



**SIÇANLARDA PENTİLENTETRAZOLLE
OLUŞTURULAN DENEYSEL TUTUŞMA
MODELİNDE GLUTAMAT
TAŞIYICILARININ ROLÜ**

Numan TAŞPINAR
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Doktora Tezi-2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA PENTİLENTETRAZOLLE
OLUŞTURULAN DENEYSEL TUTUŞMA MODELİNDE
GLUTAMAT TAŞIYICILARININ ROLÜ**

Numan TAŞPINAR

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

ERZURUM
2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL TUTUŞMA MODELİNDE GLUTAMAT
TAŞIYICILARININ RÖLÜ**

Numan TAŞPINAR

Tez Savunma Tarihi:

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zekai HALICI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Erdal AĞAR

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Gökhan ARSLAN

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüriler tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi
ERZURUM-2017**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Epilepsi	4
2.1.1 Tanımı	4
2.1.1 Tarihçesi.....	5
2.1.2 Epilepsinin Epidemiyolojisi	6
2.1.3 Epilepsinin Etiyolojisi.....	6
2.1.4 Epilepsinin Sınıflandırması	7
2.1.4.1 Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneğinin epilepsi sınıflandırması	7
2.1.5 Patofizyolojisi.....	8
2.1.5.1 GABAerjik Aktivitede Azalma	9
2.1.5.2 Glutamerjik Aktivitede Artma.....	12
2.1.5.3 Yeni Nöronal Döngülerin Oluşması	12
2.2 Glutamat.....	15
2.2.1 Glutamat konsantrasyonu.....	15
2.2.2 Glutamat metabolizması	15

2.2.2.1 Glutamat- Glutamin döngüsü	16
2.2.2.2 Glutamat Sentezi.....	17
2.2.3 Glutamat Taşıyıcıları	17
2.2.4 Glutamat Reseptörleri	19
2.2.4.1 NMDA Reseptörleri.....	20
2.2.4.2 Kainat ve AMPA reseptörleri.....	21
2.2.4.3 Metabotropik glutamat reseptörleri	22
2.2.5 Glutamat ve Nörotoksisite	23
2.3 Valproik Asit	25
2.4 Seftriakson	26
2.5 Deneysel epilepsi modelleri	27
2.5.1 Tutuşma Modeli.....	28
2.5.1.1 Kimyasal Tutuşma Modeli	29
2.5.1.2 Pentilentetrazol'ün Etki Mekanizması	29
3. MATERYAL ve METOT.....	31
3.1 Deney Hayvanları ve PTZ Tutuşma Modelinin Oluşturulması	31
3.2 Kimyasallar ve Verilişleri	32
3.3 Deney Grupları:	33
3.4 EKoG Kaydı Alınması.....	33
3.5 Voltametri Kayıtları.....	34
3.5.1 İn Vivo Voltametri.....	34
3.5.1.1 Mikroelektrot (ME) Kalibrasyonu	34
3.5.1.2 ME Kalibrasyona Hazırlığı	35

3.5.1.3 Kalibrasyon prosedürü	35
3.5.1.4 ME kalibrasyon kriteri	36
3.5.1.5 Lokal ilaç vermek için cam mikropipetler	37
3.5.1.6 Ag/AgCl Referans elektrodu	37
3.5.2 Verilerin Analizi	37
3.5.3 İn Vivo Hayvan Kayıtlarının Alınması ve Deneyin Uygulanışı	38
3.6 Moleküler Çalışmalar	40
3.6.1 Beyin Dokularının Alınması	40
3.6.2 RNA İzolasyonu	40
3.6.3 cDNA Sentezleme	40
3.6.4 Real-Time PCR Çalışmaları	41
3.7 İstatistik ve Analizler	42
4. BULGULAR	43
4.1 EKG Sonuçları	43
4.2 İn Vivo Voltametri Sonuçları	44
4.3 Gen Ekspresyon Sonuçları	57
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	89
EK-1 ÖZGEÇMİŞ	89
EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU	90

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez kapsamında hayvan modellemesini oluşturmamda bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Erdal AĞAR'a ve Öğr. Gör. Süleyman Emre KOCACAN'a (19 Mayıs Üniversitesi, Samsun), EKoG kayıtlarının alınmasında ve sonrasında bilgi paylaşımında desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Gökhan ARSLAN'a (Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas), deney modellemesini oluştururken ve sonraki aşamalarda yardımlarını esirgemeyen Selçuk BÜTÜNER'e, deneylerin çeşitli aşamalarında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Başak TOĞAR (Bayburt Üniversitesi, Bayburt) ve diğer mesai arkadaşlarıma, bu çalışmayı 2015/038 BAP proje numarasıyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ve 113S083 proje numarasıyla destekleyen TÜBİTAK'a, eğitim ve tüm yaşamım süresince her türlü desteğini esirgemeyen babam ve anneme, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla desteğini esirgemeyen eşime ve güler yüzleri ve afacanlıklarıyla beni motive eden çocuklarıma teşekkür ederim.

Numan TAŞPINAR

ÖZET

Sıçanlarda Pentilentetrazolle Oluşturulan Deneysel Tutuşma Modelinde Glutamat Taşıyıcılarının Rolü

Amaç: Bu çalışmada epilepsinin glutamat taşıyıcı ve enzimleriyle ilişkisini anlamaya ve fizyolojisi hakkında bilgiler edinmeyi amaçladık. Çalışmamızda asıl hedefimiz voltametri tekniği ve gen ekspresyon sonuçları yönünden epilepsiyle glutamatın ilişkisini ortaya koymak ve glutamat eksitotoksitesinin nasıl etkide bulunduğunu anlamaya çalışmak oldu.

Materyal ve Metot: Bu deneyde, ağırlıkları 220 ± 10 g olan Wistar cinsi otuz altı erişkin erkek sıçan kullanıldı. Tutuşma modeli için, anti epileptik ilaç keşfi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan pentilentetrazol (PTZ) kullanıldı. Tutuşma modeli oluşturuldu Seftriakson ve Valproik asit tedavisi uygulandıktan sonra elektrokortikografi (EKG) kayıtları alındı. Glutamat geri alım süreleri voltametri kayıtlarıyla alındı. Glutamat taşıyıcı ve enzimlerinin Real Time-PCR' da ekspresyon sonuçlarına bakıldı. İstatistiksel analizler için One-way ANOVA Tukey testleri için SPSS 17.0 sürümü kullanıldı.

Bulgular: Yapmış olduğumuz EKG ölçümlerinde gruplara ait spike değerleri sırasıyla PTZ: 733 ± 59 ; PTZ+VPA: 231 ± 23 , PTZ+Sef: 359 ± 30 olarak ölçüldü. Voltametriyle aldığımız ölçümlerde beyin korteksi M1 bölgesi T_{80} sürelerini değerlendirdiğimizde kontrol grubu, PTZ+Sef ve PTZ+VPA grupları için geri alım sürelerinin benzer olduğu görüldü. Sağlıklı bireylerde geri alım süresi 2.61 saniye iken tutuşturulmuş grupta bu sürenin 18.8 saniye olduğu görüldü. RT-PCR değerlendirmesinde tutuşturulmuş grupta EAAC1, GLT-1 ve GLAST glutamat taşıyıcıların ve glutaminaz ve glutamin sentetaz enzimlerinin ekspresyon oranlarında kontrol grubuna göre artış saptandı.

Sonuç: Yapılan tüm analizler sonucunda glutamat seviyesinin aşırı derecede arttığı görüldü. En kayda değer sonuç ise primer motor korteks bölgesinde görüldü. Glutaminaz enziminin ekspresyon oranı sağlıklı hayvanlara göre 9 kat daha fazla ekprese oldu. Glutamat artışını kontrol edecek mekanizmaları normal düzeylerine getirme veya sorunu ortadan kaldırma çalışmalarının epilepsi tedavisinde önemli bir yer tutacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Amperometri, Epilepsi, Glutamat, Glutamat Taşıyıcıları, RT-PCR, Voltametri

ABSTRACT

The Role of Glutamate Carriers in Experimental Kindling Model Created with Pentylenetetrazole in Rats

Aim: In this study we aimed to obtain information to understand the relationship with the glutamate transporter and enzyme and the physiology of epilepsy. Our main goal in this study was to reveal the relationship between epilepsy and glutamate in terms of voltammetry technique and gene expression results and, to understand how the glutamate exitotoxicity affects this relationship.

Material and Methods: In this experiment, thirty-six adult male rats of Wistar strain weighting 220 ± 10 g were used. For kindling model, we used pentylenetetrazole (PTZ) that widely used in antiepileptic drug discovery studies. Kindling model was set and after Seftriaxone and Valproic acid treatments the electrocorticography (EKG) records were obtained. Glutamate reuptake times were measured with voltammetry technique. The RT-PCR expressions of glutamate transporters and enzymes were considered. One-way ANOVA and Tukey tests were run for the statistical analyzes with the SPSS Statistics 17.0 version.

Results: In the EKG measurements we have done, the spike values belong to groups were measured respectively; PTZ: 733 ± 59 ; PTZ+VPA: 231 ± 23 , PTZ+Sef: 359 ± 30 . When we measured the T80 times of the control group, PTZ+Sef ve PTZ+VPA groups with voltammetry measurements of the cerebral cortex M1 region. we observed that the reuptake times were similar to each others. While the reuptake times of healthy group were 2.61 second the kindling group was 18.8 second. In the RT-PCR evaluation the expression ratios the EAAC1, GLT-1 and GLAST, glutamate transporters, glutaminase and glutamine sentetase were increased in the kindling groups.

Conclusion: The glutamate levels were excessively increased as a result of all analyzes. The most significant results were observed in the primary motor cortex. The expression ratio of the expressed glutaminase enzyme was 9 times more than in healthy rats. To bring the increased glutamate levels to its normal levels or mechanisms which can eliminate the problem is holding an important place in the treatment of epilepsy.

Key Words: Amperometry, Epilepsy, Glutamate, Glutamate Transporters, RT-PCR, Voltammetry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aa	: Askorbik Asit
AMPA	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit
BNZ	: Benzodizapin
Cpu	: Kaudatum putamen
EAAC1	: Excitatory Amino Acid Carrier (EAAT3)
EAAT2	: Glutamat Taşıyıcı (GLT-1)
EAAT3	: Ekzitator Amino Asit Taşıyıcı (EAAC1)
EKoG	: Elektrokortikografi
GABA	: Gama amino bütirik asit
GAD	: Glutamik asit dekarboksilaz
Gln	: Glutamin
GLAST	: Glutamate-Aspartate Taşıyıcı (EAAT1)
GLT-1	: Glutamat taşıyıcı (EAAT2)
Glu	: Glutamat
GS	: Glutamin sentetaz
i.p.	: İntra peritonel
M1	: Primer motor korteks
ME	: Mikroelektrot
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
PTZ	: Pentilentetrazol
RT-PCR	: Real Time PCR
Sef	: Seftriakson
VPA	: Valproik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Glutamat- Glutamin döngüsü.....	17
Şekil 3.1. EKoG kayıt görüntüsü.....	34
Şekil 3.2. FAST-16 kayıt sistemi L-glutamat ölçümleri	38
Şekil 3.3. Voltametri kayıtları alınan sıçan beyin bölgeleri	39
Şekil 4.1. Gruplara ait spike (diken) ortalama değerleri	43
Şekil 4.2. Gruplardan alınan spike kayıt örnek görüntüleri.....	43
Şekil 4.3. Kontrol grubu M1 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	45
Şekil 4.4. Kontrol grubu CA3 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	46
Şekil 4.5. Kontrol Grubu Cpu bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	47
Şekil 4.6. PTZ grubu M1 bölgesi bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	48
Şekil 4.7. PTZ grubu CA3 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	49
Şekil 4.8. PTZ grubu Cpu bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	50
Şekil 4.9. PTZ+ Sef grubu M1 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları	51
Şekil 4.10. PTZ+ Sef grubu CA3 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	52
Şekil 4.11. PTZ+ Sef grubu Cpu bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları	53
Şekil 4.12. PTZ+ VPA grubu M1 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	54
Şekil 4.13. PTZ+ VPA grubu CA3 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları	55
Şekil 4.14. PTZ+ VPA grubu cpu bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları.....	56
Şekil 5.1. Primer motor korteks (M1) bölgesi ekspresyon değişimleri.....	70

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Glutamat reseptörleri.....	20
Tablo 3.1. Tutuşma dozu ve hayvan sayısı	32
Tablo 3.2. Rat beyin bölge koordinatları	39
Tablo 3.3. Genomik DNA eliminasyon reaksiyon karışımı.....	40
Tablo 3.4. Reverse Trankripsiyon reaksiyon bileşenleri	41
Tablo 3.5. Genlere ait primer prop dizilimleri	42
Tablo 4.1. Beyin bölgelerine göre glutamat geri alım T_{80} (saniye) süreleri.....	44
Tablo 4.2. EAAC1 Glutamat taşıyıcısı ekspresyon sonuçları.....	57
Tablo 4.3. GLT-1 Glutamat taşıyıcısı ekspresyon sonuçları	57
Tablo 4.4. GLAST Glutamat taşıyıcısı ekspresyon sonuçları.....	58
Tablo 4.5. Glutamin sentetaz enzimi ekspresyon sonuçları.....	59
Tablo 4.6. Glutaminaz enzimi ekspresyon sonuçları.....	59
Tablo 4.7. Kontrol grubuna göre PTZ grubu ekspresyon değişimleri.....	60

1. GİRİŞ

Epilepsi beyinde uyarılabilirliği aşırı düzeyde artmış bir nöron topluluğunun tekrarlayan özellikte, normal olmayan boşalmalara bağlı, ani ve geçici duyuşal, motor, psişik veya otonomik olaylarla sonuçlanabilen ve beynin tamamının veya bir kısmının işlevsel bozukluğu şeklinde tanımlanmıştır.¹ Epilepsi merkezi sinir sisteminin en yaygın görülen hastalıklarından birisidir ve insan topluluğunun % 1-3'inde görülmektedir.²

Epilepsi de özellikle uyarılma/baskılanma denge bozulması üzerinde durulmaktadır. Temel inhibitör nörotransmitterlerden olan gama amino bütirik asit (GABA) diğer bir temel eksitatör nörotransmitter olan glutamat (Glu)'dan sentezlenmektedir. Bu iki nörotransmitter arasındaki dengenin GABA aleyhine değişmesi epilepsinin temel mekanizmalarından biri kabul edilmektedir.³

Memelilerde merkezi sinir sisteminde uyarıcı sinyallerin önemli bir aracısı olarak düşünölen L-Glutamat, muhtemelen biliş, hafıza ve öğrenme de dahil olmak üzere, normal beyin fonksiyonlarına bir çok yönden katılır.⁴ Glu'ın santral sinir sisteminin gelişmesi, sinapsların tetiklenmesi ve eliminasyonu, hücre göçü, farklılaşması ve ölümü üzerine önemli rolü bulunmaktadır.⁵

Glu'ın ekstrasellöler dönüşümü olmadığından, beyin dokusunun kendisini Glu toksisitesinden koruyabilmesi için çok yüksek bir Glu geri alım aktivitesine ihtiyaç duymaktadır. Glu'ın uzun süreli olarak düşük ekstrasellöler konsantrasyonlarında tutulabilmesinden sorumlu mekanizma Glu geri alınımıdır. Glu geri alınımı, plazma membranlarından taşıyıcı güç olarak elektrokimyasal yoğunluğu kullanan ve hem nöronlarda hem de glial hücrelerde bulunan Glu taşıyıcı proteinleriyle gerçekleşmektedir.⁵ Glu taşıyıcıları, Na⁺ bağımlı bir taşıyıcı protein ailesidir. Şimdiye kadar belirlenmiş 5 alt tip Glu taşıyıcısı vardır: EAAT-1 (GLAST, Glutamate-Aspartate Taşıyıcı, EAAT-2 (Glutamate Taşıyıcı, GLT), EAAT-3 ((Excitatory Amino Acid

Carrier, EAAC), EAAT-4 (Excitatory Amino Acid Taşıyıcı) ve EAAT-5. GLAST ve GLT1 ilk defa sıçan, EAAC tavşan ve EAAT4 ile EAAT5 ise insandan izole edilmiştir. EAAT-1 ve EAAT-2 sıklıkla astroglial hücrelerde eksprese olurken, EAAT-3 ve EAAT-4 nöronlarda, EAAT-5 ise retinada yer almaktadır.⁵⁻⁷ EAAT-1 ve EAAT-2 neokortekste difüz olarak bulunur.⁵⁻⁷

Glu'nun sinaptik aralıktan uzaklaştırılması nörotoksisitenin önlenmesi açısından aşırı derecede önemlidir. Aşırı ekstraselüler Glu ve Glu'nun sinaptik aralıktan uzaklaştırılmasına ait mekanizmalardaki bozukluklar, başta epilepsi olmak üzere, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer hastalığı, Huntingon hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif birçok hastalıkta rol oynamaktadır.⁸⁻¹⁰ Epilepsi cerrahisi yapılan hastalarda cerrahi öncesinde ve devamında yapılan tetkiklerde spontan ve stimulusa bağlı epileptik deşarj sırasında en çok epileptik hemisferde olmak üzere bilateral ekstraselüler Glu konsantrasyonunda geçici yükselme olduğu bildirilmiştir.^{11, 12} İnhibisyon çalışmaları özellikle EAAT-2/GLT-1'in ekstraselüler Glu geri alımında ve nöral ağ eksitabilitesinde önemli rol aldığını göstermiştir.^{13, 14}

Epilepsi tedavisinde en sık kullanılan valproik asit, absans, miyoklonik, primer jeneralize ve tedaviye dirençli fokal nöbetlerin tedavilerinde kullanılabilen geniş spektrumlu bir antiepileptik ilaçtır.¹⁵ Valproik asidin tedavi edici etkisinin, merkezi sinir sisteminde inhibitör bir nörotransmitter olan gama amino butirik asit (GABA) üzerinden olduğu kabul edilmektedir.

β -laktam bir antibiyotik olan seftriakson çeşitli bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılan bir ilaçtır. Ancak çeşitli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde terapötik potansiyeli çok az çalışılmıştır. Seftriakson üzerinde yapılan son çalışmalarda sinapstan Glu'nun hücre içine alımından sorumlu olan GLT1/EAAT2'de dahil olmak üzere, proteinlerin bir dizi ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir.^{16, 17}

Deneyssel tutuşma modeli için kullanılan kimyasallardan PTZ, konvulsif bir fenomen olan amigdalanın elektriksel olarak tutuşturulmasına benzerliği ve insandaki jeneralize tonik-klonik nöbetlere uygunluğundan dolayı sık olarak kullanılmaktadır.¹⁸

¹⁹ PTZ nonkompetitif bir GABA_A reseptör antagonistidir. Tekrarlayan PTZ enjeksiyonları giderek uzun süren nöbetlerin gelişmesine neden olur.²⁰

Bu bulgular ışığında epilepsiyi değerlendirdiğimiz de asıl sıkıntının ortamda bulunan Glu seviyesinde meydana gelen artışların olduğunu görmekteyiz. Biz de ortamda bulunan bu Glu seviyesinin ne oranda olduğunu dünyada ilk olarak voltametri tekniğiyle belirlemeye çalışıp gen ekspresyon sonuçları alarak ilişkileri ortaya koymaya çalışacağız. Ayrıca EKG kayıtlarını da alarak gruplar arasında kıyaslamalarda bulunacağız. Tedavi yaklaşımlarımızla bu Glu eksitotoksitesinin nasıl tolere edebileceğimizi anlamaya çalışmak olacaktır. Özetleyecek olursak GABA'nın azalmasından ziyade Glu'nın ne derecede arttığı toksik etkisini ne derece gösterdiği ve tedavimizin bu Glu toksisitesini hangi seviyede ortadan kaldırdığını belirlemek olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Epilepsi

2.1.1 Tanımı

Tekrarlayan spontan nöbetlerle karakterize bir hastalık olan epilepsi sistem düzeyinde nöronların ve nöron grupları arasında normal olmayan etkileşimler ile bağlantılı bir ağ hastalığıdır.²¹⁻²³ Yunanca “epilepsia” kelimesinden kökenlenmiştir. Epilepsinin kelime anlamı birden tutulmak, yakalamak manasına gelir. Tüm konvülsiyon geçiren kişiler için epileptik olduklarını söyleyemeyiz. Epilepsi tanısının konulabilmesi için konvülsif nöbetlerin tekrarlayan ve bu özelliğini senelerce sürdürmesi gerekmektedir. Epilepsi nedenleri arasında kafa travmaları, inme, beyinde oluşan bazı enfeksiyonlar (menenjit, ensefalit gibi), beyin damarlarında görülen bazı yapısal bozukluklar, genetik faktörler, doğum travmaları ve tümörler bulunmaktadır.^{1, 24}

Dünya Sağlık Örgütü ise epilepsiyi, beyinde fazlaca uyarılabilir hale gelmiş sinir hücresi topluluğunun yineleyen özellikte, normal olmayan deşarjlarından, ani ve geçici duysal, motor, psişik yada otonomik olaylarla sonuçlanabilen ve beynin bir kısmının veya tamamının işlev bozukluğu olarak tanımlanmaktadır.¹ Epilepsi merkezi sinir sisteminin en yaygın görülen hastalıklarından birisidir ve insan topluluğunun % 1-3’inde görülmektedir.² Epilepsi vakalarının yaklaşık % 70’inde temel neden bilinmemektedir.^{1, 24} Epilepsi hayatın her hangi bir döneminde ortaya çıkabildiği gibi genellikle çocukluk yaşlarında ortaya çıkmaktadır.²⁵ Epilepsinin temel sebeplerini tedavi edemediğimiz için günümüzdeki farmako terapinin amacı, nöbet sıklığını kontrol etmek olup epilepsinin altında yatan neden(ler)i tedavi etmek değildir.²⁶ Epileptik hastaların yaklaşık % 20-30’u anti-epileptik ilaçlara yanıt vermemekte ve bu hastalar sıklıkla cerrahi tedavi için aday olmaktadır.²⁷

2.1.1 Tarihçesi

Tarihte epilepsinin şeytandan, kötülüklerden, büyü veya astrolojik olaylardan kaynaklandığı düşünülmüş ve günümüzde de bu düşüncelerin epilepsi üzerinde etkisi devam etmektedir. Epilepsiyle ilgili ilk bilgiye Milattan önce 2080 senesinde yayınlandığı belirtilen Hammurabi Kanunları'nda rastlanmıştır. Bu metinde kasılma ve ateş arasında ilişki olduğu belirtilmiştir. Alkmelin ve Krolon Milattan önce 500 yıllarında beyin ve epilepsi arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Epilepsi konusunda ilk gerçek tanımı M.Ö. 400 yıllarında Hippocrates'in yaptığı ve epilepsinin orijininin beyinden geldiğini bildirdiği bilinmektedir. Bilimsel olarak ilk tanımı Huglings Jackson 1800'lü yıllarda bilhassa beyin gri cevherinde oluşan deşarjlar olarak belirtmiştir. İlk kez Gowers 1881 yılında epilepsiye sınıflandırmıştır. 1875 yılında Caton maymun ve tavşanların kafatasına elektrotlar bağlayarak yaptığı deneyler sonucunda ilk defa beyinde birtakım elektriksel faaliyetlerin varlığını gözlemleyip elektroensefalografi (EEG)'yi oluşturan potansiyelleri bulmuştur. 1929 yılında Hans Berger ilk kez insanlarda elektroensefalografi uygulamıştır. Sonraki yıllarda Gibbses spesifik EEG sonuçlarını belirterek epilepsi tedavi ve tanısında önemli bir adım atılmıştır.^{28, 29}

Epilepsili vakalarda ilk tedavi 1800 yılında Ferrier ve Todd tarafından potasyum bromür kullanılarak yapılmıştır.³⁰ 1912 yılına kadar tek antikonvülsif ilaç olarak bromidler kullanılmış fenobarbital'in sentezi ile etkin tedavi dönemine geçilmiştir. Sonraki yıllarda 1938'de epilepsi tedavisine difenilhidantoin, 1944'te trimetadion katılmıştır. Epilepsi tedavisinde cerrahi yaklaşımlar ancak 1800'lerin sonlarında olmuştur. Günümüzde modern anti-konvülsanlarla epileptik nöbetlerin % 75-80 kadarı kontrol altında tutulabilmektedir.^{28, 29}

2.1.2 Epilepsinin Epidemiyolojisi

Epilepsinin epidemiyolojisi, yöntem değişiklikleri, teşhis kriterleri ve teşhisin belirsiz olması nedeniyle kesin değildir. Ancak var olan sonuçlara göre epilepsi herhangi bir yaşta başlayabilir, görülme sıklığı çocuklukta ve yaşamın geç döneminde artış gösterir.

2.1.3 Epilepsinin Etiyolojisi

Epilepsinin etiyolojisinde temel olarak kazanılmış ve konjenital nedenlerin olduğunu söyleyebiliriz.³⁰ Epilepsiler etiyolojilerine göre üç grupta incelenebilir.³¹

1- İdiyopatik epilepsiler (Primer jeneralize): Başka bir nörolojik hastalıkla korelasyonu olmayan ve kalıtsal eğilim dışında bir nedene bağlanamayan epilepsilerdir. Konjenital etkenler sebep olmaktadır. Genç erişkinlik yâda çocukluk çağlarında başlarlar. Bu türdeki hastalar normal gelişim gösterirler ve mental ve nörolojik muayenelerinde de farklılık yoktur.

2- Kriptojenik epilepsiler: Semptoma dayalı oldukları kabul bulan lakin etiyojik sebepleri belirtilemeyen idiyopatik epilepsi kistaslarına uymayan epilepsilerdir.

3- Semptoma bağlı epilepsiler: Belirli serebral bozukluğun neden olduğu yahut onunla ilişkilendirilen epilepsi grubudur. Bu grubun etiyolojisinde birçok sebep sıralanabilir bu tür epilepsilere kazanılmış etkenler sebep olmaktadır.

Konjenital nedenler arasında genetik primer (nedeni bilinmeyen), tek bir genden kaynaklanan problemler, kromozomal problemler ve prenatal hasarlar vardır. Kazanılmış nedenler ise, enfeksiyon, damarsal sorunlar, travma, neoplastik durumlar, nörodejenerasyon, metabolik ve toksik nedenler, skleroz ve yapısal malformasyonlar vardır.³⁰

2.1.4 Epilepsinin Sınıflandırması

Epilepsiyle ilgili bugüne kadar çeşitli şekillerde sınıflandırmalar yapılmıştır. Son uluslararası sınıflandırma 1981 yılında Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği tarafından yapılmıştır ve 1989 yılında revize edilmiştir.³²

2.1.4.1 Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneğinin epilepsi sınıflandırması

1- Parsiyel (lokal, fokal) nöbetler: Bunlara lokal başlayan nöbetlerde denir.

a) Basit parsiyel nöbetler: Basit belirtiler gösteren ve bilinç bozulmasına neden olmayan kısmi nöbetler.

1. Motor belirtiler gösterenler
2. Somato ya da özel duyuşsal belirtiler gösterenler
3. Otonomik sistem bağlantılı belirti gösterenler
4. Psişik belirtiler gösterenler

b) Kompleks parsiyel nöbetler: Karmaşık belirtiler gösteren ve bilincin bozulmasına neden olan kısmi (temporal lop ya da psikomotor) nöbetler.

