



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL EPİLEPSİDE ÇINKONUN ROLÜ ÜZERİNE TOPİRAMAT
TEDAVİSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fusun (AK) SONAT

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2008



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL EPİLEPSİDE ÇİNKONUN ROLÜ ÜZERİNE TOPİRAMAT
TEDAVİSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fusun (AK) SONAT

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Doç. Dr. Behzat NOYAN

Bursa-2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne,

Bu tez, j¼rimiz tarafından F¼sun (AK) SONAT'ın tezi olarak kabul edilmiştir (doktora)

Adı ve Soyadı

İmza

Tez Danışmanı Doç. Dr. Behzat NOYAN

¼ye Prof. Dr. Nurbay Ateş

¼ye Prof. Dr. Fahr¼nisa Cengiz

¼ye Prof. Dr. Naciye İşbil B¼y¼kcořkun

¼ye Doç. Dr. Cenk Aydın

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunun tarih,
sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kasım ¼ZL¼K

Enstit¼ M¼d¼r¼

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	13
Deney Hayvanları.....	13
Gruplar.....	13
Elektrot İmplantasyonu ve Klavuz Kanülün Yerleştirilmesi.....	14
Nöbet Oluşturulması.....	15
Topiramet, ZnCl ₂ ve CaEDTA'nın uygulanışları.....	15
ECoG Kayıtlarının Alınması ve Davranışsal Değişikliklerin Gözlemlenmesi.....	15
TSQ Floresan Boyaması.....	16
Hematoksilen-Eozin Boyaması ve Nöron Sayımı.....	17
İstatistiksel Analiz.....	17
BULGULAR.....	18
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR.....	53
TEŞEKKÜR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	63

ÖZET

Bu çalışmada, topiramate (TPM) tedavisinin hipokampüsde çinko iyonu translokasyonu üzerine olan akut etkisinin ve nöroprotektif etkilerinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca TPM'in hipokampüsdeki çinko iyonlarına etki ederek antiepileptik etki göstermesinde bir rolünün olup olmadığı saptanmaya çalışıldı.

Deneylerde 300-350 g arasında erkek, erişkin Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Sıçanlardan elektrokortikografik (ECoG) kayıtların alınabilmesi için deneyler öncesinde tüm sıçanlara anestezi altında (thiopental sodium, 40 mg/kg, i.v.) 5 adet çelik paslanmaz vida elektrod epidural olarak yerleştirildi ve i.c.v. enjeksiyon için sol lateral ventriküllerine kanül yerleştirildi. Pilocarpin HCl enjeksiyonu (380 mg/kg i.p.) ile nöbet oluşturuldu. Pilocarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce 60 mg/kg topiramate (i.p.), CaEDTA (100 mM i.c.v.) ve ZnCl₂ (35 mg/kg i.p.) enjeksiyonları yapıldı. Aynı zamanda bu süreçte sıçanların davranışsal değişiklikleri gözlemlendi. Sıçanlar 24 saat sonunda anestezi altında dekapite edilerek hızla beyinleri çıkarıldı ve hipokampal boyamalar yapılarak hipokampüsdeki nöron hasarı ve çinko translokasyonu incelendi. Status Epilepticus (SE) insidansı, SE latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve nöbet skorları değerlendirildiğinde, TPM'in olumlu etkileri belirlendi ancak istatistiksel olarak anlam saptanmadı. TPM'in, ECoG üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Ayrıca, çinko histokimyası için yapılan hipokampal boyamada çinko translokasyonuna rastlanmadı. Hipokampüsdeki piramidal nöronlar üzerinde koruyucu etkisinin bulunmadığı gözlemlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlar 60 mg/kg dozda uygulanan TPM'in, Nöbet-TPM, Nöbet-ZnCl₂-TPM, Nöbet-CaEDTA-TPM gruplarında davranışsal değişiklikler, yaşam şansı, nöron hasarı ve elektrokortikografik bulgular üzerinde etkili olmadığını göstermektedir. TPM beyindeki çinko translokasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığından, TPM'in antiepileptik etkisi üzerine daha önce saptanmış olan yollarının yanı sıra, beyin çinko iyonları üzerine de etki ederek antiepileptik etki göstermesinde akut olarak rolü olamayacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Çinko, Topiramate, Hipokampüs, Epilepsi, Histokimyasal Boyama.

SUMMARY

TO INVESTIGATE THE EFFECT OF THE TOPIRAMATE TREATMENT ON THE ROLE OF ZINC IONS IN EXPERIMENTAL EPILEPSY

The effects of topiramate (TPM) therapy on zinc ion translocation acute effect and neuroprotective effects in hippocampus have been researched in this study. It has also been tried to explain, whether TPM has a role on antiepileptic effect by affecting the zinc ions on the hippocampus.

Adult, male Sprague-Dawley rats between 300-350 g have been used in this experiment. To receive the electrocorticographic (ECoG) data from the rats, 5 stainless steel screw electrodes have been implanted epidurally under anesthesia (thiopental sodium, 40 mg/kg, i.v.) to all of the rats and canuls have been located in the left lateral ventricles for i.c.v. injection before the experiments. Seizures have been provoked by pilokarpine-HCl injection (380 mg/kg i.p.). Ten minutes before pilocarpine-HCl injection; 60 mg/kg topiramate (i.p.), CaEDTA (100 mM i.c.v.) and ZnCl₂ (35 mg/kg i.p.) have been introduced into the groups accordingly. Concurrently, the behavioral variances of the rats have been observed during this process. By the end of 24 hours, the rats under anesthesia have been decapitated, their brains have been removed rapidly and by hippocampal staining, neuronal damage and the translocation of zinc ions have been analyzed. When the SE incidence, SE latance, 24-hour survival and the seizure scores have been analyzed, the positive effects of TPM have been confirmed but no significantly istatistical importance was determined. The positive effects of TPM in the ECoG records has not been observed. Besides, the zinc translocation has not been encountered at the hippocampal painting for the zinc hystochemistry. It has been observed that it doesn't have any protective effect on the pyramidal neurons in the hippocampus.

Our results show that, 60 mg/kg of TPM has no effect on behavioral variances, survival rate, electrocorticographic data and the neuron damage in groups of Seizure-TPM, Seizure-ZnCl₂-TPM, Seizure-CaEDTA-TPM. As the TPM has no effect on the zinc translocation in the brain, together with the previously reported paths of antiepileptic effects, we believe that

it is not going to play an acute role on showing antiepileptic affect by effecting on the brain zinc ions.

Key Words: Zinc, Topiramate, Hippocampus, Epilepsy, Histochemical Staining.

GİRİŞ

Epilepsi, beyindeki nöronların ani, aşırı ve düzensiz deşarjları sonucu meydana gelen sinir sistemi rahatsızlığıdır. Bilinç, davranış ve motor aktivitelerde önceden tahmin edilemeyen düzensizlikler görülebilmektedir (1). Epilepsi genel olarak toplumda % 1-0,5 sıklıkta görülmektedir. Yaşamın çeşitli evrelerinde görülme sıklığı değişir; 20 yaş altında ve 60 yaş üzerinde daha sık görülmektedir. Çocukluk döneminde ailevi nedenli epilepsilerin ortaya çıkması, yaşlılık döneminde ise beyin damar tıkanıklığı ya da tümörlerin görülmesine bağlı olarak sıklığı artmaktadır. Bebeklerden yaşlı insanlara kadar herkes epilepsiye yakalanabilir. Roma imparatoru J. Caesar, Napoleon Bonaparte, Büyük İskender, İngiltere Kralı 5. Charles, Dostoyevsky, Vincent Van Gogh, Agatha Christie, P. I. Tchaikovsky, Leonardo Da Vinci, Sokrates gibi çoğu ünlü kişi epilepsiliydi.

TPM geniş spektrumlu etki mekanizmasına sahip yeni kuşak bir antiepileptikdir. Sülfat içeren monosakkarid yapıda bir bileşiktir (2). 1979 yılında sentezlenen ve 1995 yılında ilk kez İngiltere’de kullanıma sunulan TPM, 1998 yılında, Amerikan Gıda ve İlaç Uygulama (Food and Drug Administration-FDA) komitesi tarafından da ruhsatlandırılmıştır. Geniş spektrumlu etki mekanizmasına sahip olması epilepsi tedavisiyle daha yüksek etkinlikle bağlantılı olduğunu düşündürmektedir (3). Hayvanlarda yapılan epilepsi çalışmalarında TPM’in deneysel olarak oluşturulan nöbetleri engellediği bildirilmektedir (4-7). Yapılan çalışmalarda TPM’in α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) reseptör antagonisti olduğu, nöron ölümüyle sonuçlanan hipoksik, iskemik durumlarda glutamatın aşırı birikimini engellediği bildirilmektedir. Aynı zamanda yeni doğan sıçan beyinde, özellikle hipokampüste fazla miktarda AMPA reseptörlerinin bulunduğu bildirilmektedir (8) Değişik reseptörler üzerindeki etkileri nedeniyle TPM hala araştırılmaktadır.

Çinko çok sayıda voltaj kapılı ve ligand kapılı iyon kanallarını etkilemektedir. Hücre membranında bulunan, çinkoya geçirgen olan bu kanallar; çinko ve kalsiyuma geçirgen voltaj kapılı kanallar, NMDA reseptör kanalları, AMPA/Kainat reseptör kanalları, GABA_A reseptör kanalları olarak saptanmıştır. Çinkonun postsinaptik nöronlara girişinin mekanizmasında bu kanallar önemli rol oynamaktadırlar.

Çalışmamız Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda deney hayvanları üzerinde yapıldı. Bu çalışmada epileptik nöbetlerde hipokampüste glutamat ile birlikte aşırı miktarda salınan ve nöronlarda eksitotoksitesi nedeniyle hücre ölümüne ve hücre kaybına neden olan çinko iyonlarıyla geniş spektrumlu bir antiepileptik ajan olan ve son yıllarda üzerinde çalışılan topiramatin antikonvulsan etkisini gösterdiği reseptörlerin aynı olmasına dayanarak, topiramatin tedavisinin çinko translokasyonu üzerine olan akut etkisinin ve nöroprotektif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Sinir sisteminin hastalıkları içinde epilepsi çeşitli özellikleri sebebiyle toplumun eskiden beri dikkatini çekmiştir (9). Epilepsi tüm dünyadaki popülasyonun % 1-0,5 ini etkileyen önemli bir sağlık problemidir (10, 11). Bu büyük kitlenin ekonomik ve toplumsal problemleri, eğitimleri ve çalışmalarıyla ilgili problemler konunun tıbbi yönü kadar önemlidir (9).

Merkezi sinir sisteminde nöron popülasyonunun bozuk, senkron ve ritmik deşarjlarına bağlı geçici davranış değişikliklerine nöbet denir. Epilepsi ise beyinde ani, anormal, senkronize ve aşırı miktarda elektriksel deşarjlar sonucu meydana gelen yani nöbetlerin periyodik ve tahmin edilemeyen tekrarlanmalarıyla karakterize olan beyin fonksiyonlarındaki bozukluktur (12, 13). Tekrarlayıcı nöbetler şeklinde seyreden bu tabloya fokal ve/veya jeneralize kasılmalar, duyu ve hareket bozuklukları ve bazen bilinç kaybı eşlik eder (14). Epileptik nöbetler bilinç kaybının bulunduğu tonik klonik kas kasılmaları ya da duyu ve düşünce bozuklukları gibi birçok şekilde ortaya çıkabilir (15).

Herhangi bir epileptik nöbetin merkezi sinir sistemi ile ilgili olduğu Hipokrat'tan bu yana bilinmektedir. Nöbetler genetik bozukluklar, yapısal, fonksiyonel ve metabolik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilir. Epilepsilerin çoğunda sebep olan bir patoloji (tümör, kist, glioskleroz, vasküler anomali vb.) gösterilebilmektedir (9).

Epileptik nöbetlerin patofizyolojisi her zaman tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca tüm epilepsi nöbetlerinde aynı patofizyoloji geçerli değildir. Epilepsi doğuran gliosisli hücreler, hücre dışı K^+ iyonlarını tamponlama kabiliyetleri bozulduğundan, hücre dışında K^+ iyon artışına yol açarak nöronların uyarılabilme eşiğinin düşmesine ve epilepsi nöbetlerinin oluşmasına yol açar. Ayrıca epileptojenik bölgelerde $Na^+K^+/ATPaz$ aktivitesinin azalması nedeniyle hücre dışı K^+ iyon konsantrasyonu artar. Bu şekilde nöronlar uyarılarak, deşarjların oluşması ve yayılması kolaylaşır (16).

Kısaca özetlemek gerekirse fizyopatolojide 3 mekanizma önemlidir.

- A) Gliaların (özellikle astrositlerin) fonksiyonunda bozulma
- B) Glutamat gibi eksitator aminoasitlerde artma
- C) Başta γ -aminobutirik asit (GABA) olmak üzere inhibitör aminoasitlerde azalma

Bu mekanizmalar sonucunda nöronların membran potansiyelleri bozulmakta, bu nöronlar normalden daha kolay depolarize olmakta, bir başka deyişle nöronda deşarj ve eksitasyon eşiği düşmektedir. İnhibitör bir nörotransmitter olan GABA' nın azalması da, epileptik nöronlar üzerindeki sinaptik inhibisyonun kalkmasına ve daha kolay eksite olmalarına yol açmaktadır (16).

Etyoloji

Konjenital bozukluklar: Gyrus anomalileri, korpus kallosum agenezisi, kortikal disgenезis gibi değişik kongenital malformasyonlar

Kafa travmaları: Doğum travmasından başlayarak her yaşta geçirilen kafa travmaları epilepsi etyolojisi yönünden önemlidir. Özellikle ağır kafa travmaları ve bunlara bağlı fraktürler, hematomlar, kommasyo ve kontüzyo serebri gibi durumlar önemlidir.

Enfeksiyonlar: İntrauterin enfeksiyonlar, her yaşta geçirilen menenjit ve ensefalitler, kronik ve ağır otitis media

Kitle lezyonları: Beynin primer ve metastatik tümörleri, abse ve kistler; buldukları yere, türüne ve büyüklüğüne bağlı olarak epilepsiyeye neden olabilirler.

Metabolik bozukluklar: Hipoglisemi, hiperglisemi, hiponatremi veya diğer elektrolit bozuklukları, hepatik ensefalopati

Toksik durumlar: Karbonmonoksit, kurşun, alkol, talyum, ve çeşitli ilaç entoksikasyonları

Vasküler lezyonlar: Arter-ven malformasyonları, anevrizmalar. Genç yaştaki epilepsilerde serebrovasküler hastalıklar (enfarkt veya kanamalar)

Dejeneratif ve demiyelinize hastalıklar: Özellikle çocukluk yaşındaki epilepsilerde önemlidir.

Sistemik hastalıklar: Malign hipertansiyon

Merkezi sinir sisteminde inhibisyon yapan maddelerin ani kesilmesi (alkol, morfin, hipnotik ilaçlar, vb.)

Yüksek doz fenotiazinler, nöroleptikler, trisiklik antidepresanlar (17).

Bunlar dışında genetik yatkınlıktan başka bir neden gösterilemeyen epilepsiler de vardır (idiyopatik epilepsiler). Anne ve babadan birinin epileptik olması durumunda çocuk için bu oran 1/40 tır, her ikisinde de epilepsi varsa çocukta aynı oran 1/4 e yükselir (18).

“Uluslar arası Epilepsi ile Savaş Derneği” (ILAE) 1989 yılında epileptik nöbetlerdeki farklılıkları, etyolojik faktörleri, yaş faktörünü, nöbet tipini, nöbeti uyaran faktörleri ve EEG bulgularını göz önüne alarak epileptik sendromlar için bir sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırma aşağıdaki gibidir.

I. Parsiyel (Lokal, Fokal) Nöbetler

A. Basit Parsiyel Nöbetler: (Bilinç bozukluğu yoktur) (%20)

1. Motor Semptomlu Nöbetler (Örneğin temporal lob epilepsisi bu sınıftadır)
2. Somatosensoriyel veya özel duyuusal semptomlu nöbetler
3. Otonomik semptom veya bulguları olan nöbetler
4. Psikişik semptomlu nöbetler

B. Kompleks Parsiyel Nöbetler (Bilinç bulanıklığı vardır) (%40)

1. Basit parsiyel başlangıcı bilinç bulanıklığının izlediği nöbet
2. Başlangıçtan itibaren bilinç bulanıklığı olan nöbet

C. Sekonder Jeneralize Olan Parsiyel Nöbetler

1. Basit parsiyel şeklinde başlayıp jeneralize olan nöbetler
2. Kompleks parsiyel şeklinde başlayıp jeneralize olan nöbetler
3. Basit parsiyel şeklinde başlayıp, kompleks parsiyeye dönüşüp jeneralize olan nöbetler

II. Jeneralize Nöbetler

- a. Absans Nöbetler (Petit – mal) (%10)
- b. Miyoklonik Nöbetler
- c. Klonik Nöbetler
- d. Tonik Nöbetler
- e. Tonik – Klonik Nöbetler (Grand – mal) (%20)
- f. Atonik Nöbetler

III. Sınıflandırılmayan Epileptik Nöbetler

- a. Febril Nöbetler
- b. Status Epileptikus
- c. Akut Metabolik ya da Toksik Nedenlere Bağlı Nöbetler (19)

Jeneralize nöbetler; her iki hemisferden eş zamanlı kaynaklanan, parsiyel nöbetler ise serebral hemisferin herhangi bir bölgesinden kaynaklanan nöbetlerdir.

Parsiyel (fokal) Nöbetler; Bir serebral hemisferin lokal bir bölgesindeki nöronların deşarjları sonucu ortaya çıkan, klinik ve elektroensefalografik bulgusu anatomik lokalizasyonla ilgili olan nöbetlerdir. Nöbet sırasında bilinç kaybı olup olmamasına göre ikiye ayrılır. Parsiyel bir nöbet yayılmadan sona erebilir, korteksin diğer bölgelerine yayılabilir veya deşarjlar yaygınlaşarak tonik-klonik nöbete dönüşebilir.

Basit parsiyel nöbetler; el ve ayak başparmağı ya da ağız kenarında istemsiz hareket şeklinde başlar. İstemsiz hareketler sonra yayılarak kola, bacağa ve yüze yürür. Bilinç kaybı yoktur.

Kompleks parsiyel nöbetleri basit parsiyel nöbetlerden ayıran en önemli özellik nöbet sırasında bilinç kaybı olmasıdır. Hastalar nöbeti hatırlamaz. Kompleks parsiyel nöbetlerin çoğu temporal lob kaynaklı, daha seyrek olarak da frontal lob kökenli olabilirler. Kompleks parsiyel nöbetlerin süresi 30 sn. ile birkaç dakika arasında değişebilir. Bilinç bulanıklığı ile birlikte psikomotor otomatizm görülür. Otomatizm bilincin bulanması sırasında ortaya çıkan az veya çok koordine istemsiz hareketlerdir. Otomatik hareketler sırasında hasta ayakta durmaya veya yürümeye devam edebilir. Postural fonksiyonlar genellikle iyi korunmuştur.

Absans Nöbetler; 3 yaşından büyük çocuklarda görülür, pubertede sona erer veya sıklığı azalır. Birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişen nöbetler görülür. Başlangıç anidir, yapılmakta olan aktivite aniden durur, hasta boş bakışla hareketsiz kalır, gözler kayabilir, sorulara cevap vermez, postural tonus korunduğu için düşme olmaz.

Miyoklonik Nöbetler; Kas gruplarının istem dışı, ani, hızlı kasılmaları söz konusudur. Aslında normal kişilerde de ani ses veya ışık uyararı ile veya uykuya dalarken ortaya çıkan sıçramalar bir tür miyoklonik kasılmalardır. Ekstremitelerde özellikle üst ektremitede ani, çok kısa süreli fleksiyon veya ekstansiyon şeklinde kasılmalar ile karakterizedir.

Atonik Nöbetler; Ani tonus kaybı sonucu dizler bükülür, ani düşmeler olur.

Tonik-Klonik Nöbetler; Grand-mal nöbet olarak da adlandırılmaktadır. Bu tür nöbetlerde hasta konvülsiyon geçirir. En ağır ve en çok bilinen nöbet tipidir. Nöbetlerde önce sinirlilik, baş dönmesi, baş ağrısı, istemsiz kas seğirmesi gibi belirtiler görülebilir. Nöbetin başlaması ile tüm çizgili kasların ani kasılması sonucu hasta yere düşer, bazı hastalar çılglık atar, çoğu kez dişlerini sıkar, dilini ve dudağını ısırabilir, solunum durduğundan siyanoz oluşabilir. Tonik faz 10–20 saniye sürdükten sonra 40–60 saniye süren klonik faz başlar. İstemsiz çekilme hareketleri, salivasyon veya köpük gelmesi meydana gelir. İdrar ve daha

seyrek olarak da gayta inkontinansı görülebilir. Klonik kasılmaların bitmesinden sonra hasta derin bir uykuya dalabilir veya kontüzyon görülebilir.

Tonik Nöbetler; Hasta, saniyeler süren opistotonus postürü alır. Gözler genellikle yukarı kayar ve siyanoz görülebilir. Daha çok çocukluk çağı epilepsilerinde ve uykuda ortaya çıkarlar.

Klonik Nöbetler; Bazen vücudun bir yarısında bir veya iki ekstremitede fokal kasılmalar kalabilir. Ardı sıra fokal sıçramalar şeklinde olabilir. Bu nöbetler de çocuklarda daha sık görülür (16, 17, 20).

