



T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

**İNTRAHİPOKAMPAL KAINİK ASİT ENJEKSİYONU İLE OLUŞTURULAN TEMPORAL
LOB EPİLEPSİ MODELİNDE GRUP I METABOTROPİK GLUTAMAT
RESEPTÖRLERİNİN EKSPRESYONU VE LEVETİRASETAMIN EKSPRESYONA ETKİSİ**

Dr. Tural REHİMLİ

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2013

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

**İNTRAHİPOKAMPAL KAINİK ASİT ENJEKSİYONU İLE OLUŞTURULAN TEMPORAL
LOB EPİLEPSİ MODELİNDE GRUP I METABOTROPİK GLUTAMAT
RESEPTÖRLERİNİN EKSPRESYONU VE LEVETİRASETAMIN EKSPRESYONA ETKİSİ**

Dr. Tural REHİMLİ

Tez Danışmanı

Doç.Dr. Burçak BİLGİNER

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2013

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım olarak çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında büyük desteği ve yardımı olan Sayın Doç. Dr. Burçak Bilginer'e teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda görevli değerli öğretim üyelerim Sayın Prof.Dr. Servet İnci, Sayın Prof.Dr. Tunçalp Özgen, Sayın Prof.Dr. Osman Ekin Özcan, Sayın Prof.Dr. Selçuk Palaoğlu, Sayın Prof.Dr. Nejat Akalan, Sayın Prof.Dr. İbrahim Ziyal, Sayın Prof.Dr. Hakan Oruçkaptan, Sayın Prof.Dr. Mustafa Berker, Sayın Doç.Dr. Atilla Akbay, Sayın Doç.Dr. Kamil Öge, Sayın Doç.Dr. Melike Mut Aşkun, Sayın Doç.Dr. Gökhan Bozkurt, Sayın Uzm.Dr. İlkay Işıkkay'a uzmanlık eğitimin süresince mesleki tecrübe, deneyim ve bilgilerini benimle paylaştıkları için teşekkür ederim. Beraber çalışma fırsatı bulduğum ve tez aşamasında yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışmadaki histopatolojik incelemeleri yapan Patoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof.Dr. Figen Söylemezoğlu'na, Araş. Gör. Sayın Zarife Yusifli'ye, Nöroloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof.Dr. Yasemin Özdemir'e, Western Blott çalışmasının yapılmasında Nöroloji bilimler enstitüsünden Sayın Biyolog Sevda Lüle'ye, deneyin yapılmasında ve sonuçlandırılmasında yardımcı olan Nöroşirurji Anabilim Dalı'ndan Sayın Şahin Hanalioğlu'na teşekkür ederim.

Gerek Tıp Fakültesi gerekse uzmanlık eğitimin süresince en büyük destekçilerim olan fedakar anne ve babama, uzmanlık eğitimin süresince gösterdikleri sabır ve anlayış için sevgili eşim Zarife Yuisfli'ye, kızım Medine'ye teşekkür ederim.

ÖZET

İntrahipokampal kainik asit enjeksiyonu ile oluşturulan temporal lob epilepsi modelinde grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin ekspresyonu ve levetirasetamın ekspresyona etkisi.

Giriş: Mezial Temporal Lob Epilepsisi (MTLE) erişkinlerde görülen epilepsinin en sık formudur ve genellikle hipokampal sklerozla seyreder. Temporal Lob Epilepsili hastaların yaklaşık %30'u ilaca dirençlidir. TLE'ye neden olan moleküler mekanizmalar hala bilinmemektedir. Glutamatla oluşan yaygın sinaptik uyarılma sonucu iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri ile etkileşim TLE patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalarda hipokampal grup I mGluR reseptörlerinin (mGluR 1 ve 5) epileptogenezisdeki rolü gösterilmiştir. Modülatör etkileri bulunan ve beyinde yaygın olarak eksprese edilen grup I mGluR reseptörlerinin epilepsi etyogenezinin daha iyi anlaşılması ve potansiyel tedavi hedefleri olmaları açısından önemli olduğunu düşünülmektedir.

Amaç: Bu çalışmanın amacı intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu sonrası oluşturulan epilepsi modelinde grup I mGluR ekspresyonunu ve bir antiepileptik olan levetirasetamın ekspresyon üzerine etkilerini incelemektir.

Metod: Burr hole açılan (Sham grubu – grup 1), sadece serum fizyolojik verilen (SF grubu – grup 2), intrahipokampal kainik asit verilen (KA grubu – grup 3), intrahipokampal kainik asit + intraperitoneal levetirasetam verilen (KA + Lev grubu – grup 4) ve dört gruptan oluşan deneyde stereotaksik başlık ve Hamilton iğnesi ile intrahipokampal enjeksiyon (grup 2, grup 3 ve grup 4) yapılmıştır. 2 haftalık latent periyot sonrasında denekler dekapite edilerek bir kısmı immunhistokimyasal çalışma için, diğer grup ise Western Blot çalışması için alınmıştır.

Bulgular: İntrahipokampal KA enjeksiyonu sonrasında grup 3 ve grup 4'te histopatolojik olarak hipokampal skleroz olduğu görüldü. Histopatolojik olarak hipokampustaki skleroz ağırlıklı olarak CA3'te görülsede CA1'de de kısmen nöron kaybı izlendi. Dentat girus ve CA2'nin korunduğu görüldü. İstatistiksel anlamlılığa ulaşmamakla birlikte kainik asit enjeksiyonu grubunda, enjeksiyonun yapıldığı sağ hipokampusta sol

hipokampusu göre hem mGluR1 hem de mGluR5 miktarları görece daha yüksek bulundu. Levetirasetam KA enjekte edilen deneklerde grup I mGluR ekspresyonuna etki göstermedi.

Sonuç: Yaptığımız çalışmada intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu sonrasında epilepsi modelinin oluştuğu teyit edildi. İmmunhistokimya ve Western Blot  alışmaları sonucu grup I mGluR ekspresyonunda belirgin artış izlenmedi. Levetirasetam grup I mGluR ekspresyonu üzerine etki göstermedi.

Anahtar kelimeler: epilepsi, temporal lob epilepsisi, hipokampal skleroz, metabotropik glutamat reseptörleri, levetirasetam, kainik asit, intrahipokampal

ABSTRACT

The expression of group 1 metabotropic glutamate receptors and the effect of levetiracetam on it in intrahippocampal kainic acid injection epilepsy model.

Introduction: Mesial temporal lobe epilepsy is the most common type of epilepsy in adults and is usually caused by hippocampal sclerosis. Approximately 30% of cases of temporal lobe epilepsy (TLE) are drug resistant. The molecular mechanisms behind TLE are still unknown. The widespread synaptic excitement triggered by glutamate causing interaction between ionotropic and metabotropic glutamate receptors is considered as an important process in the pathophysiology of TLE. Several *in vitro* and *in vivo* studies have shown hippocampal group I mGluR receptor's (mGluR 1 and 5) role in epileptogenesis. Group I mGluR receptors are widely expressed in the brain, have modulating effect and are considered important from etiological perspective as well as potential targets for epilepsy treatment.

Aim: The aim of this study is to research the group I mGluR receptor expression as well as the effect of an antiepileptic agent levetiracetam (LEV) on this expression in epilepsy model triggered by intrahippocampal injection of kainic acid.

Methods: There were four groups in this study: group 1 burr hole only (Sham), group 2 normal saline injection (NS), group 3 intrahippocampal kainic acid injection (KA), group 4 intrahippocampal kainic acid + intraperitoneal levatiracetam (KA+LEV). Injections were done with Hamilton needle on a stereotactic frame (groups 2, 3 and 4). After 2 weeks of latent period animals were sacrificed by decapitation and were send for either immunohistochemistry or WB analysis.

Results: After intrahippocampal KA injection we observed histopathological evidence of hippocampal sclerosis in groups 3 and 4. Histopathologically the hippocampal sclerosis was mostly observed in CA3, although there was a partial neuronal loss in CA1 as well. Dentate gyrus and CA2 were unaffected. Although statistically not significant, in KA groups right hippocampi demonstrated more mGluR1 and mGluR5 expressions. Levatiracetam did not affect the expression of mGluR1 in KA injection group.

Conclusion: We observed the development of epilepsy model after the intrahippocampal kainic acid injection. There was no significant increase in group I mGluR expression according to immunohistochemistry and Western blot analysis. Levetiracetam did not affect the expression of group I mGluR.

Keywords: epilepsy, temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, metabotropic glutamate receptors, levetiracetam, kainic acid, intrahippocampal

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ	XIII
RESİMLER DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Epilepsi tarihçesi	3
2.2 Temporal lob epilepsisi (TLE).....	3
2.3 Epilepsi ve TLE epidemiyolojisi	4
2.4 Nöbet etiyolojisi ve patofizyolojisi	4
2.5 Epilepsinin biyokimyası.....	6
2.6 TLE histopatolojisi.....	6
2.7 Nöbet ve Epilepsi sınıflaması	8
2.8 Temporal lob anatomisi.....	14
2.9 Hipokampal anatomi ve formasyon	14
2.0.1 Hipokampal skleroz	17

2.0.2 İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri.....	19
2.0.3 Grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR) epilepside rolü	23
2.0.4 Epilepsi tedavisinde antiepileptik ilaçlar	24
2.0.5 Levetirasetam	26
2.0.6 Deneysel epilepsi modelleri	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1 Deney grupları	32
3.2 Anestezi	32
3.3 Deneysel epilepsi modelinin oluşturulması.....	32
3.4 Levetirasetam (LEV) verilmesi	34
3.5 Sakrifikasyon ve dokuların elde edilmesi	34
3.6 Histopatolojik değerlendirme	34
3.7 İmmunhistokimyasal değerlendirme	35
3.8 İmmunhistokimya.....	35
3.8.1 Fiksasyon	36
3.8.2 Deparafinizasyon	37
3.8.3 Antijen uygulaması	37
3.8.4 İmmunhistokimyasal boyanma.....	38
3.9 Western blot (İmmunblotting)	39
3.9.1 Örneklerin hazırlanması.....	40
3.9.2 Elektroforez	41

4. BULGULAR	43
4.1 Histopatolojik ve immunhistokimyasal bulgular	43
4.2 Western blot.....	55
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	67
7. REFERANS	68

KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AC	: Adenylyl cyclase
ACho	: Asetilkolin
AED	: Antiepileptic drug
AEİ	: Antiepileptik ilaç
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5metil-4izoazolepropionik asit
AQP4	: Aquaporine 4
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CA	: Cornu ammonis
Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu
DAB	: 3,3',- diaminobenzidintetrahidroklorid
DG	: Dentat girus
EC	: Entorhinal 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
HIER	: Heat-induced epitop retrieval
HRP	: Horseradish peroxidase
HS	: Hipokampal skleroz
Hz	: Herz
IBE	: International Bureau for Epilepsy
ILAE	: International League Against Epilepsy
iGluR	: İyonotropik glutamat reseptörü
İHK	: İmmunhistokimya
İP	: İntraperitoneal
KA	: Kainik asit
LEV	: Levetirasetam
MES	: Maximal electroshok seizure
MFS	: Mossy Fiber Sprouting
mGluR	: Metabotropik glutamat reseptörü
MRG	: Magnit rezonans görüntüleme
MTLE	: Mezial temporal lob epilepsisi
Na⁺	: Sodyum iyonu
NMDA	: N-metil-d-aspartat
PFA	: Paraformaldehit
PLC	: Phospholipase C

PMSF	: Phenylmethysulfonyl fluoride
PTZ	: Pentylenetetrasole
PVDF	: Polivinilidin difluorid
RiPA buffer	: Radio Immuno Precipitation Assay
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SSS	: Santral sinir sistemi
SV2A	: Sinaptik vezikül proteini 2A
TLE	: Temporal lob epilepsisi
TMB	: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
WB	: Western blot

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa:
Şekil 1. Hipokampus çizimi	17
Şekil 2. Metabotropik glutamat reseptörleri, yapısı ve etki mekanizmaları	21
Şekil 3. Glutamat reseptörleri, sinaptik dağılımı ve etkileşimi	23
Şekil 4. Rat Brain Atlas, KA enjeksiyonu yapılacak bölge – dorzal hipokampus.....	33
Şekil 5. İmmunhistokimyasal boyama aşamaları	36
Şekil 6. Peroksidazın bloke edilmesi. A) DAB’ni peroksidazla etkileşimi sonucu yanlış pozitif sonuç vermesi B) Endojen peroksidazın H ₂ O ₂ ile bloke edilmesi.....	39
Şekil 7. Western blot aşamaları.....	42
Şekil 8. Rat Brain Atlas. Bregmadan 3,3 mm posteriordan geçen keside hipokampusun şematik ilüstrasyonu	47
Şekil 9. Rat Brain Atlas. Bregmadan 5,2 mm posteriordan geçen keside hipokampusun şematik ilüstrasyonu	48

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa:
Tablo 1. Parsiyel (fokal, lokal) nöbet sınıflaması (İLAE,1981).....	9
Tablo 2. Jeneralize nöbet sınıflaması (kovulziv ve nonkovulziv) İLAE, 1981	10
Tablo 3. Epilepsilerin ve epileptik sendromların sınıflandırılması (İLAE, 1989)	11
Tablo 4. Epileptik nöbet tipleri ve Refleks nöbetler için tetikleyici uyarılar	13
Tablo 5. HS sınıflaması, Wyler 1992	18
Tablo 6. İLAE hipokampal skleroz klasifikasyonu (2013).....	19
Tablo 7. İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri ve etki mekanizmaları.	20
Tablo 8. Standart ve yeni AEİ etki spektrumu.	25
Tablo 9. Zhang skalası	30
Tablo 10. Histopatolojik değerlendirmede etkilenen entorinal korteks (EC), dentat girus (DG) ve hipokampus bölgelerinin (CA1, CA2 ve CA3) skleroz derecesinin gruplara göre dağılımı. Antikorlarla boyanan grupların (mGluR1 ve mGluR5) boyanma derecesi.....	46
Tablo 11. Entorinal kortekste (EC) oluşan değişiklikler . Gruplara göre dağılımı.	49
Tablo 12. Gruplara göre hipokampal zedelenme.....	50

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa:
Resim 1. Hipokampus ve Denizatı.	15
Resim 2. İmmunhistokimyasal boyamada hipokampus. a)Normal hippokampus; b)Klasik hippokampal skleroz. İşaretli bölgelerde belirgin hücre kaybı. CA1 ve CA4'te ağır nöronal kayıp görülmekte. CA2 ve CA3 (kısmen) korunmuştur.	18
Resim 3. A) Sıçanların stereotaksik başlığa yerleştirilmesi ve B) Hamilton iğnesi ile enjeksiyon yapılması.....	33
Resim 4. A)Göğüs duvarının açılması. B) %4'lük Paraformaldehit ile doku fiksasyonu	34
Resim 5. Western blot ünitesi.	42
Resim 6. mGluR1antikoru ile boyanma paterni.	51
Resim 7. mGluR5 antikoru ile boyanma paterni	52
Resim 8. Hipoksi sonucu oluşmuş kırmızı nöronlar	53
Resim 9. Normal hipokampus. A) Hematoksilen eozin boyası (HE), B) mGluR antikorları ile immunhistokimyasal boyama (İHK)	54
Resim 10. Hipokampal skleroz. A) Hematoksilen eozin boyası (HE), B) mGluR antikorları ile immunhistokimyasal boyama (İHK)	54
Resim 11. Temsili Western Blot membran görüntüleri. mGluR1 ve mGluR5, yaklaşık 130 kDa bandına karşılık gelmektedir. Tubulin kontrol olarak kullanılmıştır. Kısaltmalar: L-RH: Levetirasetam grubu sağ hipokampus; L-LH: Levetirasetam grubu sol hipokampus; KA-RH: Kainik asit enjeksiyon grubu sağ hipokampus; KA-LH: Kainik asit enjeksiyon grubu sol hipokampus; K-RH: Kontrol grubu sağ hipokampus; K-LH: Kontrol grubu sol hipokampus; S-RH: Sham grubu sağ hipokampus; S-LH: Sham grubu sol hipokampus.....	56

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezial Temporal Lob Epilepsisi (MTLE) limbik yapılarda epileptojenik anormalliklerle seyreden bir sendrom olarak tanımlanmaktadır (13,109). Nöbet sonrasında özellikle hipokampusta nöronal hücre kaybı, nöroeneziste artış, aksonal filizlenme ve reaktif gliosis gelişmektedir. Erişkinlerde görülen epilepsinin en sık formudur ve genellikle hipokampal sklerozla (HS) seyreder. Temporal Lob Epilepsili hastaların yaklaşık %30'u ilaca dirençlidir. Epileptojenik dokunun özellikle de hipokampusun çıkarılması nöbetlerin kontrol edilmesini sağlamaktadır.

Temporal lob epilepsi (TLE) hastalarının hipokampal hücre yoğunluğunun kontrol örneklerine ve ekstra-hipokampal odaklı epilepsi hastalarına göre daha az olması, HS ve TLE arasında bir ilişki olduğu düşüncesini desteklemektedir. İlaça dirençli TLE hastalarında hipokampal yapının cerrahi girişimle eksizyonu sonucunda hastalarda nöbetlerin azaldığı ya da ortadan kalktığı görülmüştür. Özellikle HS'nin eşlik ettiği TLE hastalarında cerrahi sonrası başarı oranının yüksek olması da bu ilişkiyi desteklemektedir (108,114).

Retrospektif çalışmalar MTLE hastalarındaki HS ile çocukluk çağı uzun febril nöbetlerin, kafa travmasının, ensefalit, menenjit ve hipoksi gibi hasarların da HS gelişmesinde etken olabileceğini göstermiştir (111,112,113).

HS ve epilepsi ilişkisinin aydınlatılmasında en büyük katkı deneysel hayvan modelleridir. Yapılan çalışmalarda hipokampustaki ağır nöron kaybının sinaptik reorganizasyon ve sinyal iletiminde değişimlere neden olduğu ve beraberinde epileptik nöbetleri ortaya çıkardığı öne sürülmektedir (105).

TLE'ye neden olan moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Glutamatla oluşan yaygın sinaptik uyarılma sonucu iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri ile etkileşim TLE patofizyolojisinde önemli etken olarak kabul edilmektedir. TLE hastalarından alınan hipokampal rezeksiyon materyalinde AMPA, NMDA ve Kainat reseptörlerindeki değişiklikler gösterilmiştir. TLE'de metabotropik glutamat reseptör (mGluR) ekspresyonunu gösteren bilgiler son derece kısıtlıdır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda hipokampal grup I mGluR reseptörlerinin (mGluR1 ve mGluR5) epileptogenezde rolü gösterilmiştir. Bugüne değin TLE'de grup I mGluR ekspresyonunu araştıran yalnızca iki çalışma vardır. Bu

Çalışmalarda cerrahi rezeksiyon materyalleri incelenmiştir. Modölatör etkileri bulunan ve beyinde yaygın olarak eksprese edilen grup I mGluR reseptörlerinin epilepsi etyogenezinin daha iyi anlaşılması ve potansiyel tedavi hedefleri olmaları açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın amacı intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu sonrası oluşturulan epilepsi modelinde grup I mGluR ekspresyonunu ve bir antiepileptik ajan olan levetirasetamın ekspresyon üzerine etkisini incelemektir. Böylece TLE etyopatogenezinin anlaşılmasına ve tedavisine katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Epilepsi tarihçesi

Epilepsi, Yunanca “*ēpilambánein*” kelimesinden türetilmiştir. Anlamı “tutukluk yapmak” demektir. Epilepsi hakkındaki en eski bilgi MÖ-1067’de Akat’lar tarafından yazılan Sakikku metninde kaydedilmiştir (1). Günümüzde kullandığımız “sara” kelimesi Arapça kökenlidir ve “yere serme” anlamına gelmektedir. Türklerin tarihinde epilepsiyi tanımlayan ilk sözcük Kaşgarlı Mahmud’un yazdığı “Divanü Lüğat-it Türk”te sara karşılığı kullanılan “talgan” kelimesidir.

Epilepside çağdaş fizyopatolojik gelişme düzeyine ulaşmada en önemli adım, İngiliz hekimi J.Hughlings Jackson’un çalışmalarıyla başlamıştır. Jackson 1873 yılında “Epilepsiler ikinci kategoriden fonksiyonel değişikliklerdir ve beyin gri maddesinin ani, aşırı ve hızlı deşarjıdır” şeklinde fokal epilepsiyi tanımlamıştır (29). İlk epilepsi cerrahisi ise İngiliz Nöroşirurjiyen Victor Horsley tarafından, çökme kırığına bağlı fokal motor nöbetleri olan bir hastada 1886’da başarıyla uygulanmıştır (30).

2.2 Temporal lob epilepsisi (TLE)

Epilepsi en yaygın kronik nörolojik hastalıklardan biridir. Genel populasyon için prevalansı %0,5-1 dir. Yeni tanı alan epilepsi hastalarının yaklaşık %30’u ilaca direnç göstermektedir (114). Temporal lob epilepsisi (TLE) fokal refraktör epilepsinin en sık görülen tipidir ve lokalizasyona bağlı epilepsilerin de üçte ikisini oluşturmaktadır (Wieser and ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy 2004). Nöbetleri kontrol altına alınamayan epilepsi hastalarında ani ölümler görülmektedir.

Parsiyel başlangıçlı epilepsiler erişkin epilepsi vakalarının %60’nı oluşturmaktadır. Parsiyel epilepsilerin en sık görülen tipi TLE’dir ve genellikle ilaca dirençlidir.

International League Against Epilepsy (ILAE) ve International Bureau for Epilepsy (IBE) tanımlamalarına göre epileptik nöbet: beyinde oluşan yaygın, anormal, senkronize nöronal aktivasyon sonucu görülen bulgu ve belirtidir (115,116). Epilepsi, beyinin epileptik nöbet oluşturan ve bu durumun nörobiyolojik, kognitif, psikolojik ve sosyal sonuçları ile

karakterize beyin hastalığıdır. Epilepsi kaza, ani ve beklenmedik ölüm riskini arttırmaktadır (88).

International League Against Epilepsy (ILAE) tanımlamasına göre epilepsi 24 saatten uzun sürede sebepsiz iki ve daha fazla epileptik nöbetin olmasıdır. Yeni tanımlamaya göre ise en az bir nöbet olması ve altta yatan predispozan faktörün bulunması gerekmektedir.

Temporal lob epilepsisi 1989 ILAE sınıflamasına göre lokalizasyona bağlı semptomatik epilepsiler altında yer almaktadır. Bu sınıflamaya göre nöbetler amigdala-hipokampal bölgeden (mediobazal limbik veya rinensefalik) ve lateral temporal bölgeden (neokortikal TLE) oluşmak üzere iki gruba ayrılır.

ILAE 2010 sınıflamasında hipokampal sklerozun (HS) eşlik ettiği mesial temporal lob epilepsisi (mTLE) yer almıştır. Limbik epilepsinin bir alt grubu olarak bilinen bu formun ilaca dirençli ve epilepsi cerrahisi önerilen en büyük grup olduğu gösterilmiştir.

2.3 Epilepsi ve TLE epidemiyolojisi

Gelişmiş ülkelerde epilepsi prevalansı 4-10/1000'dur. Gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek olup 14-57/1000'dir.

Epilepsinin gelişmiş ülkelerdeki yıllık insidansı ise 25-50/100,000 iken, gelişmekte olan ülkelerdeki yıllık insidansı 30-115/100,000'dir. Gelişmiş ülkelerde epilepsi çocuk ve yaşlılarda yüksek oranda görülse de, gelişmekte olan ülkelerde genç erişkinlerde daha yüksek oranda görülmektedir.

İlk tanı alan epilepsi hastalarından %60'ında nöbetler fokal orijinlidir. Bu hastaların %80'nde nöbet odağı temporal lob kaynaklıdır (117,118,119).

2.4 Nöbet etiyolojisi ve patofizyolojisi

Nöbet beyindeki bir grup nöronun ani, anormal, beklenmedik aşırı elektriksel deşarjına bağlı olan değişikliği tanımlar. Çoğunlukla kendiliğinden sonlanan kısa epizodlardır. Epileptogenezden sorumlu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Patofizyolojik olarak epilepsi sendromları farklılık gösterse de tüm epilepsi türlerinde artmış nöronal uyarılabilirlik ve senkronizasyon gibi özellikler mevcuttur.

Nöbet oluşumundaki ana mekanizmanın beyindeki ana inhibitör nörotransmitter GABA aktivitesindeki azalma ve ana eksitator nörotransmitter Glutamat etkinliğindeki artma olduğu düşünülmektedir.

Epileptik sendromların en önemli ortak özelliği artmış hücresel uyarılardır. Anormal hücresel uyarılar travma, hipoksi, tümör, enfeksiyon, metabolik bozukluklar vb. nedenlere bağlı olabilir. Altta yatan nedenler ve patofizyolojik mekanizmalar bazı epilepsi tiplerinde kısmi de olsa anlaşılmıştır (nöronal migrasyon hastalıkları, monojenik epilepsiler). Tuberoskleroz, periventriküler heterotopi ve subkortikal band heterotopisi bunlara örnektir. Berkovic ve ark. 1996'da yeni epileptik sendrom, Familial temporal lob epilepsisini tarif etmişlerdir. Bu sendromun 10q22-24 kromozomuna bağlı geçtiği belirlenmiştir (120). Jacobs ve ark. çalışmalarında mikrogirik kortekste postsinaptik glutamat reseptörlerinde artış ve GABA reseptörlerinde azalma olduğunu göstermiştir.

Uyarılabilirlik iktogenezin temel özelliğidir ve özgün nöronlardan, nöronal mikroçevreden ve bir grup nöron popülasyonundan gelişebilir.

- I. **Özgün nöronlardan gelişen uyarılabilirlik:** postsinaptik membranda fonksiyonel ve belki de yapısal değişiklikler gelişir. Epileptik nöronlarda Ca^{2+} iletkenliği artışı mevcuttur.
- II. **Nöronal mikroçevreden gelişen uyarılabilirlik:** epileptik odakta hem fonksiyonel hem de yapısal değişiklikler görülür.
- III. **Epileptik hücre popülasyonundan gelişen uyarılabilirlik:** anatomik ve fizyolojik nöronal değişiklik sonucu artmış uyarılabilirlik. İnhibitör nöronların selektif kaybı görülür. Artmış uyarılabilirliğin nöronal değişikliğine örnek olarak Mossy liflerindeki filizlenme (Mossy Fiber Sprouting – MFS) gösterilebilir. MFS hipokampal sklerozun eşlik ettiği temporal lob epilepsilerinde gösterilmiştir. Normal şartlarda dentat granül hücreleri nöbet oluşumunu hipokampal ağ vasıtasıyla baskılasa da MFS dentat granül hücrelerini epileptojenik nöron popülasyonuna dönüştürmektedir (121).

2.5 Epilepsinin biyokimyası

Epilepsinin GABA hipotezi GABA-erjik inhibisyonundaki azalmanın nöbete yol açtığını ve GABA-erjik inhibisyonundaki artışın nöbeti engellediğini savunmaktadır (91). Dirençli epilepsi hastalarından alınan BOS'da ve cerrahi eksizyonla elde edilen patoloji materyallerinde epileptojenik odakta GABA düzeyinde ve glutamik asit dekarboksilaz (GAD) aktivitesinde düşüş izlenmiştir (91). Deneysel epilepsi modeli oluşturulan köpeklerden alınan BOS örneklerinde GABA düzeyinde düşüş izlenmiştir (38,79). Başka deneysel epilepsi modeli oluşturulan sıçanların substantia nigra'larından alınan örneklerde GAD aktivitesinde düşüş izlenmiştir (38,79,122,123). Genetiği değiştirilen ve nöbet geçiren farelerde GABA reseptör sayısında azalma kaydedilmiştir (124). Birçok antiepileptik ajan GABA analogudur, GABA metabolizmasını bloke eder (vigabatrin, tiagabin, valproate) veya GABA'nın postsinaptik etkilerini artırır.

Glutamaterjik sinapslar bütün epileptik olaylarda kritik rol alır. Hem iyonotropik hemde metabotropik glutamate reseptörlerinin aktivasyonu prokonvulzan etki gösterir. Metabotropik glutamate reseptör fonksiyonundaki değişiklik epileptogeneziste kilit rol oynayabilir (59,61,66,125).