1. Basit nispi nöbetler şeklinde başlayan bilinç bozukluğuyla devam edenler.
2. Başlangıçtan itibaren bilinç bozukluğu olanlar
 - a) Yalnız bilinç bozukluğu gösterenler
 - b) Ek olarak otomatizmalar gösterenler
 - c) Sekonder olarak jeneralize olan kısmi nöbetler

1. Basit kısmi nöbetlere sekonder olanlar
2. Kompleks kısmi nöbetlere sekonder olanlar

2- Jeneralize nöbetler: Bilateral olarak simetrik olan, bölgesel başlangıç göstermeyen nöbetler

1. a) Absens (kesinti) nöbetleri (Petit mal)
- b) Atipik absens nöbetleri

2. Miyoklonik nöbetler (ritmik spazmlı silkinme ve sıçramalar)
3. Klonik nöbetler (sadece klonik spazmlarla karakterize)
4. Tonik nöbetler (sadece kas tonusunda artış ile karakterize)
5. Tonik-klonik nöbetler (tonus artışını izleyen klonik kasılmalar) (Grand mal)
6. Atonik nöbetler (tüm kas tonusunun ani olarak kaybı)
7. Kombinasyonları

3- Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler: Nedenleri bilinmeyen veya yetersiz olan nöbetler.

2.1.5 Patofizyolojisi

Epilepsi nöbetlerin patofizyolojisi tam anlamıyla çözülememiştir. Bütün epileptik nöbetlerde aynı mekanizma geçerli değildir. Epilepside özellikle eksitator-inhibitör denge bozulması üzerinde durulmaktadır. Temel inhibitör nörotransmitterlerden olan gama amino bütirikasit (GABA) diğer bir temel eksitator nörotransmitter olan Glu'dan sentezlenmektedir. Bu iki nörotransmitter arasındaki dengenin GABA aleyhine değişmesi epilepsinin temel mekanizmalarından biri kabul edilmektedir.³ Deneysel hayvan modelleri ve insanlarda cerrahi olarak alınan örneklerde benzer anormallikler gözlemlenmiştir. GABA üretiminin baskılanması, salınımının engellenmesi ya da postsinaptik bir reaksiyonun kasılmaları artırabileceği kabul edilir.³ Beyin nöron sinapslarında GABA konsantrasyonundaki %28'lik bir azalma konvülsiyonlara yol açar. Bu görüşü destekleyen bulgular mevcuttur. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz.

1. GABA sentezinde kullanılan temel enzim glutamik asit dekarboksilaz (GAD) ve B6 vitamininden oluşan pridoksal fosfat koenzim rol oynamaktadır. B6 yetmezliğinde GABA miktarı da yetersiz kalacağından nöbetin ortaya çıkabileceği.
2. Parsiyel epilepsilerde ilişkili sinir kavşaklarında GABA'da bir azalmanın olduğu,

3. Febril konvülsiyonlarda ve tedaviye dirençli nöbetleri olan hastalarda serebrospinal sıvı GABA konsantrasyonunun azaldığı.

4. Amigdaloid nukleusa GABA transaminaz inhibitörlerinin verilmesi hayvanlarda nöbet oluşturduğu yapılan araştırmalar ışığında öğrenilmiştir. İnsan ve deneysel epileptojenik lezyonlarda, glisin yoğunluğunda artış, glutamin, glutamik asit, taurin ve aspartik asit düzeylerinde ise azalma olduğu gösterilmiştir. Epileptik nöbetlerin oluşmasında nörotransmitterler arası denge değişimi dışında reseptör sonrası olayların da rolü olabileceği düşünülmektedir. Postsinaptik hedef hücrelerde reseptörün aktive olması adenilat siklazı aktive ederek siklik adenozin mono fosfat (cAMP) oluşmasını sağlar. Hem deneysel hayvan modellerinde hem de insanlarda konvülsiyonlarda serebrospinal sıvıda cAMP düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Bunun dışında oksijen, glikoz ve vücut pH'sıyla ilişkili metabolizmadaki ekstrakranial ya da jeneralize bozukluklar da nöbetlere yol açabilmektedir.³³

2.1.5.1 GABAerjik Aktivitede Azalma

GABA sisteminin nöronal aktivite ve epileptiform deşarjların kontrolündeki önemi iyi bilinmektedir. Bu konu hakkında az bildiklerimiz ise inhibitör sistem fonksiyonlarının, uzun dönem değişimlerinin epilepsi gelişimindeki rolüdür.

GABA sistemleri nöbet aktivitesi ile değişebilir. Meydana gelen bu değişiklikler, aşırı uyarılmadan koruyucu olabileceği gibi epileptik durumu kolaylaştırabilir. GABA santral sinir sisteminin başlıca inhibitör nörotransmitterlerindendir. İnhibitör post sinaptik potansiyeller (IPSP) oluştururlar. GABA reseptörleri GABA_A ve GABA_B olmak üzere 2 alt tipe ayrılır. GABA_A reseptörleri, Cl⁻ akımı ile hızlı IPSP'lere aracılık ederler, GABA_B reseptörleri ise artmış K⁺ iletimi ile presinaptik otoreseptör olarak fonksiyon görüp yavaş IPSP'lere aracılık ederler. Genelde, selektif GABA_A reseptör antagonistleri prokonvülsan, selektif agonistler ise antikonvülsan etkilidir. Glu

aktivasyonuna benzer şekilde GABA deaktivasyonu da epileptiform deşarjlar ortaya çıkarır. Selektif GABA_A reseptör antagonistlerinden pikrotoksin ya da bikukulin tutuşma benzeri yanıtlar ortaya çıkarmaktadır ve kimyasal tutuşma oluşturmakta kullanılmaktadırlar. Bu maddeler ile oluşturulan tutuşma, muscimol ve progabid gibi selektif GABA agonistleri, GABA parçalanma inhibitörü vigabatrin, GABA geri-alım inhibitörlerinden SKF89976A ve tiagabin ile birlikte verildiklerinde nöbet aktivitesini baskılamaktadır.³⁴ Bahsi geçen GABA agonistleri, amigdala tutuşturulmuş hayvanlarda potent antikonvülsan etki göstermektedir.³⁵ Selektif GABA_B reseptör agonisti baklofen, sistemik veya amigdala içerisine enjeksiyonunun ardından sadece zayıf antikonvülsan etki ortaya çıkarmış^{36, 37} ve interiktal deşarjları artırmıştır.³⁷ GABA agonistlerinin de dahil olduğu antiepileptik ilaçların birçoğu, status epileptikus ardından uygulanırsa epileptogenez gelişmesini önleyememektedir.³⁸ Yapılan bir çalışmada ise tutuşturulmuş ya da status epileptikus ile oluşturulmuş nöbetler sırasında, GABA aracılı inhibisyon, amigdala ve hipokampus CA1 bölgesi gibi bazı spesifik bölgelerde sınırlı kalmıştır. K⁺ kaynaklı Ca²⁺ bağımlı GABA salgılanması ise tutuşma ardından artmıştır.³⁹ Hipokampal mikrodializ çalışmaları, tutuşma nöbetleri esnasında yetersiz ekstraselüler GABA konsantrasyonlarını ortaya koymaktadır. Bu nöbetler süresince GABA seviyesi, temel seviyesinden yaklaşık % 250-350 gibi bir oranda artarken, Glu seviyeleri ise %550-650 artmaktadır.⁴⁰ Bu bulgular insan temporal lop epilepsisindeki artışla benzeşmektedir.¹¹ Tutuşturulmuş amigdala nöbetleri sırasında ekstraselüler Glu %200-300 artarken GABA seviyesi % 67 azalmıştır. During ve ark. amigdala kindling ardından nöbet kaynaklı GABA salınımının iki farklı komponenti olduğuna dikkat etmiştir. Birincisi K⁺ kaynaklı GABA salınımı, ikincisi de Glu kaynaklı GABA salınımıdır. K⁺ kaynaklı GABA salınımı hipokampusta gerçekleşmektedir. Glu kaynaklı Ca²⁺ bağımsız GABA salınımı ise hipokampusta azalmaktadır.⁴¹ GABA salınımının

azalmasının altında yatan neden tam olarak açık değildir. Bu konudaki teorilerden biri olan GABA taşıyıcılarının azalması, altta yatan faktörlerden biri değildir, çünkü tutuşturulmuş hayvanlarda GABA taşıyıcılarının arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir.^{42, 43} Bu çalışmalar bize tutuşma nöbetlerinde GABA salınımının, Glu salınımını karşılamadığını ifade etmektedir. GABA_A reseptörleri, β 1-3, α 1-6, δ , γ 1-3 ve ϵ alt birimlerinin kombinasyonundan oluşan heteromerik protein kompleksidir. Bu alt birimlerin kompozisyonu farklı fonksiyonel ve farmakolojik özelliklerini ortaya çıkarmaktadır α ve γ altbirimleri benzodiazepin (BNZ) ve çinko duyarlılığını belirlemektedir. β alt birimi kanal özelliklerini, BNZ efikasitesini ve GABA afinitesini belirlemektedir.⁴⁴ Bu alt birimlerden α 4, β 1 ve β 3 mRNA ekspresyonlarının amigdala tutuşması ardından dentat girusta arttığı gösterilmiştir.⁴⁵ GABA aracılı inhibisyonu, GABA_A/BNZ reseptörlerinin sayısını değiştirmektedir. Birçok çalışma, GABA_A/BNZ reseptörlerinin kindling ardından piriform kortekste arttığını göstermektedir. [3H] Flunitrazepam'ın bağlanması amigdala, hipokampus ve dentat girusta artmıştır.⁴⁶

Epilepsi nöbetlerinin oluşmasında bu bulguların haricinde önemli derecede nöron kaybı olmaktadır ve bu konuda önemli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan biri Peredery'nin pilocarpin ile çalışmasıdır.⁴⁷ Pereder çalışmasında nöronal kaybın çok geniş olduğu, en erken değişikliklerin CA1 hipokampal alanında, piriform korteks ve talamusta olduğunu göstermiştir. Nöronal hasarın ardından inhibitör sistemin yeniden modellenmesi gelmektedir. Reorganizasyonun bir kısmı, artmış uyarıya karşı koruma olarak inhibitör sistemin artması şeklinde, diğer kısmı ise kronik epileptik nöbetlerin yayılması için inhibisyonun yetmezliği ile sonuçlanan reorganizasyondur.³⁵

2.1.5.2 Glutamerjik Aktivitede Artma

Glu memelilerin beyinde başlıca uyarıcı nörotransmitterdir. Glu ve analogları nöronlar üzerinde güçlü depolarizan etkiye sahiptir. Tutuşma modelinde, ekstraselüler Glu miktarı amigdalada belirgin olarak artmıştır.⁴⁰ Depolarizasyonla sağlanan presinaptik Glu salınımı, tutuşma epileptogenezde artmıştır.³⁹ NMDA reseptörleri, tutuşma sırasında değişim göstermekte ve NMDA reseptör bağımlı EPSP'leri artırmaktadır. NMDA'nın amigdalaya tekrarlayan mikro enjeksiyonları tutuşma benzeri etki göstermektedir.⁴⁸ NMDA reseptörlerinin elektriksel tutuşmada rolü olduğu gösterilmiştir.³⁴ Ayrıca Benzgon ve ark. yüksek nöronal NR2D seviyesi olan farelerde, amigdala kindling gelişmesinde belirgin azalma tespit etmiştir.⁴⁹ Bu sonuçlar, tutuşma gelişiminin NMDA reseptör aktivasyonuna dayandığını önermektedir. Tutuşmada ilerleyici nöbet gelişimi üzerine potansiyel etkilerinin aksine, bu NMDA reseptör antagonistleri, tutuşturulmuş hayvanlar üzerinde zayıf antikonvülsan etki göstermektedirler.⁵⁰ NMDA reseptörleri kalıcı tutuşma epileptogenezi altında yatan trans sinaptik değişikliklere neden olmaktadır.³⁶ Öte yandan, AMPA reseptörlerinin nöbet deşarj tetiklenmesinde rolü olduğuna inanılmaktadır ve kainat reseptörlerinin epileptogenezdeki rolü ise tam olarak belirli değildir. GluR6 ile nöbet kolaylaşmakta, GluR7 antikonvülsan etki ortaya koymaktadır. Grup II ve III mGluR'nin selektif agonistlerinin amigdala kindled nöbetlerde hem antiepileptogenik hem de antikonvülsan etkileri vardır.^{35, 51}

2.1.5.3 Yeni Nöronal Döngülerin Oluşması

Mevcut uyarıcı bağlantıların artmasının yanı sıra olası yeni bağlantılar da oluşmaktadır. Yeni bağlantıların oluşmasının en büyük nedeni epilepsi kaynaklı nöronal hasarlanmalardır. Aksonal gelişim ve sinaps oluşumuyla meydana gelen yeni döngüler, epileptik deşarjın yayılmasını yineleyen uyarıcı kanallar oluşturarak veya da etkilenen

bölgenin cevabını artırma suretiyle sağlamaktadır. Bu konuda en çok çalışılan yolak hipokampustaki dentat girus iç moleküler tabakasının ve CA3 stratum oriens kısımlarından dentat granül ve CA3 piramidal nöron aksonlarına doğru yosunsu lif vermesidir. Bu yolağın çok çalışılmasının nedeni, yüksek seviyede çinko içermesidir bu yüzden Timm boyaması ile çok rahat işaretlenebilmektedir. Tutuşma oluşumunu bozan tedaviler örneğin MK-801 uygulanması, yosunsu lif gelişmesini azaltmakta ya da bloklamaktadır.⁵² Nöronal filizlenmenin bir başka göstergesi 43 kDa ağırlığındaki gelişme ile ilgili GAP-43 sinaptik proteini ve sinapsin I proteinidir. GAP-43 proteinin ekspresyonu, perforant yol tutuşması ardından, sinapsin I proteini ise amigdala tutuşması ardından dentat girus ve CA3 bölgelerinde olmak üzere anlamlı derecede artmıştır.^{53, 54} Yosunsu lif filizlenmesinin glutamerjik döngü oluşturduğu düşünülmektedir, bu döngüde AMPA reseptör aktivasyonu gereklidir ve NMDA reseptörleri ise kısmen katılmaktadır.⁵⁵

Nöronal aktivasyonda, büyüme ile ilişkili moleküller iki sınıf halinde görev alırlar bunlar nörotrofik faktörler ve aksona kılavuzluk eden moleküllerdir. Bu moleküller nöron gelişiminin miktarını ve yönünü tayin eden unsurlardır. Nörotrofik faktörler; beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofinler olan sinir büyüme faktörü (NGF) ve nörotrofin 3 (NT-3)'ten ve TGF- β ailesinden glial hücre dizisi kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF)'den oluşmaktadır. Aksona kılavuzluk eden moleküller ise daha az incelenmiştir fakat açık bir şekilde eph reseptör ailesinden en az bir üye ve ligandları tutuşma kaynaklı filizlenmede görev almaktadır.³⁴

Epileptojenik hedefteki gliozisli hücreler, hücre dışı K^+ iyonlarını tamponlama yeteneklerinin bozulmasından, ekstraselüler alanda K^+ iyon artışına neden olarak, sinir hücrelerinin uyarılabilme eşiğinin düşmesine ve epileptik nöbetlerin vuku bulmasına yol açmaktadır.⁵⁶ Ayrıca epileptojenik bölgelerde sodyum/potasyum-ATPaz (Na^+/K^+ -

ATPaz) aktivitesinin azalması nedeniyle ekstraselüler K^+ iyon yoğunluğu artmaktadır ve bundan dolayı nöronların uyarılması ve oluşan uyarının yayılması kolaylaşmaktadır. Epileptik nöronlarda Na^+/K^+ -ATPaz enziminde bir bozukluk ortaya çıkabileceği de düşünülmektedir.⁵⁶

Glial hücreler uyarılmış hücreden çıkan aşırı K^+ 'u alır ve depolar. Hücre dışı K^+ aktivasyonu glial emilim limitini aşarsa nöbet oluşur. Nöbetler sınırlı kalabildiği gibi çeşitli bölgelere anormal aktivite şeklinde yayılabilir. Başka bir neden de yine glial düzenlemede bozukluk oluşmasıyla ekstraselüler Ca^{2+} azalması sonucu sinaptik geçişin bozulmasına yol açmaktadır.³³ Ultrastrüktürel araştırmalarda epileptik sinirlerin dendritik uzantılarında azalma olduğu, yeni sinapsların oluştuğu, astrosit artışına bağlı olarak gliosis oluştuğu gösterilmiştir. Santral sinir sistemindeki zedelenmeyi izleyen doku kaybını astrositler çoğalarak doldurmaya çalışırlar. Oluşan bu glial skar dokusu fibriler gliosis olarak isimlendirilir. Bu süreçte astrositik yapısal bir protein olan glial fibriler asidik protein (GFAP) sentezi hasarına bağlı olarak artmaktadır. Nöron kaybı ile spesifik pek çok nöron hasarlı hastalıkta GFAP sentezinin arttığı saptanmıştır.⁵⁷

Glial hücreler; astrosit, oligodendrosit, ependimal hücre ve mikrogliyalardır. Astrositler glial hücreler içinde sayıca en çok olanıdır. Yapısal destek, metabolik değişimler ve onarımda görevlidir ve kan beyin bariyerinin elemanıdır. Nöronları, kılcal kan damarları ve pia mater'e bağlar. Gri madde içinde yer alan protoplazmik astrositler ve beyaz madde içinde bulunan fibriler astrositler olmak üzere iki tipi vardır. Astrositler küçük yıldız şekilli hücrelerdir ve sitoplâzmalarında hücre uzantılarına doğru ilerleyen, GFAP'tan oluşan glial iplik demetleri mevcuttur.⁵⁸

İnsan ve deney hayvan çalışmaları, epilepsideki reaktif astrositlerin glutamin sentetaz'a ek olarak Glu transporturlarından GLT-1'i down-regüle ettiğini göstermiştir. Bu durum astrositlerde aşırı salınma sonucu Glu artışına, nöron gruplarının senkronize

depolarizasyonunun ya da paroksizmal depolarizasyon shift'lerinin tetiklenmesine yol açabilir.⁵⁹ Nöbetler, nöronlardaki morfolojik değişimlerle birlikte astrositlerin yapı ve organizasyonunda kalıcı değişikliklere yol açmaktadır.^{59, 60}

2.2 Glutamat

Merkezi sinir sisteminde uyarıcı sinyallerin önemli bir aracısı olarak düşünülen L-Glutamat, muhtemelen biliş, hafıza ve öğrenme de dahil olmak üzere, normal beyin fonksiyonlarına bir çok yönden katılır.⁴ Glu santral sinir sisteminin gelişmesi, sinapsların tetiklenmesi ve eliminasyonu, hücre göçü, farklılaşması ve ölümü üzerine önemli rolü bulunmaktadır.⁵ Nöron hücre korpusu, dendritler, sinir uçları ve glial hücrelerin plazma membranlarında Glu reseptörleri bulunmaktadır.^{5, 61-63} Ayrıca periferik organ ve dokularda ve endokrin hücrelerde iletimde rol oynamaktadır.⁵

2.2.1 Glutamat konsantrasyonu

Beyin çok büyük miktarda Glu içerir (yaklaşık her ıslak kg başına 5–15 mmol), fakat bu miktarın çok az miktarı ekstrasellüler ortamda bulunmaktadır.⁵ Ekstrasellüler ve serebrospinal sıvıdaki konsantrasyonları sırasıyla 3-4 μM ve 10 μM dır.⁵ Glu'nun hücre plazmasındaki konsantrasyonu binlerce kattır en yüksek konsantrasyonda olduğu yer ise sinir uçlarıdır.^{5, 64}

Glu'nun enerji durumundaki değişimlere göre dinamik bir dağılım özelliği vardır. Hücrede enerji azaldığında Glu hücreye sızmaktadır⁵. Glu sürekli olarak hücreden salınır ve ekstrasellüler sıvıdan devamlı olarak uzaklaştırılması gerekir⁵.

2.2.2 Glutamat metabolizması

Glu'nun uzun süreli olarak düşük ekstrasellüler konsantrasyonlarında tutulabilmesinden sorumlu mekanizma Glu geri alınımıdır. Glu geri alınımı, plazma membranlarından taşıyıcı güç olarak elektrokimyasal yoğunluğu kullanan ve hem nöronlarda hem de glial hücrelerde bulunan Glu taşıyıcı proteinleriyle

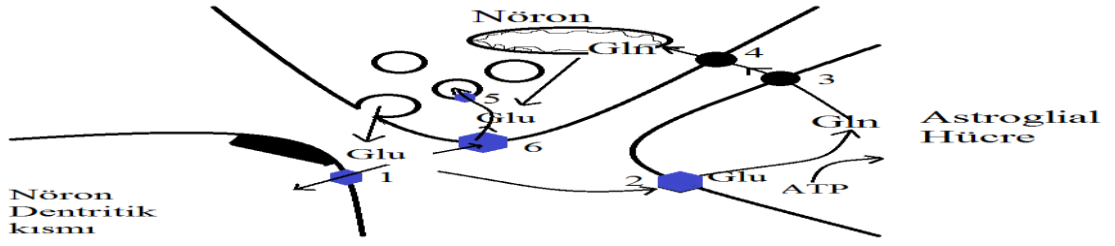
gerçekleşmektedir.⁵ Glu'ın salınması çok hızlı olduğundan, Glu geri alımının bloklanması sonucu saniyeler içinde ekstrasellüler ortamda Glu seviyesi aşırı derecede artmaktadır.⁵ Safılaştırılmış sinaptik veziküllerdeki Glu konsantrasyonu 60-210 mM olabileceği farklı çalışmalarda belirtilmiştir.^{65, 66} Ancak her ne kadar sinaptik veziküllerdeki Glu konsantrasyonları bilinse de, vezikül boyutlarında ki farklılıklar ve ekzositoz yapabilecek vezikül sayısı tam olarak bilinemediğinden, glutamaterjik sinir uçlarından Glu'ın ekzositozla ne kadar salınabileceği tam olarak bilinmemektedir.⁵

Glu'ın ekstrasellüler dönüşümü olmadığından, beyin dokusunun kendisini Glu toksisitesinden koruyabilmesi için çok yüksek bir Glu geri alım aktivitesine ihtiyaç duymaktadır. Gerçekte de sağlam beyin dokusunun Glu geri alımı oldukça fazla olup, Glu toksisitesine karşı dirençlidir.⁵ Buna karşın, kültürde ki korunmasız nöronlar ortamda birkaç mikromolar Glu varlığında dahi ölebilmektedirler.^{5, 67} Hücreler tarafından geri alınan (uptake) Glu ya metabolik olaylarda (protein sentezi, enerji metabolizması, amonyak metabolizması gibi) ya da nörotransmitter olarak kullanılabilir.⁵

2.2.2.1 Glutamat- Glutamin döngüsü

Glu sinir uçlarında veziküler Glu taşıyıcılarla sinaptik veziküllere taşınır ve daha sonra ekzositozla salınarak yeniden nörotransmitter olarak kullanılır.^{5, 68} Astrositlerde ekstrasellüler sıvıdan Glu'ın hücre içine taşınması sonrası glutamine (Gln) dönüştürülerek ekstrasellüler sıvıya salınır. Ekstrasellüler ortamda bulunan glutamin nöronlar tarafından alınarak yeniden Glu'a çevrilir. Astrositler ve nöronlar arasındaki Glu ile glutamin arasındaki bu trafik, transmitter olarak kullanılan Glu için ana yoldur ve "Glutamat- Glutamin siklusu" olarak isimlendirilir. Bu siklusta, ATP ve Ca^{+2} 'a bağımlı olarak sinir ucundan salınan Glu, presinaptik, postsinaptik ve ekstrasinaptik olarak astroglial hücreler de bulunan Glu taşıyıcıları tarafından alınır. Astroglialar ATP'ye ihtiyaç duyan

bir süreçle Glu'ı glutamine çevirerek toksik etkisini ortadan kaldırır. Daha sonra glutamin, glutamin taşıyıcıları aracılığı ile glial hücrelerden salınıp, başka glutamin taşıyıcıları ile nöronlara alınır. Nöronlarda glutamin yeniden Glu'a çevrilir. Sinaptik veziküller, veziküler Glu taşıyıcıları (vGluT) ile sitozoldeki Glu'la doldurulur (Şekil 2.1).⁶⁹ Glutamin, Glu'ın aksine toksik olmadığından ve Glu reseptörlerini aktive etmediğinden nörotransmisyonu olumsuz etkilemez.⁵



Şekil 2.1 Glutamat- Glutamin döngüsü

1-postsinaptik 2-ekstrasinaptik Glu taşıyıcıları, 3 ve 4- glutamin taşıyıcıları 5-veziküler Glu taşıyıcıları, 6- Presinaptik Glu taşıyıcıları, ATP- Adenozin trifosfat, Gln: glutamin, Glu: glutamat

2.2.2.2 Glutamat Sentezi

Glu astrosite geri alındıktan sonra iki farklı yolakla metabolize edilebilir. Birinci yolakta, Glu ATP-bağımlı glia-spesifik enzim olan glutamin sentetaz (GS) ile amidasyona uğrayarak glutamin ve amonyağa dönüşür.⁶⁴ İkinci yolakta ise, Glu dehidrogenaz (GAD) ile deaminasyon veya transaminasyonla (transaminazlarla) α -ketoglutarata çevrilebilir. Alfa-ketoglutarat trikarboksilikasit (TCA) siklusu ile suksinat, fumarat veya malata metabolize edilebilir. Malat trikarboksilik asit siklusu ile daha ileri metabolize edilebilir veya piruvata dekarboksile edilir ve laktata indirgenir. Oluşan glutamin ve laktat astrositten ekstrasellüler sıvıya geçer ve buradan nöronlara girer.⁵

2.2.3 Glutamat Taşıyıcıları

Glu, sinaptik aralıktan difüzyon ve Glu taşıyıcıları aracılığıyla nöron ve astrositler tarafından geri alınır. Hücre dışı ortamda bulunan yüksek konsantrasyonlarda Glu'ın nörotoksik etkilerine aracılık eden Glu reseptörlerinin sadece sinapslarda değil;

nöron soması, dendritler ve nöron sonlanmaları gibi nöronal unsurlarda da bulunması, nöronları Glu'nın eksitotoksik etkilerinden koruyabilmek için sadece sinaptik aralıktaki miktarının değil aynı zamanda ekstrasellüler ortamdaki miktarının da kontrol altında tutulması gerektiğini göstermektedir.^{5, 70-72}

Glu'nın hücre dışı ortamdaki miktarını bu transmitteri kimyasal yollarla parçalamak suretiyle düzenleyebilecek bir enzim sistemi bulunmamaktadır. Bundan dolayı Glu'nın hücre dışı miktarının düzenlenmesi için bir taşıyıcı mekanizmanın gerekliliği fikrini doğurmuş ve Na⁺ bağımlı bir taşıyıcı mekanizmanın Glu'ı özellikle astrositlere ve bunun yanında nöronlara geri taşımak suretiyle hücre dışı Glu miktarını kontrol altında tuttuğu tespit edilmiştir.⁵ Astrositler ve nöronlar tarafından gerçekleştirilen geri alımın büyük kısmı (%95 oranında) bahsedilen bu Na⁺ bağımlı ve yüksek afiniteli taşıyıcılarla ve az bir kısmı da (%5 oranında) Na⁺ bağımsız (Cl⁻ bağımlı Glu /sistin taşıyıcıları) bir mekanizmayla gerçekleştirilir.^{5, 73, 74} Glu taşıyıcıları, Na⁺ bağımlı bir taşıyıcı protein ailesidir. Şimdiye kadar belirlenmiş 5 alt tip Glu taşıyıcısı vardır: EAAT-1 (GLAST, Glutamate-Aspartate Taşıyıcı), EAAT-2 (Glutamate Taşıyıcı, GLT-1), EAAT-3 ((Excitatory Amino Acid Carrier, EAAC), EAAT-4 (Excitatory Amino Acid Taşıyıcı) ve EAAT-5. GLAST ve GLT-1 ilk defa sıçan, EAAC tavşan ve EAAT4 ile EAAT5 ise insandan izole edilmiştir. EAAT-1 ve EAAT-2 sıklıkla astroglial hücrelerde eksprese olurken, EAAT-3 ve EAAT-4 nöronlarda, EAAT-5 ise retinada yer almaktadır.⁵⁻⁷ EAAT-1 ve EAAT-2 neokortekste yaygın olarak bulunur.