Antikonvulzanlar, merkezi sinir sistemini seçici olarak deprese eden ilaçlardır. Bu ilaçlar esas olarak merkezi sinir sistemine zarar vermeden ve solunumu deprese etmeden epileptik nöbetlerin baskılanması için kullanılırlar (21). Hastaların % 75–80 inde etkilidirler.

Epilepsinin semptomatik tedavisi amacıyla kullanılan antiepileptik ilaçlar, motor uyarılabilirliğini etkilemeden nöbet şuur eşiğini arttırmaktadır. İlaç seçim ve doz denetimi EEG sonuçları incelenerek ve nöbet sıklığı göz önünde tutularak yapılmaktadır.

Antiepileptiklerin nöbetleri nasıl önlediği konusunda çeşitli görüşler vardır. Genellikle sinapslardaki iletimi engellemek suretiyle yüksek frekanslı düzensiz deşarjların yayılmasını bloke ederek nöbet oluşumunu engelledikleri sanılmaktadır. Antiepileptik ilaçların bu nöronal etkinliklerini eksitasyon eşiğini yükselterek, refrakter periyodu uzatarak, presinaptik ve postsinaptik inhibisyonu potansiyalize ederek yaptıkları düşünülmektedir. Çeşitli araştırmacılar antiepileptiklerin bu etkilerin çoğunu beyinde GABA etkinliğini farklı şekilde arttırmalarına bağlamaktadırlar (21-24). Ayrıca N–metil–D–aspartat (NMDA), AMPA/Kainik asit (KA) gibi glutamat reseptörlerinin blokajı ve glutamat, aspartat gibi epileptik nöbet sırasında aşırı aktif olan aminoasit salınımının inhibisyonu da antiepileptik ilaçların etki mekanizmalarındandır (21, 22, 24). Bazı antikonvulzanlar da etkilerini Na^+ ve K^+ kanallarının voltaj aktivitesini direkt veya indirekt değiştirerek gösterirler (21, 22, 24, 25).

Antiepileptik ilaçların etki mekanizmalarını incelerken uyarıyı azaltan ilaçların, inhibisyonu artıran ilaçların ve hücre uyarılabilirliğini modifiye eden ilaçların etki mekanizmalarını ayrı ayrı incelemek gerekir.

1. Uyarıyı Azaltan Antiepileptik İlaçlar

Bu grup ilaçların etki mekanizması uyarılan aminoasit reseptörlerinin blokajı ve uyarılmış glutamat, aspartat gibi epileptik nöbet sırasında aşırı aktif olan aminoasit salınımının inhibisyonu ile açıklanmaktadır (21, 22, 24). NMDA glutamat reseptörlerinin aracılık ettiği sinaptik uyarı blokajı, antikonvülzan ilaç geliştirilmesinde önemlidir. Çünkü NMDA reseptörleri epilepsinin oluşum mekanizmasında birçok alanda rol oynamaktadır. NMDA antagonistleri geniş bir antikonvülzan aktivite spektrumu gösterirler. Fakat epilepsi tedavisinde kullanılmaları öğrenme, hafızada bozulma ve duyuşsal iletimin değiştirildiği motor bozulmayı içeren yan etkilerden dolayı güvenilir değildirler.

2. İnhibisyonu Arttıran Antiepileptik İlaçlar

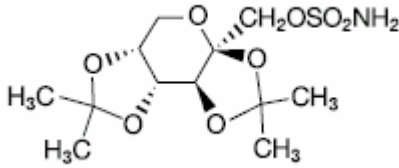
Bu ilaçlar ya GABA_A reseptörü klorür kanal kompleksini indükleyerek ya da sinaptik aralıkta GABA_A nın bulunma olasılığını arttıracak etki gösterirler. Fenobarbütal gibi barbitüratlar ve klobazom gibi benzodiazepinler bu şekilde etkilidirler. Etkilerini GABA' nın sinaptik aralıkta bulunmasının artırılması, onun salıverilmesinin sağlanması veya katabolizmasının ve/veya geri emiliminin inhibe edilmesiyle göstermektedirler. Beyindeki inhibisyon, ilaçların beyne intraventrikuler verilmesi sonucu bu ilaçların ya GABA' ya dönüşmesiyle veya GABA_A reseptör agonist aktivitesi yaratabilecek bileşiklere dönüşmesiyle gerçekleşmektedir. Bir diğer olasılık da GABA endojen analogları olan glisin verilmesidir. GABA kan-beyin bariyerini aşamazken bu tip analogları GABA' nın ön ilacı gibi davranarak bu engeli kolaylıkla aşabilirler. Daha sonra GABA' ya dönüşürler. Bir diğer önemli olay ise GABA katabolik enzimi olan GABA aminotransferazın inhibisyonudur. Örneğin vigabatrin yeni bir antikonvülzan maddedir ve oluşturduğu mediyatör bu katabolik enzime bağlanarak onu inaktif hale geçirir. Bu ilaç nöbet kontrolünde oldukça etkindir. Diğer önemli yol da GABA' nın glia ve nöronlara geri emiliminin bloke edilmesidir. Bir antikonvülzan olan tiagabin GABA geri emilimini inhibe ederek etkisini bu yolla gösterir.

3. Hücre Uyarılabilirliğini Değiştiren İlaçlar

Bu gruptaki ilaçlar antikonvülzan etkilerini Na⁺ ve K⁺ kanallarının voltaj aktivitesini direkt veya indirekt değiştirerek gösterirler. Fakat bu gruptaki bileşikler kan-beyin bariyerini

geçemedikleri için etkin bölgelere ulaşamaz ve aktiviteleri, dolayısıyla kullanımları kısıtlıdır. Bu ilaçlara örnek okskarbezepin, zonisamit, denzimol, ralitolin ve flunarizin verilebilir. Valproik asit tipi ilaçların da gösterdiği antikonvülzan aktivitenin talamik nöronlarda bulunan Ca^{++} kanallarının inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (21, 22, 24, 25).

Yeni antiepileptik ilaçlardan biri olan TPM [2,3:4,5-bis-O-(1-methylethylidene) b-D-fuructopyranose sulfamate] ($C_{12}H_{21}NO_8S$) hem deneysel (5, 6) hem de klinik çalışmalarda (26) geniş spektrumlu antiepileptik aktiviteye ve nöroprotektif etkiye sahip bir bileşiktir (Şekil-1). Doğal monosakkarit D-fruktozun sülfamat içeren bir türevi yani karbonhidrat derivatı olan topiramet, hücresel düzeyde yaygın farmakodinamik etkiler göstermesi nedeni ile diğer antiepileptik ilaçlardan farklı bir yapıya sahiptir



Şekil-1: [2,3:4,5-bis-O-(1-methylethylidene) b-D-fuructopyranose sulfamate]

TPM 'ın basit veya kompleks parsiyal nöbetlere ve generalize tonik-klonik nöbetlere karşı hem çocuklarda hem de erişkinlerde etkili olduğu bildirilmektedir (27).

TPM' in antiepileptik etkisi in vivo yapılan çeşitli nöbet modellerinde; maksimal elektroşokla oluşturulan modelde, sıçanlarda ve farelerdeki genetik nöbet modellerinde, kindling modelinde, hipokside veya vurma, çarpmanın neden olduğu çeşitli epilepsi modellerinde gösterilmiştir.

1979 yılında sentezlenen ve 1995 yılında ilk kez İngiltere'de kullanıma sunulan TPM, 1998 yılında erişkinler ve 2-16 yaş arası çocuk hastalarda kısmi başlangıçlı veya birincil jeneralize tonik - klonik nöbetlerin tedavisinde kullanılmak üzere, Amerikan Gıda ve İlaç Uygulama (Food and Drug Administration-FDA) komitesi tarafından ruhsatlandırılmıştır. TPM'in farmakodinamikleri ile ilgili yayınlar, diğer antikonvülzan ilaçlara göre daha geniş spektrumlu bir reseptör afinitesi olduğunu göstermektedir. Bu geniş spektrumun epilepsi tedavisinde daha yüksek etkinlikle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (3).

TPM' in antikonvülzan etki göstermesinde birden fazla etki mekanizması vardır.

Bunlar kısaca şöyle özetlenebilir;

1- Diğer antikonvülzanlara benzer şekilde voltaj duyarlı Na^+ kapılarını bloke ederek epileptiform deşarjların süresini ve her deşarjda ortaya çıkan aksiyon potansiyellerini azaltır.

2- γ – aminobütirik asit tip A ($GABA_A$) reseptörünün düzenlediği klor akışını artırır yani $GABA_A$ reseptör üzerine düzenleyici etkisi vardır. Genellikle GABA aktivitesini güçlendirir.

3- Sadece TPM' a özgü olduğu öne sürülen bir özellik olarak glutamat reseptör alt tiplerinden Kainat ve AMPA reseptörlerini bloke eder. Ancak NMDA reseptörleri üzerinde anlamlı etkisi yoktur.

4- Nöronal uyarılabilirliğin kontrolünde rol oynadığı bilinen Ca^{++} kanalları üzerinde düzenleyici etkisi vardır. Yüksek voltajla aktive olan Ca^{++} kanallarında negatif modülasyon sağlar yani Ca^{++} akışını azaltır.

5- K^+ kanallarını aktive eder.

6- Sinir uçlarından glutamat ve aspartat gibi eksitator aminoasit salınımını inhibe eder (3, 5, 28-39).

TPM'in diğer antikonvülzan ilaçlara göre yarılanma ömrünün daha uzun ve daha güvenilir olması yönüyle daha avantajlı olduğu vurgulanmaktadır (36). TPM'in nöroprotektif etkisi; mitokondriyal kalsiyum taşıyıcıları üzerine inhibitör etkisinden ve mitokondriyal geçirgen porlar üzerine inhibitör etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (29). Mitokondride sitozolik kalsiyumun aşırı birikiminin hücre ölümüne neden olduğu bildirilmektedir. Topiramatin etkisiyle kalsiyum oranı düşerek nöronların korunduğu ve nöbetlerin baskılandığı düşünülmektedir. Yüksek kalsiyum konsantrasyonunun neden olduğu mitokondri membran depolarizasyonuna karşı TPM'in koruyucu olduğu bildirilmektedir (29). Ayrıca glutamat ve aspartat salınım inhibitörü olması nedeniyle de nöroprotektif olduğu ileri sürülmektedir (38).

Topiramatin, gıdalardan bağımsız olarak hızlıca ve hemen hemen tamamı absorbe edilmektedir (3, 40). Tek dozdan yaklaşık 2 saat sonra zirve plazma konsantrasyonlarına erişilir. Emilimi dozla doğrusal olarak orantılıdır. Dolayısıyla doz arttıkça plazma yoğunluğu da artmaktadır (3). Çoğunlukla değişikliğe uğramamış şekilde TPM ve metabolitlerinin idrarla atıldığı (3, 40), TPM'in aktif metabolitinin bulunmadığı, plazma ortalama yarılanma

ömrünün 19–23 saat olduğu ileri sürülmektedir (3). TPM plazma proteinlerine düşük oranda (% 9–17) bağlanması nedeniyle diğer ilaçlarla etkileşme olasılığının az olduğu bildirilmektedir.

Beyindeki çinko iyonları ilk olarak 1943 yılında, radyoaktif çinko (^{65}Zn) kullanılarak Sheline ve arkadaşları tarafından köpek ve farelerde rapor edilerek saptanmıştır (41). Hu ve Friede 1968 yılında, insan beyninin 24 bölgesinde çinkoyu atomik absorpsiyon spektroskopisi yöntemiyle ilk kez ölçmüşlerdir. Hipokampusdaki konsantrasyonunun en yüksek olduğunu ve yeni doğanın beyindeki çinkonun yetişkinlere göre daha düşük olduğunu saptamışlardır. Çinko ağır metal olup iki değerli bir katyondur (42). Yaşayan hücrelerde en bol bulunan oligoelementlerden biridir (43). Vücutta en yaygın bulunan ikinci eser elementtir ve memeli beyinde büyük miktarda bulunur. Çinko beyin olgunlaşması ve fonksiyonları için gereklidir (44). Yapılan çalışmalarda akut çinko eksikliğinin deney hayvanları ve insanlarda beyin fonksiyonlarını olumsuz etkilediği, erken beyin gelişimi sırasında deney hayvanlarında malformasyonlara neden olduğu, beyin gelişiminin geç dönemlerinde ise mikroskobik anormalliklere ve sonradan gelen fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bulunmuştur (41). Bütün dokularda çoğu enzimlerin sentezi için esansiyel olmasına rağmen beyindeki çinkonun diğer özelliği presinaptik terminallerdeki veziküler lokalizasyonudur (45). Hipokampus ve amigdala bölgeleri yüksek yoğunlukta çinko içeren nöron terminallerine sahiptir (46). Hipokampal mossy fiber'ların dev boutonlarındaki veziküllerde çinko konsantrasyonu yaklaşık $300\ \mu\text{M}$ 'dir. (47). Bu $300\ \mu\text{M}$ 'lık miktar tüm vücut hücrelerinde bulunandan daha yüksektir. Beyinde en yüksek yoğunlukta çinko içeren bölge hipokampusdur. Çinko hipokampusda, dentat girusdaki granüler hücrelerin uzantıları olan mossy fiber'larda yoğunlaşmıştır (42, 48, 49).

Beyindeki toplam çinkonun yaklaşık % 10'u glutamaterjik nöronların sinaptik vezikülleri içinde bulunurken, % 90 civarı ise metalloproteinler tarafından tutulur (44). Bu metal bağlayan proteinlere sıkıca bağlı olan metabolik çinkonun aksine veziküler çinko serbesttir veya zayıfca bağlıdır. Bu yüzden sinaptik veziküllerdeki çinko, seçici floresan boyamalar veya Danscher boyama (50) yöntemleriyle saptanabilmektedir, yani histokimyasal açıdan reaksiyon veren veziküler çinkodur (50-58). Veziküler çinkonun memeli beyinde sinaptik nörotransmisyonunda rol oynadığı ve NMDA, AMPA/Kainat, GABA reseptörleri gibi birkaç önemli reseptörün endojen nöromodülatörü olduğu düşünülmektedir (45, 48, 59).

Epilepsi, iskemi, kafa travması gibi akut durumlarda presinaptik veziküllerden salınan aşırı miktarda çinko, postsinaptik nöronlara girdiği zaman toksik etki göstererek, nöronların hasarlanmasına veya ölümüne neden olmaktadır (3, 41, 60-64). Çinko iyonlarının nöron membranlarını yırtarak, direkt olarak nöronları öldürebildiği gibi indirekt olarak intrakranyal basıncın artışı, beyin ödemi ve iskemi yoluyla da nöronların ölümüne sebep olabildikleri bildirilmiştir (60). Çinkonun glutamat ile beraber salınımı NMDA, AMPA/Kainat reseptörlerinin aktivasyonu ve eksitasyon ile ilişkilidir. Veziküler çinkonun glutamat ile beraber travma, epilepsi gibi durumlardan sonra salınımı şaşırtıcı değildir. Ancak ilginç olan fizyolojik olarak çok düşük dozlarda çinko (1–10 µM) NMDA kanal aktivasyonunu antagonize eder (65, 66) ve bu nedenle hem antikonvülzan (67, 68) hem de nöroprotektifdir (69). Bununla beraber çinko çok yüksek dozda salındığı zaman bu nöroprotektif etki ortadan kalkıp, NMDA, AMPA/Kainat aktivasyonu yoluyla nörotoksik bir hal alır (70-73).

Son zamanlarda yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda, fizyolojik olarak çinkonun mossy fiber'lerden salınımı, CA3 bölgesindeki piramidal nöronlar üzerinde NMDA reseptörlerinin inhibisyonunu sağladığı, böylece nöbet aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (45, 74). Yetişkin beyninde çinkonun GABA salınımını arttırdığı bulunmuştur (59, 75). Yapılan bir çalışmada hipokampal CA3 bölgesinde eksojen çinkonun nörotransmitter salınımı üzerine etkisi incelenmiştir. Hipokampüse 10–300 µM ZnCl₂ verilmiştir. Sonuçta çinko ilavesi ile glutamat seviyesinde azalma, GABA seviyesinde ise artma saptanmıştır. GABA seviyesindeki bu artışın CA3 bölgesindeki AMPA/Kainat reseptörlerinin inhibe edilmesi yoluyla olduğu düşünülmektedir. Bir çinko şelatörü olan CaEDTA ile çinkonun şelasyonu sonucu GABA seviyesinde düşüş, glutamat seviyesinde ise artış saptanmıştır (44). Yapılan başka bir çalışmada ise intraventriküler CaEDTA enjeksiyonu ile çinko şelasyonu sonucu hipokampusdeki nöronal hasarın ve ölümün yavaşladığı saptanmıştır (60, 76).

Çinko içeren bütün presinaptik veziküller glutamaterjiktir. Bu ilişki çinkonun, glutamatın depolanması, salınımı veya glutamat reseptörlerinin modülasyonunda önemine dikkat çekmektedir (77).

Çinkonun veziküller içinde birikmesini sağlayan Zinc-Transporter 3 (ZnT-3) olarak isimlendirilen çinkoya özel, taşıma sağlayan bir proteindir. Bu ZnT-3 ler nöronların veziküllerinin membranları üzerine lokalize olmuşlardır (78, 79). ZnT-3 proteininin

immunohistokimyasal lokalizasyonu sayesinde çinko iyonlarını içeren nöronlar belirlenebilmektedirler (77).

Çinko çok sayıda voltaj kapılı ve ligand kapılı iyon kanallarını etkilemektedir. Hücre membranında bulunan, çinkoya geçirgen olan bu kanallar; çinko ve kalsiyuma geçirgen voltaj kapılı kanallar, NMDA reseptör kanalları, AMPA/Kainat reseptör kanalları, GABA_A reseptör kanalları olarak saptanmıştır (41, 42, 77). Çinkonun postsinaptik nöronlara girişinin mekanizmasında bu kanallar önemli rol oynamaktadırlar.

Bu çalışmada çinko iyonları ile TPM'in etkilediği reseptörlerin aynı olmasına (NMDA, AMPA/KA, GABA_A) dayanılarak, pilokarpınle oluşturulan deneysel epilepside, akut TPM tedavisinin, çinko translokasyonu üzerine olan etkisinin ve nöroprotektif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlarla ilgili bütün prosedürler Uludağ Üniversitesi Etik Kurulundan, 08.06.2005 tarihindeki toplantıda, 08.06.2005/3 karar numarası ile onay alındıktan sonra ve etik kurallar çerçevesinde uygulanmıştır.

Deney Hayvanları

Çalışma U. Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Elektrofizyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada erişkin, erkek, 300-350 g ağırlığında 70 adet Sprague-Dawley ırkı sıçan kullanıldı. Hayvanlar Uludağ Üniversitesi, Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden (Bursa Türkiye) temin edildi. Aydınlatması 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık (07:00-19:00), nemi % 60, sıcaklığı 18-22 °C arasında sabit olan bir odada, yem ve su alımları serbest bırakılarak barındırıldılar. Standart sıçan diyeti ile beslendiler. Beş tanesi bir kafeste olacak şekilde tutuldular.

Gruplar

Çalışma, deneysel epilepside TPM'in beklenen antikonvulsan etkisinin, nöbetlerde aşırı miktarda salınan çinkoyu etkileyip etkilemediğini gözlemlemek amacı için yapıldığından, deney gruplarında pilokarpın HCl enjeksiyonları yapıldı ve TPM tedavisi ile birlikte çinko

veya çinko şelatörü verildi. CaEDTA'nın çinko iyonlarını bağladığı ve ZnCl₂'ün de bir çinko kaynağı olduğu bilindiğinden, bu koşullar altında topiramatin çinko üzerine etkisinin araştırılabilmesi için çalışma şu gruplardan oluşturuldu;

- 1) Kontrol (Naif) Grubu (n=10) : NaCl enjekte (% 0.9, i.p.) edilen grup.
- 2) Nöbet-Kontrol Grubu (n=10): Pilokarpin HCl enjeksiyonu (380 mg/kg i.p.) ile nöbet oluşturulan grup.
- 3) Nöbet + TPM Tedavili Grup (n=10): Pilokarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce topiramet (60 mg/kg, i.p.) verilen grup.
- 4) Nöbet + TPM + CaEDTA Grubu (n=10): Pilokarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce topiramet ve CaEDTA (100 mM i.c.v.) enjeksiyonu yapılan grup.
- 5) Nöbet + TPM + ZnCl₂ Grubu (n=10): Pilokarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce topiramet ve ZnCl₂ (35 mg/kg i.p.) enjeksiyonu yapılan grup.
- 6) Nöbet + CaEDTA Grubu (n=10): Pilokarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce CaEDTA (100 mM i.c.v.) enjeksiyonu yapılan grup.
- 7) Nöbet + ZnCl₂ Grubu (n=10): Pilokarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce ZnCl₂ (35 mg/kg i.p.) enjeksiyonu yapılan grup.

Elektrod İmplantasyonu ve Klavuz Kanulün Yerleştirilmesi

Sıçanlar thiopental sodium (40 mg/kg, i.v.) (Pentothal Sodium-Abott) ile anesteziye alındı. Kafatası stereotaksik alet yardımıyla, koordinatlar göz önünde bulundurularak drill yardımıyla delindi. ECoG kayıtların alınabilmesi için 4 adet çelik paslanmaz vida elektrod epidural olarak yerleştirildi (fronto-parietal elektrodlar, bregmanın 2 mm anterior ve 2 mm posteriorüne ve orta hattın her iki tarafta 2 mm lateraline; 80). Nazal kemik üzerine yerleştirilen bir elektrod referans elektrod olarak kullanıldı. Bütün elektrotlar kafatasına dışı akriliği (Ketac Molar Easymix, 3M ESPE, Türkiye) ile sabitlendi. Lokal antibiyotik (Furacin Soluble Dressing, Eczacıbaşı, Türkiye) ve ağrı kesici (Xylocaine Pump Spray, AstraZeneca, Sweden) uygulanarak deri kapatıldı. Sıçanlar plexiglas kafesler içerisinde bireysel olarak barındırıldı. Deneylere cerrahi işlemlerden 1 hafta sonra başlandı.