2.6 TLE histopatolojisi

Hippokampal sklerozla seyreden TLE'de hippocampusun nöbet orijininde dominant fokus olduğu gösterilmiştir. Sklerotik hippocampusta iki ana patolojik olay izlenmiştir:

1. Dentat girus'ta nöronal devre reorganizasyonu: Subgranüler hilar internöron, mossy hücreleri ve granül hücrelerinde kayıp mevcuttur. Granüler hücre mossy liflerinde dentat iç moleküler katmana doğru kollateral yayılma oluşmaktadır.
2. Ammon boynuzunda nöral hücre kaybının yerini glial aktivasyon ve proliferasyon almaktadır. Glutamat reseptör ekspresyonunda artış, AQP4 yeniden dağılımı, Na^+ ve Ca^{2+} iyon kanallarında artış ve Kir4.1 kanallarında azalma ortaya çıkmaktadır.

Bu değişikliğe maruz kalan astrositler yoğun GFAP pozitif ve zayıf GFAP pozitif olarak iki gruba ayrılır.

TLE bütün dünyada 40 milyon kişinin etkilendiği en yaygın epilepsi hastalığıdır. Histopatolojisi en çok incelenen ve histolojik lezyonu en iyi anlaşılan epilepsi tipidir.

TLE histopatolojisini inceleyen en eski çalışma Sommer tarafından yapılmıştır (41). Sommer Ammon boynuzundaki patolojinin hastaların %30'da görüldüğünü ve genellikle tek taraflı olduğunu göstermiştir. Diffüz hücre kaybının hippocampusun sınırlı bölgesini etkilediğini (CA1 alanı) ifade etmiştir. Daha sonra bu alan Sommer alanı olarak tanımlanmıştır (42). Bratz otopsi yapılan epilepsi hastalarının %50'sinde Ammon boynuzundaki değişikliği göstermiş ve bu değişikliğin tek taraflı olduğunu kanıtlamıştır (43). Bratz daha detaylı inceleme sonucunda Ammon boynuzunda aşağıdaki değişiklikleri göstermiştir (44,45):

- CA1 alanında yaygın piramidal hücre kaybı,
- Korunmuş subiculum ve stratum oriens,
- Daha az hücre kaybı izlenen hilus ve dentate gyrus,
- CA2 alanındaki piramidal hücrelerin korunması ve
- CA1 alanında neovaskülarizasyon.

Hipokampal patolojinin TLE ile ilişkisi tartışma konusu olmasına rağmen hippocampusun TLE'de önemli rol oynadığı bilimsel olarak kanıtlanmıştır.

Stauder ilk kez hippocampal sklerozu TLE ile ilişkilendirmiştir (46). İlaça dirençli epilepside temporal lobun *en bloc* rezeksiyonunu tarif eden Falconer, rezeke temporal lobdaki mesial temporal skleroz varlığının iyi cerrahi sonuçla yüksek korelasyon gösterdiğini vurgulamıştır (47). Sonraki yıllarda intrakranial EEG kayıtları hippocampal sklerozlu TLE hastalarında nöbet odağının sklerotik hippocampus olduğunu göstermiştir (48). Bratz TLE'de hippocampal sklerozun nöbet sonucu oluşmadığı fikrini öne sürmüştür (43). Hippokampal sklerozun nöbetlerin nedeni ya da sonucu olması tartışma konusudur. MRG volumetrik ölçümleri hippocampal sklerozun derecesi ile nöbet sıklığı ve şiddeti arasında korelasyonun olmadığını göstermiştir (49).

Bruton ilaca dirençli TLE'de nöronal, miyelin ve immunohistokimyasal boyalarda hippocampal sklerozun farklı tiplerini tanımlamıştır (44,50,51,52). Konvansiyonel histopatolojik kriterlere göre hippocampuslar iki gruba ayrılmıştır: hippocampal sklerozu olmayanlar (otopsi kontrollerine göre normale yakın olanlar) ve hippocampal sklerozu olanlar. Hippokampal sklerozu olmayan grupta hücre kaybı %25'in altındayken, hipokampal volüm normaldir ve immunhistokimyasal değişiklik görülmemektedir. Non-sklerotik olarak değerlendirilen bu grubun iki alt grubu vardır: lezyonel TLE grubu (düşük evreli gliomlar,

kavernomlar); ve paradoksal TLE grubu. Bu grupta lezyon olmadığı gibi febril nöbet veya başka bir etyolojik neden de yoktur.

2.7 Nöbet ve Epilepsi sınıflaması

Epileptik hastalıkların sınıflandırılmasının temel amacı tanı için altyapı oluşturmak, doğru tedaviyi yapmak ve prognozu belirlemektir (7).

Henri Gastaut 1964 yılda ilk olarak nöbet ve epilepsilerin sınıflandırmasını yapmıştır. Bu sınıflama İLAE tarafından modifiye edilerek 1981’de nöbet sınıflaması ve 1989’da epilepsi ve epileptik sendromların yeni sınıflaması olarak önerilmiştir. 2010’da İLAE’nin Terminoloji ve Sınıflama Komisyonu nöbet ve epilepside yeni terminolojiler ile birlikte sınıflamada modifikasyonlar yapmıştır. Her ne kadar 1989 sınıflaması eleştirilse de günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (8).

1981 İLAE nöbet sınıflaması klinik ve EEG (iktal ve interiktal) bulgularına dayanılarak yapılmıştır. Nöbetler aşağıdaki gibi tiplendirilmiştir:

- I. Parsiyel (fokal veya lokal) nöbetler
- II. Jeneralize nöbetler (tonik, klonik, tonik-klonik, myoklonik ve tipik ya da atipik absans)
- III. Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler (neonatal nöbetler, ritmik göz hareketleri vb.)
- IV. Uzamış veya tekrarlayan nöbetler (status epileptikus)

Bu sınıflamada İLAE parsiyel ve jeneralize olmak üzere temel ayırım yapmıştır. Parsiyel nöbetlerde üç alt gruba ayrılmıştır: bilinç kaybı ile seyredenler (kompleks parsiyel), kognitif disfonksiyon olmayan (basit parsiyel) ve sekonder jeneralize nöbetler.

Klinik nöbet tipi	İktal EEG bulguları	İnteriktal EEG bulguları
A) Basit parsiyel nöbetler (bilinç etkilenmez) 1. Motor bulgularla seyreden - İlerleme olmayan fokal motor - İlerleyen fokal motor (Jacksonian) - Versif - Postural - Fonatur (vokalizasyon ve ya konuşmanın durması) 2. Somatosensoriyel ve ya özel duyuşsal belirtilerle giden (halüsinasyonlar, iğnelenme, ışık çakması ve b.) - Somatosensoriyel - Görsel - İşitsel - Koku - Tat - Vertiginöz 3. Otonom belirti ve bulgularla seyreden (epigastrik his, solukluk, terleme, kızarıklık, piloereksiyon ve pupil dilatasyonu) 4. Psişik belirtilerle seyreden (yüksek serebral fonksiyonların bozulması) - Disfazik - Dismnezik (deja vu) - Bilişsel (rüya durumu, zaman duygusu bozulması) - Affektif (korku, kızgınlık) - İllüzyonlar (makropsi) - Yapılanmış halüsnasyonlar (müzik, görüntü)	İlgili kortikal temsil alanının üzerinden başlayan kontralateral fokal deşarj	Fokal kontralateral deşarj
B) Kompleks parsiyel nöbetler (bilinç kaybı ile beraber) 1. Basit parsiyel başlangıç sonrasında bilincin kaybolması - Basit parsiyel özellikleri takiben bilinç kaybı - Otomatizmalarla birlikte 2. Bilinç kaybı ile başlayan - Sadece bilinç kaybı - Otomatizmalarla birlikte	Unilateral ya da sıklıkla bilateral deşarjlar temporal ya da fronto-temporal fokal ve ya diffüz	Unilateral ya da bilateral genellikle asenkron fokus; genellikle temporal ve ya frontal bölgelerde
C) Sekonder jeneralize nöbetlere dönüşen parsiyel nöbetler (jeneralize tonik –klonik, tonik ya da klonik) 1. Basit parsiyel nöbetlerin jeneralize nöbetlere dönüşmesi 2. Kompleks parsiyel nöbetlerin jeneralize nöbetlere dönüşmesi 3. Basit parsiyel nöbetin kompleks parsiyel nöbete daha sonra jeneralize nöbete dönüşmesi	Deşarjların hızla sekonder bilateral jeneralize olması	

Tablo 1: Parsiyel (fokal, lokal) nöbet sınıflaması (İLAE,1981)

Klinik nöbet tipi	İktal EEG bulguları	İnteriktal EEG bulguları
A. Absans nöbetleri a. Sadece bilinç kaybı b. Hafif klonik bileşenle beraber c. Atonik bileşenle beraber d. Tonik bileşenle beraber e. Otomatizmalarla beraber f. Otonom bileşenle beraber B. Atipik absans nöbetleri a. Tonus değişiklikleri daha belirgin b. Başlangıcı ve bitişi ani değil C. Myoklonik nöbetler Myoklonik atımlar D. Klonik nöbetler E. Tonik nöbetler F. Atonik nöbetler (astatik)	Genellikle regüler ve simetrik 3Hz, 2-4 Hz diken-yavaş dalga, çoklu diken-yavaş dalga kompleksleri. Anormallikler bilateraldir EEG daha heterojendir. İrregüler diken, yavaş dalga kompleksleri. Bilateral, düzensiz ve asimetrik Çoklu diken dalga ve keskin yavaş dalgalar Hızlı aktivite (sn. 10 Hz ve üzeri), yavaş dalga, nadiren diken-dalga Düşük voltajlı hızlı aktivite. Frekansın azalıp amplitüdün arttığı (9-10Hz) hızlı ritm Çoklu diken dalga, düşük ya da çok düşük amplitütlü hızlı aktivite	Zemin aktivitesi normal. Diken ve diken-yavaş dalga gibi paroksizmal anormallikler görülebilir. Düzenli ve simetrik Zemin aktivitesi genellikle anormaldır. Diken ve diken-yavaş dalga kompleksleri düzensiz ve asimetrik İktal EEG'ye benzer Diken dalga ve ya çoklu diken-dalga Az ve ya çok ritmik keskin-yavaş dalga Çoklu diken-yavaş dalga

Tablo 2: Jeneralize nöbet sınıflaması (kovulziv ve nonkovulziv) İLAE, 1981

Epilepsi ve epileptik sendromların 1989'da yapılmış sınıflamasında İLAE temel olarak iki kriter ele almıştır. Lokalize veya jeneralize nöbetler oluşum sebebine göre de idiyopatik, semptomatik ve kriptojenik altgruplara ayrılmıştır.

Tablo 3: Epilepsilerin ve epileptik sendromların sınıflandırılması (İLAE, 1989)

- I. Lokalizasyona bağlı epilepsiler ve sendromlar (fokal, parsiyel)**
 1. İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç)
 - a. Sentrotemporal dikenli iyi huylu çocukluk çağı epilepsisi
 - b. Oksipital paroksizmlı çocukluk çağı epilepsisi
 - c. Primer okuma epilepsisi
 2. Semptomatik
 - a. Temporal lob epilepsisi
 - b. Frontal lob epilepsisi
 - c. Parietal lob epilepsisi
 - d. Oksipital lob epilepsisi
 - e. Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsialis kontinuası (Kojevnikov sendromu)
 - f. Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar
- II. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar**
 1. İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç – yaş sırasına göre sıralanmıştır)
 - a. İyi huylu ailesel yenidoğan konvulzyonları
 - b. İyi huylu yenidoğan konvulzyonları
 - c. Süt çocukluğunun iyi huylu myoklonik epilepsisi
 - d. Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolesi)
 - e. Juvenil absans epilepsisi
 - f. Juvenil myoklonik epilepsi (impulsif petit mal)
 - g. Uyanmada grand mal epilepsisi
 - h. Diğer jeneralize idiyopatik epilepsiler
 - i. Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler
 2. Kriptojenik ve ya semptomatik (yaş sınırına göre)
 - a. West sendromu (infantil spazmlar, Blitz-Nick-Salaam Kraempfe)
 - b. Lennox-Gastaut sendromu
 - c. Myoklonik astatik nöbetli epilepsi
 - d. Myoklonik absans epilepsisi
 3. Semptomatik
 - a. Spesifik olmayan etiyoloji
 - Erken myoklonik ensefalopati
 - Erken infantil epileptik ensefalopati (baskılanım boşalım ile)
 - Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler
 - b. Spesifik sendromlar
- III. Fokal ve ya jeneralize oldukları belirlenemeyen epilepsiler**
 1. Jeneralize ve fokal konvülzyonlu epilepsiler
 - a. Yenidoğan konvülzyonları
 - b. Süt çocuğunun ağır myoklonik epilepsisi
 - c. Yavaş dalga uykus sırasında devamlı diken dalgalı epilepsi
 - d. Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)
 - e. Diğer belirlenemeyen epilepsiler
 2. Jeneralize ve ya fokal konvülzyon özelliği belirlenemeyen epilepsiler
Jeneralize tonik klonik nöbetleri olan ancak klinik ve EEG bulguları jeneralize ya da fokal epilepsi ayrımında kesin bilgilermeyen tüm olgular
- IV. Özel sendromlar**
 1. Duruma bağlı nöbetler
 - a. Febril konvülzyonlar
 - b. İzole nöbet ve ya izole status epileptikus
 - c. Akut metabolik ve ya toksik nedenlere bağlı nöbetler

Zamanımızda halen kullanılsa da eski sınıflamaların yenilenmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Yeni nörogörüntüleme yöntemleri ve nörofizyolojik çalışmalar jeneralize nöbetlerin tüm korteksten kaynaklandığı fikrini ortadan kaldırmıştır (53,54). Birçok nöbet tipinde fokal veya jeneralize ayırımını uygulamak zordur. EEG bulguları yenidoğan ve çocukluk döneminde farklı olabilir. Örnek olarak Dravet sendromlu hastalar hem jeneralize hemde fokal nöbetlerin görüldüğü EEG bulguları ile seyredebilir. 1989 İLAE sınıflamasında jeneralize nöbet tiplerinde yer alan West sendromu fokal nöbet geçiren ve rezektif cerrahi sonrası tedavi edilebilen hastalık grubundandır (55,56).

2010'da Epilepsi Organizasyonları jeneralize nöbetleri: bir noktadan kaynaklanan ve hızlıca bilateral yayılarak bütün ağı tutan nöbetler olarak tanımlamıştır. Bu ağ: korteksi ve subkortikal yapıları içerebilir, bütün korteksin tutulması şart değildir. Jeneralize nöbetler asimetrik olabilir (7).

Jeneralize nöbet tiplerinde rasyonelleştirilme yapılmıştır. Absans nöbetleri üç kategoriye ayrılmış: tipik, atipik ve farklı özellikleri olan (myoklonik absans ve göz kapağı myoklonisi). Myoklonik nöbetler de myoklonik, myoklonik-atonik ve myoklonik-tonik olarak sınıflandırılmıştır (7).

'Parsiyel' kelimesinin yerini 'fokal' kelimesi almıştır. Fokal nöbetler bir hemisfere sınırlı, bir odaktan kaynaklı nöbetler olarak tarif edilmiştir. 'Kompleks' kelimesi bilincin, uyanıklığın değişmesi anlamına gelmektedir, alternatif olarak 'diskognitif' kelimesi kullanıma girmiştir. 'Basit' kelimesinin yerini 'bilincin değişmemesi' almıştır. 'Kompleks parsiyel' nöbet yeni deyişimiyle 'fokal diskognitif' nöbet olarak ifade edilmektedir. Neonatal nöbetler farklı antite olarak kullanımdan kaldırılmıştır (7).

Etiyolojik gruplandırılıma tamamen değiştirilerek idiyopatik, semptomatik ve kriptojenik kelimeler kullanımdan kaldırılmıştır. Genetik, yapısal, metabolik ve bilinmeyen şeklinde yeniden yapılandırılmıştır (7).

Benign ve katastrofik kelimeleri kullanımdan kaldırılarak, kendini sınırlayan, ilaca yanıt veren ve ilaca dirençli kavramları getirilmiştir (7).

Tablo 4: Epileptik nöbet tipleri ve Refleks nöbetler için tetikleyici uyarılar

- I. Kendini sınırlayan nöbetler**
- Jeneralize nöbetler**
- Tonik-klonik nöbetler (klonik ve ya myoklonik parçaları bairangıcı olanlar dahil)
 - Klonik nöbetler
 - Tonik özelliğı olan
 - Tonik özelliğı olmayan
 - Tipik absans nöbetleri
 - Atipik absans nöbetleri
 - Myoklonik absans nöbetleri
 - Tonik nöbetler
 - Spazmlar
 - Myoklonik nöbetler
 - Gözkapağı myoklonisi
 - Absansla beraber olan
 - Absansla beraber olmayan
 - Myoklonik atonik nöbetler
 - Negatif myoklonus
 - Atonik nöbetler
- Fokal nöbetler**
- Fokal duyusal nöbetler
 - Basit duyusal semptomlarla (okspital ve paryetal lob epilepsisi)
 - Hayali duyusal semptomlarla (temporo-pariyeto-okspital bileşke)
 - Fokal motor nöbetler
 - Basit klonik motor nöbetler
 - Asimetrik tonik motor nöbetler (suplementar motor alan)
 - Tipik otomatizmalar (mezial temporal lob epilepsisi)
 - Hiperkinetik otomatizmalar
 - Fokal negatif myoklonus
 - İnhibitör motor nöbetler
 - Gelastik nöbetler
 - Hemiklonik nöbetler
 - Sekonder jeneralize nöbetler
- II. Tekrarlayan ve ya devamlı nöbetler**
- Jeneralize status epileptikus**
- Jeneralize tonik-klonik SE
 - Klonik SE
 - Absans SE
 - Tonik SE
 - Myoklonik SE
- Fokal status epileptikus**
- Epilepsia parsiyalis kontinua (Kojevnikov)
 - Aura kontinua
 - Limbik SE (psikomotor status)
 - Hemikonvulziv status
- III. Refleks nöbetler için tetikleyici uyarılar**
- Vizual, müzik, yemek, sıcak su, okuma ve b.

Engel tarafından yapılmıştır (2001).

2.8 Temporal lob anatomisi

Temporal lob beynin yan tarafında yerleşmiş telensefalon bölgesidir. Konuşma, hafıza ve duymanın dahil olduğu birçok görevi bulunmaktadır. Lateral, inferior ve medial olmak üzere üç yüzeyi vardır. Temporal lobun lateral yüzeyi preoksipital çentikle parietookspital sulkusu birleştiren hayali çizginin önünde yer almaktadır. Üç paralel yerleşimli (superior, middle ve inferior) gyrustan oluşmaktadır. Temporal lobun bazal yüzeyi oksipital lobun bazal yüzeyi ile aynı giruslardan oluşmaktadır. Bunlar oksipitotemporal, kollateral ve rinal sulkuslarla ayrılmıştır. Medialden laterale doğru yerleşen parahipokampal, oksipitotemporal ve inferior temporal giruslardan oluşmuştur.

Temporal lobun medial yüzeyi medial kortikal yapılar arasında en kompleks olanıdır. Medial yüzey hipokampusu oluşturan ve longitudinal yerleşimli üç nöral doku bandından oluşmuştur. Alttaki bant subikular zona denk gelen parahipokampal girustan, ortadaki bant dentat girustan ve üstteki bantta fimbria fornicis'ten oluşmuştur. Parahipokampal girus spleniumun alt hizasında kalkarin sulcusla ikiye ayrılır. Bunlar arkaya ve yukarıya uzanarak singulat girusla devam eden isthmus, ve arkaya doğru uzanan lingual giruslardır.

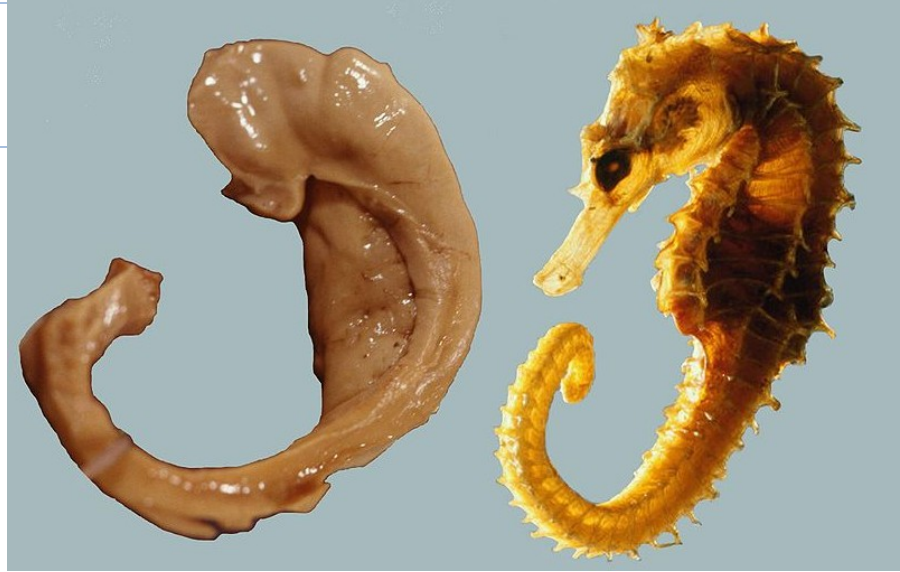
Dentat gyrus, üzerindeki dişe benzer çıkıntılar nedeniyle bu ismi almaktadır. Dentat girus spleniumun arkasına doğru önce fasciolar girus ve sonra indusium griseum olarak devam eder. Dentat girusun medialinde içe katlantı yapan ve gri maddeden oluşan yapı, Ammon boynuzu adını alır. Ammon boynuzu sıkıca yerleşmiş piramidal hücre tabakasıyla karakterizedir.

2.9 Hipokampal anatomi ve formasyon

Hipokampusun ilk tanımlaması 1587'de Arantius tarafından yapılmıştır. 1729'da J.G.Duvernoy hipokampusun şeklini çizmiştir. Her iki otör de "hipokampus" ve "ipekböceği" terimi arasında kalmıştır. 1732'de Winslow "koç boynuzu" terimini önermiştir. 1742'de De Garengeot *cornu Ammonis* ifadesini kullanmıştır (Mısır mitolojisinde tanrı Ammun Kneph). Daha sonra 1672'de Diemberbroeck tarafından ifade edildiği düşünülen *pes hippocampi* terimi kullanıma girmiştir.

Resim 1.

Hipokampus ve Denizatı.



Hipokampus ventriküle kabaran bir yapı olup, bir birine sarılan iki kortikal laminadan “Cornu Ammonis ve gyrus dentatus”tan oluşmuştur. Hipokampus limbik lobun bir parçasıdır, hemisferin inferomedialinde yerleşmiştir ve çevresindeki parahipokampal korteksten limbik fissürle ayrılmıştır. Broca (1878) limbik lobu, limbik ve intralimbik girus olarak ikiye ayırmıştır:

1. *Limbik girus* subkallozal, singulat ve parahipokampal girus olmak üzere üç kısımdan oluşmuştur. Parahipokampal girus iki segmente ayrılır: (1)Subiculum ince ve yassı olan posterior kısımdır, (2)Piriform lob uncus ve entorinal bölgeyi kapsayan daha hacimli kısımdır.
2. *Intralimbik girus*’un anterior kısmı prehipokampal rudimentten (paraterminal girus) ve superior kısmı ise prehippokampal rudimentin devamı olan korpus kallozumun üzerinde yer alan indusium griseum’dan oluşmuştur.

Hipokampus lateral ventrikül temporal hornu’na doğru kabarıklık yapan ve dışarıdan denizatına benzeyen yapıya sahiptir (Resim 1). Mezensefalonu çevreleyen bu yapı üç segmente ayrılır:

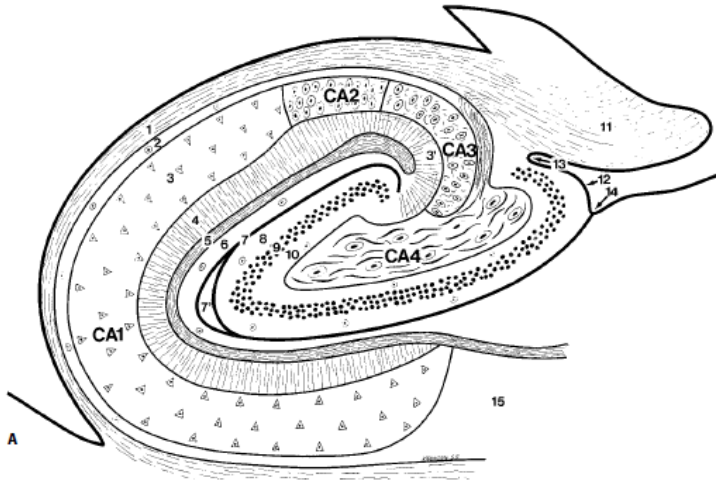
1. Orta segment veya hipokampusun gövdesi
2. Anterior segment veya hipokampusun başı
3. Posterior segment veya hipokampusun kuyruğu

Hipokampus bilaminar yapıdadır. Bir birine sarılan Cornu Ammonis (hippocampus proper) ve gyrus dentatus’tan (fascia dentata) oluşmuştur. Bu yapıların ikisinde *allocortex*’in parçalarıdır.

Cornu Ammonis içten dışa doğru sıralanan altı tabakadan oluşmuştur: alveus, stratum oriens, stratum pyramidale, stratum radiale, stratum lacunosum ve stratum moleculare.

- **Alveus** intraventrikuler yüzeyi kaplar. Ana efferent yolağı oluşturan hipokampal ve subicular nöronların aksonlarını içerir. Septum kaynaklı afferent lifleride içerir.
- **Stratum oriens** altındaki stratum pyramidale'ye karıştığı için sınırları net seçilemez. Dağınık sinir hücrelerinden (basket hücreleri) oluşmuştur.
- **Stratum pyramidale** cornu Ammonis'in ana katmanıdır, piramidal hücreleri içerir. Piramidal hücreler üçgen şekillidirler ve bazal kısımları alveusa bakarlar. Bu yüzeyinden aksonlar stratum oriensi geçerek alveusa ulaşırlar. Piramidal hücre aksonları septal nukleusa doğru uzanabilir, bazı asosiasyonel lifleri ise diğer piramidal hücrelere, hatta kontralateral hippokampusa uzanabilir (Schaffer kollateralleri).
- **Stratum radiatum** piramidal hücrelerin apikal dendritlerinden oluşmuştur. Bu katmanda apikal dendritler Schaffer kollateralleri, septal nukleus lifleri ve komissural liflerle birleşir.
- **Stratum lacunosum** cornu Ammonis'in yüzeyine paralel yerleşimli aksonal fasiküllerden oluşmuştur.
- **Stratum moleculare** hipokampal sulkusa birleşik kısımdır ve internöronlardan oluşmuştur.

Allokorteks üç tabakadan oluştuğu için Cornu Ammonis'in yukarıda belirtilen altı katmanı da üç tabakada birleştirilmiştir. Stratum oriens, Stratum pyramidale ve stratum radiatum, lacunosum ve moleculare'yi içeren moleküler zon (126,127).



Şekil 1. Hipokampus çizimi.

1, alveus; 2, stratum oriens; 3, stratum pyramidale; 3', stratum lucidum; 4, stratum radiatum; 5, stratum lacunosum; 6, stratum moleculare; 7, vestigial hippocampal sulcus. Gyrus dentatus; 8, stratum moleculare; 9, stratum granulosum; 10, polimorfik katman; 11, fimbria; 12, margo denticulatus; 13, fibrodentate sulcus; 14, superficial hippocampal sulcus; 15, subiculum

Cornu Ammonis dört alandan oluşmuştur ve Lorente de No (1934) tarafından CA1-CA4 olarak isimlendirilmiştir.

