

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

**EPİLEPSİ ETYOGENEZİNDE "DENEYSEL  
KONVÜLSİYON-NÖRAL PLASTİSİTE-  
KONVÜLSİYON" BAĞINTISININ ARAŞTIRILMASI**

**Doktora Tezi**

**Dr. Vedat EVREN**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gönül Ö. PEKER**

**EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BORNOVA-İZMİR**

**2010**



## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca benden desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan başta anabilim dalı başkanımız ve danışmanım olan Prof. Dr. Gönül Peker'e ve anabilim dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine; tez izleme jürimde bulunan Doç. Dr. Özlem Yılmaz'a ve Prof. Dr. Hasan Tekgül'e; çalışmam süresince bilgisi, tecrübesi ve emeği ile yardımını esirgemeyen Uzman Dr. Ayşegül Keser'e; birlikte huzurlu ve keyifli bir çalışma ortamı sağladığımız kürsü çalışanlarına, meslektaşlarıma, arkadaşlarıma; her zaman yanımda olan sevgili aileme ve eşime gönülden teşekkür ederim.

İzmir, 2010

Vedat EVREN

# İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2	GENEL BİLGİLER .....	6
2.1	Nöbet.....	6
2.2	Temporal Lob Epilepsisi .....	10
2.3	Hipokampus .....	10
2.3.1	Dentat Girus .....	13
2.3.2	Cornu Ammonis .....	13
2.3.3	Hipokampal Sinyal Yolakları.....	14
2.3.3.1	Tri-Sinaptik Devre .....	14
2.3.3.2	Hipokampus'un Aferent Bağlantıları.....	15
2.3.3.3	Ara Nöronlar .....	16
2.3.4	Granül Hücreleri ve Yosunsu Lifler.....	17
2.3.5	Eksitator ve İnhibitör Nörotransmitterler .....	17
2.3.5.1	Glutamat .....	17
2.3.5.2	GABA .....	19
2.4	DeneySEL Konvülsiyon Modelleri .....	20
2.4.1	Pentilentetrazol.....	22
2.5	Astrosit .....	23
2.5.1	Yapı ve Fizyoloji.....	23
2.5.1.1	Astrosit – Nöron Enerji Döngüsü.....	24
2.5.1.2	Astrosit Kalsiyum Dalgaları.....	28
2.5.2	Epilepsi – Astrosit İlişkisi .....	29
2.5.2.1	Astrositik Glutamat Reseptörleri ve Taşıyıcıları.....	31
2.5.2.2	Su ve Potasyum Dengesinin Epileptojenezdeki Rolü .....	32

2.5.2.3	Astrosit Neksuslarının Epileptojenez ile İlişkisi .....	33
2.5.2.4	Epileptik Odakta Reaktif Astrositler .....	34
2.5.2.5	Sitokinlerin Rolü .....	35
2.5.2.6	Astrosit-Nöron Sinyalleri .....	35
2.5.2.7	Nöronal Uyarılma Eşiğinin Astrositik Glutamat Salımı ile Modülasyonu.....	36
3	GEREÇ VE YÖNTEM .....	38
3.1	Deney Hayvanları.....	38
3.2	Deney Deseni .....	38
3.2.1	Gruplar .....	38
3.2.2	Anestezi.....	40
3.3	Tutuşturma (Kindling) .....	40
3.4	Primer Astrosit Kültürü.....	42
3.4.1	Gerekli Malzemeler.....	43
3.4.1.1	Donanım.....	43
3.4.1.2	Kimyasal Ajanlar .....	44
3.4.1.3	Sarf Malzemeleri.....	44
3.4.2	Kültürün (Ekinin) Hazırlanması.....	45
3.5	Stereotaksi .....	47
3.6	Perfüzyon .....	49
3.6.1	Kullanılan Çözeltiler: .....	50
3.6.1.1	Paraformaldehid .....	50
3.6.1.2	Sodyum Sülfid Çözeltisi (Na <sub>2</sub> S) .....	50
3.7	Histoloji.....	51
3.7.1	Nissl Boyaması .....	51

3.7.2	TIMM Histokimya Boyaması .....	52
3.8	Stereoloji .....	55
4	BULGULAR.....	58
4.1	Tutuşturma .....	58
4.2	Histokimya .....	62
4.2.1	Nissl Boyaması ve H¼cre Sayımları .....	62
4.2.2	TIMM Boyaması.....	64
IV.	BÖL¼M .....	67
5	TARTIşMA .....	67
6	SONUÇ .....	73
VI.	BÖL¼M .....	75
7	ÖZET - SUMMARY .....	75
8	KAYNAKLAR .....	79
9	ÖZGEÇMİş .....	93

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Transfigürasyon (Dönüşüm) Raphael, 1516-1520.....	2
Şekil 2.1: Nöbet Sınıflandırma Algoritması.....	9
Şekil 2.2: Hipokampus Tabakaları.....	12
Şekil 2.3: Pentilentetrazol .....	22
Şekil 2.4: Nöron-Astrosit Enerji Döngüsü (Klasik Görüş).....	25
Şekil 2.5: Nöron-Astrosit Laktat Mekiği .....	27
Şekil 3.1: Deney Deseni.....	39
Şekil 3.2: Tutuşturma gözlem kutuları.....	41
Şekil 3.3: Evre 3 ve evre 5 temsili görüntüleri.....	42
Şekil 3.4: Örnek Nöbet Evreleme Tablosu .....	42
Şekil 3.5: Astrosit Kültüründe Kültür Vasatının Yenilenmesi.....	47
Şekil 3.6: Stereotaksik astrosit ekimi .....	48
Şekil 3.7: Hipokampusta Stereotaksik Ekim Yeri (Paxinos) .....	49
Şekil 3.8: Nissl Boyaması (Sıçan hipokampusu hilus bölgesi, 63x).....	51
Şekil 3.9: Naif Sıçan Hipokampusunda TIMM Histokimyası.....	53
Şekil 3.10: Tarafsız sayım çerçevesi.....	56
Şekil 4.1: Gruplar arasında tutuşturma dönemi en yüksek evre ortalamaları .....	58
Şekil 4.2: Gruplar arasında kışkırtma dönemi en yüksek evre ortalamaları .....	59
Şekil 4.3: Deneklerin ekim öncesinde ve sonrasındaki nöbet ortalamaları .....	60
Şekil 4.4: Evre 3 Başlama Süresi .....	61
Şekil 4.5: Dentat Girus Hilusunda Nöron Yoğunluğu .....	62
Şekil 4.6: CA3 Bölgesi Nöron Yoğunluğu .....	63
Şekil 4.7: Dentat girus moleküler tabakada seyrek TIMM granülleri .....	65
Şekil 4.8: Supragranüler bölgede süreklilik gösteren belirgin granüller.....	65

Şekil 4.9: CA3 Stratum oriens'te yoğun tabakalı TIMM granülleri (derece 5) ..... 66

Şekil 4.10: Naif sıçan hipokampus TIMM histokimyası ..... 66

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Epileptik Nöbetlerin Uluslararası Sınıflandırması (ILAE-1981) .....	6
Tablo 2.2: Nöbeti tetikleyen faktörlerde sıklıkla karşılaşılanlar .....	8
Tablo 2.3: Nöbetlerin Düzeltilmiş ILAE Sınıflandırması.....	9
Tablo 3.1: Supragranüler Bölge TIMM Derecelendirme Tablosu.....	54
Tablo 3.2: CA3 Bölgesi TIMM Derecelendirme Tablosu .....	55
Tablo 4.1: Ölçüm bölgelerine göre grupların Post-Hoc Tukey “p” değerleri.....	64

# I.BÖLÜM

## 1 GİRİŞ VE AMAÇ

Epileptik nöbetlerle ilgili tanımlamaların tarihi uygarlık tarihi kadar eskiye dayanmaktadır. Epileptolojinin tarihsel gelişimine bakılırsa aslında süreklilik arz etmediği hemen farkedilir. Orta çağ dönemindeki insanların bu hastalık hakkında 1500 yıl öncesinde yaşamış olan Hipokrat'a göre daha az bilgiye ve ufka sahip olduklarını bilmek oldukça ilginçtir. Bugün için bilinen en eski nöbet tanımlaması M.Ö. 1000 yılında tamamlanmış, "Sakikku" (bütün hastalıklar) denilen Babil taş yazıtlarında yer almaktadır. Nöbet tanımlamasını işaret eden bir Sümer terimi düşüren / deviren hastalık (the falling sickness) olarak tercüme edilmiştir (Wilson and Reynolds 1990). Antik çağlarda epilepsi doğüstü güçlerin bir dışa vurumu ve kutsal bir hastalık olarak kabul edilmişken, sonrasında Hipokrat (M.Ö. 400) kitabında hastalığın nedeninin beyinden kaynakladığını yazmıştır. Ancak yanlış bir varsayım ile ileri sürdüğü tanımlamasında beyindeki fazla sıvının venler aracılığı ile akmasının hastanın konuşamamasına, bedeninin kasılmasına ve ağızdan köpük gelmesine neden olduğunu söylemiştir (Temkin 1933). Hipokrat'tan bu yana Galen ve İbn-i Sina gibi tıbbın ataları kabul edilen hekimler de kısmen doğru, kısmen hatalı tanımlamalarda bulunmuşlardır. Ortaçağ Avrupa'sı epilepsi için karanlık bir çağdır çünkü hastalığın şeytani güçlerden kaynaklandığı ve tedavisinin ancak dini yaklaşımlarla olabileceğine dair kanı oluşmuştur. Raphael'in İsa'nın Dönüşümü adlı tablosunda kutsal kitaplarda İsa'nın epilepsisi olan bir oğlan çocuğundan şeytani çıkardığını betimlenmektedir (Şekil 1.1). İncilde epilepsi ile ilgili birkaç benzer referans bulunmaktadır ki bu da Orta Çağ'da epilepsi ile ilgili şeytani hastalık görüşünün nasıl oluştuğunu çok iyi ortaya koymaktadır. Epilepsi ile ilgili sağlıklı

teoriler ancak 18. yüzyıldan sonra üreilmeye başlanmış, yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren gelişmeler çok hızlanmıştır. Yine de epilepsi hastalarına karşı toplumda var olan stigmatizm ne yazık ki devam etmektedir.



Şekil 1.1: Transfigürasyon (Dönüşüm) Raphael, 1516-1520

Çok az durum konvülsiv bir nöbetin dramatikliği ile eş tutulabilir. Nöbet geçiren kişi ağlayabilir, bilinçsizce yere düşebilir, çırpınıp kontrolsüz hareketler yapabilir, ağzı köpürüp mesane kontrolünü kaybedebilir. Dakikalar içerisinde nöbet sona erer ve kişi bitkin ve sersemlemiş olarak bilincini tekrar kazanır. Epilepsi ya da halk dilinde sara sözcüğünü duyduğunda birçok kişinin gözünde canlanan tablo budur. Oysaki bu “jeneralize tonik-klonik nöbet” epilepsinin yalnızca bir türüdür ve daha bir çok türde ve değişik bulgularla kendini gösteren epilepsiler vardır. Epilepsi, kendiliğinden ortaya çıkan, tekrarlayan nöbetlerle karakterize, yaygın, kronik, heterojen bir grup nörolojik bozukluktur. Yaş, cinsiyet, etnik grup veya sosyal statüye bakmaksızın her kesimden insanları etkilemektedir. Dünya üzerinde 50 milyon kadar epilepsi hastası olduğu varsayılmaktadır ve bunların büyük çoğunluğu

gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadırlar (Brusa, Zimmermann et al. 1995; Factsheets 2009). Epilepsinin bireyin yaşam kalitesini nitel ve nicel olarak olumsuz etkilediği açıktır. Bu etki dolaylı olarak üretim verimliliğine yansımakta, sağaltım giderlerini artırmakta, sonuç olarak toplum üzerinde de ekonomik ve sosyal bir yük oluşturmaktadır. Epilepsi çoğunlukla kontrol altındadır ancak ilaçla tedavisi yoktur. Ağır olgularda cerrahi yaklaşım bir seçenek olarak karşımıza çıkar. Ancak tüm bunlara karşın epilepsi hastalarının % 30'u tüm ilaç yaklaşımlarına rağmen tedaviye dirençlidir. Bu hastaların da önemli bir bölümünü temporal lob epilepsi hastaları oluşturmaktadır.

Odak belli olsa da olmasa da, altta yatan neden, nöronların normal elektriksel aktivitelerinin epizodik, geçici, patlayıcı tarzda eşzamanlı deşarjlarla bozulmasıdır. Burada nöbet ve epilepsi kavramlarının ayırımına dikkat edilmelidir. Her nöbet epileptik nöbet olmayabilir ve nöbet geçirmek kişinin epilepsi hastası olduğunu ya da olacağını göstermez. Uyarılmamış, spontan nöbetler sık görülen bir durumdur ve 80 yaşına kadar toplumun ortalama % 4'ü bu şekilde nöbet geçirir. Bu hastaların sadece % 30 – 40 kadarı ikinci bir spontan nöbet geçirirler (epilepsi). Bir anlamda yalın bir nöbetle kronik bir sendromun arasında kalan boşluğu dolduran süreç epileptojenezdir.

Epilepsiye güncel tedavi yaklaşımı, bulguların baskılanması temeline dayanan anti-epileptik ilaç tedavisidir. Bugün elimizde genetik yatkınlık ve geçirilmiş beyin hasarı gibi epilepsi için bilinen risk faktörlerine sahip olan hastalarda ya da epilepsinin ilerleyici döneminde bile bu süreci yavaşlatacak, olumlu yönde değiştirebilecek bir tedavi bulunmamaktadır (Pitkanen and Kubova 2004). Epileptojenezin önlenmesi tıpta henüz karşılığını bulamamış bir gereksinimdir. Hem Avrupa ülkelerinde hem de Amerika Birleşik Devletlerinde bu acil gereksinim

yüzünden epileptojenezin önlenmesine yönelik yeni tedavi yaklaşımları epilepsi araştırmalarının temel hedeflerinden biri olarak sıralanmıştır (Kelley, Jacobs et al. 2009).

Edinsel epileptik bozukluğun gelişimi, belirli bir serebral ilk hasar sonrasında, uzun bir süreç içerisinde anormal nöronal re-organizasyonu işaret eder (Engel 1989). Burada kastedilen durum, nörodejenerasyon, neonörojenez, aksonal filizlenme, akson hasarı, gliyal hücre aktivasyonu, vasküler hasar ve anjiyojenez, ekstraselüler matriks bileşiminde bozulma ya da iyon kanalları gibi hücrenel yapılarda moleküler değişiklikleri içerebilir (Pitkanen and Lukasiuk 2009). Gliyal faktörlerden söz ederken de astrositler üzerinde özellikle durmak gerekir.

Astrositler ya da formal tanımlama ile astrogliyal hücreler, nöbet odağının çok önemli bir yapıtaşıdır. Eski kalıplaşmış destek hücre tanımlamasının dışına çıkan astrositlerin çok kritik roller üstlendiği artık oldukça iyi bilinmekte ve uzun bir süredir de nöbetlerin oluşmasında etken olduğuna inanılmaktadır (Kang, Kim et al. 2006). Bu hücrelerin kendine özgü biyolojisi anlaşıldıkça dikkatler epilepsi-astrosit ilişkisi üzerine çekilmiştir. Epileptik odakta bulunan astrositlerin öncelikle işlevlerinin bozulduğu, bu nedenle de ortamdaki glutamati gerektiği gibi uzaklaştıramadığı, potasyum homeostazının bozulmasına yol açtığı ve ilerleyen bölümlerde daha ayrıntılı değinileceği diğer görevlerini yeterince yapamadığı için buldukları odakta nöronların uyarılma eşiğinin düşmesine ve bu yüzden de nöbet oluşumunda önemli katkısı olduğuna inanılmaktadır (Binder and Steinhauser 2006).

Sunulan bu çalışmada kimyasal ajanla deneysel olarak uyarılma eşiği düşürölmüş sıçanlarda, temporal lob epilepsisi modellerinde nöbet odağı kabul edilen ve plastik değişikliklerin gözlendiği hipokampusta, dentat girus hilusuna kültür ortamında geliştirdiğimiz sağlıklı astrositler ekilerek bunun uyarılma eşiği üzerindeki

etkileri değerlendirilmiştir. Bu araştırmanın amacı kesinlikle popöler bir yaklaşım olan hücre ve/ veya doku transplantasyonunun bir sağaltım seçeneği olarak gösterilmesi değildir. Buradaki hedefimiz temporal lob epilepsisi patojenezinde tek başına işlevleri bozulmuş astrositlerin sorumlu olup olmadığına; bir bakıma süreçte astrositlere ilişkin temel kuşkuya ampirik bir yaklaşımla yanıt aramaktır. Bu çalışma beraberinde yeni soruları ve yeni yaklaşımları da getirmekte, özelinde temporal lob epilepsisi, genelinde epileptojenezin anlaşılmasında biraz daha katkı sağlamak ve yeni olası stratejiler geliştirilmesi için ipuçları ortaya koymaya çabalamaktadır.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Nöbet

International League Against Epilepsy (ILAE), 1981 yılındaki raporunda epileptik nöbetleri yalnızca klinik ve EEG bulgularına dayanarak sınıflandırmıştır.

I.	PARSİYEL (FOKAL) NÖBETLER
a.	Basit parsiyel nöbetler
i.	<i>Motor bulgularla birlikte</i>
ii.	<i>Duyusal ya da özel duyularla ilgili bulgularla birlikte</i>
iii.	<i>Otonomik belirti ve bulgularla birlikte</i>
iv.	<i>Psikişik bulgularla birlikte</i>
b.	Kompleks parsiyel nöbetler
i.	<i>Basit parsiyel başlangıcı takiben bilinç kaybı</i>
ii.	<i>Doğrudan bilinç kaybı ile başlayan</i>
c.	İkincil olarak jeneralize forma dönen parsiyel nöbetler
i.	<i>Basit parsiyel başlayıp jeneralize olanlar</i>
ii.	<i>Kompleks parsiyel başlayıp jeneralize olanlar</i>
iii.	<i>Basit parsiyel başlayıp önce kompleks sonra jeneralize olanlar</i>
II.	JENERALİZE NÖBETLER (Konvülsiv ya da konvülsiv olmayan)
a.	Absans nöbetleri
i.	<i>Tipik absanslar</i>
ii.	<i>Atipik absanslar</i>
b.	Myoklonik nöbetler
c.	Klonik nöbetler
d.	Tonik nöbetler
e.	Tonik – Klonik nöbetler
f.	Atonik (astatik) nöbetler
III.	SINIFLANDIRILAMAYAN EPİLEPTİK NÖBETLER

Tablo 2.1: Epileptik Nöbetlerin Uluslararası Sınıflandırması (ILAE-1981)

Nöbetler epilepsi hastalarının ana semptomatolojisini oluşturur ve bütün tedavilerin hedefi nöbetlerin kontrol edilebilmesidir. Epileptik durumun belirli bir sınıflandırmaya alınabilmesi için nöbet türünün açık olarak tanımlanabilmesi şarttır.

Epileptik bir nöbet, beyinde anormal, aşırı veya eşzamanlı nöronal aktivitenin geçici bir bulgusudur (Fisher, van Emde Boas et al. 2005). Günümüzde modern video teknikleri, bir nöbetin özelliklerinin araştırılmasında detaylı bir bakış olanağı sağlamaktadır. Eşzamanlı video ve EEG kayıtlarının epileptik nöbetlerin semiyolojisi ile ilgili bilgi birikimine katkıları dramatik olmuştur. Buna rağmen kalitatif görsel analizde, gözlemciler arasındaki ayrım birçok semiyolojik özellik açısından sıkıntı yaratabilmektedir. Bu nedenle nöbet sırasındaki hareketlerin kantitatif analizleri, daha objektif kıstasların geliştirilebilmesini sağlayabilir (Li, Martins da Silva et al. 2002). 2001 yılında ILAE tarafından klinik yaklaşımlarda yardımcı olabilmesi için yeni bir tanı şeması önerilmiştir.

Epileptik nöbetler çeşitli belirti ve bulgularına göre tanımlanabilirler. Konvansiyonel yöntemle nöbet analizi görsel deneyime ve ön plandaki iktal özelliklere dayanmaktadır. Epileptik nöbetlerde iktal belirtiler 4 kategoride değerlendirilebilir:

- Duysal
- Bilişsel
- Motor
- Otonomik

Birçok epileptik nöbette yukarıda belirtilen kategorilere ait bulgular eşzamanlı gözlenebilmekte ise de bir kategori hemen her zaman baskın olarak karşımıza çıkar.

Nöbetler genellikle kısa (5 dakikadan az) sürer ve öncesinde bir prodromal dönem olabilir. Nöbeti çoğunlukla uzun bir postiktal periyod izlemektedir.

Nöbetler çoğunlukla kendiliğinden sonlanır. Nöbetin sonlanamadığı durumda status epileptikus ortaya çıkar ki yaşamı tehdit edebilen acil bir durumudur.

Epilepsi prevalansından farklı olarak nöbetler toplumun %10'unun hayatlarında en az bir kere karşılaştığı bir durumdur (Hauser, Annegers et al. 1996). Tüm yaş grupları ele alındığında kompleks parsiyel nöbetler en sık karşılaşılan türdür. Jeneralize nöbetler çocuklarda büyüklere oranla daha fazla görülürken, parsiyel nöbetler erişkinlerde daha sık görülür. Myoklonik nöbetler yaşamın ilk yılında sık karşılaşılrken ilerleyen zamanda azalmaktadır (Annegers, Rocca et al. 1996).

Nöbetler her zaman kendiliğinden oluşmaz. Kimi zaman tetikleyen bir faktörün varlığı söz konusudur (Tablo 2.2).

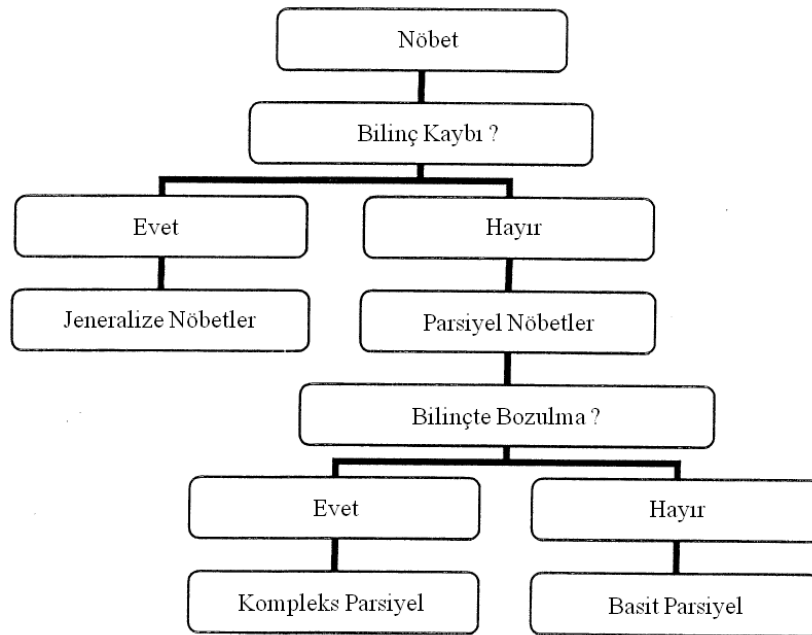
Metabolik Anormallikler	Hipoglisemi ve Hiperglisemi Hiponatremi Hipokalsemi
Alkol Yoksunluğu	
Akut Nörolojik Hasar	Enfeksiyon (Meningit, Ensefalit) İnme (İskemik, Hemorajik) Kafa Travması
Yasadışı İlaç Zehirlenmesi ve Yoksunluğu	
Nöbet Eşiğini Düşüren İlaçlar	Teofilin Trisiklik Antidepresanlar
Çocuklarda Yüksek Ateş	

Tablo 2.2: Nöbeti tetikleyen faktörlerde sık karşılaşılan örnekler

Epileptik nöbetlerin düzeltilmiş ILAE sınıflandırması (Tablo 2.3) ve sınıflandırma algoritması aşağıdaki gibidir (Şekil 2.1).

Parsiyel Nöbetler	Kompleks Parsiyel Nöbetler	
	Basit Parsiyel Nöbetler	Motor Duysal Otonomik Psişik
İkincil Jeneralize Olan Tonik-Klonik Nöbetler		
Jeneralize Nöbetler	Primer Tonik-Klonik Absans Myoklonik Klonik Tonik Atonik Atipik Absans İnfanıl Spazm	

Tablo 2.3: Nöbetlerin Düzeltilmiş ILAE Sınıflandırması



Şekil 2.1: Nöbet Sınıflandırma Algoritması

## ***2.2 Temporal Lob Epilepsisi***

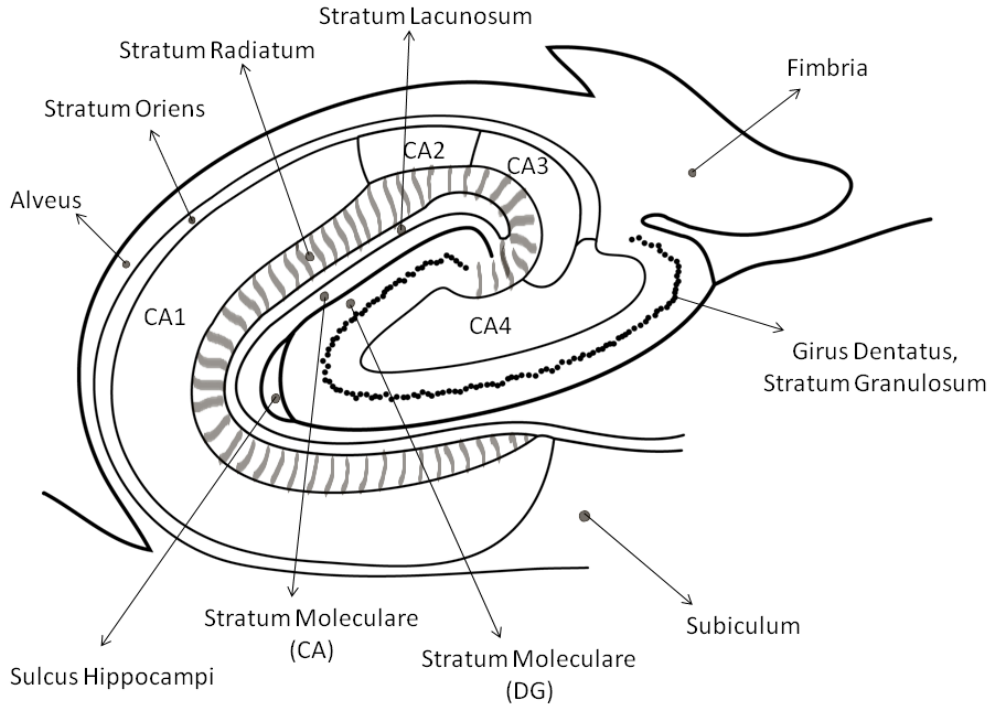
Temporal lob epilepsisi 1985 yılında ILAE tarafından medial ya da lateral temporal lob kaynaklı tekrarlayan ve uyarılmamış nöbetlerle karakterize bir durum olarak tanımlanmıştır. Temporal lob ile ilişkilendirilen nöbetler basit parsiyel nöbetler (bilinç kaybı yok) ve kompleks parsiyel nöbetlerdir (bilinç kaybı ile). Kompleks parsiyel nöbette nöbet her iki temporal loba da yayıldığı için birey uyanıklık durumunu kaybeder ve kısa süreli bellek bozulmasına yol açar. Parsiyel nöbetler ikincil olarak jeneralize forma dönüşebilir. Temporal lob epilepsisi tüm parsiyel epilepsilerin % 60'ını oluşturmaktadır (Fisher, van Emde Boas et al. 2005). Klinik gözlemler, epileptik hastaların yüksek oranda temporal lobda odağa sahip olduğunu ve bunun da sıklıkla mesial temporal lob hipokampal sklerozu gibi bir patolojik bulguyla beraberliğini göstermektedir. Bunun sonucunda da hipokampus, epilepsi araştırmalarında ilgi odağı haline gelmiştir.

