

**T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı**

**RATLARDA PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN EPİLEPTİK
NÖBET MODELİNDE TOPİRAMATIN BEYİN KALSİYUM, Ca^{+2} ATPaz VE
NMDA RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Mustafa YILMAZ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Süleyman KUTLUHAN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
1462-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2008-İSPARTA

TEŞEKKÜR

Üniversitemizin Nöroloji Anabilim Dalını kuran ve bölüme büyük emekleri geçen Prof. Dr. Galip Akhan'a,

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, uzmanlık tezimin hazırlanmasında katkılarını esirgemeyen bölümümüz öğretim üyelerinden Doç. Dr. Süleyman Kutluhan'a,

Destekleriyle her zaman yanımda olan bilgi ve deneyimlerinden her zaman istifade ettiğim değerli hocalarım; Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Hasan Rifat Koyuncuoğlu'na, Doç. Dr. Serpil Demirci'ye ve Yrd. Doç. Dr. Vedat Ali Yürekli'ye sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım.

Tezimin hazırlanmasında büyük emeği geçen Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu ve asistanlarına,

Anabilim Dalı içerisinde beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum araştırma görevlisi ve bölüm çalışanı arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Haklarını ödeyemeyeceğim aileme ve eşime minnet dolu duygularımı sunuyorum.

Varlığıyla hayatımıza ayrı bir renk ve ahenk katan kızıma sevgilerimi gönderiyorum.

Dr. Mustafa YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Epilepsi.....	2
2.1.1. Tarihçe.....	2
2.1.2. Epilepsi Fizyopatolojisi.....	3
2.1.3. Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırılması.....	7
2.1.4. Epilepside Etyoloji.....	10
2.1.5. Epilepsilerde Tanı-Ayırıcı Tanı.....	11
2.1.6. Status Epileptikus.....	13
2.1.7. Epilepside Tedavi Prensipleri.....	14
2.1.8. Antiepileptik İlaçların Etki Mekanizmaları.....	15
2.2. Topiramate.....	16
2.2.1. TPM'nin Etki Mekanizması.....	17
2.3. Deneysel Epilepsi Modelleri.....	18
2.3.1. Pentilentetrazol.....	19
2.4. Nöronal Ca ²⁺ , Ca ²⁺ ATPaz ve Epilepsi.....	20
2.5. Hipokampus.....	21
2.6. Glutamat Reseptörleri.....	23
2.6.1. NMDA Reseptör Tipleri.....	25
3. MATERYAL ve METOD	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Deney Hayvanları.....	28
3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	28
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler.....	30

3.2. Metod	31
3.2.1. Deneysel Model.....	31
3.2.2. Anestezi ve Doku-Kan Örnekleri	32
3.2.3. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu	32
3.2.4. SDS-PAGE Yöntemi	33
3.2.5. Western Blot Yöntemi.....	33
3.2.6. Mikrozomların İzolasyonu	33
3.2.7. Mikrozomal Ca ²⁺ -ATPaz Aktivitesinin Ölçümü.....	33
3.2.8. Total Beyin Kalsiyum Düzeyinin Ölçümü.....	34
3.2.9. Protein Düzeyinin Ölçümü	34
3.2.10. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Spektrofotometri ile Saptanan Total Beyin Korteks Ca ²⁺ Düzeyleri.....	35
4.2. Spektrofotometri ile Saptanan Mikrozomal Beyin Ca ²⁺ ATPaz Düzeyleri	35
4.3. Western Blot Analizi ile Saptanan NR2A, NR2B Reseptör Düzeyleri	37
5. TARTIŞMA	40
KAYNAKLAR	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Topiramamat 2,3:4,5- bis-0-(1-metiletiliden)-β-D-früktopiranoz sülfamat.....	16
Şekil 2. Hipokampus.....	22
Şekil 3. Ca ⁺² 'nin hücre içine geçiş yolları.....	25
Şekil 4. Beyin total kalsiyum düzeyi.....	36
Şekil 5. Beyin mikrozomal Ca ⁺² ATP az aktivitesi.....	36
Şekil 6. NR2A'ya ait Western Blot örneği.....	38
Şekil 7. NR2A'ya ait Western Blot örneği. Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir.....	38
Şekil 8. NR2B'ye ait Western Blot örneği.....	39
Şekil 9. NR2B'ye ait Western Blot örneği. Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir.....	39

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Epileptik Nöbetlerin Klasifikasyonu (ILAE, 1981).....	7
Tablo 2. Epilepsiler ve Epileptik Sendromların Uluslararası Sınıflaması (ILAE, 1989). 9	
Tablo 3. Beyin korteks bazal kalsiyum düzeyi ve mikrozomal Ca ⁺² ATP az aktivitesi değerlerinin ortalama ve ± SD değerleri.....	35
Tablo 4. Tüm gruplarda NR2A, NR2B reseptörlerinin yüzdelik cinsinden yoğunlukları ortalama ve ± SD değerleri.....	37

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ach	: Asetilkolin
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
AEİ	: Anti epileptik ilaç
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozole propionat
BMI	: Bicucilline methioiodide
BZD	: Benzodiazepin
CaMK-II	: Kalsiyum kalmodülün protein kinaz 2
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CA	: Cornu ammonis
EEG	: Elektroensefalografi
EPSP	: Eksitator postsinaptik potansiyel
GABA	: Gama Amino Butirik Asit
HNC	: Hipokampal Nöronal Kültür
HS	: Hipokampal skleroz
i.p.	: İntraperitoneal
IPSP	: İnhibitör postsinaptik potansiyel
JN	: Jeneralize nöbet
JE	: Jeneralize Epilepsi
KBZ	: Karbamazepin
KPN	: Kompleks parsiyel nöbetler
NO	: nitrik oksit
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
NR1	: NMDAR 1 subuniti
NR 2A	: NMDAR 2A subuniti
NR 2B	: NMDAR 2B subuniti
MSS	: Merkezi Sinir sistemi
OS	: Oksidatif stres
PTZ	: Pentilentetrazol
PDS	: Paroksizmal depolarizasyon şifti
ROS	: Serbest Oksijen radikalleri
SRED	: Spontan tekrarlayan epileptiform deşarj
SE	: Status Epileptikus
SF	: Serum fizyolojik
TPM	: Topiramet

1. GİRİŞ

Epilepsi; serebral nöronların bir bölümünün ya da tamamının senkronize olmuş anormal elektriki davranış gösterdiği nöbetlerle seyreden bir hastalıktır. Epileptik nöbetler, merkezi sinir sisteminin (MSS) inhibisyonu ile eksitasyonu arasındaki koordinasyonun bozulması durumunda ortaya çıkarlar.

Epilepsi toplumda % 0,7 oranında görülmektedir ve ilaç tedavisi uygulanan hastaların %20-30'unda nöbetler devam etmektedir. Mevcut olan pek çok antiepileptik ilaca rağmen, bulunacak yeni molekül ve ilaçların tedavideki boşluğu doldurmadaki gerekliliği kaçınılmazdır.

Epilepsinin oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte ileri sürülen hipotezlerden bir tanesi; nöronal Ca^{+2} artışının N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonuna neden olması ve beyindeki Ca^{+2} ATPaz gibi membrana bağlı enzim defektleridir. Epileptogeneze eşlik eden plastisite değişikliklerin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması; epilepsinin tedavisi ve önlenmesinde kritik role sahiptir. Bu amaçla geliştirilen hayvan epilepsi modelleri, nöbet hakkındaki soruların açıklanması, beyin elektriki aktivitesinin hücresele, moleküler ve sistemik boyutta incelenmesi, tedavi edici yöntem ve ilaçların denenip geliştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak uygulanan modellerin insanlardaki epilepsiyle tam korele olmadığı da bir gerçektir. Aynı ilacın, farklı modellerde nöbet üzerine etkisi farklı olabilmektedir. Bu yüzden farklı nöbet tiplerine karşılık gelen birçok nöbet modeli geliştirilmiştir.

Tüm hastalıklarda olduğu gibi epilepside de tedavide seçilecek ilacın özelliklerinin bilinmesi son derece önemlidir. Topiramate (TPM); geniş etki mekanizmasına sahip yeni bir antiepileptik ilaçtır (AEİ). Üzerinde çok fazla çalışma yapılmasına rağmen, TPM'nin N-metil-D-aspartat reseptörleri (NMDAR) ve Ca^{+2} ATPaz üzerine etkisiyle ilişkili bir bilgiye literatürde araştırdığımız kadarıyla rastlamadık.

Bu nedenle biz de deneysel epileptik nöbet modelinde nöbetin ve TPM'nin NMDAR subünitleri, nöronal Ca^{+2} düzeyi ve mikrozomal Ca^{+2} ATPaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacı ile bu çalışmayı yaptık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Epilepsi (Yunanca 'Epilepsia') kelime olarak yakalamak, birden tutulmak anlamındadır. Epilepsi, değişik nedenlerle beyinde nöronların anormal elektriksel boşalımı ile ortaya çıkan epizodik serebral disfonksiyondur (1).

Epileptik nöbet ani, paroksizmal, yüksek voltajlı elektriksel boşalmalar sonucu MSS'nin bir parçası ya da tümünün önüne geçilemeyen aşırı aktivitesidir (2).

Nöbet sırasında görülebilen bilinç kaybı, anormal sensoriyal veya motor aktivite ve davranışta fonksiyon bozukluğu tekrarlayıcı nitelikte ise 'epilepsi' deyimini kullanılır(3).

Beynin en sık görülen nörolojik hastalıklarından biri olan epilepsinin insidansı ve prevalansı birçok çalışmada farklılık gösterir. Bu farklılığın nedeni, sıklıkla toplumlara göre değişiklik gösteren sınıflandırma, teşhis ve olgu araştırmasındaki metodların farklılığından ileri gelmektedir. Bununla birlikte epilepsi prevalansı ortalama her 1000 kişide 5- 10 iken, insidansı yaklaşık 50/100.000 civarındadır (4). Epidemiyolojik çalışmalar, epilepsi insidansının yaşamın ilk on yılı ile 75 yaş üzeri kişilerde en sık görüldüğünü göstermektedir. Çocuklarda yüksek insidansın gelişimsel faktörler, yaşlılarda ise malignensi ve serebrovasküler hastalıklarla (SVH) ilişkili olduğu düşünülmektedir (5,6).

2.1.1. Tarihçe

Epilepsinin hikayesi insanlığın tarihi kadar eskidir ve halen dünyanın bir çok yöresinde bir takım sihirler, dini ayinler ve bilim dışı yöntemlerle tedavi edilmektedir(7).

Epilepsi ile ilgili tarihi ilk bilgiye M.Ö 2080 yılında yayınlandığı bildirilen Hammurabi Kanunlarında rastlamaktayız. Bu kanunda ateş ile konvulsiyon arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir (8).

Epilepsi konusunda ilk gerçek tanımı bundan yirmi beş asır önce Hipokrat'ın yaptığı görülmektedir. O epilepsinin orijininin beyinden geldiğini bildirmiş, Kutsal

Hastalık anlamına gelen “On the Sacred Disease” tanımını kullanmış ve epilepsinin diyet ve ilaçların yardımı ile tedavi edilebileceğini söylemiştir (9).

Yüzyıllar sonra Jackson; çalışmaları ile yeni bir dönem açarak epilepsinin ilk bilimsel tanımını yapmış ve epilepsiyi “beynin özellikle gri cevherinin akut ve lokal deşarjları” olarak tarif etmiştir (10). Gowers epilepsinin ilk sınıflamasını yapmıştır (11). Hans Berger ilk defa insanlarda elektroensefalografiyi (EEG) uygulamıştır (12).

2.1.2. Epilepsi Fizyopatolojisi

Beyinde epileptik boşalmaların başlamasına, yayılmasına ve durmasına neden olan spesifik mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Öne sürülen görüşler şöyle özetlenebilir:

- İyonik iletide bir bozukluğa yol açabilecek intrinsik nöronal membran ve moleküler kanal değişiklikleri; voltaja bağımlı Na⁺ kanalları gibi
- İnhibitör nörotransmitterlerde yetersizliğe ya da eksitatör olanlarda fazlalığa yol açacak anormal nörotransmitter sentezi; Gama Amino Butirik Asit (GABA) azlığı veya Glutamat fazlalığı gibi
- Nöronların ve glial hücrelerin iyon pompalama ve repolarizasyonlarını düzenleyen genetik kontrolün hücre içi enzim yetersizliği.

Epileptojenik odak olarak adlandırılan bölgede “pacemaker” hücreler yer almaktadır ve bu hücreler tam olarak bilinmeyen nedenlerle, artmış uyarılma ve anormal ateşlenme özelliği gösterirler, etraflarındaki hücreleri de bu ateşlenmeye ortak edebilirler. Epilepsili kişilerin hipokampus piramidal hücrelerinin CA1, CA2, CA4 nöronları “pacemaker” merkezler olabileceği kabul edilmektedir (13).

Hücre membranındaki potansiyelin devamı ve sinaps yoluyla yayılmasında rol oynayan kimyasal, hormonal ileticilerin epileptojenik aktivitede rol oynamaları olasıdır. Eksitatör nörotransmitter olan Asetilkolinin (ACh) epileptik nöbetler sırasında bol miktarda salgılandığı saptanmıştır. ACh'nin ventriküle injeksiyonu nöbetlere neden olmuştur. Endojen ACh serbestleşmesinin NMDA reseptörleri ile modüle edildiği ve GABA agonistleri ile inhibe edildiği bildirilmiştir (14).

Öte yandan bilinen en önemli inhibitör nörotransmitter olan GABA'nın eksikliği, epileptik nöbetlerin patogenezinde önemle sorumlu tutulur. Deneysel oluşturulmuş epileptik nöbetlerde GABA'nın % 50- 60 oranında azaldığı, GABA'erjik inhibitör sinapsların fonksiyon kaybının epileptik odağı oluşturduğu üzerinde durulmaktadır. GABA'nın iki mekanizma ile nöbetten sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bunlar:

Birincisi; sinapslardaki GABA konsantrasyonunun düşmesine bağlı nöronal inhibisyonda azalma.

İkincisi konsantrasyonu normal olmasına karşın GABA'nın kullanılamamasıdır.

Warlton, lityum ve pilokarpın enjeksiyonu ile oluşturulmuş deneysel status epileptikus (SE) modelinde beyinde eksitator aminositlerin konsantrasyonlarının düşük, buna karşın GABA konsantrasyonunun ise beklenmedik bir şekilde özellikle nöbetin şiddetlendiği dönemde artmış olduğunu saptamıştır (15). Chapman ve ark. Bicucilline methioiodide (BMI) ile oluşturdukları epileptik nöbet modelinde de benzer sonuçlar elde etmişlerdir (16). Buna araştırmacılar, sinaptik bölgede GABA'nın geri alınımı veya metabolize olamaması nedeniyle GABA düzeyinin artmış olabileceği şeklinde açıklama getirmişler ve "GABA sentezi var, ancak kullanılamamaktadır" demişlerdir (17).

Epileptik nöbet oluşumunda inhibitör aminoasitlerden taurinin konsantrasyonunun azalmış, glisin ise artmış olduğu saptanmıştır. Glisin, glutamatin NMDA reseptörlerine cevabını artırır. Böylece ekstrasellüler alanda artmış olan glisin glutamatin eksitator etkisini daha da artırmaktadır. Bu görüşe tezat oluşturacak Guilarte ve ark. yaptıkları çalışmada, pridoksin eksikliğiyle oluşturulmuş nöbetlerde korteks ve hipokampusta glutamatin düşmüş olduğunu, glisin ise artmış olduğunu saptamışlardır.(18).

Biyojenik aminlerin de epileptik nöbetlerin patogenezinde önemli olduğu bilinmektedir. Siklik adenosin monofosfat (cAMP) artışının nöbetleri önlediği, siklik guanosin monofosfat (cGMP) artışının nöbetleri başlattığı, Adenosin ve biyojenik aminlerin ise MSS'de cAMP düzeyini yükselterek inhibitör etki gösterdikleri bilinmektedir. ACh ise guanil siklazı aktive ederek veya $Na^+ - K^+$ geçişini etkileyerek depolarizasyonu oluşturmaktadır (19).

$Na^+ - K^+$ pompasının hücre içi Na^+ ve Ca^{+2} miktarını düzenlediği bilinmektedir. Hücre içi Ca^{+2} miktarı artışı, hücre hasarının en önemli göstergesi olup, nörotransmitter

salınımı ve sinaptik iletiyi bozmaktadır. Nitekim; epileptik nöbetlerin oluşumunda beynin en önemli pacemaker merkezi kabul edilen hipokampus CA3 piramidal hücrelerinde sınırlı Ca^{+2} artışının, NMDAR'ın aktivasyonuna neden olduğu ve magnezyumun (Mg^{+2}) da bu reseptörler üzerinde Ca^{+2} geçişini modüle ettiği çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir (19).

Magnezyum, çeşitli ATPazların (örn: Na^{+} pompasını kontrol eden $Na^{+}-K^{+}ATPaz$) aktivatörüdür. $Na^{+}-K^{+}ATPaz$ enzimi Na^{+} girişini azaltır, intrasellüler K^{+} depolanmasını artırır, membrandan Ca^{+2} akımını düzenler. Mg^{+2} ayrıca enerji bağımlı reaksiyonlarda nöromediatörlerin (aminler, aminoasidler) sentezi, serbestlemesi, geri alınımını ve depolanmasını artırır, inhibitör aminoasidlerin reseptörlerini aktive eder, eksitator aminoasidlerin reseptörlerini bloke eder, güçlü epileptojenik ajanların katabolizması için gerekli taurinin hücre içine alınmasını artırır. CAMP ve cGMP oluşumu üzerine de etkilidir (19).

