



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**GLİOBLASTOM VE NÖROBLASTOM
İN VİTRO HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
ANTİEPİLEPTİKLERİN MİTOTİK PROLİFERASYON
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Zeynep Vargün
UZMANLIK TEZİ

SİVAS
2014



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**GLİOBLASTOM VE NÖROBLASTOM İN VİTRO HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE ANTİEPİLEPTİKLERİN MİTOTİK
PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

Zeynep Vargün
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Doç. Dr. Özlem Kayım Yıldız

SİVAS
2014

Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesi, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010/1-2 sayılı kararı ile kabul edilerek yürürlüğe girmiştir.

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Yazım Kuralları na uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Üye: Prof. Dr. A. Suat TOPAKTAŞ

Üye: Prof. Dr. Semiha Gülsüm KURT

Üye: Doç. Dr. Özlem Kayım YILDIZ

Bu tez, 21.03.2013 tarih ve 69 sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Okay BULUT

Tıp Fakültesi Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Her zaman bilgi ve tecrübelerini aktarıp, her konuda desteğini esirgemeyen, değerli hocam, Anabilim Dalı Başkan'ımız Prof. Dr. A. Suat TOPAKTAŞ'a,

Uzmanlık eğitimim süresince değerli katkıları ile yol gösterici olan, tezimi hazırlarken bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum tez danışman hocam, Doç. Dr. Özlem KAYIM YILDIZ'a

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki tecrübe ve bilgilerinden yararlanma olanağı bulduğum saygı değer hocalarım Prof. Dr. E. Bolayır'a, Doç. Dr. Hatice BALABAN'a, Yrd. Doç. Dr. Burhanettin Çiğdem'e

Tezimle ilgili istatistiklerin hesaplanması ve çalışmalarındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALTUN'a,

Karşılıklı destek ve anlayış içinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum doktor arkadaşlarıma, Dr. Şeyda Çevik, Dr.Serkan Şanlı, Dr. Samet Yılmaz'a hemşire ve personellerimize,

Tezimin çalışma aşamasında bana yardımcı olan Uz. Dr. Mesut PARLAK'a,

Tüm hayatım boyunca fedakârlıkla ve sabırla yanımda olan sevgili aileme, değerli arkadaşım Dr.Zeynep KAZAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

GLİOBLASTOM VE NÖROBLASTOM İN VİTRO HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ANTİEPİLEPTİKLERİN MİTOTİK PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Zeynep Vargün, Uzmanlık Tezi, Nöroloji Anabilim Dalı,

Danışman: Doç. Dr. Özlem Kayım Yıldız, 2014, 90 Sayfa

Beyin tümörlerinde direkt yayılım, metabolik ve vasküler etkiler ile hastalığın herhangi bir döneminde (ameliyat öncesi, ameliyat sonrası ve ameliyatın mümkün olmadığı durumlarda) epileptik nöbet görülebilir.

Beyin tümörlü hastalarda epileptik nöbetlerin kontrol altına alınması tedavinin önemli bir kısmını oluşturur. İyi kontrol edilmiş beyin tümörlü hastalarda, epileptik nöbetlerin eklenmesi, beyin tümörü dışında morbiditeyi olumsuz yönde etkiler. Beyin tümörlü hastalarda epileptik nöbetler lezyonun lokalizasyonuna göre değişmekle birlikte sekonder jeneralize olan yada olmayan parsiyel ve kompleks nöbetler şeklindedir.

Beyin tümörlü hastalarda epilepsi insidansı, tümörün tipine göre değişmekle birlikte, %30 dur (1). Beyin tümörlü epileptik hastaların %30-50'sinde nöbetler ilk klinik bulgu iken, %10-30 unda hastalığın ileri evrelerinde yada post operatif dönemde ortaya çıkar.

Malign tümör hücrelerinin çoğalmasında esas etkili olan atipik mitotik proliferasyondur.

Daha önceki çalışmalarda bazı antiepileptiklerin mitotik proliferasyon üzerinde olumlu ve olumsuz etkileri gösterilmiştir. Beyin tümörlü hastalarda ise büyük çoğunluğu antiepileptik kullanmasına rağmen bütün antiepileptiklerin mitotik proliferasyon üzerindeki etkileri karşılaştırılmalı olarak araştırılmamıştır.

Üniversitemizde daha önce yapılan bir çalışmada gabapentin, pregabalin, valproik asit, levetirasetam, zonisamid, fenitoin, karbamazepinin glioblastom ve nöroblastom hücre kültürlerinde invitro şartlarda antimitotik etkileri araştırıldı.

Fenitoin, levetirasetam ve valproik asit'in glioblastom hücre kültürlerinde doz bağımlı antimitotik etkilerinin olduğu, zonisamid ve pregabalinin tüm dozlarda antimitotik etkilerinin olduğu, karbamezepinin antimitotik etkisinin olduğu fakat 25 µg/ml üzerindeki konsantrasyonlarda antimitotik etkisinin azaldığı, gabapentinin ise antimitotik etkisinin olmadığı izlendi.

Nöroblastom hücre kültürlerinde sadece valproik asit ve zonisamid'in antimitotik etkili olduğu fenitoin, levetirasetam, karbamezezin, gabapentin ve pregabalinin ise antimitotik etkili olmadığı izlendi.

Bu çalışmada ki amacımız glioblastom ve nöroblastom hücre kültüründe in vitro şartlarda antiepileptiklerin mitotik proliferasyon üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak göstererek tedavi önceliğini belirlemektir.

Çalışmamızda kullanılan antiepileptiklerden lakozamid, lamotrijin, okskarbazepin, primidon, topiramet, vigabatrinin in vitro glioblastom (GB) ve nöroblastom (NB) hücre kültürlerinde mitotik proliferasyon üzerine etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. Çalışmada E-plate 16 isimli, herbir kuyucuğu 250 µL hacminde, zemin çapı 5mm olan ve 16 kuyucuktan oluşan plateler kullanıldı. İlk olarak her bir kuyucuğa hücre içermeyen, 100 µL besiyeri karışımı konularak cihazda bir baseline okuma yaptırılarak ardından flasklardan tripsinizasyon ve santrifüjasyon (800 RPM, 10 dakika) yoluyla toplanan hücreler kuyucuklara 100 µL hacim içerisinde ekildi.

Kanser hücre hatları laminar flow içerisinde kuyucuklara ekildikten sonra plate inkübatörün içerisine yerleştirildi ve 1'er saatlik zaman aralıkları ile hücre büyümeleri takip edildi. Kuyucuklara ekilen tümör hücreleri kuyucuk tabanına yapıştı ve burada uygun besin ve O₂/CO₂ ortamında büyümeleri sağlandı. Kuyucuk tabanına yerleştirilmiş olan altın plak elektrik akımını kullanarak bölünen hücrelerin elektrik yük empedanslarını ölçerek, hücrelerin büyüme indekslerini tespit etmemizi sağladı. Hücrelerin hızlı büyüme fazına girmelerinin ardından (Log fazı), deney grubu olarak belirlenen kuyucuklara antitümör etkinliği değerlendirilecek ajanlar 10 µL hacim içerisinde, değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Bu uygulamayı takiben plate yeniden inkübatörün

içerisine yerleştirildi. İlaç uygulamasının ardından 1'er saatlik ölçümlere devam edildi ve takip 24-72 saat boyunca sürdü.

X celligence testi ile materyallerin C6 ve T98G hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi değerlendirildi ve bulgular ile her materyale ait ortalama hücre proliferasyon yüzdeleri hesaplanarak elde edilen değerler karşılaştırıldı. Topiramet ve Okskarbezepinin tüm dozlarda antimitotik etki gösterdiği, lamotrijin ve primidonun doz bağımlı antimitotik etki gösterdiği, vigabatrin ve lakozamidin antimitotik etkisi olmadığı izlendi.

Gruplar arasındaki fark varyans analizini (ANOVA testi) takiben, post hoc TUKEY testi ile araştırıldı.

Sonuç olarak bu çalışmada xCELLigence yönteminin antiepileptiklerin mitotik proliferasyonunu belirlemede kolay ve hızlı bir yöntem olduğunu ve antiepileptiklerin tümör hücreleri üzerine farklı antimitotik etkileri olduğunu göstermiştir. Antiepileptiklerin antitümöral etkisini anlamak için, antiepileptiklerin mitotik proliferasyon etkileri ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mitotik proliferasyon, xCELLigence, glioblastom, nöroblastom, Antiepileptik ilaçlar

ABSTRACT

EFFECTS OF ANTI-EPILEPTICS ON MITOTIC PROLIFERATION ON IN VITRO GLIOBLASTOMA AND NEUROBLASTOMA CELL CULTURES

Dr. Zeynep Vargün, Uzmanlık Tezi, Nöroloji Anabilim Dalı,

Danışman: Doç. Dr. Özlem Kayım Yıldız, 2014, 90 Page

Epileptic seizures can be observed at any time during the course of disease (preoperative or postoperative periods or inoperable conditions) due to direct extension, and metabolic and vascular effects of brain tumors. Controlling epileptic seizures comprises an important aspect of management in patients with brain tumors. Addition of epileptic seizures affects morbidity negatively in patients with well-controlled brain tumor. Although epileptic seizures vary based on localization of the lesion, they are secondary generalized or non-generalized partial and complex seizures.

Although the incidence of epilepsy varies depending on tumor type, it is reported as 30% in patients with brain tumor. Seizures are first clinical sign in 30-50% in epileptic patients with brain tumor, while they develop at advanced stages or post-operative period in 10-30%. Atypical mitotic proliferation is the primary mechanism in the growth of malignant tumor cells. Positive and negative effects of some anti-epileptics on proliferation were shown in previous studies; however, effects of all anti-epileptics on mitotic proliferation have not been investigated in comparative manner although most patients with brain tumor use anti-epileptic agents. In a previous study which performed in our university, antimitotic effect of gabapentin, pregabalin, valproic acid, levatiracetam, zonisamide, phenytoin and carbamazepine was investigated as in-vitro in glioblastoma and neuroblastoma cell cultures. In this study, it was found that phenytoin, levatiracetam and valproic acid had an dose-dependent antimitotic effect, zonisamide and pregabalin had an dose-independent antimitotic effect (for all doses), carbamazepine had an antimitotic effect which reduced at concentrations above 25 µg/ml but gabapentin

had no antimitotic effect in glioblastoma cell culture. In neuroblastoma cell cultures, only valproic acid and zonisamide had an antimitotic effect but phenytoin, levatiracetam, carbamazepine, gabapentin and pregabalin had no antimitotic effect.

In the present study, our aim is to determine therapeutic priority by demonstrating effects of anti-epileptics on mitotic proliferation on in vitro glioblastoma and neuroblastoma cell cultures in comparative manner.

In our study, in vitro anti-tumoral activities of lacosamide, lamotrigine, oxcarbazepin, primidone, topiramate and vigabatrin were assessed by using a real-time cell analysis system. In the study, E-Plate 16 was used, which has 16 wells with base diameter of 5 mm and volume of 250 μ L. Firstly, 100 μ L growth medium was placed to each well and a baseline reading was performed. Then, cells harvested by trypsinization and centrifugation (800 rpm for 10 minutes) were inoculated into each well with a volume of 100 μ L.

Cancer cell lines were inoculated into wells under laminar flow; then, plate was placed into incubator and cell proliferation was monitored by one-hour intervals. Tumor cells were adhered to base of wells where they proliferated under appropriate nutritional and O₂/CO₂ conditions. Proliferation indices were detected by measuring electric charge impedances of mitotic cells using electric current via gold plate placed to the base of each well. After onset of rapid proliferation phase (log phase), differential concentrations of agents in which anti-tumoral effects would be assessed were added to each well in a volume of 10 μ L. Then, plate was placed into incubator again. Measurements were performed by one-hour intervals over 24-72 hours after drug administration.

By utilizing xCELLigence test, the antimitotic effect of materials on C6 and T98G cells was assessed, then using findings of this study average cell proliferation percentage of each material was calculated and results were compared. It was observed that Topiramate and Oxcarbazepine showed antimitotic effect at all doses, lamotrigine and primidone showed dose-dependent antimitotic effect, and vigabatrin and lacosamid had no antimitotic effect.

The difference between groups was assessed by using variance analysis (ANOVA test); followed by post-hoc Tukey test.

In conclusion, it was shown that xCELLigence system is a simple and rapid method in determination of mitotic proliferation of anti-epileptics and that anti-epileptics have different cytotoxic activities on tumor cells. Further studies on effects of anti-epileptics on mitotic proliferation are needed to understand anti-tumoral effects of anti-epileptics.

Keywords: Mitotic proliferation, xCELLigence, glioblastoma, neuroblastoma, anti-epileptic agents

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
SİMGELER DİZİNİ	xvi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Beyin Tümörleri ve Epilepsi.....	4
2.2. Glioblastom.....	7
2.2.1. Patofizyolojisi	8
2.2.2. Klinik	10
2.2.3 Tedavi	11
2.3. Nöroblastom.....	12
2.3.1. Epidemiyoloji.....	12
2.3.2. Etiyoloji	13
2.3.3. Genetik.....	14
2.3.3.1. Allelik Fazlalık ve Onkogen Aktivasyonu	15
2.3.3.2. Allelik Kayıplar ve Tümör Supresör Genler	15
2.3.3.3. Bazı Genlerin Ekspresyonundaki Anormal Değişimler	15
2.3.4. Klinik	15
2.4. Antiepileptikler.....	16
2.4.1. Lamotrijin	16
2.4.2. Primidon.....	17
2.4.3. Topiramat.....	18
2.4.4. Vigabatrin	20
2.4.5. Lakozamid.....	21
2.4.6. Okskarbazepin.....	22
2.5. Hücre Kültürü.....	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Deney Örneklerinin Hazırlanması.....	26
3.2. Hücre Kültürü Teknikleri.....	30
3.2.1. Hücre Hattının Açılması.....	30
3.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması.....	30
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	30
3.2.4. Hücre Sayımı.....	31
3.2.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	31
3.3. xCELLigence sistemi.....	32
3.4. Hücre Proliferasyon Çalışması (Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, Xcelligence Deneyi)	34
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Antiepileptiklerin mitotik proliferasyon bulguları	37
4.1.1. Lakozamid.....	37
4.1.2. Okskarbazepin	38
4.3. Lamotrijin.....	40
4.4. Primidon.....	42
4.5. Topiramat.....	44
4.6. Vigabatrin.....	46
5. IC50 DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	49
6. TARTIŞMA.....	50
7. SONUÇLAR.....	56
8. KAYNAKLAR	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1: Hücrelerin incelenmesinde kullanılan mikroskop ve LN -229 Glioma hücre hattı ve NA/An1 Mouse neuroblastoma (Fare) hücre hattı hücreleri için kullanılan flask.....	28
Şekil 3.2: DMEM, Fötal sığır serumu (FBS), Penisilin-streptomisin, Trypsin, EDTA.	28
Şekil 3.3: Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril laminar akımlı kabin.	29
Şekil 3.4: Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril laminar akımlı kabinin iç görünümü.....	29
Şekil 3.5: %5 CO ₂ içeren inkübatör.....	30
Şekil 3.6: RTCA DP istasyonu ve dizüstü bilgisayar.....	33
Şekil 3.7: Analiz cihazı.....	33
Şekil 3.8: RTCA DP istasyonu	33
Şekil 3.9: Kuyucuk tabanındaki altın plağın hücrelerin elektrik yük empedanslarını ölçmesi.....	34
Şekil 3.10: E-plate 16	34
Şekil 3.11: Steril kabin içerisinde ekstraksiyon solüsyonunun E-platelere uygulanması.....	35
Şekil 3.12: Ekstraksiyon solüsyonunun E-platelere uygulanması	36
Şekil 3.13: xCELLigence sistemi bilgisayarı ve inkübatörü	36
Şekil 4.1: Lakozamid 25,50,100 mM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	37
Şekil 4.2: Lakozamid 25,50,100 mM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	38
Şekil 4.3: Okskarbazepin 7.5,15 ve 30µM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi	39

Şekil 4.4: Okskarbazepin 7,5, 15 ve 30µM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	40
Şekil 4.5: Lamotrijin 1.25nM, 2.5nM,5nM ve 10 nM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	41
Şekil 4.6: Lamotrijinin 1.25, 2.5, 5 ve 10 nM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	42
Şekil 4.7: C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	43
Şekil 4.8: Primidonun 12.5, 25, 50, 100 mM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	44
Şekil 4.9: Topiramet 25,50,100 µM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	45
Şekil 4.10: Topiramet 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.	46
Şekil 4.11: Vigabatrin 50 ,100 ve 200 mM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.....	47
Şekil 4.12: Vigabatrin 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki etkisi üzerindeki antimitotik etkisi	48
Şekil 5.1: C6gliom hücreleri için lamotrijin, okskarbazepin ve topiramatin hesaplanan IC50 değerleri.....	49
Şekil 5.2: C6gliom hücreleri için vigabatrin, lakozamid ve primidonun hesaplanan IC50 değerleri,	50
Şekil 5.3: NA/AN1 nöroblastom hücreleri için lamotrijin, okskarbazepin ve topiramatin hesaplanan IC50 değerleri.....	50
Şekil 5.4: NA/AN1 nöroblastom hücreleri için vigabatrin, lakozamid ve primidonun hesaplanan IC50 değerleri	51

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Beyin tümörlerindeki nöbet sıklığı.....	5
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan antiepileptikler ve kısa etki mekanizmaları.....	26
Tablo 3.2: Hücre kültüründe kullanılan besiyeri ve içeriği.....	29

SİMGELER DİZİNİ

cm²	: Santimetrekaře
mm²	: Milimetrekaře
mm	: Milimetre
°C	: Santigrat derece
mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
g/ml	: Gram/ mililitre
rpm	: Rate per minute (dakikadaki devir sayısı)
dk	: Dakika
cm²/mL	: Santimetre kare / mililitre
µL	: Mikrolitre
µ	: Micron
mV	: Milivolt
µgr	: Microgram
µM	: Micromalar
nM	: Normomalar

KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	: Analysis of variance test (Tek yönlü varyans analizi)
ISO	: International Organization for Standardization (Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu)
BSI	: The British Standards Institute
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fötal sığır serumu)
UV	: Ultraviyole (morötesi ışınım)
PCR	: Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
O₂	: Oksijen
CO₂	: Karbondioksit
RTCA	: Real-time cell analyzer (gerçek zamanlı hücre analizi)
(EC50)	: Maksimum etkinin yarısını yapan konsantrasyon
SD	: Standart sapma
CI	: Hücre indeksi
IC50	: Agonistin belirli bir etkisini % 50 oranında inhibe eden antagonist konsantrasyonu
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
Na	: Sodyum
GABA	: Gamma-aminobütirik asit
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
CYP	: Stokrom

EMG	: Elektromiyografi
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
T3	: Triiyodotronin-hormonu
T4	: TİROKSİN = TETRAİYODOTİRONİN
SSS	: SANTRAL SİNİR SİSTEMİ
SV2A	: Sinaptik vezikül 2a
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
RMS	: Root mean square (gerilim veya ceryanın karesinin ortalama değerinin köküdür)
KİBAS	: Kafaîçi basınç artışı
İn vivo	: Canlı ortamda ya da yaşayan koşullarda
İn vitro	: Laboratuar ortamında ya da yapay koşullarda
Ca	: Kalsiyum
IFN-a	: İnterferon a

1. GİRİŞ

Beyin tümörlerinde direkt yayılım, metabolik, vasküler etkileri ile hastalığın herhangi bir döneminde (ameliyat öncesi, ameliyat sonrası ve ameliyatın mümkün olmadığı durumlarda) epileptik nöbet görülebilir.

