dokularından yapılan çalışmalarda mGluR5 ekspresyonundaki artışın tekrarlayan nöbetler sonucunda mı yoksa nöbetlerin nedeni olarak artışın ortaya çıktığını mı söylemek zordur. Hasar görmemiő dokularda mGluR5 yüksekliği aşırı uyarıma neden olmaktadır. Bu reseptör seviyesindeki yüksekliğin aşırı uyarılabilirlik ve nörotoksisiteye karşı bir bariyer olması fikri yanlıő değildir.

Sistemik enjeksiyon sonrasında oluşturulan epilepsi modelleri günümüzde oldukça fazla eleştiri almaktadır. Bunun nedeni hipokampusta bilateral değişikliklere neden olmaları ve temporal doku dışında ileri derecede beyin hasarı oluşturarak jeneralize tonik klonik nöbetlere neden olmalarıdır. Biz çalışmamızda kainik asidi dorsal hipokampusa direk olarak enjekte ederek insan temporal lob epilepsisini taklit eden bir modeli elde etmeyi hedefledik. Bu modelde sistemik modelin tersine, oluşan değişiklikler tek taraflıdır ve hipokampus kaynaklı fokal parsiyel nöbetler oluşturulur. Bu insan modelini de daha iyi yansıtan bir metottur.

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ortama verilen glutamat ve iGluR agonistlerinin epileptiform aktiviteye yol açtıkları gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak epilepsi tedavisinde iyonotropik glutamat reseptörlerini ele alan pek çok deneysel çalışma yapılmış ve bunların antagonistlerinin nöbetleri engellediği gösterilmiştir. Fakat bunlara bağlı ortaya çıkan çok sayıda yan etki bu çalışmaların etkinliğini azaltmıştır. mGluR reseptörleri ise iGluR'lerin aksine ani etki göstermezler ve modülatör etki göstererek genellikle aktif zon dışında yer alırlar (51).

Bizim çalışmamızda kainik asit enjeksiyonu sonrasında lakozamid tedavisi alan deneklerin hipokampus bölgelerinde skleroz oluşmuştur. Bu deneklerin dentat giruslarında belirgin değişikliğe rastlanmazken CA3 bölgelerinde ileri derecede hücre kaybı izlenmiş, CA1 bölgesel olarak korunmuş, CA2 bölgeleri ise bütünüyle korunmuştur. Beynin diğer bölgelerine bakıldığında hipokampal mGluR1 ve mGluR5 immünreaktivitesinde değişikliğe rastlanmamıştır. Sham ve kontrol grubu deneklerde hipokampal skleroz oluşmamış, entorinal kortekste herhangi bir değişikliğe rastlanmamış ve mGluR1 ve mGluR5 immünreaktivitesinde artış izlenmemiştir. Alınan preparatların histopatolojik incelemesinde kainik asit enjekte edilen tüm deneklerin hipokampuslarında skleroz olduğu görüldü. Tedavi verilen grupta hipokampusun CA1 bölgesinde sklerozda bir miktar azalma gösterildi.

Ayrıca lakozamid verilen deneklerin önemli bir kısmında entorinal korteksin korunduğu gözlemlendi ki, bu da lakozamidin nöroprotektif etkilerinin olduğunu gösteren önemli bir bulgudur.

Ortaya çıkan bu etkiyi, nöbet sayısını azaltarak oluşacak olan hipoksik hasarı en aza indirmek suretiyle ortaya çıkardığını düşünmekteyiz. Grup I metabotropik glutamat reseptör salınımı oluşan nöron kaybına bağlı olarak segmental bir dağılım farklılığı göstermedi.

Bu konu ile ilgili olarak daha önce yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada ise bulgular tartışmalıdır. Akbar ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada dentat girusta iki taraflı, CA3 ve CA4 te ise tek taraflı metabotropik glutamat reseptör immünreaktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. (46). Notenboom ve ark. ise hipokampusun piramidal ve granüler hücrelerinde mGluR5 immün reaktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir (47). Tang ve ark. metabotropik glutamat reseptörü 1 immün reaktivitesinde değişiklik gözlemlenmezken, metabotropik glutamat reseptörü 5 immün reaktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Bu grup hastalarda grup 1 mGluR ekspresyonunu inceleyen çalışma oldukça kısıtlıdır. Biz yaptığımız çalışmanın sonucunda grup 1 mGluR immünreaktivitesinde azalmaya rastladık. Enjeksiyon yapılan taraf ile sağlam taraf arasında dentat giruslarda ekspresyon farkına rastlanmadı. Beynin sağlam bölgeleri dikkate alındığında mGluR1 ve mGluR5 ekspresyonunda belirgin değişiklik izlenmedi.