Epileptik nöbet oluşumunda iskemi ve hipoglisemi de önemlidir. Glikoz hem nörotransmitter yapımı, hem de $Na^{+}-K^{+}ATPaz$ enzimi için gereklidir. İskemide metabolizmanın bozulması sonucu iskemik alanda daha fazla kan akımı ihtiyacı doğmakta ve o bölgenin eksitabilite eşiği düşmektedir.

Nedeni ne olursa olsun, epileptik nöronlarda paroksizmal depolarizasyon şifti (PDS) oluşmaktadır. Bu durumda membranı depolarize eden postsinaptik potansiyelin anormal şekilde uzaması ve büyümesi sonucu nöronlar gruplar halinde ateşlenebilir. PDS'nin eksitator nörotransmitterler olan glutamat ve aspartat ile inhibitör nörotransmitter GABA sistemleri arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bunun dışında membranlardaki iyon kanallarındaki bozuklukların da PDS'nin ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir. PDS eksitator bir postsinaptik potansiyele (EPSP) benzer. Ancak daha geniş amplitüdlüdür. PDS çok sayıda ve hızlı aksiyon potansiyeli oluşturur. PDS'nin yarattığı ardışık yüksek frekanslı impuls dizileri bir nörondan diğerine yayılır ve böylece epileptik nöbet veya nöbet aktivitesi oluşur. Zengin komüssural bağlantılar nedeni ile deşarjlar bir hemisferde olmasına karşın, diğer hemisferin aynı alanında bir ayna fokus gelişebilir. Kortikotalamik yolla diensefalona yayılarak tonik klonik nöbetlere dönüşebilir. (20,21)

Epileptik nöbet oluşumu için ileri sürülen teorileri üç grupta toplayabiliriz:

Gibbs'in diffüz kortikal hipotezi: Serebral disritmiye bağlı ve jeneralize kortikal bozukluğun bir sonucu olarak geliştiği düşünülmektedir.

Penfield'in sentransefalik epilepsi konsepti: Nöbetin mezensefalon ve diensefalona yerleşmiş, kortekse bilateral projeksiyon gösteren sentransefalik sistemin nöronlarından kaynaklandığı sanılmaktadır.

Gloor'un kortikoretiküler teorisi: Ortabeyin ve talamik retiküler sistemden çıkan uyarıların, diffüz hipereksitabl kortekste generalize diken dalga boşalmalarına yol açabileceği ve bu ilişkinin absans atağına sebep olabileceği vurgulanmaktadır. EEG'de bilateral olarak ortaya çıkan diken-dalgaların kaynağı araştırıldığında, yavaş dalgaların kortekse çıkmadan birkaç dakika önce talamusta olduğu, dikenlerin ise korteksin derinliklerinde olduğu gözlenmiştir. Gloor ve ark. kedilere yüksek doz penisilin vererek insan absans nöbetlerindeki gibi bilateral senkron diken dalga boşalmaları oluşturmuşlardır. Bu çalışmada kortikal ve talamik nöronların osilasyonlarını göstererek kortiko-retiküler hipotezi desteklemişlerdir (22).

Bütün bu mekanizmalardan korteks, talamik nöronlar ve retiküler formasyon tek başına sorumlu değildir. Nöronal aktivitenin diken-dalga potansiyellerine dönüşümünü sağlayan mekanizma; kortikal hipereksitabilitenin yaygın artışı gibi görünmektedir.

GABA'erjik sistemin korunması, korteks ve talamusta ritmik şekilde diken depolarizasyonuna ve dalga esnasında oluşan nöronal sessizliğin korunmasına katkı sağlar. Gloor'un kortekse klorun iyontoforetik olarak injeksiyonu çalışmasında depolarizasyonların aralıklı, ancak güçlü olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı bir GABA'erjik sistem bu mekanizmanın daha etkin şekilde çalışmasını, inhibe edici postsinaptik potansiyeller (IPSP) arasında oluşan depolarizasyonların daha güçlü olmasını sağlar. Eksitator aminoasitlerin ise kortikal aktiviteyi şiddetlendirdiği, böylece diken-dalga potansiyellerinin gücünü ve devamlılığını sağladığı anlaşılmaktadır. Glutamat-aspartat eksitasyonu ve GABA inhibisyonu diken-dalga boşalmalarının stabil hale geçmesini sağlar (15). Roberts; travma, tümör, serebral anjiom gibi durumlara bağlı olarak, lezyonla ilgili bölgelerde normal dolaşımın bozulması ve anoksik koşulların ortaya çıkmasının nöron hasarına yol açabileceğini, GABA'erjik nöronların metabolik hızlarının yüksek olması nedeniyle GABA'erjik nöron kaybının eksitasyon-

inhibisyon dengesini eksitasyon yönünde bozarak, nöbete yatkınlığı artıracakını öne sürmüştür (23).

2.1.3. Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırılması

Epileptik olayların görüş birliği ile yapılacak bir sınıflandırılmasının gerekliliği eskiden beri bilinmektedir. Masland'a göre, çoğunluğun kabul ettiği tek bir sınıflandırmanın yapılması, altta yatan nedenlerin anlaşılması, bilimsel araştırmaların ilerletilmesi ve sonuçların karşılaştırılması konusunda atılacak ilk adımdır.

Epileptik nöbetlerin ilk sınıflandırması Uluslararası Epilepsiyle Savaş Birliği (ILAE) tarafından 1969 yılında kabul edilmiştir. 1969 ILAE sınıflaması altı kritere dayanır. Bunlar; nöbetin klinik tipi, EEG'nin interiktal ve iktal özellikleri, anatomik durum, etyoloji ve yaştır. Bu sınıflandırma 1981 yılında yeniden düzenlenmiş olup, halen kullanılmaktadır (Tablo 1).

Son yıllarda epilepsi sınıflandırmasından çok epileptik sendromları şekillendirecek bir tablo yapmak için çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. ILAE, 1989 yılında epileptik sendromları bir arada toplayan uluslararası epilepsi ve epileptik sendrom sınıflaması ortaya çıkarmıştır (Tablo 2).

Tablo 1. Epileptik Nöbetlerin Klasifikasyonu (ILAE, 1981)

1-Parsiyel (Fokal, lokal) Nöbetler
A.Basit parsiyel nöbetler (BPN)
1. Motor semptomlu
Fokal motor Jacksonian Versif Postural Fonotubar
2. Somatosensoryel veya Özel Duysal Semptomlu
Somatosensoryel Vizüel Oditubar Olfaktör

Gustatör Vertijinöz
3. Otonomik Semptomlu
4. Psşik Semptomlu
Disfazik Dismnezik Kognitif Affektif İllüzyonlar Yapısal halüsinasyonlar
B. Kompleks parsiyel nöbetler (KPN)
1-Basit parsiyel başlangıcı izleyen bilinç bozukluğu
Basit parsiyel özelliklerin ardından bilinç bozukluğu Otomatizmalarla giden
2-Bilinç durumunun başlangıçtan itibaren bozulması
Sadece bilinç bozukluğu ile giden Otomatizmalarla giden
C. Sekonder jeneralize nöbete dönüşen
1-Basit parsiyel nöbetin jeneralize nöbete dönüşmesi 2-Kompleks parsiyel nöbetin jeneralize nöbete dönüşmesi 3-Basit parsiyel nöbetin kompleks parsiyel nöbete dönüşmesi ve ardından jeneralize nöbete dönüşmesi
2. Jeneralize Nöbetler
A. Absans Nöbetleri
1. Tipik Absans
Sadece bilinç kaybı Hafif klonik komponentli Atonik komponentli Tonik komponentli Otomatizmalı Otonomik komponentli

2. Atipik Absans
Tonus değişikliği A.1 den daha belirgin olan Başlangıç ve/veya sonlanmanın ani olmaması
B. Miyoklonik Nöbetler C. Klonik Nöbetler D. Tonik Nöbetler E. Tonik-klonik Nöbetler F. Atonik Nöbetler
3. Sınıflandırılmayan Grup

Tablo 2. Epilepsiler ve Epileptik Sendromların Uluslararası Sınıflaması (ILAE, 1989)

1. Lokalizasyona bağlı (fokal, lokal, parsiyel) epilepsi ve sendromlar
1.1. İdiopatik (başlangıç yaşına göre)
Sentrottemporal dikenli benign çocukluk çağı epilepsisi Oksipital paroksizmleri olan çocukluk çağı epilepsileri Primer okuma epilepsisi
1.2. Semptomatik
Temporal lob epilepsisi Frontal lob epilepsisi Parietal lob epilepsisi Oksipital lob epilepsisi Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsiyalis kontinuası Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar
1.3. Kriptojenik epilepsiler
2. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar
2.1. İdiopatik epilepsiler
Selim ailesel yenidoğan konvülsiyonları Selim yenidoğan konvülsiyonları Süt çocukluğunun selim miyoklonik epilepsisi Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi) Jüvenil absans epilepsisi Jüvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petit mal)

Uyanırken gelen grand mal nöbetli epilepsi Diğer jeneralize idyopatik epilepsiler Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler
2.2. Kriptojenik veya semptomatik epilepsiler
West Sendromu (İnfanıl spazm) Lennox-Gastaut Sendromu Miyoklonik astatik nöbetlerle karakterize epilepsiler Miyoklonik absansla karakterize epilepsiler
2.3. Semptomatik epilepsiler
2.3.1. Nonspesifik etyolojili
Erken miyoklonik ensefalopati Süpresyon burstleri ile giden erken infanıl epileptik ensefalopati Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler
2.3.2. Spesifik nörolojik hastalıklara bağı epilepsiler
3.Fokal veya jeneralize olduğı belirlenemeyen epilepsi ve sendromlar
3.1 Jeneralize ve fokal konvülsiyonlu epilepsiler
Yenidoğan konvülsiyonları Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgalı epilepsi Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu) Diğer belirlenemeyen epilepsiler
3.2. Fokal veya jeneralize görünüşün belirgin olmadığı durumlar
4.Özel duruma bağı epilepsiler
Febril konvülsiyonlar İzole nöbetler veya status epileptikus Akut toksik veya metabolik nedenlere bağı nöbetler

2.1.4. Epilepside Etyoloji

İdiopatik

Semptomatik

- Santral sinir sisteminin konjenital malformasyonları
- Santral sinir sisteminin enfeksiyonları

- Santral sinir sisteminin travmaları
- Santral sinir sisteminin tümörleri
- Santral sinir sisteminin dejeneratif hastalıkları (Tay-Sachs, Seroid lipofusinozis vb)
- Santral sinir sisteminin kanamaları
- Perinatal nedenler (asfiksi, hipoksi, doğum travması)
- Mitokondrial hastalıklar
- Serebrovasküler hadiseler
- Nörokütanöz sendromlar (Tüberoskleroz vb.)
- Metabolik hastalıklar (Fenilketonüri vb.)
- Pridoksin eksikliği
- Mesial temporal skleroz
- Sendromlar (Aicardi Sendromu vb.)

2.1.5. Epilepsilerde Tanı-Ayırıcı Tanı

Hekim çoğunlukla nöbeti gözleyemeyeceği için nöbet hakkındaki bilgiyi hasta veya hasta yakınlarından alır. Tanımlanan nöbet(ler)in epileptik olup olmadığı, epileptik ise, ne tür olduğu, etiyolojik tanı, tedavi ve prognoz açısından meselenin nasıl ele alınması gerektiği yolundaki karar aşamalarında anamnez bilgilerinin yeri, nörolojik muayene verileri ve laboratuvar araştırmalarından daha önemlidir. Yanlış olarak epilepsi tanısı alan durumlar, gelişmiş merkezlerde dahi %30'lara varan oranlarda bildirilmekte ve bu durumların başında konversiyonlar ve senkoplar gelmektedir. Tam bir fizik ve nörolojik muayene, sistemik bir hastalığın veya yapısal nörolojik bir bozukluğun olup olmadığını göstermesi açısından önem taşır. Laboratuvar incelemeleri, menenjit ve ensefalit şüphesi taşıyan hastalarda lomber ponksiyonu da içermelidir. Anamnezin, muayene bulgularının ve EEG'nin fokal bir bozukluğu işaret ettiği hastalarda görüntüleme veya yapılmalıdır. EEG tanıda ve tedavide çok önemli bir yer tutar. Ancak klinik olarak epilepsisi olan hastaların %20 kadarında EEG normal

bulunur. Bunun yanında hayatlarında hiçbir zaman nöbet geçirmemiş sağlıklı insanların %2- 5 inin EEG lerinde epilepsiye benzer değişiklikler görülür (24,25).

Epilepside ayırıcı tanı:

A) Çocukluk Çağı:

Senkop

Siyanotik nefes tutma atakları

Gece korkuları (3-5 yaş; uyuduktan 1-3 saat sonra; terleme, taşikardi)

Metabolik nedenlere bağlı şuur kaybı

Migren (konfüzyonel durum, baziller migren)

Kardiak ritm bozuklukları (özellikle supraventriküler taşikardi)

Tikler

Titreme atakları (yenidoğan döneminde)

Psikiyatrik kökenli nöbetler

Hipnagogik miyokloniler

Benign paroksizmal koreatetoz

Yalancı nöbetler

Gastroözofageal reflü

Çocukluğun benign miyoklonisi

B) Erişkin dönem

Senkop:

Refleks: postüral, valsolvaya bağlı, miksiyona bağlı vb

Kardiak: disritmi (kalp bloğu, taşikardi vb); valvüler (en sık aort

stenozu); kardiyomiyopati; şanlı hastalıklar vb

Perfüzyon yetmezliği: hipovolemi, otonom yetmezlik

Psikojenik ataklar

Yalancı nöbet

Panik atak

Hiperventilasyon

Geçici iskemik atak

Migren

Narkolepsi

Hipoglisemi başta olmak üzere metabolik nedenler (26, 27)

2.1.6. Status Epileptikus

Status Epileptikus (SE), sebep olduğu yüksek oranda morbidite ve mortalite nedeniyle nörolojik acillerden birisidir. Amerika’da yılda 250000 SE vakası bildirilmektedir ve yaklaşık yılda 30000 SE’ye bağlı ölüm görülmektedir (28, 29).

Bu önemli nörolojik durumun patofizyolojisinin anlaşılması için yoğun uğraşlar verilmesine rağmen klinik görünümünün karışık olması ve iyi bir deneysel model oluşturulamamasından dolayı tam aydınlatılamamıştır (30).

Epilepside olduğu gibi statusun nedenleri de değişkenlik gösterir. Akut beyin zedelenmesi sonrası gelişebileceği gibi epilepsinin bir bulgusu şeklinde de karşımıza çıkabilir. En sık görülen durum; çocuklarda enfeksiyona, erişkinlerde epilepsi tedavisi amacıyla kullanılan antiepileptiğin kesilmesine veya dozunun azaltılmasına bağlıdır.(31)

Status epileptikus gerek hayatı tehdit etmesi, gerekse de ciddi sekeller oluşturması nedeniyle hızla tanımlanıp tedavi edilmesi gereken bir tablodur (31). SE, epileptik tek nöbet aktivitesinin 30 dakikadan daha uzun sürmesi veya iki ve daha fazla nöbetin aralarında hasta bilinci açılmadan seriler halinde gelmesidir. Ancak son yıllarda 5-10 dakikayı geçen konvülfik nöbetlere status gibi yaklaşılması görüşü yaygın olarak desteklenmektedir (32).

Her yaşta görülse de; küçük yaşta ve ileri dönemlerde daha sık görülür. SE, idiyopatik veya semptomatik olarak ayrılabilir. Semptomatik vakaların idiyopatik vakalara oranı 3/1 olarak verilmektedir. (31, 33).

Glutamat; primer eksitatör nörotransmitter olup NMDA reseptörü de dahil olmak üzere depolarizasyonla aktive edilen birçok nöronal reseptöre bağlanır. Bunların sonucu olarak oluşan nöron içine Ca^{+2} girişi depolarizasyonu ve nöbetleri daha da artırır. Glutamat ayrıca Na^{+} ve Ca^{+2} hücre içine girmesi için kanalları açan reseptörleri de aktive eder. Bu aşırı nörotransmisyon sonucunda daha fazla nöronal hasar oluşur. GABA ise çok sıklıkla beyinde inhibitör nörotransmitter olarak rol alır. Ancak aşırı miktarda artmış GABA uyarısı $GABA_A$ ve $GABA_B$ reseptörlerinin her ikisi üzerinde de aktivite artışına yol açar. Presinaptik yerleşimli $GABA_B$ reseptörleri $GABA_A$ reseptörlerini feedback mekanizmayla inhibe ederek paradoksal olarak nöbetlerin artmasına neden olurlar. Ach, adenosin ve nitrik oksiti (NO) de içine alan diğer nörotransmitterler, SE'nin başlama ve devamında önemli rol oynayabilirler (31, 33) .

2.1.7. Epilepside Tedavi Prensipleri

Antikonvülzan tedavisinde bazı ilkelerin benimsenmesi başarı oranını yükseltir. Bu ilkeler şöyle sıralanabilir:

- İlaç seçiminin nöbet tipine göre yapılması
- Tedaviye tek ilaç ile başlanması
- İlaç preparatlarının seçiminde hastanın yaş, mental durumu ve ailenin sosyoekonomik düzeyinin dikkate alınması
- Antikonvülzanların farmakokinetiklerinin elverdiği ölçüde seyrek aralıklarla verilmesi
- Kan düzeyinin stabilize olması için zaman verilmesi
- Hedeflenen doza yavaş ulaşılması
- Nöbetler kontrol altına alınıncaya veya yan etkiler ortaya çıkıncaya kadar doz artırılmadan bir antikonvülzan ilaçtan vazgeçilmemesi
- Nöbetleri kontrol altına alınmış hastalarda nedensiz ilaç değişimi yapılmaması
- Hastaların en az altı ayda bir kontrol edilmesi (27, 34).