Beyin tümörlü hastalarda epilepsi insidansı, tümörün tipine göre değişmekle birlikte, %30 dur (1). Beyin tümörlü epileptik hastaların %30-50'sinde nöbetler ilk klinik bulgu iken, %10-30' unda hastalığın ileri evrelerinde yada post operatif dönemde ortaya çıkar (2). Bu nöbetler tümör nedeniyle kullanılan kemoterapi ve radyoterapiye sekonder olabileceği gibi metabolik bozukluğa sekonder gelişen ensefalopati nedeniyle de gelişebilir.

Beyin tümörlü hastalarda epileptik nöbetlerin kontrol altına alınması tedavinin önemli bir kısmını oluşturur. İyi kontrol edilmiş beyin tümörlü hastalarda, epileptik nöbetlerin eklenmesi, beyin tümörü dışında morbiditeyi olumsuz yönde etkiler. Beyin tümörlü hastalarda epileptik nöbetler lezyonun lokalizasyonuna göre değişmekle birlikte sekonder jeneralize olan ya da olmayan parsiyel ve kompleks nöbetler şeklindedir (3). İntrakranyal yer kaplayan lezyonu olan hastalarda lezyonun eksizyonu sonrasında da nöbetler devam edebilir.

Epilepsi gelişiminde potansiyel risk faktörleri kortikal tümörlerdir. Frontal, temporal ve parietal yerleşimli tümörler oksipital lob yerleşimli tümörlerden daha fazla nöbet oluşumuna neden olurlar. İnfratentoryel ve sellar tümörler serebral hemisferlere yayılmadığı sürece nadiren nöbetlere sebep olurlar (4).

İnfratentoryel yerleşimli tümörler lokalizasyonları itibariyle beyin dokusuna verecekleri harabiyetin derecesinin düşük olmasından dolayı daha az epileptojen kabul edilirler (4).

Beyin tümörlü hastalarda epileptogenezin muhtemelen multifaktoryel olduğu, değişik tümör tipleri tarafından oluşturulabileceği ve tümör hücre membranlarındaki değişikliklerin aksiyon potansiyelleri üreterek nöronal eksitabiliteyi etkileyebileceği düşünülmektedir (5,6). Genç yaş ve uzun hastalık süresi sekonder epileptogenez riskini artırır. Bu nedenle primer epileptik lezyonun erken tedavisi, sekonder

epileptogenez riskini azaltarak, farklı bir odak gelişimini önlemek için gerekli olabilir (7).

Beyin tümörünün cerrahi tedavisi yapılan hastalarda antiepileptik tedavi profilaksisi önerilmekle birlikte fikir ayrılıkları mevcuttur ve cerrahi öncesi ve sonrası antiepileptik ihtiyacı halen tartışmalıdır (8,9). Hastalarda ilerleyen dönemlerde tümörün tipi, lokalizasyonu, hastanın yaşı ve önceki kanser tedavisine bağlı olarak %20-45 oranında epileptik nöbet gelişme olasılığı mevcuttur (2). Randomize çalışmalarda intraserebral metastaz ve primer supratentoryel beyin tümörlerinde profilaktik fenitoin kullanımının etkinliği gösterilememiştir (10). Nöbetleri olmayan beyin tümörlü hastalarda yapılmış 2 meta analizde antiepileptik ilaçların profilakside etkili olduğu gösterilememiştir (2,11). Amerikan Nöroloji Akademisi Kalite Standartları Alt Komitesi tarafından yayınlanan fikir birliği raporunda beyin tümörlü hastalarda profilaktik amaçla rutin olarak antiepileptik ilaçların kullanılmaması ve eğer hasta hiç nöbet geçirmedi ise bu ilaçların cerrahiden sonraki ilk haftada kesilmesi önerilmektedir (2).

Wick ve arkadaşları düşük grade gliomalarda %90 oranında, yüksek grade tümörlü hastalarda %60 oranında nöbet görüldüğünü bildirmişlerdir (9). Bu hastalardan karbamazepin alanların %70'inde, fenitoin alanların %51'inde ve valproik asit alanların %44'ünde rekürren nöbetler olduğu bildirilmiş ve beyin tümörlü hastalarda valproik asitin ilk tercih edilmesi gereken ilaç olduğu belirtilmiştir (9).

Wagner ve arkadaşları dirençli nöbetleri olan hastalarda antiepileptik tedaviye levetirasetam (LEV) ekleyerek hastaların %65'inde nöbet sıklığında azalma sağlamışlar ve hastaların önemli bir bölümünde sonradan LEV monoterapisi ile tedaviye devam ettiklerini bildirmişlerdir (12).

Parsiyel epilepsilerin tedavisinde karbamazepin tek başına en etkili antiepileptiklerden biri olmasına rağmen, kanser hastalarında enzim indükleyicisi olması nedeniyle sakıncaları mevcuttur. Bu nedenle uygun kemoterapötik ajanın etkinliğini kısıtlayabilir (13). Beyin tümörlerinde valproik asitin, okskarbazepinin kullanımı ve etkinliğine dair çalışmalar mevcuttur (4). Topiramet monoterapide tercih edilebilir, fakat diğer yeni antiepileptik ilaçlarla kıyaslandığında daha az tolere

edilebilir. İlk tercih ilaçlar yetersiz ise levetirasetam veya gabapentin eklenebilir. LEV gabapentine kıyasla daha etkili bulunduğundan öncelikle tercih edilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda LEV'in valproik asit ile kombinasyonu beyin tümörlü hastalarda etkin nöbet kontrolü sağlamıştır (8,12).

Tümör büyümesini kontrol altına almaya yarayan mümkün ise geniş tümör rezeksiyonu, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi yöntemleri nöbetlerin seyrini etkileyebilir. Dirençli epilepsisi olan hastaların %70–90'ında epileptojen bölgenin total eksizyonu sonrasında tam nöbetsizlik ya da nöbet sıklığında önemli derecede azalma saptanmıştır (15). Khan ve ark. nın beyin tümörlü çocuklarda retrospektif olarak yaptıkları bir çalışmada, %39 hastada 6 ila 8 hafta sonra antiepileptik tedavi sonlandırılmış, bunlardan sadece %17 sinde nöbet rekürrensi ortaya çıkmıştır. Nöbet rekürrensi riskini arttıran faktörler arasında iki veya daha fazla operasyon, tüm beyin radyoterapisi, genç yaşta tümör tanısı alma, ve ventriküloperitoneal şant uygulaması sayılabilir (4). Beyin tümörlü çocuklarda yapılan bazı çalışmalarda hastaların yarısında rekürrensin ilaç kesildikten sonraki ilk 6 ayda olduğu, 5 yıl içerisinde %27 olasılıkla rekürrens riskinin bulunduğu bildirilmiştir (16).

Kraniyal radyoterapinin epilepsi üzerine olumlu pozitif etkileri gösterilmekle birlikte, bazen cerrahi ya da radyoterapi sonrası ödem, kanama veya radyasyon nekrozu gibi sekonder komplikasyonlara bağlı nöbet sıklığında artış olabilir (17).

Beyin tümörlü hastalarda epileptik nöbetler siktir ve epileptogenez muhtemelen çok faktörlüdür. Operasyon sonrası ilk haftadan sonra eğer hasta hiç nöbet geçirmiyor ise antiepileptik ilaçların kesilmesi yönünde bir fikir birliği vardır. Birden fazla operasyon geçiren beyin tümörlü epileptik hastaların tedaviye daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Beyin tümörlü hastalarda ilk seçenek ilacın belirlenmesi antikanser ilaç etkileşimleri nedeni ile diğer semptomatik lokalizasyonla ilişkili epilepsi hastalarının tedavisinden farklıdır.

Bu çalışmada GB ve NB hücre kültüründe in vitro şartlarda antiepileptiklerden lamotrijin, primidon, topiramat, vigabatrin, lakozamid ve okskarbazepinin mitotik proliferasyon üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak göstererek tedavideki önceliğini belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Beyin Tümörleri ve Epilepsi

Epilepsi beyin tümörü olan hastalarda sıktır ve klinik yaklaşım açısından nöbet kontrolü önemlidir. Epilepsi nöbeti, gerek primer beyin tümörü olan, gerek serebral metastazı olan hastalarda hastalığın tanısından önce veya hastalığın seyri sırasında ortaya çıkabilmektedir. Epileptik nöbetler kontrol altına alınmış tümör varlığında dahi önemli bir morbidite nedenidir (18).

Primer ve metastatik beyin tümörlerinde sıklıkla beyin lezyonu ile ilişkili tek izole nöbet atağı veya tekrarlayıcı nöbetler olabilir (19). Beyin tümörü olan hastalarda nöbetler jeneralizasyon gösteren ya da göstermeyen kompleks parsiyel veya basit parsiyel özellikte olabilmektedir.

Tümör tipi, tümör lokalizasyonu, peritümöral değişiklikler ve genetik faktörler gibi birçok neden epileptogenezde etkilidir.

Beyin tümörlerine bağlı olarak ortaya çıkan nöbetlerin patofizyolojisi tam olarak aydınlatılmamış olup, nöronal regülasyon ve nöronal iletişimin, vasküler permeabilitenin değişmesi, kan beyin bariyerinin bozulması, glial hücre fonksiyonunun bozulması gibi çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır (18,20).

Epidemiyoloji

Beyin tümörleri epilepsi olgularının sadece %1'inden sorumlu olmakla beraber, primer ve metastatik beyin tümürlü hastaların yaklaşık %35-50'sinde nöbet görülür (21,116).

Epilepsi prevalansı tümör tipine bağlı olarak değişmektedir (18).

Tümörün yerleşim yeri epilepsi riski üzerine etkili faktörlerdendir. Kortikal yerleşimli tümörler nöbet açısından daha risklidir. Frontal, temporal, parietal yerleşimli tümörlerde nöbet gelişim oranı oksipital yerleşimli olanlara göre daha yüksektir. İnfratentorial ve sellar tümörler serebral hemisferlere yayılmadıkça çok nadir olarak nöbetlere neden olurlar (22-24).

Kural olarak yavaş büyüyen tümörler yüksek gradeli malignansilere oranla daha epileptojeniktir. Nöronal tümörlerin glial malignansilere ve lenfomalara oranla daha çok nöbete neden olduğu bilinmektedir. Sağkalımı yüksek tümöre sahip genç hastalar nöbet yönünden daha çok risk altındadır. Tümör tipi ile alakalı olmakla birlikte beyin tümörü olanlarda epilepsi görülme sıklığı yaklaşık %30 civarındadır. Beyin tümörü olanların %30-50'si nöbet ile prezente olurken %10-30'unda hastalığın tanısından sonra nöbetler ortaya çıkmaktadır (31). Tablo 2.1 de beyin tümörlerindeki nöbet sıklığı görülmektedir (25).

Tablo 2.1: Beyin tümörlerindeki nöbet sıklığı

TÜMÖR	NÖBET SIKLIĞI
Disembriyoplastik nöroepitelyal tümörler	%100
Gangliogliom	%80-90
Düşük-gradeli astrositom	%75
Menenjiom	%29-60
Glioblastom	%29-49
Metastaz	%20-35
Leptomeningeal tümör	%10-15
Primer santral sinir sistemi lenfoması	%10

Epileptogenez

Beyin tümörlerinde epileptogenezin sebebi tam aydınlatılamamıştır. Epileptogenezin multifaktöriyel olduğu inhibitör ve eksitator mekanizmalar arasındaki dengenin eksitator tarafa doğru kaymasının sebep olduğu düşünülmektedir (26). Epileptojenik aktivite genelde korteks komşuluğundaki tümör etrafındaki dokudan kaynaklanır (27).

Tümörün histolojik özelliklerinin epileptik nöbet gelişmesindeki rolü büyüktür. Düşük gradeli primer beyin tümörleri yavaş büyür, çevresindeki normal dokuları istila eder ve yüksek sıklıkta epileptik nöbete neden olur. Nöbet gelişimi için yüksek riskli olduğu düşünülen gelişimsel tümörler örneğin disembriyoplastik nöroepitelyal tümörler ve Grade II astrositomalar bu şekilde aktivite gösterirler (26).

Glioblastom gibi yüksek gradeli gliomaların nöbet oluşturma sıklığı daha azdır (26,28). Bu lezyonlara bağlı meydana gelen nöbetler nekroz alanlarından ve hemosiderin birikimlerinden kaynaklanmakta olabilir (27).

Primer beyin tümörleri normal beyin dokusuna göre daha yüksek bir metabolik değere sahiptir. Bu durum hipoksi ve interstisyel asidoza sebep olmaktadır. Beyin tümörleri etrafında belirgin vazojenik ödem gelişir, dokudaki artmış su içeriği nöral eksitabiliteye neden olur (26,29). Peritümöral dokunun kantitatif çalışmalarında artmış su içeriğine ek olarak, kalsiyum, sodyum, ve serum proteinlerinde artış da gösterilmiştir (29).

Peritümöral doku morfolojisinde, aberran nöronal migrasyon, sinaptik veziküllerdeki değişikliklerin, gap junction kanal ekspresyonundaki artış ve ya glutamat ve GABA'nın lokal konsantrasyonlarındaki değişikliklerin neden olduğu eksitator ve inhibitör mekanizmalardaki dengesizlik gibi morfolojik değişikliklerin epileptogenez de etkili olduğu düşünülmektedir (28). GABA reseptörlerine ve glutamat dekarboksilaza karşı oluşan immune reaktivasyon perilezyonel değişikliklere sebep olarak glioma gibi tümörlerde glutamat artışına ve refrakter epilepsiye neden olmaktadır (28).

Bununla birlikte tümörün kitle etkisi, lokal irritasyonu ve hipoksinin de epileptogenezle ilgili olduğu düşünülmektedir (11).

Tümör hücreleri normal dokudan daha fazla laktat üretir. Tümör hücreleri kromozomal instabilitiye sahiptir ve hipoksi bu hücrelerde DNA tamiri üzerine negatif etki yaparak, astrositik hücrelerin sodyuma geçirgenliğini artırmakta ve epilepsi riski artmaktadır (26,27).

Ayrıca beyin tümörleri, nörotransmitter reseptörlerinin ekspresyonlarında değişikliğe neden olmaktadır. Nöbete neden olanlar metabotropik ve iyonotropik glutamat reseptörleridir. Gliomalar yüksek oranda iyonotropik glutamat reseptörlerinin (alfa amino 3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol-propiyonat [AMPA], Nmetil- D-aspartik asit [NMDA] ve kainat reseptörleri) ekspresyonuna, bunun sonucunda hipereksitabiliteye neden olmakta ve aralıksız NMDA reseptör aktivasyonu sonucu nöbetler ortaya çıkmaktadır (30,31). Metabotropik glutamat

reseptörleri guanozin trifosfata bağlı proteinler ve protein kinaz kaskadı yoluyla intrasellüler sinyalizasyonu sağlarlar (28).

Normal korteksle kıyaslandığında lezyon çevresi alanda çok sayıda metabotropik glutamat reseptör alt gruplarının salınımı olduğu gösterilmiştir. Beyindeki majör eksitatör nörotransmitter olan glutamat lezyon etrafında nöbet gelişimine neden olmaktadır. Tümör invazyonu sırasında tümör hücrelerinin göç etmesini kolaylaştırmak için tümöral doku yüksek glutamat salınımına neden olmakta ve bu şekilde nöronları eksitotoksik hasara uğratmaktadır (28,30).

Kanser hastalarında nöbet oluşmasına neden olan diğer faktörler arasında, menenjit ve serebral apse gibi enfeksiyonlar, hipoglisemi, hipokalsemi gibi metabolik faktörler, radyasyon nekrozu gibi tedavi sorunları, bazı kemoterapötikler (ifosfamid, sisplatin, IL 2 vs.) ve limbik ensefalit gibi paraneoplastik sendromlar sayılabilir (31).

Beyin tümörlerine bağlı tedaviye dirençli nöbetler sık görülmektedir. Nöbetler intrakraniyal kitle lezyonu olan hastalarda hem kafa içi basıncını artırarak ve hem de beyindeki eksitatör aminlerin dengesini değiştirerek hastanın kötüleşmesine neden olabilirler. Bundan dolayı özellikle status epileptikus öncelikli olmak üzere acilen tedavi gerektirirler. Hasta ilacın yan etkilerine, toksik etkilerine ve ilaç etkileşimlerine karşı yakından izlenmelidir.

2.2. Glioblastom

Glioblastom (GB) erişkinlerde en sık görülen primer beyin tümörüdür. Bilinen en hızlı seyirli ve ölümcül tümörlerdendir. Primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak 1/3'ünü oluşturmaktadır (32). İnsidansı Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 3,2/100.000 olarak gosterilmiştir (33).

Ortalama görülme yaşı 56 yaştır. Erkeklerde görülme oranı daha fazladır. Gliomların yaklaşık %40-50'sini oluşturmaktadır. Pre-operatif semptomatolojisi ortalama 5,4 aydır. GB serebral hemisferlerde baskın olmak üzere her bölgede görülebilir. Frontal (%40), temporal (%25), parietal (%25) yerleşimleri tüm gliomlara özgü olarak rastlanır ve GB de en sık frontal lob en az oksipital lobda

görülür. Korpus kallosum aracılığıyla kısa sürede karşı hemisfere geçer. Primer olarak da kelebek tipi gliom tarzında korpus kallosumda ya da ender olarak multifokal başlangıç da sergileyebilir (34). En sık kafa içi basınç artışı semptomları (KİBAS) görülür. KİBAS semptomları olarak baş ağrısı (%68), bulantı ve kusma (%45) düşük dereceli gliomlardan daha sık olarak gözlenir. Mental durum değişiklikleri (%47), motor defisitler (%44) oldukça yaygın olarak saptanır. Nöbetler ile başvuru yaklaşık %32 dir (35).

GB genel olarak intrakranial bölgede sınırlıdır ve nüks ya lokaldır ya da yine beyin içerisinde başka bir alandadır. Ancak nadir de olsa hastalığın geç dönemlerinde metastaz yaptığı da görülmüştür. Bunlar arasında servikotorakal intrameduller, konus medullaris, spinal leptomeningeal, kemik ve visseral organ tutulumu vardır.

Nöroradyolojik olarak düzensiz sınırlı, ortasında nekrotik kavite bulunan, çevresinde halkasal düzensiz kontrast tutulumu gösteren, etrafı ödemli bir kitle olarak görülür (36, 37) ve oldukça belirgin peri tümöral ödem (vazojenik tipte) gösterir.

Korono radiata, komissürler, kortikospinal traktus ve özellikle korpus kallosum (kelebek tipi gliom) gibi beyaz cevher oluşumları yolu ile invazyon gösterir. Subaraknoid, subpial ve subependimal yayılım gösterir. Histopatolojisinde endotel proliferasyonu ile birlikte yeni damar oluşumu, nekroz alanları, bu nekroz alanlarından uzanan infiltrasyon odakları gözlenir (36). Günümüzde intrakraniyal patolojilerde ileri radyolojik tetkikler ve biyopsi ile %90-95 oranında tanı konulabilmektedir.

2.2.1. Patofizyolojisi

Glioblastom (GB) çok az differansiyasyon gösteren, yoğun mitoz, da mar proliferasyonu ve nekroz içeren, çevre dokulara yoğun infiltrasyon yapan, genellikle supratentoriyal yerleşimli, multifokal ya da multisentrik olabilen en malign astrositik tümördür (38).

Glioblastomlar birincil ya da ikincil olarak sınıflandırılabilir. Birincil GB 50 yaşından büyük erişkinlerde vakaların büyük çoğunluğunu (%60) oluşturur. Bu

tümörler de novo olarak (klinik ve histopatolojik delil olmadan) ortaya çıkarlar. Hastalar genellikle 3 aydan daha kısa bir sürede başlayan klinik öykü ile başvururlar.

İkincil GB (%40) düşük dereceli astrositom (grade II WHO) ya da anaplastik astrositomdan (grade III) ortalama 4-5 yıl içinde gelişir.