CaEDTA'nın intraserebroventriküler verilebilmesi için stereotaksik koordinatlar göz önüne alınarak (Bregma'nın 1,5 mm sol laterali ve 1 mm posteriorü, 4,0-4,2 mm derinlik)

sıçanların kafatasına bir kanül yerleştirildi ve enjeksiyonlar (10 µl CaEDTA) Hamilton mikroenjektörü yolu ile yapıldı.

Nöbet Oluşturulması

380 mg/kg dozda pilokarpin HCl (i.p.; Sigma-Aldrich, United Kingdom) enjeksiyonu ile nöbet oluşturularak hayvanlar status epileptikusa sokuldu. Bu tek ve yüksek doz pilokarpin enjeksiyonu hayvanlarda yüksek oranda tonik-klonik nöbetlerin oluşmasına neden oldu. Bu model seçimi literatur bilgisine dayanılarak yapıldı. Pilokarpin distile su ile 0.5 ml lik bir hacimde sulandırılarak uygulandı. Çalışmamızda TPM'in akut etkilerinin gösterilebilmesi için Pilokarpin HCl enjeksiyonundan 120 dakika sonra Diazepam (DZP), (20 mg/kg, i.p., Deva, Türkiye) verilerek nöbetler durduruldu. Nöbetlerde periferik yan etkilerin azaltılması için pilokarpin HCl verilmeden 30 dk. önce metil-scopolamine (1 mg/kg, s.c.; Sigma-Aldrich, Germany) enjeksiyonu yapıldı. Skopolamin distile su ile 0.5 ml lik bir hacimde sulandırılarak uygulandı.

Topiramet, ZnCl₂ ve CaEDTA'nın Uygulanışları

TPM (i.p., Sigma-Aldrich, Germany), pH 8 deki % 0.9 luk distile su ile ılık su (40-60 °C) banyosunda çözülünceye kadar tutularak enjeksiyona hazırlandı. Topirametin verilış yolunun i.p. olarak tercih edilmesinin nedeni, daha hızlı emilerek daha çabuk etkisini göstermesidir. Pilokarpin ile oluşturulan epilepsi modeli ve TPM çalışmalarında literatürde, 60 mg/kg sık kullanılan bir doz olduğu için, bizde bu dozu kullanmayı tercih ettik.

ZnCl₂ (i.p.; Sigma-Aldrich, USA) distile su ile 0.5 ml hacimde sulandırılarak, CaEDTA ise (i.c.v.; Sigma-Aldrich, Germany) distile su ile 10 µl hacimde sulandırılarak uygulandılar.

ECoG Kayıtlarının Alınması ve Davranışsal Değişikliklerin Gözlemlenmesi

Tüm hayvanların ECoG kayıtları MP100 data acquisition and analysis system (Biopac Systems, Inc.) kullanılarak alınmıştır. Sıçanların kafatası üzerine yerleştirilmiş vida elektrotlardan gelen sinyaller 4 kanal olarak kayıt edildi. Kayıtlar nöbet öncesi, nöbet sırası, DZP ile nöbet durdurulduktan sonra ve 24 saat sonrasında alındı. Pilokarpin HCl

enjeksiyonundan 120 dakika sonrasına kadar hayvanların davranışsal değişiklikleri gözlemlenerek Tablo 1'deki Racine (81) skalasına göre skorlandırıldı.

Tablo 1: Sıçanlarda gözlemlenen davranışsal bulguların skorlandırılması

Skor	Davranışsal Bulgular
0	Hareketsiz
1	Fasial otomatizmalar
2	Baş sallama
3	Unilateral veya bilateral ön ekstremite klonusu
4	Bilateral ön ekstremite klonusu ve ayağa kalkma
5	Ayağa kalkma, düşme, yuvarlanma, jeneralize konvulsiyonlar ve status epileptikus

Nöbet şiddetleri bu şekilde değerlendirilmiş olan hayvanlar ayrıca status epileptikusa girme oranı, nöbet latansı ve 24 saatlik yaşam şansı açısından da değerlendirildi.

Sıçanların 24 saat sonunda anestezi altında dekapite edilerek hızla beyinleri çıkarıldı. Hipokampal boyamalar için sol hemisfer izole edildi, horizontal olarak ventral ve dorsal iki parçaya ayrıldı. Parçalar CO₂ gazı ile donduruldu ve -80° C de saklandı. Dorsal parçadan alınan kesitlerde N-(6-methoxy-8-quinoly)-para-toluenesulfonamide (TSQ) (Invitrogen Co., USA) boyaması yapılarak hipokampüste çinko floresanı ve yeri tespit edildi. Ventral parçadan alınan histolojik kesitlerde ise hematoksilin-eozin boyaması yapılarak hipokampüste CA3 ve CA1 alanlarındaki piramidal nöronların sayısı saptanarak nöron hasarının olup olmadığı tesbit edildi.

TSQ Floresan Boyaması

Çinkonun floresan görünümü için -80° C de saklanan dorsal beyin parçalarından kryostat yardımıyla -25° C de 10 µm kalınlığında frozen kesitler alındı ve kesitlerde TSQ boyaması yapıldı. Kesitler 1 dakika boyunca TSQ (4,5 µM) solüsyonunda (140 mM sodyum barbutal (Merck, Germany) ve 140 mM sodyum asetat (Sigma-Aldrich, Japan) tamponunda) bekletildi. Sonrasında 1 dk boyunca serum fizyolojik (NaCl, %0.9) ile yıkandı (52) ve bir

floresans mikroskopunda (Nikon Eclipses E600) incelendi. 360 nm eksitasyon, 460 nm emisyon filtreleri kullanıldı. Floresan mikroskopuna bağlı bir kamera ile Quips Imaging System kullanılarak (Applied:UK) çekilen hipokampüse ait CA3, CA1 ve dentat girus alanlarının görüntüleri kayıt ve analizleri için bilgisayar ortamına aktarıldı.

Hematoksilen-Eosin Boyaması ve Nöron Sayımı

Ventral parçalardan alınan frozen 10 µm'lik kryostat kesitleri % 10 nötral formalinde oda ısısında 20 saniye tutularak fikse edildi, musluk suyundan geçirildikten sonra 10-20 saniye hematoksilen boyaması yapıldı, kesitler tekrar musluk suyundan geçirildikten sonra 10 saniye % 1'lik eosinde bekletildi, musluk suyunda yıkandıktan sonra dehidrasyon, şeffaflandırma ve kapatma işlemine tabii tutuldu. Hazırlanan preparatlar bir floresan mikroskopunda ışık mikroskopik olarak (Olympus BX-50) incelendi. Mikroskoba bağlı bir kamera (Olympus DP71; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) ile çekilen fotoğraflar bilgisayar ortamına alındı. CA3 ve CA1 alanlarındaki piramidal nöronların sayımı Scion Image programı (Scion Image for Windows, Scion Corporation 4.0.3.2., USA)(1 µm² lik alanlarda) ile yapıldı ve preparatlar nöron hasarı (asidofilili ve gliosis) yönünden değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Grupların CA1 ve CA3 hipokampal alanlarına ait ortalama nöron sayılarının karşılaştırılmasında parametrik test varsayımları yerine geldiği için tek yönlü varyans analizi yapıldı. Varyans analizi sonucuna göre istatistiki düzeyde anlam bulunan CA1 alanına ait ortalama nöron sayılarının karşılaştırılmasında Tukey Gerçek Önemli Fark Yöntemi uygulandı. Gruplardan elde edilen SE latansı ortalamaları açısından gruplar tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı. Varyans analizinde önem bulunmadığı için Post Hoc test uygulanmadı. Nöbet skorlarının ortalamaları açısından grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi yapıldı. Bu testlerin uygulanması sırasında SPSS (SPSS 15.0 for Windows, Release 15.0.0 (6 Sep 2006) Copyright (c) SPSS Inc., 1989-2006) istatistik programından yararlanıldı.

Gruplardan elde edilen 24 saat yaşam şansı ortalamaları ve SE'a girme oranı ortalamaları için bazı gruplardaki veri sayısı 5 ten az olduğu için İnstat (GraphPad Instat Copyright (c) 1990-1993. GraphPad Software V2.02 Dr. Granger, LSU Medical Center

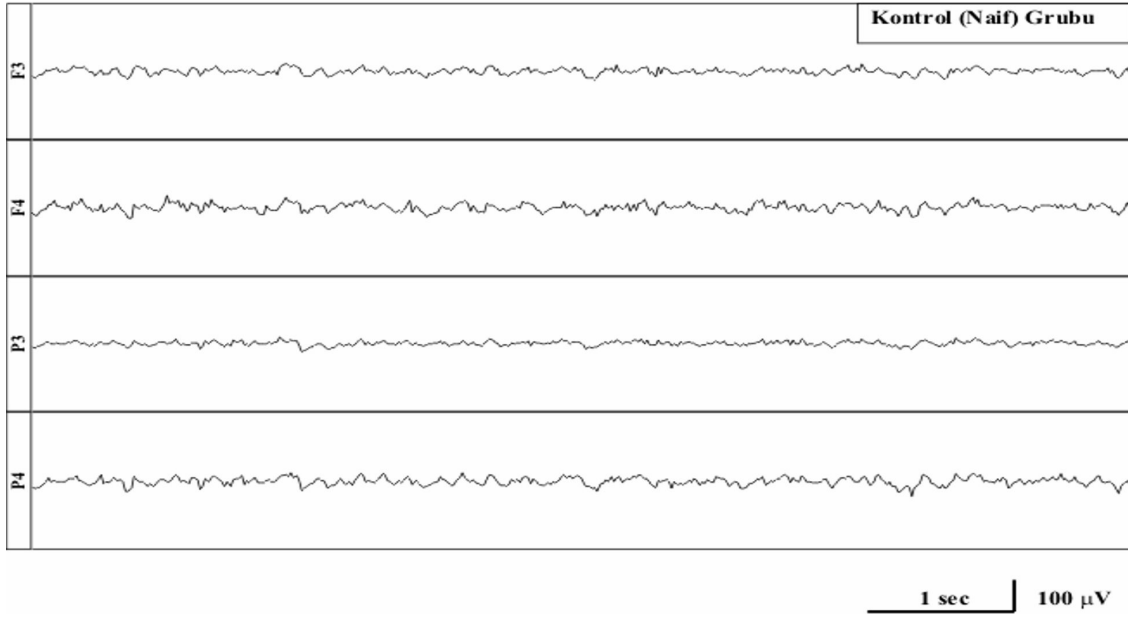
931521 S) paket programı kullanılarak gruplar ikişer ikişer karşılaştırıldı ve Fisher Kesin Khi kare testi uygulandı.

BULGULAR

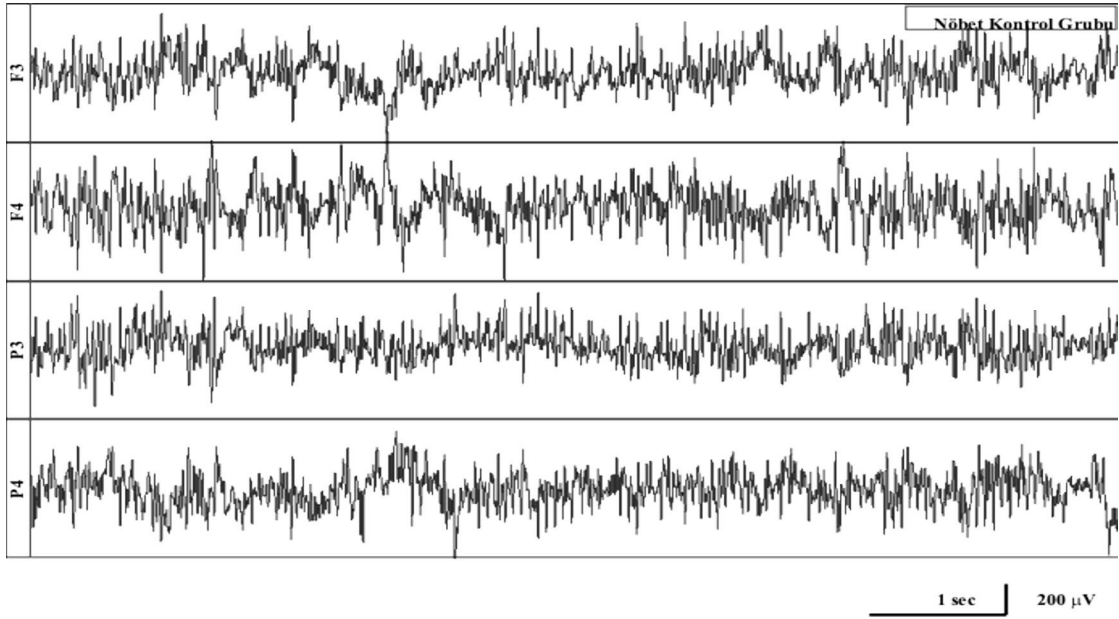
TPM tedavisinin pilokarpin ile oluşturulan nöbetlere etkileri, SE'a girme oranı, SE latansı, 24 saat yaşam şansı, nöbet skorları ve nöron hasarı değerlendirilmiştir. Ayrıca TPM'in hipokampusdeki çinko iyonları üzerinden etki ederek antiepileptik etki göstermesinde bir rolünün olup olmadığı da değerlendirilmiştir.

Sıçanlara pilokarpin HCl verilmesinden yaklaşık 5 dk sonra kolinerjik stimülasyon bulguları olan salivasyon, piloereksiyon ve diürezin yanısıra tremor, kaşınma ve çiğneme hareketleri gibi limbik otomatik hareketler saptandı. 15-20 dk sonrasında bazı sıçanlarda baş sallama, arka ayaklar üzerine kalkma ile birlikte ön ayak klonusu görüldü. Bunu bazı sıçanlarda düşme, generalize konvülsiyonlar ve SE takip etti. Tüm gruplarda SE gelişen hayvanlarda, SE pilokarpin enjeksiyonundan 40-45 dk sonrasında görüldü.

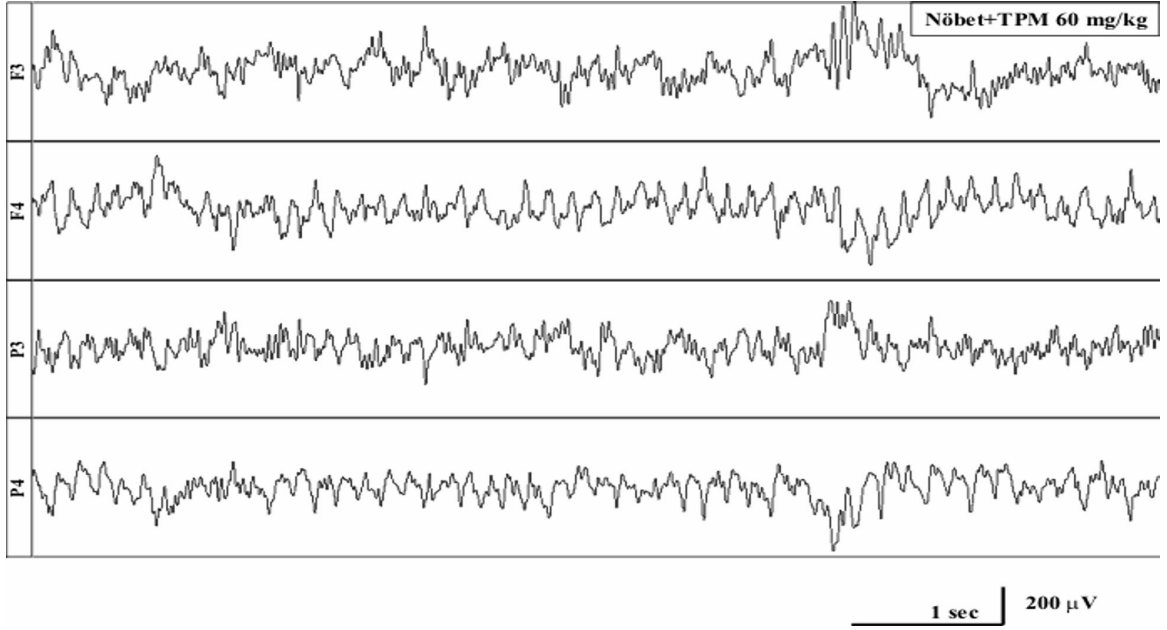
Sıçanlarda nöbet öncesi ve nöbet sırasına ait ECoG kayıtlardan örnekler tüm gruplar için şekil-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 de gösterilmiştir. Gruplar arasında nöbet sırasında her ne kadar spikelerin, polispikelerin amplitüdü ve frekansları arasında bazı farklılıklar görülse de tüm ECoG kayıtlarına generalize konvülsiyon kalıbı hakimdi. Ayrıca pilokarpin HCl öncesi tüm gruplardan alınan kayıtlarda normal ECoG paternleri gözlemlendi.



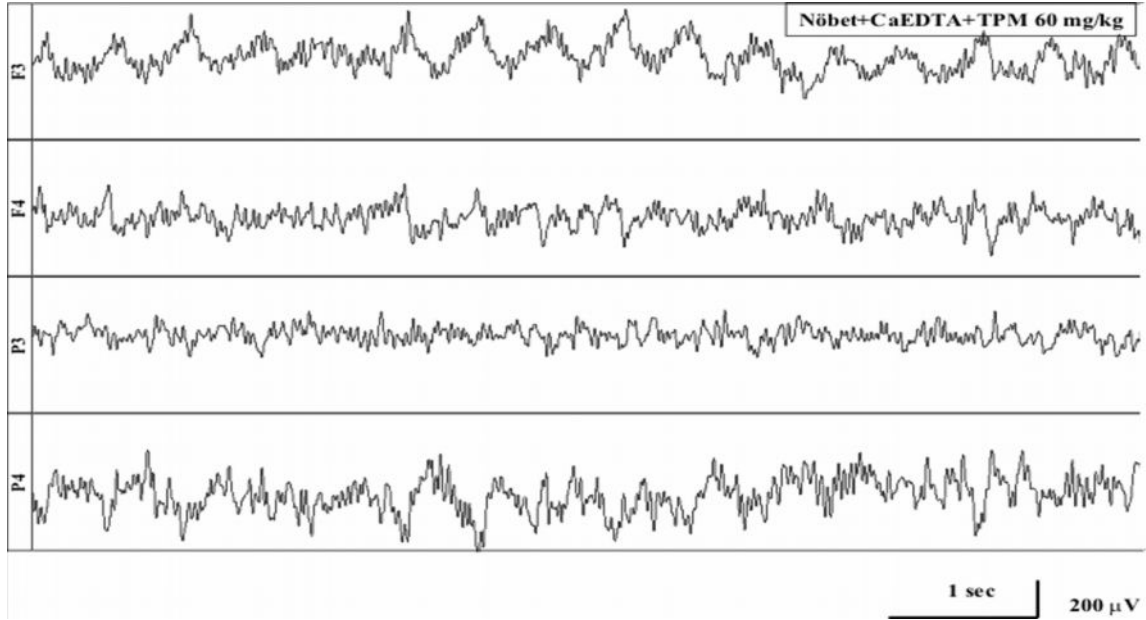
Şekil 2: Kontrol (Naif) grubu sıçanlarda ECoG kaydı



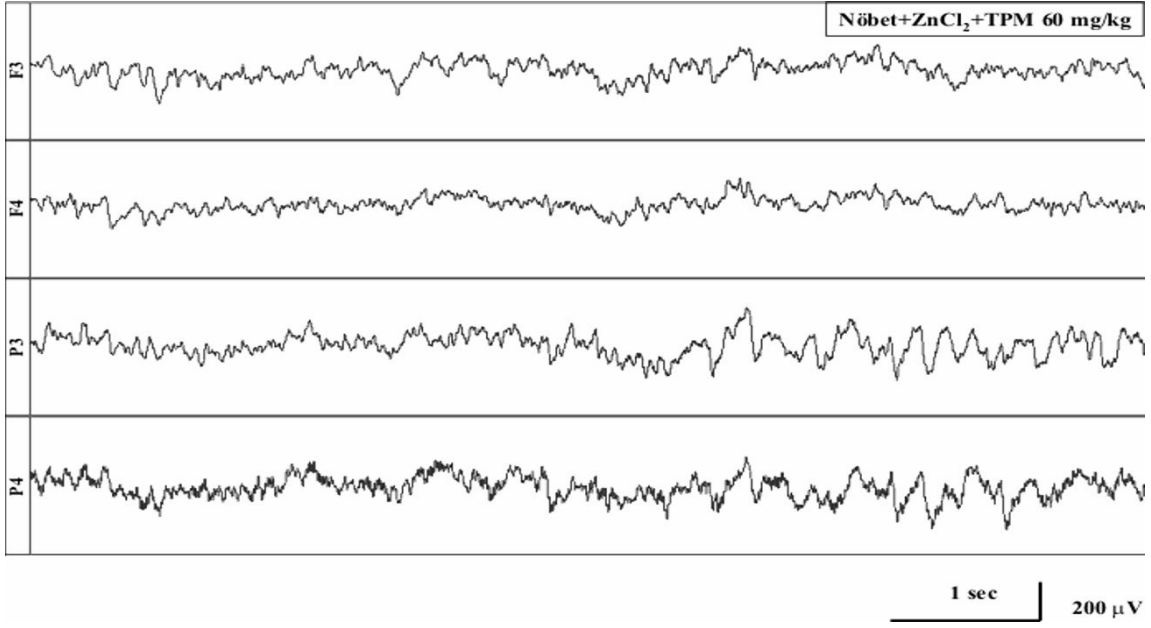
Şekil 3: Nöbet-Kontrol grubu sıçanlarda nöbet sırasındaki ECoG kaydı