Lakozamid, yeni nesil bir antiepileptik ilaç olup, fokal nöbetlerin tedavisinde ikincil ilaç olarak kullanılmaktadır. Temel etkisini yavaş sodyum kanal inaktivasyonunu artırarak göstermektedir (15-18). Kindling veya post-status epileptikus modellerinde epileptogenezi engelleyici etkisi gösterilememiştir. Ayrıca hücresel elektrofizyolojik çalışmalar, lakozamidin hızlı sinaptik transmisyona aracılık eden AMPA, NMDA ve GABAA reseptörleri gibi eksitatör ve inhibitör ligand kapılı iyon kanallarıyla etkileşmediğini göstermiştir (18). Ancak metabotropik glutamat reseptörleriyle etkileşimine dair bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır.

Bu çalışmada lakozamidin, grup I metabotropik glutamat reseptör salınımı üzerine belirgin olarak artı yada eksi yönde bir etkisi izlenmedi.

Bu çalışmada test edilen, yeni bir antiepileptik ilaç olan lakozamidin grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin ekspresyonunu etkileyerek antikonvülsif ve nöroprotektif etkiler gösterdiği şeklindeki hipotez, elde edilen bulgularla doğrulanamamıştır. Dolayısıyla lakozamidin oluşturduğu antiepileptik ve kısmen nöroprotektif etkilerin, metabotropik glutamat reseptörleri dışındaki mekanizmalarla gerçekleştiği düşünülebilir.

Bu mekanizmaların aydınlatılması ve mGluR'ların epilepsi patogenezindeki yerlerinin daha iyi anlaşılması, gelecekte daha etkili tekli veya çoklu antiepileptik tedavilerin klinik kullanıma girmesine katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ

Sonuç olarak intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu sonrasında oluşturduğumuz hipokampal skleroza bağlı gelişen epilepsi modelinde, deneklerin tümünde hipokampal skleroz olduğu görüldü. Sistemik enjeksiyonun tersine oluşturulan lezyon enjeksiyon tarafı ile sınırlı kaldı. Dolayısıyla beynin sağlam olan diğer bölgelerinde histopatolojik açıdan anlamlı bir iskemik süreç ya da sklerotik değişiklik izlenmedi. İncelenen tüm deneklerde dentat girus ve CA2 sektörü histopatolojik olarak korunmuştu. CA3 bölgesinde hipokampal skleroza rastlanırken CA1 sektöründe kısmen nöron kaybı izlendi. İmmünohistokimyasal açıdan boyanma özelliklerine bakıldığında, mGluR1'lerde granüler ve piramidal hücrelerde somatodendritik boyanma paterni izlenirken, mGluR5'lerdeki granüler ve piramidal hücrelerde dendritik boyanma paterni izlendi. Kainik asit enjeksiyonu sonrasında grup 1 metabotropik glutamat reseptör salınımında bir artma görülmedi. Kainik asit verilen bölgelerde ise hücre azalmasına bağlı olarak hipokampuslarda grup 1 metabotropik glutamat reseptör salınımında azalma izlendi. Lakozamid enjekte edilen gruptaki deneklerde ise grup 1 mGluR ekspresyonuna etki görülmedi ancak lakozamidin entorinal korteksteki iskemik değişiklikleri önlediği görüldü.

Bu çalışmada test edilen, yeni bir antiepileptik ilaç olan lakozamidin grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin ekspresyonunu etkileyerek antikonvülsif ve nöroprotektif etkiler gösterdiği şeklindeki hipotez elde edilen bulgularla doğrulanamamıştır.

KAYNAKLAR

1. Eadie, M. (1995). Epilepsy-from the Sakikku to Hughlings Jackson. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2(2), 156-162.
2. Bladin, P.F. (2005). "The Epilepsies": Kinnier Wilson's landmark epileptology. *Journal of Clinical Neuroscience*, 12(8), 863-872.
3. Engelborghs, S., D'Hooge, R. ve De Deyn, P.P. (2000). Pathophysiology of epilepsy. *Acta Neurologica Belgica*, 100(4), 201-213.
4. de Lanerolle, N.C., Lee, T.S. ve Spencer, D.D. (2012). Histopathology of Human Epilepsy. J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen ve A.V. Delgado-Escueta (Eds.). *SourceJasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]*. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
5. Téllez-Zenteno, J.F. ve Hernández-Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research and Treatment*, 2012, 630853.
6. Korff, C.M. ve Scheffer, I.E. (2013). Epilepsy classification: a cycle of evolution and revolution. *Current Opinion in Neurology*, 26(2), 163-167.
7. Engel, J. Jr. (2006). ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research*, 70(Suppl 1), S5-10.
8. Panayiotopoulos, C.P. (2010). *A clinical guide to epileptic syndromes and their treatment*. 2nd Edition, London: Springer-Verlag.
9. Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W. ve diğerleri. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676-685.
10. Duvernoy, H.M. (2005). *The human hippocampus. Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRİ*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