Genç hastalarda (<45 y) daha sık görülür. GB'nin her iki tipinin gelişiminde de bazı genetik etkilerin oluştuğu düşünülmektedir (38).

Bunlar;

1) P53 gen mutasyonu

P53 geni, kromozom 17p13.1'de lokalizedir ve hücre siklusu, DNA hasarına yanıt, hücre ölümü, hücre farklılaşması ve neovaskülarizasyon gibi pek çok süreçte aktif rol oynar (43,44). P53 tümör süppresör geninin kaybı ya da mutasyonu, pek çok gliomda ve özellikle bir grup astrositomda erken gelişen bir genetik olay olarak karşımıza çıkmaktadır (37,38). P53 mutasyonları, primer glioblastomlarda nadirken, sekonder glioblastomlarda yüksek oranda rastlanır (39).

2) MDM2 geni

MDM2 geni, kromozom 12q14.3-q15 bölgesinde lokalizedir. 54kDa ağırlığında transkripsiyon faktörü olan bir proteini kodlar (40).

MDM2 proteini hem mutant hem de wild-tip p53 proteinini bağlayabilir, ve wild-tip p53'in transkripsiyon aktivasyonu özelliğini inhibe eder (40,41). MDM2 amplifikasyonu veya overekspresyonu ile P53 tarafından düzenlenen hücre büyümesi kontrolünden kurtulmak mümkündür. MDM2 amplifikasyonu, TP53 mutasyonu içermeyen primer glioblastomların yaklaşık %10'unda izlenmektedir (42,43). MDM2 proteininin overekspresyonu immünohistokimyasal olarak primer glioblastomların yaklaşık yarısında saptanmaktadır (42,44).

3) Platelet türevi büyüme faktörü

Platelet-derived growth factor ve reseptörleri

(PDGF- PDGFR) PDGF, bağ dokusu hücreleri ve glial hücreleri için mitojen olan bir dimerdir. PDGF ligantları, tirozin kinaz ailesinden iki hücre yüzey reseptörü (PDGFR-alfa ve PDGFR beta) tarafından tanınır (45,46).

PDGFR-alfa overekspresyonu, hem düşük hem de yüksek dereceli gliomalarda saptanmaktadır. Oysa PDGFR-alfa gen amplifikasyonu sadece glioblastomların %16' sında izlenmektedir (47).

4) Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (*Epidermal büyüme faktörü reseptörü*)

(*Epidermal growth factor receptor- EGFR*)

EGFR 170 kDa'luk, transmembran bir tirozin kinaz reseptörüdür. EGFR'i kodlayan gen, kromozom 7 nin üzerinde yer almaktadır. *EGFR* geni hücre proliferasyonunun kontrolünde rol almaktadır ve astrositik tümörlerde en sık amplifiye olan onkogendir (48).

5) Heterozigosite Kaybı

Kromozom 10'un bir kopyasının kaybı düşük dereceli astrositomlarda nadir olmakla birlikte, glioblastomlarda sıklıkla izlenen bir olaydır (49,50).

6) *PTEN (MMAC1) ve Deleted in Malignant Brain Tumours 1 (DMBT1)*

PTEN (MMAC1). *PTEN* (phosphatase and tensin homology) veya MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) olarak da bilinen gen, kromozom 10q23.3'de lokalizedir (51). Hücrel bir fosfataz gibi sinyal yollarını kapatmakta ve tümör süpresyon aktivitesi sağlamakta görevlidir.

7) *DMBT1.DMBT1 (Deleted in Malignant Brain Tumours 1)* geni, kromozom 10q25-26'de yer almaktadır ve bir tümör suppressor gen adaydır.

Glioblastomların yarısından fazlasında delesyona uğramıştır (52). *DMBT1* geninin kromozomal instabilitenin gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (53).

2.2.2. Klinik

Beyin tümörleri; tümörün kitle etkisine, peritümöral ödem gelişmesine veya hidrocefaliye bağlı olarak gelişen intrakranial basınç artışı; normal doku yıkımına

bağlı olarak gelişen fokal nörolojik bozukluklar, kortikal irritasyona bağlı gelişen nöbetleri kapsayan 3 mekanizma ile ilk semptomlarını verirler.

İntrakranyal basınç artışı genellikle BOS akışında meydana gelen bir tıkanıklığın sonucudur. Baş ağrısı, bulantı, kusma, diplopi, papil ödem, mental değişiklikler ve letarji gibi semptomlar verebilir. Baş ağrısı, meninkslerde kan damarlarıyla ilişkili olan, ağrıya duyarlı sinir uçlarının irritasyonu ve lokal gerilimi sonucu oluşabileceği gibi, tümörün basıya neden olabilecek kritik hacme ulaşması sonucu, intrakranyal basıncın artışı ile de ortaya çıkabilir.

Baş ağrısı sıklıkla bölgesel olma özelliği taşır ve genellikle tümörün yerleşimi hakkında bilgi verir. BOS dolaşımı pozisyonla ilgili olarak değişiklik gösterdiğinden baş ağrısı genellikle sabah saatlerinde daha şiddetlidir. Öksürmek veya intrakranial basıncı arttıracak vücut hareketlerinde bulunmak ağrıyı şiddetlendirir. Mental değişiklikler primer veya metastatik frontal ve temporal lob tümörlü hastalarda çok sık görülen ortak bir bulgudur (54).

İntrakranyal tümörler kitle etkisi veya metabolik bozukluklara yol açmak suretiyle, fonksiyonel yıkıma neden olabilir (55, 56). Nörolojik bozukluklar, daha çok beynin tutulduğu alana bağımlı olarak ortaya çıkar. Örneğin baskın hemisferde gelişen bir tümör, afazi ve hemiparezi; serebellar yerleşimli bir tümör ataksi ve koordinasyon bozukluğu gibi bulgularla ortaya çıkabilir. Tümör yerleşimine bağımlı olarak, fokal ve hemisferik bulgular da görülebilir. Örneğin parietal lob tümörlerinde afazi, agnozi, kortikal apraksi, hemipleji veya parezi; temporal lob tümörlerinde yakın hafıza kaybı, auralı nöbetler ve halüsinasyonlar; frontal lob tümörlerinde anosmi, kişilik değişiklikleri, koku hallusasyonları; oksipital lob tümörlerinde görme alanı bozuklukları ve aleksi görülebilir (55, 56).

Epileptik nöbet sıklığı yüksek oranda görülmekte ve hastalara antiepileptik tedaviler verilmektedir.

2.2.3Tedavi

Tedavide cerrahi uygulamaların yanında kemoterapi, radyoterapi, semptomatik tedaviler uygulanmaktadır. Küratif tedavi yoktur. Tanı konulduktan

sonraki ortanca sağkalım genellikle bir yıldan azdır ve en iyi şartlarda bile hastaların %5-10'u 2 yıl kadar yaşamaktadır (32).

Hastaların standart tedavisi cerrahi ve postoperatif radyoterapidir (RT) (57). Glioblastom hemisferlerde genellikle geniş dağılım alanları göstererek beynin birden çok sayıda fonksiyonel bölgesini etkiler. Bu durum cerrahiye zorlaştıran ana nedenlerdendir. Ayrıca beyin sapı tümörlerinin de yaklaşık yarısı malign özellik taşırlar. GB lerin %10 kadarı metastatik tümörleri taklit ederek beyaz-gri madde sınırını tutarlar. Sağkalım süresini uzatmak için farklı multimodalite tedaviler geliştirilmiştir.

Yüksek doz RT, adjuvant kemoterapi, alternatif fraksiyon rejimleri, ağır partikül tedavi, RT ile radyoduyarlastırıcı kullanımı, interstisyel brakiterapi, radyocerrahi, sterotaktik fraksiyone RT, yoğunluk ayarlı RT (IMRT) tedavi şekilleridir (58).

2.3. Nöroblastom

Nöroblastom (NB) çocukluk çağıının; Ewing sarkomu, non-Hodgkin lenfoma, rabdomyosarkom ve primitif nöro-ektodermal tümör gibi küçük, mavi, yuvarlak hücreli tümörlerinden biridir. Sempatoadrenal sistemi oluşturan nöral krest hücrelerinden köken alır ve yerleşim yeri de normal sempatik sinir sisteminin bulunduğu adrenal kromafin hücreleri veya spinal sempatik ganglion hücreleridir. Periferik nöroblastik tümörler; nöroblastom, ganglionnöroblastom ve ganglionörom'u bulundurlar ve çocukluk çağıının en sık görülen nöroblastik ekstrakranial solid tümörlerini oluşturlar (59,60).

2.3.1. Epidemiyoloji

NB tüm çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %8-10 kadarını oluşturur. Onbeş yaş altında yıllık insidansı milyonda 7-12 iken, süt çocuklarında milyonda 25-51 arasındadır. Canlı doğumlara bakıldığında, NB sıklığı yenidoğan ve bir yaş altı

süt çocuklarında milyonda 64 olarak bildirilir. İnsidans, 1-4 yaş için milyonda 19,6; 5-9 yaş için milyonda 2,9 ve 10-14 yaş için milyonda 0,7'dir.

Erkeklerin kızlara oranı 1,2:1'dir. Tanı anında ortalama yaş 18 aydır. Tanı sırasında olguların %36'sı 1 yaş altında, %89'u 5 yaş altında ve %98'i 10 yaş altındadır (59,61).

Doğrulanmış bazı çalışmalar, seçici çevresel faktörler (prenatal dönemde alkole, fenobarbital ve hidantoine maruziyet gibi) ile yüksek nöroblastom riski arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir (62,63). Ebeveyn mesleği (elektronik, tarım, iş nedeniyle böcek zehiri, elektromanyetik alan, boya, radyasyona maruz kalanlar), anne yaşı, annenin kullandığı ilaç (amfetamin, diüretik, trankilizan, kas gevsetici, fenitoin, vs) ve hormonlar, alkol ve sigara, düşük öyküsü, tekrarlayan sezeryan doğum ile bebeğin düşük doğum ağırlığı, preterm doğum, tonsillektomi ve/veya adenoidektomi öyküsü nöroblastom ile ilişkilendirilmiştir. Annenin hamilelikte aldığı vitaminlerin ve 6 aydan çok anne sütü vermenin de riski azalttığı bildirilmiştir (64,65).

Bir grup hastada, otozomal dominant geçişli ailevi NB gösterilmiş olup bu olgulardaki genetik predispozisyon germlinal mutasyona bağlıdır. Tüm NB olgularının %22'sinin bu germlinal mutasyon sonucu ortaya çıktığı bildirilmektedir. Ailevi NB olguları diğer herediter kanserlerde olduğu gibi daha erken yaşta (ortanca 9 ay) tanı aldığı ve çoklu primer tümörle (olguların %20'sinde bilateral adrenal tümör veya multifokal tümör) prezente olduğu bildirilmektedir. Bu olgularda yapılan genetik analizler ile kalıtsal NB predispozisyon lokusunun (HNB1) 16. kromozom kısa kolunda (16p12-13) olduğu gösterilmiş ve sporadik NB %13'ünde saptanmıştır. Ancak, bulgular birden fazla predispozisyon geni olduğunu işaret etmektedir (66,67).

2.3.2. Etiyoloji

NB'un etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. NB, sempatik sinir sisteminin öncül hücrelerinden kaynaklanan bir embriyonel tümördür. Doğumdan sonra yıllar süren bir zamanda sempatik sinir sistemi yeniden düzenlenir. Bu sürecin NB'un başlangıç yaşı ile örtüşmesi, nöroblastik tümörlerin gelişiminde sempatik

farklılaşmada rol alan temel mekanizmalarda bozukluk olduğunu düşündürmektedir. Tümör dokusunda embriyonik veya nöral katlantı dönemi ile ilişkili MASH1, HES1, c-kit, Notch, dHAND ve hASH1 gibi genlerin saptanması embriyonun normal gelişim ve farklılaşması ile tümör oluşumu arasında bağ olduğu düşüncesini desteklemektedir. Nöral katlantı hücrelerinden gelişen sempatik sinir sistemi hücreleri nöronlar (ganglion hücreleri), kromafin hücreler ve küçük floresan ile boyanan (SIF- “small intensely fluorescent”) hücrelerden oluşur. Nöronlar, paravertebral sempatik zincir ganglionlarını, paraaortik trunkusu ve pelvik ganglionu oluşturur. Adrenal bez medullasında da bulunurlar ancak, gelişim süreci içinde kaybolurlar. SIF hücreleri, sempatik ganglionlar içinde tek veya kümeler halinde bulunurlar ve fonksiyonları henüz bilinmemektedir. Kromafin hücreler ise paraganglionları ve adrenal medullayı oluşturur. Paraganglia diğer sempatik yapılarla birlikte oluşur ancak, doğumdan sonraki 2-3 yıl içinde gerilemeye başlar ve kaybolur. Bu döneme kadar merkezi sinir sistemi dışında en önemli katekolamin kaynağıdır. Bundan sonra, adrenal medulla önem kazanır. Tümör hücre kaynağının özellikle adrenal NB’lerde, gelişmekte olan adrenal medullada geçici olarak bulunan nöroblast toplulukları olduğu varsayılır. Dolayısı ile sempatik sinir sisteminde hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozu sırasında olacak değişikliklerin malign değişimlere neden olduğu düşünülmektedir (60,68,69).

2.3.3. Genetik

Normal hücrelerin malign dönüşümü iki grup kanser geni aracılığı ile olur. Onkogenler, hücresel büyümeyi baskın olarak artırırken tümör baskılayıcı genler, normal büyüme ve farklılaşmayı kontrol eder. Yapılarının bozulması, allel kaybı, fazla kopya sayısı veya genin fazla ifade edilmesi tümör gelişimi ile ilişkilidir. Aynı zamanda, klinik gidişin ön belirleyicileri olarak kullanılırlar (60). NB’deki genetik değişiklikler başlıklar halinde şöyle özetlenebilir.

2.3.3.1. Allelik Fazlalık ve Onkogen Aktivasyonu

1. Ploidi
2. MYCN Amplifikasyonu
3. 17q'da Dengesiz Fazlalık
4. Diğer Onkogenler

2.3.3.2. Allelik Kayıplar ve Tümör Supresör Genler

1. 1p Delesyonu
2. 11q Delesyonu
3. Diğer Bölgeler
4. Spesifik Tümör Supresör Genler

2.3.3.3. Bazı Genlerin Ekspresyonundaki Anormal Değişimler

- Nörotrofin Reseptörlerinin Ekspresy
- Diğer Önemli Genlerin Ekspresyonları

2.3.4. Klinik

Klinik bulgular, primer tümörün yerine ve metastaza göre ortaya çıkar. En sık abdomende asemptomatik ele gelen kitle yakınmasıyla başvurulur. Karında şişkinlik ve karın ağrısı bulguları olabilir. Fiziki incelemede, hareketsiz ve sert kitle fark edilir. Eğer primer tümör Zuckerkandl organından köken alıyorsa basiya bağlı mesane ve anal sfinkter disfonksiyonu ortaya çıkabilir. Bebeklerde kitlesel karaciğer tutulumu sıktır (Evre 4S) ve çok büyümüş karaciğer solunum sıkıntısına neden olur. Nadiren, renal arter basısına bağlı olarak hipertansiyon gelişebilir (60,68).

Primer torasik yerleşimli tümörler, genellikle travma veya infeksiyon nedeniyle çekilen akciğer grafilerinde tesadüfen saptanır. Toraks üst kısmı yada

servikal yerleşimli tümör “Horner sendromu”nu geliştirebilir. Büyük torasik yerleşimli tümörler, superior vena kava sendromu yapabilir (60,68).

Parasipinal yerleşimli tümörler, toraks, abdomen ve pelvik bölgede paraspinal sempatik zincirden gelişen, vertebraların nöral foraminalarından spinal kanal içerisine uzanıp sinir kökleri ya da medulla spinalise bası yapabilen tümörlerdir. Buna bağlı olarak sırt ağrısı, subakut veya akut parapleji, mesane ya da anal sfinkter fonksiyon kaybıyla karşılaşılır (60).

Farklı bulgular ve semptomlar metastatik hastalık ile ilişkilendirilir.

Propitozis ve periorbital ekimoz (rakun gözü) periorbital kemiklerin metastatic infiltrasyonuna bağlıdır.

Opsomyoklonus sendromuna (OMS) neden olabilirler. OMS sendromu yeni tanı almış NB olgularının %2- 4’ünde görülen, hızlı göz hareketleri (opsoklonus), ataksi ve myoklonik sıçramalar ile karakterize edilen bir sendromdur. Tümöre karşı gelişen antikörlerin serebellar ve nöral hücrelerle çapraz reaksiyon vermesi sorumlu tutulmaktadır. İyi biyolojik özelliklere sahip tümörlerle birliktelik gösterdiğinden bu hastaların tümör prognozu iyidir. Tümörün kaybolmasına rağmen hastaların %70-80’inde uzun süreli motor gelişmede gecikme, dil sorunları ve davranışsal bozukluklar gibi nörolojik fonksiyon kayıpları görülebilir. OMS tanısı alan çocukların %30-50’sinde NB ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, OMS tanısı alan her hastaya I-MIBG sintigrafisi çekilmeli ve BT ile tüm vücut taranmalıdır (60,68).

2.4. Antiepileptikler

2.4.1. Lamotrijin

Fenitoin ve karbamazepine benzer mekanizma ile voltaja bağımlı Na kanallarının inaktivasyonunu uzatarak tekrarlayan ateşlemeleri önler, böylece nöronal membranları stabilize ederek etki gösterir (70). Temel etkisi voltaj duyarlı Na⁺ kanallarını bloke etmesidir. Böylece presnaptik nöron membranını stabilize etmekte ve özellikle glutamat olmak üzere eksitatör nörotransmitter salınımını azaltmaktadır (71). Ancak aynı zamanda Na⁺ bağımlı GABA salınımını da azaltır

(72). Na^+ kanallarını inaktive durumda stabilize ettiğinden, normal nöron elektrofizyolojisine dokunmaksızın, selektif olarak devamlı ve epileptik fokusların karakteristiği olan yüksek frekanslı depolarizasyonları azaltmaktadır (73,74). Kortikal ve striatal nöronlarda yüksek voltajla aktive olan kalsiyum akımlarını inhibe eder. Lamotrijin bu etkisini özellikle N- ve P-tipi kalsiyum kanalları üzerinde gerçekleştirir .Lamotrijin geniş antiepileptik spektruma sahiptir (75). Jenaralize ve parsiyel epilepside monoterapide kullanılmaktadır. Epilepsi dışında da bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ya da kullanım potansiyeli içermektedir.

Gastrointestinal yoldan hızla emilir. Oral verildiğinde tama yakın ve yiyeceklerden etkilenmeksizin absorbe olarak %98'lik biyo-yararlanım sağlar. Oral alınımı takiben 1-3 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonu oluşturur. Gastrik re-siklus nedeniyle 4-6 saat sonra plazma seviyesi ikinci kez yükselir. Plazma proteinlerine %55 oranında bağlanır (76). N-2-glukronidasyon ile karaciğerde metabolize edilip, %80-90'ı idrarla atılır. Mikrozomal enzim indüksiyonu veya otoindüksiyon yapmaz (77). Lamotriginin plazma düzeyi ile etki ve yan etki profili korele değildir. Etkin plazma düzeyi kesin olarak belirlenmemiştir. Monoterapide ilk ilaç olarak kullanıldığı bazı çalışmalarda bu düzeyin 2-4 mg/L (4-16 mikro-mol/L olabileceği ortaya konulmuştur (78, 79).

Lamotriginin sık görülen yan etkileri: Dizziness, baş ağrısı, diplopi, ataksi, görme bozukluğu, bulantı, somnolans, deri döküntüsü, dispepsi (80,81)

2.4.2. Primidon

Fenobarbitalin deoksi türevi olan primidonun etki mekanizması gösterilmiş olup 1952'den beri antiepileptik olarak kullanılmaktadır. Kendisi aktiftir ve ayrıca iki aktif metaboliti vardır. Primidon emildikten sonra karaciğerdeki biyotrans formasyonu sırasında fenobarbital ve feniletilmalonid (PEMA) adlı iki metabolite dönüşür; antiepileptik etkisi hem ilacın kendisine hem de metabolitlerine, özellikle de fenobarbitale bağlıdır.