Glu'nın sinaptik aralıktan uzaklaştırılması nörotoksitenin önlenmesi açısından aşırı derecede önemlidir. Epilepsi cerrahisi yapılan hastalarda cerrahi öncesi ve cerrahi sırasında yapılan tetkiklerde spontan ve stimulusa bağlı epileptik deşarj sırasında en çok epileptik hemisferde olmak üzere bilateral ekstraselüler Glu konsantrasyonunda geçici yükselme olduğu bildirilmiştir.^{11, 12} Aşırı ekstraselüler Glu ve Glu'nın sinaptik

aralıktan uzaklaştırılmasına ait mekanizmalardaki bozukluklar, başta epilepsi olmak üzere, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer hastalığı, Huntingon hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif birçok hastalıkta rol oynamaktadır.⁸⁻¹⁰ İnhibisyon çalışmaları özellikle EAAT-2'nin ekstraselüler Glu geri alımında ve nöral ağ eksitabilitesinde önemli rol oynadığını göstermiştir.^{13, 14}

2.2.4 Glutamat Reseptörleri

Glu reseptörleri (GluR); elektrofizyolojik özellikleri ve farmakolojik antagonizmaları göz önünde bulundurularak; 1-İyonotropik reseptörler (iGluR, ligand kapılı iyon kanalları) ve 2-Metabotropik reseptörler (mGluR, ACPD reseptörleri, G protein kenetli) olmak üzere iki ana grupta kategorize edilmişlerdir.⁷⁵⁻⁷⁷ Yapılan moleküler çalışmalar neticesinde ise üç farklı Glu reseptör proteini ailesi tanımlanmıştır (Tablo 2.1).^{75,}

78-80

Bu reseptör ailelerinden ilki bir Glu analogu olan N-metil-D-aspartat (NMDA) ile uyarılabilmektedir. Bu gruba ait olan NR1, NR2_A, NR2_B, NR2_C, NR2_D, NR3_A ve NR3_B reseptörleri NMDA reseptörleri olarak adlandırılmaktadır.

Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) ve kainat ile aktive olan diğer bir grup reseptör proteinine AMPA/Kainat reseptörleri denilmektedir. Bu grup AMPA ve kainat reseptörleri olarak ikiye ayrılmaktadır. GluR1-4 reseptörleri AMPA reseptörleri iken GluR5-9, KA₁ ve KA₂ reseptörleri kainat reseptörlerini oluşturmaktadır. NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri Glu kapılı iyon kanallarıdır ve iyonotropik Glu reseptörleri olarak anılmaktadırlar. NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri sodyumun hücre içine girişine, potasyumun hücre dışına çıkışına, membran depolarizasyonuna ve/veya alt ünite kompozisyonuna bağlı olarak hücreye Ca²⁺ girişine neden olmaktadır. AMPA reseptörleri düşük afinitelidir ve Glu ile uyarıldıklarında hızla açılırlar. Fakat duyarsızlaşmaları hızlıdır ve hızlı oluşan, çabuk sönen depolarizasyona sebep olurlar.^{81, 82} NMDA reseptörlerinin Glu'a afiniteleri daha yüksek ve inaktivasyonları yavaştır.

Metabotropik reseptörler (mGluR1-8) olarak adlandırılan üçüncü grup reseptörler G-proteinine bağlı reseptörlerdir.

Tablo 2.1 Glutamat reseptörleri

Metabotropik Reseptörler	İyonotropik Reseptörler		
	NMDA	AMPA/KAİNAT	
	Reseptörleri	Reseptörleri	
		AMPA	KAİNAT
mGluR ₁	NR1	GluR ₁	GluR ₅
mGluR ₂	NR2 _A	GluR ₂	GluR ₆
mGluR ₃	NR2 _b	GluR ₃	GluR ₇
mGluR ₄	NR2 _c	GluR ₄	KA ₁
mGluR ₅	NR2 _d		KA ₂
mGluR ₆	NR3 _A		
mGluR ₇			
mGluR ₈			

2.2.4.1 NMDA Reseptörleri

Eksttatör amino asit reseptörleri arasında Glu'a en fazla seçicilik gösteren reseptör tipidir. Glu kadar güçlü bir agonisti olmamasına rağmen sentetik agonisti N-metil-D-aspartat (NMDA)'a olan seçiciliğinden dolayı NMDA reseptörleri (NMDAR) olarak adlandırılmış, D-2-amino-5-fosfonovalerat (APV) ve α -metil-4-karboksifenilglisin tarafından selektif ve yarışmalı olarak bloke edilebilen, ligand (=Glu) kapılı iyon kanallarıdır. Bu iyon kanalları hipokampus, striatum, septum ve amigdalada fazla miktarda bulunur ve postsinaptik yerleşim gösterir.³

NMDA reseptörü göreceli olarak daha büyük miktarda Ca^{2+} geçişine izin vermektedir. NMDA reseptörünün uyarılarak iyon kanalının açılması için öncelikle NMDA reseptöründe bulunan glisin bağlama bölgesine glisinin bağlanması gerekmektedir. Glisinin bağlanmasından sonra Glu'ın bağlanması ile iyon kanalı

açılmaktadır lakin kanal içine bağlı bulunan Mg^{2+} iyonu nedeniyle hücre içine iyon girişi gerçekleşmemektedir. Bu Mg^{2+} iyonu sadece, reseptörü içeren nöron AMPA reseptörleri veya diğer hızlı depolarizasyona neden olan kanalların etkinleşmesi ile kısmen depolarize olduğunda bağlanma bölgesini terk etmektedir ve kanal açılmaktadır.

NMDA reseptörleri AMPA reseptörlerine oranla çok uzun süre açık kalırlar (AMPA reseptörlerinin açık kalma süresi milisaniyelerle ifade edilirken, NMDA reseptörleri yüzlerce milisaniye açık kalır). Dahası AMPA reseptörlerine göre Ca^{2+} geçirgenlikleri daha fazla miktarlardadır. Bu özellikleri NMDA reseptörlerinin, bellek oluşumu ve hareket regülasyonu gibi sinaptik plastisite içeren süreçler için uygun olabileceğini düşündürmektedir.⁸³

NMDA reseptör alt ünite genleri NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A ve NR3B'dir. NR3B alt ünitesi sadece kısmi genomik dizi olarak bilinmektedir. NMDA reseptörlerinin çoğu heteromerik NR1 ve NR2 alt ünitelerinden meydana gelmektedir (Örn: NR1/NR2A veya NR1/NR2C). NR1 temel alt ünite ve tüm NMDA reseptörlerinin bir bölümünü oluşturur. NR2 alt üniteleri kanalın açık kalma süresini, kanal geçirgenliğini ve Mg^{2+} duyarlılığını belirlemektedir.^{83, 84} NR3A alt ünitesi, NR1 ve NR2 kompleksinin tek kanal iletkenliğini azaltmaktadır ve özellikle embriyonik gelişimde NMDA reseptör fonksiyonunu sınırladığı düşünülmektedir.⁸⁵ Tüm bu genler farklı ekspresyon parçalarını izlemektedir.⁸⁴ NR1 geni çoğunlukla nöron tipi hücrelerde eksprese edilmektedir. Bazı hücrelerde (serebellar purkinje hücreleri, retina horizontal hücreleri ve medulla spinalis viseral motor nöron hücrelerinde olduğu gibi) eksprese edilen tek NMDA alt ünitesidir.⁸⁶

2.2.4.2 Kainat ve AMPA reseptörleri

Santral sinir sisteminde AMPA reseptörleri birçok sinapta genel amaçlı eksitator iletişiminden sorumludur.

AMPA reseptörleri GluR1-4 alt ünitelerinden oluşan heteromerlerdir. Komplekste GluR2 alt ünitesinin bulunması reseptörü Ca^{2+} 'a daha az geçirgen hale getirmektedir.⁸⁷ GluR4 alt ünitesine sahip reseptörlerin kinetiği daha hızlıdır. GluR1 mRNA'sı hipokampus, amigdala ve serebellar bölgelerindeki gliada bol miktarda görülürken GluR2 genel olarak her bölgede eksprese edilmektedir. Ancak serebellar granül hücreleri, neokorteks ve hipokampusta daha fazla miktarda izlenmektedir. GluR2 sadece GABAerjik internöronlarda daha düşük seviyelerde bulunmaktadır.⁸⁸ GluR3 en çok neokorteks ve hipokampusta bulunurken GluR4 serebellumda yüksek miktarda görülmektedir. Kainat reseptörlerinin cevapları AMPA reseptörlerine oranla daha azdır. Hipokampal CA1 bölgesindeki glutamaterjik sinapslarda, kainat reseptörü aracılı en yüksek sinaptik cevap AMPA reseptör cevabının onda birinden daha azdır.⁸⁹ Kainat reseptörleri tarafından başlatılan yavaş eksitasyon, aksiyon potansiyelinin başlatılma eşiğine yakın olan membran potansiyelini düzenlemekte ve sinaptik aktivite ile entegre etmektedir.⁸⁹ Kainat reseptörleri mGluR5-9, KA1 ile KA2'nin homomerik ve heteromerik komplekslerinden oluşmaktadır.^{89, 90} KA1 hipokampal CA3 piramidal hücreleri ile dentat granül hücrelerinde eksprese edilirken KA2 tüm beyinde orta düzeyde bulunmaktadır. KA1 ayrıca glial hücreler ve korpus kallosumda da görülmektedir.⁹¹⁻⁹³

2.2.4.3 Metabotropik glutamat reseptörleri

Metabotropik Glu reseptörleri (mGluR) G proteinleri ile ilişkilidir. Uyarılmaları hem elektriksel hem de metabolik olaylara neden olmaktadır. Sekiz farklı mGluR klonlanmış olup, bunlar farmakolojik özellikleri, amino asit benzerlikleri ve sinyal ileti sistemleri göz önünde bulundurularak üç gruba ayrılmıştır. Grup I (mGluR1 ve 5) fosfolipaz C ile ilişkilidir. Uyarılmaları fosfoinositollerin hidrolizine ve membran

depolarizasyonuna neden olur. Grup II (mGluR2-3) ve grup III (mGluR4, 6-8) ise iyon kanalları ve adenilat siklazın (AC) inhibisyonu ile ilişkilidir.⁹³

2.2.5 Glutamat ve Nörotoksisite

MSS'nin fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmesi için olmazsa olmaz bir transmitter olan Glu'nun⁹⁴⁻⁹⁶ hücre dışı ortamdaki miktarının hipereksitasyona bağlı nöronal eksitotoksisiteyi tetikleyecek konsantrasyonlara ulaşmasını engellemek için, ekstrasellüler Glu'nun Na^+ bağımlı ve yüksek kapasiteli bir transport mekanizması vasıtasıyla nöronlara ve özellikle de astrositlere geri taşınması ve hücre dışı konsantrasyonunun kontrol altında tutulması gerekmektedir.^{5, 73, 97, 98} Enerji bağımlı bu geri-taşıma mekanizmasının; hipoglisemi, hipoksi veya uzamış epileptik nöbetler gibi sebeplerle bozulan enerji metabolizmasına bağlı olarak yetersiz işlev görmesi ve/veya nöron ve astrositlerden aşırı Glu saliverilmesi, sinaptik aralıkta biriken Glu'a bağlı uyarının şiddetlenmesine ve Glu reseptörlerine bağlı kaskadların uzun süre ve daha güçlü işlemesine sebep olmaktadır.⁹⁸ Bahsedilen bu durum çeşitli nosiseptif, kognitif ve lokomotor hastalıklarla ilişkilendirilen nöronal hasarla yakından ilişkilendirilmektedir.⁹⁷ Şöyle ki bu reseptörlerin seçici ve yarışmalı antagonistlerinin nörodejenerasyona bağlı birçok patolojik durumda nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir.⁹⁹

Glu'nun hücre dışı ortamda yüksek konsantrasyonlara ulaşmasıyla aşırı uyarılan Glu reseptörleri (özellikle Ca^{2+} hücumuna müsaade eden NMDA reseptörleri) aracılığıyla hücre içerisine yoğun Na^+ ve Ca^{2+} akışı meydana gelir. Hücre içi tampon mekanizmalarının yetersiz kalması ile aşırı yükselen hücre için Na^+ ve Ca^{2+} yoğunluğunun bahsedilen eksitotoksisitenin birincil nedeni olduğu düşünülmektedir. Na^+ 'un hücre içi konsantrasyonlarındaki artış ile meydana gelen depolarizasyonu Cl^- ve suyun hücre içine girişi takip etmekte ve buna bağlı olarak da hücrede bazen tolere edilebilmekte bazen de hücre parçalanmasıyla sonuçlanan morfolojik şişme meydana

gelmektedir¹⁰⁰. Dendritler ve perikaryon şişmekte, bunu organel hasarı, çekirdek hasarı ve hücre ölümü izlemektedir.¹⁰¹ Bazı nörolojik hastalıkların oluşumunda akut eksitotoksik yoldan bahsedilmektedir. Bu hastalıklar arasında domoik asit zehirlenmesi, inme, hipoksik–iskemik beyin hasarı, hipoglisemik beyin hasarı, epilepsi-status epileptikus, kafa travması ve bazı diğer toksik ensefalopatiler bulunmaktadır. Ca^{2+} 'un artmış hücre içi düzeyleri ise kalpainler ve diğer proteazların, protein kinazların, nitrik oksit sentaz (NOS)'ın, kalsinörinlerin ve endonükleazların aşırı aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bahsedilen enzimlerin aşırı aktivasyonunun

- 1- aşırı miktarda hidrojen peroksit, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşmasına
- 2- hücre iskeleti teşekkülünde azalmaya
- 3- programlanmış hücre ölümüne (apoptozis) neden olan genetik sinyallerin oluşmasına
- 4- mitokondriyal hasara neden olduğu bilinmektedir.¹⁰²

Örnek olarak NOS'un Ca^{2+} kalmodulin etkileşmesi sonucu aktive olması hücre membranı hasarına ve mitokondriyal hasara neden olan hücre içi NO ve süperoksitlerin üretimini artırır¹⁰³ ve oluşan mitokondriyal hasara bağlı oluşan enerji üretiminin azalması hücrenin ölümüne ya da hasar görmesine neden olan kaskadları tetiklemektedir.⁹⁸

Anti-sense knockdown tekniğinin geliştirilmesi doğrultusunda sıçanlarda GLT-1 ekspresyonunun baskılanması, Glu geri alımını bozmuş ve sağlıklı sıçanlarda nörodejenerasyon ortaya çıkmasına neden olmuştur.¹⁰⁴ Daha sonra GLT-1 için knockout olan farelerde geri alımının ciddi miktarda azaldığı, epileptik nöbetlerin ortaya çıktığı ve nörotoksisiteye duyarlılığın arttığı belirtilmiştir.⁷ Bu bulgular Glu toksisitesinin, diğer yönleri ile normal olan hayvanlarda, nörodejenerasyon oluşturmakta etkili olduğu

düşüncesini güçlendirmektedir. Ancak nörodejenerasyon oluşması için Glu taşınmasının ne derece bozulması gerektiği henüz bilinmemektedir.

2.3 Valproik Asit

Epilepsi tedavisinde en sık kullanılan valproik asit, absans, miyoklonik, primer jeneralize ve tedaviye dirençli fokal nöbetlerin tedavilerinde kullanılabilen geniş spektrumlu bir antiepileptik ilaçtır.¹⁵ Valproik asidin tedavi edici etkisinin, merkezi sinir sisteminde inhibitör bir nörotransmitter olan gama amino butirik asit (GABA) üzerinden olduğu kabul edilmektedir. GABA'nın parçalanması (GABA aminotransferazdır) ve yapımında (glutamik asit dekarboksilazdır (GAD)) rol alan bazı enzimleri etkileyerek beyinde GABA düzeyini artırmaktadır. Valproik asit GAD aktive ederken GABA aminotransferazı zayıf bir şekilde inhibe eder. Ayrıca valproat, GABA'nın postsinaptik etkinliğini artırır, nöronal membranların potasyum iletiminde artışa neden olur ve aspartatın eksitator etkisini de azaltır.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Oral olarak alındıktan sonra emilim miktarı yiyeceklerden etkilenmeden hızlı ve tama yakın emilir. Plazmada en yüksek konsantrasyonuna ulaşma süresi 2-8 saattir, yarılanma ömrü ise 8 ila 18 saat arasındadır. Hızlı bir şekilde vücuda dağılır ve merkezi sinir sistemine dakikalar içinde ulaşarak plazma proteinlerine %90 oranında bağlanır. Karaciğerde konjugasyon ve oksidasyon ile metabolize edilir ve bazı metabolitlerinin antikonvülsan etkinliği vardır. Karaciğerde enzim indüksiyonu yapmaz fakat diğer ilaçların metabolizmasını sağlayan enzimleri inhibe ederek kan düzeylerini yükseltebilir ve boşaltım sistemi yoluyla ıtrah edilir.¹⁰⁸

En sık görülen yan etkiler gastrointestinal sistem yan etkileridir (iştah kaybı, bulantı, kusma, midede yanma hissi ve hazımsızlık gibi). Kilo alımı ve saç dökülmesi görülebilmektedir. Bu yan etkiler ilacın bırakılmasını gerektirmez fakat özellikle selenyum ve çinko içeren multivitamin bileşimleriyle kullanımı profilaktik tedaviyi

gerektirebilir. Bilişsel yetenekleri fazla etkilememekle birlikte tremor, ataksi ve sedasyon gibi nörolojik yan tesirler ortaya çıkabilmektedir. Antipsikotiklerle kombine olarak kullanıldığında sedasyon ve somnolans görülebilir. Valproik asit karaciğer fonksiyon testlerinde geçici yükselmelere neden olabilir. Valproat ile ilgili pankreatit tablosu ender görülmekle birlikte genellikle tedavinin ilk 6 ayı içinde ortaya çıkmaktadır. Hematolojik yan tesirlerde en çok trombositopeni ortaya çıkmaktadır. Valproat teratojenite potansiyeli olan bir ilaçtır ve gebeliğinin ilk üç ayında kullanımı durumunda bebeklerin % 1-2'sinde nöral tüp defektleri görülebilmektedir. Yan etkiler içinde baş ağrısı, sedasyon ve iritabilite en fazla tespit edilendir.¹⁰⁹⁻¹¹¹

Lityum ve karbamazepin gibi ilaçlar valproatın yan etkilerini artırabilir. Lityumla birlikte kullanıldığında tremor en sık görülen yan etkilerden biridir. Klasik antipsikotik ilaçlarla bir arada kullanıldığında hastalarda sedasyon düzeyinde artma ve antipsikotiklerin ekstrapiramidal yan etkilerinde artış görülmektedir.¹¹²

Valproat, monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri, trisiklik antidepresanlar (TAD) ve seçici serotonin geri-alım inhibitörleri (SSRI) gibi antidepresan ilaçlarla birlikte güvenilir biçimde kullanılabilir ancak amitriptilin veya fluoksetin ile birlikte kullanıldığında serum valproat düzeyinde artışa neden olmaktadır.¹¹²

2.4 Seftriakson

β -laktam bir antibiyotik olan seftriakson çeşitli bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılan bir ilaçtır. Ancak çeşitli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde terapötik potansiyeli çok az çalışılmıştır. Seftriakson üzerinde yapılan son çalışmalarda sinapstan Glu'n hücre içine alımından sorumlu olan GLT1/EAAT2'de dahil olmak üzere, proteinlerin bir dizi ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir.^{16, 17} Fokal serebral iskemide seftriakson uygulanması iskemik zararı düşürdüğü rapor edilmiştir.¹¹³ Çalışmamızda seftriaksonun Glu üzerinde özellikle Glu taşıyıcıları ve ilişkili enzimlerde

ne gibi değişimler meydana getirdiği araştırılarak epilepsi (tutuşma modelinde) üzerinde olumlu veya olumsuz etkileri belirlenmeye çalışıldı.

2.5 Deneysel epilepsi modelleri

Epilepsinin altında yatan temel patofizyolojik mekanizmaların anlaşılmasında, uygun olan ilaçların üretilmesinde, yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Deneysel epilepsi modelleri antikonvulsan ilaçların uygulanması (penisilin, Ba, Co, Fe, Ni, Cd), GABAerjik antagonistlerin (bikukullin, pikrotoksin, pentilentetrazol (PTZ)), nörotoksinler (kainik asit, pilokarpin, tetanos toksini) ve lezyon uygulamaları ile ortaya çıkartılır. Ayrıca bazı elektriksel uyarılar ile de nöbet oluşturulabilir.¹¹⁴

Deneysel epilepsi modelleri altı başlıkta inceleyebiliriz: ¹¹⁴

1- Basit parsiyel (akut)

- a) Topikal konvulsanlar (penisilin, bikukullin v.b.)
- b) Akut elektriksel uyarı
- c) GABA kesilmesi
- d) Neokorteks dilimleri

2- Basit parsiyel (kronik)

- a) Kortekse metal verilmesi (Alüminyum hidroksit, Kobalt, inko, Demir v.b.)
- b) Kriyojenik hasar
- c) Gangliosit antikor verilmesi
- d) Sistemik fokal epileptogenez

3- Jeneralize tonik-klonik

- a) Genetik (ışığa duyarlı babunlar, farede sesle oluşan nöbetler, paytak ve E1 fareleri, sıçan gerbil ve drozifola)
- b) Maksimal elektrik şoku

c) Kimyasal konvulsanlar (PTZ, penisilin v.b.)

d) Metabolik düzensizlik (hipoksi, hiperglisemi, hiperbarik oksijen, yüksek ısı)

4- Kompleks parsiyal

a) Kainik asit, tetanos toksini

b) Fırtınalar alanına enjeksiyon

c) Tutuşma

d) Beyin dilimleri

5- Jeneralize absans

a) Talamusun uyarılması

b) Bilateral odak

c) Sistemik penisilin

d) Gama- hidroksi-butirat

e) i.v. opiat v.b.

6- Status epileptikus (SE)

a) Lityum-pilokarpin

b) Kobalt-hemosistein

c) Tekrarlayan uyarılma

2.5.1 Tutuşma Modeli

Tutuşma modeli nöral devrelerde ki nöbete yanıt olarak uzun süreli ilerleyici yapısal ve fonksiyonel değişimlerin anlaşılmasında efektif bir modeldir ¹¹⁵. Tutuşma modelinde tekrarlayan kimyasal ya da elektriksel uyarının beyine verilmesi başlangıçta nöbet oluşturmaz zamanla nöbet eşiği düşer ve nöbetler oluşur.¹¹⁶

Sıçanlarda tutuşmanın en iyi olduğu beyin bölgeleri bulbus olfaktorius ile onun hedefi olan priform korteks, amigdalalar ve hipokampustur. Akut epileptik cevap oluşturmada en düşük eşikli bölge hipokampustur. Amigdala ve priform korteksin

motor sistemler ile kuvvetli bağlantılara sahip olmaları, bu yapılarda tutuşmayı kolaylaştıran en önemli sebep olabilir. Özellikle priform korteksin III. tabakasının da spontan deşarj yapan peysmeykır hücrelerinin varlığı tespit edilmiştir.¹¹⁴

Çoğu epilepsi modelinden farklı olarak tutuşma modeli kalıcı ve progresiftir ve önemli bir doku hasarı olmaksızın nöbet duyarlılığında kalıcı bir artışa neden olmaktadır. Tutuşma modelinin elektrografik ve davranışsal bulguları insandaki kompleks parsiyel nöbetleri çok iyi taklit ettiği için klinik epilepsi modelinin iyi bir karşılığıdır.¹¹⁷

2.5.1.1 Kimyasal Tutuşma Modeli

Tutuşma elektriksel uyaran ya da PTZ, karbakol, kokain, lidokain gibi kimyasal konvulsanlarla ortaya çıkartılabilir.¹¹⁴ Kimyasal tutuşma modeli oluşturmak için sistemik olarak kullanılan konvülsan ajanlar;¹¹⁷

1. GABA_Aerjik antagonistler: PTZ, Beta karbolin, Pikrotoksin, Bikukullin
2. Nörotoksik ajanlar: Endosülfan, Lindan, Dieltrin, Trimetilprofan
3. Lokal anestezikler: Lidokain, Kokain

Deneyisel tutuşma modeli için kullanılan kimyasallardan PTZ, konvulsif bir fenomen olan amigdalanın elektriksel olarak tutuşturulmasına benzerliği ve insandaki jeneralize tonik-klonik nöbetlere uygunluğundan dolayı sık olarak kullanılmaktadır.^{18,}

19

2.5.1.2 Pentilentetrazol'ün Etki Mekanizması

Kimyasal tutuşma modeli oluşturmada en sık kullanılan ajan PTZ'dir. PTZ nonkompetitif bir GABA_A reseptör antagonistidir. Tekrarlayan PTZ enjeksiyonları giderek uzun süren nöbetlerin gelişmesine neden olur.²⁰ PTZ GABA_A'nın pikrotoksin bağlanma bölgesine etkileyerek GABA aracılı Cl⁻ girişini bloke etmesi ile membran

depolarizasyonu oluşturur ve devamında nöbet aktivitesinin güçlenip, sürdürülmesine neden olur.^{20, 118, 119}

PTZ nöbetleri, retiküler formasyon, anterior medyal talamusun çevresindeki diensefalik bölgeler, kaudal hipotalamus, bulbar bölgeler gibi yaygın bir alanda rol oynar, bu bölgeler spinal korda inen motor yollarla bağlantılıdır.¹²⁰



3. MATERYAL ve METOT

3.1 Deney Hayvanları ve PTZ Tutuşma Modelinin Oluşturulması

Çalışmada, ağırlıkları 200 ± 20 gr olan 10–13 haftalık albino Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar Atatürk Üniversitesi ATADEM Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deneylere başlamadan önce Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na müracaat edilerek izin alındı (AÜHADYEK/36643897-180/148 (EK-2)) ve deney süresince etik kurallara uyuldu.

Tutuşmanın oluşturulması için haftanın üç günü birer gün aralıklı olarak (Pazartesi-Çarşamba-Cuma) 35 mg/kg PTZ intraperitoneal olarak hayvanlar tutuşana kadar verildi. Enjeksiyonu takiben hayvanlar 35x35x35 cm boyutlarındaki cam gözlem kafeslerinde otuzar dakika boyunca gözlemlendi. Hayvanların nöbet davranışları W. Fisher ve H. Kittner'in yaptığı çalışmaya göre skorlandı.¹²¹

Bu skorlamaya göre;

Evre 0: Nöbet aktivitesi yok

Evre 0.5: Zayıf bas sallama

Evre 1: Kulak, yüz ve göz kapağı seğirmeleri

Evre 1.5: Ön ekstremitelerde ılımlı klonik aktivite

Evre 2: Miyoklonik vücut jerkleri, yükselme olmaksızın klonik ön ekstremitte konvülsiyonları

Evre 2.5: Sık klonik ön ekstremitte konvülsiyonları, kısa süreli (tam olmayan) yükselme

Evre 3: Tam yükselme ile birlikte ciddi bilateral ön ekstremitte klonusu (≥ 10 saniye) (Kanguru pozisyonu)

Evre 3.5: Ciddi bilateral ön ekstremitte klonusuna ek olarak yükselme ve düşme

Evre 4: Yükselme-düşme epizotları veya sıçramalarla birlikte jeneralize klonik konvülsiyonlar

Evre 4.5: Düzelleme refleksinin kaybı ile birlikte jeneralize klonik-tonik nöbetler (ön ekstremitenin tonik ekstansiyonu)

Evre 5: Generalize klonik-tonik nöbetler ve status epileptikus (≥ 2 dakika)

Evre 3 veya daha şiddetli beş nöbet geçiren hayvanlar tutuşmuş olarak kabul edildi. Enjeksiyonlar 27 güne kadar yapıldı. 27. enjeksiyon sonunda tutuşmayan hayvanlar deney gruplarından çıkarıldı. Tutuşan hayvanlar deneylere alındı.