11. Engel, J., Jr. (2005). Natural history of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. M.E. Corcoran ve S.L. Moshé (Eds.). *Kindling 6: Advances in Behavioral Biology* (s. 371-384). Victoria, British Columbia, Canada: Springer US.
12. Blümcke, I., Pauli, E., Clusmann, H., Schramm, J., Becker, A., Elger, C. ve diğerleri. (2007). A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 113(3), 235-244.
13. Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, DD, Bartolomei, F, Bernasconi, A. ve diğerleri. (2013). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 54(7), 1315-1329.
14. Stephen, L.J. ve Brodie, M.J. (2011). Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents. *CNS Drugs*, 25, 89-107.
15. Beyreuther, B.K., Freitag, J., Heers, C., Krebsfänger, N., Scharfenecker, U. ve Stöhr, T. (2007). Lacosamide: a review of preclinical properties. *CNS Drug Reviews*, 13, 21-42.
16. Höfler, J. ve Trinka, E. (2013). Lacosamide as a new treatment option in status epilepticus. *Epilepsia*, 54, 393-404.
17. Stöhr, T., Kupferberg, H.J., Stables, J.P., Choi, D., Harris, R.H., Kohn, H. ve diğerleri. (2007). Lacosamide, a novel anti-convulsant drug, shows efficacy with a wide safety margin in rodent models for epilepsy. *Epilepsy Research*, 74, 147-154.
18. Rogawski, M.A., Tofighy, A., White, H.S., Matagne, A. ve Wolff, C. (2015). Current understanding of the mechanisms of action of the antiepileptic drug lacosamide. *Epilepsy Research*, 11, 189-205.
19. Bambal, G., Çakıl, D. ve Ekici, F. (2011). Deneysel epilepsi modelleri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2(1), 118-123.
20. Raedt, R., Van Dycke, A., Van Melkebeke, D., De Smedt, T., Claeys, P., Wyckhuys, T. ve diğerleri. (2009). Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurologica Scandinavica*, 119(5), 293-303.

21. Bouilleret, V., Ridoux, V., Depaulis, A., Marescaux, C., Nehlig, A. ve Le Gal La Salle, G. (1999). Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 89(3), 717-729.
22. Kew, J.N. ve Kemp, J.A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, 179(1), 4-29.
23. Ure, J., Baudry, M. ve Perassolo, M. (2006). Metabotropic glutamate receptors and epilepsy. *Journal of the Neurological Sciences*, 247(1), 1-9.
24. Jingami, H., Nakanishi, S. ve Morikawa, K. (2003). Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 271-278.
25. Bordi, F. ve Ugolini, A. (1999). Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain disease. *Progress in Neurobiology*, 59, 55-79.
26. Cartmell, J. ve Schoepp, D.D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*, 75, 889-907.
27. Alexander, G.M. ve Godwin, D.W. (2006). Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Research*, 71(1), 1-22.
28. Olivier, A. (1992). Temporal resections in the surgical treatment of epilepsy. *Epilepsy Research Supplement*, 5, 175-188.
29. Abosch, A., Bernasconi, N., Boling, W., Jones-Gotman, M., Poulin, N., Dubeau, F. ve diğerleri. (2002). Factors predictive of suboptimal seizure control following selective amygdalohippocampectomy. *Journal of Neurosurgery*, 97(5), 1142-1151.
30. Sloviter, R.S. (2005). The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *Comptes Rendus Biologies*, 328, 721-722.

31. Eid, T., Williamson, A., Lee, T.S., Petroff, O.A. ve de Lanerolle, N.C. (2008). Glutamate and astrocytes--key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*, 49(Suppl 2), 42-52.
32. Blümcke, I., Becker, A.J., Klein, C., Scheiwe, C., Lie, A.A., Beck, H. ve diğerleri. (2000). Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 59(1), 1-10.
33. Notenboom, R.G., Hampson, D.R., Jansen, G.H., van Rijen, P.C., van Veelen, C.W., van Nieuwenhuizen, O. ve diğerleri. (2006). Up-regulation of hippocampal metabotropic glutamate receptor 5 in temporal lobe epilepsy patients. *Brain*, 129(Pt1), 96-107.
34. Pitsch, J., Schoch, S., Gueler, N., Flor, P.J., van der Putten, H. ve Becker, A.J. (2007). Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 26(3), 623-633.
35. Bond, A., Monn, J. ve Lodge, D. (1997). A novel orally active Group II metabotropic glutamate reseptor agonist: LY354740. *NeuroReport*, 38, 1463-1465.
36. Tizzano, J.P., Griffey, K.I. ve Schoepp, D.D. (1995). Induction or protection of limbic seizures in mice by mGluR subtype selective agonists. *Neuropharmacology*, 34, 1063-1067.
37. Ghauri, M., Chapman, A.G. ve Meldrum, B.S. (1996). Convulsant and anticonvulsant action of agonists and antagonists of group III mGluRs. *NeuroReport*, 7, 1469-1474.
38. Thomsen, C., Klitgaard, H., Sheardown, M., Jackson, H.C., Eskesen, K. ve Jacobsen, P. (1994). (S)-4-Carboxy-3-hydroxy-phenylglycine, an antagonist of metabotropic glutamate receptor (mGluR1a) and an agonist of mGluR2, protect against audiogenic seizures in DAB/2 mice. *Journal of Neurochemistry*, 62, 2492-2495.