Aktif metabolitlerinden fenobarbital tonik klonik, feniletilmalonid (PEMA) ise kompleks parsiyel nöbetlere etkilidir. Absansta etkisizdir.

Küçük çocuklarda myoklonik epilepsilerde faydalıdır. Parsiyel ve tonik klonik nöbetlerde alternatif bir seçimdir. Esansiyel tremor tedavisinde de kullanılabilir.

Tek bir dozundan sonra tepe plazma konsantrasyonuna 2-5 saat sonra ulaşır. Beyindeki konsantrasyonunun plazma konsantrasyonu ile korelasyon gösterdiği bilinmektedir, beyin/plazma oranı 0,9'dur. Proteine bağlanma oranı düşüktür, total plazma düzeyinin %80'ini bağlanmamış primidon oluşturur. Primidonun yaklaşık %20-25'i fenobarbitol'e dönüşmektedir; bu değişkenlik kişiler arasında fark gösterir. Primodonun yarılanma ömrü 10-25 saat dolayında olup, ortalama 12 saattir ve metabolitlerine göre daha kısa yarılanma ömrüne sahiptir; bu nedenle ideal doz aralığını hesaplamak zordur (82).

Jeneralize ve parsiyel tipteki nöbetlerde etkin bir ilaçtır. Yetişkinlerde günlük sürdürme dozu 250-750 mg, çocuklarda ise 15-30 mg/kg'dır ve doz genellikle ikiye bölünerek verilir.

Yan etkileri fenobarbitale benzer; fakat daha şiddetlidir. Özellikle sedasyon ve baş dönmesi sık görülen yan etkileri arasındadır. Tedaviye düşük dozla başlayıp, giderek dozun artırılması önerilmektedir.

2.4.3. Topiramat

Topiramat, doğada bulunan monosakkarid D-fruktoz'dan üretilen yeni bir antiepileptiktir. Topiramat; 2,3:4,5-bis-0-(1-metiletiliden)- β -D-fruktopiranoz sulfamat (8) şeklindeki yapısı ile bilinen diğer antiepileptiklerden farklıdır. Ampirik formula $C_{12}H_{21}NO_8S$ olan beyaz renkli kristalize bir tozudur.

Topiramatin üç şekilde etkisini gösterdiği düşünülmektedir.

1. Voltaja bağımlı Na^+ kanallarını bloke ederek epileptiform deşarjları azaltır.

Elektrofizyolojik çalışmalarda spontan epileptiform deşarj aktivitesi gösteren sıçan hipokampal nöron kültürüne uygulandığında spontan epileptiform deşarj

süresini ve her deşarjda oluşan aksiyon potansiyellerinin sayısını zamana bağılı olarak azaltır (84). Bu etki fenitoin ve karbamazepinde de gözlenmiştir (85,86).

2. GABA reseptorlerindeki GABA aktivitesini arttırır.

Kemirgen serebellar granül hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda Cl^- u boşaltılmış nöronlarda Cl^- akımını tek başına GABA'ya kıyasla daha fazla artırdığı gösterilmiştir. Cl^- akışı üzerindeki etkisinin doza bağımlı olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, benzodiazepin agonisti olan flumazenil kortikal noronlarda bulunan GABA reseptorlerindeki topiramat tarafından arttırılan GABA'ya bağılı akımları inhibe etmemiştir (87,88).

3. Glutamat reseptorlerinin AMPA/kainat alt tipini antagonize eder.

Topiramat, sıcan hipokampal nöron kültüründe ice doğru olan akımlarda konsantrasyon bağımlı olarak azalmaya yol açar. Bu etkiyi topiramatin glutamat reseptorunun kainat / α -amino-3- hidroksi-5-metilisokszol-4-propionik asit (AMPA) alttipi üzerinde antagonistik etki yaparak gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Ancak, $200\mu M$ 'e varan konsantrasyonlarda topiramat glutamate reseptorlerinin N-metil-D-aspartat (NMDA) alt tipi üzerinde hiçbir etki göstermemiştir (83).

Ayrıca topiramat karbonik anhidraz enzimini inhibe eder. Bunun bilinen bir karbonik anhidraz enzim inhibitörü olan asetozolamide göre daha hafif bir inhibisyon olduğu bildirilmektedir. Karbonik anhidraz enzimi vücutta birçok yerde bulunan ve başlıca asit-baz tampon sisteminde görevli karbondioksit ile suyun birleşmesini katalize eden enzimdir.

Karbonik anhidraz



Karbonik anhidraz enzim inhibisyonu sonucu; (89)

- 1) H^+ üretiminin azalması sonucu böbrek tübülüslerinde $Na^+ - H^+$ kotransportu azalır ve su reabsorpsiyonu azalır. Yani diüretik etki gösterir.

- 2) Böbrek hücreleri distal tubullerinde H^+ azalması sonucu buradan K^+ salgılanmasında artma olur. Bunun sonucu idrarda potasyum kaybı ve hipokalemi oluşur.
- 3) Vucuttan HCO_3 kaybı artar metabolik asidoz gelişir ve idrar alkalileşir.
- 4) H^+ oluşumunun azalmasına bağlı olarak amonyağın amonyum iyonuna dönüşümü azalarak amonyak emilimi artar ve özellikle sirozlu hastalarda önemli olan amonyak retansiyonu gelişir.
- 5) Eritrositlerde CO_2 nin taşıma yollarından biri olan karbondioksitin su ile birleşip bikarbonat oluşumu azalacağından pCO_2 artar.

Yapılan in vivo çalışmalarda eritrosit karbonik anhidraz izozimlerini (karbonik anhidraz II ve IV) yine bilinen bir karbonik anhidraz enzim inhibitörü olan asetazolamide kıyasla daha hafif bir güçle inhibe etmiştir. Bu nedenle tedavi sırasında böbrek taşı oluşumu ve parestezi potansiyeli bulunmaktadır (90-92).

2.4.4. Vigabatrin

GABA'nın yıkılımında rol oynayan GABA transaminaz enzimini geri dönüşümsüz inhibe eder. Deneysel çalışmalar ilacın merkezi sinir sisteminde GABA düzeylerini belirgin derecede arttırdığını ortaya koymuştur. Çeşitli antiepileptiklere dirençli parsiyel epilepside ve özellikle tuberoskleroza bağlı infantil spazmlarda (West sendromunda) etkili olduğu gösterilmiştir ve bu infantil spazmlarda monoterapi olarak önerilmektedir (93). Dirençli parsiyel epilepsilerde, diğer antiepileptiklere ikincil ilaç olarak eklenir.

Ağızdan alındığında tümüyle emilir. Yarılanma ömrü yaklaşık yedi saattir. Biyotransformasyona uğramadan böbrekler yoluyla atılır. Etkileri ile plazma konsantrasyon arasında ilişki olmadığından plazma düzeyi ölçülmemektedir.

Yan etkileri, görsel fonksiyon bozukluğu, sedasyon, baş dönmesi, depresyon, psikoz gibi psikiyatrik bozukluklar, kilo alma, uyuşukluk ve ataksidir (94). Bunlar içinde en önemlisi görme bulanıklığı, çift görme, görme alanı kaybı, oküler kan akımında azalma şeklinde görsel fonksiyon bozukluğudur. Görme alanı kaybı,

hastaların farkedemediği konsantrik periferik görme alanı daralması şeklindedir ve kalıcıdır. Bu nedenle vigabartrin kullanan hastaların tedaviye başlamadan önce ve tedavi sırasında oftalmojik parametrelerinin bu açıdan dikkatle izlenmesi önerilmektedir.

2.4.5. Lakozamid

Lakozamid aktif maddesi (R -2-asetamido-N-benzil-3-metoksipropionamid), fonksiyonelize bir amino asittir. Lakozamidin insanlardaki antiepileptik etkileri ile ilgili etki mekanizması henüz tam açıklanamamaktadır. İn vitro elektrofizyolojik çalışmalar; lakozamidin seçici olarak voltaj kapılı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonunu arttırdığını göstermiştir, bunun sonucu olarak yüksek derece uyarılabilir nöronal mebranların stabilizasyonu meydana gelir.

Lakozamid, parsiyel ve primer jenarilize nöbetler için, geniş bir hayvan modeli aralığında, nöbetlere karşı koruma göstermiştir.

Klinik olmayan deneylerde, levetirasetam, karbamazepin, fenitoin, valproat, lamotrijin, topiramat veya gabapentin ile kombinasyonda lakozamid sinerjistik veya aditif antikonvülsan etkiler göstermiştir.

Lakozamid oral uygulamadan sonra hızla ve tamamen absorbe olur.Oral biyoyararlanımı %100'e yakındır. Oral uygulamayı takiben, değişmemiş lakozamidin plazma konsantrasyonu, hızla artar ve doruk plazma konsantrasyonuna (C_{maks}) doz uygulanmasından yaklaşık 0.5-4 saat sonra ulaşılır. Gıdalar emilim hız ve miktarını etkilemez.

Lakozamid, başlıca renal atılım ve biyotransformasyon ile sistemik dolaşımdan elimine olur. Radyoaktif işaretli lakozamidin oral ve intravenöz uygulanmasından sonra, uygulanan radyoaktivitenin yaklaşık %95'i idrarda, %0,5'ten azı gaytada saptanır. Değişmemiş ilacın eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 13 saattir. Farmakokinetiği dozla orantılı ve zaman boyunca sabit, bireysel ya da bireyler arası değişkenliği düşüktür (95,96).

2.4.6. Okskarbazepin

Okskarbazepin (OXC) 10,11-dihydro-10-oxo-5H-dibenz molekülünde olup etkisini voltaj bağımlı sodyum kanallarını bloke ederek gösteren yeni antiepileptik ilaçlardandır. Oral alımından 1 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmakta ve indirgenme metabolizması ile monohidroksi türevi olan 10-hydroxy-10,11-dihydro-10-oxo-5H-dibenz'e (mono hidroksi derivativesi) dönüşmektedir.

Monohidroksi derivativesi oral alımdan sonra aktif olan ilaç komponenti olup farmakokinetik etkilerden sorumludur ve yarılanma ömrü 9 saattir. OXC iki dozda kullanıldığında kararlı serum seviyesi yaklaşık 2-3 günde oluşur ve doz artımı ile kararlı serum düzeyi oluşumu ilişkilidir. İn vivo olarak proteinlere bağlanma oranı %40 olup gıdalarla birlikte alınması emilimini degistirmemektedir. Karaciğerde glukuronidasyona uğrayarak metabolize edilir ve metabolitleri üriner yolla atılır.

OXC erişkin ve çocukluk çağında parsiyel epilepsilerde monoterapi veya ilave tedavide de kullanılabilir. OXC'nin yan etkilerinin az olması ve parsiyel epilepsy tedavisinde kullanılan diğer ilaçlar kadar nöbet kontrolü sağlaması avantaj olarak gösterilmektedir. Hiponatremi, OXC kullanan hastaların %25'inde ortaya çıkabilmekte ve genellikle asemptomatik olmaktadır. En sık görülen yan etkileri uyku hali, baş ağrısı, bulantı, apati, ve cilt döküntüsüdür (97-100).

2.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarının gelişimi ve yöntemleri, organ ve doku kültürü çalışmalarıyla yakından ilişkilidir. Bundan dolayı da onlarla benzer özellikler taşımaktadır. Doku ve hücre kültürü çalışmaları yüz yılı aşkın bir süredir yapılmaktadır.

Hayvansal hücre kültürü teknikleri 1900'lerin ortalarında laboratuvarında rutin olarak uygulanmaya başlanmış fakat asıl doku kaynaklarından ayrılarak yaşayan hücre hatları kavramı 19. yüzyılda ortaya konmuştur.

Hücre kültürü, canlı dokulardan alınan hücrelerin yaşama ve üremelerinin in vitro koşullarda besin ve büyüme faktörleri ile sağlanması işlemidir (101).

Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısısında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik konumunu taklit eden besleyici sıvılarda çoğaltılmaktadır. Bu besiyeri plazma, serum, amino asit, mineraller, şeker, tuz, vitamin ve antibiyotikleri içermektedir (102).

Hücre kültürleri, bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalar yapılabilmesi, tekrarlanabilirliği, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (103).

Hücre ve Doku Kültürlerinin Avantajları

- Her cins doku veya hücrelerde kimyasal maddelerin etkileri ayrı ayrı araştırılabilme özelliği taşır.
- Hücreler üzerindeki etki doğrudan doğruya gözlenir, bu yüzden çalışmadaki yanıt da hızlı olur ve etkiler üzerinde standart ölçümler yapılabilir.
- İstatistiksel olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılamayacak kadar fazla hücre kullanılabilir.
- Uygulamalar pH, nem, oksijen, karbondioksit, ozmotik basıncın standart olduğu şartlarda tekrarlanabilir.
- Organizmadaki karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmalar in vitro şartlarda defalarca çalışılabilir.
- Hücreler kolayca taşınabilir. Karantina gibi bir sorun olmadığından çok uzak ülkelerde bile deneyler ve uygulamalar aynı şartlarda yapılabilir.
- Hücre kültürleri ile yapılan deneyler hayvan deneylerine kıyasla daha ekonomiktir.

Hücre ve Doku Kültürlerinin Dezavantajları

- Tek başına doku ve hücre kültürlerinin yeterli bilgi sağlaması mümkün değildir (in vivo ve in vitro).
- Kimyasal maddelerin, ilaçların hücrelerin davranışları üzerine olan karmaşık etkileri incelenemez.

- İn vitro çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme bir uzmanlığı gerektirir (104). Bu yüzden deneyim kültür çalışmalarında önemlidir.
- Hücreleri uzun süre dondurmak, biyokimyasal ve genetik değişikliklere sebep olabilir. Ayrıca normal dokulardan elde edilen hücre soyları yavaş yavaş çoğalma potansiyellerini kaybedebilirler.

Hücre kültürü çalışmaları temel olarak;

1. Hücrelerin normal fizyoloji ve biyokimyasını araştırmak,
2. Spesifik hücreler üzerinde bazı bileşiklerin etkilerini test etmek,
3. Spesifik hücre tiplerini kombine ederek yapay dokular elde etmek,
4. Yeni biyolojik materyallerin sentezlenmesini sağlamak amacıyla, kullanılır (101).

Hücre kültürü işleminin yapıldığı laminar flow kabinlerin, kullanım öncesinde UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla sterilizasyonunun sağlanması gerekir. Hücreler yaklaşık olarak %5 CO₂ içeren ortamda üretildikleri için CO₂ etüvlerinden yararlanılmaktadır. Hücreleri gözlemek için de faz kontrast mikroskoplar kullanılır (105).

Farklı dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç grup altında toplanmaktadır (106);

1. Primer hücre kültürleri: Orijin aldığı dokudan ayrıldıktan sonra kültür kabına ekimi yapılan ilk hücreleri içerir. Alındığı dokunun fizyolojik özelliklerini taşıyan bu hücreler genotip ve fenotip olarak orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri taşır. Ancak pasaj sayıları sınırlıdır (106,107).

Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınırlar. Bu işleme subkültür adı verilir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluştururlar. Hücre hatları, hücrelerin alındığı dokuların özelliklerine göre değişmek şartıyla değişen oranlarda subkültüre izin verirler (107).

Bu tipe örnek olarak EMF (Embriyonik Mouse Fibroblast) hücre kültürü,

Tavşan böbrek hücresi, Maymun böbrek hücresi, primer aortik, göbek kordonu endotel hücreleri, primer hepatosit ve primer düz kas hücreleri vs. gösterilebilir.

2. Devamlı hücre kültürleri: Bu tip kültürlerde yetiştirilen hücreler sonsuz çoğalma özelliği olan tek tip hücrelerden oluşur. Bu hücreler kanserli dokulardan veya diploid hücrelerden transformasyon ile meydana gelirler. Transformasyon geçirmeleri nedeniyle fizyolojik özelliklerinin hepsini koruyamazlar.
3. Diploid hücre kültürleri: Primer kültürlerin pasajlanması ile elde edilirler. Bu kültürlerdeki hücreler, alındıkları dokunun karyotipini % 80-90 oranında korumaktadırlar. Diploid kültürlerdeki bazı hücrelerde, kromozom özellikleri kaybolabilmektedir (106,107).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan altı farklı antiepileptik ilacın, NA/An1 Mouse neuroblastoma (Fare) hücre hattı (T98G), LN -229 GB hücre hattı (C6) hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi, hücre kültürü şartlarında, gerçek zamanlı hücre analizi ile invitro koşullarda araştırılmıştır.

Araştırmamız, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi laboratuvarında Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deney Örneklerinin Hazırlanması

Araştırmamızda, hücre kültüründe değerlendirilmek üzere lamotrijin, lakozamid, okskarbazepin, primidon, topiramet, vigabatrin etken maddeli antiepileptik ilaçlar kullanılmıştır. Tablo 3.1 de araştırmada kullanılan antiepileptiklerin etki mekanizmaları gösterilmektedir. Test materyalleri ile aynı hücre kültürü şartlarında değerlendirmek üzere materyal konmayan, yalnızca NA/An1 Mouse neuroblastoma (Fare) hücre hattı (T98G), LN -229 Glioblastom hücre hattı (C6) içeren besiyeri pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

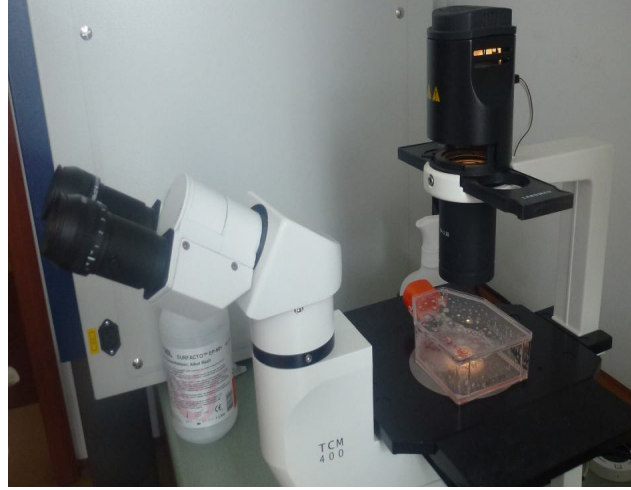
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan antiepileptikler ve kısa etki mekanizmaları

MATERYAL	ETKİ MEKANİZMASI
Lamotrijin	Voltaja bağımlı sodyum iletim bloğu, presinaptik eksitator aminoasit (glutamat ve aspartat gibi) kalıtımı modülasyonu
Primidon	GABA-A reseptör aktivite artışı, glutamat azaltma, sodyum, potasyum ve kalsiyum ileti azalması
Lakozamid	Seçici olarak voltaj kapılı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir bunun sonucu olarak yüksek derece uyarılabilir nöronal mebranların stabilizasyonu meydana gelir.
Okskarbazepin	Sodyum kanal blokajı, potasyum iletim artışı, yüksek voltajla kalsiyum kanal aktivite modülasyonu
Topiramet	Sodyum kanal blokajı, GABA ile ilişkili klor alım artışı, GABA A reseptör modülasyonu, AMPA reseptör etkili, karbonik anhidraz inhibisyonu
Vigabatrin	GABA transaminaz inhibitörü

Çalışma için ilaçların kullanıldığı konsantrasyon değerleri proliferasyon paternine uygun olarak hücre sayısının arttığı dönem olan log fazında uygulandığı için ilaçların uygulanma saatlerinde farklılık olmuştur. Deneylerin sonlanma saatleri ise kontrol hücrelerinin doygunluğa ulaşmış ve artık eğrilerin aşağı doğru gitmesi ile belirlenmiştir. Ayrıca ilaçların konsantrasyon farkları ise daha önceden bu ilaçların kullanıldıkları in vitro farklı çalışmalar incelenerek belirlenmiştir. Çalışmamıza dahil edilen altı antiepileptik ilacın antimitotik potansiyeli daha önce GB ve NB üzerinde karşılaştırılmalı olarak araştırılmamıştır.