## ***2.3 Hipokampus***

Hipokampus oldukça özgün, bilateral yerleşimli, uzun ve içe bükülmüş şekilde bulunan bir korteks yapısıdır. Neokorteksin altında, temporal lobların bazal medial yüzeyinde yerleşmiştir. Amigdaladan septuma kadar temporal lob boyunca uzanır ki bu aynı zamanda hipokampusun septo-temporal eksenini de oluşturmaktadır (Paxinos 1995). Hipokampus ve subikulum bir arada hipokampal formasyon olarak adlandırılırlar. Filogenetik olarak en eski beyin bölgelerinden olan hipokampus başlıca aferent sinyallerini entorinal korteksten alırken, eferent sinyallerini limbik ve ekstra-limbik bölgelere gönderir. Hipokampus, entorinal korteks ile birlikte bellek işlevleri açısından önemli bir merkez olarak kabul edilmektedir (Kandel, Schwartz et al. 2000).

Yunancadan gelen hipokampus terimini ilk olarak bundan 400 yıl önce İtalyan anatomist Arantius, girus dentatus'u kastederek kullanmıştır (Walther 2002). Arantius'un bu terimi kullandığında aklında deniz atı olduğu düşünülmektedir. Hipokampusun eğimli yapısı ipek böceğini de andırmaktadır. 1742'de Garengot Cornu Ammonis (Ammon boynuzu) terimini literatüre katmıştır (Lewis 1923). Bugün bu terimin latince kısaltması hipokampusun alt birimleri için kullanılmaktadır (CA 1-4). Hipokampusla ilgili önemli çalışmalar yapmış olan diğer araştırmacıların başında Ramon y Cajal (1911) gelmektedir. Hipokampusu tüm ayrıntıları ile burada sunmak olanaksızdır. Bunun yerine temel yapı ve işlevleri kısaca özetlenecektir.

Hipokampus bilaminar (çift tabakalı) bir yapıya sahiptir. Bu tabakalar, Cornu Ammonis (hippocampus proper) ve girus dentatus (ya da fascia dentata) olarak adlandırılırlar ve bir tabaka diğerinin içine doğru kıvrılmış şekilde durmaktadır (Duvernoy 2005). Gelişimin erken aşamalarında bu iki tabaka süreklilik göstermekteyken, tam olarak açıklanamayan nedenlerle Cornu Ammonis ventriküler boşluğa doğru kabarıklık göstererek boyutlarını artırır. Kortikal yüzeye yakın hipokampal sulcusun (yarık) oluşumu bu katlanma ile ilgili durmaktadır. Dentat girus konkav bir şekle bürünür ve olasılıkla iki yapının asimetric gelişimine bağlı olarak Cornu Ammonis'in medial ucu altına doğru ilerler. Sonuç olarak Cornu Ammonis ve girus dentatus "U" şeklinde, birbiri içerisine doğru kenetlenmiş ve birbirleri ile sulcus hippocampus ile ayrılan iki ayrı tabaka olarak karşımızda durmaktadır (Duvernoy 2005). Cornu Ammonis kabaca altı tabakaya ayrılabilir. Bunlar ventriküler boşluktan sulcus hipokampusu doğru sırası ile alveus, stratum oriens, stratum pyramidale, stratum radiatum, stratum lacunosum ve stratum moleculare'dir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Hipokampus Tabakaları

Alveus intraventricüler yüzeyi oluşturur ve hipokampus ile subikulum nöronlarının aksonlarını taşır. Zaten bu yüzden de bu yapıların temel eferent yolağını teşkil eder. Stratum oriensin sınırları çok belirgin değildir. Bu tabaka piramidal tabaka ile karışmaktadır. Stratum oriens saçılmış şekilde basket hücreleri içerir ve alveusa ulaşan piramidal nöron aksonları bu tabakadan geçer. Stratum pyramidale Cornu Ammonis'in ana yapıtaşı olan piramidal hücreleri barındırır. Piramidal hücre soması üçgen bir yapıda olup taban kısmı alveusa, tepe kısmı sulkusa dönük yerleşimlidir. Tabanından çıkan aksonu asıl olarak septal nükleusa uzanırken bazı asosiyasyon lifleri diğer piramidal nöronlara ve belki de kontralateral hipokampusa ulaşır. Bu yolda piramidal nöronların aksonları Schaffer kollaterallerini verirler. CA3 piramidal hücre aksonlarından ayrılan bu kollateraller bükülerek stratum radiatuma girerler ve CA1 piramidal nöronları ile sinaps yaparlar. Bu kollateraller bellek ve

duygu ile ilgili süreçlerde Papez devresi ve bugün artık tartışılan hipokampal trisinaptik halkanın önemli bir parçasıdır (Paxinos 1995).

### **2.3.1 Dentat Girus**

Dentat girusun başlıca tabakası granül hücre tabakası ya da stratum granulosum'dur. Bu tabaka granül hücrelerin somalarını barındırır. Granül hücre soması ortalama 7 µm'dir. Stratum moleculare granül hücrelerin proksimal dendritlerini içerir. Granül hücrelerin aksonları olan yosunsu lifler (mossy fiber) ise CA3 bölgesinin piramidal hücrelerine ulaşır (Claiborne, Amaral et al. 1986). Yosunsu liflerin proksimal kısımları dentat girusun polimorfik tabakasından geçer. Sıçanda dentat girusta bulunan granül hücrelerin sayısı 1 milyon olarak kestirilmektedir (Boss, Peterson et al. 1985; Amaral, Ishizuka et al. 1990).

### **2.3.2 Cornu Ammonis**

Cornu Ammonisin (CA) başlıca tabakası piramidal hücre tabakası ya da stratum pyramidale'dir. Golgi yöntemi kullanılarak yapılan sınıflandırmada CA bölgesi dört alt bölgeye ayrılmaktadır: CA1, CA2, CA3 ve CA4 (Lorente De Nó 1934; Amaral 1978). Her ne kadar CA4 bölgesi olarak adlandırılan kısım Cornu Ammonis'in bir alt bölgesi olarak kabul edilse de, hilusta yer alması nedeniyle dentat girus'un bir parçası olarak ta görülmektedir. Ayrıca bu bölgedeki nöronlar piramidal nöronlardan farklıdır. CA1 bölgesi subiculum ile bitişiktir. CA2 bölgesi CA3 ve CA1 arasında bir geçiş bölgesidir. CA3 bölgesi fimbria, forniks ve koroid pleksus ile komşuluğa sahiptir. Nissl boyaması gibi standart histoloji boyaları, hipokampal alt bölgeleri arasında hücre yapılarına göre sınırları gösterebilmektedir. Burada CA2-CA3 sınırı istisna oluşturmaktadır.

Piramidal hücrelerin somaları üçgen şeklinde olup CA2 ve CA3 bölgelerinde CA1 bölgesine oranla daha büyüktür. CA2-3 bölgesinde taban genişliği 40 – 60 µm iken CA1 bölgesinde 20 – 40 µm olarak izlenmektedir. Stratum oriens piramidal hücrelerin bazal dendritlerini içerirken stratum moleculare apikal dendritleri barındırmaktadır. CA3 piramidal nöronların dendritleri CA1 nöronlarına göre daha kısa ve kalındır. Yosunsu lifler CA3 bölgesi piramidal hücreleri ile stratum lucidum'da sinaptik bağlantı kurarlar. Kantitatif çalışmalar sıçanlarda CA3 bölgesindeki piramidal nöronların sayısının 330000 olduğunu, CA1 bölgesinde ise 420000 piramidal hücre olduğunu kestirmektedir (Boss, Peterson et al. 1985; Amaral, Ishizuka et al. 1990).

### **2.3.3 Hipokampal Sinyal Yolakları**

Hipokampus anatomisinin temel karakteristik özelliklerinden birisi de gelen aferent liflerin hipokampus tabakaları ile yaptıkları tri-sinaptik devreyi teşkil eden bağlantılardır. Hipokampus çeşitli beyin bölgelerinden, en belirgin olarak da entorinal korteksten aferentlerini alır. Entorinal korteks dışında hipotalamus, septal nükleus, amigdala ve Broca'nın septal diagonal bandı da aferent sinyallerin kaynağını oluşturmaktadır.

#### **2.3.3.1 Tri-Sinaptik Devre**

Hipokampusun oldukça özgün bir bağlantı örüntüsü bulunmaktadır. Temel iletim yolağı tri-sinaptik devre olarak adlandırılır. Tri-sinaptik devrenin ilk halkasını hipokampusun başlıca aferent bağlantısı olan perforant yolak oluşturur. Perforant yolak, entorinal korteksin ikinci tabakasındaki piramidal hücrelerin aksonlarının (perforant lifler) stratum moleculare'yi geçerek dentat girus granül hücrelerine sinaptik bağlantı kurmasıyla oluşur (Andersen, Bliss et al. 1969; Andersen, Soleng et

al. 2000). Bu aksonların perforant lifler adını almasının nedeni yolak üzerinde hipokampal fissürün içinden geçmesidir.

Devrenin ikinci halkasını granül hücrelerin aksonları yani yosunsu lifler (mossy fiber) meydana getirir. Yosunsu lifler CA3 bölgesindeki piramidal nöronlar ile sinaptik bağlantılar kurar.

Devrenin üçüncü halkası ise CA3 bölgesindeki piramidal nöronların CA1 bölgesindeki piramidal nöronlara gönderdiği kollateral uzantılardır ve stratum radiatum'da ilerleyen bu kollateraller özel olarak Schaffer kollateralleri adını alır.

Hipokampusun başlıca tabakalarında izlenen bu tri-sinaptik iletim, entorinal korteksten gelen uyarıların hipokampusta temelde tek yönlü aktığını işaret etmektedir. Ardışık iletinin gözlemlendiği tri-sinaptik ağın yanında, bir bölgeyi diğer bölge ya da bölgelere bağlayan farklı bağlantılar da mevcuttur. Entorinal korteksin üçüncü tabakası, perforant lifler ve temporo-ammonik uzantılar CA1 ve CA3 bölgelerinin piramidal nöronları inerve eder. CA3 piramidal nöronları yalnızca CA1 bölgesini değil subikulum ve entorinal korteksi de uyarır. CA1 bölgesinden de aynı bölgelere bağlantılar vardır. Ayrıca CA3 bölgesinden çıkan akson kollateralleri CA3'te diğer nöronlara da dallar verebilmektedir. Burada dikkat çekilmesi gereken konu, dentat girus granül hücrelerinin yalnızca CA3 piramidal nöronlarını inerve etmesidir (Wyss, Swanson et al. 1979). Cornu Ammonis piramidal hücrelerinin aksonları alveus boyunca fimbria-forniks'e ulaşmakta ve bu da hipokampus'un başlıca çıkış bölgesi olmaktadır.

### **2.3.3.2 Hipokampus'un Aferent Bağlantıları**

Entorinal korteksin ikinci ve üçüncü tabakalarının yanında hipokampus diğer bölgelerden de aferent sinyaller almaktadır:

Hipotalamus: Dentat girus ve CA2 bölgesine ulaşır (Segal 1979).

Medial septal nükleus ve diagonal band (Broca): Başlıca dentat girus ve CA3 olmak üzere tüm hipokampal bölgelere bağlantı kurarlar (Amaral and Kurz 1985; Frotscher and Leranth 1985). Bu bağlantılar kolinerjik ve GABAerjik olup GABAerjik ara nöronlarla sinaps yaparlar. Bu da septo-hipokampal bağlantıda GABA inhibisyonunu kuvvetlendirmektedir (Krnjevic, Reiffenstein et al. 1981).

Karşı hipokampus: Komissural lifler olarak ifade edilen bir grup GABAerjik lif karşı hipokampustan korpus kallosum aracılığı ile diğer hemisfere ve fimbria-forniks aracılığı ile de hipokampusa ulaşır. Bu lifler stratum moleculare'yi geçerek dentat girusa ulaşır (Frotscher and Zimmer 1983; Leranth and Frotscher 1983).

Bunun dışında hipokampusa serotonerjik, noradrenerjik ve olasılıkla dopaminerjik aferent sinyaller de mevcuttur.

### **2.3.3.3 Ara Nöronlar**

Dentat girusta ara nöronlar, yosunsu hücreler, basket hücrelerin aksonları granül hücreleri ile simetrik sinaptik bağlantılar kurarlar (Amaral 1978; Seress and Frotscher 1991). Simetrik bağlantılar da bilindiği gibi inhibitör sinapslar için histolojik kriterlerden birisidir. Entorinal korteksten gelen perforant yolak lifleri dentat girus granül hücreleri yanında moleküler tabakanın ara nöronları ile de sinaptik bağlantılar kurmaktadır. Bu ara nöronlar da aksonlarını subgranüler bölgeye göndermektedir (Kneisler and Dingledine 1995; Freund and Buzsaki 1996).

Cornu Ammonis bölgesinde piramidal hücreler basket hücreleri tarafından inerve edilir ve bu bağlantılar da simetrik sinapslardır (Mott, Turner et al. 1997)

### **2.3.4 Granül Hücreleri ve Yosunsu Lifler**

Granül hücreleri stratum granulosum tabakasında bulunan ve aksonlarının, yani yosunsu liflerin, CA3 piramidal nöronlarını inerve ettiği, dentat girusun temel hücreleridir. Yosunsu lifler CA3 bölgesine ulaşırken dentat girus hilus bölgesinden geçerler. Myelinsiz aksonlardır ve ortalama 0.5 µm çapa sahiptirler. Başlıca afferent bağlantısı entorinal korteksin ikinci tabakasıdır (Amaral and Witter 1989).

Granül hücreleri eksitator hücreler olarak kabul edilmektedir ve glutamat yosunsu liflerden salınan nörotransmitterdir (Crawford and Connor 1973). Glutamat yalnızca yosunsu liflerden değil, ayrıca CA bölgesi piramidal hücrelerinden de salınan nörotransmitterdir. Buradan hipokampustaki başlıca iletim yolağında eksitator uyarının egemenliği anlaşılmaktadır.

Granül hücreleri, glutamat dışında endojen opioidleri ve nörotrofik faktörleri de sentezleyip salgılayabilirler (McGinty, Henriksen et al. 1983). Yosunsu liflerin akson sonlanmalarında yüksek oranda çinko bulunması önemli bir özelliktir (Timm 1958). TIMM histokimya boyaması ile bu çinko gösterilebilir. Çinkonun gösterilebilen kısmı histo-aktif çinkodur ve yoğun olarak sinaptik veziküllerde depolanır. Bu nedenle bu çinkonun sinirsel aktivite sırasında rol oynadığı düşünülmektedir.

### **2.3.5 Eksitator ve İnhibitör Nörotransmitterler**

#### **2.3.5.1 Glutamat**

Glutamat merkezi sinir sisteminin başlıca eksitator nörotransmitteridir ve beyin yüksek oranda glutamat içerir. Bu durum glutamatın metabolik önemini, özellikle de glutamin siklusundaki rolünü gözler önüne sermektedir. Glutamin, gliyal hücrelere özgün glutamin sentetaz enzimi ile glutamattan sentezlenir. Daha sonra

nöronlara diffüze olur ve nöronlarda glutaminaz enzimi ile glutamat sentezi gerçekleşir. Sinaptik aktivite sırasında açığa çıkan glutamat gliyal hücrelere taşınır ve burada tekrar glutamine metabolize edilir (Hertz 2004). Öte yandan glutamat, aspartatın, aspartat amino-transferaz enzimi ile transaminasyonu aracılığı ile nöronlarda da sentezlenebilmektedir.

Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik olarak iki grupta incelenir (Kew and Kemp 2005). İyonotropik glutamat reseptörleri multimerik reseptörlerdir. Sodyum ve kalsiyum kanalları ile eşleşmişlerdir. Bu reseptörler agonistlerinin işlevine göre sınıflandırılırlar. N-methyl-D-aspartate reseptörünün agonisti NMDA,  $\alpha$ -amino-3-methyl-4-isoxazolepropionate reseptörünün agonistleri AMPA ve quisqualate ve kainat reseptörünün agonisti kainik asittir (Monaghan, Bridges et al. 1989; Watkins, Krogsgaard-Larsen et al. 1990). NMDA reseptörü magnezyum tarafından voltaj bağımlı olarak bloklanmaktadır. İyonotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu, sodyum ve kalsiyum iyon kanallarının açılmasını tetikler. Hücre içine doğru gerçekleşen katyon akışı da postsinaptik membranın depolarizasyonuna, dolayısıyla sinirsel aktivitenin aktarımına neden olur (Fagg and Foster 1983). Metabotropik glutamat reseptörleri G protein eşleşmeli reseptörlerdir. Quisqualate ile aktive olmaktadır ve inositol trifosfat (IP3) oluşumunu tetikler. Pertussis toksinine (boğmaca) duyarlıdır.

Glutamat nöronal ve gliyal hücreler tarafından, yüksek afiniteye sahip taşıyıcılar aracılığı ile hücre içerisine alınır. Bu taşıyıcılar membranda yerleşimlidir; sodyum ve potasyum girişiyle eşleşmiştir (Balcar and Johnston 1972; Attwell, Barbour et al. 1993). Sinaptik veziküllere ise sodyum gradiyentinden bağımsız, ATPaz bağımlı proton pompası aracılığı ile düşük afiniteye sahip veziküler

taşıyıcılar tarafından taşınmaktadır (Burger, Mehl et al. 1989; Fremeau, Voglmaier et al. 2004).

### **2.3.5.2 GABA**

GABA sitoplazmada glutamat dekarboksilaz (GAD) aracılığı ile glutamattan; glutaminaz aracılığı ile de glutaminden sentezlenir (Roberts and Frankel 1950). Glutamat dekarboksilazın GAD65 ve GAD67 olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Ekspresyonları farklı genlerden olmaktadır (Erlander, Tillakaratne et al. 1991; Erlander and Tobin 1991). Bunun yanında farklı molekül ağırlıklarına ve farklı hücresel dağılımlara da sahiptirler. GAD65 akson sonlarında, sinaptik alana yakın bulunurken GAD67 başlıca somada ve dendritlerde gözlenir (Kaufman, Houser et al. 1991). GAD kofaktör olarak piridoksal fosfat kullanır ve bu etkileşim GAD'ın kısa dönem aktivasyonunun düzenlenmesinde temel faktördür. GAD65 ve GAD67'nin ekspresyonları birbirlerinden bağımsızdır. GAD65 nörotransmitter havuzunun sentezinde, GAD67 ise metabolik GABA havuzunun sentezinde görev alır (Waagepetersen, Sonnewald et al. 2001).

GABA için iyonotropik (GABA-A) ve metabotropik (GABA-B) reseptörler tanımlanmıştır. (Bowery, Hudson et al. 1987; Matsumoto 1989). GABA-A, isoguvacine ve muscimol ile aktifleşirken kompetitif olarak bicuculline ve pikrotoksin tarafından bloklanmaktadır (Mohler 2006). GABA-A aktivasyonu klor kanalının açılmasına ve hücre içrisine klor girişine yol açar. Bu da postsinaptik membranın hiperpolarizasyonuna ve sinir iletiminin inhibisyonuna yol açar (Sivilotti and Nistri 1991). GABA-B ise G protein eşleşmeli bir reseptördür ve baklofen aracılığı ile aktive olur (Kornau 2006).

Hem GABA, hem de glisin sinir ve gliya hücrelerine sodyum ve potasyum girişine bağımlı taşıyıcılar (GAT) aracılığı ile alınır (Bernath and Zigmond 1988).

## ***2.4 Deneysel Konvülsiyon Modelleri***

İnsanda epileptik durumlar için yapılacak araştırmalarda her ne kadar ideal olanı insan denekler üzerinde çalışmak olsa da bu yaklaşım her zaman pratik olmamaktadır. Çok önemli sorulara yanıt ararken kimi zaman gerekli olan girişimsel yaklaşımlar bilinen etik kısıtlamalarla karşı karşıyadır. İstatistiksel analizler genellikle klinik olanakların çok üzerinde geniş olgu örnekleri ile çalışmayı gerektirmektedir. Bunların ötesinde hastalarda yürütülecek araştırma projelerinin maliyeti daha en başında projeyi etkisiz kılabilmektedir. Sonuç olarak gelişmiş beyin görüntüleme yöntemleri gibi girişimsel olmayan teknikler ve cerrahi örneklerin incelenmesi ile sağlanan bilgilerin yanında sürece doğrudan etkili olabildiğimiz, aşamaları denetleyebildiğimiz ve izleyebildiğimiz girişimsel hayvan modelleri, en azından görülebilir gelecek içerisinde geçerliliğini koruyacaktır.

Hayvan epilepsi modelleri karşılaştırmalı olarak normal ve anormal beyin işlevlerinde, nöronal mekanizmaları araştırmak için kullanılır. Bunun yanında yeni anti-epileptik ilaçların etkinliğinin test edilmesinde ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde de hayvan deneyleri araştırmacıların elinde önemli bir araçtır. Yakın gelecekte önleyici (anti-epileptojenik) yaklaşımlar da bu Şekilde test edilebilir. Epilepsi hayvan modelleri yalnızca epileptik durumlar için değil normal beyinde de fizyolojik nöral mekanizmaların anlaşılmasında oldukça değerlidir. Örneğin epileptojenik ajanlarla yapılan uygulamalar sonrası gözlenen değişimlerde, beyinde anatomik ve fizyolojik olarak ilişkili bölgelerin ve yolakların haritalanmasında

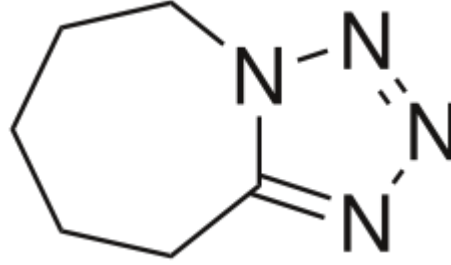
epilepsi hayvan modelleri kullanılabilir. Epilepside hayvan çalışmalarının sağladığı önemli katkılar arasında epileptiform aktivite ve normal osilasyonlar arasındaki ayrımın gösterilmesi, eksitator mekanizmaya karşı inhibitör kontrolün anlaşılması ve epileptojenez çalışmalarında önemli bir etken olan plastisitenin araştırılması sayılabilir.

Epilepsi ve nöbet ilişkili modellerle çalışmak, mekanizmaya dair temel sorulara karşı farklı görüşler doğurmaktadır. Burada modellerin farklılığı da söz konusudur. Kullanılan tekniğe göre oluşturulan modellerin ayrımını yapmak istersek bunlar: Akut nöbet modelleri, kronik epilepsi modelleri ve multifaktöriyel modellerdir.

Akut nöbet modelleri, normal hayvanlarda çeşitli ajanlarda nöbet oluşturulması ile gerçekleşir ve bir nöbetin doğuşu ile sonlanması sürecindeki potansiyel hücrel ve moleküler değişiklikleri gözlemlememizi sağlar ki bugün bu konular epilepsi araştırmalarında da odak durumundadır (Engel and Pedley 2008). Önceleri elektroşok ve kimyasal ajanların yanında insülin ve travma gibi diğer yöntemler denenerek hayvanlarda akut jeneralize nöbet oluşturulmuştur. Bu yöntemlerin bir kısmı bugün geçerliliğini korumaktadır. Sınırlanmış akut nöbetler ise fokal elektriksel uyarı yanında striknin ve penisilin gibi kovülzan ajanların lokal uygulamaları ile sağlanmıştır. Bu teknikler normal beyinde iktal aktivitenin ve nöbet sonlanmasının incelenmesine izin vermekte ve birçok hipotezin de türetilmesini sağlamaktadır. Bunlar arasında nöronların intrinsek özelliklerinin bozulması, sinapslarda inhibisyon kaybı ya da eksitasyonda artış yanında ekstraselüler ortam bileşimindeki değişimler sayılabilir. Çalışmamızda konvülsan ajan olarak pentilentetrazol (PTZ) uygulaması yapılmıştır.