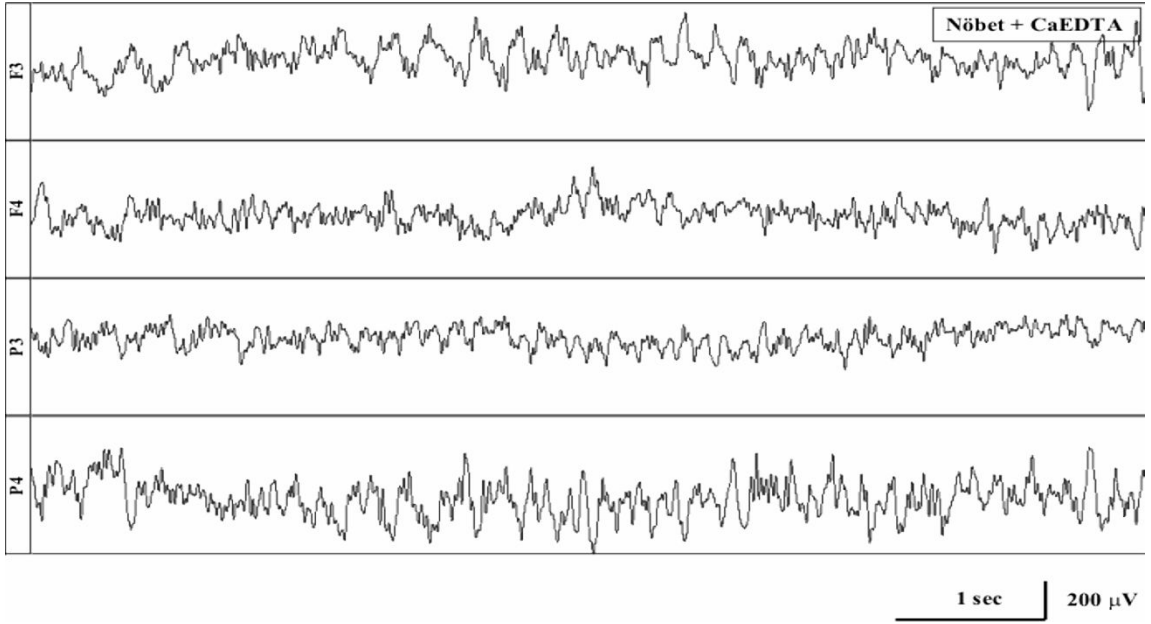
Şekil 4: Nöbet-TPM grubu sıçanlarda nöbet sırasındaki ECoG kaydı



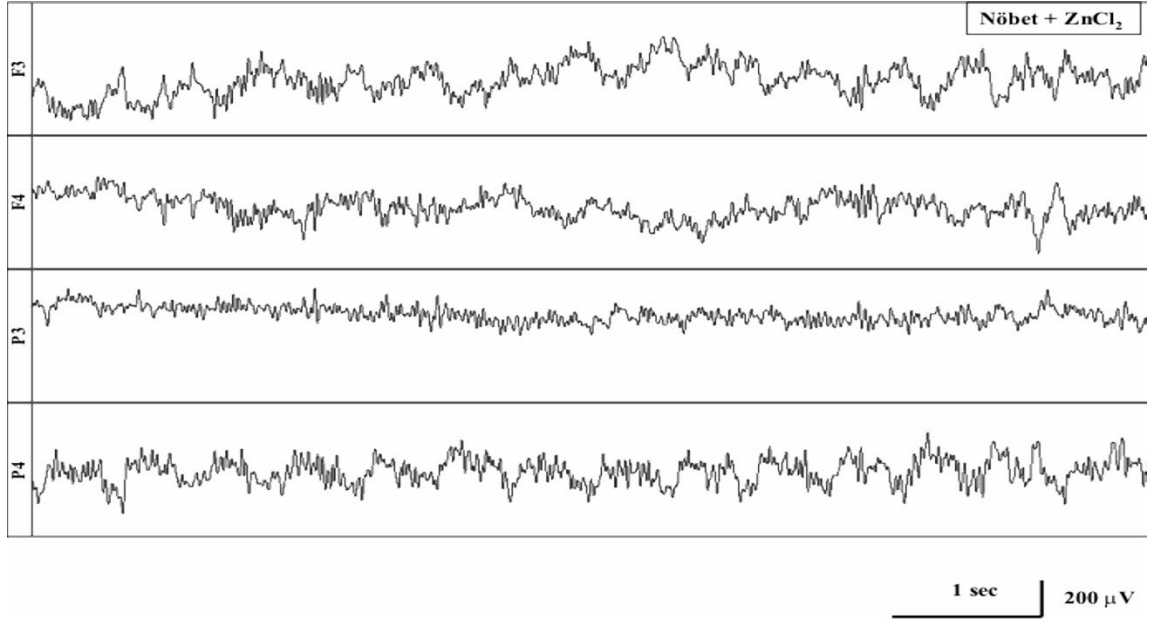
Şekil 5: Nöbet-TPM-CaEDTA grubu sıçanlarda nöbet sırasındaki ECoG kaydı



Şekil 6: Nöbet-TPM-ZnCl₂ grubu sıçanlarda nöbet sırasındaki ECoG kaydı



Şekil 7: Nöbet-CaEDTA grubu sıçanlarda nöbet sırasındaki ECoG kaydı



Şekil 8: Nöbet-ZnCl₂ grubu sıçanlarda nöbet sırasındaki ECoG kaydı

Nöbet-Kontrol grubunda pilokarpin HCl enjeksiyonu yapılan sıçanların 9 tanesi (% 90,00) ortalama $40,67 \pm 1,80$ dakika sonra davranışsal ve elektrokortikografik olarak SE'ya girdi. Bu gruptaki sıçanların 24 saat yaşam şansı % 80 olarak saptandı. Nöbet skoru ise ortalama $4,50 \pm 0,22$ olarak bulundu (Tablo-2). Nöbetle birlikte TPM verilen grupta, sıçanların 5 tanesinde (% 50) SE pilokarpin HCl enjeksiyonundan sonra ortalama $45,00 \pm 1,64$ dakika sonra oluşurken, 24 saat yaşam şansı % 90 olarak bulundu ve nöbet skoru da $3,80 \pm 0,41$ olarak saptandı (Tablo-3). TPM ve CaEDTA enjeksiyonları ile birlikte nöbet oluşturulan hayvanlarda SE insidansı % 60 olarak bulundu. Sıçanların 6 tanesi ortalama $44,50 \pm 2,07$ dakika sonra SE'ya girdi ve 24 saat yaşam şansı % 90 olarak saptandı. Bu gruptaki hayvanların nöbet skoru ise $3,90 \pm 0,34$ olarak saptandı (Tablo-4). Nöbet-TPM-ZnCl₂ grubundaki sıçanların 9 tanesi (% 90) ortalama $42,11 \pm 2,69$ dakika sonra SE'ya girerken, sıçanların 24 saat yaşam şansı % 80, nöbet skorları ise ortalama $4,30 \pm 0,30$ olarak bulundu (Tablo-5). Nöbet-CaEDTA grubunda ise SE insidansı % 70 bulundu. Sıçanların 7 tanesi ortalama $44,71 \pm 3,36$ dakika sonra SE'ya girdi. 24 saat yaşam şansı % 90 olarak saptandı. Bu gruptaki hayvanların nöbet skoru ise $4,20 \pm 0,24$ olarak bulundu (Tablo-6). Nöbet ile birlikte ZnCl₂ enjeksiyonu

yapılan sıçanların 9 tanesi (% 90) ortalama $44,50 \pm 2,07$ dakika sonra SE' a girdi. 24 saat yaşam şansı % 70 olarak bulunurken nöbet skoru ise $4,60 \pm 0,22$ olarak saptandı (Tablo-7).

Tüm grupların SE' a girme oranı (Şekil-9), SE latansı (Şekil-10), 24 saat yaşam şansı (Şekil-11) ve nöbet skorları (Şekil-12) karşılaştırıldığında, nöbet-kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo-8).

Tablo-2: Nöbet-Kontrol grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	+	35	-	5
2	+	47	+	4
3	+	35	+	5
4	+	38	+	5
5	-	-	+	3
6	+	45	+	4
7	+	49	+	5
8	+	36	+	4
9	+	38	-	5
10	+	43	+	5
%	90		80	
$\bar{X} \pm \text{SEM}$		40.67 ± 1.80		4.50 ± 0.22

Tablo-3: Nöbet-TPM grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	-	-	+	3
2	+	48	+	5
3	-	-	+	3
4	-	-	+	2
5	+	49	+	5
6	+	45	-	5
7	+	43	+	5
8	+	40	+	5
9	-	-	+	2
10	-	-	+	3
%	50		90	
$\bar{X} \pm \text{SEM}$		45.00 \pm 1.64		3.80 \pm 0.41

Tablo-4: Nöbet-TPM-CaEDTA grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	+	43	+	5
2	-	-	+	3
3	+	41	+	5
4	+	44	+	5
5	-	-	+	2
6	+	51	+	4
7	-	-	+	3
8	-	-	+	3
9	+	50	+	4
10	+	38	-	5
%	60		90	
$\bar{X} \pm \text{SEM}$		44.50 ± 2.07		3.90 ± 0.34

Tablo-5: Nöbet-TPM-ZnCl₂ grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	+	41	+	4
2	+	52	+	5
3	+	43	+	4
4	+	35	+	5
5	+	40	-	5
6	+	37	+	5
7	+	40	+	4
8	+	33	-	5
9	+	58	+	4
10	-	-	+	2
%	90		80	
$\bar{X} \pm \text{SEM}$		42.11 ± 2.69		4.30 ± 0.30

Tablo-6: Nöbet-CaEDTA grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	+	37	-	5
2	+	39	+	5
3	-	-	+	4
4	-	-	+	3
5	+	40	+	5
6	+	54	+	4
7	-	-	+	4
8	+	35	+	5
9	+	52	+	4
10	+	56	+	3
%	70		90	
$\bar{X} \pm \text{SEM}$		44.71 \pm 3.36		4.20 \pm 0.24

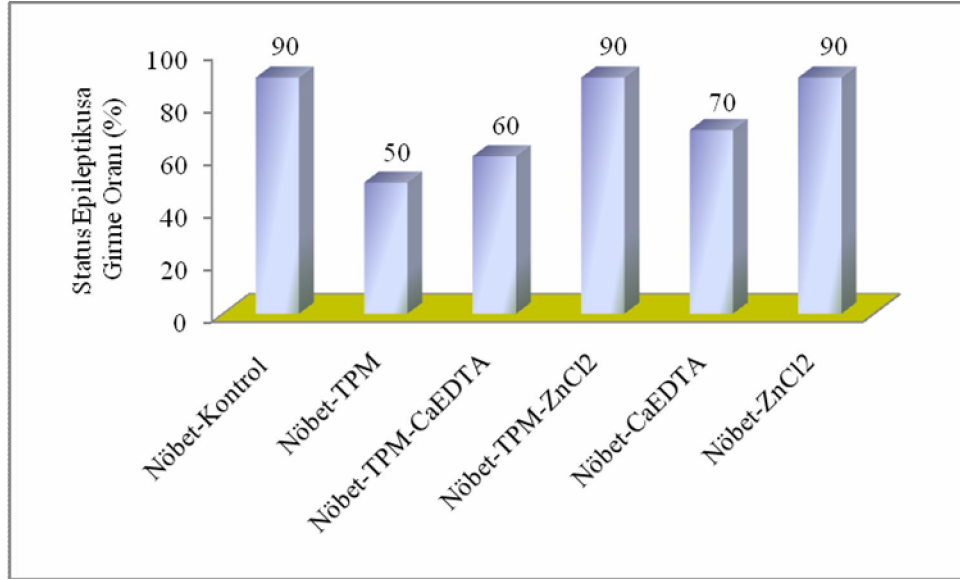
Tablo-7: Nöbet- ZnCl₂ grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	-	-	+	3
2	+	39	-	5
3	+	42	+	5
4	+	35	+	5
5	+	36	+	5
6	+	44	+	5
7	+	37	-	5
8	+	50	+	4
9	+	48	+	4
10	+	34	-	5
%	90		70	
$\bar{X} \pm \text{SEM}$		44.50 \pm 2.07		4.60 \pm 0.22

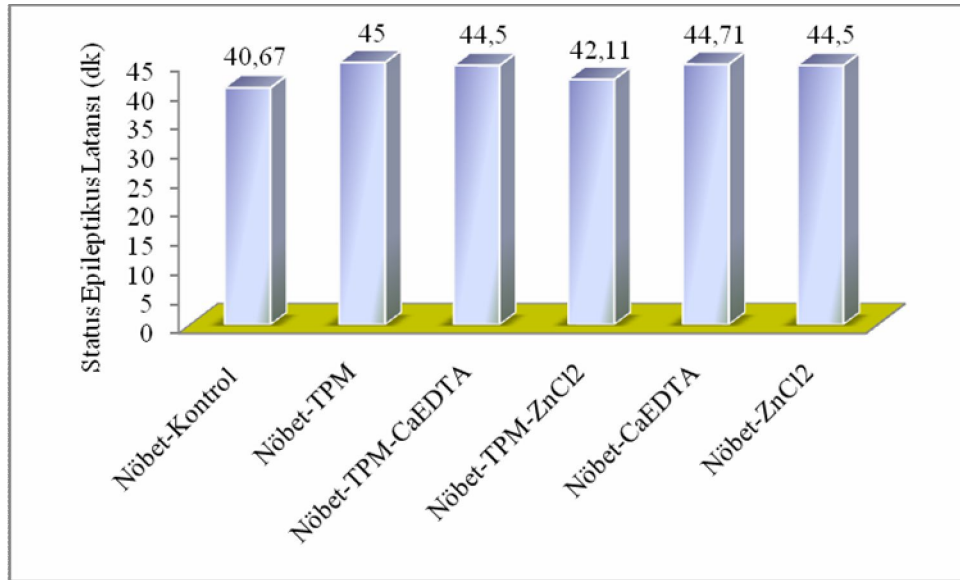
Tablo-8: Nöbet-kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-TPM-CaEDTA, Nöbet-TPM-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA, Nöbet- ZnCl₂ gruplarında status epileptikusa girme oranı, nöbet latansı, 24 saat yaşam şansı ve nöbet skoru ortalamalarının karşılaştırılması (ortalama ± SEM).

	SE (%)	SE Latansı (dk) (ortalama±SEM)	24-saat Yaşam Şansı(%)	Nöbet Skoru (sayı-dereceleme) (ortalama±SEM)
<i>Nöbet-Kontrol Grubu (n=10)</i> <i>(pilocarpine 380 mg/kg)</i>	90	40.67±1.80	80	4.50±0.22
<i>N-TPM (n=10)</i>	50	45.00±1.64	90	3.80±0.41
<i>N-TPM-CaEDTA (n=10)</i>	60	44.50±2.07	90	3.90±0.34
<i>N-TPM-ZnCl₂ (n=10)</i>	90	42.11±2.69	80	4.30±0.30
<i>N-CaEDTA (n=10)</i>	70	44.71±3.36	90	4.20±0.24
<i>N-ZnCl₂(n=10)</i>	90	44.50±2.07	70	4.60±0.22

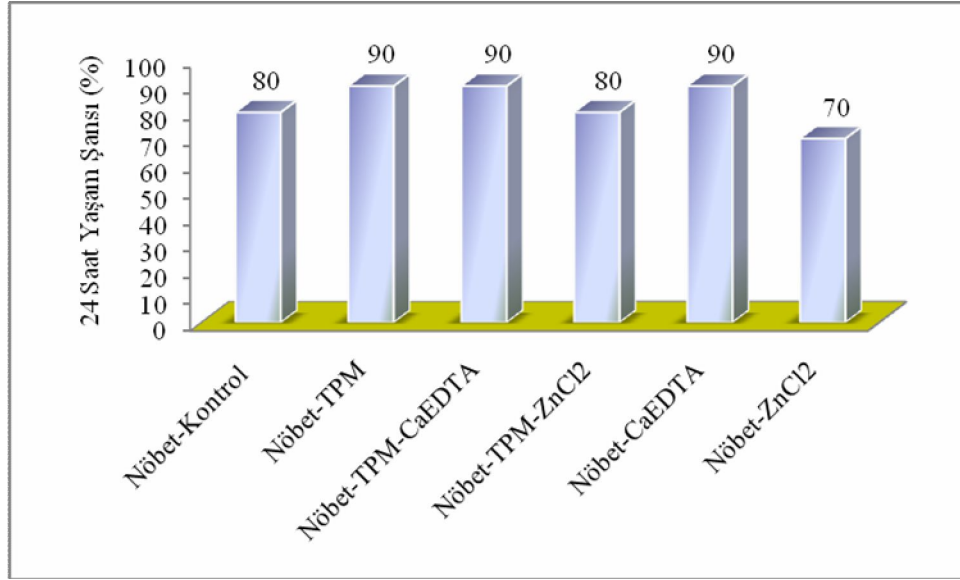
ANOVA sonucuna göre istatistiksel fark bulunmamıştır (p>0.05).



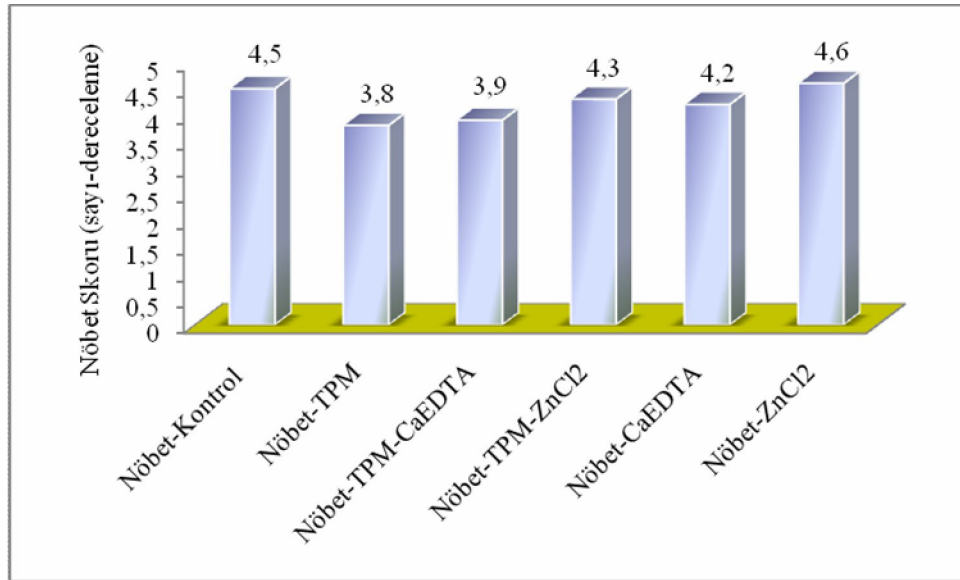
Şekil-9: Nöbet-Kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-TPM-CaEDTA, Nöbet-TPM-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA, Nöbet- ZnCl₂ gruplarında status epileptikusa girme oranlarının karşılaştırılması.



Şekil-10: Nöbet-Kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-TPM-CaEDTA, Nöbet-TPM-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA, Nöbet- ZnCl₂ gruplarında status epileptikus latansının karşılaştırılması.



Şekil-11: Nöbet-Kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-TPM-CaEDTA, Nöbet-TPM-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA, Nöbet- ZnCl₂ gruplarında 24 saat yaşam şansının karşılaştırılması.

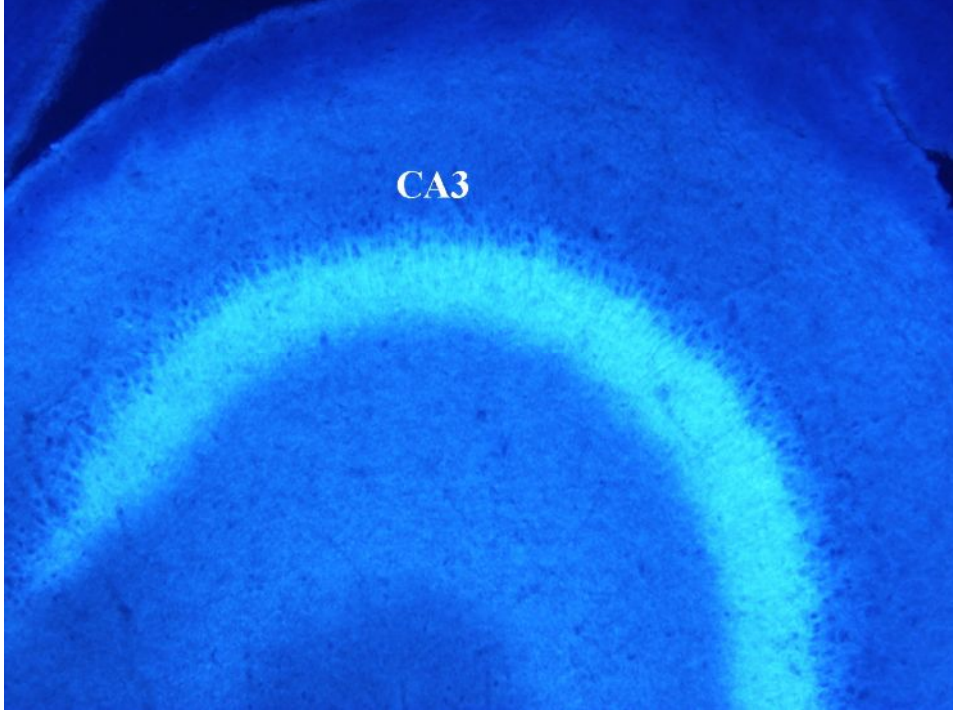


Şekil-12: Nöbet-Kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-TPM-CaEDTA, Nöbet-TPM-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA, Nöbet- ZnCl₂ gruplarında nöbet skorlarının karşılaştırılması.