32 hayvana tutuşturulmak için PTZ enjeksiyonu yapıldı. Bu hayvanlardan 18 tanesi 5 nöbet geçirdi. 7 hayvan 27 enjeksiyon süresince 3 den fazla nöbet geçirmedi ve gruplardan çıkarıldı. Geri kalan 7 hayvan ise 1-5 arasında değişen nöbet sayısında nöbet esnasında öldü. Ölen hayvanlara en fazla 10 kez ilaç verilebildi ölümleri ise 1,3,5,8 ve 10. dozlar oldu. Beş kez nöbete giren hayvanların doz ve hayvan sayıları Tablo 3.1' de verildi.

Tablo 3.1 Tutuşma dozu ve hayvan sayısı

Doz sayısı	Hayvan sayısı
11. doz	3
12. doz	3
13. doz	4
15. doz	4
19. doz	1
23. doz	3
Toplam	18

3.2 Kimyasallar ve Verilişleri

Pentilentetrazol (PTZ): Serum fizyolojikte çözüldü. Kilograma 35 miligram dozunda oranlanarak periton içine (i.p.) enjeksiyon yoluyla verildi.

Valproik asit (VPA): Distile suda çözüldü. Kilograma 350 mg oranında i.p. verildi.

Seftriakson (Sef): Serum fizyolojikte çözüldü. Kilograma 200 mg oranında i.p verildi.

Üretan: Distile suda çözüldü. Kilograma 1,25 gr oranında %25'lik olarak i.p. verildi.

3.3 Deney Grupları:

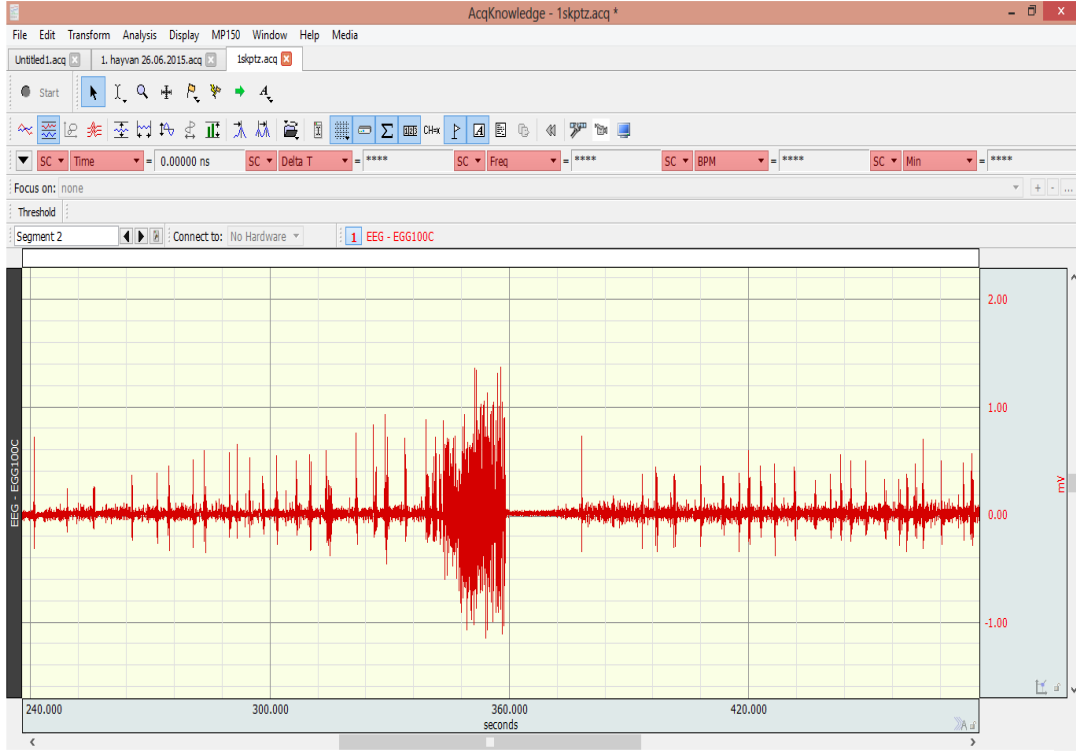
- 1. Kontrol Grubu:** Diğer gruplara yapılan enjeksiyon sayısınca ve süresince intraperitoneal serum fizyolojik enjekte edildi. (n = 6)
- 2. PTZ grubu:** 35 mg/kg intraperitoneal PTZ enjeksiyonu yapıldı (n = 6)
- 3. VPA Grubu:** Tutuşma oluşuncaya kadar 35 kg/mg i.p. PTZ, tutuşma oluştuktan sonra 15 gün süreyle 350 mg/kg VPA i.p. olarak verildi. (n = 6)
- 4. Sef Grubu:** Tutuşma oluşuncaya kadar 35 kg/mg i.p. PTZ, tutuşma oluştuktan sonra 15 gün süreyle 200 mg/kg Sef i.p. olarak verildi. (n = 6)

3.4 EKG Kaydı Alınması

Deneyde kullanılan hayvanlar cerrahi operasyona alındı. Üretan anestezisi altındaki hayvanların beyin aktivitelerini kaydedebilmek için kafataslarına kalıcı vida elektrotlar monte edildi. Bunun için hayvanlar 1 gr/kg Üretan ile anestezide alındı. Her bir hayvanın kafası stereotaksik alete yerleştirildi. Kafa derisi rostro-kaudal doğrultuda 3 cm uzunluğunda bir insizyonla açıldı. İnsizyonun ardından kafatası, üzerindeki fasya ve tendon uzantılarından arındırıldı. Daha sonra, bir tur motoru aracılığıyla kafatası üzerine 1 mm çapında, 1 mm derinliğinde 2 adet delik açıldı. Bu deliklere paslanmaz çelikten yapılmış vida elektrotlar yerleştirildi. Açılan delikler; 1. Bregma noktasının 3 mm anteriorunda orta çizginin 3 mm sol laterali, (pozitif elektrot) 2. Bregma noktasının 3 mm posteriorunda orta çizginin 3 mm sol laterali, (negatif elektrot) koordinatlarında yapıldı. Topraklama ise hayvanın derisine sabitlendi.

Her bir hayvan için 10 dakika süreyle bazal seviye belirlemesi için EKG kaydı alındı. Tutuşmuş hayvanlara 10 dakika sonunda PTZ enjeksiyonu yapılarak EKG kaydı alınmaya devam edildi. EKG kayıtları BIOPAC System MP150 modeliyle

yapıldı. Diken dalga kayıtlarının eldesinde kullanılan paket program ve kayıt anından bir görüntü Şekil 3.1’de verildi.



Şekil 3.1 EKoG kayıt görüntüsü

3.5 Voltametri Kayıtları

3.5.1 İn Vivo Voltametri

3.5.1.1 Mikroelektrot (ME) Kalibrasyonu

ME'nin platinden oluşan kayıt alanları peroksit ve Glu'a farklı yanıtlar oluşturabilmektedir. Elektrot eğimlerinin tespiti için invivo hayvan kayıtları alınmadan in-vitro kalibrasyon gerekmektedir. Bundan dolayı kalibrasyonlar, L-glutamattan açığa çıkardığı peroksitten vuku bulan analit yoğunluğundaki farklılığı, peroksit yükseltgenmesiyle ortaya çıkan akım farklılıklarını eşitleme amacıyla kullanılır. Konsantrasyonunu bildiğimiz hedef madde, 37 °C'de 0.05 Molar 40 ml'lik PBS çözeltisine eklenerek FAST-16 sisteminde ölçülebilen piko amper düzeyinde akım meydana çıkarır ve bu kayıtları kaydederek veritabanında saklar. Ayrıca askorbik asit

(Aa) gibi bilinen interferentler, kalibrasyon sırasında teste eklenir ve istenilen hedef maddenin Aa'ya göre ayırıcılığı belirlenir. Canlı deneyi esnasında kalibrasyon verileri ile karşılaştırılarak hedef maddenin yoğunluğunun tespitinde kullanılır.

3.5.1.2 ME Kalibrasyona Hazırlığı

Nafyonla kaplanmış ME'lar, 37 °C'de 0.05 molarlık PBS'de en az 30 dakika bekletilir. Bu bekletme ölçülecek maddenin nafyon tabakasından daha iyi difüze olması ve enzim tabakasının aktivasyonuna önemlidir. Ancak mPD ile kaplanmış ME'lar suda bekletilmemelidir. ME ucunun, mPD ve kalibrasyon çözeltisinde bekletildiği süre, uygun enzim etkinleşmesinde yeterlidir. Bütün depo L-glutamat kalibrasyon çözeltileri didistile suda hazırlanır.

Çözeltiler:

20 milimolar Askorbat

20 milimolar Glu sodyum tuz hidrat

2 milimolar DA

8.8 milimolar H₂O₂ olarak hazırlanır

Çözeltiler +4⁰C'de saklanır. H₂O₂ ve Aa hazırlanmalıdır.

3.5.1.3 Kalibrasyon prosedürü

0.05 M PBS'den 40 ml alınarak 50 ml'lik behere konur. L-gutamat oksidazın aktivasyon sıcaklığı 37 °C olduğundan PBS 37°C'ye ısıtılır. Ag/AgCl referans elektrodu sıvı içerisine sokulur ve sıvı karıştırıcı ile yavaşça karıştırılır. ME'nin ölçüm alanı sıvı içerisine sokulur. FAST 16 ölçüm sisteminde Glu'ı ölçebilmemiz için ME'ye +0.7 voltluk gerilim uygulanır. Bu voltaj farklı maddeler için farklılık gösterir. Kalibre işlemine geçildiğinde yaklaşık 15–20 dakika akımın minimal seviyeye inmesi beklendi. Akım Sabit (taban) seviyesi inince yazılım taban değer tuşuna basılıp 20 mM Aa'dan 500 µl eklenerek ve birkaç dakika akımın sabitlenmesi beklendi. Akım sabitlenince 20

mM L-glutamattan 40 µl üç kere periyodik olarak eklendi ve kaydedildi. Bu sonuçlar test edilen maddenin, ayırıcılığını kontrol etme amacıyla enzim kaplı ve enzim kaplı olmayan referans kayıtlarının normalleştirilmesinde kullanıldı. Test maddesinin ilavesi, ölçülen maddenin ölçüm değerinin hesaplanmasında etkide bulunmaz. Hayvan çalışmasında kullanılacak bütün kimyasal maddelerin, ME kayıt bölgelerinde hiçbir şekilde ölçülmeyeceğinden emin olunmalıdır bu bize alacağımız dataların güvenilirliğinde belirleyici olacaktır. Kalibrasyonun bitiminde program durduruldu veriler kaydedildi. ME çözeltiden çıkarılıp saklandı.

3.5.1.4 ME kalibrasyon kriteri

Normalizasyon sırasında kayıt sistemi, Glu'nun Aa'ya göre ayırıcılığı, ME duyarlılığını, belirleme limitini (LOD) ve doğrusallığı (R^2) analiz yardımcısıyla belirler. İyi bir ME'de düşük R^2 ender görülürken Glu'a karşı cevabın anlamlı olabilmesi için değerinin 0.99 eşit veya küçük olması idealidir. ME'nin hassasiyeti, Glu değişimlerdeki ölçüm kalitesini göstermektedir. Ayrıca hassasiyet değeri ME'nin kullanılabilmesinde en güvenilir ölçüt olan tespit edebilme limitinin hesaplanabilmesinde de kullanılmaktadır. ME kullanımında duyarlılık yanıltıcı olabileceğinden LOD değeriyle birlikte kullanılmaktadır. LOD ME için belirteçtir. Deneyde kullandığımız ME LOD değerleri 0.2–1 µM olması gerekmektedir.

Duyarlılık; Glu'nun Aa gibi maddelere göre seçicilik oranını göstermektedir. Glu'a olan seçiciliğin Aa'ya seçiciliğe bölümüyle hesaplanmaktadır. Yani 100/1 seçici ME demek, 100 µM'lık Aa yoğunluğundaki artışının Glu'ta yalnızca 1 µM yoğunluk değişimine neden olacağını ifade etmektedir ve ME'nin Aa'yı %99 etkinlikte engellediğini belirtmektedir. Bu seçicilik değeri ve üzeri iyi ve ideal olmakla birlikte 20/1 duyarlılıkta kullanılabilir.

3.5.1.5 Lokal ilaç vermek için cam mikropipetler

ME kalibrasyonları bitince, hayvan deneylerinde belirteç maddenin lokal olarak canlıya verilebilmesi amacıyla cam mikropipetin ucu kayıt alanlarını ortalayacak şekilde ME'ye sabitlendi. Mikropipetlerin hazırlamada vertikal pipet çekici kullanıldı. Bu pipet çekici ısı kullanarak çekme işlemi yapar. Mikroskop altında 12–15 mikromilim olacak şekilde mikropipetin en ucu kırılarak hazırlandı.

3.5.1.6 Ag/AgCl Referans elektrodu

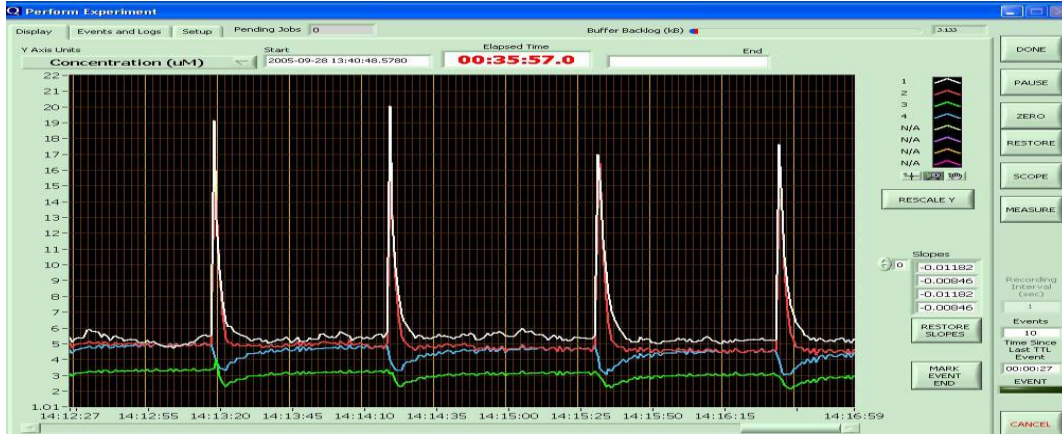
İnvivo çalışmalarda kullanabilmek için küçük çapta referans elektrot gereklidir. Bu yüzden tel yapıda Ag-AgCl referans elektrot her deneyin başlangıcında hazırlanması gerekmektedir. Bu elektrot, gümüş tel ve NaCl ile doyurulmuş 1 M HCl çözeltisiyle hazırlandı. Gümüş telin bir ucu çözeltiye sokuldu diğer ucu ise güç kaynağının + ucuna bağlandı. Yaklaşık 10–15 dakika elektrik potansiyeli uygulandı. Uygulanan potansiyel, kloru gümüş tele doğru hareketlendirdi ve AgCl referans tel oluşturulmuş oldu.

3.5.2 Verilerin Analizi

Pikosipritzer III ve ek donanımlar kayıt cihazına eklenir. Cam mikropipet içerisinde eklenen çözelti basınçla enjekte edildiğinde sistem yazılımı aktiviteleri kaydeder. Kaydedici sistem, her 4 kanalda otomatik olarak bilgileri, zamanı ve basınç enjeksiyon uygulamalarını kaydeder.

Çözelti yoğunluğundaki maksimal değişiklik, L-glutamat verisinin maksimum genişliği olduğu düşünülür ve μM olarak kaydedilir. Sonrasında ise sinyalin maksimum genişliği uyarıma neden olan hacmi belirlenir. Enjekte edilen miktar stereomikroskop aracılığıyla belirlenir. Sıvı miktarındaki değişim cam pipetin iç çapına göre kalibre edilir. (kullanmış olduğumuz cam pipetin mm'de sıvı hacmi 250 nL'dir). Cam pipetten verilen çözelti miktarı nanolitre olarak kaydedilir ve sonra genişlik/nanolitre ($\mu\text{M} / \text{nL}$) sinir hücrelerinin uyarılabilirlik miktarını verir. Sonuç olarak sinyalin temel seviyeden

maksimum miktara ulaşma süresi, pik süresi olarak tanımlanır (TR). Bu baseline'dan maksimal değere çıkıp daha sonra tekrar baseline iniş süresi T_{100} olarak tanımlanır. Genel olarak da bu sürenin %80'lik kısmı olan T_{80} iniş zamanı değerlendirilmektedir. Şekil 3.2. deki kırmızı ve beyazla gösterilen çizgiler enzimle kaplı, mavi ve yeşil çizgiler ise enzimsiz bölgelerdeki Glu miktarlarını vermektedir.



Şekil 3.2 FAST-16 kayıt sistemi L-glutamat ölçümleri

3.5.3 İn Vivo Hayvan Kayıtlarının Alınması ve Deneyin Uygulanışı

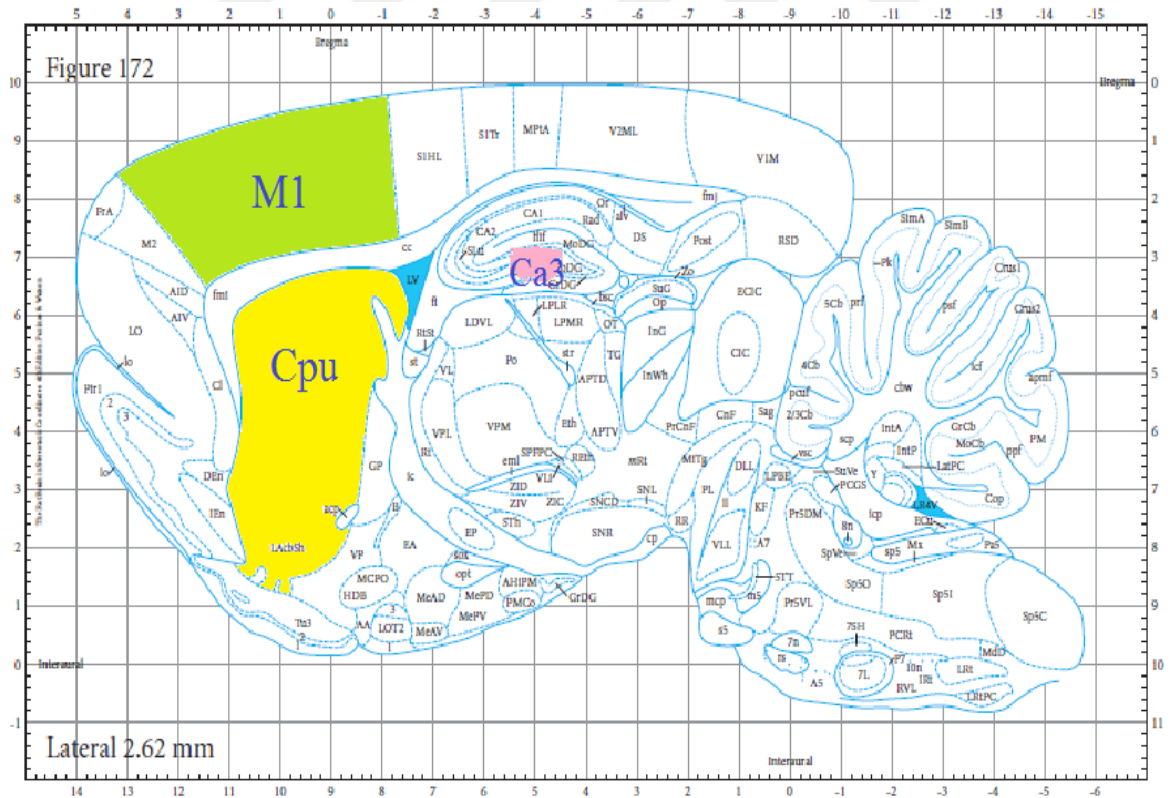
ME kalibre edildikten sonra sıçanlar ürethan ile anestezi edildi. Denek, anestezi işleminden sonra stereotaksi cihazına koyuldu. Hayvanın vücut ısı 37°C ' de sabitlenebilmesi için yanlardan ısıtıcı destekler yerleştirildi. Kafatasının orta hattından kesi yapıldı. Forseps kullanılarak dura yana alındı ve kafatası kemiğine ulaşıldı. Sıçanlar için 107 nolu delici ile kafatası delindi. AgCl referans elektrodu için küçük bir oyuk açıldı. Kaplanmış referans elektrot beyine sokularak dış dolgu maddesiyle bu kısımda sabitlendi.

Mikromanipülatör, stereotaksik cihaza birleştirildi buda ME'nin mikrometrelik değerlerde konumlandırılmasında kullanıldı. Cam mikropipet, mikroelevtroda sabitlenerek içerisi çözeltiyle dolduruldu. Pikosipritzer III, cam mikropipete iliştilirdi. Basıncılı enjeksiyonla ön kontrol yapıldı. ME önceden belirlenen beyin bölgesine indirilirdi. Kalibrasyon parametreleri FAST-16 veri tabanından geri çağırıldı. ME taban

seviyeye ulaştığında (yaklaşık 15-20 dakika) deneye başladı. Beynin istediğimiz bölgesine stereotaksik olarak güvenli şekilde girilebilmesi için hayvan ağırlıkları 270-310 gr arasında tutuldu. Stereotaksik olarak girilen 3 boyutlu koordinatlar Tablo 3.2 (Bregma noktasına göre) verilmiştir. Bu bölgeler CA3, M1 ve Cpu olmak üzere 3 bölgedir (Şekil 3.3). Beyin bölge koordinatları Paxinos & Watson'un The Rat Brain in stereotaxic coordinates 6th edition beyin atlasına göre belirlendi.

Tablo 3.2 Rat beyin bölge koordinatları

Düzlem	X	Y	Z
CA3 (Kornus Ammonis)	1	-2.04	3.8
M1 (Primer Motor korteks)	2.4	3	1.6
Cpu (Kaudatum putamen)	2.2	1.8	4.5



Şekil 3.3 Voltametri kayıtları alınan sıçan beyin bölgeleri

3.6 Moleküler Çalışmalar

3.6.1 Beyin Dokularının Alınması

Steriotaksi cihazı kullanılarak beyinin CA3, M1 ve Cpu olmak üzere 3 bölgesi işaretlendi ve bu bölgeler soğuk zincir üzerinde çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokularından RNA izolasyonu yapıldı.

3.6.2 RNA İzolasyonu

Alınan her bir beyin bölgesi (bölgeye göre 5-10 mg) 2 ml'lik steril deney tüplerine alındı ve üzerine 1 ml qiazol eklendi. Doku parçalayıcıya (Tissue Lyser II/Qiagen) yerleştirilerek 2.5 dakika parçalamaya tabi tutuldu. Homojenizasyondan sonra her tüpe 200 µl kloroform eklendi ve karıştırıldı. 15 dakika 12000 G'de santrifüjlendi. 500 µl'lik süper natant kısmı alınarak 1.5 ml'lik deney tüplerine eklendi. Daha sonra örnekler RNeasy Lipid Tissue Mini Kit 50 (Qiagen) RNA izolasyon kiti kullanılarak Qiacube (Qiagen) cihazında total RNA izolasyonu yapıldı ve spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile 260 nm'de ölçüldü.

3.6.3 cDNA Sentezleme

Qiagen Quantitect Reverse Transcription Kit kullanılarak Roche Light Cycler Nano PCR cihazında cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi aşağıdaki protokole göre yapıldı. cDNA miktarı spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüm belirlendi ve -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.3 Genomik DNA eliminasyon reaksiyon karışımı

Karışım İçeriği	Hacim
gDNA Temizleme Tamponu,7X	2 mikrolitre
Total RNA	Miktara göre değişebilir
RNaz içermeyen su	Değişken
Toplam	14 mikrolitre

Karışım Tablo 3.3'e göre hazırlandı ve 42 °C'de 2 dakika inkübasyona bırakıldı. 2 dakika sonunda cihazdan alınarak soğuk zincir üzerine alındı. Revers-Transkripsiyon (RT) reaksiyonu için karışım hazırlandı (Tablo 3.4). Hazırlanan karışım PCR cihazında;

15 dakika 42 °C ve

3 dakika 95 °C inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.4 Reverse Trankripsiyon reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim
Ana Karışım	1 mikrolitre
RT Tampon	4 mikrolitre
RT Primer Karışım	1 mikrolitre
Toplam	6 mikrolitre

İnkübasyon tamamlandıktan sonra cDNA kütüphaneleri alınarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.6.4 Real-Time PCR Çalışmaları

Roche Fast Start Essential DNA Probes Master Kit (Roche), Applied Biosystems B-actin (AB System) kullanılarak elde edilen cDNA'lardan Roche Light Cyclers Nano cihazında RT-PCR yapılarak sonuçlar elde edildi. RT-PCR protokolü 95 °C'de 10 dakika ve 60 °C'de 45 saniye, 95 °C'de 15 saniye 45 döndü olacak şekilde uygulandı.

Kantitatif ölçümü yapılan genlere ait primer prop baz dizilimleri Tablo 3.5'de verildi.

Tablo 3.5 Genlere ait primer prop dizilimleri

Gen İsmi	Primerler	Primer Baz Dizilimleri
Slc1a1 (EAAC1)	İleri Primer	AATCGTGGGCCTGTACTCAG
	Geri Primer	AGTCCAAAGACGAGGCAGAA
	Tagman Prop	_{FAM} -ACGGCATCAACGTCCTGGGC ⁶⁶ TAMRA
Slc1a2 (GLT-1)	İleri Primer	AGG AATCATGTCAACCAAGC
	Geri Primer	TGTGGGAATCTGGTGAAACA
	Tagman Prop	_{FAM} -TGCATCCAGCATGGTGGGAC ⁻ TAMRA
Slc1a3 (GLAST)	İleri Primer	AACATCAACGAGGGTGAAG
	Geri Primer	CAGAGGGCTCCCATGAGTA
	Tagman Prop	_{FAM} -TTCAGGCGAGGCAGCTCCAG ⁻ TAMRA
GluL (Glutaminaz)	İleri Primer	TGTTGGACAGGTAGCCAGTG
	Geri Primer	AGTTGACCAGCCAACTCATAC
	Tagman Prop	_{FAM} -TTGCCGCCACTG ^{-TCCCTGG-TAMRA}
Gls (Glutamin Sentetaz)	İleri Primer	CGGTTTCTGCCCAATTACTG
	Geri Primer	TGCCACAGGAGTGCATTAAG
	Tagman Prop	_{FAM} -TCAGTCCTGAGGCCGTTTCGGA ^{-TAMRA}
B-aktin	Rn00667869_m1 (Tagman Gene expression assays, Applied biosystems)	

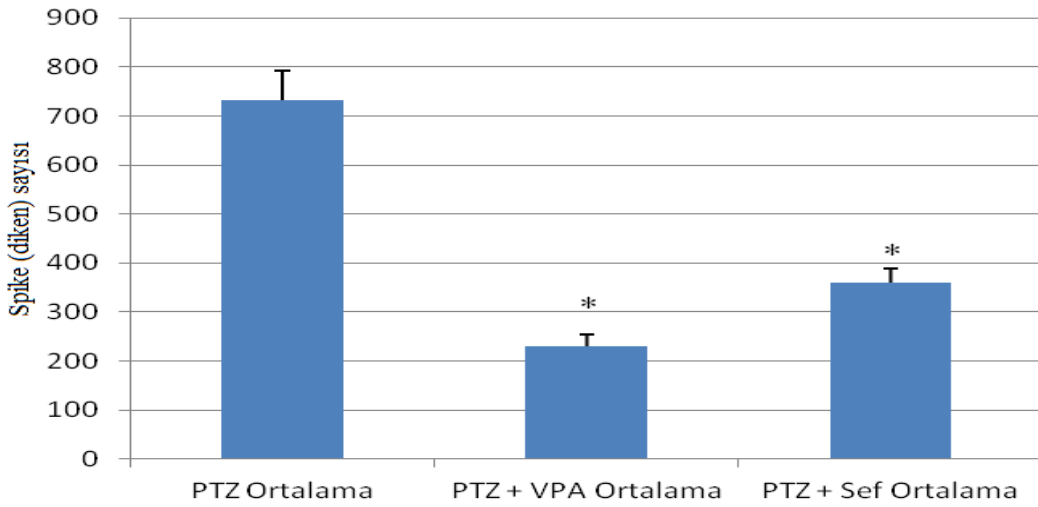
3.7 İstatistik ve Analizler

Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz bulgular değerlendirmesinde ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. İstatistikler için SPSS Statistics 17.0 kullanıldı gruplar arasındaki farklar için One-way ANOVA Tukey testi uygulandı.