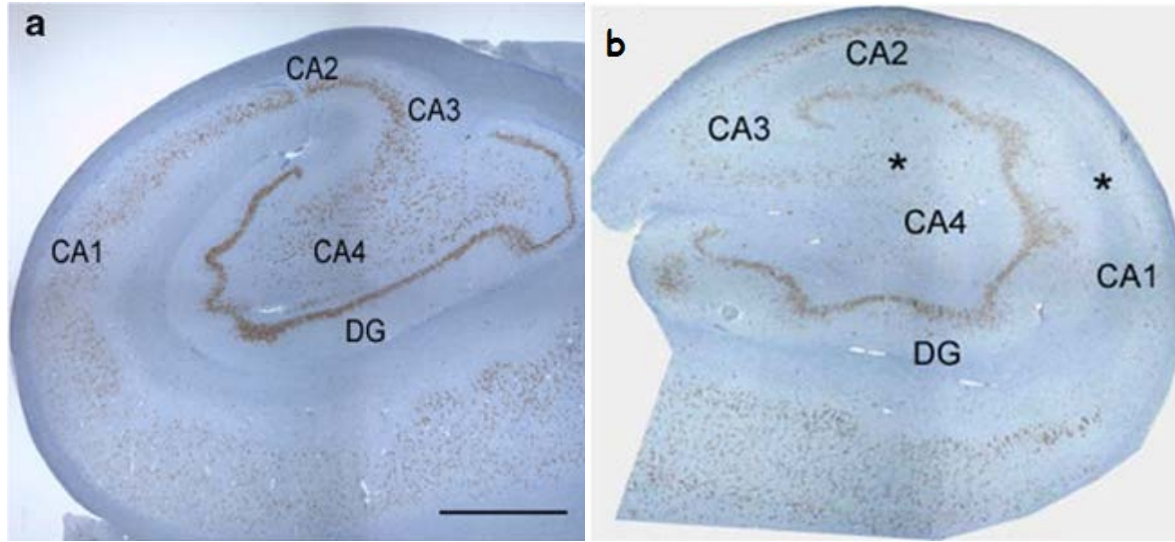
- **CA1** subiculum'un devamıdır. Piramidal hücreleri tipik olarak üçgen şeklinde, küçük ve dağınıktır (128). İnsanda CA1'in stratum pyramidale'si geniş, sıçanlarda ise ince ve yoğundur (128,129,130).
- **CA2** stratum pyramidale ince ve yoğun yapan geniş, ovoid ve yoğun hücrelerden oluşmuştur (128,129,130).
- **CA3** cornu Ammonis'in genusunu oluşturur. Piramidal hücreler CA2 ile aynıdır. CA3'ün özelliği dentat giristan orijin alan ince, miyelinsiz mossy lifleridir. Bu lifler piramidal hücreleri çevreler, stratum radiatum ve pyramidale arasında sıkışarak CA3'e özel stratum lucidum'u oluşturur(128,130).
- **CA4** dentat girusun oluşturduğu olukta yerleşir. Hücreleri ovoid, geniş, dağınık ve mossy lifleri miyelinlidir (CA4 için özgü). Girus dentatus CA4 ile beraber *area dentata*'yı oluşturur (131,132).

Hipoksiye dayanıklılığına göre CA1 hassas bölge veya Sommer sektörü, CA3 dayanıklı bölge veya Spielmeyer sektörü, CA4 ise orta hassas bölge veya Bratz sektörü olarak bilinir.

2.0.1 Hipokampal skleroz

MTLE'de en belirgin patolojik bulgu hipokampal skleroz'dur. HS hipokampusta atrofi, nöronal kayıp, gliosis ve sinaptik reorganizasyon ile karakterizedir (Resim 2). CA1 ve CA4 nöronal kaybın en ağır olan bölgeleridir. CA2 ve DG hücre ölümüne karşı dirençli bölgelerdir

(52,81,117,119). HS'de nöronal hücre kaybının olduğu bölgelerde astrosit ve mikroglia aktivasyonu ve proliferasyonu ile tanımlanan reaktif gliosis görülmektedir. Astrositlerde bu süreçte morfolojik değişiklikler oluşmaktadır (93,107). Yoğun fibriler astroglia sonucu dokuda büzüşme ve sertleşme oluşmaktadır. HS'de Mossy liflerinde filizlenme (MFS) bir başka patognomonik bulgu sayılabilir (105). MFS CA3'teki piramidal hücre kaybı ile bağlantılıdır (86).



Resim 2. İmmunohistokimyasal boyamada hipokampus. a)Normal hipokampus; b)Klasik hipokampal skleroz. İşaretli bölgelerde belirgin hücre kaybı. CA1 ve CA4'te ağır nöronal kayıp görülmekte. CA2 ve CA3 (kısmen) korunmuştur.

Hipokampal sklerozun en eski sınıflamalarından biri Wyler evrelendirmesidir (12). Bu evreleme sistemi sınıflamadan çok hipokampusun anatomik bölgelerindeki nöronal hücre kaybının semi-kantitatif değerlendirilmesine dayalıdır.

Evre	Patolojik bulgu
I	Hipokampal piramidal hücre katmanının CA1, CA3 ve CA4 segmentlerinde düşük oranda gliosis. Nöron kaybı yok
II	CA1, CA3 ve CA4 segmentlerinde belirgin gliosis ve %50' den daha az nöron kaybı var
III	CA1, CA3 ve CA4 segmentlerinde ağır hasar ve gliosis mevcut. %50'den fazla nöron kaybı var. CA2 korunmuştur
IV	Hipokampal piramidal hücre katmanının bütün segmentlerinde belirgin gliosis ve %50'den fazla nöron kaybı var

Tablo 5. HS sınıflaması, Wyler 1992

Ancak benzer semi-kantitatif değerlendirmeye dayanan 2013 İLAE sınıflaması kullanıma girmiştir (Tablo 6) (107).

Tablo 6. İLAE hipokampal skleroz klasifikasyonu (2013)

	Hipokampal alanlarda nöronal hücre kaybı ve gliosis patoloji paterni (<i>en bloc</i> rezeksiyon materyallerinde)			
Klas, ^a	HS İLAE Tip 1	HS İLAE Tip 2 “CA1 Predominant”	HA İLAE Tip 3 “CA4 Predominant”	HS yok/ Yalnız Gliosis
CA1 ^b	2	1-2	0-1	0
CA2 ^b	0-2	0-1	0-1	0
CA3 ^b	0-2	0-1	0-1	0
CA4 ^b	2	0-1	1-2	0
DG ^c	0-2	0-1	0-2	0-1

0 = aşikar nöronal kayıp yok veya yalnız orta derece astrogliosis

1 = orta derecede nöronal kayıp ve gliosis (GFAP)

2 = ağır nöronal kayıp ve fibriler astrogliosis

a – bu klasifikasyon anatomik olarak bütün alanları korunmuş hipokampal spesimene uygulanır (*en bloc* rezeksiyon)

b – vizüel değerlendirmede hipokampal alanlarda yaklaşık %30-40 nöronal kaybı gösterir

c – dentat girus için skrolama: 0-granüler hücre tabakası normal; 1-granüler hücre tabakasında dağılma; 2-granüler hücre tabakasında ağır kayıp

2.0.2 İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri

Glutamat santral sinir sistemindeki (SSS) major eksitatör nörotransmitterdir ve etkisini hem iyonotropik hem de metabotropik glutamat reseptörlerini uyararak gösterir. Bu reseptörlerin selektif ligandlarının (kompetitif agonist ve antagonistleri, pozitif ve negatif modulatorleri) bulunması glutamat reseptörlerinin fonksiyonlarının araştırılmasında önemli rol almıştır.

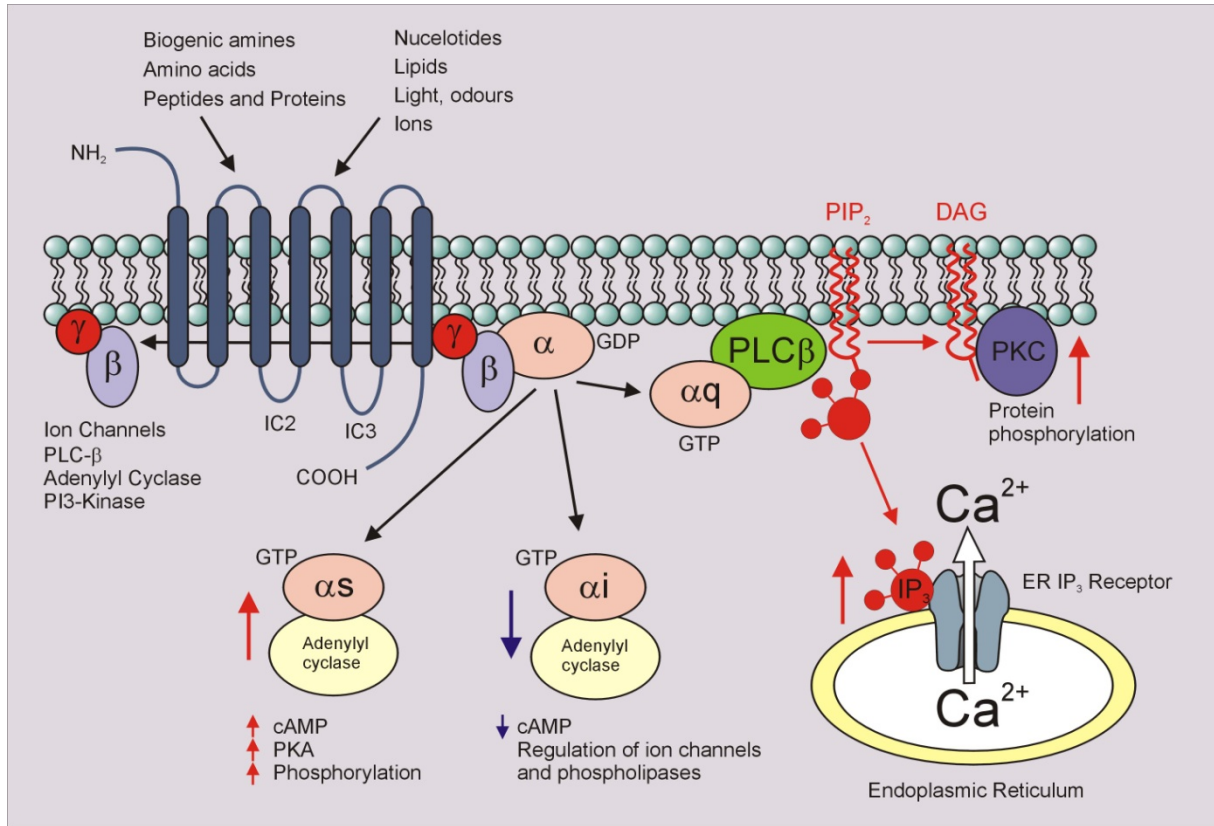
İyonotropik glutamat reseptörlerinin (iGluR) üç major tipi vardır. Bu reseptörler kendi selektif uyarımlarının adlarını taşıyır: N-metil-D-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5metil-4izoozolepropionik asit (AMPA) ve 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirrolidin (Kainat) reseptörleri (22)(Tablo 6).

Tablo 7. İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri ve etki mekanizmaları.

GLUTAMAT					
İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR)			Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR)		
NMDA reseptörleri	AMPA reseptörleri	Kainat reseptörleri	Grup I	Grup II	Grup III
NR1	GluR1	GluR5	mGluR1	mGluR2	mGluR4
NR2A	GluR2	GluR6	mGluR5	mGluR3	mGluR6
NR2B	GluR3	GluR7			mGluR7
NR2C	GluR4	KA-1			mGluR8
NR2D		KA-2			
NR3A					
NR3B					
 Ca^{2+} Na^{+}			 G_q , PLC artması		
 Na^{+} (Ca^{2+})			 G_i , AC azalması		
 Na^{+} (Ca^{2+})			 G_i , AC azalması		

Glutamat reseptör ailesinin transmembran topolojisi klasik dörtlü transmembran alan modelli nikotinik asetilkolin reseptörlerinden farklıdır ve ekstraselüler amino- terminali bulundurulur.

NMDA reseptör ailesinin yedi alt ünitesi vardır, NR1, NR2A-D ve NR3A ve B. NMDA reseptörleri yüksek Ca^{2+} geçirgenliğine ve yavaş kinetiğe sahiptirler. AMPA reseptörleri ise dört alt ünitelerden oluşmuştur (GluR1-4). AMPA reseptörleri yavaş Ca^{2+} geçirgenliğine ve hızlı kinetiğe sahiptirler. Kainat reseptör ailesi ise iki farklı alt ünitelerden oluşmuştur, GluR5-7 ve KA1 ve 2.



Şekil 2. Metabotropik glutamat reseptörleri, yapısı ve etki mekanizmaları.

Günümüzde G-proteinine bağlanan metabotropik glutamat reseptör ailesinin sekiz üyesi (mGluR1-8) vardır. Dizilimine, ikinci haberciye bağlanmasına ve farmakolojik özelliklerine göre üç gruba ayrılırlar: grup I (mGluR1 ve 5), grup II (mGluR 2 ve 3) ve grup III (mGluR 4, 6, 7, 8) (Tablo 6). Grup I metabotropik glutamat reseptörleri G_q yardımı ile fosfolipaz C'ye bağlanarak aktivasyona yol açar, grup II ve grup III reseptörler G_i yardımıyla adenilat siklaz aktivitesini inhibe eder (22). mGluR uyarılması hem intraselüler ikinci haberci yoluyla, hem de heteromerik G proteini $\beta\gamma$ alt ünitelerinin uyarılması ve iyon kanalı aktivitesi modülasyonu ile oluşur (133,134,135). Retina yerleşimli mGluR6 dışında (136,137) bütün diğer mGluR ailesi memelilerin santral sinir sisteminde hem glial hemde nöronal hücrelerde yerleşmiştir (138,139). mGluR'lar ayrıca periferik sinir sisteminde, nosiseptif sistemde de yerleşmiştir (135,139). Nöronlarca eksprese edilen grup I mGluR'lar tipik olarak postsinaptik somatodendritik alanlarda yerleşirken, grup II ve grup III reseptörler ağırlıklı olarak postsinaptik aksonal alanda ve aksonal terminallerde yerleşir (138,139).

Metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR) iktal deşarjların başlamasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. mGluR'ların yapısal özellikleri, sentetik bileşenlerin bu reseptörlerin aktivitesine etki ederek nöbet kontrolünde alternatif uygulamada

kullanılabileceğini düşündürmektedir (21). Wong ve ark. çalışmalarında mGluR'ların iktal deşarjların başlamasında rol aldığını ve normal beyin dokusunun iktal senkronize deşarjlara katılmasında önemli rol oynadığını ifade etmiştir (21). mGluR sentetik bileşenlerinin terapötik kullanım için avantajları vardır. Kan beyin bariyerini rahat geçebilirler (57).

Grup I metabotropik glutamat reseptörleri beyinde özellikle hipokampusun CA3 bölgesinde yaygındır. İnsan serebral korteksinden alınan spesimenlerde mGluR1a ile yapılan elektron mikroskopu ve immunohistokimya çalışmaları sonucu, bu reseptörlerin piramidal nöron cisimlerinde çok az sayıda, piramidal hücre dendritlerinde ise yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. mGluR5'in de aynı özellikler gösterdiği bildirilmiştir. Grup I mGluR nöronal uyarılmayı tetikler. Grup I mGluR agonistleri uzun süreli depolarizasyona neden olur ve prokonvülzan aktiviteye sahiptirler (58,59). Grup I mGluR antagonistlerinin ise birçok deneysel epilepsi modelinde antikonvülzan etki oluşturduğu izlenmiştir (60,61).

Merlin ve Wong çalışmalarında grup I mGluR spesifik agonistlerinin kısa süreli interiktal uyarıyı uzun süren deşarjlara dönüştürdüğünü göstermişlerdir (62). Bu uzamış deşarjlar agonist ajan vücuttan atıldıktan sonra da devam etmektedir. Grup I mGluR antagonistlerinin bu deşarjları geçici olarak engellediği gösterilmiş ve epileptiform aktivitenin grup I mGluR endojen aktivasyonu sonucu devam ettiği fikrini desteklemiştir. Oluşturulan hasar sonrası gelişen kendini uyarmanın (grup I mGluR) epileptogenezisin indüksiyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Daha sonra bu olayın iyonotropik glutamat reseptörlerinden bağımsız olduğu gösterilmiştir (63). mGluR5 reseptörlerinin indüksiyonda, mGluR1'in ise uzamış nöbetlerin stabilizasyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (64).

Rutecki ve ark. çalışmalarında grup I mGluR ikincil haberci kaskadını aktive ederek, *in vivo* nöbet yaptığı ve *in vitro* epileptiform aktiviteye neden olduğunu göstermişlerdir. (65).

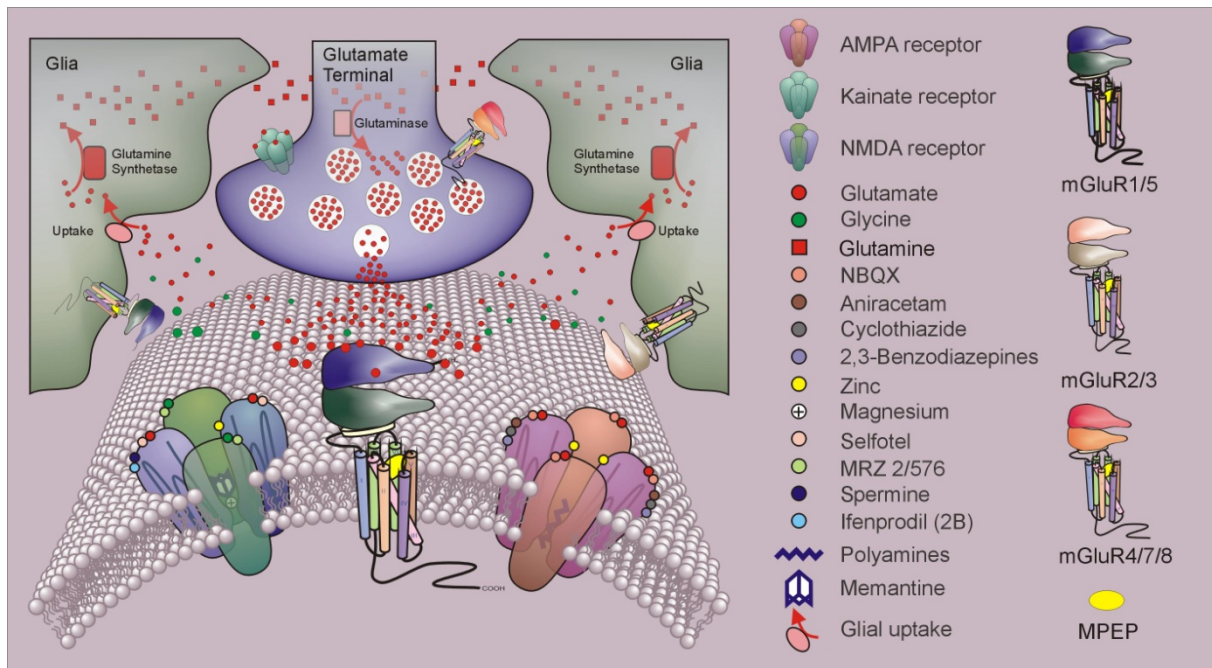
Chapman ve ark. mGluR5 selektif antagonistlerinin çok düşük terapötik dozlarda bile nöbetleri engellediğini göstererek antikonvülzan tedavide alternatif olabileceğini göstermişlerdir (66).

Notenboom ve ark. temporal lob epilepsili hastaların hipokampuslarında mGluR5 immunoreaktivitesinde artış izlemiştir (67). Artmış immunoreaktivite hipokampusun birincil nöronlarında ve dentat girus moleküler tabakasındaki hücre cisimleriyle, apikal

dendritlerinde izlenmiştir. Hipokampal sklerozu olan temporal lob epilepsili hastalarda bu artış daha da belirgindir.

2.0.3 Grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR) epilepside rolü

İnsan temporal lob epilepsisi ve sıçanlarda oluşturulan deneysel epilepsi modellerinde hipokampal uyarılma mekanizması halen aydınlatılamamıştır (68). Bilinen en geçerli hipoteze göre hipokampustaki eksitator ve inhibitör nörotransmitter arasındaki dengesizlik nöbet eşiğinde düşüşe neden olmaktadır. İnhibitör nörotransmitter sistemi olan GABA_A'nın uyarılma ve ekspresyonu üzerinde pekçok insan ve deneysel hayvan çalışmaları mevcuttur (69,70,71). İnsan temporal lob epilepsisinde (TLE) mGluR'ların rolü hakkındaki bilgi oldukça kısıtlıdır (26). Bugüne kadar grup I mGluR'ın TLE'deki rolünü araştıran yalnız iki çalışma yayınlanmıştır (26). L-Glutamat hipokampustaki major eksitator nörotransmitterdir, iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri üzerinden etki etmektedir. Bu reseptör sistemleri epileptogenezis ve antiepileptik ilaç tedavisinde hedef olarak görülmektedir (25). Grup I mGluR uyarılmasıyla inositol trifosfat hidrolizi oluşarak intraselüler Ca^{2+} salınmasına ve eksitator membran depolarizasyona yol açmaktadır (25). Farklı mGluR uyarılmasının TLE patogeneze katkida bulunabileceği düşüncesi bu reseptörlerin kronik refraktör epilepsi tedavisinde hedef olacağını düşündürmektedir.



Şekil 3. Glutamat reseptörleri, sinaptik dağılımı ve etkileşimi.

2.0.4 Epilepsi tedavisinde antiepileptik ilaçlar

Epilepsi tekrarlayan epileptik nöbetlerle karakterize kronik bir durumdur. Epileptik nöbet beyindeki nöronların anormal, yaygın ve hipersenkronize elektriksel deşarjlarıdır. Nöbet ve epilepsi multifaktöryel ve heterojen bir durum olduğu için sınıflandırılması gerekmektedir (8,13,27,30). Epilepsi tedavisi nöbet ve epilepsinin uygun sınıflamasına göre belirlenmektedir. Antiepileptik ilaç seçimi de epileptik sendromun ve nöbetin tipine, hastaya uygunluğuna, hastanın özgeçmişine ve ilacın güvenilirliğine göre belirlenir (27). İlaç tedavisi her zaman monoterapi şeklinde en düşük dozla başlanmalı ve yavaş titre edilmelidir.

Antiepileptik ilaçların yarısından çoğu 1980'den önce, geri kalanı 1990'dan sonra kullanıma girmiştir (Tablo 7)(27). Klasik antiepileptik ilaçların hepsi birinci basamak ilacı olarak kullanılmaktadır. Yeni antiepileptik ilaçların birinci basamak ilacı veya monoterapide kullanılması için yeni klinik çalışmalara gerek vardır. Yeni antiepileptik ilaçların büyük çoğunluğu ek ilaç olarak kullanılmaktadır (27). Bu ilaçların bazıları monoterapide kullanılmak için Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde onay alsa da Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) onay alamamıştır.

Tablo 8. Standart ve yeni AEİ etki spektrumu.

Standart ilaçlar	Parsiyel	JTK	Myoklonik	Absans
Fenitoin	+	+	-	-
Karbamazepin	+	+	-	-
Valproik asit	+	+	+	+
Fenobarbital	+	+	-	-
Primidon	+	+	+	-
Etosuksimid	-	-	-	+
Metsuksimid	+		?	+
klonazepam	+	+	+	+
Yeni ilaçlar				
Felbamat	^b	+	?	?
Gabapentin ^a	^b	-	-	-
Lamotrijin ^a	^b	^b	?	^b
Topiramet ^a	^b	^b	?	?
Tiagabin	^b	?	-	-
Okskarbazepin	^b	+?	-	-
Levetirasetam	+	^b	+	? ^b
Zonisamid	^b	+	+	?
Pregabalin	^b	?	-	-

a – pozitif başlangıç monoterapi çalışması olan yeni AEİ

b – etki endikasyonu kör çalışmalarla desteklenmiş yeni AEİ

Birinci basamak antiepileptik ilaçlar en yüksek tolere edilebilir dozda kullanılmasına rağmen nöbetler halen devam ediyorsa ilacın değiştirilmesi gerekir. Alternatif monoterapi önerilmesine rağmen monoterapinin ikili ilaç tedavisine üstünlüğünü kanıtlayan çalışmalar yoktur (140,141). Birinci basamak monoterapi etkisiz ise veya tolere edilemiyorsa alternatif monoterapi en iyi seçenektir. Eğer ilaç iyi tolere edilebiliyor ve en azından kısmen etkiliyse, ek ilaç başlanması düşünülebilir. Alternatif monoterapi ve ek ilaç seçimi birçok etkene

bağlıdır. İlacın güvenilirliği, tolere edilebilirliği, klinik çalışmalardaki etkisi, kullanım kolaylığı, hızlı titrasyon için uygunluğu, farmakokinetik etkileşimi, ko-morbid etkileri ve etki mekanizması bunlara örnektir. Ek ilaç tedavisi başlandıysa bu ilaçların etkileşimi dikkate alınmalıdır (27,142). İkinci ilaca rağmen nöbetleri kontrol edilemeyen hastaların üçüncü antiepileptik ilaç tedavisiyle nöbetlerinin durma ihtimali oldukça azdır (140,141). İki veya üç ilaca rağmen nöbetleri kontrol edilemeyen parsiyel başlangıçlı epilepsi hastalarında (öz. hipokampal sklerozu olan TLE’de) cerrahi tedavi düşünülmesi gerekir.

2.0.5 Levetirasetam

Levetirasetam (LEV) bütün dünyada 2000 yılından itibaren kullanıma giren en yeni antiepileptik ilaçlardan biridir. ABD’de LEV yalnızca parsiyel başlangıçlı epilepside ek tedavi ilacı olarak onay almıştır. AB ülkelerinde ise LEV birinci basamak monoterapi ilacı olarak da kullanıma girmiştir.

Levetirasetam yaşlılarda kullanılan ve zekâ üzerine etkisi olduğu söylenen Pirasetamın etil analogunun S-enantiomeridir. LEV oral alımı takiben hızlı ve nerdeyse tamamen absorbe olur. En yüksek plazma konsantrasyon değeri oral alımından bir saat sonra ölçülür. Gıda alımı plazma konsantrasyon değerini %20 azaltarak bu değere yükselmeyi 1.5 saat geciktirmektedir fakat biyoyararlanımını azaltmaz (27,142). 500 – 5000 mg değerinde doz ve LEV plazma değeri arasında lineer ilişki vardır (143). LEV metabolizması sitokrom P450 enzim sisteminden bağımsızdır. LEV vücutta değişmeden böbreklerden atılır (%27 si metabolize olur). Başlıca metabolik yolağı kanda asetamid grubu ile hidrolizdir (143). Metabolik ürünü inaktiftir. LEV plazma yarı ömrü erişkinlerde 7 ± 1 saattir. Bu değer yaşlılarda kreatinin klirensinin artması nedeniyle 2,5 saat uzayabilir (27). Böbrek hastalığı olanlarda kreatinin klirensine göre doz titrasyonu yapılması gerekmektedir (27). Hepatik metabolizma ve proteine bağlanma olmaması diğer ilaçlarla etkileşiminin olmadığını göstergesidir (27). Bugüne kadar LEV’in fenitoin, warfarin, digoksin ve oral kontraseptiflerle farmakokinetik etkileşimi gösterilmemiştir (27,141,142). İntravenöz (iv) formunun oral formuyla bioekivalan olduğu gösterilmiştir (27).

LEV’in lineer kinetiğı vardır, serum konsantrasyonu doza paralel olarak artmaktadır (142). LEV’in efektif plazma değeri belirlenememiştir. Yanıt veren ve yanıt vermeyen hastalarda ortalama plazma değeri 12,9 ila 9,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçülmüştür. Hastaların çoğunun

1000 mg/gün dozda nöbetlerinin olmadığı gösterilmiştir ve bu dozdaki plazma değeri $6,5 \pm 2,4$ µg/mL ölçülmüştür (27). Buna rağmen LEV'in terapötik ve toksik dozu belirlenememiştir (27).