Monoterapi ile ilaca ait yan etkiler daha az görülür, ilaç etkileşim sorunu ile karşılaşılmaz. Bilişsel işlevler daha az etkilenir ve daha ucuz tedavi olanağı sağlanır. İlaç sayısı arttıkça hastaların ilaçları düzenli kullanma olasılığı azalır ve yan etkiler nöbet kontrolündeki etkinliğe göre daha çok artar. Nöbetlerin kontrol altına alınmadığı durumlarda veya hastanın farklı antikonvülzanlara yanıt veren farklı tipte nöbetlerinin bulunması durumunda politerapi uygulanabilir. Kan düzeyinin stabilize olması için zaman verilmesi önemlidir. Çoğu antikonvülzanlarda bu süre iki haftayı aştığından en az iki hafta beklenmeden ilacın etkin olmadığına karar verilmemelidir. Bu arada ortaya çıkan hafif nöbetleri dikkate almayıp sık ve ciddi nöbetlerde başka antikonvülzanlara geçilmelidir (34-36).

Nöbetler kontrol altına alınıncaya kadar veya yan etkiler ortaya çıkıncaya kadar doz artırılmadan bir antikonvülzandan vazgeçilmemelidir. Bir ilacın etkili olmadığına karar verebilmek için en az 2-3 ay süre ile etkili ve önemli yan etki oluşturmayacak dozda kullanılması gerekir. İlaça rağmen nöbetleri devam eden ve ilacı düzenli almadığı düşünülen hastalarda veya toksisite kuşkusunda kan düzeyi belirlenmelidir. Antikonvülzan tedavi nöbetlerin kontrol altına alınmasını sağlar fakat epilepsi nedenini ortadan kaldırmaz. Nedene yönelik tedavi semptomatik konvülzyonlarda ve bir ölçüde de epileptik cerrahi de söz konusu olabilir. Bu nedenle herhangi bir hastalık gibi iyileşme kararı vermek ve tedavi süresini kesin olarak belirlemek zordur. Tedavi şartlarının hastanın yaşam kalitesini yükseltmeye yönelik olduğunun unutulmaması gerekmektedir (35,36).

2.1.8. Antiepileptik İlaçların Etki Mekanizmaları

Antiepileptik ilaçların başlıca etki mekanizmaları şöyle özetlenebilir:

1- Nöron membranında yer alan voltaja bağlı Na^+ kanallarını bloke ederek, yüksek frekanslı tekrarlayıcı aksiyon potansiyellerinin ateşlenmesini önleyenler: karbamazepin (KBZ), fenitoin, lamotrigin, okskarbazepin, valproat (36,37).

2-GABA ya bağımlı inhibisyonun allosterik yolla artırılması: fenobarbital, BZD, TPM (36,37).

3-Sinir sisteminde kalsiyum kanalları dendritler, hücre gövdesi ve sinir terminalleri olmak üzere geniş bir alana yayılmıştır. Bu kanallar N, P, T ve Q tipi olmak

üzere ayrılır ve sinir sonlanmalarındaki nörotransmitter salınımını sağlarlar. Özellikle talamusta yer alan ve T tipi kalsiyum kanalının jeneralize absans tipi oluşumunda rol aldığı ve bu nedenle etosüksimid gibi antiepileptiklerin T tipi kalsiyum kanalını bloke ederek nöbeti engellediği düşünülmektedir (36,37).

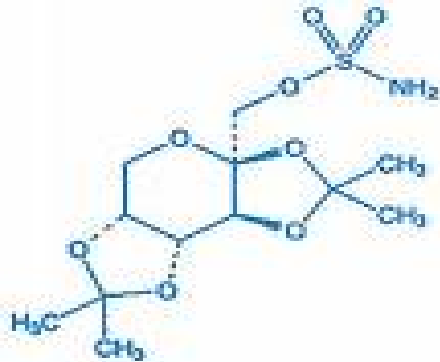
4-GABA transaminaz inhibisyonu: Vigabatrin inhibitör nörotransmitter olan GABA analogudur ve yıkımını sağlayan GABA transaminaz enzimini irreversibl olarak inhibe eder (36,37).

5-Eksitator aminoasid olan glutamatın reseptörünü bloke ederek ya da bizzat glutamatın salınımını inhibe ederek etki edenler: TPM, lamotirigin (36,37).

2.2. Topiramet

Yaklaşık otuz yıl önce sentezlenen ve 1995 yılında İngiltere’de kullanıma sunulan TPM, parsiyel veya birincil jeneralize tonik-klonik nöbetlerin tedavisinde, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından da ruhsatlandırılmıştır. TPM, doğada bulunan monosakkarid D-fruktoz’dan üretilen yeni bir antiepileptiktir. TPM; 2,3:4,5-bis-0-(1-metiletiliden)-β-D-fruktopiranoz sülfamat şeklindeki yapısı ile; bilinen diğer antiepileptiklerden farklıdır (38).

Ampirik formülü $C_{12}H_{21}NO_8S$ olan beyaz renkli kristalize bir tozdür.



Şekil 1. Topiramet 2,3:4,5- bis-0-(1-metiletiliden)-β-D-früktopiranoz sülfamat

Hücresel düzeyde yaygın farmakodinamik etkiler göstermesi nedeniyle diğer antiepileptik ilaçlardan farklı bir yapıya sahiptir. TPM, KBZ ve valproatın farmakolojik profillerini bir araya getirmektedir. Bu niteliği, antiepileptik aktivitenin daha kapsamlı olmasını sağlamaktadır (39,40).

2.2.1. TPM'nin Etki Mekanizması

1. Diğer antikonvülzanlara benzer şekilde, voltaj-duyarlı Na⁺ kanallarını bloke ederek epileptiform deşarjların süresini ve her deşarjda ortaya çıkan aksiyon potansiyellerini azaltmaktadır.

2. Valproat, gabapentin ve BZD'ler gibi beyindeki birincil inhibitor nörotransmitter olan GABA aktivitesini, doza bağlı olarak arttırmaktadır. Ancak TPM'nin etkilerinin bir BZD antagonisti olan flumazenil tarafından inhibe edilmemesi, ilginç olarak TPMnin GABA reseptör kompleksinde, bz-bağlanma yerinden başka bir yere etki ettiğini göstermektedir.

3. Sadece TPM'ye özgü gibi görünen bir özellik olarak, glutamat reseptör alt-tiplerinden kainat ve α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozole propionat (AMPA) reseptörlerini seçici olarak antagonize eder.

4. L tipi kalsiyum kanallar üzerinde düzenleyici etki

5. Karbonik anhidraz (KA) enzimini zayıf olarak inhibe etmektedir. Ancak bu etkinin antiepileptik aktiviteyle ilişkili olduğu düşünülmemektedir (41-45).



TPM gıdalardan bağımsız olarak hızla ve neredeyse tümüyle emilir. Tek dozdan yaklaşık 2 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonlarına erişilir. Emilimi dozla doğrusal olarak orantılıdır. Dolayısıyla doz arttıkça plazma konsantrasyonları da artar. Plazma proteinlerine düşük (%9-17) oranda bağlanması nedeniyle, diğer ilaçlarla etkileşme olasılığının az olduğu bildirilmektedir. TPM'nin hepatik metabolizması sınırlıdır. Böbrekler, (dozun %80'den çoğu) TPM ve metabolitlerinin atıldığı ana yoldur. Aktif metaboliti bulunmamaktadır. Sağlıklı gönüllülerde plazma ortalama yarılanma ömrü 19- 23 saattir. Normal böbrek fonksiyonlarına sahip kişilerde yaklaşık 4 günde kararlı duruma erişilir. Irk ve cinsiyetin kararlı durum farmakokinetiği üzerinde anlamlı etkisi yoktur. Böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması gerekmektedir. Yaşa bağlı farmakokinetik değişim gözlenmemiştir. Dolayısıyla böbrek hastalığı yoksa yaşlı hastalarda doz azaltımının gerekmediği bildirilmektedir. Çocuk hastalarda da

farmakokinetikler benzer ve lineer olmakla birlikte, kararlı durum konsantrasyonun yaklaşık %33 daha az olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (46- 49).

Epilepside monoterapi için önerilen hedef doz 100- 200 mg/gün, maksimum 500 mg/gündür. Bazı dirençli epilepsi olgularında 1000 mg/güne kadar dozların kullanıldığı bildirilmektedir. Tedaviye düşük dozla başlanması ve haftada 25- 50 mg artırılması önerilmektedir. Fenitoin ve KBZ ile birlikte kullanıldığında TPM'nin plazma konsantrasyonları %50 oranında azalırken, valproik asidin TPM plazma konsantrasyonları üzerinde anlamlı bir etkisi saptanmamıştır. Yeterince araştırılmamış olmakla beraber, fenobarbital ile birlikte kullanıldığında TPM'nin plazma konsantrasyonunun dozla orantılı olarak artabileceği belirtilmektedir (47,48,49). Diğer antiepileptik ilaçlarla tedaviye TPM eklenmesi ise, bu ilaçların plazma konsantrasyonlarında klinik açıdan anlamlı bir değişime neden olmamaktadır. TPM lityum düzeylerini minimum azaltmaktadır (50). Araştırmalar, TPM'nin karaciğer enzimlerinden sadece CYP2C19'u inhibe ettiğini göstermektedir. TPM ile birlikte kullanıldığında digoksinin plazma konsantrasyonu azalabilir. TPM özellikle yüksek dozlarda oral kontraseptiflerin etkinliğini azaltabilir. Barbitüratlar, klasik antipsikotikler, trisiklik antidepresanlar, kafein, teofilin ve kumadin üzerinde TPM'nin, metabolizma inhibisyonuna yönelik anlamlı bir etkisinin saptanmadığı bildirilmektedir. Yan etkileri arasında iştahsızlık, kilo kaybı, davranış bozuklukları, kognitif fonksiyon bozukluğu, ürolitiasis, somnolans ve glokom sayılabilir (51).

2.3. Deneysel Epilepsi Modelleri

Epilepsi hakkında bilinenlerin çoğu hayvan modellerinden sağlanmıştır. Hiçbir modelin klinik epilepsiyi tam taklit edememesinden ve her nöbet için farklı model gerekmesinden dolayı çok sayıda model sistem geliştirilmiştir. Hayvan epilepsi modelleri, nöbet hakkında soruların açıklanması, beynin elektriki aktivitesinin hücresel, moleküler ve sistemik boyutta incelenmesi, tedavi edici yöntem ve ilaçların denenip geliştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (52).

Kindling, elektrikselsel ya da kimyasal uyarıların tekrarlanan uygulanmasıyla konvülsiyon aktivitesinin oluşumu ile sonuçlanır. Epilepsi ve epileptogenezisin deneysel modelini oluşturur (53,54).

Kimyasal uyarılar için Pentilentetrazol (PTZ), penisilin, pilokarpin, kainik asit, FG-7142 ve picrotoksin kullanılabilir. Elektriksel uyarıyla KPN modeli oluşturulurken, PTZ ile uygulanan doza bağlı çeşitli nöbet tipleri oluşturulmaktadır. Yüksek ve tek doz uygulanan kimyasal uyarılarla SE modeli elde edilmektedir (55- 58).

2.3.1. Pentilentetrazol

Hayvan modellerinde oluşturulan epileptik nöbetlerin insanlardakine çok benzemesi nedeniyle Primer jeneralize nöbetlerin (PjN) oluşturulmasında PTZ en çok kullanılan ajanlardandır (59). PTZ, (1,5- pentamethylene; 6, 7, 8, 9 tetrahydro- 5 azetpotetrazol) bir tetrazol derivativesidir. Etki mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. PTZ, MSS uyarıcı etkisini GABA_A / BZD reseptör kompleksine picrotoksin bağlanma yerine bağlanarak ve Cl⁻ kanallarının açılmasını engelleyerek gösterir (60).

Pentilentetrazol, GABA sinapslarının etkinliğini GABA reseptör- BZD -klorid iyonofor kompleksi üzerinden azaltır ve nöronların depolarizasyonunu kolaylaştırır. Tekrarlanan PTZ enjeksiyonları sonucu BZD reseptör sayısında artış olduğu bildirilmiştir (61,62). PTZ uygulanması ile provoke olan nöbetlerle, ekstra ve intrasellüler iyon miktarlarındaki değişiklikler ile artmış eksitator veya azalmış inhibitör aktivite nedeniyle spesifik membran fonksiyonlarında bozukluklar görülür (63,64). NMDA reseptörleri ile düzenlenen iletide PTZ ile indüklenen jeneralize tonik-klonik nöbet oluşumunda önemli rol almaktadır (65).

Merkezi sinir sistemindeki en önemli inhibitör sistemlerden biri olan adenozin ve bazı nöroprotektif ajanların PTZ nöbetleri sonrası konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir (66). Uygulanma dozuna bağlı olarak, parsiyel nöbetten SE'ye kadar geniş yelpazede nöbet oluşturulabilir (67). PTZ, kortikal nöronlardan önce mezensefalik nonspesifik retiküler formasyon nöronlarını aktive ettiği ve spinal kordu indüklediği düşünülmektedir. Mirski ve Ferrendelli; mamiller cisim ve mamilletalamik traktusun farelerde PTZ nöbetlerinin düzenlenmesindeki rolünü göstermişlerdir(68- 70).

2.4. Nöronal Ca⁺², Ca⁺² ATPaz ve Epilepsi

Hücre büyük miktarda Ca⁺² içermekle birlikte, önemli bir kısmı serbest halde değildir. Hücre içi Ca⁺² bir takım proteinlere bağlanıp, endoplazmik retikulum, mitekondri gibi organeller tarafından sekestre edilmektedir (71).

Ca⁺² mobilizasyonu hücrenin bir takım bölgeleri tarafından kontrol edilmektedir. Bu bölgeler:

- Voltaja bağlı Ca⁺² kanalları
- Reseptöre bağlı bölgeler
- Na⁺ / Ca⁺² değiştirici bölgeler
- Sarkolemmal Ca⁺² ATPaz
- Plazmolemmal Ca⁺² bağlanma bölgeleri
- Mitekondrial Ca⁺² bağlanma bölgeleri (71).

Nöronal Ca⁺², sinaptik transmisyon, plastisite ve hücrenin hayatta kalması gibi birçok nöronal fonksiyonun düzenlenmesinde rol alır. Bu yüzden Ca⁺² homeostazisindeki bozukluklar farklı yollarla ve çeşitli derecelerde nöronu etkileyebilir.(71).

Kalsiyum homeostazisindeki bozukluk fizyolojik yaşlanmayla da ilgilidir. Yaşla birlikte oksidatif stres, Ca⁺² homeostazisinde bozulmayla birlikte nöronal dejenerasyona neden olabilir. Alzheimer, Parkinson ve Huntington Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda Ca⁺² homeostazisinde bozukluğa bağlı kalsiyum artışı sonucu nöronal kayıp tespit edilmiştir. Bütün bu kronik patolojilerde mitokondrial ve endoplazmik retikulum disfonksiyonu, glutamat eksitotoksitesisi sonucu kalsiyumun nöronlar içerisine girmesiyle nöronal hasar görülmektedir. Epilepsi, şizofreni, Amyotrofik Lateral Skleroz, glukom gibi multifaktöriyel hastalık grubunda da benzer durumlar görülür. Yine HIV enfeksiyonu, travmatik beyin hasarı ve strok gibi ani olaylarda Ca⁺² regülasyon bozukluğuna bağlı beyin ölümüne yol açabilir. Ca⁺² iyonunun MSS'de epileptik aktivite oluşumunda ve devamında önemli rolü olduğu yönünde bir çok yayın bulunmaktadır. Epileptik aktivite sırasında ekstraselüler alanda Ca⁺² miktarı azalmaktadır(72).

