

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN  
DENEYSEL EPİLEPSİ MODELİNDE YABANI HİNDİBA’NIN  
(*Cichorium intybus*) KAN VE BEYİN OKSİDATİF STRES,  
APOPTOZİS, GENOTOKSİSİTE VE DNA HASARI ÜZERİNE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Öğr. Gör. Özlem ERGÜL ERKEÇ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TIP PROGRAMI)  
DOKTORA TEZİ

**DANIŞMANLAR**

1. Danışman: Prof. Dr. İsmail MERAL
2. Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARA

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN  
DENEYSEL EPİLEPSİ MODELİNDE YABANI HİNDİBA’NIN  
(*Cichorium intybus*) KAN VE BEYİN OKSİDATİF STRES,  
APOPTOZİS, GENOTOKSİSİTE VE DNA HASARI ÜZERİNE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Öğr. Gör. Özlem ERGÜL ERKEÇ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TIP PROGRAMI)  
DOKTORA TEZİ

**DANIŞMANLAR**

1. Danışman: Prof. Dr. İsmail MERAL
2. Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARA

VAN-2014

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2013-SBE-D080 numaralı proje olarak desteklendi.

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL  
EPİLEPSİ MODELİNDE YABANI HİNDİBA'NIN (*Cichorium intybus*) KAN VE  
BEYİN OKSİDATİF STRES, APOPTOZİS, GENOTOKSİSİTE VE DNA  
HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Öğr. Gör. Özlem ERGÜL ERKEÇ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TIP PROGRAMI)  
DOKTORA TEZİ

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet KARA

Prof. Dr. İsmail MERAL

Üye

Prof. Dr. Hasan Serdar GERGERLİOĞLU

Üye

Doç. Dr. Ramazan ESEN

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ragıp BALAHOROĞLU

Üye

TEZ KABUL TARİHİ

11 / 08 / 2014

## TEŞEKKÜR

Bu tezin bilimsel projelendirilmesinde, çalışmanın tüm aşamalarında ve sonuçlandırılmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen, Sayın Danışman Hocalarım Prof. Dr. İsmail MERAL ve Prof. Dr. Mehmet KARA'ya tüm kalbimle teőekkürlerimi sunarım. Çalıőmamın istatistiksel analizlerinin oluőturulmasında ve yorumlanmasında bana yol gösteren ve yardımını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Sıddık KESKİN' e teőekkürlerimi sunarım. Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı akademik kadrosuna ve Araştırma Merkezi çalıőanlarına, laboratuvar deneylerimin gerçekleőmesi esnasında vermiő oldukları destekten dolayı teőekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince defalarca çeşitli kurslara katılmak veya laboratuvar deneylerimi yapmak amacıyla il dışına çıktığımda bıkmadan usanmadan benden desteğini esirgemeyen sevgili aileme ve son olarak bu araőtırmayı 2013-SBE-D080 numaralı proje ile destekleyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Baőkanlıėına sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER.....	IX
TABLolar.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Epilepsinin Tarihçesi.....	3
2.2. Epilepsinin Sınıflandırılması.....	5
2.1.1. İdiopatik epilepsiler.....	5
2.1.2. Kriptojenik epilepsiler.....	6
2.2.3. Semptomatik epilepsiler.....	6
2.2.4. Provoke tipteki epilepsiler.....	6
2.3. Epilepsi Nöbetleri.....	9
2.3.1. Parsiyel Nöbetler.....	10
2.3.2. Jeneralize (umumi) nöbetler.....	11
2.3.3. Karma (sınıflandırılmayan) nöbet tipleri.....	14
2.4. Hangi Nöbet Tipi Daha Yaygındır?.....	15
2.5. Epileptogenez.....	15
2.5.1. Temel mekanizmalar.....	15
2.5.2. Moleküler mekanizmalar.....	17
2.6. Hayvan DeneYleri.....	25
2.7. Deneysel Epilepsi Modelleri.....	26
2.8. Kindling (Tutuşma) Modeli.....	31
2.8.1. Elektriksel kindling modeli.....	34
2.8.2. PTZ kindling modeli (kimyasal kindling modeli).....	34
2.9. Epilepsi ve Apoptozis.....	38
2.10. Cichorium İntybus.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Gereçler.....	42

3.1.1. Bitki.....	42
3.1.2. Hayvanlar.....	42
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	42
3.1.4. Protein miktar tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	43
3.1.5. SDS PAGE elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler	43
3.1.6. Western blotlamada kullanılan tampon ve çözeltiler.....	46
3.2. Yöntem.....	48
3.2.1. Bitki ekstraktının hazırlanması.....	48
3.2.2. Epilepsi oluşturulması.....	48
3.2.3. Cerrahi işlem.....	49
3.2.4. GABA <sub>A</sub> reseptör yoğunluğu ve apoptozis için dokuların hazırlanması.....	50
3.2.5. GABA <sub>A</sub> reseptör immunohistokimyası.....	50
3.2.6. In situ DNA fragmantasyon analizi.....	51
3.2.7. Western blot yöntemi için protein miktar tayini.....	51
3.2.8. SDS PAGE elektroforezi.....	52
3.2.9. Western Blot ile Bcl-2, Siklin B1 ve $\beta$ -Tubulin değerlerinin belirlenmesi.....	53
3.2.10. Plazmada TAS, TOS ve OSİ değerlerinin belirlenmesi .....	54
3.2.11. İstatistik analiz.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Epileptik Nöbet Aktivitesi.....	56
4.1.1. Nöbet skorları.....	56
4.1.2. Nöbet Latansı.....	57
4.2. Plazma TAS, TOS, OSİ Değerleri.....	58
4.3. GABA <sub>A</sub> Reseptör İmmunohistokimyası.....	60
4.4. In Situ DNA Fragmantasyon Analizi (TUNEL) Bulguları.....	67
4.5. Western Blot Bulguları.....	69
4.5.1. Western blot ile elde edilmiş Bcl-2 değerleri.....	69
4.5.2. Western blot ile elde edilmiş Siklin B1 değerleri.....	71
4.5.3. Western blot ile elde edilmiş $\beta$ -Tubulin değerleri.....	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	76
5.1. Epileptik Nöbet Aktivitenin Değerlendirilmesi.....	76

5.2. Plazmada TAS, TOS, OSİ Değerlerinin Değerlendirilmesi.....	77
5.3. GABA <sub>A</sub> Reseptör İmmunohistokimyasının Değerlendirilmesi.....	78
5.4. In Situ DNA Fragmantasyon Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi.....	79
5.5. Western Blot ile Elde Edilen Bulgularının Değerlendirilmesi.....	81
5.5.1. Siklin B1 bulgularının değerlendirilmesi.....	81
5.5.2. Bcl-2 bulgularının değerlendirilmesi.....	82
5.5.3. $\beta$ -Tubulin bulgularının değerlendirilmesi.....	83
6. ÖZET.....	85
7. SUMMARY.....	86
8. KAYNAKLAR.....	87
9. ÖZGEÇMİŞ.....	95
10. EKLER.....	96

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ACh</b>	: Asetil kolin
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>AEİ</b>	: Antiepileptik ilaç
<b>AMP</b>	: Adenozin monofosfat
<b>AMPA</b>	: $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilosokzasole- 4-propionat
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BCIP/NBT</b>	: 5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat
<b>Bcl-2</b>	: B-cell lymphoma gene-2 protein ailesi üyeleri
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin monofosfat
<b>DAB</b>	: Diaminobenzidin
<b>DAG</b>	: Diaçilgliserol
<b>EEG</b>	: Elektroensefalografi
<b>EPSP</b>	: Eksitatör postsinaptik potansiyel
<b>GABA</b>	: Gama aminobütirik asit
<b>ILAE</b>	: Epilepsiye karşı uluslararası dernek
<b>IP3</b>	: İnositol trifosfat
<b>İPSP</b>	: İnhibitör postsinaptik potansiyel
<b>MES</b>	: Maksimal elektroşok
<b>mGluR</b>	: Metabotropik glutamat reseptörleri
<b>MRI</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>MSS</b>	: Merkezi sinir sistemi
<b>NMDA</b>	: N-metil-D-aspartat
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>OSİ</b>	: Oksidatif stres indeksi
<b>PBS</b>	: Fosfatla tamponlanmış tuz (Phosphate buffered saline)
<b>PDK</b>	: Paroksizmal depolarizasyon kayması
<b>PTX</b>	: Pikrotoksin
<b>PTZ</b>	: Pentilentetrazol
<b>PVDF</b>	: Polivinilidinden diflorür
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat



- SOD** : Süperoksit dismutazdır
- SSS** : Santral sinir sistemi
- TAS** : Total antioksidan seviyesi
- TLE** : Temporal lob epilepsisi
- TOS** : Total oksidan seviyesi
- TUNEL** : (Terminal deoksinükleotidil transferaz (Tdt)- aracılı deoksiuridin trifosfat (dUTP) - biotin nick end-labelling) In situ DNA fragmentasyon analizi

## ŞEKİLLER

Şekil 1.	Metabotropik glutamat reseptörleri.....	19
Şekil 2.	Metabotropik glutamat reseptörlerine ait aile ağacı.....	20
Şekil 3.	İyonotropik glutamat reseptörleri.....	21
Şekil 4.	İyonotrofik glutamat reseptörlerinin aile ağacı.....	21
Şekil 5.	AMPA ve NMDA reseptörleri.....	23
Şekil 6.	GABA <sub>A</sub> reseptör kanalının yapı ve fizyolojisi.....	24
Şekil 7.	Epilepsiye ve epileptik nöbetlere genel bir bakış.....	29
Şekil 8.	Bcl-2 onkoproteininin apoptozis üzerine etkisi.....	39
Şekil 9.	Deney gruplarına ait nöbet skorları.....	56
Şekil 10.	Deney gruplarına ait skor 3 ve üstü nöbet latans değerleri.....	58
Şekil 11.	Gruplara ait TOS değerleri.....	59
Şekil 12.	Gruplara ait TAS değerleri.....	59
Şekil 13.	Gruplara ait OSİ değerleri.....	60
Şekil 14.	Kontrol grubuna ait hipokampus hücrelerinde GABA <sub>A</sub> reseptör pozitifliği.....	61
Şekil 15.	PTZ grubuna ait hipokampus hücrelerinde GABA <sub>A</sub> reseptör pozitifliği.....	61
Şekil 16.	PTZ+CI grubuna ait hipokampus hücrelerinde GABA <sub>A</sub> reseptör pozitifliği.....	62
Şekil 17.	Hipokampusta GABA <sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı.....	63
Şekil 18.	Hipokampusta GABA <sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücrelerde boyanma yoğunluğu.....	63
Şekil 19.	Kontrol grubuna ait beyin hücrelerinde GABA <sub>A</sub> reseptör pozitifliği.....	64
Şekil 20.	PTZ grubuna ait beyin hücrelerinde GABA <sub>A</sub> reseptör pozitifliği.....	65
Şekil 21.	PTZ+CI grubuna ait beyin hücrelerinde GABA <sub>A</sub> reseptör pozitifliği.....	65
Şekil 22.	Tüm beyinde GABA <sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı.....	66
Şekil 23.	Tüm beyinde GABA <sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücrelerde boyanma yoğunluğu.....	66

<b>Şekil 24.</b>	Tünel negatif boyanma gösteren kontrol grubuna ait tüm beyin dokusu hücreleri.....	68
<b>Şekil 25.</b>	Tünel pozitif boyanma gösteren PTZ grubuna ait tüm beyin dokusu hücreleri.....	68
<b>Şekil 26.</b>	Tünel pozitif boyanma gösteren PTZ+Cİ grubuna ait tüm beyin dokusu hücreleri .....	69
<b>Şekil 27.</b>	Bcl-2'ye ait Western Blot örneği.....	70
<b>Şekil 28.</b>	Tüm beyin dokusuna ait Bcl-2 Western blot sonuçları.....	70
<b>Şekil 29.</b>	Hipokampus dokusuna ait Bcl-2 Western blot sonuçları.....	71
<b>Şekil 30.</b>	Siklin B1'e ait Western Blot örneği.....	72
<b>Şekil 31.</b>	Tüm beyin dokusuna ait Siklin B1 Western blot sonuçları.....	72
<b>Şekil 32.</b>	Hipokampus dokusuna ait Siklin B1 Western blot sonuçları.....	73
<b>Şekil 33.</b>	$\beta$ -Tubulin'e ait Western Blot örneği.....	73
<b>Şekil 34.</b>	Tüm beyin dokusuna ait $\beta$ -Tubulin Western blot sonuçları.....	74
<b>Şekil 35.</b>	Hipokampus dokusuna ait $\beta$ -Tubulin Western blot sonuçları....	74

## TABLolar

<b>Tablo 1.</b>	Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması (ILAE, 1989).....	7
<b>Tablo 2.</b>	Uluslararası nöbet sınıflandırması.....	12
<b>Tablo 3.</b>	Epilepsiye Karşı Uluslararası Dernek (International League Against Epilepsy)'e ait nöbet sınıflandırılması.....	12
<b>Tablo 4.</b>	İyonotrofik glutamat reseptörleri.....	22
<b>Tablo 5.</b>	DeneySEL epilepsi modelleri.....	26
<b>Tablo 6.</b>	DeneySEL epilepsi modeli geliştirmek amacıyla kullanılan çeşitli kimyasallar.....	27
<b>Tablo 7.</b>	Erken dönemde antiepileptik ilaç keşfi modelleri.....	30
<b>Tablo 8.</b>	Kronik epilepsi modelleri.....	30
<b>Tablo 9.</b>	Deney gruplarında nöbet skoru bakımından tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.....	57
<b>Tablo 10.</b>	Skor 3, 4 ve 5 nöbetlerin latans sürelerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.....	57
<b>Tablo 11.</b>	Serum TAS, TOS ve OSİ değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.....	60
<b>Tablo 12.</b>	Tüm beyin ve hipokampusta GABA <sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı ve GABA <sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücrelerde boyanma yoğunluğu değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları .....	67
<b>Tablo 13.</b>	TUNEL pozitif hücre sayısı değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları .....	69
<b>Tablo 14.</b>	Tüm beyin ve hipokampusta Western blot ile elde edilmiş Bcl-2, Siklin B1 ve $\beta$ -Tubulin değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları .....	75

## 1. GİRİŞ

Dünya sağlık örgütü, epilepsinin dünya çapında en yaygın ve ciddi beyin bozukluklarından biri olduğunu bildirmektedir. Epilepsi, ciddi fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik sonuçlara yol açmaktadır (WHO, 2004).

Epilepsi yaklaşık olarak insan popülasyonunun % 1'inde görülmektedir (Xu ve ark., 2013) ve sonradan edinilen, en yaygın kronik bozukluktur. Modern antiepileptik ilaçlarla tedavi gören hastaların yaklaşık % 50'si nöbet geçirmeye devam etmekte ve bu hastaların bir bölümünde de nöbet sıklığında artış ve bilişsel zayıflama görülmektedir (Pitkanen ve Sutula, 2002). En yüksek epilepsi insidansı küçük çocuklarda ve yaşlılarda görülmektedir (Kandel, 2012). Epilepsi insidansı, yaşamın ilk on yılında ve 60 yaşından sonra en yüksektir ve erkeklerde kadınlara kıyasla oranı daha yüksektir. Morbidite ve mortalite hastalar için önemli sorunlardır; çalışma ve araba kullanma konusunda ciddi sınırlamalar vardır ve epilepside ani ölüm oranı genel popülasyona kıyasla 24 kat daha yüksektir (Henshall ve Simon, 2005).

Epilepsi, epileptik nöbet olarak adlandırılan, tekrarlayan ve önceden olacağı tahmin edilemeyen, normal beyin fonksiyonlarının kesintisi olarak tanımlanan, beyindeki bir düzensizliğe verilen addır. Epilepsi tek başına bir hastalık olmaktan ziyade, çok çeşitli nedenlerden ileri gelen beyin fonksiyon bozukluklarını yansıtan bir durumdur (Fisher ve ark., 2005). Epileptik konvulzyonlar beyin yapıları üzerinde çok önemli etkilere sahip olmalarının yanı sıra nöron ölümüne de yol açmaktadırlar (Henshall ve Simon, 2005; Naseer ve Ark., 2009).

Kullanılan güncel tedaviler nöbet etkinliğini kontrol edebilmekte fakat epilepsiyi önlememekte ya da tedavi etmemektedir. Hipokampusta temporal lob epilepsisinde (TLE) olduğu gibi nöral ağların yeniden yapılanmasına neden olan nöronal hasarlar, epileptogeneze götüren en önemli bileşenlerden biridir. Anti-nöbet ilaçlarının nöron koruyucu gücü zayıftır veya uzun süreli tedavi gerekliliğinin negatif etkileri, verdiği faydayı önemli derecede aşar. Bu nedenle dikkatler değişik bileşenlerin daha önceden belirlenmiş nöron koruyucu güçlerine yönelmiştir (Velisek ve ark., 2013) ya da bu amaçla yeni bileşenlerin çalışılmasına ihtiyaç duyulmuştur.

Beyin uyarılabilirliğini çalışmak için yaygın olarak kullanılan davranışçı yaklaşımlardan biri de sıçanlarda pentilentetrazol (PTZ) uygulamasıdır (Klioueva ve ark.,

2001). Antiepileptik ilaç geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda PTZ yaygınca kullanılır. PTZ uygulaması ratlarda hipokampal atrofiye yol açar. PTZ uygulanmış ratlarda hipokampusta seçici nöronal kayıp ve astrositozis görülür. Ayrıca PTZ uygulanmış ratlar üzerine yapılan manyetik rezonans görüntüleme (MRI) alışmalarında, serebellum hacminde azalma grlmektedir (Akdoğan ve Yonguç, 2011).

Kindling, beyinde nörokimyasal ve uzun dönem yapısal değişimleri araştırmak için kullanılan en önemli epilepsi modellerinden biri haline gelmiştir (Akdoğan ve Yonguç, 2011). Kindling elektriksel ya da kimyasal subkonvulzif uyarıların tekrar tekrar uygulanmasıyla konvulziyon aktivitesinde progresif yoğunlaşma ile sonuçlanan bir fenomendir (Pavlova, 2004). PTZ ile indüklenen kimyasal kindling, insan absans epilepsi ve miyoklonik jeneralize tonik, klonik (primer jeneralize) nöbet modelini oluşturur (Wu ve ark., 2006).

*Cichorium intybus* bitkisinin kökleri hem Avrupa'da hem de Doğu Anadolu Bölgesinde, geçmişten günümüze halk arasında geleneksel olarak epilepsi tedavisi için kullanılmaktadır. Literatürde bitkinin nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (Ahmed ve Tarannum, 2009). Ayrıca suda znen fraksiyonunda bulunan laktusin ve laktukopikrin alkaloidleriyle ilgili olarak başka bitkilerle yapılan çalışmalarda, merkezi sinir sistemi (MSS) zerine yatıştırıcı ve sedatif etkileri gösterilmiştir (Tyler, 1999).

Yetişkinlerde en yaygın görülen epilepsi tipi temporal lob epilepsisidir. Klinik ve deneysel çalışmalarla TLE'nin temelinde yatan nöbetlere hipokampal katkı kanıtlanmıştır. Hipokampusun TLE'nin jeneratörü olduğu birçok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (Avoli, 2007). PTZ kindling modeli, TLE'nin deneysel bir modelidir (Economou ve ark., 2001). Bu çalışmada, plazma, tüm beyin ve hipokampustan alınan doku örnekleri, nöbete ve *Cichorium intybus* kök ekstraktına verdiği yanıt yönünden araştırıldı. Hipokampusun TLE'ye katkısı nedeniyle, beyin dokusu hipokampus ve tüm beyin olmak üzere ayrı ayrı incelendi. Ayrıca bitkinin halk arasında geleneksel olarak kaynatılıp kullanımına atfen, *Cichorium intybus* bitkisinin epileptik nöbetleri önlemede olası etkinliğinin oksidatif stres, apoptozis, genotoksisite ve DNA hasarı yönünden ortaya konulması amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

Epilepsi, beyinde epileptik nöbetler üretmeye sürekli bir yatkınlık ve bu durumun nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçlarından oluşan bir düzensizliktir (Fisher ve ark., 2005). Beyinde, sinir hücresi aktivitesini alt üst eden bir nöbete yol açar ve nöbet süresince kişi bilinç kaybını da kapsayan anormal davranış, belirti ve duygu durumu gösterebilir (Anonim, 2013a).

Epilepsi, beyindeki sinir hücrelerinin artmış uyarılabilirliğinden (nöronal hipereksitabilite) kaynaklanır ve inhibisyon ve eksitasyon arasındaki denge bozulduğu zaman ortaya çıkan tekrarlayan, spontan nöbet durumudur (Scharfman, 2007; Engel ve ark., 2013). Epilepsi, kronik olarak tekrarlayan, tetiklenmemiş (non-provoke) nöbetlerle giden tabloyu tanımlar, bu nedenle tek bir tetiklenmemiş nöbet epilepsi anlamına gelmez.

Epilepsi nöbeti ise gri maddedeki artmış, hızlı ve yerel elektriksel boşalımlardan köken alır. Klinik gözlemede; belli bir süreye sınırlı olarak, bilinç, davranış, duygu, hareket veya algılama fonksiyonlarında, ani başlayan, kısa süreli ve geçici stereotipi değişiklik durumu bulunur (Anonim, 2013b). Epileptik bir nöbet, nöronların hipersenkronik deşarjı tarafından indüklenen beynin geçici, fizyolojik fonksiyon bozukluğu sonucu ileri gelir. (Henshall ve Simon, 2005). Özetle; epileptik nöbet, beyin fonksiyonların geçici olarak bozulması sonucu anormal ve aşırı nöronal aktiviteyi tanımlarken; epilepsi ise tekrarlayan nöbetlerin kronik durumu olarak tanımlanmaktadır (Kandel ve ark., 2012).

Çok sayıda klinik ve epidemiyolojik çalışma erişkin hastaların yaklaşık üçte birinin (% 20-30) epilepsiden muzdarip olduğunu, belirtilen dozlara uygun antikonvulzan kullanmalarına rağmen en sonunda ilaca dirençli epilepsi geliştiğini göstermektedir (Shuele ve Luders, 2008). İlaça dirençli epilepside hastalığın seyirinde hiçbir şekilde hafifleme görülmemektedir (Bernhardt ve ark., 2013).

### 2.1. Epilepsinin Tarihçesi

Epilepsi sözcüğü Yunanca “tutmak, yakalamak” anlamına gelen “epilepsia” sözcüğünden gelmektedir. Günümüzde, konuşma dilinde epilepsinin karşılığı olarak kullandığımız “sar’a” sözcüğü Arapça kökenlidir ve ‘yere serme’ anlamına gelmektedir (Bora ve ark., 2008). Antik dönemde epilepsinin, kötü ruhların, şeytanların veya cinlerin yol açtığı bir hastalık olduğu düşünülmekteydi. Babilliler epilepsi hastalığını ve nöbetlerini çok iyi

bilmelerine rağmen hastalığın nedeni olarak yine de şeytanları ve kötü ruhları gösteriyorlardı (Coşkun, 2011). Epilepsiyle ilgili bilinen en eski kayıtlar Mezopotamya uygarlığına aittir. Babil Kralı Hammurabi'nin ünlü yasalarının 278. Maddesinde (MÖ 1750 dolayları) şöyle denilmektedir: “Eğer bir kişi, erkek ya da kadın bir köleyi satın alır ve bir ay geçmeden kölede bennu (epilepsi) hastalığı ortaya çıkarsa köleyi satıcısına geri verecek ve ödenmiş olan parayı geri alacaktır” (Bora ve ark., 2008).

Epilepsi konusundaki ilk bilimsel yaklaşım MÖ 400'lü yıllarda Hipokrat tarafından yapılmıştır; Hipokrat, epilepsinin cinlerden ve şeytanlardan kaynaklanmadığını aksine bir beyin hastalığı olduğunu ve mutlaka ilaç ve diyetle tedavi edilmesi gerektiğini belirtmiştir. Hipokrat'ın açtığı yol, uzun süre açık kalmamış ve 2.000 yıldan fazla bir süre epilepsi konusunda önemli bir aşama kaydedilmemiştir. Hastalığın nedeni olarak şeytanlar ve cinler suçlanmaya devam edilerek, bilimsel yaklaşımda adeta bir sessizlik dönemi yaşanmıştır. Hastalığın tedavisinde okutma, sihir, kurşun dökme gibi yöntemler uygulanmış ve hastalar toplum dışına itilmiştir. Kötü ruhların çıkması için bazı hastaların kafatasında delikler açılmıştır (Coşkun, 2011).

17. yüzyılda İngiliz hekim Thomas Willis'in (1621-1675) beyin anatomisine, kas dokusuna ve nörofizyolojiye çok önemli katkıları oldu. Willis *Pathologicae cerebri* adlı eseri ile epilepsinin nedenleri üzerine bilimsel bir yaklaşımla tarih sahnesine çıkmıştır. Böylece biyoelektrik ve beynin elektriksel etkinliği ile ilgili çalışmalara ve nihayet epilepsinin moleküler mekanizmalarına gidecek uzunca bir yolun temeli atılmış oldu. 1849 yılında İrlandalı hekim Robert Bentley Todd epilepsi nöbetlerinin beyindeki elektriksel deşarjlardan kaynaklandığını ileri sürdü. Yaklaşık 25 yıl sonra Caton ve Berger'in çalışmaları ile Todd'un bu hipotezi desteklendi (Coşkun, 2011).

Hayvan beyinde elektriksel akımın varlığı ilk kez 1875 yılında Caton tarafından gösterildi; Caton, deney hayvanlarının gözüne uyguladığı ışık uyarını ile beyin elektriksel sinyallerinde değişiklik meydana geldiğini göstermeyi başardı. Takip eden yıllarda Pravdich-Neminsky, köpeklerde beyin yüzeyine yerleştirdiği elektrotlar aracılığıyla elektriksel etkinliği kaydetmeyi başardı. Beyindeki elektriksel etkinliğin kaydedilmesi ve özelliklerinin tanımlanması konusunda Hans Berger'in çalışmaları kilometre taşı oldu. Elektriğin artık sadece doğada karşılaşılan bir olay olmadığı, canlı sistemlerin de yaşamlarını sürdürebilmek için elektrik kullanmak zorunda olduğu ortaya çıktı. 19. yüzyılın sonlarında John Hughlings Jackson, hastaları ayrıntılı inceleyerek epilepsinin anlaşılmasını kolaylaştırdı. Jackson



epilepsiyi “sinir dokusunun ara sıra gelen düzensiz ve aşırı boşalımı” şeklinde tarif etti. Bu ve benzeri çalışmalar epilepsi üzerindeki sır perdesini yavaş da olsa araladı ve Hipokrat’ın 2.400 yıl önce yaptığı açıklamalar doğrulanmaya başlandı (Coşkun, 2011).

## **2.2. Epilepsinin Sınıflandırılması**

Epilepsi nöbeti ile epilepsi hastalığının eş anlamlı gibi kullanılması günümüzde artık bir hata olarak görülmektedir. Epilepsi nöbeti, epilepsi hastalığının temel semptomudur. Fakat nöbet, merkezi sinir sistemini doğrudan ya da dolaylı etkileyen birçok klinik semptomda da ortaya çıkabilir.

Epilepsi nöbeti beyindeki bir ya da birkaç grup sinir hücresinin aşırı deşarjına bağlı olarak ortaya çıkan ve klinikte gelip geçici motor, duysal, duyumsal, duygusal, bilişsel ve otonom; sıklıkla pozitif, bazen de negatif belirtilerle şekillenen bir durumdur. Bedende yaygın kasılma ve çarpınmalarla ve bilinç yitimiyle şekillenen büyük nöbetlerin (grand mal) sıklığı, ağız birleşği, göz kapağı, kol, bacak gibi sınırlı bölgelerdeki kasılmalar ya da atmalar, görme kaybı ya da ilüzyonları, konuşmada takılmalar, anlık dalmalar gibi küçük nöbetlerden çok daha seyreklerdir (Anonim, 2013b).

Epilepsi hastalığı, nöbetlerin tekrarlama eğiliminin bulunduğu kronik bir durumdur. Bu durum;

1. İdiopatik epilepsiler,
2. Kriptojenik epilepsiler ve
3. Semptomatik epilepsiler olarak 3 ana grupta toplanabilir (Anonim, 2013b).

Etiyolojik sınıflandırmaya göre ise epilepsi yukarıdakilere ilaveten 4. bir grup daha içermektedir;

4. Provoke edilen epilepsiler (Ngugi ve ark., 2010; Shorvon, 2011).

### **2.2.1. İdiopatik epilepsiler**

İdiopatik epilepsiler, adından da anlaşılacağı gibi, mevcut araştırma yöntemleriyle altta yatan bir nedenin gösterilemediği durumlar olarak kabul edilmektedir (Anonim, 2013a). Bu epilepsi tipinde genellikle (veya muhtemelen) genetik bir neden bulunmaktadır ve herhangi bir önemli nöropatolojik veya nöroanatomik anomali bulunmamaktadır. İdiopatik

epilepsi, henüz genetik temeli aydınlatılamamış fakat çok genli veya kompleks kalıtımla oluştuğu varsayılan epilepsi tipi olarak tanımlanmaktadır (Ngugi ve ark., 2010; Shorvon, 2011).

### **2.2.2. Kriptojenik epilepsiler**

Kriptojenik epilepsiler, idiopatik epilepsilerin bilinen özelliklerine uymamaları nedeniyle semptomatik gibi görünen fakat mevcut araştırma yöntemlerinin gene de etiyolojik bir bilgi vermediği durumlardır (Eşkazan, 1998).

Kriptojenik epilepsi, nedeni tespit edilememiş fakat semptomatik bir doğası olan epilepsi tipi olarak tanımlanmaktadır. Bu tarzdaki epilepsi vakalarının sayısı azalmakla beraber, yine de erişkinlik döneminde ortaya çıkan epilepsilerin % 40'ı bu sınıfa girmektedir (Ngugi ve ark., 2010; Shorvon, 2011).

### **2.2.3. Semptomatik epilepsiler**

Semptomatik epilepsilerde, çevresel faktörlerin yarattığı hücresel düzeydeki hasarın epilepsiye yol açabilmesinin; kişinin genetik özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Anonim, 2013b).

Semptomatik epilepsilerinin travma, tümör, enfeksiyon, malformasyon veya sistemik bir genetik hastalık gibi çeşitli nedenleri olabilir. Semptomatik epilepside edinsel veya genetik bir neden söz konusudur. Ciddi anatomik veya patolojik anomaliler ve/ veya klinik bulgular, altta yatan hastalığın göstergesidir. Genetik veya edinsel kökeni olabilen serebral patolojik değişikliklerle ilişkili gelişimsel ve konjenital düzensizlikler de bu gruptadır. Tek gen veya diğer genetik düzensizlikler sonucu serebral ve sistemik düzensizliklerle birlikte çok geniş bir fenotipte rahatsızlıkların ortaya çıktığı ve epilepsinin de bu rahatsızlıklara eşlik ettiği durumlar da semptomatik epilepsi sınıfında değerlendirilmektedir (Ngugi ve ark., 2010; Shorvon, 2011).

### **2.2.4. Provoke tipteki epilepsiler**

Provoke tipte yine herhangi bir önemli nöroanatomik ya da nöropatolojik anomali bulunmazken, nöbetler ağırlıklı olarak spesifik çevresel veya sistemik faktörler tarafından oluşturulur. Bazı provoke edilmiş epilepsi vakalarında genetik bir temel söz konusuken bazılarında edinsel bir temel söz konusudur. Fakat vakaların çoğunda kalıtsal bir neden tespit

edilememiştir. Genellikle genetik temelli olan ve refleks epilepsiler de bu kategoriye girmektedir. Refleks epilepsilerde nöbetler ani ve beklenmedik bir şekilde oluşur (Ngugi ve ark., 2010; Shorvon, 2011).

**Tablo 1.** Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması (ILAE, 1989) (Bora ve ark, 2008).

<p><b>I.</b> Lokalizasyona bağlı ( fokal, lokal, parsiyel) epilepsiler ve sendromlar</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. İdiopatik (yaşa bağlı başlangıç)<ul style="list-style-type: none"><li>i. Santrotemporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi</li><li>ii. Oksipital paroksizmlili çocukluk çağı epilepsisi</li><li>iii. Primer okuma epilepsisi</li></ul></li><li>b. Semptomatik<ul style="list-style-type: none"><li>i. Temporal lob epilepsisi</li><li>ii. Frontal lob epilepsisi</li><li>iii. Paryetal lob epilepsisi</li><li>iv. Oksipital lob epilepsisi</li><li>v. Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsialis kontinuası (Kojewnikow sendromu)</li><li>vi. Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar</li></ul></li><li>c. Kriptojenik</li></ul>
<p><b>II.</b> Jeneralize epilepsiler ve sendromlar</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. İdiopatik (yaşa bağlı başlangıç-yaş sırasına göre sıralanmıştır)<ul style="list-style-type: none"><li>i. İyi huylu ailesel yenidoğan konvulziyonları</li><li>ii. İyi huylu yenidoğan konvulziyonları</li><li>iii. Süt çocukluğunun iyi huylu miyoklonik epilepsisi</li><li>iv. Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi)</li><li>v. Jüvenil absans epilepsisi</li><li>vi. Jüvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petit mal)</li><li>vii. Uyanmada grand mal nöbetli epilepsi</li><li>viii. Diğer jeneralize idiyopatik epilepsiler</li><li>ix. Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler</li></ul></li></ul>

<p>b. Kriptojenik veya semptomatik (yaş sırasına göre)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>i. West sendromu (infantil spazmlar, Blitz-Nick-Salaam Kraempfe)</li><li>ii. Lennox-Gastaut sendromu</li><li>iii. Miyoklonik astatik nöbetli epilepsi</li><li>iv. Miyoklonik absans epilepsi</li></ol> <p>c. Semptomatik</p> <ol style="list-style-type: none"><li>i. Spesifik olmayan etyolojili<ul style="list-style-type: none"><li>• Erken miyoklonik ensefalopati</li><li>• Erken infantil epileptik ensefalopati (baskılanım-boşalım ile)</li><li>• Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler</li></ul></li><li>ii. Spesifik sendromlar</li></ol>
<p><b>III. Fokal veya jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsiler</b></p> <p>a. Jeneralize ve fokal nöbetli epilepsiler</p> <ol style="list-style-type: none"><li>i. Yenidoğan konvulziyonları</li><li>ii. Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi</li><li>iii. Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgalı epilepsi</li><li>iv. Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)</li><li>v. Diğer belirlenemeyen epilepsiler</li></ol> <p>b. Jeneralize veya fokal özelliği belirlenemeyen epilepsiler</p> <ol style="list-style-type: none"><li>i. Jeneralize tonik-klonik nöbetleri olan ancak klinik ve EEG bulguları jeneralize ya da fokal epilepsi ayrımında kesin bilgi vermeyen tüm olgular (uykuda jeneralize tonik klonik nöbet gibi) bu gruba girer.</li></ol>
<p><b>IV. Özel sendromlar</b></p> <p>a. Duruma bağlı nöbetler (Gelegenheitsanfaelle)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>i. Febril konvulziyonlar</li><li>ii. İzole nöbet veya izole status epileptikus</li><li>iii. Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler</li></ol>

Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneğinin (International League Against Epilepsy-ILAE) uzun yıllar süren çalışmaları sonucunda, 1989 yılında epilepsi ve epileptik sendromlar; nöbet tipi, etyolojisi, nöbeti uyaran faktörler, başlangıç yaşı, tedavi seçimi gibi faktörleri de kapsayacak şekilde yeniden sınıflandırılmıştır (Tablo 1). Bu sınıflamada iki ana grup bulunmaktadır: İlk gruptaki epileptik sendromlar lokalizasyonla ilişkili epilepsileri, ikinci gruptaki sendromlar ise jeneralize epilepsileri içermektedir. Gerek jeneralize gerekse lokalizasyonla ilişkili epilepsiler kendi içlerinde nedene yönelik olarak idiyopatik (primer), semptomatik veya kriptojenik olarak üçe ayrılmaktadırlar. İdiyopatik epilepsilerde herediter yatkınlık dışında altta yatan herhangi bir patolojik süreç bulunmamaktadır (Bambal ve ark., 2011).

### 2.3. Epilepsi Nöbetleri

Nöbetler epilepsinin karakteristik özelliğidir ve 40'tan fazla farklı nöbet tipi tanımlanmıştır (Coşkun, 2011). Nöbetlerin ve epilepsinin sınıflandırılması patogeneze ve tedavi bakımından önemlidir. Tüm nöbetler birbirinin aynı değildir. Nöbetler ve tekrarlanan nöbetlerin kronik durumu (epilepsi) ortaktır. Birçok bakımdan nöbetler prototipik, nörolojik bir hastalık (semptomlar pozitif ve negatif duyuşal veya motor belirtilerin her ikisini de içerir) sunmaktadır. Bir nöbet boyunca oluşan pozitif işaretlere örnekler, yanan sönen ışıklar veya bir kolun sıçraması algısını içerir. Öz farkındalık ve bilinçte bozukluk ve hatta geçici körlük veya felç gibi negatif belirtiler, normal beyin fonksiyonu bozukluğunu yansıtmaktadır. Bu örnekler nöbetlerin genel bir özelliğini vurgulamaktadır: belirti ve semptomlar etkilenen beyin bölgesinin kapsam ve lokasyonuna bağlıdır (Kandel ve ark., 2012).

Klinik nöbetler ilkin parsiyel (fokal-lokal) ve jeneralize olmak üzere iki büyük sınıfa ayrılmaktadır (Scheuer ve Pedley, 1990; Marangoz, 1997); Parsiyel ya da kısmi nöbetler lokal bir beyin bölgesinden başlar (Marangoz, 1997; Kandel ve ark., 2012). Genellikle tek bir serebral hemisfer bölgesinde başlar ve nöbet esnasında beyinin diğer bölgelerine de yayılabilir (Löscher ve Ebert, 1996). Yüzde ya da bir kolda seğirme, bir duyuda değişiklik veya temporal lob nöbetlerinde olduğu gibi odak türü hafıza değişikliği biçiminde fokal belirtilerle sonuçlanır (Kandel ve ark., 2012). Bir hemisferin belli bir kısmından başlayan anormal deşarjlar, nöbet esnasında beyinin diğer kısımlarına da yayılır (Marangoz, 1997).

Jeneralize nöbetlere beyin bütün bölgelerinde aynı anda başlayan anormal nöron deşarjı neden olmaktadır (Marangoz, 1997). Jeneralize nöbetler beyin iki tarafında başlar (Kandel ve ark., 2012) ve lokalize başlangıca dair bir kanıt barındırmazlar fakat esasen başlangıçta eş zamanlı olarak her iki hemisferin tümünü veya geniş alanlarını kapsarlar (Löscher ve Ebert, 1996). Hatta epilepsi uzmanları bu nöbetlerin beyin derin yapılarında başladığını ve nöbet belirtilerinin nispeten aynı anda ortaya çıktığı kortikal yüzeye hareket ettiğini düşünmektedirler (Kandel ve ark., 2012).

Birincil jeneralize nöbetler, başlıca çarpınma hareketlerinin değişik biçimlerinin varlığı ya da yokluğu tarafından alt sınıflara ayrılmaktadır. Avrupa ve Amerika'daki epidemiyolojik verilere göre insanlarda görülen en sık nöbet tipi, ikincil jeneralizasyonla birlikte olan ya da olmayan kompleks parsiyel nöbetlerdir (Löscher ve Ebert, 1996). Kompleks parsiyel nöbetlerin çoğunluğu temporal loblardan (% 70- 85) özellikle hipokampus ve amigdaladan

köken almaktadır ve temporal lob epilepsisi biçiminde adlandırılmaktadır (Löscher ve Ebert, 1996).

Kindling, TLE’de olduğu gibi ikincil jeneralizasyonun eşlik ettiği kompleks parsiyel nöbetlerin birkaç modelinden biridir. Bu nedenle bu tip nöbetlerin, fokal epileptogenezin ve antiepileptik ilaçların fokal ve ikicil jeneralize nöbetler üzerine etkilerinin patofizyolojisini çalışmak için yaygın biçimde kullanılmaktadır (Löscher ve Ebert, 1996).

### **2.3.1. Parsiyel nöbetler**

Parsiyel nöbetler şu alt gruplara ayrılır;

- I. Basit parsiyel nöbetler (hafıza ve bilinçte değişiklik yok),
- II. Kompleks parsiyel nöbetler (hafıza ve bilinçte değişim) (Kandel, 2012) ve
- III. İkincil olarak jeneralize olan (klonik ve/ veya tonik nöbetlere yaygınlaşan) parsiyel nöbetler (Löscher, 1996).

#### **2.3.1.1. Basit parsiyel nöbetler**

Basit parsiyel nöbetler seğirme, anormal hisler, anormal görüntüler, sesler ve kokular ve algı bozulmaları gibi motor nöbetler olabilir. Nöbet aktivitesi otonom sinir sistemine yayılabilir ve kızarma, karıncalanma veya mide bulantısıyla sonuçlanabilir. Bu tür basit parsiyel nöbetlerde bilinç açık ve hasta adını tam olarak hatırlıyor olmalı. Eğer hasta şaşkınsa veya nöbet boyunca neler olduğunu anımsamıyorsa bu durumda nöbet, kompleks parsiyel nöbet olarak sınıflandırılır (Kandel, 2012). Basit parsiyel nöbetler; (Tablo 2 ve Tablo 3) motor, duyu, duyu-motor, otonomik viseral ve kognitif olmak üzere 5’e ayrılabilir (Marangoz, 1997).

#### **2.3.1.2. Kompleks Parsiyel nöbetler**

Kompleks parsiyel nöbetler her iki hemisferle ilgilidir, şuur kaybı veya şuur bulanıklığı görülür. Kompleks parsiyel nöbetler terimi, temporal lob nöbeti terimi ile eş anlamlıdır (Marangoz, 1997).

Kompleks parsiyel nöbetler, evvelce “psikomotor nöbetler”, “temporal lob nöbetleri” veya “limbik nöbetler” olarak adlandırılmaktaydı. Kompleks parsiyel nöbetlerin, nöbet için uyaran olan bir aurası olabilir; bu tanıdık bir his (deja vu), bulantı, ısınma, karıncalanma ya da

duysal algıda bozukluk olabilir. Hastaların yaklaşık yarısı herhangi bir aura anımsayamamaktadırlar. Kompleks parsiyel nöbet esnasında hastalar; aktivitelerini bozarlar ya da otomatik parçalar halinde gerçekleştirirler örneğin dudak şapırdatmak, amaçsızca yürümek ya da saçma sapan sözcükleri tekrar tekrar söylemek gibi. Bu amaçsız aktivitelere otomatizm (reflekssel hareketler) denir. Kompleks parsiyel nöbetleri olan kişilerin % 75’inde bu hareketler görülür (Kandel, 2012).

Parsiyel nöbetler bazen jeneralize tonik-klonik nöbet haline dönüşebilir (Marangoz, 1997). Bu durumda bu nöbetler için “ikincil olarak jeneralize olan parsiyel nöbetler” adlandırılması kullanılır.

TLE, yetişkinlerde en yaygın olarak görülen fokal epilepsi biçimidir. Ayrıca çocuklarda da en yaygın epilepsi tiplerinden biridir (Spencer ve Huh, 2008; Bell ve ark., 2009). Yanı sıra yetişkinlerde en inatçı epilepsi sendromudur. Hastaların yaklaşık üçte biri antiepileptik ilaç kullanmalarına rağmen nöbet geçirmeye devam etmektedirler (Henshall ve Simon, 2005).

Temporal lob epilepsisinde, genellikle basit ve/ veya kompleks kısmi nöbetler görülmele beraber altta yatan patoloji geniş yelpazedeki patolojik unsurların herhangi biri olabilir. Örneğin hipokampal skleroz, düşük grade’li glial tümörler (disembriyoplastik nöroepitelyal tümör, ganglioglioma ve oligodendroglioma), nöronal migrasyon bozuklukları (kortikal displazi) ve vasküler lezyonlar (kavernöz malformasyon ve arteriyovenöz malformasyon) gibi. Olguların önemli bir kısmında ise hiçbir yapısal anomali bulunmamaktadır (Georgiadis ve ark., 2013).

### **2.3.2. Jeneralize (umumi) nöbetler**

Jeneralize nöbetlerde bir odağın varlığı tespit edilmemiştir. Epileptik deşarjlar beynin her tarafında aynı anda başlamaktadır (Marangoz, 1997). Jeneralize nöbetler Tablo 2 ve 3’te de görüldüğü üzere birçok kategoriye ayrılmaktadırlar.

**Tablo 2.** Uluslararası nöbet sınıflandırması (Fisher ve Saul, 1997).

I. Parsiyel (lokal-kısmi) epilepsi
a. Basit
i. Duyu
ii. Motor
iii. Duyu-Motor
iv. Psişik (anormal düşünceler ve algılama)
v. Otonomik (ısı, karıncalanma veya gastrointestinal)
b. Kompleks (bilinç/hafızanın kaybı)
i. Auralı (uyarıcı) ya da aurasız
ii. Otomatizmlili ya da otomatizmsiz
c. Sekonder jeneralize (yayılr)
II. Jeneralize (umumi) epilepsi
a. Absans, tipik veya atipik (petit mal)
b. Tonik-klonik (Grand mal)
c. Miyoklonik
d. Atonik
e. Tonik
III. Sınıflandırılmayanlar

**Tablo 3.** Epilepsiye Karşı Uluslararası Dernek (International League Against Epilepsy)'e ait nöbet sınıflandırılması (Kandel ve ark, 2012).

I. Genellenmiş (yaygın) nöbetler
a. Tonik-klonik (herhangi bir kombinasyonda)
b. Absans (tipik, atipik ve absansa özgü özellikleri olan da dahil)
c. Miyoklonik
d. Klonik
e. Tonik
f. Atonik
II. Fokal (odaksal) nöbetler (eskiden basit parsiyel ve kompleks parsiyel olarak adlandırılırdı).
III. Bilinmeyen



Jeneralize nöbetler sınıfa giren başlıca nöbetler; Petit mal (absans), grand mal (tonik-klonik), myoklonik, atonik, tonik biçiminde gruplanabilir (Tablo 2). Epileptik nöbetlerin % 10-25'i sıralanan bu grupların hiçbirine uymaz. Bu nedenle sınıflandırılmayan grubu oluştururlar (Marangoz, 1997).

### **2.3.2.1. Absans nöbetler**

Absans nöbetler evvelce petit mal nöbetler diye adlandırılmaktaydı. Absans nöbetler genellikle çocuklukta başlar yetişkinlikte de devam edebilir. Absans nöbetler, birkaç saniye gözlerde dalma biçimindedir. Bazen göz kapağını kırpma veya kafa sallama da bu dalmaya eşlik edebilir. Absans tipi nöbetler genellikle kısa sürer ve hızlı iyileşmeye olanak sağlar. Bu nöbetlerin gözde dalmayla sonuçlanabilen kompleks parsiyel nöbetlerden ayırt edilmesi zor olabilir. Elektroensefalografi (EEG) bir absansı, kompleks parsiyel nöbetten ayırt etmek için olanak sağlar (Kandel, 2012).

### **2.3.2.2. Tonik-klonik nöbetler**

Jeneralize tonik-klonik nöbetler evvelce grand mal nöbetler olarak adlandırılmaktaydı. Bu nöbetler ani bilinç kaybı ile başlar ve tonik aktiviteyi (katılaşma) klonik aktivite (uzuvların ritmik kasılması) takip eder. Nöbetin başlangıcında hastanın gözleri yukarı doğru kayar ve tipik olarak bir çığlık duyulur fakat nedeni acı değil, kapalı bir gırtlığa karşı solunum kaslarının kasılmasıdır. Jeneralize tonik-klonik nöbetler genellikle bir ila üç dakikada sonlanırlar. Nöbetin kendisi bir “iktus” olarak adlandırılır. Nöbetten sonra hasta “post-iktal”dir (uyuşuk, uykulu ve şaşkıncı) değişken olmakla birlikte, bu durum saatlerce sürebilir (Bora ve ark., 2008).

### **2.3.2.3. İkincil jeneralize nöbetler**

Fokal olarak başlayan nöbetler tüm beyne yayılabilir. Bu durumda tonik klonik bir nöbet ortaya çıkar. Nasıl olursa olsun bunun başlangıçta jeneralize olan gerçek grand mal ile fokal olarak başlayıp sekonder jeneralize olan tipten ayırt edilmesi oldukça önemlidir. İkincil jeneralize nöbetler fokal olarak anormal olan bir beyin bölgesinden kaynaklanır. Birincil ve ikincil jeneralize tonik-klonik nöbetlerin tedavisinde kullanılan ilaçlar farklıdır. İkincil jeneralize tonik-klonik nöbetleri olan hastalar iyileştirici epilepsi ameliyatı için adaydırlar,

birincil jeneralize tonik klonik nöbetleri olan hastalar ameliyat için aday olamazlar çünkü ameliyatla alınabilecek, nöbetin köken aldığı bir bölge (odak) yoktur (Bora ve ark., 2008).

#### **2.3.2.4. Miyoklonik nöbetler**

Bir miyoklonik nöbet, kısa, sürekli olmayan bir kasılma veya kasılmalar serisidir ve bir jeneralize tonik klonik nöbet sürecinde görülen ritmik kasılmalardan daha az organize dir (Bora ve ark., 2008).

#### **2.3.2.5. Atonik nöbetler**

Atonik nöbetler epileptik düşme ataklarıdır. Atonik nöbetler tipik olarak geniş alana yayılan beyin hasarı olan çocuklarda ya da yetişkinlerde görülmektedir. Atonik nöbetleri olan insanlar aniden gevşeyerek yere düşerler. Ciddi yaralanmalara karşı korunmak için bazen kaska ihtiyaç duyulabilir (Bora ve ark., 2008).

#### **2.3.2.6. Tonik nöbetler**

Tonik nöbetler, birinci nöbet belirtisi olarak kasların katılaşmasına neden olur. Kollar ve bacaklar öne veya yukarı havaya doğru uzanır. Bilinç kaybolabilir ya da kaybolmayabilir. Tanım olarak, klonik (kasılma) fazı yoktur. Sınıflandırma zor olabilir, çünkü katılaşma birçok kompleks parsiyel nöbetin bir özelliğidir. Bununla birlikte, tonik nöbetler, kompleks parsiyel ve tonik-klonik nöbetlere göre daha az yaygındır (Bora ve ark., 2008).

#### **2.3.3. Karma (Sınıflandırılmayan) nöbet tipleri**

Hastalar birden fazla nöbet tipine sahip olabilirler. Elektriksel aktivite beynin her tarafına yayılırken bir nöbet tipi bir diğerine gelişebilir; Basit parsiyel nöbetten, kompleks parsiyel nöbete (hasta şaşkına döner) ya da ikincil jeneralize tonik klonik nöbete (elektriksel aktivite tüm beyine yayılırsa) tipik olarak gelişebilir. Beynin nöbeti sınırlamak için kontrol mekanizmaları vardır. Anti-epileptik ilaçlar, beynin bir nöbetin yayılımını sınırlandırma yeteneğini artırır (Bora ve ark., 2008).

## **2.4. Hangi Nöbet Tipi Daha Yaygındır?**

Kompleks parsiyel nöbetler erişkinlerdeki tüm nöbet tiplerinin yaklaşık % 40'ını oluştururlar. Basit parsiyel nöbetler yaklaşık % 20'sini, birincil jeneralize tonik-klonik nöbetler yaklaşık % 20'sini, absans yaklaşık % 10'unu ve diğer tipler de % 10'unu oluştururlar. Pediatrik bir popülasyonda ise absans nöbetleri büyük bir oranı oluşturur (Bora ve ark., 2008).

## **2.5. Epileptogenez**

Epileptogenez terimi, klinik belirti ile birlikte ya da herhangi bir klinik belirti olmaksızın, elektroensefalografik olarak nöbet aktivitesinin kayıtladığı, tekrarlayıcı olarak yeterli sayıda nöronun ateşlenmesi sonucu nöbet aktivitesinin oluşması olarak ifade edilir. Epileptogenez bir beyin hasarı sonrası beyindeki hücrel ve moleküler değişikliklere bağlı olarak eksitabilitenin artması ve tekrarlayıcı spontan nöbetlerin görülmesi olarak tariflenebilir (Bora ve ark., 2008).

Epileptogenezden sorumlu hücrel mekanizmalar halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Tüm epilepsi nöbetlerinde aynı mekanizmadan söz edilmemekle birlikte hepsinde artmış nöronal uyarılabilirlik ve senkronite gibi ortak özellikler mevcuttur. Epileptojenik odak adını verdiğimiz beyin bölgelerindeki hücreler tam açıklanamayan nedenlerle artmış uyarılma ve anormal ateşlenme özelliği gösterirler ve etraflarındaki normal hücreleri de bu duruma ortak ederler (Bambal ve ark., 2011).

### **2.5.1. Temel mekanizmalar**

Epilepsi oluşumunda rolü olduğu kabul edilen güçlü hipotezler;

- I. Nöronal reseptörlerin yeniden organize olarak dağılımlarının değişimi (up veya down regulasyon).
- II. GABAerjik inhibisyonun epileptogenezini baskılamak yerine, paradoksal olarak fonksiyonel değişimler yaratması ve epileptik aktiviteyi artırması (Bora ve ark., 2008).

Hayvan deneylerinden ve insanda yapılan çalışmalardan elde edilen verilerden, kortikal nöronların membran potansiyellerinde ve ateşlenme şekillerinde bazı karakteristik bozukluklar saptanmıştır. "Paroksizmal depolarizasyon kayması" (PDK) olarak bilinen bu

durumda membranı depolarize eden postsinaptik potansiyelin anormal şekilde uzaması ve büyümesi söz konusudur. Bunun sonucu olarak nöronlar gruplar halinde ateşlenebilir ve etraflarındaki nöronları benzer şekilde ateşleyebilecek bir kapasiteye ulaşırlar. PDK'nın eksitator nörotransmitterler olan glutamat ve aspartat ile inhibitör nörotransmitter gama-aminobütirik asit (GABA) sistemleri arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bunun dışında membranlardaki iyon kanallarındaki bozuklukların da PDK'nın ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir (Anonim, 2013b).

Birkaç klasik nörotransmitter sistemindeki, örneğin glutamerjik ve GABAerjik sistemlerdeki değişimler epileptik nöbet oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca, nitrik oksit (NO) sinaptik plastisite, beyin uyarılabilirliğinin düzenlenmesi ve nöbet aktivitesinin tetiklenmesi ile bağlantılı bir potansiyel nörotransmitter veya retrograd haberci olduğu bildirilmektedir. Ayrıca NO, hem antikonvulzan hem de prokonvulzan etkileri ile nöbet duyarlılığının tartışmalı bir modülatörüdür (Kumar ve ark, 2013).

Epileptojenik odak olarak adlandırılan bölgede "pacemaker" hücreler yer almaktadır ve bu hücreler tam olarak bilinmeyen nedenlerle, artmış uyarılma ve anormal ateşlenme özelliği gösterirler. Pacemaker hücrelerin etraflarındaki hücreleri de bu ateşlenmeye ortak edebilecek güçleri vardır. Sonradan katılan bu nöronların miktarı; tablonun EEG'de bir interiktal (nöbet arası dönem) dikenle sınırlı kalmasını ya da yeterli miktara ulaşabildiğinde EEG'de ve klinikte nöbet aktivitesinin oluşmasını belirler. Epileptik bir nöbet sırasında beyindeki nöronların hipersenkron ve tekrarlayıcı aktivasyonu söz konusudur. EEG'de görülen diken artmış eksitasyonu, diken izleyen yavaş dalga ise inhibisyonu göstermektedir (Anonim, 2013b).

Özetle, fokal kortikal bir nöbet aktivitesinin oluşabilmesi için ilgili nöronlarda iki temel fizyopatolojik özellik (hipereksitabilite ve senkronizasyon) birlikte bulunmalıdır. Nöbet aktivitesinin yayılması ise eksitasyon alanını çevreleyen inhibitör nöronların inaktivasyonu (çevresel inhibisyon alanının kaybı) ile gerçekleşmektedir (Anonim, 2013b).

Bugün için, eskiden kabul gören, santrensefalik epilepsi, yani jeneralize ve santral yerleşimli bir epilepsi jeneratörü olduğu kavramı tartışmalıdır ve yerini korteksin ön planda rol aldığı kortiko retiküler teoriye bırakmıştır. Bazı nöbet tipleri için (örneğin, tipik absans nöbetleri) talamusta yer alan T-tipi  $Ca^{+2}$  kanallarının rolü kanıtlanmış olsa da, bütün epilepsi

nöbetlerinin kortikal mekanizmalarla tetiklendiği görüşü giderek ağırlık kazanmaktadır (Anonim, 2013b).

Jeneralize epilepsilerde, beyin sapı retiküler formasyonundan, orta hat talamus nukleusları üzerinden taşınan yaygın bir girdinin aşırı uyarılmış durumdaki kortekse etkisi üzerinde durulmakta ve bazı asendan biojenik aminlerin rolleri vurgulanmaktadır. Bazı araştırmacılar ise tetikleyici bölgenin büyük olasılıkla kortikal olduğunu ve anterograd veya retrograd yolla senkron aktivitenin talamusa yayıldığını savunmaktadırlar (Anonim, 2013b).

Nöbete eşlik eden anormal deşarjların fizyolojisi konusunda yeterince bilgi olmasına karşın epileptogeneze sorumlu hücrel mekanizmalar halen bilinmemektedir. İstirahat membran potansiyelinin instabilitesine neden olan primer bir nöronal membran defekti üzerinde durulmaktadır. Buna neden olduğu düşünülen mekanizmalar; potasyum iletiminde bozukluk, voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$  kanallarında defekt veya ATPaza bağlı iyon transportunda bozukluk olarak özetlenmektedir. GABAerjik inhibitör sistemlerin primer defekti olasılığı veya eksitatör nörotransmisyonunda rol alan reseptörlerin duyarlılığı ve düzenlenmesindeki olası defektler üzerinde de durulmaktadır. Eksitatör nörotransmisyonla yakından ilişkili olan “mossy fiber” sistemindeki morfolojik değişiklikler gösterilmiştir (Anonim, 2013b).

Epileptik nöbetlerde paroksizmal deşarjlarla ilgili olarak bölgesel beyin kan akımının arttığı uzun zamandan beri bilinmektedir. Nöbet sırasında ATP (adenozin trifosfat) azalırken AMP (adenozin monofosfat), ADP (adenozin difosfat), laktik asit gibi maddeler çoğalmaktadır. Yine hücre içi  $Ca^{+2}$ 'un artmasıyla aktive olan fosfolipazlar serbest yağ asitlerinin artmasına yol açmakta ve prostaglandinler de artış göstermektedir. İktal dönemdeki bölgesel beyin kan akımının artışı, ADP ve prostaglandinlerin vazodilatasyondaki rolleri ile açıklanmaktadır (Anonim, 2013b).

### **2.5.2. Moleküler mekanizmalar**

Epileptogeneze götüren moleküler mekanizmalar arasında;

- Voltaj bağımlı  $Na^{+}$  kanallarının aktivasyonu,
- GABA sentez veya yıkımındaki değişiklikler,
- Hücrel GABA alımının inhibisyonu,
- Başta  $GABA_A$  olmak üzere çeşitli aminoasit reseptörlerinin modülasyonu ve
- Adenozin metabolizmasındaki düzenleme ile ortaya çıkan değişiklikler de yer alır.

Bu moleküler mekanizmalar daha çok reseptör alt grubundaki değişiklikler ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu değişikliklerin başında N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonu ve  $Ca^{+2}$  iyonunun hücre içine girişi gelmektedir.  $Ca^{+2}$  'un hücre içine girişi,  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilosokzasole- 4-propionat (AMPA) ve NMDA üzerinden sinaptik geçişte bir artışı ve GABAerjik inhibitör sinaptik geçişte akut bir azalmayı tetikleyebilir (Bora ve ark., 2008).

Mevcut fizyolojik ve genetik analizler epilepsinin çok çeşitli iyon kanallarıyla [voltaj bağımlı iyon kanalları ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cl^-$ ) ve ligand kapılı kanallar (nikotinik asetilkolin (ACh) ve GABA reseptörleri)] yakından ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Detaylı moleküler mekanizmalar hala araştırılmaktadır (Naseer ve ark., 2009).

Eksitator ve inhibitör nöronlar arasındaki denge, yani temel olarak glutamaterjik ve GABAerjik nöronlar arasındaki denge, geçici nöron senkronizasyonunu kontrol eder. Bu dengesizliği anlama, epilepsiye çare bulmak için anahtar noktalardan biridir (Cloix ve Hévor, 2009). Glutamat ve GABA, santral sinir sisteminde (SSS) en çok bulunan nörotransmitterlerdir (Bora ve ark., 2008).

Sekonder epilepsi sendromlarında glutamaterjik sistem önemli bir yer tutmaktadır. Birçok epilepsi çeşidinin aşırı glutamaterjik sinaptik iletim bozukluğundan kaynaklanabileceği öngörülmektedir (Bambal ve ark., 2011).

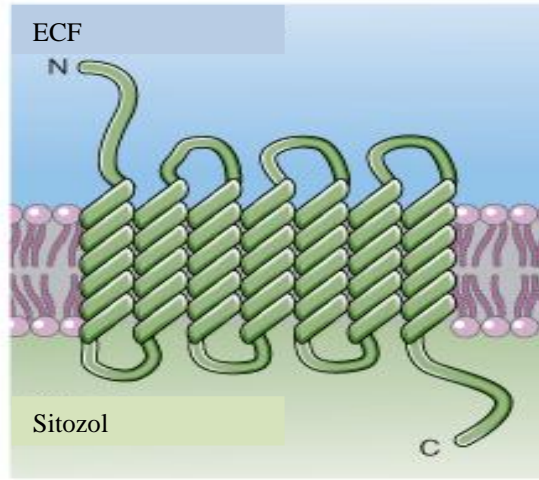
Glutamat memeli beyinde temel uyarıcı nörotransmitterdir ve glutamat ve analoglarının nöronlar üzerine güçlü bir depolarize edici etkisi vardır (Morimoto ve ark., 2004). Glutamat aminoasitinin beyindeki uyarıcı iletimin % 75'inden sorumlu olduğu hesaplanmıştır. Glutamat sitoplazmadaki krebs döngüsünün ara ürünü olan  $\alpha$ -ketoglutaratın indirgenmiş aminasyonu ile oluşur. Sitoplazmik glutamin deposu hücrelerarası sıvıdan glutamata alan üç taşıyıcı ve glutamatın glutamine dönüştürülüp glutamaterjik nöronlara aktarıldığı yer olan astrositlere taşıyan iki ilave taşıyıcıyla zenginleştirilmiştir. Serbestlenen glutamat astrositler tarafından alınarak nöronlara geri iletilen glutamine dönüştürülür ve sinaptik iletimci olarak serbestlenen glutamata tekrar geri dönüştürülür. Nöronlara ve astrositlere alım glutamatın sinapslardan uzaklaştırılması için esas mekanizmadır (Ganong, 2011). Beyindeki eksitator post sinaptik potansiyellerin büyük bölümüne iki tip glutamat reseptörü aracılık eder. Birçok glutamat aracılı sinapslar, iki ayrı bileşenle (biri diğerinden daha hızlıdır) bir EPSP (eksitator post sinaptik potansiyel) üretir. Her iki bileşen aynı

presinaptik terminalden salınan glutamat nörotransmitteri ile tetiklenirler fakat iki EPSP bileşeni farklı postsinaptik reseptörlere ait farklı tipte iyon kanallarınca oluşturulurlar.

Glutamat, dört büyük grup reseptör üzerinde etki gösterebilir: biri G protein eşlenik ya da metabotropik reseptör adını alır ve diğer üçü iyon kanallarıdır ve iyonotropik reseptörler adını alırlar (Boron ve Boulpaep, 2012). Eksitatör aminoasit glutamat tarafından aksiyon potansiyelinin iletimine aracılık eden reseptörler sınıflandırılırken ilkin ikiye ayrılır:

- Metabotropik reseptörler
- İyonotropik reseptörler (Bora ve ark., 2008).

Metabotropik reseptörler, hücre içi inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) ve diaçilgliserol (DAG) seviyesini artıran veya hücreiçi siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyesini azaltan G proteiniyle eşleşmiş reseptörlerdir. Hem presinaptik hem de postsinaptiktirler ve beyinde yaygın biçimde dağılmışlardır (Ganong, 2011). Metabotropik reseptörler “mGluR” biçiminde gösterilirler ve her biri membranı 7 defa kat ederler ve heterotrimerik G proteiniyle ilişkilidirler (Boron ve Boulpaep, 2012).

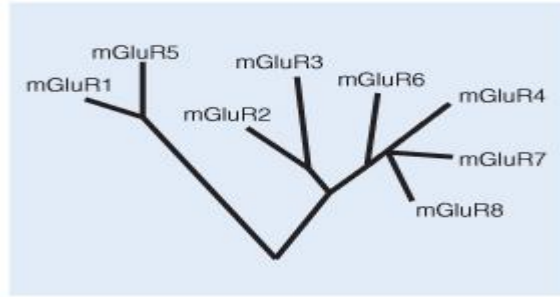


**Şekil 1.** Metabotropik glutamat reseptörleri (Boron ve Boulpaep, 2012).

Sekiz adet metabotropik glutamat reseptörü (mGluR) bilinmektedir (Şekil 2). Bu reseptörler, heterolog ekspresyon sistemlerindeki sinyal ileti mekanizmaları, sekans benzerlikleri ve farmakolojileri temel alınarak, üç grupta sınıflandırılmaktadır;

- Grup I, mGluR1 ve mGluR5'i içermektedir. Bunlar G<sub>q</sub> proteinle kaplıdır. G<sub>q</sub> protein, ikinci haberci sistemi olan fosfolipaz C'yi aktive eder. Fosfolipaz C, diaçilgliserol ve inositol trifosfatı oluşturur.
- Grup II, mGluR2 ve mGluR3 alt tiplerinden oluşmaktadır.
- Grup III, mGluR4, 6, 7 ve 8 alt tiplerinden oluşmaktadır.

Hem grup II hem de grup III mGluR'leri G<sub>ai</sub> proteini ile kaplıdır ve adenilsiklazı inhibe ederek intraselüler cAMP oluşumunu azaltır ve *in vivo* çalışmalarda iyon kanallarını modüle ettiği gösterilmiştir (Ritzen ve ark., 2005). Grup II ve III negatif biçimde adenilsiklaz ile eşleşmişlerdir. Grup II (mGluR2, 3) ve Grup III (mGluR4, 6–8) reseptörlerinin, glutamat salınımını azaltmak için presinaptik olarak rol oynadıkları tahmin edilmektedir (Morimoto ve ark., 2004).

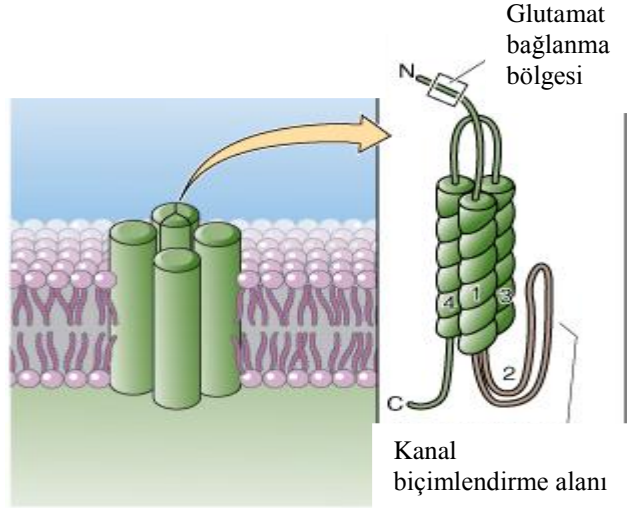


**Şekil 2.** Metabotropik glutamat reseptörlerine ait aile ağacı (Boron ve Boulpaep, 2012).

Epilepsinin kindling modelinde biyokimyasal ve elektrofizyolojik fonksiyonel ölçümler ile grup I reseptörlerinin upregüle olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kompleks parsiyel nöbetli hastaların hipokampusunda mGluR5'inde up regülasyonunun olduğu bildirilmiştir. Kindled sıçanların hipokampal dilimlerinde grup III mGluR'lerinde bir down regülasyonun olduğu da bildirilmiştir (Bambal ve ark., 2011).

İyonotropik reseptörler (Şekil 3), kimyasal kapılı iyon kanallarıdır (Ganong, 2011). SSS'de uyarıcı nörotransmitter olan glutamat, postsinaptik hücre üzerindeki etkisini spesifik iyonotropik NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri üzerinden gerçekleştirir (Bora ve ark., 2008). Reseptör adları, kendilerine ait nispeten spesifik agonistlerinden türetilmiştir (Boron ve Boulpaep, 2012).

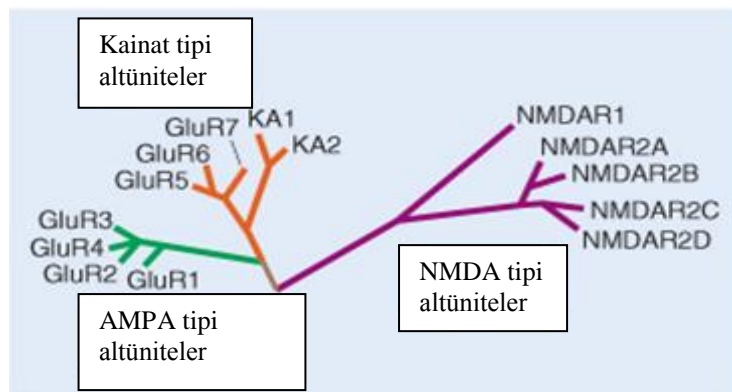




**Şekil 3.** İyonotropik glutamat reseptörleri (Boron ve Boulpaep, 2012).

- I. AMPA reseptörleri ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilosokzasole- 4-propionat için),
- II. NMDA (N-metil-D-aspartat için) ve
- III. Kainat (kainik asit) reseptörleri (Şekil 4), kainat deniz yosunlarından elde edilen bir asittir (Ganong, 2011).

İyonotrofik glutamat reseptörleri için AMPA reseptör alt birimleri, GluR1, 2, 3 ve 4; kainat reseptör alt birimleri, düşük affiniteli alt birimler GluR5, 6 ve 7 ve yüksek affiniteli alt birimler KA1 ve 2; NMDA reseptör alt birimleri ise NR1 ve NR2A, 2B, 2C ve 2D'dir (Şekil 4).



**Şekil 4.** İyonotrofik glutamat reseptörlerinin aile ağacı (Boron ve Boulpaep, 2012).

Farklı alt birimlerin çeşitli kombinasyonlarda bir araya toplanması sonucunda reseptör proteinler heterojen bir populasyonla farklı farmakolojik ve biyofiziksel özelliklerle karşımıza çıkmaktadır. Örneğin AMPA reseptörleri GluR 1-4 alt birimlerinin bir araya gelmesiyle

oluşmuştur ve GluR2 alt birimiyle kanallar  $Ca^{2+}$ ya tamamiyle geçirimsiz hale gelmektedir. NR1 altbirimi NMDA reseptör fonksiyonu için gereklidir, NR2A–D altbirimleri ise farklı ekspresyon profillerine sahiptirler ve reseptör hassasiyetini, kapılama kinetiğini,  $Ca^{2+}$  iletkenliğini ayarlarlar. Kainat reseptörleri GluR6 altbirimlerini kapsar ve CA3 piramidal hücrelerdeki mossy fiber sinapslarda, postsinaptik olarak lokalize oldukları düşünülmektedir. Kainat indüklü nöbetler bu GluR6 kapsayan reseptörlerin aktive edilmesiyle oluşmaktadır. Aksine GluR7'nin epileptogenezi azalttığı düşünülmektedir. Diğer yandan kainat reseptörleri GluR 5'i de içerirler ve GABAerjik ara nöronlar üzerindeki glutamerjik sinapslarda yerleşmişlerdir (Morimoto ve ark., 2004).

AMPA reseptörleri, glutamat sinapslarında daha hızlı eksitator postsinaptik potansiyellere (EPSP) aracılık ederlerken NMDA reseptörleri yavaş EPSP'lere ve hem kimyasal hem de elektriksel bağlı bir kanal aracılığıyla  $Ca^{2+}$ un hücre içine akışına aracılık ederler (Morimoto ve ark., 2004).

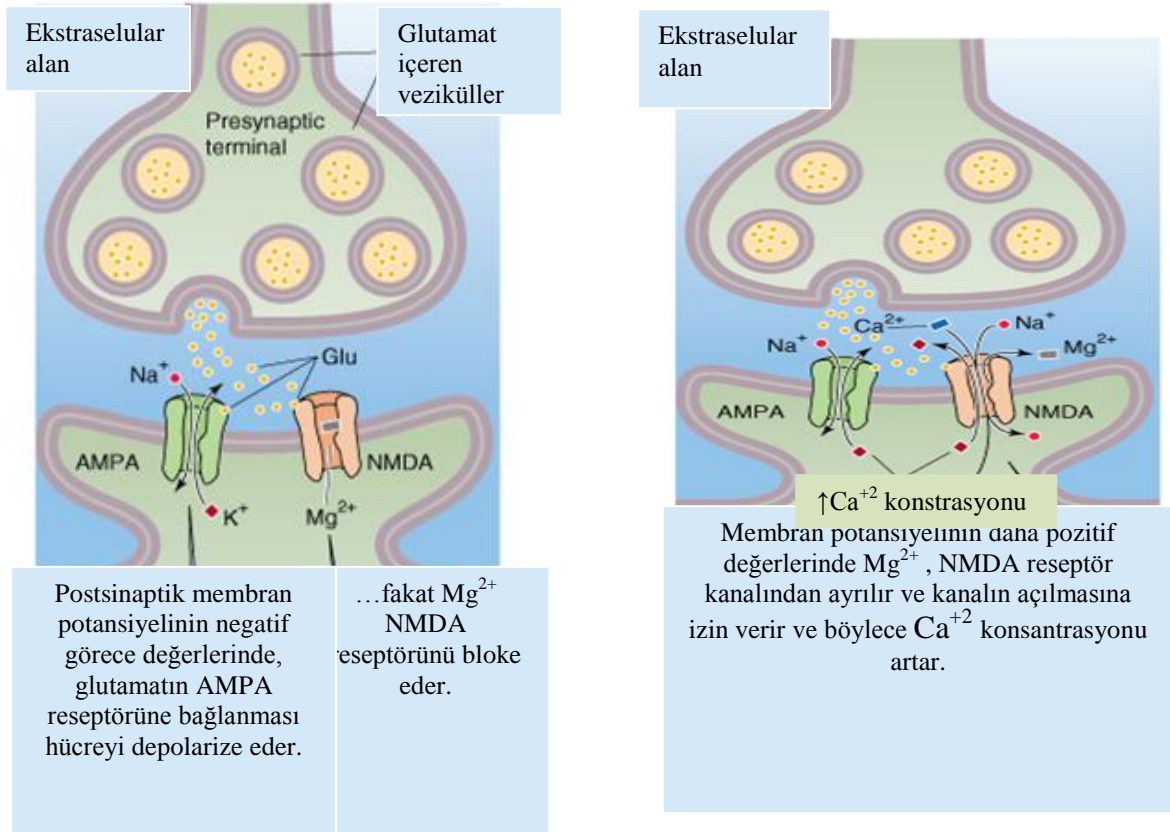
Her üç iyonotropik reseptör de glutamat tarafından aktive edilir fakat farmakolojileri farklıdır (Boron ve Boulpaep, 2012). Bu reseptörlerin aktivasyonu,  $K^+$  (potasyum) iyonlarının dışarı,  $Na^+$  (sodyum) iyonlarının içe doğru geçişine neden olur (Tablo 4, Şekil 5). Böylece sırayla aksiyon potansiyelinin aktivasyonu sağlanır (Cloix ve Hévor, 2009).

Kainat reseptörleri, açıldıkları zaman  $Na^+$ un içeri akışına ve  $K^+$ un dışarı akışına izin veren basit iyon kanallarıdır. AMPA reseptörlerinin iki grubu vardır; biri basit bir  $Na^+$  kanalıdır, diğeri ise  $Na^+$ un yanı sıra  $Ca^{2+}$ a da geçirgendir. Belli bir sinapsta iki grup arasındaki denge aktiviteye bağlı olarak değişir (Boron ve Boulpaep, 2012).

**Tablo 4.** İyonotropik glutamat reseptörleri (Boron ve Boulpaep, 2012).

Reseptör	Hız	Permeabilite
AMPA	Hızlı	$Na^+$ , $K^+$ (bazı durumlarda $Ca^{2+}$ )
NMDA	Yavaş	$Na^+$ , $K^+$ , $Ca^{2+}$
Kainat	Hızlı	$Na^+$ , $K^+$

Glutamatın veya iyonotropik glutamat reseptör agonistlerinin, beyin kesitlerinde ve hayvanlarda konvulzif ve nonkonvulzif nöbetlere neden olduğu bildirilmektedir. Üstelik epilepsili hastalardaki gibi epileptik hayvan modellerinde de glutamat ve aspartatın düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Bambal ve ark., 2011).

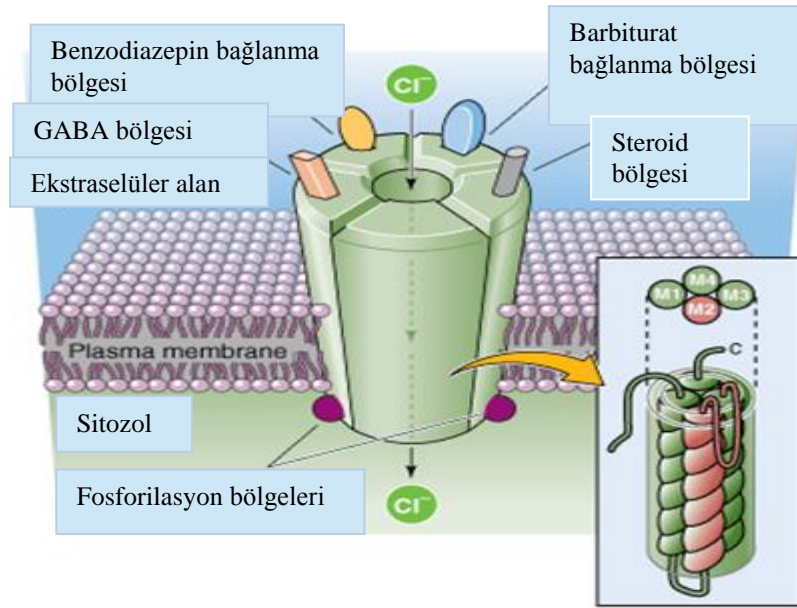


**Şekil 5.** AMPA ve NMDA reseptörleri (Solda sadece AMPA reseptör kanalı açık, sağda ise hem AMPA hem de NMDA reseptör kanalları açık durumdadır (Boron ve Boulpaep, 2012).

GABA'nın sentezi, taşınması ve almaçları yanı sıra iyon kanalları gibi, etkinliği için gerekli basamaklardaki herhangi bir bozukluk epilepsiye davetiye çıkarıyor gibi görünmektedir. Yapılan çok sayıda deneysel hayvan araştırması ve insanlardaki klinik çalışmalar GABA'nın işlevlerindeki bir yetersizliğin epilepsi nöbetlerini tetiklediğini göstermektedir. GABA'nın sentezini baskılayan ilaçlar epilepsi nöbetlerini artırırken, GABA benzeri etki gösterenler nöbetleri baskılar. Bazı epilepsi hastalarında GABA almaçlarını kodlayan genlerde mutasyon olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde bazı hastalarda iyon kanallarının yapısında bulunan proteinleri kodlayan genlerde de mutasyon olduğu görülmüştür. Bu mutasyonlar K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> ve Ca<sup>2+</sup> kanallarında bozukluğa neden olmaktadır. Tüm epilepsi hastalarında gösterilmemiş olmakla birlikte, kanal yapılarındaki bozukluğun epilepside önemli bir etken olabileceği düşünülmektedir. Ancak beyindeki baskılamanın gerçekleşmesinde önemli rolü olan GABA'nın tam işlevsel etkinliği için çok sayıda başka bileşiğin de (steroid yapılı bazı bileşikler gibi) devreye girmesi gerekmektedir. Dolayısıyla hastalığın mekanizması karmaşık ve tedavisi de o denli karmaşıktır (Coşkun, 2011).

GABA, SSS'de sinaptik inhibisyonun büyük bir bölümüne aracılık eder. Sinaptik inhibisyonun beyinde dikkatlice ayarlanması gerekmektedir. Aşırı inhibisyon bilinç kaybına ve komaya neden olurken çok az baskılama ise nöbete yol açmaktadır (Boron ve Boulpaep, 2012).

Üç tip GABA reseptörü tanımlanmıştır. GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>C</sub> reseptörleri iyonotropik, GABA<sub>B</sub> reseptörleri ise metabotropiktir. GABA<sub>A</sub> reseptörleri (Şekil 6) muskimol tarafından aktive ve bikukulin tarafından inhibe edilen ligand kapılı Cl<sup>-</sup> kanallarıdır. GABA<sub>A</sub> reseptörleri ile ilgili iyonotropik reseptörler başlıca beyin korteksi, hipokampus, bazal gangliyonlar, serebellum ve omurilikteki nöronlarda bulunur. GABA<sub>A</sub> reseptörleri, GABA ile aktive edildiklerinde inhibitör postsinaptik potansiyellerin (İPSP) ortaya çıkmasına yol açarlar. GABA<sub>A</sub> reseptörleri genelde nöronların dentrit ve hücre gövdesinde yerleşik olup Cl<sup>-</sup> 'un hücre içine geçişinde artışa ve bunun sonucunda postsinaptik bölgede hiperpolarizasyona yol açarak sinaptik inhibisyonun ortaya çıkmasına neden olurlar. İnhibe edici sinaptik akımın gücü doğrudan sinaptik GABA<sub>A</sub> reseptör sayısı ile ilişkilidir (Bora ve ark., 2008).



Şekil 6. GABA<sub>A</sub> reseptör kanalının yapı ve fizyolojisi (Boron ve Boulpaep, 2012).

GABA<sub>B</sub> reseptörleri ise G proteinine eşlenik reseptörlerdir. Baklofen tarafından aktivite ve saklofen tarafından inhibe edilirler. Daha çok soma ve akson terminallerinde bulunan GABA<sub>B</sub> reseptörleri, ikinci haberci mekanizmasını devreye sokan ve çoğunlukla K<sup>+</sup> kanallarını aktive eden metabotrop reseptörler olarak çalışırlar (Bora ve ark., 2008) ya da Ca<sup>+2</sup> kanallarını baskılayarak çalışırlar (Boron ve Boulpaep, 2012). GABA<sub>B</sub> reseptörlerinin epilepsi ve nöbetlerdeki rolü net değildir. Bu reseptörler primer jeneralize epilepsiler ile

ilişkilendirilmiştir ancak fokal epilepsilerdeki rolleri tartışmalıdır. GABA<sub>B</sub> reseptörlerinin blokajı, *in vivoda* odyojenik nöbetlere duyarlı sıçanlarda nöbetlerin oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte GABA<sub>B</sub> agonisti baklofenin prokonvulzan özelliği de gösterilmiştir (Bambal ve ark., 2011).

GABA<sub>C</sub> reseptörleri, GABA<sub>A</sub> reseptörleri gibi ligand kapılı Cl<sup>-</sup> kanallarıdır. En çok retinada bulunmasına karşın superior kollikulus, hipofiz, serebellum ve omurilikte de gösterilmiştir. Bu reseptörler iki  $\alpha$ , iki  $\beta$  ve iki  $\gamma$  alt ünitesinden oluşmaktadır. GABA bu alt ünitelerden herhangi birine bağlanır (Bora ve ark., 2008). Fakat GABA<sub>C</sub> reseptörlerine beyinde nadiren rastlanır (Boron ve Boulpaep, 2012).

Temporal lob yapıları, (özellikle hipokampus, amigdala ve piriform korteks) nöbet oluşturan veya epileptogenezi tetikleyen hasara en duyarlı olan beyin yapılarıdır. Hipokampus medial septal alandan yoğun kolinerjik innervasyon almaktadır. Hipokampal dilimlerde de muskarinik ACh reseptörlerinin aktivasyonunun senkronize nöronal boşalım paterni oluşturduğu gösterilmiştir. Nikotinik ACh reseptör aktivasyonunun, hem eksitator hem de inhibitör modülatörleri etkileyebileceği öne sürülmektedir. Nörokimyasal deliller presinaptik ACh reseptörlerinin aktivasyonunun ACh, GABA ve glutamat gibi nörotransmitterlerin salınımını arttıracaklarını göstermektedir (Bambal ve ark., 2011).

## 2.6. Hayvan Denepleri

Epilepsi hastalığının temelinde yatan mekanizmaların anlaşılması ve yeni antiepileptik ilaçların keşfi için deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Çünkü intakt insan beyninde hücre içi kayıtlar, mikrokimyasal analizler ve anatomik iz sürme işlemlerini yapmak, en azından tıbbi etik açıdan mümkün değildir (Marangoz, 1997). Bu nedenle epileptogenezin hayvan modelleri bilimsel ilerleme bakımından vazgeçilmezdir (Bora ve ark., 2008).

Epilepsinin hayvan modelleri hastalık durumunun nörobiyolojisini anlamak ve yeni antiepileptik moleküllerin keşfi için kullanılmaktadır. Kemirgenler, bu hayvan modellerini geliştirmek için sıklıkla kullanılırlar. En yaygın olarak kullanılan nöbet modelleri, kimyasal konvulzan maddelerin (örn., pentilentetrazol, pikrotoksin, bikukulin, kainik asit) uygulanması ile belli beyin bölgelerinin eşik değerlerinde elektriksel olarak stimülasyonun sağlanması ile oluşturulabilir. Bu indüklenmiş nöbetler, hem davranışsal hem de elektrografiksel olarak tanımlanabilir (Dhir, 2012).

## 2.7. Deneysel Epilepsi Modelleri

Değişik hayvan modelleri sayesinde insanlarda görülen farklı epilepsi biçimleri oluşturulur (Tablo 5). Örneğin PTZ ile uyarılmış konvulziyonlar, petit mal ya da absans nöbetleri taklit ederken, maksimal elektroşok (MES) ile uyarılmış nöbetler insan Grand mal (tonik-klonik nöbetler) epilepsisini ortaya koymaktadır (Tablo 5). Bu hayvan modellerinde ölçülen parametreler, bu modellerin, farklı evrelerde konvulziyonları ve farklı nöbet sürelerini ortaya çıkardığını göstermektedir (Dhir, 2012). Bu evrelerin eşik değerlerini değiştiren moleküller (bunların antiepileptik olduğu düşünülmektedir), 1993'ten bu yana tanıtılan ikinci jenerasyon tüm antiepileptik ilaçların (AEİ) geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve epilepsi hastalarında nöbetin kontrolüne katkı sağlamaktadırlar (White, 2003).

**Tablo 5.** Deneysel epilepsi modelleri (Marangoz, 1997).

Basit parsiyel (akut) Topikal konvulzanlar (penisilin, bikukulin vb) Akut elektriksel uyarı GABA kesilmesi Neokorteks dilimleri
Basit parsiyel (kronik) Kortekse metal verilmesi (Alüminyum hidroksit, kobalt, çinko, demir vb.) Kriyojenik hasar Gangliosit antikor verilmesi Sistemik fokal epileptogenez
Jeneralize tonik-klonik Genetik (ışığa duyarlı babunlar, farede sesle oluşan nöbetler, paytak ve El fareler, Sıçan, gerbil ve drozofila) Maksimal elektrik şoku Kimyasal konvulzanlar (Pentilentetrazol, penisilin vb.) Metabolik düzensizlik (Hipoksi, hiperglisemi, hiperbarik oksijen, hiperkarbi, üremi, yüksek temperatür, ilaç kesilmesi)
Kompleks parsiyel Kainik asit, tetanos toksini, Fırtınalar alanına enjeksiyon Tutuşma Beyin dilimleri
Jeneralize absans Talamusun uyarılması Bilateral odak Sistemik penisilin $\gamma$ -hidroksi-butirat İ.v. opiat vb.
Status epileptikus Lityum-pilokarpin Kobalt-hemosistein Rekurrent uyarılma

Deneysel epilepsi modelleri kabaca iki grupta toplanabilir; akut modeller ve kronik modeller (Şekil 6). Akut modeller tepkisel epileptik nöbet modelleridir. Konvulzan maddelerin sistemik ya da topikal uygulanmasıyla veya elektriksel uyarım gibi ani biçimde gelişen nöbetlerden oluşur. Akut modeller, epileptik nöbet gelişimi, sürdürülmesi ve bitişi hakkında, ayrıca nöbet sonrası bozukluklar hakkında bilgi edinmek istenildiğinde tercih edilen epilepsi modelleridir. Akut modellerin dezavantajları şunlardır: nöbetler normal, sağlıklı beynin yapay olarak uyarımıyla oluşturulduğu için spontan nöbet oluşum mekanizmaları (iktogenez) veya nöbetler arası epileptojenik anomalileri (interiktal) araştırmak için uygun değildirler.

Kronik modeller ise nöbetler arası epileptojenik anomalilerin sürekli incelenebilmesine ve epilepsinin tanımlanmasına olanak sağlayan modellerdir. Kronik modeller epilepsi gelişimi (epileptogenez), interiktal dönemdeki nöronal düzensizlikler ve spontan iktogenez hakkında araştırmacıya fikir sunan modellerdir (Engel, 2013). Deneysel epilepsi modeli geliştirmek amacıyla kullanılan çeşitli kimyasallar tablo 6’da listelenmiştir.

**Tablo 6.** Deneysel epilepsi modeli geliştirmek amacıyla kullanılan çeşitli kimyasallar (Bambal ve ark., 2011).

Lokal konvulzanlar		Sistemik konvulzanlar	
Kimyasallar	Nöbet modeli	Kimyasallar	Nöbet modeli
Penisilin	Basit parsiyel akut	Kainik Asit	Kompleks parsiyel
Tetanus toksini	Kompleks parsiyel kronik	Bikukulin	Jeneralize Klonik/tonik
Striknin	Basit parsiyel akut	Bemegrid	Jeneralize Klonik/tonik
Alümin	Basit parsiyel akut	Isoniazid	Jeneralize Klonik/tonik
Kobalt	Basit parsiyel akut	Methionine	Jeneralize Klonik/tonik
Tungstik asit	Basit parsiyel akut	Sulfoksimin	Jeneralize Klonik/tonik
Demir	Basit parsiyel akut	Pentilentetrazol	Jeneralize Klonik/tonik
		Pikrotoksin	Jeneralize Klonik/tonik
		Flurotil	Jeneralize Klonik/tonik

Deneysel epilepsinin hayvan modelleri üç gruba ayrılmaktadır:

- I. Konvulzan kimyasal maddeler veya elektrik akımıyla oluşturulanlar
- II. Refleks epilepsi modelleri
- III. İdiopatik modeller

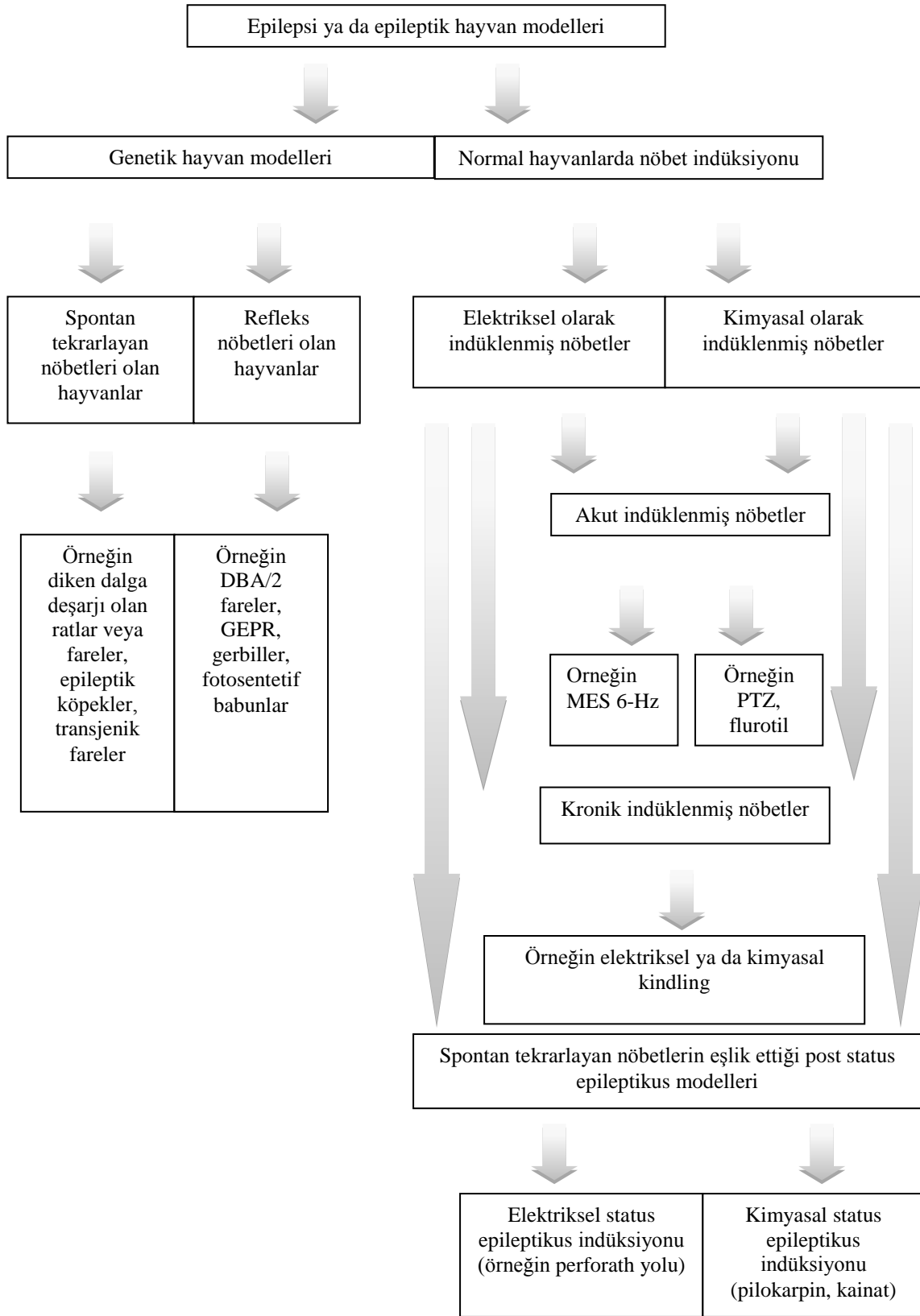
Model seçimi çalışmanın amacına göre yapılmaktadır. Genellikle deneysel epilepsi çalışmaları üç amaçla yapılır;

- I. İlaç geliştirme
- II. Mekanizmayı aydınlatma
- III. Temel olaylar arasındaki ilişkileri ve olayların gelişimini belirleme (Marangoz, 1997).

Tüm kriterleri karşılayacak tek bir model maalesef bulunmamaktadır. İdeal bir epilepsi modeli şu özelliklere sahip olmalıdır;

- Spontan olarak tekrarlayan nöbetleri olmalı
- Nöbetler insan epilepsisindekine benzemeli
- Modeldeki EEG'nin biçimi, ilgili epilepsi çeşidindekine benzemeli
- Nöbetlerin frekansı ilaçların etkisini akut veya kronik olarak test etmeye yetecek ölçüde olmalı
- Antiepileptik ilaçların farmakokinetiği insandakine benzer olmalı
- Antiepileptiklerin etkili oldukları plazma ve beyin seviyeleri insanda ilgili nöbeti önleyen seviye kadar olmalıdır. (Marangoz, 1997).





**Şekil 7.** Epilepsiye ve epileptik nöbetlere genel bir bakış (Löscher, 2011).

Tablo 7’de günümüzde yeni antiepileptik ilaç keşfi için rutin olarak kullanılmakta olan üç *in vivo* model bulunmaktadır (White, 2003).

Tablo 7. Erken dönemde antiepileptik ilaç keşfi modelleri (White, 2003).

I. Uyandırılmış nöbet modelleri
a. Elektriksel (örn., MES)
b. Kimyasal (örn., PTZ)
II. Fokal nöbetler
a. Elektriksel kindling (korneal, amigdala ve hipokampal)

Yeni antiepileptik ilaçların araştırılmasında daha çok konvulzan kimyasal maddeler veya elektrik akımıyla oluşturulan modeller kullanılmaktadır (Bambal ve ark., 2011). Fakat bu modeller içinde akut MES ve PTZ testleri epilepsi modeli olmaktan ziyade akut nöbet modelleri oldukları için bu testlerle keşfedilen AEİ’lerin hiçbirinin epilepsiyi önleme ya da modifiye etme yeteneğinde olmaması şaşırtıcı değildir. Kronik modeller incelendiğinde sayısız epilepsi ve epileptik nöbet modeli olduğu görülmektedir. Fakat sadece birkaç kronik epilepsi modeli (Tablo 7 ve Tablo 8) günümüzde farmakolojik epilepsi veya epileptik nöbet çalışmalarında kullanılmaktadır (Löscher 2002).

**Tablo 8.** Kronik epilepsi modelleri (Löscher 2002).

Sonradan kazanılan (semptomatik epilepsi modelleri)	
Epilepsinin elektriksel olarak indüklenmesiyle	Kindling Post status modelleri, elektriksel olarak indüklenmiş status epileptikustan sonra gelişen epilepsi
Epilepsinin kimyasal olarak indüklenmesiyle	Kimyasal olarak indüklenmiş status epileptikustan (örn., pilokarpin ve kainat epilepsi modelleri) sonra gelişen epilepsi
Genetik (idiyopatik) epilepsi modelleri	
Farklı hayvan türlerindeki spontan mutasyonlar	Refleks epilepsili mutant hayvanlar Spontan tekrarlayan nöbetleri olan mutant hayvanlar.
Farede uyarılmış mutasyonlar	Transjenik veya knock-out fareler

Epilepsi ve nöbet için oluşturulan hayvan modelleri epileptogenezin altında yatan temel mekanizmaları kavrayışımızı ilerleten temel bir rol oynamasının yanı sıra bu modeller, yeni antiepileptik ilaçların geliştirilmesi ve keşfinde de faydalıdırlar (Löscher, 2011). Yeni antiepileptik ilaçların gelişimi ve keşfinde nöbet ve epilepsinin hayvan modelleri çeşitli amaçlara hizmet etmektedir;

- Yeni AEİ'lerin keşfi
- Yeni AEİ'lerin antikonvulzan aktivitelerinin spektrumunun tanımlanması
- İlaça dirençli nöbetler için spesifik modeller
- Yeni AEİ'lerin etkinliğinin kronik tedavi sürecinde değişip değişmediğinin değerlendirilmesi
- Yeni AEİ'lerin olumsuz etkilerinin epileptik ve epileptik olmayan hayvanlarda karşılaştırılması
- İlk klinik araştırmalar için yeni AEİ'lerin etkin plazma konsantrasyonlarının yorumlanması
- Antiepileptojenik veya hastalığı hafifleten tedavilerin keşfi (Löscher, 2011).

Bu amaçla yapılan çalışmalarda en az üç önemli hedef bulunmaktadır;

- I. Epilepsiye yol açan süreçlerin temelinde yatan mekanizmaları daha iyi anlamak, bu sayede epilepsi için risk grubunda olan hastaları koruyucu tedaviler oluşturmak.
- II. İlaça karşı direncin biyolojik mekanizmasını kavrayışımızı geliştirmek ve bu sayede dirence karşı korunma sağlayan ya da süreci tersine çeviren ilaçlar geliştirmek.
- III. Epilepsinin ilerlemesini engelleyici, hastalığı hafifletici tedaviler geliştirmek.

Yukarıda açıklanan bütün bu amaçlara ulaşmak için, epilepsinin hayvan modelleri en önemli ön koşuldur (Löscher, 2002).

## **2.8. Kindling (Tutuşma) Modeli**

Kindling elektriksel ya da kimyasal subkonvulzif uyarıların tekrar tekrar uygulanmasıyla, konvulziyon aktivitesinde progresif yoğunlaşma ile sonuçlanan bir fenomendir. Kindling deneysel bir epilepsi modeli olmasının yanı sıra beynin “patolojik bir

plastisite” modeli olarak da tanımlanmaktadır (Pavlova ve ark., 2004). Kindling, tekrarlayan fokal nöbet deşarjlarının uyarılması sonucu, uyarıcı ajana (genellikle elektrik stimülasyonu) karşı verilen epileptik yanıtta ilerleyen, büyük ölçüde güvenilir, daimi artış oluşturan basit bir fenomendir (Morimoto ve ark., 2004). Deney hayvanında uyarıcı, jeneralize konvulziyon oluşturuyor ise kindling tamamlanmış ve bundan sonra bu anormal uyarılabilir durum kalıcı hale gelmiş demektir (Erdoğan ve ark., 2006). Kindling modeli psikomotor epilepsiye benzer. Beyinde büyük bir nöron topluluğu birlikte ve anormal biçimde deşarj yapmaya başlayınca epileptik nöbetler görülür (Marangoz, 1997).

Kindling, elektriksel veya kimyasal olarak uyarılabilir; elektriksel kindling kompleks parsiyel epilepsi modeli olarak kabul edilirken, kimyasal kindling ise primer jeneralize epilepsi modeli olarak kabul edilmektedir (Shandra ve Godlevsky, 2005). Örneğin, PTZ ile uyarılmış konvulziyonlar petit mal veya absans nöbetleri taklit ederken MES ile indüklenmiş nöbetler, insan Grand mal tipi epilepsiyi (tonik, klonik nöbetler) betimler (Dhir, 2012).

Kindling modeli, Goddard tarafından 1967’de (Goddard, 1967) keşfedildiğinden bu yana TLE’nin kronik bir hayvan modeli olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Goddard, ratlarda yaptığı çalışmada beyinde farklı subkortikal bölgelere bipolar elektrotları implante ederek, değişken akım şiddetleri ile bu bölgeleri stimüle etti. Goddard başta yaptığı subkonvulzif uyarımlara yanıt olarak herhangi bir davranışsal ya da elektrografiksel yanıt alamazken bu subkonvulzif dozları tekrar tekrar ratlara uygulandığında en sonunda belirli uyarımlardan sonra tam gelişmiş konvulziyonlar oluştuğunu buldu. Ayrıca, kindlingin beyinde oluşturduğu kalıcı değişiklikler sayesinde, bir defa tutuşma aşamasına gelmiş hayvanlara, aylarca subkonvulzif uyarı vermeden beklendikten sonra bile, tekrar subkonvulzif uyarım sonucu hayvanların hala tutuşma gösterebildiklerini tespit etti. Goddard beyindeki bu tür progresif değişiklikler için ‘kindling’ (tutuşma) deyimini üretti. Yine Goddard elektriksel uyarımlara değişik beyin bölgelerinin değişik yanıtlar ürettiğini de (amigdala gibi bazı bölgelerin diğerlerine göre uyarıma çok daha hassas olduğunu) gösterdi (Dhir, 2012).

Birkaç istisna hariç, kindling hala genellikle, diğer birçok epilepsi modelinde de görüldüğü üzere büyük morfolojik hasar yokluğunda nöronal yanıtta değişimin geliştiğı bir fonksiyonel epilepsi modeli olarak kabul edilmektedir. Epilepsi mekanizmalarının araştırılmasına, uygulanmasına ek olarak, kindling antiepileptik ilaçların prelinik değerlendirilmesi için de kullanılmaktadır (Morimoto ve ark., 2004).

Kindlingin erken aşamalarında tek davranışsal yanıt uyandırılmış iktal deşarj süresince bir donma yanıtıdır. Tekrarlanan aktivasyonla, nöbet yanıtı jeneralize hale gelir ve bilateral klonik nöbete dönüşür (tipik olarak aşama 5 diye adlandırılır). Kindling gidişatında nöbet eşiği de tipik olarak azaltılır. Bir defa jeneralize kindling nöbetleri oluşturuldu mu (aşama 5 nöbetler), bu değişimler aylar, yıllarca devam eder (Morimoto ve ark., 2004).

Kimyasal kindling belli kimyasal konvulzan maddelerin sistemik olarak uygulanmasını gerektirir. Farklı konvulzan maddeler; örn GABA<sub>A</sub> reseptor antagonistleri (PTZ, pikrotoksin ve bikukulin), N-metil-D-aspartat, ve kokain, kemirgenlerde kimyasal kindling oluşturmak için kullanılabilir. Bu modeller arasında; PTZ-kindling, yeni antiepileptik moleküllerin etkilerini çalışmak için en yaygın biçimde kabul edilen hayvan modelidir (Dhir, 2012).

Kindling modelinin avantajları ve dezavantajları şunlardır;

- Kindling modeli hem epileptojenik hem de spontan nöbet modeli oluşturması bakımından avantaj sağlar (Ali ve ark., 2005).
- Stimulasyonun zamanı, yeri ve süresi ayarlanabilir. Bu sayede potansiyel tedaviler ayarlanabilir (Bertram ve Williamson, 2005).
- Bu yöntemle nöbeti başlatmak kolaydır, antiepileptik ilaçların klinik etkilerini belirlemede öngörüsü yüksektir (Löscher, 2002).

Epilepsinin MES kindling modelinde avantajlar nettir;

- Antiepileptik ilaç geliştirme ve keşfetme amaçlı çalışmalar için uygun bir modeldir (Löscher, 2011).
- Hedeflenen beyin bölgesinin tam aktivasyonu mümkündür.
- Kronik epileptogenez gelişimi güvenilir biçimde izlenebilir.
- Nöbet şablonunun yayılması ve jeneralize hale gelmesi kolayca izlenebilir.
- Nöbetler arasındaki dönem, iktal ve postiktal dönemleri kolayca ayarlanabilir (Morimoto ve ark., 2004).

Kimyasal kindling modelinin avantajları;

- Kimyasal kindling elektriksele göre daha kolaydır ve daha az zaman alır.
- Beyin cerrahisi gerektirmez (Dhir, 2012).

- Elektrotların beyne implante edilmesini gerektirmez.
- Laboratuvar donanımını oluşturmak kolaydır.
- Kindling protokolü, laboratuvarlar ve türler arasında kolaylıkla tekrarlanabilir bir protokoldür.
- Mortalite oranı düşüktür hayvanların büyük bir bölümü jeneralize motor nöbetleri sürdürürler (Pitkanen ve ark., 2005).
- PTZ kindling de elektriksel kindling gibi kompleks parsiyel epilepsi hastalığının bir modelidir (Ali ve ark., 2005).

### **2.8.1. Elektriksel kindling modeli**

Maksimal elektroşok testi 60 yıl önce Toman ve arkadaşlarınca geliştirildi. Grand mal tipi jeneralize tonik klonik nöbetlere karşı etkin ilaçları öngörmeye muhtemelen en iyi doğrulanmış klinik öncesi testtir. Bu test bir maddenin, nöral dokuya nöbet yayılımını engelleme yeteneğinin değerlendirilmesine olanak sağlar (Castel-Branco ve ark., 2009).

Kindling, amigdala veya hipokampus gibi limbik beyin bölgelerine tekrar tekrar kısa elektriksel stimülasyonlar sonucunda oluşan elektro grafik ve davranışsal nöbet aktivitesinde ilerleyici bir artıştır. Bu nöbetlerin, farmakolojisi ve kompleks parsiyel ve ikincil jeneralize klinik fenomolojisi TLE'nin klinik durumuna oldukça benzerdir bu nedenle yaygın bir biçimde TLE modeli olarak kullanılmaktadır (Löscher, 2002).

### **2.8.2. PTZ kindling modeli (kimyasal kindling modeli)**

PTZ, bir GABA<sub>A</sub> reseptör antagonistidir (Park ve ark., 2006). PTZ, GABA<sub>A</sub> reseptörünün klorid iyonofor kompleksinin seçici bir engelleyicisidir. Hipokampusun da dahil olduğu birçok beyin bölgesinde GABA<sub>A</sub>erjik ve glutamerjik sistemleri etkiler (Patsoukis ve ark., 2004).

PTZ kindling, nöbet oluşum mekanizmasını ve nöbetlerin nörodavranışsal ve nörofizyolojik sonuçlarını araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Shandra ve Godlevsky, 2005). Sıçanlarda PTZ uygulanması, beyin uyarılabilirliği çalışmalarına (Klioueva ve ark., 2001) uygun olmasının yanı sıra antiepileptik ilaç geliştirmek için de yaygın olarak kullanılan davranışçı yaklaşımlardan biridir (Löscher, 2002). PTZ kindling, insan absans epilepsi ve jeneralize tonik klonik (birinci jeneralize ) nöbet modellerini oluşturur (Wu ve ark., 2006).

Kindling, beyinde nörokimyasal ve uzun dönem yapısal değişimleri araştırmak için kullanılan en önemli epilepsi modellerinden biri haline gelmiştir (Akdoğan ve Yonguç, 2011). PTZ kindling, TLE'nin bir kronik hayvan modeli (Morimoto ve ark., 2004), ilaca karşı dirençli epilepsi modeli (Ali ve ark., 2005) ve kompleks parsiyel epilepsinin çok önemli bir modeli olarak karşımıza çıkmaktadır (Marangoz, 1997).

Standart PTZ kindling modeli, davranışsal ve elektrofizyolojik deneyler yapılacaksa elektrotların implantını gerektirirken; davranışsal ve moleküler deneyler yapılacaksa elektrot implantını gerektirmemektedir (Davoudi ve ark., 2013).

PTZ hem akut hem de kronik (kindling) epilepsi hayvan modeli geliştirmek için kullanılabilir. Örneğin, kemirgenlerde PTZ'nin eşik dozda (60-100 mg/kg, i.p. veya s.c.) akut enjeksiyonu ile miyoklonik jerkler, çırpınma, tonik ekstensiyon ortaya çıkar. Ancak, PTZ'nin eşik altı dozlarda (20 - 40 mg/kg, i.p.) tekrar tekrar uygulanması kindling fenomenini oluşturabilir (Dhir, 2012).

TLE'li hastaların hipokampal nöronlarında siklin B1 ekspresyonu tanımlandığından bu yana, PTZ kindlingin nöbet indüklü nöronal ölüm mekanizmalarını çalışmak için uygun bir model olduğu önerilmektedir (Pavlova ve ark., 2006). PTZ ile indüklenen kimyasal kindling, primer jeneralize epilepsi modelini oluşturur (Rossi, 1996).

PTZ kindling modeli ile tutuşma gerçekleşikten sonra;

- Duygusal davranışlarda değişim
- Bilişsel düzensizlikler ve
- Hipokampusta nöronal kayıp gösterilmiştir (Pavlova ve ark., 2006).

### **2.8.2.1. PTZ'nin etki mekanizması**

PTZ indüklü kindlingde çeşitli davranışsal, nörofizyolojik ve nörokimyasal değişiklikler oluşur (Schröder ve ark., 1998). PTZ uygulaması ratlarda hipokampal atrofiye yol açmaktadır. PTZ uygulanmış ratlarda hipokampusta seçici nöronal kayıp ve astositozis görülür. Ayrıca PTZ uygulanmış ratlar üzerine yapılan manyetik rezonans görüntüleme (MRI) çalışmalarında, serebellum hacminde azalma görülmektedir (Akdoğan ve Yonguç, 2011).

PTZ'nin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, GABA<sub>A</sub>erjik sistemde, Glutamerjik sistemde ve antioksidan savunma sisteminde değişikler oluşturduğu literatürde bildirilmektedir:

PTZ'nin, GABA<sub>A</sub> reseptörlerini bloke ederek etkisini gösterdiği ileri sürölmektedir. PTZ tarafından üretilen kindlingin, beyinde GABA<sub>A</sub>erjik sistemin inhibitör fonksiyonunda kalıcı bir azalmayla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Corda, 1991). Tekrarlanan tek doz uygulamaları, GABA<sub>A</sub>erjik aktivitenin azalmasına neden olur (Corda, 1992). PTZ'nin, GABA tarafından aktive edilen kanalları inhibe ederek (Macdonald ve Barker, 1978) özellikle GABA<sub>A</sub> kapılı klorid reseptörlerini bloke ederek etkinliğini gösterdiği düşünölmektedir (Corda, 1992; Luthman ve Humpel, 1997). Böylece PTZ uygulanması, GABA ve diğer bazı inhibitör nörotransmitterlerin etkisini inhibe ederek, nöronların depolarizasyonunu kolaylaştırmaktadır (Velisek ve ark., 1990).