LEV'in etki mekanizması diğer antiepileptik ilaçlardan farklıdır. Antikonvülzan etkisi standart epilepsi modellerinde gösterilememiş, ancak "kindling model"inde gösterilmiştir (34,60). LEV'in sinaptik vezikül proteini 2A'ya (SV2A) bağlanarak etki ettiği düşünülmektedir (144). SV2A proteinine bağlanarak vezikülden glutamat salınımını engellediği düşünülmektedir (144).

LEV'in hedeflenen dozu 2 yarım doza ayrılan 60 mg/kg/gündür. Önce 20 mg/kg/gün 2 hafta, ardından 40 mg/kg/gün ve nihayetinde 60 mg/kg/gün dozuna ulaşılması önerilir. En yüksek dozu tolere edemeyen hasta popülasyonunda 40 mg/kg/gün dozla sınırlanmalıdır (27). En sık rastlanan yan etkisi depresyon ve uyku bozukluğudur.

Çalışmalar TLE'nin LEV'e frontal lob epilepsisinden daha iyi yanıt verdiğini göstermiştir (145). Epilepsi cerrahisiyle nöbetleri kontrol edilemeyen hastaların, ameliyat olmayan hastalara kıyasla LEV'e daha iyi yanıt verdiğini gösterilmiştir (145,146). Epilepsi cerrahisiyle kontrol altına alınamayan hastaların uzun dönem takip sonuçlarında yeni başlanmış LEV pozitif prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (146,147). LEV'in status epileptikus'ta (SE) kullanımı önerilmektedir (145,146,147). LEV'in yükleme dozu 250 ila 1500 mg arasında değişir. İdame dozu 1500 mg/gün'den 7000 mg/güne kadar arttırılabilir.

LEV'in yan etkileri arasında somnolans, asteni, başdönmesi ve üst solunum yolu enfeksiyonu vardır. Somnolans ABD'de LEV'in kesilme nedenleri arasındadır (27). Yan etkiler ilk aydan itibaren ortaya çıkar. Uyuşukluk yaşlılarda görülen bir yan etkidir.

2.0.6 Deneysel epilepsi modelleri

Epilepsi %1 prevalansa sahip olduğu tahmin edilen ve dünyada en yaygın görülen nörolojik bozukluktur. Fazla sayıda deneysel epilepsi modeli geliştirilmiştir. Bu modeller hayvanlarda elektrik uyarımı, kimyasal ajanlar, genetik modeller, yapısal lezyonlar, fiziksel uyarılar (soğuk, basınç, hipertermi, elektrik) ile oluşturulmaktadır. İyi karakterize edilmiş hayvan modelleri epileptogenezisin altında yatan temel mekanizmaların anlaşılmasına olanak sağlayabilmektedir. Ayrıca bu modeller epilepsi tedavisinde yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde faydalı olabilmektedir (31).

İnsandaki farklı epilepsi tipleri ile benzer olan; gerek genetik, gerekse kimyasal ajanlar kullanılarak lezyon oluşturulan çok sayıda farklı deneysel epilepsi modeli geliştirilmiştir (72). Günümüzdeki hayvan çalışmalarının çoğu sıçanlarda yapılmaktadır (73). Epilepsinin hücrel mekanizmalarını araştıran çalışmalar hipersenkronizasyonun mekanizmasının anlaşılmasına, hücrel ve ağ uyarılabilirliğinin değerlendirilmesine odaklanmıştır (74).

Elliden fazla nöbet modeli bulunmaktadır. Başlıca kullanılan nöbet modellerini; basit parsiyel nöbetler, kompleks parsiyel nöbetler, jeneralize tonik klonik nöbetler, jeneralize absans nöbetleri ve status epileptikus modelleri olarak sınıflandırabiliriz (75).

Kimyasal olarak indüklenen nöbet modelleri lokal ve sistemik olarak uygulanan kimyasallara göre sınıflandırılmaktadır. Lokal olarak uygulanan kimyasalların ya basit parsiyel akut nöbetleri ya da basit parsiyel kronik nöbetleri oluşturduğu, sistemik uygulanan kimyasalların ise kompleks parsiyel veya jeneralize tonik klonik nöbetlere neden olduğu genel olarak bilinmektedir (76).

- **Basit parsiyel epilepsi modelleri**

İnhibitör amino asit blokerlerinin lokal enjeksiyonu (penisilin, bikukulin, pikrotoksin, striknin)

Kortikal implante edilen metaller (alüminyum, kobalt, çinko, demir)

Akut odaksal elektrik uyarımı

Eksitatör ajanların bölgesel enjeksiyonu (glutamat agonistleri; kainat, domoik asit, quisqualat, NMD ACho agonistleri, lityum, pilokarpin)

GABA yoksunluğu

Kriyojenik hasar

- **Kompleks parsiyel nöbet modelleri**

Tetanus toksini

Sistemik veya intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu

Sistemik quisqulik asit enjeksiyonu

Sistemik domoik asit enjeksiyonu

Sistemik pilokarpin enjeksiyonu

Area tempesta enjeksiyonları

Kindling modeli

- **Jeneralize nöbet modelleri**

Maksimal elektroşok nöbetleri (MES)

Kimyasallarla oluşturulan

Genetik modeller

MES modeli: Genellikle 50 – 60 Hz ya da düşük frekansda (6 Hz) alternan akım kornea, kafa ya da kulak elektrotları ile uygulanır. Akım şiddeti farede 50 mA, sıçanda 150 mA kadardır. Elektroşok nöbetler postür kaybı, tonik refleksiyonu takiben tonik ekstansiyon ve klonusdur. Ancak modelin en kritik noktası ön ve arkaya doğru tonik ekstansiyon şeklindeki bitiş nöbetidir (77).

PTZ ile oluşturulan akut nöbet modeli: PTZ'nin dozunun ayarlanması son derece önemlidir. PTZ intravasküler olarak yaklaşık 50 mg/kg ya da intraperitoneal olarak 100 – 150 mg/kg dozunda tonik klonik nöbet aktivitesi oluşturmaktadır. PTZ'nin daha düşük dozlarında ise azalmış davranış yanıtı ve daha uzun nöbet öncesi evreleri görülmektedir. PTZ serum fizyolojik içinde çözündürülerek hazırlanmaktadır (76). PTZ nöbetlerinde yapılan skorelama şu şekildedir:

0 – nöbet yok

1 – jeneralize myoklonik jerk (bir kasın geçici kasılması)

2 – doğrulma kaybının eşlik etmediği jeneralize klonik nöbet

3 – doğrulma kaybının eşlik ettiği jeneralize klonik nöbet

4 – ön ekstremité tonusu ile doğrulma kaybı

5 – arka ekstremité tonusu ile doğrulma refleksinin kaybı

Absans modellerinden düşük doz PTZ modeli: Sıçan ya da fareye 10 – 30 mg/kg intraperitoneal ya da subkutan PTZ verilmekte ve neticede EEG’de bilateral, senkron 7 – 9 Hz’lik diken dalga deşarjları görülmektedir. PTZ’nin dozu arttırılıp 40 mg/kg şeklinde ara doza çıkıldığında ise yüz ve ön ekstremitelerle sınırlı olan klonik bulgular ortaya çıkmaktadır (77).

Deneyisel epilepsi modellerinde, nöbetleri her zaman EEG kaydı altında gözlemlemek mümkün olmayabilir. Literatürde bulunan çalışmalarda, nöbet aktivitesi 1997 yılında Zhang ve ark. tarafından yapılan skalaya göre değerlendirilmektedir (Tablo 8).

Derece	Aktivite
1	Silkinme
2	Hiperaktivite
3	Dikleşme ve gerinme
4	Gerinme ve düşme
5	Zıplama

Tablo 9. Zhang skalası

Temporal lob epilepsisi (TLE) insanda en yaygın görülen epilepsidir ve genellikle antiepileptik ilaçlara direnç göstermektedir (78). Epilepsinin hayvan modelleri geleneksel antiepileptik ilaçlara olan direncin ve epilepsi gelişiminin altında yatan temel mekanizmaların araştırılmasına olanak sağlamaktadır (79).

TLE’nin hayvan modelleri iki majör gruba ayrılır. İlki eksitotoksik bileşimlerin (kainik asit, pilokarpin) uygulanması ile indüklenen status epileptikus takiben gelişen spontan epilepsi durumu, ikincisi “kindling-model” temporal lob epilepsisi olarak belirtilen elektrikle uyarılmış kronik tekrarlayan nöbetlerdir (80).

TLE modelleri genellikle fokal epileptogenezin altta yatan nedenlerini araştırmak için kullanılır. Bizim çalışmamızda nöropatolojik bulgulara dayanan TLE modeli yapılmıştır. Dorsal hipokampusu unilateral olarak enjekte edilen Kainik asit (KA) 24 saat içerisinde sonlanan akut status epileptikus oluşturmaktadır. TLE klinikopatolojik özellikleri hayvan deneylerinde de

oluşturulabilir. KA gibi prokonvulziv ajanların intraperitoneal olarak uygulanması kemirgenlerde oluşturulan TLE modelinin en sık kullanılan şeklidir (99,104,148,149). Sistemik enjeksiyon sonrası oluşturulan bu modeller günümüzde çok eleştirilmektedir. Bu modellerin insan TLE'sine uygun olmayan birçok özelliği vardır. Bilateral hipokampal değişiklik, temporal lob dışı yaygın beyin hasarı ve jeneralize tonik-klonik nöbetler bunlar arasında yer almaktadır (105). Sıçanların dorsal hipokampusuna tek seferde enjekte edilen KA, insan TLE'de görülen değişiklikleri benzer şekilde taklit eden hayvan modelini oluşturmaktadır (99,104,148,149). Dorsal hipokampusa KA enjekte edilerek oluşturulan TLE modelinde hipokampal sklerozu taklit eden histopatolojik değişiklikler ve kronik rekürren parsiyel nöbetler 2 haftalık latent dönem sonrası gelişmektedir (150,151,152). Sistemik KA enjeksiyonu ile oluşturulan TLE modelinin aksine, lokal intrahipokampal KA modelinde yapısal değişiklikler tek taraflıdır, kronik fazda oluşan fokal parsiyel nöbetler KA enjekte edilen hipokampustan kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak iyi karakterize edilmiş hayvan modelleri epileptogenezisin altında yatan moleküler ve hücresel değişikliklerin aydınlatılmasına, epilepsinin tedavisinde yeni ve alternatif tedavi edici yaklaşımların belirlenmesine olanak sağlayabilmektir. Dolayısıyla deneysel çalışmalarda, insandaki epilepsi hastalığının patofizyolojik temelini en iyi derecede yansıtabilen uygun modelin seçimi son derece önemlidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney grupları

Bu çalışmada ağırlıkları 200 ile 220 gr arasında değişen 32 adet dişi Sprague-Dawley albino rat kullanıldı. Deney süresince hayvanlar standart laboratuvar koşullarında (polikarbon kafeslerde, % 50-60 nem aralığında, 20-25⁰ C’de, 12 saatlik karanlık – aydınlık dönüşümünde) tutuldu ve standart yem (ad libitum su ve pellet yem) ile beslendi.

Ameliyat sonrası 2 hafta yaşatılan denekler, histopatolojik çalışma için örneklerin alınması amacı ile sakrifiye edildi. Sonuçlar immunhistokimya (İHK) ve Western Blot (WB) teknikleri ile değerlendirildi. Çalışmada denekler 4 gruba ayrıldı.

- **Grup 1 Sham grubu:** 8 denekte sadece Burr hole açıldı, intrahipokampal KA ve LEV tedavisi uygulanmadı.
- **Grup 2 Kontrol grubu:** 8 denekte Burr hole açılarak, intrahipokampal Serum Fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldı. İntrahipokampal KA ve LEV tedavisi uygulanmadı.
- **Grup 3 Kainik asit (KA) grubu:** 8 denekte Burr hole açılarak, intrahipokampal KA enjeksiyonu yapıldı. LEV tedavisi uygulanmadı.
- **Grup 4 Levetirasetam (LEV) grubu:** 8 denekte Burr hole açılarak, intrahipokampal KA enjeksiyonu yapıldı. 2 hafta boyunca 50mg/kg dozunda intraperitoneal (İP) LEV tedavisi uygulandı.

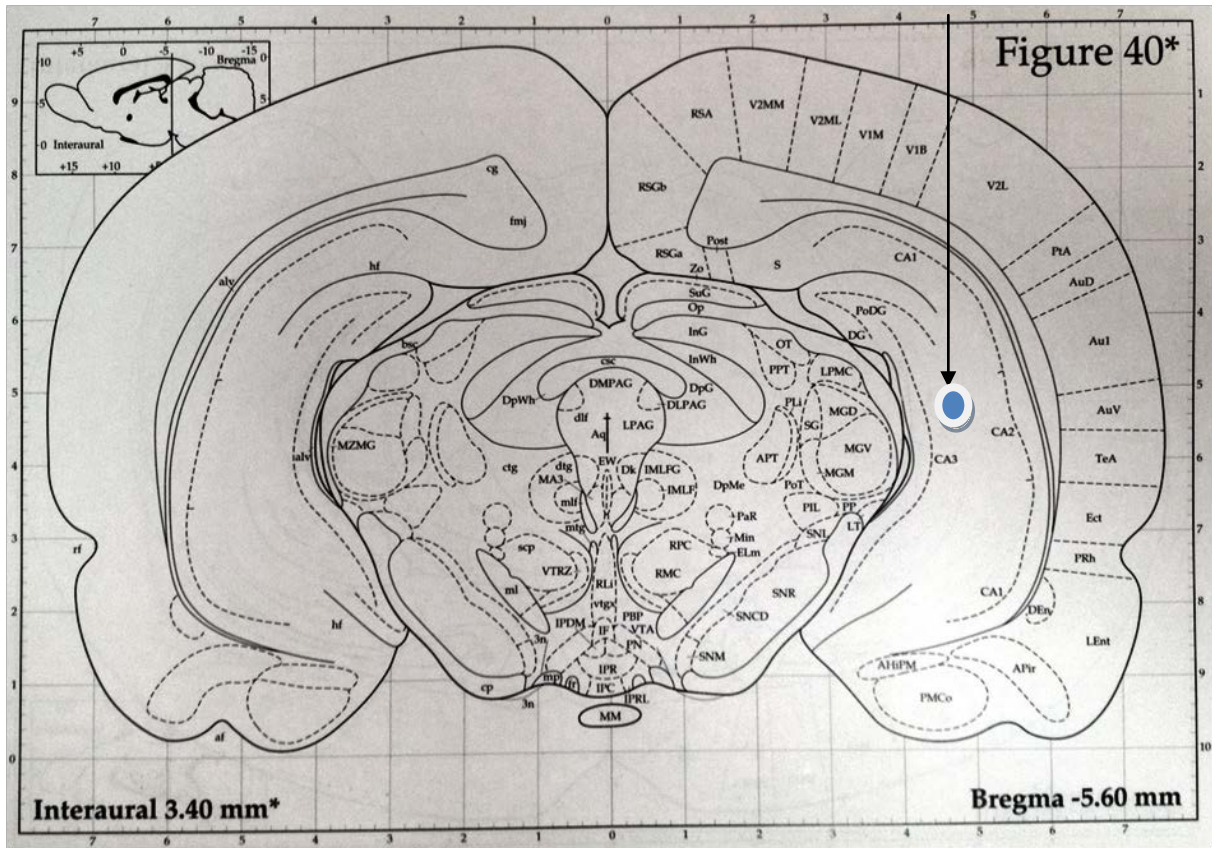
3.2 Anestezi

Altı saatlik açlık sonrasında deneklere 1 mgr/kg ketamine (Ketalar, Phizer) ve 1mgr/kg xylasin (Alfazyne, Alfasan) intraperitoneal olarak verildi. Denekler spontan solunuma bırakılarak cerrahi işlemler yapıldı.

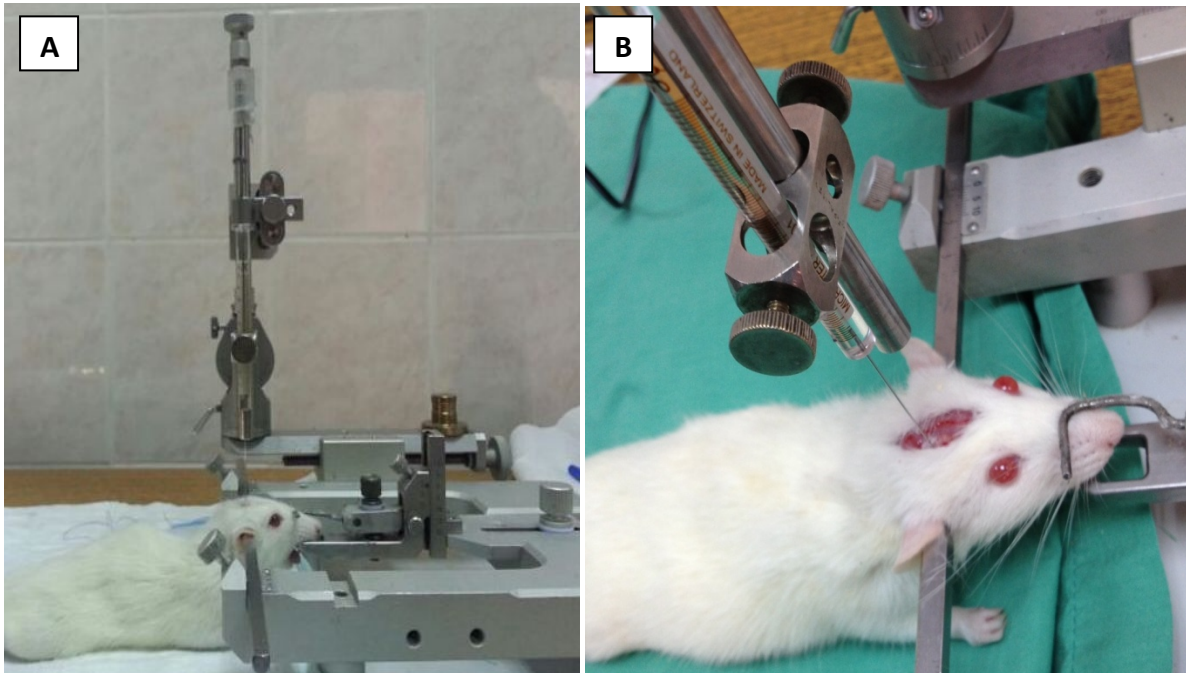
3.3 DeneySEL epilepsi modelinin oluşturulması

Deneklere anestezi uygulandıktan sonra eksternal akustik meatusları çivilere denk gelecek şekilde stereotaksik cihaza yerleştirildi. Orta hat insizyonu ile cilt dokusu kesilerek diseke edildi. Diseksiyon sonrasında Bregma (Br) bulunarak Rat Brain Atlasında gösterilen noktaya (Bregmadan Anteroposteriora doğru 5,5 mm, orta hattan laterale 4,8 mm) Burr hole açıldı ve vertical olarak 5 mm derine, dorsal hipokampusa (CA3 bölgesine) Hamilton iğnesi ile

girilerek $0.4 \mu\text{gr} / 0.2 \mu\text{L}$ hacminde KA(Sigma, St. Louis, MO, ABD), $0.1 \mu\text{L} / \text{min}$ hızla uygulandı (Şekil 4).



Şekil 4. Rat Brain Atlas, KA enjeksiyonu yapılacak bölge – dorzal hipokampus.



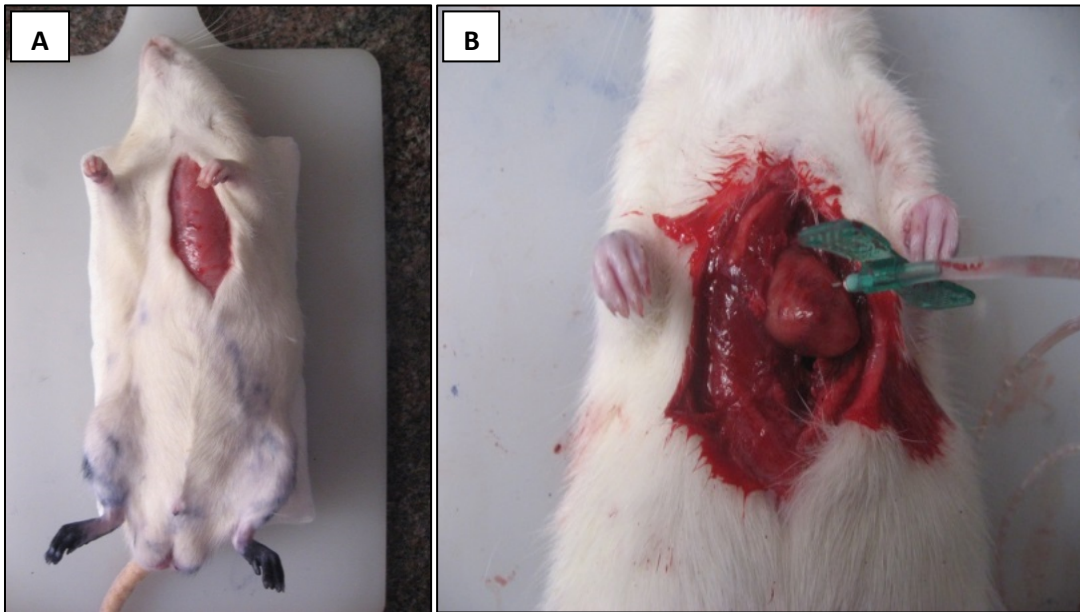
Resim 3. A) Sıçanların stereotaksik başlığa yerleştirilmesi ve B) Hamilton iğnesi ile enjeksiyon yapılması

3.4 Levetirasetam (LEV) verilmesi

LEV tedavisi verilerek çalışmaya dahil edilen 4. Grup deneklere 2 hafta boyunca İP yolla 50 mg/kg dozda LEV (KEPPRA 500 mg/ 5 ml konsantre inf. çöz, UCB Pharma A.Ş.) günde tek doz olarak uygulandı.

3.5 Sakrifikasyon ve dokuların elde edilmesi

Genel anestezi altındaki hayvanlara sol ventrikülden hayvanın karaciğeri beyazlaşınca kadar heparinli solusyon, sonrasında hayvanın vücudu sertleşinceye kadar sabit hızda %4 paraformaldehit (0,1 mol/L sodium fosfat tamponu içinde, pH 7,4) verilerek doku fiksasyonu yapıldı. Ardından hayvanlar dekapite edilerek uygun yöntemlerle beyinleri çıkarıldı ve %4'lük paraformaldehit solüsyonu içerisinde 1 gün fikse edildi. Bu dokular immunhistokimyasal değerlendirme için hazırlandı. Western Blot tekniği ile incelenecek olan beyin dokularını elde etmek için hayvanlar genel anestezi altında dekapite edilerek beyinleri çıkarıldı ve -80°C olan buzdolabında muhafaza edildi.



Resim 4. A) Göğüs duvarının açılması. B) %4'lük Paraformaldehit ile doku fiksasyonu.

3.6 Histopatolojik değerlendirme

Sıçanlarda epilepsi modelinin ve LEV'in etkilerinin incelenmesi için histopatolojik çalışma yapılmıştır. %10'luk formaldehit içerisinde tespit edilen beyinlerden enjeksiyon bölgesinden geçecek şekilde 2 mm'lik koronal kesitler elde edilerek parafine gömüldü. Bu

işlemi takiben parafine gömülü dokulardan 6 µm'lik kesitler alındı. Kesitler HE ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

3.7 İmmunhistokimyasal değerlendirme

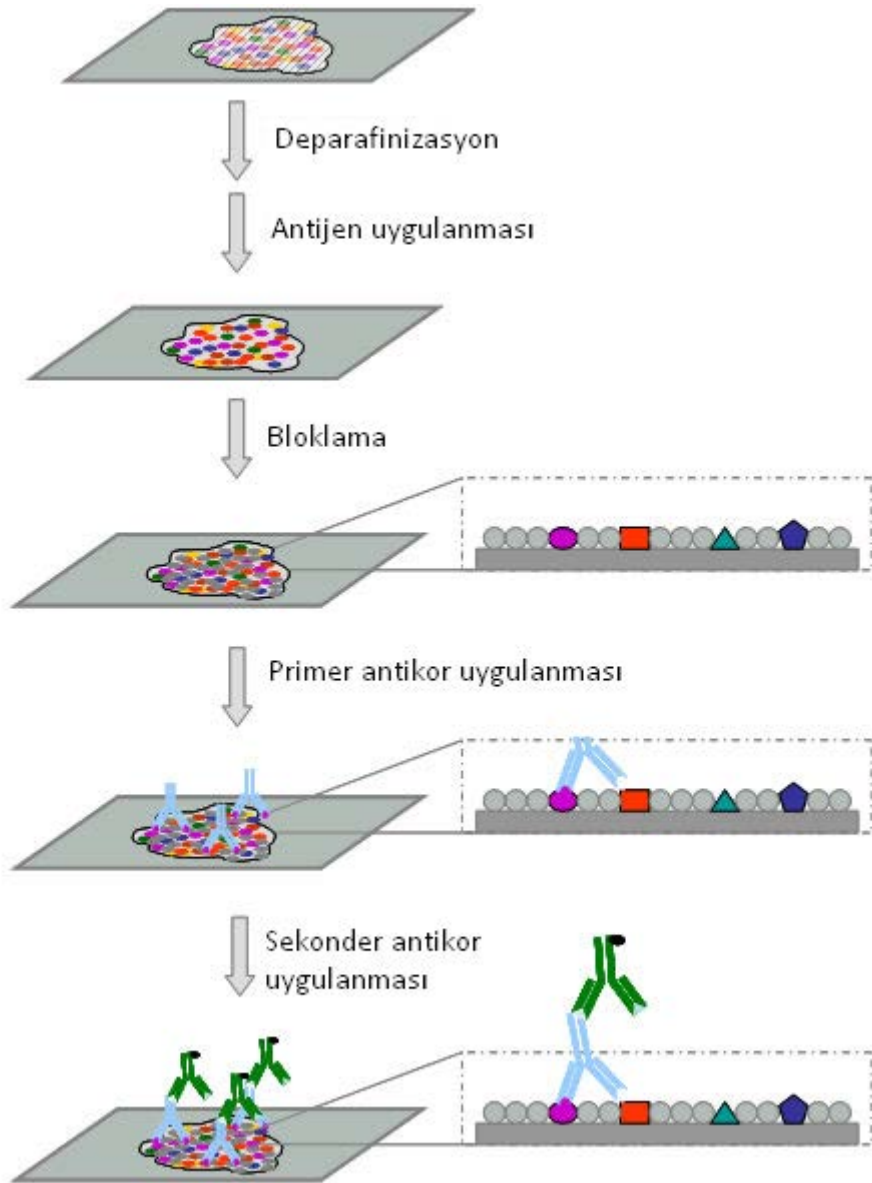
Parafin bloklardan elde edilen 6 µm'lik kesitlere anti-metabotropik glutamat reseptör-1 (ab82211) ve anti-metabotropik glutamat reseptör-5 (ab76316) antikorları ile immunhistokimyasal boyama yapıldı.

3.8 İmmunhistokimya

İmmunhistokimya yöntemi (İHK) doku örneklerinde proteinleri ve proteinlerin lokalizasyonunu göstermek için kullanılan yöntemdir. Bu nedenle Western Blot ve ELİSA gibi diğer immünolojik yöntemlerden kantitatif olarak daha az hassastır. İmmunhistokimyasal boyamada hedef proteini tanımak için mGluR1 ve mGluR5 antikorları kullanıldı. Antikorlar proteine spesifik oldukları için doku örneklerinde sadece hedeflenen proteinlere bağlanırlar. Antikora bağlı enzim protein lokalizasyonundaki çevre dokuları temizleyerek kromogenik deteksiyonla görüntülenebilecek renkli çökelti (antikor antijen etkileşimi) oluşturur.

Önce fikse edilen ve sonrasında parafine gömülen dokuları İHK görüntülemek için temel adımlar şu şekilde tanımlanır (Şekil 5);

- Dokunun fiksasyonu ve parafine gömülmesi
- Kesilme ve kesitlerin düzenlenmesi
- Deparafinizasyon ve rehidrasyon
- Antijen uygulaması
- İmmunhistokimyasal boyama
- Counterstaining – çapraz boyama
- Dehidrasyon ve stabilizasyon
- Mikroskopik görüntüleme



Şekil 5. *İmmunhistokimyasal boyama aşamaları.*

Önce optimal boyama koşullarını tespit etmek için antikorun test edilmesi gerekir. Her antikorun optimal dilüsyonu birbirinden farklıdır.