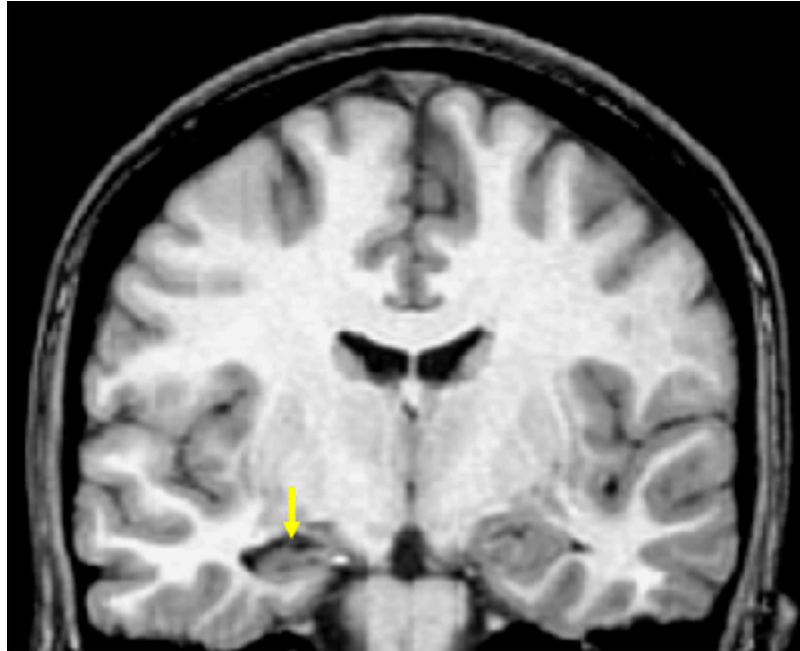
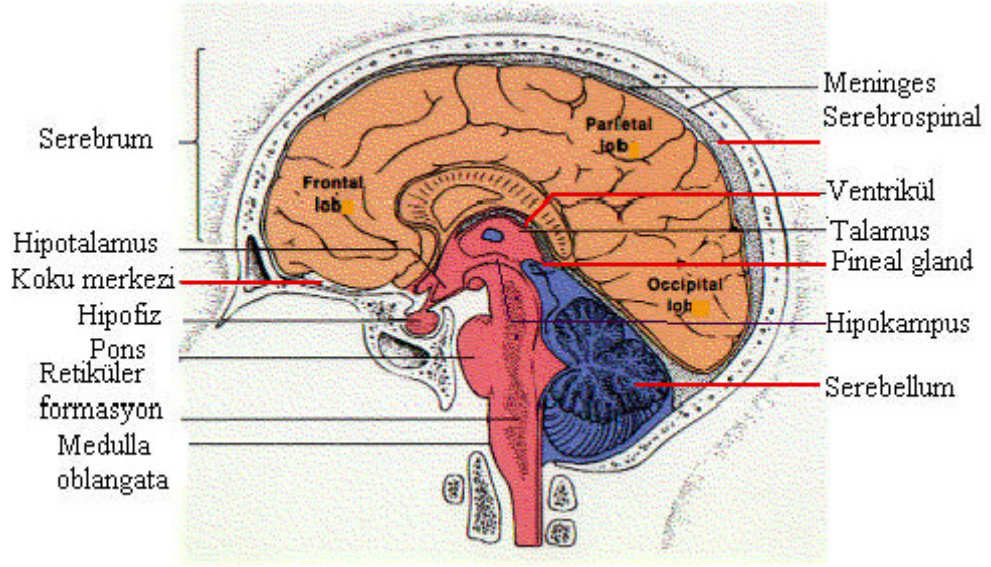
Epilepsi; nöronlarda spontan tekrarlayan epileptiform deşarjlarla (SRED) karakterizedir. Hipokampal nöronal kültürde (HNC) oluşturulan kazanılmış epilepsi modelinde kalsiyum-kalmodülin protein kinaz 2 (CaMK-II) aktivitesinin azalmasıyla SRED oluştuğu görülmüş ve Ca^{+2} homeostazisindeki değişiklerle SRED'ler gelişmiştir.(73).

Pek çok araştırmacı epileptogenezin uzun sürede oluştuğunu, buna bağlı olarak da hücrel ve moleküler mekanizmalarda değişiklikler olduğunu belirtmişlerse de epileptogenez hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir (74,75). Bu yüzden epileptogeneze eşlik eden plastisite değişikliklerin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması epilepsinin tedavi ve önlenmesinde kritik role sahiptir. İntraselüler Ca^{+2} 'nin kronik yükseklikleri ve değişiklikleri epileptik nöronlarda epileptik fenotipin başlatılması ve sürdürülmesinde rol alır (76,77). Ca^{+2} , membranın uyarılması ve sinaptik aktivite gibi çeşitli hücrel olaylarda rol alan önemli bir ikinci mesajcıdır. Ca^{+2} 'nin yükselmesi toksisiteye yol açabilir ki bunun öncesinde epilepsi ve epileptogenez oluşur (78).

Normal hücrelerde Ca^{+2} çeşitli homeostatik mekanizmalarla kontrol edilir (79). Epileptik nöronlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki Ca^{+2} 'nin salınma ve salgılanma mekanizmasında bozukluk bazal Ca^{+2} artışına yol açmakla birlikte önceki Ca^{+2} düzeyine dönme kabiliyetinde de azalma olmaktadır (80,81).

2.5. Hipokampus

Hipokampus; temporal korteksin lateral ventrikülünün alt boynuzunun tabanı boyunca uzanan, kıvrılmış, 5-8 cm uzunluğunda gri cevher kitlesidir. Deniz atına benzediği için bu isimle anılır. Hipokampusun bir ucu amigdaloid çekirdeklerle bitişirken diğer kenarlarından biri temporal lobun ventromedial korteksini oluşturan parahipokampal girusla kaynaşır (82, 83).



Şekil 2. Hipokampus
(Ok işaretiyle sağda hipokampal atrofi gösterilmekte)

Hipokampus, limbik sistem içerisinde önemli fonksiyonlara sahiptir.

- Subikulum (hipokampus ile devam eden girusparahipokampalis)
- Cornu Ammonis (CA) CA1- CA4 piramidal hücre bölgeleri
- Dentat girus olmak üzere üç nöral yapıya ayrılır.

Dentat girus, girus parahipokampalis ile hipokampus arasında yer alan gri cevher parçasıdır. Hipokampus, dentat girus ve subikulumda major input sağlayan bölgedir.(82,83).

Epilepsili kişilerin hipokampus piramidal hücrelerinin CA1, CA2, CA4 nöronları “pacemaker” merkezler olabileceği kabul edilmektedir (84). Araştırmalar bu nedenle bu bölgelerden yapılırlar. Yapılan çalışmalarda hipokampusun hassasiyetinde lateralizasyon mevcut olduğu, epileptik hastaların sağ hipokampusun CA4 piramidal hücreleri sol hipokampusu göre düşük yoğunlukta bulunması hassasiyet asimetrisini düşündürür (85). Hipokampus ve ona bağlı temporal lop yapıları; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve “hipokampal formasyon” adını alır. Hipokampus, forniks yoluyla ön talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderir. Böylece gelen duyuşal sinyalleri farklı amaçlar için uygun davranış reaksiyonlarının içerisinde geçiren ek bir kanal rolü oynar (86-89).

Ayrıca, glukokortikoid hormonların nöroendokrin kontrolünü sağlar. Hiperekstabilite özelliğine sahiptir. Hafif elektriksel uyarılmasında, uyarı bittikten sonra da saniyelerce süren bir epileptik nöbet gözlenir. Bu da hipokampusun normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir. Hareket, yürüme ve diğer motor işlemlerde major rol oynamaktadır. Bu işlemler sırasında hipokampustaki ritmik yavaş dalga EEG aktivitesi (teta ritmi) değişmektedir. Bilginin bellekte pekiştirilmesini sağlar. Epilepsi tedavisi amacıyla hipokampusları çıkarılan hastalarda “anterograd amnezi”, hipokampusun harabiyetiyle “retrograd amnezi” tabloları oluştuğu bildirilmiştir (90,91).

2.6. Glutamat Reseptörleri

Merkezi sinir sisteminde işlev gören en önemli eksitatör nörotransmitter glutamattır (86). Glutamat reseptörleri memelilerin MSS’deki çoğu uyarıcı sinir iletisini düzenlemektedirler. Glutamat reseptörleri hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına katkıda bulunan sinaptik iletide rol alırken, bir yandan da sinir sisteminin gelişimi esnasındaki nöronlar arası bağlantının da oluşturulmasına katkıda bulunmaktadırlar (92).

Glutamat reseptörlerinin başlıca 2 tipi vardır:

I-Metabotropik glutamat reseptörleri: İkinci haberciler üzerinden dolaylı olarak iyon kanallarını kontrol eder.

II-İyonotropik glutamat reseptörleri: Doğrudan iyon kanallarını kontrol ederler. 3 gruba ayrılır:

1. α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozole propionat (AMPA) tercih eden reseptörler
2. Kainat tercih eden reseptörler
3. NMDA tercih eden reseptörler (93-95).

NMDA Reseptörleri

Tüm beyinde yaygın olarak bulunduğu gösterilen N-metil-D-aspartat reseptörlerinin (NMDAR) en fazla bulunduğu yer ise hipokampustaki CA1 bölgesindedir (96). NMDAR agonistleri olan glutamat ve aspartat tipik olarak kısa zincirli dikarboksilik aminoasitlerdir ve kuvvetli eksitator nörotransmitterlerdir (95). EPSP'nin geç komponentini oluşturan NMDAR kanallarının üç özelliği vardır.

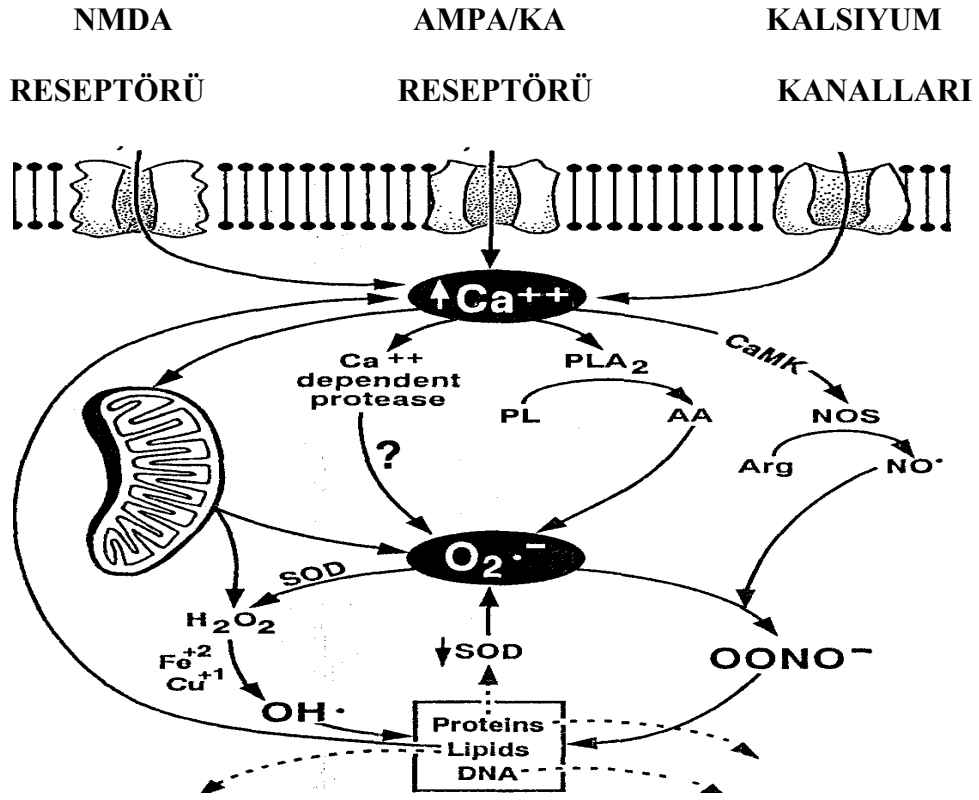
1- Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler ve Na^+ ve K^+ 'nin yanısıra Ca^{+2} 'ya da geçirgendirler.

2- Kanalin açılması bir kofaktör olan glisin ekstrasellüler olarak bulunmasına bağlıdır.

3- Açılması kimyasal haberciye bağlı olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu, NMDAR' ı diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir (96).

Üzerinde en çok çalışılan ve bilgi sahibi olunan reseptör kompleksi olan NMDAR, MSS'de sinaptik fonksiyonun düzenlenmesinde esas rol oynar. NMDA reseptör aracılı kalsiyum, hücre içi akımı, sinapsların şekillenmesi, düzenlenmesi ve seçilmesi gibi farklı fenomenlerin düzenlendiği sinyal iletim şelalesini-kaskadlarını-uyarır (96,97). NMDAR; Monovalan katyonlara ek olarak, Ca^{+2} iyonunun da hücre membranından geçişini sağlar. Diğer iyonotropik reseptörlere kıyasla Ca^{+2} a karşı en az beş kez daha fazla geçirgen olduğu gösterilmiştir (97). MSS'de yaygın olarak

dağılmıştır. Duyusal ileti ve iletinin integrasyonu ile motor fonksiyon ve aktivitenin koordinasyonu ve programlamasında yer alır (98).



Şekil 3. Ca^{+2} 'nin hücre içine geçiş yolları

Fosfolipaz A2 (PLA2); fosfolipitler (PL); Arasidonik Asit (AA); Kalsiyum ve Kalmodulin bagimli protein kinaz (CaMK); Nitrik oksit sentaz (NOS); Arginin (Arg); Nitrik oksit (NO.); Süperoksit anyon radikali (O_2^-); Hidrojen Peroksit (H_2O_2); Hidroksil radikali ($OH\cdot$); Peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$); Süperoksitdismutaz (SOD).

2.6.1. NMDA Reseptör Tipleri

NMDAR, fonksiyonel kanalları endoplazmik retikulumda bir araya getirilen, NR1, NR2 ve NR3 subtipleri tarafından meydana getirilir yedi tane subuniti vardır. Bunlar;

NR1

NR2A

NR2B

NR2C

NR2D

NR3A

NR3B (99,83).

NMDAR voltaja bağımlı tek iyonotropik reseptördür. Normal miktarlarda Ca^{+2} bazı bellek tiplerinin oluşmasında gerekli sinyal yollarını tetiklemektedir. NMDAR'ın aktivitesi Mg^{+2} ile voltaja hassas blokajı ve Ca^{+2} 'a geçirgenliği pora uzanmış olan M2 segmentindeki aminoasit rezidülerine dayanmaktadır. Katyon seçiciliği M2 segmentinin kritik bir alanına (N alanı) dayanmakta, bu alan NMDAR 1 subuniti (NR1) ve NMDAR 2 subuniti (NR2) alt ünitelerinde bulunan bir asparajin rezidüsü tarafından oluşturulmaktadır (94- 96).

Bu subünitler değişik beyin bölgelerinde daha yoğun konsantrasyonlarda yer almakta ve canlının gelişim evresine göre de farklılıklar gösterebilmektedir (100,101). NMDAR özellikle sinaptik bölgede görev yaptıkları için yan etkileri de bu alanlarda beklenmelidir (102).

Yüksek miktarlarda glutamat nöronlar için toksiktir. Beyindeki birçok hücrede L-glutamata yanıt veren reseptörler bulunmaktadır. Doku kültürlerinde ortama yüksek düzeyde glutamat eklenmesi birçok nöronu öldürmektedir. Buna glutamat eksitotoksitesisi adı verilmektedir. Birçok hücrede bu tür toksisite NMDA tipi reseptörlerden Ca^{+2} 'nin hücre içine girişi sorumlu tutulmaktadır. Yüksek intrasellüler Ca^{+2} , kalsiyuma bağlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücreye toksik olan serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. İnme sonrası hücre hasarından, status epileptikusta ortaya çıkan hücre ölümünden ve dejeneratif hastalıklardan kronik glutamat reseptör aktivasyonun ve glutamat toksisitesinin payı olduğu düşünülmektedir. Spesifik NMDAR blokerleri, glutamatın toksik etkisini engelleyebilmesi nedeniyle bugün kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır (94-96,103).

Bazı NMDAR antagonistlerinin deneysel çalışmalarda öğrenme ve hafıza bozuklukları oluşturdukları gösterilmiştir. Özellikle nonkompetitif NMDAR antagonistleri (fenilsiklidin, dizocilpine...) ile olan bir diğer ciddi problem de psikomimetik yan etkilerdir. Bu durum reseptörlerin hipokampustaki yoğunluğu ile açıklanmaktadır. Ayrıca bu ilaçların sıçan limbik sisteminde glukoz kullanımını da arttırdıkları gösterilmiştir. Bazı NMDAR antagonistlerinin vizüel sistemin gelişimini bozduğu, bunun da ilaçların pediatrik hastalardaki kullanımını etkileyebileceği

bildirilmiştir (104,105). NMDAR; solunum, arteryel kan basıncı gibi birçok fizyolojik olayın santral kontrolünde görev yaptıkları için, NMDAR antagonistleri solunum ve kan basıncı değişikliklerine neden olabilir. NMDAR, yoğun çalışılan konulardan biri olup, öğrenme, epilepsi, eksitotoksinle oluşan hücre ölümü gibi nöronal olaylarda önemli rol oynamaktadır (106). NMDAR ile alıştırılan Ca^{+2} kanallarından hipokampal piramidal hücrelere Ca^{+2} girişi ile nöbet oluşmaktadır. NMDAR antagonistleri ise antikonvulzan özellik göstermektedir (105).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan laboratuvarı, Biyofizik ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada on iki haftalık Wistar Albino cinsi toplam 32 adet 200±20 gr ağırlığında erkek sıçan kullanıldı. Tıp Fakültemizde üretilmiş olan sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (25° C) koşullara maruz bırakıldı. Plastik kafeslerde sekizerli gruplar halinde tutuldu. Yeterli miktarda yiyecek ve içecek sağlandı.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1- Soğutmalı santrifüj | : Eppendorf MR5415 (Almanya) |
| 2- Santrifüj | : Jouan B4İ (Fransa) |
| 3- Derin dondurucu | : Uğur (Türkiye) |
| 4- Hassas terazi | : Scaltec SPB 33 (İsviçre) |
| 5- Vorteks | : Nüve NM 100 (Türkiye) |
| 6- Otomatik pipetler | : Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa) |
| 7- Spektrofotometre | : Shimadzu UV 1601 (Japonya) |
| 8- Cam-Teflon homojenizatör | : Çalışkan Cam A.Ş.(Türkiye) |
| 9- pH metre | : Hanna Instruments (Portekiz) |
| 10- Manyetik karıştırıcı | : Nüve (Türkiye) |
| 11- Elektroforez cihazı | : EC Apparatus Corporation 250-90 (ABD) |
| 12- Biyokimya analizörü | : Roche/Hitachi Modular P800(Almanya) |
| 13- Kodak Image Station 2000 MM | : USA |

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

SDS-PAGE ve Western Blot İçin Kullanılanlar:

- Akrilamid: bisakrilamid % 30 T, % 2.6 C; Sigma (Almanya)
- Tris, Merck (Almanya)
- Glisin, Merck (Almanya)
- SDS, Merck (Almanya)
- APS, Merck (Almanya)
- TEMED, Merck (Almanya)
- 2-Merkaptoetanol, Merck (Almanya)
- Brom Fenol Blue, Merck (Almanya)
- Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
- Tween 20, Merck (Almanya)
- Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
- EDTA, Merck (Almanya)
- EGTA, Merck (Almanya)
- Leupeptin, Sigma (Almanya)
- Aprotinin, Sigma (Almanya)
- Benzamidin, Sigma (Almanya)
- Triton X-100, Sigma (Almanya)
- Immobilon-P, Sigma (Almanya)
- Kromotografi filtre kağıdı, Whatman (İngiltere)
- Metanol, Merck (Almanya)
- Hidroklorik Asit, Merck (Almanya)
- Anti NR2A, Sigma (Amerika)
- Anti NR2B, Sigma (Amerika)

- Sekonder antibody-HRP-conjugate, Sigma (Amerika)
- Kemilüminesans working solüsyonu(Almanya)
- Prestained Molecular Weight Marker, Sigma (Amerika)

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılanlar:

1- 4 x Lower Buffer: 1.5 M Tris HCl, pH: 8.8

36.3 g Tris 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH'ı 8.8'e ayarlandı. Soğutulup pH'ı tekrar 8.8'e ayarlandı. 200 ml'ye distile suyla tamamlandı.