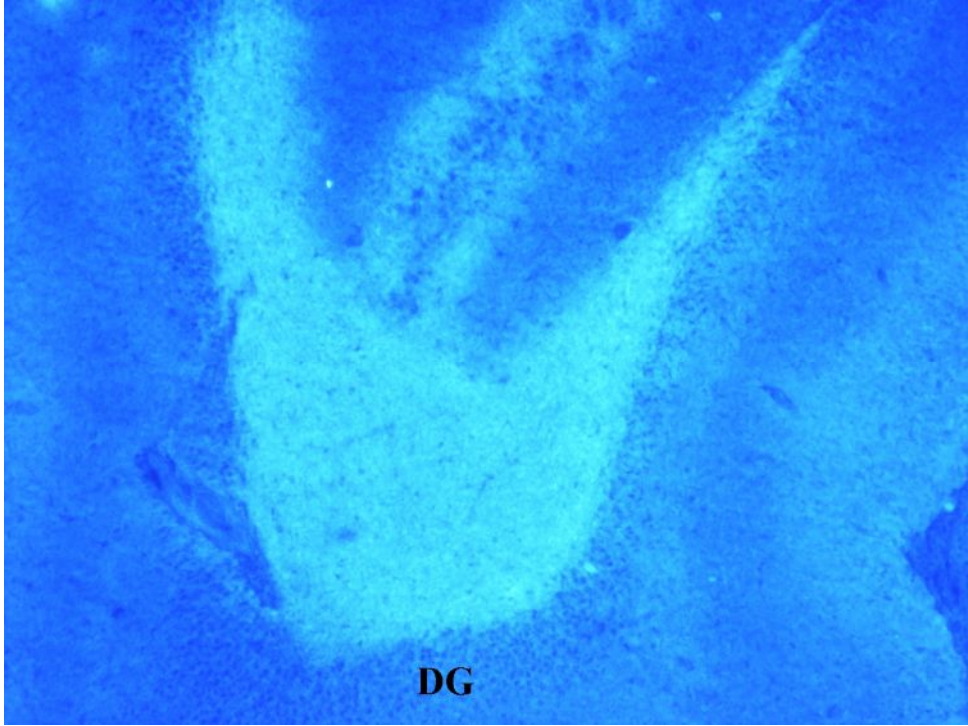
Tüm gruplardaki sıçanlardan 24 saat sonrasında hipokampüse ait dorsal beyin parçalarından alınan kesitlerde histokimyasal TSQ boyaması sonucunda CA1, CA3 ve DG alanlarında çinko boyanması normal olarak gözlemlendi, çinko translokasyonuna rastlanmadı. Bu nedenle sadece Kontrol (naif) grubuna ve Nöbet-Kontrol grubuna ait CA1, CA3 ve DG alanlarının TSQ histokimyasını gösteren örnek fotoğraflar şekil-13, şekil-14, şekil-15, şekil-16, şekil-17 ve şekil-18 de gösterilmiştir. Bu boyamada özellikle mossy fiberlerin presinaptik uçlarındaki veziküllerde bol miktarda bulunan çinko iyonları boyanmış fakat hem CA3 hemde CA1 alanlarındaki piramidal hücrelerde çinko boyanmasına rastlanılamamıştır. Bu nedenle çinko iyonlarının postsinaptik nöronlara geçmediği gözlemlenmiştir.



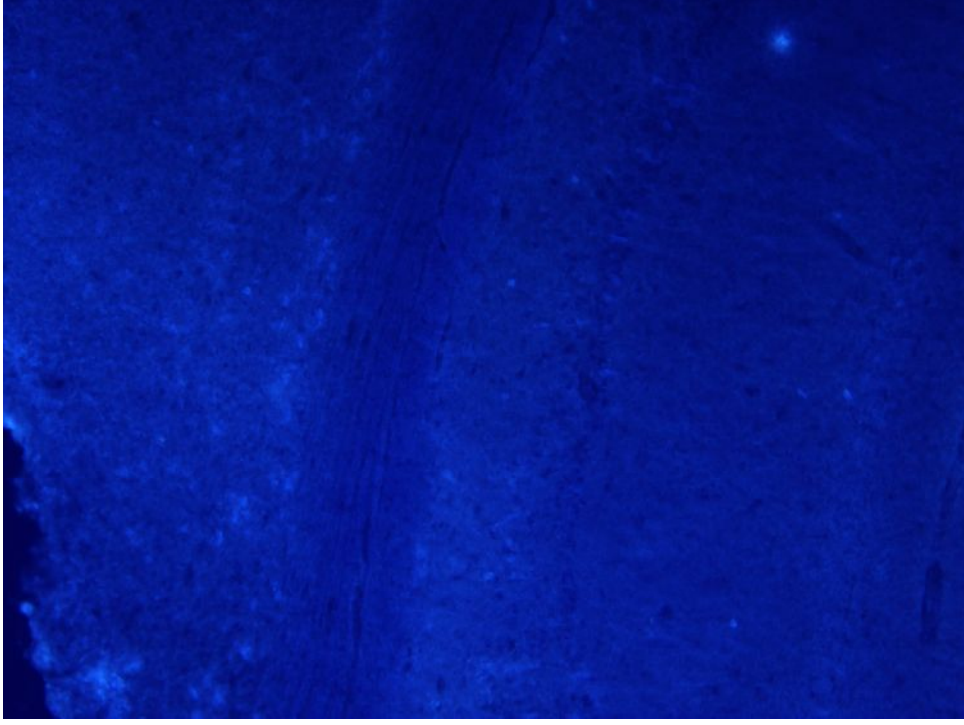
Şekil-13: Kontrol (naif) grubunda hipokampüsün CA1 bölgesinde TSQ boyaması ile normal piramidal hücrelerin görünümü



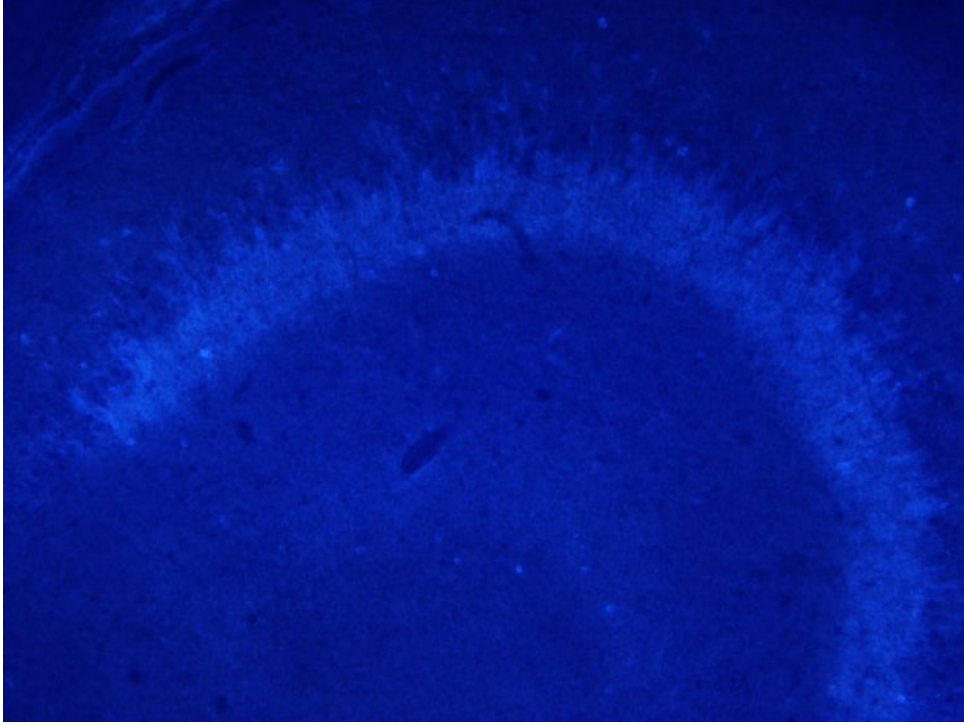
Şekil-14: Kontrol (naif) grubunda hipokampüsün CA3 bölgesinde TSQ boyaması ile normal piramidal hücrelerin görünümü ve floresan görüntüsü



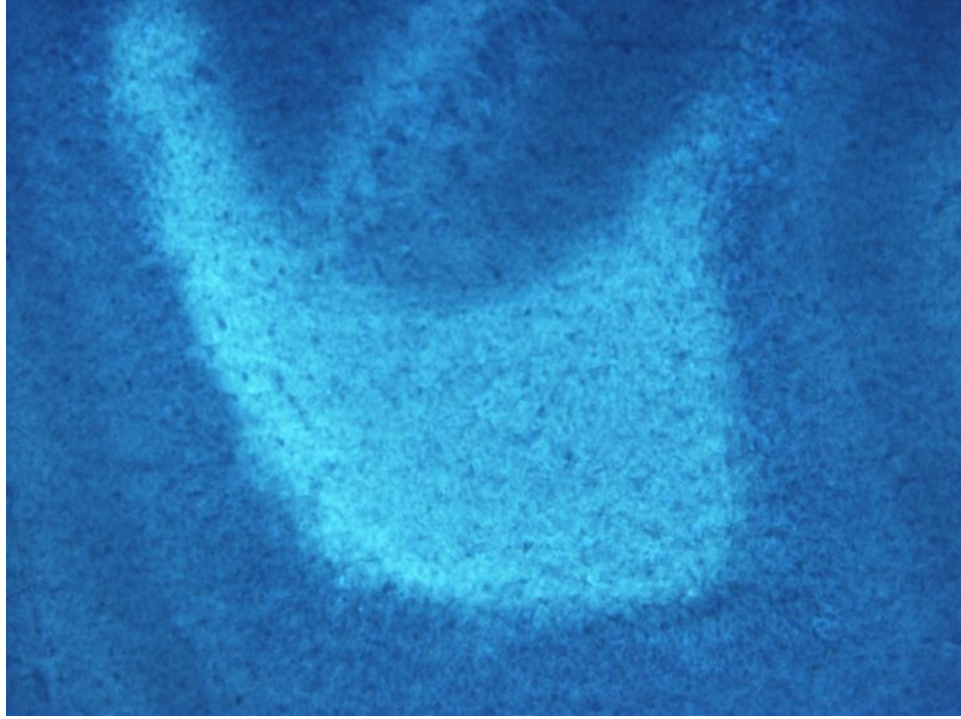
Şekil-15: Kontrol (naif) grubunda hipokampüsün DG bölgesinde TSQ boyaması ile normal granuler hücrelerin görünümü ve floresan görüntüsü



Şekil-16: Nöbet-Kontrol grubunda hipokampüsün CA1 bölgesinde TSQ boyaması ile normal piramidal hücrelerin görünümü



Şekil-17: Nöbet-Kontrol grubunda hipokampüsün CA3 bölgesinde TSQ boyaması ile normal piramidal hücrelerin görünümü ve floresan görüntüsü



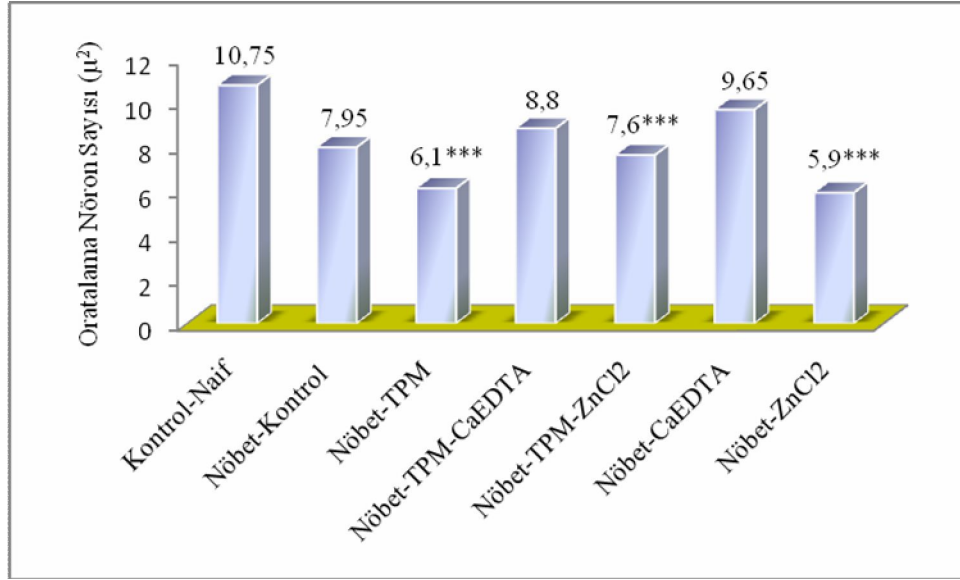
Şekil-18: Nöbet-Kontrol grubunda hipokampusün DG bölgesinde TSQ boyaması ile normal granuler hücrelerin görünümü ve floresan görüntüsü

Yapılan hematoksilin-eosin boyamalarında tüm grupların hipokampal CA1 ve CA3 alanlarındaki nöron sayıları saptandı. CA1 bölgesindeki piramidal nöronların sayısının kontrol (naif) grubuna göre, TPM tedavisi yapılan, TPM ile birlikte ZnCl₂ ve sadece ZnCl₂ verilen gruplarda anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p < 0.001$). Özellikle nöron sayısının azaldığı gruplarda asidofilik piramidal hücrelere rastlanıldı. Diğer gruplarda nöron sayısındaki azalma Nöbet-Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CA1 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil-19). CA3 bölgesinde ise hem kontrol (naif) hem de nöbet-kontrol gruplarına göre diğer gruplarda nöron sayısı açısından anlamlı düzeyde fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil- 20) (Tablo-9). Tüm gruplara ait CA1 ve CA3 alanlarının H&E boyamasını gösteren örnek fotoğraflar şekil 21-şekil 34 te gösterilmiştir.

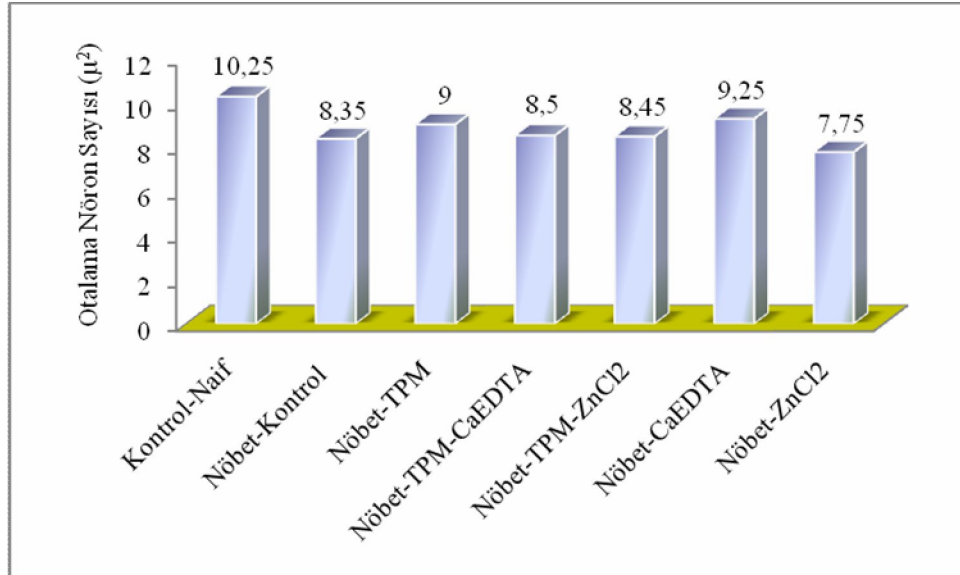
Tablo-9: Kontrol (Naif), Nöbet-kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-TPM-CaEDTA, Nöbet-TPM-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA, Nöbet- ZnCl₂ gruplarında, hipokampusün CA1 ve CA3 bölgelerindeki nöron sayıları ortalamalarının karşılaştırılması (ortalama ± SEM).

	CA1 (ortalama ± SEM)	CA3 (ortalama ± SEM)
<i>Kontrol (Naif) Grubu (n=10)</i>	10.75±1.03 ^a	10.25±1.16
<i>Nöbet-Kontrol Grubu (n=10)</i> <i>(pilocarpine 380 mg/kg)</i>	7.95±0.33 ^{abc}	8.35±0.24
<i>N-TPM (n=10)</i>	6.10±0.78 ^c	9.00±0.77
<i>N-TPM-CaEDTA (n=10)</i>	8.80±0.33 ^{abc}	8.50±0.28
<i>N-TPM-ZnCl₂ (n=10)</i>	7.60±0.53 ^{bc}	8.45±0.55
<i>N-CaEDTA (n=10)</i>	9.65±0.90 ^{ab}	9.25±0.55
<i>N-ZnCl₂ (n=10)</i>	5.90±0.33 ^c	7.75±0.37
	P<0.001	A.D.

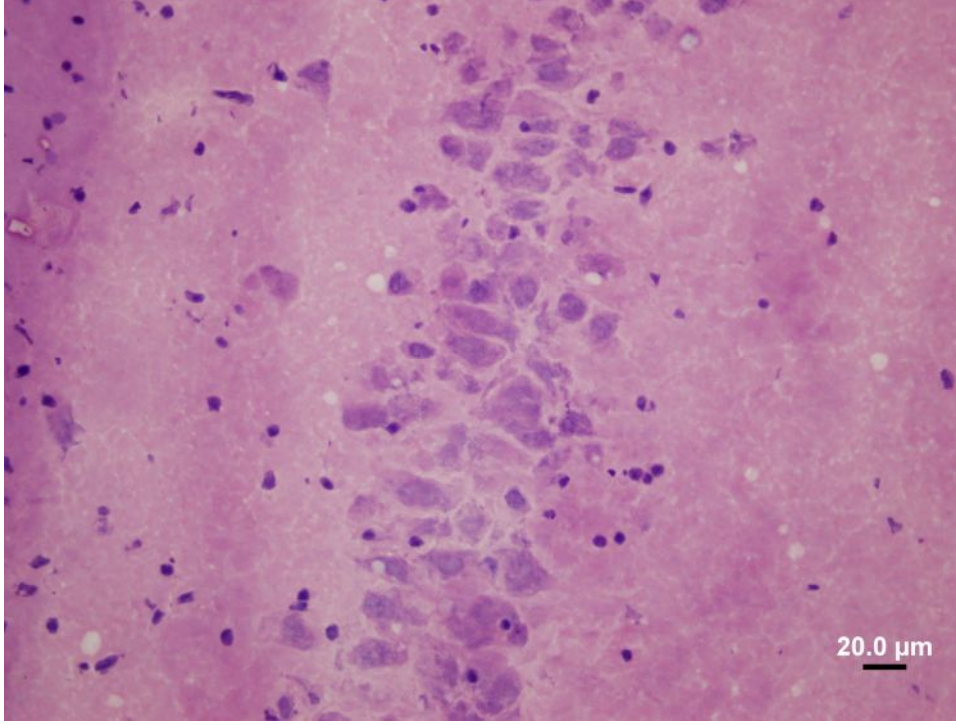
a, b, c: Aynı sütundaki değişik harfler ile gösterilen gruplar arası farklar önemlidir (p< 0.05) (Tukey). A.D.: Anlamli değil



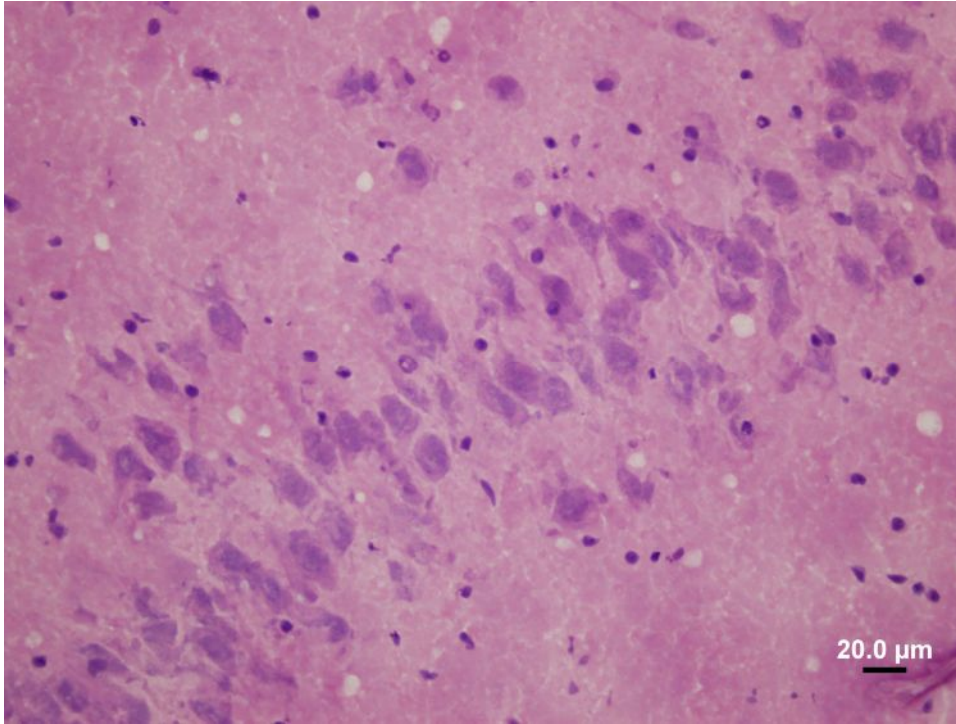
Şekil-19: Kontrol (Naif), Nöbet-kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-TPM-CaEDTA, Nöbet-TPM-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA, Nöbet- ZnCl₂ gruplarında, hipokampusün CA1 bölgesindeki nöron sayıları ortalamalarının karşılaştırılması. Nöbet-Kontrol grubu ile kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken ($p>0.05$), Kontrol (Naif) grubu ile kıyaslandığında $p<0.001$ düzeyinde anlam bulundu.



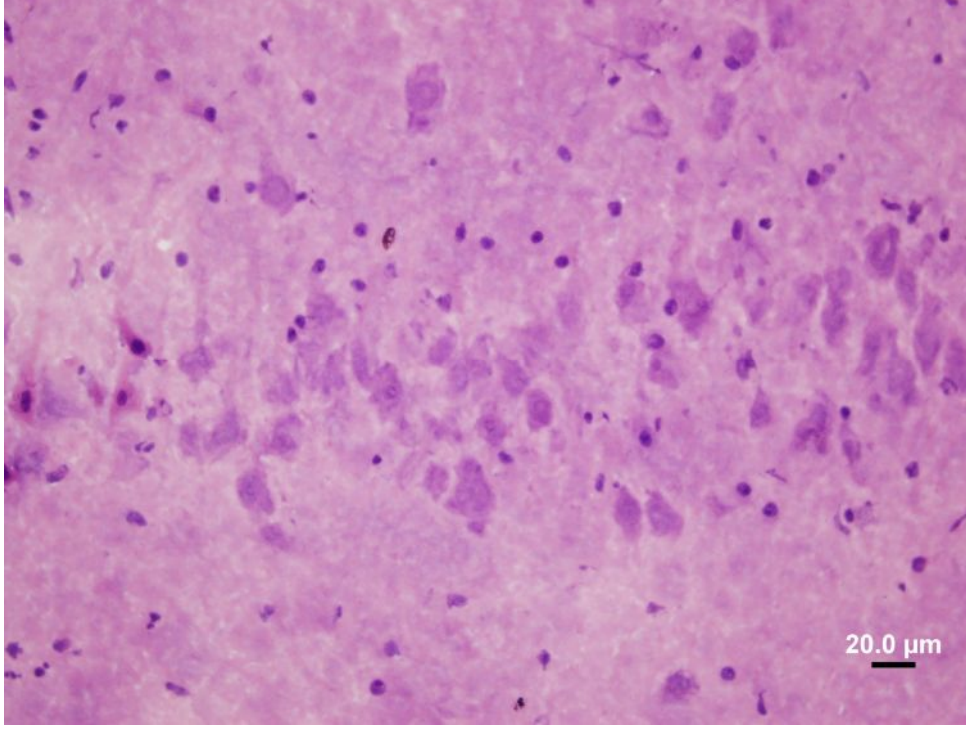
Şekil-20: Kontrol (Naif), Nöbet-kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-TPM-CaEDTA, Nöbet-TPM-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA, Nöbet- ZnCl₂ gruplarında, hipokampusün CA3 bölgesindeki nöron sayıları ortalamalarının karşılaştırılması.



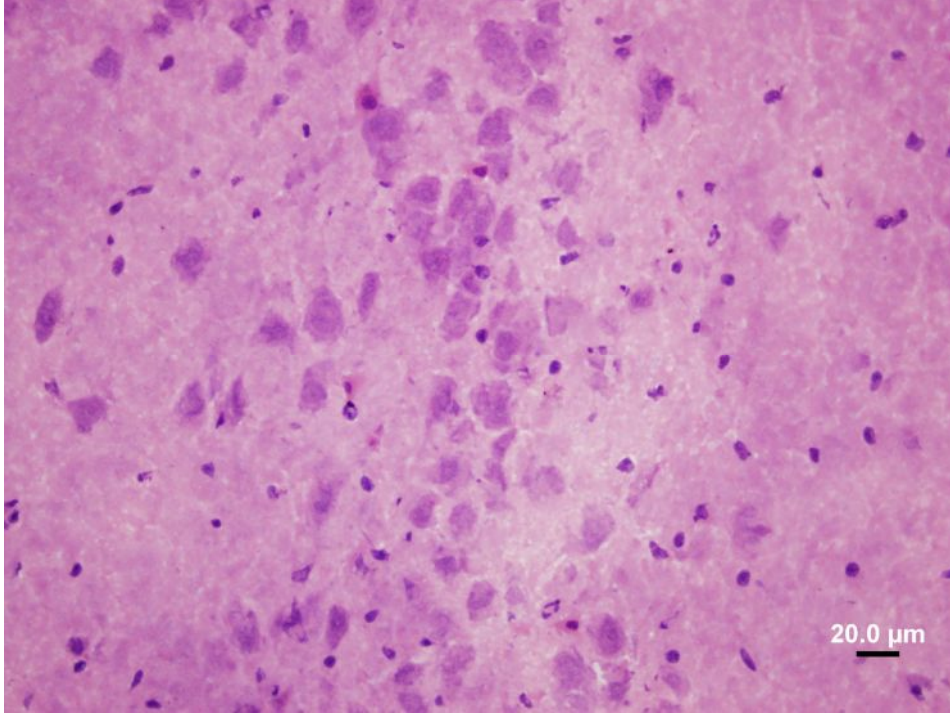
Şekil-21: Kontrol (naif) grubunda hipokampüsün CA1 bölgesinde H&E boyaması ile normal piramidal hücrelerin görünümü



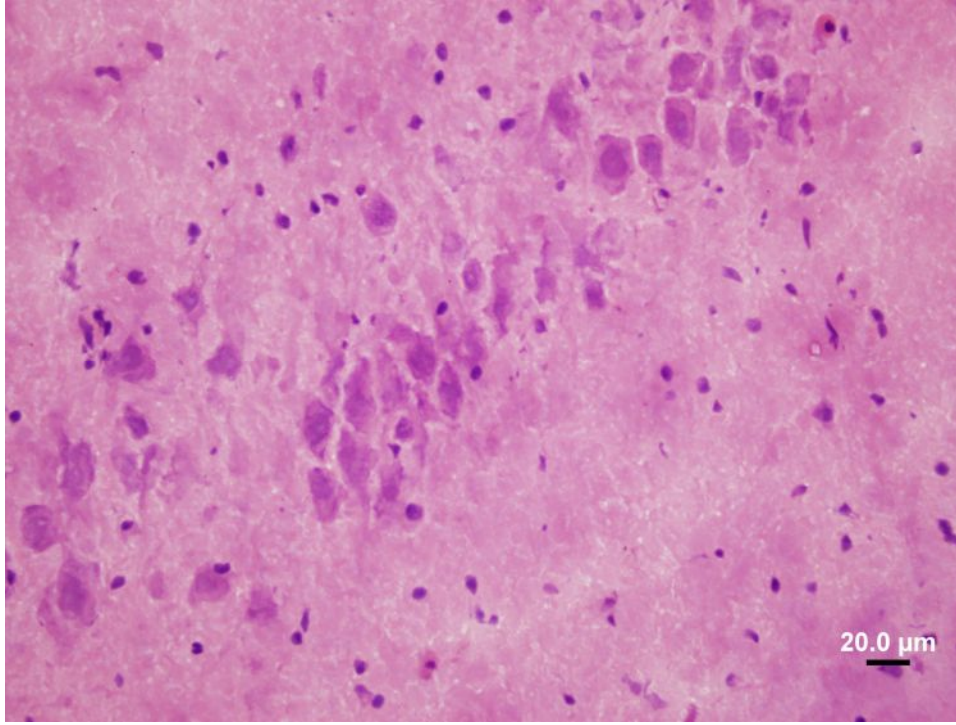
Şekil-22: Kontrol (naif) grubunda hipokampüsün CA3 bölgesinde H&E boyaması ile normal piramidal hücrelerin görünümü



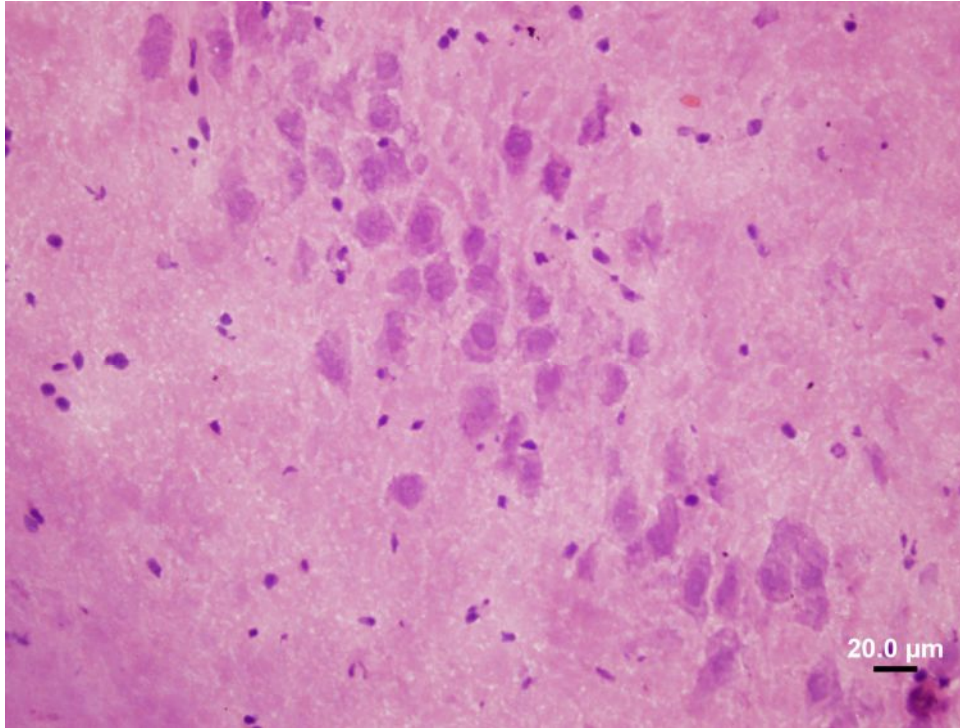
Şekil-23: Nöbet-Kontrol grubunda hipokampusün CA1 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



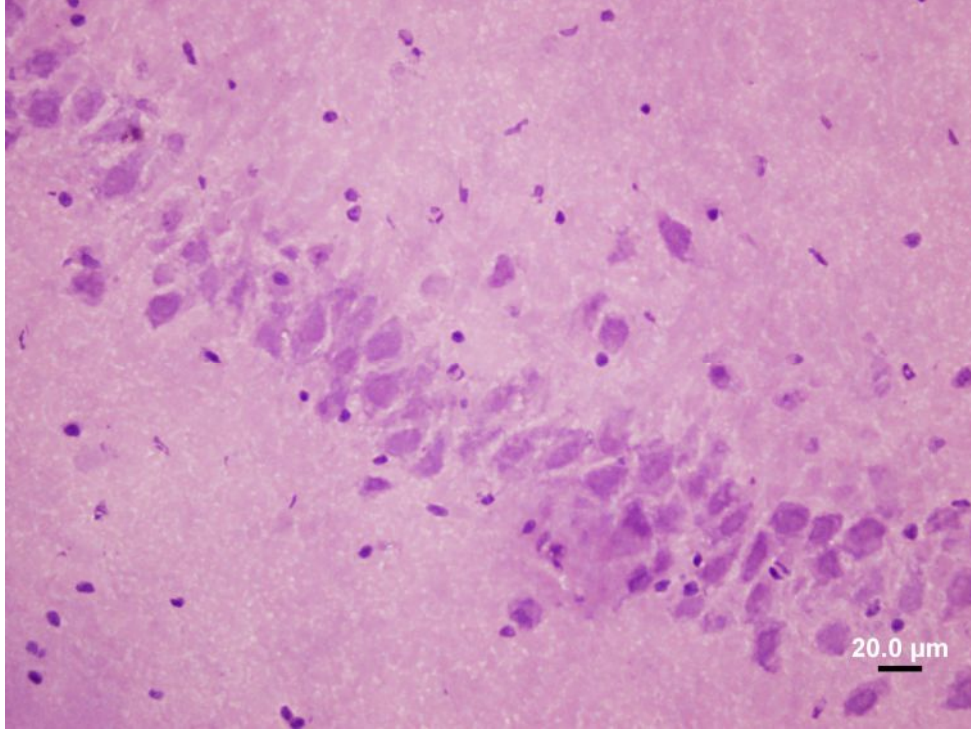
Şekil-24: Nöbet-Kontrol grubunda hipokampusün CA3 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



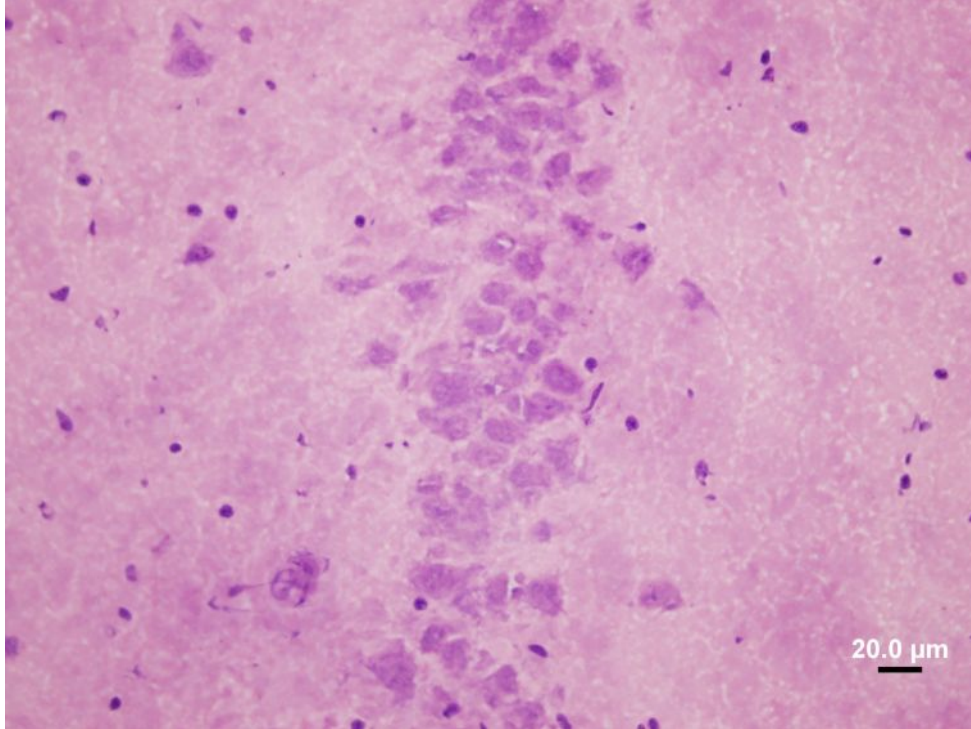
Şekil-25: Nöbet-TPM grubunda hipokampüsün CA1 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



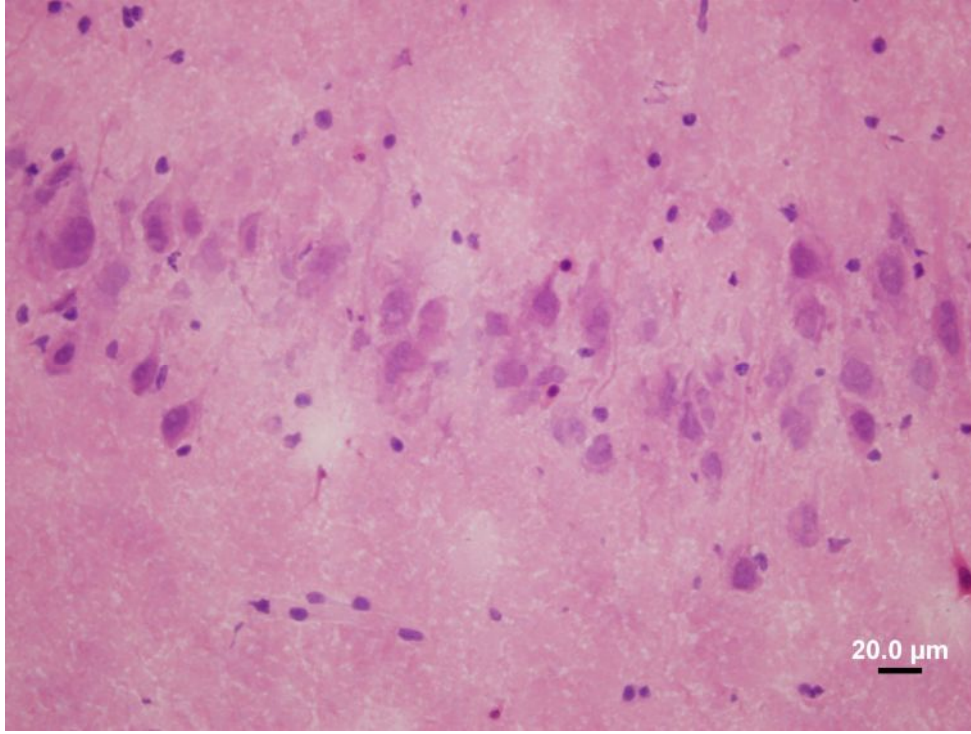
Şekil-26: Nöbet-TPM grubunda hipokampüsün CA3 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



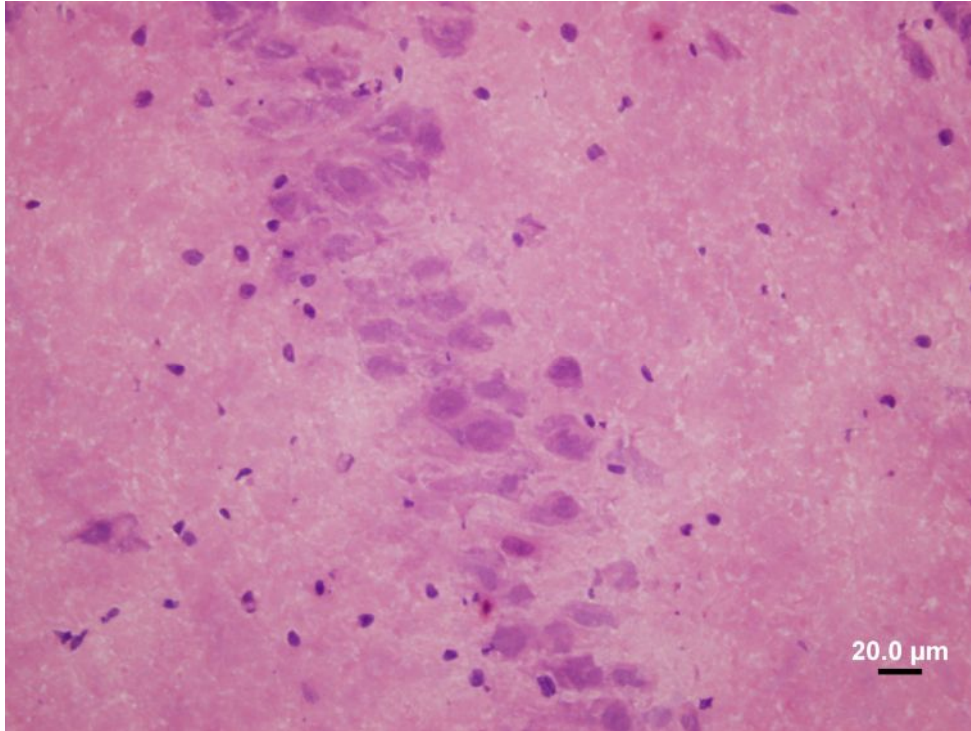
Şekil-27: Nöbet-TPM-CaEDTA grubunda hipokampüsün CA1 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



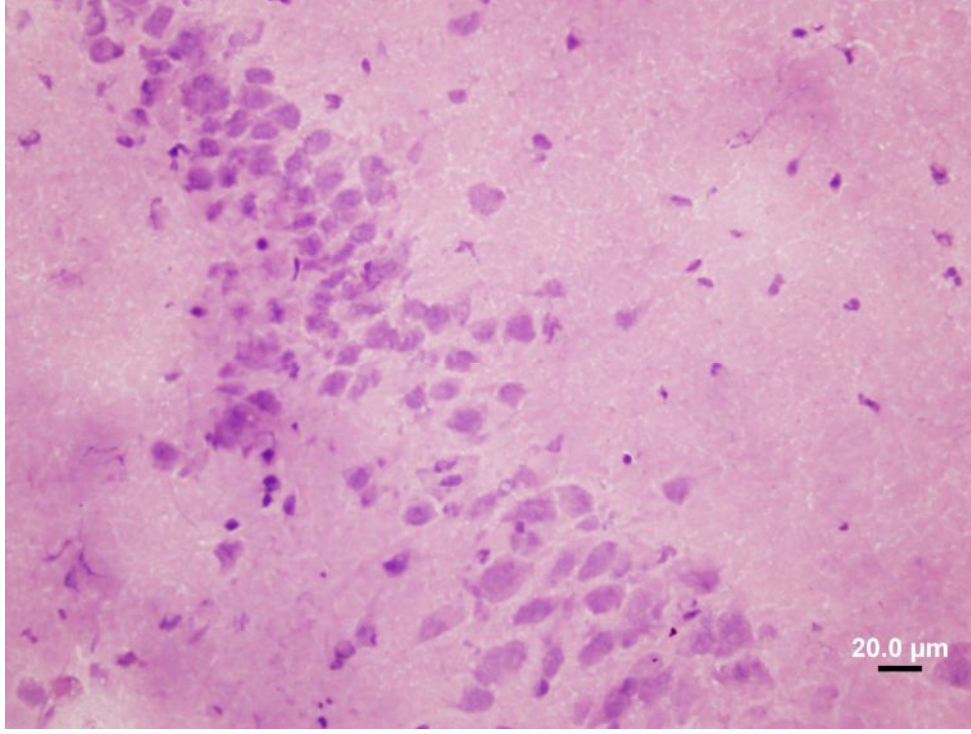
Şekil-28: Nöbet-TPM-CaEDTA grubunda hipokampüsün CA3 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