3.8.1 Fiksasyon

Uygun fiksasyon başarılı İHK'nın en önemli adımlarından biridir. Çalışmamızda bu amaçla paraformaldehit (PFA) kullanılmıştır. Fiksasyon zamanı dokunun hacmine ve tipine bağlıdır. Genellikle 18-24 saatlik fiksasyon çoğu dokular için yeterli olmaktadır. Yetersiz fiksasyon kenarların boyanmasına (dokunun kenarları iyi boyanmasına rağmen dokunu ortası boya tutmaz) neden olabilir. Fazla fiksasyon ise epitopu maskeleyebilir. Antijen uygulaması bu maskelenmeyi ortadan kaldırabilir. Fakat eğer doku çok daha uzun müddette fikse edilmiş

ise antijen uygulaması yapılırsa da görüntü alınamayabilir. Fiksasyon sonrası doku parafine gömülerek mikrotomla istenilen kalınlıkta kesildi (5 mikron İHK için idealdir).

3.8.2 Deparafinizasyon

Boyama yapılmadan önce kesitlerin deparafinleştirilmesi ve rehidrasyonu yapıldı. Parafinin yetersiz temizlenmesi zayıf boyanmaya neden olabilir. Bunun için Xylene, %100'lük ve %95'lik etanol kullanıldı. Bu işlemin adımları şöyledir;

1. Xylene ile 2 kez 3 dk
2. Xylene ile %100'lük etanol 1:1 karışımında 3 dk
3. %100'lük etanol ile 2 kez 3 dk
4. %95'lik etanol ile 3 dk
5. %70'lik etanol ile 3 dk
6. %50'lik etanol ile 3 dk yıkanma
7. Soğuk musluk suyu ile çalkalanma

Antijen uygulanana kadar camlar musluk suyunda saklandı. Camların kurummasından kaçınmak gerekir. Eğer örnekler kurursa non-spesifik antijen bağlanması nedeniyle aşırı koyu boyanma olur.

3.8.3 Antijen uygulaması

Formalinle fikse edilen dokuların çoğuna İHK boyanmadan önce antijen uygulandı. Fiksasyon zamanı oluşan metilen köprüleri proteinlerle çapraz birleşme yaparak antijenlerin bağlanma bölgesini maskeleyebilir. Antijen uygulaması için iki yöntem vardır: HİER (heat-induced epitope retrieval) ve enzimatik. Her iki yöntem metilen köprülerinin kırılmasına ve antikorların bağlanması için antijenik bölgelerin ortaya çıkmasına neden olur. Enzimatik uygulama bazen örneklerin morfolojik yapısını bozabilir. Bunun olmaması için konsantrasyon ve uygulama süresi önemlidir. Tris/EDTA pH 9.0 solusyonu çoğu antijen için uygundur.

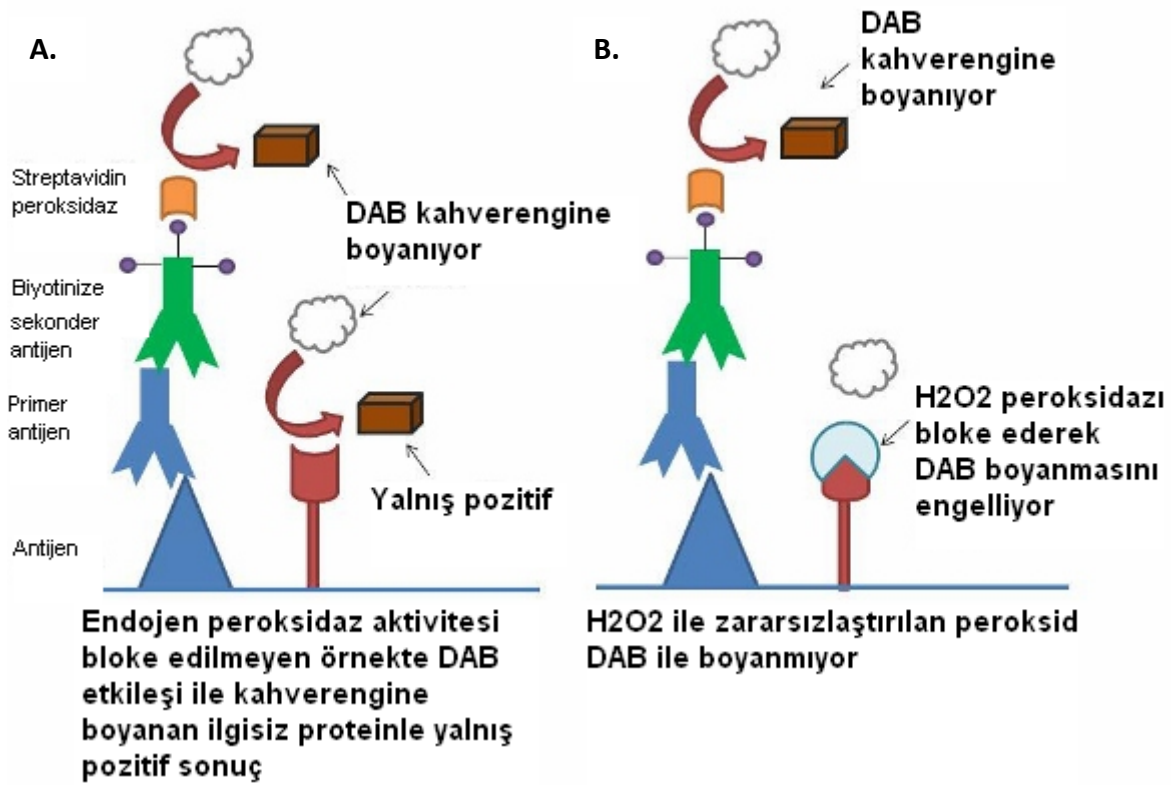
3.8.4 İmmunhistokimyasal boyanma

Örneklerin bütün aşamalarda nemlendirilmiş kamerada tutuldu. Aksi taktirde non-spesifik bağlanma oluşur ve aşırı yoğun kontrastlanma meydana gelir. Bu boyama işlerinde izlenecek yol aşağıdaki gibidir;

1. Kesitler 2 ke 5'er dk TBS ve %0,025'lik Triton X-100 ile yıkanır
2. %10'luk serum ve %1'lik BSA ile bloklayıp TBS içerisinde 2 saat oda sıcaklığında tutulur
3. Örneklerin üzerindeki solüsyon alınır (çalkalama yapılmamalıdır) ve kenarları peçete ile silinir
4. TBS ve %1'lik BSA ile dilüe edilmiş antikorlar (mGluR1 ve mGluR5) uygulanır
5. Gece boyunca 4°C'de inkübe edilir
6. 2 kez 5'er dk TBS 0,025 % Triton ile durulanır
7. TBS ile 3 kez 5'er dk durulanır
8. 10 dk oda sıcaklığında kromogen uygulanır
9. Counterstain (Çapraz boyama) yapılır

Non-spesifik bağlanma ve Fc reseptörüne bağlanmayı tespit ile ayırmak için, ilgisiz antijene bağlanan antikorla uygulayarak paralel inceleme yapılabilir. İlgisiz antijene yönelik antikor izotip kontrol olarak bilinir.

- ✓ TBS ile %0,025'lik Triton X-100 yüzey gerilimini azaltarak reagentlerin bütün dokuyu kaplamalarına kolaylık sağlar. Aynı zamanda Fc reseptörleri çözerek nonspesifik boyanmayı engellediği de düşünülmektedir.
- ✓ Sekonder antikorlar dokudaki endojen immunglobulinlerle çapraz etkileşim gösterebilir. Primer antikor uygulamasından önce serum uygulaması da Fc reseptör bağlanmasını azaltmaktadır. BSA hidrofobik etkileşim yaparak non-spesifik bağlanmayı azaltır.
- ✓ Primer antikor önerilen şekilde dilüe edilmelidir (0,5 ila 10 µg/ml).
- ✓ H₂O₂ endojen peroksidaz aktivitesini baskılayarak yoğun boyanmayı engeller (Şekil 6). Endojen peroksidaz varlığını göstermek için DAB solüsyonu uygulanabilir. Peroksid TBS veya su ile dilüe edilebilir.
- ✓ Counterstain için hematoksin boyası kullanılabilir.



Şekil 6. Peroksidazın bloke edilmesi. **A)** DAB'ni peroksidazla etkileşimi sonucu yanlış pozitif sonuç vermesi **B)** Endojen peroksidazın H₂O₂ ile bloke edilmesi.

İlgisiz antijenlere bağlanarak yanlış pozitif sonucu engellemek için H₂O₂ solüsyonu kullanıldı. H₂O₂ endojen peroksidaza bağlanarak DAB'nin ilgisiz antijenle etkileşimini engeller ve yanlış pozitif boyanma bu şekilde engellenmiş olur (Şekil 6.)

İyi sinyal alabilmek için avidin-biyotin kompleksi (ABC) ile sinyal amplifikasyonu yapıldı. Bu teknik Su-Ming Hsu ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Avidin'in biyotin'e 4 bağlanma bölgesi vardır ve bu bağlanma kalıcıdır.

Primer antikor ilgili proteine bağlanırken, biyotinize sekonder antikor ise primer antikora bağlanır.

3.9 Western blot (İmmunoblotting)

1979 yılında Towbin tarafından tanımlanmış protein analiz yöntemidir. Jelde ayırımı yapılmış proteinlerin membrana emdirilerek ilgilenilen proteinin radyoaktif izotopla ya da başka şekilde işaretlenmiş özel antikor yardımıyla membran üzerinde belirlenmesidir. Antikor spesifik antijenini tanıdığından immunoblotting olarak da isimlendirilir. Western blotting

kompleks karışım içinden spesifik proteinin tanınması ve bu protein hakkında kalitatif ve semikantitatif veri elde edilmesinde kullanılır.

Örnekler hazırlandıktan sonra aşağıdaki aşamalardan geçirilerek görüntüleme yapılır (Şekil 7):

1. Jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması
2. Jelde ayrılmış proteinlerin membrana transferi - blotlama
3. Nonspesifik bağlanma bölgelerinin blokajı - bloklama
4. Primer ve sekonder antikör aşamaları
5. İşaretleyiciye uygun substrat ile reaksiyon
6. Görüntüleme

3.9.1 Örneklerin hazırlanması

Jel üzerinde yürütülecek örneklerin hazırlanması için dokuları lize uğrattakı tamponlar hazırlandı. Bu çözeltiler proteinlerin izole olarak yürüyebilmesini sağlamaktadır. Membrana bağlı proteinleri ayırmak için Nonidet-P40 (NP40) buffer ve RİPA buffer (Radio İmmuno Precipitation Assay) kullanıldı.

Nonidet-P40 (NP40) buffer

- 150 mM sodyum klorür
- 1,0% NP-40 (Triton X-100 NP-40 yerine kullanılabilir)
- 50mMTris, pH 8,0

RİPA buffer (Radio İmmuno Precipitation Assay)

- 150 mM sodyum klorür
- 1,0% NP-40 ve ya Triton X-100
- 0,5%sodyum deoksikolat
- 0,1% SDS (sodyum dodesil sulfat)
- 50 mM Tris, pH 8,0

Lizis oluştuktan sonra proteolizis, defosforilasyon ve denaturasyon başlar. Bunları engellemek için örnekler buzda veya 4° C’de yeni ilave edilmiş lizis inhibitörleri ile saklandı. Bunun için Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A, PMSF, EDTA, PMSF EGTA, Na florid ve Na ortovanadat kullanıldı.

Dokudan örneklerin hazırlanması için buzlu dokuları proteoliz oluşmadan, mümkün mertebe hızlı ve dikkatli şekilde ayrıldı. Alınan dokular azot solüsyonu içinde Eppendorf tüplerine yerleştirildi ve hemen homojenize edildi. Her 5 mg doku için 300 µl litik tampon

konuldu ve homojenize edildi. 2 kez 300 µl litik tamponla durulanarak homojenizasyona devam edildi. Protein kaybını engellemek için fazla durulamadan kaçınılması gerekir. Optimal konsantrasyon 1-5 mg/ml, minimal konsantrasyon 0,1 mg/ml olması gerekir. Mikrosantrifüjde, 4° C'de 20 dk 12000 rpm santrifüj edilerek ultrafiltrat hücresel komponentinden ayrıldı. Antikorlar tipik olarak proteinlerin az ve açılmış kısmına bağlanır. Proteinlerin açılması ve denaturasyonu için anyonik tampon (Laemmli 2X buffer) ve denatüre edici deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) ile 95-100° C'de 5 dk kaynatıldı.

3.9.2 Elektroforez

Jel elektroforezi kullanılarak makromoleküllerin ayrılmasıdır. Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda göç etmeleri prensibine dayanır. Ayrılmış moleküller ikinci bir matrikse (genelde nitroselüloz ya da polivinilidin difluorid-PVDF membrana) transfer edildi. Jelden matrikse elektroforetik transfer (blotting) protein içeren poliakrilamid jel ile nitroselüloz ya da protein bağlayıcı başka bir desteğe direkt teması ve sandwich modeli şeklinde gerçekleştirildi.

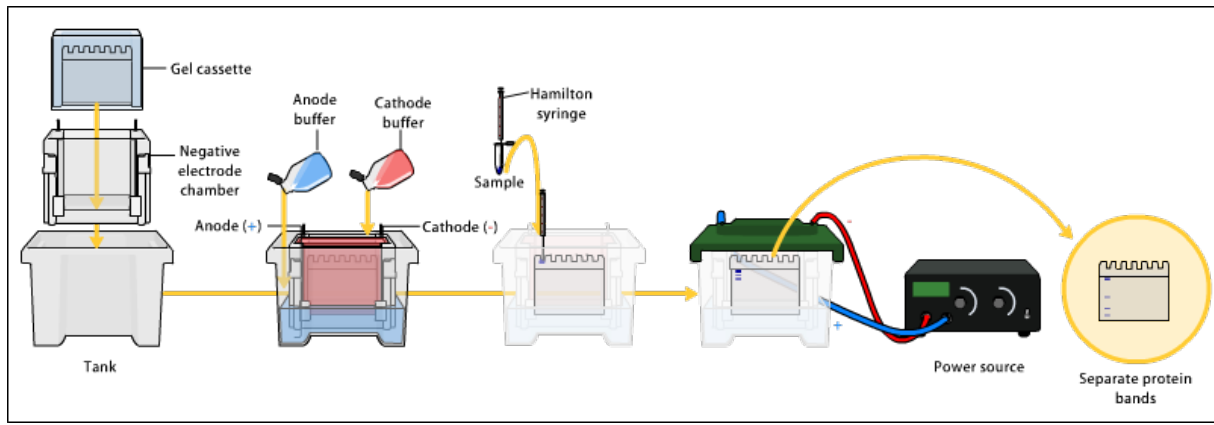
Elektrik uygulandığında proteinler poliakrilamid jelden sıkıca bağlandıkları membran yüzeyine hareket ederler. Membranda jeldeki protein paterninin aynen kopyası elde edildi. Transfer etkinliği proteinin jelden migrasyon yeteneği, membrana bağlanma özelliği, jel ve membranın komplet teması, elektrotların pozisyonu, transfer süresi, proteinlerin büyüklüğü, alan direnci ve deterjanların varlığına bağlıdır.

Membran üzerindeki nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloke edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla süt veya normal serum kullanıldı.

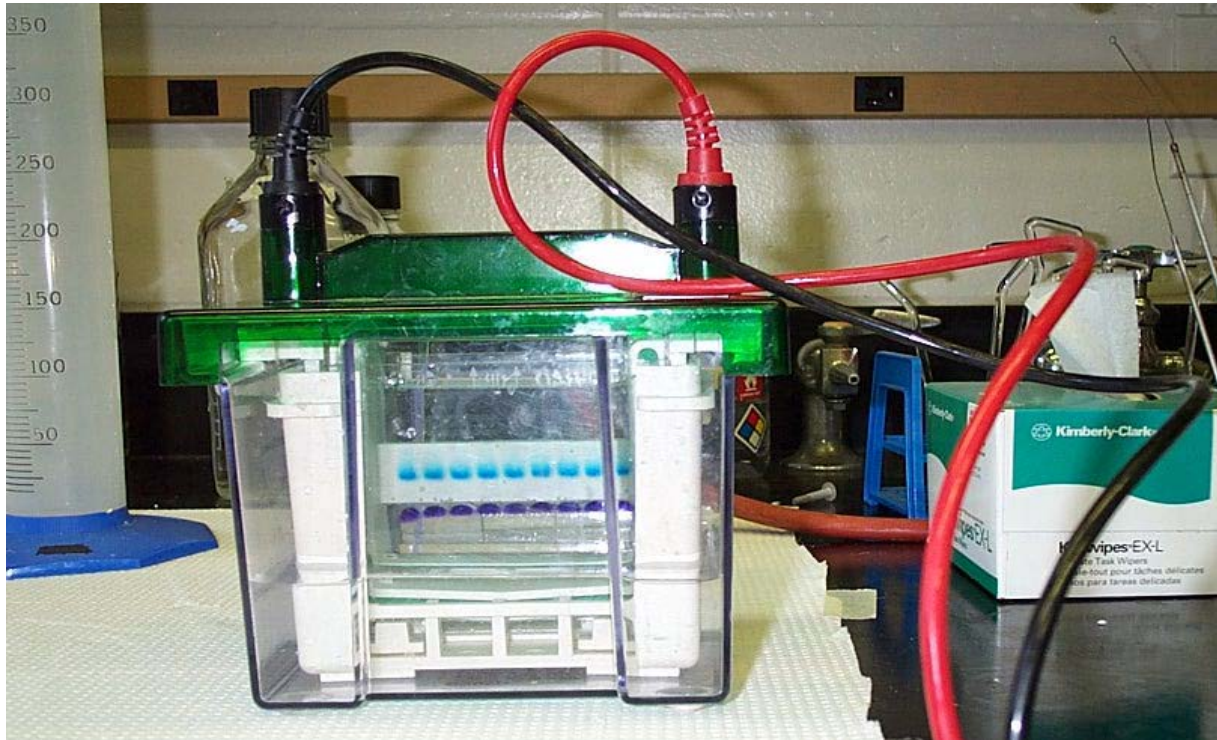
Transfer edilmiş protein enzim-işaretli antikor ile kompleks oluşturur. Enzim için uygun substrat eklendi, böylece membran üzerinde kromojenik ya da fluorojenik presipitat oluştu. Primer antikor seçimi tanınacak antijene bağlıdır. Poliklonal antikorlar daha ucuz, üretimi kolay, antijen için yüksek afiniteye sahiptir. Monoklonal antikorlar yüksek spesifite ve saflığa sahiptir.

Bağlanmamış ajanların elimine edilmesi için membranlar yıkandı. Yetersiz yıkama yüksek zemin etkisine, çok yıkama ise antikor veya antijenin blottan kaybına neden olabilir. Yıkama için TBS ya da PBS bufferları, sıklıkla %0.05 Tween 20 gibi bir deterjan eklenerek

kullanıldı. Sekonder antikorun seçimi primer antikorun geliştirildiği canlıya bağlıdır. Optimal dilüsyon denenerek saptandı. Biotin, fluoresan, rodamin, horseradish peroksidaz, alkalin fosfataz işaretleyicileri kullanıldı. Seçilecek olan substrat istenen sensitivite, tanıma metodu, sinyalin şekline ve kullanılan enzim işaretleyicisine göre değişiklik gösterir. Bu substratlar uygun enzim ile bir araya geldiğinde membran üzerinde çözünmeyen renkli presipitatlar oluşturur ve ek görüntülemeye ihtiyaç duymazlar. TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), 4-CN (4-kloro-1-naftol) ve DAB (3,3',-diaminobenzidintetrahidroklorid) HRP ile kullanılabilecek kromojenik substratlardır. Film banyosu sonrası siyah renkte spotlar (bant) izlendi. En iyi görüntü yakalanana kadar film süresi tekrarlandı.



Şekil 7. Western blot aşamaları.



Resim 5. Western blot ünitesi.

4. BULGULAR

4.1 Histopatolojik ve immunhistokimyasal bulgular

Sham grubu – sağ tarafa burr hole açılmış, enjeksiyon yapılmamış, 3 denekten oluşan gruptur.

HE boyamasında:

- Dentat girus granül nöronlarında değişiklik saptanmadı.
- CA sektörü piramidal nöronlarında kayıp ve gliosis saptanmadı.
- Entorinal kortekste herhangi bir patoloji izlenmedi.

mGluR1 boyamasında – kortikal nöronlar, hipokampal piramidal nöronlar ve dentat girus nöronlarında somatodendritik boyanma izlenmiştir.

mGluR5 boyamasında – kortikal nöronlar, hipokampal piramidal nöronlar ve dentat girus nöronlarında dendritik boyanma izlenmiştir.

Kontrol grubu – sağ tarafa intrahipokampal SF enjeksiyonu yapılan, 3 denekten oluşan gruptur.

HE boyamasında (Resim 9A):

- Enjeksiyon yapılan tarafta ve karşı tarafta dentat girus granül nöronlarında değişiklik saptanmadı.
- Enjeksiyon yapılan tarafta ve karşı tarafta CA piramidal nöronlarında kayıp ve gliosis saptanmadı.
- Enjeksiyon yapılan tarafta ve karşı taraf entorinal kortekste gliosis ve nöron kaybı yanısıra herhangi bir patoloji izlenmedi.

mGluR1 boyamasında – kortikal nöronlar, hipokampal piramidal nöronlar ve dentat girus nöronlarında somatodendritik boyanma izlenmiştir (Resim 9B).

mGluR5 boyamasında – kortikal nöronlar, hipokampal piramidal nöronlar ve dentat girus nöronlarında dendritik boyanma izlenmiştir.

KA grubu - sağ tarafa intrahipokampal kainik asit (KA) enjeksiyonu yapılan, 4 denekten oluşan gruptur.

HE boyamasında (Resim 10A):

- Enjeksiyon yapılan tarafta ve karşı tarafta dentat girus (DG) granül nöronlarda değişiklik saptanmadı.
- Enjeksiyon yapılan tarafta (sağ) CA3'te skleroz: nöron kaybı ve gliosis izlenmiştir.
- Enjeksiyon yapılan tarafta (sağ) CA2 kısmen korunmuştur.
- Enjeksiyon yapılan tarafta (sağ) CA1'de skleroz: nöron kaybı ve gliosis izlenmiştir.
- Enjeksiyon yapılan tarafta (sağ) entorinal kortekste şiddetli iskemik değişiklikler: nöropilde rarifikasyon, kırmızı nöronlar (resim 8), vasküler belirginleşme ve histiositler izlenmiştir.

mGluR1 boyamasında, lezyon tarafında – CA3 ve CA1 piramidal nöronlarda somatodendritik ekspresyon kaybı mevcut iken, dentat girus nöronlarında somatodendritik ekspresyon kaybı izlenmemiştir.

mGluR5 boyamasında, lezyon tarafında – CA2 piramidal nöronlar ve dentat girus nöronlarında dendritik ekspresyon izlenmiş olup, CA3 ve CA1'de ekspresyon nöron kaybına ikincil olarak azalmıştır (Resim 10B).

KA + LEV grubu - sağ tarafa intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu yapılmış, 2 hafta boyunca İP yolla LEV verilmiş, 4 denekten oluşan gruptur.

HE boyamasında:

- Enjeksiyon yapılan tarafta ve karşı tarafta dentat girusgranül nöronlarında değişiklik saptanmadı.
- Enjeksiyon yapılan tarafta (sağ) CA3'te skleroz: nöron kaybı ve gliosis izlenmiştir.
- Enjeksiyon yapılan tarafta (sağ) CA2 kısmen korunmuştur.
- Enjeksiyon yapılan tarafta (sağ) CA1'de skleroz: nöron kaybı ve gliosis izlenmiştir.
- Enjeksiyon yapılan tarafta (sağ) entorinal korteks 2 denekte korunmuş, diğer 2 denekte iskemik değişiklikler: nöropilde rarifikasyon, kırmızı nöronlar (resim 8), vasküler belirginleşme ve histiositler izlenmiştir.

mGluR1 boyamasında, lezyon tarafında – CA3 ve CA1 piramidal nöronlarında dendritik ekspresyon kaybı mevcut iken, dentat girus nöronlarında somatodendritik ekspresyon korunmuştur.

mGluR5 boyamasında, lezyon tarafında – CA2 piramidal nöronlarda ve dentat girus nöronların dendritlerinde ekspresyon izlenmiş olup, CA3 ve CA1’de piramidal nöronlarda dendritik ekspresyon nöron kaybına ikincil olarak azalmıştır.

Özet olarak; immunhistokimyasal olarak sıçan beyinlerinde mGluR 1 boyanma paterni – kortikal nöronlar, hipokampal piramidal nöronlar ve dentat girus nöronlarında somatodendritik boyanma şeklindedir (resim 6). mGluR5 boyanma paterni ise kortikal nöronlar, hipokampal piramidal nöronlar ve dentat girus nöronlarının dendritlerinde boyanma olarak saptanmaktadır (resim7).

Epilepsi modeli oluşturulmuş deneklerde sklerotik alanda mGluR 1 ve mGluR 5 boyanmasında somatodendritik boyamada azalma izlenmiştir. Aynı örneklerde beyin farklı yerlerinde boyanma paterninde değişiklik izlenmemiştir. mGluR 1 ve mGluR 5 boyamalarındaki ekspresyon kaybının hipokampal skleroz ve nöron kaybına bağlı olduğu düşünülmüştür.