Test materyallerinin mitotik proliferasyon etkilerinin belirlenmesi için sırasıyla; test örneklerinin hazırlanması ve sterilizasyonu, hücre kültürünün hazırlanması, Xcelligence testinin yapılması işlemleri takip edilmiştir. Uygulanacak testlerde standardizasyonun sağlanması amacıyla, tüm örnekler in vitro hücre kültürü çalışmaları için standart prosedürleri içeren ISO 10993-5 protokolüne uygun olarak hazırlandı.

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi'nin de (CÜTFAM) gerçekleştirildi. Çalışmamızda, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığına bağlı Şap Enstitüsünden temin edilen NA/An1 Mouse neuroblastoma (Fare) hücre hattı, LN-229 Glioma hücre hattı kullanıldı. Şap Enstitüsünden temin edilen hücreler CÜTFAM 'daki hücre kültürü modülünde 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda, % 5 CO₂, % 95 nem içeren karbondioksitli inkübatör ortamında tutularak çoğaltıldı. Hücreler için besiyeri olarak "Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu" (DMEM) kullanıldı (Tablo 3.2) (Şekil 3.2). DMEM'e ek olarak % 10 oranında fetal sığır serumu (FBS) ve %1 oranında penisilin-streptomisin kullanıldı (Şekil 3.2). Hücreler %70 yoğunluğa ulaşmış flasksın yüzeyini kaplayınca, haftada en az iki kere pasajlanarak çoğaltıldı (Şekil 3.1). Tüm işlemler UV ışıkla sterilize edilen laminar akımlı kabin içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). % 0.05 tripsin, 0.53 mM EDTA solüsyonu ile hücrelerin flasktan ayrılması sağlandı. Hücre süspansiyonunun üzerine DMEM eklenerek tripsinin etkisi nötralize edildi ve hücre süspansiyonu flaskslar arasında paylaştırıldı.



Şekil 3.1: Hücrelerin incelenmesinde kullanılan mikroskop ve LN -229 Glioma hücre hattı ve NA/An1 Mouse neuroblastoma (Fare) hücre hattı hücreleri için kullanılan flask.



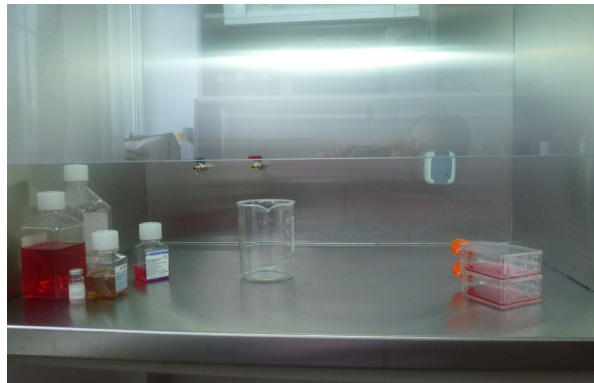
Şekil 3.2: DMEM, Fötal sığır serumu (FBS), Penisilin-streptomisin, Tripsin, EDTA.

Tablo 3.2: Hücre kültüründe kullanılan besiyeri ve içeriği

Hücre Kültür Besi Yeri	Kullanılan Miktar	Üretici Firma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	100 ml	Sigma Aldrich Cheme, Germany
Penicilin/Streptomycin (1000 U/10000 Mg/ml)	1 ml	Biochrom KG, Berlin Germany
L-glutamin	1 ml	Biochrom KG, Berlin Germany
Fetal Bovine Serum (FBS)	4 ml	Biochrom KG, Berlin Gernay



Şekil 3.3: Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril laminar akımlı kabin.



Şekil 3.4: Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril laminar akımlı kabinin iç görünümü.



Şekil 3.5: %5 CO₂ içeren inkübatör

3.2. Hücre Kültürü Teknikleri

3.2.1. Hücre Hattının Açılması

Uzun süre sıvı azot buharında saklanmış olan hücreler çözünmesi sağlanana kadar 37 °C'lık su banyosunda tutuldu. Çözünen hücre süspansiyonu % 20 FBS içeren medyum ile muamele edilerek flasklara kondu, sonrasında 3-4 saat 37 °C'de, % 5 CO₂ ve 1 atm basınç altında inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.5). Bu sürenin sonunda hücre medyumunu %10 FBS içeren medyumla değiştirildi.

3.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 8-10 ml, 75 cm²'lik flasklarda ise 25 ml %10 FBS ve %1 (100 IU) penisilin-streptomisin içeren DMEM medyumunu içerisinde % 70 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretildi.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklar içerisinde yeterli yoğunluğa gelen hücrelerden medyum uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine % 0.05'lik tripsinden, küçük flasklara 1-2 ml, büyük flasklara 3-4 ml eklenerek 2-3 dakika bekletildi. Flasklar 37 °C'lık %5'lik CO₂ etüvde 2-3 dakika bekletilerek hücrelerin kontrollü şekilde kalkmaları sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine tripsinin etkisini bloke etmek için tripsinle aynı

miktarda medyum eklendi ve iyice pipetaj yapıldıktan sonra, santrifüj tüpüne süspanse halde toplanan hücreler 800 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant (üst faz) kısım uzaklaştırıldı. Bir miktar medyumla süspanse edilen ve iyice pipetaj yapılan hücreler yeterli miktarda medyum konulmuş flasklara eklendi. Flasklar 37°C’lik %5’lik CO₂ etüve kaldırıldı.

3.2.4. Hücre Sayımı

Toplam hücre süspanسیونunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 4 adet 16 küçük kare içeren bölgeden oluşan 1 mm²’lik alan ve 0.1 mm derinliğe sahip hemasitometre kullanıldı. Süspanسیونun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Toplam hücre sayısı/ml} = \text{Hemasitometre sayım sonucu} \times 10^4 \times \text{Medyum miktarı (ml)}$$

3.2.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler %0.05’lik tripsin uygulaması ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Kalktıkları gözlenen hücrelere tripsinin etkisini bloke etmek için medyum eklendi ve süspanسیون santrifüj tüpünde toplanarak 800 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Pellete tekrar medyum eklendi ve tripsinin etkisinden kurtarmak için tekrar santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında pellete tekrar medyum ilave edildi ve pipetajla hücreler tek hücre süspanسیونu haline getirildi. Hemasitometrede hücre sayımı yapıldı. Hücreleri içeren falkon tüpü, %90 FBS ve %10(dimetil sülfoksil) DMSO içeren medyumlu falkon tüpü buz içerisine oturtuldu. Kullanılacak soğuğa dayanıklı saklama tüpleri (cryo tüp) de buza oturtularak soğumaları sağlandı. Tüp içerisindeki tek hücre süspanسیونundan DMSO’lu serumlu medyum içerisine alınan hücreler cryo tüpüne damla damla ilave edildi. Saklama tüpü 1 gece -20°C’de, 1 gece de -70°C’de bekletildikten sonra sıvı nitrojen buharına alındı. Tüm bu uygulamalar tüpteki son konsantrasyon 2.5x10⁶ hücre/ml olacak şekilde yapıldı.

3.3. xCELLigence sistemi

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (XCELLigence sistemi) dört ana bileşenden oluşur: RTCA analizörü, RTCA DP istasyonu, entegre yazılım ile RTCA bilgisayar ve atılabilir E-plate 16' dır (Şekil 3.6-3.8).

Analiz cihazı ve dizüstü bilgisayar dışarıda yer alırken, RTCA DP istasyonu, standart bir doku kültürü inkübatörü içerisinde yer almaktadır. XCELLigence sisteminin temeli E-plate16'dır. Yaygın olarak kullanılan 96 kuyucuklu platelere benzer bir uygulaması olan, RTCA DP cihazı üzerinde hücre bazlı deneyleri gerçekleştirmek için kullanılan, tek kullanımlık atılabilir bir alettir. fakat E-plate 16, 96 kuyucuklu platelerden zemininde altın plakalar içermesi, her bir kuyucukta ayrı ayrı deney yapılabilmesi ve bunların sonuçlarının ayrı ayrı değerlendirilebilmesi özelliği ile çok farklıdır. E-plate 16 düşük buharlaşma sağlayan bir kapak tasarımına sahiptir. Her kuyucuğun taban çapı $5.0\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$; toplam hacmi $210 \pm 5 \mu\text{L}$ 'dir. Her kuyucuğun zemin alanının yaklaşık %80'i dairesel elektrodlarla kaplıdır. Sensör elektrodların elektronik empedansları, elektrodlar üzerindeki hücrelerin fizyolojik değişikliklerini tespit etme ve izlemeye izin verecek şekilde ölçülür (Şekil 3.9). RTCA ölçümleri boyunca elektrodlara uygulanan voltaj 20mV (RMS) civarındadır. Herbir kuyucuk içinde elektrodlar arasında ölçülen empedans, elektron geometrisine, kuyucuk içindeki iyon konsantrasyonuna ve hücrelerin elektrodlara bağlı olup olmamasına bağlıdır.

RTCA yazılımı kullanıcıların ortalama değer, maksimum ve minimum değerler, standart sapma (SD), maksimum etkinin yarısını yapan konsantrasyon (EC50), maksimum inhibisyonun yarı konsantrasyonu (IC50), hücre indeksi (CI) ve grafik gibi parametreler elde etmesini sağlar (RocheDiagnosticsGmbH).



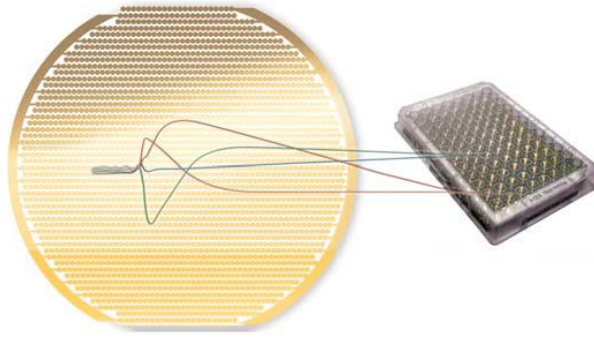
Şekil 3.6: RTCA DP istasyonu ve dizüstü bilgisayar



Şekil 3.7: Analiz cihazı



Şekil 3.8: RTCA DP istasyonu



Şekil 3.9: Kuyucuk tabanındaki altın plağın hücrelerin elektrik yük empedanslarını ölçmesi



Şekil 3.10: E-plate 16

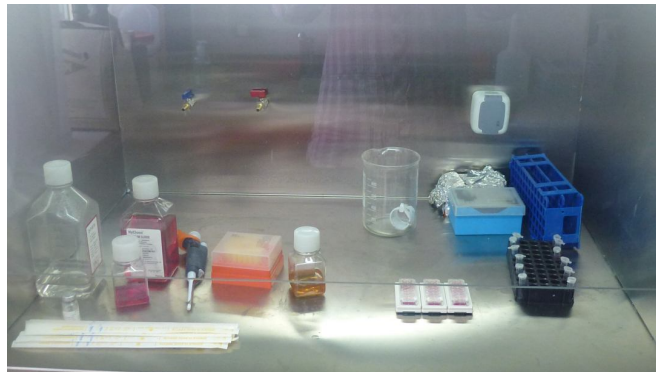
3.4. Hücre Proliferasyon Çalışması (Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, Xcelligence Deneyi)

Çalışmamızda kullanılan lamotrijin, lakoamid, okskarbazepin, primidon, topiramat, vigabatrin etken maddeli antiepileptik ilaçların in vitro antimitotik etkinlikleri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. xCELLigence sistemi üretici firma talimatlarına göre kullanılmıştır (Roche Applied Science and ACEA Biosciences).

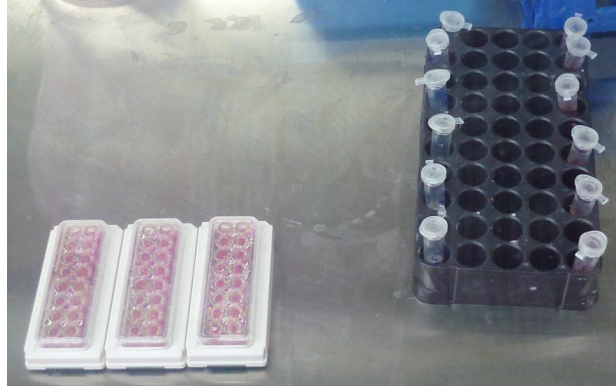
Çalışmada E-plate 16 isimli, her bir kuyucuğu 250 μ L hacminde, zemin çapı 5 mm olan ve 16 kuyucuktan oluşan plateler kullanıldı (Şekil 3.10). İlk olarak her bir kuyucuğa hücre içermeyen, 100 μ L besiyeri karışımı konularak cihazda bir bazal

okuma yaptırıldı. Ardından flasklardan tripsinizasyon ve santrifüj (800 RPM, 10 dakika) yoluyla toplanan hücreler kuyucuklara 100 µL hacim içerisinde ekildi.

C6 ve T986 hücreleri laminar flow kabin içerisinde kuyucuklara ekildikten sonra plate inkübatörün içerisine yerleştirildi ve 1'er saatlik zaman aralıkları ile hücre büyümeleri takip edildi. Kuyucuklara ekilen C6 (glioma hücresi) ve T98G (nöroblastom hücresi) hücreleri kuyucuk tabanına yapıştı ve burada uygun besin ve O₂/CO₂ ortamında büyümelerini sürdürdüler. Kuyucuk tabanına yerleştirilmiş olan altın plak elektrik akımını kullanarak bölünen hücrelerin elektrik yük empedanslarını ölçtü ve hücrelerin büyüme indekslerini tespit etmemizi sağladı. Hücrelerin hızlı büyüme fazına girmelerinin ardından (Log fazı), deney grubu olarak belirlenen kuyucuklara sitotoksik etkinliği değerlendirilecek ajanlar 10 µL hacim içerisinde, değişen konsantrasyonlarda (1/1 ve 1/2 dilüsyonlarda) uygulandı (Şekil 3.11-12). Aynı deney seti içerisinde antiepileptik içermeyen, sadece medium ve hücre içeren kontrol grubu ilave edildi. Ayrıca hücre içermeyen negatif kontrol grubu da çalışmaya dahil edildi. Bu uygulamayı takiben plate yeniden inkübatörün içerisine yerleştirildi. Ekstraksiyon sıvısı uygulamasının ardından 1'er saatlik ölçümlere devam edildi. Takip 24-72 saat boyunca devam ettirildi. Xcelligence testi ile materyallerin C6 ve T98G hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirildi ve bulgular ile her materyale ait ortalama hücre proliferasyon yüzdeleri hesaplanarak elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.



Şekil 3.11: Steril kabin içerisinde ekstraksiyon solüsyonunun E-platelere uygulanması



Şekil 3.12: Ekstraksiyon solusyonunun E-platelere uygulanması



Şekil 3.13: xCELLigence sistemi bilgisayar ve inkübatörü

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

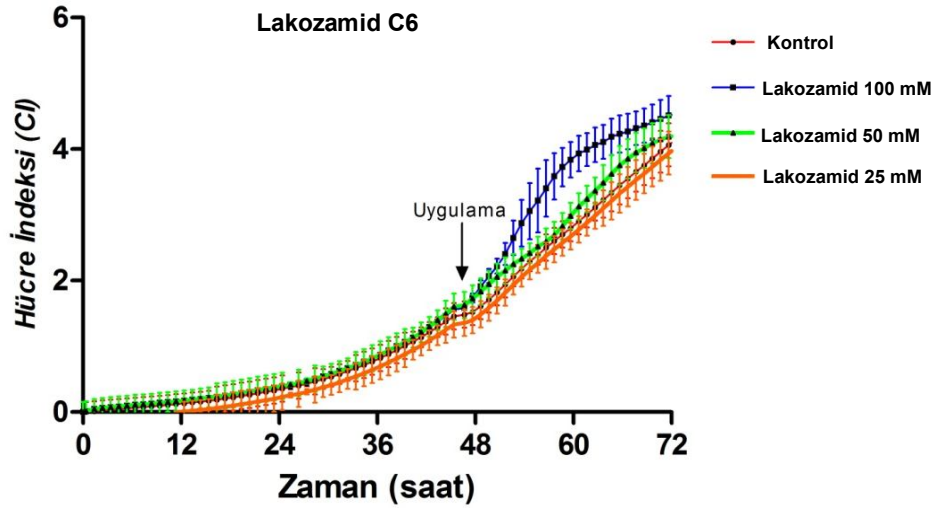
Bu çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 16.0 bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Tüm verilerin ortalaması ve standart hatası hesaplanarak veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu (mean $\pm$ SEM). Gruplar arasındaki fark varyans analizini takiben (ANOVA testi), post hoc TUKEY testi ile araştırıldı. p değerinin 0,05'den küçük olması durumunda fark anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Antiepileptiklerin mitotik proliferasyon bulguları

4.1.1. Lakozamid

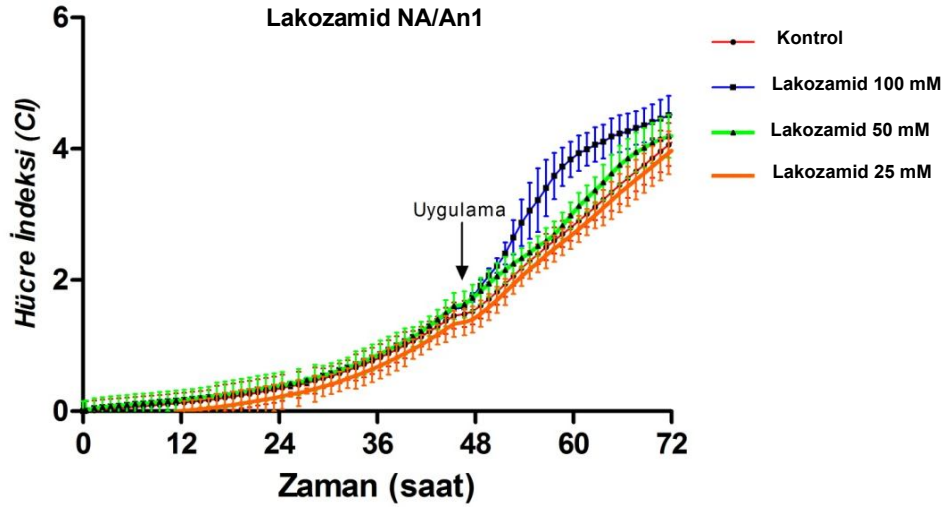
Lakozamid C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisini değerlendirmek amacıyla lakozamidin 25, 50 ve 100 mM konsantrasyonları uygulandı ve sonuçlar gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. Proliferasyon paternine uygun olarak ilaç uygulaması 47. saatte gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından sonra sonuçlar 72. saate kadar takip edildi. Uygulanan tüm konsantrasyonların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı antimitotik etki göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Lakozamid 25, 50, 100 mM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

Lakozamidin NA/AN1 Nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi C6 hücrelerindeki benzer şekilde 25, 50, 100 mM konsantrasyonlar uygulanarak yine gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. 47. saatteki uygulamanın ardından 72. saate kadar takip edildi.