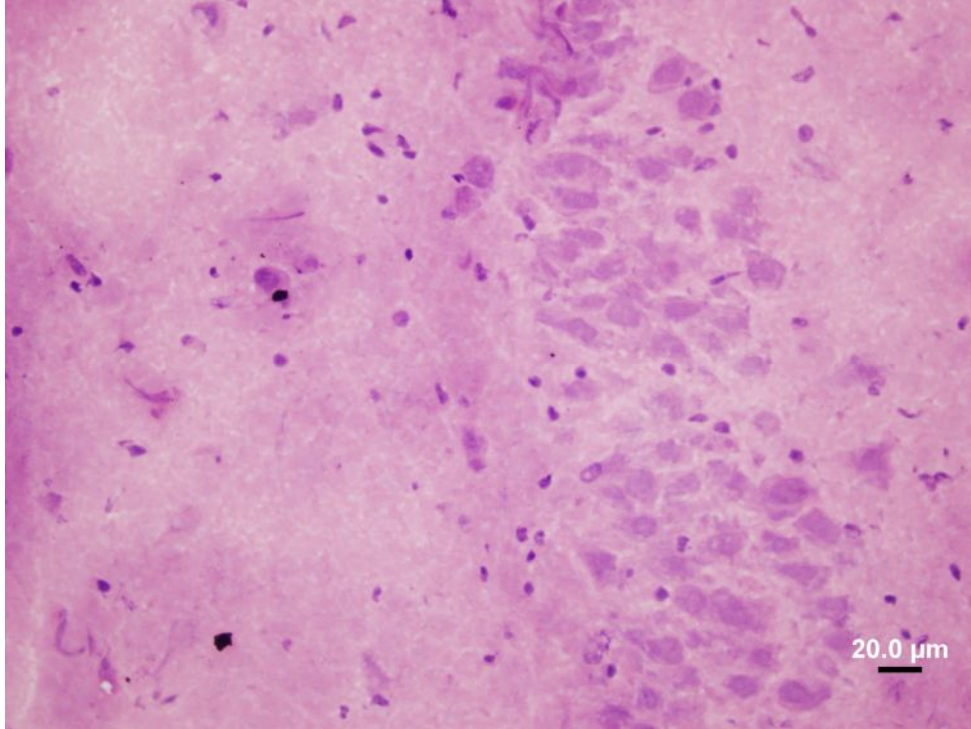
Şekil-29: Nöbet-TPM- $ZnCl_2$ grubunda hipokampüsün CA1 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



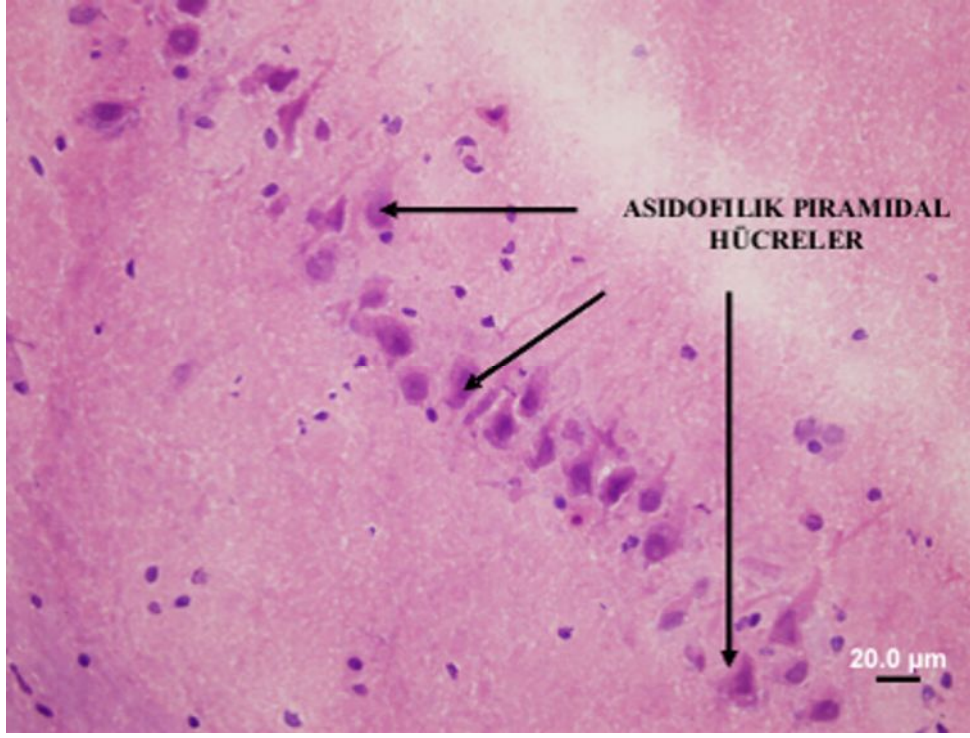
Şekil-30: Nöbet-TPM- $ZnCl_2$ grubunda hipokampüsün CA3 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



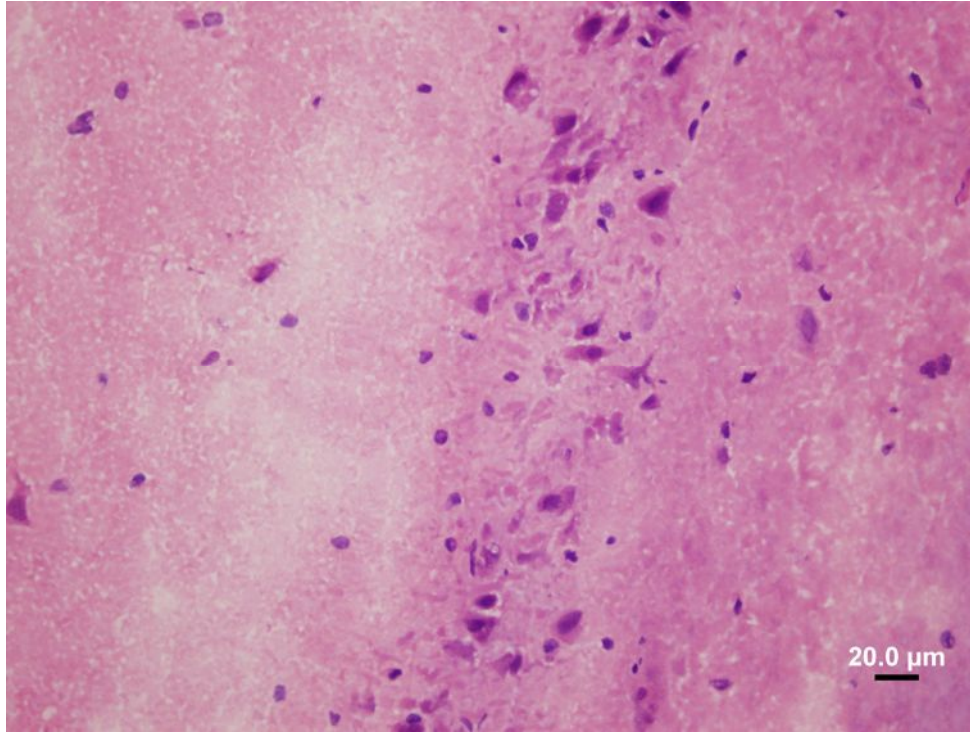
Şekil-31: Nöbet-CaEDTA grubunda hipokampusün CA1 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



Şekil-32: Nöbet-CaEDTA grubunda hipokampusün CA3 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



Şekil-33: Nöbet- ZnCl₂ grubunda hipokampusün CA1 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü



Şekil-34: Nöbet- ZnCl₂ grubunda hipokampusün CA3 bölgesinde H&E boyaması ile piramidal hücrelerin görünümü

TARTIŞMA

Bu çalışmada topiramamat tedavisinin hipokampüste çinko translokasyonu üzerine olan etkisinin ve nöroprotektif etkilerinin araştırılması amaçlandı. TPM tedavisinin pilokarpin ile oluşturulan nöbetlere etkileri, ECoG bulguları, SE'a girme oranı, SE latansı, 24 saat yaşam şansı, nöbet skorları ve nöron hasarı yönünden incelendi. Ayrıca TPM'in hipokampüsdeki çinko iyonları üzerinden etki ederek antiepileptik etki göstermesinde bir rolünün olup olmadığı da değerlendirildi.

Tüm gruplar SE'a girme oranı, SE latansı, 24 saat yaşam şansı ve nöbet skorları açısından karşılaştırıldığında, nöbet-kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermedi. Nöbet-Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Nöbet-TPM ve Nöbet-TPM-CaEDTA gruplarında SE'a girme oranı ve nöbet skoru açısından TPM ve CaEDTA'nın bir miktar olumlu etkisi gözlemlense de istatistiksel açıdan anlam bulunmadı. Nöbet-TPM-CaEDTA grubunda Nöbet-CaEDTA grubuna kıyasla SE insidansı ve nöbet skoru açısından bir miktar azalma saptanmış olup, Nöbet-TPM-ZnCl₂ grubunda ise Nöbet-ZnCl₂ grubuna göre 24 saat yaşam şansında bir miktar artış, nöbet skorunda ise bir miktar azalma saptanmış olmasına rağmen bu bulgular istatistiki olarak anlamlı değildi. ECoG bulgular da bu verileri destekler nitelikteydi.

Nöbet-Kontrol, Nöbet-TPM, Nöbet-ZnCl₂-TPM, Nöbet-CaEDTA-TPM, Nöbet-ZnCl₂, Nöbet-CaEDTA gruplarında çinko histokimyası için yapılan TSQ boyamasında çinko translokasyonuna rastlanmadı. TPM, beyindeki çinko translokasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamasından dolayı, TPM'in antiepileptik etkisi üzerine daha önce saptanmış olan yolaklarının yanı sıra, beyin çinko iyonları üzerine de etki ederek antiepileptik etki göstermesinde rolü olamayacağını düşündürmektedir. Bu bulgular bizi 60 mg/kg dozda uygulanan TPM enjeksiyonunun, hipokampüste çinko translokasyonuna etkili olmadığı sonucuna götürdü. TPM beyindeki çinko translokasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığından, 60 mg/kg dozda uygulanan TPM'in olası antiepileptik yolak üzerinde etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.

Hipokampal CA1 ve CA3 alanlarındaki nöronlar üzerinde etkisi değerlendirildiğinde, Nöbet-Kontrol grubuna göre CA1 ve CA3 alanlarında TPM uygulamasıyla istatistiksel olarak

anlamli bir sonuç elde edilmemiştir. Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda TPM'in nöroprotektif etkisi saptanmamıştır.

Niebauer ve Gruenthal (36) tarafından yapılan bir çalışmada farklı dozlarda uyguladıkları TPM'in, EEG üzerinde olumlu bir etkisini bulamamış olmaları bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Fisher ve arkadaşlarının (34) alışmalarından elde ettikleri EEG bulguları da bizim verilerimizi desteklemektedir. Onlar 20, 40, 80, 160 ve 320 mg/kg dozda uyguladıkları TPM'in EEG nöbet aktivitesi üzerinde olumlu etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Yüksek dozlardan (160-320 mg/kg) sonra spike amplitüdünde bir miktar azalma eğilimi saptansa da, bu eğilimin önemsiz olduğunu ve spike frekansı zerine TPM'in etkisinin olmadığını vurgulamışlardır. Aynı araştırıcılar TPM'ı, NMDA reseptör antagonisti olan budipine (10 mg/kg) ile beraber kombine ederek kullandıklarında spike frekansı ve amplitüdünün % 50 kadar azaldığını saptamışlardır. Rigoulot ve arkadaşlarının (30) yaptığı bir çalışmada 10, 30 ve 60 mg/kg dozda uyguladıkları TPM'in, EEG kayıtlarında diken-dalga deşarjlarının (SWD) süresini doza bağlı olarak azalttığını, aynı zamanda nöbet süresini de azalttığını (30-60 mg/kg) bulmuşlardır. Ancak bu çalışmada genetik olarak epilepsili sıçanlar (GAERS) ve sese duyarlı audiogenic Wistar AS sıçanlar kullanılmıştır. EEG ile ilgili bulgularının bizi desteklememesinin bir nedeni ırklar arası farklılıktan ve nöbet oluşturmada kullandıkları yöntemin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Aynı zamanda fareler (1h/1h) zerinde yapılan bir çalışmada TPM etkisiz bulunmuştur (82). Bu da bize türler ve ırklar arası farklılıkların sonuçlardaki çeşitliliği etkiliyor olabileceğini göstermektedir. Rigoulot ve arkadaşlarının (28) Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde yaptığı bir başka çalışmada farklı dozlarda (10, 30, 60 mg/kg) TPM uygulaması sonucunda EEG kayıtlarında doza bağlı bir fark görülmemiştir. Literatürde ECoG aktivite zerine TPM'in etkisiyle ilgili olarak yapılan çalışmalar fazla sayıda bulunamamıştır. Bu nedenle alışmamızda ECoG parametreleri incelemeyi gerekli gördük. Ayrıca epilepsi tedavisinin başarılı olabilmesi için tedavi sırasında ECoG paterninin incelenmesi önemlidir. Bizde bu sebeple alışmamızda ECoG kayıtları aldık. Ayrıca nöbet esnasında davranışsal olarak fark edilemeyen bazı bulgular ECoG kayıtları sırasında saptanabilmektedir. Grabenstatter ve arkadaşları (83) TPM'in nöbet frekansını dşrdğin bulmuşlardır. Ancak bu araştırmacılar bizden farklı olarak TPM tedavisini kronik olarak uygulamışlar ve farklı bir ajan ile nöbet oluşturmuşlardır. Bizden farklı olarak TPM'in nöbetler üzerinde olumlu etki yaratması bu farklılıklardan dolayı olabilir.

Niebauer ve Gruenthal'ın (36) hayvanlar arasında davranış açısından TPM verilen ve verilmeyen gruplar arasında bir fark bulamamış olmaları da bizim bulgularımızı desteklemektedir. Fisher ve arkadaşları (34) TPM'in herhangi bir dozunun (20-320 mg/kg) SE'ü sonlandırmadığını bulmuşlardır. Rigoulot ve arkadaşları (30) TPM'in davranış üzerinde etkili olmadığını saptamışlardır. Bu araştırmacıların davranış ile ilgili bulguları bizi desteklemektedir. Ayrıca sıçanlarda iskemi sonrası epilepsi modeli oluşturulan bir çalışmada TPM'in tonik, klonik nöbetleri engellediği (84), pentilentetrazol ile nöbet oluşturulmuş farelerde yapılan başka bir çalışmada ise TPM'in nöbet eşliğini arttırdığı (7, 85), genç ve erişkin sıçanlarda yapılan çalışmada ise generalize nöbetlerin tonik fazını baskıladığı bulunmuştur (86). Sills ve arkadaşları (87) farelerde yaptıkları bir çalışmada beyindeki GABA seviyesi üzerinde TPM'in etkili olmadığını ileri sürmüşlerdir. Rigoulot ve arkadaşları (30) ise GAERS sıçanlarda TPM enjeksiyonu ile GABA ve glutamat seviyesinin değişebileceğini iddia etmişlerdir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada ise sağlıklı bireylerde (88) ve epilepsi hastalarında (89) TPM'in GABA seviyesini arttırarak antiepileptik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Daha öncede bahsedildiği gibi bu bulguların bizi desteklememesi türler arası farklılıktan ve nöbet oluşturmada kullandıkları yöntemin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Placidi ve arkadaşları (90) insanlarda TPM'in hem parsiyel hem generalize tonik-klonik nöbetleri önemli derecede (\geq %50) azalttığını ve tedavi boyunca spike sayılarını da azalttığını bulmuşlardır. Ancak bu çalışmada uygulanan tedavi insanlar üzerinde yapılan kronik bir tedavidir. Bulgularımızdaki farklılık çalışmamızın akut olmasından da kaynaklanıyor olabilir. SE'dan sonra beyindeki nöron ölümünün çoğu ilk 24 saat içerisinde gerçekleşmektedir (91, 92). Bu nedenle biz de akut çalışmayı tercih ettik. Kudin ve arkadaşları (29) tarafından yapılan bir çalışmada 100 mg/kg ve altındaki dozlarda TPM'in SE'yi sonlandırmadığı fakat doza bağlı olarak sıçanların ve piramidal hücrelerin yaşam sürelerini önemli düzeyde arttırdığı bulunmuştur. Nöbeti durdurmak için diazepam (DZP) yerine TPM verdiklerinde, TPM'in nöbeti sonlandırmadığını görmüşlerdir. SE'nin başlamasından 180 dakika sonra, sıçanların yaşaması için DZP vererek nöbeti durdurmuşlardır. Yalnızca TPM verdiklerinde hayvanların yaşama şanslarının azaldığını, DZP verdiklerinde arttığını, DZP ile birlikte TPM verdiklerinde ise yaşama şanslarının daha da arttığını görmüşlerdir. TPM'in, SE'deki nöbetlerin şiddetini azaltarak hayvanların yaşam şansını arttırabileceğini ifade etmektedirler. Ancak bu çalışmanın

bizim bazı bulgularımızı desteklememesinin nedeni bizim çalışmamızın akut, onların çalışmasının ise kronik olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu güne kadar beyindeki çinko iyonları ve TPM ile ilgili herhangi bir çalışmanın yapılmamış olması, çinko ile TPM arasında bir ilişkinin var olup olmadığının bilinmemesinden dolayı bu konunun da çalışılmasını gerekli kılmıştır. Çalışmamız, TPM'in çinko histokimyası üzerinde etkili olmadığını gösterdi. Noyan (93) L-Arjinin ile ilgili yaptığı bir çalışmada pilokarpin HCl enjeksiyonundan sonra hipokampüste çinko translokasyonunun olup olmadığını TSQ boyaması yaparak test etmiştir. Akut dönemde (2 saat) nöbet oluşmasına rağmen çinkonun postsinaptik nöronlar içerisinde görülmemiş olması bizim bazı gruplardaki bulgularımızı destekler niteliktedir. Noyan ve arkadaşlarının (94) yaptıkları bir başka çalışmada hipokampüste çinko iyonlarının dağılımı ve yoğunluğu açısından kontrol hayvanları ve pilokarpin uygulanmış hayvanlar arasında fark bulamamışlardır. Bizde Nöbet-Kontrol grubu ile TPM, CaEDTA ve ZnCl₂ enjeksiyonları yapılan gruplar arasında, hipokampal piramidal hücrelerde nöbetin neden olduğu serbest çinkonun postsinaptik birikimini değerlendirmek için yaptığımız, TSQ boyamasında çinko iyonlarının dağılımı ve yoğunluğu açısından CA1, CA3 ve DG alanlarında fark saptamadık. Biz 60 mg/kg TPM enjeksiyonunun nöbet aktivitesine olumlu yönde bir etkisi olmadığını ve benzer şekilde hipokampüste çinko histokimyasında da değişiklik oluşturmadığını gözlemledik. Ancak literatürde TPM ve çinko histokimyası ile ilgili olarak bizi olumsuz ya da olumlu yönde destekleyecek bir bilgiye rastlayamadık.