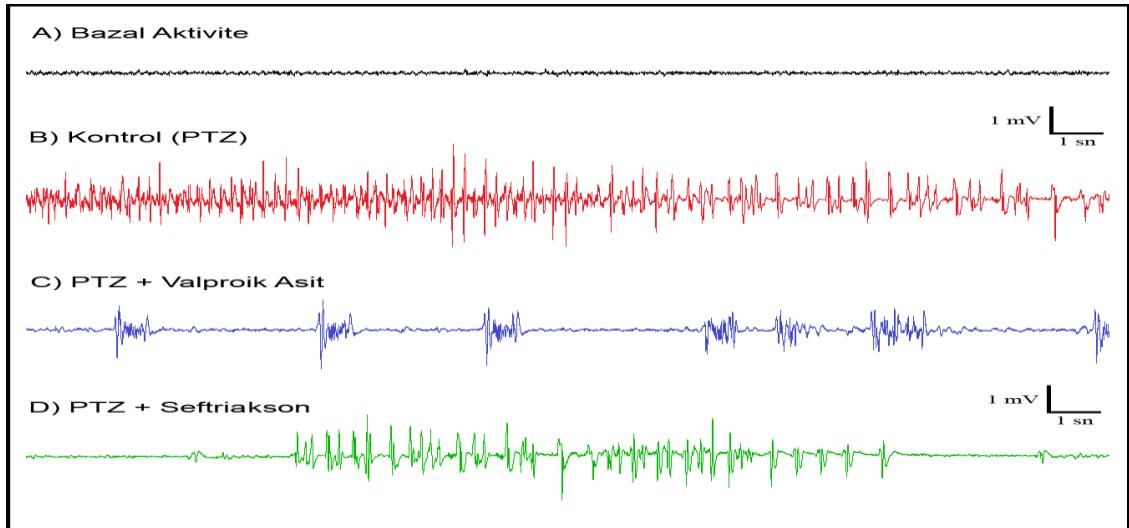
4. BULGULAR

4.1 EKoG Sonuçları

Yapmış olduğumuz EKoG ölçümlerinde gruplara ait 30 dakikalık spike (diken) sayısı ortalama±standart hata değerleri sırasıyla PTZ: 733±59; PTZ+VPA: 231±23, PTZ+Sef: 359±30 olarak ölçüldü (Şekil 4.1). Diken kayıtlarına ait örnek görüntü Şekil 4.2’ de verilmiştir.



Şekil 4.1 Gruplara ait spike (diken) ortalama değerleri
PTZ grubuna göre * p<0,001 olarak anlamlı kabul edildi



Şekil 4.2 Gruplardan alınan spike kayıt örnek görüntüleri

A) PTZ enjeksiyonu yapılmadan alınan bazal aktivite kaydı. B) Kontrol grubu tutuşmuş hayvana 35 mg/kg PTZ enjekte edildikten sonra elde edilen aktivite kayıt örneği C) 15 gün 350 mg/kg VPA ile tedavi edilen tutuşmuş hayvana 35 mg/kg PTZ enjeksiyonu ile elde edilen aktivite kayıt örneği D) 15 gün 200

mg/kg Sef ile tedavi edilen tutuşmuş hayvana 35 mg/kg PTZ enjeksiyonu ile elde edilen aktivite kayıt örneği.

4.2 İn Vivo Voltametri Sonuçları

Çalışmamızda rat beyninin 3 farklı bölgesinde in vivo voltametri tekniğiyle kayıtlar aldık. Glu geri alım süresinin %80'nini T_{80} süresi olarak verdik ve ölçüm aldığımız süreler Tablo 4.1'de verildi.

M1 bölgesi T_{80} sürelerini incelediğimizde kontrol grubu, PTZ+Sef ve PTZ+VPA grupları için geri alım sürelerinin benzer olduğunu görmekteyiz. Sağlıklı bireylerde geri alım süresi 2.61saniye iken PTZ kullanarak tutuşturduğumuz grupta bu sürenin 18.8 saniye olduğunu görmekteyiz. Tedavi gruplarımıza ait geri alım süreleri ise kontrole yakın değerlere inmiş olduğunu gözlemledik.

CA3 bölgesinden aldığımız kayıtları incelediğimizde ise M1(primer motor korteks) bölgesinde olduğu gibi sağlıklı ve tutuşmuş gruplar arasında geri alım süresinin uzadığını tedavi gruplarında ise bu sürenin sağlıklı grupla aynı değerlere gerilemiş olduğunu gözlemledik.

Cpu (kaudatum putamen) bölgesinden aldığımız kayıtlar da ise tüm gruplarda geri alım sürelerinin 2.5 saniye civarında olduğunu görmekteyiz.

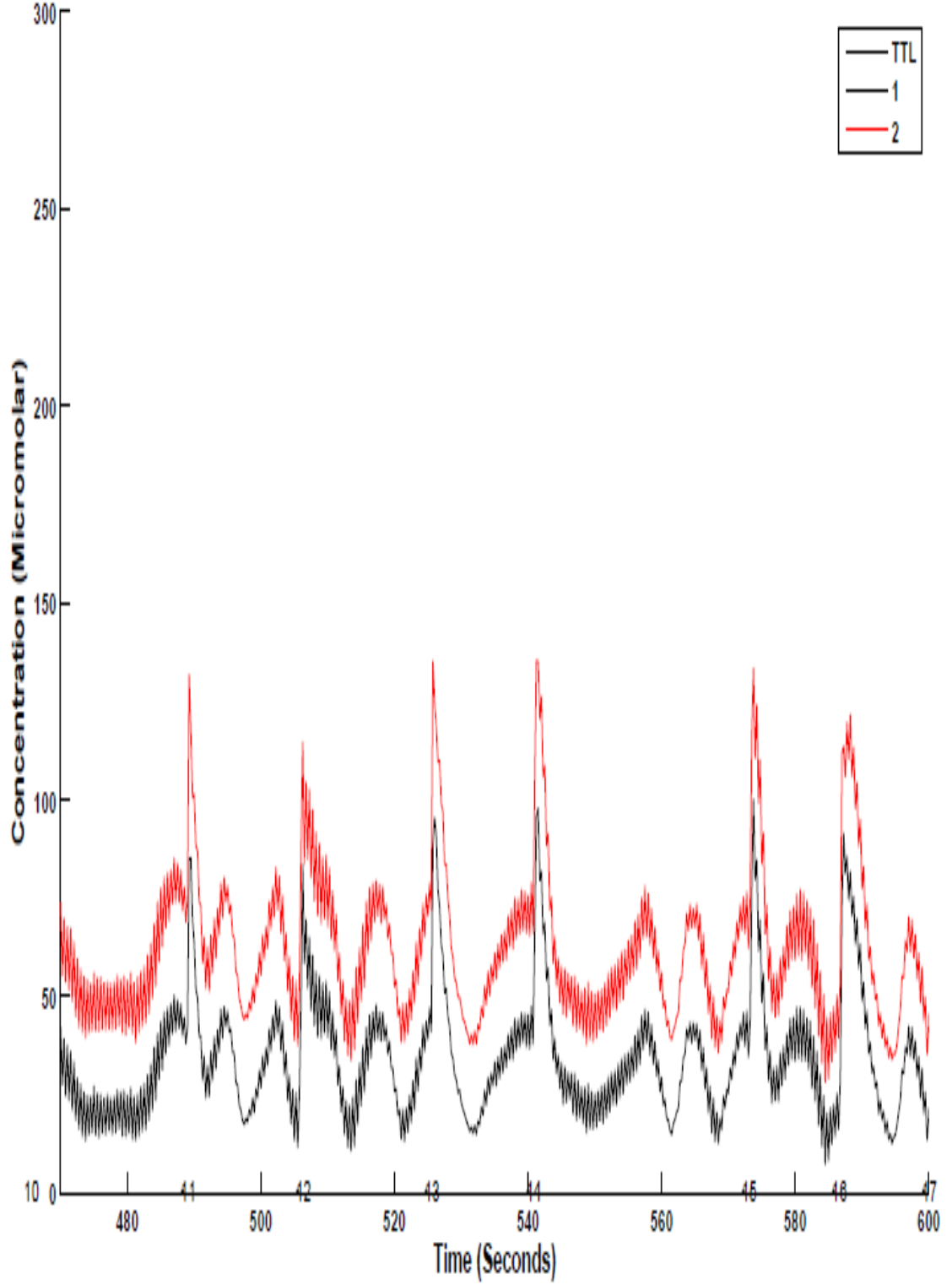
Tablo 4.1 Beyin bölgelerine göre glutamat geri alım T_{80} (saniye) süreleri

	Kayıt sayısı (n)	M1 X±SS	CA3 X±SS	Cpu X±SS
Kontrol	16	2.61±0.61	2.95±0.21	2.52±0.23
PTZ	16	18.8±5.20*	6.81±1.14*	2.61±0.50
PTZ+Sef	16	1.91±0.42#	3.00±0.25#	2.50±0.14
PTZ+VPA	16	2.10±0.52#	3.36±0.81#	2.42±0.38

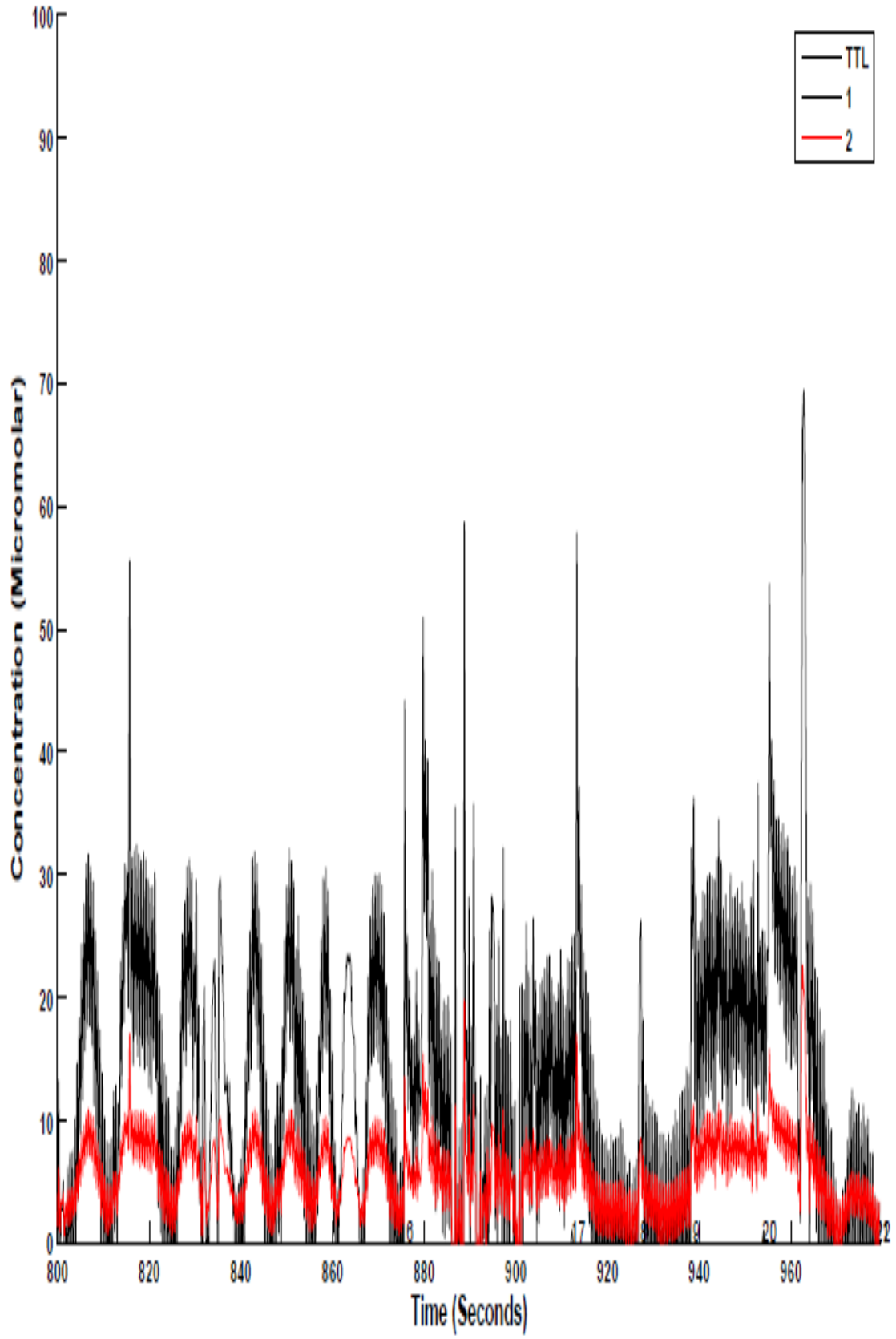
* kontrole göre $p<0.0001$; # PTZ'ye göre $p<0.0001$ anlamlı kabul edildi. Her grupta kayıtlar için altışar adet rat kullanılmıştır. X±SS ortalama ± standart sapma.

Her bir grup (Kontrol, PTZ, PTZ+Sef ve PTZ+VPA) ve her bir bölge (M1, CA3 ve Cpu) için yapmış olduğumuz in vivo voltametri kayıtlarına ait örnek görüntüler

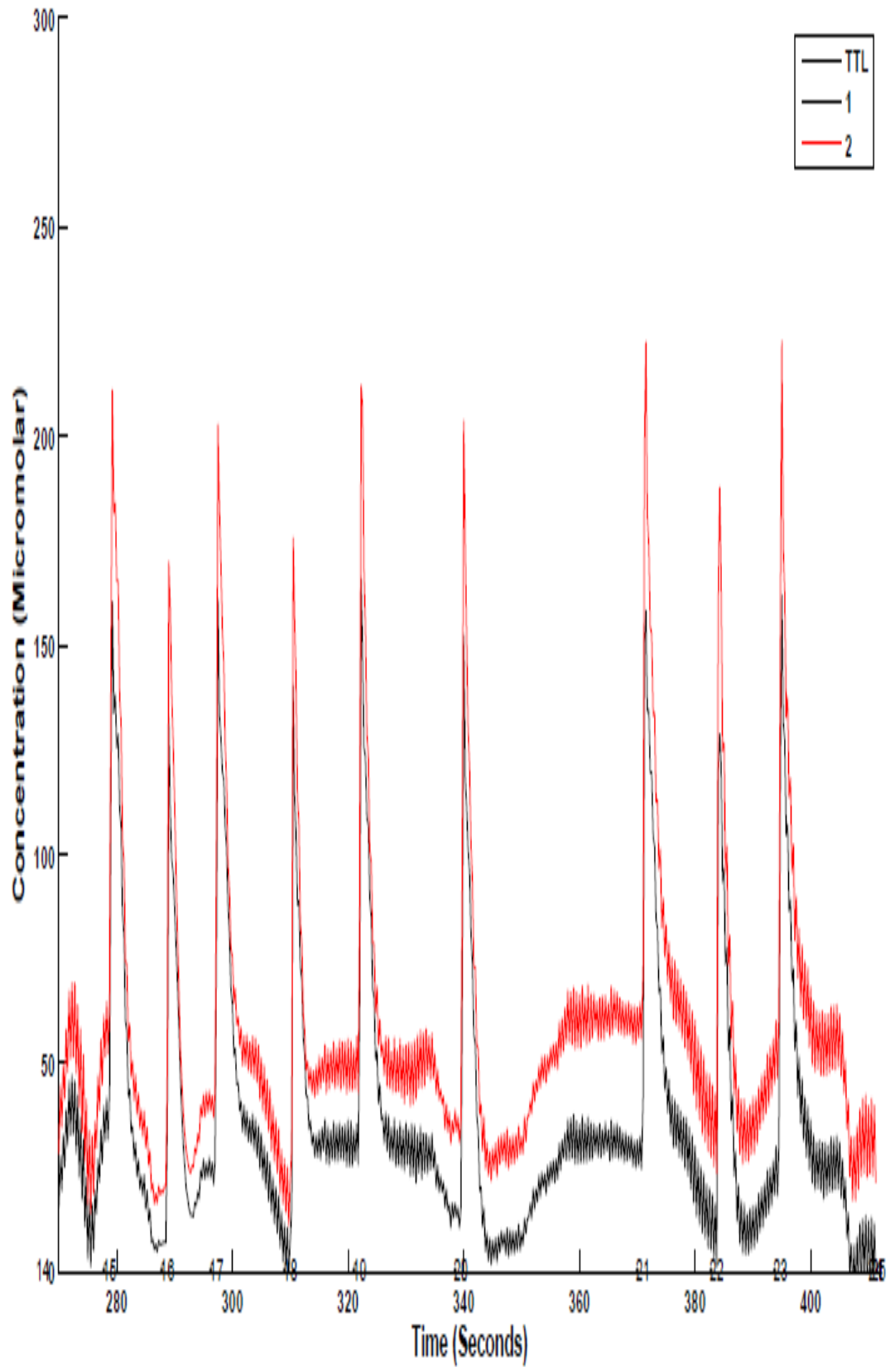
sırasıyla aşağıda verilmektedir (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, **Şekil 4.14**).



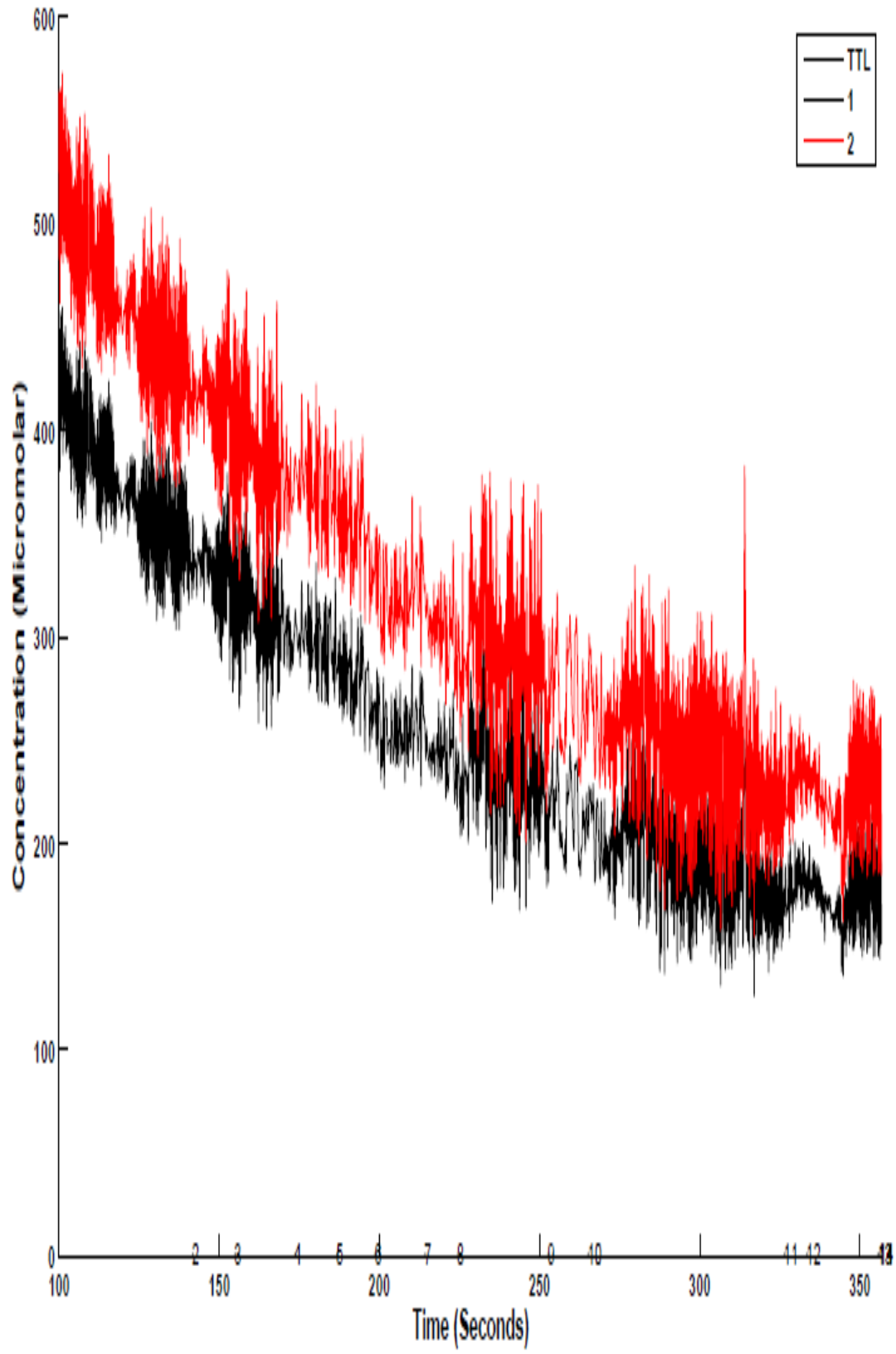
Şekil 4.3 Kontrol grubu M1 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



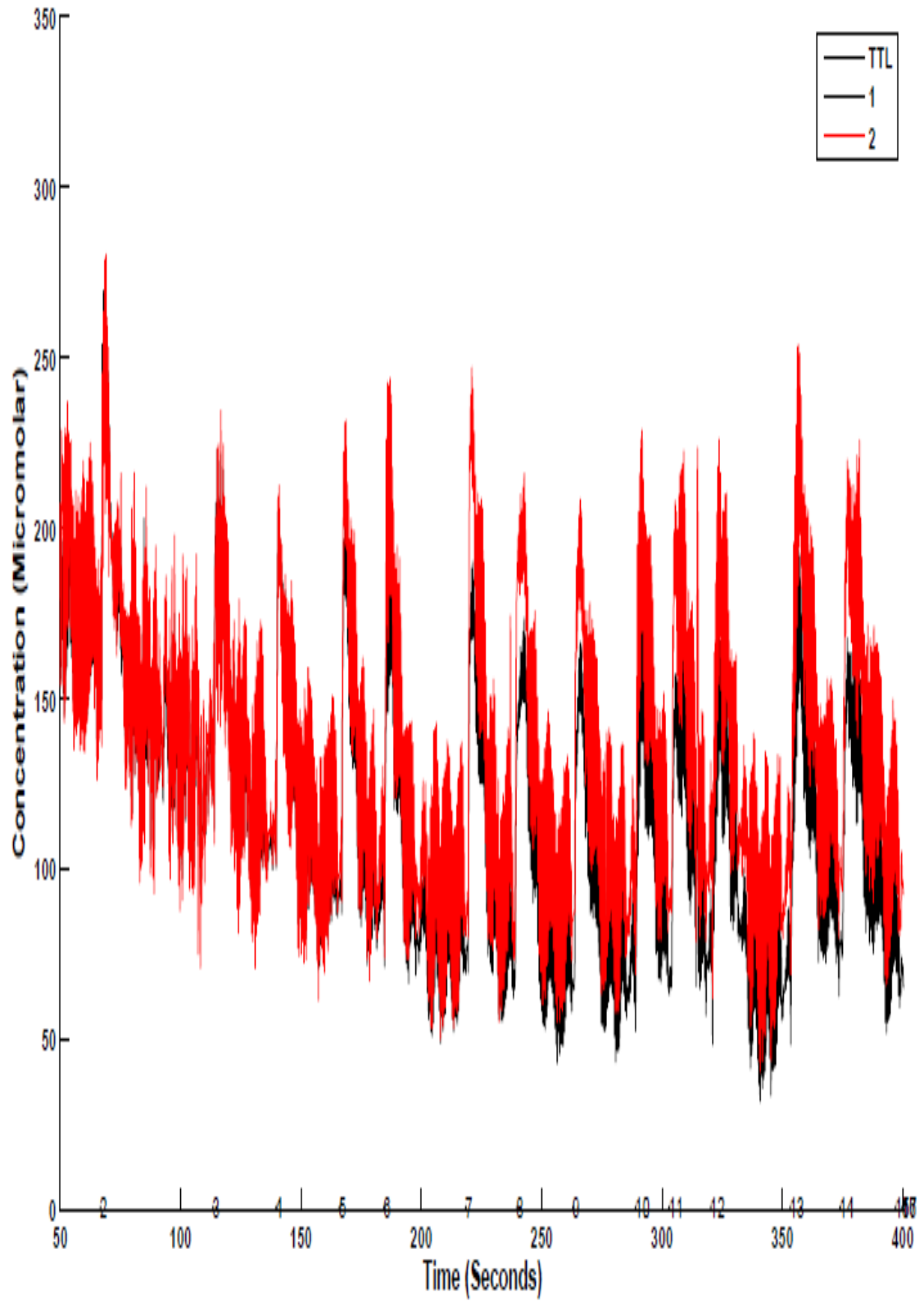
Şekil 4.4 Kontrol grubu CA3 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