	Dentat Girus (DG)		CA1		CA2		CA3		Entorinal Korteks (EC)		mGluR1		mGluR5	
	Sayı	Skleroz derecesi	Sayı	Skleroz derecesi	Sayı	Skleroz derecesi	Sayı	Skleroz derecesi	Sayı	Skleroz derecesi	Sayı	Boyanma derecesi	Sayı	Boyanma derecesi
Sham n=3	3/3	-	3/3	-	3/3	-	3/3	-	3/3	-	3/3	+	3/3	+
Kontrol n=3	3/3	-	3/3	-	3/3	-	3/3	-	3/3	-	3/3	+	3/3	+
KA n=4	4/4	-	4/4	++	4/4	-	4/4	++	4/4	++	4/4	-	4/4	-
KA+LEV n=4	4/4	-	4/4	+	4/4	-	4/4	++	4/2	++	4/4	-	4/4	-

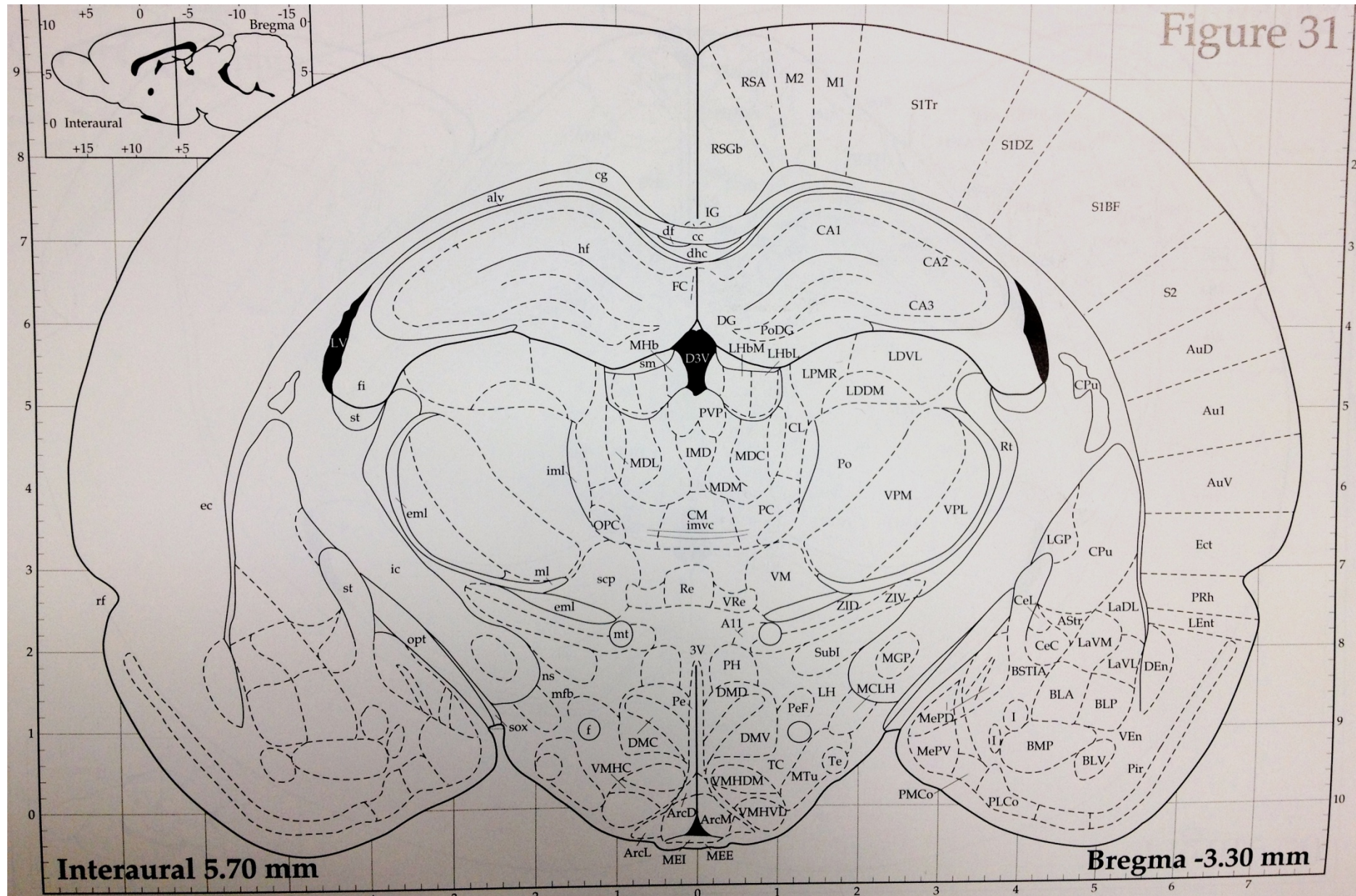
(-) – Nöron kaybı izlenmedi

(+) – Orta şiddette nöron kaybı + gliosis

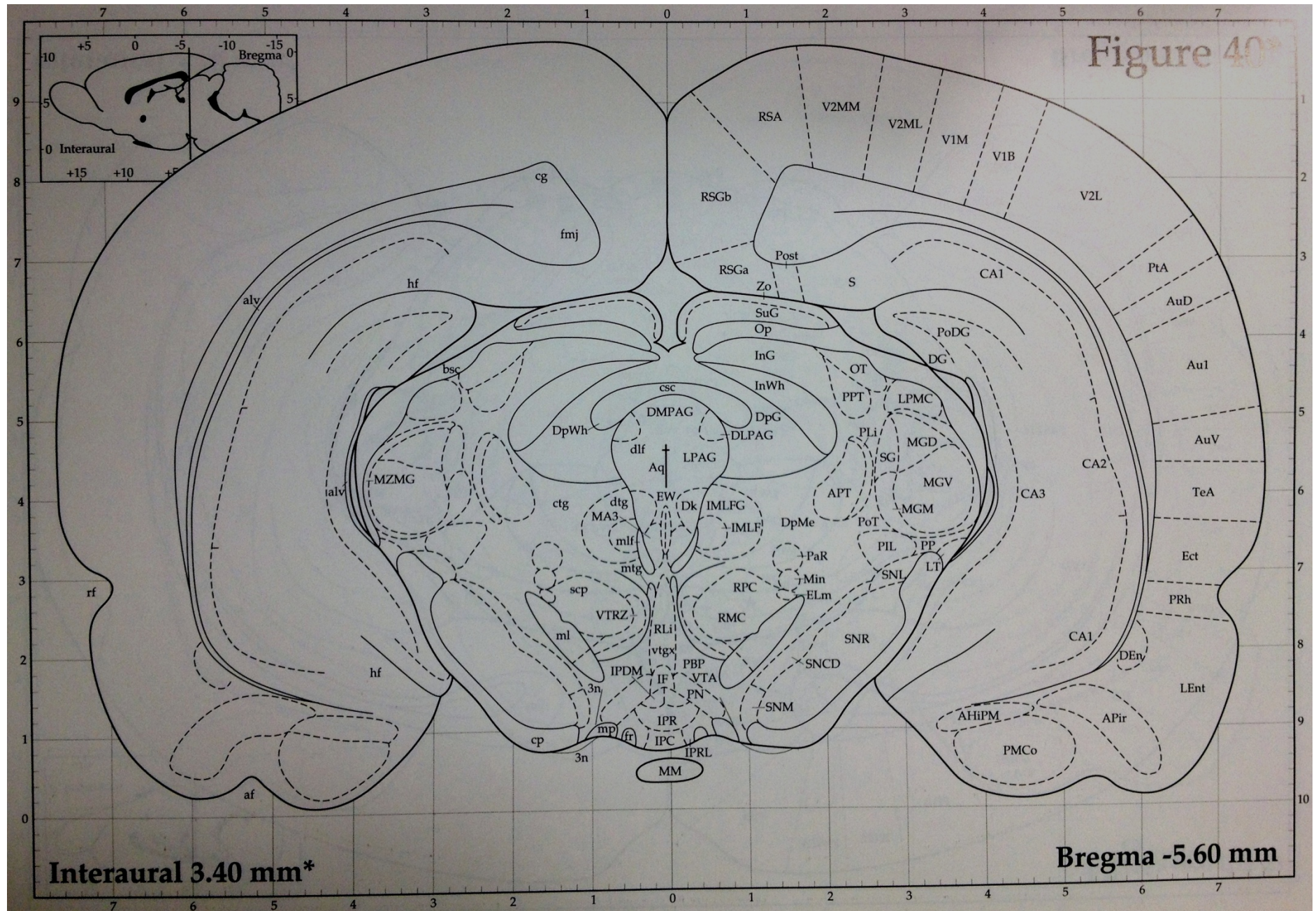
(++) – Ağır nöronal kayıp + gliosis

Tablo 10. *Histopatolojik değerlendirmede etkilenen entorinal korteks (EC), dentat girus (DG) ve hipokampus bölgelerinin (CA1, CA2 ve CA3) skleroz derecesinin gruplara göre dağılımı. Antikorlarla boyanan grupların (mGluR1 ve mGluR5) boyanma derecesi.*

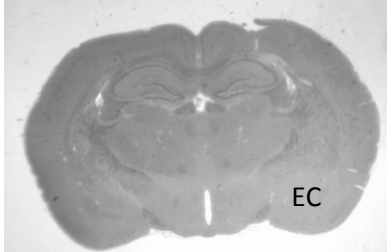
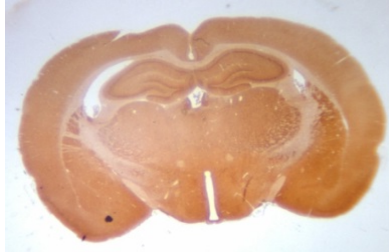
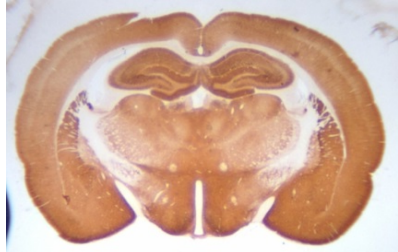
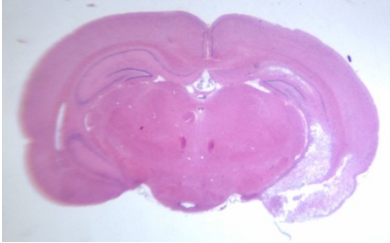
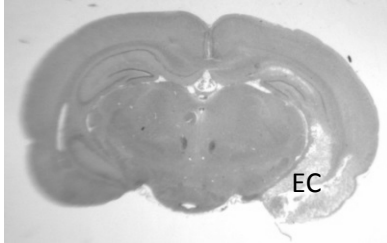
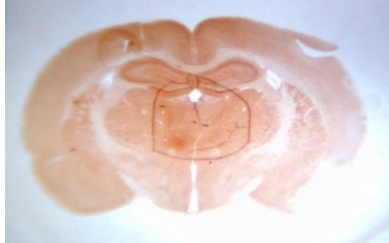
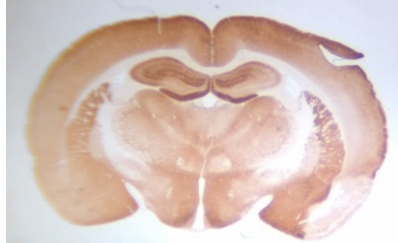
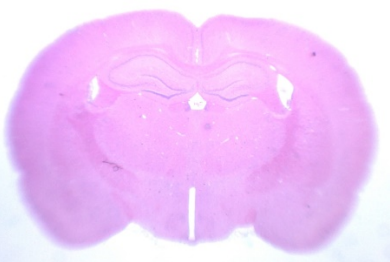
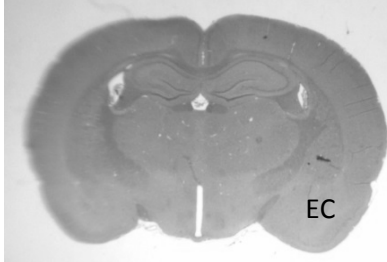
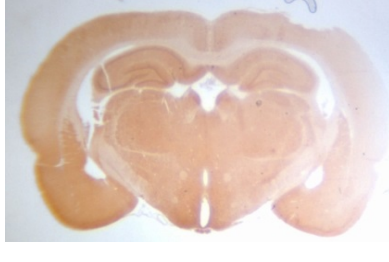
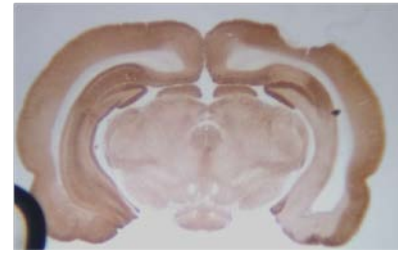
Şekil 8. Rat Brain Atlas. Bregmadan 3,3 mm posteriordan geçen keside hipokampusun şematik ilüstrasyonu.



Şekil 9. Rat Brain Atlas. Bregmadan 5,6 mm posteriordan geçen keside hipokampusun şematik ilüstrasyonu.

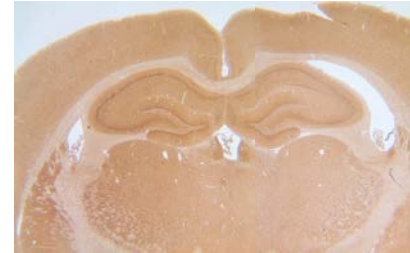
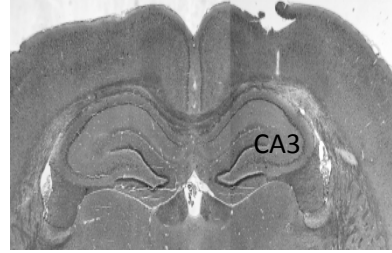
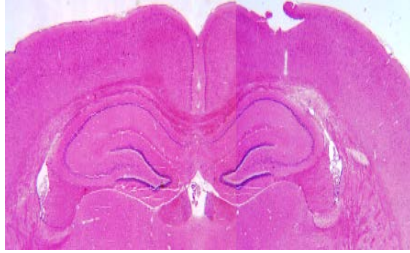


Tablo 11. Entorinal kortekste (EC) oluşan değişiklikler. Gruplara göre dağılımı.

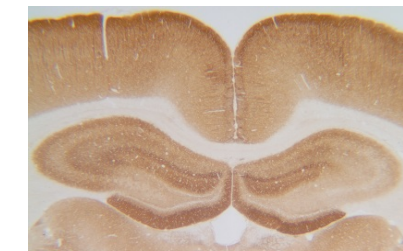
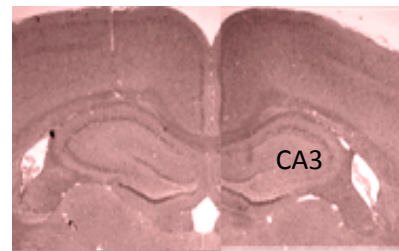
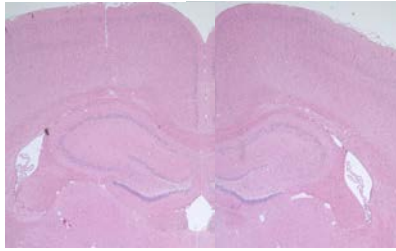
	HE	Şema	mGluR1	mGluR5
Kontrol n=3				
KA n=4				
KA+LEV n=4				

Tablo 12. *Gruplara göre hipokampal zedelenme.*

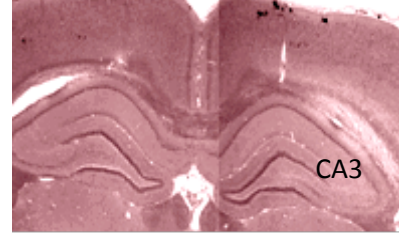
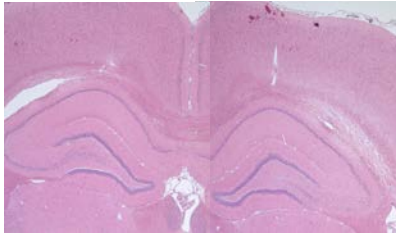
Kontrol



KA



KA+LEV

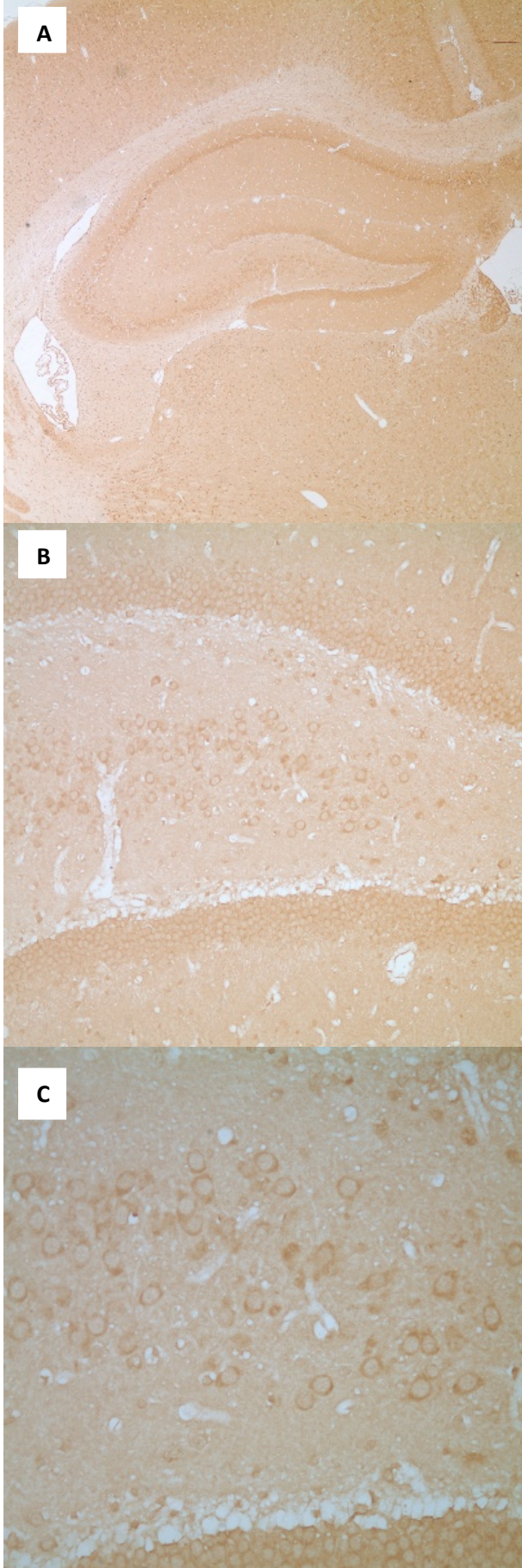


HE

Şema

mGluR1

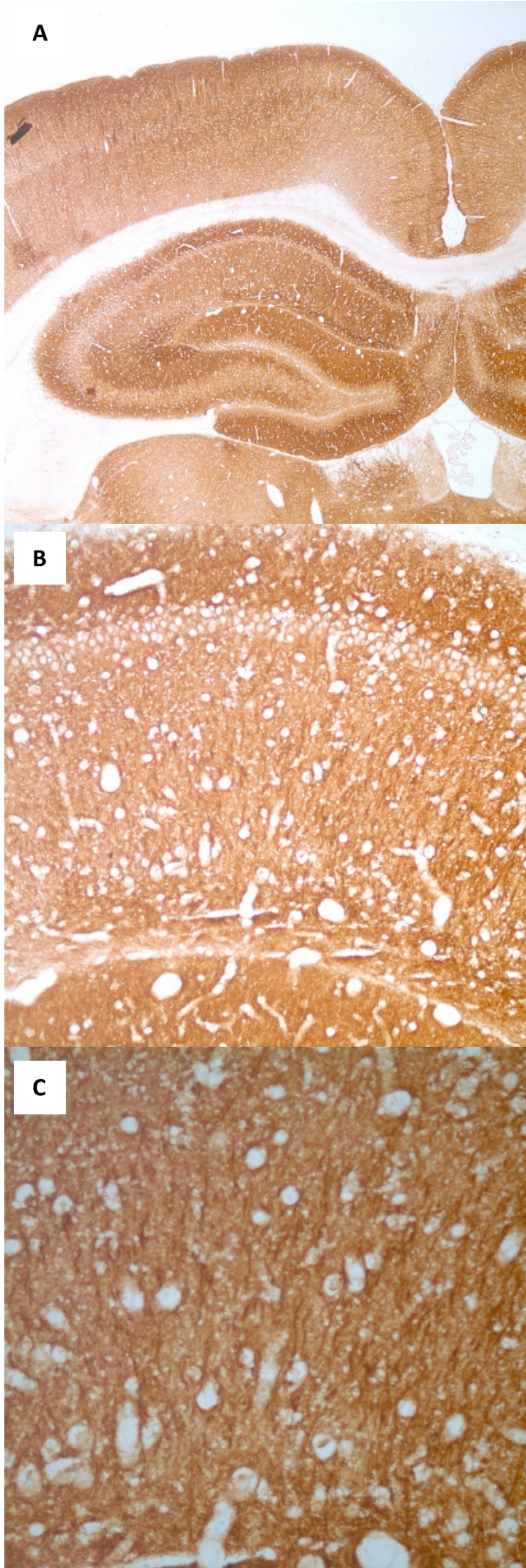
mGluR5



Resim 6. *mGlu1*antikoruna ile boyanma paterni.

Hipokampal kesitlerde piramidal ve granüler hücrelerin boyanmış görünümü. Piramidal ve granüler hücrelerde somatodendritik boyanma mevcut.

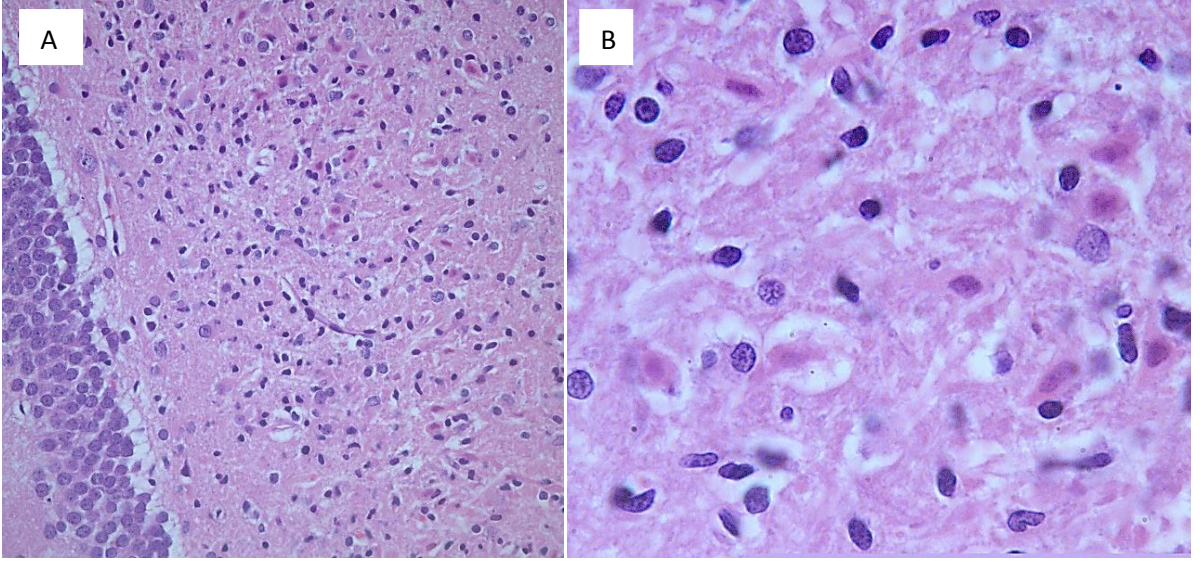
- A) 10x büyütme
- B) 20x büyütme
- C) 40x büyütme



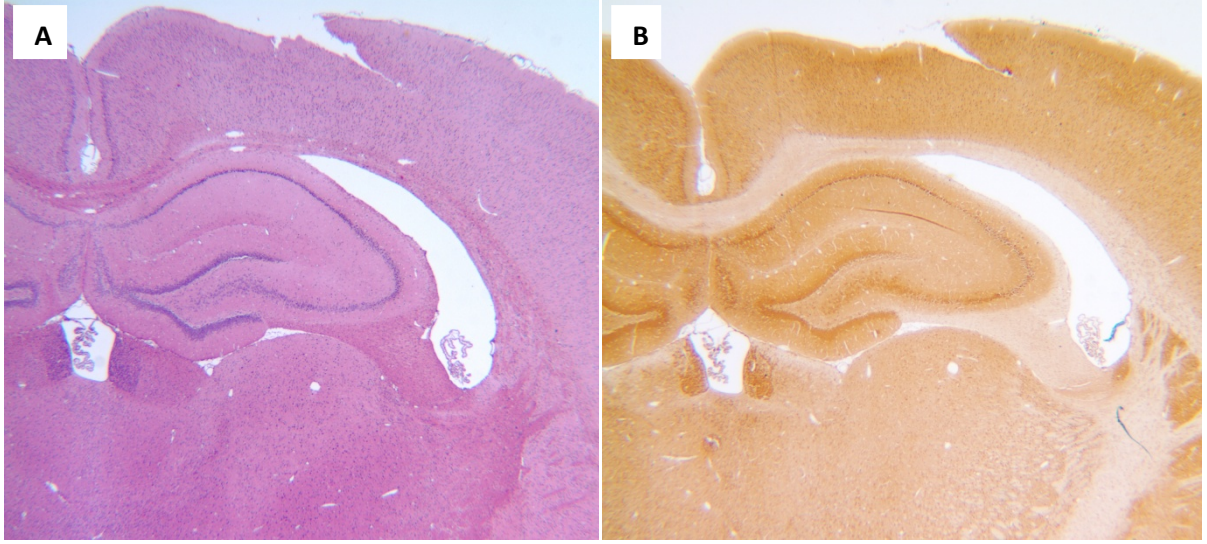
Resim 7. *mGluR5 antikoruna ile boyanma paterni.*

Hipokampal kesitlerde piramidal ve granüler hücrelerin boyanmış görünümü. Piramidal ve granüler hücrelerin dendritleri boya tutuyor.

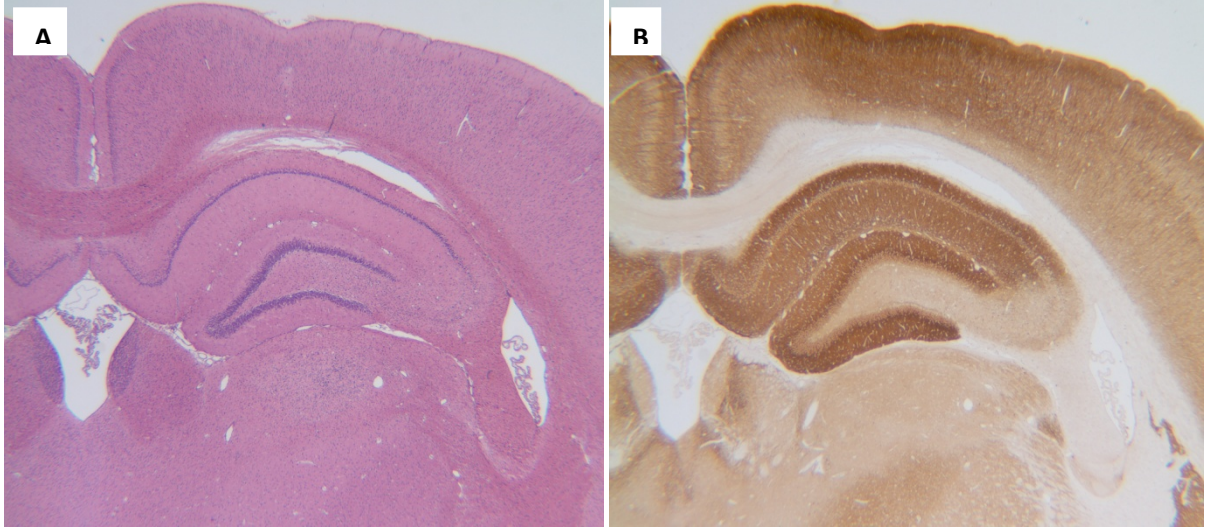
- A) 10x büyütme
- B) 20x büyütme
- C) 40x büyütme



Resim 8. *Hipoksi sonucu oluşmuş kırmızı nöronlar (A. 40x büyütmede ve B. 100x büyütmede).*



Resim 9. Normal hipokampus. **A)** Hematoksilen eozin boyası (HE), **B)** mGluR1 antikoru ile immunhistokimyasal boyama (İHK).

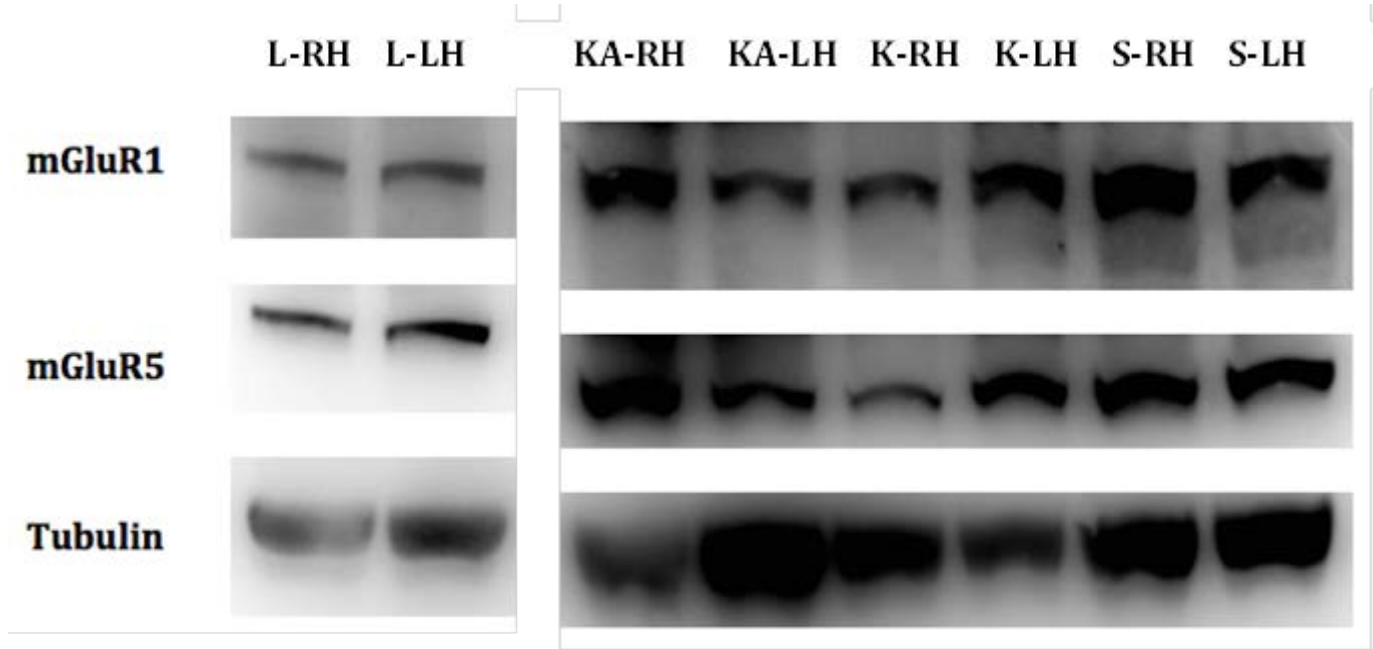


Resim 10. Hipokampal skleroz. **A)** Hematoksilen eozin boyası (HE), **B)** mGluR5 antikoru ile immunhistokimyasal boyama (İHK).