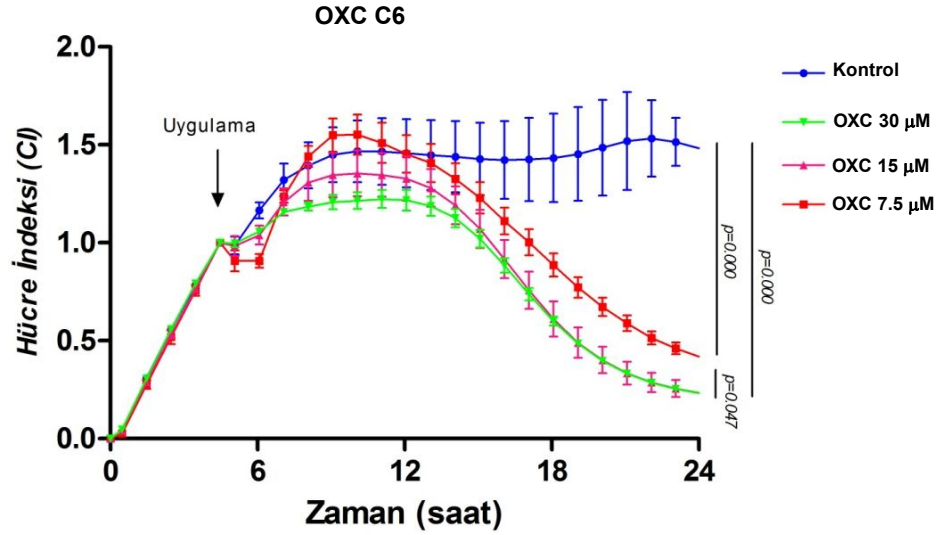
Uygulanan tüm konsantrasyonların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde güçlü bir antimitotik etki göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$). (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Lakozamid 25,50,100 mM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

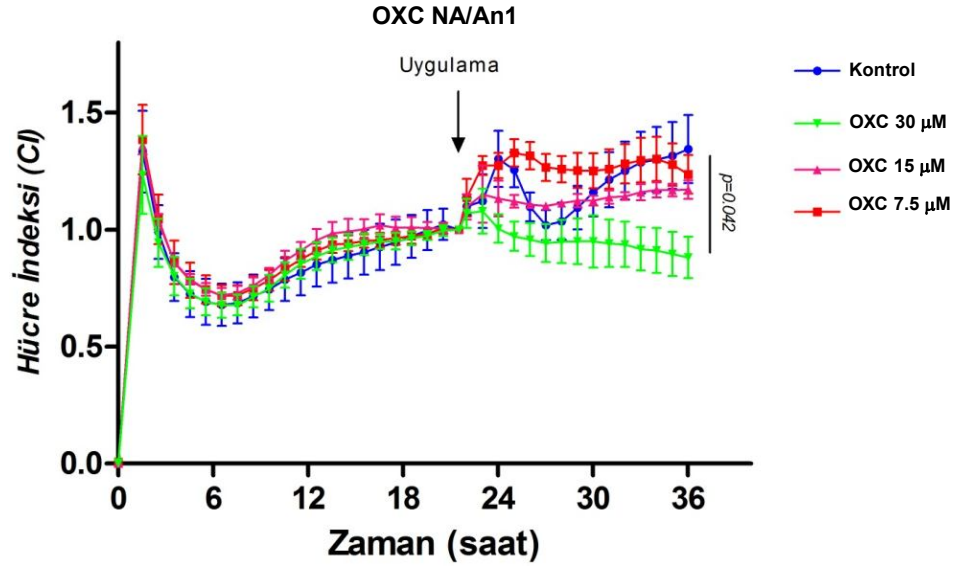
4.1.2. Okskarbazepin

Okskarbazepinin C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisini değerlendirmek amacıyla okskarbazepin 7,5, 15 ve 30 μ M konsantrasyonları uygulandı ve sonuçlar gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. Proliferasyon paternine uygun olarak ilaç uygulaması 5. saatte gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından sonra sonuçlar 24. saate kadar takip edildi. Uygulanan tüm konsantrasyonların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde antimitotik etki gösterdiği gözlemlendi. (Okskarbazepin 7,5 μ M-Kontrol $p=0.00$, Okskarbazepin 15 μ M-Kontrol $p=0.00$ ve Okskarbazepin 30 μ M-Kontrol $p=0.00$) . Uygulanan konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında 30 ve 15 μ M okskarbazepinin 7.5 μ M konsantrasyonundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha güçlü antimitotik etki oluşturduğu gözlemlendi (Okskarbazepin 30 μ M-Okskarbazepin7.5 μ M $p=0.047$ ve Okskarbazepin 15 μ M-Okskarbazepin7.5 μ M $p=0.047$) İnhibitör Konsantrasyon 50 (IC50) değeri 20.7 μ M olarak hesaplandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Okskarbazepin 7.5, 15 ve 30 µM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi

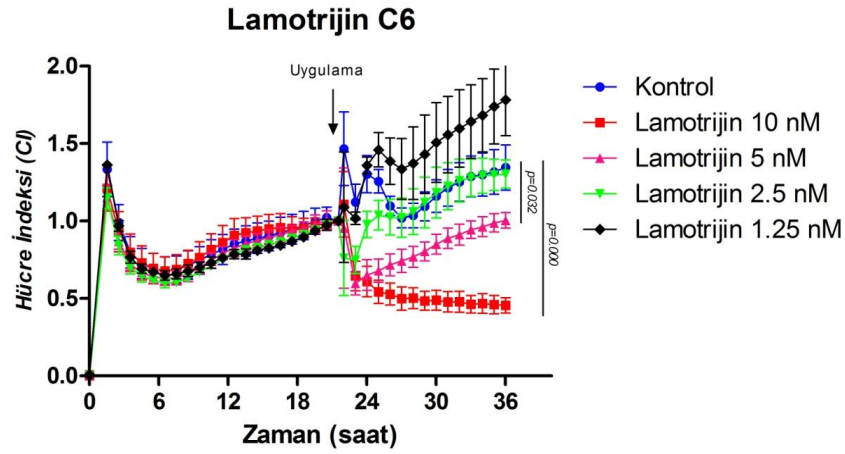
Okskarbazepinin NA/AN1 Nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi C6 hücrelerindeki benzer şekilde 7.5, 15 ve 30 µM konsantrasyonlar uygulanarak yine gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. Okskarbazepinin 23. saatteki uygulamanın ardından 36. saate kadar takip edildi. 7,5 ve 15 µM konsantrasyonların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde güçlü bir antimitotik etki göstermediği gözlemlendi ($p > 0.05$). IC 50 değeri 24,2 µM olarak hesaplandı. Fakat 30 µM konsantrasyonda yapılan uygulamanın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde antimitotik etki gösterdiği gözlemlendi (Okskarbazepin 30 µM-Kontrol $p = 0,042$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Okskarbazepin 7,5, 15 ve 30µM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

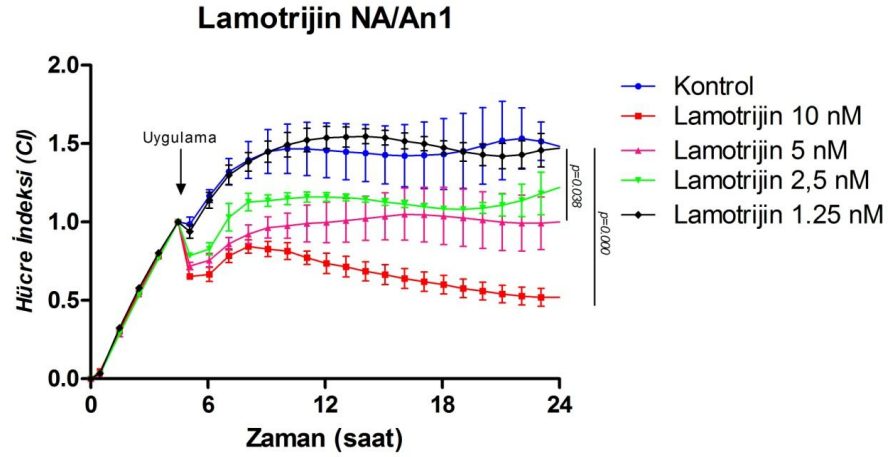
4.3. Lamotrijin

Lamotrijin C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisini değerlendirmek amacıyla 1.25, 2.5 ,5 ve 10 nM konsantrasyonları uygulandı ve sonuçlar gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. Proliferasyon paternine uygun olarak ilaç uygulaması 19.saatte gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından sonra sonuçlar 36. saate kadar takip edildi. Uygulanan 1,25 ve 2,5nM konsantrasyonların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı antimitotik etki göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$). Lamotrijin 5nM konsantrasyonunda uygulama sonrası ilk 5 saatte belirgin antimitotik etki olurken sonrasında bu etki azalmıştır.lamotrijin 10nM konsantrasyonda uygulandığında ise istatistiksel olarak anlamlı antimitotik etki göstermiştir. (Lamotrijin 10nM-Kontrol $p=0.00$ ve Lamotrijin 5nM-Kontrol $p=0.032$). İnhibitör Konsantrasyon 50 (IC50) değeri 2.4215 nM olarak hesaplandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Lamotrijin 1.25nM, 2.5nM, 5nM ve 10 nM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

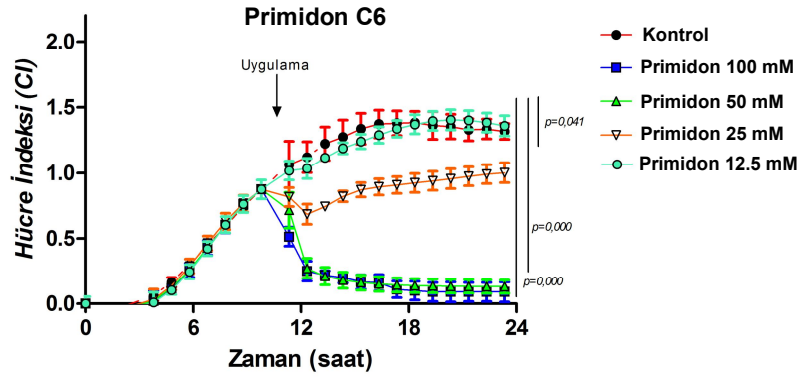
Lamotrijinin NA/AN1 Nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi C6 hücrelerindeki benzer şekilde 1.25, 2.5, 5 ve 10 nM konsantrasyonlar uygulanarak yine gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. Lamotrijin hücre proliferasyon paternine uygun olarak 5. saatteki uygulamanın ardından hücre proliferasyonlarında 1,25 ve 2,5 nM konsantrasyonda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin antimitotik etki oluşturmadığı izlendi ($p>0,05$) 5 nM ve 10 nM konsantrasyonların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı antimitotik etki gösterdiği izlendi(Lamotrijin 10 nM –Kontrol $p=0,00$ ve Lamotrijin 5 nM-Kontrol $p=0,038$). IC 50 değeri 2,8654 nM olarak hesaplandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Lamotrijinin 1.25, 2.5, 5 ve 10 nM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

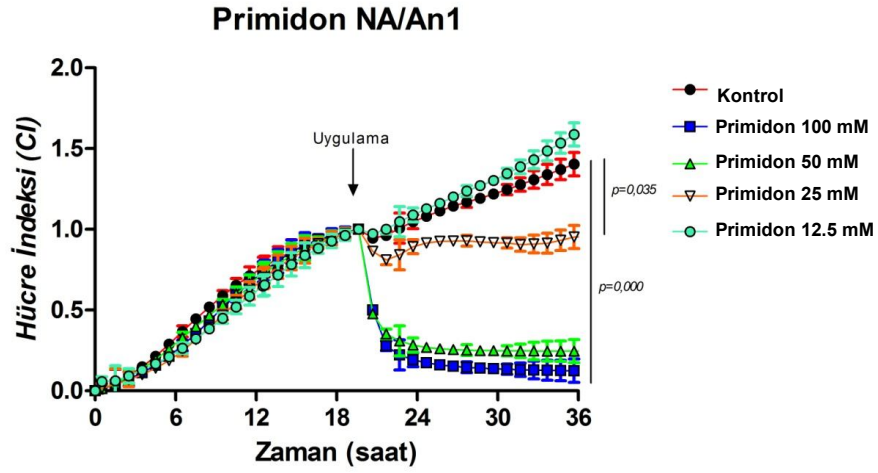
4.4. Primidon

Primidonun C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisini değerlendirmek amacıyla 12.5, 25, 50, 100 nM konsantrasyonları uygulandı ve sonuçlar gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. Proliferasyon paternine uygun olarak ilaç uygulaması 11. saatte gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından sonra sonuçlar 24. saate kadar takip edildi. Primidon, hücre proliferasyonlarında 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde antimitotik etki oluşturduğu gözlemlendi (Primidon 25mM-Kontrol $p=0.041$, Primidon 50mM-Kontrol $p=0.00$, Primidon 100mM-Kontrol $p=0.00$). Fakat primidon 12.5 nM konsantrasyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). IC50 değeri 8.6 mM olarak hesaplandı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

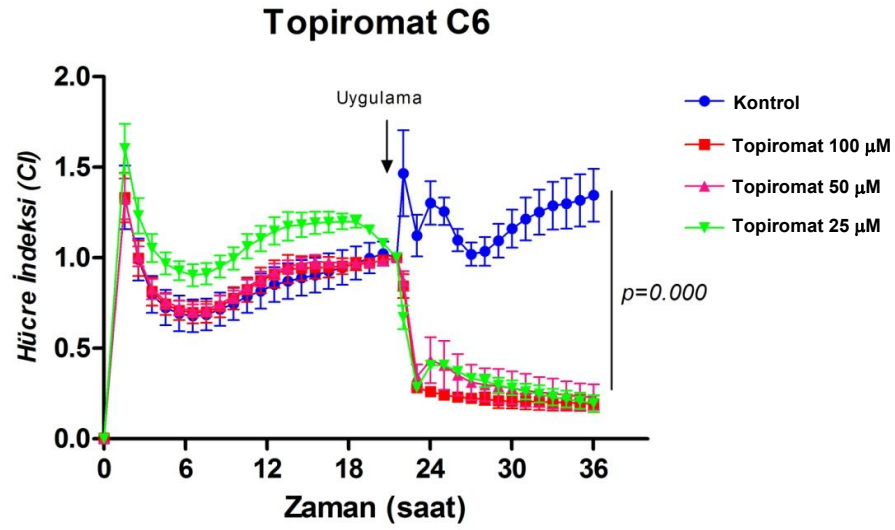
Primidonun NA/AN1 Nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi C6 hücrelerindeki benzer şekilde 12.5, 25, 50, 100 mM konsantrasyonlar uygulanarak yine gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. Primidonun 19. saatteki uygulamanın ardından 36.saaate kadar takip edildi. Primidon, hücre proliferasyonlarında 25, 50 ve 100 mM konsantrasyonda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde antimitotik etki oluşturduğu gözlemlendi (Primidon 25mM-Kontrol $p=0.035$, Primidon 50mM-Kontrol $p=0.00$, Primidon 100mM-Kontrol $p=0.00$). Fakat primidon 12.5 mM konsantrasyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). IC50 değeri 13.9 mM olarak hesaplandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Primidonun 12.5, 25, 50, 100 mM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

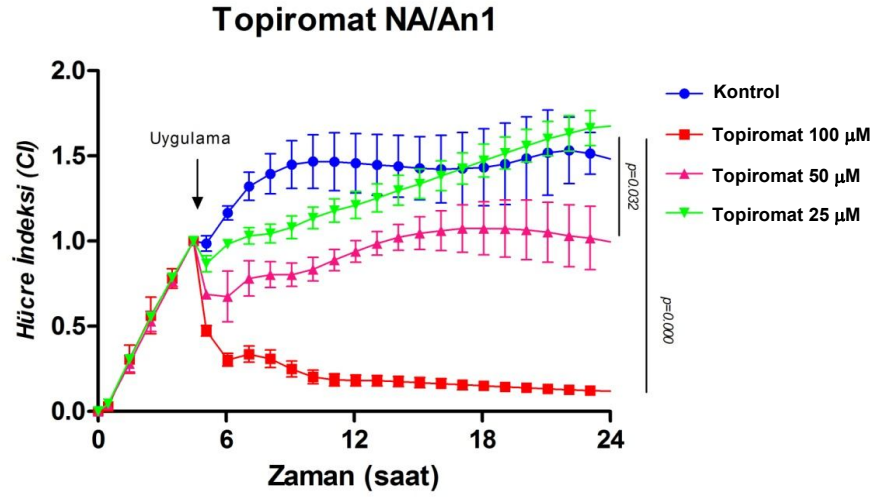
4.5. Topiramet

Topiramet C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisini değerlendirmek amacıyla topirametin 25, 50, 100 nM konsantrasyonları uygulandı ve sonuçlar gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. Proliferasyon paternine uygun olarak ilaç uygulaması 23. saatte gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından sonra sonuçlar 36. saate kadar takip edildi. Uygulanan tüm konsantrasyonların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı antimitotik etki gösterdiği gözlemlendi (Topiramet 25 μ M-Kontrol $p=0.00$, Topiramet 50 μ M-Kontrol $p=0.00$ ve Topiramet 100 μ M-Kontrol $p=0.00$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Topiramet 25,50,100 μM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

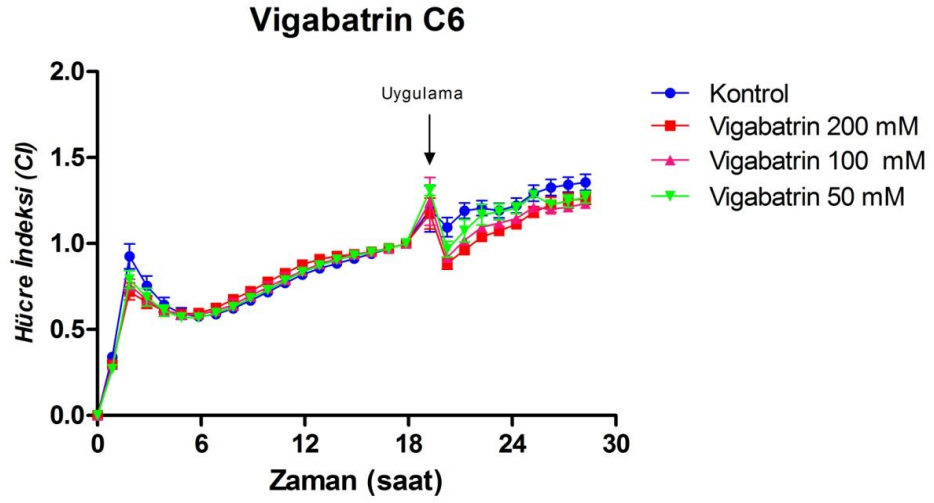
Topiramet NA/AN1 Nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi C6 hücrelerindeki benzer şekilde 25, 50, 100 μM konsantrasyonlar uygulanarak yine gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. Proliferasyon paternine uygun olarak ilaç uygulaması 5. saatte gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından sonra sonuçlar 24. saate kadar takip edildi. Topirametin 25 μM konsantrasyonunda başlangıçta kontrol grubuna göre hafif de olsa bir antimitotik etki izlenmiş olup takip eden süre boyunca antimitotik etkinin anlamlı olmadığı izlenmiştir. ($p>0,05$). 50, 100 μM konsantrasyonların kontrol grubuyla karşılaştırılmasında ise belirgin antimitotik etki oluşturduğu ve bu antimitotik etkinin doz bağımlı artış gösterdiği gözlemlendi (Topiramet 50 μM -Kontrol $p=0.032$ ve Topiramet 100 μM -Kontrol $p=0.00$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Topiramet 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi.