2- 4 x Upper Buffer: 0.5 M Tris HCl, pH: 6.8

12.1 g Tris, 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH'ı 6.8'e ayarlandı. Soğutulup pH'ı yeniden 6.8'e ayarlandı. 200 ml'ye distile suyla tamamlandı.

Lower jel: (% 7.5'lük)

Distile su	4450 µl
Acril: bisacril % 30 T, % 2.6 C	2500 µl
4 × lower buffer (tris HCl, pH: 8.8)	2500 µl
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	450 µl
TEMED	10 µl

Upper jel: (% 4'lük)

Distile su	2920 µl
Acril: bisacril % 30 T, % 2.6 C	670 µl
4 × Upper buffer (tris-HCl, pH: 6.8)	1250 µl
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	200 µl
TEMED	10 µl

3- Homojenizasyon buffer: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml Aprotinin, 10 µM benzamidin ve % 1'lik Triton X-100 bulunacak şekilde total hacim 30 ml'ye tamamlandı.

4- Sample buffer:

Upper buffer (0.5 M Tris-HCl, Ph: 6.8)	2.0 ml
Gliserol	1.6 ml
% 10 SDS	3.2 ml
2-Merkaptoetanol	0.8 ml
% 0.1(w/v) Brom fenol blue	0.4 ml

5- Running buffer: 15 gr Tris, 72 gr Glisin, 5 gr SDS, pH 8.3'e ayarlanıp distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. 5 kat sulandırılarak kullanıldı.

6- Transfer buffer: 0.606 gr Tris, 2.882 gr Glisin ve 1 ml % 10 SDS, distile su ile 160 ml'ye pH: 8.2-8.4 olacak şekilde tamamlandı. 40 ml metanol eklendi.

7- TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 12.1 gr Tris, 17.5 gr NaCl, 2 ml Tween 20 (pipetle yavaşça çekilir, yoğun bir madde olduğu için) pH: 7.5 olarak ayarlanıp 2 litreye distile suyla tamamlandı.

8- Primer antikolar: NR2A 1/3000 ve NR2B 1/5000 oranında, taze % 1 Bovin serum albumin (BSA)-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

9- Sekonder antikor: HRP-konjugate 1:5.000 oranında, taze hazırlanmış TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Deneysel Model

Sıçanlar;

Grup1 (G1) : Kontrol. Sadece 6.gün serum fizyolojik (SF) uygulanan grup (n=8)

Grup2 (G2): Sadece 6. gün 60 mg/kg den PTZ ile epileptik nöbet oluşturulan grup (n=8)

Grup3 (G3) : 6 gün süre ile TPM 50 mg/kg/g verilip son uygulamadan 2 saat sonra 60 mg/kg den PTZ ile epileptik nöbet oluşturulan grup (n=8)

Grup4 (G4) : 6 gün süre ile TPM 100 mg/kg/g verilip son uygulamadan 2 saat sonra 60 mg/kg den PTZ ile epileptik nöbet oluşturulan grup (n=8) olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı.

Altı gün süre ile üçüncü gruba 50 mg/kg/g den, dördüncü gruba 100 mg/kg/g den gavajla TPM verildi. 6.gün kontrol grubuna intraperitoneal (i.p.) %0,9'luk SF uygulandı. Diğer bütün gruplar 60 mg/kg i.p. PTZ ile epileptik nöbet oluşturuldu.

3.2.2. Anestezi ve Doku-Kan Örnekleri

Bir gece önceden beslenmesi kesilen hayvanlara PTZ veya SF uygulamasından iki saat sonra ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) karışımı i.p. olarak uygulandı. Daha sonra bütün ratlar sakrifiye edilerek beyin korteksi çıkarıldı. Çıkarılan beyin korteks dokusu iki kez soğuk SF ile yıkandı. Cam şişelerde derin dondurucuda (-30 °C) on saatten daha az süre bekletildi.

Daha sonra korteks örneği buz üzerinde küçük parçalara ayrıldı. Teflon homogenizer kullanılarak soğuk-buz Tris-HCl bufferle (50 mM, pH 7.4) 2 dakika 5000 rpm de homojenize edildi. Kalan beyin korteks örneği ultrasantrifüj kullanılarak mikrozomlar izole edildi. Bütün preparatlar 4 °C de saklandı

3.2.3. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu

Hipokampuslar tartılıp, SDS-PAGE ve Western Blot prosedürü uygulanmak üzere ayrıldı. Aynı gruptaki farklı sıçanlara ait hipokampus örnekleri tartıldıktan sonra grupları 2'şerli gruplar halinde birleştirildi ve ardından 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edildi. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbede homojenizasyon yapıldı. Homojenize edilen örnekler 10000 devirde +4°C'da soğutmalı santrifüjde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar ayrılarak lowry metoduna göre protein tayini yapılarak SDS-PAGE ve Western Blot çalışıldı.

3.2.4. SDS-PAGE Yöntemi

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışıldı (107). % 7.5'lik lower jel ve % 4'lük upper jel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein olacak şekilde, doku homojenatı sample buffer'la 1/1 oranında karıştırılarak uygulandı.

3.2.5. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldı ve daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer prosedürü sonrası anti NR2A ve anti NR2B içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar, Kemilüminesans çalışma solüsyonunda 3 dakika bekletildi. Oluşan bantlar Kodak Image Station 2000 MM, USA cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör subüniti için kendi arasında karşılaştırıldı.

3.2.6. Mikrozoamların İzolasyonu

Dokular temizlenip küçük parçalara ayrıldıktan sonra 1/6 oranında homojenize edildi. 0,3 mol/l sükröz, 10m mol/l (Hepes- HCl pH 7.4) ve 2 m mol/l dithiothreitolden hazırlanan Buffer A solusyonunda homojenize edildi. Beyin dokusu cam homojenizatörlerle parçalandı. Homojenat 85000 g / 75dk'de santrifüj edildi.(MSE, MS 80, Sanyo Inc) (Sorvall, Teknolab A.Ş, Ankara, Turkey). Süpernatant çıkarıldı. Pellet 0,6 M KCl içeren Buffer A solusyonu ile tekrar homojenize edildi ve 85000 g / 75 dk. sonra kalan pellet Buffer A solusyonu ile tekrar aynı işlemlerden geçirildi. Bu işlemler sonrasında süpernatanttan sonra kalan kısmın protein konsantrasyonu 2-7 mg ml/ml olarak ayarlandı. Örnekler -60°C de saklandı ve izolasyon işlemi +4°C de gerçekleştirildi ve taşındı. (107)

3.2.7. Mikrozomal Ca²⁺-ATPaz Aktivitesinin Ölçümü

Ca²⁺-ATPaz aktivitesi Niggli ve ark.nın spektrofotometrik metoduna göre ölçüldü (108)

Ca²⁺ ATPase

ATP -----→ADP+Pi

Pyruvate kinase

ADP+Phosphoenolpyruvate -----→ ATP+Pyruvate

Lactate dehydrogenase

Pyruvate+NADH-----→Lactate+NAD⁺

Medium içeriği : 120 mmole l / l KCl, 60 mmole l / l HEPES pH 7 (at 37 °C), 1 mmole l / l MgCl₂, 0.5 mmole l/l K₂-ATP, 0.2 mmole l/l NADH, 0.5 mmole l/l PEPA, 1 IU pyruvate kinase, 1 IU ml/l LDH and 500 µmole l/l EGTA..Dört dak 37°C inkübasyon ortamında bekletildi. (toplam hacim 1 ml) ve hazırladığımız mikrozomlardan 50 µg ilave edildi. 2 dak. Sonrasında 600 mmol l/l CaCl₂. ilavesinden sonra reaksiyon başladı. ATPaz aktivitesi 365 nm. dalga boyunda okundu.

3.2.8. Total Beyin Kalsiyum Düzeyinin Ölçümü

Doku kalsiyum düzeyi atomic absorpsiyon spektrofotometri ile nitrik asitle yaş yakma prosedürüne göre yapıldı. (Perkin Elmer 2380)

3.2.9. Protein Düzeyinin Ölçümü

Mikrozomlarda ve beyin korteksindeki protein içeriği, Lowry metodu kullanılarak ölçülmüştür (109).

3.2.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 15.0 for Windows” paket programı kullanılarak yapıldı. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analiziyle değerlendirildi. Grupların birbiriyle karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Western Blot sonuçları ortalama ± SEM olarak verildi. P değerinin 0.05’den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Spektrofotometri ile Saptanan Total Beyin Korteks Ca⁺² Düzeyleri

Total beyin korteks Ca⁺² düzeyleri değerlendirildiğinde; kontrol gruna göre diğer grupların beyin total Ca⁺² düzeylerinin anlamlı ölçüde artmış olduğu bulunmuştur.(p<0.001). Sadece PTZ verilen 2. grup, TPM 50 mg /kg +PTZ grubu ve TPM100 mg/kg+PTZ gruplarıyla karşılaştırıldığında beyin total Ca⁺² düzeylerinin yine anlamlı ölçüde artmış olduğu bulunmuştur.(p<0.001). TPM verilen iki grup arasında da yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. (p< 0.001)

Tablo 3. Beyin korteks bazal kalsiyum düzeyi ve mikrozomal Ca⁺²ATP az aktivitesi değerlerinin ortalama ve ± SD değerleri

	Beyin korteks bazal Ca ⁺² düzeyi (µg/gr beyin dokusu) (ort ± S.D., n = 8).	mikrozomal Ca ⁺² ATP az aktivitesi (IU/ mg prot) (ort ± S.D. n = 8).
Kontrol	475± 180	0.0837±0.027
PTZ	1480± 220*	0.0245±0.008**
Top50mg/kg+PTZ	1103±122 ^a	0.0715±0.018
Top100mg/kg+PTZ	878± 57 ^{**b}	0.0897±0.010

* ; kontrole kıyasla p<0,001

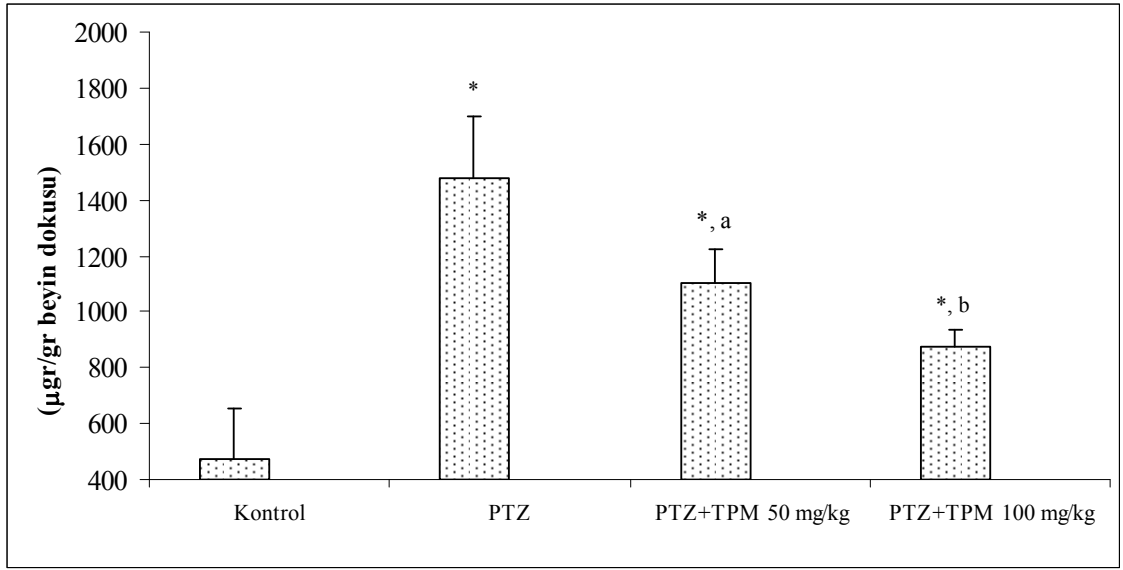
a ; PTZ'ye kıyasla p<0.05

b ; PTZ ve PTZ+ TPM 50 mg/kg'ye kıyasla p<0,001

** ; Ca⁺²ATP az'daki bütün grupla kıyasla p<0.001

4.2. Spektrofotometri ile Saptanan Mikrozomal Beyin Ca⁺²ATPaz Düzeyleri

Mikrozomal beyin Ca⁺²ATPaz düzeyleri değerlendirildiğinde; kontrol grubuyla PTZ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur(p<0.001). Sadece PTZ verilen 2. grupta mikrozomal beyin Ca⁺²ATPaz düzeyleri diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşüktür. (p< 0.001). TPM verilen gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte TPM 100 mg/kg+PTZ grubunda kontrol grubuna daha yakın sonuç elde edilmiştir. (p> 0.05).

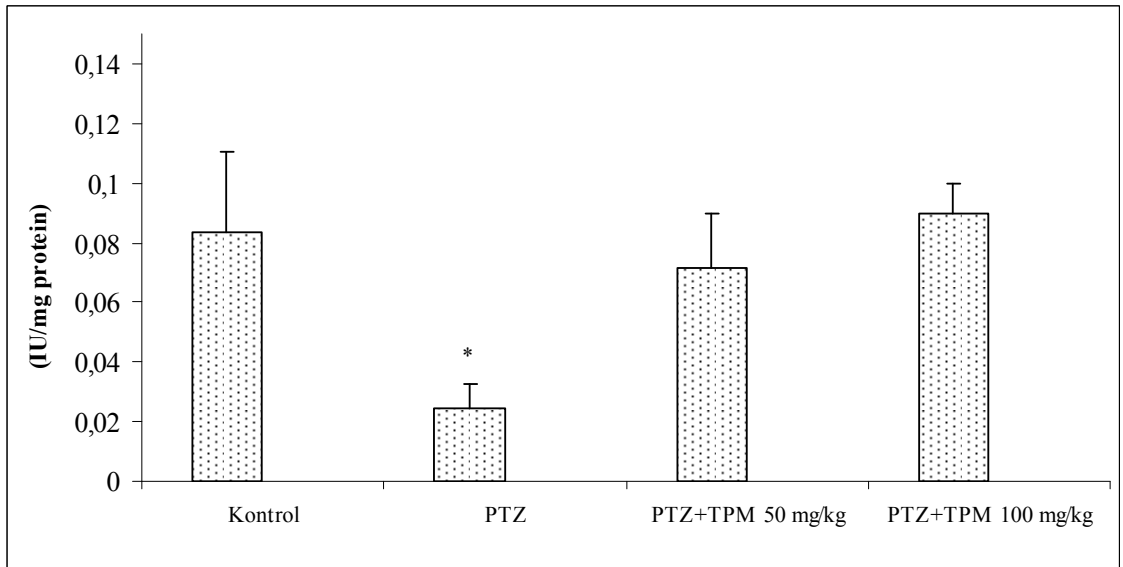


* ; kontrole kıyasla $p < 0,001$

a ; PTZ'ye kıyasla $p < 0,05$

b ; PTZ ve PTZ+ TPM 50 mg/kg'ye kıyasla $p < 0,001$

Şekil 4. Beyin total kalsiyum düzeyi



* ; bütün gruplara kıyasla $p < 0,001$

Şekil 5. Beyin mikrozomal Ca^{+2} ATP az aktivitesi

4.3. Western Blot Analizi ile Saptanan NR2A, NR2B Reseptör Düzeyleri

Hipokampal NR2A reseptör yoğunlukları değerlendirildiğinde; PTZ ile nöbet oluşturulan grupla diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Kontrol grubuyla sadece PTZ verilen 2. grup kıyaslandığında PTZ verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı artış ($p < 0.01$) bulunmuştur. Kontrol grubuyla TPM 50 mg /kg +PTZ grubu ve TPM100 mg/kg+PTZ grubu kıyaslandığında TPM 50 mg /kg +PTZ ve TPM100 mg/kg+ PTZ gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif artış gözlenmiştir ($p > 0.05$). TPM 50 mg/kg +PTZ ve TPM100 mg/kg grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir. ($p > 0.05$)

NR2B reseptör yoğunlukları analizinde, kontrol grubuyla diğer bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ($p < 0.01$). PTZ grubuyla TPM 50 mg /kg +PTZ grubu ve TPM100 mg/kg+PTZ grubu kıyaslandığında PTZ grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p < 0.01$). TPM 50 mg /kg +PTZ ve TPM100 mg/kg karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir. ($p > 0.05$)

Hipokampus NR2A ve NR2B reseptör Western blot analiz sonuçlarının düzeylerinin ortalamaları ve standart sapmaları tablo 4, şekil 7 ve şekil 9 de gösterilmektedir.