4.2 Western blot

Korteks ve hipokampusu ayrılan homojenatlar gruplar, sağ ve sol hemisfer olarak çalışıldı. Lezyon oluşturduğumuz sağ hemisfer ve hipokampus sağlam tarafla belirgin farklılık göstermedi. Gruplara göre incelenen homojenatlarda grup I mGluR ekspresyonunda beklenen değişiklik saptanmadı.

Bütün deney gruplarına ait sağ ve sol hipokampus ve korteks örneklerinde mGluR1 ve mGluR2 protein miktarları Western Blotlama yöntemi ile tayin edildi. Toplam protein miktarlarının standardizasyonu için tubulin kontrolü kullanıldı. mGluR1 ve mGluR5 antikorları ile membranlarda yaklaşık 130 kDa civarında ilgili proteinlere ait bantlar elde edildi. Kemiluminesans yöntemi ile ölçülen bant intensiteleri önce tubulin kontrolü ile oranlandı. Her bir örnek için (Levetirasetam grubu 1. Hayvan Hipokampus-Sağ gibi) değerler elde edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. Gerek hipokampus-korteks, gerek sağ-sol gerekse deney grupları arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı ($p>0.05$). Ancak, istatistiksel anlamlılığa ulaşmamakla birlikte kainik asit enjeksiyonu grubunda, enjeksiyonun yapıldığı sağ hipokampusta sol hipokampusu göre hem mGluR1 hem de mGluR5 miktarları görece daha yüksek bulundu (mGluR1: 0,39 vs 0,19; mGluR5: 0,32 vs 0,20, $p>0,05$). Yine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bu fark levetirasetam grubunda ortadan kalkmış görünmekteydi (mGluR1: 0,32 vs 0,26; mGluR5: 0,23 vs 0,30, $p>0,05$). Korteksler arasında ise böyle bir ilişki görünmemekteydi.



Resim 11: Temsili Western Blot membran görüntüleri. mGluR1 ve mGluR5, yaklaşık 130 kDa bandına karşılık gelmektedir. Tubulin kontrol olarak kullanılmıştır. Kısaltmalar: L-RH: Levetirasetam grubu sağ hipokampus; L-LH: Levetirasetam grubu sol hipokampus; KA-RH: Kainik asit enjeksiyon grubu sağ hipokampus; KA-LH: Kainik asit enjeksiyon grubu sol hipokampus; K-RH: Kontrol grubu sağ hipokampus; K-LH: Kontrol grubu sol hipokampus; S-RH: Sham grubu sağ hipokampus; S-LH: Sham grubu sol hipokampus.

5. TARTIŞMA

Epilepsi en yaygın kronik nörolojik hastalıklardan biridir. Genel populasyon için prevalansı %0,5-1 dir. Yeni tanı alan epilepsi hastalarının yaklaşık %30'u ilaca direnç göstermektedir (114). Temporal lob epilepsisi (TLE) fokal refraktör epilepsinin en sık görülen tipidir ve lokalizasyona bağlı epilepsilerin üçte ikisini oluşturur (Wieser and ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy 2004).

Mezial Temporal Lob Epilepsisi (MTLE) limbik yapılarda epileptojenik anormalliklerle seyreden bir sendrom olarak tanımlanmaktadır (13,30,94,95). Nöbet sonrasında özellikle hipokampusta nöronal hücre kaybı, nöroeneziste artış, aksonal filizlenme ve reaktif gliosis gelişmektedir.

Temporal lob epilepsi (TLE) hastalarının hipokampal hücre yoğunluğunun kontrol örneklerle ve ekstra-hipokampal odaklı epilepsi hastalarına göre daha az olması, HS ve TLE arasında bir ilişki olduğu düşüncesini desteklemektedir. İlaça dirençli TLE hastalarında hasarlı hipokampal yapının cerrahi girişimle eksizyonu sonucunda hastalarda nöbetlerin azaldığı ya da ortadan kalktığı görülmektedir (108,114).

HS ve epilepsi ilişkisinin aydınlatılmasında en büyük katkı deneysel hayvan modelleridir. Yapılan çalışmalarda hipokampustaki ağır nöron kaybının sinaptik reorganizasyon ve sinyal iletiminde değişimlere neden olduğu ve beraberinde epileptik nöbetleri getirdiği öne sürülmektedir (105).

TLE neden olan moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Glutamatla oluşan yaygın sinaptik uyarılma sonucu iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri ile etkileşim TLE patofizyolojisinde önemli proses olarak kabul edilmektedir. TLE hastalarından alınan hipokampal rezeksiyon materyalinde AMPA, NMDA ve Kainat reseptörlerindeki değişiklikler gösterilmiştir. TLE'de metabotropik glutamat reseptör (mGluR) ekspresyonunu gösteren bilgiler son derece kısıtlıdır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda hipokampal grup I mGluR reseptörlerinin (mGluR1 ve mGluR5) epileptogenezde rolü olduğu gösterilmiştir. Literatürde TLE'de grup I mGluR ekspresyonunu araştıran yalnızca iki çalışma vardır. Bu çalışmalarda cerrahi rezeksiyon materyalleri incelenmiştir. Modülatör etkileri bulunan ve beyinde yaygın olarak eksprese edilen grup I mGluR reseptörlerinin epilepsi etyogenezindeki

rolü daha iyi anlaşılmıştır. Bu reseptörler epilepsi tedavisinde potansiyel hedef olarak görülmektedir.

Bu çalışmanın amacı intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu ile epilepsi modeli oluşturmaktır. Bu modelde grup I mGluR ekspresyonu ve levetirasetamın bu ekspresyon üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışma TLE etyopatogenezinin daha iyi anlaşılması ve tedavide kullanılacak ilaçların test edilmesine katkı sağlayacaktır.

Glutamat santral sinir sistemindeki (SSS) major eksitatör nörotransmitterdir. Etkisini hem iyonotropik hem de metabotropik glutamat reseptörlerini uyararak gösterir. Bu reseptörlerin selektif ligandlarının (kompetitif agonist ve antagonistleri, pozitif ve negatif modülatörleri) bulunması glutamat reseptörlerinin fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli rol oynamaktadır.

Metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR) iktal deşarjların başlamasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. mGluR'ların yapısal özelliklerinin bilinmesi sentetik bileşenlerin bu reseptörlere etki ederek nöbet kontrolünde alternatif olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (21). Wong ve ark. çalışmalarında mGluR'ların iktal deşarjların başlamasında rol aldığını göstermişlerdir. Bu reseptörler normal beyin dokusunun da iktal senkronize deşarlara katılmasına neden olmaktadır (21). mGluR sentetik bileşenlerinin terapötik amaçlı kullanımının kan beyin bariyerini rahat geçebilmek gibi avantajları vardır (57).

Grup I metabotropik glutamat reseptörleri beyinde özellikle hipokampusun CA3 bölgesinde daha yaygındır. İnsan serebral korteksinden alınan spesimenlerde mGluR1a elektron mikroskopu ve immunohistokimya yöntemleriyle incelenmiştir. Bu çalışma sonucu reseptörlerin piramidal nöronların cisminde çok az sayıda, dendritlerinde ise yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. mGluR5'de aynı özellikleri taşıdığı bildirilmiştir. Grup I mGluR agonistleri uzun süreli depolarizasyona neden olmakta ve prokonvülzan etki göstermektedirler (58,59). Grup I mGluR antagonistlerinin ise deneysel epilepsi modellerinde antikonvülzan etki gösterdiği izlenmiştir (60,61).

İnsan temporal lob epilepsisi ve sıçanlarda oluşturulan deneysel epilepsi modellerinde hipokampal uyarılma mekanizması halen anlaşılamamıştır (68). Geçerli olan hipoteze göre hipokampustaki eksitatör ve inhibitör nörotransmitterler arasındaki

dengesizlik nöbet eşiğini düşmesine neden olmaktadır. Bir inhibitör nörotransmitter sistemi olan GABA_A'nın etkileri üzerine yapılmış çok sayıda insan ve deneysel hayvan çalışması mevcuttur (69,70,71). İnsan temporal lob epilepsisinde (TLE) mGluR'ların rolü hakkındaki bilgiler oldukça kısıtlıdır (26). Grup I mGluR'ların uyarılmasıyla oluşan inositol trifosfat hidroksilasyonu sonucu intraselüler Ca²⁺ salınarak eksitatör membran depolarizasyonu gelişmektedir (25). Farklı mGluR'ların uyarılmasının TLE patogeneze etkisi olabileceği düşüncesiyle kronik refraktör epilepsi tedavisinde bu reseptörler hedef olarak görülmüştür.

Merlin ve Wong, grup I metabotropik glutamat reseptör agonistlerinin pikrotoksinle indüklenen kısa süreli interiktal uyarıları uzun süreli deşarjlara dönüştürdüğünü bildirmiştir. Grup I mGluR selektif agonistleri tarafından oluşturulan bu deşarjlar, agonist ortadan kaldırıldıktan sonra da saatlerce devam etmektedir. Agonist etkisine maruz kaldıktan sonra oluşan kalıcı deşarjlar grup I mGluR antagonistleri tarafından geçici olarak engellenmektedir. Sonuçta epileptiform aktivitenin; grup I mGluR'ların glutamatla endojen aktivasyonu ile oluştuğu fikrini desteklemektedir. Buradan yola çıkarak grup I mGluR'ların kendisini indüklemeye özelliğinin epileptogenezin indüksiyonuna neden olduğu fikri ileri sürülmüştür. Daha sonra bu olayların iyonotropik reseptörlerden bağımsız olduğu anlaşılmıştır. mGluR 5'in nöbetlerin indüksiyonunda, mGluR 1'in ise nöbetlerin uzamasında kritik rol aldığı düşünülmektedir.

Rutecki ve ark. göre, grup I mGluR uyarılmasıyla ikinci haberci kaskadı aktive olmakta, bunun sonucunda *in vivo* nöbetler ve *in vitro* epileptiform deşarjlar ortaya çıkmaktadır. Grup I mGluR spesifik agonistleri tarafından oluşturulan iktal deşarjlar; yüksek eşikli L-tipi Ca kanallarının blokajı ile baskılanmaktadır.

Akbar ve ark. oluşturduğu "amigdala-kindled" epilepsi modelinde, deney sonrası 1. gün, 7. gün ve 28. gün sonunda sakrifiye edilen sıçanların hipokampuslarında ilginç bulgulara rastlamışlardır. Bir gün sonra sakrifiye edilen deneklerin bilateral olarak dentat giruslarında mGluR 1 de artış izlenmiştir. Yine deneklerde bilateral CA3'te ve tek taraflı olarak CA4'te mGluR 1 artışı görülmüştür. 7. gün sonunda sakrifiye edilen deneklerin hipokampuslarında bu değişikliklerin bazal seviyelere döndüğü görülmüştür. 28 gün sonra sakrifiye edilen deneklerde ise sadece dentat girusta tek taraflı olarak mGluR 1 de artış izlenmiştir. Her üç

grupta mGluR 5'te ise CA4 ve CA1 bölgesinde bilateral, DG ve CA3'te tek taraflı olarak azalma izlenmiştir.

Chapman ve ark. DBA/2 ve letarjik farelerde mGluR 5 selektif agonisti CHPG ((R,S)-2-chloro-5-hydroxyphenylglycine) ile indüklenen klonik nöbet oluşturarak mGluR 5'in selektif antagonistleri olan MPEP (2-methyl-6-phenylethynyl-pyridine) ve SİB 1893 ((E)-6-methyl-2-styryl-pyridine)'ün etkilerini araştırmışlardır. mGluR 5 reseptörlerinin aktivasyonu sonucu oluşan epileptik aktivitenin mGluR 5 selektif antagonistlerinin küçük dozlarında bile nöbetleri engellediği gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak mGluR antagonistlerinin kullanılmasının epilepsi tedavisinde alternatif olabileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir.

Notenboom ve ark. otopsi spesimenlerinde, HS olmayan TLE hastalarından ve HS ile seyreden TLE hastalarından aldıkları örneklerde grup I mGluR ekspresyonunu incelemişlerdir. TLE hastalarının hipokampuslarında non-epileptik gruba kıyasla göreceli olarak mGluR 5 ekspresyonu arttığını göstermişlerdir. mGluR 5 ekspresyonunun hipokampal özgün nöronlarda (özellikle piramidal ve granül hücrelerinde) ve dentat girus moleküler tabakasında belirgin arttığını izlemişlerdir. Her üç gruptan alınan hipokampus örneklerinde mGluR 1 ekspresyonunda belirgin değişiklik izlenmemiştir. mGluR1'in hipokampus örneklerinde stratum oriens ve hilustaki internöronların ve özgün nöronların soma ve proksimal dendritlerinde yerleştiğini göstermişlerdir (21,22,25,28).

Notenboom ve ark. çalışmalarında teknik zorluklara rağmen mGluR 1 antikollarının özgün nöronlarda boyanma özelliğinin CA3'te daha yoğun ve CA1'de daha zayıf olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar mGluR1'in hipokampal özgün nöronlarda piramidal hücre fonksiyonlarını düzenlediği fikrini desteklemiştir (25).

Notenboom ve ark. çalışmasında mGluR 1 boyanma paternini non-HS grubu, HS grubu ve otopsi grubunda benzer bulmuşlardır. Beklenildiği gibi HS grubunda hipokampal yapıda skleroza bağlı değişiklikler mGluR 1 boyanma paterninde göreceli değişiklikler göstermektedir (21,22,25,28). Patolojik değişikliklere bağlı mGluR 1 immunreaktif hücre sayında azalma izlenmiştir (CA1 ve CA4'te belirgindir). Tang ve ark. (2001) çalışmasında ve Blümcke ve ark. (2000) çalışmasına benzer şekilde TLE hastalarının dentat girus moleküler tabakasında mGluR1 immunreaktivitesinde değişiklik tespit etmemişlerdir. mGluR5 immunreaktivitesinde ise artış izlenmiştir.

mGluR5 immunreaktifliği kontrol grubundaki dendritlerde daha belirgindir (14,107), TLE grubunda ise hipokampal özgün nöronlarda ve glial hücrelerde artış izlenmiştir. TLE grubunda otopsi grubuna kıyasla mGluR5 immunreaktifliği piramidal ve granüler hücrelerin soma ve dendritlerinde daha belirgindir. mGluR5 immunreaktifliğindeki artış santral sinir sisteminin diğer bölgelerinde de izlenmiştir (107). mGluR5 immunreaktifliğindeki artış otopsi kontrol grubunda hafif, non-HS grubunda göreceli olarak artmış ve HS grubunda ise belirgin olarak artmıştır. İmmunblot tetkiklerinde non-HS grubundaki artış desteklense de, HS grubunda bu artış desteklenmemiştir. HS grubunda bu sonuç nöronal hücre kaybı ile maskelenmiştir.

Notenboom ve ark. mGluR5 immunreaktifliğinin ilaca dirençli TLE hastalarının hipokampal nöronlarında artış gösterdiğini belirtmişlerdir. mGluR5 immunreaktifliği non-HS ve HS gruplarındaki dentat girus dış moleküler tabakasında artış göstermiştir. Non-HS grubunun dentat girus iç moleküler tabakasında HS grubuna kıyasla mGluR5 immunreaktifliğinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki hasta grubunun uzun süreli nöbet hikayesi olduğu dikkate alındığında bu azalmanın nöbetlerle ilişkili olmadığı, hipokampal patolojiye bağlı olduğu tespit edilmiştir. HS'da yaygın sinaptik reorganizasyon iç moleküler tabakadaki mossy liflerinin filizlenmesine bağlı olarak oluşmaktadır (107).

Hipokampal nöronlardaki ve dentat girus moleküler tabakasındaki mGluR5 immunreaktifliğindeki artış Tang ve ark. (2001) çalışmasında da gösterilmiştir. Tang ve ark. mGluR5 lokalizasyonu ile ilgili TLE hastalarındaki çalışmalarında mGluR5'in dentat girus moleküler tabakasında ve hipokampal CA1 bölgesinde pre-sinaptik ve post-sinaptik dağılım gösterdiğini tespit etmişlerdir. Fakat bu çalışmada non-HS ve otopsi kontrol grubu incelenmemiştir. Blümcke ve ark. (2000) HS ile seyreden TLE hastalarında mGluR5 immunreaktifliğinin non-epileptik peritümöral hipokampal spesimenlere göre azalmış olduğunu göstermişlerdir.

HS grubunda mGluR5 immunreaktifliğinin glial hücrelerde de arttığı gözlemlenmiştir. Hipokampal reaktif astrositlerdeki mGluR5 ekspresyonunun artışı KA modelinde ve elektrikle indüklenen status epileptikus modelinde gösterilmiştir. Glial hücrelerdeki mGluR5 ekspresyon artışı hem epileptik gliotik dokularda (99), hemde non-epileptik dokularda (14,107) izlenmiştir.

İnsan epileptik dokularında yapılan çalışmaların bazı zorlukları vardır. Bu hastalardan yalnız bir kısmı cerrahi olarak tedavi edilirler. Bu hastalar cerrahi tedaviye kadar uzun süre nöbet geçirmekte ve antiepileptik ilaç tedavisi almaktadırlar. Bu hastaların mGluR5 ekspresyonundaki artışın tekrarlayan nöbetler sonucu geliştiğini veya nöbetlerin nedeni olduğunu tespit etmek oldukça zordur mGluR5 ekspresyonundaki artışın nöbetler sonucu olduğu düşünülmektedir. AEİ kullanımı TLE grupları arasında fark oluşturmadığı için bu artışın ilaç kullanımına bağlanması mümkün değildir. Hasara uğramamış dokularda mGluR5 artışı hipokampusta hipereksitabiliteye neden olmaktadır. Bu artışın hipereksitabilite ve nörotoksisiteye karşı savunma mekanizması olması alternatif bir fikir olarak ifade edilmiştir (107).

LEV'in etki mekanizması diğer AEİ'den farklıdır. Standart epilepsi modellerinde etkisi gösterilemeyen LEV'in "kindling model"de etkin olduğu gösterilmiştir (34,60). LEV'in sinaptik vezikül proteini 2A'ya (SV2A) bağlanarak etki ettiği hipotezi ileri sürülmüştür. SV2A proteinine bağlanan LEV'in sinaptik vezikülden glutamat salınımını engellediği düşünülmektedir.

Çalışmalar TLE'nin LEV'e frontal lob epilepsisinden daha iyi yanıt verdiğini göstermiştir (145). Epilepsi cerrahisiyle nöbetleri tamamen kontrol edilemeyen hastaların, ameliyat edilmeyen hastalara kıyasla LEV'e daha iyi yanıt verdiği gösterilmiştir (146). Epilepsi cerrahisiyle kontrol altına alınamayan hastaların uzun dönem takip sonuçlarında yeni başlanmış LEV pozitif prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (145,146,147).

TLE modelleri genellikle fokal epileptogenezis ve iktogenezisin altta yatan nedenlerini araştırmak için kullanılır. Bizim çalışmamızda nöropatolojik bulgulara dayanan TLE modeli kullanılmıştır. Dorsal hipokampusu unilateral olarak enjekte edilen Kainik asit (KA) 24 saat içerisinde sonlanan akut status epileptikusa neden olmaktadır. KA gibi prokonvulzif ajanların intraperitoneal olarak uygulanması kemirgenlerde oluşturulan TLE modelinin en sık kullanılan şeklidir (145,146,147,148). Sistemik enjeksiyon sonrası oluşturulan bu modeller günümüzde çok eleştirilmektedir. Bu modellerin insan TLE'ne uygun olmayan bilateral hipokampal değişiklik, temporal lob dışı yaygın beyin hasarı ve jeneralize tonik-klonik nöbet oluşturma gibi etkileri vardır (105). Sıçanların dorsal hipokampusuna tek seferde enjekte edilen KA modeli, insan TLE'de görülen değişiklikleri benzer şekilde taklit eden bir modeldir

(147,148). Dorsal hipokampusa KA enjekte edilerek oluşturulan TLE modelinde hipokampal sklerozu taklit eden histopatolojik değişiklikler ve kronik rekürren parsiyel nöbetler 2 haftalık latent dönem sonrası gelişmektedir (147,148,149,150). Sistemik KA enjeksiyonu ile oluşturulan TLE modelinin tersine, lokal intrahipokampal KA modelindeki yapısal değişiklikler tek taraflıdır ve kronik fazda oluşan fokal parsiyel nöbetler KA enjekte edilen hipokampustan kaynaklanır.

Sonuç olarak iyi karakterize edilmiş hayvan modelleri; epileptogenezisin altında yatan moleküler ve hücresel değişikliklerin aydınlatılmasına, epilepsinin tedavisinde alternatif tedavi edici yaklaşımların belirlenmesine olanak sağlayabilmektedir. Dolayısıyla deneysel çalışmalarda, insandaki epilepsi hastalığının patofizyolojik temelini en iyi derecede yansıtabilen uygun modelin seçimi son derece önemlidir.

İlaça dirençli epilepsi hastaları klasik AEİ'lara yanıt vermemektedir. Bu ilaçlar genellikle iyon kanallarını ve postsinaptik reseptörleri hedef almaktadır. Glutamatın etkili olduğu glutamaterjik yolağın araştırmalarda hedef alınmasının epilepsi etyopatogenezinin anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. G-proteinine bağlanarak etki eden metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) sinapslardaki glutamat regülasyonunda önemli rol almaktadır. Glutamatın santral sinir sisteminde dağılımı dikkate alındığında mGluR'ların hem presinaptik glutamat salınımında, hem de postsinaptik nöronal yanıt üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir.

İyon kanalı ve postsinaptik reseptörler üzerinden etki eden klasik AEİ'lara bazı epilepsi hastaları direnç göstermektedir. Bununla birlikte AEİ'nin zararlı yan etkilerinin olması epilepsi tedavisinde yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasını gerektirmektedir. mGluR'lar glutamaterjik sinapslarda hızlı sinaptik ilettime etki eden iyonotropik glutamat reseptörlerinin aksine devam eden aktiviteyi modüle etmektedir. Ağırlıklı olarak presinaptik yerleşmiş grup I mGluR'lar sinaptik glutamat salınımı üzerine etkilidir. mGluR'ların modülatör etkileri SSS'de glutamaterjik iletiyi iGluR'dan bağımsız şekilde düzenleyebilmektedir. Bu regülasyon mGluR'ların sinaptik dağılımına göre eksitator veya inhibitör olabilmektedir.

Epilepsinin yaygın sinaptik glutamaterjik iletim bozukluğu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (59,61,125). Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel epilepsi modellerinde glutamat ve iGluR agonistlerinin verilmesinin epileptiform aktiviteye neden olduğu

gösterilmiştir (66,125,148,149). Epilepsi hastalarında olduğu gibi deneysel hayvan modellerinde de glutamaterjik aktivite artışı izlenmiştir (61,66). Epileptik bozukluklarda glutamaterjik iletinin önemi dikkate alınarak, epilepsi tedavisinde iGluR'i hedef alan çok sayıda çalışma yapılmış ve iGluR antagonistlerinin birçok deneysel epilepsi modellerinde nöbetleri engellediği gösterilmiştir (59,61,66). Fakat bu ilaçlarla yapılan klinik çalışmalarda motor ve kognitif bozuklukları kapsayan çok sayıda yan etki gözlemlenmiştir (59,61,66). mGluR'ların bulunmasıyla epilepsi tedavisinde glutamaterjik yolak üzerine hedeflenen çalışmalar yeniden canlanmıştır. iGluR'nin aksine mGluR'lar ani etki göstermezler ve her sinaptik uyarı sonucu etkileri görülmez. mGluR'lar modülatör rol oynayarak genelde aktif zon dışında yer almaktadırlar (138,139). Ayrıca mGluR'lar G-proteini ile ikinci haberci üzerinden uzun süren etkiler oluşturmaktadır (138).

Çalışmamızdaki Sham ve Kontrol grubu deneklerde DG, CA1, CA2 ve CA3'te hipokampal skleroz izlenmemiştir. Entorinal kortekste iskemik değişiklikler izlenmemiştir. mGluR1 ve mGluR5 immunreaktivitesinde enjeksiyon yapılmayan bölgelerle kıyaslandığında artış izlenmemiştir. Boyanma paterni bütün bölgelerde eşit dağılmıştır.

Kainik asit enjekte edilen grupta, enjeksiyon yapılmış tarafta hipokampal skleroz oluşmuştur. CA2 korunmuştur. CA1 kısmen korunmuş, CA3'te ise ağır hücresel kayıp izlenmiştir. Dentat girus korunmuştur. mGluR1 ve mGluR5 immunreaktivitesinde karşı tarafla kıyaslandığında DG'ta belirgin fark izlenmemiştir. CA3 bölgesinde yoğun piramidal hücre kaybı izlenmiş olup boyanmada azalma izlenmiştir. Beynin diğer bölgeleri ile kıyaslandığında mGluR1 ve mGluR5 boyanma paterninde değişiklik izlenmemiştir. Deneklerin hepsinde entorinal kortekste ağır iskemik değişiklikler izlenmiş olup, yoğun hücre kaybı görülmüştür.

Kainik asit enjekte edilerek 2 hafta boyunca İP yolla LEV tedavisi uygulanan deneklerde enjeksiyon bölgesinde hipokampal skleroz oluşmuştur. Dentat girus enjeksiyon yapılmayan tarafla kıyaslandığında belirgin değişikliğe maruz kalmamıştır. CA3'te ağır hücre kaybı izlenmiştir. CA1 yer yer korunmuştur. CA2 tamamen korunmuştur. Kainik asit grubu ile kıyaslandığında deneklerin yarısında entorinal korteks korunmuştur. Beynin diğer bölgeleri ile kıyaslandığında mGluR1 ve mGluR5 immunreaktivitesinde değişiklik izlenmemiştir. Hipokampal skleroz oluşmuş bölgede özellikle de, CA3'te boyanma paterninde azalma izlenmiştir.

Çalışmamızda histopatolojik olarak KA enjekte edilen deneklerin hepsinde hipokampal skleroz olduğu görüldü. KA+LEV enjeksiyonu yapılan grupta sadece KA enjeksiyonu yapılmış gruba kıyasla CA1'de skleroz dercesinde semikantitatif olarak azalma kaydedildi. Ayrıca levetirasetam verilen deneklerin yarısında entorinal korteks korunmuş olup, yayınlarda da bahsedildiği gibi LEV'in nöroprotektif etkisini desteklemektedir. Bu etkiyi nöbetleri azaltarak hipoksik hasarın önüne geçmek suretiyle yaptığını düşünmekteyiz. Grup I mGluR ekspresyonu nöron kaybına bağlı olarak segmental bir farklılık sergilemedi.

Daha önce yapılan benzer çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Akbar ve ark. dentat girusta bilateral, CA3 ve CA4'te tek taraflı olarak mGluR1 immunreaktivitesinde artış olduğunu izlemişlerdir. mGluR5 immunreaktivitesinde bilateral olarak CA4 ve CA1'de, DG ve CA3'te ise tek taraflı azalma olduğunu ifade etmişlerdir. Notenboom ve ark. TLE hastalarında hipokampal piramidal ve granüler hücrelerde mGluR5 immunreaktifliğinde artış izlemişlerdir. Dentat girusta boyanmanın daha belirgin olduğunu ifade etmişlerdir. Diğer çalışmadan farklı olarak mGluR1 boyanmasında normal dokulara göre değişikliğin olmadığını belirtmişlerdir. mGluR1 boyanma paterni CA3'te daha belirgin olmak üzere CA1'de de yoğun olduğunu vurgulamışlardır. Tang ve ark. DG mGluR1 immunreaktivitesinde değişiklik olmadığını, mGluR5'te ise artış olduğunu belirtmiştir. Blümcke HS'lu TLE hastalarında mGluR5 boyanmasında azalma olduğunu ifade etmiştir. Aynı zamanda mGluR5'in glial hücrelerde de olduğunu ifade etmiştir.