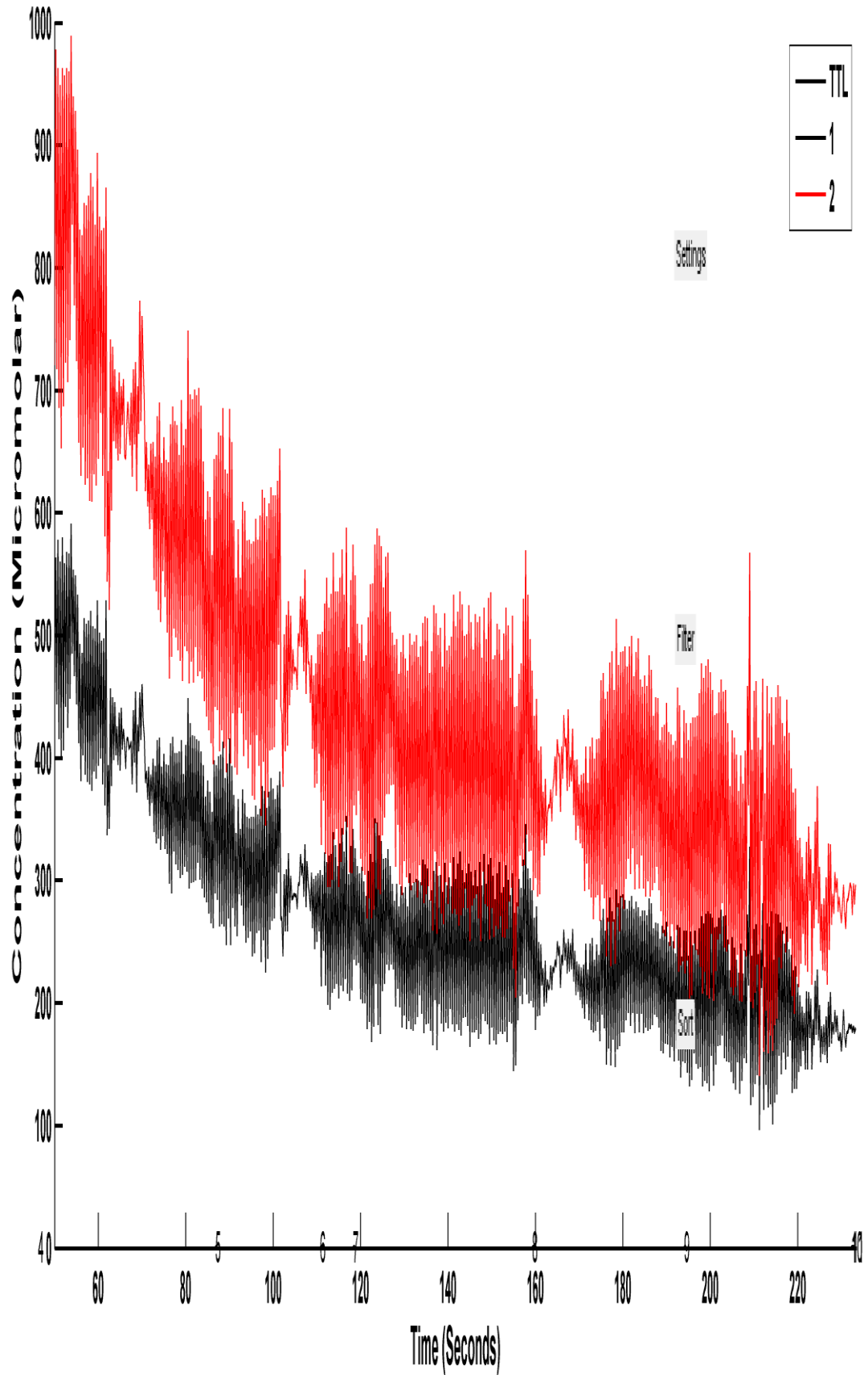
Şekil 4.5 Kontrol Grubu Cpu bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



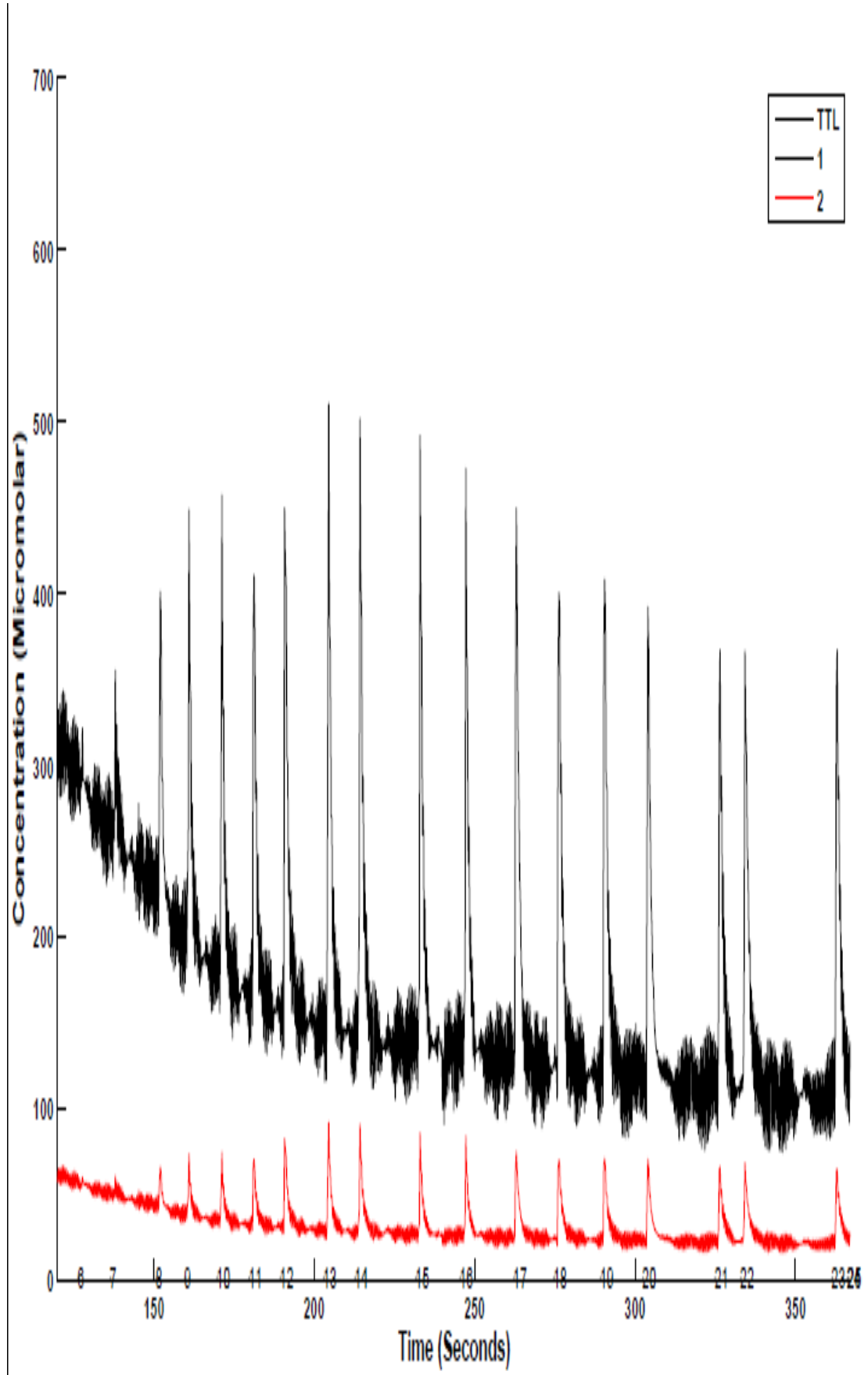
Şekil 4.6 PTZ grubu M1 bölgesi bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



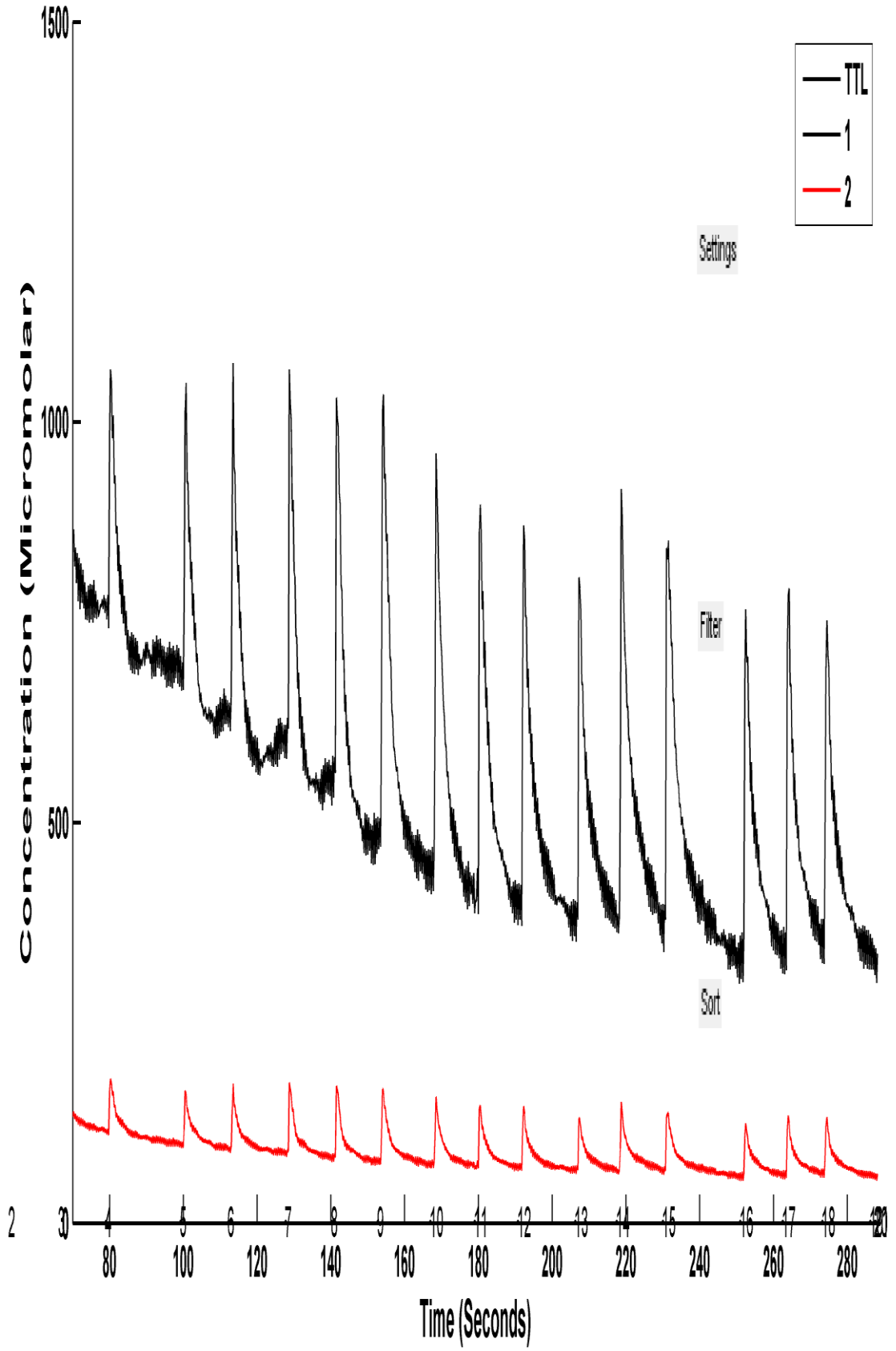
Şekil 4.7 PTZ grubu CA3 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



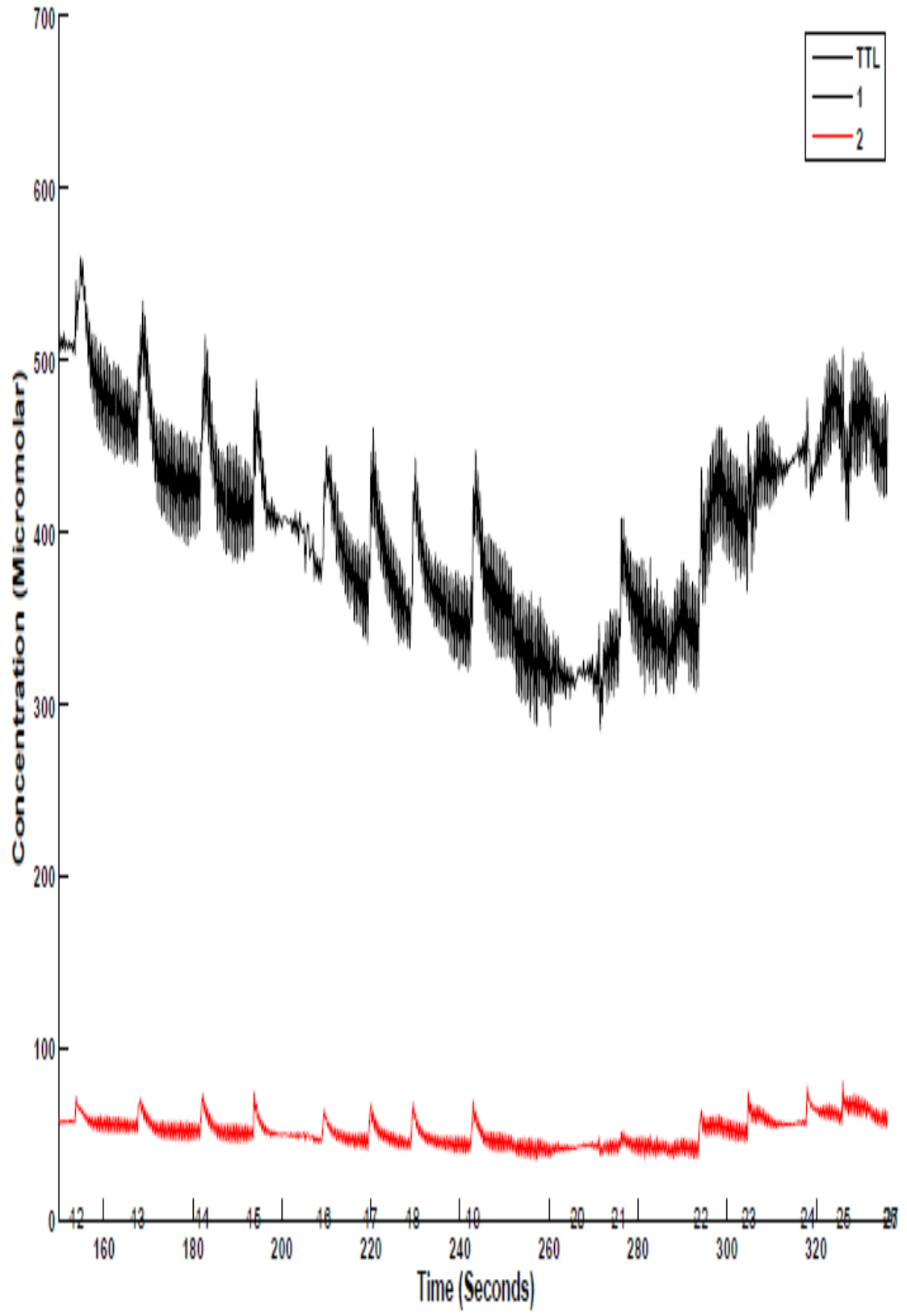
Şekil 4.8 PTZ grubu Cpu bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



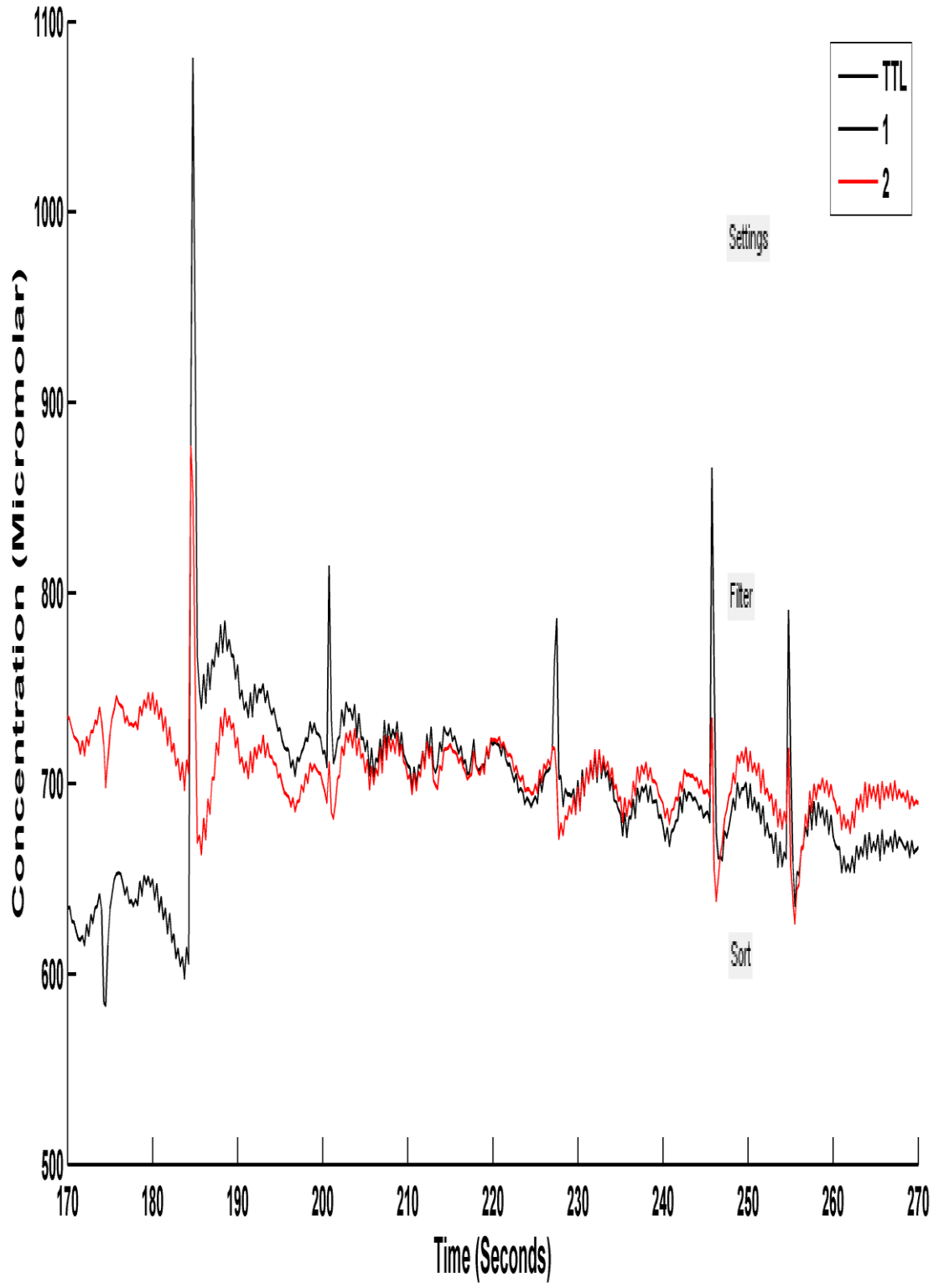
Şekil 4.9 PTZ+ Sef grubu M1 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



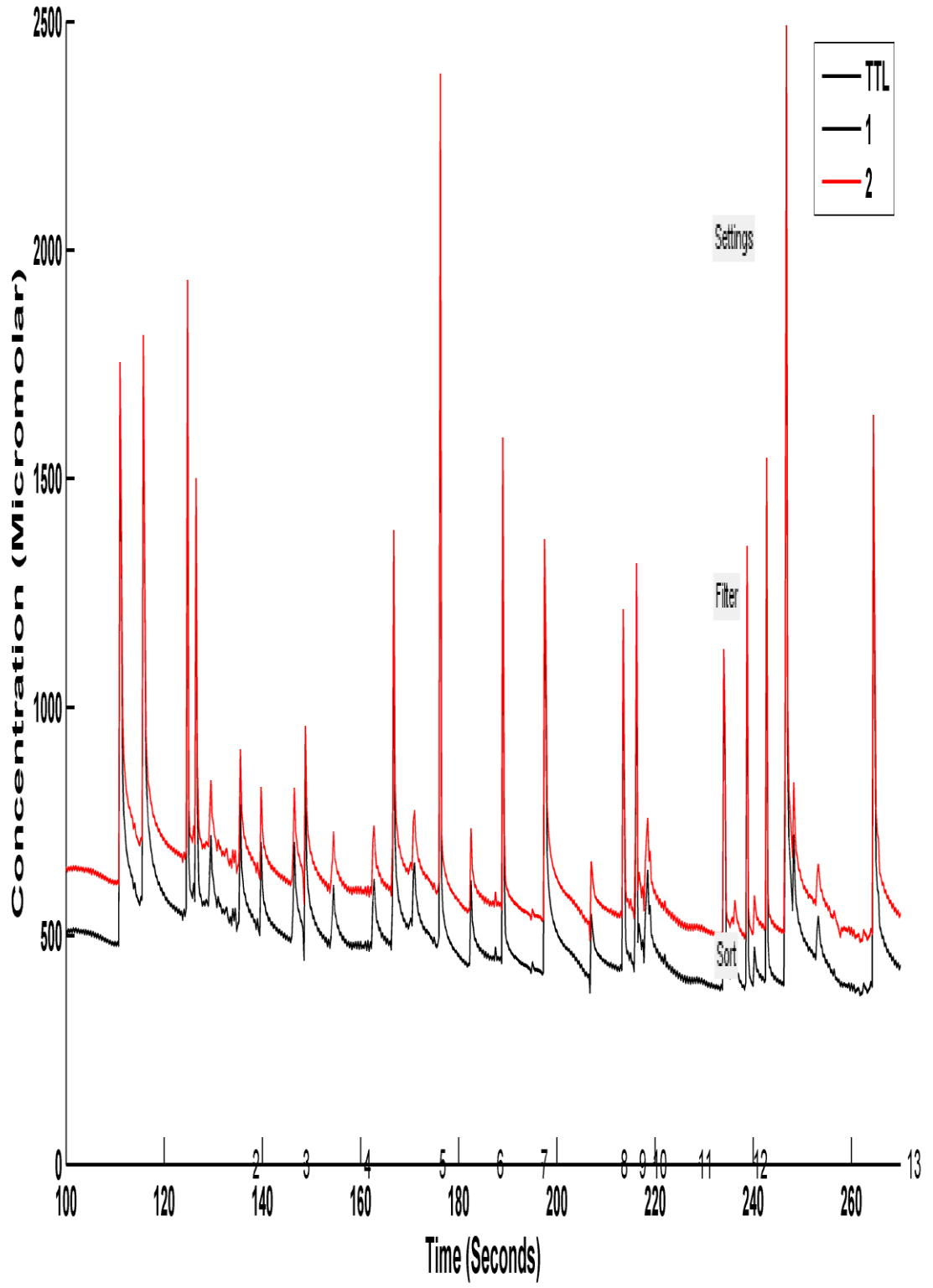
Şekil 4.10 PTZ+ Sef grubu CA3 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



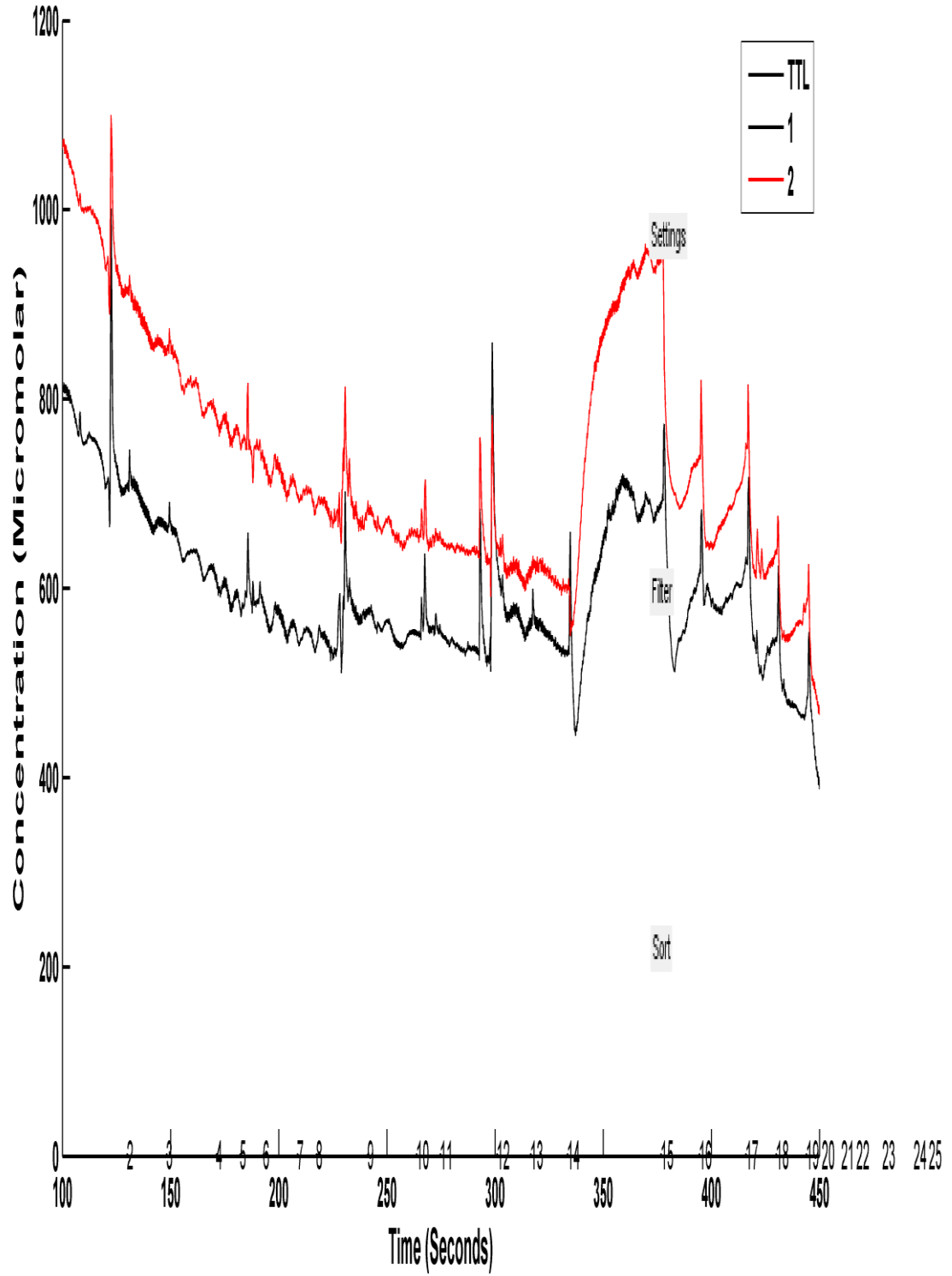
Şekil 4.11 PTZ+ Sef grubu Cpu bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



Şekil 4.12 PTZ+ VPA grubu M1 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



Şekil 4.13 PTZ+ VPA grubu CA3 bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları



Şekil 4.14 PTZ+ VPA grubu Cpu bölgesinden alınan örnek voltametri kayıtları

4.3 Gen Ekspresyon Sonuçları

Yapmış olduğumuz moleküler çalışmalarda Glu taşıyıcılarından EAAC1 (Slc1a1), GLT-1 (Slc1a2) ve GLAST (Slc1a3) enzimlerden ise Glutaminaz (Glu) ve Glutamin sentetaz (Gls) gen ekspresyonlarının ölçümleri yaptık. Üç farklı beyin bölgesine ait ekspresyon sonuçları genlere göre aşağıdaki tablolarda verilmektedir. Değerler ise RT-PCR Ct değerlerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplamasıyla yapıldı.¹²²

Slc1a1 genine ait sonuçları incelediğimizde tutuşturulmuş grubu kontrol grubuna göre oranladığımızda M1, CA3 ve Cpu beyin bölgelerindeki değişim sırasıyla M1’de 4.71, CA3’de 3.07 ve Cpu’da ise 2.52 kat artmış olduğunu görmekteyiz (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 EAAC1 Glutamat taşıyıcısı ekspresyon sonuçları
EAAC1 (Slc1a1)

	M1	CA3	Cpu
	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol	1±0.08	1±0.14	1±0.20
PTZ	4.71±0.31*	3.07±0.29*	2.52±0.24*
PTZ+Sef	2.84±0.23 ^{##}	2.28±0.13 [#]	1.72±0.07 [#]
PTZ+VPA	1.19±0.17 ^{##}	1.48±0.06 ^{##}	1.72±0.02 [#]

Kontrolle göre* p<0.0001; PTZ’ye göre [#] p<0.05, ^{##} p<0.0001, X±SS ortalama ± standart sapma.