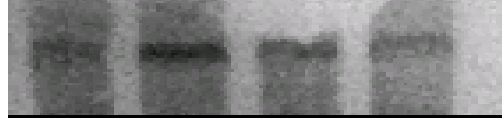
Tablo 4. Tüm gruplarda NR2A, NR2B reseptörlerinin yüzdellik cinsinden yoğunlukları ortalama ve \pm SD değerleri

Gruplar (n =8)	NR2A (optik dansite)	NR2B (optik dansite)
Kontrol	100	100
PTZ	174,86 \pm 7,54*	187,05 \pm 12,01**
TPM 50 mg/kg+PTZ	105,74 \pm 10,03	127,17 \pm 11,09**a
TPM100 mg/kg+PTZ	112,74 \pm 5,08	120,42 \pm 3,62**a

* ; NR2A'daki bütün gruplara kıyasla $p < 0,001$

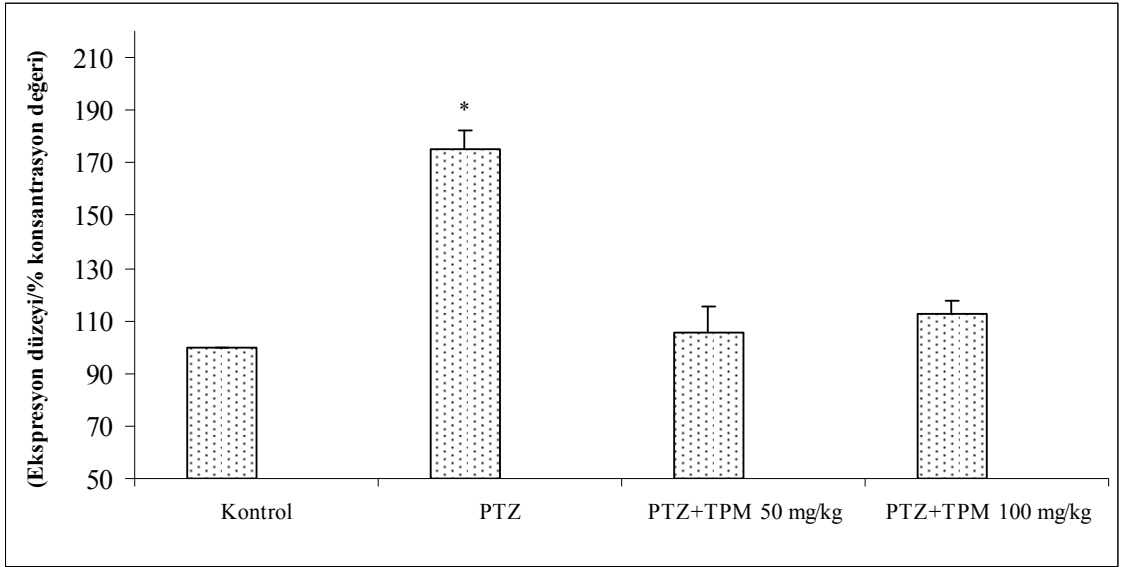
** ; NR2B'deki kontrole kıyasla $p < 0,01$

^a ; NR2B'deki PTZ ye kıyasla $p < 0,01$



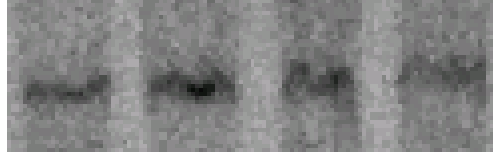
G1 G2 G3 G4

Şekil 6. NR2A'ya ait Western Blot örneği

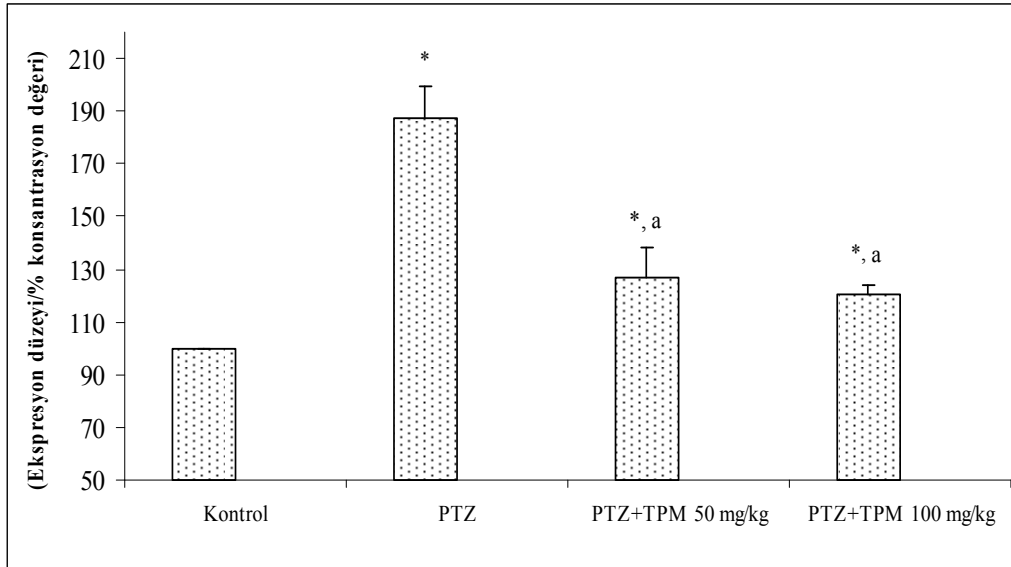


* ; bütün gruplara kıyasla $p < 0,001$

Şekil 7. NR2A'ya ait Western Blot örneği. Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir



G1 G2 G3 G4
Şekil 8. NR2B'ye ait Western Blot örneği



* ; kontrole kıyasla $p < 0,01$

a ; PTZ ye kıyasla $p < 0,01$

Şekil 9. NR2B'ye ait Western Blot örneği. Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir

5. TARTIŞMA

Epilepsi serebral nöronların bir bölümünün ya da tamamının senkronize olmuş anormal elektriki davranış gösterdiği nöbetlerle seyreden bir hastalıktır. Nöbetler, MSS' nin inhibisyonu ile eksitasyonu arasındaki koordinasyonun bozulması sonucunda ortaya çıkarlar. Epilepsinin oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte ileri sürülen hipotezlerden bir tanesi; iyonik iletide bir bozukluğa yol açabilecek intrinsik nöronal membran ve moleküler kanal değişiklikleridir. Wallace ve ark. voltaja bağlı Na^+ kanallarındaki mutasyonun, tipik febril nöbetle birlikte JE ve idiopatik JE ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (110). Yine idiopatik epilepsilerde tanımlanmış ilk defekt ligant kapılı iyon kanallarından CHRNA 4 nöronal nikotinik Ach reseptörü defektidir. Son zamanlarda KCNQ2 ve KCNQ3 diye tanımlanan iki voltaj kapılı K^+ kanal geninin benign famiyal neonatal konvulsiyonlarla ilişkili olduğu bulunmuştur (111-113).

Glutamatın aşırı artışına bağlı olarak aktive olan NMDA subüniti intraselüler Ca^{+2} artışını sağlar, ekstraselüler alanda ise Ca^{+2} miktarı azalır. Ayrıca çeşitli nedenlere bağlı olarak oluşan serbest oksijen radikalleri (ROS), oksidatif stres oluşturarak hücre içerisine Ca^{+2} akışına neden olur. Artan ROS lipid peroksidasyonuna neden olarak nöronal dejenerasyon meydana getirebilir ve epilepsinin gelişiminde rol oynayabilir (114).

Mitokondrideki Ca^{+2} birikimi, artan ROS ile birleşerek Ca^{+2} 'un mitokondrilerden hücre içine girişine neden olur. Böylelikle intraselüler Ca^{+2} daha da artar.

NMDAR ile çalıştırılan kalsiyum kanallarından hipokampal piramidal hücrelere Ca^{+2} girişi ile nöbet oluşmaktadır. NMDAR antagonistleri ise antikonvulzan özellik göstermektedir (106).

Paroksizmal depolarizasyon şifti; tek nöron düzeyinde epileptik aktivitenin göstergesi olan tipik membran potansiyeli değişikliğidir. Hücre içinde artan Ca^{+2} , katyon akımına yol açmakta ve bu akım depolarizasyonu desteklemektedir. Artan Ca^{+2} , hücre dışına K^+ , hücre içine de Cl^- akışına neden olarak PDS sona erdirilmektedir. PDS kalsiyum kanal antagonisti D890 ile deprese olurken, kalsiyum kanal agonisti BAY K 8644 ile PDS'nin amplitüdünü artmaktadır. Fenitoinin sinaptozomal Ca^{+2} geri alımını inhibe ederek etki ettiği gösterilmiştir (115).

Kalsiyum depolarizasyonla presinaptik terminallerden hücre içine girmekte ve beyinde en büyük Ca^{+2} reseptör proteini olan kalmodülinle birleşmektedir. Ca^{+2} -kalmodülin kompleksi membran proteinlerini fosforilleyerek nörotransmitter salınımı ve nöronal fonksiyonları düzenlemektedir. Kalsiyum kalmodülin protein kinaz 2 (CaMK-II) nöronal eksitabilite ve fonksiyonlarında önemli rol oynar. Çeşitli invivo ve invitro epilepsi modellerinde CaMK-II aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir(116).

. Biz de yaptığımız çalışmada; PTZ ile epilepsi oluşturulan 2. grupta total Ca^{+2} düzeyinin diğer gruplardan yüksek olduğu, PTZ öncesi TPM verilen 3 ve 4. grupta ise kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılığı olmadığı sonucunu elde ettik. Bu sonuçlar TPM'nin antiepileptik etkisinin hücre içi Ca^{+2} artışını engelleyerek sağladığı hipotezini desteklemektedir. Ancak bu sonuçlar, doğrudan hücre içerisine Ca^{+2} girişi önlenerek olabileceği gibi dolaylı olarak OS azaltılarak da sağlanmış olabilir.

Raza ve ark. yaptıkları bir çalışmada genç ve orta yaşlı ratlarda hipokampal CA1 nöronlarında Ca^{+2} düzeylerini karşılaştırmışlar. Bazal Ca^{+2} düzeyi genç nöronların %60 ında 51-100 nM iken orta yaşlı nöronlarda Ca^{+2} düzeyi %50 den fazlasında 150 nM bulunmuştur (117). Yine benzer şekilde yaşlı memeli beyinlerinde kalbindin, kalretinin, parvalbümin gibi Ca^{+2} bağımlı proteinlerde düşme gözlenmiştir (118).

Bu bulgular yaşlı bireylerde nöronlarda biriken Ca^{+2} miktarındaki artışın ileri yaşta ortaya çıkan epilepsilerde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Pilokarpinle oluşturulmuş epilepsi modelinde yeni epileptik ratlarla bir yıldır nöbetleri olan epileptik ratların nöbet sonrası yükselen Ca^{+2} düzeylerinin eski seviyelerine dönme süreleri karşılaştırılmış. Uzun süredir nöbetleri olan epileptik ratların Ca^{+2} düzeyinin eski seviyesine dönme süresinin daha uzun olduğu bulunmuş (119). Ancak bu çalışmada grupların nöbet süreleri değerlendirilmemiş. Farklı kindling modellerinde yapılan çalışmalarda tekrarlayan nöbetlerin sürelerinin ilk nöbetlere göre daha kısa oldukları bildirilmiştir. Bu durum ise kullanılan konvulzan ajana karşı gelişen tolerabiliteye bağlanmıştır. Ayrıca maksimal elektroşokla oluşturulan epilepsi modelinde ilk zamanlarda Ca^{+2} düzeyinde belirgin bir değişiklik olmadığı da rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda tek ve yüksek dozda uygulanan PTZ'nin Ca^{+2} düzeyinde anlamlı farklılık meydana getirdiği bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda hipokampal nöronal kültür (HNC) modelinde SE ve epileptogenezde oluşan SRED'lerde Ca^{+2} düzeyinin yükseldiği görülmüştür. Dahası, SE ve elektrografik nöbet aktivitesinin bitmesine rağmen Ca^{+2} yüksekliğinin 2- 4 saat kadar daha devam ettiği görülmüştür. Ayrıca Ca^{+2} homeostazisinde değişiklik sonucu mikrozomal Ca^{+2} geri alımında azalmaya bağlı olarak akut, yükselen Ca^{+2} düzeyinin yavaş şekilde azaldığı görülmüştür (120- 123).

Pal ve ark. yaptıkları in vitro SE modelinde Ca^{+2} miktarındaki maksimum artışın 2. saate kadar olduğunu gözlemlemişlerdir(121). Biz de PTZ uygulandıktan 2 saat sonra sıçanları sakrifiye ettik. PTZ uygulanan tüm gruplarda süre ve şiddeti farklı olan epileptik nöbetleri gözlemledik.

Sun ve ark. glutamat hasarının indüklediği epileptogenezde kültür hücrelerinde intraselüler Ca^{+2} düzeyinin geri dönüşümlü yükseldiğini tespit etmişlerdir. Epileptojenik glutamat maruziyetinde ekstraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun azaldığını, Ca^{+2} için subsünit olan baryum veya NMDAR antagonistleri verildiğinde intraselüler Ca^{+2} yükselmesinin azaldığını ve epileptik aktivitenin inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca non NMDAR antagonistlerinin Ca^{+2} düzeyi ve epileptogenez üzerine etkisinin olmadığı, Ca^{+2} yükselme süresi ve total Ca^{+2} 'un epileptogenezle ilişkisi olduğu sonucuna varmışlardır. Burada da epileptik nöronlarda glutamatın indüklediği Ca^{+2} yüksekliğinin kontrol nöronlarına göre daha uzun sürede normal düzeyine gerilediği gösterilmiştir(124).

Pal ve ark. yaptıkları bir çalışmada sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz inhibitörü thapsigarginin, epileptik nöronlarda Ca^{+2} salınımını anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Çalışmanın sonucu olarak Ca^{+2} düzeyindeki ısrarcı değişikliklerin epileptogenezde uzun süreli plastisite değişikliğine neden olduğu bildirilmiştir (120).

Epilepsi mekanizmasının, ailesel kanalopatilerle birlikte Na^{+} , K^{+} , veya Ca^{+2} kanal mutasyonlarıyla ilgili defektlere ve onların aktiviteleriyle ilişkili hücre membranından iyonların geçişini düzenleyen Na^{+} - K^{+} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz gibi membrana bağımlı enzimlerdeki defekte bağlı olabileceği düşünülmektedir. Arundhati ve ark. idiopatik JE'li hastaların eritrositlerinden hazırladıkları Na^{+} - K^{+} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz aktivitelerinin kontrol grubuna göre belirgin düşük bulmuşlardır.

İnsanlardaki idiopatik epilepsilerin $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$ ve $\text{Ca}^{+2}\text{ATPaz}$ gibi aktif transport mekanizmalarındaki genetik defektlere bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. $\text{Ca}^{+2}\text{ATPaz}$ membrana bağlı enzimlerdir ve hücre içerisinde Ca^{+2} dengesinin sağlanmasında önemli rol oynar. Ayrıca hücre içi artan Ca^{+2} 'ı normalde dışarı pompalayan voltaj bağımlı Ca^{+2} pompasının fonksiyonunun bozulması membranda Ca^{+2} 'a karşı geçirgenliği artırır (125).

Rosenblatt ve ark. 7-60 günlük epileptik ve kontrol grubu farelerde $\text{Ca}^{+2}\text{ATPaz}$ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$ ve $\text{Mg}^{+2}\text{ATPaz}$ aktivitelerini araştırmışlar. $\text{Ca}^{+2}\text{ATPaz}$ ve $\text{Mg}^{+2}\text{ATPaz}$ aktiviteleri epileptik ratlarda düşük bulunurken, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesinin epileptik ve kontrol grubu arasında bir farklılık olmadığı görülmüştür. (126)

Bizim çalışmamızda da mikrozomal Ca^{+2} ATPaz enzim aktivitesi düzeyinin PTZ ile nöbet oluşturulan 2. grupta en az olduğu 50 ve 100 mg/kg TPM verilen 3 ve 4. grupta ise kontrol grubuna yakın düzeylerde sonuçlar elde ettik. TPM ya doğrudan, ya da hücre içine aşırı Ca^{+2} akışını engelleyip hücreler arasında iyon dengesini sağlayarak voltaj kapılı kanalların fonksiyonunun bozulmasını engelliyor olabilir.

İskemi sırasında oksidatif fosforilasyonun ortadan kalkması ile Na^+K^+ pompası için gerekli olan ATP sentezi üretilememektedir. Bu inhibisyon sonucu voltaja bağımlı Ca^{+2} kanalları açılıp nöron içine doğru Ca^{+2} akışı olmaktadır. Bu akım geri dönüşümsüz nöronal hasara yol açacak olaylar zincirini tetiklemektedir. Ca^{+2} akışının iskemik nöbetlerin biyokimyasal katalizörü olarak rol oynadığı ileri sürülmektedir (127). Bu mekanizmanın anlaşılmasından sonra bir dönem hipertansiyonu olan inmeli hastalarda kalsiyum kanal antagonisti kullanılmıştır. Ancak günümüzde kalsiyum kanal antagonistlerinin nöronal hasar üzerine etkisinin diğer antihipertansife göre çok üstün olmadığı görüşü hakimdir.

Epileptik nöbetlerin oluşumunda GABA'nın farklı bir açıdan önemini ortaya koyan Bonnet ve ark. PTZ, bicucilline methiodide (BMI), Penisilin, kafein ile oluşturdukları deneysel epilepsi modellerinde hipokampus CA3 nöronlarının GABA cevaplarına bakmışlar ve şu sonuçları elde etmişlerdir;

- a) GABA antagonisti olan PTZ ve BMI'nin düşük konsantrasyonlarında GABA'erjik IPSP'yi değiştirmemiştir.
- b) Endojen olarak epileptik etki gösteren kafein verildiğinde GABA'erjik IPSP'ler büyümüş veya değişmeden kalmıştır.