### 2.4.1 Pentilentetrazol

Pentilentetrazol (Cardiazol, Metrazole, Pentazol, PTZ), kardiyovasküler ve solunum sistemlerini uyarıcı etkileri nedeni ile kullanılmış bir ilaçtır. Yüksek dozlarda konvülsiyonlara yol açtığı anlaşıldıktan sonra klinikte konvülsiv ajan olarak psikiyatrik hastalarda kullanılmış ancak yan etkisi olarak istemsiz nöbetlere yol açtığı için etkinliği tartışılmış, daha sonraları yerini elektrokonvülsiv terapiye bırakmıştır (Fink 1984). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 1982 yılında kullanımı yasaklanmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Pentilentetrazol

Pentilentetrazolün epileptojenik özellikleri açık değildir. Transmittere bağlı klor kondüktansını düşürdüğü öne sürülmüştür (Pellmar and Wilson 1977). Burada sözü edilen blokasyonun GABA ile aktive olan kanallar olduğu gösterilmiş (Macdonald and Barker 1978) ve başlangıçtaki radyoligand bağlama çalışmalarından sonra PTZ'nin bağlandığı yerin GABA<sub>A</sub> reseptöründe benzodiazepin bağlanma bölgesi olduğu açıklanmıştır (Rehavi, Skolnick et al. 1982). Bu çalışmaları takip eden bağlama çalışmalarından sonra pentilentetrazolün etki bölgesinin olasılıkla GABA<sub>A</sub> reseptörünün pikrotoksin bölgesi olduğu görülmektedir (Squires, Saederup et al. 1984). Bugün kabul edilen görüş ise pentilentetrazolün ve pikrotoksinin GABA<sub>A</sub> reseptöründe üst üste gelen ancak farklı olan bölgelere bağlandığıdır (Huang, Bell-Horner et al. 2001).

Pikrotoksin (PTX) ve diğerk ilişkili maddelerin reseptörü ne şekilde blokladığı da henüz açıklık kazanmamıştır. Eğer kullanıma bağılı özellikleri dikkate alınırsa bunun kanal lümenini doğrudan bloklamak şeklinde olduğu düşünülebilir (Akaike, Hattori et al. 1985). Buna rağmen tek kanal çalışmaları PTX'in kanaldaki akım süresini değıştirmedini ortaya koymuştur (Newland and Cull-Candy 1992).

## **2.5 Astrosit**

Önceleri merkezi sinir sisteminde boşlukları doldurduğu, destek sağladığı, adeta bir tutkal görevi gördüğü iddia edilen astrositlerin, bilgi birikimimiz arttıkça nöral işlevlerin vazgeçilemez aktörleri olduğu açığa çıkmıştır. Bugün bilişsel görevlerden nöropatolojik durumlara kadar astrositlerin temel fizyolojik mekanizmalardaki etkinliği ve rolü giderek artan bir ilgiyle mercek altındadır.

### **2.5.1 Yapı ve Fizyoloji**

Astrositler genellikle yıldız şeklinde, merkezi sinir sisteminin hemen her yerini kaplayan, sinaptik aktivite, enerji metabolizması, kan-beyin bariyerinin sağlamlığı, ekstraselüler ortamın su ve iyon dengesi, sinir sisteminde hasar onarımı gibi birçok işlevi bulunan gliyal hücrelerdir. Genellikle histolojik olarak tanımlanırlar. Değışen oranlarda gliyal fibriler asidik protein (GFAP) sentezlerler. Bu protein özellikle immünohistokimya çalışmalarında hedef faktör olarak kullanılmaktadır.

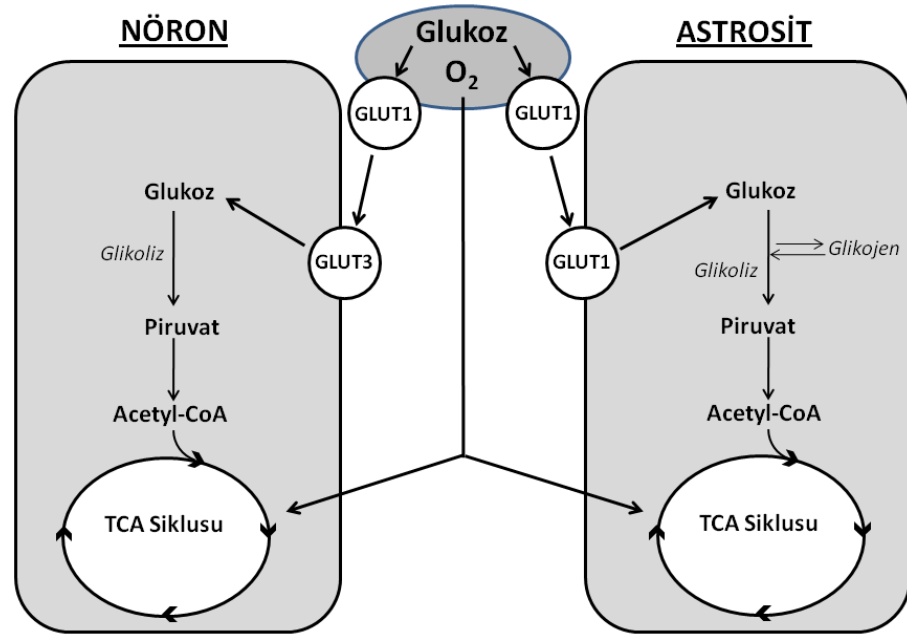
Astrositlerin temelde iki formu vardır: Protoplazmik ve fibröz astrositler. Fibröz astrositler ağırlıkla beyaz maddede bulunur ve kan damarlarının çevresinde yoğunlaşır. Protoplazmik astrositlerse özellikle gri maddede, sinaps çevresinde görülür ve çok miktardaki uzantıları ile sinaptik bağlantıların etrafını sarar.

Astrositler birçok başlıkta görev yapmaktadır. Bunlar: Sinir sisteminin yapısal bir parçası olması, nöronlara ve diğer sinir sistemi hücrelerine metabolik destek sağlaması, kan-beyin bariyerinin idamesi, ekstraselüler ortamdan nörotransmitterlerin uzaklaştırılması, ekstraselüler ortamın iyon dengesi, hasar onarımı, gliotransmitter salgılanması ve sinaptik aktivitenin modülasyonu sayılabilir. Bu fizyolojik işlevlerden bazılarına aşağıda değinilmiştir.

#### **2.5.1.1 Astrosit – Nöron Enerji Döngüsü**

Beyin enerji metabolizması ile ilgili önceleri yapılan çalışmalarda, klasik yöntemler kullanıldığında serebral solunum bölümü (respiratory quotient) ortalama 1.0 olarak bulunmuş, buna karşın oksijen tüketiminin glukoz kullanımına oranının da ortalama 5.5 olduğu öngörülmüştür (Sokoloff 1992). Bu değerler karbonhidratların tam oksidasyonunda beklenen değerlere yakın olduğu için glukozun beyinde ana enerji kaynağı olduğu ve enerji üretiminde ana sürecin de oksidatif fosforilasyon olduğu görüşü kuvvet kazanmıştır. Bu görüş diğer enerji kaynaklarının ve yollarının rolünü önemli ölçüde dışlamaktadır. Oysa istisna durumlar zaman içerisinde bulunmuş, örneğin gelişim aşamasında laktatların ve keton cisimlerinin beyin tarafından kullanıldığı gösterilmiştir (Nehlig and Pereira de Vasconcelos 1993). Bunlar ayrıca, uzamış açlıkta, diyabette ve hipoglisemi durumlarında da beyin enerji gereksinimlerini önemli ölçüde karşılamaktadırlar. Egzersiz sırasında kandaki laktat seviyesinin yükselmesi beyinde glukoz tüketiminde azalmaya yol açmıştır (Smith, Pernet et al. 2003). Bu maddelerin dışında oktanoat ta beyin oksidatif enerji üretiminde kullanılabilir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada bu kullanımın oranının % 20'ye ulaştığı ifade edilmiştir (Ebert, Haller et al. 2003). Tüm bu bulgular glukozun önemini azaltmasa da nöronların kullandığı enerji kaynaklarının çeşitliliğini açıkça göstermektedir.

Klasik görüşe göre glukoz ve oksijen beyine kan yoluyla ulaştıktan sonra glukoz kan-beyin bariyerini aşar ve özgün reseptörleri aracılığı ile hem nöronlara hem de glial hücrelere alınır. Hücre içine giren glukoz glikoliz ve krebs döngüsü sonucunda tam okside olarak hücrenin enerji gereksinimi karşılar. Normal fizyolojik etkinlik sırasında olasılıkla bu enerjinin % 90 – 95'i nöronlar tarafından kullanılırken kalan kısmı glia hücrelerince tüketilir (Attwell and Laughlin 2001).



Şekil 2.4: Nöron-Astrosit Enerji Döngüsü (Klasik Görüş)

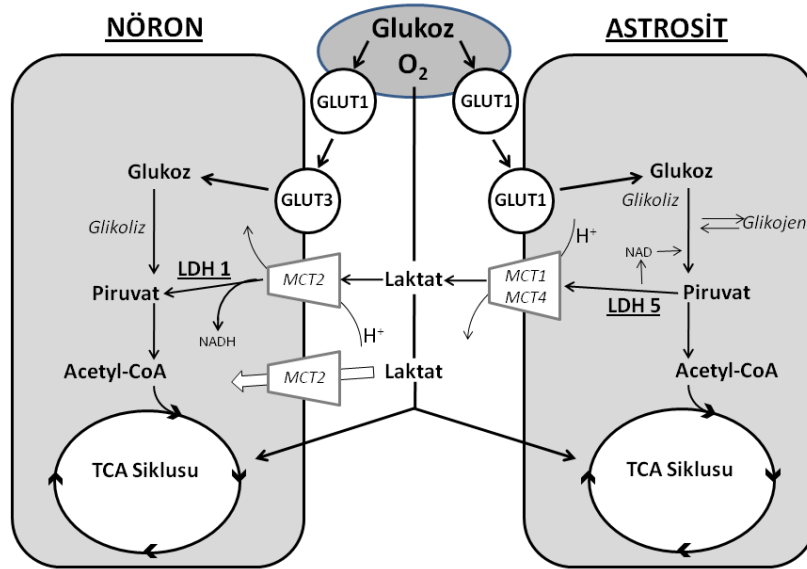
Yakın zamanda 2-deoksiglukoz (2-DG) ile yapılan dağılım çalışmaları ise bu yaklaşımı reddetmektedir. Sonuçlar dinlenme sırasında 2-DG'nin nöronlar ve astrositlerde hemen hemen eşit miktarda tutulduğunu göstermektedir (Wittendorp-Rechenmann, Lam et al. 2002). Ayrıca izole vagus sinirinde yapılan deneylerde Schwann hücreleri ve aksonlar arasında 2-DG, laktat ve glukoz dağılımına bakıldığında glukozun % 80'inin glial hücreler tarafından kullanıldığı, bunun da nöronların yüksek enerji gereksinimleri için glial hücre tarafından glukozun metabolik ara ürünlerinin sunulması gerektiğini işaret etmektedir (Vega, Martiel et al. 2003).

Özelde astrositler olmak üzere glial hücreler, normal oksijen düzeylerinde belirgin miktarda laktat üretme kapasitesine sahiptirler. Burada gerçekleşen aerobik glikoliz  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase aktivasyonunu takiben glutamate alımı ile artmaktadır. Sonuçta daha fazla miktarda glukoz tüketilir ve laktat üretilir (Pellerin and Magistretti 1994). Buradan astrositlerin glutamaterjik sinapslarda aktiviteyi algıladığı ve glukozu laktata metabolize ederek nöronlara sunduğu anlaşılır. Bu süreç önemli oranda astrositlerdeki glutamat taşıyıcılarına bağımlıdır. Glial hücrelerde bulunan glutamat taşıyıcıları (GLAST ve GLT1) eğer baskılanırsa glukoz tüketimi belirli oranda düşmekte, bu da daha az laktat üretimi ile sonuçlanmaktadır (Voutsinos-Porche, Bonvento et al. 2003). Bu bilgilere paralel olarak astrositlerde glutamat alımı, astrositlere büyük bir hızla glukoz taşınmasına neden olmaktadır. Bu durum tüm hücreler arasında gözlenen en hızlı glukoz taşınmasıdır (Loaiza, Porras et al. 2003). Görülen o ki, nöronlardaki kısa süreli uyarılma bile, astrositlerin glukozu hızlıca almasına ve ara metabolik ürünlere çevirmesine neden olmaktadır.

Glutamat taşıyıcıları, her glutamata karşı 3  $\text{Na}^+$  ve 1  $\text{H}^+$  iyonunun eş-taşınmasını ve bir  $\text{K}^+$  iyonunun karşı-taşınmasını gerçekleştirmektedir. Buradan astrositlerdeki hücre içi sodyum konsantrasyonunun astrositlerin metabolik yanıtında önemli bir etken olduğu düşünülebilir. Gerçekten de artmış glutamat taşınması, hücre içi sodyum konsantrasyonunu yükseltmektedir ve bu da artmış aerobik glikoliz için zorunlu gözükmektedir (Voutsinos-Porche, Knott et al. 2003).

Astrositler artmış sinaptik aktiviteyi algılamakta ve karşılık olarak nöronlarda artmış enerji gereksinimi için ekstraselüler ortama laktat sağlamaktadır. Laktat, piruvat ve keton cisimleri ile beraber monokarboksilik asitler grubundadır. Bu moleküller hidrofilik oldukları için membrandan geçerken taşıyıcıya gereksinim duyarlar. Monokarboksilat taşıyıcıları (MCT) SLC16 gen ailesini içerir ve 14 üyesi

vardır (Halestrap and Meredith 2004). Bunlardan yalnızca MCT1-4'ün monokarboksilik asitlerin taşınması ile ilişkili olduğu kesinleşmiştir. MCT1 mRNA'sı tüm hücre tiplerinde gözlenirken nöronlarda çok sınırlı olduğu gözlenmektedir. Gelişim sürecinde ekspresyonu astrositlerde artarken nöronlarda azalmaktadır (Vannucci and Simpson 2003). MCT2 ekspresyonu ise beyinde neredeyse hemen tamamen nöronlarda gözlenmekte ve dendritlerde, özellikle de sinaptik alana yakın olarak yerleşim göstermektedir (Bergersen, Magistretti et al. 2005). İşin aslı postsinaptik dendritler beyinde enerjinin en fazla tüketildiği bölgedir (Attwell and Laughlin 2001). Bu durum MCT2 lokalizasyonunu açıklamaktadır. Ayrıca MCT2'nin özellikle yoğunlaştığı sinaptik bölge de glutamaterjik sinapslardır. MCT4 taşıyıcısı laktat dışı taşınmasından sorumludur ve beyinde özellikle astrositlerde lokalize olmuştur (Bergersen, Rafiki et al. 2002). Pellerin ve Magistretti beyin enerji döngüsü için nöron-astrocit laktat mekiği modelini ileri sürmüşlerdir.



Şekil 2.5: Nöron-Astrosit Laktat Mekiği

### 2.5.1.2 Astrosit Kalsiyum Dalgaları

Çeşitli çalışmalarla varlığı gösterilmiş olan kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) sinyalleri ve kalsiyum dalgaları, astrositlere özel türde bir uyarılabilirlik sağlamaktadır.  $Ca^{+2}$  dalgalarının astrositler arasında yayılmasının hücresel ve moleküler mekanizmaları incelendiğinde de iki yolak bu süreçte tanımlanmıştır. Bunlardan ilki bitişik iki hücrenin sitozollerinin gap junction kanalları aracılığı ile doğrudan temasıdır. Diğer yol ise “gliotransmitter” salgılanmasına ve bu transmitterlerin komşu hücrelerin membran reseptörlerine bağlanmasına bağlıdır. Burada sözünü etmemiz gereken konu bu  $Ca^{+2}$  dalgalarının işlevsel ne gibi sonuçları olduğudur. Bu iki süreç, tamamen bağımsız olmayıp, birlikte işleyerek hücre gruplarının aktivitesini koordine etmektedir.

Astrositlerin çeşitli iyon kanallarını ve membran reseptörlerinin ekspresyonunu gerçekleştirebiliyor olduğunun anlaşılması ve nöronların aktivitesine çok hızlı bir şekilde ya membran potansiyelini değiştirerek ya da hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyini artırarak yanıt vermesi, bu hücrelerin aslında bilişsel süreçte görev aldığına dair hipotezin oluşmasına yol açmıştır. Astrositler dış uyaranlarla hücre içi kalsiyum düzeylerini yükseltmenin ötesinde bu sinyalleri komşu uyarılmamış astrositlere de iletirler. Böyle bir özelliğin var olması merkezi sinir sistemine uzun mesafe hızlı sinyal iletiminde astrositlerin ektranöronal bir yolak oluşturduğu fikrini doğurmuştur (Cornell-Bell, Finkbeiner et al. 1990). Bu fikir daha da ileri giderek, böyle bir interselüler iletişim ağını oluşturan astrositlerde  $Ca^{+2}$  sinyallerinin nöronal aktiviteyi etkileyen fizyolojik bir önemi olduğunu, yani çift-yönlülüğü işaret etmiştir. Hipokampusta nöronal etkinlik astrositik ağda  $Ca^{+2}$  dalgalarını tetiklemekte ve bu  $Ca^{+2}$  dalgaları nöronal aktiviteyi düzenlemektedir (Dani, Chernjavsky et al. 1992). Astrositlerdeki  $Ca^{+2}$  dalgalarının nöronal sinaptik aktiviteyi etkilemesi, astrositlerden

ekstraselüler ortama salınan glutamat, ATP ve D-Serine moleküllerine bağlıdır (Bezzi, Gundersen et al. 2004). Böylece pre-sinaptik ve post-sinaptik nöronlara üçüncü bir ortak çıkmış ve peri-sinaptik astrositlerle beraber tripartite-sinaps (üç ayaklı) terimi ortaya çıkmıştır (Araque, Parpura et al. 1999).

Bir  $Ca^{+2}$  dalgası sitozolik kalsiyumda lokalize artış ve bunu takip eden dalga şeklinde olayın tekrarlamasıdır. Bu dalgalar bir hücre ile sınırlı olabileceği gibi (intraselüler) komşu hücelere de aktarılabilirler (interselüler). İntraselüler  $Ca^{+2}$  dalgalarına giden süreçte ilk basamak genellikle G-protein kapılı reseptör aktivasyonu, fosfolipaz-C aktivasyonu ve IP3 oluşumunu, sonuçta endoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  salınımını içermektedir (Golovina and Blaustein 2000). İnterselüler  $Ca^{+2}$  dalgalarının ne kadar ilerleyebileceği, hücre içi ve hücrelerarası ortamda  $Ca^{+2}$  mobilizasyonunu sağlayan moleküllerin difüzyon özelliklerine bağlıdır.

## **2.5.2 Epilepsi – Astrosit İlişkisi**

Beyinde astrositler nöbet odağının önemli bir yapı taşıdır. Önceleri, nöron gruplarının aşırı uyarılmasının ve bu uyarının beyinde yayılmasının epilepsinin tek nedeni olduğu kabul edilmişken sonraları astrositlerin nedensellik bağlamında önemli olduğu düşünölmeye başlanmıştır. Nöbet oluşumu ile ilişkilendirilmiş birçok beyin odağı yüksek oranda astrosit içermektedir. Bunlara örnek olarak başta temporal lob epilepsisi, kitle lezyonları (astrositoma, oligodendroglioma, arteio-venöz malformasyonlar) ve tuberoskleroz sayılabilir (Engel and Pedley 2008). Gliyal skar (hasar dokusu) oluşumu insan epilepsileri için belirgin bir özelliktir (Penfield W. 1940). Kronik fokal epilepsilerdeki glial hasar dokularının bu yüksek görünme

durumu, doğal olarak astrositlerin epilepsideki fizyolojik rolleri ile ilgili teoriler üretilmesine neden olmuştur (Pollen and Trachtenberg 1970).

Astrositlerle ilgili görüşlerin büyük kısmı temporal lob epilepsisi esas alınarak yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Daha önce de değinildiği üzere temporal lob epilepsisi temporal lobdan, özellikle de hipokampustan köken alır (de Lanerolle and Lee 2005). Cerrahiye başvuru alan tedaviye dirençli vakalarda çıkartılan nöbet odağı yapının anlaşılabilmesi için önemli bilgiler sağlamıştır. Hipokampal cerrahi eksizyon örnekleri incelendiğinde vakaların %40 -65 arasındaki bir kısmında hipokampal skleroz izlenmiştir (de Lanerolle, Kim et al. 2003). Cerrahinin sonuçları hipokampal sklerozlu hastalarda, sklerozu olmayanlara göre daha başarılıdır. Sklerotik hipokampusta büyük oranda (% 50) nöron kaybının yanında glial hücre yoğunluğu da normal ve sklerotik olmayan kontrollere göre % 80 gibi yüksek bir oranda artmıştır (Cohen-Gadol, Pan et al. 2004). Bu astrositlerin de sıradışı özellikleri gözlenmiştir.

Reaktif astrogliosis, merkezi sinir sistemi hastalıklarında, dokuda gözlenen temel bir patolojik bulgu olmasına rağmen, yaygın olarak kabul edilen bir tanımlaması ve sınıflandırması yoktur. Gözlemler ve hayvan çalışmaları ile biriken bilgi birikimi sonucu reaktif astrosit için bir tanımlama ileri sürülmüştür (Sofroniew 2009). Bu tanım dört özelliği kapsamaktadır: (1) Reaktif astrogliosis, merkezi sinir sisteminin her şekilde ve şiddetteki hasarına karşı astrositlerde gözlenen hücresel, moleküler ve fonksiyonel değişikliklerdir, (2) reaktif astrositlerdeki değişiklikler, hasarın şiddetine göre ilerleyici hipertrofi, moleküler sentez değişiklikleri ve ileri vakalarda sayıca artış ve skar dokusu oluşumuna kadar geniş bir aralıkta değişiklik gösterebilir, (3) reaktif astrogliosisteki değişiklikler hücre içi ve hücresel arası sinyal molekülleri aracılığı ile düzenlenir, (4) reaktif astrogliosis sürecindeki değişiklikler

astrosit aktivitesini bulunduğu dokudaki nöral yapılar için iyi ya da kötü yönde değiştirme potansiyeline sahiptir.

Bu noktada astrositlerin fizyolojik özelliklerinden de yola çıkarak epileptogeneze ne şekilde dahil olduğuna ya da olabileceğine dair teoriler temel başlıklar altında özetlenebilir. Tabiki öncelikle sklerotik hipokampusta astrositlerin nasıl işlevsel değişiklikler gösterdiğine değinilmelidir.

### **2.5.2.1 Astrositik Glutamat Reseptörleri ve Taşıyıcıları**

Merkezi sinir sisteminde birçok hücre glutamat taşıyıcısının ekspresyonunu yapar ancak astrositler glutamat alımında birincil olarak sorumlu hücrelerdir. Astroglial GLT-1 glutamat taşıyıcısının merkezi sinir sisteminde glutamatın ekstraselüler ortamdan büyük oranda temizliğinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Danbolt 2001). Birçok çalışmada glutamat taşıyıcıları ile nöbetin yayılması arasında ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Epileptik odakta artmış olan ekstraselüler glutamat seviyesi buna bir örnektir (During and Spencer 1993). GLT-1 knockout farelerin spontan nöbetler geliştirdiği ve bunun patolojisinin de temporal lob epilepsisinde gözlenen değişikliklerle uyumlu olduğu (Tanaka, Watase et al. 1997), bunun yanında GLT-1'in farmakolojik olarak inhibisyonunun da epileptiform aktivitenin eşliğini düşürdüğü belirtilmiştir (Campbell and Hablitz 2004). Tessler ve arkadaşlarının (Tessler, Danbolt et al. 1999) temporal lob epilepsisi örneklerinde çalışılan mRNA ve protein seviyesi çalışmalarında ne GLT-1 için ne de GLAST için bir değişiklik bulamazken Matherne (Mathern, Mendoza et al. 1999) ve Proper (Proper, Hoogland et al. 2002) GLT-1 için düşük değerler yayınlamışlardır. Bu araştırmacılar GLT-1 için ayrıca sklerotik olmayan hipokampal örneklerde bir artış da belirtmişlerdir. Bu sonuçlar azalmış ya da işlevi bozuk glutamat taşıyıcılarının hipokampusta istemsiz nöbetleri tetiklediğine dair olan hipotezi desteklemektedir ancak altta yatan

mekanizma açık değildir. Birkaç çalışma nöbet gelişiminde iyonotropik glutamat reseptörlerine de dikkat çekmektedir. Astrositler GluR1-4 alt tiplerine sahip AMPA reseptörlerini büyük oranda sentezlemektedir (Verkhratsky and Steinhauser 2000). GluR<sub>2</sub> altbirimi açısından mutant farelerde erken başlangıçlı ve tekrarlayan istemsiz nöbetlerle karakterize epilepsi bildirilmiştir ki bu da AMPA reseptörlerinin GluR<sub>2</sub> altbiriminin Q formundan geçen Ca<sup>2+</sup> akışının nöbet eşiğini düşürdüğüne işaret eder (Brusa, Zimmermann et al. 1995). Astrositlerde de GluR<sub>2</sub> altbirimini vardır ancak glial GluR<sub>2</sub> değişikliklerinin insan temporal lob epilepsisi ile ilişkisi görülmemektedir. Daha ziyade tek hücre transkripsiyon analizleri, GluR1 varyasyonlarının epileptik hastalarda hipokampal astrositlerde gözlenen uzamış reseptör yanıtlarından sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Seifert, Schroder et al. 2002). Buradaki uzamış reseptör aktivasyonu Ca<sup>2+</sup> ve Na<sup>+</sup> iyonlarının hücre içine geçişine, bu da astrosit Kir kanallarının blokasyonuna yol açar ki, astrositlerin K<sup>+</sup> tamponlama kapasitesinin düşmesi sonuçta depolarizasyonun şiddetini güçlendirir (Schroder, Seifert et al. 2002). Glial reseptör işlevlerindeki değişiklik, epileptik durumun nedeni midir yoksa sonucu mudur, bu henüz açık değildir.