Slc1a2 (GLT-1) genine ait sonuçları incelediğimizde kontrol grubuna göre tutuşturulmuş (PTZ) grupta M1 ve CA3 bölgelerinde gen ifadesinin artmış olduğunu Cpu bölgesinde ise kontrolden daha az oranda eksprese olduğu görülmektedir. M1 bölgesinde VPA grubunda Cpu bölgesinde ise Sef grubunda en yüksek artış oranını görmekteyiz. Tedavi olarak Sef kullandığımız grupta ise üç bölgede de ekspresyon oranının artmış olduğu görülmektedir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 GLT-1 Glutamat taşıyıcısı ekspresyon sonuçları

GLT-1 (Slc1a2)			
	M1	CA3	Cpu
	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol	1±0.02	1±0.03	1±0.04
PTZ	2.89±0.04**	1.32±0.16*	0.88±0.03*
PTZ+Sef	3.28±0.05 ^{##}	1.21±0.08	2.17±0.02 ^{##}
PTZ+VPA	5.58±0.07 ^{##}	1.07±0.04 [#]	0.63±0.02 ^{##}

Kontrole göre* p<0,05, ** p<0,0001; PTZ'ye göre # p<0,05, ^{##} p<0,0001, X±SS ortalama ± standart sapma.

Slc1a3 (GLAST) genine ait sonuçları incelediğimizde ise Glt-1 gen ekspresyon sonuçlarına benzer bulgular elde edildi ve Tablo 4.4'de gen ifade oranları verildi.

Tablo 4.4 GLAST Glutamat taşıyıcısı ekspresyon sonuçları

GLAST (Slc1a3)			
	M1	CA3	Cpu
	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol	1±0.03	1±0.02	1±0.03
PTZ	1.54±0.09*	0.96±0.03	0.88±0.01**
PTZ+Sef	1.91±0.07	0.87±0.04 [#]	0.92±0.01
PTZ+VPA	3.39±0.34 ^{##}	0.73±0.02 ^{##}	0.76±0.02 ^{##}

Kontrole göre* p<0.05; ** p<0.0001; PTZ'ye göre # p<0.05; ^{##} p<0.0001, X±SS ortalama ± standart sapma.

Glutamin Sentetaz enzimi için yapmış olduğumuz ekspresyon oranlarını incelediğimizde beyin bölgelerinin tamamında tutuşturulmuş grubun (PTZ grubu) Glul gen ekspresyonunun artmış olduğunu görmekteyiz. Tedavi gruplarımızın ekspresyon değişim oranları M1 bölgesi için PTZ grubuna göre değişmediği, Cpu ve CA3 bölgelerinde ise PTZ grubu değerlerinden düşük oranda olduğunu görmekteyiz (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 Glutamin sentetaz enzimi ekspresyon sonuçları

Glutamin Sentataz (Glu)			
	M1	CA3	Cpu
	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol	1±.02	1±.01	1±.03
PTZ	2.13±0.02*	1.71±0.03*	2.22±0.11*
PTZ+Sef	2.21±0.03	1.12±0.02#	0.96±0.03#
PTZ+VPA	1.86±0.02#	0.86±0.06#	0.93±0.01#

Kontrole göre* p<0.0001; PTZ'ye göre # p<0.0001, X±SS ortalama ± standart sapma.

Gls gen ekspresyon sonuçlarını incelediğimizde tutuşmuş grubun ekspresyon artışı en fazla M1 motor korteks bölgesinde olduğunu Cpu bölgesinde ise ekspresyon oranı kontrol grubuna göre çok fazla artmadığını görmekteyiz (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 Glutaminaz enzimi ekspresyon sonuçları

Glutaminaz (Gls)			
	M1	CA3	Cpu
	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol	1±0.13	1±0.03	1±0.04
PTZ	8.85±0.04**	2.43±0.1**	1.20±0.05*
PTZ+Sef	3.05±0.17#	1.33±0.06#	0.83±0.03#
PTZ+VPA	2.17±0.05#	1.09±0.09#	1.14±0.03

Kontrole göre* p<0.05; ** p<0.0001; PTZ'ye göre # p<0.0001, X±SS ortalama ± standart sapma.

Asıl olay, PTZ ile oluşturulmuş kronik epilepside glutaminaz aktivitesini aşırı derecede yükseltmesidir. Glu üretiminin artması ve sinaptik aralığa fazla Glu salınmasıdır. Diğer GLT-1, GLAST, EATT3 ve Glutamin Sentetaz aktivitesi bu Glu artışı nedeniyle ekspresyon oranları artmıştır.

Farklı beyin bölgelerinden elde etmiş olduğumuz gen ifade oranları da kontrol grubundan elde etmiş olduğumuz değerlere göre kıyaslaması Tablo 4.7'de verildi.

Tablo 4.7 Kontrol grubuna göre PTZ grubu ekspresyon değişimleri

	EAAC1	GLT-1	GLAST	Glutamin Sentetaz	Glutaminaz
M1	↑ 5 Kat	↑ 3 Kat	↑ 1.5 Kat	↑ 2.2 Kat	↑ 9 Kat
CA3	↑ 3 Kat	↑ 1.3 Kat	- 1 Kat	↑ 1.7 Kat	↑ 2,4 Kat
Cpu	↑ 2.5 Kat	↓ 0.88 Kat	↓ 0.88 Kat	↑ 2.2 Kat	↑ 1.2 Kat

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda epilepsinin Glu taşıyıcı ve enzimleriyle ilişkisini anlamaya ve fizyolojisi hakkında bilgiler edinmeyi amaçladık. PTZ ile oluşturduğumuz tutuşma modelinde deneklerimizde Jeneralize Tonik-Klonik Epilepsi oluşturuldu. Çalışmamızda asıl hedefimiz voltametri tekniği ve gen ekspresyon sonuçları yönünden epilepsiyle Glu'nun ilişkisini ortaya koymak Glu eksitotoksitesinin nasıl etkide bulunduğunu anlamaya çalışmak oldu. Gruplarımızda her ne kadar skorlamalar yapıp tutuşma modelini oluşturmuş olsak da EKoG kayıtlarını aldık ve bu kayıtlar ışığında tutuşma modelinin oluşup oluşmadığını tam olarak kesinleştirdik.

EKoG sonuçlarına göre, epileptiform aktivitenin ortalama sıklığı tedavi gruplarında belirgin olarak azalmıştır. Dahası, epileptiform aktivite bakımından, VPA'nın Sef'den daha etkili olduğu bulundu. Birçok çalışma VPA'nın epileptik nöbet sıklığını azalttığını göstermiştir.^{123, 124} Aynı şekilde, Hussein ve ark. beta laktam antibiyotik Sef'in PTZ kaynaklı nöbetlere karşı nöroprotektif etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.¹²⁵ Literatür çalışmalarına baktığımızda beta laktam antibiyotiklerin 1986'dan beri antiepileptik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.^{126, 127} İlk olarak, penisilinin antiepileptik etkilerini 1986'da Chen ve ark.¹²⁶ tarafından daha sonra, Shimada ve ark. 1992'de, sefalosporinlerin ve karbapenlerin konvülsan etkisinin, memeli merkezi sinir sisteminde GABA reseptör bağlanmasını baskılayarak gösterdiğini bildirmişlerdir.¹²⁸

Voltametri sonuçlarını incelediğimizde özellikle M1 bölgesinde geri alım (reuptake) T_{80} süresinin tutuşturulmuş grupta çok uzadığını (18.8 saniye) tedavi gruplarında ise T_{80} süresinin kontrol grubuyla aynı değerlere (2.5-3 saniye) indiğini gözlemledik. CA3 bölgesinde ise T_{80} süreleri tutuşturulmuş grup için 6.8 saniye kontrol ve tedavi gruplarında ise 3 saniye civarında olduğunu gördük. Cpu bölgesinde ise tüm

gruplarda bu sürenin 2.5 saniye civarında olduğunu in vivo voltametri tekniğiyle belirlemiş olduk. T_{80} sürelerini değerlendirdiğimizde M1 ve CA3 bölgelerinde Glu geri alınımın sürelerinin arttığı Cpu bölgesinde ise her hangi bir farklılık olmadığını bulduk. Cpu bölgesindeki T_{80} süresinin tüm gruplarda aynı seviyelerde olması bize bu bölgede tutuşma olayıyla ilişkili olmadığını düşündürdü. Yapılan bir TLE çalışmasında [11C]ABP688 microPET/CT işaretleme yöntemiyle akut, subakut ve kronik epilepsi dönemlerinde hipokampus, amigdala ve Cpu bölgelerinde değişimlerin kıyaslamaları yapılmıştır.¹²⁹ Bu çalışma sonucunda sıçan Cpu beyin bölgesi dokusunda mGluR5 Glu reseptöründe yeniden düzenleme olurken diğer bölgelerde her hangi bir iyileşme veya yeniden düzenleyici bir farklılık ortaya çıkmamıştır.¹²⁹ Yapılan başka bir çalışmada ise striatum (özellikle Cpu) ve amigdala beyin bölgelerindeki glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzim yoğunluğu ölçülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada striatum bölgesinde GAD yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir.¹³⁰ Bu sonuçta bizim bulgularımızı desteklemektedir. Bölgede GAD enzimi aracılığıyla Glu GABA'ya dönüşüyor ve bölgedeki epileptik aktiviteler engellenmiş oluyor. Yapmış olduğumuz çalışmada dünyada ilk kez epileptik aktivite esnasında Glu geri alım aktivitesi voltametri tekniğiyle aydınlatılmaya çalışılmıştır. Saniye saniye Glu ölçümü yaptığımız bu teknikle farklı beyin bölgelerinin Glu geri alım süreleri (T_{80}) ölçülmüş ve epilepsiyle ilişkili bölgeler daha açık bir şekilde gözlemlenmiştir. Motor korteks ve hipokampus (CA3) bölgeleri epileptik aktiviteyle ilişkiliyken striatumun (Cpu) ilişkili olmadığı epileptik aktivitenin ortaya çıkmadığı açık olarak saptanmıştır.

Diğer bir kıstasımız RT-PCR çalışma sonuçların da ise tutuşturulmuş grup M1 bölgesinde EAAC1, GLT-1, GLAST, Glutaminaz ve Glutamin sentetaz gen ekspresyon oranlarının arttığını gördük. Özellikle GLT-1, Glutaminaz ve Glutamin sentetazın artışı

bize bu beyin bölgesinde Glu miktarının normalden çok fazla olduğunu ve glutamin sentetazın da buna katkıda bulunduğu fikrini destekler nitelikte oldu.

Sırasıyla yapmış olduğumuz kantitatif gen ekspresyon oranlarına değerlendirdiğimizde slc1a1 (EAAC1) geni için kontrol grubunda bakmış olduğumuz üç beyin (M1, CA3 ve Cpu) bölgesinde de ekspresyon oranlarının aynı oranda (0.11 ± 0.02) olduğu görmekteyiz. Bu sonuçlar bize bu Glu taşıyıcısı için beyin bölgelerine göre bir farklılık olmadığını ve gen ifadesinin yani mRNA sentez miktarının aynı olduğunu göstermektedir. PTZ kontrol grubu ekspresyonu da kontrol grubuna göre; M1 bölgesinde 5, CA3 ve Cpu bölgelerinde ise 3 kat daha fazla eksprese olduğunu görmekteyiz. Bu alanda fazla çalışma olmamakla birlikte birkaç çalışma yapılmıştır.

Çalışmamızla daha çok benzer olan bir immünohistokimyasal boyama çalışmasında status epileptikusdan sonra CA1-3, Dentat gyrus (DG) gibi bölgelerde EAAC1 Glu taşıyıcısı seviyelerinin arttığını belirtmişlerdir.¹³¹ Başka bir çalışmada ise çift mutasyonu olan (çift heterozigot tremor (tm)(tm/+) ratlarla homozigot zitter (zi) (zi/+) ratların çiftleştirilmesiyle oluşturulan) kendinden epileptik sıçanlarla yabanıl tip normal sıçan hipokampuslerinde (CA1, CA3 ve DG) EAAC1 seviyelerine western blot, immünohistokimya ve RT-PCR yöntemleriyle araştırılmıştır.¹³² Mutant sıçanlarda Glu seviyesi normal sıçanlara göre yaklaşık %25 fazla olmasına rağmen EAAC1 geni ekspresyon seviyesinin normal ve mutasyonlu sıçanlar arasında bir farklılık olmadığını GLT-1 seviyesinin ise mutant sıçanlarda istatistiksel anlamlı artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Muhtemelen bu çalışmada bulunan çift mutasyon EAAC1 geniyle dolaylı olarak ilişkili olabilir. Diğer bir çalışmada ise beyin motor korteks ve hipokampus CA1 bölgelerinde bu Glu taşıyıcısına ait genin ekspresyonun artmış olduğunu belirtmişlerdir.¹³³ Yapmış olduğumuz çalışmada ise bakmış olduğumuz tüm

beyin bölgelerinde (M1, CA3 ve Cpu) ekspresyon oranının artmış olduğu en fazla artışın ise M1 bölgesinde olduğunu belirlemiş olduk.

Ana Glu taşıyıcısı olan Slc1a2 (GLT-1) ekspresyon sonuçlarını değerlendirdiğimizde, beynin korteksinde konumlanmış olan M1 bölgesinde tutuşturulmuş grupta kontrole göre ekspresyon seviyemiz 2.89 kat artarken Sef grubunda 3.28 kat ve VPA tedavi grubunda 5.6 kat artmış olduğunu gördük. Burada PTZ grubunda görülen 2.89 kat artışın sebebi sinaptik aralıktaki artmış olan Glu'nın Glu taşıyıcılarını upregüle etmesidir. Sef 3.28, VPA ise 5.58 kat artırdı. Sef'da Glu'nın sinaptik aralıktan xCT aktivitesi artırılarak¹³⁴ seviyesini azaltıp upregülasyonu önlemiştir. Ama kendisi GLT-1 in direk ekspresyonunu artırdığı için 3.28 kat arttığı görülmüştür. VPA ekspresyonu Sef kadar artırmamasına rağmen Glu'nın sinaptik aralıktaki seviyesini azaltmadığından Glu taşıyıcı seviyesi daha fazla artmıştır. Sef'in GLT-1 ekspresyon düzeyini artırmış olması epilepsi üzerinde tedavi edici etkisinden ziyade genel olarak bu genin ekspresyonunu artırmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar Sef bu etkisini ortaya koymaktadır.¹³⁵ Bu veriler ışığında tutuşturmuş olduğumuz grupta GLT-1 Glu taşıyıcısının ortamdaki Glu'ı belli bir seviyeye kadar uzaklaştırabildiği tedavi gruplarımızda ise daha da fazla oranda ekspresyonu artırarak sinaptik aralıkta fazla miktarda bulunan Glu'ı uzaklaştırdığı kanısına varabiliriz. Yani sistem maruz kalmış olduğu Glu toksisitesinden Glu taşıyıcı seviyesini artırma yoluyla kendini korumaya çalıştığı kanısı güçlenmektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda bizim bulgularla tamamen zıt bulgular elde edilmiştir. Çalışmamızda tutuşturulmuş gruplarda GLT-1 seviyesi artarken diğer çalışmalarda bu oranın azaldığı belirtilmiştir.^{136, 137} Ayrıca sıçan hipokampus CA1 ve motor korteks beyin bölgelerinde immunohistokimyasal boyama yöntemiyle yapılan diğer bir çalışmada ise yine GLT-1 Glu taşıyıcısının ekspresyon oranının artmış olduğu belirtilmiştir.¹³³

Hipokampüste konumlanmış olan CA3 bölgesinde ise kontrol grubumuzda ekspresyon oranı M1 bölgesinde tutuşturulmuş PTZ grubunda kontrol grubuna göre 1.33 kat arttığını Sef tedavi grubunda 1.28 kat arttığı ve VPA grubunda ise kontrolle hemen hemen aynı oranda ekspre olduğunu görmekteyiz. Mishra ve ark. çalışmalarında $FeCl_3$ ile oluşturdukları epilepsi modelinde hipokampus bölgesinde GLT-1 seviyesini incelemişler ve sonuçta epileptik grupta GLT-1 ekspresyon miktarının azaldığını ve Glu seviyesinin artmış olduğunu gözlemlemişlerdir.¹³⁸ Bizim çalışmada ise bunun tam tersi olarak ana Glu taşıyıcısı GLT-1 ekspresyonun artmış olduğunu görmekteyiz. Çalışmamızdaki bulgular mantıklı görülmektedir. Sinaptik aralıkta fazla miktarda bulunan Glu'nun ortamdaki uzaklaştırılması için astrositlere geri alımının artması gerekmektedir. Geri alımın artması için de taşıyıcıların daha fazla çalışması veya miktarlarını artırmak için gen ekspresyon seviyesini artırmaları gerekecektir. Çalışmamızda gördüğümüz gibi hücreler sinaptik aralıktan Glu'nun toksik etkisinden korunmak için gen ekspresyonunu artırmış ve Glu'yu ortamdaki uzaklaştırmışlardır.

Cpu bölgesinde kontrol grubuna göre ekspresyon oranları PTZ grubu için 0.12 PTZ+VPA grubunda 0.37 oranında azaldığını PTZ+Sef grubunda ise 2.17 kat artmış olduğunu görmekteyiz. Bu veriler ışığında Sef beyin bölgelerinin tamamında Glu taşıyıcı seviyesini artırdığını PTZ ve VPA gruplarının da Cpu bölgesinde ekspresyonu düşürüp özellikle M1 bölgesinde GLT-1 mRNA miktarını aşırı derece artırmış olması bu bölgenin tutuşmaya yönlendiren mekanizmaların daha fazla olduğunu ya da farklı mekanizmaların etkide bulunduğu kanısını güçlendirmektedir. CA3 bölgesinde hipokampusün tutuştuğunu ancak korteks bölgesi kadar olmadığını göstermektedir. VPA tedavi grubunun bölgelere göre farklı seviyelerde eksprese olması ise hipokampüste GLT-1 mRNA artışını tetiklediğini CA3 bölgesinde ise farklı bir mekanizmayla etkide bulunduğunu göstermektedir. Akbar ve arkadaşlarının genetik

olarak epileptik yatkınlığı olan sıçanlarda immunoblot işaretlemeyle yaptıkları çalışmalarında striatum bölgesinde GLT-1 miktarının azaldığını belirtmişlerdir.¹³⁹ Ayrıca diğer beyin bölgelerinde de (korteks ve hipokampus) benzer bulgular elde etmişlerdir.¹³⁹

Slc1a3 (GLAST) geni mRNA ifadeleri de GLT-1'e benzer olduğunu Tablo 4.4'de görmekteyiz. Bu benzer sonuçların taşıyıcıların konumlanmış olduğu hücre gruplarından kaynaklandığını düşündürmektedir. GLAST ve GLT-1 Glu taşıyıcıları glial hücrelerde (Astrosit, Glia) konumlanmaktadır.¹⁴⁰ Yapılan çoğu çalışmada GLT-1 ifadesinde olduğu gibi GLAST taşıyıcısı içinde azalma olduğunu belirtilmiştir.^{135, 136, 138, 139} Ancak bizim bulgularımızdaki GLAST ve GLT-1 taşıyıcılarının benzer sonuçlar vermesi bulgularımızın doğruluğunu ve niteliğini desteklemektedir. Diğer çalışmalarda genelde genetik yatkınlığı olan veya mutasyon oluşturulmuş sıçanların kullanılması farklı sonuç almamızın nedenleri arasında sayılabilir.

Glutamin sentetaz/Glu-amonyak ligaz (GS/Glu) genine ait mRNA ekspresyon oranlarını Tablo 4.5'de verilmiştir. Bu sonuçları ayrıntılı irdelediğimizde kontrol grubunda beyin bölgeleri arasında gen ifadesinin farklılık göstermediğini görmekteyiz (2.5-2.7 kat değişmekte). Glu taşıyıcılarında olduğu gibi Glu'ı glutamine dönüştüren GS enziminin ekspresyon artışı tutuşturulmuş gruplarda en fazla korteks bölgesinde olmuştur. PTZ grubunda incelemiş olduğumuz bütün beyin bölgelerinde kontrol grubuna göre GS mRNA miktarı yaklaşık 2 kat artmıştır. Bu bilgiler ışığında PTZ ile tutuşturma modelinde beynin genelinde enzim ekspresyonun artmış olduğunu düşünebiliriz. Hipokampal iskemili temporal lop epilepsili sıçanlarda yapılan bir çalışmada nöronal hücre kaybına bağlı olarak GS eksikliği olduğunu belirtmişlerdir.¹⁴¹ PTZ ile oluşturulmuş diğer bir tutuşma modelinde hipokampus dokusunda yapılan GS incelemesinde kronik epileptik kontrolde GS ekspresyonun artışı bildirilmiştir.¹⁴² Başka

bir PTZ ile tutuşturulmuş çalışmada hipokampus beyin dokusunda yine GS ekspresyon oranında kontrol grubuna göre artığı belirtilmiştir.¹³⁶

Glutaminaz (Gls) geni sonuçlarını Tablo 4.6’da verildi. GLT-1, GLAST ve GS enzimi mRNA oranları M1 bölgesi için tutuşturulmuş gruplarda kontrol grubuna göre artmıştı. Glutaminaz enziminin aynı şekilde arttığını ancak bu artışın diğer genlere göre çok daha fazla olduğunu görmekteyiz. Özellikle PTZ grubunda kontrol grubuna göre artış 8.8 kat iken Sef ve VPA gruplarında bu oran 3 kat civarında olmuştur ve PTZ grubuna göre 3 kat azalmıştır. Yapılan çalışmalarda bulgularımıza benzer sonuçlar görülmekte olup hipokampus dokusunda glutaminaz ekspresyon artışlarının olduğu belirtilmiştir.¹⁴² Bu sonuçlar Gls aktivitesinin epileptik aktivitede önemli olduğunu düşündürmektedir.

Tutuşturulmuş grup ile kontrol grubunu kıyasladığımızda Motor korteks M1 bölgesinde tutuşturulmuş grupta bakmış olduğumuz tüm taşıyıcı (GLAST, GLT-1 ve EAAC1) ve Glu’la ilişkili enzimlerin (Glutaminaz ve Glutamin Sentetaz) ekspresyon oranlarının artmış olduğunu görmekteyiz. Tutuşturulmuş grupta Glu’in artmış olduğu ve sisteminde bu Glu artışına bağlı olarak Glu nrotoksisitesini ortadan kaldırmak zararları tolere edebilmek için taşıyıcı ve enzim miktarlarını arttırdığı görülmektedir. Ancak glutaminden Glu sentezleyen glutaminaz enzimide bu bölgede sağlıklı gruba göre yaklaşık 9 kat artış göstermiştir. Sinaptik aralıktan Glu uzaklaştırılrsa da presinaptik nöron hücrelerinden aşırı miktarda Glu retimi ve buna bağlı olarak da sinaptik aralığa salınması söz konusudur. Yapılan bir araştırmada epileptik hastalarda glutamin seviyesi yüksek bulunmuştur.¹⁴³ Doi ve arkadaşları PTZ ile oluşturdukları tutuşma modelinde Glu taşıyıcı ve enzimlerinin artışını protein seviyesinde Western blot tekniğiyle göstermişlerdir. Ayrıca alışmalarında Glutamat dekarboksilaz (GAD1/2) enzim protein seviyelerini de incelemişlerdir. Özellikle GLT-1 ve GS miktarları aşırı artış gösterirken,

GLAST ve EAAC1 herhangi bir artış bulgusuna rastlamamışlardır.¹⁴² Glutaminaz ise GS ve GLT-1 oranı kadar artış göstermese de istatistiksel olarak artmıştır. GAD enzimlerinden GAD2 enziminde istatistiksel bir azalışın olduğunu GAD1 enziminde ise kontrol ve tutuşturulmuş grup arasında farklılık görülmediğini belirtmişlerdir. GAD1 (GAD67) geninin epileptik deşarjları engelleyebilecek bir gen olduğu da ifade edilmiştir.¹⁴⁴

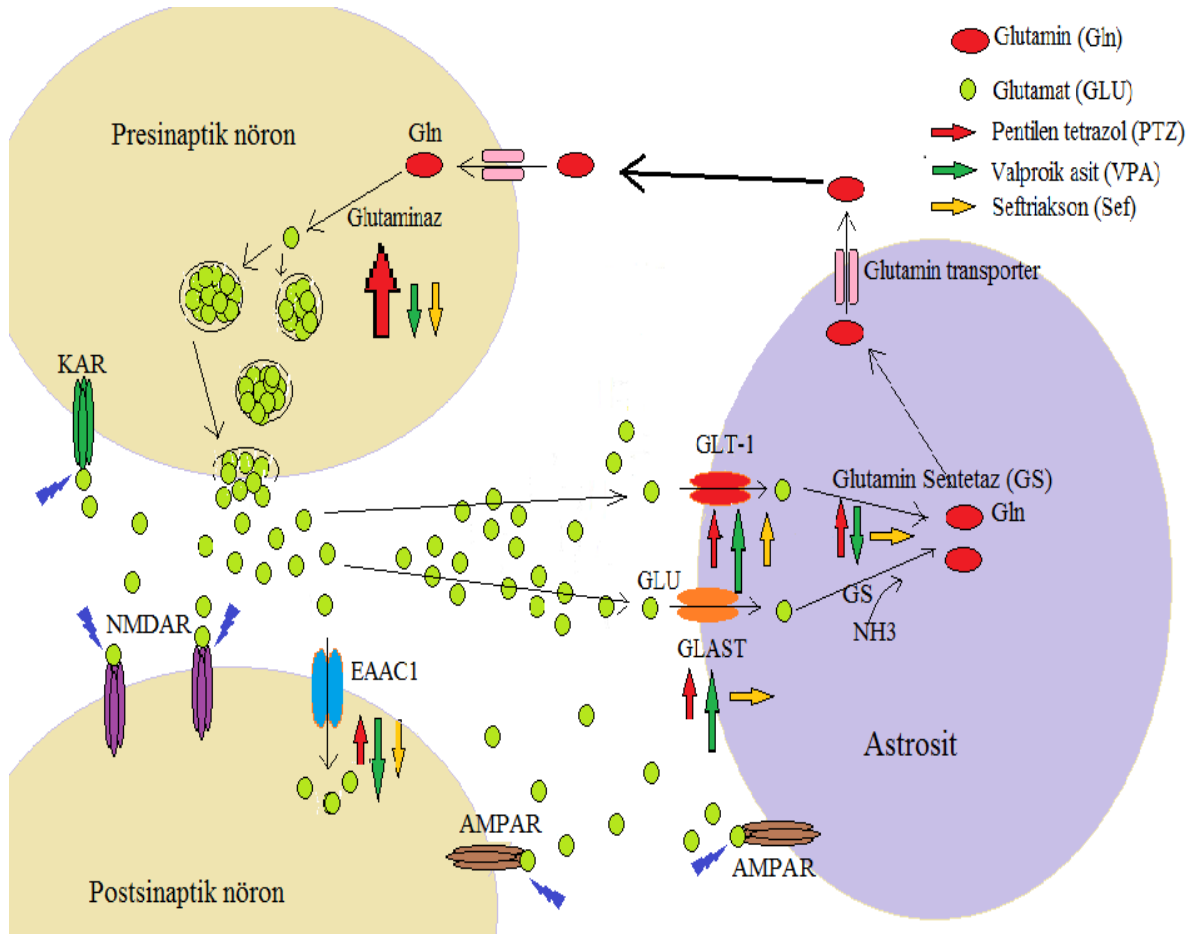
Glutaminaz enziminin ekspresyon ifadesinin tedavi gruplarımızda epilepsi grubuna göre 3 kat azalmış olması uygulanan tedavilerin etkili olduğunu ve epilepsili hastalarda Glu artışına neden olan mekanizmaların baskılandığını göstermektedir.