- c) BMI ile oluşturulan epileptik paroksizmal depolarizasyon organik Ca^{+2} antagonisti verapamil tarafından bloklanmıştır (128).

Bu bilgilerin ışığında; konvülfif ilaçların, GABA antagonistik özellikleri yanında, intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunu değiştirerek epileptik aktiviteye neden olabilecekleri düşünülebilir. Epileptik aktivite oluşumundan tek bir neden sorumlu tutulamaz. Birçok presipitan faktör söz konusudur. Çeşitli nedenlerle, GABA'erjik sinaps hasarı ve mevcut GABA'nın kullanılmaması nedeniyle GABA inhibisyonunun ortadan kalkması sonucu jeneralize nöbetler oluşabilmektedir. Bu arada bir takım faktörler nedeniyle hücre içi Ca^{+2} miktarı artışı gözardı edilmemelidir (129).

NMDA reseptörleri sinaptik güçteki değişiklikleri başlatabilen eksitator sinaptik transmisyon tamamlanmasına aracılık eden ligant kapılı iyon kanallarıdır (118). NMDAR; strok, beyin hasarı, epilepsi ve bazı psikiyatrik hastalıkların patofizyolojisinde etkilidirler (128-132). NMDA reseptörleri glisin bağımlı NR1 ve glutamat bağımlı NR2 kombinasyonunu kapsayan tetramerik protein kompleksleridir. Dört farklı NR2 subünitinin (2A, 2B, 2C, 2D) yayılımı ve fonksiyonel profilleri farklıdır(133,134).

Erişkin sıçan beyininden yapılan çalışmalarda NMDA reseptör subünitlerinden NR2A hemen bütün beyin bölgelerinde yaygın bulunurken NR2B ön beyinde, NR2D diensefalon ve mezensefalonda, NR2C serebellum, talamus ve olfaktor bulbusta sınırlıdır. Yani NR2A beyin tamamında hakim reseptör subtipi iken diğerleri bölgeye spesifik reseptör subtipleridir (135). Carlos ve ark. yaptıkları bir çalışmada erişkin ve yeni doğan sıçan beyinlerinde NR2A ve NR2B reseptör yoğunluklarını incelemişler. Erişkin sıçanlarda NR2A ve NR2B; korteks ve hipokampusta en yoğunlukta, ön beyin bölgelerinde daha az yoğunlukta bulunmuş. Arka beyin bölgelerinde NR2A az, NR2B çok daha az tespit edilmiş. Bu subünitlerin MSS'de postnatal yayılım ve gelişiminin farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca korteks ve striatumda NR2A doğumda bulunmazken sonraki dönemlerde tespit edilmiştir. Oysaki ön beyinde NR2B düzeyi neredeyse erişkin dönemdeki kadar bulunmuş. Bu sonuçlar erken postnatal dönemde NR2B, MSS'de NMDA reseptörlerinin modülasyonunda dominant rolü oynamaktadır. Bu sebeple NMDA reseptör fonksiyonundaki geçici değişikliğin NR2A ve NR2B

subünitlerindeki maturasyon esnasındaki farklılıktan olabileceği sonucuna varmışlardır(136).

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki; farklı nöbet tiplerinde ve farklı beyin bölgelerinde NMDA reseptör subünitleri artış azalabilmektedir Belki ileride epilepsi tedavisine girecek NMDA antagonistleri, subünitindeki yoğunluğuna göre, hastanın yaşı da göz önünde bulundurularak tercih edileceklerdir.

Gary ve ark. temporal lob epilepsili hastalarda NMDAR subünitinde mRNA düzeylerindeki değişikliği nöbeti olmayan otopsi vakalarıyla karşılaştırmışlar. Hipokampal skleroz (HS) ve non HS hastalarında dentat granüler hücrelerde NR2A ve NR2B düzeylerinin, otopsi vakalarıyla karşılaştırıldığında artmış olduğunu bulmuşlardır. Dahası non-HS hastalarında 2/3 CA piramidal nöronların NR1 ve NR2B düzeylerinin arttığını belirtmişlerdir. HS'li hastaların, nonHS ve otopsi vakalarından 2/3 CA piramidal nöronlarında NR2A düzeyinin düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular temporal lob epilepsili hastalarda dentat granüler hücrelerde NMDA reseptörlerinin arttığını ve eksitator postsinaptik potansiyellerin NMDA aracılığıyla olduğunu güçlü şekilde desteklemektedir (137).

Çalışmamızda hipokampal bölgeden alınan örneklerde NMDA reseptör subtiplerinden NR2A ve NR2B reseptör yoğunlukları PTZ ile nöbet oluşturulan ikinci grupta kontrol ve TPM tedavisi verilen gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. TPM verilmesi sonrası nöbet oluşturulan 3. ve 4. grupta NR2A ve NR2B reseptör yoğunluklarının, kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu saptanmıştır. Yani TPM; NMDAR üzerine etki etmekte ve etkinliğini bu yol üzerinden de sağlıyor gözükmektedir.

Qian ve Noebels yaptıkları çalışmada; hipokampal CA1 ve CA3 bölgelerine elektrik stimülasyonu ile oluşturdukları nöbet modeline TPM vermişler. TPM'nin presinaptik Ca^{+2} girişine etkisinin olmadığını, etkisini AMPA ve kainat reseptörleri üzerinden sağladığını ve NMDA reseptörlerini etkilemediğini belirtmişlerdir (138). Bilindiği üzere epileptik nöbet ne kadar uzun sürerse nöbetin kontrolü o kadar güçtür ve bu durum birbirini izleyen bozuklukların gelişmesiyle ilgili gözükmektedir. Bu duruma GABA'erjik inhibisyonun bozulması ve NMDA reseptör üzerinden yönlendirilen uyarımın serbest kalması örnek olarak gösterilebilir. Bizim çalışmamızda 6 gün gavajla

TPM verilmesi sonrası yüksek doz PTZ ile nöbet oluşturulmuştur. Konvulzan ajanın farklı dozlarda farklı nöbet tipleri oluşturduğu ve aynı antiepileptiğin farklı konvulzanlarla oluşturulmuş nöbet modellerinde etkisinin farklı olduğu bilinmektedir. Yüksek dozda konvulzanla oluşan uzun ve şiddetli nöbetlerde GABA'erjik inhibisyonun bozulması ve NMDA reseptör aktivasyonu olmaktadır. TPM; direk veya dolaylı olarak NMDA subünit konsantrasyonunu azaltarak etkisini göstermektedir.

ÖZET

Ratlarda Pentilentetrazol İle Oluşturulan Epileptik Nöbet Modelinde Topiramatin Beyin Kalsiyum, Ca⁺² ATPaz Ve NMDA Reseptörleri Üzerine Etkileri

Epilepsi, dünya popülasyonunun yaklaşık %1 ini etkileyen yaygın bir nörolojik hastalıktır ve çeşitli beyin bölgelerinde nöronların hipereksitabilitesi sonucu görülen nörodavranışsal bir rahatsızlıktır.

Pek çok araştırmada epileptogenezisin oluşumu, uzun süreli hücrel değişimle oluştuğu belirtilmişse de epileptogenezisin hücrel ve moleküler mekanizması hala tam anlaşılabilmiş değildir. Bu yüzden epileptogenezde plastisite değişikliğinin altındaki mekanizmaların aydınlatılması çalışmaları epilepsinin hem önlenmesi hem de tedavisinde önemli gelişmeler sağlayacaktır.

Kalsiyum, sinaptik aktivite ve membran eksitabilitesi gibi pek çok hücrel olaylarda rol oynayan önemli bir ikincil habercidir. Araştırmalar epileptik nöronlarda Ca²⁺ un sekresyon ve atılım mekanizmalarındaki bozukluğun bazal Ca²⁺ miktarında artışa yol açabileceğini göstermektedir. Ca²⁺ATPaz membrana bağlı enzimlerdir ve hücre içerisinde Ca²⁺ dengesinin sağlanmasında önemli rol oynarlar. Bugünkü bilgiler epilepsilerin Na⁺, K⁺ veya Ca²⁺ kanallarındaki mutasyona, ailesel kanalopatilere ve hücre membranında iyon transportunu düzenleyen membran bağımlı enzimlerden Na⁺-K⁺ATPaz ve Ca²⁺-ATPaz gibi enzim defektlerine bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Konvulzanların tekrarlayan kullanılması GABA'erjik (Gama Amino Butirik Asit) fonksiyonların azalmasına yol açmakta ve farklı glutamat subtiplerinin yoğunluğunda ve konsantrasyonunda değişiklik meydana gelmektedir. NMDAR (N-metil-D-aspartat reseptör) aktivasyonu ve Ca²⁺ un artması epilepsinin oluşumuna yol açmaktadır.

Bu çalışmanın amacı PTZ ile epileptik nöbet oluşturulmuş ratlarda, beyin korteks kalsiyum, mikrozomal Ca²⁺-ATPaz aktivitesi ve hipokampal NMDAR konsantrasyonunu ölçmektir.

Çalışma için otuziki erkek Wistar sıçan alındı ve dört eşit gruba ayrıldı. İlk grup kontrol grubu ve ikinci grup tek doz PTZ verilen gruptu. 3. gruba 50 mg/kg/g den, 4. gruba ise 100 mg/kg/g den Topiramet (TPM) intragastrik olarak 6 gün boyunca verildi. 6. gün 2,3, ve 4. gruplara 60 mg/kg Pentilentetrazol (PTZ) ile epileptik nöbet oluşturuldu. Nöbetten 2 saat sonra tüm ratlar sakrifiye edildi. Beyin dokusu ve hipokampusları alındı.

Sonuçlarımız PTZ indüksiyonuyla oluşan nöbette Ca^{2+} -ATPaz aktivitesin azaldığını, bazal Ca düzeyinin ve NMDA subünit konsantrasyonlarının arttığını desteklemektedir. TPM tedavisi enzim aktivitesini artırırken, total Ca^{+2} düzeyini ve NMDA subünit konsantrasyonlarını azaltmaktadır. Sonuç olarak bizim çalışmamız, bu mekanizmalarının anlaşılmasının epilepsi tedavisinde ve epileptogenezin önlenmesi veya geri dönüşümünde yeni terapötik yaklaşımlar geliştireceğini desteklemektedir.

Anahrat Kelimeler: Epilepsi, PTZ, TPM, Ca^{+2} , Ca^{+2} ATPaz, NMDA

SUMMARY

Effect of Topiramate on Pentylenetetrazol Induced Epileptic Seizure, Brain Ca^{2+} , Microsomes Ca^{2+} -ATPase and NMDA Receptors of Rats

Epilepsy, a common neurological disorder affecting approximately 1% of the population worldwide and complex neurobehavioral disorders resulting from increased excitability of neurons in various brain regions.

Although considerable research is being conducted on longterm changes associated with epileptogenesis, the exact cellular and molecular mechanisms involved in epileptogenesis are still not completely understood. Therefore, studies elucidating the underlying mechanisms mediating the plasticity changes associated with epileptogenesis are crucial to advancing both the treatment and prevention of epilepsy. Calcium is an important second messenger involved in diverse cellular events, such as membrane excitability and synaptic activity. Studies in epileptic neurons have shown that disruption of Ca^{2+} extrusion and sequestration mechanisms can lead to elevated basal Ca^{2+} .

Ca^{2+} -ATPase is membrane bound enzymes and play a pivotal role in the homeostasis of Na^+ , K^+ and Ca^{2+} in cells. Evidence is now emerging that certain epilepsies may be a family of channelopathies with defects involving mutations in the Na^+ , K^+ or Ca^{2+} channels and defects in the membrane- bound enzymes Na^+ - K^+ ATPase and Ca^{2+} -ATPase that regulate the transport of ions across the cell membrane.

Repeated administration of the chemical convulsant leads to a decrease in GABAergic function and to the stimulation and modification of density or sensitivity of different glutamate receptor subtypes. NMDAR activation and elevations in Ca^{2+} have been implicated in the induction of epilepsy.

The aim of this study was to investigate the brain cortex calcium, microsomes Ca^{2+} -ATPase activity and hippocampal NMDA reseptors consantration in rats induced epileptic seizure by PTZ.

Thirty two male Wistar rats were randomly divided into four equal groups. First group was used as control and second group received a single dose of PTZ. Fifty and 100 mg/ kg TPM each day were intragastrically administrated to rats constituting

third and fourth groups for 6 days, respectively. Epileptic seizure was induced in group II, III and IV by administration of PTZ (60 mg/kg). After 2 hours of PTZ administration all rats will be sacrificed and brain tissue and hippocampus were taken.

Our results support the that decreased Ca^{2+} -ATPase activities, increased basal Ca^{2+} levels and NMDA subunit concentrations following induction of seizures with PTZ implantations. Topiramate treatment caused increase in the activity of the enzyme, decrease in Ca^{2+} levels and NMDA subunit concentrations. In conclusion, our study has suggest that understanding these mechanisms may provide an insight into the development of novel therapeutic approaches to treat epilepsy and prevent or reverse epileptogenesis.

Key Words: Epilepsy, PTZ, TPM, Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATPase, NMDA

KAYNAKLAR

1. Engel J.Jr. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001;42: 796 -803
2. Adams R.D, Victor M.: Principles of neurology 1989, p.258
3. Shovon S.D. Epidemiology, classification, natural history and genetics of epilepsy. *Lancet* 1990;336: 93- 6
4. Sander J.W. Epilepsy-Library of articles-The incidence and prevalence of epilepsy. The National Society for Epilepsy 2003
5. O'Donohoe NV. Epilepsies of Childhood. 3rd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd; 1994:1- 5
6. Hauser WA. Seizure disorders: the chances with age. *Epilepsia* 1992;33 (suppl 4): S 6- 14.
7. Janz D. When should antiepileptic drug treatment be terminated? In: Wolf P, Dam M, Janz D, and Dreifuss F. Eds, *Advances in Epileptology. The Xth Epilepsy International Symposium*. New York, Raven Pres, 1987: 365- 72.
8. Ozer IJ. Images of epilepsy in literature. *Epilepsia* 1991; 32: 798- 809
9. Griffin J., Wyles M. *Epilepsy Towards Tomorrow*. London, England: Office of Health Economics; 1991.
10. Wolf P. Epilepsy and catalepsy in Anglo-American literature between romanticism and realism: Tennyson, Poe, Eliot and Collins. *J. Hist. Neurosci.* 2000; 9(3) 286-293.
11. Aktin E. Nörolojide Dünden Bugüne, Nöroloji İ.Ü İstanbul Tıp Fak. Temel Klinik Bilimler Ders Kitapları. Ed: A.Emre Öge. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004, sayfa:4
12. Karbowski K. Hans Berger (1873-1941), *J Neurol* (2002) 249:1130–31
13. Zaidel D.W., Esiri M. Oxbury J.M.: Regional differentiation of cell densitiesin the left and right hippocampi of epileptic patients. *J Neurol.*1993; 240: 322
14. Alberch J., Arenas E., Arroyos A.R., Marsal J.: Excitatory amino acids releaseendogenous acetylcholine from rat striatal slices: Regulation by Gammaaminobtyric acid. *Neurochem Int.*1990; 1: 107
15. Walton N.Y., Gunawan S., Treiman D.M.: Brain Amino acid Concentration Changes during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine.*Experimental Neurology.*1990; 108:61
16. Chapman A.G., Meldum B.S., Siesjo B.K.: Cerebral metabolic changes during prolonged seizures in rats. *J Neurochem.*1977; 28:1025
17. Cain D.H., Boon P., Bevan M.: Failure of Aspartame to Affect Seizuresusceptibility in kindled rats *Neuropharmacology.*1989; 28:433

18. Guilarte T.R.: Regional changes in the concentrations of Glutamate, Glycine, Taurine and GABA in the Vitamin B6 Deficient developing rat brain: Association with neonatal seizures. *Neurochemical Research*.1989;14:889
19. Durlach J.P., Rouhani S., Bara S., , Guiet-Bara M.: The control of central neuronal Hyperexcitability in Magnesium Deficiency. *Nutrients and Brain Function. Central neuronal Excitability and magnesium Deficiency* (1987), p.48.
20. Engel J.Jr., Kuhl D.E., Phelps M.E., Chandall P.H.: Comparative localization of epileptic foci in partial epilepsy by PCT and EEG. *An Neurol*.1982; 12:529
21. Green J.D., Petsche H.: Hippocampal electrical activity. IV. Abnormal electric activity. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol*.1961;13:868
22. Gloor P., Fariello R.G.: Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. *TINS* 1988; 11:63.
23. Roberts E.: GABA-related phenomena, models of nervous system function, and seizures. *Ann Neurol*. 1984 16(suppl): 77-89
24. Engel J.Jr: *Seizures and Epilepsy*. Philadelphia, FA Davis Co, 1989
25. Roger J., Dravet C., Bureau M., et al: *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence*. London, John Libbey Eurotext, 1985
26. Yeni N. Epilepsi ve Acil Sorunlar, İç Hastalıklarında Aciller Sempozyum Dizisi No:29 Mart 2002 sayfa 219-36.
27. Baykan B., Gürses C. Epilepsi. *Nöroloji İ.Ü İstanbul Tıp Fak. Temel Klinik Bilimler Ders Kitapları*. Ed: A. Emre Öge. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004, sayfa 279-309
28. DeLorenzo R.J., Hauser W.A., Towne A.R., Boggs J.G., Pellock J.M., Penberthy L., Garnett L., Fortner C.A., Ko D., A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia, *Neurology* 46 1996.1029–1035.
29. DeLorenzo R.J., Pellock J.M., Towne A.R., Boggs J.G., Epidemiology of status epilepticus, *J. Clin. Neurophysiol.* 12_1995.316–325,
30. Dodson W.E., Shinnar S., Treiman D.M., Wannamaker B.B., The treatment of convulsive status epilepticus: recommendation of the Epilepsy Foundation of America's working group of status epilepticus, *JAMA* 270 1993.
31. Pellock M.J. Status epilepticus. In Swaiman K. F, Ashwal S (Eds). *Pediatric Neurology Principles and Practice Third Edition* St Louis: Mosby 1999; 683-91
32. Holmes G.R, Stafstrom C.E The Epilepsies. In David B.R (eds). *Child and Adolescent Neurology* St Louis: Mosby 1998; 183-234.
33. Treiman M.D. Status epilepticus. In: Wyllie E (eds). *The Treatment of Epilepsy Principles and Practice*. Third edition. Philadelphia: Lipincott Williams &Wilkins 2001; 681-97
34. Sander J.W. The Use of Antiepileptic Drugs-Principles and Practice. *Epilepsia* 2004; 45 (6): 28-34

35. Yamatogi Y. Principles of antiepileptic drug treatment of epilepsy. *Psychiatric Clin Neurosci.* 2004 Jun;58(3): 3-6
36. Bora İ., Taşkapıoğlu Ö. Epilepsi tedavisinde yeni yönelimler. *Epilepsi* 2003 ;9(2):91-102
37. Deckers C.L, Genton P, Sills G.J; Schmidt D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. *Epilepsy Res* 2003;53:1-17
38. Shank RP, Gardocki JF, Vaught JL. TPM: preclinical evaluation of a structurally novel anticonvulsant. *Epilepsia* 1996;37:148-61
39. Van Kammen D, Shank RP. New anticonvulsants in affective disorder. In: Michael Trimble & Bettina Schmitz, editors. *Seizures, Affective Disorders and Anticonvulsant Drugs*. 1st ed. Guilford, UK, Clarius Press, 2002:143-165
40. Rustembegovic A, Sofic E, Kroyer G. A pilot study of TPM in the treatment of tonic-clonic seizures of alcohol withdrawal Syndromes. *Medarh* 2002;56: 211- 12
41. Leach JP, Brodie MJ. New antiepileptic drugs--an explosion of activity. *Seizure*. 1995 Mar;4(1):5-17.
42. Skradski S, White HS. Topiramate blocks kainate-evoked cobalt influx into cultured neurons *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 1:S: 45-7.
43. Herrero AI, Del Olmo N, González-Escalada JR, Solís JM. Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA(A)-mediated responses and activation of a potassium conductance. *Neuropharmacology*. 2002 Feb;42(2):210-20.
44. Zhang X, Velumian AA, Jones OT, Carlen PL. Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 1:S52-60.
45. Shank RP, Gardocki JF, Vaught JL, Davis CB, Schupsky JJ, Raffa RB, Dodgson SJ, Nortey SO, Maryanoff BE, Topiramate: preclinical evaluation of structurally novel anticonvulsant, *Epilepsia*. 1994 Mar-Apr;35(2):450-60.
46. Latini G, Verrotti A, Manco R, Scardapane A, Del Vecchio A, Chiarelli F. Topiramate: its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy *Mini Rev Med Chem*. 2008 Jan;8(1):10-23.
47. Perucca E. A pharmacological and clinical review on TPM, a new antiepileptic drug. *Pharmacol Res* 1997;35:241- 56
48. Langtry HD, Gillis JC, Davis R. TPM. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in the management of epilepsy. *Drugs* 1997;54:752- 73
49. Privitera M. TPM: a new antiepileptic drug. *Ann Pharmacother* 1997;31:1164-73
50. Chengappa KNR, Rathore D, Levine J, Atzert R, Solai L, Parepally H, Levin H, Moffa N, Delaney J, Brar JS. TPM as add-on treatment for patients with bipolar mania. *Bipolar Disord* 1999;1:42- 53

51. Anderson GD. A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. *Ann Pharmacother* 1998; 32:554- 63
52. Fisher R.S. : animal models of the epilepsies. *Brain Research Reviews*, 1989; 14: 245- 278,
53. Elmer E, Kokaia M, McIntyre DC, Londavall O. Epileptogenesis induced by rapidly recurring seizures in genetically fast-but not slow-kindling rats. *Brain Res.* 1998;789: 111-17.
54. Mason CR, Cooper RM. A permanent change in convulsive treshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia.* 1972;13;663-674.
55. McNamara JO. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. *Ann neurol.* 1984;168(suppl):S72-76.
56. Ono J, Vieth RF, Walson PD. Electroctricographical observation of seizures induced by pentylenetetrazol injections in rats. *Funct Neurol.* 1990;5:345- 52.
57. Rossi R. Sensitization induced by kindling and kindling related phenomena as a model for multiple chemical sensitivity. *Toxicology* 1996;111:87- 100.
58. Schmoll H, Badan I, Grecksch G, Walker L, Kessler C, Popa-Wagner A. Animal Model: Kindling status in sprague-dawley rats induced by pentylenetetrazole. *Am J Pathology.* 2003;162:1027-1034.
59. Ziylan Y.Z. Ateş N. Age-related changes in regional pattern of blood-brain barrier breakdown during epileptiformseizures induced by pentylenetetrazol. *Neuroscience Letters.* 1989 96: 179-184
60. Pitkanen A., Jolkkenen J., Honkanen K-L., Riekkinen P.: Effect of pentylenetetraol – induced convulsions on somatostatin-like immunoreactivity in rat cerebrospinal fluid. *Neuropeptides.* 1987 9:19-24
61. Paredes G.S., Otero R.S. Alvers E.M., Experimental spike-and-wave discharges induced by pentylenetetrazol and tolerance to repeated injections: an electrophysiological and biochemical study. *Epilepsy Res.* 4:139-146 1989
62. Mc donald RL, Barker JL. Different actions of anticonvulsant and anesthetic barbiturates revealed by use of cultured mammalian neurons. *Science.* 1978;200:775- 77.
63. De Boer T, Stoof JC, van Duijn H. The effects of convulsant and anticonvulsant drugs on the release of radiolabeled GABA, Glutamate, noradrenaline, serotonin and acetylcholine from rat cortical slices. *Brain Res.* 1982;253:153-160.
64. De Deyn PP, Macdonald RL. Effects of antiepileptic drugs on reduction of GABA responses by PTZ and DMCM on mouse neurons in cell culture. *Prog Neurobiol.* 1995;47:477-511.
65. Velisek L, Kusa R, Kuluvana M, Mares P. Exitatory amino acid antagonist and pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis: I. The effects of 2-amino-7phosphonoheptonate. *Life Sci.* 1990; 46:1349- 57.
66. Levin E., Blec V. Electroshock seizures in mice. *Epilepsia* 1981 22: 577- 881

67. Goldman, H., Berman R.B., Hazlet J., Cerebrovasculer response to pentylenetetrazole: Time and doze dependent effects. *Epilepsy Res.* 1992 12: 227- 42
68. Valesco E., Valesco M., Estrada-Villanueva F., Machado J.P.: Spesific and nonspecific multiple unit activities during the onset of pentylenetetrazol seizures: 1. Íntacts animals., *Epilepsia*, 1975 16: 207-14,
69. Mirski M.A. Ferrendelli J.A.: Anterior thalami mediation of generalized pentylenetetrazol seizures. *Brain Res.* 1986, 399: 212- 13
70. Magistris M.R., Mouradian M.S., Gloor P.: Generalize onvulsions induced by pentylenetetrazol sin the cat: Participation of forebrain, brainstem and spinal cord. *Epilepsia*, 1988 29(4): 379- 88
71. Triggle D.J. : Calcium antagonist histry and perspective. *Stroke (Suppl IV)* 1990 21: 49-58
72. Speckmann E.J., Straub H.1 and Köhling, R.: Contribution of calcium ions to the generation of epileptic activitiy and antiepileptic calcium antagonism. *Neuropsychobiology* 1993 27:122- 26
73. Carter D.S., Haider S.N., Blair R. E., Deshpande L.S., Sombati S., and DeLorenzo R.J. Altered Calcium/Calmodulin Kinase II Activity Changes Calcium Homeostasis That Underlies Epileptiform Activity in Hippocampal Neurons in Culture. *Neuropharmacology JPET* 2006 319:1021- 31
74. Shin C. and Mc Namara JO. Mechanism of epilepsy. *Annu Rev Med* 1994 45: 379–389)
75. Delorenzo RJ, Sun DA, and Deshpande LS Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 2005 105: 229–266
76. DeLorenzo RJ, Pal S, and Sombati S Prolonged activation of the N-methyl-D-aspartate receptor-Ca²⁺ transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 14482–14487
77. Raza M, Pal S, Rafiq A, and DeLorenzo RJ 2001 Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 2001 903: 1–12
78. Raza M, Blair RE, Sombati S, Carter DS, Deshpande LS, and DeLorenzo RJ Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogenesis cause acquired epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 101: 17522–27
79. Carafoli E, Nicotera P. and Santella L Calcium signalling in the cell nucleus. *Cell Calcium* 1997 22: 313–319.
80. Pal S, Sun D, Limbrick D, Rafiq A, and DeLorenzo RJ Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy. *Cell Calcium* 2001 30: 285–296
81. Sun DA, Sombati S, Blair RE, and DeLorenzo RJ Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an in vitro model of stroke-induced epilepsy. *Cell Calcium* 2004 35: 155– 63.

82. Aktan ZA. Limbik Sistem Sendrom 1997 65- 69
83. Ozawa S, Haruyuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 1987. 54: 581-618,
84. Zaidel D.W, Esiri M., Oxbury J.M.: Regional differentiation of cell densities in the left and right hippocampi of epileptic patients. *J Neurol*.1993; 240: 322
85. Dam A.M: The density of neurons in the human hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1979 5: 249
86. Gerard JT; Nicholas P: Anagnostakos. Principles of anatomy and physiology. Sixth edition, 1990. 331.
87. Seeley RR, Stephens TD, Tate P: Anatomy and physiology, Internatioanl edition. 1999. 378
88. Adel KA, Ronald AB. Functional neuroanatomy text and atlas. 1998.
89. Dere F.: Nöroanatomî ve Fonksiyonel Nöroloji birinci baski 1990. 90,
90. Guyton A. C. Hall J.E. : Tibbi Fizyoloji. 9. Edisyon. 1996 (çeviri editörü: Prof. Dr. Hayrünnisa Çavusoglu)
91. Ganong F. W. Review pf medical physiology, seventeenth edition, Appleteon- Lange USA, 1995.
92. Yıldırım M. Tıp Öğrencileri İçin Klinik Nöroanatomî, 4. basımdan çeviri. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2000
93. Goebel DJ, Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Molecular Brain Research*. 1999 69:164- 70
94. Cull-Candy S, Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001.
95. Carroll RC, Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targetting: İmplications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neuroscience*. 2002 25: 571- 77
96. Petrie RXA, Reid IC., Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. *Pharmacology and therapeutics*. 2000 87:11- 25
97. Schneggenburger R, Zhou Z, Konnerth A, Neher E: Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* 1993 11: 133- 143,
98. Coyle IT, Bird SI, Evans RH, Gulley RL, Nadler JV, NicklasWJ, Olney JW: Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specifity, and mechanism of action. *Neurosci Res Prog Bull* 1981 19: 331- 427
99. McIlhinney RA, Le Bourdelles B, Molnar E, Tricaud N, Streit P, Whiting PJ. Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology*. 1998 37(10-11):1355-67

100. Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K, Steen B, Skoog I. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med.* 2003 Jul 14;163(13):1524
101. Gortmaker, S. L., Dietz, W. H., Sobol, A. M., & Wehler, C. A. Increasing pediatric obesity in the United States. *American Journal of Diseases of Children*, 1987. 141(5), 535–540
102. Scatton B, Carter C, Benavides J: N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: A novel therapeutic perspective for the treatment of ischemic brain injury. *Cerebrovasc Dis* 1991 1: 121-135
103. Choi DW: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS* 1988 11: 465- 469.
104. Koek W, Woods JH, Winger GD: MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp. Ther* 1988 245: 969- 74
105. Olney JW, Labruyere J, Price MT: Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 1989 244: 1360- 62
106. Croucher MJ, Collins JF, Meldrum BS Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science.* 1982 May 21;216(4548):899-901
107. Sonntag V.W. E, Bennett S. A., Khan, A.S., Thornton, P. L., Xu, X., Ingram, R.L., Brunso-Bechtold, J.K.,. Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. *Brain Res. Bull.* 2000 51,331- 38
108. Niggli V, Adunyah E.S, Penniston J.T, Carafoli E. Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids *J Biol Chem.* 1981 Jan 10;256(1):395-401
109. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin- Phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75
110. Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺ - channel B1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet.* 1998 Aug;19(4):366-70
111. Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M.A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet.* 1998. 18 (1): 53- 55
112. Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R et al. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 1998. 18 (1): 25-29.
113. Steinlein OK. Channelopathies can cause epilepsy in man. *Eup J Pain*, 2002 6 Suppl: A-27-34.
114. Abott LC., Nejad H.H., Bttje W.G., Hassan A.S. Glutathione levels in specific brain regions of genetically epileptic mice. *Brain Res. Bull.* 1990 25: 629-31

115. Walden J., Pocberger H., Speckmann E.J. and Petsche, H.: Paroxysmal neuronal depolarizations in the rat motor cortex in vivo : intracellular injection of the calcium agonist BAY K 8644. *Exp. Brain. Res.* 1986 64: 607-609
116. Greenberg DA., Cooper EC., Carpenter CL. Phenytoin interacts with calcium channels in brain membranes. *Ann Neurol.* 1984 Nov;16(5):616-7
117. Raza M., Deshpande L. S, Blair R. E., Carter D. S., Sombati S., DeLorenzo R. J. Aging is associated with elevated intracellular calcium levels and altered calcium homeostatic mechanisms in hippocampal neurons *Neuroscience Letters* 418 2007 77–81
118. Malenka RC and Nicoll RA NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosc* 1993 16: 521- 27
119. Raza M., Shubhro P., Rafiq A., DeLorenzo R.J. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy *Brain Research* 903 2001 1–12
120. Pal S., Limbrick D., Rafiq A., DeLorenzo R.J., Induction of spontaneous recurrent epileptiform discharges causes long-term changes in intracellular calcium homeostatic mechanisms, *Cell Calcium* 28 2000 181–193.
121. Pal S., Sombati S., Limbrick D., DeLorenzo R.J., In vitro status epilepticus causes sustained elevation of intracellular calcium levels in hippocampal neurons, *Brain Res.* 1999 851 20–31.
122. Parsons J.T., Churn S.B., Kochan L.D., DeLorenzo R.J, Persistent inhibition of Ca²⁺ uptake by rat cortex microsomes in the pilocarpine model of epilepsy, *Soc. Neurosci.* 2000 Abstr. 26 1777.
123. Parsons J.T., Churn S.B., Kochan L.D., DeLorenzo R.J., Pilocarpine-induced status epilepticus causes N-methyl-D-aspartate receptor-dependent inhibition of microsomal Mg²⁺/Ca²⁺ATPase-mediated Ca uptake- *J. Neurochem.* 2000 75 1209– 18
124. Sun DA, Sombati S, Blair RE, DeLorenzo RJ.. Calcium-dependent epileptogenesis in an in vitro model of stroke-induced “epilepsy”. *Epilepsia.* 2002 Nov;43(11):1296-305
125. Arundhati K., Mohan D. S. and Padma T. Reduced Activity of Red Cell Na⁺ K⁺ ATPase and Ca²⁺ ATPase in Patients with Idiopathic Generalized Epilepsy. *Int J Hum Genet*, 2003 3(1): 59- 63
126. Rosenblatt D.E, Lauter C.J, Trams E.G. Deficiency Of A Ca²⁺-Atpase In Brains Of Seizure Prone Mice *Journal Of Neurochemistry* 1976 Volume 27 Issue 6 Page 1299- 304
127. Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM Jr, Sharbrough FW. Selective central nervous system calcium channel blockers--a new class of anticonvulsant agents. *Mayo Clin Proc.* 1986 Apr;61(4):239- 47
128. Bonnet U. Bingmann D.: GABA responses of CA3 neurones at epileptogenic threshold concentrations of convulsants. *Neuropharmacology* 1989 28: 433
129. Wang CX and Shuaib A. NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005 4:143- 51.

130. Heresco-Levy U. and Javitt DC. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated neurotransmission in the pathophysiology and therapeutics of psychiatric syndromes. *Eur Neuropsychopharmacol* 1998 8:141- 52.
131. Mares P, Folbergrova J and Kubova H Excitatory aminoacids and epileptic seizures in immature brain. *Physiol Res* 2004 53:S115-S124
132. MacDonald AW.: 3rd and Chafee MV Translational and developmental perspective on N-methyl-D-aspartate synaptic deficits in schizophrenia. *Dev Psychopathol* 2006 18:853-76
133. Dingledine R., Borges K., Bowie D. and Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999 51:7-61.
134. Chen PE. and Wyllie DJ: Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* 2006 147:839- 53
135. Wenzel A., Scheurer L., Kunzi R., Fritschy J. M, Mohler H.; Benke D. Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport*. 1995 December 29 7(1):45- 48
136. Cailliau C.P., Price D.L., and Lee J. M. N-Methyl-d-Aspartate Receptor Proteins NR2A and NR2B Are Differentially Distributed in the Developing Rat Central Nervous System as Revealed by Subunit-Specific Antibodies. *Journal of neurochemistry* 1996 volume 66, issue 2, 692-700
137. Mathern G.W., Pretorius J.K., Mendoza D., Leite J.P., Chimelli L. Hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Annals of Neurology*. 2002 Volume 46, issue 3, p343- 58
138. Qian J, Noebels JL.. Topiramate alters excitatory synaptic transmission in mouse hippocampus. *Epilepsy Res*. 2003 Aug;55(3):225-33.