#### **2.5.2.2 Su ve Potasyum Dengesinin Epileptojenezdeki Rolü**

Temporal lob epilepsisi olan hastalardan elde edilen hipokampal örneklerde, sklerozu gözlenen dokularda skleroz olmayanlara göre K<sup>+</sup> tamponlaması bozulmuş gözükmemektedir (Heinemann, Gabriel et al. 2000). Pilocarpin epilepsi modelinde Ba<sup>2+</sup> ile yapılan Kir bloklama çalışmasında, astrositlerde, status epileptikus sonrası günler içerisinde Kir akımlarının azaldığını göstermektedir (Gabriel, Eilers et al. 1998). Patch-clamp çalışmaları da bu sonucu doğrulamaktadır. Sonuçlar sklerotik hipokampusta K<sup>+</sup> tamponlanması ve Kir ekspresyonunun azaldığını göstermektedir ki bu da K<sup>+</sup> klirensi için ana yolun Kir olduğunu işaret eder. Azalmış K<sup>+</sup>

tamponlanmasının nöronlarda uyarılabilme eşiğini düşürmesi ve epilepsi oluşumuna katkıda bulunması öngörülmektedir.  $K^+$  tamponlanması için tek başına Kir akımları yetersizdir. Ekstraselüler su dengesi de  $K^+$  tamponlanması için şarttır. Sklerotik medial TLE hastalarında manyetik rezonans görüntüleri hipokampusta artmış T2 sinyal yoğunluğu göstermektedir (Hugg, Butterworth et al. 1999). Bu durum dokuda su birikimi olduğunu ifade eder. Buna ek olarak aquaporin 4 (AQP4) mRNA ekspresyonu da bu hastalarda CA1 bölgesinde artmıştır (Lee, Eid et al. 2004). Astrositlerin perivasküler uzantılarında AQP4 kaybı ekstraselüler  $K^+$  klirensinin azalması ile ilişkili gözükmektedir (Amiry-Moghaddam, Williamson et al. 2003). Potasyumun astrositlerce Kir (inward rectifying potassium channel) aracılığı ile ekstraselüler aralıktan uzaklaştırılması, eş zamanlı ve paralel olarak plazma membranından su akımını da gerektirmektedir. Yüksek nöronal aktivite sırasında  $K^+$  ve su astrositlerin sinaptik aralığa bakan yüzleri tarafından alınır ve uç ayaklarından kana veya beyin-omurilik sıvısına boşaltılır. Böylece bu  $K^+$  ve su akımını bozacak durumlar nöbet potansiyelini artıracaktır.

### **2.5.2.3 Astrosit Neksuslarının Epileptojenez ile İlişkisi**

Neksuslar connexin proteinlerinin kümeleşmesi ile bitişik hücreler arasında işlevsel kanallar olarak karşımıza çıkarlar (Unger, Kumar et al. 1999). Özellikle astrositik uzantılarda yoğun olarak bulunur ve bu uzantılar sayesinde geniş hücrelerarası ağlar oluşturabilirler. Bu sayede belirli bir bölgede oluşan nöronal aktivite sonrası biriken glutamat ve  $K^+$  gibi moleküllerin alınıp, bu gliyal sinsisyum kanalları sayesinde hızla diğer bölgelere doğru dağıtılması sağlanabilir (Wallraff, Kohling et al. 2006). Astrosit neksuslarının oluşması için connexin 30 ve 43 gereklidir (Nagy, Dudek et al. 2004). Bu proteinler yönünden çift knockout farelerde CA1 bölgesindeki uyarılar ekstraselüler  $K^+$  seviyelerinde çok az bir yükselmeye

neden olmuştur ki bu da astrositlerde nexus kaybının aşırı uyarılma ve eksitotoksisite için yeterli bir neden olmadığına işaret eder. Öte yandan bu kanallar yönünden eksik farelerden hazırlanan hipokampal kesitlerde kendiliğinden görülen interiktal akımlar izlenmiştir (Wallraff, Kohling et al. 2006). Literatür, bu noktada tutarlı veri sağlamamaktadır.

#### **2.5.2.4 Epileptik Odakta Reaktif Astrositler**

Beyinde olan hemen hemen tüm hasarlarda reaktif gliyosis bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna uzamış nöbetler de dahildir. Bu değişim, ortamdaki var olan astrositlerde belirgin morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin yanında kök hücrelerden yeni astrositlerin de oluşmasını beraberinde getirir (Ravizza, Gagliardi et al. 2008), (Borges, McDermott et al. 2006). Seçici olarak astrogliyosis'in engellenmesinin epilepsi üzerine etkileri bilinmemektedir ancak travmatik beyin hasarı modellerinde gangsiklovir ile yapılan çalışmada kortikal bölgede lökosit infiltrasyonunun arttığı ve nöral hasarın şiddetlendiği gözlenmiştir (Bush, Puvanachandra et al. 1999). Benzer durum omurilik hasarında da izlenmektedir (Faulkner, Herrmann et al. 2004). Bu çalışmalar hasarı takip eden kronik dönemde reaktif astrositlerin koruyucu etkileri olduğunu göstermekte, akut değişiklikleri ise açıklamamaktadır.

Epilepsideki bu süreç, gerek hücresel, gerek moleküler mekanizmaları açısından henüz anlaşılammıştır. Reaktif astrositlerdeki değişimlerde, uzantıların hipertrofisi, intermediate filamentlerde belirgin artış (vimentin, nestin, GFAP) yanında bazı diğer proteinlerde de yükselme görülür. Bunlar arasında mGluR3, mGluR5, mGluR8 (Aronica, van Vliet et al. 2000), proinflamatuvar proteinler COX2 ve CXCR4 (Lee, Mane et al. 2007), sinir büyüme faktörü ve reseptörleri (Sofroniew, Howe et al. 2001), östrojen alfa reseptörü (tokuhara 2005), TGF $\beta$ , TNF  $\alpha$ , interlökin

1-4-6-10 gibi sitokinler ve enzimler (iNOS) (Ridet, Malhotra et al. 1997) sayılabilir. Reaktif astrositlerde glutamin sentaz oldukça belirgin olarak azalmaktadır (Eid, Thomas et al. 2004). Tüm bu değişimlerin nöbet duyarlılığını etkileyip etkilemeyeceği tartışmaya açıktır.

#### **2.5.2.5 Sitokinlerin Rolü**

Astrositler birçok pro ve anti-inflamatuar maddeyi salgılar. Astrositlerce TNF  $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  üretimi yerine göre yararlı ya da zararlı sonuçlar doğurabilir. Buradaki belirleyici faktör ekspresyon zamanı ve hangi reseptörlerin aktifleştiğidir (Bernardino, Xapelli et al. 2005), (Vezzani and Granata 2005). IL-1 $\beta$  tarafından aktifleştirilen IL-1R1 nöbet eşiğini düşürmektedir ve nöbetler astrositlerde IL-1 $\beta$  üretimini tetiklemektedir (De Simoni, Perego et al. 2000). Bu bulgular astrositik IL-1 $\beta$ 'nın nöbet duyarlılığını düzenlediğini göstermektedir. Benzer şekilde IL-10 , IL-4 ve TGF  $\beta$ , çeşitli hasarlar sonucu astrositlerce üretilmekte ve pro-inflamatuar sitokinlerden IL-1  $\beta$ , IL-6 ve TNF  $\alpha$  ile beraber nitrik oksit ekspresyonunu düşürür (Ledeboer, Breve et al. 2000).

#### **2.5.2.6 Astrosit-Nöron Sinyalleri**

Astrositlerle ilgili algımızda en dramatik değişimlerden birisi de astrositlerin nörotransmitterlere, hormonlara ve diğer uyarılara, hücre iç  $Ca^{+2}$  düzeylerini artırarak yanıt verebiliyor olması ve bunun sonucunda glutamat, ATP ve D-serin gibi kimyasal aracıları salgılayabiliyor olmasıdır (Haydon and Carmignoto 2006). Burada üzerinde yoğunlaşılan konular bu mekanizmalardaki hücresel ve moleküler aşamalar, bu süreci tetikleyen durumlar ve belki de en önemlisi, bu gliyotransmisyonun astrositin yakın çevresinde bulunan nöronlarda uyarılabilirliği değiştirip değiştirmediğidir.

Astrositlerin glutamat salımı yapabildiği kültür şartlarında HPLC yoluyla gösterilmiştir (Parpura, Basarsky et al. 1994), (Jeftinija, Jeftinija et al. 1997). Astrositlerden salınan glutamatın izlediği yol merak konusudur. Bu yollardan biri sistin-glutamat xc-zıt taşıyıcısı ile, hacime duyarlı anyon kanalları ile (Abdullaev, Rudkouskaya et al. 2006), nexus yarı-kanalları ile (Ye, Wyeth et al. 2003) ve veziküler ekzositoz ile (Bezzi, Gundersen et al. 2004) geri taşınmadır (Rossi, Oshima et al. 2000).

Örneğin çeşitli anyon kanalları blokerleri kullanılarak oluşturulan hipototik ortamda astrositlerin glutamat salgıladıkları gösterilmiştir. Aslında bu durum, iskemi ya da nöbetlerde gözlenen hücre şişmesinin astrositik glutamat salımını tetikleyeceğini düşündürmektedir.

Astrositik glutamat salımı ile ilgili en kuvvetli kanıtlar,  $Ca^{+2}$  aracılı veziküler ekzositozudur. Astrositler de diğer nöron olmayan hücreler gibi veziküllerin membrana birleşmesini sağlayan proteinleri (SNARE, sinaptobrevin2, sinaptotagmin IV, VGLUT 1/2) sentezlerler (Bezzi, Gundersen et al. 2004). Astrositlerden kültür ortamında mekanik uyarı sonucu salgılanan glutamat, ortamdan  $Ca^{+2}$  uzaklaştırılması ya da seçici olarak SNARE proteininin proteolizi ile engellenebilir.

#### **2.5.2.7 Nöronal Uyarılma Eşiğinin Astrositik Glutamat Salımı ile Modülasyonu**

Birçok çalışma astrositik  $Ca^{+2}$  dalgalarının yerel glutamat salımını tetiklediği ve bunun da yakındaki nöronlarda depolarizasyona neden olduğu ya da  $Ca^{+2}$  akımları yarattığını göstermiştir (Pasti, Volterra et al. 1997; Parri, Gould et al. 2001; Angulo, Kozlov et al. 2004). Burada deneysel teknikler glutamatın nöronal mi yoksa astrositer mi olduğunu artık ayırabilmektedir. Yakın zamanda yapılmış iki çalışma, astrositik glutamat salımının yakındaki sinapslarda aktarımı etkilediğine dair kuvvetli

kanıtlar sunmaktadır (Jourdain, Bergersen et al. 2007).  $Ca^{+2}$ 'a bağlı gliotransmisyonun epileptojenez ile ilişkisi çekiciliğini korumakta ve giderek artan oranlarda bilgi elimize ulaşmaktadır ancak bugün net yargılara varmak için henüz erkendir.

## II. BÖLÜM

### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda tutuşturma (“kindling”) yöntemi ile nöbet eşiği düşürülmüş sıçanlarda hipokampus astroglial hücre ekiminin konvülsiyon eşiği üzerine etkilerini araştırmak amacı ile nöbet davranışının yapılandırılmış değerlendirilmesi, hücre kültürü ve histokimya yöntemleri uygulanmıştır. Davranış değerlendirmesi kapsamında kimyasal ajana karşı ortaya çıkan tepkilerin nitel ve nicel farklılıkları sınıflandırılarak gözlenmiştir. Bu sınıflama sürecinde, ajanın verilmesi itibariyle nöbetin başlangıç zamanı, nöbetin evresi, (varsa / geliyorsa) jeneralize nöbetin başlangıç zamanı ve süresi kaydedilmiştir. Kontrol grubunda astrosit kültürü için kullanılan (ancak, astrosit içermeyen) hücre ekim ortamı (vasatı) kullanılmıştır.

#### 3.1 *Deney Hayvanları*

Çalışmalarda Ankara’da bulunan ticari KOBAY firmasından sağlanmış 6 aylık 350-400 gr ağırlığında erkek Sprague Dawley tipi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar bakım birimimiz koşullarında 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde ve serbest su ve yem erişimi ile barındırılmışlardır. Ön çalışmalar itibariyle, Ege Üniversitesi Yerel Hayvan Etik Kurulun’un izni alınmış ( 2008 - 15), ve tüm deneyler / işlemler, bu kurallar çerçevesinde yürütülmüştür.

#### 3.2 *Deney Deseni*

##### 3.2.1 **Gruplar**

Deney grupları Astrosit ve Sham (“Yalancı İşlem”) grubu olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır ve başlangıçta her iki grupta da 8 adet sıçan çalışmaya alınmış,

tutuşturma d6neminde bazı sıçanlar (2 sıçan astrosit grubunda, 3 sıçan kontrol grubunda olmak 6zere) kaybedilmiştir.

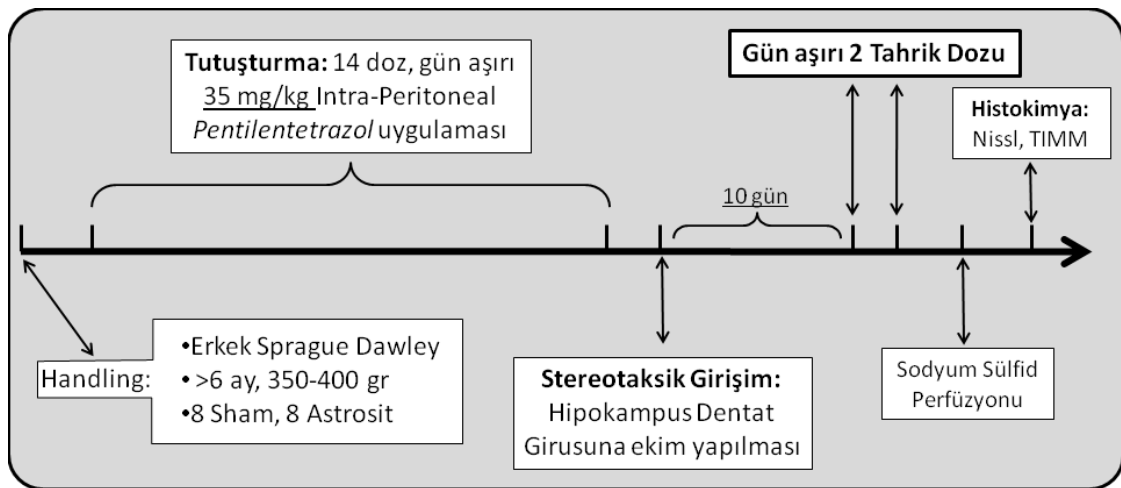
Grup 1: Kontrol Sham(Yalancı İşlem) Grubu (n=5)

Grup 2: Astrosit Grubu (n=6)

Gruplardaki sıçanlara 14 dozluğ pentilentetrazol (PTZ) tutuşturma protokol6 ile n6bet evrelemesi yapılmış. Ond6rd6nc6 dozdan sonra stereotaksi tekniği ile ulaşılan hipokampus dentat girus hilusuna astrosit ağırlıklı bileşim (s6spansiyon) ya da k6lt6r ortamı ekimi yapılmış ve ekimden 10 g6n sonra g6n aşırı iki kez olmak 6zere kışkırtma dozları ile n6bet davranışı g6zlenmiştir.

Kontrol Grubu: Bu gruptaki sıçanlara astrosit grubunda verilene eşit hacimde k6lt6r ortamı ekilmiştir.

Astrosit Grubu: Sağ ve sol hipokampusun her birine, hilus b6lgesine  $7-8 \times 10^5/\mu\text{l}$  yoğunlukta 3  $\mu\text{l}$  (toplamda her bir hipokampusa 210000-240000 h6cre) ekimi yapılmıştır.



şekil 3.1: Deney Deseni

### 3.2.2 Anestezi

Stereotaksik girişimde Ketamin anestezisi, perfüzyon için ve ötenazide yüksek doz Tiyopental anestezisi kullanılmıştır

Ketamin Baz: 40 mg/kg (Alfamine %10, Alfasan Inc.)

Xylazine: 4 mg/kg

Acepromazine Maleate: 0,25 mg/kg

Tiyopental Sodyum: 200 mg/kg (Pental Sodyum 1g, İ.E. ULAGAY)

### 3.3 Tutuşturma (*Kindling*)

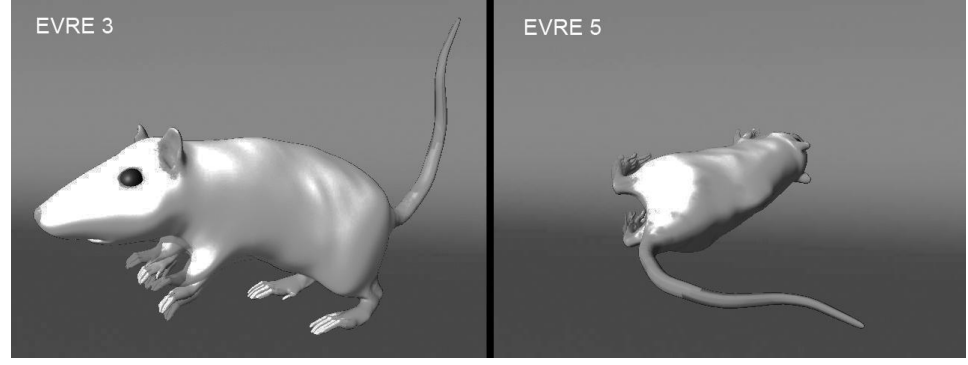
Gruplardaki tüm hayvanlara eş zamanlı olarak başlanan tutuşturma döneminde sıçanlara 35mg/kg Pentilentetrazol (Sigma Co) intra-peritoneal yolla gün aşırı olarak toplam 14 doz olmak üzere enjekte edilmiştir. Pentilentetrazol (PTZ) -20<sup>0</sup>C'da saklanmaktadır ve oda sıcaklığında uzun süre bekletildiğinde etkinliği azalmaktadır. Toz formunda olan etken madde serum fizyolojik ya da distile su ile çözdürülebilmektedir. Çalışmamız öncesinde buz içerisinde alınan PTZ 35mg/kg/ml olacak şekilde serum fizyolojik içerisinde hızla çözdürülmüş ve 1'er mililitrelik ependorflara ayrılarak tekrar -20<sup>0</sup>C'da saklanmıştır. Çalışma sırasında gerekli miktar uygulamadan hemen önce çözülmüş ve bekletilmeden enjeksiyonlar yapılmıştır. Enjeksiyonlar öğleden sonraları yapılmış, hafta sonları uygulama yapılmamıştır. Enjeksiyon yapılan sıçanlar hemen gözlem kutularına konmuş ve iki gözlemci tarafından aynı anda süre tutularak 30 dakika boyunca nöbet evrelemesi kaydedilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Tutuştırma gözlem kutuları

Nöbet evrelemesi “Racine” sınıflandırmasına göre yapılmıştır (Racine 1972). Literatürde Racine sınıflandırmasının değiştirilmiş uygulamaları olmakla birlikte (Becker, Grecksch et al. 2000), kendi evrelememiz klasik sınıflandırmayı dikkate alarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre:

- EVRE 0: Normal
- EVRE 1: Donma, yüzde lokomosyon
- EVRE 2: Baş sallama, bedende yüzeysel miyoklonik hareketler
- EVRE 3: Sıçrama tarzında miyoklonik hareketler veya tek ön uzuvda klonus
- EVRE 4: İki yanlı ön ekstremitelerde klonus (“eşzamanlı piyano çalma hareketi”) ve geriye doğru eğilme
- EVRE 5: Geriye doğru eğilme ve düşmeyi takiben jeneralize tonik-klonik konvülsiyon



Şekil 3.3: Evre 3 ve evre 5 temsili görüntüleri

Evrelemede gözlenen nöbet evresi ve ilaç dozunu takiben başlama zamanı ile evre 5 nöbet geçiren sıçanlarda konvülsiyonun süresi kaydedilmiştir (Şekil 3.4).

Denek	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4	Evre 5 / Süre

Şekil 3.4: Örnek Nöbet Evreleme Tablosu

14 dozluk uygulama dönemi sonunda ardışık 2 dozda Evre 4 – 5 nöbet davranışı gösteren sıçanlar “tutuşturulmuş” kabul edilip çalışmaya alınmıştır. Bu süreç içerisinde karşılaşılan sorunlardan biri aşırı duyarlılaşma ve buna bağlı olarak gelişen “status epileptikus”tur. Status epileptikus’a giren sıçanları kaybetme olasılığı yüksek olduğu için bu durumun 10 dakikayı geçtiği hallerde veya solunum durması gözlemlendiğinde 10 mg/kg Diazepam uygulaması ile nöbet sonlandırılmıştır. Buna karşın gerek kontrol grubunda gerekse astrosit grubunda tutuşturma ve kışkırtma dozu dönemlerinde kayıplar yaşanmıştır.

### 3.4 Primer Astrosit Kültürü

Kültür hazırlanması Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Primer astrosit kültürü, temelde

primer karışık (mikst) glia kültürünün işlemden geçirilmesi ile elde edilmektedir. Primer karma gliya kültürü uygun laboratuvar koşulları altında aşağıda belirtildiği gibi elde edilmektedir:

### 3.4.1 Gerekli Malzemeler

#### 3.4.1.1 Donanım

- Karbondioksitli Enkübatör: Sabit sıcaklık, nem ve karbondioksit oranlarında kültür ortamlarının yerleştirildiği cihazdır. Karbondioksit oranı kullanılan kültür vasatındaki bikarbonat tamponlamasına bağlı olarak %5 ile %10 arasında olabilir. Enkübatör içerisinde arzu edilen nem oranı %95'tir. Enkübatör koşullarının kültür izlemi boyunca denetlenmesi, özellikle steril koşulların korunması ve karbondioksit oranındaki değişimlere bağlı olarak kültür vasatının pH değişimlerine engel olunması, hücrelerin karşı karşıya kalabileceği streslerden uzak kalabilmesini sağlamak için zorunludur.
- Laminar Flow (Steril Kabin): Kültürün steril şartlarda hazırlanması ve sonrasındaki izleminde vasat değişimi için kullanılan kabindir. Bu kabinler içerisindeki iki aşamalı Hepa (high efficiency particulate air) filtrelemesi sayesinde kabin içerisinde %99'un üzerinde bir arıtma gerçekleştirilmektedir; böylece, en büyük sorun olan enfeksiyonun önlenmektedir.
- Inverted Mikroskop: Kültür ortamlarının, hazırlama ve izlemi sırasında incelenebilmesi içindir.
- Otoklav: Cerrahi malzeme ve bazı dayanıklı sarf malzemelerinin sterilizasyonu için.

- Thoma Lamı (Hemositometri): Hücre sayımı için kullanılmaktadır
- Sıcak Su Banyosu: Kültür vasatı ya da diğer kimyasal solüsyonların uygun fizyolojik sıcaklığa getirilmesi amacıyla kullanılır
- Steril Cerrahi Malzeme: Başlangıçta beyin dokularının işlenmesinde kullanılır.
- Steril Kültür Süzgeci
- Pipetleme Cihazı
- Shaker (Karıştırıcı)
- +4 ve -20 derece soğutucular

#### 3.4.1.2 Kimyasal Ajanlar

- Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Co): +4 derecede saklanır
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma Co): -20 derecede saklanır
- L-Glutamine (Sigma Co): -20 derecede saklanır
- Antibiyotik (Penisilin-Streptomisin) (Sigma Co): -20 derecede saklanır
- Trypsin-EDTA (% 0,25) (Sigma Co): -20 derecede saklanır

#### 3.4.1.3 Sarf Malzemeleri

- Steril Cam Şişeler: 100, 250, 500 ml
- 0,22 µm steril filtre
- 15 ve 50 ml santrifüj tüpleri (Falcon)
- 10 ml'lik steril pipetler
- Steril pastör pipetleri
- Ağız kapaklı steril kültür flaskları ve steril petripler

- 50 ml'lik enjektör

### **3.4.2 Kültürün (Ekinin) Hazırlanması**

Kültür hazırlığı için embriyonik 18.günden (E18) doğum sonrası 7. Güne (P7) kadar sıçan yavruları kullanılabilir. Bizim çalışmamızda yenidoğan 1 ya da 2 günlük yavrular (P1 – 2) kullanılmıştır.

Ön aşamada hücre vasatı taze olarak hazırlanır. Bunun için hazırlanacak miktara göre FCS, L-Glutamin ve Antibiyotik sıcak su banyosunda çözündürülür. Steril cam şişe içerisine %10 FCS, % 2 L-Glutamin, %1 Antibiyotik ve %87 DMEM konarak karıştırılır. Bu karışım daha sonra 0,22 µm steril filtre aracılığı ile ikinci bir steril cam şişe içerisine filtre edilerek tekrar sterilize edilir. Kültür hazırlığı için uygun miktar 50 ml'lik Falcon tüpe alınarak sıcak su banyosuna konur. Kalan miktar ise + 4 derecede 1 hafta süre ile saklanmaktadır.

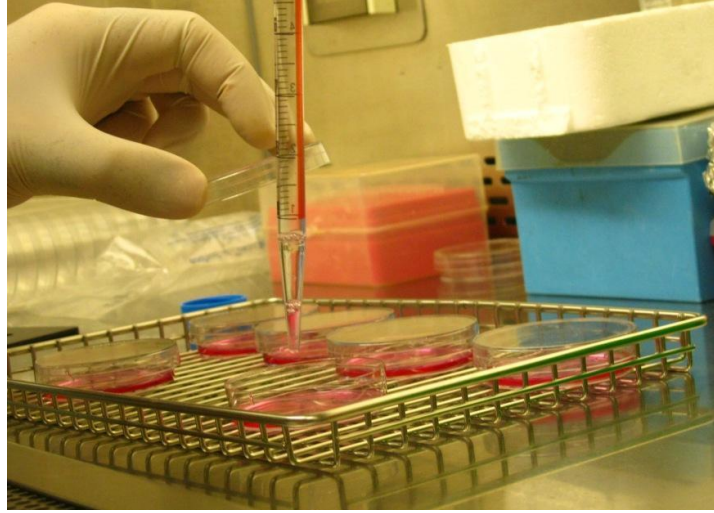
Steril kabin içerisi alkol ile dezenfekte edilir. Alkol ile silinen kap içerisine buz (tercihen kırık buz) konur ve üzerine steril petri kapları yerleştirilir. Bu petrilere soğuk DMEM konarak hazırlık tamamlanır. Tüm aşamalar buz üzerinde ve steril cerrahi malzeme kullanarak yapılır.

Tez çalışmasında P1 – 2 sıçan yavrularına önce soğuk anestezisi uygulanmış, ardından kafaları alkolle yıkanarak petri içerisinde dekapite edilmişlerdir. Baş, pens ile tutularak kafa derisi orta hatta kesilmiş ve çok ince ve yumuşak olan kafatası, kaudal bölümden ince makas ile kesilip, pens ile iki yana ayrılarak beyin dokusu açığa çıkarılmıştır. Beyinler eğri uçlu pens aracılığı ile temiz bir petri kabına alınmıştır.

Beyinler ince uçlu pens yardımıyla zarlarından temizlenir. Bu aşamada olabildiğince temizlik yapılmalıdır. İstenilen bölgeye göre dokular kesilip ( frontal, paryetal v.s) kullanılacak bölümler ince makas (Microscissors) ile parçalanır (Triturasyon). Olabildiğince küçük parçalara ayrılmalı ve bunu yaparken dokuları ezmekten kesinlikle kaçınılmalıdır. Dokular daha sonra tüp içerisinde sıcak su banyosunda 10 dakika tripsin ile işlenir. Tripsin dokudaki bağ dokusuna ait yapıları parçalayarak tek hücre süspansiyonuna gelmesini sağlar. 10 dakika sonra tüpe kültür vasatı konur. Bu sayede FCS ile tripsinin nötralizasyonu sağlanır. Tripsine hücrelerin uzun süreli maruz kalması hücrelerin ölmesine neden olabilir. Tüp içerisinde Pasteur pipeti yardımıyla duvara çarptırmak suretiyle henüz yeterince ayrışmamış olan dokuların parçalanması sağlanır. Bundan sonra 800 devir 6 dakika santrifüj yapılır ve üstte kalan sıvı atılır. Tekrar FCS içeren kültür vasatı eklendikten sonra steril süzgeçten geçirilen süspansiyon yeni bir tüpte toplanarak hücre sayımı aşamasına geçilir. Hücre sayımında 10ul hücre süspansiyonu, 10 µl tripan mavisi ile karıştırıldıktan sonra hemositometrede (“Thoma”) sayılır. Süspansiyona mililitresinde 2-4 x 10<sup>5</sup> adet hücre içerecek biçimde kültür vasatı eklenir ve toplam hacim ölçülür.

Bu çalışmada 25 cm<sup>2</sup>'lik ağzı filtre kapaklı flasklar ve 6 cm çapında steril petripler ekim için kullanılmışlardır. İlk ekim sırasında her flaska 4 ml süspansiyon konmuş ve flasklar hücrelerin tutunabilmesi için 48 saat enkübatörde bekletilmişlerdir. 48 saat sonraki değerlendirmede hücre vasatı yenilenmiş ve bu şekilde tutunmamış olan ölü hücrelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. İzleyen dönemde 3 -4 günde bir kültür vasatı yenilenmiş ve flaskta yeterli konflüens sağlandıktan sonra hücreleri ayrıştırma işlemine geçilmiştir. Ayrıştırmada flasklar enkübatör içerisine yerleştirilen çalkalayıcı üzerinde 200 devir/dakikada 6 saat

bekletilmiş, DMEM ile yıkama yapıp vasat değiştirildikten sonra bu kez 250 devirde 48 saat çalkalanmışlardır. Bu işlemler karma gliya hücre kültüründe astrosit dışındaki hücrelerin zeminden ayrılmasını ve astroglial hücrelerin yüzde oranının artırılmasını sağlamaktadır. Bu ayrıştırma işleminin sonucunda astroglial hücrelerin oranı %90'ın üzerine çıkmaktadır. Ayrıştırmadan sonra tekrar yıkama yapıp tripsinle kaldırılan hücreler pasajlanarak steril 6 cm çapında petrilere aynı yoğunlukta ve bu sefer 3'er ml olarak ekilmiştir. Konfluense ulaşan hücre kültürü pasajlanarak ekim gününe kadar enkübatörde tutulmuştur.



Şekil 3.5: Astrosit Kültüründe Kültür Vasatının Yenilenmesi

### 3.5 Stereotaksi

Kültür ortamında çoğaltılan astrositler, konfluense ulaştıktan sonra Tripsin-EDTA ile kaldırılmış, nötralize edilmiş, hemositometrede sayılmış, santrifüj ile düşük devirde konsantre edilerek mikrolitrede  $7-8 \times 10^4$  olacak şekilde konsantre edilerek ependorfa konmuş ve çalışma süresince buz içerisinde bekletilmiştir. Ketamin anestezisi ile uyutulan sıçanların önce kafa derisi traş edilmiş, gerekli aseptik koşullar altında longitudinal insizyon ile kafatası açığa çıkarılmıştır. Periostun kuruması ve bregmanın belirgin hale gelmesinden sonra sıçan stereotaksik

çerçeveye (Kopf Instruments) yerleştirilmiş, vücut ısısının dengelenmesi için rektal prob ve ısıtıcı pad kullanılmış, stereotaksik sıçan beyin atlası (Paxinos and Watson 2009) yardımı ile belirlenen koordinatlar işaretlenip dental matkap ile bilateral olarak açılmıştır. Hemostatik koşullar gözlenerek hedeflenen beyin bölgesine 28G, 10 µl'lik Hamilton® GasTight enjektör aracılığı ile 3 µl  $7-8 \times 10^5$  hücre/ul olacak biçimde ekim yapılmıştır (Lapore) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Stereotaksik astrosit ekimi

Gerek enjektörün hedefe ulaşmasından sonra gerekse de ekimden sonra bölgesel basınç dengesi göz önüne alınarak enjektör 2'şer dakika dokuda hareketsiz bekletilmiştir. Ayrıca ekim de 1 µl / dk hız ile gerçekleştirilmiştir. Hedeflenen bölge hipokampusun dentat girus hilusudur. Atlas yardımı ile belirlenen koordinatlar, bregmaya göre; antero-posterior: -3.80, lateral:  $\pm 2.2$ , vertikal: -3.5 olarak belirlenmiştir. Verilen değerler "mm" cinsindedir (Şekil 3.7).



### 3.6.1 Kullanılan Çözeltiler:

#### 3.6.1.1 Paraformaldehid

Paraformaldehid (PFA) histolojik tekniklerde fiksasyon amacıyla kullanılan bir ajandır ve oldukça toksiktir. Derinlemesine işler ve dokuların uzun süre saklanabilmesine olanak sağlar. PFA dokuda bulunan proteinler arasında, özellikle de bazik lizin amino asid rezidülerinde çapraz kovalan bağlar kurarak sabitlenmeyi sağlar ve çözünmüş haldeki proteinlerin hücre iskeletine kenetlenmesi ile hücreye sertlik kazandırır. Doku yüksek oranda suyla karşı karşıya geldiğinde bu etki geri dönüşümlüdür ve buna pigmentasyon da dahildir. Perfüzyon için kullanılan % 4'lük PFA %16'lık olarak hazırlanan paraformaldehitin tampon çözeltiler ve distile su ile seyreltilmesi yoluyla elde edilmektedir. İki litre %4 PFA için 500 ml %16 PFA, 500 ml dH<sub>2</sub>O, 190 ml birinci tampon çözelti (çözelti A) ve 810 ml ikinci tampon çözelti (çözelti B) kullanılmaktadır:

- Çözelti A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (27,6 g / 1L dH<sub>2</sub>O)
- Çözelti B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (28,4 g / 1L dH<sub>2</sub>O)

#### 3.6.1.2 Sodyum Sülfid Çözeltisi (Na<sub>2</sub>S)

Perfüzyonda sodyum sülfid kullanılması TIMM boyaması için zorunludur. Çözeltideki kükürt, dokudaki ağır metallere bağlanmaktadır. Bu aşamada bizi ilgilendiren metal çinkodur. Çözelti için 3,7 g saf sodyum sülfid, PBS (fosfat tampon çözeltisi) ile 1 litreye tamamlanmaktadır. Mutlaka maske kullanılmalı ve iyi havalandırma koşulları altında çalışılmalıdır. Çözünme sırasında bir miktar H<sub>2</sub>S (Hidrojen Sülfür) gazı havaya karışabilir ve solunması sakıncalı toksik bir gazdır.

## 3.7 Histoloji

### 3.7.1 Nissl Boyaması

Nissl boyaması nöronlarda bulunan Nissl cisimciğinin gözlenebilmesini sağlayan bir histolojik boyama tekniğidir. Alman nörolog Franz Nissl'a atfen bu isim verilmiştir. Nissl cisimciği diye sözü edilen aslında granüler endoplazmik retikulumdur. Serbest ribozomlar içerir. Bu nedenle bu yapı çok miktarda RNA barındırmaktadır. Nöronlar ve glialar çok farklı miktarlarda Endoplazmik Retikulum içermektedir. Bu yüzden Nissle boyaması ile Nöronlar ve Glial hücreler birbirlerinden ayrılabilirler. Mikroskopta gövdesi (Perikaryon) boyanmış olan hücreler, özellikle de uzantıları belirgin ise, hemen tamamen nöronlardır (Şekil 3.8). Gözlenebilen uzantılar varsa bunlar dendritlerdir. Aksonlar ise çok ince olduklarından ve akson tepeciği Nissl granülü içermediğinden kolay seçilemezler. Glia hücrelerinde nöronlar kadar endoplazmik retikulum bulunmadığı için yalnızca çekirdekleri boyanır. Astrositler açık boyanan düzensiz sınırlı bir çekirdeğe ve çekirdeğin hemen çevresinde soluk boyanan ince bir sitoplazma olarak izlenir. Oligodendrositler ise oldukça koyu boyanan küçük çekirdeği ve polar yerleşimi le kendisini belli eder.



Şekil 3.8: Nissl Boyaması (Sıçan hipokampusu hilus bölgesi, 63x)

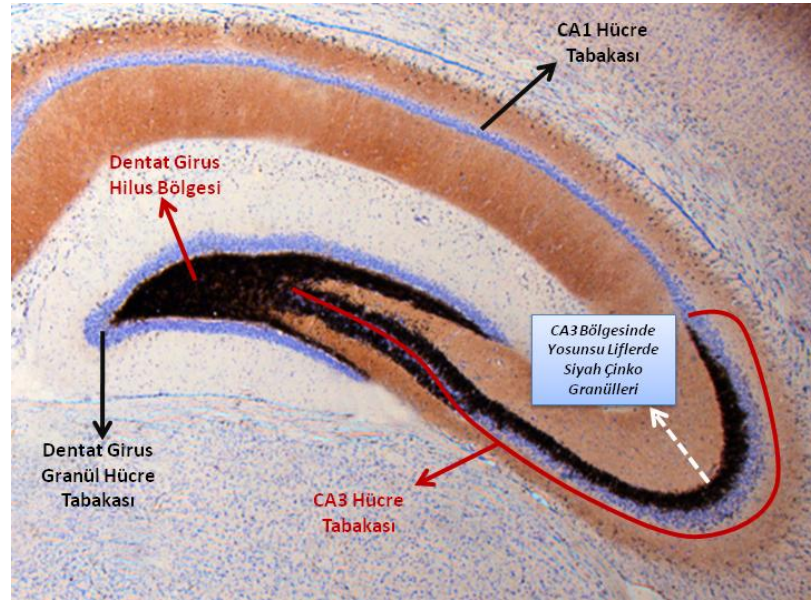
Nissl tekniğinde bazofilik anilin boya ları kullanılır. Toluidin mavisi ve krezil viyole en sık kullanılan boyalardır. Literatürdeki yöntemlerde temel mantık aynı olsa da ufak farklılıklar görülebilmektedir. Bunlar sırasıyla dehidratasyon (kurutma), rehidratasyon (sulandırma), boyama, dehidratasyon, ksilende bekletme ve lamların kapatılmasıdır. Çalışmada Nissl boyaması şu aşamalarda gerçekleştirilmiştir:

- % 100 Alkol: 15 dakika
- % 70 Alkol: 2 dakika
- % 50 Alkol: 2 dakika
- dH<sub>2</sub>O (distile su): 2 dakika
- Krezil Viyole solüsyonu: 10 dakika (karanlıkta ve 37<sup>0</sup>C’de)
- dH<sub>2</sub>O: Bir iki kez daldırıp çıkarılır
- % 50 Alkol: 2 dakika
- % 70 Alkol: 2 dakika
- % 100 Alkol: 2 dakika
- Ksilen: 5 dakika

### **3.7.2 TIMM Histokimya Boyaması**

Bir otometallografi yöntemi olan TIMM gümüş sülfid metodu bugüne kadar merkezi sinir sisteminde ve diğer dokularda çeşitli metallerin gösterilmesinde oldukça duyarlı bir boyama yöntemi olarak kullanılmıştır ve kullanılmaya da devam etmektedir. Bunlar arasında çinko (Zn), bakır (Cu), demir (Fe), kobalt (Co) ve nikel (Ni) gibi esansiyel metallerin yanında civa (Hg) kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), bizmut (Bi), talyum (Tl), altın (Au) ve gümüş (Ag) gibi toksik metaller de yer almaktadır. Orjinalinde Timm tarafından geliştirilmiş (Timm 1958), daha sonra ise bazı temel değişikliklere uğramıştır (Danscher 1981). Bu yöntemin ilkesi dokudaki metalin

sülfid ile çökeltilmesi ve bunu izleyen fiziksel olarak olgunlaştırılmasına dayanır (developer çözeltisi aracılığı ile). Bu son aşamada metal sülfidleri, indirgeyici ajanların gümüş iyonlarını indirgemelerini katalize eder. Bu yöntemin özellikle çinko içeren nöronların gösterilmesinde ve merkezi sinir sisteminde yeni gelişen aksonların ve akson sonlanmalarının belirlenmesindeki etkinliği kanıtlanmıştır. TIMM boyaması tek başına kullanılabilir gibi ek olarak Nissl boyaması da zıt-boyama tekniği ile uygulanabilir. Böylece, sağlam nöronların özellikle nicel irdelemesi yanısıra, sinaptik morfolojik değişikliklerin de nicel ve nitel irdelemesine olanak sağlanır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Naif Bir Sıçan Hipokampusunda TIMM Histokimyası

TIMM boyaması için kullanılan otometallografi çözeltisinin (“developer”)

150 ml’si aşağıdaki maddeleri içerir:

- 90 ml Arap sakızı (gum arabic): Çözeltideki kolloiyd etken
- 45 ml hidrokuinon: İndirgeyici ajan
- 15 ml sitrat tamponu: Asetik asit ve sodyum sitrat
- 0,7 ml gümüş nitrat: Işığa duyarlıdır

Boyama sırasında başlangıç dehidratasyon ve rehidratasyon aşamalarının ardından kesitler otometallografi çözeltilisine daldırılarak karanlıkta ve 26<sup>0</sup>C’de 60 – 90 dakika boyunca olgunlaştırılırlar. Sürenin sonunda dH<sub>2</sub>O’ya daldırılıp çıkartılan kesitler 10 dakika boyunca akan suda yıkanır ve ardından %5 Sodyum Tiyosülfat çözeltilisine daldırılır. Bu aşama tepkimenin durdurulması içindir. İsteğe bağlı olarak ya dehidratasyon işlemleri ardından kesitler kapatılır ya da dehidratasyondan önce zıt-boyama aşaması uygulanır.

TIMM boyaması yapılmış kesitlerde hipokampusun dentat girusu ve CA3 bölgesi sem-kantitatif bir yöntemle derecelendirilir (Cavazos, 1991, J.Neurosci). Bu derecelendirme supragranüler bölge ve CA3 için mossy liflerinin flizlenmesn ve saçılımını tanımlayabilmek için yapılmıştır. Aşağıdaki tablolarda her iki derecelendirme sistematığı sunulmuştur.

<b>DERECE</b>	<b>KISTAS</b>
0	Supragranüler bölgede uç ve ağız kısmında granül yok.
1	Supragranüler bölgede yer yer yama tarzı granüller var.
2	Supragranüler bölgede sık ve yama tarzı granüller var.
3	Supragranüler bölgede süreklilik gösterebilen belirgin granüller var.
4	Süreklilik gösterebilen oldukça yoğun granül tabakaları var.
5	Uç ve ağız kısımları boyunca sürekli ve yoğun band tarzında granüller var.

Tablo 3.1: Supragranüler Bölge TIMM Derecelendirme Tablosu

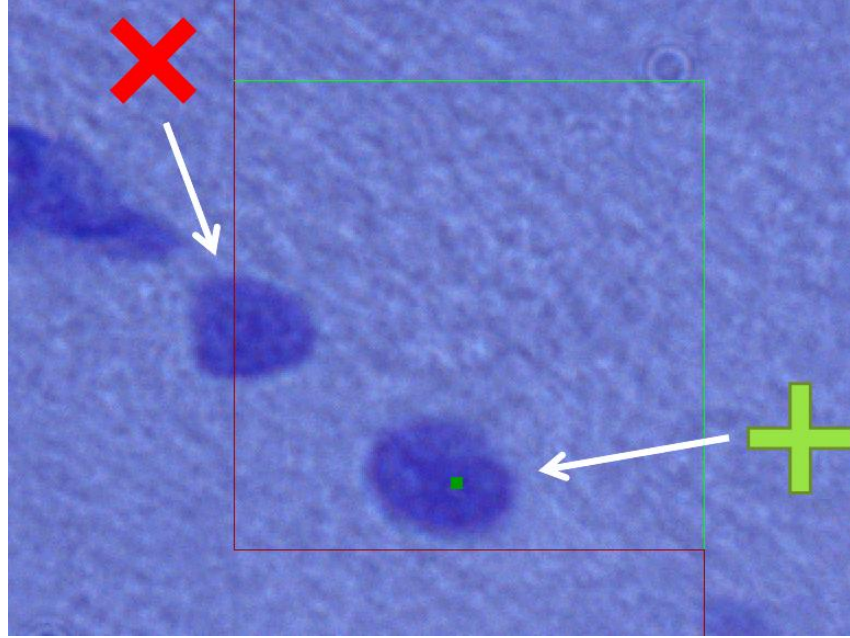
<b>DERECE</b>	<b>KISTAS</b>
0	CA3 boyunca stratum piramidale ya da stratum orienste granül yok.
1	Stratum piramidale ya da orienste yer yer yama tarzı granüller var.
2	Stratum piramidale ya da orienste yer yer ama belirgin granüller var.
3	Stratum orienste çok ve belirgin granüller var.
4	Stratum oriens ya da piramidalede süreklilik gösteren belirgin granüller var.
5	Tüm CA3 boyunca süreklilik gösteren yoğun band şeklinde granüller var.

Tablo 3.2: CA3 Bölgesi TIMM Derecelendirme Tablosu

### **3.8 Stereoloji**

Stereoloji basitçe geometrik niceliklerin kestirilmesi çalışmasıdır. İki boyutlu düzlemde gözlenen yapı veya cisimlerin üç boyutlu özelliklerini anlama ve tanımlama ile ilgili bilim dalıdır. Tüm stereolojik yöntemler “Delesse ilkesi” olarak adlandırılan basit bir kurala dayanmaktadır (Delesse 1847). Bu kurala göre rastgele seçilmiş histolojik kesitler, kesilmemiş dokunun toplam bileşimini nicel olarak temsil edebilir. Stereolojide asıl olan yansız / nesnel / rastgele örneklemedir. Kullanılan teknik “Sistemik Rastgele Örnekleme Tekniği” olarak adlandırılır. Bu teknikle incelenen yapının tüm bileşenlerine eşit olasılıkla örneklenme şansının verilmesi amaçlanmaktadır. Genel olarak beş tür nicelik stereoloji ile incelenmektedir. Bunlar; sayı, uzunluk, yüzey, hacim ve yoğunluktur. Tanecik sayımı için “Optik Diseksiyon Tekniği” kullanılmaktadır. Burada tanecik olarak belirtilen glomerül, sinaps, organel veya hücre olabilir. “Disektör Yöntemi” taneciklerin biçiminden bağımsızdır, yansızdır ve bir ön kabul gerektirmemektedir. Bu yöntem ile her tanecik yalnız bir kez örneklenebilir ve sayılabilir. Taneciklerin iki boyutlu izdüşümünden 3 boyutlu sayı verisi elde edilir. Sayım için sayılacak taneciğe ait bir bölge / bileşen (örneğin

hücre çekirdeği) referans olarak kabul edilip sayılmalıdır. Sayımlar mikroskopta “Tarafsız Sayım Çerçevesi” kullanılarak yapılır (Şekil 3.10). Bu çerçeve sondası optik disektör ile belirli bir hacimde sayım yapmamıza olanak sağlar.



Şekil 3.10: Tarafsız sayım çerçevesi

Tarafsız sayım çerçevesi ile kesitlerde sayılan parçacıklardan yoğunluk hesabı yapılmaktadır:

Örneklenip sayılan toplam hücre sayısı

İlgilenilen taneciğin sayısal yoğunluğu = -----

Sayım yapılan tüm disektörlerin toplam hacmi

$$N_V = \sum Q^- / \sum V$$

Gerek tek başına Nissl kesitlerinde gerekse zıt-boyama yapılmış TIMM kesitlerinde ardışık 10 kesitten biri sayıma dahil edilmiş ve sağ hemisfer hipokampus

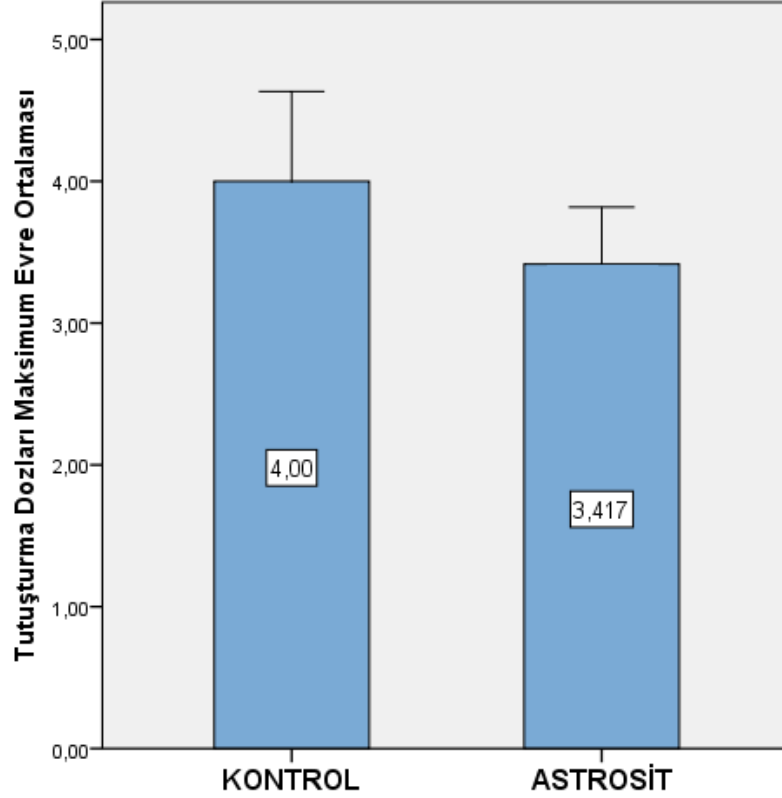
dentat girus hilusunda ve CA3 bölgelerinde nöronlar stereolojik yöntemle sayılmıştır. Sayım için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı Stereoloji Mikroskobu (Leica Microsystems) ve yazılımı (Stereo Investigator, Microbrightfield) kullanılmıştır. Kaydedilen parametrelerde sırasıyla kesit kalınlığı 30  $\mu\text{m}$ , ölçülen ortalama gerçek kesit kalınlığı 9,3  $\mu\text{m}$ , tarafsız sayım çerçevesi alanı 400  $\mu\text{m}^2$  (bir kenarı 20  $\mu\text{m}$ ), disektör sonda yüksekliği 7  $\mu\text{m}$  ve güvenlik sınırı % 10 olarak belirlenmiştir. Her bir sıçan için 8 veya 9 kesit sayılmış olup kesitlerde sayım bölgesi 1,25x büyütmede belirlenmiş, sayımlar ise 100x imersiyon objektifinde yapılmıştır. Sayım sonunda toplam sayılan hücre, toplam hacim, yoğunluk, alan ve hata katsayısı gibi değerler hesaplanmıştır.

### III. BÖLÜM

## 4 BULGULAR

### 4.1 *Tutuşturma*

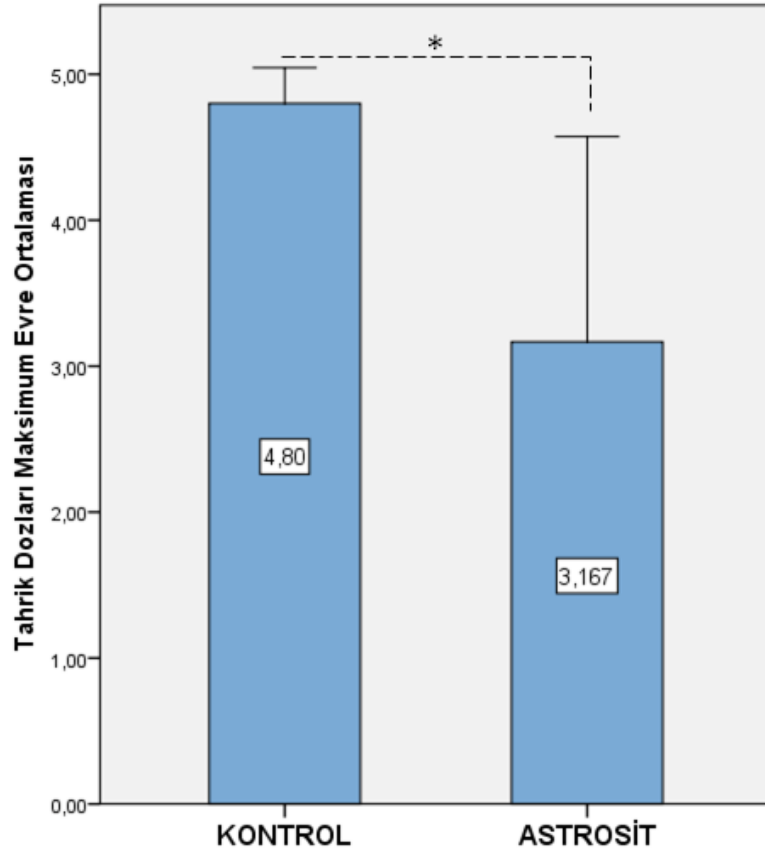
Tutuşturma d6nemi boyunca g6n aşırı tekrarlayan PTZ (35 mg/kg) uygulamalarında sıçanların en y6ksek evre g6stergesi yanında eğer evre 5 (jeneralize tonik-klonik konv6lsiyon) n6bet g6zleniyorsa n6betin başlangıç zamanı ve n6betin sonlanma s6resi not edilmiş ve gruplar arasındaki fark SPSS paket programı aracılığı ile parametrik olmayan 2 bağımsız 6rnek testi ile analiz edilmiştir (şekil 4.1).



şekil 4.1: Gruplar arasında tutuşturma d6nemi en y6ksek evre ortalamaları

Grupların ortalamaları arasındaki fark Mann-Whitney U testinde anlamlı bulunmamıştır:  $p = 0,177$

Her iki grupta da tekrarlayan PTZ uygulamaları sonucu kıstasları karşılayıp tutuşmuş kabul edilen sıçanlara stereotaksik uygulamaya alınıp ekim yapılmış ve 10 günlük bekleme döneminin ardından gün aşırı olmak üzere eşit dozlarda PTZ ile kışkırtma uygulamaları yapılmıştır. En yüksek nöbet ortalamaları iki grup arasında yine parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir .

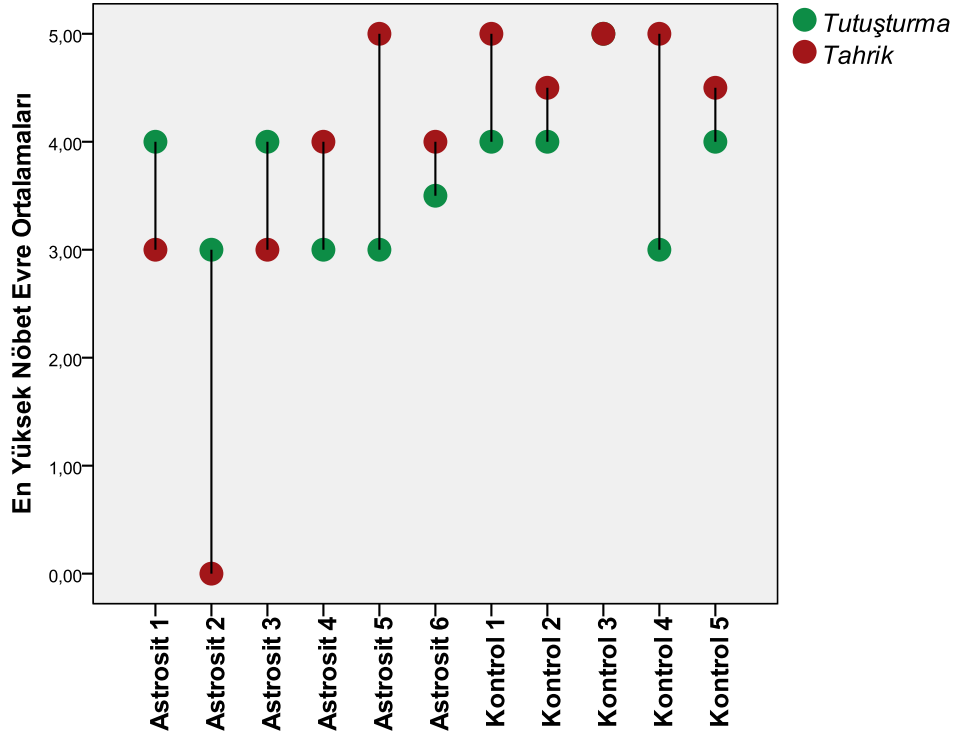


Şekil 4.2: Gruplar arasında kışkırtma dönemi en yüksek evre ortalamaları

Sonuçta astrosit grubundaki sıçanların nöbet ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük çıkmıştır:  $* = p < 0,05$  ( $p = 0,03$ )

Nöbet ortalamaları arasındaki farklar, ekim uygulaması öncesinde ya da sonrasında gözlenmiş olan, yalnızca gruplar arasındaki farklardır. Bunun yanında

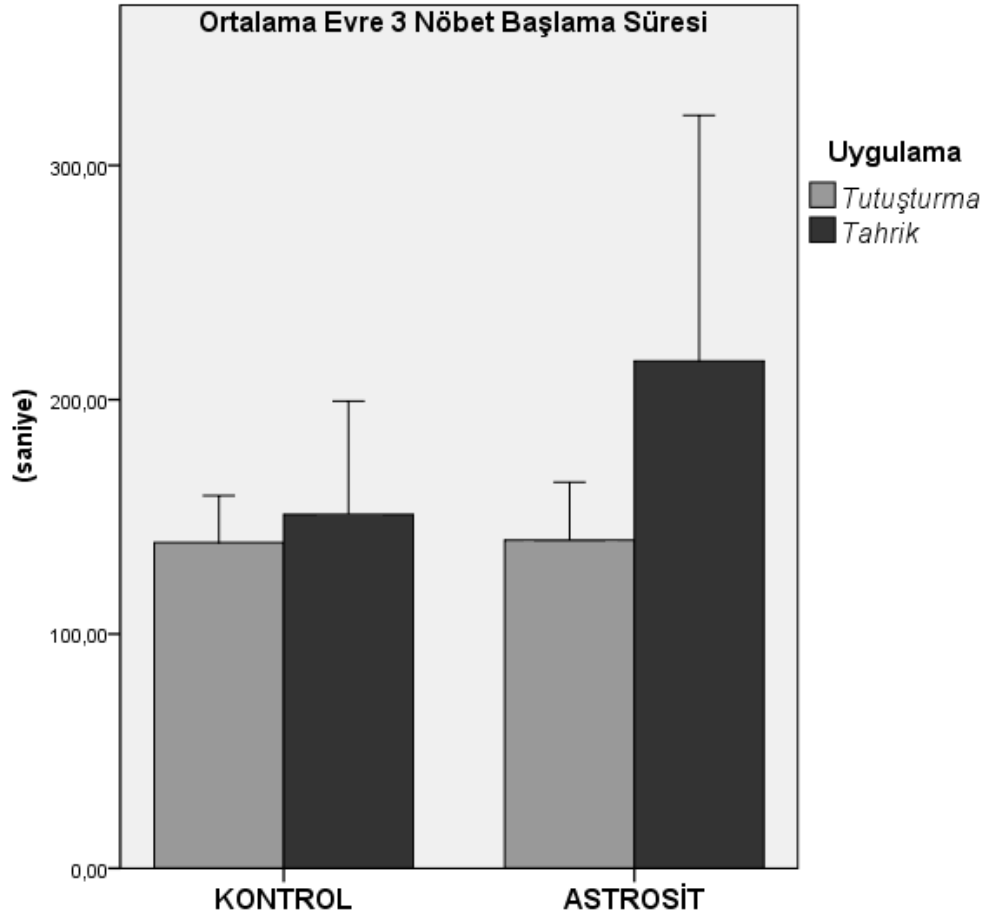
grup içerisinde, ekim uygulaması öncesi ile sonrası arasındaki değişim de önemlidir. Bu yüzden aşağıda, gruplardaki her bir denek için çizgi değişim grafiği sunulmuştur. Ekim öncesi yapılanlar tutuşturma dönemi ölçümleri, ekim sonrası yapılan ise tahrik (kışkırtma) dönemi ölçümleridir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Deneklerin ekim öncesinde ve sonrasındaki nöbet ortalamaları

Şekilde dikkat edileceği üzere kontrol grubundaki sıçanların neredeyse tamamının nöbet ortalamaları kışkırtma döneminde artış göstermiştir. Yalnızca bir denek değişim göstermemiştir ki zaten o da yüksek değer ortalamasına sahiptir. Astrosit grubundaki sıçanlarda ise kışkırtma döneminde uygulama öncesi ortalamaya göre kısmen düşüş izlenmektedir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 'de sunulan bar grafikler üzerindeki ortalama değerler grupların kendi içerisindeki değişimi hakkında fikir vermektedir.

Gruplar arasında incelenen diğ er bir parametre de, PTZ enjeksiyonunu takiben miyoklonik sıçramaların (evre 3) başlamasına kadar geçen süredir (Ş ekil 4.4). Neden bu parametrenin seçildiğine tartışma kısmında değ inilecektir.



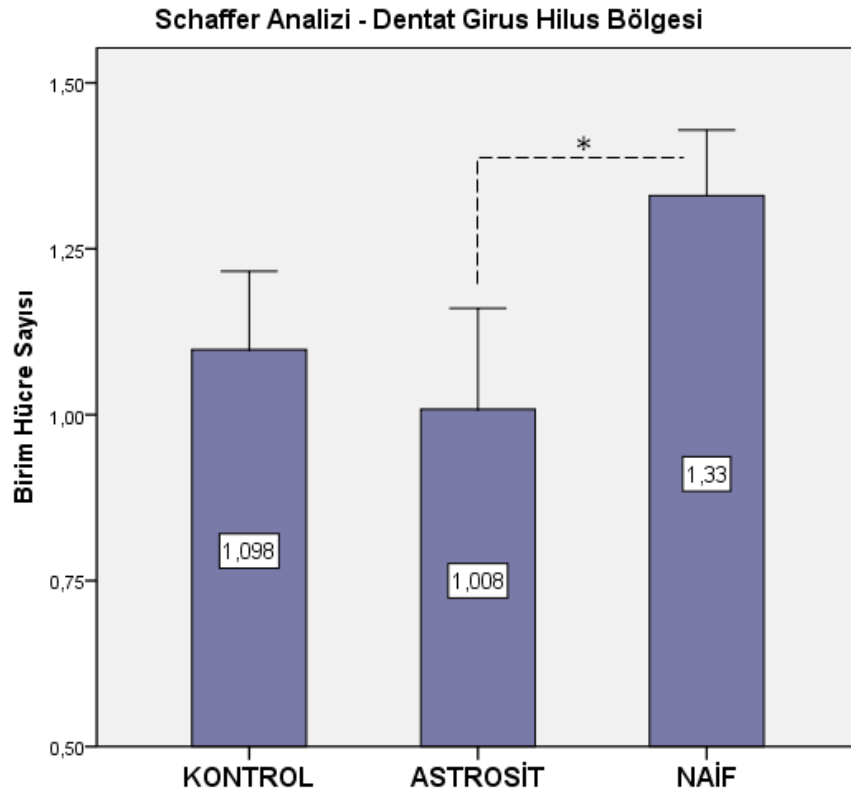
Ş ekil 4.4: Evre 3 Başlama Süresi

Miyoklonik sıçramaların başlama zamanı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur ( $p > 0,05$ ). Ancak grafik incelendiğinde ekim uygulaması öncesi grupların ortalamaları birbirine çok yakın iken, uygulama sonrasında kışkırtma dozlarında evre 3 başlangıç zamanı astrosit grubunda gecikme eğilimi göstermekte, bunun yanında istatistiksel varyansın artmış olduğu da dikkati çekmektedir.

## 4.2 Histokimya

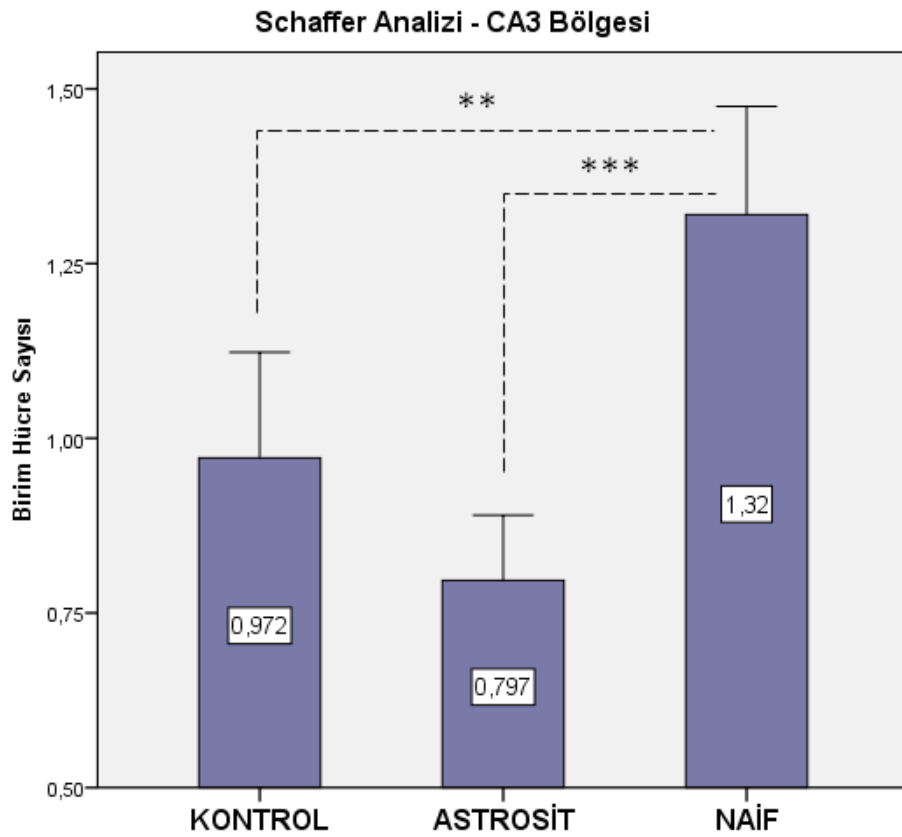
Gerek Nissl tekniği ile boyanmış kesitlerde gerekse TIMM boyaması ile nissl zıt boyaması yapılmış kesitlerde hipokampusta CA3 bölgesi ve dentat girus hilusundaki nörönler, stereolojik olarak sayılmış ve Schaffer yöntemi ile hata katsayısı da hesaba katılarak birim hacimdeki nörön yoğunluğu ölçülmüştür. Burada kontrol ve astrosit gruplarının yanında histolojik karşılaştırma yapabilmek için herhangi bir konvülsiv ajanla karşılaşmamış naif sıçanlar da değerlendirmeye katılmıştır. Sonuçlar tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edilmiş, Post-Hoc testi olarak Tukey kullanılmıştır.

### 4.2.1 Nissl Boyaması ve Hücre Sayımları



şekil 4.5: Dentat Girus Hilusunda Nörön Yoğunluğu

Dentat girus hilus hücre yoğunluğu bakımından gruplar arası fark ANOVA ile anlamlı bulunmuştur ( $F = 5,578$ ,  $p < 0,05$ ). Tukey testinde ikili gruplar arasındaki fark değerlendirildiğinde ise naif ve astrosit grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) iken kontrol grubu ile diğer iki grup arasındaki farklar anlamlılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ). Fark anlamlı olmasa da astrosit grubundaki sıçanlarda nöron yoğunluğu kontrol grubuna göre düşük durmaktadır (Şekil 4.5).



Şekil 4.6: CA3 Bölgesi Nöron Yoğunluğu

CA3 bölgesinde de dentat girus hilusundakine benzer şekilde ancak daha belirgin olarak gruplar arasındaki fark ANOVA ile anlamlı bulunmuştur ( $F = 15,791$ ,  $p < 0,001$ ). Tukey testinde ikili gruplar arasındaki farkta bu sefer her iki çalışma grubunun da naif gruba göre hücre yoğunluğu anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Tablo 4.1). Dentat girusta olduğu gibi CA3 bölgesinde de astrosit grubundaki hücre

yoğunluğunda, istatistiksel anlamlılık göstermese de kontrol grubuna göre bir düşüş göze çarpmaktadır (Şekil 4.6).

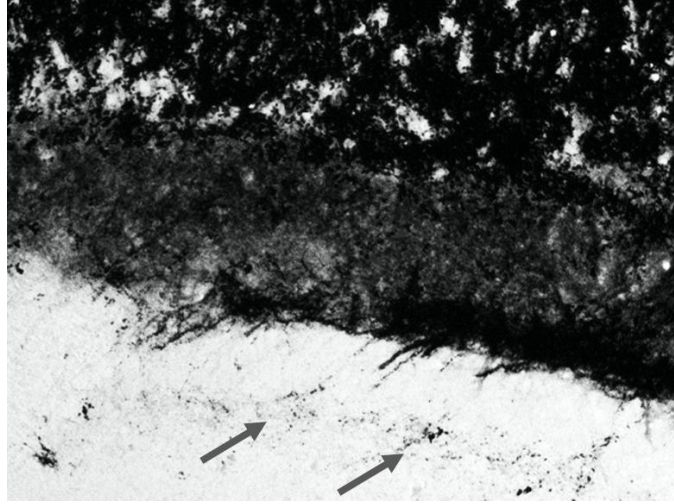
BÖLGE	GRUPLAR	Kontrol	Astrosit	Naif
CA3	Kontrol	-	0,154	<b><u>0,01</u> **</b>
	Astrosit	0,154	-	<b><u>0,001</u> ***</b>
	Naif	<b><u>0,01</u> **</b>	<b><u>0,001</u> ***</b>	-
Dentat Girus	Kontrol	-	0,601	0,095
	Astrosit	0,0601	-	<b><u>0,016</u> *</b>
	Naif	0,095	<b><u>0,016</u> *</b>	-

Tablo 4.1: Hipokampusta nöron yoğunluğunun bölgelere göre gruplar arası istatistiksel karşılaştırması

#### 4.2.2 TIMM Boyaması

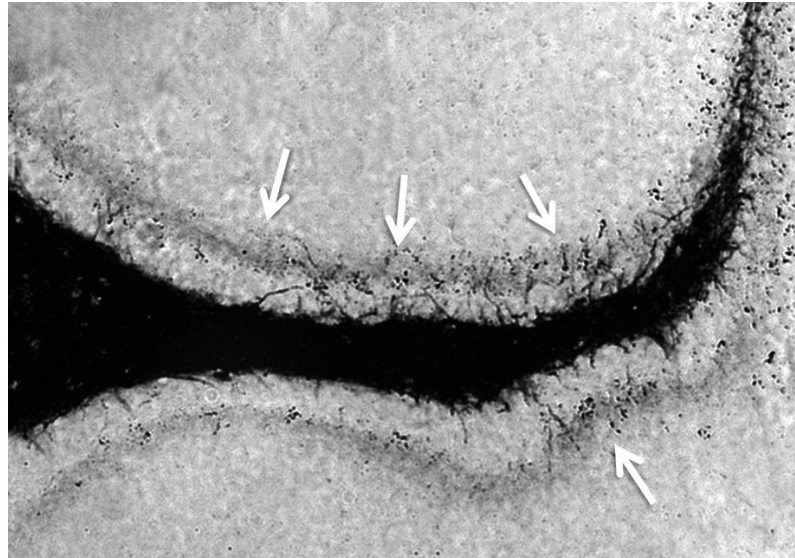
Her ne kadar gereç ve yöntem kısmında TIMM boyamasının semi-kantitatif derecelendirilmesinden söz edilmiş olsa da bu bölümde sonuçların kalitatif değerlendirilmesine yer verilmiştir. Bu uygulamadaki gerekçe naif ve ekim grupları arasındaki farkın bir anlamlılık testini gerektirmiyor olması, öte yandan uygulama yapılmış kontrol ve astrosit grupları arasında ise uygulamaya bağlı herhangi bir fark gözlenmemiş olmasıdır.

TIMM değerlendirmesinde CA3 ve supragranüler bölge değerlendirildiğinde CA3 bölgesindeki tutulumun çok daha belirgin olduğu gözlenmektedir. Öte yandan tutulum yoğunluğu ile ilgili olarak gerek grup içerisindeki denekler arasında, gerekse aynı deneğin farklı seviyelerdeki kesitleri arasında varyasyonlar gözlenebilmektedir.



Şekil 4.7: Dentat girus moleküler tabakada seyrek TIMM granülleri

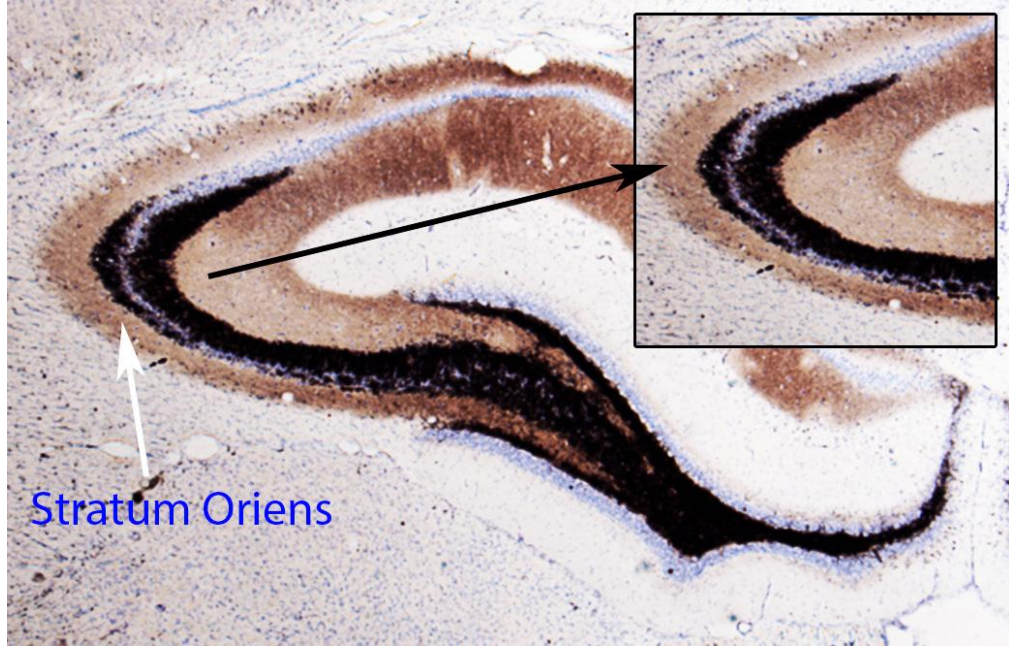
Bu varyasyonlar supragranüler bölgede derece 1-2 tutulumlar yanında (Şekil 4.7) özellikle uç kısımlarda süreklilik gösterebilen derece 3-4 tutulumlar olabilmektedir (Şekil 4.8).



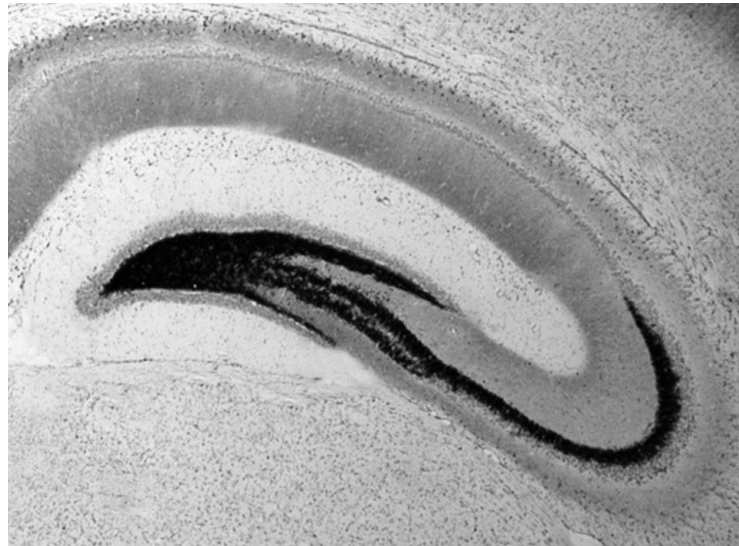
Şekil 4.8: Supragranüler bölgede süreklilik gösteren belirgin granüller

Kesitlerde hem kontrol hem de astrosit grubunda en dramatik gözlenen tutulum CA3 bölgesinde görülmüştür. Bu her zaman tüm CA3 boyunca gözlenmese de özellikle CA1'e yakın bölgede stratum orienste yoğun band halinde derece 4-5 tutulumlar sıklıkla gözlenmiştir (Şekil 4.9). Şekilde tutulumun sadece stratum

orienste olmadığı, ayrıca CA3 boyunca piramidal tabaka boyunca uzandığı da seçilmektedir. Tutulumun şiddeti gereç ve yöntem kısmında örnek olarak sunulmuş normal (naif sıçan) TIMM boyaması (Şekil 4.10) ile kıyaslandığında daha net görülmektedir.



Şekil 4.9: CA3 Stratum oriens'te yoğun tabakalı TIMM granülleri (derece 5)



Şekil 4.10: Naif bir sıçan hipokampus TIMM histokimyası

## IV. BÖLÜM

### 5 TARTIŞMA

Bulguları değerlendirmeye başlamadan önce çalışmanın hipotezini ( $H_0$ ) tekrar gözden geçirmek, hipotezin doğru kabul edilebileceği ya da reddedilip alternatif hipotezin ( $H_1$ ) kabul edilebileceği senaryolara değinmek ve bulguları bu bakış açısını koruyarak irdelemek daha doğru olacaktır.

Giriş ve genel bilgiler kısmında değinildiği üzere varsayımlarımızda, literatürün de desteklediği şekilde epileptojenez sürecinde astrositlerin rolü olduğu ve epileptik odakta, özellikle de mesial temporal lob epilepsisinde sıklıkla gözlenebilen hipokampal sklerozun ve buna eşlik eden astrogliosis'in yapısında işlevleri bozulmuş patolojik astrositlerin olduğu kabul edilmiştir. Bu kabullerden yola çıkarak, ampirik bir yaklaşımla, sağlıklı örneklerden alınıp kültür ortamında geliştirildikten sonra hipokampusa stereotaksik yöntemle ekilen astroglial hücrelerin, konağın kendi astrositlerinden kaynaklanan görev boşluğunu üstlenebileceği ve bunun da nöbet eşiğini tekrar yükseltebileceği iddia edilmiştir. Bu iddia astrosit transplantasyonunu kesinlikle bir tedavi seçeneği olarak sunmamakta, yalnızca patofizyolojik mekanizmanın anlaşılmasında bir araç olarak kullanılmaktadır. Bulguların yorumlanmasında bu durum göz ardı edilmemelidir.

Çalışmanın sonuçları iki ana başlık altında sunulmuştur. Tutuşturma ile ilgili kısımda grupların nöbet eşiğine dair veriler yer almakta, histokimya kısmında ise özellikle epileptojenezin kabahatlarından nörodejenerasyon ve neo-sinaptojenez (ya da sinaptik plastisite) ile ilgili sonuçlar sunulmaktadır.