TLE'de grup I mGluR ekspresyonunu inceleyen çalışma sayısı oldukça sınırlı sayıdadır. Bu çalışmalarda bir biri ile çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bizim çalışmamızın sonucunda hipokampal skleroz gelişen bölgede yoğun hücre kaybına bağlı olduğunu düşündüğümüz grup I mGluR immunreaktivitesinde azalma izlenmiştir. Enjeksiyon yapılan tarafla sağlam tarafın dentat giruslarında ekspresyon farkının olmadığı izlenmiştir. Beynin diğer bölgeleri ile kıyaslandığında mGluR1 ve mGluR5 ekspresyonunda belirgin değişiklik izlenmemiştir. mGluR1 boyanma paternine göre diğer çalışmalara benzer şekilde hücre cisimlerinde, mGluR5 ise denritlerde yoğun izlenmiştir.

LEV'in grup I mGluR ekspresyonu üzerine olumlu veya olumsuz etkisi izlenmedi. mGluR5'in epileptogenezin aydlatılması ve yeni antiepileptik ilaçlar için hedef olması düşüncesiye bu araştırmalar yapılmaktadır. Alınan sonuçlarda mGluR1 ve mGluR5

ekspresyonunda değişiklik izlenmese de çalışmanın daha iyi şartlarda devam ettirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel epilepsi modelinde:

- 1) İntrahipokampal KA enjeksiyonu sonrasında deneklerin tümünde histopatolojik olarak hipokampal skleroz olduğu görüldü. KA enjeksiyon modeli başarı ile gerçekleştirildi.
- 2) Deneklerin enjeksiyon sonrası ilk gün jeneralize nöbet geçirdikleri izlendi. Fakat uygun koşullar sağlanamadığı için denekler nöbet açısından monitorize edilemedi.
- 3) Oluşturulan lezyon enjeksiyon tarafına sınırlı kaldı. Histopatolojik olarak beyin diğer bölgelerinde iskemik veya sklerotik değişiklikler izlenilmedi.
- 4) Histopatolojik olarak hipokampustaki skleroz ağırlıklı olarak CA3'te görülsede CA1'de de kısmen nöron kaybı izlendi. Dentat girus ve CA2'nin korunduğu görüldü.
- 5) İHK'sal boyanma paternine göre mGluR1'lerin granüler ve piramidal hücre somatodendritik boyanma gösterdiği tespit edildi. mGluR5'lerin ise granüler ve piramidal hücre dendritlerinde boyanma gösterdiği izlendi.
- 6) KA enjeksiyonu sonrası İHK'sal ve Western blot tekniği ile incelemede grup I mGluR ekspresyonunda artış izlenmedi. Enjeksiyon bölgesinde hücre kaybına bağlı olarak hipokampusta grup I mGluR ekspresyonunda azalma izlendi. Beynin diğer bölgelerinde grup I mGluR ekspresyonunda artış izlenilmedi.
- 7) Levetirasetam KA enjekte edilen deneklerde grup I mGluR ekspresyonuna etki göstermedi. Fakat entorinal kortekste akut iskemik değişiklikleri önlediği gösterildi. Levetirasetamın bu nöroprotektif etkisini nöbetlerin yol açtığı hipoksik hasarın oluşmasını engelleyerek gösterdiğini düşünmekteyiz.

Yaptığımız bu çalışmada grup I mGluR deneysel epilepsi modelinde ekspresyonunu incelemiş olduk. Epilepsi etyolojisindeki grup I mGluR rolünün aydınlatılmasına katkıda bulunduğumuzu düşünüyoruz.

Çalışmanın daha geniş denek grubunda ve nöbet monitorizasyonu eşliğinde devam ettirilmesinin önemli olduğu kanaatindeyiz.

7. REFERANS

1. Eadie M. Epilepsy-from the Sakikku to hughlings Jackson. J Clin Neurosci. 1995 Apr;2(2):156-62.
2. Téllez-Zenteno JF, Hernández-Ronquillo L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res Treat. 2012;2012:630853. Epub 2011 Dec 29.
3. Bladin PF. "The Epilepsies": Kinnier Wilson's landmark epileptology. J Clin Neurosci. 2005 Nov;12(8):863-72.
4. Marini H, Costa C, Passaniti M, Esposito M, Campo GM, Ientile R, Adamo EB, Marini R, Calabresi P, Altavilla D, Minutoli L, Pisani F, Squadrito F. Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. Life Sci. 2004 Jan 23;74(10):1253-64.
5. Engelborghs S, D'Hooge R, De Deyn PP. Pathophysiology of epilepsy. Acta Neurol Belg. 2000 Dec;100(4):201-13.
6. de Lanerolle NC, Lee TS, Spencer DD. Histopathology of Human Epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. SourceJasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
7. Korff CM, Scheffer IE. Epilepsy classification: a cycle of evolution and revolution. Curr Opin Neurol. 2013 Apr;26(2):163-7.
8. Engel J Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. Epilepsy Res. 2006 Aug;70 Suppl 1:S5-10. Epub 2006 Jul 5.
9. Epileptic seizures and their classification. A clinical guide to epileptic syndromes and their treatment.
10. The cerebrum. Albert Rethon Jr.
11. Duvernoy HM. The human hippocampus. Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. Springer, Heidelberg.
12. Buge Öz, Figen Söylemezoğlu. Epilepsi cerrahisinde patolojik değerlendirme. Epilepsi 2012; 18(Ek1):53-59
13. Jerome Engel, Jr. Natural history of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis
14. Blümcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, von Deimling A, Scheiwe C, Zentner J, Volk B, Romstöck

- J, Stefan H, Hildebrandt M. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2007 Mar;113(3):235-44. Epub 2007 Jan 13.
15. Casillas-Espinosa PM, Powell KL, O'Brien TJ. Regulators of synaptic transmission: roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Epilepsia.* 2012 Dec;53 Suppl 9:41-58. Review.
 16. Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 1999 Mar;89(3):717-29.
 17. Dericioglu N, Saygi S. Ictal scalp EEG findings in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Clin EEG Neurosci.* 2008 Jan;39(1):20-7.
 18. Dericioglu N, Soylemezoglu F, Gursoy-Ozdemir Y, Akalan N, Saygi S, Dalkara T. Cell death and survival mechanisms are concomitantly active in the hippocampus of patients with mesial temporal sclerosis. *Neuroscience.* 2013 May 1;237:56-65. [j.neuroscience.2013.01.050](#). Epub 2013 Feb 4.
 19. Varoglu AO, Saygi S, Acemoglu H, Ciger A. Prognosis of patients with mesial temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res.* 2009 Aug;85(2-3):206-11. [j.eplepsyres.2009.03.001](#). Epub 2009 Apr 3.
 20. Raedt R, Van Dycke A, Van Melkebeke D, De Smedt T, Claeys P, Wyckhuys T, Vonck K, Wadman W, Boon P. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurol Scand.* 2009 May;119(5):293-303.
 21. Ure J, Baudry M, Perassolo M. Metabotropic glutamate receptors and epilepsy. *J Neurol Sci.* 2006 Aug 15;247(1):1-9. Epub 2006 May 11. 21
 22. Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl).* 2005 Apr;179(1):4-29. Epub 2005 Feb 2
 23. Mazarati AM, Baldwin R, Klitgaard H, Matagne A, Wasterlain CG. Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus. *Epilepsy Res.* 2004 Feb;58(2-3):167-74.

24. Oliveira AA, Nogueira CR, Nascimento VS, Aguiar LM, Freitas RM, Sousa FC, Viana GS, FontelesMM. Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: cholinergic muscarinic system involvement.
25. Blümcke I, Becker AJ, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, Waha A, Friedl MG, Kuhn R, Emson P, Elger C, Wiestler OD. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000 Jan;59(1):1-10.
26. Notenboom RG, Hampson DR, Jansen GH, van Rijen PC, van Veelen CW, van Nieuwenhuizen O, de Graan PN. Up-regulation of hippocampal metabotropic glutamate receptor 5 in temporal lobe epilepsy patients. *Brain*. 2006 Jan;129(Pt1):96-107. Epub 2005 Nov 25.
27. Abou-Khalil B. Levetiracetam in the treatment of epilepsy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Jun;4(3):507-23.
28. Pitsch J, Schoch S, Gueler N, Flor PJ, van der Putten H, Becker AJ. Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2007 Jun;26(3):623-33. Epub 2007 Mar 16.
29. Jackson JH. Selected writings Arts and Boeve Nijmegen; Vol. 1; 1996: 94
30. Engel J Jr. Seizures and epilepsy. Philadelphia; F. A. Davis Company, 1989;536
31. Gönül Bambal, Duygu Çakıl, Fatih Ekici. Deneysel epilepsi modelleri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2011; 2 (1): 118-123
32. Carriero G, Arcieri S, Cattalini A, Corsi L, Gnatkovsky V, de Curtis M. A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia*. 2012 Nov;53(11):1917-27. Epub 2012 Sep 21.
33. Murphy BL, Hofacer RD, Faulkner CN, Loepke AW, Danzer SC. Abnormalities of granule cell dendritic structure are a prominent feature of the intrahippocampal kainic acid model of epilepsy despite reduced postinjury neurogenesis. *Epilepsia*. 2012 May;53(5):908-21.
34. Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wülfert E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur J Pharmacol*. 1998 Jul 24;353(2-3):191-206.

35. Zheng Y, Moussally J, Cash SS, Karnam HB, Cole AJ. Intravenous levetiracetam in the rat pilocarpine-induced status epilepticus model: behavioral, physiological and histological studies. *Neuropharmacology*. 2010 Mar-Apr;58(4-5):793-8. j.neuropharm.2009.12.007. Epub 2009 Dec 21.
36. Meehan AL, Yang X, Yuan LL, Rothman SM. Levetiracetam has an activity-dependent effect on inhibitory transmission. *Epilepsia*. 2012 Mar;53(3):469-76. Epub 2012 Jan 31.
37. Margineanu DG, Matagne A, Kaminski RM, Klitgaard H. Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res Bull*. 2008 Nov 25;77(5):282-5. Epub 2008 Aug 21.
38. Glien M, Brandt C, Potschka H, Löscher W. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2002 Apr;43(4):350-7.
39. Kolber BJ, Montana MC, Carrasquillo Y, Xu J, Heinemann SF, Muglia LJ, Gereau RW 4th. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 in the amygdala modulates pain-like behavior. *J Neurosci*. 2010 Jun 16;30(24):8203-13.
40. Gibbs JE, Walker MC, Cock HR. Levetiracetam: antiepileptic properties and protective effects on mitochondrial dysfunction in experimental status epilepticus. *Epilepsia*. 2006 Mar;47(3):469-78.
41. Sommer W. Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1880; 10:631-675
42. Bouchet C. De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. Recherche sur la nature et siège de ces deux maladies. *Arch Gen Med* 1825;9:510-542
43. Bratz E: Ammonshornbefunde bei Epileptikern. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1899;32:820-835
44. de Lanerolle NC, Kim JH, Williamson A, Spencer SS, Zaveri HP, Eid T, Spencer DD. A Retrospective Analysis of Hippocampal Pathology in Human Temporal Lobe Epilepsy: Evidence for Distinctive Patient Subcategories. *Epilepsia* 2003;44:677-687
45. Kim JH, Guimaraes PO, Shen M-Y, Masukawa LM, Spencer DD. Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas. *Acta Neuropathol* 1990;80:41-45
46. Stauder KH. Epilepsie und schlafenlappen. *Arch Psychiatr* 1935;104:181-212

47. Falconer MA. The significance of mesial temporal sclerosis (Ammon's horn sclerosis) in epilepsy. *Guy's Hosp Reports* 1968;117:1-12
48. Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia* 1984;25:721-728
49. Bower SPC, Kilpatrick CJ, Vogrin SJ, Morris K, Cook MJ. Degree of hippocampal atrophy is not related to a history of febrile seizures in patients with proved hippocampal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2000;69:733-738
50. Margerison JH, Corsellis JAN. Epilepsy and the temporal lobes. *Brain* 1966;89:499-530
51. Bruton CJ. The neuropathology of Temporal Lobe Epilepsy. Oxford; Oxford University Press; 1988.
52. de Lanerolle NC, Kim JH, Brines ML. Cellular and molecular alterations in partial epilepsy. *Clin Neurosci* 1994;2:64-81
53. Laufs H. Functional imaging of seizures and epilepsy: evolution from zones to networks. *Curr Opin Neurol* 2012;25:194-200
54. Gotman J. Epileptic networks studied with EEG-MRI. *Epilepsia* 2008;49:45-51
55. Ferrie CD. Idiopathic generalized epilepsies imitating focal epilepsies. *Epilepsia* 2005;46:91-95
56. Oguni H. Symptomatic epilepsies imitating idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* 2005;46:84-90
57. Bond A, Monn J, Lodge D. A novel orally active Group II metabotropic glutamate receptor agonist: LY354740. *Neuroreport* 1997;38:1463-5
58. Tizzano JP, Griffey KJ, Schoepp DD. Induction or protection of limbic seizures in mice by mGluR subtype selective agonists. *Neuropharmacology* 1995;34:1063-7
59. Ghauri M, Chapman AG, Meldrum BS. Convulsant and anticonvulsant action of agonists and antagonists of group III mGluRs. *NeuroReport* 1996;7:1469-74
60. Thomsen C, Klitgaard H, Sheardown M, Jackson HC, Eskesen K, Jacobsen P. (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. *J Neurochem* 1994;62:2492-5

61. Chapman AG, Yip PK, Yap JS, Quinn LP, Tang E, Harris JR. Anticonvulsant action of two antagonists at mGluR1: KY367385 ((+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine) and (RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid (AIDA). *Eur J Pharmacol* 1999;368:17-24
62. Merlin LR, Wong RS. Role of Group I metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities in vitro. *J Neurophysiol* 1997;78:539-44
63. Merlin L. Group I mGluR-mediated silent induction of long-lasting epileptiform discharges. *J Neurophysiol* 1999;82:1078-81
64. Merlin L. Differential roles for mGluR1 and mGluR5 in the persistent prolongation of epileptiform bursts. *J Neurophysiol* 2002;87:621-5
65. Rutecki PA, Vielhuber K, Sayin U. Mechanisms of ictal epileptiform activity produced by group I metabotropic glutamate activation in hippocampus. *Epilepsia* 2000;41:162
66. Chapman AG, Nanan K, Williams M, Meldrum BS. 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 (SIB 1893). *Neuropharmacology* 2000;39:1567-74
67. Notenboom RGE. Upregulation of metabotropic glutamate receptor 5 immunoreactivity in the hippocampus of patient with intractable temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2001;42:118
68. Blümcke I, Beck H, Wiestler OD. Molecular neuropathology of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1999;36:205-23
69. Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin Rikhter TY, Coulter DA. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 1998;4:1166-72
70. Nusser Z, Hajos N, Somogyi P, Mody I. Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 1998;395:172-77
71. Shumate MD, Lin DD, Gibbs JW, Hooloway KL, Coulter DA. GABA(A) receptor function in epileptic human dentate granule cells: Comparison to epileptic and control rat. *Epilepsy Res* 1998;32:114-28
72. Garcia ME, Garcia Morales I, Matias Guiu J. Experimental models in epilepsy. *Neurologia* 2010;25:181-8

73. Galanopoulou AS, Moshe SL. The epileptic hypothesis: developmentally related arguments based on animal models. *Epilepsia* 2009;50:37-42
74. Contreras D. Experimental models in epilepsy. Elsevier Academic Press, USA. *Revista de Neurologia* 2000;30:370-376
75. Fisher RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Rev* 1989;14:245-278
76. McCandless DW, FineSmith RB. Chemically induced models of seizures. *Animal models of Neurological Disease, II Metabolic Encephalopathies and the Epilepsies*. 1992:Vol22
77. Onat F. Epilepsinin deneysel modelleri. *Epilepsi. Nobel Tıp Kitabevleri* 2008;4:37-43
78. Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 2004;73:1-60
79. Bethmann K, Fritschy JM, Brandt C, Löscher W. Antiepileptic drug resistant rats differ from drug responsive rats in GABA A receptor subunit expression in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2008;31:169-187
80. Majores M, Eils J, Wiestler OD, Becker AJ. Molecular profiling of temporal lobe epilepsy: comparison of data human tissue samples and animal models. *Epilepsy Res* 2004;60:173-178
81. Kim JH. Pathology of seizure disorders. *Neuroimag Clinics of North Am* 1995;5:527-545
82. Gloor P. Mesial temporal sclerosis: Historical background and an overview from a modern perspective. In: Luders H, editor. *EpilepsySurgery*. New York: Raven Press;1991.p.6889-6903
83. Engel J, Brown WJ, Kuhl DE, Phelps ME, Mazziota JC, Crandall PH. Pathological findings underlying focal temporal lobe hypermetabolism in partial epilepsy. *Ann Neurol* 1982;12:518-528
84. Djamshidian A, Grassl R, Seltenhammer M, Czech T, Baumgartner C, Schmidbauer M, Ulrich W, Zimprich F. Altered expression of voltage-dependent calcium channel $\alpha 1$ subunits in temporal lobe epilepsy with Ammon's horn sclerosis. *Neuroscience* 2002;111:57-69
85. Bordey A, Spencer DD. Distinct electrophysiological alterations in dentate gyrus versus CA1 glial cells from epileptic humans with temporal lobe sclerosis. *Epilepsy Res* 2004;59:107-122
86. Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Pavada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 1989;26:321-330

87. M.C. Picot, M. Baldy-Moulinier, J.P. Daures, P. Dujols and A. Crespel. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. *Epilepsia* 2008;49:1230-1238
88. T. Tomson. Mortality in epilepsy. *Journal of Neurology* 2000;247:15-21
89. Allen K. M, Walsh C. A. Genes that regulate neuronal migration in the cerebral cortex. *Epilepsy Res* 1999;36:143-154
90. Berkovic S. F, McIntosh A, Howell R. A, Mitchell A, Sheffield L. J. Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann Neurol* 1996;40: 227-235
91. DeDeyn P. P, Marescau B, MacDonald R. L. Epilepsy and the GABA hypothesis. A brief review and some examples. *Acta Neurol Bel* 1990;90:65-81
92. Wyler AR, Dohan FC, Schweitzer JB, Berry AD. A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. *J Epilepsy* 1992;5:220-5
93. Thom M, Eriksson S, Martinian L, Caboclo LO, McEvoy AW, Duncan JS. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:928-38
94. Engel Jr. J, 1998. Classifications of the International League Against Epilepsy: time for reappraisal. *Epilepsia* 1998;39:1014-1017
95. Engel Jr. J, 2001. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001;42:796-803
96. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1981;22:489-501
97. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989;30:389-399
98. Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K. Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13:271-278
99. Aronica E, van Vliet EA, Mayboroda OA, ZTroost D, Lopes da Silva FH, Gorter JA. Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR⁴ and mGluR5 in

- reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2000;12:2333-44
100. Bordi F, Ugolini A. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain disease. *Prog Neurobiol* 1999;59:55-79
 101. Cartmell J, Schoepp DD. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *Neurochem* 2000;75:889-907
 102. Bruno V, Copani A, Knopfel T, Kuhn R, Casabona G, Dell'Albani P, Condorelli DF, Nicoletti F. Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology* 1995;20:6413-6420
 103. Sayin U, Rutecki PA. Group I metabotropic glutamate receptor activation produces prolonged epileptiform neuronal synchronization and alters evoked population responses in the hippocampus. *Epilepsy Res* 2003;53:186-195
 104. Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 2004;73:1-60
 105. Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol* 2005;328:721-722
 106. Alexander GM, Godwin DW. Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res.* 2006 Sep;71(1):1-22
 107. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, Bernasconi N, Bien CG, Cendes F, Coras R, Cross JH, Jacques TS, Kahane P, Mathern GW, Miyata H, Moshé SL, Oz B, Özkara Ç, Perucca E, Sisodiya S, Wiebe S, Spreafico R. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013 Jul;54(7):1315-29.
 108. Olivier A. Temporal resections in the surgical treatment of epilepsy. *Epilepsy Res Suppl.* 1992;5:175-88.
 109. Eliashiv SD, Dewar S, Wainwright I, Engel J Jr, Fried I. Long-term follow-up after temporal lobe resection for lesions associated with chronic seizures. *Neurology*. 1997 May;48(5):1383-8.

110. Akbar MT, Ratray M, Powell JF, Meldrum BS. Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdala-kindled rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Dec 31;43(1-2):105-16.
111. Sagar HJ, Oxbury JM. Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions. *Ann Neurol*. 1987 Sep;22(3):334-40.
112. Duncan JS, Sagar HJ. Seizure characteristics, pathology, and outcome after temporal lobectomy. *Neurology*. 1987 Mar;37(3):405-9.
113. Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Melendez M, Lévesque MF. The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 1995 Jun;21(2):133-47.
114. Abosch A, Bernasconi N, Boling W, Jones-Gotman M, Poulin N, Dubeau F, Andermann F, Olivier A. Factors predictive of suboptimal seizure control following selective amygdalohippocampectomy. *J Neurosurg*. 2002 Nov;97(5):1142-51.
115. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005 Apr;46(4):470-2.
116. Fisher RS, Harding G, Erba G, Barkley GL, Wilkins A; Epilepsy Foundation of America Working Group. Photic- and pattern-induced seizures: a review for the Epilepsy Foundation of America Working Group. *Epilepsia*. 2005 Sep;46(9):1426-41.
117. Luby M, Spencer DD, Kim JH, deLanerolle N, McCarthy G. Hippocampal MRI volumetrics and temporal lobe substrates in medial temporal lobe epilepsy. *Magn Reson Imaging*. 1995;13(8):1065-71.
118. King D, Spencer SS, McCarthy G, Luby M, Spencer DD. Bilateral hippocampal atrophy in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 1995 Sep;36(9):905-10.
119. Jeong SW, Lee SK, Kim KK, Kim H, Kim JY, Chung CK. Prognostic factors in anterior temporal lobe resections for mesial temporal lobe epilepsy: multivariate analysis. *Epilepsia*. 1999 Dec;40(12):1735-9.
120. Winawer MR, Ottman R, Hauser WA, Pedley TA. Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: defining the phenotype. *Neurology*. 2000 Jun 13;54(11):2173-6.

121. Routbort MJ, Bausch SB, McNamara JO. Seizures, cell death, and mossy fiber sprouting in kainic acid-treated organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience*. 1999;94(3):755-65.
122. Schwark WS, Löscher W. Comparison of the anticonvulsant effects of two novel GABA uptake inhibitors and diazepam in amygdaloid kindled rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1985 Jun;329(4):367-71.
123. Löscher W, Schwark WS. Evaluation of different GABA receptor agonists in the kindled amygdala seizure model in rats. *Exp Neurol*. 1985 Aug;89(2):454-60.
124. Sykes CC, Horton RW. Cerebral glutamic acid decarboxylase activity and gamma-aminobutyric acid concentrations in mice susceptible or resistant to audiogenic seizures. *J Neurochem*. 1982 Nov;39(5):1489-91.
125. Chapman AG. Glutamate and epilepsy. *J Nutr*. 2000 Apr;130(4S Suppl):1043S-5S.
126. Moreno A, de Felipe J, García Sola R, Navarro A, Ramón y Cajal S. Neuronal and mixed neuronal glial tumors associated to epilepsy. A heterogeneous and related group of tumours. *Histol Histopathol*. 2001 Apr;16(2):613-22.
127. Marco P, Sola RG, Ramón y Cajal S, DeFelipe J. Loss of inhibitory synapses on the soma and axon initial segment of pyramidal cells in human epileptic peritumoural neocortex: implications for epilepsy. *Brain Res Bull*. 1997;44(1):47-66.
128. Mouritzen Dam A. The density of neurons in the human hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1979 Aug;5(4):249-64.
129. Rafael H. Commentary on human hippocampal structures: Braak et al. *J Child Neurol*. 1998 Mar;13(3):146-7.
130. Braak E, Strotkamp B, Braak H. Parvalbumin-immunoreactive structures in the hippocampus of the human adult. *Cell Tissue Res*. 1991 Apr;264(1):33-48.
131. Blackstad TW. Studies on the hippocampus: methods of analysis. *UCLA Forum Med Sci*. 1969;11:391-414.
132. Malmierca MS, Bjaalie JG, Mugnaini E, Theodor W. Blackstad (1925-2003): a pioneer in quantitative neuroanatomy. *Neuroscience*. 2005;136(3):601-6.
133. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999 Jan;29(1):83-120.

134. Camodeca N, Breakwell NA, Rowan MJ, Anwyl R. Induction of LTD by activation of group I mGluR in the dentate gyrus in vitro. *Neuropharmacology*. 1999 Oct;38(10):1597-606.
135. Huang LQ, Rowan MJ, Anwyl R. Role of protein kinases A and C in the induction of mGluR-dependent long-term depression in the medial perforant path of the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett*. 1999 Oct 22;274(2):71-4.
136. Masu M, Nakajima Y, Moriyoshi K, Ishii T, Akazawa C, Nakanishi S. Molecular characterization of NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Dec 20;707:153-64.
137. Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998 May;26(2-3):230-5.
138. López-Bendito G, Shigemoto R, Fairén A, Luján R. Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex*. 2002 Jun;12(6):625-38.
139. López-Bendito G, Shigemoto R, Fairén A, Luján R. Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex*. 2002 Jun;12(6):625-38.
140. Kwan P, Brodie MJ. Epilepsy after the first drug fails: substitution or add-on? *Seizure*. 2000 Oct;9(7):464-8.
141. Beghi E, Gatti G, Tonini C, Ben-Menachem E, Chadwick DW, Nikanorova M, Gromov SA, Smith PE, Specchio LM, Perucca E; BASE Study Group. Adjunctive therapy versus alternative monotherapy in patients with partial epilepsy failing on a single drug: a multicentre, randomised, pragmatic controlled trial. *Epilepsy Res*. 2003 Nov;57(1):1-13.
142. Patsalos PN, Perucca E. Clinically important drug interactions in epilepsy: interactions between antiepileptic drugs and other drugs. *Lancet Neurol*. 2003 Aug;2(8):473-81.
143. Radtke RA. Pharmacokinetics of levetiracetam. *Epilepsia*. 2001;42 Suppl 4:24-7
144. Gu J, Lynch BA, Anderson D, Klitgaard H, Lu S, Elashoff M, Ebert U, Potschka H, Löscher W. The antiepileptic drug levetiracetam selectively modifies kindling-induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats. *Eur J Neurosci*. 2004 Jan;19(2):334-45.

145. Bazil CW. New antiepileptic drugs. *Neurologist*. 2002 Mar;8(2):71-81
146. Motamedi M, Nguyen DK, Zaatreh M, Singh SP, Westerveld M, Thompson JL, Mattson R, Blumenfeld H, Novotny E, Spencer SS. Levetiracetam efficacy in refractory partial-onset seizures, especially after failed epilepsy surgery. *Epilepsia*. 2003 Feb;44(2):211-4.
147. Rossetti AO, Bromfield EB. Levetiracetam in the treatment of status epilepticus in adults: a study of 13 episodes. *Eur Neurol*. 2005;54(1):34-8. Epub 2005 Aug 10.
148. Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Schwarz M, Turski L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res*. 1984 Nov 12;321(2):237-53.
149. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci*. 2000 Nov;23(11):580-7.
150. Bouillieret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1999 Mar;89(3):717-29.
151. Bragin A, Engel J Jr, Wilson CL, Vinent E, Mathern GW. Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal KA injection. *Epilepsia*. 1999 Sep;40(9):1210-21.
152. Gröticke I, Hoffmann K, Löscher W. Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Exp Neurol*. 2008 Sep;213(1):71-83.