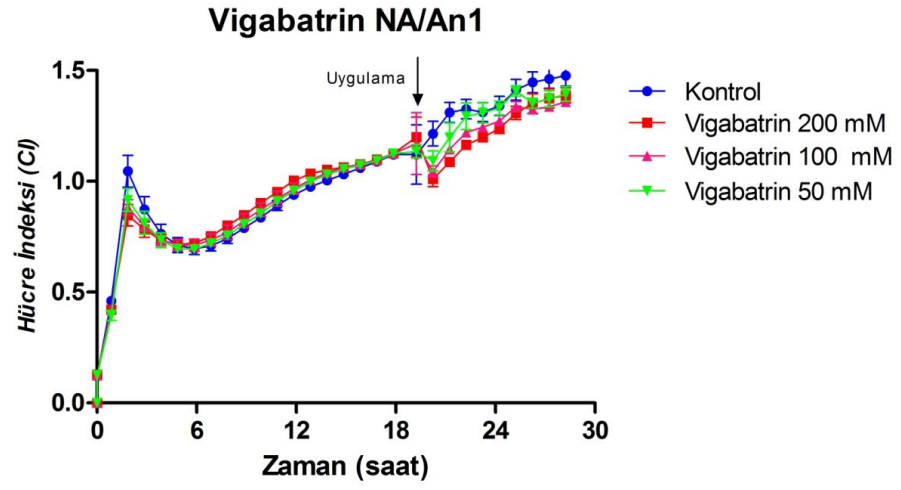
4.6. Vigabatrin

Vigabatrinin C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisini değerlendirmek amacıyla 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonları uygulandı ve sonuçlar gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. Proliferasyon paternine uygun olarak ilaç uygulaması 19. saatte gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından sonra sonuçlar 30. saate kadar takip edildi. Uygulanan 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı antimitotik etki göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Vigabatrin 50 ,100 ve 200 mM konsantrasyonlarının C6 glioma hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi

Vigabatrin NA/AN1 Nöroblastom hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi C6 hücrelerindeki benzer şekilde (50 ,100 ve 200 mM) konsantrasyonlar uygulanarak yine gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. Proliferasyon paternine uygun olarak ilaç uygulaması 19. saatte gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından sonra sonuçlar 30. saate kadar takip edildi. Vigabatrinin bütün konsantrasyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında antimitotik etki oluşturmadiğı gözlemlendi ($p>0.05$) (Şekil 4.12).

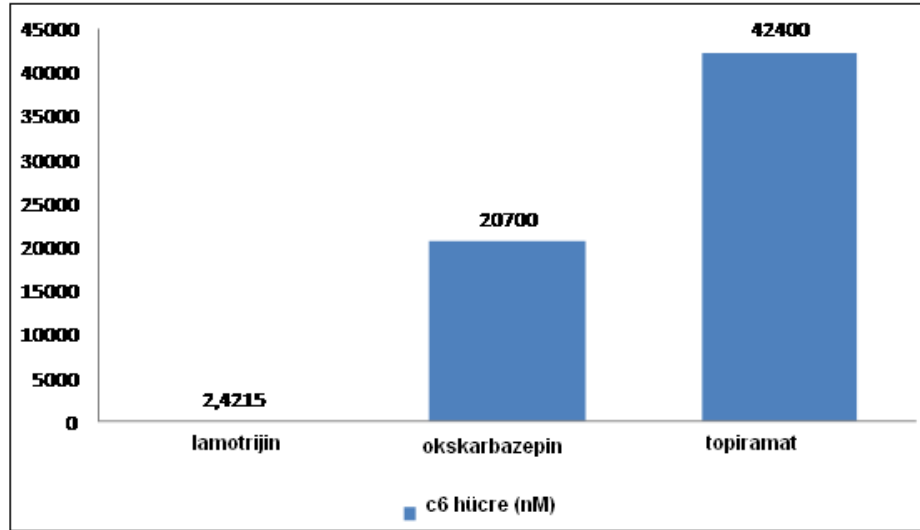


Şekil 4.12: Vigabatrin 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarının NA/AN1 nöroblastom hücreleri üzerindeki etkisi üzerindeki antimitotik etkisi

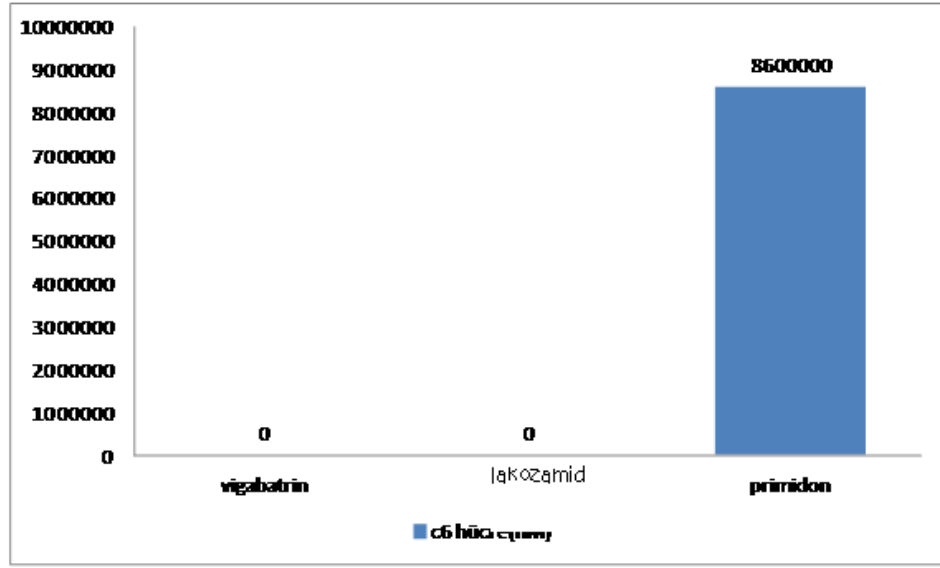
5. IC50 DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Antiepileptik ajanların C6 ve NA/An1 beyin kanseri hücreleri üzerindeki antimitotik etkilerinin inhibitör 50 (IC₅₀) konsantrasyonları

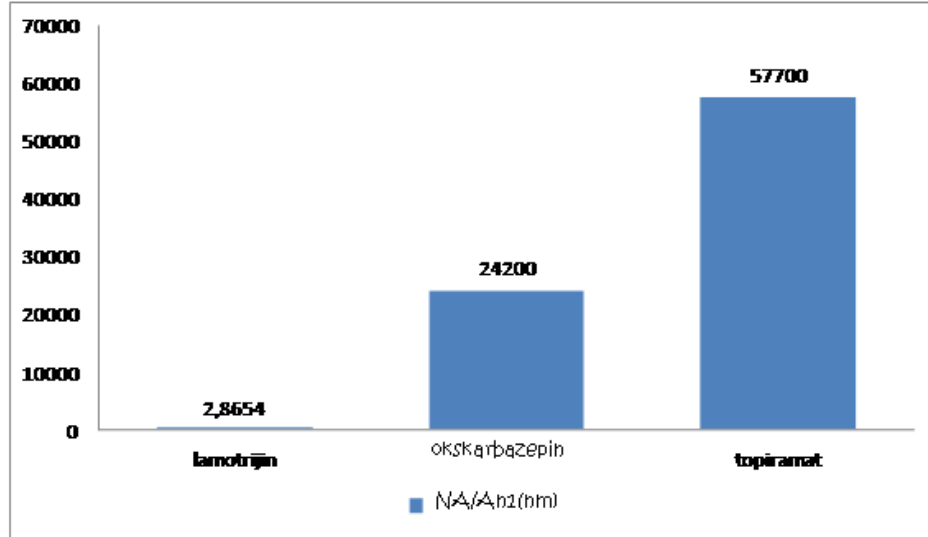
Anti Epileptik Ajan	C6 için IC ₅₀	NA/An1 için IC ₅₀
Lamotrijin	2,4215 nM	2,8654 nM
Topiromat	42,4 µM	57,7 µM
Okskarbazepin	20,7 µM	24,2 µM
Primidon	8,6 mM	13,9 mM
Lakozamid	-	-
Vigabatrin	-	-



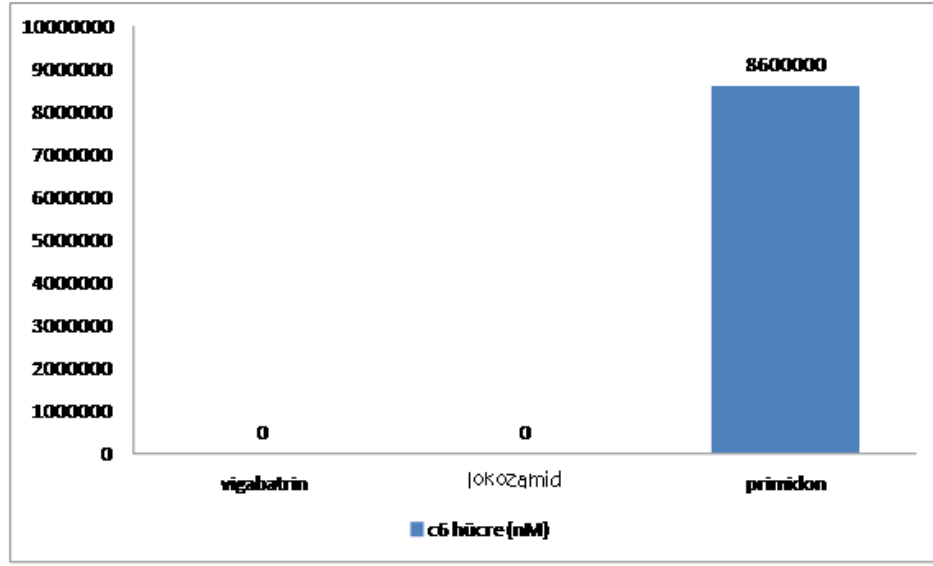
Şekil 5.1: C6gliom hücreleri için lamotrijin, okskarbazepin ve topiromatın hesaplanan IC₅₀ değerleri



Şekil 5.2: C6gliom hücreleri için vigabatrin, lakozamid ve primidonun hesaplanan IC50 değerleri,



Şekil 5.3: NA/AN1 nöroblastom hücreleri için lamotrijin, okskarbazepin ve topirametin hesaplanan IC50 değerleri



Şekil 5.4: NA/AN1 nöroblastom hücreleri için vigabatrin, lakoamid ve primidonun hesaplanan IC50 değerleri

6. TARTIŞMA

Beyin tümörlü hastaların ilk nöbet geçirme oranı %30-50 arasındayken daha sonrasında nöbet geçirme oranı %30 ve üstü olarak değerlendirilmiştir.(optımızın antiepileptic drug treatment in tumoral epilepsy) ayrıca beyin tümörlerine bağlı epileptik nöbetlerin nedeni multifaktöriyel olup tedavi yaklaşımı da multidisipliner olmalıdır. Bu hastalar aynı zamanda kemoterapötik ajanlar da kullandıkları için hastalarda seçilecek antiepileptiklerin enzim inhibisyonu yapmayacak mekanizmada olmasına dikkat edilmelidir (108).

Çalışmamızda piyasada mevcut olan altı antiepileptik ilacın GB ve NB hücre kültüründe mitotik proliferasyon üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada tümör hücreleri üzerine antimitotik etkisi en yüksek olan ilacın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma için vigabatrin, topiramat, lamotrijin, lakozamid, primidon, okskarbazepin kullanılmıştır.

NB ve GB yüksek görülme sıklıkları, kötü seyirli olmaları ve nöbet sıklığının fazla olması nedenleriyle çalışmamızda tercih edilmiştir.

Okskarbazepin

Karbamazepin analogu olan okskarbazepinin etki mekanizması karbamazepine benzerdir. Karbamazepinin memeli vero hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (109). Karbamazepinin mitotik içciklerin normal organizasyonu arasında antiproliferatif aktivite gösterdiği saptanmış (110) ve bu mekanizmada mitotik iç dinamiklerinin supresyonundan antimikrotübül özellikli ilaçların yol açtığı mitotik blok sorumlu tutulmuş.Mitotik arrestten iç morfogenezinde rol alan mitotik kinazların ve mikrotübül motor proteinlerinin her ikisinin inhibisyonuyla ilişkili olduğu düşünülmüştür (111,112). Karbamazepin tedavisi uygulandıktan sonra metafazda bloke olan hücrelerin kaybolmasıyla paralel olarak apoptotik hücrelerde artış belirlenmiş ve böylece oluşan bu mitotik bozukluk apoptozisi hızlandırmıştır (109). Anormal mitozla bağlı hücre ölümü (katastrofik mitoz) sadece bir kaç geniş şekilli, mikronükleasyon içeren ve apoptozisi gecikmiş hücrede görülmüştür (109).

Okskarbazepinin ise hem HELA hem de MCF7 kanser hücreleri üzerinde kuvvetli bir antimitotik etki gösterdiği saptanmıştır (113).

Daha önce GB hücre kültürlerinde karbamazepinle yapılan benzer çalışmada karbamazepinin 12,5 µg/ml ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında 50 µg/ml konsantrasyonundan daha fazla antimitotik etkili olduğu tespit edilmiştir (114). Çalışmamızda ise GB hücre kültürlerinde okskarbazepinin doz arttıkça antimitotik etkisinin arttığı belirlenmiştir. Uygulanan tüm konsantrasyonların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde antimitotik etki gösterdiği gözlemlendi. (Okskarbazepin 7,5 µM-Kontrol p=0.00, Okskarbazepin 15µM-Kontrol p=0.00 ve Okskarbazepin 30 µM-Kontrol p=0.00). Uygulanan konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında 30 ve 15 µM okskarbazepin 7.5 µM konsantrasyonundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha güçlü antimitotik etki oluşturduğu gözlemlendi (Okskarbazepin 30µM-Okskarbazepin 7.5µM p=0.47 ve Okskarbazepin 15µM-Okskarbazepin 7.5µM p=0.47). IC50 değeri 20.7 µM olarak hesaplandı.

Okskarbazepinin NB hücreleri üzerindeki antimitotik etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 7,5 ve 15µM konsantrasyonların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde güçlü bir antimitotik etki göstermediği gözlemlendi (p>0.05). IC 50 değeri 24,2 µM olarak hesaplandı. Fakat 30µM konsantrasyonda yapılan uygulamanın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde antimitotik etki gösterdiği gözlemlendi(Okskarbazepin 30 µM-Kontrol p=0,042)

Vigabatrin

Vigabatrinin hücreler üzerindeki mitotik etkileri üzerine yeterli bilgi olmamakla beraber yapılan bir çalışmada vigabatrin tedavisinden sonraki 1. ve 3. Aylarda T süpresör hücreler (CD8) in mutlak sayısı, NK hücreleri ve NK hücre aktivitesi de dahil olmak üzere istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir. Elde edilen veriler VGB nin NK hücre aktivitesi üzerinden bağışıklık sisteminde özellikle de sitotoksik hücre popülasyonlarının modülasyonuna müdahale edebileceğini göstermiştir (115). Çalışmamızda hem GB hem de NB hücre kültürlerinin 30 saate kadar izlemi yapılmış olup bu süre içinde vigabatrin uygulaması sonrası kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada antimitotik etki gözlenmediği saptanmıştır.

Lakozamid

Literatürde lakozamidin mitotik proliferasyon üzerine etkisi ile ilgili bilgi mevcut değildir. Çalışmamızda GB ve NB hücreleri üzerinde lakozamidin bir antimitotik etki göstermediği saptanmıştır.

Lamotrijin

Çalışmamızda GB hücreleri üzerine 1,25 ve 2,5nM konsantrasyonlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında antimitotik etki göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$). Lamotrijin 5nM konsantrasyonunda uygulama sonrası ilk 5 saatte belirgin antimitotik etki olurken sonrasında bu etki azalmıştır. Lamotrijin 10nM konsantrasyonda uygulandığında ise istatistiksel olarak anlamlı antimitotik etki göstermiştir. (Lamotrijin 10nM-Kontrol $p=0.00$ ve Lamotrijin 5nM-Kontrol $p=0.032$). IC₅₀ değeri 2.4215 nM olarak hesaplandı.

Lamotrijinin 2.5, 5 ve 10 nM konsantrasyonda NB hücreleri üzerinde 1,25 ve 2,5 nM konsantrasyonlarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin antimitotik etki oluşturmadığı izlendi ($p>0,05$) 5nM ve 10 nM konsantrasyonların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı antimitotik etki gösterdiği izlendi (Lamotrijin 10 nM –Kontrol $p=0,00$ ve Lamotrijin 5 nM-Kontrol $p=0,038$). IC 50 değeri 2,8654 nM olarak hesaplandı.

Primidon

Literatürde primidonun tümör hücreleri mitotik proliferasyonu üzerine etkisine ilişkin bir bilgi mevcut değildir. Çalışmamızda primidonun GB hücre kültürleri üzerinde 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde antimitotik etki oluşturduğu gözlemlendi (Primidon 25mM-Kontrol $p=0.041$, Primidon 50mM-Kontrol $p=0.00$, Primidon 100mM-Kontrol $p=0.00$). Fakat primidon 12.5 nM konsantrasyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). IC₅₀ değeri 8.6 mM olarak hesaplandı.

Primidonun NB hücre kültürlerinde 25, 50 ve 100 mM konsantrasyonda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde antimitotik etki oluşturduğu gözlemlendi (Primidon 25mM-Kontrol $p=0.035$, Primidon 50mM-Kontrol

p=0.00, Primidon 100mM-Kontrol p=0.00). Fakat primidon 12.5 mM konsantrasyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p>0,05). IC50 değeri 13.9 mM olarak hesaplandı. Ayrıca hem NB hem GB hücre kültürlerinde bu ilişkinin dozla ilişkili olduğu; 50ve 100 mM konsantrasyonun 25mM konsantrasyondan daha fazla antimitotik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Topiramat

Bir araştırmada topiramatin Lewis akciğer karsinoma tümörü olan C57BL / 6 farelerinde metastaz oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiş. Bu etkinin osteopontin, VEGF (vascular endothelial growth factor) ve karbonik anhidraz II down-regülasyonu aracılığı ile anjiyojenezin inhibisyonu ile oluştuğu düşünülmüştür (116). Çalışmamızda topiramatin GB hücre kültürlerinde tüm konsantrasyonlarda antimitotik etki gösterdiği saptanmıştır. (Topiramat 25µM-Kontrol p=0.00, Topiramat 50µM-Kontrol p=0.00 ve Topiramat 100µM-Kontrol p=0.00).

NB hücre kültürü üzerinde Topiramatin 25 µM konsantrasyonunda başlangıçta kontrol grubuna göre hafif de olsa bir antimitotik etki izlenmiş olup takip eden süre boyunca antimitotik etkinin anlamlı olmadığı izlenmiştir (p>0,05). 50,100 µM konsantrasyonların kontrol grubuyla karşılaştırılmasında ise belirgin antimitotik etki oluşturduğu ve bu antimitotik etkinin doz bağımlı artış gösterdiği gözlemlendi (Topiramat 50µM-Kontrol p=0.032 ve Topiramat 100µM-Kontrol p=0.00).

Çalışmamız xCELLigence yönteminin antiepileptiklerin antimitotik etkisini belirlemede kolay ve hızlı bir yöntem olduğunu belirlemiştir.

Bütün antiepileptiklerin karşılaştırmalı olarak tümörlü hücreler üzerindeki mitotik proliferasyonu engelleyici, durdurucu ve baskılayıcı etkilerinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi ve klinik şartlarda antiepileptik seçimini belirleyecek sonuçlara varmak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

7. SONUÇLAR

Beyin tümörlü hastalarda oldukça sık kullanılan bazı eski jenerasyon ve yeni jenerasyon antiepileptiklerin in vitro şartlarda hem yetişkin hem de çocukluk çağı tümörlerinden olan GB ve NB hücre kültürleri üzerine antimitotik etkilerinin incelendiği bu çalışma da şu sonuçlara ulaşılmıştır.