Tutuşturma d6neminde gruplarımız için PTZ n6bet-altı dozu olarak 35 mg/kg belirlenmiştir. Literat6rde bunun farklı 6rnekleri g6r6lmektedir. Genellikle dozlar 30 mg/kg ile 40 mg/kg arasında değişmektedir. Burada karar mekanizmasını ağrılıkla 6n çalışmalar oluşturmaktadır. İlginçtir ki, aynı kabul edilen t6r için farklı kaynaklardan elde edilen sıçanlar arasında, hatta aynı grubun bireyleri arasında bile doz-yanıt ilişkisi belirgin farklılıklar g6stermektedir. Bu çalışmaya ait 6n çalışmada da 6nce 38 mg/kg doz denenmiş, sıçanların fazla duyarlı olmasından dolayı 35 mg/kg doza geçilmiştir. Tutuşturma ile ilgili s6z edilmesi gereken bir diğer 6nemli nokta tutuşturma protokol6d6r. Bu noktada da literat6rde çeşitlilik s6z konusudur. Bazı gruplar, PTZ dozlarını uygulamaya başladıktan sonra, kriterleri sağlayan sıçanları s6re tamamlanmamış bile olsa çalışma gruplarına almakta, bazıları tutuşturulmuş sıçanlar için farklı kıstaslar 6retmekte, bazı gruplar da toplam ilaç enjeksiyon sayısı ve kışkırtma dozu protokollerinde farklı uygulamalar getirmektedir. Bu konuya dikkat çekilmesinin nedeni aslında literat6rdeki sonuçlara da eleştirel bir bakış açısı sunmaktır. Çok iyi bilinmektedir ki bireyler arası farklar ilaç uygulamalarında doz-yanıt ilişkisi bakımından 6nemli sorunlar yaratmakta ve bu durumu aşmak için genellikle denek sayısı artırılıp varyans d6ř6r6lmeye çalışılmaktadır. Bu istatistiksel olarak doğru bir yaklaşım olsa da PTZ ile ilgili çalışmalarda olduğu gibi duyarlılaştırma d6neminde tutuşturma kriterlerini sağlamış her deneğin eşit kabul edilip çalışmaya alınması tartışılması gereken bir konudur. 6rneğin bir sıçan ilk 6 uygulama içerisinde şiddetli n6bet geçirip (evre 4-5) hemen çalışma grubuna alınıyorsa, diğer bir sıçan ise aynı kriterleri ancak 14 uygulama sonunda zar zor karşılıyıp 6yle çalışma grubuna alınıyorsa, bu iki deneğin aynı şartlarda değerlendirilmesi açıkçası sağlıklı olmayacaktır. Bu nedenle bu çalışmada sıçanlar, tutuşturma d6nemi boyunca g6sterdikleri n6bet 6r6nt6s6 açısından da

karşılaştırılmışlardır. Şekil 4.1'de kontrol ve astrosit grubundaki sıçanların duyarlılaştırma süreci boyunca her PTZ uygulaması sonrası gözlenen en yüksek nöbet evrelerinin ortalamaları karşılaştırılmaktadır. Astrosit grubunun ortalaması kontrol grubuna göre bir miktar düşüktür ancak istatistiksel analiz gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Bu da istenilen ve beklenen bir durumdur. İki grup belirli bir uygulama sonrası karşılaştırılacaksa uygulama öncesi aralarında bireysel farklılıklar en az düzeyde olmalıdır. Bu nedenle gruplar yalnızca kışkırtma dozlarına verdikleri yanıtlar yönünden karşılaştırılmamış, bunun yanında fikir vermesi açısından değişim grafiği de çizilmiştir (Şekil 4.3). Değişim grafiği istatistiksel bir sonuç değil görsel bir geri bildirim sağlamaktadır. Bu grafiğe göre astrosit grubundaki sıçanların nöbet evrelerine bakıldığında ekim uygulamasından, kontrol grubuna oranla daha fazla yarar görüldüğü izlenmektedir. Tutuşturma ve kışkırtma dönemlerine ait bar grafiklerinde verilen ortalamalardaki değişim de bu izlenime destek sağlamaktadır.

Elbette ki hipoteze göre gerçek farkın kışkırtma dozu ile ortaya çıkması gerekir ki zaten kışkırtma dozlarında evre ortalaması, gruplar arasında astrosit grubunun lehine olacak şekilde anlamlılık göstermektedir (Şekil 4.2). Grafikte standart hata astrosit grubunda yüksektir ancak anlamlılığı etkilememiştir. Çalışmanın tekrarında gruplardaki denek sayısı artırılarak varyans düşürülebilir ve standart hata da daha alt düzeylere çekilebilir. Açıkçası eğer hipotez doğru ise olması gereken bu farkın daha da belirgin ortaya çıkmasıdır. Ancak burada hemen yönteme dönüp astrositlerin süreçteki yolculuğu, eleştirel bir bakış açısıyla irdelenmelidir. Astrositler 1-2 günlük yeni doğan sıçanlardan elde edilmekte, kültür ortamında geliştirilmekte ve stereotaksik yolla başka bir sıçana ekilmektedir. Yani uygulanan teknik allotransplantasyon, astrositler de allograft olmaktadır. Her ne kadar

laboratuvar deneyleri için üretilen sıçanların çok yakın genetik özelliklere sahip olduğu kabul edilse de, sonuçta iki ayrı birey arasındaki organ, doku ya da hücre transplantasyonu, bağışıklık sisteminin saldırısına açıktır. İnsandaki ve çoğu zaman hayvanlardaki transplantasyonlarda bu sorunun önüne geçmek için immün-süpresif tedavi ek olarak uygulanmaktadır. Bu çalışmada ise immün-süpresyon uygulanmamıştır. Bu durum ektiğimiz astrositlerin en azından bir kısmının dokudaki inflamatuvar yanıt sonucu tahrip olmuş olabileceğini akla getirmektedir. İmmün-süpresyon uygulanmamasının nedeni, kullanılan ajanın kendisinin anti-konvülsiv etkilerinin olabileceği ve bunun da sonuçların yanlı çıkmasına neden olabileceği gerçeğidir. Astrositlerin dokuya ekilmesinde kullanılan enjektörün de, çapı ne kadar küçük olursa olsun, doku hasarına neden olduğu açıktır. Özellikle kan-beyin bariyerinin bozulması epileptojenezde suçlanan mekanizmalardan birisidir (Friedman, Kaufer et al. 2009). Bir diğer konu da ektiğimiz astrositlerin dokuda görev yapıp yapamayacağıdır. Ekilen astrositlerin bir kısmı ekim sonrası gerek travmatik olarak gerekse bağışıklık yanıtıyla olasılıkla tahrip olmaktadır. Buna rağmen literatür çalışmaları hatırı sayılır oranda astrositin sağ kaldığını ve dokuya tutunabildiğini göstermiştir (Lepore, Rauck et al. 2008).

Nöbet izlemlerinde olabildiğince çok parametre kayıt edilmeye çalışılmıştır. Bireysel farklılıklar yüzünden uygulamalarda kaydedilen bir parametrede sıçanların tümü bir değer göstermeyebilir. Örneğin çalışmada her uygulamada evre 5 gözlenmediği için belirli bir sıçandan alınan kayıtlarda kimi zaman evre 5 süresi ya da başlangıç zamanı verileri eksik kalmaktadır. Bu da zaten sınırlı olan denek sayısının yanında ölçülebilir veri sayısında da sorun teşkil edebilmektedir. Her zaman olmasa da çoğu zaman gözlenebilen nöbet, evre 3'tür. Tespiti evre 1 ve 2'ye göre daha kolaydır ve tek yapılması gereken ilaç uygulamasının ardından ilk

myoklonik sıçrama gözlenen zamana kadar geçen süreyi kaydetmektir. Şekil 4.4' te her iki grubun bu parametre açısından karşılaştırmasında görüldüğü gibi, özellikle ekim öncesi gruplar arası fark neredeyse yoktur, hatta aynı denebilir. Uygulama sonrası astrosit grubunda başlangıç süresi kontrol grubuna göre gecikme göstermekle beraber, varyanstaki artış nedeniyle istatistiksel anlam yakalanamamıştır. Burada da daha önce söylendiği gibi tekrarlayan çalışmalarda denek sayısının artırılması ile farkın belireceğine inanılmaktadır.

Histokimya çalışmalarında deneklerde nörodejenerasyon ve sinaptik plastisite gibi faktörler irdelenmiştir. Nöron yoğunluğu için çalışılan bölgeler CA3 ve dentat girus hilus bölgesidir. Aslında hipokampal sklerozda en fazla nöron kaybı, en duyarlı olan bölgede yani CA1 bölgesindeki piramidal nöronlarda gözlenmektedir. CA1 bölgesini CA3 ve dentat girus hilus bölgeleri izlemektedir (Schwartzkroin 2009). CA1 bölgesi yosunsu liflerin hedef bölgesi değildir. Bu bölge ağırlıklı olarak CA3 bölgesinden Schaffer kollaterallerini alır. CA1 bölgesindeki sinaptik plastisite burada uyguladığımız TIMM tekniğinde gözlenemediği için bu bölge sayım dışı bırakılmıştır. Sonuçlar beklendiği üzere naif sıçanlara göre her iki grupta da düşük çıkmıştır. Temporal lob epilepsisinin önemli belirtilerinden olan hipokampal skleroz, nöron kaybı ve astrogliosis ile birlikte ve oluşturduğumuz modellerde de bu doğrulanmıştır. Ancak burada dikkatten kaçmaması gereken kısım kontrol ve astrosit grupları arasındaki farktır. Bu fark istatistiksel bir anlam göstermemektedir ancak her iki bölgede de astrosit grubunda düşüş gözlenmektedir. Bu çalışmanın öncesinde bu sonucu destekleyen ya da reddeden herhangi bir önermemiz olmamıştır. Bu nedenle bu sonucu yöntemle ilişkilendirmek daha doğru olacaktır. İmmün-süpresyon uygulanmadığı için ekilen astrositlerin lokal olarak bir inflamasyon oluşturması, ortaya çıkan sitokinlerin bağışıklık hücrelerini ortama çekmesi, dokuda nöron

hasarına yol açmış olabilir. Özellikle yosunsu liflerin en yoğun olarak geçtiği bölge olan dentat girus hilusunda, inflamasyona bağlı ayrıca aksonlarda hasar oluşması, gerek hilusta gerekse bu aksonların sinaps yaptığı CA3 piramidal nöronlarında nörodejenerasyona yol açabileceği düşünülebilir. Bu aşamada yapılacak dahi ileri yorumlar spekülatifdir. Bu nedenle bu farkın tekrarlayan bir çalışmada, daha çok denekle ve yalnız nissl tekniği kesitlerinde doğrulanması, eğer mümkünse immünohistokimya çalışmaları ile desteklenmesi şarttır.

TIMM boyamasının değerlendirmesi, gereç ve yöntem kısmında da değinildiği gibi semi kantitatif olarak hesaplanmaktadır (Schwartzkroin 2009). Bu çalışmada, plastisite açısından kontrol ve astrosit grupları arasında bir fark gözlenmemektedir. TIMM boyamasında gözlenen siyah granüller aslında yosunsu (mossy) liflerin sinaps yaptığı glutamaterjik akson sonlanmalarıdır. Bu sinaps sonlarında vezikül içerisindeki yüksek oranda bulunan çinko, bu boyama ile görünür hale getirilmektedir. Çalışmamızda en belirgin tutulum CA3 bölgesinde, stratum oriente gözlenmektedir. Birçok farklı epilepsi modeli ile yapılan çalışmalar incelenirse farkedilecektir ki, tutulumlar genellikle supragranüler bölgede belirgindir ve şiddetine göre moleküler tabakada bir band oluşturur. Ancak bu durum hemen tamamen kullanılan yöntemle bağlıdır. Örneğin kainik asit ile tutuşturulmuş sıçanlarda bu sözü edilen durum geçerliken, PTZ ile yapılan tutuşturma modelinde tutulum daha az şiddetli olmakta ve supragranüler bölgede seyrek, CA3 bölgesinde yoğun olarak görülmektedir (Schwartzkroin 2009). Bu bilgiler ışığında sonuçlarımızda sıra dışı bir durum görülmediği rahatlıkla söylenebilir.

## V.BÖLÜM

### 6 SONUÇ

Bu tez çalışmasının sonucunda elde edilen bulguların tezin hipotezi ile büyük oranda örtüştüğü söylenebilir. Kışkırtma dozu uygulamalarında astrosit grubunun lehine gruplar arası anlamlı fark olması, ekilen astrositlerin öngörüldüğü gibi ekstrasinaptik glutamatın uzaklaştırılmasında faktör olabileceğini, gruplardaki denek sayılarının artırılması ile daha düşük varyanslarda sonuçlar elde edebileceğimizi düşündürmektedir. Histolojik sonuçlar da en azından hipotezimizle çelişmemektedir. Oluşturduğumuz temporal lob epilepsi modeli sıçanlarda hipokampal sklerozun belirtileri olan nöron kaybı ve yosunsu liflerde filizlenmenin var olması, literatür bilgisi ile uyumludur ve modelin geçerli olduğuna işaret eder. Astrosit grubundaki hücre sayılarında gözlenen düşme eğilimi, her ne kadar istatistiksel anlam göstermese de düşündürücüdür ve yöntemde kafa yormamızı, özellikle de astrosit ekimi ile neden olduğumuz bağışıklık yanıtını alternatif yollar bularak kontrol altına almamız gerekebileceğini göstermektedir. Kalitatif olarak sunulmuş olan plastisite bulgularının (TIMM) astrosit ve kontrol grupları arasında fark göstermemiş olması da sağlıklı bir sonuçtur, çünkü plastik değişimler hücre ve vasat ekiminden önceki konvülsiv ajan uygulamalarına bağımlı olmalıdır. Ekim sonrası, 10 günlük doz uygulaması olmayan bir dönemde gruplar arası bir fark belirmesi ya da geriye dönüş olması ne beklenebilir, ne de öngörülebilir.

Bu çalışma güncel literatür değerlendirildiğinde başka örneği bulunmayan, gerek hipoteze yaklaşımı gerekse yorumlanması sonuçları itibari ile hipotezi tatmin etse de yöntem açısından denetlenmesi, eklenmesi ya da değiştirilmesi gereken birçok parametre bulunmaktadır. Bu ampirik çalışmanın devamında bu çalışmadan

elde edilen bilgi ve deneyimler, epileptojenez ile ilgili sorularımıza daha kuvvetli, ve ayırım gücü yüksek yanıtlar almamızda kesinlikle bize yol gösterecektir.

## VI. BÖLÜM

### 7 ÖZET - SUMMARY

#### EPİLEPSİ ETYOGENEZİNDE "DENEYSEL KONVÜLSİYON-NÖRAL PLASTİSİTE-KONVÜLSİYON" BAĞINTISININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Vedat EVREN  
Doktora Tezi, E.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gönül Ö. PEKER  
EKİM 2010

Epilepsi toplumda % 1 oranında oranında görülen ve tekrarlayan istemsiz nöbetlerle karakterize bir nörolojik durumdur. Epilepsi tedavisi bugün için yalnızca nöbetlerin kontrol altına alınmasını, ileri vakalarda epileptik odağın cerrahi rezeksiyonunu gerektirmektedir. En sık karşılaşılan ve ilaca en dirençli türü temporal lob epilepsisidir (TLE). TLE olgularında sıklıkla hipokampal örneklerde skleroz, nöron kaybı ve astrogliosis izlenir. Astrositler bugün yalın destek hücre tanımından sıyrılmış ve sinir sisteminin işleyişinde aktif rol aldığı gösterilmiştir. Epilepsinin oluşum süreci olan epileptojenez bugün için aydınlatılamamıştır ancak süreçte astrositlerin rolü daha sık tartışılır olmuştur. Çalışmamızda epileptojenez sürecinde astrositlerin hasar gördüğü ve işlevlerinin bozulduğu, bu nedenle ampirik yaklaşımla hipokampusa sağlıklı astrosit ekilmesinin nöbet eşliğini düşüren artmış ekstraselüler glutamat ve potasyum gibi faktörlerin etkisini azaltacağını ve nöbet eşliğinin tekrar yükseldiğini göstererek astrositlerin mekanizmada rol aldığını göstermeyi amaçladık.

Çalışmada PTZ ile tutuşturulmuş sıçanlar kullanılmıştır ( 35 mg / kg, IP). Duyarlılaşma süreci sonunda kontrol grubunda (n=5) hipokampusa kültür vasatı, astrosit grubunda ise (n=6)  $7 - 8 \times 10^4 / \mu\text{l}$  astroglial hücre ekilmiştir. Ekimi takiben 10 gün sonra gün aşırı 2 kışkırtma uygulaması yapılmış ve maksimum nöbet ortalamaları ile evre 3 nöbetin görülme süresi açısından gruplar karşılaştırılmıştır. Nöbet değerlendirmesi ardından gümüş-sülfid çökeltme tekniğine uygun olarak perfüze edilen sıçanların beyinlerinde 30  $\mu\text{m}$  kesitler alınarak nissl ve TIMM boyamaları gerçekleştirilmiştir. Kesitlerde CA3 ve dentat hilar bölgelerde nöronlar stereolojik yöntemle (StereoInvestigator, MBF) sayılmıştır.

Sonuçlarda astrosit grubunda kışkırtma dozunda maksimum gözlenen nöbet ortalaması kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük çıkmış, evre 3 başlama zamanında da belirli bir uzama gözlenmiştir. Hem kontrol hem astrosit gruplarında normal sıçanlara göre CA3 bölgesinde daha belirgin olacak şekilde nöron kaybı görülmüştür. TIMM boyaması da hem kontrol grubunda hem de astrosit grubunda normal sıçanlardan tamamen farklı olarak aksonal filizlenme (CA3 stratum oriente belirgin olarak) izlenmiştir.

Çalışmanın sonuçları tezin önermesi ile uyumaktadır ve tekrarlayan çalışmalarda daha yüksek denek sayısı ve daha düşük varyans ile tespit edilememiş farkların anlamlı hale gelebileceği düşünülmüştür.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Epilepsi, nöbet, tutuşturma, astrosit, glutamat, aksonal filizlenme

[vedat.evren@ege.edu.tr](mailto:vedat.evren@ege.edu.tr)

**INVESTIGATION OF “EXPERIMENTAL CONVULSION – NEURAL  
PLASTICITY – CONVULSION” RELATIONSHIP IN THE ETIOGENESIS  
OF EPILEPSY**

Dr. Vedat EVREN  
PhD Thesis, E.U.F.M Dept. of Physiology  
Supervisor: Prof. Dr. Gönül Ö. PEKER  
OCTOBER 2010

Epilepsy is a common neurological syndrome with a 1 % prevalence rate and characterized by recurrent unprovoked spontaneous seizures. There is no cure for epilepsy and the therapeutic approach only provides seizure control. In some resistant cases surgery may also be necessary. The most commonly seen and medically resistant form of epilepsy is the temporal lobe epilepsy (TLE). Hippocampal specimens obtained from TLE shows marked sclerosis with loss of neurons and astrogliosis. Until recently, the prevailing view regarding the astrocytes was that the astrocytes are supportive glial components in the neural tissue. This view has changed for some time and astrocytes have shown to be involved actively in the functioning of the nervous system. The mechanisms underlying the epileptogenesis are yet to be identified; however the role of astrocytes is discussed more and more in the process. With the assumption of disfunctioning and damaged astrocytes causing hyperexcitability of the neural tissue by means of impaired glutamate and potassium uptake from extracellular matrix, we claim that the transplantation of healthy astrocytes into the hippocampus could result in an increase of seizure threshold.

We used TLE model to test our hypothesis and the TLE model was achieved by repetitive injections of PTZ (35 mg / kg, ip). At the end of the kindling process

the control group (n = 5) received culture medium and the astrocyte group (n = 6), received  $7 - 8 \times 10^4 / \mu\text{l}$  astroglial cells via stereotaxic method into the hippocampal dentate gyrus. 10 days after the application, two challenge PTZ doses were applied one day apart and the maximum seizures were scored and compared between the groups. After the seizure assessment, the rats were perfused in accordance with the silver-sulfide precipitation technique and 30  $\mu\text{m}$  sections of brains were obtained for nissl and TIMM staining. CA3 and dentate hilar areas in sections were counted for neurons by stereological methods (StereoInvestigator, MBF).

Comparison of the mean of maximum observed seizure stages between groups during challenge period shows significantly lower result in astrocyte group than the control group with a slight extension of seizure 3 start time. Both groups represent significant neuron loss in dentate gyrus hilus and CA3 subregion compared to the naive rats. TIMM staining also demonstrates prominent axonal sprouting in the control and astrocyte groups that is most profound in CA3 stratum oriens.

The results of the study are consistent with the hypothesis of the thesis in terms of seizure threshold and mossy fiber sprouting. The reproduction and extension of this study with larger experimental groups could provide lower variances and stronger significant results.

**KEYWORDS:** Epilepsy, seizure, kindling, astrocyte, glutamate, mossy fiber sprouting

vedat.evren@ege.edu.tr

## VII. BÖLÜM

### 8 KAYNAKLAR

1. Abdullaev, I. F., A. Rudkouskaya, et al. (2006). "Pharmacological comparison of swelling-activated excitatory amino acid release and Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat astrocytes." J Physiol **572**(Pt 3): 677-89.
2. Akaike, N., K. Hattori, et al. (1985). "Bicuculline and picrotoxin block gamma-aminobutyric acid-gated Cl<sup>-</sup> conductance by different mechanisms." Experientia **41**(1): 70-1.
3. Amaral, D. G. (1978). "A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat." J Comp Neurol **182**(4 Pt 2): 851-914.
4. Amaral, D. G., N. Ishizuka, et al. (1990). "Neurons, numbers and the hippocampal network." Prog Brain Res **83**: 1-11.
5. Amaral, D. G. and J. Kurz (1985). "An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat." J Comp Neurol **240**(1): 37-59.
6. Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." Neuroscience **31**(3): 571-91.
7. Amiry-Moghaddam, M., A. Williamson, et al. (2003). "Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13615-20.
8. Andersen, P., T. V. Bliss, et al. (1969). "Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways." Acta Physiol Scand **76**(1): 4A-5A.
9. Andersen, P., A. F. Soleng, et al. (2000). "The hippocampal lamella hypothesis revisited." Brain Res **886**(1-2): 165-171.
10. Angulo, M. C., A. S. Kozlov, et al. (2004). "Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus." J Neurosci **24**(31): 6920-7.

11. Annegers, J. F., W. A. Rocca, et al. (1996). "Causes of epilepsy: contributions of the Rochester epidemiology project." Mayo Clin Proc **71**(6): 570-5.
12. Araque, A., V. Parpura, et al. (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." Trends Neurosci **22**(5): 208-15.
13. Aronica, E., E. A. van Vliet, et al. (2000). "Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy." Eur J Neurosci **12**(7): 2333-44.
14. Attwell, D., B. Barbour, et al. (1993). "Nonvesicular release of neurotransmitter." Neuron **11**(3): 401-7.
15. Attwell, D. and S. B. Laughlin (2001). "An energy budget for signaling in the grey matter of the brain." J Cereb Blood Flow Metab **21**(10): 1133-45.
16. Balcar, V. J. and G. A. Johnston (1972). "The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices." J Neurochem **19**(11): 2657-66.
17. Becker, A., G. Grecksch, et al. (2000). "Pentylentetrazol-kindling modulates stimulated dopamine release in the nucleus accumbens of rats." Pharmacol Biochem Behav **66**(2): 425-8.
18. Bergersen, L., A. Rafiki, et al. (2002). "Immunogold cytochemistry identifies specialized membrane domains for monocarboxylate transport in the central nervous system." Neurochem Res **27**(1-2): 89-96.
19. Bergersen, L. H., P. J. Magistretti, et al. (2005). "Selective postsynaptic co-localization of MCT2 with AMPA receptor GluR2/3 subunits at excitatory synapses exhibiting AMPA receptor trafficking." Cereb Cortex **15**(4): 361-70.
20. Bernardino, L., S. Xapelli, et al. (2005). "Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures." J Neurosci **25**(29): 6734-44.
21. Bernath, S. and M. J. Zigmond (1988). "Characterization of [3H]GABA release from striatal slices: evidence for a calcium-independent process via the GABA uptake system." Neuroscience **27**(2): 563-70.

22. Bezzi, P., V. Gundersen, et al. (2004). "Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate." Nat Neurosci **7**(6): 613-20.
23. Binder, D. K. and C. Steinhauser (2006). "Functional changes in astroglial cells in epilepsy." Glia **54**(5): 358-68.
24. Borges, K., D. McDermott, et al. (2006). "Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus." Exp Neurol **201**(2): 416-27.
25. Boss, B. D., G. M. Peterson, et al. (1985). "On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat." Brain Res **338**(1): 144-50.
26. Bowery, N. G., A. L. Hudson, et al. (1987). "GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system." Neuroscience **20**(2): 365-83.
27. Brusa, R., F. Zimmermann, et al. (1995). "Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice." Science **270**(5242): 1677-80.
28. Burger, P. M., E. Mehl, et al. (1989). "Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate." Neuron **3**(6): 715-20.
29. Bush, T. G., N. Puvanachandra, et al. (1999). "Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice." Neuron **23**(2): 297-308.
30. Campbell, S. L. and J. J. Hablitz (2004). "Glutamate transporters regulate excitability in local networks in rat neocortex." Neuroscience **127**(3): 625-35.
31. Claiborne, B. J., D. G. Amaral, et al. (1986). "A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus." J Comp Neurol **246**(4): 435-58.
32. Cohen-Gadol, A. A., J. W. Pan, et al. (2004). "Mesial temporal lobe epilepsy: a proton magnetic resonance spectroscopy study and a histopathological analysis." J Neurosurg **101**(4): 613-20.

33. Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, et al. (1990). "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling." Science **247**(4941): 470-3.
34. Crawford, I. L. and J. D. Connor (1973). "Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fibre pathway." Nature **244**(5416): 442-3.
35. Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol **65**(1): 1-105.
36. Dani, J. W., A. Chernjavsky, et al. (1992). "Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks." Neuron **8**(3): 429-40.
37. de Lanerolle, N. C., J. H. Kim, et al. (2003). "A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories." Epilepsia **44**(5): 677-87.
38. de Lanerolle, N. C. and T. S. Lee (2005). "New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy." Epilepsy Behav **7**(2): 190-203.
39. De Simoni, M. G., C. Perego, et al. (2000). "Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus." Eur J Neurosci **12**(7): 2623-33.
40. Delesse, M. A. (1847). Proce'de' me'canique pour de'terminer la composition des roches. Paris, C. R. Acad. Sci.
41. During, M. J. and D. D. Spencer (1993). "Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain." Lancet **341**(8861): 1607-10.
42. Duvernoy, H. M. (2005). The human hippocampus : functional anatomy, vascularization, and serial sections with MRI. Berlin
43. Berlin ; New York, Springer.
44. Ebert, D., R. G. Haller, et al. (2003). "Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy." J Neurosci **23**(13): 5928-35.
45. Eid, T., M. J. Thomas, et al. (2004). "Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised

- extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy." Lancet **363**(9402): 28-37.
46. Engel, J. (1989). Seizures and epilepsy. Philadelphia, F.A. Davis Co.
  47. Engel, J. and T. A. Pedley (2008). Epilepsy : a comprehensive textbook. Philadelphia, Pa. ; London, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
  48. Erlander, M. G., N. J. Tillakaratne, et al. (1991). "Two genes encode distinct glutamate decarboxylases." Neuron **7**(1): 91-100.
  49. Erlander, M. G. and A. J. Tobin (1991). "The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review." Neurochem Res **16**(3): 215-26.
  50. Factsheets. (2009, January ). "Epilepsy: Key Facts." Retrieved October, 2010, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>.
  51. Fagg, G. E. and A. C. Foster (1983). "Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system." Neuroscience **9**(4): 701-19.
  52. Faulkner, J. R., J. E. Herrmann, et al. (2004). "Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury." J Neurosci **24**(9): 2143-55.
  53. Fink, M. (1984). "Meduna and the origins of convulsive therapy." Am J Psychiatry **141**(9): 1034-41.
  54. Fisher, R. S., W. van Emde Boas, et al. (2005). "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." Epilepsia **46**(4): 470-2.
  55. Fremeau, R. T., Jr., S. Voglmaier, et al. (2004). "VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate." Trends Neurosci **27**(2): 98-103.
  56. Freund, T. F. and G. Buzsaki (1996). "Interneurons of the hippocampus." Hippocampus **6**(4): 347-470.

57. Friedman, A., D. Kaufer, et al. (2009). "Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy." Epilepsy Res **85**(2-3): 142-9.
58. Frotscher, M. and C. Leranth (1985). "Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study." J Comp Neurol **239**(2): 237-46.
59. Frotscher, M. and J. Zimmer (1983). "Commissural fibers terminate on non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus -- a combined Golgi/EM degeneration study." Brain Res **265**(2): 289-93.
60. Gabriel, S., A. Eilers, et al. (1998). "Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine-treated epileptic rats." Neurosci Lett **242**(1): 9-12.
61. Golovina, V. A. and M. P. Blaustein (2000). "Unloading and refilling of two classes of spatially resolved endoplasmic reticulum Ca(2+) stores in astrocytes." Glia **31**(1): 15-28.
62. Halestrap, A. P. and D. Meredith (2004). "The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond." Pflugers Arch **447**(5): 619-28.
63. Hauser, W. A., J. F. Annegers, et al. (1996). "Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota." Mayo Clin Proc **71**(6): 576-86.
64. Haydon, P. G. and G. Carmignoto (2006). "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling." Physiol Rev **86**(3): 1009-31.
65. Heinemann, U., S. Gabriel, et al. (2000). "Alterations of glial cell function in temporal lobe epilepsy." Epilepsia **41 Suppl 6**: S185-9.
66. Hertz, L. (2004). "Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future." Neurochem Int **45**(2-3): 285-96.
67. Huang, R. Q., C. L. Bell-Horner, et al. (2001). "Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action." J Pharmacol Exp Ther **298**(3): 986-95.

68. Hugg, J. W., E. J. Butterworth, et al. (1999). "Diffusion mapping applied to mesial temporal lobe epilepsy: preliminary observations." Neurology **53**(1): 173-6.
69. Jeftinija, S. D., K. V. Jeftinija, et al. (1997). "Cultured astrocytes express proteins involved in vesicular glutamate release." Brain Res **750**(1-2): 41-7.
70. Jourdain, P., L. H. Bergersen, et al. (2007). "Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength." Nat Neurosci **10**(3): 331-9.
71. Kandel, E. R., J. H. Schwartz, et al. (2000). Principles of neural science. New York ; London, McGraw-Hill, Health Professions Division.
72. Kang, T. C., D. S. Kim, et al. (2006). "Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy." Glia **54**(4): 258-71.
73. Kaufman, D. L., C. R. Houser, et al. (1991). "Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions." J Neurochem **56**(2): 720-3.
74. Kelley, M. S., M. P. Jacobs, et al. (2009). "The NINDS epilepsy research benchmarks." Epilepsia **50**(3): 579-82.
75. Kew, J. N. and J. A. Kemp (2005). "Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology." Psychopharmacology (Berl) **179**(1): 4-29.
76. Kneisler, T. B. and R. Dingledine (1995). "Spontaneous and synaptic input from granule cells and the perforant path to dentate basket cells in the rat hippocampus." Hippocampus **5**(3): 151-64.
77. Kornau, H. C. (2006). "GABA(B) receptors and synaptic modulation." Cell Tissue Res **326**(2): 517-33.
78. Krnjevic, K., R. J. Reiffenstein, et al. (1981). "Disinhibitory action of acetylcholine in the rat's hippocampus: extracellular observations." Neuroscience **6**(12): 2465-74.
79. Ledebor, A., J. J. Breve, et al. (2000). "Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-

induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells." Glia **30**(2): 134-42.

80. Lee, T. S., T. Eid, et al. (2004). "Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy." Acta Neuropathol **108**(6): 493-502.
81. Lee, T. S., S. Mane, et al. (2007). "Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes." Mol Med **13**(1-2): 1-13.
82. Lepore, A. C., B. Rauck, et al. (2008). "Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease." Nat Neurosci **11**(11): 1294-301.
83. Leranth, C. and M. Frotscher (1983). "Commissural afferents to the rat hippocampus terminate on vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive non-pyramidal neurons. An EM immunocytochemical degeneration study." Brain Res **276**(2): 357-61.
84. Lewis, F. T. (1923). "The significance of the term Hippocampus." J. Comp. Neurol.(35): 213-230.
85. Li, Z., A. Martins da Silva, et al. (2002). "Movement quantification in epileptic seizures: a new approach to video-EEG analysis." IEEE Trans Biomed Eng **49**(6): 565-73.
86. Loaiza, A., O. H. Porrás, et al. (2003). "Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy." J Neurosci **23**(19): 7337-42.
87. Lorente De Nó, R. (1934). "Studies on the structure of the cerebral cortex. Continuation of the study of the ammonic system." J. Psychol. Neurol(46): 113-177.
88. Macdonald, R. L. and J. L. Barker (1978). "Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: a common mode of convulsant action." Neurology **28**(4): 325-30.
89. Mathern, G. W., D. Mendoza, et al. (1999). "Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy." Neurology **52**(3): 453-72.

90. Matsumoto, R. R. (1989). "GABA receptors: are cellular differences reflected in function?" Brain Res Brain Res Rev **14**(3): 203-25.
91. McGinty, J. F., S. J. Henriksen, et al. (1983). "Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(2): 589-93.
92. Mohler, H. (2006). "GABA(A) receptor diversity and pharmacology." Cell Tissue Res **326**(2): 505-16.
93. Monaghan, D. T., R. J. Bridges, et al. (1989). "The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system." Annu Rev Pharmacol Toxicol **29**: 365-402.
94. Mott, D. D., D. A. Turner, et al. (1997). "Interneurons of the dentate-hilus border of the rat dentate gyrus: morphological and electrophysiological heterogeneity." J Neurosci **17**(11): 3990-4005.
95. Nagy, J. I., F. E. Dudek, et al. (2004). "Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system." Brain Res Brain Res Rev **47**(1-3): 191-215.
96. Nehlig, A. and A. Pereira de Vasconcelos (1993). "Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats." Prog Neurobiol **40**(2): 163-221.
97. Newland, C. F. and S. G. Cull-Candy (1992). "On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat." J Physiol **447**: 191-213.
98. Parpura, V., T. A. Basarsky, et al. (1994). "Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling." Nature **369**(6483): 744-7.
99. Parri, H. R., T. M. Gould, et al. (2001). "Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation." Nat Neurosci **4**(8): 803-12.
100. Pasti, L., A. Volterra, et al. (1997). "Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ." J Neurosci **17**(20): 7817-30.

101. Paxinos, G. (1995). The rat nervous system. San Diego ; London, Academic Press.
102. Paxinos, G. and C. Watson (2009). The rat brain in stereotaxic coordinates. London, Academic.
103. Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1994). "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10625-9.
104. Pellmar, T. C. and W. A. Wilson (1977). "Synaptic mechanism of pentylenetetrazole: selectivity for chloride conductance." Science **197**(4306): 912-4.
105. Penfield W., H. S. (1940). "Epileptogenic lesions of the brain. A histologic study." Arch Neurol Psychiatry(43): 240-259.
106. Pitkanen, A. and H. Kubova (2004). "Antiepileptic drugs in neuroprotection." Expert Opin Pharmacother **5**(4): 777-98.
107. Pitkanen, A. and K. Lukasiuk (2009). "Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy." Epilepsy Behav **14 Suppl 1**: 16-25.
108. Pollen, D. A. and M. C. Trachtenberg (1970). "Neuroglia: gliosis and focal epilepsy." Science **167**(922): 1252-3.
109. Proper, E. A., G. Hoogland, et al. (2002). "Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy." Brain **125**(Pt 1): 32-43.
110. Ravizza, T., B. Gagliardi, et al. (2008). "Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy." Neurobiol Dis **29**(1): 142-60.
111. Rehavi, M., P. Skolnick, et al. (1982). "Effects of tetrazole derivatives on [3H]diazepam binding in vitro: correlation with convulsant potency." Eur J Pharmacol **78**(3): 353-6.
112. Ridet, J. L., S. K. Malhotra, et al. (1997). "Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function." Trends Neurosci **20**(12): 570-7.

113. Roberts, E. and S. Frankel (1950). "gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid." J Biol Chem **187**(1): 55-63.
114. Rossi, D. J., T. Oshima, et al. (2000). "Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake." Nature **403**(6767): 316-21.
115. Schroder, W., G. Seifert, et al. (2002). "AMPA receptor-mediated modulation of inward rectifier K<sup>+</sup> channels in astrocytes of mouse hippocampus." Mol Cell Neurosci **19**(3): 447-58.
116. Schwartzkroin, P. A. (2009). Encyclopedia of basic epilepsy research. London, Academic.
117. Segal, M. (1979). "A potent inhibitory monosynaptic hypothalamo-hippocampal connection." Brain Res **162**(1): 137-41.
118. Seifert, G., W. Schroder, et al. (2002). "Changes in flip/flop splicing of astroglial AMPA receptors in human temporal lobe epilepsy." Epilepsia **43 Suppl 5**: 162-7.
119. Seress, L. and M. Frotscher (1991). "Basket cells in the monkey fascia dentata: a Golgi/electron microscopic study." J Neurocytol **20**(11): 915-28.
120. Sivilotti, L. and A. Nistri (1991). "GABA receptor mechanisms in the central nervous system." Prog Neurobiol **36**(1): 35-92.
121. Smith, D., A. Pernet, et al. (2003). "Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo." J Cereb Blood Flow Metab **23**(6): 658-64.
122. Sofroniew, M. V. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." Trends Neurosci **32**(12): 638-47.
123. Sofroniew, M. V., C. L. Howe, et al. (2001). "Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair." Annu Rev Neurosci **24**: 1217-81.
124. Sokoloff, L. (1992). "Energy metabolism and effects of energy depletion or exposure to glutamate." Can J Physiol Pharmacol **70 Suppl**: S107-12.
125. Squires, R. F., E. Saederup, et al. (1984). "Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain." Life Sci **35**(14): 1439-44.

126. Tanaka, K., K. Watase, et al. (1997). "Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1." Science **276**(5319): 1699-702.
127. Temkin, O. (1933). "The doctrine of epilepsy in the Hippocratic writings." Bull Hist Med(1): 277-22.
128. Tessler, S., N. C. Danbolt, et al. (1999). "Expression of the glutamate transporters in human temporal lobe epilepsy." Neuroscience **88**(4): 1083-91.
129. Timm, F. (1958). "[Histochemistry of heavy metals; the sulfide-silver procedure.]" Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med **46**(5): 706-11.
130. Unger, V. M., N. M. Kumar, et al. (1999). "Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel." Science **283**(5405): 1176-80.
131. Vannucci, S. J. and I. A. Simpson (2003). "Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(5): E1127-34.
132. Vega, C., J. L. Martiel, et al. (2003). "Uptake of locally applied deoxyglucose, glucose and lactate by axons and Schwann cells of rat vagus nerve." J Physiol **546**(Pt 2): 551-64.
133. Verkhratsky, A. and C. Steinhauser (2000). "Ion channels in glial cells." Brain Res Brain Res Rev **32**(2-3): 380-412.
134. Vezzani, A. and T. Granata (2005). "Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence." Epilepsia **46**(11): 1724-43.
135. Voutsinos-Porche, B., G. Bonvento, et al. (2003). "Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex." Neuron **37**(2): 275-86.
136. Voutsinos-Porche, B., G. Knott, et al. (2003). "Glial glutamate transporters and maturation of the mouse somatosensory cortex." Cereb Cortex **13**(10): 1110-21.
137. Waagepetersen, H. S., U. Sonnewald, et al. (2001). "Metabolic distinction between vesicular and cytosolic GABA in cultured GABAergic neurons using <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopy." J Neurosci Res **63**(4): 347-55.

138. Wallraff, A., R. Kohling, et al. (2006). "The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus." J Neurosci **26**(20): 5438-47.
139. Walther, C. (2002). "Hippocampal terminology: concepts, misconceptions, origins." Endeavour **26**(2): 41-4.
140. Watkins, J. C., P. Krogsgaard-Larsen, et al. (1990). "Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists." Trends Pharmacol Sci **11**(1): 25-33.
141. Wilson, J. V. and E. H. Reynolds (1990). "Texts and documents. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy." Med Hist **34**(2): 185-98.
142. Wittendorp-Rechenmann, E., C. Lam, et al. (2002). "High resolution tracer targeting combining microautoradiographic imaging by cellular <sup>14</sup>C-trajectory with immunohistochemistry: a novel protocol to demonstrate metabolism of [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes." J Trace Microprobe Tech **20**(4): 505 - 515.
143. Wyss, J. M., L. W. Swanson, et al. (1979). "Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus." Anat Embryol (Berl) **156**(2): 165-76.
144. Ye, Z. C., M. S. Wyeth, et al. (2003). "Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release." J Neurosci **23**(9): 3588-96.



## 9 ÖZGEÇMİŞ

### Vedat EVREN

#### ADRES

İş: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji AbD  
Bornova, İzmir 35100  
TURKEY  
Tel: +90 (232) 388 28 68  
Fax: +90 (232) 374 65 97  
E-mail: vedat.evren@ege.edu.tr

Ev: 1814 Sokak No: 22/16  
Karşıyaka, İzmir 35540  
Tel: +90 (232) 336 89 11  
GSM: +90 (542) 2462166

#### DOĞUM TARİHİ ve YERİ

19 Ağustos 1975  
Antalya, Türkiye

#### UYRUĞU

Türkiye Cumhuriyeti

#### MEDENİ DURUMU

Evli (Merve Evren)

#### EĞİTİM

2000 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

1992 Meram Fen Lisesi, Konya

#### ÇALIŞMA DENEYİMİ

2004- Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AbD, İzmir

2001-2003 Yedek Subay, Tıp Doktoru, Türk Hava Kuvvetleri, İstanbul

## DERNEK ÜYELİKLERİ

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (2006)

SFN (Society for Neuroscience) (2005)

Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinirbilimleri Derneği (TUBAS) (2005)

FENS (Federation of European Neuroscience Societies) (2005)

IBRO (International Brain Research Organization) (2005)

Turkey Chapter of SFN (2005)

## TEZ ÇALIŞMASI

Epilepsi Etiyolojisinde “Deneysel Konvülsiyon-Nöral Plastisite-Konvülsiyon” Bağıntısının Arştırılması

## YAYINLAR

- Temeltas G, Dagci T, Evren V, Lekili M. “Effects of Neuronal and Glial Restricted Precursor Cells Transplantation on Erectile Function after Experimentally Induced Spinal Cord Injury” Journal of Sexual Medicine, 2009 June 29 EPUB,
- Temeltas G, Dagci T, Kurt F, Evren V, Tuglu I. “Bladder function recovery in rats with traumatic spinal cord injury after transplantation of neuronal-glia restricted precursors or bone marrow stromal cells” Journal of Urology, 2009 Jun;181(6):2774-9. Epub 2009 Apr
- Karaman S, Evren V, Firat V, Cankayali I. “The effects of dexmedetomidine on spontaneous contractions of isolated gravid rat myometrium” Adv Ther. 2006 Mar-Apr; 23(2):238-43 Ege University Research Fund.

## POSTER SUNUMLARI

### Bireysel Sunumlar

- V. Evren, A. Keser, G. Peker, (2010) “Kronik Civa Zehirlenmesi Uygulanmış Sıçanlarda Pentilentetrazol ile Nöbet Eşiğinin Değerlendirilmesi : Ön Çalışma” 9. Ulusal Sinirbilimler Kongresi, Yeditepe Üniversitesi, İSTANBUL
- V. Evren, A. Keser, T. Dagci, O.A. Yilmaz, G.O.Peker, (2009) “ Effects of primary astrocytes on eliptogenesis in chemically kindled rats following implantation into the dentate gyrus of hippocampus: Preliminary study”, Annual Meeting of Society for Neuroscience, CHICAGO, USA

- V. Evren, A. Keser, Ö. A. Yılmaz, G. Ö. Peker, (2009) “Sıçanlarda Pentilentetrazol ile indüklenmiş konvülsiyonlarda hipokampal plastisitenin davranışsal ve histolojik metodlarla gösterilmesi : Ön Çalışma” 8. Ulusal Sinirbilimler Kongresi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, BOLU
- V. Evren, G.Ö. Peker, S. Pogun, T. Dagci, (2008) “Motor Recovery Following Embryonic Neuronal/Glial Restricted Precursor Cell Transplantation in Spinal Injury Induced Rats is More Profound in the Female than the Male”, 7. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, Çukurova Üniversitesi, ADANA
- V. Evren, G. Temeltas, T. Dagci, I. Tuğlu, (2007) ”Effect Of Embryonic Neuronal Stem Cell Implantation on Rat Urinary Bladder Function Following Spinal Partial Hemi-section”, Annual Meeting of Society for Neuroscience, SAN DIEGO, USA
- V. Evren, -G. Temeltaş, T. Dağcı, (2006) “Effect of Oral Tadalafil Application for the Erectile Function of the Rats with Spinal Cord Injury”, 32. Türk Fizyolojik Bilimler Kongresi, DENİZLİ

#### Ortak Sunumlar

- Taşkiran D, V. Evren, (2009) “Yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasında 17 $\beta$ - östradiolun uyarıcı etkisi”, 35. Türk Fizyolojik Bilimler Kongresi, ANKARA (*En iyi poster ikincilik ödülü*)
- Taşkiran D, T. Dağcı, V. Evren, (2009) “Mezenkimal kök hücrelerinin sıçan kemik iliği ve yağ dokusundan izolasyonu ve çoğaltılması”, 35. Türk Fizyolojik Bilimler Kongresi, ANKARA
- G. Peker, V. Evren, E. Yıldırım, M. Uluğ, A. Keser, G. Mola, O. Erbaş, B. Balkan (2009) “Sinirbilim ve Toplum: Sinirbilimcinin Toplumsal Sorumluluğu” Türk Nöroloji Dergisi, 2009, cilt 15, ek 1, sayfa 266; 8. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, BOLU
- G. Peker, V. Evren, E. Yildirim, A. Keser, G. Mola, S. Pogun, T. Dagci, B. Balkan, (2008) “Brain & Behavior Science and Health” intensive interactive course for 11th grade students in one most privileged urban and one least privileged ghetto high school: A longitudinal study of the impact of this experience on the students’ perceptions, impressions, expectations and neuroscience knowledge”, 7. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, ADANA
- G. Temeltaş, T. Dağcı, İ. Tuğlu, V. Evren, O. Ölçer (2006), “Spinal Kord Yaralanmalı Sıçanlarda Oral Tadalafil Uygulamasının Eretil Cevaba Etkisi”, 19. Ulusal Üroloji Kongresi, ANTALYA

- G. Temeltaş, T. Dağcı, İ. Tuğlu, V. Evren, O. Ölçer (2006), “Ratlarda Spinal Kord Yaralanması Olan Bölgeye Embriyonal Nöronal Kök Hücre Uygulamasının Mesane Fonksiyonlarına Etkisi”, 19. Ulusal Üroloji Kongresi, ANTALYA

## **YURT İÇİNDE TAMAMLANAN ARAŞTIRMA PROJELERİ**

- Sıçanda kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin kondrojenik potansiyelinin araştırılması: Karşılaştırmalı biyokimyasal ve immünohistokimyasal bir çalışma” TÜBİTAK (SBAG-HD-198-106S351), 2007
- Dişi ve Erkek sıçanlarda omurilik hasarlı bölgeye nakledilen nöronal kök hücrelerin nörogenesis üzerine etkisi” , Ege Üniversitesi Araştırma Fonu, 2004-T-10

## **YURT İÇİNDE DEVAM EDEN ARAŞTIRMA PROJELERİ**

- “Deneyisel temporal lob epilepsisinde astrosit ekiminin etkileri: Davranışsal ve histolojik korelasyon” (*TEZ PROJESİ*), 2009 – T – 014, G. Peker (PI), V. Evren, A. Keser, T. Dağcı
- Sıçan mezenkimal kök hücrelerinin kondrositlere diferansiasyonunda büyüme faktörlerinin etkileri. BAP, 2007/TIP /026

## **KATILDIĞI KURSLAR ve KONGRELER**

- VII. Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, “Deney Hayvanları Kullanım Kursu” 11-22 Ekim 2010, Ege Üniversitesi, İzmir
- “9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi” 2010, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul
- “Annual Meeting of Society for Neuroscience” 2009, CHICAGO, USA
- “V. Ege Biyenali Uluslararası Mezuniyet Sonrası Yaz Okulu (Ege BINGSS) : Neuro-Glial Interaction from Womb to Tomb”, 29 Haziran – 4 Temmuz 2009, Ege Üniversitesi, İZMİR
- “8. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi” 18-22 Nisan, 2009, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, BOLU
- “Deneyisel ve Klinik Araştırmalarda Stereolojik Metodlar” 17 Nisan 2009, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, BOLU
- “7. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi” 16-19 Nisan, 2008, Çukurova Üniversitesi, ADANA

- “Annual Meeting of Society for Neuroscience” 2007, SAN DIEGO, USA
- “IV. Ege Biyenalı Uluslararası Mezunyet Sonrası Yaz Okulu (Ege BINGSS) : Developmental, Degenerative and Restorative Neural Plasticity”, 25-29 Haziran 2007, Ege Üniversitesi, İZMİR
- “6. Ulusal Sinirbilim Kongresi” 9-13 Nisan, 2007, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Safranbolu – KARABÜK
- “5. Ankara Biyoteknoloji Günleri - Stem Cell Technologies from Laboratories to Clinics” 15-17 Kasım, 2006, Ankara Üniversitesi, ANKARA
- “8. Annual Conference of the SRNT Europe” , 23 – 26 Eylül 2006, KUŞADASI
- “Clinical Research Workshop - The Biology of Tobacco Dependence: From Laboratory to the Smoker”, 23 Eylül 2006, KUŞADASI
- “Davranış Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler Kursu” 32. Türk Fizyolojik Bilimler Kongresi, 18-22 Eylül, 2006, DENİZLİ
- “Annual Meeting of European Epilepsy Academy Workshop: An Experimental Model of Epilepsy: Kindling”, 19 Nisan, 2006, DENİZLİ
- “4. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi” 29 Mart – 2 Nisan 2005, Mersin Üniversitesi, MERSİN
- “Temel ve Klinik Elektrofizyoloji Kursu”, 29 Mart 2005, Mersin Üniversitesi, MERSİN
- “Proje Yazım Kursu” 8 Şubat 2005, Ege Üniversitesi Beyin Araştırmaları Araştırma ve Uygulama Merkezi, İZMİR
- “12. Deney Hayvanları Kursu” 12 – 14 Ocak 2005, Ege Üniversitesi, İZMİR
- “III. Ege Biyenalı Uluslararası Mezunyet Sonrası Yaz Okulu (Ege BINGSS) : Myths and Facts about Neural Stem Cells: From Dish to Bedside”, 5 – 9 Temmuz 2004, Ege Üniversitesi, İZMİR
- “3. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi”, 7-11 Nisan 2004, Pamukkale Üniversitesi, DENİZLİ

## **KONGRE SEMİNER ORGNİZASYONLARI**

- KOORDİNATÖR ve WEB SORUMLUSU: V. Ege Biyenalı Uluslararası Mezunyet Sonrası Yaz Okulu (Ege BINGSS), 29 Haziran – 4 Temmuz 2009, İzmir
- DÜZENLEME KURULU ÜYESİ ve WEB SORUMLUSU: IV. Ege Biyenalı Uluslararası Mezunyet Sonrası Yaz Okulu (Ege BINGSS), 25-29 Haziran 2007, İzmir

## **YABANCI DİL**

- İngilizce: Çok İyi
- Fransızca: Başlangıç

## **LABORATUVAR DENEYİMİ**

- Temel Uygulamalar (Solüsyon ve kesit hazırlığı, perfüzyon, diseksiyon, mikroskopi v.b)
- Nöral ve glial kök hücre kültürü ve uygulamaları, Primer Astrosit kültürü ve uygulamaları
- Kimyasal Kindling (Deneyisel konvülsiyon çalışmaları)
- İzole organ ve doku banyosunda farmakolojik ve elektrofzyolojiik çalışmalar
- Ürodinami
- Stereotaksik girişimler
- Sıçanda omurilik cerrahi uygulamaları
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

## **ÖĞRETİM DENEYİMİ**

- Davranışın Fizyolojik Temelleri” Fizyoloji ve PDR 1. Sınıf
- Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvar Pratikleri
- Hemşirelik Fakültesi Fizyoloji Laboratuvar Pratikleri
- Acil Müdahale ve Travma Yönetimi, NATO tatbikatı (OPEVAL) 2002

## **BİLGİSAYAR DENEYİMİ**

- Microsoft Office: İyi
- SPSS: İyi
- End Note: İyi
- Autodesk Maya: Mükemmel
- Pixologic Zbrush: Mükemmel
- Adobe Photoshop: İyi