39. Chapman, A.G., Yip, P.K., Yap, J.S., Quinn, L.P., Tang, E. ve Harris J.R. (1999). Anticonvulsant action of two antagonists at mGluR1: KY367385 ((+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine) and (RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid (AIDA). *European Journal of Pharmacology*, 368, 17-24.
40. Merlin, L.R. ve Wong, R.S. (1997). Role of Group I metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 78, 539-544.
41. Merlin, L. (1999). Group I mGluR-mediated silent induction of long-lasting epileptiform discharges. *Journal of Neurophysiology*, 82, 1078-1081.
42. Merlin, L. (2002). Differential roles for mGluR1 and mGluR5 in the persistent prolongation of epileptiform bursts. *Journal of Neurophysiology*, 87, 621-625.
43. Rutecki, P.A., Vielhuber, K. ve Sayin, U. (2000). Mechanisms of ictal epileptiform activity produced by group I metabotropic glutamate activation in hippocampus. *Epilepsia*, 41, 162.
44. Chapman, A.G., Nanan, K., Williams, M. ve Meldrum, B.S. (2000). Anticonvulsant activity of two metabotropic glutamate Group I antagonists selective for the mGluR5 receptor: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), and (E)-6-methyl-2-styryl-pyridine (SİB 1893). *Neuropharmacology*, 39, 1567-1574.
45. Nicoletti, F., Bruno, V., Ngomba, R.T., Gradini, R. ve Battaglia, G. (2015). Metabotropic glutamate receptors as drug targets: what's new? *Current Opinion in Pharmacology*, 20, 89-94.
46. Akbar, M.T., Rattray, M., Powell, J.F. ve Meldrum, B.S. (1996). Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdala-kindled rats. *Molecular Brain Research*, 43(1-2), 105-116.
47. Notenboom, R.G.E. (2001). Upregulation of metabotropic glutamate receptor 5 immunoreactivity in the hippocampus of patient with intractable temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 42, 118-125.

48. Aronica, E., van Vliet, E.A., Mayboroda, O.A., Troost, D., Lopes da Silva, F.H. ve Gorter, J.A. (2000). Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *European Journal of Neurosciences*, 12, 2333-2344.
49. Sayin, U. ve Rutecki, P.A. (2003). Group I metabotropic glutamate receptor activation produces prolonged epileptiform neuronal synchronization and alters evoked population responses in the hippocampus. *Epilepsy Research*, 53, 186-195.
50. Picot, M.C., Baldy-Moulinier, M., Daures, J.P., Dujols P. ve Crespel, A. (2008). The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. *Epilepsia*, 49, 1230-1238.
51. Bruno, V., Copani, A., Knopfel, T., Kuhn, R., Casabona, G., Dell'Albani, P. ve diğerleri. (1995). Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology*, 34, 1089-1098.

EKLER

EK 1: Etik Kurul İzni



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: 52338575 - 39

26 Mart 2014

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 21.03.2014 (CUMA)
TOPLANTI SAYISI : 2014/03
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2013/57
KARAR NUMARASI : 2013/57-01
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Doç.Dr.Burçak BİLGİNER
HAYVAN DENEYLERİNDEN
SORUMLU ARAŞTIRMACI : Doç.Dr.Burçak BİLGİNER, Dr.Fırat NARİN
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Prof.Dr.Figen SÖYLEMEZOĞLU, Dr. Şahin HANALIOĞLU
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 36 adet Sprague-Dawley Rat

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Burçak BİLGİNER'in araştırma yürütücüsü olduğu 2013/57 kayıt numaralı *"İntrahippokampal Kainik Asit Enjeksiyonu ile Oluşturulan Temporal Lob Epilepsi Modelinde Grup I Metabotropik Glutamat Reseptörlerinin Ekspresyonu ve Lakozamidin Ekspresyona Etkisi"* isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı