

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

**KRONİK LEVETİRASETAM UYGULANAN  
NORMAL VE TEMPORAL LOB EPİLEPSİ MODELİ  
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA AROMATAZ  
EKSPRESYONU DEĞİŞİKLİKLERİ**

**Uzm. Ecz. Mehtap PALABIYIK**

**Farmakoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2015**

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

**KRONİK LEVETİRASETAM UYGULANAN  
NORMAL VE TEMPORAL LOB EPİLEPSİ MODELİ  
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA AROMATAZ  
EKSPRESYONU DEĞİŞİKLİKLERİ**

**Uzm. Ecz. Mehtap PALABIYIK**

**Farmakoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. E. Pelin KELİCEN-UĞUR**

**ANKARA  
2015**

## TEŞEKKÜR

Sayın Prof. Dr. E. Pelin Kelicen-Uğur'a, tez danışmanım olarak yaptığım çalışmalarda destekleyici ve hayatımın her alanında bilgi ve tecrübesiyle her zaman yol gösterici, ışık tutucu ve yüreklendirici olduğu için,

Sayın Prof. Dr. Alper Bektaş İskit'e, deneylerde kullandığım madde temininde yardımcı olduğu ve hayatımı her alanda kolaylaştırdığı için,

Sayın Prof. Dr. Mustafa Ark'a, daha önceki çalışmalarında ve bu tez çalışmasında da verdiği fikirler ve değerli yorumları için,

Sayın Prof. Dr. Yıldırım Sara'ya, laboratuvarının imkanlarını bana sunduğu ve her daim engin bilgilerini paylaşıp bana manevi destek verdiği için,

Sayın Prof. Dr. Dilek Ertoy-Baydar'a, Dr. Meral Buğdaycı'ya, Uzm. Bio. Sevda Lüle'ye, patoloji ve immünohistokimya deneyleri için laboratuvarlarında yoğun tempolarına rağmen bana gözetmen olup tecrübelerini paylaştıkları için,

Sayın Ecz. Hande Karahan ve Dr. S.Taşkın Taş'a yardımseverlikleri ve verdikleri manevi destek için,

Değerli aileme ve sevgili eşim Bora Palabıyık'a çalışmalarım süresince sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana gönülden destek oldukları için içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (H.Ü.B.A.B. 010 01 301 001).

Tezin bir bölümü tebliğ olarak Türk Farmakoloji Derneği-22. Ulusal Farmakoloji Kongresi'nde "Antiepileptik levetirasetamın vas deferens kasılma yanıtlarına ve testiküler aromataza etkisi" başlığı ile sunulmuştur.

## ÖZET

**Palabıyık, M. Kronik levetirasetam uygulanan normal ve temporal lob epilepsi modeli oluşturulmuş sıçanlarda aromataz ekspresyonu değişiklikleri. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2015.** Eksitotoksik ajan kainik asit (KA) intraperitoneal (i.p.) uygulanarak temporal lob epilepsi (TLE) modeli *Wistar* erkek sıçanlarda oluşturuldu. Günümüzde sık kullanılan oldukça etkin yeni nesil antiepileptik ilaç (AEİ) levetirasetamın (LTC) 27 mg/kg/gün dozda ve artan dozlarında (54 ve 108 mg/kg/gün) aromataz enzim ekspresyonunda yaptığı değişiklikleri ve gonadal dokuların fonksiyonelliği üzerine potansiyel yan etkileri araştırmaya yönelik olarak bu tez çalışması gerçekleştirildi. Aromataz enziminin ekspresyon düzeyi, TLE'li grupların beyin korteksinde 4 hafta sonunda, hipokampusunda hem 4 hem 8 hafta sonunda kontrole göre 1.5 kat artış gösterdi. Yalnızca LTC (27, 54 ve 108 mg/kg/gün) uygulanan grupların beyin aromataz ekspresyonunda tüm zamanlarda kontrole göre değişiklik olmadı ve bu 8 haftalık grupta immünohistokimya deneyleri ile de doğrulandı. TLE modelinde ortaya çıkan hipereksitasyonun oluşturduğu nörodejeneratif hasarda aromataz ekspresyonunun artması üzerinden kompensatuar koruyucu mekanizmaların devreye girdiği ancak LTC'nin etki mekanizmasının beyin korteksinde ve hipokampusundaki aromataz ekspresyonu ile ilişkili olmadığı söylenebilir. Gonadal dokularda yapılan deneylerde LTC'nin 27 mg/kg/gün dozda uygulanması 1, 4 veya 8 hafta sonunda vas deferensin kasılma yanıtını kontrole göre değiştirmede. Buna ek olarak LTC artan dozlarda uygulandığında 8 hafta sonunda vas deferens, epididim ve testiste histolojik değişiklik gözlenmedi. 27 ve 54 mg/kg/gün LTC uygulaması sonrasında testiste aromataz ekspresyonu 8 hafta sonunda kontrole göre azalırken 108 mg/kg/gün dozunda değişmedi. Bu sonuçlara göre LTC'nin gonadal dokuların fonksiyonelliği üzerinde yan etkilere sebep olmadığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Aromataz, kainik asit, levetirasetam, temporal lob epilepsisi, gonadal dokular.

Destekleyen kurumlar: H.Ü.B.A.B. Tez Destekleme (010 01 301 001).

## ABSTRACT

**Palabıyık, M. Aromatase expression changes at chronic levetiracetam treated normal and temporal lobe epilepsy modelled rats. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Pharmacology, Ankara, 2015.** Temporal lobe epilepsy (TLE) model was generated at male *Wistar* rats by intraperitoneal (i.p.) injection of excitotoxic agent kainic acid (KA). This thesis work has been done as to investigate possible side-effects on gonadal tissue functionality and aromatase expression change of contemporarily, highly efficient, new generation antiepileptic drug (AED) levetiracetam (LEV) at 27 mg/kg/day dose and increasing doses (54 ve 108 mg/kg/day). Expression level of aromatase enzyme was found to be up-regulated 1.5 times than controls in brain cortex of TLE groups after 4 weeks and hippocampus after 4 and 8 weeks. There was no change compared with controls in aromatase expression of all times in only LTC (27, 54 ve 108 mg/kg/day) given groups for 4 weeks and these results are confirmed with immunohistochemistry experiments in 8 week groups. Compensatory protective mechanisms are activated via the increase of aromatase expression in neurodegenerative damage, caused by hyperexcitation in TLE model, however it can be said that effect mechanism of LTC is not associated with aromatase expression in brain cortex and hippocampus. At experiments on gonadal tissues; administration of LTC, 27 mg/kg/day, did not change vas deferens contractions at the end of the 1, 4, or 8 weeks compared with controls. In addition, when LTC administered in increasing doses no histological changes were observed in vas deferens, epididymis and testis at the end of 8 weeks. After administration of 27 and 54 mg/kg/day LTC; testis aromatase expression was down-regulated at the end of 8 weeks compared to controls but has not changed at 108 mg/kg/day dose. According to these results it can be said that LTC did not cause adverse side effects on the functionality of gonadal tissues.

**Key Words:** Aromatase, kainic acid, levetiracetam, temporal lobe epilepsy, gonadal tissues.

Supported by H.Ü.B.A.B. Ph.D. Thesis Grant (010 01 301 001).

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epilepsinin tarihçesi	3
2.2. Epilepsinin tanımı ve epileptik sendromların sınıflandırılması	3
2.3. Epilepsinin patofizyolojisi	5
2.4. Epilepsinin tedavisinin önemi	10
2.5. Epilepsinin modellenmesi	13
2.6. Tez çalışmasının kaynağı ve amacı	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Kalıcı elektrot yerleştirilmesi ve EKoG kaydedilmesi	20
3.2. Deney grupları	21
3.3. Doku lizisi ve protein eldesi	23
3.4. Ekstrelerden <i>Western Blot</i> yöntemiyle protein eldesi	23
3.5. Proteinlerin görünür hale getirilmesi	24
3.6. 27 mg/kg dozda LTC uygulamasının korteks ve hipokampusta kaspaz-3 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi	25
3.7. 27 mg/kg dozda LTC uygulamasının vas deferensin in vitro kasılma yanıtlarına etkisinin incelenmesi	25
3.8. Artan dozda LTC uygulamasının korteks ve hipokampus aromatazına etkisinin immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi	25

3.9.	Artan dozda LTC uygulamasının gonadal doku histolojilerine etkisinin incelenmesi	28
3.10.	Kullanılan kimyasallar	29
3.11.	Kullanılan çözeltiler	30
3.12.	Kullanılan cihazlar	32
3.13.	Verilerin istatistiksel analizi	32
4.	<b>BULGULAR</b>	33
4.1.	Sıçan EKoG kayıtlarının değerlendirilmesi	33
4.2.	27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan beyin korteksindeki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi	39
4.3.	27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan beyin hipokampusundaki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi	40
4.4.	27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan beyin korteksi ve hipokampusundaki kaspaz-3 ekspresyonuna etkisinin değerlendirilmesi	41
4.5.	27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan testisindeki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi	42
4.6.	27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan izole vas deferens kasılması üzerine etkisinin değerlendirilmesi	43
4.7.	Artan dozda LTC uygulamasının sıçan beyin korteksi ve hipokampusundaki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi	45
4.8.	Artan dozda LTC uygulaması sonrası sıçan beyin korteksi ve hipokampusunun immünohistokimya sonuçlarının değerlendirilmesi	47
4.9.	Artan dozda LTC uygulamasının sıçan testisindeki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi	49
4.10.	Artan dozda LTC uygulamasının sıçan gonadal dokularına olan etkilerinin histopatolojik açıdan değerlendirilmesi	50
5.	<b>TARTIŞMA</b>	52
6.	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	58
	<b>KAYNAKLAR</b>	59
	<b>EKLER</b>	
	EK 1: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı-1	
	EK 2: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı-2	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AAKK	Agonistle açılan kalsiyum kanalları (AOCC)
AEİ	Antiepileptik ilaç
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit
ATPaz	Adenozin trifosfataz
BSA	Sığır serum albumini
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum iyonu
cAMP	Siklik-adenozin monofosfat
Cl <sup>-</sup>	Klorür iyonu
DG	Dentat girus ( <i>Gyrus dentatus</i> )
EKoG	Elektrokortikografi
EEG	Elektroensefalografi
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GABA	$\gamma$ -amino bütirik asit
GnRH	Gonadotropin salıverici hormon
HRP-GAM	<i>Horseradish peroxidase-goat anti mouse</i>
HRP-GAR	<i>Horseradish peroxidase-goat anti rabbit</i>
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
i.p.	İntraperitoneal
K <sup>+</sup>	Potasyum iyonu
KA	Kainik asit
LH	Lüteinleştirici hormon
LTC	Levetirasetam
Mg <sup>+2</sup>	Magnezyum iyonu
MSS	Merkezi sinir sistemi
NaCl	Sodyum klorür
NMDA	N-metil-D-aspartat
p38-MAPK	p38-Mitojenle aktive olan protein kinaz
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PDK	Paroksizmal Depolarizasyon Kayması



PVDF	Polivinilidenfluorid
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi
SE	Status epileptikus
TBS	Tris-tamponlu tuz solüsyonu
TLE	Temporal lob epilepsisi
Zn <sup>+2</sup>	Çinko iyonu

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Glutamat reseptörleri ve sinaptik plastisite.	10
2.2. Kolesterolde östradiol sentezi	15
2.3. Cyp19 (aromataz) geni.	16
2.4. Fizyolojik ve patolojik şartlarda aromatazın etkisi.	18
3.1. EKOg kaydedilirken cam fanustaki elektrotlu sıçan.	21
3.2. İmmünohistokimya metodu uygulanan beyin dilimlerinin genel görüntüsü.	26
3.3. Atlastaki referans figüre uygun olarak seçilmiş sıçan beyin diliminin <i>Hoescht</i> solüsyonu ile boyanması sonucu 1X objektifteki görüntüsü.	27
3.4. Sıçan beyin atlasına göre CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinin yerleşimi.	27
3.5. İmmünohistokimya uygulaması yapılmış sıçan beyin dilimlerinde hipokampusun 4X büyütmedeki görüntüsü.	28
4.1. 27 mg/kg LTC uygulamasının sıçan beyin korteksinden kaydedilen dakikadaki ortalama spayk sayısına olan etkisinin zamana göre gösterimi.	33
4.2. 27 mg/kg LTC uygulamasının sıçan beyin korteksinden kaydedilen ortalama spayk amplitüdüne olan etkisinin zamana göre gösterimi.	34
4.3. Sıçan beyin korteksinin bazal elektriksel aktivitesi.	35
4.4. KA verildikten 30 dakika sonra beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	35
4.5. KA verildikten 24 saat sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	35
4.6. KA verildikten 1 hafta sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	36
4.7. KA verildikten 4 hafta sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	36
4.8. KA verildikten 8 hafta sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	36

4.9.	Sıçan beyin korteksinin bazal elektriksel aktivitesi.	37
4.10.	KA verildikten 30 dakika sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	37
4.11.	24 saat süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması sonucu TLE modeli oluşturulan sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	37
4.12.	1 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması sonucu TLE modeli oluşturulan sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	38
4.13.	4 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması sonucu TLE modeli oluşturulan sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	38
4.14.	8 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması sonucu TLE modeli oluşturulan sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.	38
4.15.	1, 4, 8 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulanan ve uygulanmayan TLE modeli oluşturulmuş sıçanların beyin korteksi elektriksel aktivitelerinin karşılaştırmalı gösterimi.	39
4.16.	Sıçan beyin korteksinde aromataz ekspresyonunun zamana göre gösterimi.	40
4.17.	Sıçan hipokampusunda aromataz ekspresyonunun zamana göre gösterimi.	41
4.18.	Sıçan beyin korteksinde kaspaz-3 ekspresyonunun zamana göre gösterimi.	42
4.19.	Sıçan testisinde aromataz ekspresyonunun zamana göre gösterimi.	42
4.20.	1 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif karbakole verdiği cevap.	43
4.21.	4 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif karbakole verdiği cevap.	43
4.22.	8 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif karbakole verdiği cevap.	44
4.23.	1 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif fenilefrine verdiği cevap.	44
4.24.	4 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif fenilefrine verdiği cevap.	45

- 4.25. 8 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif fenilefrine verdiği cevap. 45
- 4.26. Artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg) LTC verildiğinde sıçan beyin korteksinde 8 hafta sonra ölçülen aromataz ekspresyonunun gösterimi. 46
- 4.27. Artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg) LTC verildiğinde sıçan hipokampusunda 8 hafta sonra ölçülen aromataz ekspresyonunun gösterimi. 46
- 4.28. Kontrol grubundaki sıçanın korteks ve hipokampus bölgelerinden alınan aromataz işaretlemesi yapılmış görüntüler (400X büyütmede) 47
- 4.29. 8 hafta süreyle 27 mg/kg LTC verilen sıçanların korteks ve hipokampus bölgelerinden alınan aromataz işaretlemesi yapılmış görüntüler (400X büyütmede). 47
- 4.30. 8 hafta süreyle 54 mg/kg LTC verilen sıçanların korteks ve hipokampus bölgelerinden alınan aromataz işaretlemesi yapılmış görüntüler (400X büyütmede). 48
- 4.31. 8 hafta süreyle 108 mg/kg LTC verilen sıçanların korteks ve hipokampus bölgelerinden alınan aromataz işaretlemesi yapılmış görüntüler (400X büyütmede). 48
- 4.32. 8 hafta süreyle artan dozlarda LTC alan sıçanların aromataz için beyin korteks ve hipokampus bölgelerindeki ortalama immünohistokimyasal pozitiflik değerleri. 49
- 4.33. LTC'nin artan dozlarının (27, 54, 108 mg/kg) 8 hafta sonunda testis aromataz ekspresyonunda yaptığı değişimin gösterimi. 49
- 4.34. Testislerin tübül çapı (A), tübül kalınlığı (B), tübül interstisyel aralığı (C), atrofik tübül ölçümleri (D), epididim çapı (E) ve vas deferens çapı (F) ölçümleri. 51

## TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Deneysel epilepsi modelleri ve modeli oluşturmak için lokal veya sistemik kullanılan kimyasallar.	13
3.1. Deney gruplarındaki hayvan sayısı.	21
3.2. Deney gruplarındaki hayvan sayısı.	23
3.3. İlgili proteinler için kullanılan antikorlar, blok ve antikor çözetileri.	24
4.1. Artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg) LTC verilen sıçanların testis dokularında yapılan patolojik incelemeler sonucu elde edilen bulguların gösterimi.	50

## 1. GİRİŞ

Epilepsi dünyada nüfusun % 1'ini etkileyen ciddi bir hastalıktır ve yüksek ölüm oranlarına sahiptir (1). Türkiye'de ise 700.000 epilepsi hastası olduğu tahmin edilmektedir. Tanım olarak epilepsi beynin kortikal ve subkortikal bölgelerinde tekrarlayan, tetiklenmemiş elektriksel deşarjların neden olduğu nöbetlerle karakterize, heterojen bir grup nörolojik bozukluğu ifade eder. Normal bir beyin dokusunun epileptik olmasına kadar geçen süreç ise epileptogenez olarak adlandırılır. Epileptogenez ile ilgili yapılan pek çok çalışma epilepsinin kazanılmış formları üzerine odaklanmıştır. Epileptogenez süresince genetik, yaş, beynin yapısal özellikleri ve fonksiyonel plastisitesi irdelenerek kronik veya tedaviye cevap vermeyen yönleri sorgulanmaktadır (2). Epileptogenezde bir başlangıç hasarından sonra nöronal yollar, tekrarlayan spontan epileptik nöbetleri yani status epileptikus (SE) oluştururlar ve bu nöbetler daha ciddi ve sık hale gelerek kronik epilepsiye dönüşür. Mevcut farmakolojik tedaviler yalnızca nöbetleri baskılamaktadır, bu nedenle antiepileptik olarak adlandırılmaktadırlar. Ancak hastalığı modifiye eden veya diğer deyişle antiepileptojenik olan bir tedavi henüz bulunmamaktadır (3). Bununla beraber topiramet ve levetirasetam antiepileptojenik ilaç adaylarındandır (4).

Epilepsinin farklı tipleri olmakla beraber bu alt tiplerin de farklı sınıflandırıldıkları olur. İnsanda en sık karşılaşılan alt tip TLE; sekonder jeneralize tutarıklar ve motor konvülsiyonlar oluşturabilen kompleks kısmi tutarıklarla ilişkili bir epilepsi çeşididir (5). KA kullanılarak sıçanlarda modellenen, temporal lobdan kaynaklanan bu hipereksitasyon çeşidi bu tez çalışmasının da ana çıkış noktası seçildi ve KA toksininin oluşturduğu beyin hasarında ve LTC uygulaması sonucunda aromataz enzimindeki değişim araştırıldı.

Aromataz, sitokrom p450 aromataz enzim ailesinin bir üyesidir ve androjen prekürsörlerden östrojen biyosentezini katalizler. Aromataz (*P450 arom*; CYP 19) ekspresyonunun; beyin travmaları, deneysel iskemik hasar (oklüzyon-reperfüzyon hasarı ve KA gibi eksitotoksin uygulamaları) ve Alzheimer gibi sinir hasarına yol açan hastalıklarda artmış olmasının gösterilmesi, onun beyinde bölgesel östrojen seviyesini arttırarak sinir hücrelerinin korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini

düşündürmektedir (6). Bilişsel fonksiyonları önemli ölçüde etkileyen aynı zamanda eksitotoksik hasardan beyni koruyan östradiolün sentezinden sorumlu aromataz enziminin ekspresyon düzeyinin epilepside nasıl değiştiğini araştırmak ve patofizyolojiyi anlamak ilaç geliştirilmesi aşamasında yol gösterici olması açısından önem arz eder.

Bu tez çalışmasında KA ile oluşturulan TLE modelinde, LTC'nin insanda klinikte kullanılan tedavi dozunun (1000 mg/75 kg erişkin için) deney hayvanlarına ekstrapole edilen dozda (27 mg/kg/gün) beyin korteksi ve hipokampusta aromataz ekspresyonuna etkisi incelendi. Ayrıca LTC'nin artan dozlarında (54 ve 108 mg/kg/gün) beyinde aromataz miktarındaki değişim ve üreme fonksiyonları üzerinde olumsuz yan etkisinin olmadığı hipotezini ispatlamak üzere vas deferens kasılma yanıtlarında, testisteki aromataz ekspresyonunda ve gonadal dokuların histolojik yapısındaki etkisi değerlendirildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Epilepsinin tarihçesi

Epilepsi kelime olarak "*epi*" (üzerine) ve "*lapse*" (düşmek) kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Epilepsiden bahseden ilk kişi M.Ö. 350'lerde Hipokrat'tır. Bu yüzden "Hipokrat Hastalığı" olarak da bilinir. 1861'de J. Russell Reynolds, sinir sistemindeki yapısal bir düzensizliğe bağlı olan kasılmaları semptomatik epilepsi, merkezi sinir sisteminin dışındaki nedenlerden kaynaklananları da sempatik epilepsi olarak tanımlamıştır. Sinir sisteminin içinde ya da dışında herhangi bir yapısal anormallik söz konusu değilken oluşan epilepsileri ise idiyopatik olarak değerlendirmiştir. 1881 yılında Sir William Gowers ise epilepsiyi grandmal, petitmal ve histeroid olarak sınıflamıştır. Merritt ve Putnam'ın 1912'de kedilerde yaptıkları deneylere kadar tek ilaç olan fenobarbitali; fenitoin, karbamazepin, etosüksimid, sodyum valproat, felbamat, gabapentin, lamotrijin, topiramet, tiyagabin, levetirasetam, okskarbazepin gibi ilaçlar takip etmiştir. 1929'da Hans Berger hastalardan elektroensefalografi (EEG) ile beyin kayıtlarını almayı başarmış ve hastalığın teşhisi için önemli bir adım atmıştır (7). Epilepsi ile ilgili ilk fizyopatolojik değerlendirmeler ise 1931'de John Hughlings Jackson tarafından nöbet tanımının yapılması ve epileptik nöbetlerin çok farklı nedenlerle ortaya çıktığı ve birçok çeşidinin bulunduğu bildirilmesi ile olmuştur.

### 2.2. Epilepsinin tanımı ve epileptik sendromların sınıflandırılması

Epilepsiye Karşı Uluslararası Birlik (*International League Against Epilepsy*, ILAE) tarafından epilepsi; nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal olumsuz sonuçları olan, tekrarlayan nöbetlerle karakterize, heterojen bir grup nörolojik bozukluk olarak tanımlanmaktadır (8). Epileptik nöbet ise beyindeki hücrelerin kontrol edilemeyen, ani, aşırı ve anormal deşarjlarına bağlı olarak ortaya çıkan akut bir durumdur. Epilepsi nöbetleri değişik tiplerde olabilir. Nöbetler; genel (jeneralize tonik-klonik/grand mal) ya da kısmi (basit parsiyel/kompleks parsiyel) nöbetler şeklinde ortaya çıkabilir. Ayrıca kısa süreli (5-20 saniye) gözlerini dikip sabit bakma,



cevapsızlık şeklinde kasılsız dalma (absans) nöbetleri ve özellikle sabahları uykudan uyandıktan sonraki dönemlerde ortaya çıkan kollarda sıçrama-atmalar tarzında myoklonik nöbetler de mevcuttur. Jeneralize nöbetlere beynin tüm bölgelerinde aynı anda başlayan anormal nöron deşarjı sebep olurken, parsiyel nöbetler beyinde lokal bir bölgeden başlar. Eğer parsiyel nöbetler beynin diğer bölgelerine de yayılırsa buna sekonder jeneralize nöbet adı verilir (9). Ancak epilepsiyi jeneralize ve parsiyel olarak ayırmak yetersiz kalır. Doğru tanı koymak ve doğru tedaviyi yapabilmek adına epilepsiyi sınıflandırmak önem arz eder. Dünyada kabul edilen en büyük otoritelerden ILAE'nin 1989'da yaptığı ve halen geçerli epilepsi sınıflandırması (9) aşağıdaki gibidir:

## 1. Lokalizasyona bağlı (fokal, lokal, parsiyel) epilepsiler ve epileptik sendromlar:

### 1.1. İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç)

- Sentrotemporal spayklı selim çocukluk çağı epilepsisi
- Oksipital paroksizimli çocukluk çağı epilepsisi
- Primer okuma epilepsisi

### 1.2. Semptomatik

- Çocukluk çağının kronik progresif *epilepsia parsialis continua*'sı
- Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize semptomlar
- Temporal lob epilepsisi
- Frontal lob epilepsisi
- Pariyetal lob epilepsisi
- Oksipital lob epilepsisi

### 1.3. Kriptojenik

## 2. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar

### 2.1 İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç)

- Selim ailesel yeni doğan konvülsiyonları
- Selim yeni doğan konvülsiyonları
- Süt çocuğunun selim myoklonik epilepsisi
- Çocukluk çağı absans epilepsisi
- Jüvenil myoklonik epilepsi (impulsif *petit mal* epilepsi)
- Uyanırken gelen *grand mal* nöbetli epilepsi
- Diğer jeneralize idiyopatik epilepsiler

- Belirli aktivasyon yöntemleri ile uyarılan epilepsiler

## 2.2. Kriptojenik veya semptomatik

- *West* sendromu
- *Lenox – Gastaut* sendromu
- Myoklonik astatik nöbetli epilepsi
- Myoklonik absanslı epilepsi

## 2.3. Semptomatik

### 2.3.1. Nonspesifik etyoloji

- Erken myoklonik ensefalopati
- Supresyon *burst*'lü erken infantil epileptik ensefalopati
- Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler

### 2.3.2. Spesifik sendromlar

## 3. Fokal ya da jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsiler

### 3.1. Jeneralize ve fokal konvülsiyonlu epilepsiler

- Yeni doğan konvülsiyonları
- Süt çocuğunun ağır myoklonik epilepsisi
- Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı spayk dalgalı epilepsi
- Edinsel epileptik afazi (*Landau-Kleffner* sendromu)
- Diğer belirlenemeyen epilepsiler

### 3.2. Net jeneralize ya da fokal konvülsiyon özelliği olmayanlar

## 4. Özel durumlar

### 4.1. Duruma bağlı nöbetler

- Febril konvülsiyonlar
- İzole nöbet ya da izole status epileptikus
- Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler

## 2.3. Epilepsinin patofizyolojisi

Görülme sıklığından ziyade bahsedildiği gibi çok sayıda epilepsi tipinin olması tanıyı ve dolayısıyla tedaviyi güçleştirmektedir. Ayrıca her hastanın aynı ilaca karşı verdiği cevabın derecesindeki farklılık ve ilaç tedavisinde görülen hayat kalitesini azaltan yan etkiler epilepsinin patofizyolojisinin irdelenmesini

güçleştirmektedir. Bununla beraber hayvan deneylerinde ve insanda etiyojoloji anlamaya yönelik olarak yapılan çalışmalarda kortikal nöronların membran potansiyellerinde ve ateşlenme şekillerinde bazı karakteristik bozukluklar olduğu saptanmıştır. Paroksizmal depolarizasyon kayması (PDK) olarak bilinen bu hipereksitasyon durumunda 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  $\gamma$ -amino bütirik asit (GABA) sistemleri arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bunun dışında membranlardaki iyon kanallarındaki bozuklukların da PDK'nın ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir (10).

Epileptojenik odak olarak adlandırılan bölgede "*pacemaker*" hücreler yer alır ve bu hücreler tam olarak bilinmeyen nedenlerle artmış uyarılma ve anormal ateşlenme özelliği gösterirler, etraflarındaki hücreleri de bu ateşlenmeye ortak edebilecek güçleri vardır. Anormal eksitotoksositeye sonradan katılan bu nöronların miktarı; ortaya çıkan tablonun EEG'de spaykla sınırlı kalmasını ya da yeterli miktara ulaşabildiğinde EEG'de ve klinikte nöbet aktivitesinin oluşmasını belirler. Özetle, fokal kortikal bir nöbet aktivitesinin oluşabilmesi için ilgili nöronlarda iki temel fizyopatolojik özellik (hipereksitabilite, senkronizasyon) birlikte bulunmalıdır. Nöbet aktivitesinin yayılması ise eksitasyon alanını çevreleyen inhibitör nöronların inaktivasyonu (çevresel inhibisyon alanının kaybı) ile gerçekleşmektedir (11).

Nöbete eşlik eden anormal deşarjların fizyolojisi konusunda bilinenlere karşın epileptogenezden sorumlu hücrel mekanizmalar halen bilinmemektedir. İstirahat membran potansiyelinin instabilitesine neden olan primer bir nöron membran defekti üzerinde durulmaktadır. Buna neden olduğu düşünülen mekanizmalar; potasyum iletiminde bozukluk, voltaja duyarlı kalsiyum kanallarında defekt veya ATPaz'a (adenozin trifosfataz) bağlı iyon transportunda bozukluk olarak özetlenmektedir. GABAerjik inhibitör sistemlerin primer defekti veya eksitator nörotransmisyonunda rol alan reseptörlerin duyarlılığı ve düzenlenmesindeki olası defektler, hücre kaybı, gliosis, bazı genlerin artan ekspresyonu (c-fos, c-jun), büyüme faktörlerinin artışı, nörogenez, sinaptogenez, glutamat ve GABA sinyalizasyonunda değişiklikler,

inflatuar aracılar, voltaja duyarlı iyon kanallarında değişiklikler ve eksitotoksik antikörler olabileceği üzerine de çalışmalar vardır (12).

Epileptik nöbetlerde paroksizmal deşarjlarla ilgili olarak bölgesel beyin kan akımının arttığı uzun zamandan beri bilinmektedir. Nöbet sırasında ATP azalırken adenozinmonofosfat, adenzindifosfat, laktik asid gibi maddeler artmaktadır. Yine hücre içi kalsiyumun artmasıyla aktive olan fosfolipazlar serbest yağ asidlerinin artmasına yol açmakta ve prostaglandinler de artış göstermektedir. Adenzindifosfat ve prostaglandinlerin vazodilatasyondaki rolleri göz önüne alınırsa, nöbet dönemindeki bölgesel beyin kan akımının artışı ve lokal pH değişikliklerini açıklamak kolaylaşmaktadır (13).

Epileptogenezi tetikleyen beyin hasarına en duyarlı yapı olan temporal lob; amigdala, hipokampus ve anatomik olarak bağlantılı olan korteksi (entorinal, peririnal ve parahipokampal korteksler, subikular korteks ve lateral korteks) kapsamaktadır (14). Bu beyin yapılarından kaynaklanan spontan nöbetler genellikle epigastrik bölgede his değişikliği, duyu-durum değişiklikleri (genellikle korku) ve koku ya da tat halüsinasyonları gibi semptomlar üretirler (15). Öğrenme ve hafıza bozuklukları da TLE'nin diğer önemli semptomları arasında yer alır.

Epilepsinin kesin nedenleri çoğu vakada tam olarak bilinmemekle beraber, hipokampal sklerozla birlikte seyreden TLE'nin, beyin hasarı, tümörler, menenjit, ensefalit, SE veya çocukluk çağı febril nöbetleri gibi bir başlangıç hasarı nedeniyle sekonder olarak meydana geldiği düşünülmektedir (16,17).

Bazı epileptik sendromlarda ise genetik faktörlerin rolü vardır. Örneğin, gen mutasyonları anormal iyonik kanal fonksiyonlarına yol açabilmekte ve anormal ağ bağlantılarına neden olabilmektedir. Fakat monogenetik kalıtım örneği gösterenler (otozomal X'e bağlı, mitokondriyal) hariç tutulursa, genetik analizler, fenotipik ve genotipik heterojenitenin işe karışması nedeniyle, epileptik sendromların kalıtım özelliklerini açıklamakta çoğu kez yetersiz kalmaktadır (18). Tek gen epilepsilerinin çoğu, nöronal iyon kanallarını kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (19). İyon kanallarındaki mutasyonlar eksitator ve inhibitör nörotransmisyonun etkinliğinin değişmesine yol açmakta; bunun sonucunda eksitator nörotransmisyonun artmasına ya da inhibitör fonksiyonun kaybına neden olmaktadır (20).

Beyindeki nöronal eksitabilitenin ana inhibitörü GABA'dır ve etkisini GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. GABA<sub>A</sub> reseptörleri pentamerik yapıdadır ve çeşitli altbirimlerin alttiplerinden ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 6,  $\beta$ 1- $\beta$ 3,  $\gamma$ 1- $\gamma$ 3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  ve  $\rho$ 1- $\rho$ 3) oluşmaktadır (20). İyonotropik GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>C</sub> (Cl<sup>-</sup> iyonu geçişine izin verir) ve metabotropik GABA<sub>B</sub> (G-proteinlerine bağlı olup adenilat siklazı ve buna bağlı Ca<sup>+2</sup> akışını inhibe ederken K<sup>+</sup> kanallarında geçirgenliği artırır) bilinen üç GABA reseptörüdür (21). GABA<sub>B</sub> ve GABA<sub>C</sub> reseptörleri nikotinic asetilkolin reseptörü ve birçok glutamat reseptöründeki gibi bir kanal oluşturacak şekilde yan yana dizilmiş beş alt birimden oluşur. GABA<sub>A</sub> reseptörleri de beş alt birimden oluşur, ancak burada altı  $\alpha$ , dört  $\beta$ , dört  $\gamma$ , bir  $\delta$  ve bir  $\epsilon$  bulunur. Bu çok sayıda farklı bağlanma yerleri nedeni ile GABA<sub>A</sub> çok sayıda ilaç için hedefdir. İyon kanallarının dışında GABAerjik sisteme ait genetik bozukluklar da tespit edilmiştir. GABA<sub>A</sub> iletimindeki azalmanın *in vitro* ortamda memeli neokorteksinde (beyin hemisferinin en dış tabakası) epileptiform aktiviteye neden olduğu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, epilepsi gelişimi esnasında anormal GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin aşırı eksprese olduğu bulunmuştur. GABA<sub>B</sub> reseptörleri ise primer jeneralize epilepsiler ile ilişkilendirilmiştir, fokal epilepsilerdeki rolleri tartışmalıdır (22).

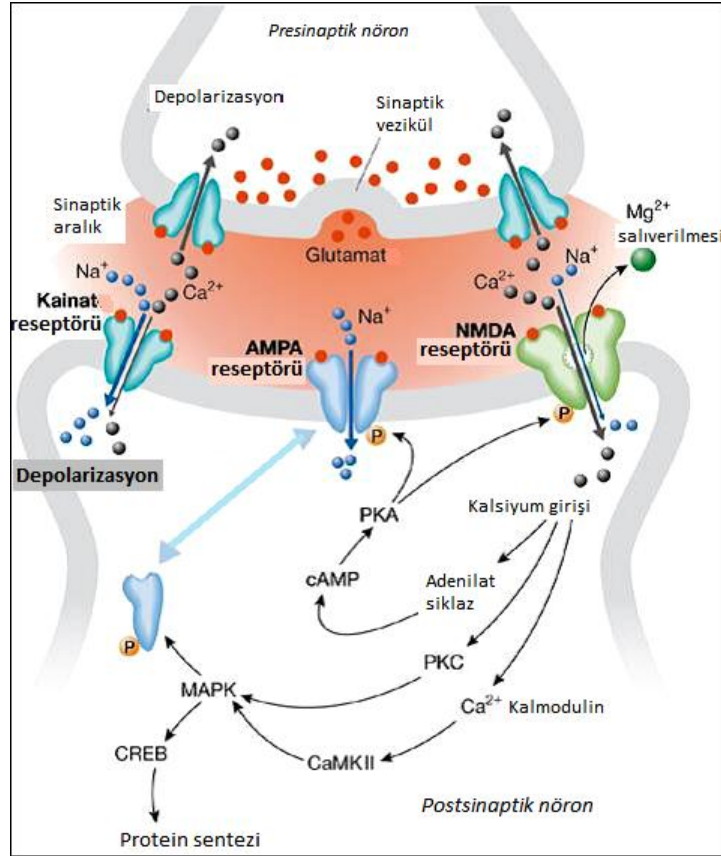
Sekonder epilepsi sendromlarında glutamaterjik sistem de önemli bir yer tutmaktadır. Glutamatın beyindeki en önemli eksitator nörotransmitterlerden biri olduğu ilk 1950'lerde bulunmuştur (23). Glutamat; hem iyonotropik [N-metil-D-aspartat (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propiyonik asit (AMPA) ve kainat reseptörleri] hem de metabotropik (hücre içi inozitoltrifosfat ve diaçilgliserol düzeylerini arttıran veya cAMP'yi düşüren G-proteinine bağlı) reseptörlere etki eder (Şekil 2.1). Metabotropik veya iyonotropik glutamat reseptör agonistlerinin beyin kesitlerinde deşarja, hayvanlarda konvülsif ve konvülsif olmayan nöbetlere neden olduğu bildirilmiştir. İyonotropik reseptörler her zaman eksitator iken metabotropik reseptörler eksitator ya da nadiren inhibitör olabilirler. Presinaptik terminale uyarıların ulaşması glutamat salımını tetikler ve glutamat post-sinaptik membrandaki glutamat reseptörlerine bağlanır (24). Kainat ve AMPA reseptörleri hücre içine Na<sup>+</sup> girişine ve K<sup>+</sup> çıkışına izin verirken NMDA reseptöründeki iyon kanalları Ca<sup>+2</sup> geçişine de izin verir. NMDA reseptörünün

işlevini kolaylaştırmak için önce kofaktör rolündeki glisin reseptöre bağlanır. Daha sonra glutamat buraya bağlanır. Ancak normal membran potansiyeli halinde bu kanal  $Mg^{+2}$  ile bloke edilmiş haldedir. Blok durumu, NMDA reseptörü içeren nöron kısmen depolarize olduğu zaman ortadan kalkar. İyon kanalları arasında hem kimyasal haberciyle hem de voltaja bağlı açılabilen tek kanal NMDA reseptörüdür. Son yıllarda AMPA reseptörlerinin bazı formlarının da  $Ca^{+2}$ 'a geçirgen oldukları gösterilmiştir. NMDA ve AMPA reseptörleri nöron dejenerasyonu ve hücre ölümünde önemli rol oynarlar (24).

1980'li yılların başında, hipoksi-iskemi, hipoglisemi ve SE'de hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı ve buna bağlı gelişen nöron ölümünün, dendritik membran üzerinde yerleşmiş voltaja duyarlı kalsiyum kanalları (VDKK) yoluyla oluştuğu düşünülmektedir. Günümüzde  $Ca^{+2}$  'un hücre içine birçok giriş yolu olduğu, en önemlilerinden birinin de glutamat ve diğer eksitatör aminoasitlerin etkisiyle açılan agonistle açılan kalsiyum kanalları (AAKK) olduğu anlaşılmıştır. En önemli AAKK; eksitatör aminoasitler tarafından aktive edilen NMDA reseptörüdür. Bu temel olarak NMDA kanalları ile yürütülür ve hücre içi depolardan da  $Ca^{+2}$  salımını tetikler. Hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı lipolitik (lipaz ve fosfolipaz) ve proteolitik enzimleri (Kalpain-I ve diğer  $Ca^{+2}$  bağımlı proteazlar) aktive eder. Proteolitik enzimler plazma membranını ve hücre iskeletini oluşturan madde ve zincirleri yıkar. Lipolitik enzimlerin aktivasyonu ise nöron membranındaki fosfolipidlerden araşidonik asid salımına, yani araşidonik asid döngüsünün başlamasına neden olur. Bu döngüde prostaglandinler, lökotrienler ve tromboksanlar sentezlenir. Olay serbest radikal ve lipid hidroksiperoksidlerin yapımıyla ve kısır bir döngü içinde ilerleyerek nöronun ölümüyle sonuçlanır (11).

NMDA fizyolojik koşullarda beyinde sinaptik plastisite, nöronal ağın oluşumu, öğrenme ve hafıza gibi süreçlerde önemli role sahiptir (25). Bazı koşullar altında glutamat gibi eksitatör transmitterlerin dengesizliği, hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Yüksek miktarlarda glutamat nöronlar için toksiktir ve glutamat eksitotoksitesi olarak adlandırılır. Hücrelerarası glutamat dengesinin bozulması sonucu hasarın şiddetine bağlı olarak apoptoz veya nekroz gibi değişik tipte hücre ölümleri olabilir (23). Eksitotoksik hücre hasarının mekanizmasına ek olarak hücre içi depolardan peroksinitritle indüklenen  $Zn^{+2}$  saliverilmesi; p38-mitojenle aktive olan protein kinaz (p38-MAPK) apoptotik yolağı ile ilişkili reaktif

oksijen türevlerinin mitokondriyal üretimini de tetikler (23). Çalışmalarda SE, mekanik travma veya iskemi sonrası oluşan akut beyin hasarında eksitotoksisitenin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Glutamat toksisitesi; Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı ve amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda da başrolde dir (23).



Şekil 2.1. Glutamat reseptörleri ve sinaptik plastisite.

Voglis ve diğ. (24) 'nden alınmıştır.

#### 2.4. Epilepsi tedavisinin önemi

Epilepsi gerek hastaların gerekse ailelerinin günlük yaşamları üzerinde yıpratıcı etkiye sahip bir hastalıktır. Bir nöbet geçirme tehdidi, epilepsi hastalarının yaşamlarına ve fonksiyonlarına, özellikle motorlu araç kullanma, çalışma, kişisel ilişkiler kurma ve bağımsız olma yetilerine çok büyük kısıtlamalar getirmektedir. Nöbet korkusu kişinin kendisiyle ilgili algısının kötü olmasına, anksiyete ve

depresyona ve sosyal izolasyona sebep olur. Sağlıklı bireylere kıyasla epilepsisi olan bireylerin kazalar, travma, anksiyete, depresyon ve sosyal izolasyon gibi psikososyal problemler ve bilişsel bozukluklar yönünden daha büyük risk altında oldukları gösterilmiştir. Epilepsinin bazı hastalarda kalıtım, kafa travması, serebrovasküler hastalık gibi belirlenebilen sebepleri olmasının yanında çoğu hastada epilepsinin etiyojisi veya nihai sebebi sıklıkla bilinmemektedir. Tekrarlayan nöbetler vücutta hasar oluşması ve hatta ölüm için belirgin bir risk oluştururlar. Ayrıca nöbetleri tamamen kontrol altına alınamayan epilepsi hastaları genellikle kötü bir yaşam kaliteleri olduğunu deneyimler. Buna karşın epilepsi günümüzde ilaçla veya cerrahi olarak tedavi edilebilen ve çoğu hastada (%70-75) nöbetlerin tek ilaçla kontrol altına alınabildiği bir hastalıktır. Her ne kadar ilaca dirençli epilepsiler olsa da epilepsili hastalar çoğu zaman ilacını kullanarak aktif ve başarılı bir yaşam sürebilir.

Epilepsinin etkin tedavisi için tanının doğru konması önemlidir. Epilepsinin tanısında genel fizik ve nörolojik muayene yapıldıktan sonra EEG önemli bir araçtır. Bilgisayarlı beyin tomografisi ve magnetik rezonans incelemesi epilepsi nöbetlerine neden olan olayların ortaya konmasında yardımcı olabilir.

Epilepsili hastalarda nöbet oluşumunu tetikleyen nedenler arasında ilacı doğru kullanmamak, uykusuzluk, uyuşturucu madde kullanımı, aşırı alkol alımı, AEİ'lerin etkinliğini azaltan diğer ilaçların kullanımı, aşırı kafein alımı, menstrüasyon dönemlerinde kan şekerinin düşmesi, B6 vitamin eksikliği, kan elektrolit dengesinde bozulma, kalıtsal hastalıklar (nörofibromatozis, tuberoskleroz, fenilketonüri) yer alır.

Tedavide öncelikle ve en sık kullanılan yöntem AEİ uygulamasıdır. Ancak ketojenik diyet, vagus sinir stimülasyonu ve bölgesel lobektomi ameliyatları da denenebilmektedir (8). AEİ tedavisi en az 4-5 yıl süren, erken veya geç dönemde ortaya çıkabilen olası hafif veya ağır yan etkilerin görülebileceği bir tedavidir. Hastanın tedaviye göstereceği bireysel farklılıklar, tedaviye uyumu, uzun süreli takip gerekliliği, komorbid hastalıkları ve bu hastalıkları için kullanması gereken ilaçlar tedavinin etkinliğini değiştirir. İyi bir AEİ'den beklenen özellikler yan etkisinin olmaması, biyoyararlanımının iyi olması, basit lineer kinetiğe sahip olması, ilaç etkileşimlerinin olmaması, proteince az bağlanması, ilacı metabolize eden sistemleri etkilememesi, günde bir veya en fazla iki kerede kullanılabilmesi ve



maliyetinin düşük olmasıdır. Teratojen olmaması ve farklı formüllerde (şurup, kapsül, tablet vb.) alınabilmesi de önemlidir. Karaciğerde metabolize olan ve enzim indükleyicisi olan AEİ'ler birbirleriyle ve diğer ilaçlarla etkileşmektedir. Bu özellikler eski kuşak ilaçlarda daha belirgindir. Genel olarak yeni kuşak ilaçlar bunu önlemek amacıyla geliştirilmiştir ve daha az etkileşim gösterirler (gabapentin, pregabalin, LTC gibi). 1993'ten sonra lamotrijin, okskarbazepin, levetirasetam, vigabatrin, klobazam, topiramet, felbamat, gabapentin, tiagabin, zonisamid, pregabalin, lakozamid gibi pek çok ilaç dünyada ve ülkemizde kullanıma sunulmuştur.

Birçok ilaçta olduğu gibi çoğu AEİ'nin de ciddi yan etkisi mevcuttur. Bu grup ilaçlar merkezi sinir sisteminde (MSS) etkili olduğu için bekleneceği üzere tedaviyle en sık gelişen advers olaylar, uyku hali, halsizlik ve kognitif fonksiyon değişiklikleri, anksiyete, depresyon, konsantrasyon güçlüğü, hafıza güçlüğü ve konuşma güçlükleri gibi MSS ile ilişkili olanlardır. Ancak kontrol edilemeyen nöbetlerin çocuklardaki kognitif fonksiyon üzerindeki etkileri, AEİ tedavisinin yan etkilerinden daha zararlı olabilir. AEİ'lerin periferdeki en önemli yan etkisi ise infertilitedir (8).

LTC; 1992'de ilaç araştırmaları esnasında keşfedilmiş, bilinen diğer antiepileptiklere göre daha geniş terapötik pencereye sahip ve daha az yan etkili olduğundan kullanıma sunulmuştur. Epilepsi tedavisinde kısmi tutarıklarda tek başına veya parsiyel, miyoklonik ve tonik-klonik tutarıklarda tedaviye ek olarak kullanılır. Tourette sendromu, Alzheimer hastalığı, otizm, bipolar bozukluk ve anksiyete bozukluklarında da kullanılır. LTC antiepileptik özellikleri yanında çözünlülüğünün iyi olması, nöron koruyucu etkisi, düşük akut toksisiteye sahip olması gibi özellikleriyle diğer AEİ'ler arasında öne çıkmaktadır (26). Sıçanlarda sodyum valproat, klonazepam ve karbamazepin gibi klasik ilaçlarla karşılaştırıldığında LTC'nin bilişsel fonksiyonlarda değişiklik yapmadığı gözlenmiştir. LTC güvenli, iyi tolere edilen, oral biyoyararlanımı yüksek, yiyeceklerden etkilenmeyen, plazma proteinlerine neredeyse hiç bağlanmayan, karaciğerde çok az metabolize olan, lineer farmakokinetik profile sahip, ilaç etkileşmesi açısından düşük potansiyelde yeni nesil AEİ'lerden biridir.

LTC'nin açık adı [(-)-(S)- $\alpha$ -etil-2-okso-1-pirolidin asetamid] ve moleküler formülü  $C_8H_{14}N_2O_2$ 'dir. Epilepsi tedavisindeki gerçek etki mekanizması tam olarak

bilinmemekle birlikte bir sinaptik vezikül proteini olan SV2A'ya bağlandığı (27) ve presinaptik kalsiyum kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir (28). Böylece sinaptik aralıkta impuls iletimini engellediği düşünülmektedir (29). SV2A geni silinmiş ve dolayısıyla bu proteini taşımayan farelerde presinaptik  $Ca^{+2}$  birikmesi, nörotransmitter salıverilmesinin anormal artışı ve tekrarlayan stimülasyonla epilepsinin indüklenmesine neden olmuştur (27,30). LTC terapötik konsantrasyonlarda direkt glutamat veya GABA reseptörü üzerinden sinaptik iletimi etkilemez veya  $Na^{+}$  kanal akımını değiştirmez. Ancak yüksek voltajla aktive olan  $Ca^{+2}$  akımlarında azalma yapar. Tutarıkların zamanla eşliğini yükseltir, tutarık şiddeti ve frekansını azaltır (4).

## 2.5. Epilepsinin modellenmesi

Epilepside görülen fokal veya jeneralize tutarıklar beyin korteksinde veya subkortikal yapılarda belirli bir bölgede veya korteksin genelinde eksitabilitenin artmasına bağlıdır (5). Epilepsi oluşturmak için kullanılan pek çok yöntem vardır. Bu deneysel epilepsi modellerinden bazıları ve modeli oluşturmak için kullanılan kimyasallar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Deneysel epilepsi modelleri ve modeli oluşturmak için lokal veya sistemik kullanılan kimyasallar. Bambal ve diğ. (31)'nden alınmıştır.

Lokal konvülsanlar		Sistemik konvülsanlar	
Kimyasallar	Nöbet modeli	Kimyasallar	Nöbet modeli
Penisilin	Basit parsiyel akut	Kainik asit	Kompleks parsiyel
Tetanus toksini	Kompleks parsiyel	Bikukulin	Jeneralize tonik klonik
Striknin	Basit parsiyel akut	Bemegrid	Jeneralize tonik klonik
Alüminyum	Basit parsiyel kronik	İsonizaid	Jeneralize tonik klonik
Kobalt	Basit parsiyel kronik	Pentilentetrazol	Jeneralize tonik klonik
Tungstik asit	Basit parsiyel kronik	Pikrotoksin	Jeneralize tonik klonik
Demir	Basit parsiyel kronik	Flurotil	Jeneralize tonik klonik

Bilindiği üzere; beynin temporal lobu duyguları ve hafızayı kontrol eden limbik sistemin bir parçasıdır. Epilepsili hastaların büyük bir bölümünü TLE'li hastalar oluşturmaktadır. Temporal lobdan kaynaklanan nöbetler limbik nöbet veya

psikomotor nöbet olarak da adlandırılmaktadır. Kompleks parsiyel nöbetlerin gözlendiği TLE'nin en sık rastlanan etiyojisi hipokampusta meziyal temporal sklerozdur ve bu nedenle bu epilepsi tipinde hafıza ve dil yeteneğinde bozulma görülür. Bazı TLE'li hastalarda tutarık ve konvülsiyonlar ilk hasarın (febril konvülsiyonlar, travma, SE vb.) oluşmasından sonra bir latent periyodu takiben görülür (9,32). TLE'nin araştırılması için nöbetlerin spontan olarak oluştuğu çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir. İdeal model kolay ve etkili olan (düşük ölüm oranlı ve spontan nöbetli) ve TLE'nin davranışsal, elektrografik ve anatomik karakteristiklerine sahip olan modeldir (1).

Yapılan modellemenin epilepsinin oluşumunu ispatlaması ve derecelendirmenin yapılabilmesi için bazı gözlemsel parametrelere ihtiyaç vardır. Bunlardan halen geçerli olan 1972'deki çalışmasında *Racine*'in her stimülasyondan sonra sıçanların davranışsal aşamalarını belirli basamaklara ayırarak değerlendirdiği ve bu tez çalışmasında da kullanılan *Racine* Skalası'dır (33). Bu çalışmada sıçanların modellemeye uyup uymadıkları değerlendirilirken *Racine* Skalası'nın yanında, korteksin elektriksel aktivitesini kaydederek incelemeye yarayan elektrokortikografi (EKoG) yöntemi de kullanıldı.

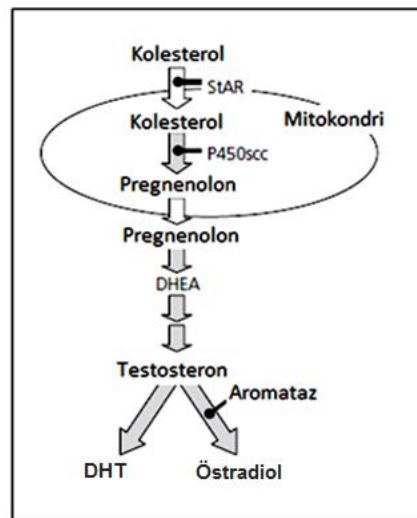
## 2.6. Tez çalışmasının kaynağı ve amacı

KA; aynı TLE'de olduğu gibi latent bir periyottan sonra yüksek fakat değişen frekanslarda kronik epileptik bir durum oluşturan eksitotoksik etkili bir aminoasittir (32,34). Erişkin hayvanda glutamat kan-beyin engelini geçemezken, onun etkili analogu olan ve Japon su yosunundan (*Digena simplex*) elde edilen KA sistemik uygulama sonucu kolaylıkla kan-beyin engelinden geçerek konvülsiyonlara ve beyinde nöron ölümüne yol açar. KA'nın sıçan beynine intraserebroventriküler yolla verildiğinde epilepsidekine benzer nöbetlere ve hipokampusta hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir (35,36). KA i.p. verildiğinde de sıçan hipokampusunun CA1 ve CA3 bölgelerinde ve amigdalanın medial çekirdeğinde aşırı eksitasyon nedeniyle oluşturduğu nöron hasarı yönünden insan TLE'sine çok benzer bir modeldir (35,37). KA ile oluşturulan TLE modelinin sıçan ve insanlarda kronik spontan tekrarlayan

tutarıklar, beyin hasarı, hilar nöron kaybı, dentat girus granül hücresi aksonlarının yeniden düzenlenmesi bakımından benzerlik gösterdiği bulunmuştur (38,39).

Glutamat analogu olan KA düşük dozlarda glutamat gibi etki gösterir. Lokal olarak yüksek dozda nörotoksik etki yapar, nöron somalarını tahrip eder. Yüksek miktarlarda, glutamat nöronlar için toksiktir ve oluşturduğu toksisiteye glutamat eksitotoksitesi adı verilir. Beyindeki birçok hücrede L-glutamata yanıt veren reseptör bulunur. Bu tür toksisiteden NMDA tip reseptörlerden  $Ca^{+2}$ 'un hücre içine girişi sorumlu tutulmaktadır. Yüksek intraselüler  $Ca^{+2}$ , kalsiyuma bağlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücreye toksik olan serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır (40). KA ile oluşturulan kompleks parsiyel nöbetlerin olduğu TLE modeline bağlı tutarıkların davranışsal kalıbı, insanda sekonder olarak jeneralize tonik-klonik tutarıklara yol açan kompleks kısmi tutarıklara yani temporal lob tutarıklarına benzerdir (5,41).

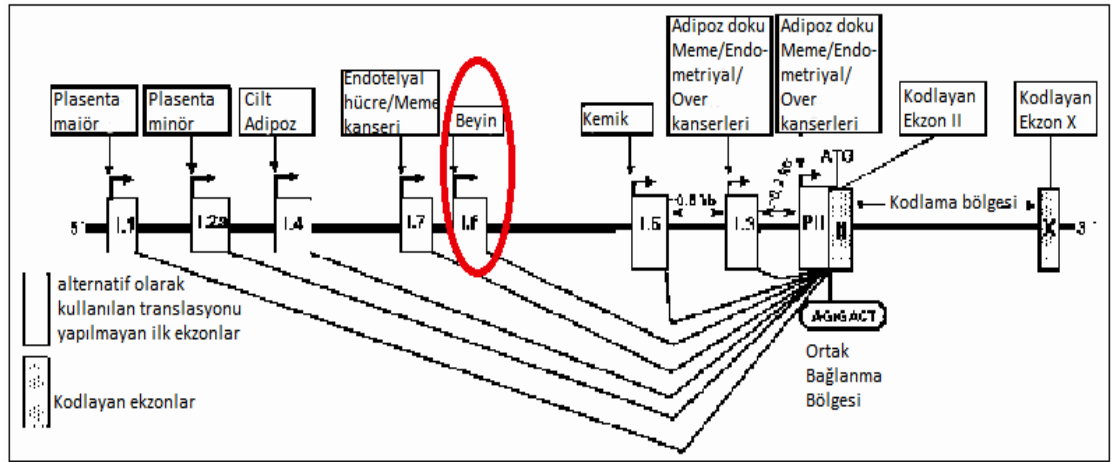
Aromataz normal şartlar altında memelilerde özellikle sinir hücrelerinde eksprese edilir (42) ve Naftolin ve diğ. (43) tarafından insan beyinde aromataz ekspresyonu ve aktivitesi gösterilmiştir. Beyinde lokal östrojen sentezinden sorumlu aromataz, sitokrom p450 aromataz enzim ailesinin bir üyesidir ve androjen prekürsörlerden östrojen biyosentezini katalizler. Beyinde östrojen biyosentezi (Şekil 2.2), kolesterolün mitokondriye girmesini takiben başlayan altı enzimatik basamağa bağlıdır.



Şekil 2.2. Kolesterolde östradiol sentezi.

Garcia-Segura (30)'dan alınmıştır.

Aromataz C<sub>19</sub> steroidlerinin androjenlerden östron ya da östradiole dönüştüğü son basamağı katalizleyen anahtar enzimdir (44). Cyp19 gen ürünü olan sitokrom P450 aromataz enziminin sentezi farklı dokularda farklı promotörler aracılığıyla gerçekleşir (45). Bu promotörler aromatazın gonadlar, adipoz doku, kemik, cilt, fetal karaciğer, plasenta ve beyindeki farklı ekspresyonlarını düzenlerler (Şekil 2.3). Şimdiye kadar insanda 10 alternatif dokuya özgü ilk ekzon bulunmuştur: Promotör (P) I.1, I.2 ve I.2a plasentada, I.4 adipoz doku ve ciltte, I.5 fetal dokuda, I.7 endotel hücrelerinde, I.6 kemikte, I.3 adipoz dokuda, PII gonadlarda ve I.f beyinde (46) bulunmaktadır. Beyin aromatazı belirli nöronlarda, kodlama bölgesinin yaklaşık 36 kb üstündeki beyne spesifik distal promotör I.f'de sentezlenir. Vertebral beyinde aromataz birincil olarak hipotalamus, hipokampus ve amigdalada promotör I.f yoluyla sentezlenir (47).



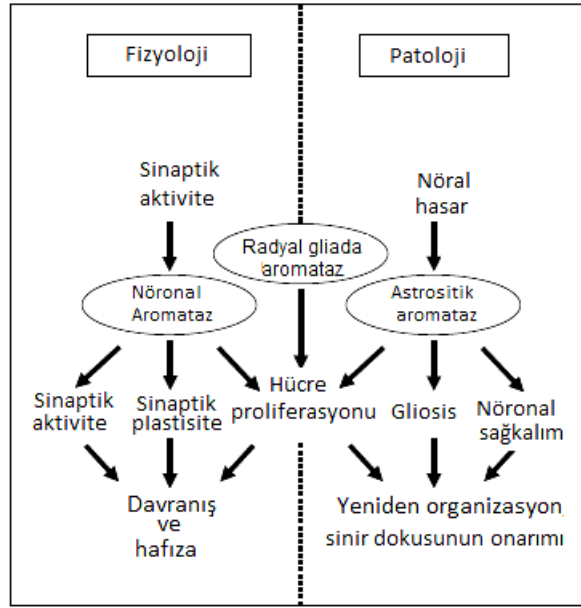
Şekil 2.3. Cyp19 (aromataz) geni.

Bulun ve diğ. (48)'nden alınmıştır.

Beyinde eksprese edilen aromatazın lokal östrojen oluşumunu sağlayarak nöronal farklılaşma, nöral ve sinaptik plastisitede düzenleyici fonksiyonlarının olduğu gösterilmiştir (49,50). Östrojenler; östron, östradiol ve östriol olmak üzere 3 tiptir. Özellikle 17 $\beta$ -östradiol hücre yaşamının devamı, farklılaşması ve morfolojisinde görev alarak hipokampusta dendrit dansitesini düzenler (51). Bu

hormon öğrenme ve hafıza oluşumu gibi algısal işlevlerde anahtar rol oynar (52). Aromataz enzimiyle üretilen bölgesel östrojenin korteksle ilgili işlevlerde oldukça önemli olduğu birçok çalışmanın ortak sonucudur (53). Östrojen sıçanlarda (54,55), farelerde (56), gerbillerde (57) oluşturulan önbeyin iskemisi modellerinde nöron koruyucu etkinlik gösterir. Östrojenin nöron koruyucu etkileri bazal önbeyin kolinerjik nöronlarda (58) ve nigrostriatal sistemde (59) tanımlanmıştır. Östradiol ayrıca hipokampal hilar nöronları da *in vivo* eksitotoksik hasardan korur (60-62). Pregnenolon, dehidroepiandrosteron, testosteron gibi steroidlerin de nöroprotektif etkilerinin aromataz aracılığıyla östrojene dönüşmek suretiyle oluştuğuna dair bulgular elde edilmiştir (63).

Aromataz ile androjen prekürsörlerden bölgesel olarak sentezlenen östrojen, normal şartlar altında beyinde nöroendokrin işlevlerin düzenlenmesinden sorumludur. Ancak MSS'yi tehdit eden durumlarda oluşan hasar ile başa çıkabilmek amacıyla sinir hücreleri östrojeni koruma mekanizmalarının bir parçası olarak kullanırlar (6). Fizyolojik olarak nöronlarda bazal düzeyde sentezlenen aromataz; travma, iske mi, mekanik lezyonlar, beyne deneysel nörotoksinlerin (kainik asit, domoik asit vb.) uygulanmasının ardından hasarlı nöronların çevresindeki reaktif mikrogliyalarda ve astrositlerde artmaktadır (64-66). Nöronal hasardaki bu artış, hasarlı dokunun lokal östrojen düzeyini artırarak koruyucu etkiyi başlatmasını sağlar (66). Sentezi artan östrojen, hasarlı nöronlar için trofik faktör olarak salgılanır böylelikle sinaptik fonksiyonları etkileyerek, bölgesel beyin kan akımını arttırarak, nöronal iyileşmeyi çabuklaştırarak, nöronal sağ kalımı arttırarak ve nöron ölümünü en aza indirgeyerek muhtemel kompensasyon mekanizmalarında rol oynayabilir (67). Yapılan bazı çalışmalarda beyne doğrudan KA gibi eksitotoksin uygulanması aromataz ekspresyonunda artışa neden olduğu, bu artışın fadrazol gibi aromataz inhibitörleri ile önlenemediği gösterilmiştir (53). Yine aromataz *knock-out* farelerin beyinlerinde nöron hasarına karşı toleransın ortadan kalktığı ve hücrelerin hasara daha açık hale geldiği gözlenmiştir (68). Bu enzimin ekspresyonunun travmatik beyin hasarı ve bazı nörodejeneratif hastalıklarda artmış olduğunun gösterilmesi, onun beyinde sinir hücrelerinin korunmasında görev alabileceği düşüncesini destekler (Şekil 2.4) (69,70).



Şekil 2.4. Fizyolojik ve patolojik şartlarda aromatazın etkisi.  
Garcia-Segura (30)'dan alınmıştır.

Östradiolün ayrıca eksitasyonda önemli rolü olan tip-1 glutamat reseptörlerini azalttığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Östradiol bu yönüyle TLE'de nörotoksisiteden koruyucu olması açısından önemlidir (35). Epilepsi ile kognitif fonksiyonlar arasında bağlantı kuran çalışmaların büyük bir bölümü bugüne kadar sadece periferdeki organlardan (over, testis) kaynaklanan östrojen ve testosteron gibi hormonların düzeyi ile ilişkilendirilmiştir. Hipokampus gibi bilişsel fonksiyonlarda önemli görevlere sahip bir MSS yapısında bu hormonların endojen sentezi ile ilgili yapılan çalışmaların ise yetersiz olduğu görülmüştür (35,71,72).

Düşük fertilité ve seksüel fonksiyonlarda bozukluk epilepsili erkeklerde üreme hormonları ile ilişkili olarak görülen problemlerdir. Serbest testosteron seviyesi ve testis fonksiyon kaybının iyi bir göstergesi olan serbest testosteron / luteinleştirici hormon oranının azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (73-76). Aromataz inhibitörü letrozol verildiğinde periferdeki testosteron östradiole dönüşmediğinden tutarıkların şiddetlenmesi inhibe olmuştur (30). Bunun yanı sıra birçok AEİ tedavisi alan özellikle erkek hastaların fertilité açısından negatif yönde etkilendikleri bilinmektedir ancak bununla ilgili mekanizmaya yönelik yeterince prelinik araştırma bulunmamaktadır (73,77,78). Pek çok AEİ ya aromatazı inhibe ederek (lamotrijin, okskarbazepin, tiyagabin, fenobarbital, fenitoin, etosüksimid)

veya globulinlere östrojen bağlanması üzerinden (karbamazepin) veya östrojen reseptörlerine bağlanarak (gabapentin) ya da steroid sülfataz aktivitesini inhibe ederek (topiramet) etki eder (79). Erkeklerdeki fertilité problemlerinin AEİ ile tedavi sonrasında aromataz inhibisyonu sonucu azalan östrojen sebebiyle olduğu düşünölmektedir. Bu; sperm üretiminde östrojenlerin düzenleyici rolü olduğunu gösterir. LTC tedavisinin gonadal dokuların fonksiyonelliklerine olan etkisinin ise yeterince araştırılmadığı görölmüştür.

Bu çalışmada, sıçanda eksitotoksik etkili KA ile oluşturulan TLE modelinde ve LTC ile tedavide; nörodejenerasyondan koruyucu etkinliği ile bilinen aromataz enziminin beyin korteksinde, hipokampusta, testisteki değişiminin ölçölmesi ve LTC tedavisinin vas deferens ve testis gibi gonadal dokuların fonksiyonelliğine etkilerinin araştırılması amaçlandı.



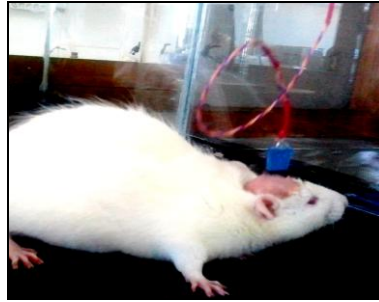
### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyleerde *Wistar* cinsi yetişkin erkek albino sıçanlar kullanıldı (200-250g). Laboratuvar denekleri bakım ve kullanım talimatlarına uygun çalışıldı. 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde tutulan sıçanlara musluk suyu ve standart sıçan pellet yemi verildi. Deneyleer Hacettepe Üniversitesi Deneyle Hayvanları Etik Kurulu'nun 2012/26-13 ve 2014/30-2 numaralı izinleri ile Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları'nda yapıldı. Ayrıca doku ve ekstrelerdeki deneylelerin bir kısmı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Nörolojik Bilimler Enstitüsü Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

#### 3.1. Kalıcı elektrot yerleştirilmesi ve EKOg kaydedilmesi

Sıçanlarda EKOg kayıtlarını alabilmek amacıyla deneyle TLE modeli oluşturma işlemi öncesi invaziv yöntemle hayvanların kafataslarına kalıcı elektrot yerleştirildi. Elektrot yerleştirilecek sıçanlar öncelikle i.p. verilen ketamin:ksilazin (90:10 mg/kg) ile anesteziye edildi. Kafa üzerindeki tüyleler jilet yardımıyla temizlendi, kafa derisi iyotlu solüsyonla dezenfekte edildi. Kulak boşluklarına lidokain damlatılan sıçan stereotaksi cihazına sabitlenerek kafa derisi bistüriyle açıldı. Periost temizlendi, lambda ve bregma bölgeleri referans alınarak koordinatları (frontoparietal neokortekste bregmanın 2 ve 4 mm arkası, orta hattın 3,5 mm sağında, korteks yüzeyinden 1mm derinde; topraklama elektrodu: lambdanın 2,5 mm arkası, orta hattın 1 mm solunda, korteks yüzeyinden 1mm derinde) belirlenerek kafatası kemiğinde matkap yardımıyla 2 mm çapında delikler açıldı. Ayrıca destek vidaları için iki adet parietalde ve bir adet frontalde olmak üzere toplam üç adet delik açıldı. Vidalar takıldı ve üç uçlu erkek elektrodun ilk iki ucu kortekse yerleştirildi. Elektrodun üçüncü ucundaki tel topraklama vidasına lehimlendi. Kafatası serum fizyolojikle yıkandı ve kurutuldu. Akrilik ile iç kısım doldurularak kafa derisi kapatıldı. Cerrahi sonrası dehidratasyonu ve ağrıyı önlemek amacıyla i.p. serum fizyolojik ve parasetamol (0,1 mg/kg) enjeksiyonları yapılan sıçan, akrilik donduktan

sonra stereotaksiden çıkarılarak kafesine alındı. Hayvanların cerrahi sonrası 3 günlük iyileşme döneminden sonra deneyler başladı.



Şekil 3.1. EKG kaydedilirken cam fanustaki elektrotlu sıçan.

### 3.2. Deney grupları

Deneyde kullanılan sıçanların bir kısmında TLE modellemesi KA kullanılarak yapıldıktan sonra 27 mg/kg/gün dozda LTC 1, 4 ve 8 hafta boyunca i.p. verildi. Sıçanlar aşağıdaki tedaviye tabi tutuldu ve böylece toplam 12 grup oluşturuldu. Her gruptaki hayvan sayısı Tablo 3.1'de gösterildi.

	<u>1.deney günü</u>	<u>2.günden sonraki her gün</u>
Kontrol grubu	i.p. %0,9 NaCl	i.p. %0,9 NaCl
TLE'li grup	i.p. KA	i.p. %0,9 NaCl
LTC alan grup	i.p. %0,9 NaCl	i.p. LTC
LTC alan TLE'li grup	i.p. KA	i.p. LTC

Tablo 3.1. Deney gruplarındaki hayvan sayısı.

	1 haftalık	4 haftalık	8 haftalık
Kontrol grubu (Kontrol)	6	6	7
TLE'li grup (KA)	6	6	6
LTC alan grup (LTC)	6	6	7
LTC alan TLE'li grup (KA+LTC)	6	6	6

Çalışmanın başlangıcında ve sonunda hayvanların ağırlıkları kaydedildi. İlk deney gününde, aynalı bir cam fanus içine geçici olarak alınan elektrot takılmış ve iyileşmiş sıçanların yaklaşık 3 saat EKG'ları kaydedildi (Şekil 3.1). Bunun için

hayvan fanusa alınırken önceden yerleştirilen erkek uçlu elektroda dişi uçlu elektrot takıldı ve dişi uçlu elektrodun kablosu sinyal kaydediciye bağlandı. Bilgisayar aracılığıyla beynin elektriksel aktivitesi dalgalar halinde gözlemlendi ve kaydedildi. Fanusa alışma süresi olan 20 dakikadan sonra sıçanlara i.p. KA (5 mg/kg) çözeltisi veya eşdeğer hacimde çözücü (%0,9 NaCl) 3 saat süreyle saatte bir enjekte edildi. İkinci deney gününden sonraki her gün sıçanlara i.p. LTC (27 mg/kg) veya eşdeğer hacimde sadece çözücüsü (%0,9 NaCl) enjekte edildi. Her hayvanın ilk deney gününden sonraki 24. saatte ve 1, 4, 8 hafta sonra 20 dakika süreyle EKO'ları kaydedildi. EKO parametreleri; *gain* x500, *low pass filter cutoff*, 1kHz, AC olarak belirlendi. Bütün EKO kayıtları elektromanyetik gürültüden korunmak amacıyla *Faraday* kafesinin içinde gerçekleştirildi.

Tüm KA uygulanan hayvanlara ilk deney günü sonunda dehidratasyonu önlemek amacıyla derialtına 3 ml laktatlı *Ringer* çözeltisi enjekte edildi. Yaklaşık üç saat sonra belirgin motor tutarıklar (Sınıf IV ve V) gösteren sıçanlarda modelin oluştuğu kabul edildi ve 5 mg/kg dozda i.p. diazepam verilerek tutarıkları kontrol altına alındı. Değerlendirmede sadece motor tutarıklar dikkate alındı ve *Racine* Skalası'na göre (8,30) skorlandı. *Racine* Skalası'nda (33) bir denek hayvanının nöbet aşamaları aşağıdaki gibidir.

Sınıf 1: Davranışsal duraklama

Sınıf 2: Ritmik kafa hareketleri, kafa sallama ve bıyık oynatma

Sınıf 3: Ön bacak klonusu

Sınıf 4: Ön bacak klonusu ile beraber şaha kalkma

Sınıf 5: Şaha kalkma, düşme ve klonik konvülsiyon

Ötanazi günü TLE modeli oluşturulan gruptaki sıçanlar karbondioksitle uyutuldu ve dekapite edildi. Beyin korteksi, hipokampusu, ve testisleri izole edilerek -80°C'de bekletildi. Vas deferensler organ banyosu deneylerinde kullanıldı.

Deneyde kullanılan sıçanların bir kısmına ise 8 hafta boyunca i.p. olarak LTC artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg/gün) uygulandı. Kontrol grubuna ise i.p. %0,9 NaCl verildi. Böylece toplam 4 grup (n=3/grup) oluşturuldu. Her gruptaki hayvan sayısı Tablo 3.2'de gösterildi. Bu deney gruplarının oluşturulmasının amacı tedavide

kullanılan dozda LTC verilen sıçanlarda görülen değişikliklerin LTC'nin literatürde belirtilen (80,81) artan dozlarında da görülüp görülmeyeceğini incelemektir.

Tablo 3.2. Deney gruplarındaki hayvan sayısı.

	8 haftalık
Kontrol grubu (Kontrol)	3
27 mg/kg/gün LTC alan grup	3
54 mg/kg/gün LTC alan grup	3
108 mg/kg/gün LTC alan grup	3

Artan doz LTC uygulaması yapılan gruptaki sıçanlar 8 hafta sonunda kardiyak perfüzyon yöntemiyle ötanaziye uğratıldı. Kloral hidrat verilerek uyutulan hayvanların göğüs kafesi açıldı ve kalp atımı devam ederken sol ventriküle kanül takıldı. Sağ atriuma kesi atılarak buradan dışarı kanın akması sağlandı. Kanül ucundaki hortumdan kalbe heparin:%0,9NaCl (1:250) karışımı pompalandı. Sonrasında kanülden paraformaldehit (%4) geçirilerek ötanazi tamamlandı. Doku izolasyonları yapıldı. Beyin paraformaldehitte; testis, vas deferens ve epididimis ise *Bouin* çözeltilisinde saklandı.

### 3.3. Doku lizisi ve protein eldesi

Beyin korteksleri, hipokampuslar ve testisler immünoiblot için ultrasonik homojenizatörde buz üzerinde dokuya uygun soğuk lizis tampon çözeltileri ile homojenize edildi. Homojenatlar 14.000g'de, 4°C'de, 20 dakika süreyle berrak ekstre elde edilinceye kadar santrifüjlenerek elde edilen ekstrelerdeki total protein konsantrasyonu *Lowry* protein tayini yöntemiyle hesaplandı.

### 3.4. Ekstrelerden *Western Blot* yöntemiyle protein eldesi

Her bir örneğin total protein miktarları eşit olacak şekilde yükleme yapıldı. Sıçan over ekstresi pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her bir ekstreye 4X örnek tamponu ilave edilerek 100°C'de 5 dakika kaynatıldı, proteinler sodyum dodesil

sülfat-poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) tabi tutuldu. Sürüklenme tamponu varlığında 100V ve 250mA akımın etkisiyle jel üzerindeki proteinler molekül ağırlıklarına göre sıralandı. Polivinilidenfluorid (PVDF) membran jel boyutlarında kesildi, metanolde 5 dakika bekletildi, soğuk transfer tamponuyla 5 dakika yıkandı. Sünger ve *Wattmann* kağıtları arasına yerleştirilen PVDF membran ve jel 1 saat süreyle 300V ve 250mA akıma maruz bırakıldı. Böylece jeldeki proteinler transfer tamponu yardımıyla PVDF membrana ıslak elektroforez yöntemiyle transfer oldu. Isınmaya karşı transfer tankı buz kalıplarıyla desteklendi.

### 3.5. Proteinlerin görünür hale getirilmesi

Membranlar aşağıdaki tabloda belirtilen blok, primer antikor ve sekonder antikor çözeltilerine maruz bırakıldılar. Her çözelti değişiminden önce membranlar %0.1'lik *Tween-20* içeren tris-tamponlu tuz solüsyonu (TBS) ile yıkandı. Bloklama ve antikor maruziyetleri orbital çalkalayıcı üzerinde ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Kullanılan çözeltiler Tablo 3.3'de belirtildiği gibi değişik konsantrasyonlarda süt tozu veya sığır serum albümini (BSA) içermektedir. PVDF membran, güçlendirilmiş kimyasal ışımaya reaktifleri (*enhanced chemiluminiscent*) ile muamele edildikten sonra fotoğraf filmi üzerinde oluşan immünoreaktif bantlar; tab edici çözeltilerle görünür hale getirilip bilgisayarda *Scion Image 4.0.3.2*. (Scion Corp.) programıyla kantite edildi. Veriler optik dansite olarak sunuldu.

Tablo 3.3. İlgili proteinler için kullanılan antikorlar, blok ve antikor çözeltileri.

Protein	Blok çözeltisi	1° antikor ve çözeltisi	2° antikor ve çözeltisi
<b>Aromataz</b>	%5 süt tozu + TBS-T	%5 BSA + TBS-T + Aromataz (1:5000)	%5 süt tozu + %1 BSA + TBS-T + HRP-GAM (1:5000)
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	%5 süt tozu + TBS-T	%5 süt tozu + TBS-T + $\beta$ -Aktin (1:5000)	%5 süt tozu + TBS-T + HRP-GAM (1:5000)
<b>Kaspaz-3</b>	%5 süt tozu + TBS-T	TBS-T + Kaspaz-3 (1:500)	%5 süt tozu + TBS-T + HRP-GAR (1:5000)

### **3.6. 27 mg/kg dozda LTC uygulamasının korteks ve hipokampusta kaspaz-3 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi**

Sıçan beyin korteks ekstrelerinde *Western Blot* ile kaspaz-3 ekspresyonuna bakıldı.

### **3.7. 27 mg/kg dozda LTC uygulamasının vas deferensin in vitro kasılma yanıtlarına etkisinin incelenmesi**

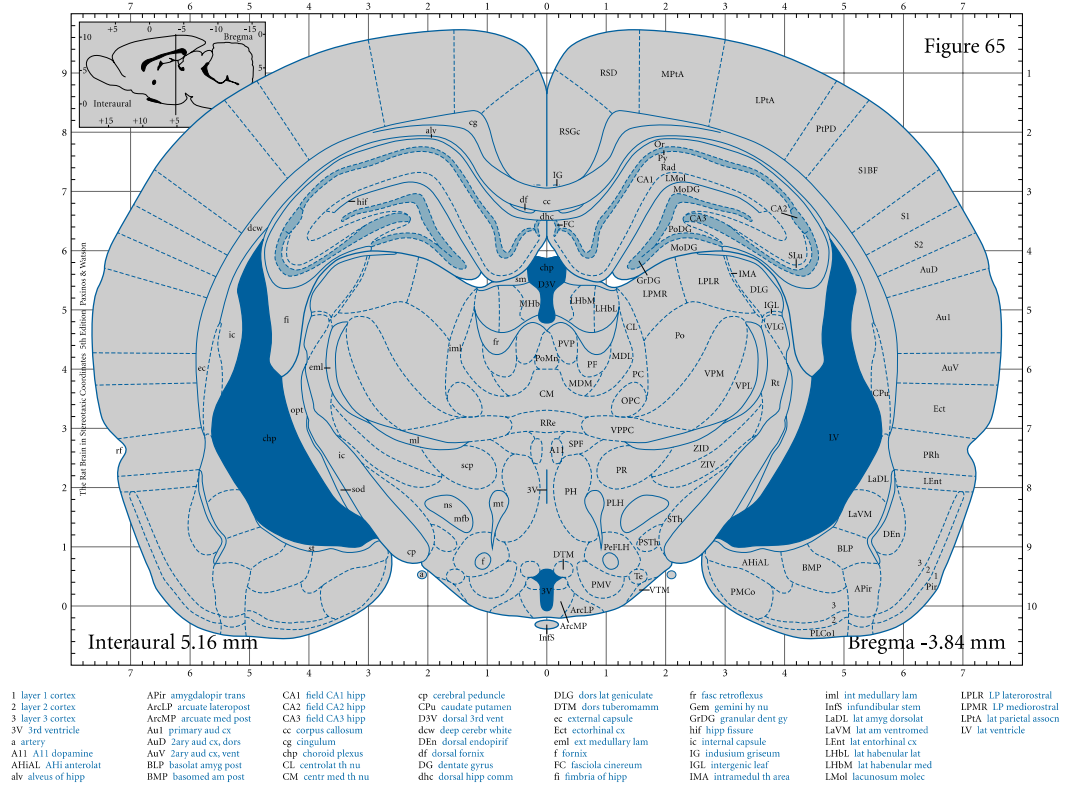
Ötanaziden sonra çıkarılan vas deferens kası etrafındaki bağ dokusu temizlenerek izole edildi. Dokunun bir ucu organ askısı yardımıyla 32°C'de, %95 O<sub>2</sub> - %5 CO<sub>2</sub> karışımı ile gazlandırılan *Tyrode* solüsyonu içeren organ banyosuna alındı. Kasın serbest kalan ucu izometrik kuvvet transdüserine bağlandı ve bazal gerim uygulandı. Doku deney protokolünden önce 1 saat boyunca 10'ar dakika arayla yıkanarak dinlendirildi. Dinlenme periyodunun ardından doku 20'şer dakika arayla eş büyüklükte kasılma yanıtı elde edilene kadar 2-3 kez 60 mM KCl ile kastırıldı. Doku 10 dakika aralıklarla *Tyrode* solüsyonu ile yıkandı ve 30 dakika dinlenmeye bırakıldı. Fenilefrin ve karbakol gibi kasıcı ajanlara karşı dokunun verdiği cevap gözlemlendi ve bu yanıtlar kontrol hayvanlarının kasılma yanıtları ile istatistiksel karşılaştırmaya tabi tutuldu. Deney sırasında gerimdeki değişiklikler izometrik kuvvet transdüseri ile *MP35 Transducer Data Acquisition System* (Biopac, ABD) aracılığıyla bilgisayara kaydedildi.

### **3.8. Artan dozda LTC uygulamasının korteks ve hipokampus aromatazına etkisinin immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi**

İmmünohistokimya deneyleri için kardiyak perfüzyon ötanazisi uygulanan 27, 54 ve 108 mg/kg/gün dozda LTC verilmiş hayvanlardan izole edilen beyinler +4°C'de önce 24 saat süreyle paraformaldehitte (%4), sonra 24 saatte bir değiştirilerek sırayla %10, %20 ve %30'luk sükröz çözeltilerinde bekletilerek kriyokoruma yapıldı. Sükröz solüsyonları değiştirilmeden önce tüm beynin kap dibine batmış olduğundan emin olundu. Beyinler -20°C'lik kriyostatta, 20µm'lik koronal

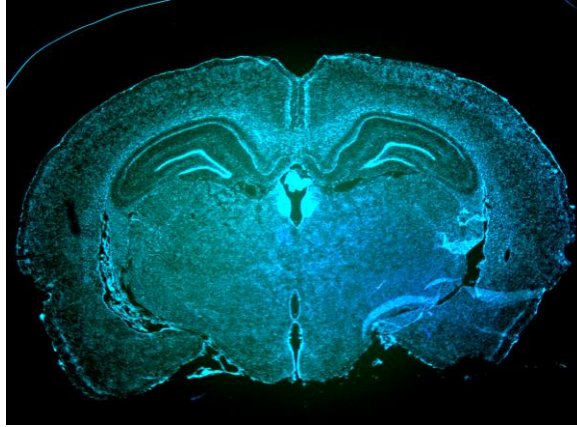
dilimler halinde kesilerek, kesilen her dilim poli-L-lizin ile kaplı lamlara alındı. Tüm hipokampusu içerecek şekilde koronal dilimlenen beyin örnekleri immünohistokimya metodunun uygulanacağı zamana kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Şekil 3.2'de görülen dilim gibi hipokampuslardan her sıçan için iki adet beyin dilimi *Paxinos-Watson*'ın beyin atlasına (82) göre seçildi.

Seçilen beyin dilimleri kalemle işaretlendikten sonra 2 kez 5 dakika fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Yıkama sonrasında oda sıcaklığında bloklama solüsyonunda (%0.1PBS-Tween 20 içerisinde %1 BSA, %10 normal keçi serumu, 0.3M glisin) 1 saat bekletildi. Bloklama aşamasından sonra tüm kesitler bloklama solüsyonu içerisinde 1:250 konsantrasyonda aromataz antikoruna ile  $4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra Cy-3-GAM antikoruna ile 1:200 konsantrasyonda, 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 3 kez 5 dakika 12.5 mg/ml sodyum azid içeren gliserol:PBS (1:1) karışımı ile yıkanan kesitler *Hoescht* solüsyonu ile kapatıldı. Böylelikle her beyin dilimine aromataz antijenine karşı işaretleme yapılmış oldu (Şekil 3.3).



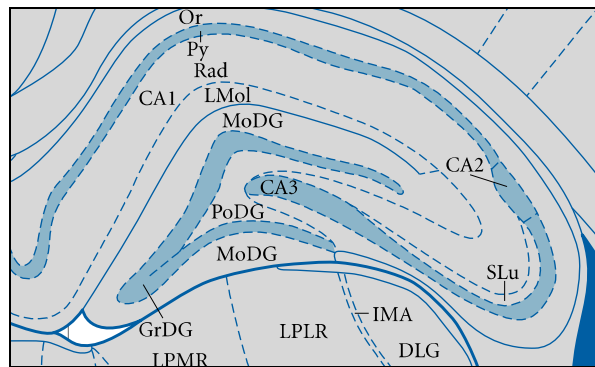
Şekil 3.2. İmmünohistokimya metodu uygulanan beyin dilimlerinin genel görüntüsü.

*Paxinos-Watson*'ın beyin atlası (82)'nden alınmıştır.



Şekil 3.3. Atlastaki referans figure uygun olarak seçilmiş sıçan beyin diliminin *Hoescht* solüsyonu ile boyanması sonucu 1X objektifteki görüntüsü.

Değerlendirme yapılırken korteks ile hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve dentat girus (DG) bölgelerinin sınırları sıçan beyin atlasındaki koordinatlara göre belirlendi (Şekil 3.4). Her beyin diliminin hem sağ hem de sol tarafındaki bölgeler her seferinde bir mikroskop alanını kaplayacak şekilde beyin değerlendirildi. Floresan mikroskopta (Nikon Eclipse E600) incelenen görüntüler *Nikon Advanced Research 3.2* programı kullanılarak analiz edildi. Özetle her hayvandan 2 kesit, her kesitten 1 korteks, 4 özelleşmiş hipokampus alanı, her alandan bir bölge, hem sağ hem de sol hemisferden seçilerek aromataz antijeni için pozitiflik gözlemlendi.



Şekil 3.4. Sıçan beyin atlasına göre CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinin yerleşimi.

*Paxinos-Watson* beyin atlası (82)'ndan alınmıştır.



İmmünohistokimya uygulaması yapılmış sıçan beyin dilimlerinde hipokampus 4X büyütmede belirlenirken atlasta belirtilen referans noktalarına göre özelleşmiş alanlar belirlendi (Şekil 3.5). Değerlendirme immünohistokimyasal boyanma yoğunluğuna göre yarı-nicel olarak aşağıdaki puanlama sistemine göre yapıldı.

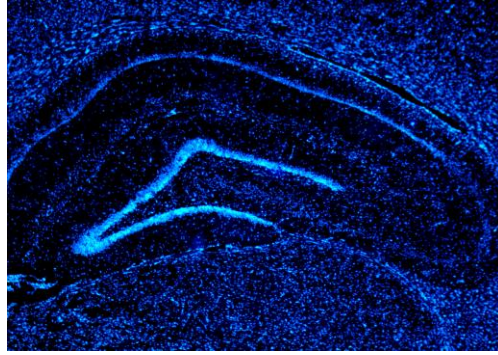
0 – Boyanma gözlenmedi

1+ çok zayıf (düşük yoğunlukta sitoplazmik boyanma)

2+ sitoplazmik zayıf (kolaylıkla gözlenen sitoplazmik boyanma)

3+ sitoplazmik güçlü (çok yüksek yoğunlukta sitoplazmik boyanma)

4+ sitoplazmik çok güçlü (sitoplazmik perinükleer boyanma ve difüz aksonal ve dendritik immünoişaretleme)



Şekil 3.5. İmmünohistokimya uygulaması yapılmış sıçan beyin dilimlerinde hipokampusun 4X büyütmedeki görüntüsü.

### **3.9. Artan dozda LTC uygulamasının gonadal doku histolojilerine etkisinin incelenmesi**

48 saat *Bouin* çözeltisinde fikse olan testis, vas deferens ve epididimlere bir gecelik doku takip işlemi uygulandı. Bloklama işleminden sonra mikrotomda 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hemotoksilen-Eozin boyamasının ardından kesitler sentetik reçine ile kapatılıp mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi.

Gonadal dokular öncelikle makroskopik olarak değerlendirildi ve dokunun mikroskopik incelemesini daha kolay, daha doğru yapabilmek adına doku kesitlerinin olduğu slaytların üzerine numaralandırma ve işaretlemeler yapıldı. Böylece temsili bölgeleri atlamadan homojen bir değerlendirme yapılması

amaçlandı. 8 hafta süreyle artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg) LTC verilen sıçanlarda vas deferensin ve epididimin korpus çapı kaydedildi. Testis dokularında ise öncelikle tübüllerin fonksiyonel veya atrofik olup olmadığı kararı verildi ve testisler aşağıda belirtilen kriterler açısından incelendi ve ölçümleri yapıldı:

- Fonksiyonel ve atrofik tübül sayısı
- Dejenere germ hücreli tübül sayısı
- Obstrüktif tübül sayısı
- Fonksiyonel ve atrofik tübül çapı
- Fonksiyonel ve atrofik tübülün kalınlığı
- İnterstisyel aralık

### 3.10. Kullanılan kimyasallar

$\beta$ -aktin antikoru, HRP-GAM (*Horseradish peroxidase-goat anti mouse*) antikoru, HRP-GAR (*Horseradish peroxidase-goat anti rabbit*) antikoru, PVDF membran, güçlendirilmiş kimyasal ışımaya reaktif (enhanced chemiluminescent) (Santa Cruz, ABD), Kaspaz-3 antikoru (Cell Signaling Technology, ABD), *Hoescht* boyası (Molecular Probes, ABD), fotoğraf filmi, tab edici çözeltiler (developer-fixer) (Kodak, Türkiye), Lowry protein tayini reaktif A ve B, MiniProtean TGX Precast hazır jel, *Laemmli* 4X örnek tamponu,  $\beta$ -merkaptoetanol (BioRad, Türkiye), sığır serum albümini (BSA), etilendiamintetraasetik asit, magnezyum klorür, tris hidroklorür, tris baz, kainik asit, sodyumdodesilsülfat, tetrametilendiamin, ditiyotritol, sodyum klorür, gliserol, fenilmetansülfonilfluorid, akrilamid-bisakrilamid, karbakol, fenilefrin (Sigma, ABD), glisin (Applichem, ABD), proteaz inhibitör kokteyl tablet (Roche, İsviçre), Aromataz antikoru (Acris, ABD), Tween-20, sentetik reçine *Entellan* (Merck, Almanya), yağsız granül süt tozu (Pınar, Türkiye), lidokain (Sanovel, Türkiye), diazepam (Deva, Türkiye), ketamin, ksilazin (Pfizer, Almanya), soğuk diş akriliği (Imicryl, Türkiye), Cy-3-GAM antikoru, (Jackson Immunoresearch, İngiltere), levetirasetam (Abdi İbrahim İlaç, Türkiye), metanol, *Bouin* çözeltisi, formalin, laktatlı *Ringer* çözeltisi.

### 3.11. Kullanılan çözeltiler

#### Korteks Lizis Tamponu (3ml/g)

Tris hidroklorür (pH: 7.5)	50 mM
Etilendiamintetraasetik asit	1 mM
Magnezyum klorür	5 mM
Ditiyotritol	5 mM
Fenilmetansülfonilfluorid	1 mM
Proteaz inhibitör kokteyl tablet (PBS içinde)	400 ul/10 ml

#### Hipokampus Lizis Tamponu (0.3ml/g)

Tris hidroklorür (pH: 7.5)	20 mM
Etilendiamintetraasetik asit	1 mM
Magnezyum klorür	5 mM
Ditiyotritol	5 mM
Fenilmetansülfonilfluorid	1 mM
Proteaz inhibitör kokteyl tablet (PBS içinde)	400 ul/10 ml

#### Testis Lizis Tamponu (0.3ml/g)

Tris hidroklorür (pH: 7.5)	50 mM
Etilendiamintetraasetik asit	20 mM
Triton X-100	%1
Ditiyotritol	5 mM
Fenilmetansülfonilfluorid	2 mM
Proteaz inhibitör kokteyl tablet (PBS içinde)	400ul/10 ml

#### TBS-T

Tris hidroklorür (pH: 7.6)	0.01 M
Sodyum klorür	0.05 M
Tween-20	%0.01
Distile su	1 L

## Sürüklenme Tamponu\*

Tris baz (pH: 8.3)	248 mM
Glisin	1.92 M
Sodyumdodesilsülfat	34.6 mM
Distile su	1 L

\* Deney günü 100 ml sürüklenme tamponu 900 ml distile suyla seyreltilir.

## Transfer Tamponu#

Tris baz	48 mM
Glisin	386 mM
Sodyumdodesilsülfat	3.5 mM
Distile su	1 L

# Deney günü 200 ml transfer tamponu; 200 ml metanol ve 600 ml distile suyla seyreltilir.

## Tyrode Çözeltisi

Sodyum klorür	138 mM
Potasyum klorür	5.7 mM
Sodyum bikarbonat	15 mM
Sodyum dihidrojen fosfat	0.36 mM
Glukoz	5.5 mM
Kalsiyum klorür	1.8 mM

## Bouin Çözeltisi

Doymuş pikrik asit çözeltisi	75 ml
Formaldehit	25 ml
Glasiyel asetik asit	5 ml

### 3.12. Kullanılan cihazlar

Blok ısıtıcı (Labnet, ABD), çalkalayıcı su banyosu (Nüve, Türkiye), ELISA cihazı (Biotek ve Tecan Sunrise, ABD), güç kaynağı (BioRad, Türkiye), mikroskop (Olympus BX51, ABD), floresan mikroskop (Nikon Eclipse E600), orbital çalkalayıcı (FinePCR, ABD), organ banyosu (Biopac, ABD), soğutmalı santrifüj cihazı (Kubota, Japonya), ultrasonik homojenizatör (Omni Inc., ABD), kriyostat (Leica, Almanya).

### 3.13. Verilerin istatistiksel analizi

Tüm deney sonuçları analizleri yapıldıktan sonra *Prism5 (GraphPad Prism Software Inc., ABD)* programıyla istatistiksel açıdan anlamlılığı incelendi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (S.H.) olarak sunuldu.  $P < 0,05$  ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edildi ve kullanılan denek sayısı “n” ile gösterildi.

EKoG spaykları *Biopac Student Lab Analysis 3.7.7 (ABD)* programıyla kaydedildi. Korteksin bazal elektriksel aktivitesine göre amplitüdü en az 2 kat arttıran dalga spayk kabul edildi ve gözlemsel olarak spayklar sayıldı. Tek yönlü ANOVA ve “*Newman-Keuls Multiple Comparison*” testi kullanılarak istatistiksel incelemeler yapıldı (n=3-6).

Aromataz (n=6) ve Kaspaz-3 (n=3) bantları *ScnImage* programıyla analiz edildikten sonra iki yönlü ANOVA testi ve “*Bonferroni's Multiple Comparison*” testi kullanılarak istatistiksel incelemeler yapıldı.

Vas deferensin kasılma yanıtları *Biopac AcqKnowledge (ABD)* programıyla analiz edildikten sonra t-test ve “*Mann Whitney U*” testi kullanılarak istatistiksel incelemeler yapıldı (n=6).

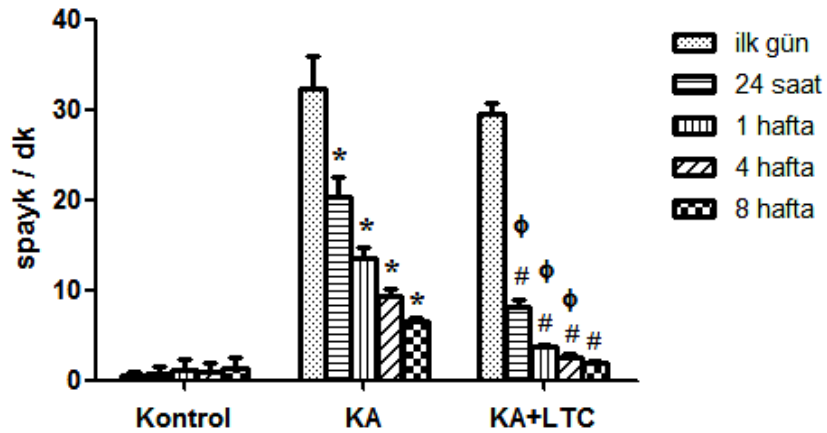
Patolojik ölçümler *Spot Advanced* programı ile yapıldı ve tek yönlü ANOVA ve “*Kruskal-Wallis*” testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi (n=3).

İmmünohistokimya görüntülerinde aromataz immünopozitiflik değerleri *Nikon Advanced Research 3.2* programı ile yarı-nicel olarak analiz edildikten sonra “*Kruskal-Wallis*” testi ve ikili grup karşılaştırmaları için “*Mann Whitney U*” testi kullanılarak istatistiksel incelemeler yapıldı (n=3).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sıçan EKG kayıtlarının değerlendirilmesi

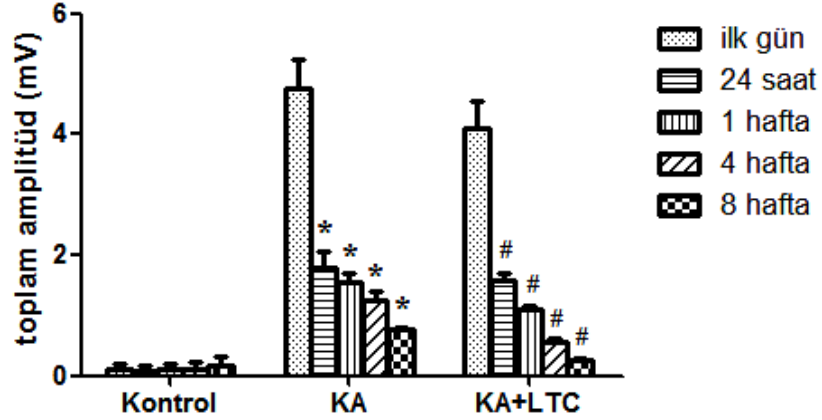
KA verilen gruptaki sıçanların EKG kayıtları incelendiğinde kontrole göre dakikadaki ortalama spayk sayısı (Şekil 4.1) ve ortalama spayk amplitüdlerinde tüm zaman dilimlerinde artış olduğu görüldü (Şekil 4.2). Bu durum modelin başarıyla oluşturulduğunu gösterir. Hem KA grubundaki hem de KA+LTC grubundaki sıçanların ilk güne göre kıyaslandığında 24 saat, 1 hafta, 4 hafta ve 8 hafta sonunda alınan EKG kaydında dakikadaki ortalama spayk sayısında anlamlı azalma gözlemlendi. Ayrıca; KA verilerek hipereksitasyon oluşturulan gruba 27 mg/kg/gün dozda LTC verilen sıçanların dakikadaki ortalama spayk sayısında LTC almayan KA grubundaki sıçanlara göre 24 saat, 1 hafta ve 4 haftalık ölçümlerde anlamlı azalma oldu (Şekil 4.1,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ).



Şekil 4.1. 27 mg/kg LTC uygulamasının sıçan beyin korteksinden kaydedilen dakikadaki ortalama spayk sayısına olan etkisinin zamana göre gösterimi.

(\*:KA ilk güne göre anlamlı  $P<0.05$ , #: KA+LTC ilk güne göre anlamlı  $P<0.05$ ,  
 $\phi$ :Eşlenik KA grubuna göre anlamlı  $P<0.05$ )

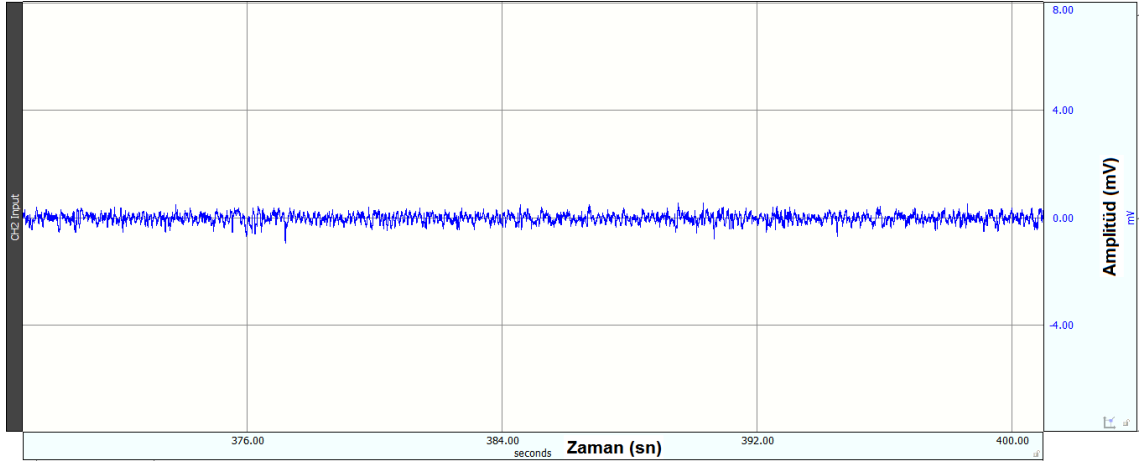
KA grubundaki ve KA+LTC grubundaki sıçanların ilk güne göre kıyaslandığında 24 saat, 1 hafta, 4 hafta ve 8 hafta sonunda alınan EKG kaydında ortalama spayk amplitüdlerinde anlamlı azalma gözlemlendi (Şekil 4.2,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ).



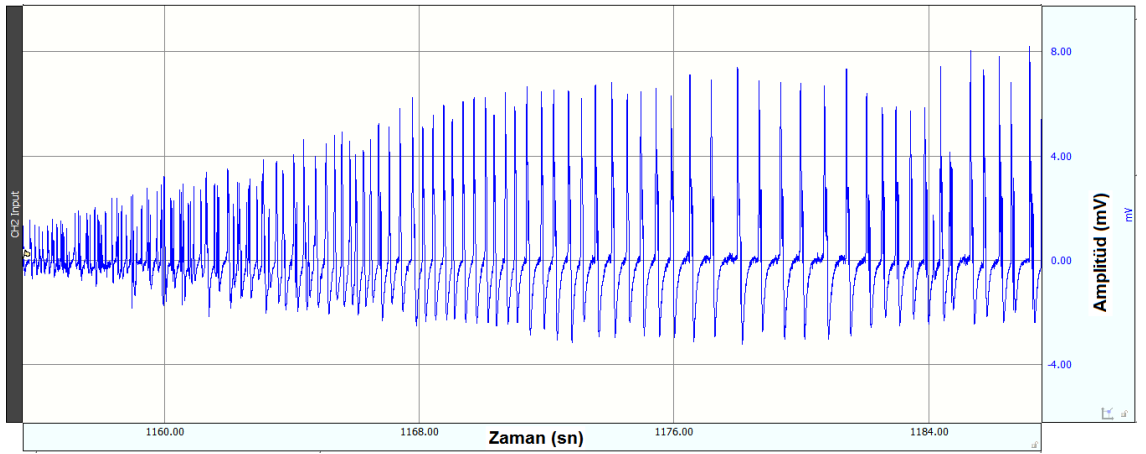
Şekil 4.2. 27 mg/kg LTC uygulamasının sıçan beyin korteksinden kaydedilen ortalama spayk amplitüdüne olan etkisinin zamana göre gösterimi.

(\*:KA ilk güne göre anlamlı  $P<0.05$ , #: KA+LTC ilk güne göre anlamlı  $P<0.05$ )

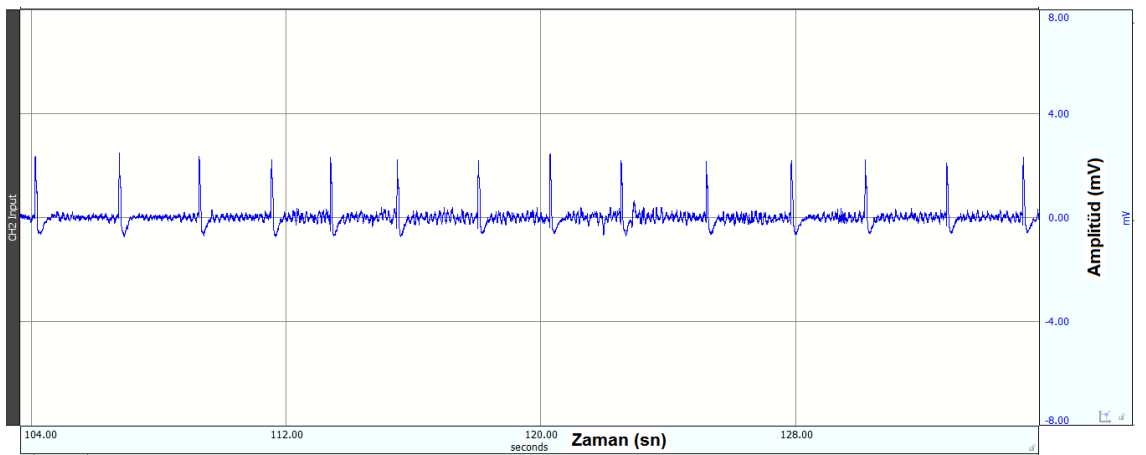
KA (Şekil 4.3-4.8) ve KA+LTC (Şekil 4.9-4.14) grubundaki sıçanlardan alınan EKoG kayıtlarının örnek traseleri aşağıda gösterildi. Bazal elektriksel aktivite Şekil 4.3 ve 4.9'da görüldüğü gibi stabildi. İlk KA enjeksiyonundan yaklaşık 30 dakika sonra Şekil 4.4 ve 4.10'daki gibi zamanla frekansı azalan ancak amplitüdü gittikçe artan spayklar görüldü. Bu spayk paketlerinin yaklaşık 90 dakikalık ölçümde saatte  $12.6 \pm 1.9$  kez tekrarladığı gözlemlendi. KA verilmesini takip eden günde tekrar EKoG kaydı alındığında spaykların amplitüd ve frekanslarının ilk güne göre azalarak devam ettiği gözlemlendi. Elektriksel aktivite deneyin 1.hafta, 4.hafta ve 8.haftalarında da kaydedildi.



Şekil 4.3. Sıçan beyin korteksinin bazal elektriksel aktivitesi.

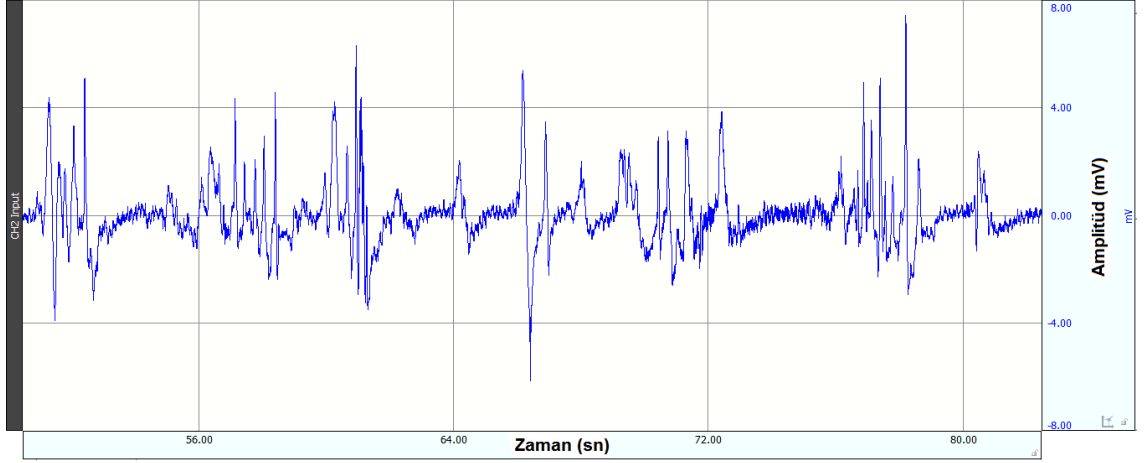


Şekil 4.4. KA verildikten 30 dakika sonra beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.

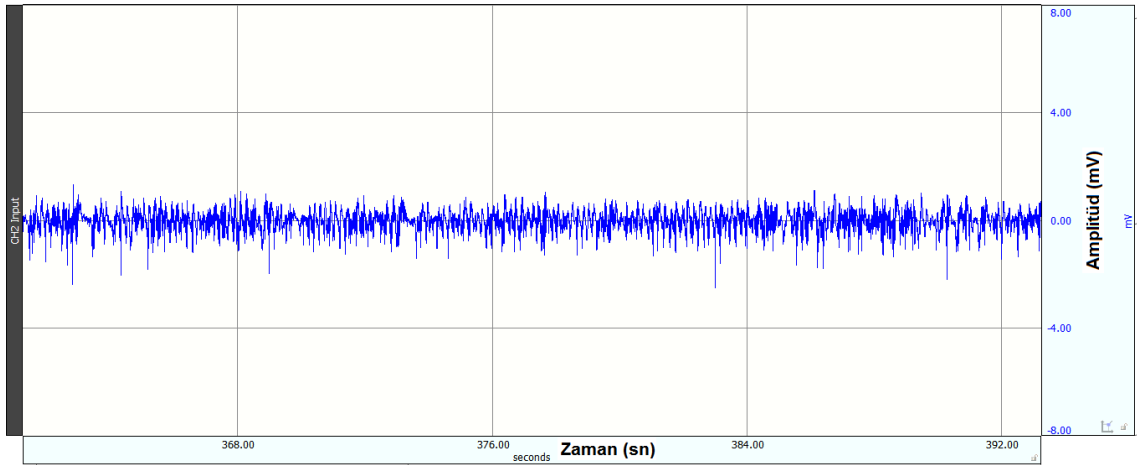


Şekil 4.5. KA verildikten 24 saat sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.

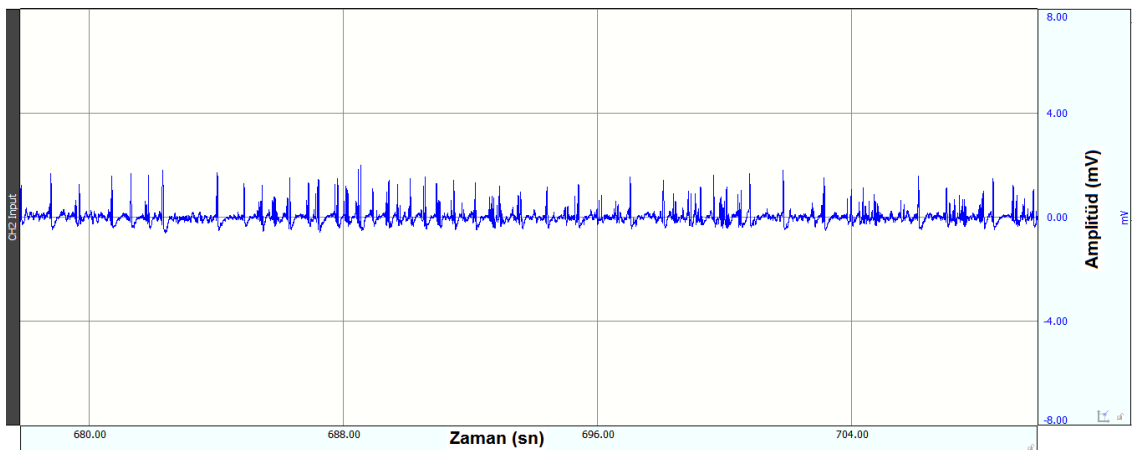




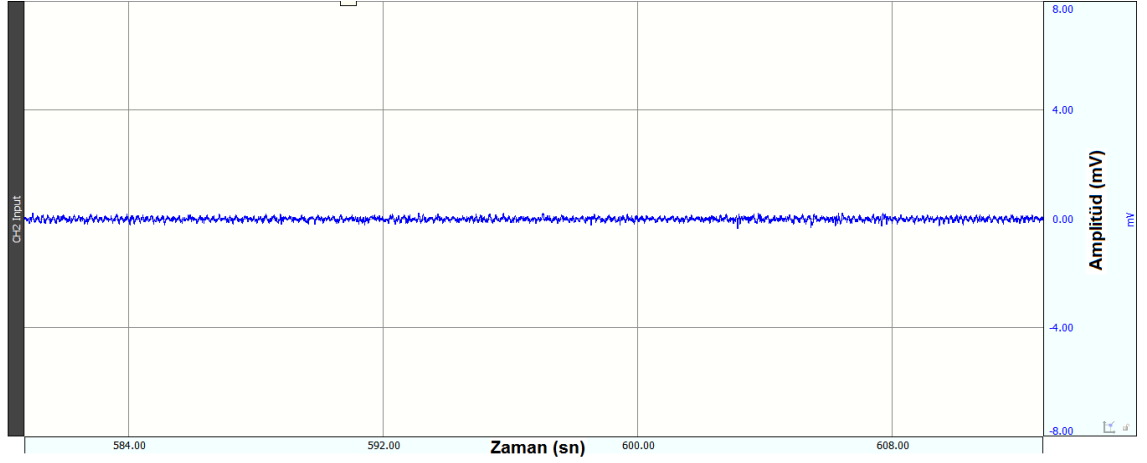
Şekil 4.6. KA verildikten 1 hafta sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.



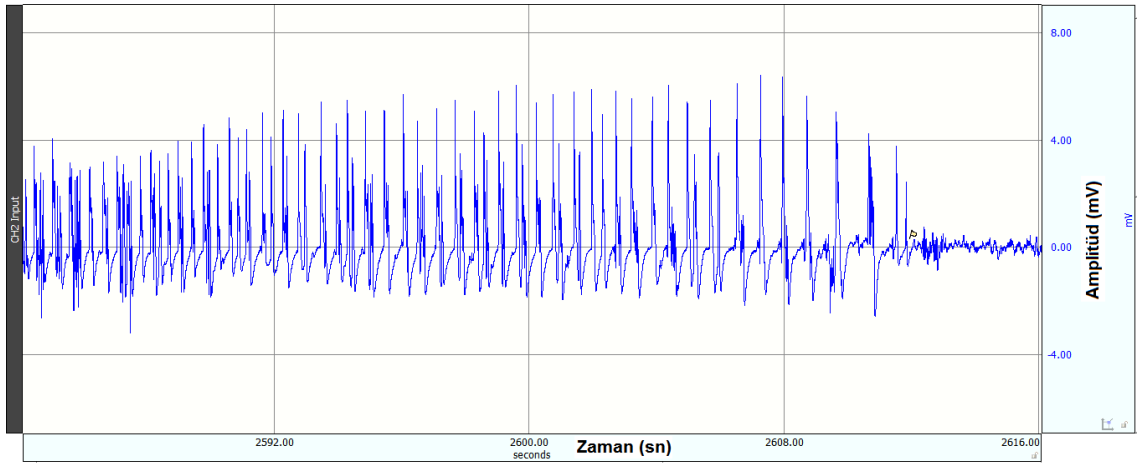
Şekil 4.7. KA verildikten 4 hafta sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.



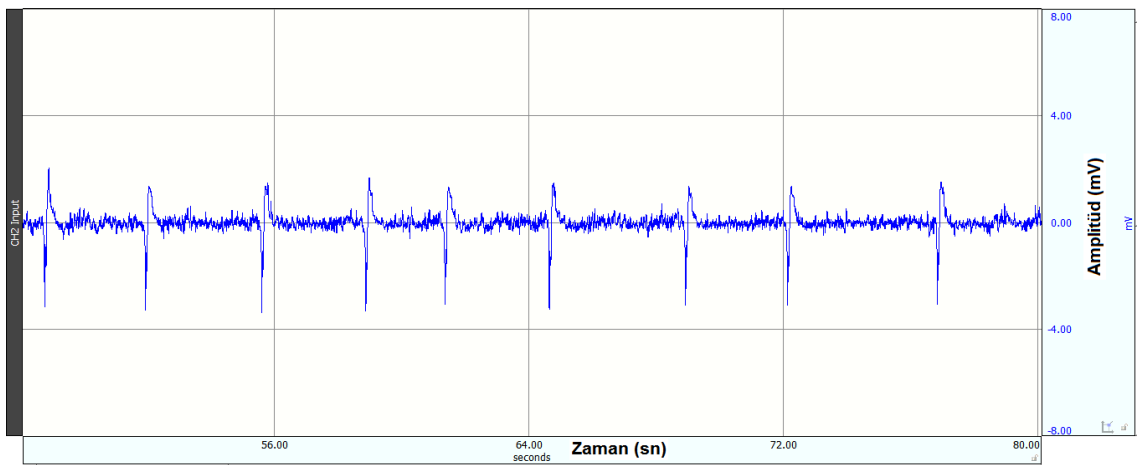
Şekil 4.8. KA verildikten 8 hafta sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.



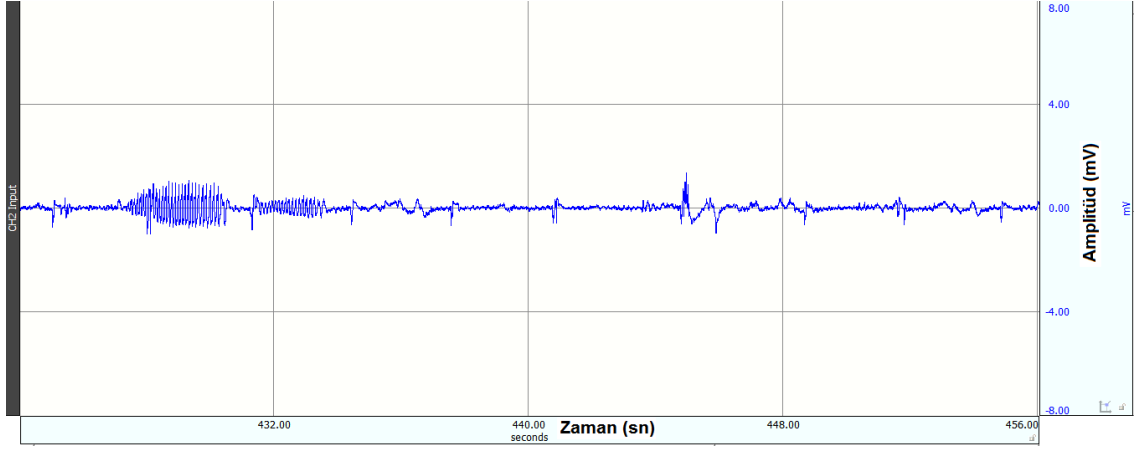
Şekil 4.9. Sıçan beyin korteksinin bazal elektriksel aktivitesi.



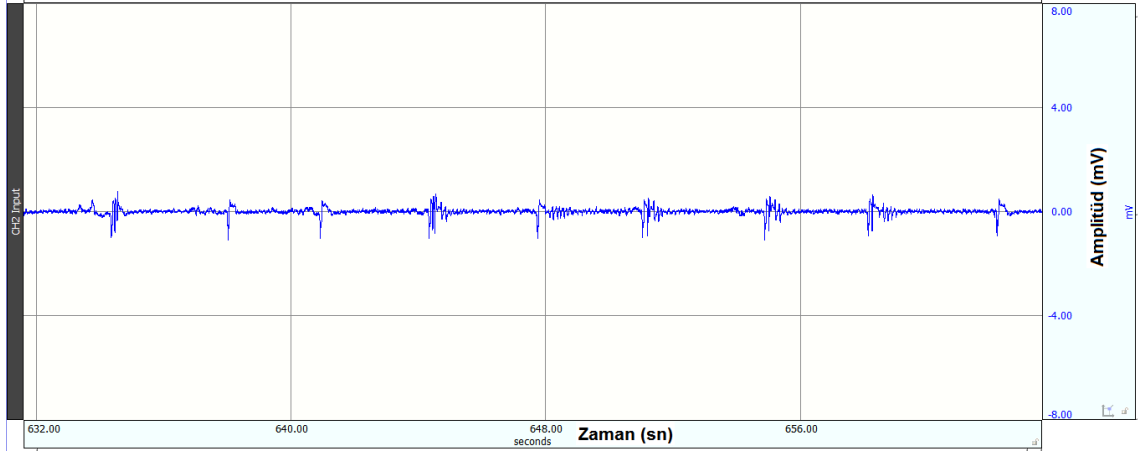
Şekil 4.10. KA verildikten 30 dakika sonra sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.



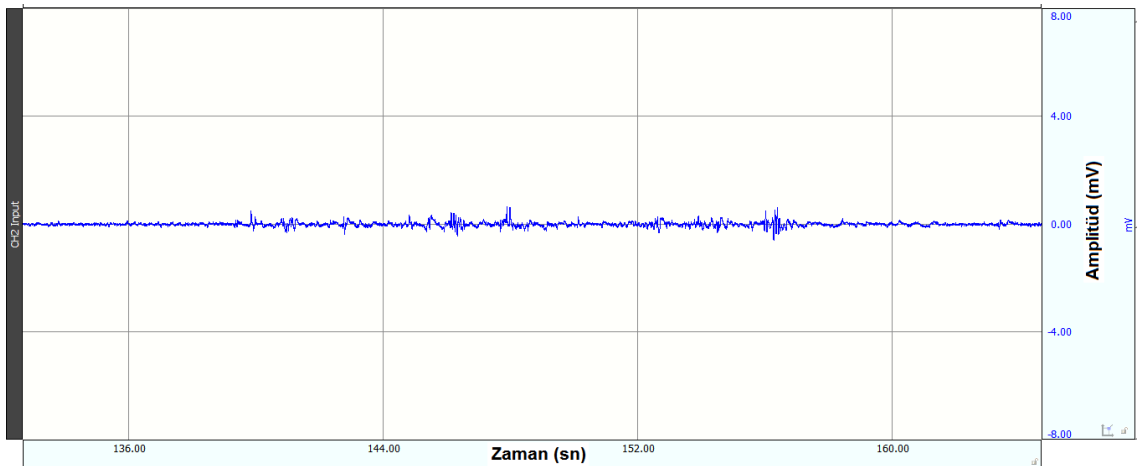
Şekil 4.11. 24 saat süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması sonucu TLE modeli oluşturulan sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.



Şekil 4.12. 1 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması sonucu TLE modeli oluşturulan sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.

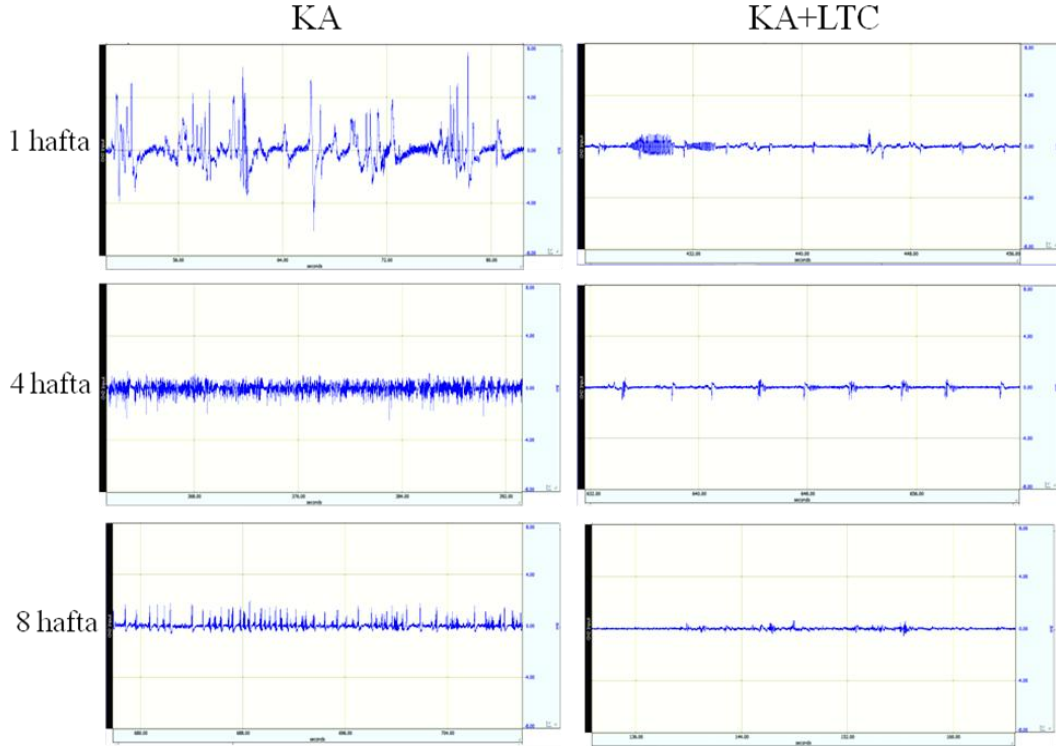


Şekil 4.13. 4 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması sonucu TLE modeli oluşturulan sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.



Şekil 4.14. 8 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması sonucu TLE modeli oluşturulan sıçan beyin korteksinin elektriksel aktivitesi.

KA ve KA+LTC gruplarının örnek traseleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.15'de gösterildi. Özellikle KA+LTC grubundaki sıçanların 4. ve 8. hafta EKOg kayıtlarında LTC almayan gruptaki sıçanlara göre farklılık görüldü.



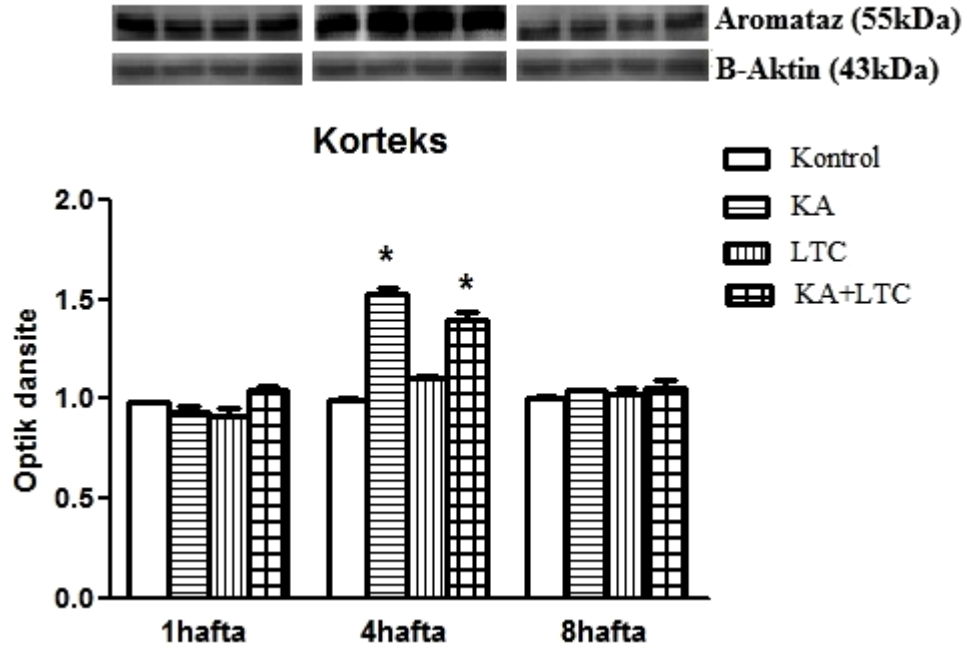
Şekil 4.15. 1, 4, 8 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulanan ve uygulanmayan TLE modeli oluşturulmuş sıçanların beyin korteksi elektriksel aktivitelerinin karşılaştırmalı gösterimi.

#### 4.2. 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan beyin korteksindeki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi

1 ve 8 haftalık KA, LTC ve KA+LTC grupları kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında beyin korteksi total ekstrelerindeki aromataz enzim seviyelerinde değişiklik görülmedi.

4 haftalık KA grubunda ise beyin korteksinde aromataz ekspresyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı. KA+LTC grubunda ise kontrole göre artış gözlenirken, LTC uygulaması bu grupta KA grubuna göre değişikliğe neden

olmadı. Yalnızca LTC verilen grupta ise aromataz ekspresyonunda değişiklik gözlenmedi. (Şekil 4.16, n=6,  $P<0.05$ ).

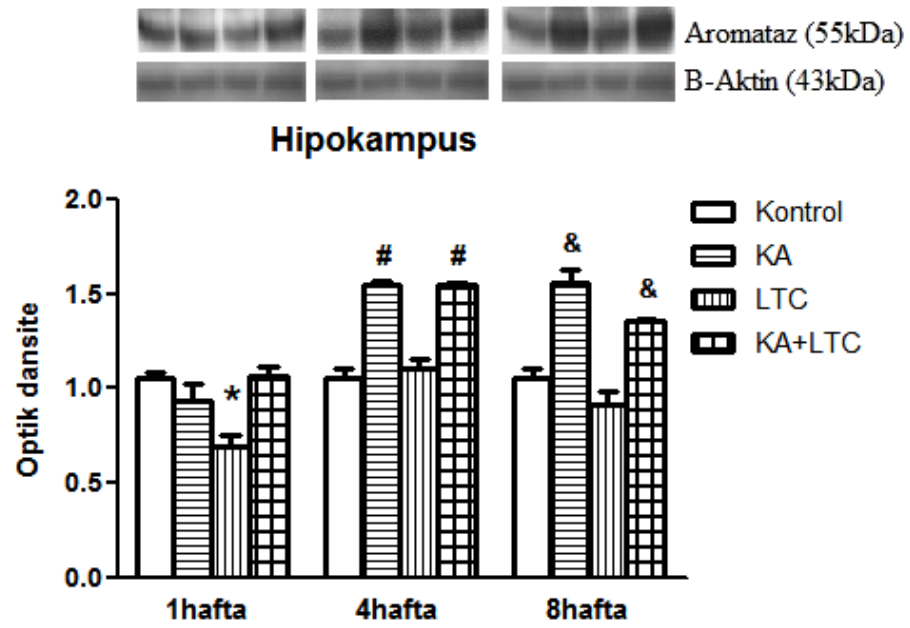


Şekil 4.16. Sıçan beyin korteksinde aromataz ekspresyonunun zamana göre gösterimi.

(\*: 4 hafta kontrole göre anlamlı,  $P<0.05$ )

#### 4.3. 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan beyin hipokampusundaki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi

1 haftalık LTC grubunda kontrol grubuna göre hipokampus total ekstrelerindeki aromataz ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlendi. Bununla beraber 4 haftalık KA grubunda kontrole göre aromataz ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı ve KA+LTC gruplarında da bu artış devam etti. 4 hafta süreyle sadece LTC verilen grupta ise değişiklik gözlenmedi. 8 haftalık gruplarda da aynı 4 haftalık grupta olduğu gibi kontrole göre KA ve KA+LTC gruplarında aromataz ekspresyonunda artış görüldü (Şekil 4.17, n=6,  $P<0.05$ ).

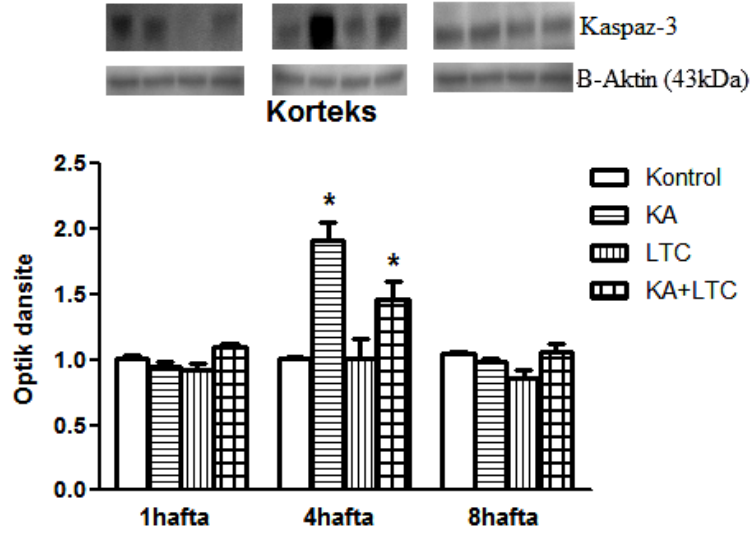


Şekil 4.17. Sıçan hipokampusunda aromataz ekspresyonunun zamana göre gösterimi.

(\*:1 hafta kontrole, #:4 hafta kontrole, &:8 hafta kontrole göre anlamlı,  $P<0.05$ )

#### 4.4. 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan beyin korteksi ve hipokampusundaki kaspaz-3 ekspresyonuna etkisinin değerlendirilmesi

Sıçan beyin korteksi ekstralarında hücrelerin apoptotik ölüme gittiğinin bir göstergesi olan kaspaz-3 seviyelerine *Western blot* yöntemi kullanılarak bakıldı. *Western blot* sonuçlarında kaspaz-3'ün molekül ağırlığına karşılık gelen ancak tüm optimizasyon denemelerine rağmen analiz edilemeyen 17 kDa'da silik bantlara rastlandı. Bunun yanında 50-60 kDa aralığında gözlenen ve kaspaz prekürsörü olduğu düşünülen bantlara göre 4 haftalık KA grubunda kaspaz-3 seviyesinin kontrole göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. KA grubuna 4 hafta LTC uygulaması kaspaz-3 seviyesini değiştirmede (Şekil 4.18,  $n=3$ ,  $P<0.05$ ). Bu sonuçlar aromataz ekspresyonu sonuçları ile uyumlu çıktı.

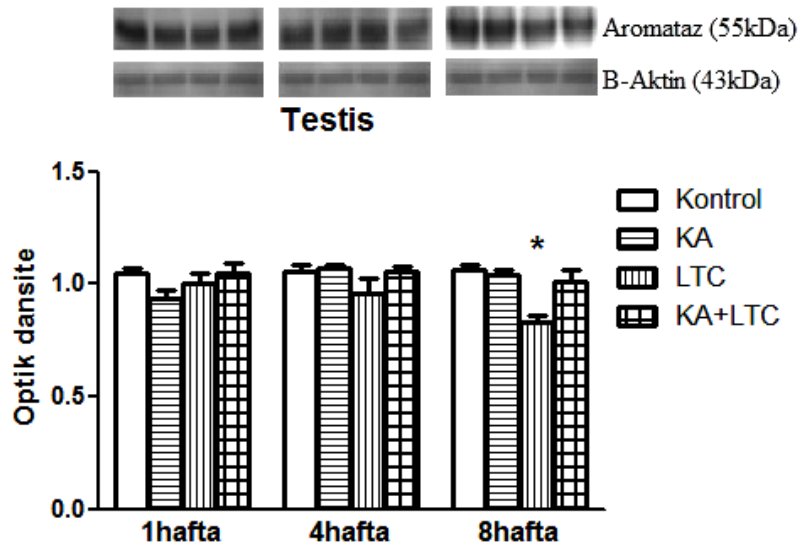


Şekil 4.18. Sıçan beyin korteksinde kaspaz-3 ekspresyonunun zamana göre gösterimi.

(\*:4 hafta kontrole göre anlamlı  $P<0.05$ )

#### 4.5. 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan testisindeki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi

Yalnızca 8 haftalık LTC grubunda kontrol grubuna göre testis ekstrelerindeki aromataz enzim seviyelerinde anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.19,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ). Diğer hiç bir grupta kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmedi.

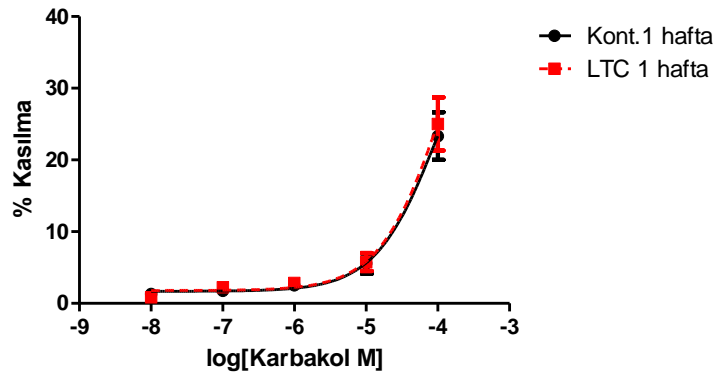


Şekil 4.19. Sıçan testisinde aromataz ekspresyonunun zamana göre gösterimi.

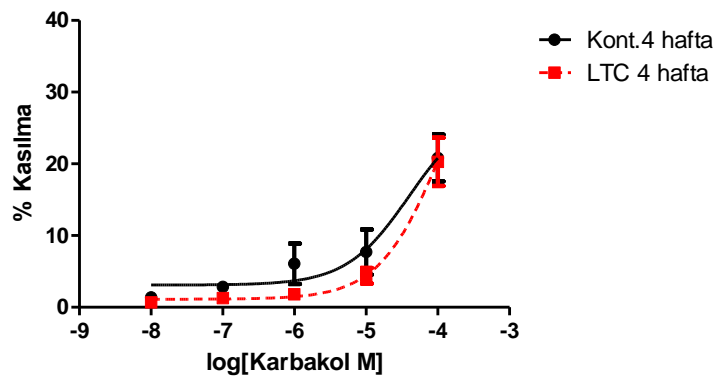
(\*: 8 hafta kontrole göre anlamlı,  $P<0.05$ )

#### 4.6. 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulamasının sıçan izole vas deferens kasılması üzerine etkisinin değerlendirilmesi

1, 4 ve 8 hafta süreyle 27 mg/kg/gün dozda LTC verilen sıçanlardan izole edilen vas deferenslerin kümülatif karbakole verdikleri cevaplar değerlendirildi. 4 haftalık grupta vas deferens kasının karbakolle kasılmasında kontrole göre bir azalma oldu ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. 1 ve 8 haftalık grupta kontrole göre değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.20, 4.21, 4.22, n=6).

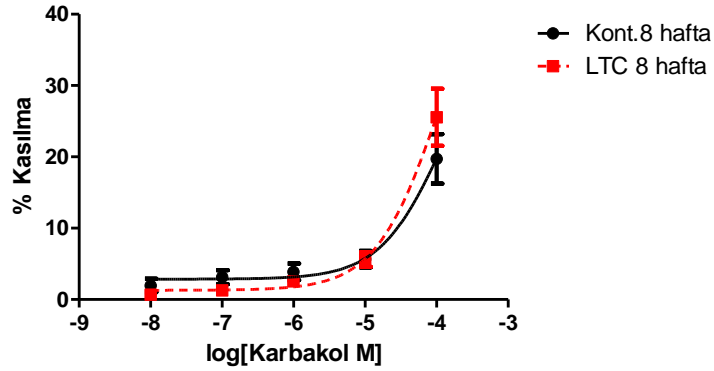


Şekil 4.20. 1 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif karbakole verdiği cevap.



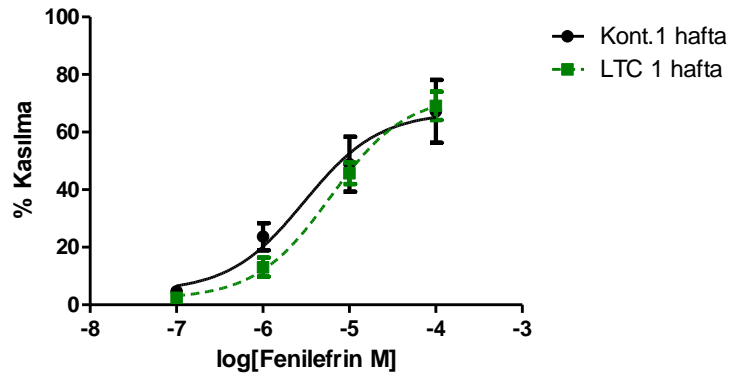
Şekil 4.21. 4 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif karbakole verdiği cevap.



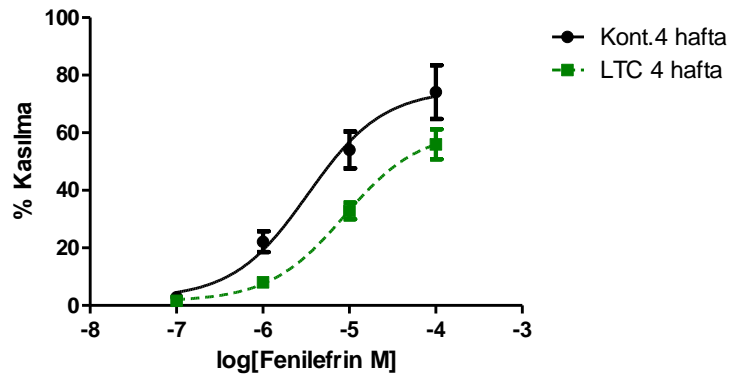


Şekil 4.22. 8 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif karbakole verdiği cevap.

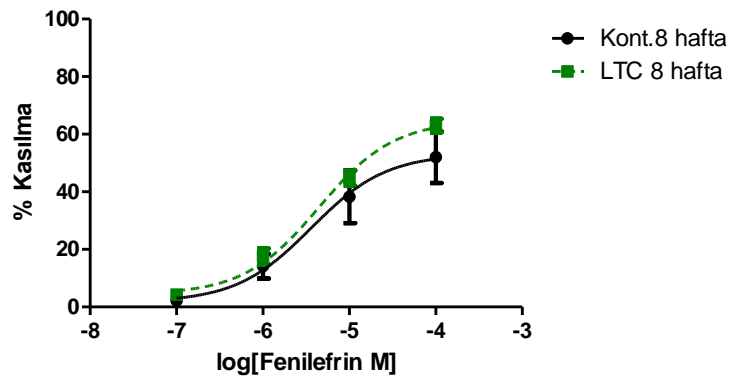
1, 4 ve 8 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçanlardan izole edilen vas deferenslerin kümülatif fenilefrine verdikleri cevaplar değerlendirildi. 4 haftalık grupta vas deferens kasının fenilefrinle kasılmasında kontrole göre bir azalma oldu ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. 1 ve 8 haftalık grupta kontrole göre değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.23, 4.24, 4.25, n=6).



Şekil 4.23. 1 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif fenilefrine verdiği cevap.



Şekil 4.24. 4 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif fenilefrine verdiği cevap.



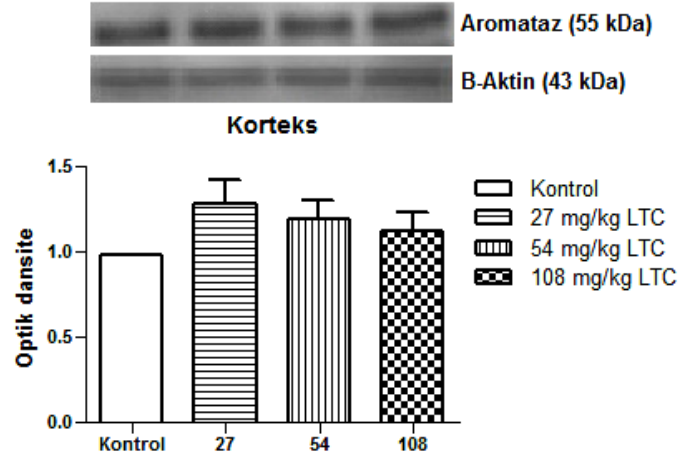
Şekil 4.25. 8 hafta süreyle 27 mg/kg dozda LTC verilen sıçandan izole edilen vas deferens kasının kümülatif fenilefrine verdiği cevap.

LTC'nin 27 mg/kg/gün dozunda beyin korteksi, hipokampusu ve testis üzerinde koruyucu olduğu düşünülen aromataz enzim ekspresyonundaki değişiklikler vas deferensin kasılma yanıtları araştırıldıktan sonra; LTC'nin 54 ve 108 mg/kg/gün dozunda uygulanmasının yaptığı değişiklikler incelendi.

#### 4.7. Artan dozda LTC uygulamasının sıçan beyin korteksi ve hipokampusundaki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi

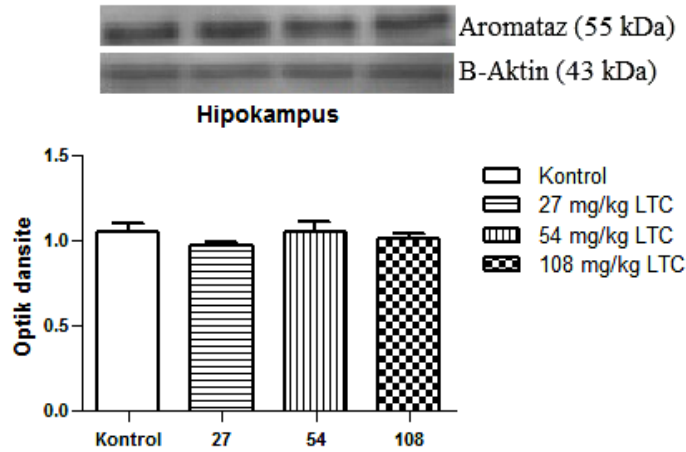
Deney hayvanlarına 8 hafta süreyle (uzun dönem) artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg/gün) LTC uygulaması yapıldı ve korteks ekstralarında *Western blot*

yöntemiyle aromataz ekspresyonu ölçüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında hiç bir grupta istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.26, n=3).



Şekil 4.26. Artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg) LTC verildiğinde sıçan beyin korteksinde 8 hafta sonra ölçülen aromataz ekspresyonunun gösterimi.

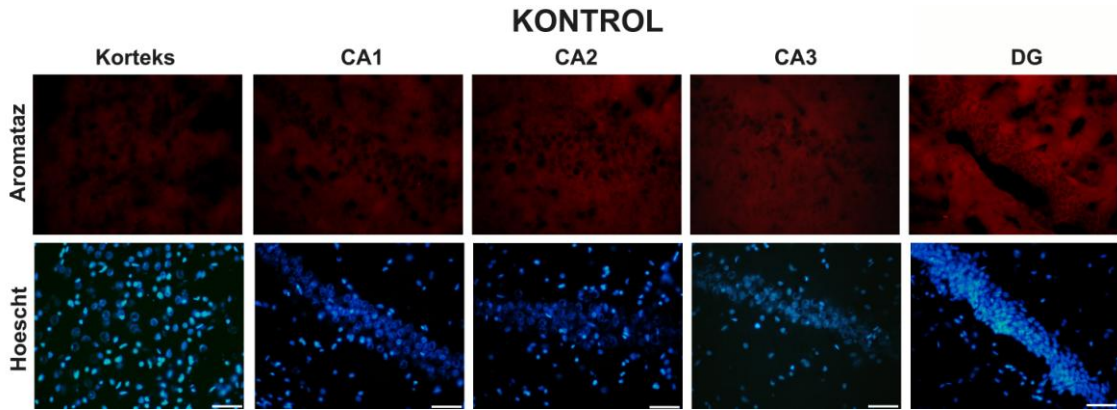
Deney hayvanlarına 8 hafta süreyle (uzun dönem) artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg/gün) LTC uygulaması yapıldı ve *Western blot* yöntemiyle hipokampus ekstrelerinde aromataz ekspresyonu ölçüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında hiç bir grupta istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.27, n=3).



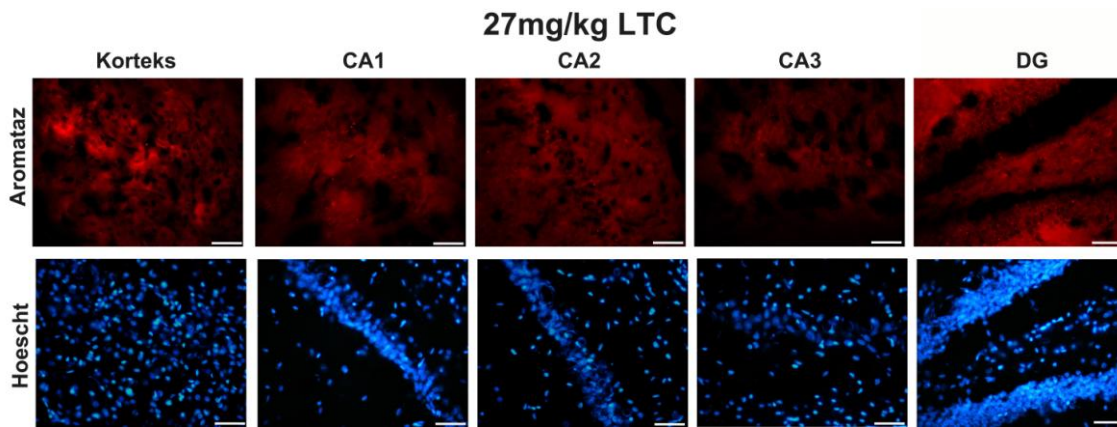
Şekil 4.27. Artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg) LTC verildiğinde sıçan hipokampusunda 8 hafta sonra ölçülen aromataz ekspresyonunun gösterimi.

#### 4.8. Artan dozda LTC uygulaması sonrası sıçan beyin korteksi ve hipokampusunun immünohistokimya sonuçlarının değerlendirilmesi

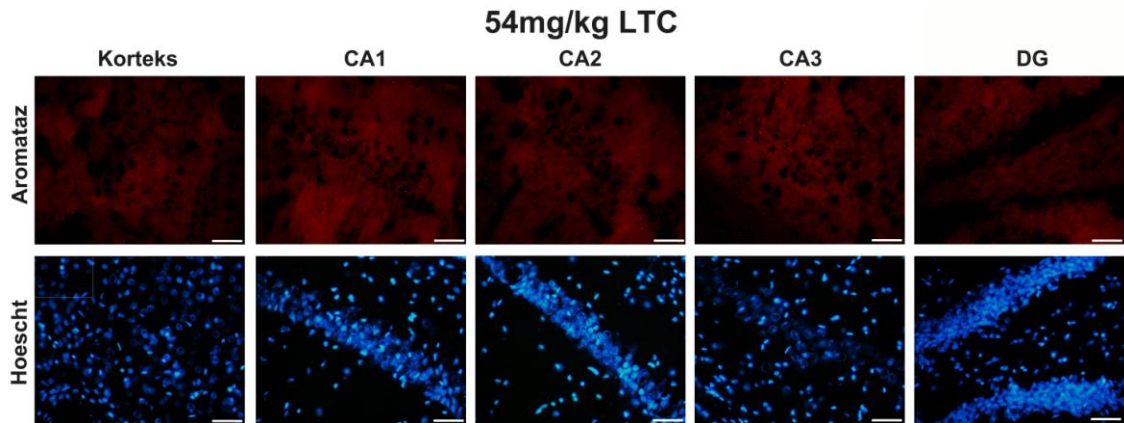
8 hafta süreyle artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg) LTC verilen sıçanlardan metod bölümünde anlatıldığı üzere beyin dilimleri alındı. Aromataz enzimi beyin korteksi ve hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinde immünohistokimyasal yöntemle de gösterildi. Boyama sonunda aromataz kırmızı, çekirdek mavi olarak işaretlendi (Şekil 4.28-4.31, boyut çizgisi 100µm'yi gösterir). Örnek resimler aşağıda gösterildiği gibidir.



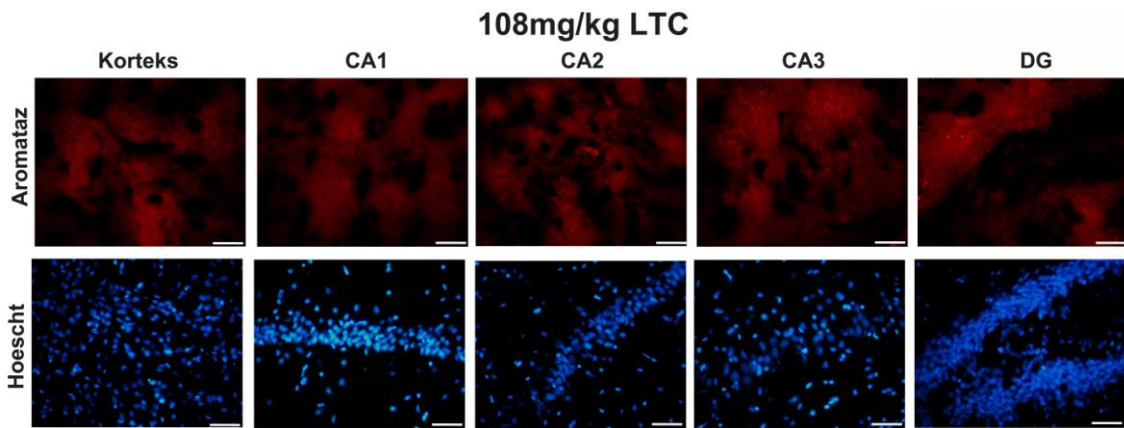
Şekil 4.28. Kontrol grubundaki sıçanın korteks ve hipokampus bölgelerinden alınan aromataz işaretlemesi yapılmış görüntüler (400X büyütmede).



Şekil 4.29. 8 hafta süreyle 27 mg/kg LTC verilen sıçanların korteks ve hipokampus bölgelerinden alınan aromataz işaretlemesi yapılmış görüntüler (400X büyütmede).

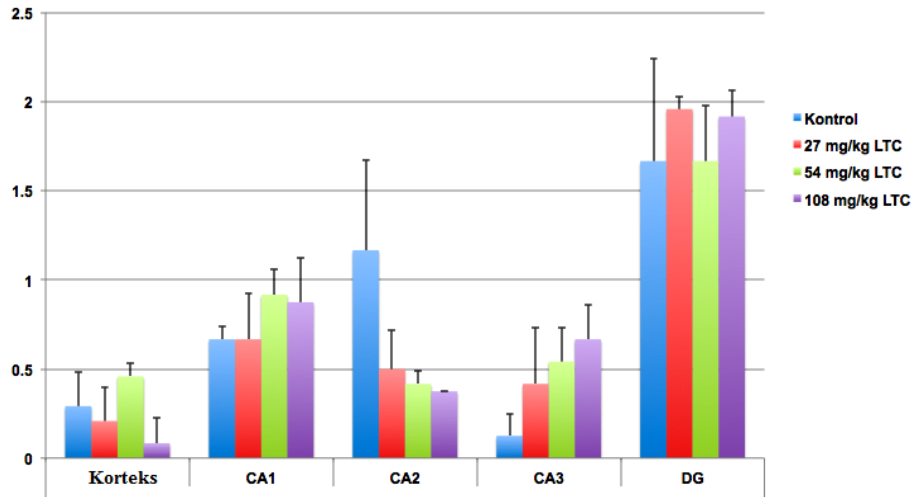


Şekil 4.30. 8 hafta süreyle 54 mg/kg LTC verilen sıçanların korteks ve hipokampus bölgelerinden alınan aromataz işaretlemesi yapılmış görüntüler (400X büyütmede).



Şekil 4.31. 8 hafta süreyle 108 mg/kg LTC verilen sıçanların korteks ve hipokampus bölgelerinden alınan aromataz işaretlemesi yapılmış görüntüler (400X büyütmede).

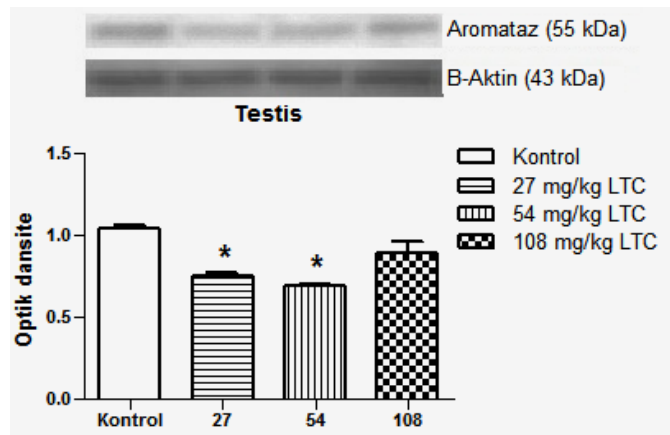
Fotoğraflarda (Şekil 4.28-4.31) görüldüğü üzere sadece sitoplazmik bölgeler kırmızı boyandığından aromataz ekspresyonu sitoplazmiktir ve çekirdeklere ekspresyonun az olduğu görülmektedir. Aromatazın elde edilen immünohistokimyasal pozitiflik değerlerinin grafiğine (ortalama±standart sapma) bakıldığında (Şekil 4.32, n=3) hipokampusun dentat girusunda yoğun olarak eksprese olduğu hipokampusun diğer bölgelerinde ve kortekste ise az miktarda olmakla beraber; LTC'nin herhangi bir dozunda immünohistokimyasal pozitiflik açısından ise kontrole göre anlamlı değişiklik gözlenmedi.



Şekil 4.32. 8 hafta süreyle artan dozlarda LTC alan sıçanların aromataz için beyin korteks ve hipokampus bölgelerindeki ortalama immünhistokimyasal pozitiflik değerleri

#### 4.9. Artan dozda LTC uygulamasının sıçan testisindeki aromataz ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin değerlendirilmesi

Deney hayvanlarına 8 hafta süreyle (uzun dönem) artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg/gün) LTC uygulaması yapıldı ve testis ekstratlarında *Western blot* yöntemiyle aromataz ekspresyonu ölçüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 27 ve 54 mg/kg/gün dozda LTC verilen sıçanların testisteki aromataz ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı, 108 mg/kg/gün dozda LTC verilenlerde ise değişiklik olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.33,  $n=3$ ,  $P<0.05$ ).



Şekil 4.33. LTC'nin artan dozlarının (27, 54, 108 mg/kg) 8 hafta sonunda testis aromataz ekspresyonunda yaptığı değişimin gösterimi.

(\*: 8 hafta kontrole göre anlamlı  $P<0.05$ )

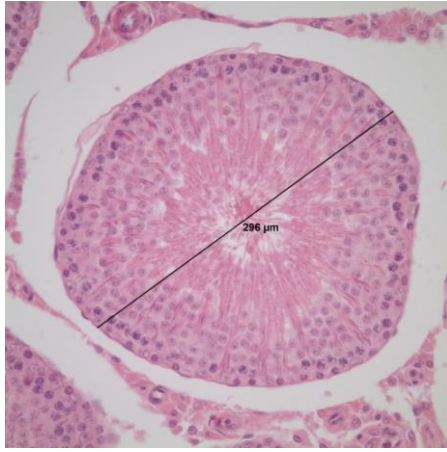
#### 4.10. Artan dozda LTC uygulamasının sıçan gonadal dokularına olan etkilerinin histopatolojik açıdan değerlendirilmesi

Yapılan patolojik incelemelerde testis tübüllerinin çapı, kalınlığı, tübüller arası interstisyel aralığı ve testisin devamı olan epididim ile yine gonadal dokulardan biri olan vas deferensin çap ölçüm değerleri Tablo 4.1'de verildi. Ölçümün nasıl yapıldığı ve doku kesitlerinin örnek mikroskopik resimleri Şekil 4.34'de gösterildi. Artan dozda LTC alan sıçanların gonadal dokularında kontrole göre hiç bir parametrede histolojik değişiklik gözlenmedi ve patolojik bulguya rastlanmadı. Ayrıca testiste obstrüktif tübül ve dejenere germ hücreye rastlanmadı (n=5-6).

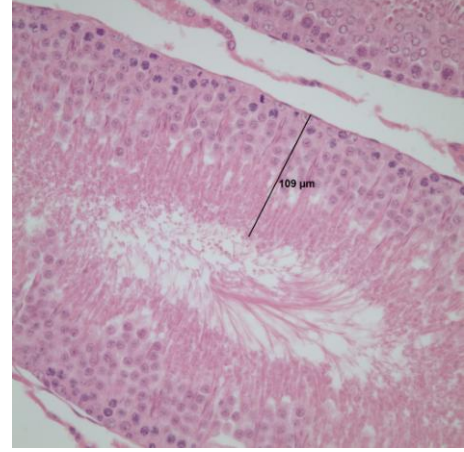
Tablo 4.1. Artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg) LTC verilen sıçanların testis dokularında yapılan patolojik incelemeler sonucu elde edilen bulguların gösterimi (Ortalama±standart hata).

	<b>Kontrol (n=6)</b>	<b>27 mg/kg LTC (n=5)</b>	<b>54 mg/kg LTC (n=6)</b>	<b>108 mg/kg LTC (n=6)</b>
<b>Fonksiyonel tübül sayısı</b>	9.4±1.8	12.4±0.3	13.2±0.4	11.3±1.6
<b>Atrofik tübül sayısı</b>	2.7±1.4	0.9±0.2	0.7±0.4	3.7±1.9
<b>Fonksiyonel tübül çapı</b>	263.5±9.5	268.8±4.0	259.7±6.9	258.9±6.6
<b>Atrofik tübül çapı</b>	85.4±24.3	126.9±15.0	52.0±23.8	119.9±27.3
<b>Fonksiyonel tübül kalınlığı</b>	50.6±1.6	53.7±1.1	46.3±2.0	49.5±1.8
<b>Atrofik tübül kalınlığı</b>	18.6±5.2	23.3±3.3	11.3±5.2	22.1±5.3
<b>İnterstisyel aralık</b>	56.9±2.7	42.2±7.6	45.9±1.8	41.3±2.9
<b>Epididim çapı</b>	1068.0±63.8	931.8±58.1	1108.3±50.7	1048.8±45.4
<b>Vas deferens çapı</b>	551.8±51.6	439.0±48.9	603.8±22.8	514.0±76.0

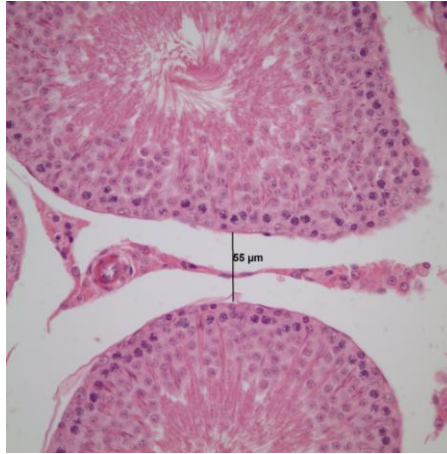




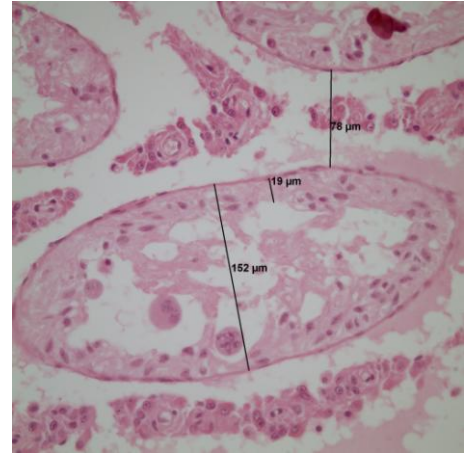
(A)



(B)



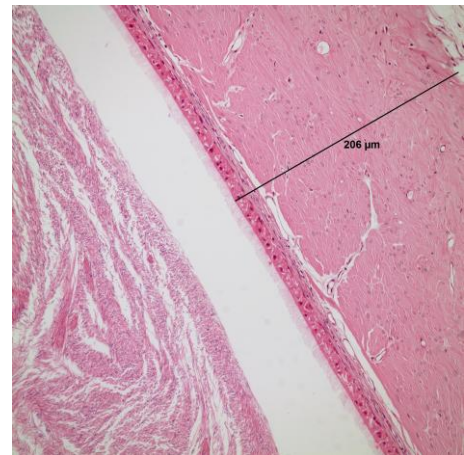
(C)



(D)



(E)



(F)

Şekil 4.34. Testislerin tübül çapı (A), tübül kalınlığı (B), tübül interstisyel aralığı (C), atrofik tübül ölçümleri (D), epididim çapı (E) ve vas deferens çapı (F) ölçümleri.



## 5. TARTIŞMA

Hayvanlarda oluşturulan TLE, sekonder jeneralize tutarıklar ve motor konvülsiyonlar oluşturabilen kompleks kısmi tutarıklarla ilişkilidir. Ancak bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada TLE modellemelerinde yüksek mortalite görülmesinin sebebi hayvanlara uygulanan hipereksitasyona yol açan nörotoksinlerin akut olarak yüksek tek doz uygulamasıdır. SE sebebiyle gerçekleşen ölümleri önlemek amacıyla bazı çalışmalarda KA'nın sıçanlara düşük ve çok dozlu olarak uygulanması yöntemi bu çalışmada da uygulanmış böylece mortalite oranı düşürülmüştür. KA uygulama protokolündeki bu modifikasyonun, modeli oluşturmada daha etkili olduğu ve insan TLE'sine benzediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (32).

Bu tez çalışmasında *Wistar* erkek sıçanlara KA uygulaması ile TLE modeli oluştururken hayvanın EKoG kayıtları ve davranışları da eş zamanlı izlendi. KA uygulamasını takip eden 30 dakika içinde spayklar görülmeye başlandı ve zaman geçtikçe spayk amplitüdü ve frekansındaki artışla beraber SE gözlenir hale geldi. KA uygulamasını takip eden ilk 24 saatte EKoG kayıtlarında spaykların anlamlı olarak daha düşük amplitüdle ve frekansta devam ettiği, tutarıkların ise ilk 3 saate göre daha seyrek olmakla beraber devam ettiği gözlemlendi. Hayvandaki gözlenen bu hipereksitabilitenin 1, 4 ve 8 hafta sonra da devam ettiği yine korteksten alınan kayıtlarla gösterildi. Bu kayıtlardaki spontan deşarjlardan da anlaşılacağı üzere sıçanda deneysel TLE modeli başarıyla oluşturuldu.

LTC 27 mg/kg/gün dozda uygulandığında tüm deney zamanlarında (1, 4, 8 hafta) ilk günküne göre TLE oluşturulmuş sıçanların EKoG kaydında görülen spaykların amplitüdünde ve spayk frekansında anlamlı bir azalma gözlemlendi. SE parametrelerinde görülen bu azalma düşük doz kronik LTC uygulamasıyla KA'nın oluşturduğu nöronal hipereksitabilitenin bloke olduğunu gösterir.

LTC'nin epilepsiye sebep olabilecek hipereksitasyonu doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiği, ilaç kesildikten sonra bile motor tutarıkların ve beyin elektriksel boşalmalarının daha kısa olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (30). Bu; LTC'nin tutarıkları sadece bir antikonvülsif gibi önlemediğini aynı zamanda güçlü bir antiepileptojenik olduğunu da gösterir.

Yeni bazı araştırmalarda KA enjeksiyonu sonucu beyinde ekspresyonu artan ve reaktif astrosit kaynaklı aromatazın nöronları hasardan koruyucu bir mekanizma olabileceğini gösteren sonuçlar bulunmuştur (30). KA, mevcut astrositik aktivitenin artışı kadar (reaktif astrositler), nörogenezi azaltarak da rNSC havuzunun reaktif astrositler lehine farklılaşmasına neden olmaktadır (83).

Bu çalışmada KA ile hipereksitasyon oluşturulan sıçanların beyin korteksinde aromataz ekspresyonu 4 hafta sonra kontrole göre anlamlı bir artış gösterdi. Bu durumda artan aromataz ekspresyonunun rNSC kaynaklı olabileceği speküle edilebilir.

TLE modeli oluşturulmuş sıçanların kortekslerinde 4 hafta sonra, hipokampuslarında ise 4 ve 8 hafta sonra aromataz ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmesi literatürde sözü geçen KA ile indüklenen ve hasardan koruyucu östrojen sentezindeki artışı tetikleyen mekanizma savını doğrulamaktadır. 27 mg/kg/gün dozda LTC uygulaması; 4 haftalık TLE'li grupta beyin korteksinde, 4 ve 8 haftalık TLE'li grupta hipokampusta gözlenen aromataz ekspresyonundaki bu artışı değiştirmeydi. KA ile indüklenen bu artışın ya da LTC ile indüklenmesi olası nöron/astrosit ölümünün kaspaz-3 ekspresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülerek kaspaz-3 aktivitesi ve ekspresyon düzeyleri ölçüldü.

Kaspaz-3'ün KA kaynaklı nörodejenerasyon, dendritik plastisite değişimi, nörogenez, mikroglial aktivasyon, gliozis, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve kök hücrelerin farklılaşmasında gerekli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (84,85). Bu tez çalışmasında 4 haftalık KA ve KA+LTC gruplarında kaspaz-3 seviyesinin kontrole göre anlamlı olarak arttığının, LTC gruplarında ise kaspaz-3'ün değişmediğinin gözlenmesi; LTC'nin nörodejeneratif hasara sebep olmadığını düşündürdü. Bu sonuçlar korteks aromataz ekspresyonu seviyeleri ile de uyumludur.

TLE'li hayvanlara LTC uygulaması sonrası hem 4 hem de 8 haftalık grupların hipokampuslarında aromataz ekspresyonlarının hala yüksek olduğu görüldü. Bu etki KA'nın oluşturduğu nörodejeneratif hasara cevap olarak gelişen aromataz ekspresyonunun, LTC uygulanan TLE'li gruplarda da varolageldiğini ve LTC uygulamasından etkilenmediğini dolayısıyla LTC'nin etkisini aromataz ekspresyonu üzerinden göstermediğini düşündürmektedir.

Bir haftalık TLE'li grupların beyin korteksinde ise LTC öncesi veya sonrasında aromataz ekspresyonunda değişiklik olmadı. Bu durum 1 haftalık grupta ekspresyon artışı için gerekli mekanizmaların henüz devreye girmemesi olarak yorumlandı. Bir hafta boyunca sadece LTC uygulanan grubun hipokampus aromataz ekspresyonunun kontrole göre düşük çıkması ise ilacın bazal aromataz ekspresyonunda azalma yaptığı şeklinde yorumlandı. Bu tez çalışmasında 8 haftalık artan dozda LTC uygulanan grupların *Western blot* sonuçları ile immünohistokimya sonuçları değerlendirildiğinde uyumlu oldukları görüldü.

Bilindiği üzere başta östrojen olmak üzere testosteron gibi gonadal hormonlar canlının yaşam süresi boyunca beyin fonksiyonlarını düzenlemektedir. Erken gelişimde cinsel farklılaşmada, hipotalamus ve hipokampus gibi birçok beyin yapısının olgunlaşmasında gereklidirler. Parkinson, Alzheimer ve epilepsi gibi hastalıklarda bu hormonların normal plazma seviyelerinde azalma gözlenmektedir.

MSS'de de sentezlenen bir gonadal hormon olan östrojen; serbest radikaller (86),  $\beta$ -amiloid peptid (87), glutamat (88), AMPA (40), kainat (89) ve NMDA (90) tarafından tetiklenen hücre ölümüne karşı nöronları korur. MSS'de ve periferde diğer bir gonadal hormon olan testosterondan östradiolü sentezleyen aromataz oldukça önemli bir enzimdir.

Beyne özgü aromataz genini düzenleyen sinyal yolları ve moleküler mekanizmalar tam olarak açıklanmamış olmakla beraber beyinde aromataz ekspresyonunun ve aktivitesinin östrojen ve cAMP (siklik-adenozin monofosfat) tarafından düzenlendiği bilinmektedir (91). Çünkü sinir hücresi kültürlerinde cAMP artışının aromataz mRNA (mesajcı ribonükleik asit) seviyelerinde artışa neden olduğu (92) ve östrojenin koruyucu etkisini aromataz geni üzerindeki östrojen reseptör elementine, cAMP'nin ise cAMP-cevap elementine bağlanarak gerçekleştirdiği (93,94) gösterilmiştir.

Fizyolojik şartlarda beyinde sinir hücrelerinde eksprese edilen aromataz; nörotoksin uygulaması, iskemi/reperfüzyon hasarı, inme gibi stres şartlarında astrositlerde artan oranlarda eksprese edilir. Bu ekspresyon paternindeki değişiklik nöron hasarına karşı bir tepkidir ve koruyucu östrojenin artışını tetikler (30).

LTC'nin nöron koruyucu etkileri olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir. (4). LTC serebral arter oklüzyonu yapılan sıçanlarda da nöron

koruyucu etkinlik göstermiştir (95). Ayrıca hipokampal kültürlerde 1 saatlik oksijen-glukoz yoksun bırakmasından 24 saat sonra dahi hücre ölümünü engellemiştir (96). Sıçanlarda pilokarpinle indüklenen SE'nin tüm parametrelerinde LTC belirgin azalma yapmıştır (97). Tüm bu çalışmalara karşın bu tez çalışmasında LTC'nin kortekste ve hipokampusta nöron koruyucu etkinliğinin aromataz ekspresyonu ve buna bağlı olası koruyucu östrojen sentezi üzerinden olamayacağı gösterildi.

Pek çok çalışmada, klasik AEİ'lerin reproduktif organların fonksiyonellikleri üzerine negatif etki gösterdikleri vurgulanmıştır. Sodyum valproatın testis ve epididimi küçülttüğü, serum testosteron seviyesini düşürdüğü (98), karbamazepinin anormal şekilli sperm sayısını arttırdığı ve sperm motilitesini bozduğu gösterilmiştir (99). Ancak bu konuda LTC ile ilgili yapılmış araştırma bulunmaması, bu tez çalışmasının önemini bir kez daha vurgular.

Epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçların bilinen yan tesirleri arasında östrojen gibi üreme hormonlarının metabolizmasını indüklemek/inhibe etmek, başka hormonlara veya metabolitlerine dönüşmesine etki etmek yoluyla gonadal dokuların fonksiyonelliğini değiştirmek sayılmaktadır (100). Sodyum valproat başta olmak üzere AEİ'lerin gonadal fonksiyonlara olumsuz tesirleri üzerine pek çok klinik çalışma mevcuttur (98,101-103). Ancak LTC'nin bu hormonlar üzerinden olabilecek yan etkileri yeterince araştırılmamıştır. Bunun üzerine bu tez çalışması kapsamında antiepileptik LTC uygulaması sonrası erkek sıçanların testis, vas deferens ve epididim dokularının fonksiyonellikleri incelendi.

Spermin taşınması yoluyla gonadal fonksiyonellikte önemli role sahip dokulardan biri olan vas deferens üzerine LTC'nin olası yan etkilerini incelemek amacıyla *in vitro* organ banyosu deneyleri yapıldı. 27 mg/kg/gün dozda LTC'yi 1, 4 ve 8 hafta süreyle alan sıçanların vas deferens kasının adrenerjik ve kolinerjik sistem üzerinden verdiği kasılma miktarında kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik bulunmaması, ilacın vas deferensin fonksiyonelliği üzerine olumsuz etkisi olmadığına işaret eder.

Testislerde spermatogenezi belirleyen östrojen/testosteron dengesi aromataz tarafından kontrol edilmektedir (6). Bu tez çalışmasında TLE modeli oluşturulmuş sıçanların testisindeki aromataz ekspresyonunun kontrole göre değişmediği gözlemlendi. Bundan başka LTC'nin artan dozlarda uygulamasının infertiliteyi olumsuz etkileyip

etkilemediği de incelendi. LTC 27 mg/kg/gün dozda 1 ve 4 hafta verildiğinde normal sıçanlarda testisin aromataz ekspresyonu kontrole göre değişmedi, ancak 8 hafta sonunda az ama kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü. LTC dozu 54 mg/kg/gün'e arttırıldığında aromataz ekspresyonunun kontrole göre yine azalmış olduğu gözlenirken daha yüksek dozda, 108 mg/kg/gün dozda LTC verildiğinde ise kontrole göre bir değişiklik olmadı. LTC'nin 27 ve 54 mg/kg/gün dozlarında sebep olduğu aromataz ekspresyonundaki azalmanın mekanizması bilinmemekle beraber aromataz ekspresyonunu arttırmaması yan etki olarak infertiliteye sebep olmadığı kanısını kuvvetlendirmektedir. Çünkü testiküler aromataz ekspresyonunda artış ve bu dengenin östrojen lehine kayması, testosteron seviyesinin azalmasına sebep olacağından, erkek infertilitesinin muhtemel sebepleri arasında gösterilmektedir (72).

Bu çalışma kapsamında LTC'nin artan dozlarda verildiğinde olası yan etkilerini tam olarak belirleyebilmek amacıyla sıçan gonadal dokularından testis, vas deferens ve epididim üzerine olan etkileri histopatolojik açıdan da incelendi. LTC; 8 hafta süreyle artan dozlarda (27, 54, 108 mg/kg/gün) uygulandığında epididim ve vas deferens çapları üzerinde kontrole karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik görülmedi. Testisteki fonksiyonel ve atrofik tübül parametrelerinin hiçbirinde değişiklik gözlenmedi. Bu durum LTC'nin gonadal dokuların normal fonksiyonunda ve histolojik yapısında olumsuz değişikliğe yol açmadığına işaret eder. Günümüze kadar kullanılan ve hala kullanımda olan konvansiyonel AEİ'lerin üreme fonksiyonlarında yaptığı olumsuz etkiler göz önünde bulundurulduğunda, LTC bu yönüyle tercih edilen antiepileptik ilaç olabilir.

Normal testiküler fonksiyon; ikincil seksüel karakteristiklerin oluşması ve spermatozoa üretimi yani fertilite için gereklidir (6). Testosteron ise testisin tübül fonksiyonunu gösterir. Bu çalışmalara ilave olarak testislerdeki Leydig hücre fonksiyonu; testosteron ve LH serum seviyelerinin ölçülmesi ile gösterilebilir. Çünkü serum testosteron seviyeleri düştüğünde Leydig hücrelerinde testiküler testosteron üretimi LH'daki artışla stimüle edilir. Eğer serumda testosteron düşük ama LH yüksekse hipofiz stimülasyonuna rağmen testisler yeterli testosteron üretilmiyor demektir (70,76). LH ve Leydig hücrelerinden spermatozoa üretimini sağlayan FSH ise GnRH ile kontrol edilir. Buradan hareketle LH, testosteron, FSH ve GnRH

hormonlarının serum düzeyleri elde edilen verileri destekleyici olarak ileride ölçülebilecek parametrelerdir.

Sonuç olarak LTC erkek sıçanlarda, testiste aromataz indüksiyonu yapmaz, vas deferensin kontraktilite fonksiyonlarını etkilemez ve tüm gonadal dokuların histolojisinde belirgin değişimler yapmaz; dolayısıyla infertiliteye sebep olmaz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda beyinde aromataz enziminin sinir koruyucu etkinliği ile ilgili yapılan araştırmaların sayısında artış görölmektedir. Aromatazın Alzheimer hastalığı ve epilepsi gibi pek çok nörodejeneratif olayda önemli role sahip olduğu düşünöldüğünde bu enzimin fonksiyonlarının ve etkileşimlerinin incelenmesinin önemi belirginleşmektedir. Özellikle TLE'nin bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkileri ve AEİ'lerle yapılan tedavinin bu fonksiyonları iyileştirmede etkili olup olmadığının araştırılması gerektiği açıktır. Yapılan çalışmaların da ışığında LTC kullanımının gonadal dokularda aromataz ekspresyonunda dolayısıyla üreme fonksiyonlarında oluşturabilecekleri diğer olası değişikliklerin incelenmesi gerektiği kanısına varılmıştır. Elde edilen sonuçların nörodejeneratif hastalıkların ve gonadal hipofonksiyonun mekanizmalarının aydınlatılmasına ilişkin literatüre yeni bilgiler ekleyeceği düşünölmektedir.

Özetle bu çalışmanın LTC'nin etki mekanizmasını anlamaya yönelik ileride gerçekleştirilecek yeni araştırmalara katkı sağlayacağı düşünölmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1.Liu, G., Guo, H., Guo, C., Zhao, S., Gong, D.,Zhao, Y. (2011) Involvement of IRE1alpha signaling in the hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bull*, 84 (1), 94-102.
- 2.Giblin, K.A.,Blumenfeld, H. (2010) Is epilepsy a preventable disorder? New evidence from animal models. *Neuroscientist*, 16 (3), 253-275.
- 3.Rakhade, S.N.,Jensen, F.E. (2009) Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol*, 5 (7), 380-391.
- 4.Klitgaard, H.,Pitkanen, A. (2003) Antiepileptogenesis, neuroprotection, and disease modification in the treatment of epilepsy: focus on levetiracetam. *Epileptic Disord*, 5 Suppl 1, S9-16.
- 5.Kayaalp, S.O. (2005). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji: Hacettepe Taş Kitapçılık Limited Şti.
- 6.Roselli, C.F. (2007) Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 106 (1-5), 143-150.
- 7.Kwan, P.,Sander, J.W. (2004) The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 (10), 1376-1381.
- 8.Berto, P. (2002) Quality of life in patients with epilepsy and impact of treatments. *Pharmacoeconomics*, 20 (15), 1039-1059.
- 9.Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. ve diğerleri. (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.
- 10.Matsumoto, H.,Marsan, C.A. (1964) Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations. *Exp Neurol*, 9, 286-304.
- 11.Görgülü, A.,Kırış, T. (2005) Eksitatör Aminoasidler ve Eksitotoksisite. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 15 (1), 33-38.
- 12.Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., Puig, B., Dominguez, I.,Vinals, F. (2002) Active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates are differentially expressed



- following systemic administration of kainic acid to the adult rat. *Acta Neuropathol*, 103 (4), 391-407.
13. Siesjö, B.K., Ingvar, M., Wieloch, T. (1986) Cellular and molecular events underlying epileptic brain damage. *Ann N Y Acad Sci*, 462, 207-223.
  14. Squire, L.R., Zola-Morgan, S. (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253 (5026), 1380-1386.
  15. Engel, J., Jr. (1996) Excitation and inhibition in epilepsy. *Can J Neurol Sci*, 23 (3), 167-174.
  16. Cendes, F. (2004) Febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 17 (2), 161-164.
  17. Wieser, H.G., Hane, A. (2004) Antiepileptic drug treatment in seizure-free mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis following selective amygdalohippocampectomy. *Seizure*, 13 (8), 534-536.
  18. Stafstrom, C.E. (2006) Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (8), 983-1004.
  19. Sanchez-Carpintero Abad, R., Sanmarti Vilaplana, F.X., Serratos Fernandez, J.M. (2007) Genetic causes of epilepsy. *Neurologist*, 13 (6 Suppl 1), S47-51.
  20. Kang, J.Q., Macdonald, R.L. (2009) Making sense of nonsense GABA(A) receptor mutations associated with genetic epilepsies. *Trends Mol Med*, 15 (9), 430-438.
  21. Wallace, R. (2002) Mutations in GABA-receptor genes cause human epilepsy. *Lancet Neurol*, 1 (4), 212.
  22. Bormann, J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 21 (1), 16-19.
  23. Budd Haeberlein, S., Lipton, S. (2009) Excitotoxicity in neurodegenerative disease. *Encyclopedia of neuroscience*, 77-86.
  24. Voglis, G., Tavernarakis, N. (2006) The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep*, 7 (11), 1104-1110.
  25. Platenik, J., Kuramoto, N., Yoneda, Y. (2000) Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci*, 67 (4), 335-364.
  26. Mazarati, A.M., Baldwin, R., Klitgaard, H., Matagne, A., Wasterlain, C.G. (2004) Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus. *Epilepsy Res*, 58 (2-3), 167-174.

27. Lynch, B.A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A. ve diğerleri. (2004) The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (26), 9861-9866.
28. Vogl, C., Mochida, S., Wolff, C., Whalley, B.J., Stephens, G.J. (2012) The synaptic vesicle glycoprotein 2A ligand levetiracetam inhibits presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels through an intracellular pathway. *Mol Pharmacol*, 82 (2), 199-208.
29. Rogawski, M.A. (2006) Diverse mechanisms of antiepileptic drugs in the development pipeline. *Epilepsy Res*, 69 (3), 273-294.
30. Garcia-Segura, L.M. (2008) Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol*, 20 (6), 705-712.
31. Bambal, G., Çakıl, D., Ekici, F. (2011) Deneysel epilepsi modelleri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2 (1), 118-123.
32. Hellier, J.L., Patrylo, P.R., Buckmaster, P.S., Dudek, F.E. (1998) Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 31 (1), 73-84.
33. Racine, R.J. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32 (3), 281-294.
34. Tuunanen, J., Lukasiuk, K., Halonen, T., Pitkanen, A. (1999) Status epilepticus-induced neuronal damage in the rat amygdaloid complex: distribution, time-course and mechanisms. *Neuroscience*, 94 (2), 473-495.
35. Pereno, G.L., Beltramino, C.A. (2009) Differential role of gonadal hormones on kainic acid-induced neurodegeneration in medial amygdaloid nucleus of female and male rats. *Neuroscience*, 163 (3), 952-963.
36. Marangoz, C. (1997) Deneysel epilepsi modelleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 14 (3), 147-186.
37. Buckmaster, P.S., Dudek, F.E. (1997) Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol*, 385 (3), 385-404.

38. Ben-Ari, Y. (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 14 (2), 375-403.
39. Ben-Ari, Y., Cossart, R. (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci*, 23 (11), 580-587.
40. Zaulyanov, L.L., Green, P.S., Simpkins, J.W. (1999) Glutamate receptor requirement for neuronal death from anoxia-reoxygenation: an in Vitro model for assessment of the neuroprotective effects of estrogens. *Cell Mol Neurobiol*, 19 (6), 705-718.
41. Wang, S., Wu, D.C., Fan, X.N., Zhu, M.Z., Hu, Q.Y., Zhou, D. ve diğeri. (2010) Mediodorsal thalamic stimulation is not protective against seizures induced by amygdaloid kindling in rats. *Neurosci Lett*, 481 (2), 97-101.
42. Balthazart, J., Ball, G.F. (1998) New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci*, 21 (6), 243-249.
43. Naftolin, F., Ryan, K.J., Petro, Z. (1971) Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human fetuses. *J Endocrinol*, 51 (4), 795-796.
44. Simpson, E.R., Davis, S.R. (2001) Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocrinology*, 142 (11), 4589-4594.
45. Sebastian, S., Bulun, S.E. (2001) A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (10), 4600-4602.
46. Zhao, H., Innes, J., Brooks, D.C., Reierstad, S., Yilmaz, M.B., Lin, Z. ve diğeri. (2009) A novel promoter controls Cyp19a1 gene expression in mouse adipose tissue. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 37.
47. Lephart, E.D. (1997) Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61 (3-6), 375-380.
48. Bulun, S.E., Chen, D., Lu, M., Zhao, H., Cheng, Y., Demura, M. ve diğeri. (2007) Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 106 (1-5), 81-96.
49. Naftolin, F., Ryan, K.J., Petro, Z. (1971) Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab*, 33 (2), 368-370.

50. Lephart, E.D. (1996) A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev*, 22 (1), 1-26.
51. Minano, A., Xifro, X., Perez, V., Barneda-Zahonero, B., Saura, C.A., Rodriguez-Alvarez, J. (2008) Estradiol facilitates neurite maintenance by a Src/Ras/ERK signalling pathway. *Mol Cell Neurosci*, 39 (2), 143-151.
52. Tremere, L.A., Jeong, J.K., Pinaud, R. (2009) Estradiol shapes auditory processing in the adult brain by regulating inhibitory transmission and plasticity-associated gene expression. *J Neurosci*, 29 (18), 5949-5963.
53. Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., Honda, S., Harada, N., Garcia-Segura, L.M. (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol*, 47 (4), 318-329.
54. Simpkins, J.W., Rajakumar, G., Zhang, Y.Q., Simpkins, C.E., Greenwald, D., Yu, C.J. ve diğeri. (1997) Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg*, 87 (5), 724-730.
55. Dubal, D.B., Shughrue, P.J., Wilson, M.E., Merchenthaler, I., Wise, P.M. (1999) Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*, 19 (15), 6385-6393.
56. Culmsee, C., Vedder, H., Ravati, A., Junker, V., Otto, D., Ahlemeyer, B. ve diğeri. (1999) Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons: evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19 (11), 1263-1269.
57. Sudo, S., Wen, T.C., Desaki, J., Matsuda, S., Tanaka, J., Arai, T. ve diğeri. (1997) Beta-estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. *Neurosci Res*, 29 (4), 345-354.
58. Rabbani, O., Panickar, K.S., Rajakumar, G., King, M.A., Bodor, N., Meyer, E.M. ve diğeri. (1997) 17 beta-estradiol attenuates fimbrial lesion-induced decline of ChAT-immunoreactive neurons in the rat medial septum. *Exp Neurol*, 146 (1), 179-186.
59. Dluzen, D. (1997) Estrogen decreases corpus striatal neurotoxicity in response to 6-hydroxydopamine. *Brain Res*, 767 (2), 340-344.

60. Azcoitia, I., Fernandez-Galaz, C., Sierra, A., Garcia-Segura, L.M. (1999) Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J Neurocytol*, 28 (9), 699-710.
61. Reibel, S., Andre, V., Chassagnon, S., Andre, G., Marescaux, C., Nehlig, A. ve diğeri. (2000) Neuroprotective effects of chronic estradiol benzoate treatment on hippocampal cell loss induced by status epilepticus in the female rat. *Neurosci Lett*, 281 (2-3), 79-82.
62. Veliskova, J., Velisek, L., Galanopoulou, A.S., Sperber, E.F. (2000) Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus. *Epilepsia*, 41 Suppl 6, S30-35.
63. Zwain, I.H., Yen, S.S. (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140 (8), 3843-3852.
64. Melcangi, R.C., Panzica, G., Garcia-Segura, L.M. (2011) Neuroactive steroids: focus on human brain. *Neuroscience*, 191, 1-5.
65. Garcia-Segura, L.M., Wozniak, A., Azcoitia, I., Rodriguez, J.R., Hutchison, R.E., Hutchison, J.B. (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89 (2), 567-578.
66. Peterson, R.S., Saldanha, C.J., Schlinger, B.A. (2001) Rapid upregulation of aromatase mRNA and protein following neural injury in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neuroendocrinol*, 13 (4), 317-323.
67. Hutchison, J.B., Wozniak, A., Beyer, C., Hutchison, R.E. (1996) Regulation of sex-specific formation of oestrogen in brain development: endogenous inhibitors of aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 56 (1-6 Spec No), 201-207.
68. McCullough, L.D., Blizzard, K., Simpson, E.R., Oz, O.K., Hurn, P.D. (2003) Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci*, 23 (25), 8701-8705.
69. Negri-Cesi, P., Poletti, A., Celotti, F. (1996) Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5 $\alpha$ -reductase and aromatase in brain differentiation and functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58 (5-6), 455-466.
70. Azcoitia, I., DonCarlos, L.L., Garcia-Segura, L.M. (2002) Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res*, 4 (3), 235-245.

- 71.Meyer, R.P., Hagemeyer, C.E., Knoth, R., Kaufmann, M.R.,Volk, B. (2006) Anti-epileptic drug phenytoin enhances androgen metabolism and androgen receptor expression in murine hippocampus. *J Neurochem*, 96 (2), 460-472.
- 72.Reddy, D.S. (2004) Testosterone modulation of seizure susceptibility is mediated by neurosteroids 3alpha-androstanediol and 17beta-estradiol. *Neuroscience*, 129 (1), 195-207.
- 73.Roste, L.S., Tauboll, E., Morkrid, L., Bjornenak, T., Saetre, E.R., Morland, T. ve diğ erleri. (2005) Antiepileptic drugs alter reproductive endocrine hormones in men with epilepsy. *Eur J Neurol*, 12 (2), 118-124.
- 74.Quigg, M., Kiely, J.M., Shneker, B., Veldhuis, J.D.,Bertram, E.H., 3rd. (2002) Interictal and postictal alterations of pulsatile secretions of luteinizing hormone in temporal lobe epilepsy in men. *Ann Neurol*, 51 (5), 559-566.
- 75.Herzog, A.G.,Fowler, K.M. (2005) Sexual hormones and epilepsy: threat and opportunities. *Curr Opin Neurol*, 18 (2), 167-172.
- 76.Morris, G.L., 3rd,Vanderkolk, C. (2005) Human sexuality, sex hormones, and epilepsy. *Epilepsy Behav*, 7 Suppl 2, S22-28.
- 77.Herzog, A.G., Drislane, F.W., Schomer, D.L., Pennell, P.B., Bromfield, E.B., Kelly, K.M. ve diğ erleri. (2004) Differential effects of antiepileptic drugs on sexual function and reproductive hormones in men with epilepsy: interim analysis of a comparison between lamotrigine and enzyme-inducing antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 45 (7), 764-768.
- 78.Isojarvi, J.I., Tauboll, E.,Herzog, A.G. (2005) Effect of antiepileptic drugs on reproductive endocrine function in individuals with epilepsy. *CNS Drugs*, 19 (3), 207-223.
- 79.Fucic, A., Miskov, S., Zeljezic, D., Bogdanovic, N., Katic, J., Gjergja, R. ve diğ erleri. (2009) Is the role of estrogens and estrogen receptors in epilepsy still underestimated? *Med Hypotheses*, 73 (5), 703-705.
- 80.Gower, A.J., Falter, U.,Lamberty, Y. (2003) Anxiolytic effects of the novel anti-epileptic drug levetiracetam in the elevated plus-maze test in the rat. *Eur J Pharmacol*, 481 (1), 67-74.

81. Klitgaard, H., Matagne, A., Gobert, J., Wulfert, E. (1998) Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur J Pharmacol*, 353 (2-3), 191-206.
82. Paxinos, G., Watson, C. (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates-The New Coronal Set (5th bs.): Academic press.
83. Sierra, A., Martin-Suarez, S., Valcarcel-Martin, R., Pascual-Brazo, J., Aelvoet, S.A., Abiega, O. ve diğeri. (2015) Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 16 (5), 488-503.
84. Narkilahti, S., Pirttila, T.J., Lukasiuk, K., Tuunanen, J., Pitkanen, A. (2003) Expression and activation of caspase 3 following status epilepticus in the rat. *Eur J Neurosci*, 18 (6), 1486-1496.
85. Graham, R.K., Ehrnhoefer, D.E., Hayden, M.R. (2011) Caspase-6 and neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 34 (12), 646-656.
86. Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Akaike, A., Shimohama, S. (1998) Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res*, 54 (5), 707-719.
87. Bonnefont, A.B., Munoz, F.J., Inestrosa, N.C. (1998) Estrogen protects neuronal cells from the cytotoxicity induced by acetylcholinesterase-amyloid complexes. *FEBS Lett*, 441 (2), 220-224.
88. Singer, C.A., Rogers, K.L., Strickland, T.M., Dorsa, D.M. (1996) Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett*, 212 (1), 13-16.
89. Regan, R.F., Guo, Y. (1997) Estrogens attenuate neuronal injury due to hemoglobin, chemical hypoxia, and excitatory amino acids in murine cortical cultures. *Brain Res*, 764 (1-2), 133-140.
90. Weaver, C.E., Jr., Park-Chung, M., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (1997) 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res*, 761 (2), 338-341.
91. Yilmaz, M.B., Wolfe, A., Cheng, Y.H., Glidewell-Kenney, C., Jameson, J.L., Bulun, S.E. (2009) Aromatase Promoter 1f is Regulated by Estrogen Receptor Alpha (ESR1) in Mouse Hypothalamic Neuronal Cell Lines. *Biol Reprod*.

92. Lavaque, E., Mayen, A., Azcoitia, I., Tena-Sempere, M., Garcia-Segura, L.M. (2006) Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450<sub>scc</sub>, and aromatase in the olivocerebellar system. *J Neurobiol*, 66 (3), 308-318.
93. Chen, S., Zhou, D., Okubo, T., Kao, Y.C., Yang, C. (1999) Breast tumor aromatase: functional role and transcriptional regulation. *Endocr Relat Cancer*, 6 (2), 149-156.
94. Chen, S., Ye, J., Kijima, I., Kinoshita, Y., Zhou, D. (2005) Positive and negative transcriptional regulation of aromatase expression in human breast cancer tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 95 (1-5), 17-23.
95. Hanon, E., Klitgaard, H. (2001) Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure*, 10 (4), 287-293.
96. Rekling, J.C. (2003) Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. *Neurosci Lett*, 335 (3), 167-170.
97. Glien, M., Brandt, C., Potschka, H., Loscher, W. (2002) Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43 (4), 350-357.
98. Sveberg Roste, L., Tauboll, E., Berner, A., Berg, K.A., Aleksandersen, M., Gjerstad, L. (2001) Morphological changes in the testis after long-term valproate treatment in male Wistar rats. *Seizure*, 10 (8), 559-565.
99. Shetty, A.J., Narayana, K. (2007) The effects of carbamazepine on sperm morphology in wistar rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 51 (3), 255-260.
100. Svalheim, S., Sveberg, L., Mochol, M., Tauboll, E. (2015) Interactions between antiepileptic drugs and hormones. *Seizure*.
101. Krogenaes, A.K., Tauboll, E., Stien, A., Oskam, I.C., Lyche, J.L., Dahl, E. ve diğlerleri. (2008) Valproate affects reproductive endocrine function, testis diameter and some semen variables in non-epileptic adolescent goat bucks. *Theriogenology*, 70 (1), 15-26.



102. Mikkonen, K., Tapanainen, P., Pakarinen, A.J., Paivansalo, M., Isojarvi, J.I., Vainionpaa, L.K. (2004) Serum androgen levels and testicular structure during pubertal maturation in male subjects with epilepsy. *Epilepsia*, 45 (7), 769-776.
103. Sveberg Roste, L., Tauboll, E., Isojarvi, J.I., Pakarinen, A.J., Huhtaniemi, I.T., Knip, M. ve diğeri. (2002) Effects of chronic valproate treatment on reproductive endocrine hormones in female and male Wistar rats. *Reprod Toxicol*, 16 (6), 767-773.