Tüm ekspresyon sonuçlarını genel olarak değerlendirdiğimizde post sinaptik nöronda konumlanmış olan EAAC1 Glu taşıyıcısının astroglial hücrelerde konumlanmış olan diğer taşıyıcılara kıyasla daha fazla eksprese olmaları Glu'nun astroglial hücrelerden daha çok post sinaptik nörona taşındığını ve iletimden sorumlu bu postsinaptik nöronların uyarılabilirliklerinin arttığını ve periferik uyarımlarında buna bağlı olarak artmış olabileceğini düşünebiliriz. İnsan ve sıçan hipokampal nöronlarında yapılan çalışmalarda epileptik veya pilokarpine oluşturulmuş epilepsi modellerinde EAAC1 (Slc1a1) geni ekspresyonu artış göstermiştir.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ Sıçan motor korteksinde yapılan diğer bir çalışmada ise EAAC1'in upregüle olduğu belirtilmiştir.¹³³ Postsinaptik nöronların periferde direk olarak dokularla ilişkili olduğunu düşünürsek kas uyarılmaları ve buna bağlı konvülsiyonların oluşması olağan görülmektedir.

Epilepside asıl mesele M1 bölgesindeki glutaminaz enzim aktivitesi artışı olduğunu düşünmekteyiz. Epileptik grupta kontrol grubuna göre yaklaşık 9 kat oranında gen ifadesinde artış olduğu belirlenmişti. Bu artışa bağlı olarak fazla Glu sentezlenip presinaptik nörondan sinaptik aralığa salınır. EAAT'larca sinaptik aralıktan

uzaklaştırılır. Astrositlerde glutamin sentetaz aktivitesi artar. Bu M1 bölgesinde meydana gelen gen ifade değişimlerine ait farklılıklar ise Şekil 5.1’de gösterilmiştir.





Şekil 5.1 Primer motor korteks (M1) bölgesi ekspresyon değişimleri

Kırmızı, yeşil ve sarı oklar ekspresyon değişimlerini göstermektedir. Kırmızı ok kontrol grubuna göre değişimi yeşil ve sarı oklar ise PTZ grubuna göre ekspresyon değişimini ifade etmektedir. NMDAR, AMPAR, KAR glutamat reseptörleridir. GLT-1, GLAST, EAAC1 glutamat taşıyıcılarıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda özellikle M1 bölgesinde tutuşmanın daha şiddetli olduğunu ve buna en büyük nedeninde glutaminden Glu'ı oluşturan glutaminaz enziminin neden olduğu ihtimali yüksek görülmektedir. Bu sonucumuzu hem voltametri hem de ekspresyon çalışmaları güçlü olarak desteklemektedir. Sağlıklı gruptaki Glu geri alım süresi 2.5-3 saniye iken bu tutuşturulmuş grupta yaklaşık 19 saniye olduğu görülmüştür. Buda 6-8 katlık bir artışı göstermektedir. Yine RT-PCR gen ifadesi sonuçlarına baktığımızda ise glutaminaz enziminin ifadesinin yaklaşık 9 kat artışı voltametri sonuçlarını desteklemiştir. Her ne kadar Glu taşıyıcıları ve GS ifadesi artmış olsa da tutuşturulmuş grupta bu artışlar yetersiz kalmıştır. Glu taşıyıcıları ve GS ifadesi yaklaşık 2-3 kat artarken glutaminaz 9 kat artış göstererek sinaptik aralıktaki Glu seviyesini artırmış ve toksisiteye neden olmuştur (Şekil 5.1). Glu seviyesinin artışına bağlı olarak toksisite artışı ve epileptik aktivite artışı şeklinde ifade edilmiştir. Glu seviyesinin azaltılması için yeni yaklaşımlar önem kazanmaktadır. Ayrıca şimdiye kadar yapılan çalışmalarda VPA'nın anti epileptik etkinliğini Na^{2+} ve Ca^{2+} kanal blokajı ve GABAerjik aktivasyonu aracılığıyla oluşturduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu anti epileptik etkisini Glutamerjik aktiviteyi baskılayarak etkide bulunduğunu gördük. İlerideki çalışmalarımızda Glu artışıyla birlikte Glu-GABA dönüşümün, GABA reseptörlerine ait gen ifadelerine ait değişim farklılıkları ve bazı biyokimyasal parametrelerdeki değişimlerin ne seviyede olduğu araştırılarak daha net sonuçlar elde edilmeye çalışılacaktır. Sinaptik aralıktaki Glu seviyesinin fazlalığı epilepsi epidemiyolojisinde son derece önemli rol oynamaktadır. Elde edilecek ek bulgularla epilepsi oluş/oluşum mekanizmaları ve yeni tedavi yaklaşımları ortaya konmaya çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Engel J, Plum F, Gilman S, Martin JB. *Causes of human epilepsy*. 2nd ed. Philadelphia, Oxford, 1989: 112-134.
2. Hauser WA. Prevention of post-traumatic epilepsy. *N Engl J Med*, 1990, 323: 540-542.
3. Kayaalp O. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 13. Baskı. Ankara, Pelikan, 2012: 2027-2033.
4. Headley PM, Grillner S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci*, 1990, 11: 205-211.
5. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobio*, 2001, 65: 1-105.
6. D'Antoni S, Berretta A, Bonaccorso CM, Bruno V, Aronica E, Nicoletti F, Catania MV. Metabotropic glutamate receptors in glial cells. *Neurochem Res*, 2008, 33: 2436-2443.
7. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, 1997, 276: 1699-1702.
8. Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 1996, 40: 759-766.
9. Meldrum BS. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*, 1994, 44: S14-23.
10. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1995, 38: 73-84.

11. During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet*, 1993, 341: 1607-1610.
12. Ronne-Engstrom E, Hillered L, Flink R, Spannare B, Ungerstedt U, Carlson H. Intracerebral microdialysis of extracellular amino acids in the human epileptic focus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1992, 12: 873-876.
13. Campbell SL, Hablitz JJ. Glutamate transporters regulate excitability in local networks in rat neocortex. *Neuroscience*, 2004, 127: 625-635.
14. Campbell SL, Hablitz JJ. Decreased glutamate transport enhances excitability in a rat model of cortical dysplasia. *Neurobiol Dis*, 2008, 32: 254-261.
15. Gilbert TH, Teskey GC. Conventional anticonvulsant drugs in the guinea-pig kindling model of partial seizures: effects of repeated administration. *Exp Brain Res*, 2007, 178: 115-125.
16. Mao J. Glutamate transporter: an unexpected target for some antibiotics. *Mol Pain*, 2005, 1: 5.
17. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 2005, 433: 73-77.
18. Uzum G, Akgun-Dar K, Aksu U. The effects of atorvastatin on memory deficit and seizure susceptibility in pentylenetetrazole-kindled rats. *Epilepsy Behav*, 2010, 19: 284-289.
19. Lamberty Y, Klitgaard H. Consequences of Pentylenetetrazole Kindling on Spatial Memory and Emotional Responding in the Rat. *Epilepsy Behav*, 2000, 1: 256-261.

20. Hansen SL, Sperling BB, Sanchez C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004, 28: 105-113.
21. Engel J, Jr., Thompson PM, Stern JM, Staba RJ, Bragin A, Mody I. Connectomics and epilepsy. *Curr Opin Neurol*, 2013, 26: 186-194.
22. Spencer SS. Neural networks in human epilepsy: Evidence of and implications for treatment. *Epilepsia*, 2002, 43: 219-227.
23. Faingold CL. Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action. *Prog Neurobio*, 2004, 72: 55-85.
24. Ettinger AB. Structural causes of epilepsy. Tumors, cysts, stroke, and vascular malformations. *Neurol Clin*, 1994, 12: 41-56.
25. Janz D. The idiopathic generalized epilepsies of adolescence with childhood and juvenile age of onset. *Epilepsia*, 1997, 38: 4-11.
26. Cascino GD, Trenerry MR, Jack CR, Dodick D, Sharbrough FW, So EL, Lagerlund TD, Shin CS, Marsh WR. Electrocorticography and Temporal-Lobe Epilepsy - Relationship to Quantitative Mri and Operative Outcome. *Epilepsia*, 1995, 36: 692-696.
27. Hardman JG, Limbird LE, Goodman GA. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Mexico city, Milan, New Delhi, san Juan, Seoul, Singapore, Sydney, Toronto, McGrawHill, 2001: 1354-1369.
28. Lowenstein DH, Alldredge BK. Status epilepticus. *N Engl J Med*, 1998, 338: 970-976.

29. O'Leary JL, Goldring S. *Science and Epilepsy Neuroscience Gains in Epilepsy Research*. 1st ed. New York, Raven Press, 1976: 122-129.
30. Parsons LM. Epilepsy: epidemiology, classification and natural history. *Epilepsy Res*, 2008, 36: 11.
31. Chusid JG. *Epilepsy*. In: *Correlative Neuroanatomy and Functional Neurology*. 15th ed. Los Altos, California, LANGE Medical Publications 1973: 361-365.
32. Hart YM. Epidemiology, natural history and classification of epilepsy. *Medicine*, 2012, 40: 471-476.
33. Ge WP, Duan S. Persistent enhancement of neuron-glia signaling mediated by increased extracellular K⁺ accompanying long-term synaptic potentiation. *J Neurophysiol*, 2007, 97: 2564-2569.
34. Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobio*, 2004, 73: 1-60.
35. Morimoto K, Sato H, Yamamoto Y, Watanabe T, Suwaki H. Antiepileptic effects of tiagabine, a selective GABA uptake inhibitor, in the rat kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 1997, 38: 966-974.
36. Morimoto K, Holmes KH, Goddard GV. Kindling-induced changes in EEG recorded during stimulation from the site of stimulation. III. Direct pharmacological manipulations of the kindled amygdala. *Exp Neurol*, 1987, 97: 17-34.
37. Morimoto K, Sanei T, Sato K. Comparative study of the anticonvulsant effect of gamma-aminobutyric acid agonists in the feline kindling model of epilepsy. *Epilepsia*, 1993, 34: 1123-1129.
38. Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 2002, 50: 105-123.

39. Kaura S, Bradford HF, Young AM, Croucher MJ, Hughes PD. Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: in vivo and in vitro studies. *J Neurochem*, 1995, 65: 1240-1249.
40. Ueda Y, Tsuru N. Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res*, 1995, 20: 213-219.
41. During MJ, Ryder KM, Spencer DD. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature*, 1995, 376: 174-177.
42. Hirao T, Morimoto K, Yamamoto Y, Watanabe T, Sato H, Sato K, Sato S, Yamada N, Tanaka K, Suwaki H. Time-dependent and regional expression of GABA transporter mRNAs following amygdala-kindled seizures in rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 54: 49-55.
43. Lamas M, Gomez-Lira G, Gutierrez R. Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 93: 209-214.
44. Coulter DA. Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol*, 2001, 45: 237-252.
45. Clark M, Massenburg GS, Weiss SR, Post RM. Analysis of the hippocampal GABAA receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, 26: 309-319.

46. Titulaer MN, Kamphuis W, Lopes da Silva FH. Long-term and regional specific changes in [3H]flunitrazepam binding in kindled rat hippocampus. *Neuroscience*, 1995, 68: 399-406.
47. Peredery O, Persinger MA, Parker G, Mastrosov L. Temporal changes in neuronal dropout following inductions of lithium/pilocarpine seizures in the rat. *Brain Res*, 2000, 881: 9-17.
48. Croucher MJ, Ruffle KL, Bradford HF. The effects of focal N-methyl-D-aspartate pretreatment on the parameters of amygdaloid electrical kindling. *Eur J Pharmacol*, 1997, 319: 207-213.
49. Bengzon J, Okabe S, Lindvall O, McKay RD. Suppression of epileptogenesis by modification of N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition. *Eur J Neurosci*, 1999, 11: 916-922.
50. Loscher W. Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy. *Prog Neurobio*, 1998, 54: 721-741.
51. Greenwood RS, Fan Z, McHugh R, Meeker R. Inhibition of hippocampal kindling by metabotropic glutamate receptor antisense oligonucleotides. *Mol Cell Neurosci*, 2000, 16: 233-243.
52. Sutula T, Koch J, Golarai G, Watanabe Y, McNamara JO. NMDA receptor dependence of kindling and mossy fiber sprouting: evidence that the NMDA receptor regulates patterning of hippocampal circuits in the adult brain. *J Neurosci*, 1996, 16: 7398-7406.
53. Suemaru S, Sato K, Morimoto K, Yamada N, Sato T, Kuroda S. Increment of synapsin I immunoreactivity in the hippocampus of the rat kindling model of epilepsy. *Neuroreport*, 2000, 11: 1319-1322.

54. Bulsara KR, Iskandar BJ, Villavicencio AT, Skene JH. A new millenium for spinal cord regeneration: growth-associated genes. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27: 1946-1949.
55. Patrylo PR, Dudek FE. Physiological unmasking of new glutamatergic pathways in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-induced epileptic rats. *J Neurophysiol*, 1998, 79: 418-429.
56. Dudek FE, Yasumura T, Rash JE. 'Non-synaptic' mechanisms in seizures and epileptogenesis. *Cell Biol Int*, 1998, 22: 793-805.
57. Gurnett CA, Landt M, Wong M. Analysis of cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein after seizures in children. *Epilepsia*, 2003, 44: 1455-1458.
58. Gözel S. Grade IV Astrositik Tümörlerde Her2/Neu Ekspresyonu ve CD105 ile Boyanan Mikrodamar Yoğunluğunun Birbiriyle İlişkisi ve Erken Dönem Mortalite Üzerine Etkileri. Patoloji Laboratuvarı. Uzmanlık Tezi, İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2006.
59. Agalar Z. Pentilentetrazol ile Oluşturulan Kindling Epilepsi Modelinde Agmatinin Etkisinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi, 2008.
60. Oberheim NA, Tian GF, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, Nedergaard M. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci*, 2008, 28: 3264-3276.
61. Conti F, Barbaresi P, Melone M, Ducati A. Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 1999, 9: 110-120.
62. Shelton MK, McCarthy KD. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia*, 1999, 26: 1-11.

63. Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*, 2000, 405: 187-191.
64. Ottersen OP, Zhang N, Walberg F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience*, 1992, 46: 519-534.
65. Shupliakov O, Brodin L, Cullheim S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Immunogold quantification of glutamate in two types of excitatory synapse with different firing patterns. *J Neurosci*, 1992, 12: 3789-3803.
66. Burger PM, Mehl E, Cameron PL, Maycox PR, Baumert M, Lottspeich F, De Camilli P, Jahn R. Synaptic vesicles immunoisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron*, 1989, 3: 715-720.
67. Rosenberg PA, Amin S, Leitner M. Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci*, 1992, 12: 56-61.
68. Cousin MA, Robinson PJ. Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J Neurochem*, 1999, 73: 2227-2239.
69. Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci*, 1995, 17: 203-211.
70. Balcar VJ. Molecular pharmacology of the Na⁺-dependent transport of acidic amino acids in the mammalian central nervous system. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 291-301.
71. Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc*, 2005, 80: 1326-1338.

72. Tanaka K. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci Res*, 2000, 37: 15-19.
73. Kanner BI. Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family. *FEBS Lett*, 1993, 325: 95-99.
74. Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 2000, 32: 1-14.
75. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobio*, 1998, 54: 581-618.
76. Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol*, 2006, 17: 592-604.
77. Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 179: 4-29.
78. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 1994, 17: 31-108.
79. Borges K, Dingledine R. AMPA receptors: molecular and functional diversity. *Prog Brain Res*, 1998, 116: 153-170.
80. 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, 26: 230-235.
81. Tang CM, Dichter M, Morad M. Quisqualate activates a rapidly inactivating high conductance ionic channel in hippocampal neurons. *Science*, 1989, 243: 1474-1477.
82. Trussell LO, Fischbach GD. Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission. *Neuron*, 1989, 3: 209-218.

83. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 1994, 12: 529-540.
84. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 1992, 256: 1217-1221.
85. Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*, 1998, 393: 377-381.
86. Shibata T, Watanabe M, Ichikawa R, Inoue Y, Koyanagi T. Different expressions of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid and N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs between visceromotor and somatomotor neurons of the rat lumbosacral spinal cord. *J Comp Neurol*, 1999, 404: 172-182.
87. Swanson GT, Kamboj SK, Cull-Candy SG. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci*, 1997, 17: 58-69.
88. Boulter J, Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C, Heinemann S. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science*, 1990, 249: 1033-1037.
89. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 1999, 51: 7-61.
90. Myers SJ, Dingledine R, Borges K. Genetic regulation of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, 39: 221-241.

91. Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron*, 1992, 8: 775-785.
92. Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH. Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature*, 1991, 351: 742-744.
93. Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Ronnback L. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int*, 2000, 37: 317-329.
94. Hertz L. Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzbica III. *Neurochem Int*, 2006, 48: 416-425.
95. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev*, 1999, 29: 83-120.
96. Kullmann DM, Asztely F, Walker MC. The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 1551-1561.
97. Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*, 2007, 51: 333-355.
98. Tapia R, Medina-Ceja L, Pena F. On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem Int*, 1999, 34: 23-31.

99. Chizh BA, Cumberbatch MJ, Herrero JF, Stirk GC, Headley PM. Stimulus intensity, cell excitation and the N-methyl-D-aspartate receptor component of sensory responses in the rat spinal cord in vivo. *Neuroscience*, 1997, 80: 251-265.
100. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 1987, 7: 369-379.
101. Regan RF, Panter SS, Witz A, Tilly JL, Giffard RG. Ultrastructure of excitotoxic neuronal death in murine cortical culture. *Brain Res*, 1995, 705: 188-198.
102. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 657-668.
103. Akaike A, Katsuki H, Kume T, Maeda T. Reactive oxygen species in NMDA receptor-mediated glutamate neurotoxicity. *Parkinsonism Relat Disord*, 1999, 5: 203-207.
104. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 1996, 16: 675-686.
105. Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev*, 2003, 9: 199-216.
106. Loscher W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobio*, 1999, 58: 31-59.
107. Loscher W. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs*, 2002, 16: 669-694.
108. Loscher W. Serum protein binding and pharmacokinetics of valproate in man, dog, rat and mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 1978, 204: 255-261.

109. Barnes GL, Jr., Mariani BD, Tuan RS. Valproic acid-induced somite teratogenesis in the chick embryo: relationship with Pax-1 gene expression. *Teratology*, 1996, 54: 93-102.
110. Robert E, Guibaud P. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet*, 1982, 2: 937.
111. Zarate CA, Jr., Tohen M, Narendran R, Tomassini EC, McDonald J, Sederer M, Madrid AR. The adverse effect profile and efficacy of divalproex sodium compared with valproic acid: a pharmacoepidemiology study. *J Clin Psychiatry*, 1999, 60: 232-236.
112. Shorvon SD. *Handbook of Epilepsy Treatment: Forms, Causes and Therapy in Children and Adults*. 2. Baskı. London, Blackwell Publishing, 2007.
113. Chu K, Lee ST, Sinn DI, Ko SY, Kim EH, Kim JM, Kim SJ, Park DK, Jung KH, Song EC, Lee SK, Kim M, Roh JK. Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation. *Stroke*, 2007, 38: 177-182.
114. Marangoz C. Deneysel epilepsi modelleri. *J. Exp. Clin*, 1997, 14: 147-186.
115. Sutula TP. Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. *Epilepsy Res*, 2004, 60: 161-171.
116. Mehla J, Reeta KH, Gupta P, Gupta YK. Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model. *Life Sci*, 2010, 87: 596-603.
117. Gilbert ME, Goodman JH. *Chemical Kindling*. 1st ed. Burlington, Academic Press, 2006: 379-393.

118. Mortazavi F, Ericson M, Story D, Hulce VD, Dunbar GL. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats. *Epilepsy Behav*, 2005, 7: 629-638.
119. Sejima H, Ito M, Kishi K, Tsuda H, Shiraishi H. Regional excitatory and inhibitory amino acid concentrations in pentylenetetrazol kindling and kindled rat brain. *Brain Dev*, 1997, 19: 171-175.
120. Pi X, Lee J, Li F, Rosenberg HC. Decreased expression of brain cAMP response element-binding protein gene following pentylenetetrazol seizure. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 127: 60-67.
121. Fischer W, Kittner H. Influence of ethanol on the pentylenetetrazol-induced kindling in rats. *J Neural Transm*, 1998, 105: 1129-1142.
122. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
123. Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate - A summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs*, 2002, 16: 695-714.
124. Viteri C, Codina M, Cobaleda S, Lahuerta J, Barriga J, Morales MD, Study SQ-V. Quality of life and treatment satisfaction in Spanish epilepsy patients on monotherapy with lamotrigine or valproic acid. *Seizure-European Journal of Epilepsy*, 2010, 19: 432-438.
125. Hussein AM, Ghalwash M, Magdy K, Abulseoud OA. Beta Lactams Antibiotic Ceftriaxone Modulates Seizures, Oxidative Stress and Connexin 43 Expression in Hippocampus of Pentylenetetrazole Kindled Rats. *J Epilepsy Res*, 2016, 6: 8-15.
126. Chen RC, Huang YH, How SW. Systemic penicillin as an experimental model of epilepsy. *Exp Neurol*, 1986, 92: 533-540.

127. Horiuchi M, Kimura M, Tokumura M, Hasebe N, Arai T, Abe K. Absence of convulsive liability of doripenem, a new carbapenem antibiotic, in comparison with beta-lactam antibiotics. *Toxicology*, 2006, 222: 114-124.
128. Shimada J, Hori S, Kanemitsu K, Shoji Y, Nakashio S, Yanagawa A. A comparative study on the convulsant activity of carbapenems and beta-lactams. *Drugs Exp Clin Res*, 1992, 18: 377-381.
129. Choi H, Kim YK, Oh SW, Im HJ, Hwang do W, Kang H, Lee B, Lee YS, Jeong JM, Kim EE, Chung JK, Lee DS. In vivo imaging of mGluR5 changes during epileptogenesis using [11C]ABP688 PET in pilocarpine-induced epilepsy rat model. *PLoS One*, 2014, 9: e92765.
130. Loscher W, Schirmer M, Freichel C, Gernert M. Distribution of GABAergic neurons in the striatum of amygdala-kindled rats: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res*, 2006, 1083: 50-60.
131. Voutsinos-Porche B, Koning E, Clement Y, Kaplan H, Ferrandon A, Motte J, Nehlig A. EAAC1 glutamate transporter expression in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26: 1419-1430.
132. Guo F, Sun F, Yu JL, Wang QH, Tu DY, Mao XY, Liu R, Wu KC, Xie N, Hao LY, Cai JQ. Abnormal expressions of glutamate transporters and metabotropic glutamate receptor 1 in the spontaneously epileptic rat hippocampus. *Brain Res Bull*, 2010, 81: 510-516.
133. Lu Z, Zhang W, Zhang N, Jiang J, Luo Q, Qiu Y. The expression of glutamate transporters in chest compression-induced audiogenic epilepsy: a comparative study. *Neurol Res*, 2008, 30: 915-919.

134. Sondheimer I, Knackstedt LA. Ceftriaxone prevents the induction of cocaine sensitization and produces enduring attenuation of cue- and cocaine-primed reinstatement of cocaine-seeking. *Behav Brain Res*, 2011, 225: 252-258.
135. Soni N, Reddy BV, Kumar P. GLT-1 transporter: an effective pharmacological target for various neurological disorders. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 127: 70-81.
136. Yu YH, Xie W, Zhao YY. [Effects of heterotherapy for homopathy on the metabolism path of glutamate in the pentylenetetrazol-kindled seizure rats' hippocampus]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2013, 33: 95-99.
137. Soni N, Koushal P, Reddy BV, Deshmukh R, Kumar P. Effect of GLT-1 modulator and P2X7 antagonists alone and in combination in the kindling model of epilepsy in rats. *Epilepsy Behav*, 2015, 48: 4-14.
138. Mishra M, Singh R, Mukherjee S, Sharma D. Dehydroepiandrosterone's antiepileptic action in FeCl₃-induced epileptogenesis involves upregulation of glutamate transporters. *Epilepsy Res*, 2013, 106: 83-91.
139. Akbar MT, Rattray M, Williams RJ, Chong NW, Meldrum BS. Reduction of GABA and glutamate transporter messenger RNAs in the severe-seizure genetically epilepsy-prone rat. *Neuroscience*, 1998, 85: 1235-1551.
140. Takayasu Y, Iino M, Takatsuru Y, Tanaka K, Ozawa S. Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009, 197: 1-12.
141. van der Hel WS, Notenboom RG, Bos IW, van Rijen PC, van Veelen CW, de Graan PN. Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 2005, 64: 326-333.
142. Doi T, Ueda Y, Takaki M, Willmore LJ. Differential molecular regulation of glutamate in kindling resistant rats. *Brain Res*, 2011, 1375: 1-6.

143. Helms G, Ciumas C, Kyaga S, Savic I. Increased thalamus levels of glutamate and glutamine (Glx) in patients with idiopathic generalised epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006, 77: 489-494.
144. He X, Wang W, Ruan X, Li W, Zhang L. Effects of antisense glutamic acid decarboxylase oligodeoxynucleotide on epileptic rats induced by pentylenetetrazol. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115: 425-429.
145. Crino PB, Jin H, Shumate MD, Robinson MB, Coulter DA, Brooks-Kayal AR. Increased expression of the neuronal glutamate transporter (EAAT3/EAAC1) in hippocampal and neocortical epilepsy. *Epilepsia*, 2002, 43: 211-218.
146. Rakhade SN, Loeb JA. Focal reduction of neuronal glutamate transporters in human neocortical epilepsy. *Epilepsia*, 2008, 49: 226-236.
147. Ross JR, Porter BE, Buckley PT, Eberwine JH, Robinson MB. mRNA for the EAAC1 subtype of glutamate transporter is present in neuronal dendrites in vitro and dramatically increases in vivo after a seizure. *Neurochem Int*, 2011, 58: 366-375.
148. Zhang GJ, Raol YSH, Hsu FC, Brooks-Kayal AR. Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility. *J Neurochem*, 2004, 88: 91-101.

EKLER

EK-1 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Numan TAŞPINAR Doğum tarihi: 01.04.1978 Doğum yeri: Pasinler Medeni hali: Evli, 2 çocuk Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 344 87 32 Faks: Metin girmek için burayı tıklatın. E-mail: n.taspinar@atauni.edu.tr numantaspinar@hotmail.com
Eğitim
Lise: Erzurum Fen Lisesi (1995) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi (1996-2001) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2008-2011) Doktora: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı (2011-2017)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede (KPDS 57, Kasım 2010)
Almanca:
Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Türk Farmakoloji Derneği (TFD) Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinir Bilim Derneği (TÜBAS)
İlgi Alanları ve Hobiler
Çalışma ilgi alanlarımı çoğunlukla Sinirbilim ve Moleküler çalışmalar oluşturmaktadır. Hobilerim arasında resim çizme ve doğa resmi çekme vardır.

EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-180

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

04.12.2014
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 25.11.2014 tarih ve 42190979-01-02-5599 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalının Nörofarmakoloji Laboratuvarında yürütülecek olan "Sıçanlarda Glutamat Taşıyıcı Aktivite Değiştirici İlaçların Epilepsi Tedavisindeki Yeri" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 28.11.2014 tarih ve 8 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 148 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Sayı No : 6/77
Tarih : 4.12.2014

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

05 Aralık 2014 Prof.Dr. S.Sekuk ATAMANALP
Dekan

Toplantı Tarihi : 28.11.2014

Toplantı Sayısı : 8

KARAR NO : 148- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalının Nörofarmakoloji Laboratuvarında yürütülecek olan "Sıçanlarda Glutamat Taşıyıcı Aktivite Değiştirici İlaçların Epilepsi Tedavisindeki Yeri" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 25.11.2014 tarih ve 42190979-01-02/5599 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; (Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi gereğince, Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU, görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı) karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-231 47 30 **Fax** : 0-442-231 55 63 **e-mail**: hadyek@atauni.edu.tr