1. GB hücreleri üzerinde vigabatrin ve lakozamidin antimitotik etkisi olmamasına rağmen lamotrijin ve primidon doz bağımlı güçlü antimitotik etki, topiramata ve okskarbazepin ise tüm konsantrasyonlarda antimitotik etki göstermiştir.
2. Bu altı ilacın GB hücreleri üzerindeki maksimum inhibisyonlarının %50 'sini oluşturan ilaç konsantrasyonlarının (IC 50) karşılaştırılmasında ise primidon ve topiramatin diğer ilaçlara kıyasla istatistiksel olarak daha fazla antimitotik etki gösterdiği gözlenmiştir. Primidonun topiramata karşılaştırılmasında ise primidon topiramata göre daha fazla antimitotik etki göstermiştir. Vigabatrin ve lakozamid antimitotik etki göstermezken okskarbazepin ve lamotrijin primidon ve topiramata kıyasla daha düşük antimitotik etki göstermiştir.
3. NB hücrelerinde sadece vigabatrin ve lakozamid antimitotik etki göstermezken, diğer antiepileptiklerin doz bağımlı antimitotik etki gösterdiği gözlenmiştir. Primidon ve topiramatin istatistiksel olarak anlamlı biçimde diğer antiepileptiklere göre daha fazla antimitotik etki gösterdiği bulundu.

Araştırmamız, beyin tümörlü hastalarda nöbetlerle birlikte nöroloji kliniğine başvuran hastalarda antiepileptikler seçilirken nüks riski olan tümörlü hastalarda tümör hücrelerinin çoğalmasını baskılayacak antimitotik etki gösteren ilaçların ilk sırada seçiminin önemli olduğunu göstermiştir.

Böylece hem nöbetleri durdurmaya yönelik tedavi başlanırken hem de kullanılan ilacın antimitotik etkisinden yararlanılarak ameliyat sonrası veya ameliyatın mümkün olmadığı durumlarda tümörlü hücrelerin mitotik proliferasyonu baskılanarak tümörün büyümesi de engellenebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984. *Epilepsia* 1993; 34: 453–68.
2. Glantz MJ, Cole BF, Forsyth PA, et al. Practice parameter: anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2000; 54: 1886–93.
3. Taphoorn MJ. Neurocognitive sequelae in the treatment of lowgrade gliomas. *Semin Oncol* 2003; 30: 45–8.
4. Khan and Onar A, Seizure Recurrence and Risk Factors after Antiepilepsy Drug Withdrawal in Children with Brain Tumors *Epilepsia* 2006, 47(2):375–9.
5. Schaller B. Influences of brain tumor-associated pH changes and hypoxia on epileptogenesis. *Acta Neurol Scand* 2005; 111: 75–83.
6. Aronica E, Yankaya B, Jansen GH, et al. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor protein expression in glioneuronal tumours from patients with intractable epilepsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001; 27: 223–37.
7. Morrell F, Toledo-Morrell L. From mirror focus to secondary epileptogenesis in man: an historical review. *Adv Neurol* 1999; 81: 11–23.
8. Mahaley MS Jr, Dudka L. The role of anticonvulsant medications in the management of patients with anaplastic gliomas. *Surg Neurol* 1981; 16: 399–401.

9. Wick W, Menn O, Meisner C, et al. Pharmacotherapy of epileptic seizures in glioma patients: who, when, why and how long? *Onkologie* 2005; 28: 391–6.
10. North JB, Penhall RK, Hanieh A, Frewin DB, Taylor WB. Phenytoin and postoperative epilepsy. A double-blind study. *J Neurosurg* 1983; 58: 672–7.
11. Sirven JI, Wingerchuk DM, Drazkowski JF, Lyons MK, Zimmerman RS. Seizure prophylaxis in patients with brain tumors: a metaanalysis. *Mayo Clin Proc* 2004; 79: 1489–94.
12. Wagner GL, Wilms EB, Van Donselaar CA, Vecht C. Levetiracetam: preliminary experience in patients with primary brain tumours. *Seizure* 2003; 12: 585–6.
13. Vecht CJ, Wagner GL, Wilms EB. Interactions between antiepileptic and chemotherapeutic drugs. *Lancet Neurol* 2003; 2: 404–9.
14. Ma B, Pan Y, Song Q, Tie L, Zhang Y, Xiao Y, Zhang J, Han J, Xu Y, Xiang Y, Yu HM, Li XJ.) The effect of topiramate on tumor-related angiogenesis and on the serum proteome of mice bearing Lewis lung carcinoma. *Eur J Pharmacol*. 2011 Aug 1;663(1-3):9-16.
15. Britton JW, Cascino GD, Sharbrough FW, Kelly PJ. Low-grade glial neoplasms and intractable partial epilepsy: efficacy of surgical treatment. *Epilepsia* 1994; 35: 1130–5.
16. Matricardi M, Brinciotti M, Bnedetti P. Outcome after discontinuation of antiepileptic drug therapy in children with epilepsy. *Epilepsia* 1989; 30:582-9.
17. Hildebrand J. Management of epileptic seizures. *Curr Opin Oncol* 2004; 16: 314–7.

18. van Breemen MS, Wilms EB, Vecht CJ. Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. *Lancet Neurol* 2007;6(5):421-30.
19. Vecht CJ, van Breemen M. Optimizing therapy of seizures in patients with brain tumors. *Neurology* 2006;67(12 Suppl 4):S10.
20. Maschio M, Dinapoli L, Zarabia A, Jandolo B. Issues related to the pharmacological management of patients with brain tumours and epilepsy. *Funct Neurol* 2006;21(1):15-9.
21. LeBlanc FE, Rasmussen T. Cerebral seizures and brain tumors. Vincen PJ, Bruyn GW, ed. *Handbook of Clinical Neurology*. New York: Elsevier, 1974;15:295-301.
22. Pasquier B, Peoc'h M, Fabre-Bocquentin B, et al. Surgical pathology of drug-resistant partial epilepsy. A 10-year-experience with a series of 327 consecutive resections. *Epileptic Disord* 2002; 4: 99–119.
23. Chang EF, Potts MB, Keles GE, Lamborn KR, Chang SM, Barbaro NM, Berger MS. Seizure characteristics and control following resection in 332 patients with low-grade gliomas. *J Neurosurg*. 2008 Feb;108(2):227-35.
24. Lieu AS, Hwang SL. Intracranial meningiomas and epilepsy: incidence, prognosis and influencing factors. *Epilepsy Res* 2000; 38: 45–52.
25. Vanderberg SR. Current diagnostic concepts of astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51:644-657.
26. Schaller B. Influences of brain tumor-associated pH changes and hypoxia on epileptogenesis. *Acta Neurol Scand* 2005;111(2):75-83.

27. Wolf HK, Roos D, Blumcke I, Pietsch T, Wiestler OD. Perilesional neurochemical changes in focal epilepsies. *Acta Neuropathol* 1996;91(4):376-84.
28. Aronica E, Yankaya B, Jansen GH, Leenstra S, van Veelen CW, Gorter JA, et al. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor protein expression in glioneuronal tumours from patients with intractable epilepsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27(3):223-37.
29. Gilmore R, Morris H III, Van Ness PC, Gilmore-Pollak W, Estes M. Mirror focus: function of seizure frequency and influence on outcome after surgery. *Epilepsia* 1994; 35(2):258-63.
30. Maas S, Patt S, Schrey M, Rich A. Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(25):14687-92.
31. Villanueva V, Codina M, Elices E. Management of epilepsy in oncological patients. *Neurologist* 2008;14(6 Suppl 1):S44-54.
32. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;64(19):6892-9.
33. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL: Epidemiology of brain tumors. *Neurologic Clinics* 25(4): 867-890,2007
34. Temel nöroşirürji cilt 1;Türk Nöroşirürji derneği yayınları 2005;S:656
35. Mc Donald j, Rosenblum ML.Gliomas In.Principles of Neurosurgery Ed. Rengachary SS, Wilkins RH. Mosby-Wolfe, 1994;26.1-32.

36. Öge E. Nöroloji 2.baskı .İstanbul Üniversitesi S:579
37. Oğul E. Klinik Nöroloji 2002; 255.
38. Jeffrey N Bruce, MD, Benjamin Kennedy; Glioblastoma Multiforme, Nov 5, 2009.
39. Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, Biernat W, von Deimling A, Yasargil MG et al. A case history of glioma progression. *Acta Neuropathol.*(Berl),97:525-32. 1999.
40. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George O, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*,69:1237-45. 1992.
41. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358:80-3.1992.
42. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp Neurol*, 56:180-5. 1997.
43. Reifemberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.*,53:2736-9. 1993.
44. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL et al. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol*, 8:655-67. 1998.

45. Claesson W. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J. Biol. Chem.*, 269:32023-6. 1994.
46. Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul.*, 1:555-66. 1990.
47. Hermanson M, Funa K, Koopmann I, Maintz D, Waha A, Westermark B et al. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res.*, 56:164-71. 1996.
48. Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat. Res.*, 276:299-306. 1992.
49. Bigner SH, Vogelstein B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. *Brain Pathol.*, 1:12-8. 1990.
50. James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hausen M, Nordenskjold MD, Collins VP et al. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res.*, 48:5546-51. 1988.
51. Li J, Yen C, Liaw O, Podsypanina K, Bose S, Wang SI et al. *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275:1943-7. 1997.
52. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus K et al. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet.*, 17:329.

53. Mollenhauer J, Holmskov U, Wiemann S, Krebs I, Herbertz S, Madsen J et al. The genomic structure of the D M BT 1 gene: evidence for a region with susceptibility to genomic instability. *Oncogene*,18:623340. 1999.
54. Dere F. Nöroanatomy. 1. Baskı, Adana: Ç.Ü. Basımevi, 1990; 10-113.
55. Karlsson UL, Leibel SA, Wallner K, Davis LW, Brady LW, Brain in: Principles and Practise of Radiation Oncology. (eds): Perez CA, Brady LW , J.B Lippincot Company Philadelphia:1992, ch23: 513-563.
56. Karlsson UL, Leibel SA, Wallner K, Davis LW, Brady LW. Primary intracranial Neoplasms. Perez CA, Brady LW. Principles and Practise of Radiation Oncology. Third ED., Philadelphia: J.B Lippincot Company 1998: 777-822.
57. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, et al. Comparison of post-operative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. *Cancer* 1983; 52: 997-1007.
58. Buatti JM, Marcus RB, Mendenhall WM, et al. Accelerated hyperfractionated radiotherapy for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 34: 785-792.
59. Goodman M, Gurney JG, Smith MA, Olshan AF. Sympathetic nervous system tumors. *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program, SEER pediatric monograph*. 1975-1995.65-72.
60. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins 2006:934-969.

61. Kutluk T. First national pediatric cancer registry in Turkey: A Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) study. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;43(4):452.
62. Allen RW, Ogden B, Bentley FL, Jung AL. Fetal hydantoin syndrome, neuroblastoma and hemorrhagic disease in a neonate. *Journal of the American Medical Association* 1996;244,1464-1465.
63. Schwartzbaum JA. Influence of the mother's prenatal drug consumption on risk of neuroblastoma in the child. *American Journal of Epidemiology* 1996, 135, 1358-1367.
64. Haase GM, Perez C, Atkinson JB. Current aspects of biology, risk assessment, and treatment of neuroblastoma. *Semin Surg Oncol*. 1999;16(2):91-104.
65. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1999;17(7):2264-79.
66. Tonini GP, Longo L, Coco S, Perri P. Familial neuroblastoma: a complex heritable disease. *Cancer Lett*. 2003;197(1-2):41-5.
67. Hiyama E, Yokoyama T, Hiyama K, Yamaoka H, Matsuura Y, Nishimura S, Ueda K. Multifocal neuroblastoma: biologic behavior and surgical aspects. *Cancer*. 2000;88(8):1955-63.
68. Aksoylar S. Nöroblastom. *Pediatric onkoloji. Klinik gelişim* 2007;20:62-74.
69. Pahlman S, Stockhausen MT, Fredlund E, Axelson H. Notch signaling in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 2004;14(5):365-73.

70. Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, ed. USA: McGraw Hill, 2001:521-547.
71. Leach MJ, Marden CM, Miller AA. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential anti-epileptic drug: II. Neurochemical studies on the mechanism of action. *Epilepsia*-1986; 27: 490-497.
72. Richter A, Loschmann PA, Loscher W. The novel antiepileptic drug, lamotrigine, exerts prodystonic effects in a mutant hamster model of generalized dystonia. *Eur J Pharmacol*-1994; 264: 345-351.
73. Bora İbrahim ;*Epilepsi*; 2008 syf 602.
74. Leach MJ, Lees G, Riddall DR. Lamotrigine: Mechanisms of action. In *Antiepileptic Drugs*-4th edition by Levy RE, Mattson RH, Meldrum BS et al. Lippincott-Raven Healthcare-1995; pp: 861-869.
75. Rogawski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs: Pharmacological mechanism and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol Rev*-1990; 42: 223-286.
76. Parsons DN, Dickins M, Morley TJ. Lamotrigine: Absorption, distribution, and excretion. In *Antiepileptic Drugs*-4th edition by Levy RE, Mattson RH, Meldrum BS et al. Lippincott-Raven Healthcare-1995; pp: 877-881.
77. Dickins M, Sawyer DA, Morley TJ, Parsons DN. Lamotrigine: Chemistry and biotransformation. In *Antiepileptic Drugs*-4th edition by Levy RE, Mattson RH, Meldrum BS et al. Lippincott-Raven Healthcare-1995; pp: 871-875.
78. Battino D, Buti D, Croci D et al. Lamotrigine in resistant childhood epilepsy. *Neuropediatrics*-1993; 24: 332-336.

79. Brodie MJ, Richens A, Yuen AWC. Double-blind comparison of lamotrigine and carbamazepine in newly diagnosed epilepsy. *Lancet*-1995;345:476-479.
80. Richens A. Safety of lamotrigine. *Epilepsia*-1994;35 (suppl-5):37-40.
81. Richens A. Lamotrigine: Toxicity. In *Antiepileptic Drugs*-4th edition by Levy RE, Mattson RH, Meldrum BS et al. Lippincott-Raven Healthcare-1995; pp: 897-902.
82. Bora İbrahim ;Epilepsi; 2008 Syf:598.
83. 1999 avrupa ve amerika çok merkezli yapılan çalışmalar. Kaplan Meier. Topamax s9-42.
84. Coulter DA, Sombati S, DeLorenzo RJ. Selective effects of topiramate on sustained repetitive firing and spontaneous bursting in cultured hippocampal neurons.*Epilepsia* 1993; 34(suppl2):123.
85. Rogawski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol Rev* 1990;42:223-86.
86. Yaari Y, Selzer ME, Pincus JH. Phenytoin: mechanisms of its anticonvulsant action. *Ann Neurol* 1986;20:171-84.
87. White HS, Brown SD, Woodhead JH, et al. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res* 1997;28:167-79.

88. Brown SD, Wolf HH, Swinyard Ea, Twyman RE, White HS. The novel anticonvulsant topiramate enhances GABA-mediated chloride flux. *Epilepsia* 1993; 34 (suppl 2):122-3.
89. *Guyton*. Tıbbi Fizyoloji 7. baskı 1989 1. cilt: s596, 629-45,715.
90. Tassinari CA, Michelucci R, Chauvel P, et al. Double-blind, placebo-controlled trial of topiramate (600mg daily) for the treatment of refractory partial epilepsy. *Epilepsia* 1996;37:763-8.
91. Maryanoff BE, Nortey SO, Gardocki JF, Shank RP, Dodgson SP. Anticonvulsant 0-alkyl sulfamates. 2,3: 4,5-bis-O-(1-methylethylidene)- β -D-fructopyranose sulfamate and related compounds. *J Med Chem* 1987; 30: 880-7.
92. Wasserstein AG, Rak I, Reife RA. Nephrolithiasis during treatment with topiramate. *Epilepsia* 1995; 36 (suppl 3): s153.
93. Duncan JS. The promise of new antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 2002;53:123-131.
94. Trimble MR, Rüşch N, Betts T, ve ark. Psychiatric symptoms after therapy with new antiepileptic drugs: psychopathological and seizure related variables. *Seizure*, 2000; 9:249-254.
95. Lacosamide: A Review of Preclinical Properties. Beyreuther BK, Freitag J, Heers C, Krebsfanger N, Scharfenecker U, Stohr T. *CNS Drug Rev.* 2007;13(1):21-42.

96. Adjunctive lacosamide for partial-onset seizures: Efficacy and safety results from a randomized controlled trial. Halász P, Kälviäinen R, Mazurkiewicz-Beldzińska M, Rosenow F, Doty P, Hebert D, Sullivan T; SP755 Study Group. *Epilepsia*. 2009;50(3):443-53.
97. Schmidt D, Sachdeo R. Oxcarbazepine for Treatment of Partial Epilepsy: A Review and Recommendations for Clinical Use. *Epilepsy Behav*. 2000; 1:396-405.
98. Pina-Garza JE, Espinoza R, Nordli D et al. Oxcarbazepine adjunctive therapy in infants and young children with partial seizures. *Neurology*. 2005 ;65:1370-1375.
99. Verdru P. Epilepsy in children: the evidence for new antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2005;181:17-20.
100. Horga de la Parte JF, Horga A. Oxcarbazepine in the treatment of epilepsy. A review and updat. *Rev Neurol*. 2006;42:95-113.
101. İlbars, N. Yeni Nesil Metal Desteksiz Seramikler ve Yapıştırılmasında Kullanılan Rezin Simanların Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 11-13.
102. International Standard 7405. “Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry test methods for dental materials.” International Organization for Standardization, 1997.
103. Schmalz, G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials, *Clin Oral Investig*, 1997, 1,154-162.

104. Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C.R., Granchi, D. and et all. Cell culture methods for testing biocompatibility, Clin Mater, 1994, 15,173-190.
105. Harriso, M.A. and Rae, I.F. General techniques of cell culture Cambridge University Pres, UK. 1997.
106. Butler, M. Animal Cell Culture and Technology, BIOS Scientific Publishers, New York, 2004.
107. Tunçel, A. Sabit Protetik Restorasyonlarda Kullanılan Farklı Fiberle Güçlendirilmiş Kompozit Yapıların Yüzey Sertliği, Yüzey Pürüzlülüğü ve Sitotoksisitelerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 2005, 34-41.
108. Melanie S M van Breemen, Erik B Wilms, Charles J VechtEpilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management.
109. A. Jos, G. Repetto, J. R'ios, M. Hazen, M. Molero, A. del Peso, M. Salguero, P. Fern'andez Freire, J. P'erez Mart'ın, Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints, Toxicol. In Vitro 17 (2003) 525–532.
110. J.M. P'erez Mart'ın, P. Fern'andez Freire, V. Labrador, M.J. Hazen *Carbamazepine induces mitotic arrest in mammalian Vero cells.
111. V. Mountain, D. Compton, Dissecting the role of molecular motors in the mitotic spindle, Anat. Rec. 261 (2000) 14–24.
112. P. Andrews, E. Knatko, W. Moore, J. Swedlow, Mitotic mechanics: the auroras come into view, Curr. Opin. Cell Biol. 15 (2003) 672–683.

113. El Sharkawi FZ, El Shemy HA, Khaled HM.).Possible anticancer activity of rosuvastatine, doxazosin, repaglinide and oxcarbazepin. Asian Pac J Cancer Prev. 2014; 15(1): 199-203.
114. Çevik Ş, Glioblastom Ve Nöroblastom İnvitro Hücre Kültürlerinde Antiepileptiklerin Mitotik Proliferasyon Üzerine Etkileri, Doktora Tezi,Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi,Sivas, 2013,32-46.
115. Pacifici R, Zuccaro P, Iannetti P, Raucci U, Imperato C..Immunologic aspects of vigabatrin treatment in epileptic children. Epilepsia. 1995 Apr; 36(4):423-6.
116. Liigant A, Haldre S ,Oun A,ve ark.Seizure disorders in patients with brain tumors.Eur Neurol, 2001;45:46-51.
117. Perucca E,Optimizing antiepileptic drug treatment in tumoral epilepsy Epilepsia 2013,54(9):97-104