GABA<sub>A</sub> reseptörleri çeşitli allosterik bağlanma sitelerine sahiptir. Çeşitli ilaçlar bu bağlanma siteleri üzerinden GABA aracılı Cl<sup>-</sup> akımını ayarlayabilirler. PTZ, bir merkezi sinir sistemi konvulzanıdır ve pikrotoksinin (PTX), GABA<sub>A</sub> reseptörüne bağlandığı siteye bağlanarak etkinliğini gerçekleştirmektedir (Huang ve ark.,2001). Ayrıca PTZ ile tutuşma sağlanmış ratlarda, PTX gibi GABA<sub>A</sub>erjik nörotransmisyon inhibitörlerinin konvulzan etkilerine karşı hassasiyette uzun süreli bir artış görölmektedir (Corda, 1991).

PTZ kindling yöntemiyle yapılan öğrenme ve bellekle ilgili bir çalışmada GABA<sub>B</sub> reseptör mekanizmasının da kindlingte değiştiğine dair bulgular mevcuttur (Getova, 1998). Ayrıca, GABA taşıyıcı seviyelerinin, nöbet duyarlılığında ve epileptogenezde bir belirleyici olabileceği bildirilmektedir (Doi ve ark., 2009).

PTZ beyinin birçok bölümünde, farklı glutamat reseptör alt tiplerinin yoğunluk ve duyarlılığında da artış meydana getirmektedir (Schröder ve ark., 1998):

- PTZ kindlingte, (metabotropik) glutamat reseptör yoğunluğunda ve IP3 oluşumunda artış olduğu bildirilmektedir (Schröder ve ark., 1998b).

- Ayrıca epileptojenik mekanizmada, iyonotropik glutamat reseptörlerinden AMPA'da rol oynuyor gibi görünmektedir. Konuyla ilgili bir çalışmada PTZ kindling fenomeninin sürdürölmesi bakımından korteks ve bazal gangliyonlarda AMPA reseptörlerinin rol oynadığı bildirilmektedir (Economou ve ark, 2001). Farede PTZ kindlingin hipokampal



CA3 alanında ve temporal kortekste AMPA reseptör bağlanmasında geçici bir artış, hipokampal CA1 ve dentate girusta AMPA reseptör alt birimlerinden GluR2 ve GluR3 için mRNA ekspresyonunda geçici bir azalma bildirilmektedir (Morimoto ve ark., 2004).

- NMDA'nın da kindling epileptogenezde rol oynadığı bildirilmektedir (Zhu ve ark., 2004). Ratlarda PTZ indüklü tutuşmaya bağlı nöbet gelişiminde, NMDA reseptörlerinin sentez esnasında altbirim ve bölge ilişkili değişikliğe uğraması, PTZ indüklü nöronal hiperaktivitenin yayılışı ve nöbetin gelişmesinden de bu değişikliklerin sorumlu olabileceğini akla getirmektedir (Zhu ve ark., 2004).

- Ayrıca PTZ, hipokampal alanlarda glutamat nörotransmitteri yoğunluğunda da artış meydana getirir (Li ve ark., 2004). Kindling sürecinde glutamat taşıyıcılarının moleküler ekspresyonundaki değişikliğin, epileptogenezin gelişiminde ve nöbet duyarlılığında önemli olabileceği bildirilmektedir (Doi ve ark., 2009).

Kindling tarafından uyarılan uzun dönem neokortikal plastisite; nöronal inhibisyon ve eksitasyondaki hassas dengede değişim (inhibisyonda göreceli bir azalma ve eksitasyonda göreceli bir artış veya bu ikisinin bir kombinasyonu nedeniyle) ile üretilebilir (Getova ve ark., 1998). Kindling gelişiminde önemli bir kriter olarak GABA<sub>A</sub> aracılı inhibisyonunun çöküşü ile birlikte, NMDA reseptör kompleksinin aktivasyon gelişimi gösterilmektedir (Morimoto, 1990). Kindlingle ilişkili olarak hipokampusta GABA salınımında artış, GABA reseptör duyarlılığında azalmaya yol açar. Glutamat reseptör aktivasyonu ve inhibitör GABA nörotransmitterinin inhibisyonu nedeniyle PTZ indüklü nöbet başlar ve jeneralize hale gelir (Erakovic ve ark., 2001).

Birçok epilepsi modelinde oksidatif stres etkin bir rol oynar. PTZ uygulamasıyla oksidatif stres arasında güçlü bir korelasyon olduğu bildirilmektedir (Patsoukis ve ark., 2004). PTZ kindlingin beynin anti oksidatif savunma sisteminde değişimlere yol açtığı bildirilmektedir (Dhir A., 2012).

Oksidatif strese bağlı olarak, hücrel proteinler, membran lipitleri, DNA ve RNA'da anormal yapı değişiklikleri meydana gelir. Beyindeki oksidatif stres, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi daha kronik hastalıklar da dahil olmak üzere, birçok akut nörolojik bozukluğun yaygın nedeni olarak kabul edilmektedir (İlhan ve ark., 2006).

## 2.9. Epilepsi ve Apoptoz

Apoptoz gelişen beyinde aslında normal bir süreçtir; optimum gelişme için ilk nöronların % 50'sinden daha fazlasının apoptoza yani programlı hücre ölümüne uğraması gerekmektedir (Naseer ve ark., 2009).

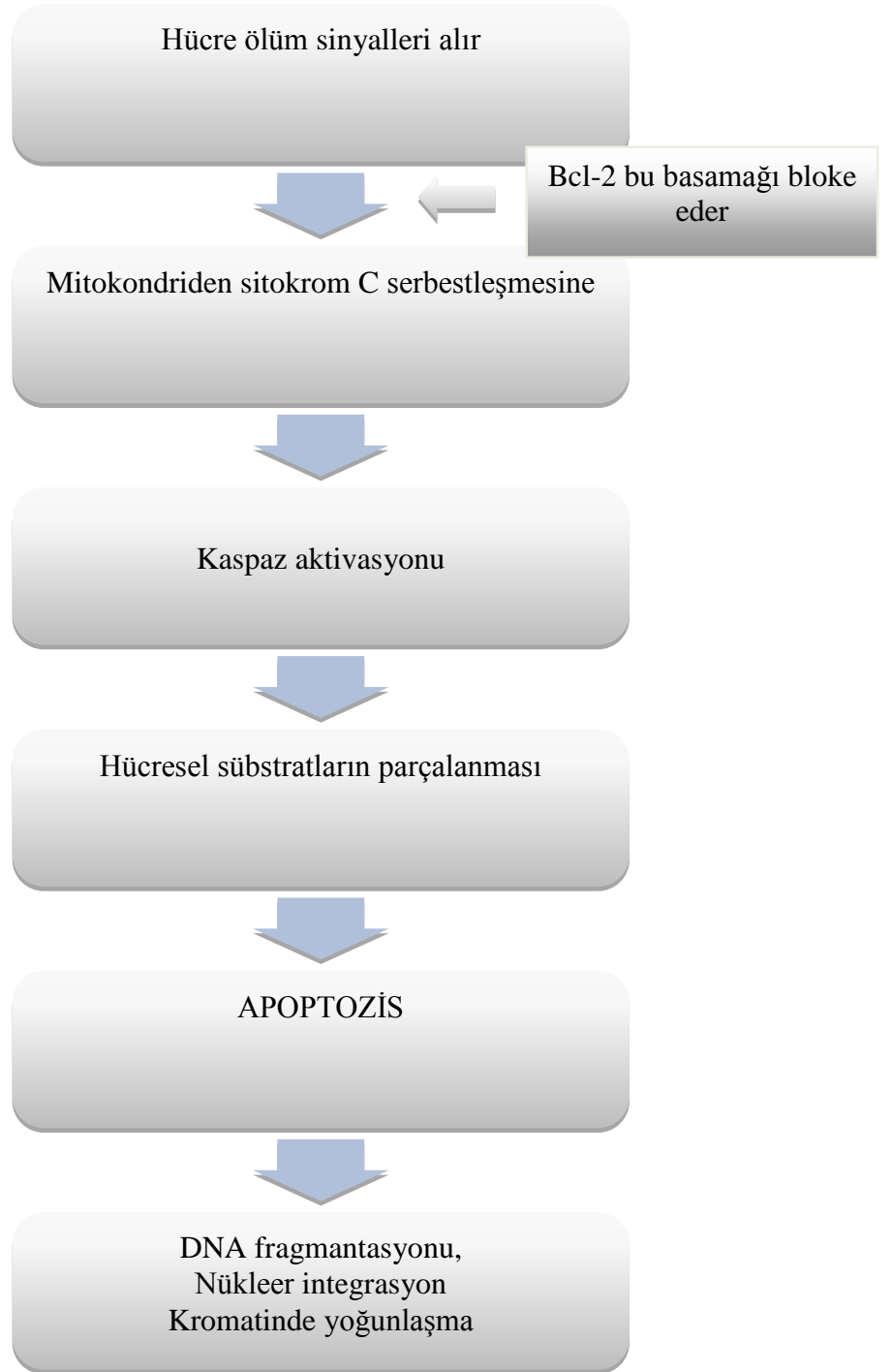
Apoptoz, Yunanca yaprak dökümü demektir. Apoptoz normal embriyonik gelişimde ve yetişkin organizmalarda, farklılaşmış dokuların homeostazisini sürdürmede çok önemli bir role sahiptir. Apoptoz sürecinin tamamlanması, ilgili hücrelerde spesifik morfolojik ve biyokimyasal değişimlere eşlik eder. Apoptozdaki çeşitli bozuklukların altında çeşitli nörodejeneratif hastalıklar bulunur. Nörotropik faktörlerde eksiklik nöronların apoptozuna yol açmaktadır. Hayatta kalan spesifik nöron popülasyonları nörotropik faktörler ve kombinasyonlarıyla kontrol edilir (Chelyshev ve ark., 2001).

Apoptoz, sitoplazma yoğunlaşması, nükleusta büzüşme (piknoz) ve sonrasında (karyoreksiz) nükleusta parçalanmayla birlikte kromatin taneciklerinin hücre sitoplazmasında dağılmasına neden olur. Apoptozun son aşamasında hücre parçalanırken aynı anda apoptotik cisimler (örneğin bir membranla çevrili kromatin parçaları) oluşur. Apoptoza uğrayan hücreler ve apoptotik cisimler makrofajlar ve granülositlerce fagosite edilirler buna karşın lokal inflamasyon gerçekleşmez (Chelyshev ve ark., 2001).

Bcl-2 protein ailesi, apoptozun en önemli biyolojik düzenleyicilerini içerirler. Hücre ölümünün antagonistleri (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, ve A1) ve agonistlerinden (Bax, Bak, Bcl-XS, Bad, Bid, Bik ve Hrk) oluşurlar (Yuan ve Yankner, 2000). Bcl-2 gen ailesi, pozitif veya negatif yönde apoptozu düzenleyen 20'den fazla değişik üyeyi kapsar (Henshall ve Simon, 2005).

Antiapoptotik üyeler, apoptozu tetikleyen üyelerin aktivasyonunu, mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu (MOMP-Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) inhibe ederek apoptotik mekanizmanın başlamasını durdururlar (Şimşek ve Vatansever, 2014). Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir. Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Bcl-2 salgılanması sonucu

Bcl-2 homodimerleri şekillenir. Böylece apoptoz inhibe edilir (Şekil 7). Oysa aşırı Bax apoptozu aktive eder (Altunkaynak ve Özbek, 2008).



**Şekil 8.** Bcl-2 onkoproteininin apoptoz üzerine etkisi (değiştirilerek alınmıştır, Altunkaynak ve Özbek, 2008).

## 2.10. *Cichorium İntybus*

*Cichorium intybus* bitkisi (Familya: Compositae, Asteraceae) Chicory ya da Kasni ismiyle bilinmektedir. Chicory (*Cichorium intybus L.*) tarihte mısırlılar tarafından tıbbi bir bitki olarak yetiştirilmekteydi (Grieve, 1971). Bitki, karaciğer tonik, kardiyotonik, idrar söktürücü, safra söktürücü, yıkıntı ürünlerinin atılmasını hızlandırıcı, baş ağrısını giderici, emenagog ayrıca iltihap, iştahsızlık, hazımsızlık, gaz, kolik, sarılık, splenomegali, amenore dismenore, astım, karaciğer büyümesine karşı kullanılmaktadır (Ahmed ve ark., 2003). Bitkinin kökleri hazmettirici, diüretik, laksatif ve sedatif olarak kullanılmaktadır (Bais ve Ravishankar, 2001). *Cichorium intybus*'un köklerinden ve üst kısımlarından elde edilen metanolik ekstraktının yara iyileştirici (Süntar ve ark., 2012), antifungal etkisi bulunmaktadır (Mares ve ark., 2005). Chicory kök ekstresi tedavisi, hepatitte bazı morfofonksiyonel karaciğer özelliklerinin normalleşmesine yol açar (Krylova ve ark., 2006). Ayrıca kök kallus ekstraktı doğal kök ekstraktına kıyasla daha iyi bir koruma sağlamaktadır (Zafar ve Mujahid, 1998).

*Cichorium intybus*'un tohum ekstraktının antihepatotoksik aktivitesi bulunmaktadır (Gilani ve Janbaz, 1994; Ahmed ve ark., 2003; Atta ve ark., 2010). Ayrıca diyabet üzerinde erken ve geç dönem etkilerinin olduğu, diyabetin ilerleme hızını yavaşlatmak için doğal bir besin takviyesi olarak kullanışlı olduğu ve komplikasyonların gelişimini geciktirici etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Ghamarian ve ark., 2012). *Cichorium intybus* tohumlarından elde edilen zengin etanol ekstraktı, diyet sebebiyle metabolik bozuklukları iyileştirmektedir, özüt klinik çalışmalar yürütülürken ek besin takviyesi olarak önerilmektedir (Jurgoński ve ark., 2012). Başlıca inulin içeren chicory ekstraktı ile beslenen ratlarda lipid metabolizmasında iyileşme gözlenmektedir (Kim ve Shin, 1998). Ayrıca bitki tohumlarından elde edilen bir glikozid olan cichotyboside'nin, antihepatotoksik aktivitesi bulunmaktadır (Ahmed ve ark., 2008). *Cichorium intybus*'un tüm bitki kısımlarının etanolik ekstraktı diyabetes mellitusta (Hindistan'da çok yaygın biçimde kullanılmaktadır) hipoglisemik etkiye sahiptir (Pushparaj ve ark., 2007).

*Cichorium intybus* bitkisindeki içerik, tüm bitki kısımlarına yayılmış olmakla birlikte asıl içerik köklerde bulunmaktadır. Acımtırak içerikte laktusin ve laktukopikrin, eskuletin, eskulin, cichoriin, umbelliferon, skopoletin ve 6,7-dihidroksikumarin (Chopra ve Nagar, 1956), kikhorik asit, klorojenik asit, apijenin, quersitin, glukoz, fruktoz, inulin ve vitaminler bulunmaktadır (Mares ve ark., 2005).

*Cichorium intybus* bitkisinin, asetilkolinesteraz aktivitesini stimule ederek nöroprotektif koruma sağladığı bildirilmektedir (Ahmed ve Tarannum, 2009). *Cichorium intybus* bitkisi ile yapılan bir çalışmada suda çözünen fraksiyonunun sedatif bir etkisinin olduğu, çay ve kahvenin uyarıcı etkilerini bir MSS mekanizması yoluyla antagonize ettiği bildirilmektedir (Anonim, 2013c).

*Cichorium intybus*'un, modern epileptik ilaçların bulunmadığı dönemde, 16. ve 17. yüzyıllarda Avrupa'da epilepsi tedavisi için kullanılan bitkiler arasında olduğu bildirilmektedir (Adams ve ark., 2012). Günümüzde halen, Van ve Bitlis yörelerinde *Cichorium intybus* bitkisinin kökleri, halk arasında, epilepsi tedavisinde kullanılmaktadır. Kökler ezilerek hazırlanıp, kaynatıldıktan sonra elde edilen öz, üç gün boyunca sabah aç karnına içilmektedir (Tabata ve ark., 1994).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Bitki

*Cichorium intybus* bitkisi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi kampusundan toplandıktan sonra Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalında teşhis ettirilerek, VANF163742 referans numarasıyla kayıt altına alındı. Toplanan bitkiye ait bir örnek Yüzüncü Yıl Üniversitesi herbaryumunda saklanmaktadır.

##### 3.1.2. Hayvanlar

Sunulan çalışmada, 7-8 aylık, ağırlıkları 400-430 gr arasında, 27 adet erişkin erkek *Wistar*- albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar, 12 saat karanlık-12 saat aydınlık döngüsüne uygun olarak, sabit ısı bir odada (21 °C), laboratuvar sıçan yemi ve şebeke suyu kullanılarak ve serbest yem ve su alımı sağlanarak Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Araştırma Merkezi'nde barındırıldı. Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışma için gerekli etik izin, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 2013/216 sayılı etik onay raporu ile alındı.

Hayvanlar randomize olarak üç gruba ayrıldı;

- I. Serum fizyolojik grubu: Serum fizyolojik (SF) (0.5 ml, i.p.) (n=7)
- II. PTZ grubu: PTZ (35 mg/kg, i.p., 0,5 ml SF içinde çözüldü) (n=10)
- III. PTZ ve *Cichorium intybus* grubu: PTZ (35 mg/kg, i.p., 0,5 ml SF içinde çözüldü) + *Cichorium intybus* suda çözünür ekstraktı (200 mg/kg, p.o., 0,5 ml distile suda çözüldü) (n=10).

##### 3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

- Pentilentetrazol
- Bcl-2 antibody 2 ml
- Tubulin AB 100 UL
- Cyclin B1 mouse antibody 500 UL
- Glycerol 100 ml

- Bromophenol blue 5 gr
- Western blot protein standart 250 ml
- Proteinase K 15 ml
- 2 propanol 1 lt
- Hidrojen peroksidi 1 lt
- Western breeze immunodet kit
- İblot transfer regular
- NP 40 cell lysis buffer
- Sybr green gel stain
- Histostain plus 3RD ihc detect kit
- Apoptag fluorescein apopt. detect kit
- Pap pen immunologic
- Sitrate buffer 250 ml
- Pozitif şarjlı lam (3 adet)
- Vectashiled mounting medium
- Anti GABA A receptor
- Anti 8 hydroxyguanosine
- Anestezik madde: ksilazin, ketalar

### **3.1.4. Protein miktar tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler**

#### **3.1.4.1. Bradford Ayıracı**

Protein miktar tayininde Bradford metodu (Bradford, 1976) kullanıldı. Bu metot için kullanılan çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 g
% 95 'lik etanol	50 ml
% 95'lik Fosforik asit	100 ml
deiyonize su	1L tamamlandı

### **3.1.5. SDS PAGE elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler**

SDS page elektroforezinde aşağıda verilen tampon ve çözeltiler kullanıldı.

### 3.1.5.1. % 30 Akrilamid / % 0,08 Bis akrilamid

Akrilamid, SDS-page jelinin ana bileşenidir. Jeli oluşturmak için aşağıdaki maddeler kullanıldı. 0.45 µm filtre ile süzüldü, + 4°C’de karanlıkta saklandı.

Akrilamid	30 g
Bis akrilamid	0,8 g
Deiyonize saf su	100 ml’ye tamamlandı.

### 3.1.5.2. 5 M Tris-HCl / SDS, pH=8,8

Bu tampon ayırma jelinin hazırlanmasında kullanıldı. 0.45 µm filtre ile süzüldü, + 4°C’de saklandı.

Tris baz	18,2 g
SDS	0,4 gr
Deiyonize saf su	100 ml tamamlandı.

### 3.1.5.3. 0,5M Tris-HCl/ SDS , pH=6,8

Yığıma jelinin hazırlanmasında kullanıldı. 0.45 µm filtre ile süzüldü 4°C’de saklandı.

Tris baz	6,05 g
SDS	0,4 gr
Deiyonize saf su	100 ml tamamlanır

### 3.1.5.4. % 10 APS:

TEMED’le beraber polimerleşmenin meydana gelmesinin sağlanması için kullanıldı. Çalışma öncesinde taze olarak hazırlandı.

Amonyum persülfat	0,1 g
deiyonize su	1 ml çözüldü.



### 3.1.5.5. Yürütme Tamponu, pH=8,3 (5X)

Örnekleri jele yüklendikten sonra, tank içerisinde uygun iyonik bir ortam oluşturup, protein moleküllerinin elektrik akımıyla hareket etmesini sağlamak üzere kullanıldı. pH ayarlanmadı. Çalışma yapılacağı zaman su ile 1X olarak dilüe edildi.

Tris base	15.1 g
Glycine	72.0 g
SDS	5.0 g
Deiyonize su ile	1L tamamlandı.

### 3.1.5.6. 2X SDS-PAGE örnek yükleme tamponu

İçerisindeki  $\beta$ -mercaptoetanol protein molekülündeki disülfid bağlarının kopmasını, SDS ise protein molekülünün negatif yükle kaplanmasını sağlayarak denatüre olmasını sağlar. Gliserol ve Bromo fenol ise örneklerin jele kolayca yüklenmesini ve jelde hareketinin görüntülenmesini sağlamak amacıyla kullanıldı. Küçük tüplere konularak, kullanıncaya kadar -20 °C' de saklandı.

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml
Glycerol (% 100)	2.0 ml
$\beta$ -mercaptoethanol	0.4 ml
Bromophenol Blue	0.02 g
SDS	0.4 g
Deiyonize su ile	10 ml tamamlandı

### 3.1.5.7. 1X SDS-PAGE Örnek yükleme Tamponu

2X SDS-PAGE tamponu deiyonize su ile 1:1 oranında dilüe edilip hazırlandı.

### 3.1.5.8. Boyama çözeltisi

Elektrik akımıyla jelde farklı seviyede yürüyen protein moleküllerinin görüntülenmesini sağlamak amacıyla kullanıldı. Bu işlem çözelti içerisindeki Comassie

Brilliant Blue R-250 boyasının protein molekülleriyle bağlanması sonucu oluşur. Boyama çözeltisi, aşağıdaki şekilde hazırlandı. +4°C'de karanlıkta saklandı.

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,1 g
Metanol	50 ml
Asetik asit	10 ml
Deiyonize su	100 ml tamamlandı.

### **3.1.5.9. Jel yıkama çözeltisi**

Jel yıkama çözeltisi jel boyanması sırasında, protein molekülü haricindeki jelde bulunan boyanın uzaklaştırılmasını ve protein bantlarının jelde ayırt edilmesini sağlamak amacıyla kullanıldı. + 4°C'de saklandı

Metanol	50 ml
Asetik asit	10 ml
Deiyonize su	100 ml tamamlandı

### **3.1.6. Western blotlamada kullanılan tampon ve çözeltiler**

#### **3.1.6.1. Transfer Tamponu (10x), (pH: 8.3)**

SDS page jelinde bulunan protein moleküllerinin jelden, polivinilidin diflorid (PVDF) membrana aktarılmasını sağlamak amacıyla kullanıldı. Semidry sistem kullanıldığı için az miktarda kullanıldı. (pH ayarlanmadı, yakınlığı ölçüldü). Bu tampon iyonik ortam oluşturarak elektrik akımı sağlar, bu sayede proteinler jelden membrana transfer edildi.

250 mM Tris-HCl	30,275 g
1,92 M Glisin	144.13g
Deiyonize su	1L tamamlandı

### 3.1.6.2. Transfer Tamponu (1x) (pH: 8.3)

Stok halinde hazırlanan transfer tamponu (10x) tamponunun dilüe edilmesi ve metanol eklenmesi ile elde edildi. İçerisindeki metanolden dolayı taze olarak hazırlandı. (pH ayarlanmadı).

Transfer Tamponu (10×)	10 ml
Metanol	20 ml
H <sub>2</sub> O	100 ml tamamlandı

### 3.1.6.3. Blocking tampon

Kit içerisindeki Blocking buffer aşağıda belirtilen şekilde hazırlanarak kullanıldı. (Blocking tampon, transformasyon işleminden sonra, membrandaki protein moleküllerinin arasını doldurarak, primer antikorun bu bölgelere bağlanıp nonspesifik sonuçların ortaya çıkmasını engellemektedir).

Deiyonize su	5ml
Blocker dilüent part A	2ml
Blocker dilüent part B	3ml
Toplam	10 ml

### 3.1.6.4. Primer antikor

Dilüsyon tamponu, proteinin tanımlanmasına öncülük etmesi amacıyla kullanıldı. Dilüsyon tamponunda bulunan primer Anti-His antikor, membranda bulunan His-Sumo-Omp28 prekürsör proteinin His kısmıyla bağlanma yeteneğindedir. (Antikor yalnızca His rezidüsü bulunan proteine bağlanarak, protein tanımlanmasında öncülük eder). Dilüsyon tamponu aşağıda tarif edilen biçimde hazırlandı.

Deiyonize su	7ml
Blocker dilüent part A	2ml
Blocker dilüent part B	1ml
Anti - His antikor	2 µl
toplam	10 ml

### 3.1.6.5. Antikor yıkama tamponu

Antikor yıkama tamponu, His-Sumo-Omp28 prekürsör proteinine bağlanmayan Anti – His antikorlarını uzaklaştırmak amacıyla kullanıldı. Bu sayede istenmeyen reaksiyonların oluşumu önleildi.

Deiyonize su	150 ml
Antikor yıkama solüsyonu (16 x)	10 ml
Toplam	160 ml

### 3.1.6.6. Sekonder antikor

Kit içerisinde bulunan kullanıma hazır sekonder antikor çözeltisi kullanıldı. (Bu çözelti alkalın fosfataz konjuge edilmiş Anti–mouse IgG keçi antikorunu içerir). Sekonder antikor primer antikora bağlandıktan sonra alkalın fosfataz substratı ortama konarak renk oluşumu sağlandı.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Bitki ekstraktının hazırlanması

Bitkinin kökleri, 1 ay boyunca kurutulduktan sonra 1mm'lik elekten geçirilerek toz haline getirildi. Bitki tozu 200 mg/kg olacak biçimde, distile suda verim hesabı dikkate alınmadan çözüldü. 70°C'de, 50 dakika boyunca sık sık karıştırılarak su banyosunda bekletildi. Hazırlanan karışım 10 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra filtre kâğıdından süzülerek bitkinin su ekstraktı elde edildi. Ekstrakt, her bir rata 0.5 ml olacak biçimde per oral olarak gavaj yoluyla uygulandı.

### 3.2.2. Epilepsi oluşturulması

PTZ grubundaki ratlara, çalışmanın 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22 ve 24. günlerinde Pentilentetrazol (Sigma, Aldrich) 35 mg/kg olarak kullanıldı. Her bir rat için PTZ, 0.5 ml % 0.9'luk NaCl çözeltisinde çözüldü ve intra peritoneal olarak enjekte edildi. Her bir PTZ enjeksiyonundan sonra ratlar 30 dk boyunca gözlemlendi ve nöbet skorları ve latans periyodu belirlendi. Ayrıca 30 dakikalık bu gözlem süreci video ile kayıt altına alındı.

PTZ+ *Cichorium intybus* grubundaki ratlara, çalışmanın 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22 ve 24. günlerinde bitki ekstraktı 200 mg/kg (19, 32) dozunda ve her rat için 0.5 ml olacak biçimde gavaj yoluyla verildi. Bitki uygulamasından 2 saat sonra PTZ (35 mg/kg), her bir rat için 0.5 ml % 0.9'luk NaCl çözeltisinde çözüldükten i.p. yolla enjekte edildi. Bu grupta da yine latans periyod ve nöbet skorları enjeksiyondan hemen sonra 30 dk süresince gözlenerek belirlendi ve video ile kayıt altına alındı. (Kontrol grubundaki ratlara ise, çalışmanın aynı günlerinde her bir rata 0.5 ml olacak biçimde SF i.p. olarak verildi, ancak PTZ enjeksiyonu yapılmadı).

PTZ ile kindling modeli oluşturulduktan sonra, çalışmanın 26. gününde kontrol grubundaki hayvanlara i.p. SF, PTZ grubundaki ratlara PTZ (75 mg/kg, i.p.) ve PTZ+ *Cichorium intybus* grubundaki ratlara *Cichorium intybus* uygulamasından iki saat sonra, PTZ (75 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu yapılarak, klonik ve tonik nöbetler oluşturuldu. PTZ enjeksiyonundan sonra 30 dk boyunca nöbetler gözlemlendi ve kayıt altına alınarak skorlandı.

Her bir PTZ enjeksiyonundan sonra 30 dk boyunca nöbetler aşağıdaki şekilde skorlandı (İlhan ve ark., 2005):

Evre 0: Cevap yok

Evre 1: Kulaklar ve yüzde seğirme

Evre 2: Vücuda yayılan konvulzif dalga

Evre 3: Myoklonik jerkler ya da arka ayakları üzerinde şaha kalkma

Evre 4: Hayvanın olduğu yere düşmesiyle birlikte klonik nöbetler

Evre 5: Tekrarlayan şiddetli tonik-klonik nöbetler

Evre 6: Ölümcül nöbetler

### **3.2.3. Cerrahi işlem**

26. günde yukarıda anlatılan işlemler tamamlandıktan sonra ratlara 15 mg/kg ksilazin, 50 mg/kg ketalar verildikten sonra anesteziye girmeleri beklendi ve kan ve beyin örnekleri alındı.

Alınan beyin dokusu örnekleri (hipokampus ve tüm beyin) ikiye ayrıldıktan sonra tartıldı. Bir kısmına Western Blot çalışmaları için örnek tamponu eklenerek doku ekstraktları hazırlandı, dokunun diğer kısmı fosfat tamponu ile (pH:7) homojenize edilerek biyokimyasal

parametreler (TOS ve TAS) çalışıldı. Histolojik parametrelerin incelenmesi için ayrılan doku örnekleri incelemeye dek nötral tamponlu formaldehitte saklandı.

### **3.2.4. GABA reseptör yoğunluğu ve apoptozis için dokuların hazırlanması**

Deney gruplarından alınan dokular, % 10'luk nötral tamponlu formalin (NBF) içerisinde 72 saat fikse edildi. Dokular yükselen alkol serilerinden (% 70, % 90, % 96, % 100) geçirilerek dehidrate edildi; ksilen ile şeffaflaştırıldı; 60 °C'lik parafinde gece boyunca bekletildi ve parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan, pozitif şarjlı lamlara yaklaşık 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

### **3.2.5. GABA<sub>A</sub> reseptör immunohistokimyası**

Hem kronik hem de akut epilepsi modellerinde GABA<sub>A</sub> reseptör tonun değiştiği gözlenmiş olup, postsinaptik GABA<sub>A</sub> reseptör fonksiyonunda azalma olduğuna inanılmaktadır. Bu amaçla elde edilen dokularda GABA reseptör yoğunluğu analiz edildi. Bu analiz, floresan olarak işaretlenmiş sekonder antikoların, incelenmek istenen GABA reseptörlerine uygun bir şekilde tutunan primer antikora bağlanması (Blair ve ark., 2004). ya da primer antikora peroksidaz, alkalen fosfataz gibi enzim işaretçilerinin bağlanması esasına dayanmaktadır. Enzim kullanıldığında kromojen substrat uygulanarak görüntü elde edilir.

Alınan kesitler 1 gece boyunca 37°C' lik etüvde bekletildi. Deparafinize etmek amacıyla ksilende 3x5 dakika tutuldu. Saf alkol ve % 96'luk alkolde 10 dakika bekletildikten sonra metanol ile hazırlanmış % 3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika bekletilerek endojen enzim blokajı yapıldı. Önce musluk suyu sonra distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için sitrat tamponda 10 dakika 200 W mikrodalgaya maruz bırakıldı. Oda ısısında soğutulan kesitler PBS ("Phosphate buffered saline" fosfatla tamponlanmış tuz) ile 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra blokama solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Tavşan anti-GABA<sub>A</sub> reseptör alfa (1: 100, Abcam, Cat:ab33299) birincil antikorda 1 gece boyunca +4°C'de bekletildi. Birincil antikora streptavidin-peroksidaz yöntemi kullanılarak diaminobenzidin (DAB) kromojenik işaretleme yapıldı. Bu metot için Histostain®-Plus 3rd Gen IHC Deteksiyon Kiti (Cat: 85-9073, Invitrogen, CA, USA) kullanıldı. Boyama sonrası işaretli hücreler Nikon DS-Fi1c (Tokyo, Japan) kamera ataçmanlı Nikon Eclipse i5 (Tokyo, Japan) ışık mikroskobu ve NIS Elements sürüm 4.0 görüntü analiz sistemi (Nikon Instruments

Inc, Tokyo, Japan) ile incelenip görüntülendi. Her kesitte rastgele seçilen 5 benzer alandaki x200 büyütmede alınan görüntülerde pozitif boyanmış hücre sayımı yapıldı ve Photoshop CS6 kullanılarak da boyanmış hücrelerin boyanma yoğunlukları ölçüldü.

### **3.2.6. In situ DNA fragmantasyon analizi**

Dokularda apoptozisin immünohistokimyasal olarak gösterilebilmesi için in situ DNA fragmantasyon analizi (TUNEL) yöntemi kullanıldı.

Pozitif şarjlı lamlara alınan 4 µm kalınlığında kesitler ksilen ile deparafinize edildi. İnen alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi ve PBS ile yıkandı. TUNEL metodu üretici firmanın (Apoptag Fluorescein In Situ Apoptozis Kiti, Millipore, S7110) verdiği kullanım kılavuzundaki yönteme göre yapıldı.

Proteinaz K' da (20 µg/ml, Sigma) 15 dakika tutuldu. Distile su ile yıkamadan sonra, kesitler PBS'de hazırlanmış % 3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika tutuldu. PBS ile yıkanmış, dengeleme tamponunda 30 dakika tutuldu. Daha sonra tüm kesitler 37°C'lik etüvde terminal 36 deoksinükleotidil transferaz (TdT) enziminde 1 saat tutuldu. Sonra, oda ısısında yıkama tamponunda 15 saniye ajite edildikten sonra 10 dakika inkübe edildi. PBS' de 3 kere 1'er dakika yıkandı. Ardından antidigoksinin konjugatta 30 dakika bekletildi. PBS' de 2' şer dakikadan 4 kez yıkandı. DAPI ile nükleus boyaması yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı. Her kesitte rastgele seçilen 10 benzer alandaki x200 büyütmede alınan görüntülerde TUNEL pozitif hücre sayımı yapıldı.

### **3.2.7. Western blot yöntemi için protein miktar tayini**

Bradford metoduyla protein miktarı ölçüldü. Bradford ayıracı; 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml, % 95 'lik etanolde çözüldü. Bu çözelti üzerine % 95 'lik 100 ml fosforik asit ilave edildikten sonra deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. 0,45 µm lik filtre ile filtre edildikten sonra ışık almayan bir şişeye konarak + 4 °C'de saklandı.

**Standart:** 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart çözeltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.

Bradford metodu 0,1- 200 µg protein ölçme hassasiyetine sahiptir. İşlem şu şekilde gerçekleştirildi:

- I. 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart çözeltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.
- II. 20 µl örnek ya da standart üzerine 980 µl Bradford ayırıcı eklendikten sonra vortekslendi.
- III. Oda ısısında 10 dk inkübe edildi.
- IV. Spektrofotometrede 595 nm okundu.

### 3.2.8. SDS PAGE elektroforezi

Proteinlerin denatüre edilerek büyüklüklerine göre ayrılması SDS-PAGE yöntemi ile yapıldı. SDS-PAGE jeli iki farklı özellikteki jelden oluşturuldu; ayırma jeli proteinlerin asıl olarak ayrımının yapıldığı jeldir. Yığıma jeli ise daha geniş por büyüklüğüne sahiptir. SDS'nin proteinleri tam olarak kaplaması ve aynı hızda ayırma jeline yönlendirmesi amacı ile kullanıldı.

SDS-PAGE deneyi şu şekilde yapıldı: Elektroforez camları kullanılmadan önce su ve alkolle yıkanarak iyice temizlendi, sonra camlar arasında 0,75 mm olacak şekilde sistem oluşturuldu. Jelin hazırlanacağı jel dökme aparatı kurularak su ile test edildi. Sızdırma yapmadığı tespit edildikten sonra jel hazırlanmaya başlandı. Ayırma jeli hazırlanırken en son aşamada TEMED ve APS eklendikten sonra camlara döküldü. Polimerleşmenin sağlanması ve jelin üst kısmının düz bir şekil alması için 0,5 ml isopropanol ayırma jelinin üzerine hafifçe eklendi. 30-60 dk arasında oda ısısında jel polimerleştikten sonra, jel üzerindeki isopropanol kurutma kâğıdıyla uzaklaştırıldıktan sonra su ile yıkanıp, kurutma kâğıdıyla su uzaklaştırıldı. Yığıma jeli, ayırma jelinin üzerine döküldükten sonra taraklar yerleştirildi. 30-45 dk arasında polimerleşme sağlandı. Bu işlemin ardından, protein örneği 1:1 oranında 2X SDS örnek tamponu ile karıştırıldıktan sonra örnekler buz üzerinde tutuldu, sonra 5 dk 95 °C'de inkübe edildi. Kaynama işleminden sonra örnekler oda ısısında soğutuldu. 10,000 rpm 'de 2 dk santrifüj edildikten sonra jele yüklenir hale getirildi. Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra kuyular 1X SDS elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen monomerler uzaklaştırıldı. Jeller tanka yerleştirildikten sonra iç kısım 1X SDS elektroforez tamponu ile dolduruldu. Kuyucuklara 20 µl den fazla örnek yüklenmedi. Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için belirteç olarak, Pageruler Prestained belirteci (Thermo) kullanıldı. Jeller önce 100 V yürütüldü, bromofenol ayırma jeline geldiğinde akım 120V çıkarıldı. Bu işlem 2 saat sürdü. Camlar açılıp jel çıkarıldıktan sonra bir köşesi işaretlendi sonra boyama işlemine geçildi. Jel boyama çözeltisinde bir gece boyunca bırakıldı. Sonrasında fazla boyanın



giderilmesi için jel yıkama çözeltisine kondu. Bantlar belirginleşip fazla boya giderildikten sonra jel görüntülendi.

### 3.2.9. Western Blot ile Bcl-2, Siklin B1 ve $\beta$ -Tubulin değerlerinin belirlenmesi

Western blot analizi için öncelikle proteinler denatüre edici şartlarda SDS-PAGE ile elektroforetik olarak ayrıldılar. Proteinler jelde ayrıldıktan sonra membrana (PVDF, nitroselüloz) aktarıldılar. Sonra uygun antikorlar ile istenilen protein, renklenme veya radyoaktif yöntem ile belirlenir. Bu işlemi şu şekilde gerçekleştirdi:

- PVDF membran jele uygun bir şekilde kesildi.
- PVDF membran % 100 metanolde 1 dk yıkandıktan sonra distile suyla 3 dk yıkayıp metanol uzaklaştırıldı.
- PVDF ve SDS page jeli transfer tamponunda 15 dk bekletildi.
- Üçer adet whatman filtre transfer tamponu içinde ıslatıldı. Transfer sandviçini hazırlamak için, Katot (-) elektrot kısmına whatman filtre kağıdı yerleştirildi.
- Filtre kağıdının üzerine PVDF membranı konup, havası alındı.
- Membranın üzerine transfer tamponunda SDS page jeli yerleştirildi.
- Jelin üzerine ikinci bir whatman filtre kağıdı yerleştirildi, hava kabarcığı kalmaması için bir cam tüp ile üzerinden geçildi.
- Sandviçin etrafındaki sıvı kurutulduktan sonra sistem kapatılıp 150 mA 'de 1 saat transfer edildi.
- Aktarma işleminden sonra transferin olup olmadığını kontrol etmek için, jel boyama işlemine tabi tutuldu.
- Aktarma yapılmış olan PVDF membranı oda ısısında ya da 37 °C'de inkübe edilerek kuruması sağlandı.
- PVDF membran 10 ml blocking buffer içerisine konulup, 1 saat oda ısısında rotary shakerde inkübe edildi.
- Blocking solüsyonu ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra, membran 20 ml distile su ile 5 dk boyunca shakerde karıştırılarak yıkandı.
- 10 ml 1:5000 oranında dilüe edilen anti-His antikor eklenerek, 1 saat inkübe edildi.
- Antikor solüsyonu ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra, üç defa 20 ml antikor yıkama tamponu ile 5 dk yıkandı.

- 10 ml sekonder antikor (keçi, alkaline fosfatase konjuge edilmiş IgG anti Mouse) solüsyonu ile 30 dk inkübe edildi.
- Sekonder antikor solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, üç defa 20 ml antikor yıkama tamponu ile 5 dk yıkandı.
- Membrane iki defa 20 ml distile su ile 2 dk yıkandı.
- 5 ml chromogenic substrate, 5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat (BCIP/NBT) ile renk oluşuncaya dek inkübe edildi.
- Renk oluşuktan sonra, membran iki defa 20 ml distile su ile 2 dk yıkandı.
- Membrane filtre kağıdı üzerine konularak kurutulduktan sonra jel görüntüleme sitesinde (Fusion fx7) görüntülendi. (Bu işlemler her antibody için tekrarlandı).

### 3.2.10. Plazmada TAS, TOS ve OSİ değerlerinin belirlenmesi

Kan örnekleri sarı jelli tüpe alındı 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Biyokimyasal parametrelerden TAS ve TOS seviyeleri ticari kit kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi (Erel, 2004; Erel, 2005).

Serum örneklerinin Total antioksidan kapasitesi (Total antioksidan status: TAS), Erel tarafından geliştirilmiş otomatik bir ölçüm metoduyla tespit edildi (Erel, 2004). Bu ölçüm metodunun prensibi  $H_2O_2$  varlığında ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylebenzothiazoline-6-sulfonate) molekülünün ABTS+ molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. Bu metodda ABTS+'nın karakteristik rengi örnekteki antioksidanlarca azaltılır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak gözlenebilir ve rengin açılma oranı örneğin TAS'ı ile ters ilişkilidir. Reaksiyon hızı standart yöntem olan troloks ile kalibre edilmektedir. Trolox standart olarak kullanıldı. Birimi mmol troloks Eqv/L'dir (Erel, 2005).

Total oksidan kapasitenin (Total oksidan status: TOS) tayini için Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorometrik bir yöntem kullanıldı. Örnekte bulunan oksidanların ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlemesine dayanır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xlenol orange ile renkli bir bileşke oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Birimi:  $\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Eqv. / L'}$  dir (Erel, 2005).

Oksidatif stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilmektedir. Örneklerin

OSİ değeri hesaplanırken TAS düzeyleri 100 ile çarpılarak TOS düzeyleri ile birimler eşitlendi. OSİ değerinin birimi Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi (Abuhandan ve ark., 2014).

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.}}{\text{TAS, mmol trolox Equiv. / L. X 100}}$$

### **3.2.11. İstatistik analiz**

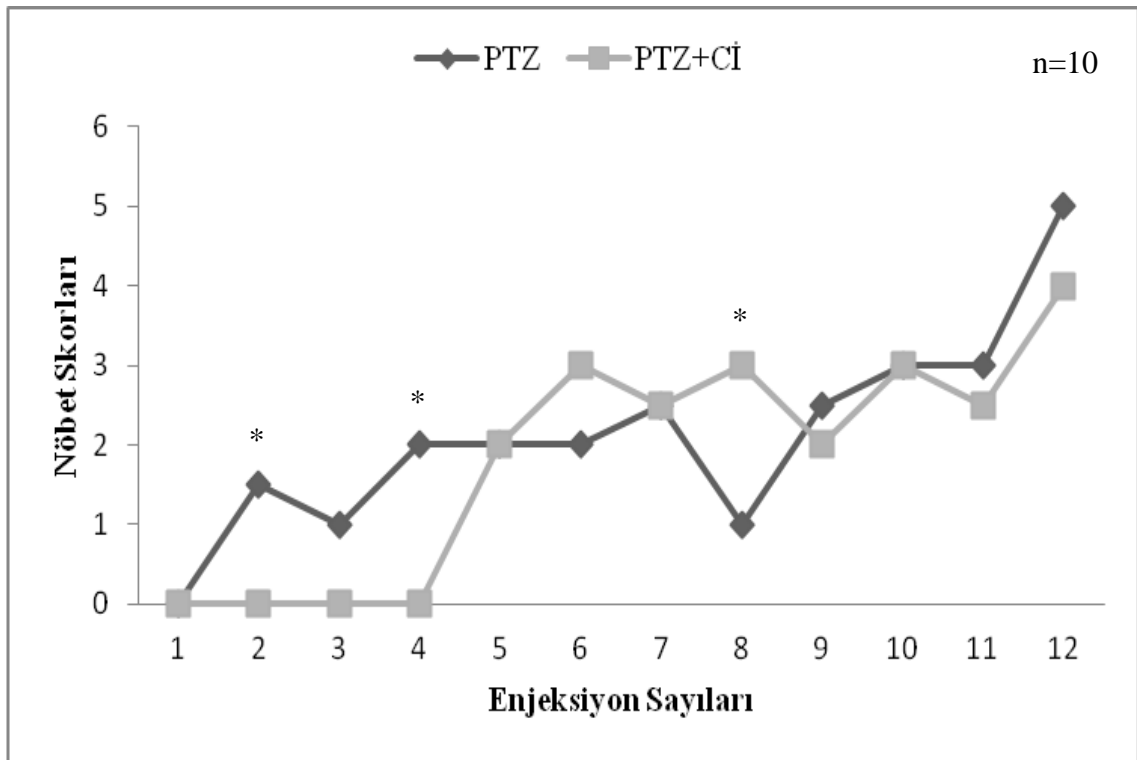
Üzerinde durulan özelliklerden sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; Medyan, Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değerler olarak ifade edilirken, Kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Sürekli değişkenler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testini takiben farklı grupları belirlemede Dunn testi kullanıldı. Grup içerisinde periyotları karşılaştırmada ise Friedman testi kullanıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi % 5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanıldı.

## BULGULAR

### 4.1. Epileptik Nöbet Aktivitesi

#### 4.1.1. Nöbet skorları

PTZ grubu ile PTZ+Cİ grubu, gün aşırı enjeksiyonlardaki nöbet skorları bakımından karşılaştırıldı (Şekil 9, Tablo 9). Şekilde de görüldüğü üzere *Cichorium intybus* ekstraktı uygulanmış grupta epileptik nöbet aktivitesi oluşumu PTZ grubuna kıyasla daha geç (5. enjeksiyonda) gerçekleşti. Onikinci gün, yani konvulzan dozda (75 mg/kg) enjeksiyonun yapıldığı gün nöbet skoru istatistik olarak anlamlı olmamakla beraber PTZ+Cİ grubu lehine azalma eğilimi göstermektedir. İkinci ve dördüncü enjeksiyonlarda PTZ grubundaki ratların nöbet skorları PTZ+Cİ grubuna göre istatistik olarak anlamlı biçimde yüksektir ( $p<0.05$ ). Aksine, sekizinci enjeksiyonda PTZ+Cİ grubundaki ratların nöbet skorlarının PTZ grubuna kıyasla istatistik olarak anlamlı biçimde yüksek olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).



Şekil 9. Deney gruplarına ait nöbet skorları. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir. \*, iki grup arasında nöbet skorları bakımından istatistiksel anlamlılığı ( $P<0.05$ ) ifade etmektedir.

**Tablo 9.** Deney gruplarında nöbet skoru bakımından tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

Enj.	PTZ					PTZ+Cİ				
	Medyan	Ortalama	St. Sap.	Min.	Mak.	Medyan	Ortalama	St. Sap.	Min.	Mak.
1	,00 <sup>d</sup>	0,00	,00	,00	,00	0,00 <sup>d</sup>	,00	,00	,00	,00
2	1,5 <sup>cd#</sup>	1,10	,99	,00	2,00	0,00 <sup>d</sup>	,40	,84	,00	2,00
3	1,00 <sup>c</sup>	1,10	1,20	,00	3,00	0,00 <sup>d</sup>	,80	1,14	,00	3,00
4	2,00 <sup>c#</sup>	2,20	,92	1,00	4,00	0,00 <sup>d</sup>	1,00	1,33	,00	3,00
5	2,00 <sup>c</sup>	1,90	,99	1,00	4,00	2,00 <sup>c</sup>	1,80	1,03	,00	3,00
6	2,00 <sup>c</sup>	2,20	,63	1,00	3,00	3,00 <sup>b</sup>	2,60	,70	1,00	3,00
7	2,50 <sup>bc</sup>	2,50	,53	2,00	3,00	2,50 <sup>bc</sup>	2,50	,53	2,00	3,00
8	1,00 <sup>d#</sup>	1,60	,84	1,00	3,00	3,00 <sup>b</sup>	2,70	1,25	,00	4,00
9	2,50 <sup>bc</sup>	2,30	,82	1,00	3,00	2,00 <sup>c</sup>	2,50	1,18	1,00	5,00
10	3,00 <sup>b</sup>	3,00	,00	3,00	3,00	3,00 <sup>b</sup>	2,70	,48	2,00	3,00
11	3,00 <sup>b</sup>	2,60	,52	2,00	3,00	2,50 <sup>bc</sup>	2,60	,70	2,00	4,00
12	5,00 <sup>a</sup>	4,70	,67	4,00	6,00	4,00 <sup>a</sup>	3,60	1,96	,00	5,00

Farklı harfler, dönemler arasındaki istatistiksel farklılığı ifade etmektedir (P<0.05).

#, deney grupları arasında nöbet skoru bakımından istatistiksel anlamlılığı (P<0.05) ifade etmektedir.

#### 4.1.2. Nöbet Latansı

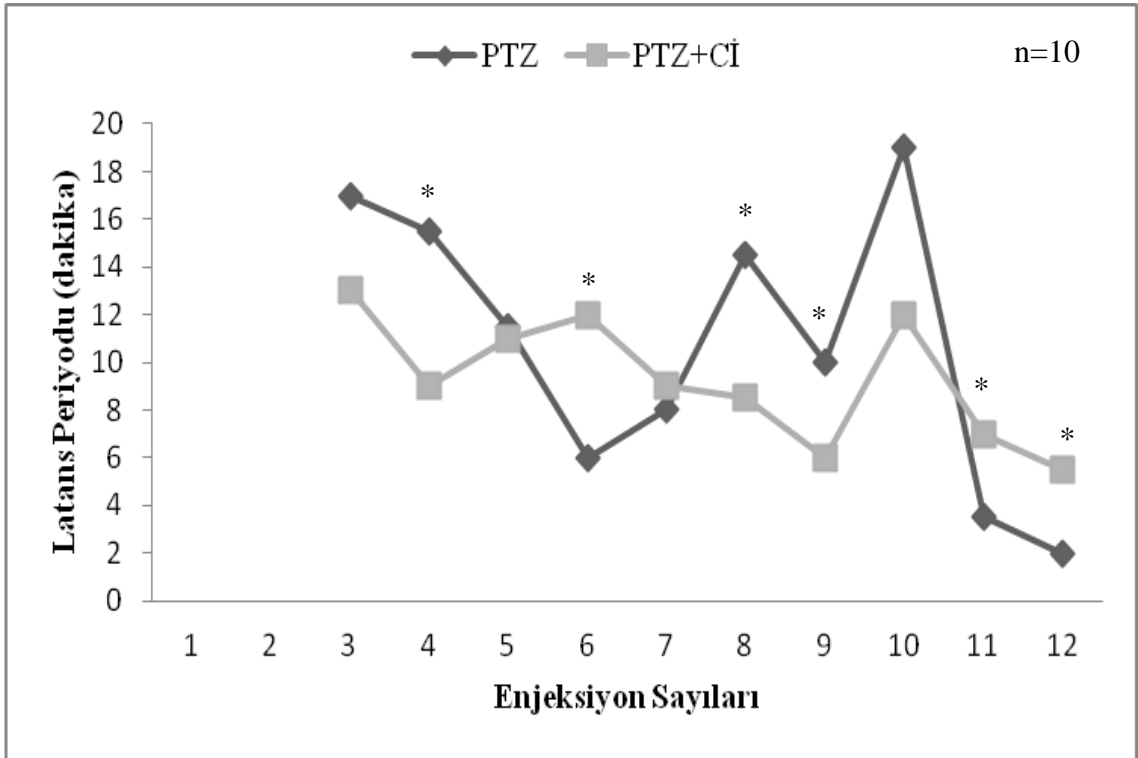
PTZ ve PTZ+Cİ gruplarına ait, skor 3 ve üstü nöbet latansları Şekil 10'da görülmektedir. Dört, sekiz ve dokuzuncu enjeksiyon günlerinde PTZ grubunun skor 3 ve üstü nöbetlerdeki latans periyodu PTZ+Cİ grubuna kıyasla istatistik olarak anlamlı biçimde daha uzunken (p<0.05); aksine altı, on bir ve on ikinci enjeksiyon günlerinde PTZ+Cİ grubuna ait latans periyodu PTZ grubuna kıyasla istatistik olarak anlamlı biçimde (p<0.05) uzun bulundu (Tablo 11).

**Tablo 10.** Skor 3, 4 ve 5 nöbetlerin latans sürelerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

Enj.	PTZ					PTZ+Cİ				
	Medyan	Ortalama	St. Sap.	Min.	Mak.	Medyan	Ortalama	St. Sap.	Min.	Mak.
3	17,00 <sup>a</sup>	17,00	.	17,00	17,00	13,00 <sup>a</sup>	13,00	.	13,00	13,00
4	15,50 <sup>a#</sup>	15,50	9,19	9,00	22,00	9,00 <sup>b</sup>	9,00	1,41	8,00	10,00
5	11,50 <sup>bc</sup>	11,50	6,36	7,00	16,00	11,00 <sup>ab</sup>	9,33	2,89	6,00	11,00
6	6,00 <sup>c#</sup>	12,67	14,22	3,00	29,00	12,00 <sup>ab</sup>	12,71	3,95	9,00	19,00
7	8,00 <sup>c</sup>	15,40	11,10	7,00	29,00	9,00 <sup>b</sup>	8,80	3,70	3,00	12,00
8	14,50 <sup>a#</sup>	14,50	6,36	10,00	19,00	8,50 <sup>b</sup>	8,25	3,01	5,00	14,00
9	10,00 <sup>c#</sup>	11,00	5,10	5,00	18,00	6,00 <sup>c</sup>	6,33	1,53	5,00	8,00
10	19,00 <sup>a</sup>	19,30	9,36	6,00	30,00	12,00 <sup>ab</sup>	11,00	5,74	3,00	20,00
11	3,50 <sup>d#</sup>	5,83	5,46	2,00	16,00	7,00 <sup>bc</sup>	9,20	10,33	2,00	27,00
12	2,00 <sup>d#</sup>	3,00	1,73	2,00	6,00	5,50 <sup>c</sup>	6,13	4,02	2,00	11,00

Farklı harfler, dönemler arasındaki istatistiksel farklılığı ifade etmektedir (P<0.05).

#, deney grupları arasında latans süresi bakımından istatistiksel anlamlılığı (P<0.05) ifade etmektedir.



**Şekil 10.** Deney gruplarına ait skor 3 ve üstü nöbet latans değerleri. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir. \*, iki grup arasında nöbet skorları bakımından istatistiksel anlamlılığı (P<0.05) ifade etmektedir.

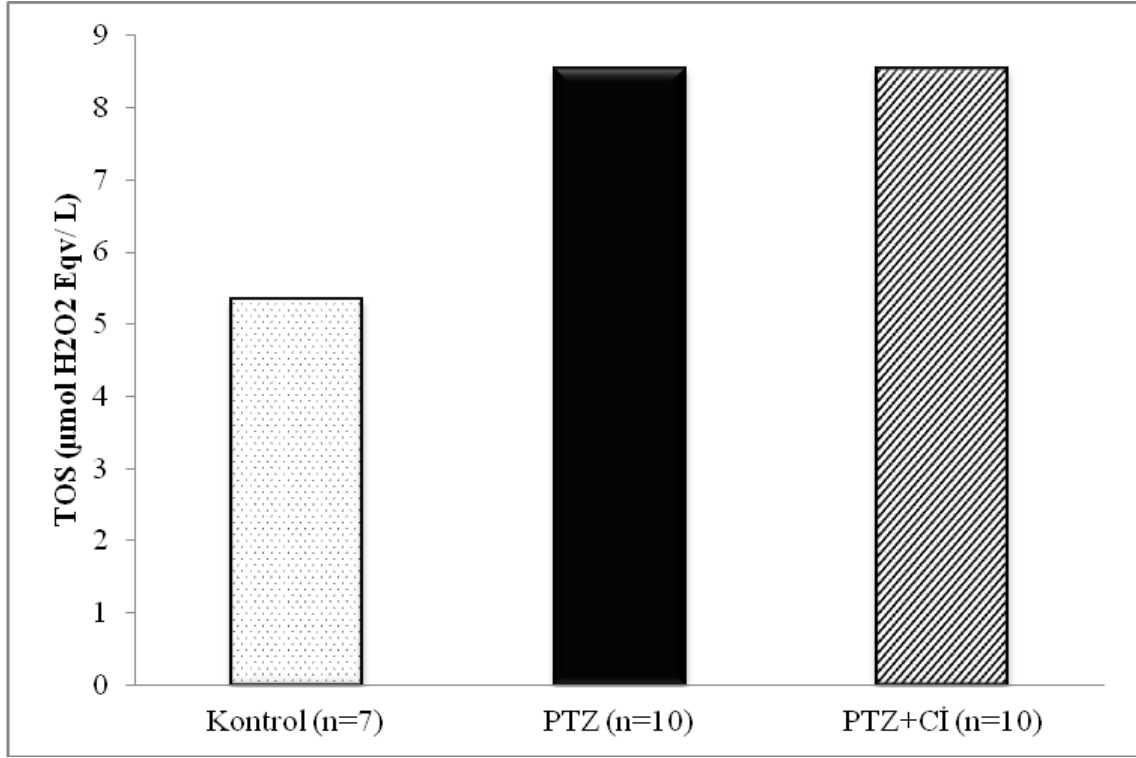
#### 4.2. Plazma TAS, TOS, OSİ Değerleri

Gruplar arasında total oksidan statüsü bakımından istatistik olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı (Tablo 11). Buna rağmen, grafikte PTZ ve PTZ+Cİ gruplarında, kontrole göre bir artış eğilimi gözlenmektedir (Şekil 11).

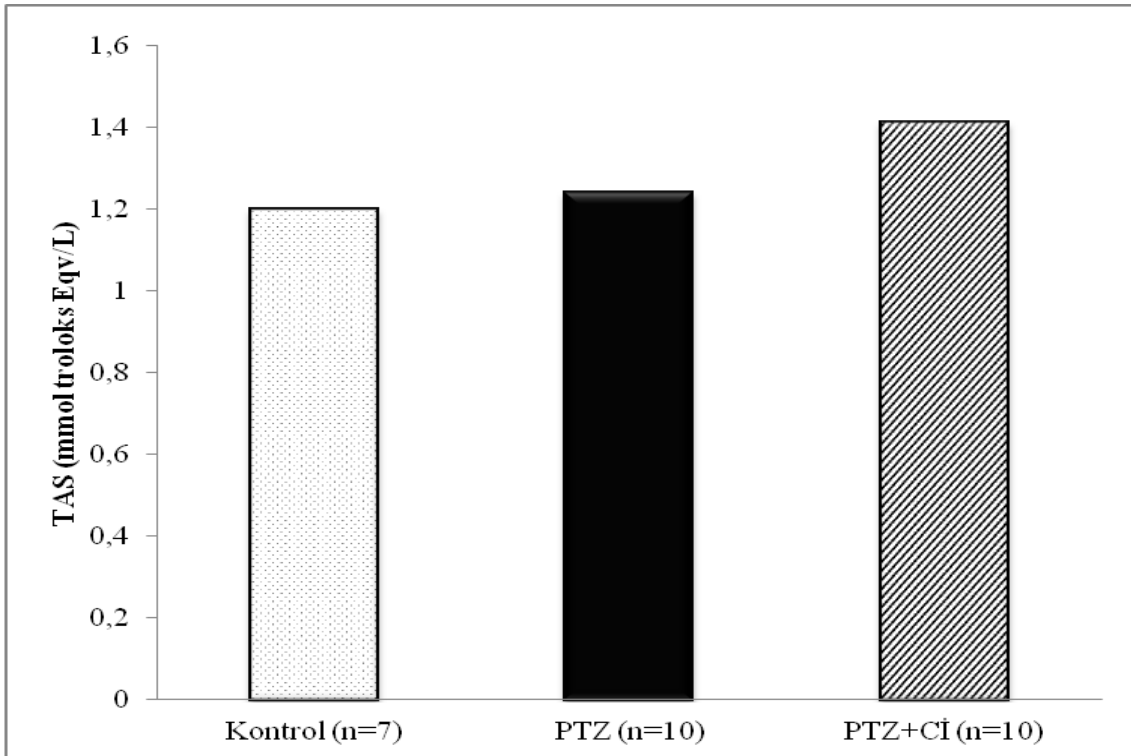
Total antioksidan statüsü bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı (Tablo 12). Grafikte PTZ+Cİ grubu lehine diğer gruplara kıyasla istatistik bakımından anlamlı olmayan bir artış eğilimi gözlenmektedir (Şekil 12).

Gruplar arasında oksidatif stres indeksi bakımından istatistik olarak anlamlı bir sonuç mevcut değildi (Tablo 12). Buna rağmen, grafikte PTZ grubunun OSİ değerinin kontrol ve PTZ+Cİ grubuna göre artış eğiliminde olduğu gözlenmektedir (Şekil 13).

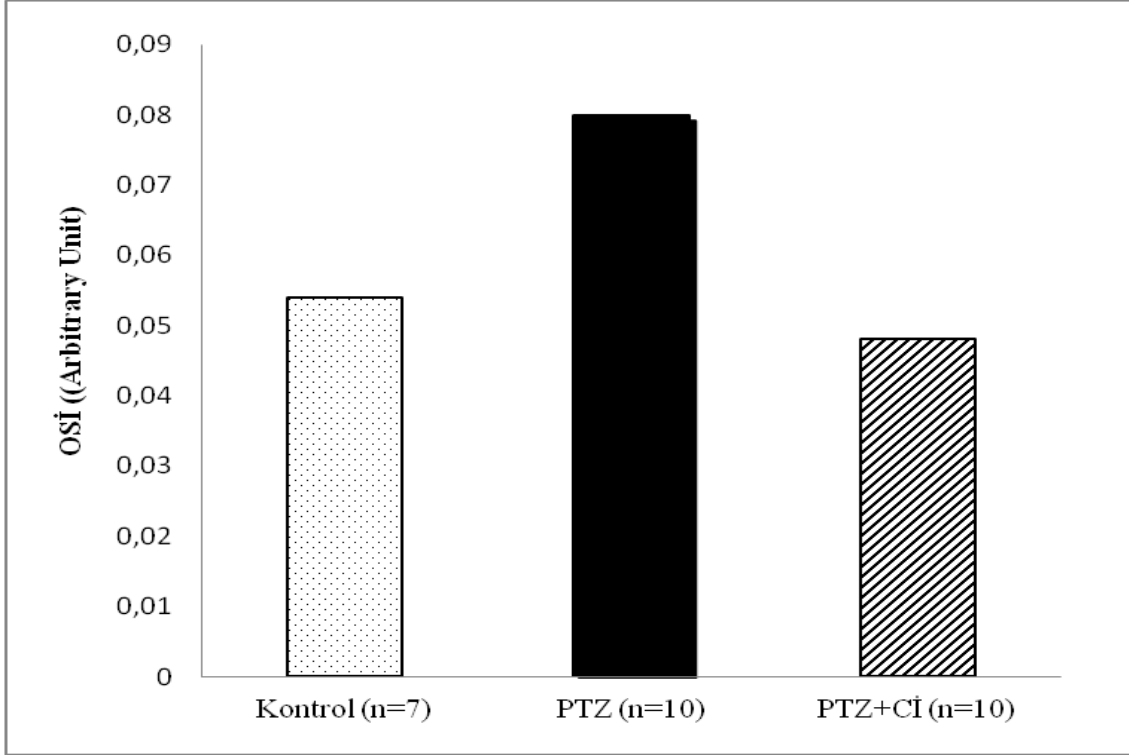
Doku oksidatif stres değerleri Anti 8 hydroxyguanosine kullanılarak immunohistokimyasal metodlarla çalışıldı. Ancak sonuç elde edilemedi.



Şekil 11. Gruplara ait TOS değerleri. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.



Şekil 12. Gruplara ait TAS değerleri. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.



**Şekil 13.** Gruplara ait OSİ değerleri. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.

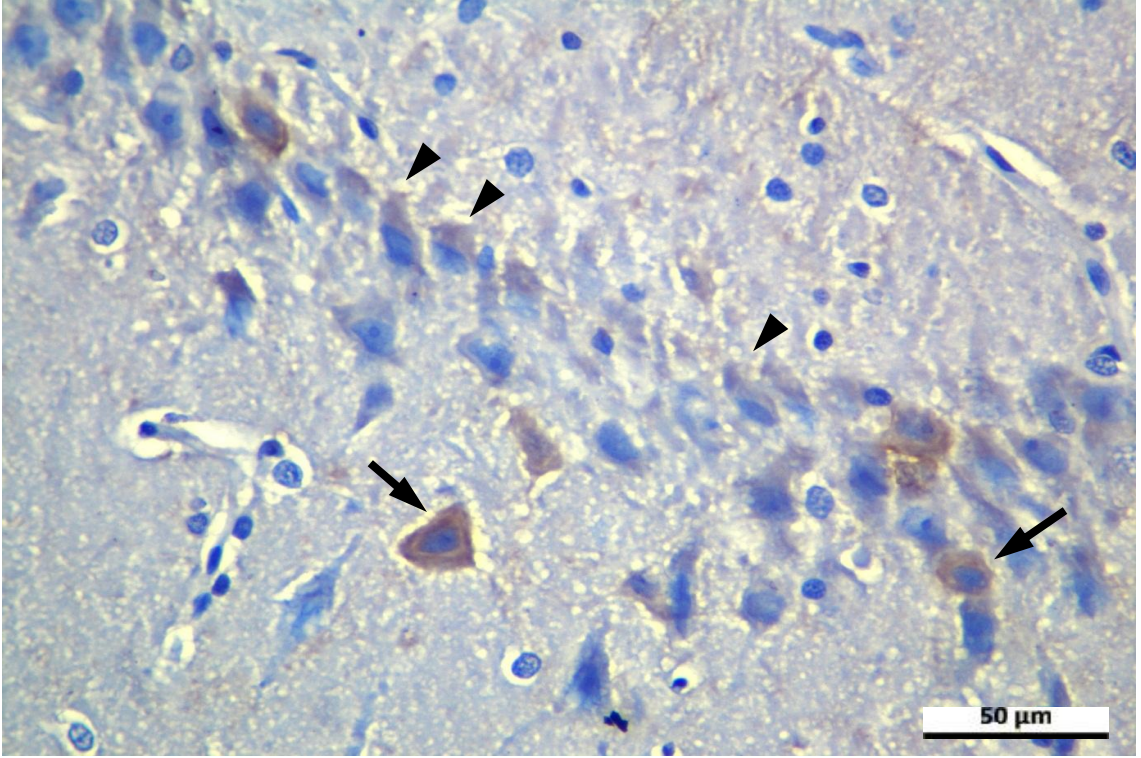
**Tablo 11.** Serum TAS, TOS ve OSİ değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

	Grup	Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Mak.	p
TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/ L)	Kontrol	5,33	5,97	1,771	4,3400	9,5100	,493
	PTZ	8,54	12,20	10,483	3,6000	34,1500	
	PTZ+Çİ	8,53	19,29	18,121	3,7900	47,7900	
TAS (mmol troloks Eqv/L)	Kontrol	1,20	1,09	,198	,8500	1,2900	,117
	PTZ	1,24	1,63	,829	,6400	2,8400	
	PTZ+Çİ	1,41	2,00	1,093	,6400	3,6000	
OSİ (Arbitrary Unit)	Kontrol	,054	,057	,0241	,0347	,1081	0,797
	PTZ	,080	,080	,0704	,0297	,2542	
	PTZ+Çİ	,048	,085	,0489	,0301	,1620	

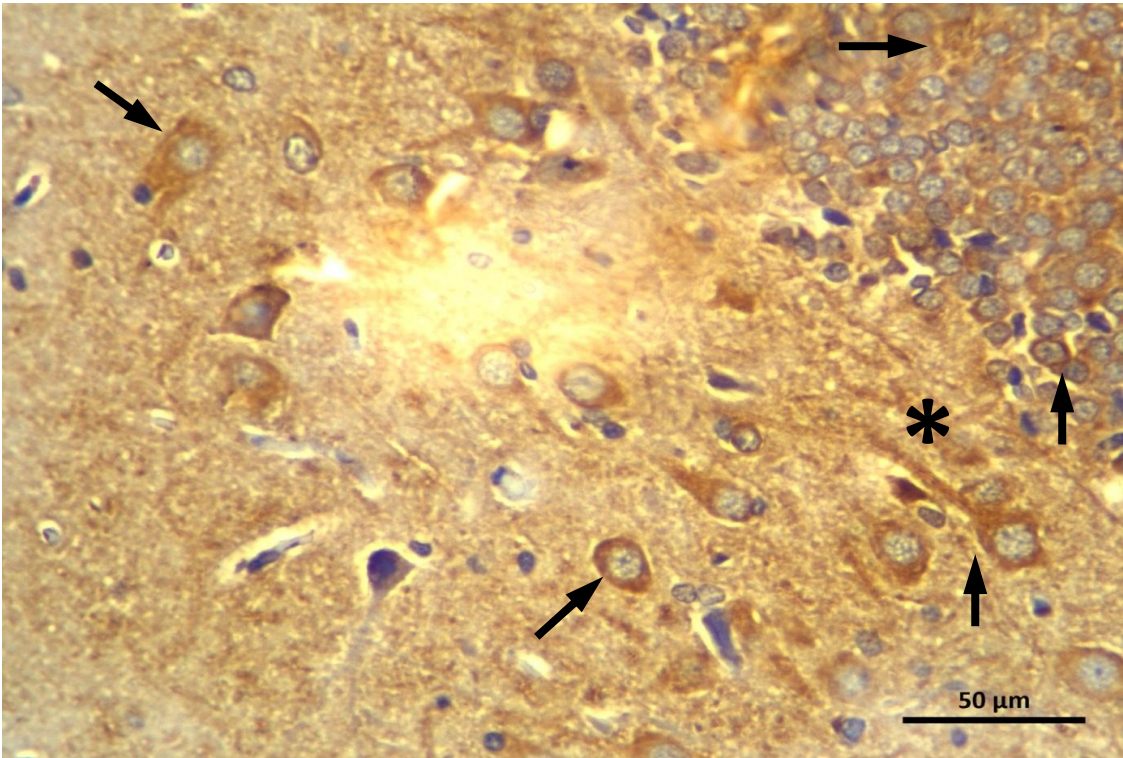
### 4.3. GABA<sub>A</sub> Reseptör İmmunohistokimyası

Hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör immunohistokimyası bakımından kontrol grubunda, nöronlarda kuvvetli (ok) ve zayıf (ok başı) immünreaktivite tespit edilirken (Şekil 14). PTZ grubunda, nöron gövdelerinde (ok) ve nöronal uzantılarda (\*) kuvvetli immünreaktivite tespit edildi (Şekil 15). PTZ+Çİ grubunda da Kontrol grubuna benzer biçimde nöronlarda kuvvetli (ok) ve zayıf (ok başı) immünreaktivite tespit edildi (Şekil 16).

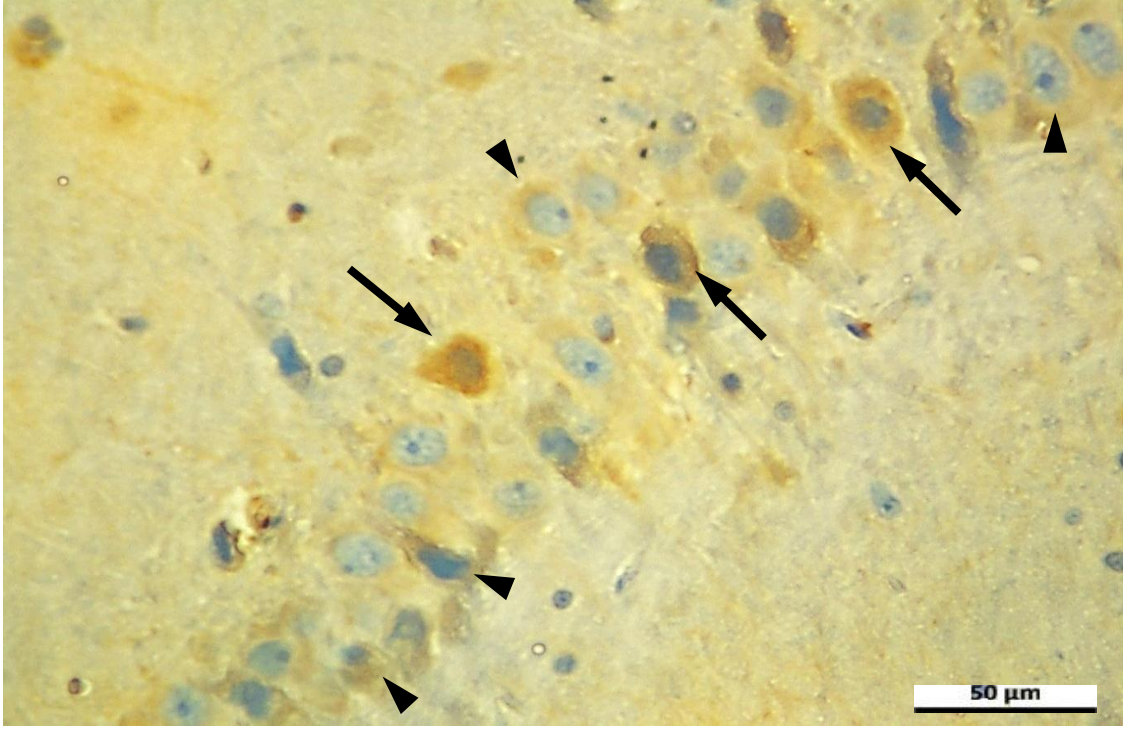




Şekil 14. Kontrol grubuna ait hipokampus hücrelerinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitifliği (GABA<sub>A</sub> immünohistokimyası, Bar skalası= 50 μm).

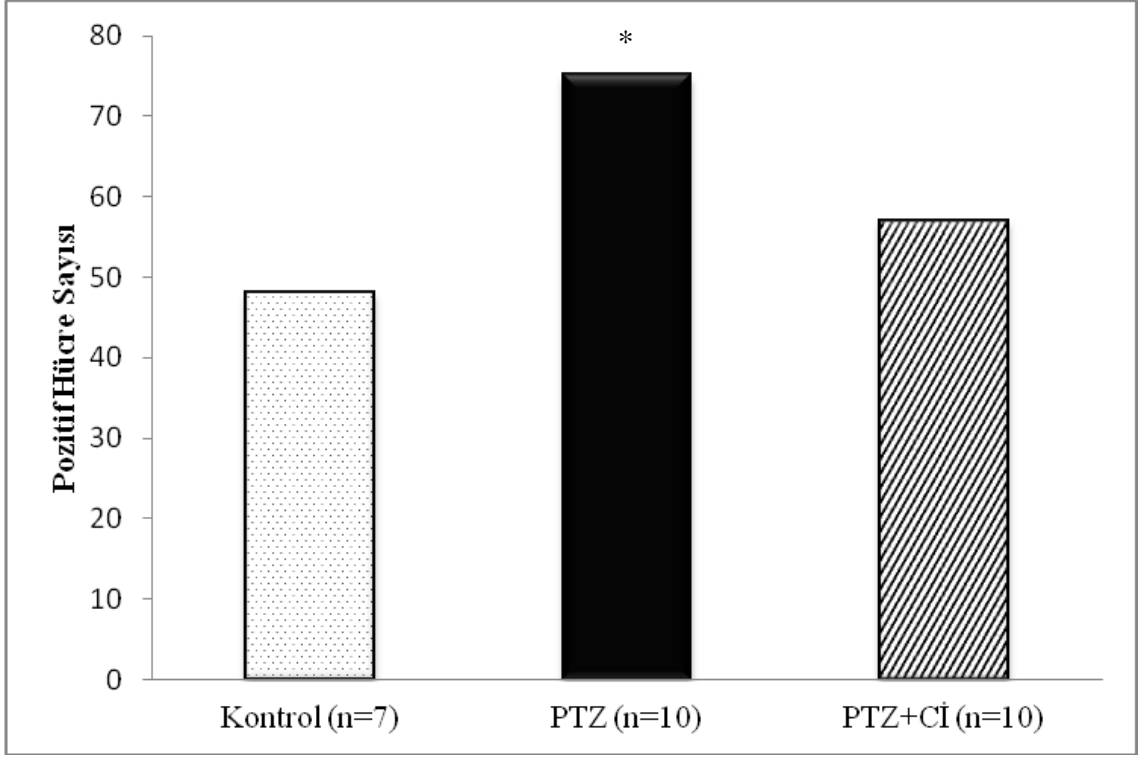


Şekil 15. PTZ grubuna ait hipokampus hücrelerinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitifliği (GABA<sub>A</sub> immünohistokimyası, Bar skalası= 50 μm).

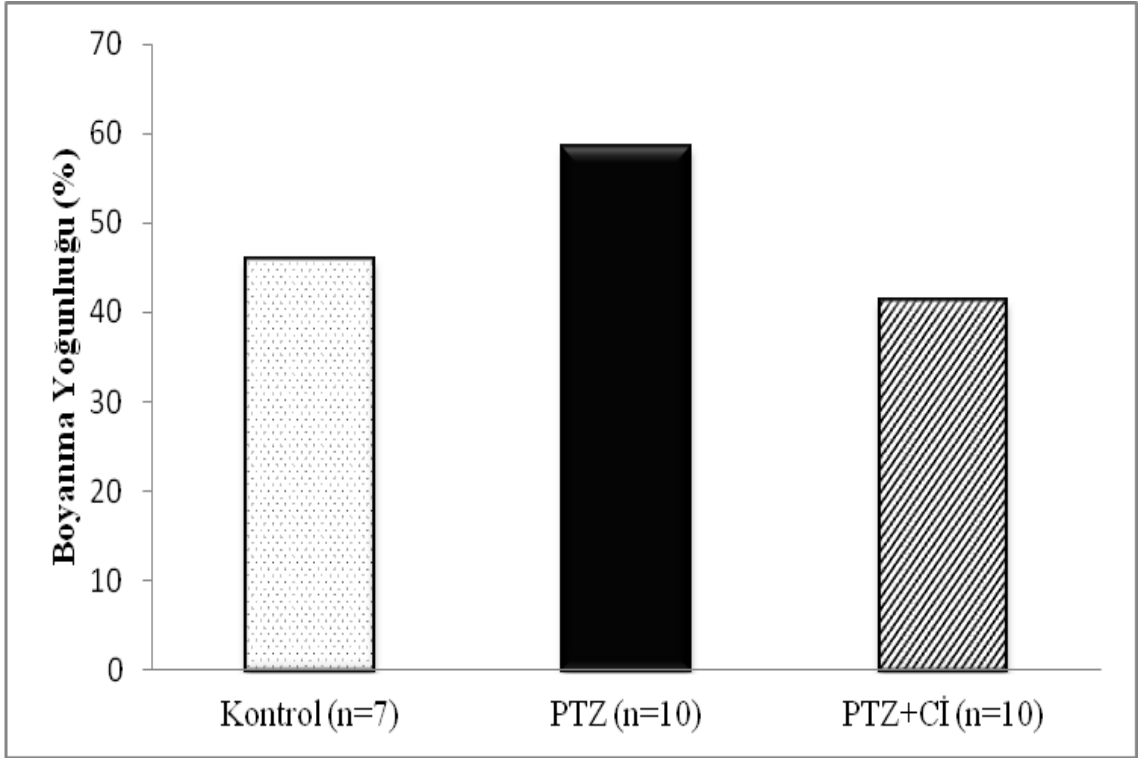


**Şekil 16.** PTZ+CI grubuna ait hipokampus hücrelerinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitifliği (GABA<sub>A</sub> immünohistokimyası, Bar skalası= 50 μm).

PTZ grubu, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hipokampusta, GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısının istatistik olarak anlamlı biçimde arttığı bulundu (Tablo 12). PTZ+CI grubu ise hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı bakımından gerek Kontrol gerekse PTZ grubundan istatistik olarak farklı bulunmadı (Şekil 17). Hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücrelerde, boyanma yoğunluğu bakımından, gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 18).



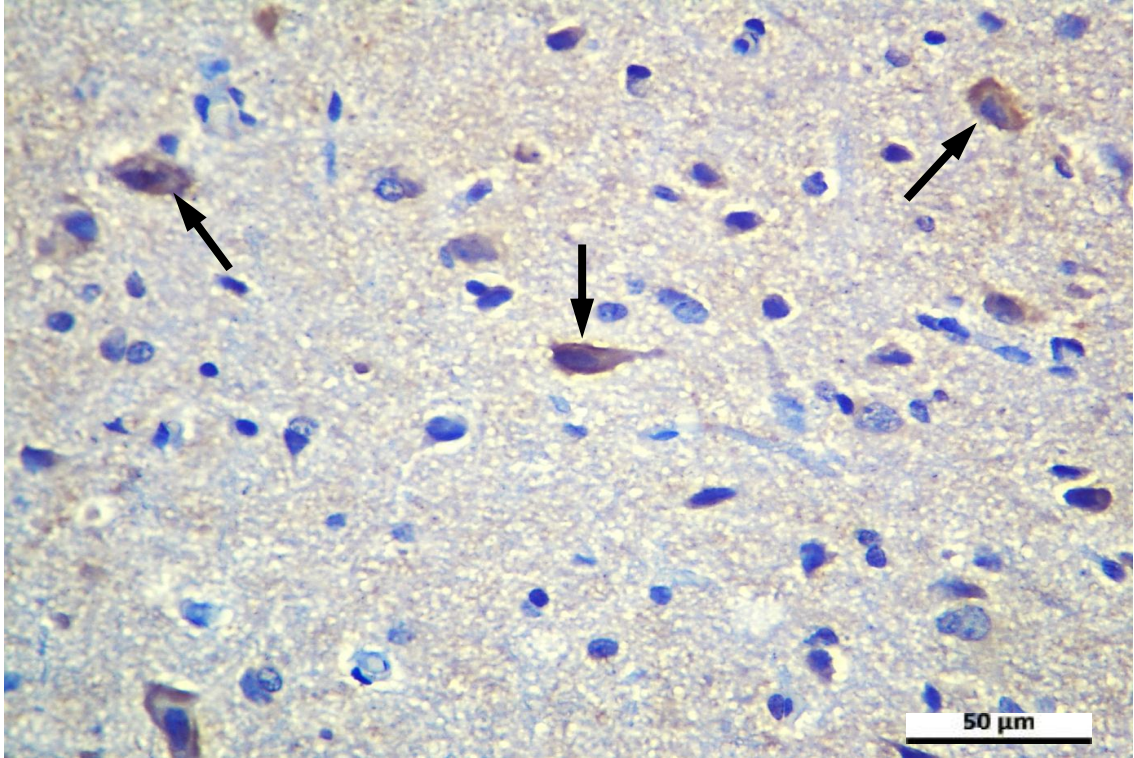
**Şekil 17.** Hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir. \*, kontrol grubu ile deney grubu arasındaki istatistiksel farkı (P<0.05) ifade etmektedir.



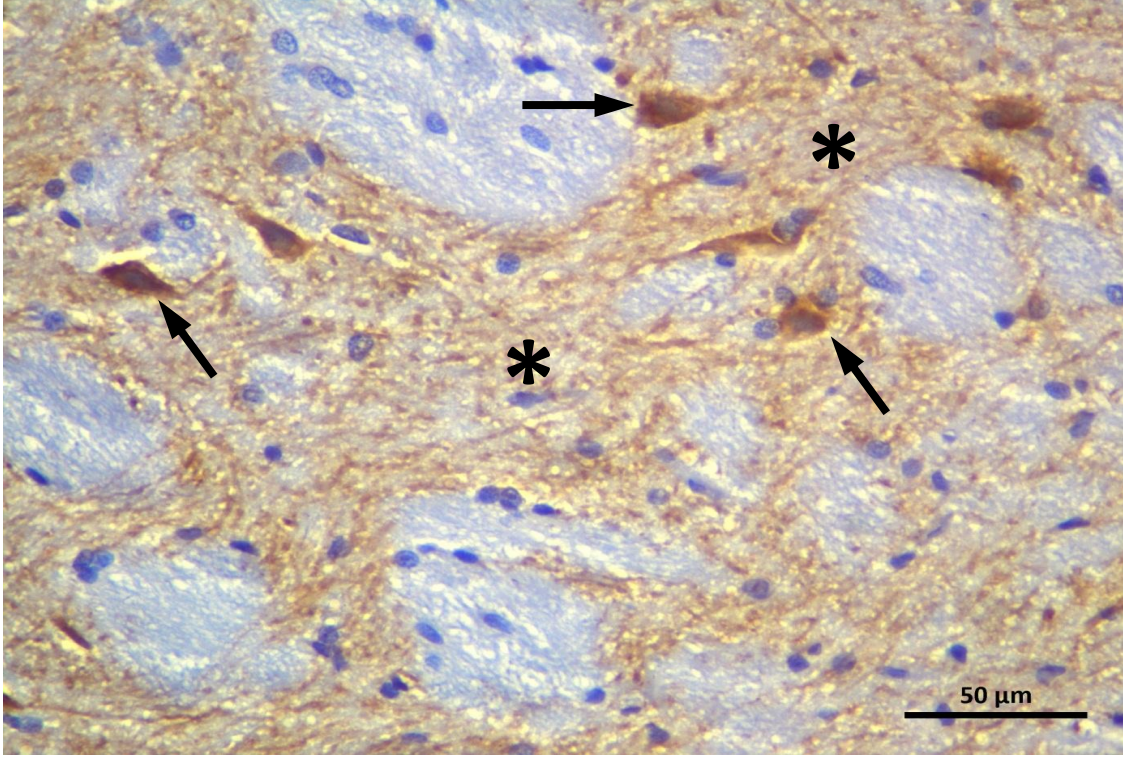
**Şekil 18.** Hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücrelerde boyanma yoğunluğu. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.

Tüm beyinde, GABA<sub>A</sub> reseptör immunohistokimyası çalışıldı. Kontrol grubunda, az sayıda boyanmış nöronlarda kuvvetli (ok) immünreaktivite tespit edildi (Şekil 19). PTZ grubunda, nöron gövdelerinde (ok) ve nöronal uzantılarda (\*) kuvvetli immünreaktivite tespit edildi (Şekil 20). PTZ+Cİ grubunda, nöron gövdelerinde (ok) ve nöronal uzantılarda (\*) kuvvetli immünreaktivite tespit edildi (Şekil 21).

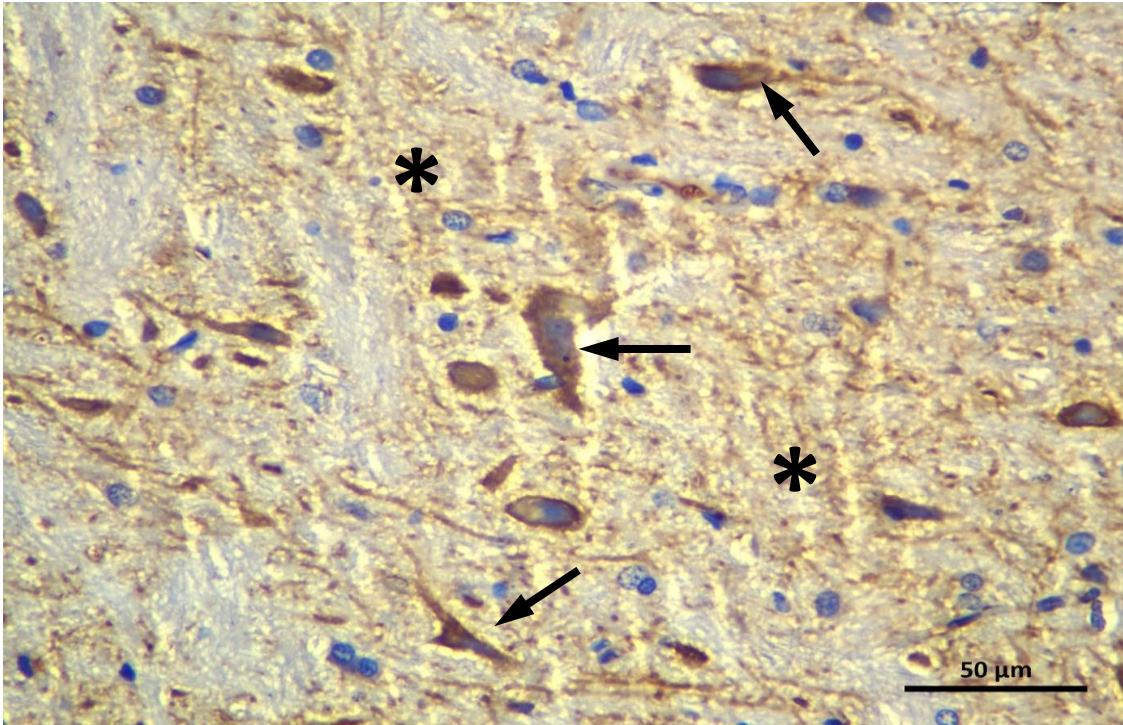
Tüm beyinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı bakımından PTZ ve PTZ+Cİ gruplarında, kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı olmasa da bir artış eğilimi görülmektedir (Şekil 22). Tüm beyinde, GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücrelerde, boyanma yoğunluğu bakımından, kontrol grubu ile kıyaslandığında PTZ ve PTZ+Cİ grubunda istatistik olarak anlamlı ( $p<0.01$ ) bir artış olduğu gözlenmektedir (Şekil 23).



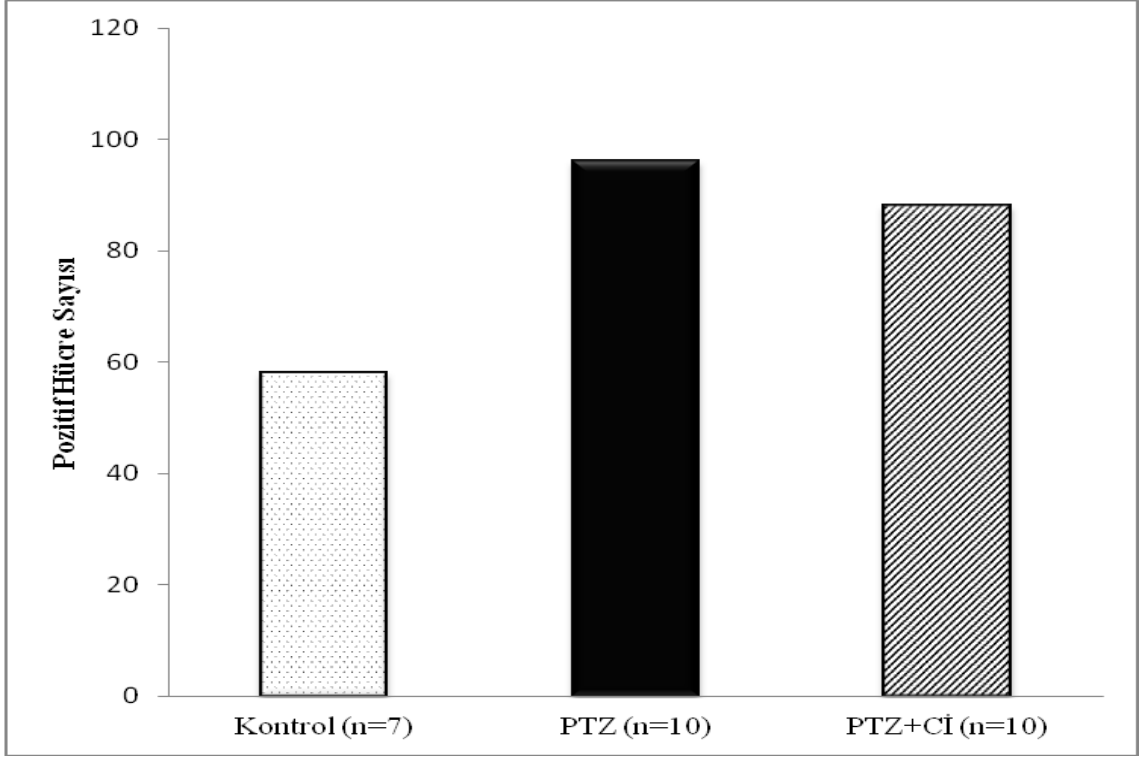
**Şekil 19.** Kontrol grubuna ait beyin hücrelerinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitifliği (GABA<sub>A</sub> immünohistokimyası, Bar skalası= 50 μm).



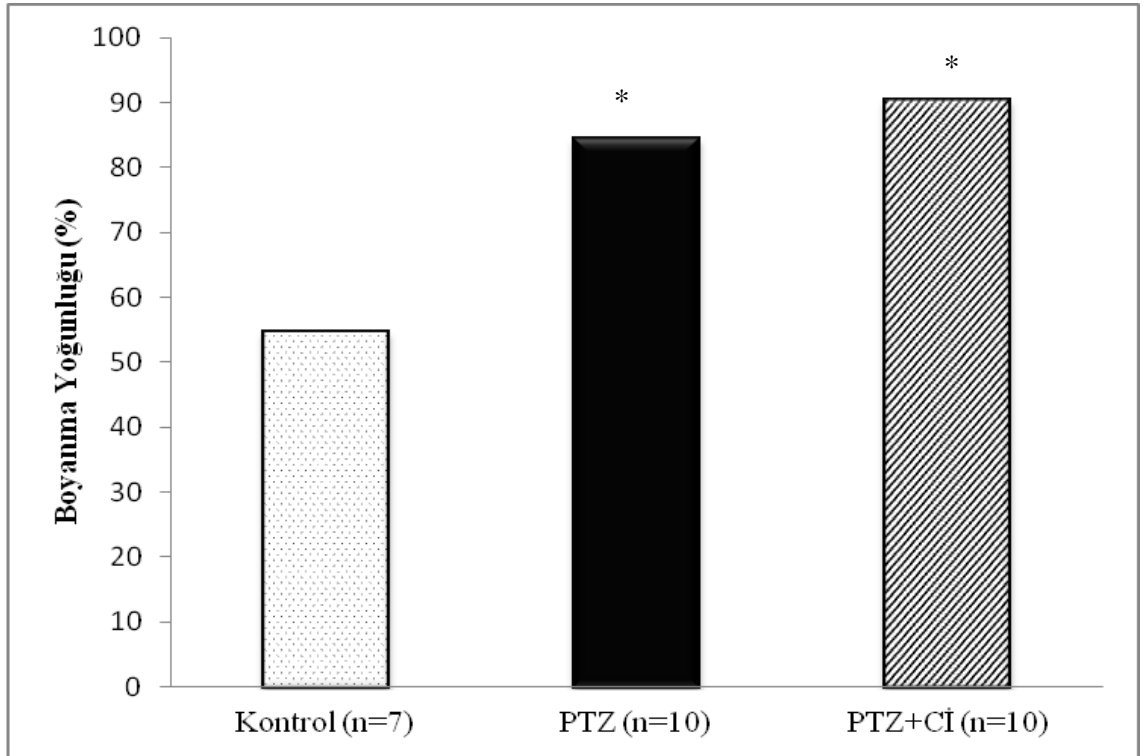
**Şekil 20.** PTZ grubuna ait beyin hücrelerinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitifliği (GABA<sub>A</sub> immünohistokimyası, Bar skalası= 50 μm).



**Şekil 21.** PTZ+CI grubuna ait beyin hücrelerinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitifliği (GABA<sub>A</sub> immünohistokimyası, Bar skalası= 50 μm).



**Şekil 22.** Tüm beyinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.



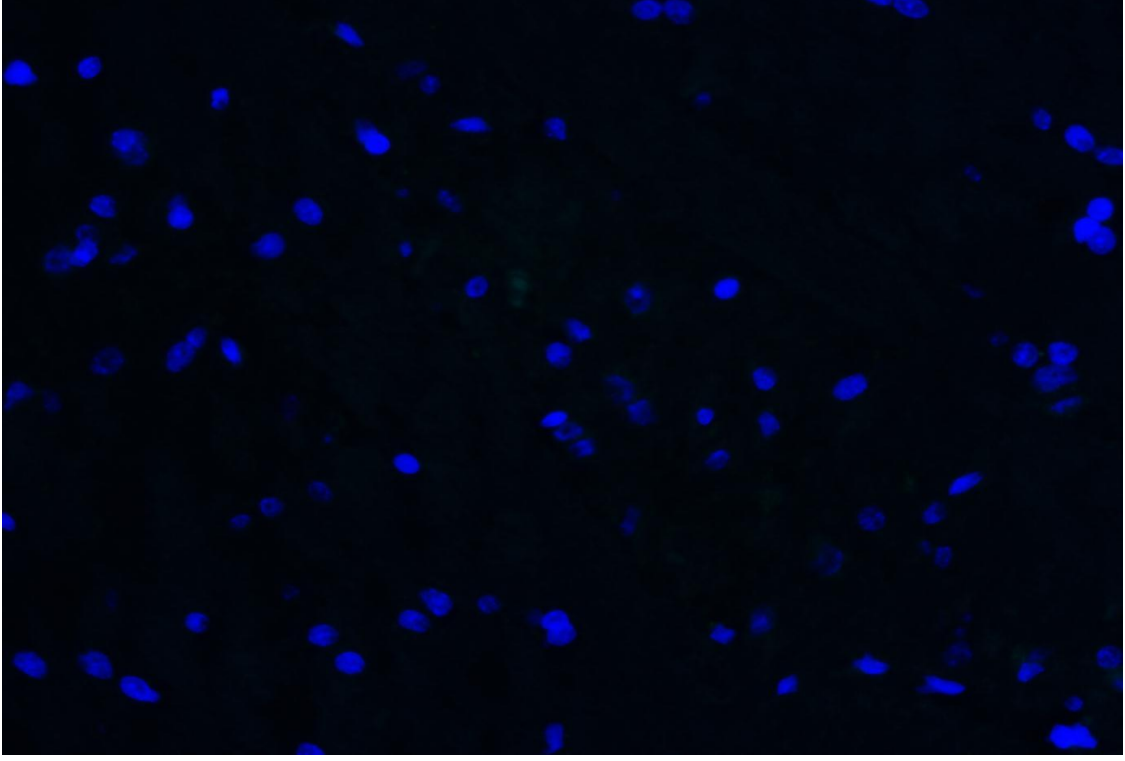
**Şekil 23.** Tüm beyinde GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücrelerde boyama yoğunluğu. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir. \*, kontrol grubu ile deney grubu arasındaki istatistiksel farkı ( $P < 0.05$ ) ifade etmektedir.

**Tablo 12.** Tüm beyin ve hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı ve GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücrelerde boyanma yoğunluğu değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

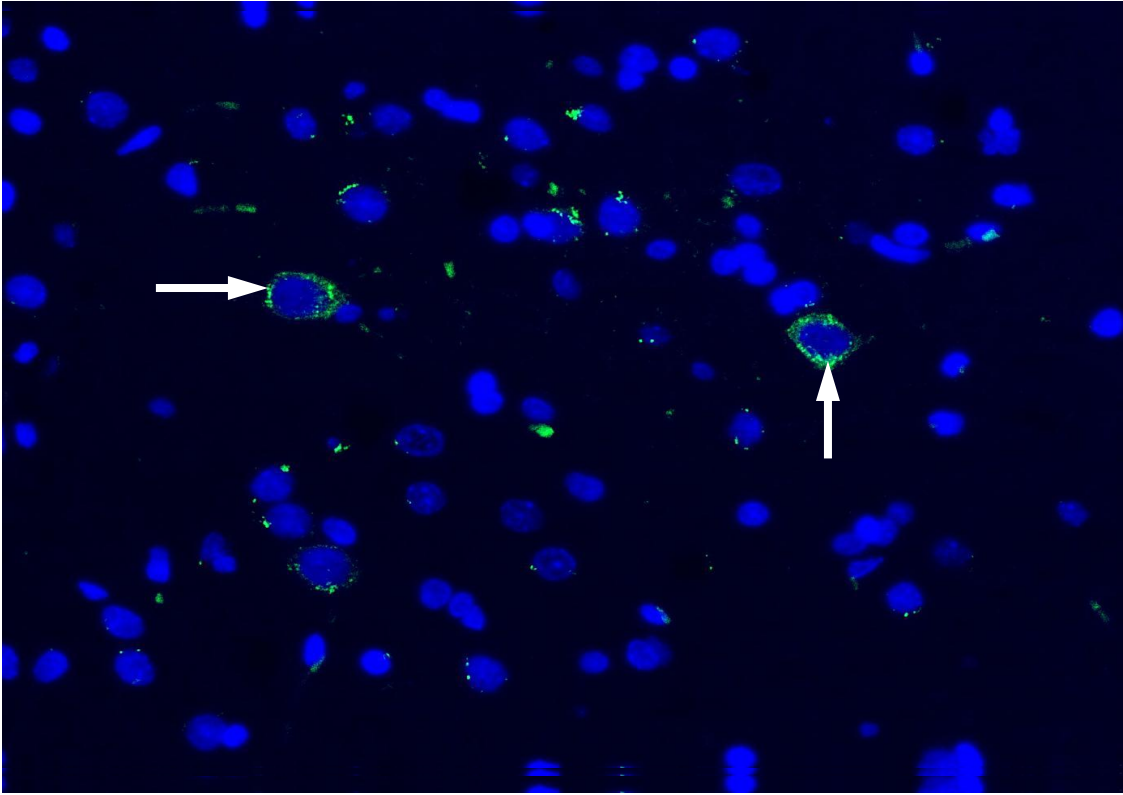
	<b>Gruplar</b>	<b>Medyan</b>	<b>Ort.</b>	<b>St. Sap.</b>	<b>Min.</b>	<b>Mak</b>	<b>p</b>
Pozitif Hücre Sayısı (Hipokampus)	<b>Kontrol</b>	48,00 <sup>b</sup>	43,67	22,56	10,00	66,00	,044*
	<b>PTZ+Cİ</b>	57,00 <sup>ab</sup>	60,30	36,88	12,00	123,00	
	<b>PTZ</b>	75,00 <sup>a</sup>	76,11	20,39	34,00	110,00	
Pozitif Hücre Sayısı (Beyin)	<b>Kontrol</b>	58,00	58,57	22,83	24,00	91,00	,024
	<b>PTZ+Cİ</b>	88,00	83,30	21,56	45,00	108,00	
	<b>PTZ</b>	96,00	91,89	17,16	58,00	112,00	
Boyanma Yoğunluğu (Hipokampus)	<b>Kontrol</b>	45,90	41,59	18,53	8,13	58,26	,061
	<b>PTZ+Cİ</b>	41,33	42,06	9,33	23,41	57,77	
	<b>PTZ</b>	58,49	55,34	15,69	26,34	74,53	
Boyanma Yoğunluğu (Beyin)	<b>Kontrol</b>	54,62 <sup>b</sup>	57,83	16,70	38,84	89,14	,004*
	<b>PTZ+Cİ</b>	90,25 <sup>a</sup>	88,90	7,08	77,19	98,11	
	<b>PTZ</b>	84,33 <sup>a</sup>	85,61	4,16	80,18	92,63	

#### 4.4. In Situ DNA Fragmentasyon Analizi (TUNEL) Bulguları

Gruplara ait TUNEL pozitif işaretlenmeler Şekil 24, 25 ve 26’de görülmektedir. In Situ DNA fragmentasyon analizi (TUNEL boyaması) sonucu Kontrol grubuna ait kesitte (tüm beyin) TUNEL pozitif işaretlenme görülmedi (Şekil 24). PTZ grubuna ait kesitte çok az sayıda hücrede TUNEL pozitif işaretlenme (ok) görüldü (Şekil 25). PTZ+Cİ grubuna ait kesitte ise benzer biçimde çok az sayıda hücrede TUNEL pozitif işaretlenme (ok) görüldü (Şekil 26). TUNEL pozitif hücre sayısı bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 13).

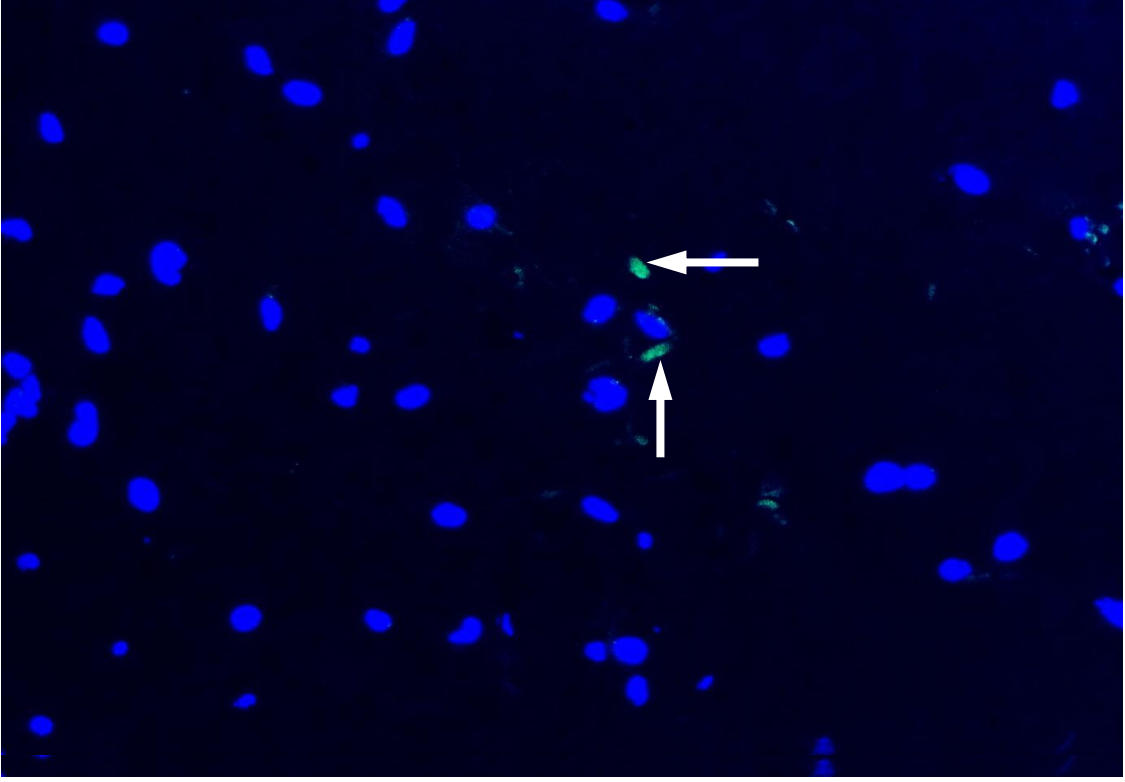


**Şekil 24.** TUNEL negatif boyanma gösteren kontrol grubuna ait tüm beyin dokusu hücreleri (TUNEL boyama, Bar skalası=50µm).



**Şekil 25.** TUNEL pozitif boyanma gösteren PTZ grubuna ait tüm beyin dokusu hücreleri (TUNEL boyama, Bar skalası=50µm).





**Şekil 26.** Tünel pozitif boyanma gösteren PTZ+Cİ grubuna ait tüm beyin dokusu hücreleri (TUNEL boyaması, Bar skalası=50µm).

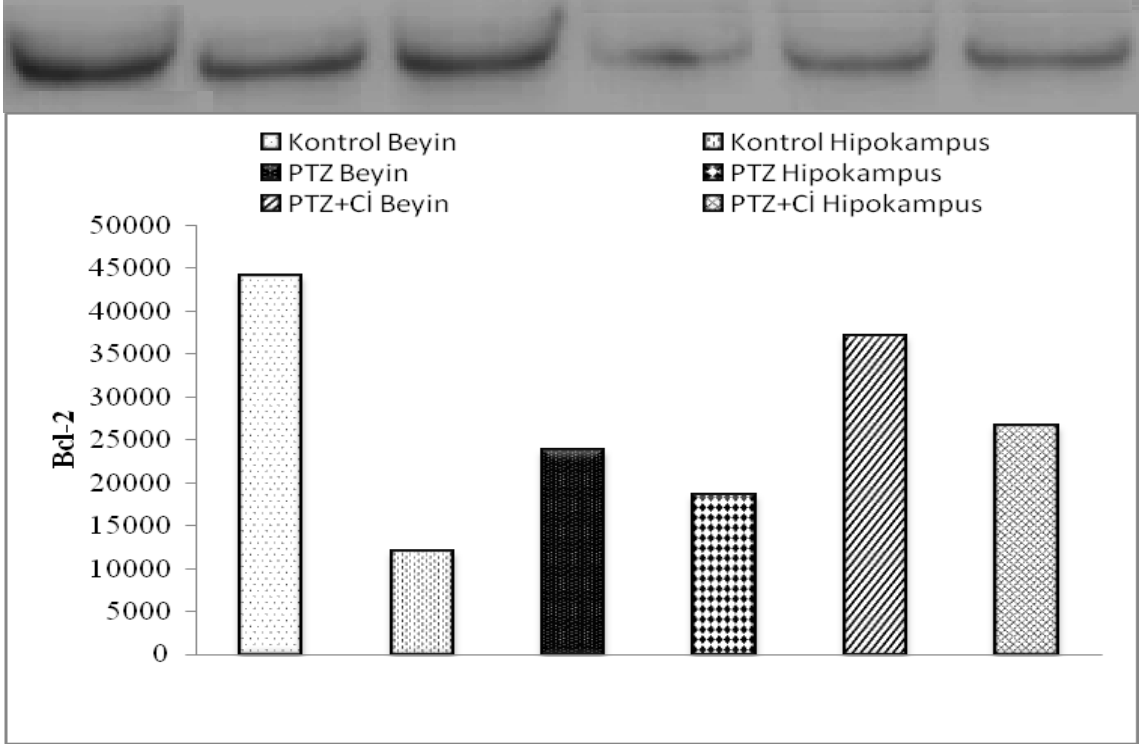
**Tablo 13.**TUNEL pozitif hücre sayısı değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

	Medyan	Ortalama	St. Sap.	Min.	Mak.	p
<b>Kontrol</b>	1	,70	,67	0	2	0,531
<b>PTZ</b>	1	,80	,79	0	2	
<b>PTZ+Cİ</b>	1	,80	,79	0	2	

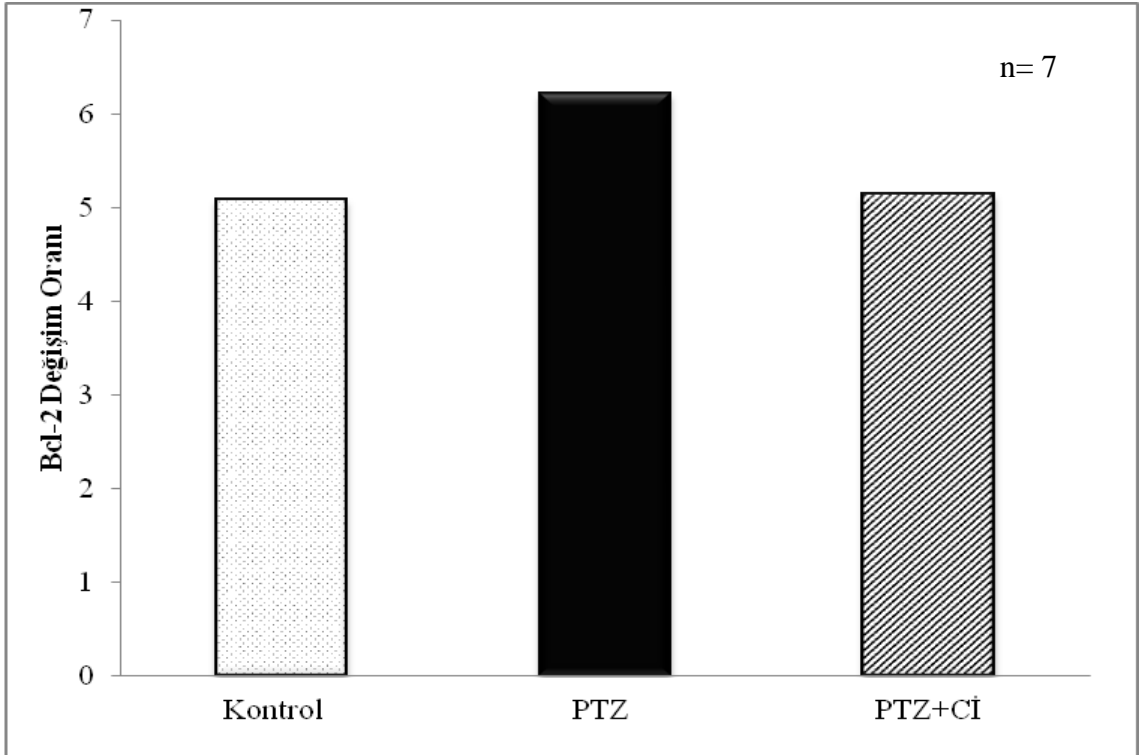
#### 4.5. Western Blot Bulguları

##### 4.5.1. Western blot ile elde edilmiş Bcl-2 değerleri

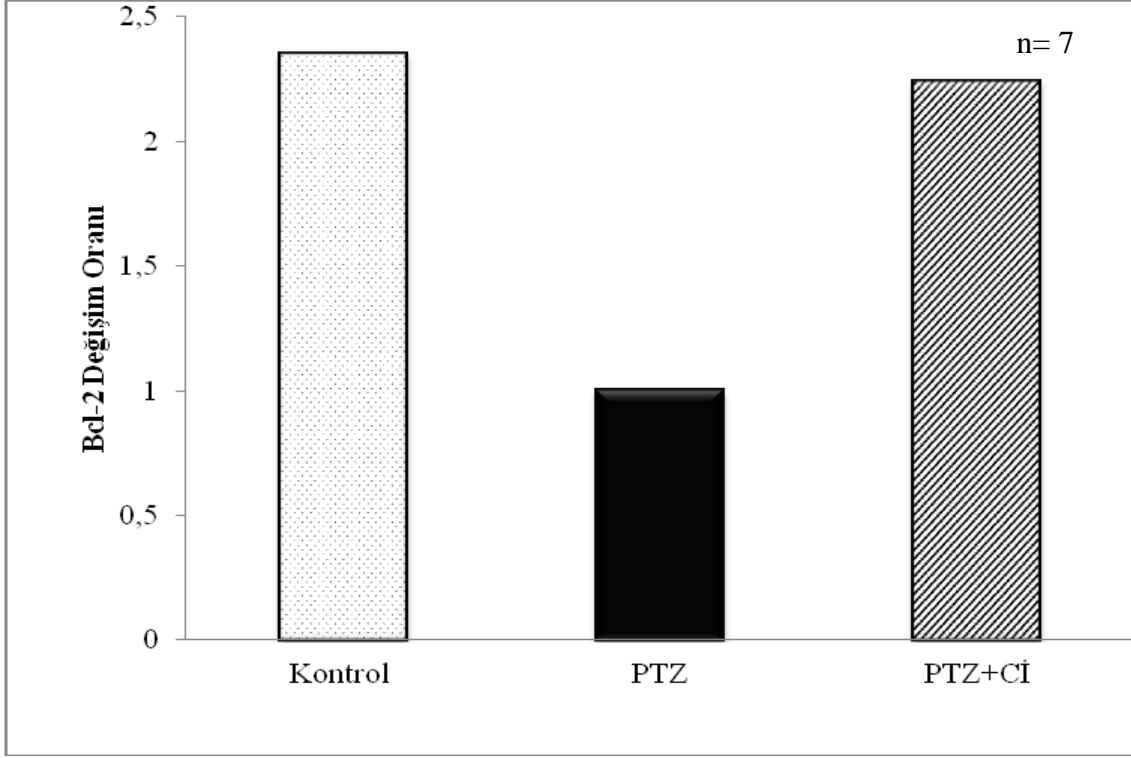
Tüm beyin ve hipokampusta Bcl-2 protein değerleri bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmadı (Tablo 14). Grafiklerde (Şekil 27, 28, 29) ve Tablo 14'te de görüldüğü üzere kontrol grubu ile PTZ+Cİ grubundaki ratlara ait hem tüm beyin hem de hipokampustaki Bcl-2 değerleri oldukça yakın bulundu.



Şekil 27. Bcl-2'ye ait Western Blot örneği



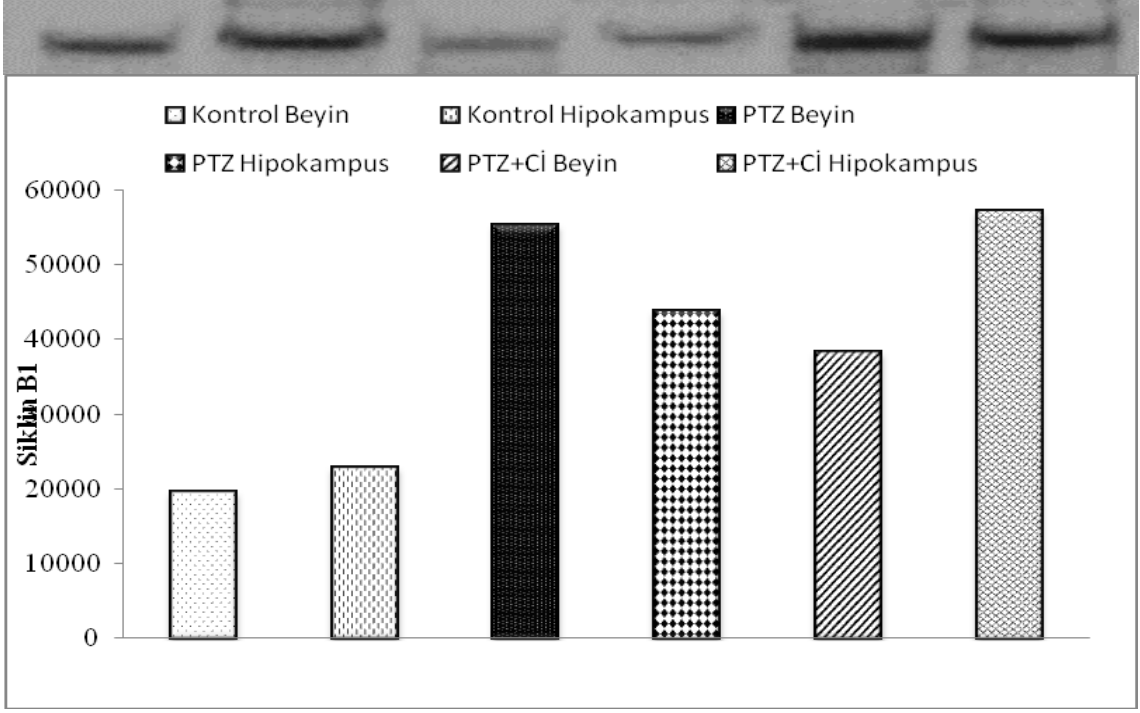
Şekil 28. Tüm beyin dokusuna ait Bcl-2 Western blot sonuçları. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.



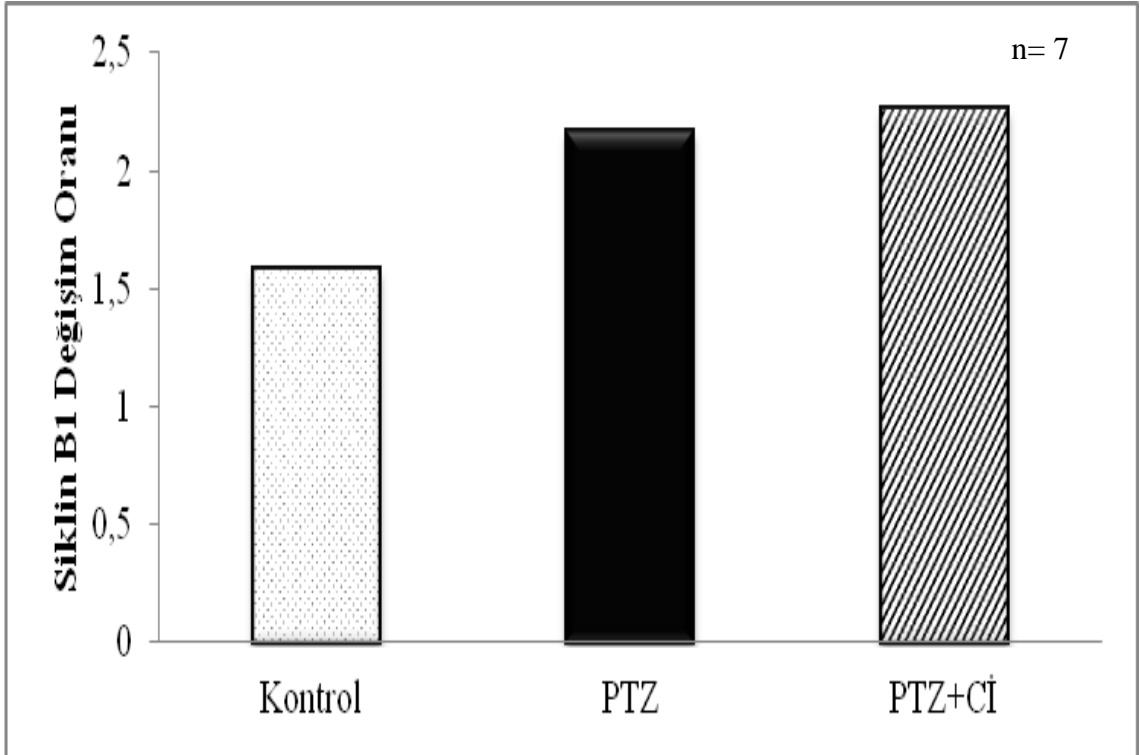
**Şekil 29.** Hipokampus dokusuna ait Bcl-2 Western blot sonuçları. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.

#### 4.5.2. Western blot ile elde edilmiş Siklin B1 değerleri

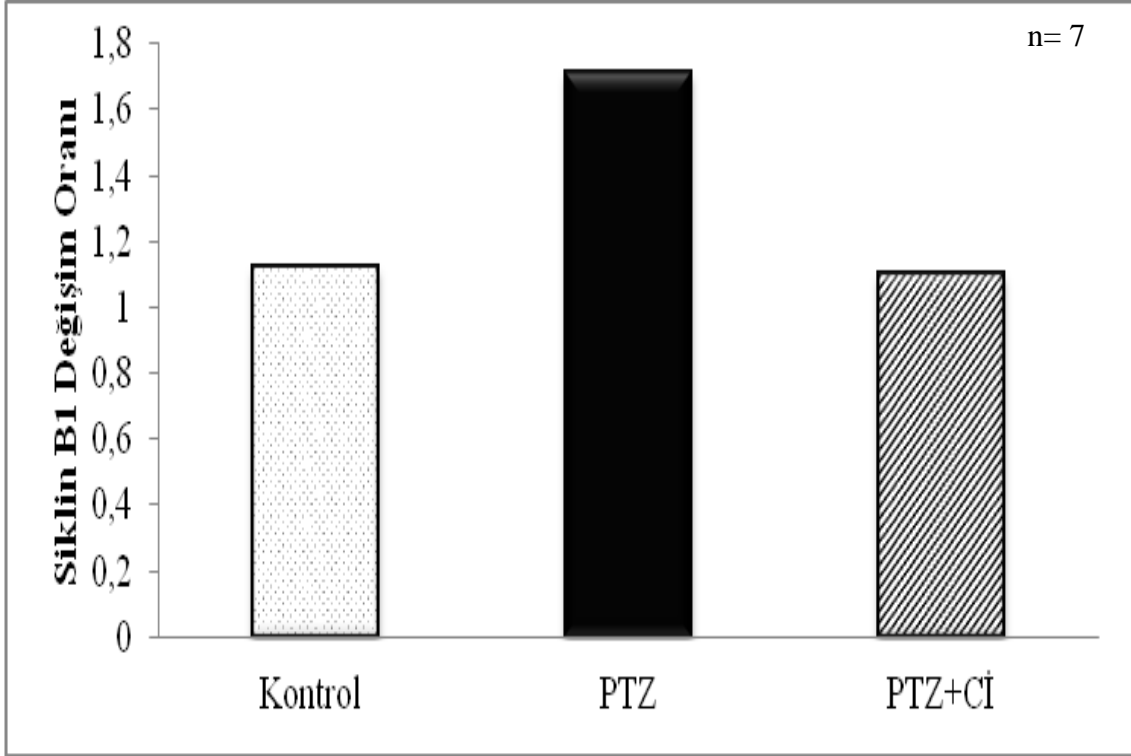
Tüm beyin ve hipokampusta Siklin B1 protein değerleri bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmadı (Tablo 14). Şekil 32 ve Tablo 14'te de görüldüğü üzere hipokampustaki Siklin B1 değerleri bakımından kontrol grubu ile PTZ+CI grubundaki ratlara ait değerler oldukça yakın bulundu.



Şekil 30. Siklin B1'e ait Western Blot örneği



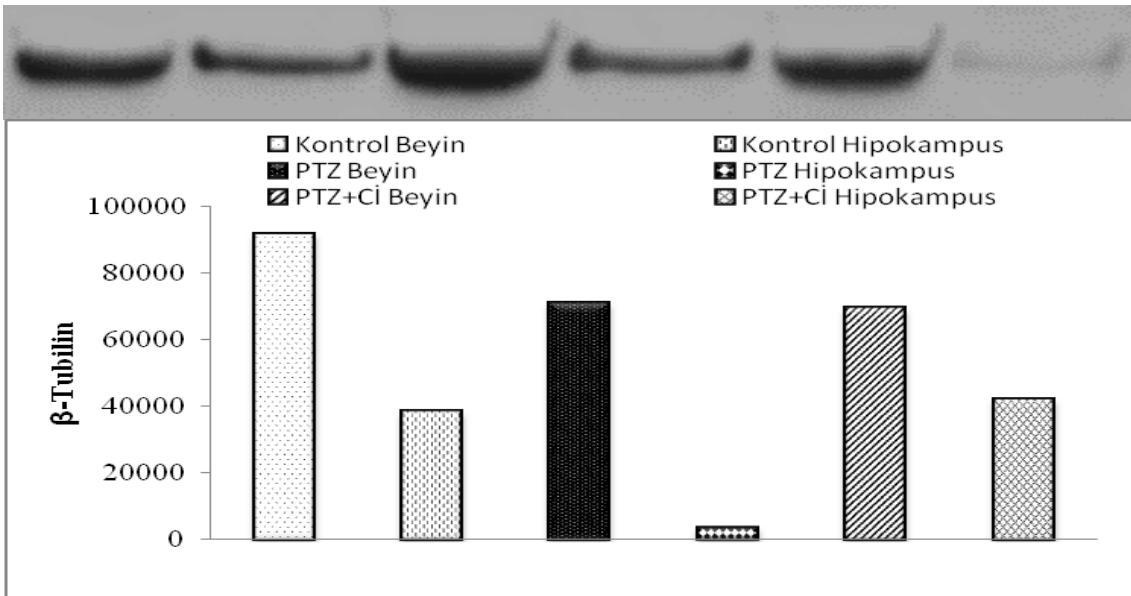
Şekil 31. Tüm beyin dokusuna ait Siklin B1 Western blot sonuçları. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.



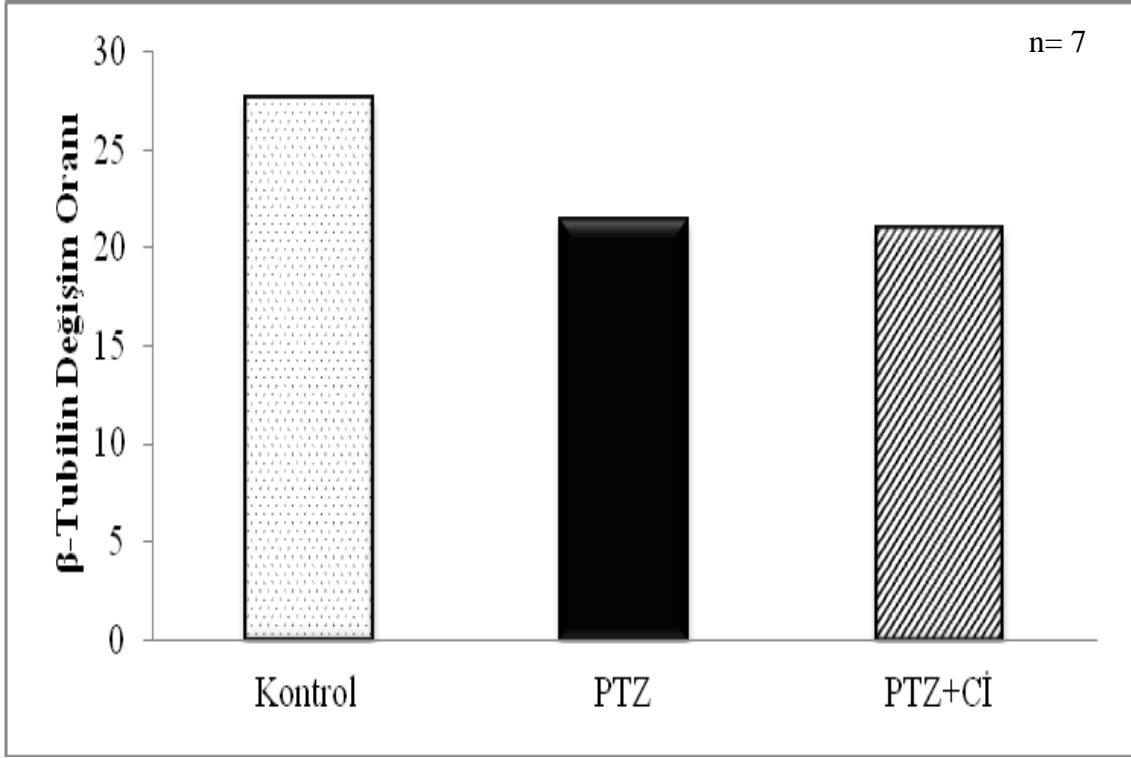
**Şekil 32.** Hipokampus dokusuna ait Siklin B1 Western blot sonuçları. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.

#### 4.5.3. Western blot ile elde edilmiş $\beta$ -Tubulin değerleri

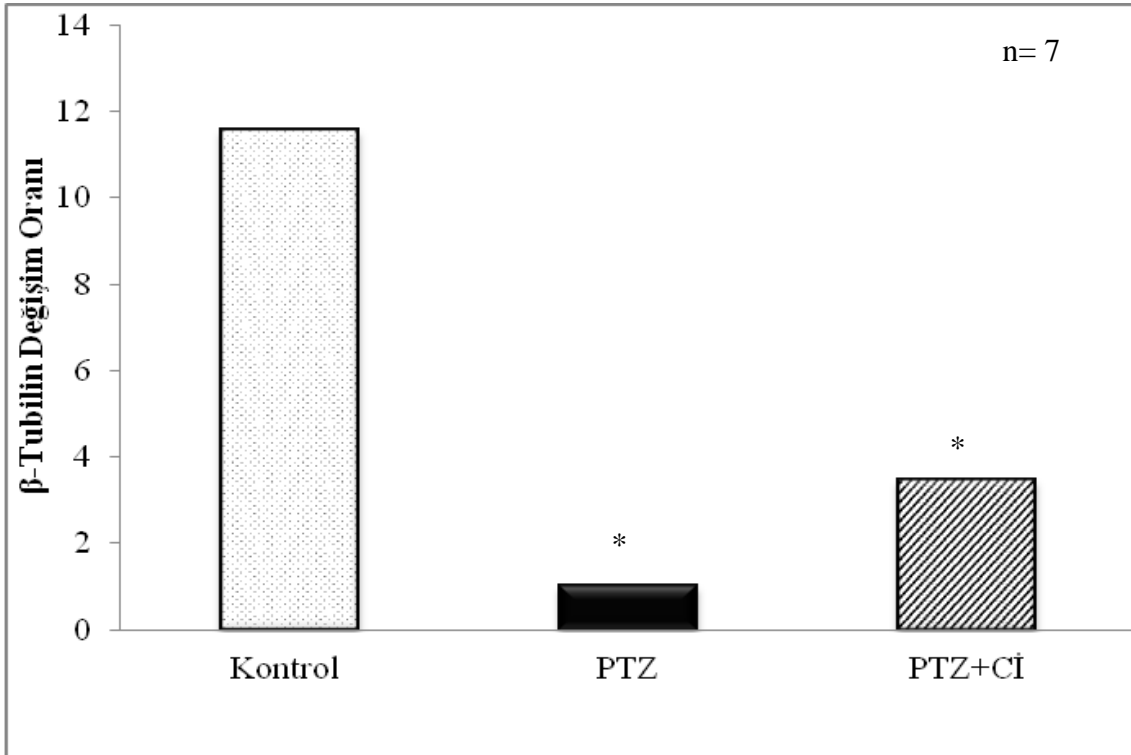
Tüm beyinde  $\beta$ -Tubulin protein değerleri bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmazken, hipokampusta  $\beta$ -Tubulin protein değerleri bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir fark bulundu (Şekil 34 ve 35, Tablo 14).



**Şekil 33.**  $\beta$ -Tubulin'e ait Western Blot örneği



**Şekil 34.** Tüm beyin dokusuna ait  $\beta$ -Tubulin Western blot sonuçları. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.



**Şekil 35.** Hipokampus dokusuna ait  $\beta$ -Tubulin Western blot sonuçları. Veriler medyan değeri olarak ifade edilmektedir.

**Tablo14.** Tüm beyin ve hipokampusta Western blot ile elde edilmiş Bcl-2, Siklin B1 ve  $\beta$ -Tubulin değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

	Grup	Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Mak	p
Bcl-2 tüm beyin	Kontrol	5,08	5,26	2,455	1,4677	9,4298	,956
	PTZ+Cİ	5,14	7,49	7,235	1,0161	22,4353	
	PTZ	6,20	7,91	7,102	1,2258	19,0540	
Bcl-2 hipokampus	Kontrol	2,35	2,62	1,872	1,0000	6,1741	,238
	PTZ+Cİ	2,24	3,10	2,162	1,0000	6,8110	
	PTZ	1,00	1,59	,862	1,0000	3,0935	
Siklin B1 tüm beyin	Kontrol	1,58	2,27	1,735	,0000	4,1833	,589
	PTZ+Cİ	2,26	2,76	1,228	1,4585	4,6549	
	PTZ	2,16	2,46	1,558	1,0000	5,5881	
Siklin B1 hipokampus	Kontrol	1,12	1,25	1,003	,0000	3,3267	,424
	PTZ+Cİ	1,10	1,59	,794	1,0000	2,9282	
	PTZ	1,71	1,76	,669	1,0000	2,6733	
$\beta$ -Tubulin tüm beyin	Kontrol	27,65	27,40	25,626	1,7254	71,6772	,974
	PTZ+Cİ	20,90	35,53	34,709	1,6534	89,4737	
	PTZ	21,36	29,47	25,436	1,1612	62,8165	
$\beta$ -Tubulin hipokampus	Kontrol	11,54 <sup>a</sup>	20,80	23,685	1,3217	64,7661	,005*
	PTZ+Cİ	3,46 <sup>b</sup>	16,35	24,082	1,0000	66,4557	
	PTZ	1,00 <sup>b</sup>	0,88	,394	,0000	1,1696	

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. Epileptik Nöbet Aktivitenin Değerlendirilmesi

PTZ'nin, GABA<sub>A</sub> reseptörlerini bloke ederek etkisini gösterdiği ileri sürülmektedir (Corda, 1991). PTZ ile indüklenen kimyasal kindling nöbetleri, insan absans epilepsisi ve miyoklonik, jeneralize tonik klonik (primer jeneralize) epilepsi nöbetlerinin (Rossi, 1996) bir hayvan modelidir (Wu ve ark., 2006). PTZ kindling ile elde edilen epilepsi modeli, ilaca karşı dirençli bir epilepsi modeli olarak kullanılmaktadır (Ali ve ark., 2005).

PTZ+Cİ grubunda epileptik nöbet aktivitesi oluşumunun PTZ grubuna kıyasla daha geç (5. enjeksiyonda) gerçekleştiği tespit edildi. İkinci ve dördüncü enjeksiyonlarda, PTZ grubundaki ratların nöbet skorları PTZ+Cİ grubuna göre istatistik olarak anlamlı biçimde yüksek bulundu. Sadece 8. enjeksiyonda PTZ+Cİ grubundaki ratların nöbet skorlarının PTZ grubuna kıyasla istatistik olarak anlamlı biçimde yüksek olduğu bulundu. Bu sonuçlar bitki tedavisinin epileptogenezi geciktirdiğini ve ayrıca nöbet aktivitesini azalttığını göstermektedir.

On ikinci gün yani konvulzan dozda (75 mg/kg) enjeksiyonun yapıldığı gün PTZ grubu aleyhine nöbet skorunda istatistik olarak anlamlı olmayan bir artış eğilimi gözlenmektedir. Onikinci günde görülen bu artış eğilimi, daha geniş bir denek grubu kullanılarak ya da daha yüksek dozda ekstrakt kullanılarak yapılacak olan bir çalışmada bu sonucun anlamlı çıkacağını düşündürmektedir.

Dört, sekiz ve dokuzuncu enjeksiyon günlerinde PTZ grubunun skor 3 ve üstü nöbetlerdeki latans periyodu, PTZ+Cİ grubuna kıyasla istatistik olarak anlamlı biçimde daha uzun bulundu. Aksine altı, on bir ve on ikinci enjeksiyonlarda PTZ+Cİ grubunun skor 3 ve üstü nöbetlere ait latans periyodunun PTZ grubuna kıyasla istatistik olarak anlamlı biçimde daha uzun bulundu. Bu sonuçlar bitki tedavisinin zamanla latans periyodunu geciktirici yönde olumlu bir etkiye neden olduğunu düşündürmektedir. Özellikle konvulzan dozun uygulandığı onikinci günde PTZ+Cİ grubunun latans periyodunun istatistik bakımdan anlamlı biçimde uzun bulunması, bitkinin nöbet aktivitesini geciktirici etkisinin konvulzan dozda bile geçerli olduğunu göstererek bu etkiyi kanıtlamaktadır.



## 5.2. Plazmada TAS, TOS, OSİ Değerlendirilmesi

Reaktif oksijen türleri (ROS) metabolik ve fizyolojik süreçlerde üretilirler ve organizmada zararlı oksidatif reaksiyonlar oluşturabilirler. Bunlar enzimatik ya da enzimatik olmayan anti oksidatif mekanizmalar yoluyla uzaklaştırılabilirler. Bazı koşullar altında oksidanlarda artış ve antioksidanlarda azalma engellenemez ve oksidatif/ anti oksidatif denge oksidatif duruma doğru kayar. Sonuç olarak, 100'den fazla düzensizliğe yol açan oksidatif stres gelişir. Antioksidan molekülleri bu zararlı reaksiyonları önler ya da inhibe eder. Farklı antioksidanların serum ya da plazma konsantrasyonları ölçülebilir (Erel, 2004). Antioksidanlar, hedef moleküldeki oksidatif hasarı engelleyen veya geciktiren hatta oluşan hasarı tamir eden maddelerdir. Endojen ya da eksojen kaynaklı antioksidanlar bir oksidatif olayın değişik basamaklarında etkili olabilirler (Kıyıcı ve Yücel, 2007). Oksidan molekülleri ise endojen olarak organizmalarda üretilir ayrıca dış çevreden de alınabilirler (Erel, 2005).

Son yıllarda çalışmalar, nöbetlerdeki oksidatif strese odaklanmıştır. Oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun, epileptik nöbetlerin hem bir sonucu hem de nedeni olarak rolü olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Deneysel nöbetlerin, reaktif oksijen türlerinin şiddetli salınımı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bazı çalışmalarda birçok antiepileptik ilacın oksidatif stresi artırdığı bildirilmektedir. Benzer şekilde akut PTZ indüklü epileptik nöbetler, beyin dokusunda oksidatif streste bir artışa neden olmaktadır. PTZ indüklü epileptik ratlarda beyin dokusunda, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin düştüğü bildirilmektedir (Obay ve ark., 2008). Antiepileptik ilaç ve tekrarlayan nöbetlerle ilişkili zıt etki bunların kullanımını sınırlandırmaktadır. Artan sayıda veri epilepsi patofizyolojisinde oksidatif stresin ilgisini akla getirmektedir. Aşırı oksidatif stres, lipid peroksidasyonu vasıtasıyla nöronal dejenerasyona katkı sağlar ve epileptik odakta glutasyon konsantrasyonlarını düşürür (Agarwal ve ark., 2011).

Epilepsi hastalarında TAS değerleri üzerine yapılan bir çalışmada valproat adlı antiepileptik ilaç ile tedavi edilen grupta, total antioksidan kapasite düzeylerinde düşüş gözlenirken, tedavi görmeyen epilepsi hastaları arasında ise total antioksidan kapasitede belirgin şekilde azalma olduğu bildirilmektedir (Hamed ve ark., 2004).

Epileptik hastalarla yapılan bir başka çalışmada, hastaların kanlarındaki antioksidan statüsünün kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve AEİ tedavisiyle düzeldiği bildirilmektedir (Sudha ve ark., 2001).

Bu çalışmada gruplar arasında TAS, TOS ve OSİ düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı. Buna rağmen, TOS değerleri bakımından grafikte görüldüğü üzere PTZ ve PTZ+CI grubunda, kontrole göre bir artış eğilimi olduğu gözlenmektedir. Bu sonuç epileptik nöbetlerin plazma TOS seviyesini artırdığı biçiminde yorumlanabilir. TAS değerleri incelendiğinde, PTZ+CI grubu lehine bir artış eğilimi görülmektedir. OSİ değerleri bakımından istatistik olarak anlamlı olmasa da kontrole kıyasla PTZ grubunda bir artış eğilimi mevcuttur. Bu durumda epileptik nöbetlerin antioksidan kapasiteyi azaltıp oksidan kapasiteyi artırdığı düşünülebilir ki bu sonuç yukarıda değinilen çalışmalarını da desteklemektedir.

### 5.3. GABA<sub>A</sub> Reseptör İmmunohistokimyasının Değerlendirilmesi

Hem kronik hem de akut epilepsi modellerinde GABA<sub>A</sub> reseptör tonun değiştiği ve bunun kısmen postsinaptik GABA<sub>A</sub> reseptör fonksiyonunda bir azalma sonucunda olduğuna inanılmaktadır (Blair ve ark., 2004). İnhibitör GABA<sub>A</sub> reseptör fonksiyon ve yapısındaki değişikliklerin ilaca karşı dirençli epilepsiye katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Bethmann ve ark., 2008). Epilepsi gelişimi ve hastalığın gidişatı süresince anormal GABA<sub>A</sub> reseptör ekspresyonu olmaktadır (Teichgräber ve ark., 2009; Bambal ve ark., 2011).

GABA<sub>A</sub> iletimindeki azalmanın *in vitro* ortamda memeli neokorteksinde epileptiform aktiviteye neden olduğu çeşitli araştırmalarda bildirilmektedir (Bambal ve ark., 2011). PTZ kindling, MSS'de GABA aracılı inhibisyonda bir azalmayla ilişkilidir. Bu nedenle PTZ ile tutuşma sağlanmış ratlarda, uygulanan kontrol grubundaki ratlara kıyasla serebral kortekste GABA bağlanması ve GABA aracılı CI alımını önemli biçimde azalmaktadır (Corda ve ark., 1992).

Deneysel TLE konulu bir çalışmada, (tutuşma sağlandıktan sonra) hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör sayısında ve yoğunluğunda artış olduğu bildirilmektedir (Nusser ve ark., 1998). Bizim çalışmamızda, hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı bakımından PTZ grubunda, Kontrol grubuna kıyasla istatistik olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu. PTZ+CI grubundaki artış eğilimi ise kontrole kıyasla istatistik olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonuçlar Nusser ve ark., (1998) ile Teichgräber ve ark., (2009) çalışmalarını destekler niteliktedir. GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif hücre sayısı bakımından PTZ grubunda istatistik olarak anlamlı artış gözlenmesi ve PTZ+CI grubunda böyle bir sonucun bulunmaması bitkinin epileptogenezi geciktirici etkisinin olduğunu göstermektedir. Tüm

beyinde ise GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif boyanmış hücre sayısı bakımından gruplar arasında istatistik bakımdan önemli bir fark bulunmamış olmasına karşın, tüm gruplarda en fazla artış eğiliminin PTZ grubuna ait olduğu görülmektedir. PTZ kindling modeli epilepside, jeneratör bölgenin hipokampus olduğu dikkate alınır, PTZ grubunda hipokampustaki GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif hücre sayısı artışının ve PTZ+Cİ grubunda böyle anlamlı bir artışın gerçekleşmemesinin önemi daha ciddi olarak kavranabilir.

Hipokampusta boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmazken, tüm beyinde gruplar arasında bu bakımdan istatistik olarak anlamlı bir fark bulundu. Bu sonuçlar Nusser ve ark., (1998) bulgularını desteklemektedir. Reseptör upregülasyonu, hayatta kalan hücrelerde nöbetlere yanıt olarak bir telafi edici mekanizma gibi görünmektedir. Bu sayede tekrarlayan uyarıcı yanıtlarla başa çıkmak için GABA<sub>A</sub> reseptör sayısında artış ve inhibitör nörotransmitter uyarımlara karşı duyarlılık oluşmaktadır (Loup, 2006). Hipokampustan elde edilen verilerde PTZ+Cİ grubu lehine hem hücre sayısı hem de boyanma yoğunluğunda azalma eğilimi olduğu görülmektedir. Özellikle hipokampus GABA<sub>A</sub> reseptör boyanma yoğunluğu bakımından PTZ+Cİ grubunun değerleri neredeyse kontrol grubuyla aynı değerdedir. Bu durum PTZ+Cİ grubunda hipokampustaki nöronların, nöbet indüklü uyarımının PTZ grubuna kıyasla daha az olduğunu göstermektedir ve PTZ kindling modelinde jeneratör alanın hipokampus olduğu göz önünde bulundurulursa taşıdığı anlam artmaktadır.

#### **5.4. In Situ DNA Fragmantasyon Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi**

1990'ların ortalarında araştırmacılar, nöbet indüklü beyin hasarında apoptozis ve biyokimyasal mekanizmasına odaklandılar. İlk çalışmalarda araştırmacılar, in situ apoptotik DNA fragmantasyonu olduğunu TUNEL yöntemi ile belirlediler. Kısa nöbetlerden sonra ölen az sayıda hücre "apoptotik" DNA fragmantasyonu göstermekteydi (Henshall ve Simon, 2005).

PTZ ile oluşturulan nöbetler apoptotik nörodejenerasyona neden olmaktadır (Naseer ve ark., 2009). Kindling nöbetleri nedeniyle oluşan nöronal kayıp farklı tekniklerle doğrulanmaktadır. Bu tekniklerden biri de apoptotik nöronların TUNEL boyanmasıdır (Pitkänen ve Sutula, 2002). TUNEL, apoptozisin bir göstergesi olan DNA fragmanlarının (kırıklarının) in situ olarak saptanması için kullanılan bir boyama yöntemidir. Uzun konvulzif aktiviteyle ilgili en erken morfolojik değişimler epileptojenik yapılarda özellikle de

hipokampusta seçici hücre ölümüdür (Naseer ve ark., 2009). Aslında hem nekrotik hem de apoptotik mekanizmalar hasara katkı sağlamaktadır. Ayrıca kindling nöbetlerinde, nöronal hasara yol açan bir moleküler yolak olarak serbest radikal oluşumuna da değinilmektedir (Pitkänen ve Sutula, 2002).

Epilepsi hastalarına ait hipokampal sklera örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, tipik apoptotik hücreler Hematoksilen-eozin ve TUNEL boyama ile araştırıldı. Elde edilen sonuçlarda ne kontrol grubunda ne de epilepsi hastalarında tipik apoptotik hücreler bulunmadığı bildirildi (Xu ve ark., 2007). Kindling modeli epilepsi oluşturularak ratlarda Bcl-2 ailesi genlerin rolü üzerine yapılan bir çalışmada, TUNEL pozitif herhangi bir hücreye rastlanmadığı bildirildi (Akcali ve ark., 2005). PTZ ile tutuşmuş ratların hipokampusunda artmış kaspaz 3 aktivitesinin orta dereceli nöronal dejenerasyona eşlik etmesine karşın nöronal bir apoptozis tespit edilemediği için nöronal ölüm mekanizmasının belirsiz olduğu bildirilmektedir (Pavlova ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda da yukarıda değinilen sonuçlara benzer biçimde gruplar arasında TUNEL pozitif hücre sayısı bakımından istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Yukarıda değinilen çalışmaların ve bizim sonuçlarımızın aksine PTZ kindling modeli kullanılarak sunulan bir tezde, PTZ grubunda TUNEL pozitif hücre sayısının, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede fazla bulunduğu ifade edilmektedir (Huang, 2010).

Rat kindling model üzerine yapılan çalışmalar, skor 3, 150 saniyelik jeneralize nöbetlerin hipokampusun spesifik alt alanlarında % 20-50 oranında nöronal kayba yol açtığını göstermektedirler. Nöbet sayısı arttıkça hasar daha ciddi hale gelmektedir. Bu gözlemleri destekleyecek biçimde kindling nöbetlerinin nöron-spesifik-enolase (bir nöronal hasar belirteci) konsantrasyonunu artırdığı bildirilmektedir (Pitkänen ve Sutula, 2002).

Nöbet indüklü hasara bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla, PTZ grubundaki epileptik ratlarda TUNEL pozitif hücre sayısı bakımından anlamlı farklılık çıkması beklenir fakat bizim çalışmamızda böyle bir bulgu tespit edilmedi. Bu durumun nedeni aşağıda değinilen iki çalışmaya ait bulgularla açıklanabilir; Rat modellerinde diğerlerine göre az miktarda dejenere nöronda klasik apoptotik morfoloji görülmektedir. Bu veriler hücre ölümünün son safhadaki sürecinin, en azından ratlarda, apoptozisin tüm özelliklerini kapsamadığını akla getirmektedir. Buna rağmen farede nöbetlerden sonra hipokampusta dejenere olmuş TUNEL pozitif hücrelerin üçte biri gibi bir çokluğu apoptozun nükleer özelliklerini sergilemektedir (Henshall ve Simon, 2005).

PTZ kindling, ratlarda serebral korteks, hipokampus ve serebellumda kaspaz 3'ü aktive etmektedir. Yapılan bir çalışmada, apoptotik nukleus bulunmadığı bildirilmekte ve bu sonuç inceleme zamanına dek nöronların apoptozisle yok edilmiş olmasıyla ya da nöronal ölümün apoptotik olmayan bir yolakla gerçekleştiği biçiminde ifade edilmektedir (Pavlova ve ark., 2004). PTZ kindling oluşturulmuş ratlarda, hipokampal alandaki hücre ölümüyle ilgili yapılan bir çalışmada hücre ölümünün ne nekroz ne de klasik apoptozisle gerçekleşmediği sonucuna varıldığı bildirilmektedir (Pavlova ve ark., 2006). Bizim çalışmamızın sonuçları da Pavlova ve ark., (2004; 2006) ait her iki çalışmayı da destekler niteliktedir.

## **5.5. Western Blot ile Elde Edilen Bulgularının Değerlendirilmesi**

### **5.5.1. Siklin B1 bulgularının değerlendirilmesi**

Artan kanıtlar, postmitotik terminal açıdan farklılaşmış nöronların ölümden önce hücre siklusunu aktive ettiklerini öne sürmektedir. Hem kemirgenler hem de insanlarda, mitotik belirteçler çok çeşitli nörodejeneratif koşullar altında ölüm riskindeki nöronlarda görülmeye başlar. Epilepsi 'nörodejeneratif hastalıklar' grubunda olmasa da, nöbetlerin nöronal kayıpla sonuçlandığı yönündeki bulgular kesin olarak kanıtlanmıştır. Buna karşın nöbet indüklü ölümün doğası meçhuldür (Pavlova ve ark., 2006). 1998'de Nagy ve Esiri, TLE üzerine yaptıkları bir çalışmada, hipokampusta nöronal siklin ekspresyonunun, ölmekte olan hipokampal nöronlarda anormal hücre siklusunun aktive olabileceğini akla getirdiğini bildirdiler (Pavlova ve ark., 2006). Ölmekte olan hücrelerde siklin B1 ekspresyonu, nöronal ölüme anormal hücre siklusunun katkısını akla getirmektedir. Siklin B1 ekspresyonu temporal lob epilepsili hastaların hipokampusunda tanımlandığından bu yana PTZ kindling modelinin nöbet indüklü nöronal ölüm mekanizmalarını çalışmak için uygun bir model olabileceği önerilmektedir (Pavlova ve ark., 2006). PTZ ile tutuşma sağlanmış ratlarda yapılan bir çalışmada, hipokampusta hasara uğramış hücrelerin büyük bir bölümü siklin B1 pozitifken ne diğer hücre siklusu belirteçleri ne de TUNEL pozitif apoptotik çekirdeğe rastlanmadığı bildirilmektedir (Pavlova ve ark., 2006).

Bu çalışmada, tekrarlayan nöbetlerin indüklediği nöronal hücre ölümüne, hücre siklusu olaylarının katkısını araştırmak amacıyla hücre siklusu belirteçlerinden siklin B1'e bakıldı. Bizim çalışmamızda gruplar arasında siklin B1 bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Fakat kontrol grubu ve PTZ+Cİ grubuna ait ratların hipokampusundaki siklin B1 değerlerinin birbirine çok yakın olduğu tespit edildi. Bu

değerler, bitki ekstraktının hipokampusta PTZ indüklü nöbetlere bağlı siklin B1 ekspresyonunu düşürdüğünü akla getirmektedir. Yine de bu grupların PTZ grubuyla arasındaki fark istatistik bakımdan önemli değildi.

### **5.5.2. Bcl-2 bulgularının değerlendirilmesi**

Apoptozisin epileptogenez üzerine etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışmada tüm beyin ve hipokampusta Bcl-2 proteinine western blot metoduyla bakıldı. Onkojen Bcl-2, hücre ölümünü baskılayıcı, apoptozu kontrol eden faktörlerdendir. Programlı hücre ölümü, hasar görmüş hücreler ve fonksiyonunu tamamlamış hücrelerin yok edilmesi, aktif hücre ölümünün tam olarak düzenlenmiş bir biçimi olan apoptozla yapılır. Bcl-2 ailesi proteinler, apoptozu inhibe edebilir ya da uyarabilirler. Onkojen Bcl-2 apoptoz baskılayıcısıdır. Birçok Bcl-2 proteini dış mitokondriyal membranda yer alır (Bcl-2, Bcl-XL, Bax). Ek olarak Bcl-2 nükleer membran ve endoplazmik retikulumda da bulunur. Bcl-2'nin apoptozu baskılaması, Mas-p70 veya sitokrom b5 gibi mitokondriyal proteinlerin karboksil terminallerinin modifikasyonu sayesinde başarılır (Yuan ve Yankner, 2000).

Temporal lob epilepsili hastalarda, hipokampus sklerotik dokudan alınan örnekler üzerinde yapılan bir çalışmada kontrol grubunda Bcl-2 pozitif hücrelere rastlanmazken epileptik grupta Bcl-2 pozitif (özellikle nöron plazmasında ekspresse olmuş) hücreler keşfedildi. Bcl-2 ekspresyonu nöbetlerin süresi ya da sıklığıyla korele değildi (Xu ve ark., 2007). Kindling modeli epilepsi oluşturularak ratlarda kindling sürecinde Bcl-2 ailesi genlerin rolü üzerine yapılan bir çalışmada Bcl-2 ekspresyonuna dair herhangi bir modülasyon tespit edilmedi (Akcali ve ark., 2005).

Bizim çalışmamızda da Akcali ve ark., (2005)'nin çalışmasına benzer biçimde tüm beyin ve hipokampusta Bcl-2 protein değerleri bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmadı. PTZ grubundaki ratlarda Bcl-2 protein değerleri tüm beyinde diğer gruplara kıyasla yükselme eğilimindeyken, hipokampusta ise azalma eğilimindedir. Bu sonuçlar PTZ grubunda, tüm beyinde apoptotik mekanizmalardaki artışa yanıt olarak Bcl-2 miktarının artmış olabileceğini göstermektedir.

### 5.5.3. $\beta$ -Tubulin bulgularının değerlendirilmesi

Temel olarak, nöronal uyarılabilirlik iyon kanalları ile belirlenir. Voltaj kapılı iyon kanalları da sırayla kanalın üzerine etki eden elektrik alanına bağlıdır. Bir tubulin kanalın iç kısmında olduğunda, intraselüler  $Cl^-$  iyonlarına benzer biçimde bir hiperpolarize edici alan uygular. Bir tubulinin kanaldan uzaklaşması depolarizasyona benzer etkiler yaratacaktır. Tubulin postsinaptik membranda ligand kapılı iyon kanallarının bulunduğu yerde bulunur. Bu kanallardan biri aynı zamanda voltaj kapılı olan NMDA reseptörleridir. Bu nedenle NMDA reseptörlerinin açık olma olasılığı post sinaptik yoğunluktaki tubulin miktarına bağlıdır. Post sinaptik densitedeki daha fazla tubulin NMDA reseptörlerinin daha az olasılıkla açılması anlamına gelmektedir. NMDA reseptörlerinin açılması katyonların hücre içine akışına ve membranın depolarize olmasına yol açar. Anormal derece açılması nöbetlere neden olabilir. Tubulin, NMDA reseptörleri ile ilişkisi nedeniyle epilepsiyle bağlantılı olabilir. Hakikaten TLE'de  $\alpha$  ve  $\beta$  tubulinde önemli derecede azalma vardır (Yang ve ark., 2006).  $\alpha$  ve  $\beta$  tubulinin özellikle post sinaptik densitedeki ekspresyonunun downregüle olduğu çalışmalarda gösterilmektedir (Bo ve ark., 2009).

Tüm beyinde  $\beta$ -Tubulin protein değerleri bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmazken hipokampusta  $\beta$ -Tubulin protein değerleri bakımından Kontrol grubuna kıyasla PTZ ve PTZ+Cİ gruplarında istatistik olarak anlamlı derecede bir azalma bulundu. Hipokampusta kontrol grubu ile PTZ+Cİ grubu ve PTZ grupları arasında beta tubulin değerleri bakımından anlamlı bir azalma olması PTZ kindling indüklü nöbetlerin beta tubulin değerlerini düşürdüğünü göstermekte ve sonuçlar daha önceki çalışmaları desteklemektedir. *Cichorium intybus* tedavisi uygulanmış ratlarda hipokampusa ait beta tubulin değerlerinin PTZ grubuna kıyasla artma eğiliminde olduğu gözlenmektedir. Bu durum PTZ+Cİ grubunda nöbet aktivitesinin PTZ grubuna kıyasla geç gözlenmesinin (5. enjeksiyon) nedeni olarak yorumlanabilir. Ayrıca daha geniş bir denek grubuyla ekstrakt tedavisinin beta tubulin değerleri bakımından olası koruyucu etkisinin istatistik biçimde anlamlı olarak gösterilebileceğini akla getirmektedir.

Bu çalışma, halk arasında geleneksel olarak epilepsi tedavisinde kullanılan *Cichorium intybus* bitkisinin olası antiepileptik etkilerinin ortaya konması amacıyla gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar bitki tedavisinin PTZ'nin etkilerini, kontrole yaklaştırma eğiliminde olduğunu ortaya koymaktadır. Bitki ekstraktının epiletogenezi geciktirici, konvulzan dozda nöbet latansını uzatıcı etkileri, ve  $GABA_A$  reseptör pozitif hücre sayısını PTZ uygulamasına rağmen

kontrol grubuna yakın tuttuğu çalışmanın sonunda (istatistik olarak anlamlı biçimde) ortaya kondu. Beta tubulin değerleri bakımından ise hem PTZ hem de PTZ+Cİ grubunda kontrole gör istatistik olarak anlamlı bir azalma bulundu. Bu sonuçlara göre hipokampus GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif hücre sayısı, nöbet aktivitesinin oluşumu (epileptogenez) ve konvulzan dozda nöbet latansı bakımından *Cichorium intybus* bitkisinin olumlu etkisinden söz edilebilirken TUNEL pozitif hücre sayısı, Siklin B1, Bcl-2, TAS, TOS ve OSİ bakımından ise bitkinin herhangi bir olumlu ya da olumsuz etkisi tespit edilemedi. Fakat çalışmanın geneline bakıldığında bu sayılan özellikler bakımından sonuç olarak, PTZ+Cİ grubuna ait değerlerin Kontrol grubuna yaklaşıma eğiliminde olduğu görölmektedir. Bu genel sonuç bitki ekstraktının PTZ'nin etkisini azaltarak değerleri Kontrol grubuna yaklaştırma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, çalışma daha geniş bir denek grubuyla gerçekleştirilebilseydi ya da daha yüksek dozda ekstrakt uygulaması yapılabilsen, bu çalışmada araştırılan değerlerin gruplar arasında istatistik olarak anlamlı biçimde farklı bulunacağını düşündürmektedir. Bu etkilerin tespit edilebilmesi açısından gelecekte daha yüksek doz ekstrakt uygulamaları ve daha geniş bir denek grubu ile ilave çalışmaların yapılması önerilmektedir.



## ÖZET

**Ergül Erkeç, Ö. Ratlarda Pentilentetrazol ile Oluşturulan Deneysel Epilepsi Modelinde Yabani Hindiba'nın (*Cichorium İntybus*) Kan ve Beyin Oksidatif Stres, Apoptozis, Genotoksisite ve DNA Hasarı Üzerine Etkisinin İncelenmesi Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Doktora Lisans Tezi. Van, 2014.** Epilepsi, genel popülasyonun yaklaşık % 1'ini etkileyen en yaygın nörolojik düzensizliklerden biridir. Epilepsi için kullanılan güncel tedaviler semptomatiktir ve antiepileptik etkiden ziyade anti nöbet etkilidir. *Cichorium intybus* bitkisinin kökleri hem Avrupa'da hem de Doğu Anadolu Bölgesi'nde geçmişten günümüze halk arasında geleneksel olarak epilepsi tedavisi için kullanılmaktadır. Pentilentetrazol (PTZ), antiepileptik ilaç keşif çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır ve PTZ kindling modeli epilepsinin patofizyolojisinin anlaşılması bakımından oldukça önemlidir. Bu çalışmada, nöroprotektif etkisi bilinen *Cichorium intybus* kök ekstraktının epileptik nöbetler üzerine olası etkisinin oksidatif stres, apoptozis, genotoksisite ve DNA hasarı yönünden ortaya konulması ve halk sağlığı bakımından kullanımının incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla, 27 adet Wistar albino erkek rat randomize olarak Kontrol, epilepsi ve bitki ekstraktı uygulama grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı ve PTZ kindling ile tutuşma sağlandıktan sonra; plazma, tüm beyin ve hipokampusta; TAS, TOS, OSİ, GABA<sub>A</sub> reseptör yoğunluğu ve GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif hücre sayısı, TUNEL pozitif hücre sayısı ve Siklin B1, Bcl-2 ve β-Tubulin seviyeleri incelendi. TAS, TOS, OSİ bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Benzer şekilde TUNEL pozitif hücre sayısı, Siklin B1 ve Bcl-2 bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. *Cichorium intybus* su ekstraktı uygulanmış grupta epileptik nöbet aktivitesi oluşumu PTZ grubuna kıyasla daha geç gerçekleştiği tespit edildi. Tüm beyinde GABA<sub>A</sub> reseptör boyanma yoğunluğu, hipokampusta GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif hücre sayısı ve β-Tubulin bakımından ise gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir fark mevcuttu (p<0.05). Bu sonuçlara göre hipokampus GABA<sub>A</sub> reseptör pozitif hücre sayısı, nöbet aktivitesinin oluşumu (epileptogenez) ve konvulzan dozda nöbet latansı bakımından *Cichorium intybus* bitkisinin olumlu etkisinden söz edilebilirken TUNEL pozitif hücre sayısı, Siklin B1, Bcl-2, β-Tubulin, TAS, TOS ve OSİ bakımından ise bitkinin herhangi bir anlamlı etkisi tespit edilemedi. Bu etkilerin tespit edilebilmesi açısından gelecekte farklı epilepsi modellerinde daha yüksek doz ekstrakt uygulamaları ve daha geniş bir denek grubu ile ilave çalışmaların yapılması önerilmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Cichorium intybus*, epilepsi, GABA<sub>A</sub> reseptörü, pentilentetrazol, β-tubulin

## SUMMARY

**Ergül Erkeç, Ö. Investigation of effects of Chicory (*Cichorium Intybus*) on Blood and Brain Oxidative Stress, Apoptosis, Genotoxicity and DNA Damage in Pentilentetrazole-Induced Experimental Epilepsy Model on Rats. Yüzüncü Yıl University, Health Science Institute, PhD Thesis in Department of Physiology, Van, 2014.** Epilepsy is among the most frequent neurological disorder which affects about 1% of general population. Current therapies used for epilepsy are symptomatic and they have anti convulsive rather than anti epileptic effect. Roots of *Cichorium intybus* plant have been used for the folkloric treatment of epilepsy both in Europe as well as in Eastern Anatolia region from past to present. Pentylenetetrazol (PTZ) is widely used in antiepileptic drug discovery and PTZ kindling model has great importance in understanding of pathophysiology of epilepsy. Aim of this study is to investigate root extract of *Cichorium intybus*, which has a well known neuroprotective activity, on the epileptic seizures in the aspects of oxidative stress, apoptosis, genotoxicity and DNA damage. Also investigation of its use in the context of public health was also aimed. For that reason 27 male Wistar-albino rats were randomly divided into 3 groups as control, epilepsy and plant extract groups. Following PTZ kindling; TAS, TOS, OSI, GABA<sub>A</sub> receptor density, number of GABA<sub>A</sub> receptor positive cells, number of TUNEL positive cells and Siklin B1, Bcl-2 and  $\beta$ -Tubulin levels were investigated in plasma, whole brain and hippocampus. No significant difference was found between groups for TAS, TOS, OSI. Similarly no statistically significant difference was found between groups for number of TUNEL positive cell quantity, Siklin B1 and Bcl-2. In the *Cichorium intybus* aqueous extract administered group, occurrence of epileptic seizure activity was found more latent compared to PTZ group. However there was a significant difference in whole brain for GABA<sub>A</sub> receptor staining density and for GABA<sub>A</sub> receptor protein cell number and  $\beta$ -Tubulin in hippocampus between groups ( $p < 0.05$ ). According to these results it is possible to state a positive impact of *Cichorium intybus* plant on GABA<sub>A</sub> receptor positive cell number in hippocampus, occurrence of seizure activity (epileptogenesis) and seizure latency at convulsant dose. However, no effect of this plant was found on TUNEL positive cell number, Siklin B1, Bcl-2,  $\beta$ -Tubulin, TAS, TOS and OSI. In order to determine these effects, different experimental epilepsy models with higher extract doses and larger experimental groups in supplementary studies are recommended.

**Keywords:** *Cichorium intybus*, epilepsy, GABA<sub>A</sub> receptor, pentylenetetrazolium,  $\beta$ -tubulin

## KAYNAKLAR

- Abuhandan M, Kandemir H, Geter S, Karababa F (2014). Primer enürezis nokturnalı çocuk ve ergen hastalarda oksidatif durumun değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi*, 41, 1, 123-127.
- Adams M, Schneider SV, Kluge M, Kessler M, Hamburger M (2012). Epilepsy in the Renaissance: A survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. *Journal of Ethnopharmacology*, 143,1, 1-13.
- Agarwal NB, Jain S, Agarwal NK, Mediratta PK, Sharma KK (2011). Modulation of pentylene-tetrazole-induced kindling and oxidative stress by curcumin in mice. *Phytomedicine*, 18, 8, 756-759.
- Ahmed B, Al-Howiriny TA, Siddiqui AB (2003). Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. *Journal of ethnopharmacology*, 87, 2, 237-240.
- Ahmed B, Khan S, Masood MH, Siddique AH (2008). Anti-hepatotoxic activity of cichotyboside, a sesquiterpene glycoside from the seeds of *Cichorium intybus*. *Journal of Asian natural products research*, 10, 3, 218-223.
- Ahmed N, Tarannum S (2009). Acetylcholinesterase activity in the brain of alloxan diabetic albino rats: Presence of an inhibitor of this enzyme activity in the cerebral extract. *International journal of diabetes in developing countries*, 29, 4, 174.
- Akcali KC, Sahiner M, Sahiner T (2005). The role of bcl-2 family of genes during kindling. *Epilepsia*, 46, 2, 217-223.
- Akdogan I, Yonguc NG (2011). Experimental epilepsy models and morphologic alterations of experimental epilepsy models in brain and hippocampus, underlying mechanisms of epilepsy, *InTech*, 15, 269-282.
- Ali A, Ahmad FJ, Pillai KK, Vohora D (2005). Amiloride protects against pentylene-tetrazole-induced kindling in mice. *British journal of pharmacology*, 145, 7, 880-884.
- Altunkaynak BZ, Özbek E (2008). Programlanmış hücre ölümü: apoptoz nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6, 2, 93-104.
- Anonim (2013a). <http://www.mayoclinic.com/health/epilepsy/DS00342>, (Erişim tarihi: 28.12.2013).
- Anonim (2013b). [www.itfnoroloji.org/epilepsi/Epilepsi.htm](http://www.itfnoroloji.org/epilepsi/Epilepsi.htm) (Erişim tarihi: 28.12.2013)
- Anonim (2013c). [www.drugs.com/npp/chicory.html](http://www.drugs.com/npp/chicory.html), Erişim tarihi: 13.08.2013.
- Atta AH, Elkoly TA, Mouneir SM, Kamel G, Alwabel NA, Zaher S (2010). Hepatoprotective effect of methanol extracts of *Zingiber officinale* and *Cichorium intybus*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72, 5, 564-570.
- Avoli M (2007). The epileptic hippocampus revisited: back to the future. *Epilepsy Curr*, 7, 4, 116-8.

- Bais HP, Ravishankar GA (2001). Cichorium intybus L.cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. *J. Sci. Food. Agric*, 81, 467-484.
- Bambal G, Çakıl D, Ekici F (2011). Deneysel epilepsi modelleri. *Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi*, 2, 1, 118-123.
- Bambal G, Çakıl D, Ekici F (2011). Epilepsi oluşum mekanizmaları. *Konuralp Tıp Dergisi*, 3, 3, 42-45.
- Bell ML, Rao S, So EL, Trenerry Y, Kazemi N, Stead SM, Cascino G, Marsh R, Meyer FB, Watson RE, Giannini C, Worrell GA (2009). Epilepsy surgery outcomes in temporal lobe epilepsy with a normal MRI. *Epilepsia*, 50, 9, 2053–2060.
- Bernhardt BC, Hong S, Bernasconi A, Bernasconi N (2013). Imaging structural and functional brain networks in temporal lobe epilepsy. *Frontiers in human neuroscience*, 1, 7, 624.
- Bertram EH, Williamson J (2005). Kindling as a tool for studying the role of subcortical structures in limbic seizures. *Advances in Behavioral Biology*, 55, 1, 137-145.
- Bethmann K, Fritschy JM, Brandt C, Löscher W(2008). Antiepileptic drug resistant rats differ from drug responsive rats in GABA<sub>A</sub> receptor subunit expression in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 31, 169-187.
- Blair RE, Sombati S, Lawrence DC, McCay BD, DeLorenzo RJ (2004). Epileptogenesis causes acute and chronic increases in GABA<sub>A</sub> receptor endocytosis that contributes to the induction and maintenance of seizures in the hippocampal culture model of acquired epilepsy. *JPET*, 310, 871-880.
- Bo X, Xiaomei W, Zhiling H (2009). Down-regulation of tubulin at postsynaptic density in rat temporal epilepsy and effect of tubulin stability on epilepsy seizure. National conference of Neurology & The 2nd sino-french joint conference of Neurology.
- Bora İ, Yeni SN, Gürses C (2008). Epilepsi. *Nobel Tıp Kitabevi*. İstanbul.
- Boron WF, Boulpaep EL (2012). Medical Physiology, 2e Updated Edition: with Student Consult Online Access. Elsevier Health Sciences.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem*, 72, 248-254.
- Castel-Branco MM, Alves GL, Figueiredo IV, Falcão AC, Caramona MM (2009). The maximal electroshock seizure (MES) Model in the preclinical assessment Of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 31, 2, 101-106.
- Chelyshev YA, Cherepnev GV, Saitkulov KI (2001). Apoptosis in the nervous system. *Russian Journal of Developmental Biology*, 32, 2, 92-102.
- Chopra L ve Nagar P (1956). Glossary of Indian medicinal plants. *PID*, New Delhi, 613-664.

- Cloix JF, Hévor T (2009). Epilepsy, regulation of brain energy metabolism and neurotransmission. *Current medicinal chemistry*, 16, 7, 841-853.
- Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Carboni G, Frau V, Giorgi O (1991). Pentylentetrazol-induced kindling in rats: effect of GABA function inhibitors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 40, 2, 329-333.
- Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Giorgi O (1992). Decrease in GABAergic function induced by pentylentetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 262, 2, 792-800.
- Coşkun A (2011). Beynimizde çakan şimşekler, epilepsi. *Bilim ve Teknik*, 522, 76-80.
- Davoudi M, Shojaei A, Palizvan MR, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J (2013). Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylentetrazol kindled seizures in the rat. *Epilepsy Res*, 106, 54-63.
- Dhir A (2012). Pentylentetrazol (PTZ) Kindling Model of Epilepsy. *Current Protocols in Neuroscience*, 9-37.
- Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, Willmore LJ (2009). Role of glutamate and GABA transporters in development of pentylentetrazol-kindling. *Neurochem Res*, 34, 7, 1324-31.
- Ekonomou A, Smith AL, Angelatou F (2001). Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylentetrazole-induced 'kindling' model of epilepsy. *Molecular brain research*, 95, 1, 27-35.
- Engel J (2013). Seizures and epilepsy. *Oxford University Press*, New York.
- Engel JJ, Thompson PM, Stern JM, Staba RJ, Bragin A, Mody I (2013). Connectomics and epilepsy. *Curr. Opin. Neurol*, 26, 2, 186-194.
- Eraković V, Župan G, Varljen J, Laginja J, Simonić A (2001). Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylentetrazol kindling and pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy research*, 43, 2, 165-173.
- Erdoğan F, Küçük A, Gölgeci A (2006). The assesment of the features of seizures and EEG in pentylentetrazol-induced kindling. *Journal of Neurological Sciences*, 23, 2, 084-092.
- Erel O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37, 2, 112-119.
- Erel O (2004). A novel automed method to measure total antioxidant capacity using a new generation, more stable abts radical cation. *Clin Biochem*, 37, 277-285.
- Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38, 12, 1103-1111.
- Eşkazan E (1998). Epilepsilerde tanı ve tedavi sempozyumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul.

Fisher R, Saul M (1997). Overview of epilepsy. Book of Comprehensive Epilepsy Center, Stanford.

Fisher RS, Boas WVE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international league against epilepsy (ILAE) and the international bureau for epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46, 4, 470-472.

Ganong WF (2011). Review of medical physiology. *McGraw-Hill Medical*, New York.

Georgiadis I, Kapsalaki EZ, Fountas KN (2013). Temporal lobe resective surgery for medically intractable epilepsy: a review of complications and side effects. *Epilepsy research and treatment*, 1-13.

Getova D, Froestl W, Bowery NG (1998). Effects of GABA<sub>B</sub> receptor antagonism on the development of pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Brain research*, 809, 2, 182-188.

Ghamarian A, Abdollahi M, Su X, Amiri A, Ahadi A, Nowrouzi A (2012). Effect of chicory seed extract on glucose tolerance test (GTT) and metabolic profile in early and late stage diabetic rats. *Daru*, 20,1, 56.

Gilani AH, Janbaz KH (1994). Evaluation of the liver protective potential of Cichorium intybus seed extract on acetaminophen and CCl<sub>4</sub>-induced damage. *Phytomedicine*, 1, 3, 193-197.

Goddard GV (1967). Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*, 214, 5092, 1020-1021.

Grieve M (1971). A modern herbal: the medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folklore of herbs, grasses, fungi, shrubs, trees with all their modern scientific uses. Tiger Books International PLC, United Kingdom.

Hamed SA, Abdallah MM, El-Melegy N (2004). Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *Journal of pharmacological sciences*, 96, 4, 465-473.

Henshall DC, Simon RP (2005). Epilepsy and apoptosis pathways. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25, 12, 1557-1572.

Huang RQ, Bell Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH (2001). Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptors: Mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther*, 298, 3, 986-995.

Huang YY, Li HB, Li JZ (2010). Effect of erdosteine on damage of hippocampal neurones and oxidative stress in rats with epilepsy. *Journal of Jilin University Medicine Edition*, 36, 6, 1102-1105.

Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M (2005). Antiepileptogenic and antioxidant effects of Nigella sativa oil against pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Neuropharmacol*, 49, 4, 456-464.

- Ilhan A, Iraz M, Kamisli S, Yigitoglu R (2006). Pentylentetrazol-induced kindling seizure attenuated by Ginkgo biloba extract (EGb 761) in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30, 8, 1504-1510.
- Jurgoński A, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z, Król B (2012). Caffeoylquinic acid-rich extract from chicory seeds improves glycemia, atherogenic index, and antioxidant status in rats. *Nutrition*, 28,3, 300-306.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell, TM (2012). Principles of Neural Science. McGraw-Hill, New York.
- Kıyıcı A, Yücel D (2007). Antiepileptik ilaç kullanımı ve oksidatif stres. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 5, 2, 57-62.
- Kim M, Shin HK (1998). The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentrations and fecal lipid excretion in rats. *The Journal of nutrition*, 128,10, 1731-1736.
- Klioueva IA, van Luijtelaar EL, Chepurnova NE, Chepurnov SA (2001). PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain. *Physiol Behav*, 72, 3, 421-6.
- Krylova SG, Efimova LA, Vymiatina ZK, Zueva EP (2006). The effect of cichorium root extract on the morphofunctional state of liver in rats with carbon tetrachloride induced hepatitis model. *Eksp Klin Farmakol*, 69,6, 34-36.
- Kumar A, Lalitha S, Mishra J (2013). Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against pentylentetrazole (PTZ)-induced kindling and associated cognitive dysfunction in mice. *Epilepsy & Behavior*, 29, 1, 103-111.
- Li ZP, Zhang XY, Lu X, Zhong MK, Ji YH (2004). Dynamic release of amino acid transmitters induced by valproate in PTZ-kindled epileptic rat hippocampus. *Neurochemistry international*, 44, 4, 263-270.
- Loup F (2006). GABA<sub>A</sub> receptors in human temporal lobe epilepsy. *Epileptologie*, 23, 187-194.
- Löscher W (2002). Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, 50,1, 105-123.
- Löscher W (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20, 5, 359-368.
- Löscher W, Ebert U (1996). The role of the piriform cortex in kindling. *Progress in neurobiology*, 50, 5, 427-481.
- Luthman J, Humpel C (1997). Pentylentetrazol kindling decreases N-methyl-d-aspartate and kainate but increases gamma-aminobutyric acid-A receptor binding in discrete rat brain areas. *Neuroscience letters*, 239, 1, 9-12.

- Macdonald RL, Barker JL (1978). Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons A common mode of convulsant action. *Neurology*, 28, 4, 325-330.
- Marangoz C (1997). Deneysel epilepsi modelleri. *OMÜ Tıp Dergisi*, 14, 3, 147-186.
- Mares D, Romagnoli C, Tosi B, Andreotti E, Chillemi G, Poli, F (2005). Chicory extracts from *Cichorium intybus* L. as potential antifungals. *Mycopathologia*, 160,1, 85-91.
- Morimoto K (1990). Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 13, 4, 253-260.
- Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in neurobiology*, 73, 1, 1-60.
- Naseer MI, Shupeng L, Kim MO (2009). Maternal epileptic seizure induced by Pentylene-tetrazol: Apoptotic neurodegeneration and decreased GABA. *Molecular brain*, 2, 20: 1-11.
- Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR (2010). Estimation of the burden of active and lifetime epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*, 51, 5, 883-890.
- Nusser Z, Hajos N, Somogyi P, Mody I (1998). Increased number of synaptic GABA<sub>A</sub> receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature*, 395, 6698, 172-177.
- Obay BD, Taşdemir E, Tümer C, Bilgin HM, Atmaca M (2008). Dose dependent effects of ghrelin on pentylene-tetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides*, 29, 3, 448-455.
- Park JH, Cho H, Kim H, Kim K (2006). Repeated brief epileptic seizures by pentylene-tetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats. *Neuroscience*, 140, 2, 673-684.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylene-tetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Lett*, 357, 2, 83-86.
- Pavlova T, Stepanichev M, Gulyaeva N (2006). Pentylene-tetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. *Neuroscience letters*, 392, 1, 154-158.
- Pavlova TV, Yakovlev AA, Stepanichev MY, Mendzheritskii A, Gulyaeva NV (2004). Pentylene-tetrazole kindling induces activation of caspase-3 in the rat brain. *Neuroscience and behavioral physiology*, 34, 1, 45-47.
- Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL (2005). Models of seizures and epilepsy. *Academic Press*, Finland.
- Pitkänen A, Sutula TP (2002). Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal lobe epilepsy. *The Lancet Neurology*, 1, 3, 173-181.



- Pushparaj PN, Low HK, Manikandan J, Tan BKH, Tan CH (2007). Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 111, 2, 430-434.
- Ritzén A, Mathiesen JM, Thomsen C (2005). Molecular pharmacology and therapeutic prospects of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 97, 4, 202-213.
- Rossi J (1996). Sensitization induced by kindling and kindling-related phenomena as a model for multiple chemical sensitivity. *Toxicology*, 111, 1, 87-100.
- Scharfman HE (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*, 7, 4, 348-354.
- Scheuer ML, Pedley TA (1990). The evaluation and treatment of seizures. *New England Journal of Medicine*, 323, 21, 1468-1474.
- Schröder H, Becker A, Grecksch G, Schröder U, Hoell V (1998b). The effect of pentylenetetrazol kindling on synaptic mechanisms of interacting glutaminergic and opioid system in the hippocampus of rats. *Brain Res*, 811, 1, 40-46.
- Schröder H, Becker A, Holtt V (1998). Sensitivity and density of glutamate receptor subtypes in the hippocampal formation are altered in pentylenetetrazol-kindled rats. *Exp Brain Res*, 120, 4, 527-530.
- Schuele SU ve Luders HO (2008). Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives. *The Lancet Neurology*, 7, 6, 514-524.
- Shandra AA ve Godlevsky LS (2005). Pentylenetetrazol-induced kindling as a model of absence and convulsive forms of epilepsy. *In Kindling*, 6, 49-59.
- Shorvon SD (2011). The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, 52, 6, 1052-1057.
- Spencer S ve Huh L (2008). Outcomes of epilepsy surgery in adults and children. *The Lancet Neurology*, 7, 6, 525-537.
- Sudha K, Rao AV, Rao A (2001). Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clinica Chimica Acta*, 303, 1, 19-24.
- Süntar I, Küpeli Akkol E, Keles H, Yesilada E, Sarker SD, Baykal T (2012). Comparative evaluation of traditional prescriptions from *Cichorium intybus* L. for wound healing: Stepwise isolation of an active component by in vivo bioassay and its mode of activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 1, 299-309.
- Şimşek ve Vatansever (2014). Apoptotik ve otofajik ölümlerde hücre içi organizasyon. *Yeni Tıp Dergisi*, 31, 6-11.
- Tabata M, Sezik E, Honda G, Yesilada E, Fukui H, Goto K, Ikeshiro Y (1994). Traditional medicine in Turkey III. folk medicine in east anatolia, Van and Bitlis provinces. *Pharmaceutical Biology*, 32, 1, 3-12.

- Teichgräber LA, Lehmann TN, Meencke HJ, Weiss T, Nitsch R, Deisz RA (2009). Impaired function of GABA<sub>B</sub> receptors in tissues from pharmacoresistant epilepsy patients. *Epilepsia*, 50, 7, 1697-1716.
- Tyler VE (1999). *The new honest herbal: a sensible guide to the use of herbs and related remedies*. Psychology Press, Oxxon.
- Velisek L, Kusa R, Kuluvana M, Mares P (1990). Excitatory amino acid antagonist and pentylentetrazol-induced seizures during ontogenesis: I. The effects of 2-amino-7-phosphonoheptonate. *Life Sci*, 46, 1349-1357.
- Velisek L, Nebieridze N, Chachua T, Velišková J (2013). Anti-seizure medications and estradiol for neuroprotection in epilepsy: The 2013 update. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 8, 1, 24-41.
- White HS (2003). Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions. *Epilepsia*, 44, 7, 2-8.
- World Health Organization, epilepsy in the who africa region, bridging the gap: the global campaign against epilepsy, out of the shadows, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2004.
- Wu XH, Ding MP, Zhu-Ge ZB, Zhu YY, Jin CL, Chen Z (2006). Carnosine, a precursor of histidine, ameliorates pentylentetrazole-induced kindled seizures in rat. *Neurosci Lett*, 400, 1, 146-149.
- Xu D, Miller S D, Koh S (2013). Immune mechanisms in epileptogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 7, 195-203.
- Xu S, Pang Q, Liu Y, Shang W, Zhai G, Ge M (2007). Neuronal apoptosis in the resected sclerotic hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of Clinical Neuroscience*, 14, 9, 835-840.
- Yang JW, Czech T, Felizardo M, Baumgartner C, Lubec G (2006). Aberrant expression of cytoskeleton proteins in hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Amino Acids*, 30, 4, 477-493.
- Yuan J, Yankner BA (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407, 6805, 802-809.
- Zafar R, Mujahid AS (1998). Anti-hepatotoxic effects of root and root callus extracts of *Cichorium intybus* L. *Journal of ethnopharmacology*, 63,3, 227-231.
- Zhu LJ, Chen Z, Zhang LS, Xu SJ, Xu A, Luo JH (2004). Spatiotemporal changes of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit levels in rats with pentylentetrazole-induced seizures. *Neuroscience letters*, 6, 356, 1, 53-56.

## ÖZGEÇMİŞ

İzmir’de 1977 yılında doğdu. İnönü İlköğretim Okulu’ndan mezun olduktan sonra, Vangölü Anadolu Lisesi’nde orta öğrenimini tamamladı. 2001 yılında, Balıkesir Üniversitesi, Necatibey Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümünü bitirdi. 2006-2009 yılları arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalında (Tıp) Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2009 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalında (Tıp Programı) Doktora öğrenimine başladı. Halen Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında, Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.

## EKLER

EK-1



T.C.  
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
KARAR METNİ

SAYI: 2013/ 216  
KONU: Sn. Prof. Dr. İsmail MERAL

31.10.2013

Sayın Prof. Dr. İsmail MERAL,

Başlığı "Ratlarda pentilentetrazol ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde Cichorium intybus'un kan ve beyin oksidatif stres, apoptozis, genotoksisite ve DNA hasarı üzerine etkisinin incelenmesi" olan projeniz 31.10.2013 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Ülkan KILIÇ  
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE  
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN  
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL  
Üye  
KATILIMCI

Prof. Dr. Serdar UŞÜMEZ  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Mahmut GÜRGAN  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL  
Üye

Ali DOĞAN  
Üye

Veli ÖZTÜRK  
Üye