Niebauer ve Gruenthal (36) tarafından hem CA1 hem CA3 alanlarındaki piramidal hücreler üzerinde TPM'in nöroprotektif etkisi saptanmıştır. Ancak CA1 de uygulanan tüm TPM dozlarında (20, 40, 80 mg/kg) nöron hasarının azaldığı bulunurken, CA3 de ise yalnız yüksek iki dozda bu etki belirlenmiştir. Bizim bulgularımızı destekler nitelikte CA1 bölgesindeki piramidal nöronlardaki hasarın yine de CA3 bölgesine göre daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca SE'dan sonra CA1 ve CA3'deki nöronların hasar görmesine rağmen DG'daki granuler hücrelerin hasar görmediğini bildirmişlerdir. CA3 ve özellikle CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerin nöron hasarına karşı daha hassas olduğu bilinmektedir. Nöronlarda hasara ve ölüme neden olan olay ise eksitatör aminoasit olan glutamata aşırı miktarda maruz kalınmasına bağlanabilmektedir. Diğer antiepileptik ilaçlarla karşılaştırıldığında, TPM'in güvenlik profilinin geniş ve yarılanma ömrünün uzun olmasını bir

avantaj olarak değerlendirmişlerdir (36). Fischer ve arkadaşları (34) CA1 ve CA3 alanlarında minimal 80 mg/kg dozda TPM uyguladıklarında nöronlar üzerinde koruyucu etki gösterdiğini bulmuşlardır. 80 mg/kg altındaki dozlarda uyguladıkları TPM'in nöron hasarı üzerine etkisiz olması bizim sonuçlarımızı da desteklemektedir. Aynı çalışmada TPM'in maksimal nöroprotektif etkisini 80 mg/kg da göstermesine karşılık, bu dozda nöbet frekansı ve amplitüdü üzerine önemli etkisi olmamıştır. Aynı zamanda 320 mg/kg dozda uygulanan TPM'in çalışmadaki bazı sıçanlarda ciddi solunum depresyonu yarattığını ve buna bağlı olarak da ölümlerin meydana geldiğini vurgulamışlardır. TPM'in nöron koruyucu mekanizmasının tam olarak bilinmemesine karşılık yüksek dozlarda nöroprotektivitenin azalması, kısmen solunum depresyonuna neden olmasıyla açıklanabilir. Bu çalışmada aynı zamanda TPM'in tek başına veya budipin ile kombine edilerek verilmesi arasında nöron koruyuculuğu açısından anlamlı fark saptanmamıştır (34). Rigoulot ve arkadaşları (28) Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada farklı dozlarda uygulanan TPM tedavisinin sonucunda, TPM'in hipokampüste yalnızca CA1 alanında nöron koruyucu etkisinin olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda CA1 bölgesindeki nöronların CA3 nöronlarından daha hassas olduğu da vurgulanmaktadır. Bizim çalışmamızda ise naif gruba göre TPM tedavisi uygulanan grupta CA1 alanında hücre sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olması CA3 de ise anlam bulunmaması, CA1 deki piramidal nöronların daha hassas olmasından kaynaklanıyor olabilir. Yine bu çalışmada LiCl ve pilokarpin ile oluşturdukları nöbet sonucunda mortalitenin yüksek olması dikkatlerini çekmiş ve bunun üzerine LiCl verilmeden yalnızca pilokarpin ile oluşturdukları nöbette ölüm oranının azaldığını saptamışlardır. Böylece LiCl ile TPM'in etkileşebileceği ve buna bağlı olarak da mortaliteyi arttırabileceğini ifade etmişlerdir (28). Bu yüzden bizde çalışmamızda yalnızca pilokarpin HCl kullanarak nöbet oluşturmayı tercih ettik. TPM'in nöron korumadaki etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, GABA reseptörleri (85), AMPA/Kainat reseptörleri (95), Ca⁺⁺ kanalları (96) ve voltaja duyarlı sodyum kanallarına (97) etki ederek antiepileptik etki gösterdiği ve nöron korunmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir. TPM'in nöron koruyucu etkisinin korteksdeki hücrelerle karşılaştırıldığında, hipokampüsteki nöronlar üzerinde daha fazla olduğu bildirilmiştir (28). AMPA/Kainat reseptörlerinin kortekse göre hipokampüste daha fazla bulunduğu ve hipokampüsünde en fazla CA1 ve CA3 bölgelerinde bulunduğu bildirilmektedir (98). TPM'in hipokampüste bu nöron koruyucu etkisi AMPA/Kainat

reseptörlerinin aktivasyonunu inhibe etmesi ile açıklanabilmektedir (28). Buna dayalı olarak bizde çalışmamızda özellikle TPM'in hipokampüsdeki piramidal nöronlar üzerinde olan etkisine yoğunlaştık. Kudin ve arkadaşları (29) yaptıkları kronik bir çalışmada 20-100 mg/kg dozlarda uyguladıkları TPM tedavisi sonucu CA1 ve CA3 bölgelerindeki piramidal hücrelerin yaşam sürelerini doza bağlı olarak TPM'in arttırdığını bulmuşlardır. TPM'in bu nöron koruyucu etkisinin direk olarak mitokondriyal porların (MPT) geçirgenliği üzerinde inhibe edici etkisinden dolayı olabileceğini bildirmektedirler. Hücre ölümünde, yüksek sitozolik Ca^{++} 'un, MPT'nin açılmasını tetiklediği ve böylelikle mitokondri membranında depolarizasyonun şekillendiği, buna bağlı olarak da nöronal hücre ölümünün geliştiği bildirilmektedir. Kudin ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada yüksek Ca^{++} konsantrasyonu ile indüklenen mitokondri membran depolarizasyonuna karşı TPM'in koruyucu etkisinin olabileceğini bulmuşlardır. Araştırmacılar TPM'in etkisi sonucu MPT porlarının inhibe olmasıyla nöronal Ca^{++} seviyesinin düşeceğini, Ca^{++} 'un depolarize edici etkisinin ortadan kalkacağını ve böylelikle nöronun yaşam süresinin artmış olacağını ileri sürmektedirler. Yapılan in vitro çalışmalarda sıçan beyninden izole edilen mitokondrielerde TPM'in mitokondriyal oksidatif fosforilasyon üzerine direkt etkisinin olmadığı bildirilmektedir. Ancak eksternal Ca^{++} akışına karşı hipokampal mitokondrieler üzerinde koruyucu etkili olduğu bildirilmektedir. Ayrıca TPM'in mitokondride biriken Ca^{++} 'un kinetiği üzerine etkili olmadığı, yalnızca MPT'nin açılması için gereken Ca^{++} miktarını etkilediği bildirilmektedir (29). TPM'in mitokondriyal Ca^{++} alımı üzerine etkisi, TPM'in mitokondriyal Ca^{++} taşıyıcıları üzerine veya MPT porları üzerine inhibitör etkili olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak Kudin ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada bizden farklı olarak TPM'in nöroprotektif etkisini saptamış olmaları kronik ve in vitro ortamda çalışmış olmalarından kaynaklanıyor olabilir. Lee ve arkadaşları (99) yapmış oldukları bir iskemi çalışmasında bizim bulgularımızı destekler nitelikte 50 mg/kg dozda uyguladıkları TPM'in CA1 alanında nöron hasarı üzerinde etkisiz olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca Cha ve arkadaşları (2) yaptığı TPM tedavisi ile ilgili bir başka çalışmada ise 80 mg/kg dozda 4 hafta boyunca TPM uygulamışlardır. Sonuçta TPM tedavisinin nöronlardaki hücre kaybı üzerinde nöroprotektif etkisinin olmadığını bulmuşlardır. Her ne kadar çalışmamız akut olsa da Cha ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Beyindeki toplam çinkonun yaklaşık % 10'u glutamaterjik nöronların sinaptik vezikülleri içinde bulunurken, % 90 civarı ise metalloproteinler tarafından tutulur (44). Bu metal bağlayan proteinlere sıkıca bağlı olan metabolik çinkonun aksine vezikuler çinko serbesttir veya zayıfca bağlıdır. Bu yüzden sinaptik veziküllerdeki çinko, seçici floresan boyamalar ile saptanabilmektedir, yani histokimyasal açıdan reaksiyon veren veziküler çinkodur (50-58). Veziküler çinkonun memeli beyinde sinaptik nörotransmisyonunda rol oynadığı ve NMDA, AMPA/Kainat, GABA reseptörleri gibi birkaç önemli reseptörün endojen nöromodülatörü olduğu düşünülmektedir (45, 48, 59). Çinkonun glutamat ile beraber salınımı NMDA, AMPA/Kainat reseptörlerinin aktivasyonu ve eksitasyon ile ilişkilidir. Veziküler çinkonun glutamat ile beraber travma, epilepsi gibi durumlardan sonra salınımı şaşırtıcı değildir. Çinko çok yüksek dozda salındığı zaman NMDA, AMPA/Kainat aktivasyonu yoluyla nörotoksik bir hal almaktadır. Çinko iyonları ile TPM'in etkilediği reseptörlerin aynı olmasına (NMDA, AMPA/KA, GABA_A) dayanılarak, akut TPM tedavisinin, çinko translokasyonu üzerine olan etkisinin ve nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, 60 mg/kg dozda uygulanan TPM'in etkisinin saptanmamış olması belkide çalışmamızın akut olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak biz 60 mg/kg dozda uygulanan TPM'in ECoG üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığını, davranışsal değişiklikler açısından anlamlı sonuç vermediğini, hipokampüsde CA1 ve CA3 alanlarındaki piramidal hücreler üzerinde koruyucu etkisinin bulunmadığını, beyindeki çinko translokasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını gözlemledik.

Ayrıca çinkonun epileptik nöbetler ve iskemi, beyin travması gibi olaylar sonrasında hipokampüsde postsinaptik nöronlarda hücre ölümüne sebep olması nedeniyle ve literatürde TPM ve çinko histokimyası ile ilgili olarak bizi olumsuz ya da olumlu yönde destekleyecek bir bilgiye rastlayamamış olmamız nedeniyle TPM'in çinko iyonlarının translokasyonu üzerindeki kronik etkilerinin araştırılacağı bir nöbet çalışmasının yapılmasını önemli kılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. TUCKER GM. Oral anticonvulsants used in the chronic management of seizure disorders. P& T, 27(2): 96-102, 2002.
2. CHA BH, SILVEIRA DC, LIU X, HU Y, HOLMES GL. Effect of topiramate following recurrent and prolonged seizures during early development. Epilepsy Research, 51: 217-232, 2002.
3. KARAMUSTAFALIOGLU O, DEMIRKIRAN S. Psikiyatrik bozukluklarda topiramate kullanımını. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 14: 26-37, 2004.
4. NAKAMURA J, TAMURA S, KANDA T, ISHII A, ISHIHARA K, SERIKAWA T, YAMADA J, SASA M. Inhibition by topiramate of seizures in spontaneously epileptic rats and DBA/2 mice. European Journal of Pharmacology, 254: 83-89, 1994.
5. SHANK RP, GARDOCKI JF, VAUGHT JL. Topiramate: preclinical evaluation of structurally novel anticonvulsant. Epilepsia, 35: 450-460, 1994.
6. WAUQUIER A, ZHOU S. Topiramate: a potent anticonvulsant in the amygdala-kindled rat. Epilepsy Research, 24: 73-77, 1996.
7. WHITE HS, BROWN SD, WOODHEAD JH, SKEEN GA, WOLF HH. Topiramate enhances GABA mediated chloride flux and GABA evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. Epilepsy Research, 28:167-179, 1997.
8. WILLMORE LJ. Antiepileptic drugs and neuroprotection: Current status and future roles. Epilepsy & Behaviour, 7: 25-28, 2005.
9. ZENBİLCİ N. Sinir Sistemi Hastalıkları, 3.Baskı, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul, 625-661, 1995.
10. LOSCHER W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. TRENDS in Pharmacological Sciences, 23(3): 113-118, 2002.
11. BLACKBURN TP, SLOVITER RS. Epilepsy, parkinson's disease, migraine and brain plasticity-the next paradigm shift ? Current Opinion in Pharmacology, 3: 3-5, 2003.
12. McNAMARA JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. The Journal of Neuroscience, 14(6): 3413-3425, 1994.
13. VELEZ L, SELWA LM. Seizure disorders in the elderly. The Lancet, 356(9226): 323-329, 2000.
14. KAYAALP O. Antiepileptik ilaçlar, Cilt 2, 7. Baskı, Tıbbi Farmakoloji, Ankara,

2027-2053, 1995.

15. GALE K. Progression and generalization of seizure discharge: anatomical and neurochemical substrates. *Epilepsia*, 28(21): 515-534, 1988.

16. JOHANNESSEN S, GRAW L, SILLANPAA M, TOMSON T. *Intractable Epilepsy*. Wrightson Biomedical Publishing Ltd., 1995.

17. LAIDLAW J, RICHENS A, CHADWICK D. *A Textbook of Epilepsy*. Churchill-Livingstone, 1993.

18. ÖZEKMEKÇİ S, APAYDIN H. *Nöroloji*, 2. Baskı, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul, 1995.

19. Commission on classification and terminology of the international league against epilepsy, Proposal for revised classification of epilepsy and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 30: 389-399, 1989.

20. AKMAN O. Geçirilmiş febril konvulsiyonların generalize tonik-klonik ve absans epilepsiler üzerine etkisi. *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Kocaeli, 2004.

21. SODERPALM B. Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. *European Journal of Pain*, 6: 3-9, 2002.

22. CZAPINSKI P, BLASZCZYK B, CZUCZWAR SJ. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr. Top. Med. Chem*, 5(1): 3-14, 2005.

23. SANKAR R, HOLMES GL. Mechanisms of action for the commonly used antiepileptic drugs: relevance to antiepileptic drug-associated neurobehavioral adverse effects. *J. Child Neurol.*, 19(1): 6-14, 2004.

24. MACDONALD RL, KELLY KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia*, 36(2): 2-12, 1995.

25. SILLS GJ, BRODIE MJ. Update on the mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Epileptic Disorder*, 3(4): 165-172, 2001.

26. BOURGEOIS BF. New antiepileptic drugs. *Current Opinion Pediatr.*, 8: 543-548, 1996.

27. BIALER M, JOHANNESSEN SI, KUPFERBERG HJ. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference. *Epilepsy Research*, 34: 1-41, 1999.

28. RIGOULOT, KONING E, FERRANDON A, NEHLIG A. Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(2): 787-795, 2004.

29. KUDIN AP, DEBSKA-VIELHABER G, VIELHABER S, ELGER CE, KUNZ WS. The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia*, 45(12): 1478-1487, 2004.
30. RIGOULOT MA, BOEHRER A, NEHLIG A. Effects of topiramate in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the audiogenic Wistar AS. *Epilepsia*, 44(1): 14-19, 2003.
31. BOROWICZ KK, LUSZCZKI JJ, DUDA AM, CZUCZWAR SJ. Effect of topiramate on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in two models of experimental epilepsy. *Epilepsia*, 44(5): 640-646, 2003.
32. RUSSO E, CONSTANTINI A, FERRERI G, CITRARO R, DE SARRO G. Nifedipine effects the anticonvulsant activity of topiramate in various animal models of epilepsy. *Neuropharmacology*, 46: 865-878, 2004.
33. KAMINSKI RM, BANERJEE M, ROGAWSKI MA. Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology*, 46: 1097-1104, 2004.
34. FISHER A, WANG X, COCK HR, THOM M, PATSALOS PN, WALKER MC. Synergism between topiramate and budipine in refractory status epilepticus in the rat. *Epilepsia*, 45(11): 1300-1307, 2004.
35. KOH S, JENSEN FE. Topiramate blocks perinatal hypoxia-induced seizures in rat pups. *Ann. Neurol.*, 50: 366-372, 2001.
36. NIEBAUER M, GRUENTHAL M. Topiramate reduces neuronal injury after experimental stetus epilepticus. *Brain Research*, 837: 263-269, 1999.
37. GLAUSER T. Topiramate. *Epilepsia*, 40(5): 71-80, 1999.
38. ALVES OL, DOYLE AJ, CLAUSEN T, GILMAN C, BULLOCK R. Evaluation of topiramate neuroprotective effect in severe TBI using microdialysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 993: 25-34, 2003.
39. KANDA T, KUROKAWA M, TAMURA S, NAKAMURA J, ISHII A, KUWANA Y, SERIKAWA T, YAMADA J, ISHIHARA K, SASA M. Topiramate reduces abnormally high extracellular levels of glutamate and aspartate in the hippocampus of spontaneously epileptic rats (SER). *Life Science*, 59(19): 1607-1616, 1996.
40. BIGAL ME, RAPOPORT AM, SHEFTELL FD, TEPPER SJ. New migraine preventive options: an update with pathophysiological considerations. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, 57(6): 293-298, 2002.

41. STANDSTEAD HH, FREDERICKSON CJ, PENLAND JG. History of zinc as related to brain function. *J. Nutr.*, 130: 496-502, 2000.
42. LIN DD, COHEN AS, COULTER DA. Zinc induced augmentation of excitatory synaptic currents and glutamate receptor responses in hippocampal CA3 neurons. *J. Neurophysiol*, 85: 1185-1196, 2001.
43. GARCIA CL, VAREA E, PALOP JJ, NACHER J, RAMIREZ C, PONSODA X, MOLOWNY A. Cytochemical techniques for zinc and heavy metals localization in nerve cells. *Microscopy Research and Technique*, 56: 318-331, 2002.
44. TAKEDA A, MINAMI A, SEKI Y, OKU N. Differential effects of zinc on glutamatergic and GABAergic neurotransmitter systems in the hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 75: 225-229, 2004.
45. WEISS JH, SENSI SL, KOH JY. Zn^{2+} : a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends in Pharmacological Science (TIPS)*, 21: 395-401, 2000.
46. FREDERICKSON CJ. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.*, 31: 145-238, 1989.
47. FREDERICKSON CJ, KLITENICK MA, MANTON WI, KIRKPATRICK JB. Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Research*, 273: 335-339, 1983.
48. DUDEK FE. Zinc and epileptogenesis. *Epilepsy Currents*, 1(2): 66-70, 2001.
49. FREDERICKSON CJ, DANSCHER G. Zinc containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Prog. Brain Res.*, 83: 71-74, 1990.
50. DANSCHER G. The autometallographic zinc-sulphide method. A new approach involving in vivo creation of nanometer-sized zinc sulphide crystal lattices in zinc-enriched synaptic and secretory vesicles. *Histochem. J.*, 28(5): 361-373, 1996.
51. PERUCCA EA. Pharmacological and clinical review on topiramate, a new antiepileptic drug. *Pharmacol. Res.*, 35: 241-256, 1997.
52. FREDERICKSON CJ, KASARKIS EJ, RINGO D, FREDERICKSON RE. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J. Neurosci. Methods*, 20: 91-103, 1987.
53. BUDDE T, MINTA A, WHITE JA, KAY AR. Imaging free zinc in synaptic terminals in live hippocampal slices. *Neuroscience*, 79: 347-358, 1997.
54. SUH SW, LISTIACK K, BELL B, CHEN J, MOTAMEDI M, SILVA D, DANSCHER G, WHETSELL W, THOMPSON R, FREDERICKSON C. Detection of pathological zinc accumulation in neurons: methods for autopsy, biopsy, and cultured tissue. *J. Histochem.*

Cytochem., 47: 969-972, 1999.

55. LEE JY, PARK J, KIM YH, KIM DH, KIM CG, KOH JY. Induction by synaptic zinc of heat shock protein-70 in hippocampus after kainate seizures. *Exp. Neurol.*, 161: 433-441, 2000.

56. DANSCHER G, HOWELL G, PEREZ-CLAUSELL J, HERTEL N. The dithizone, Timm's sulphide silver and the selenium methods demonstrate a chelatable pool of zinc in CNS: a proton activation (PIXE) analysis of carbon tetrachloride extracts from rat brains and spinal cords intravitally treated with dithizone. *Histochemistry*, 83: 419-422, 1985.

57. PEREZ-CLAUSELL J, DANSCHER G. Release of zinc sulphide accumulations into synaptic clefts after in vivo injection of sodium sulphide. *Brain Research*, 362: 358-361, 1986.

58. PEREZ-CLAUSELL J, DANSCHER G. "Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons: a histochemical study. *Brain Research*, 337: 91-98, 1985.

59. SMART TG, XIE X, KRISHEK BJ. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog. Neurobiol.*, 42: 393-441, 1994.

60. SUH SW, CHEN JW, MOTAMEDI M, BELL B, LISTIAK K, PONS NF, DANSCHER G, FREDERICKSON CJ. Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Research*, 852: 268-273, 2000.

61. FREDERICKSON CJ, HERNANDEZ MD, GOIK SA, MORTON JD, MCGINTY JF. Loss of zinc staining from hippocampal mossy fibers during kainic acid induced seizures: a histofluorescence study. *Brain Research*, 480: 317-321, 1988.

62. FREDERICKSON CJ, HERNANDEZ MD, MCGINTY JF. Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Research*, 480(1-2): 317-321, 1989.

63. TONDER N, JOHANSEN FF, FREDERICKSON CJ, ZIMMER J, DIEMER NH. Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat. *Neuroscience Letter*, 109: 247-252, 1990.

64. KOH JH, SUH SW, GWAG BJ, HE YY, HSU CY, CHOI DW. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science*, 272: 1013-1016, 1996.

65. PETERS S, KOH J, CHOI DW. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science*, 236: 589-593, 1987.

66. WESTBROOK GL, MAYER ML. Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature*, 328: 640-643, 1987.

67. MITCHELL CL, BARNES MI. Proconvulsant action of diethyldithiocarbamate in stimulation of the perforant path. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15: 165-171, 1993.

68. MORTON JD, HOWELL GA, FREDERICKSON CJ. Effects of subcutaneous injections of zinc chloride on seizures induced by noise and by kainic acid. *Epilepsia*, 31: 139-144, 1990.
69. KOH JY, CHOI DW. Zinc alters excitatory amino acid neurotoxicity on cortical neurons. *J. Neurosci.*, 8: 2164-2171, 1988.
70. DANSCHER G, JUHL S, STOLTENBERG M, KRUNDERUP B, SCHRODER HD, ANDREASEN A. Autometallographic silver enhancement of zinc sulfide crystals created in cryostat sections from human brain biopsies: a new technique that makes it feasible to demonstrate zinc ions in tissue sections from biopsies and early autopsy material. *J. Histochem. Cytochem.*, 45: 1503-1510, 1997.
71. SENSI SL, YIN HZ, CARRIEDO SG, RAO SS, WEISS JH. Preferential Zn^{2+} influx through Ca^{2+} -permeable AMPA/Kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 2414-2419, 1999.
72. YIN HZ, HA DH, CARRIEDO SG, WEISS JH. Kainate-stimulated Zn^{2+} uptake labels cortical neurons with Ca^{2+} -permeable AMPA/Kainate channels. *Brain Res.*, 781: 45-55, 1998.
73. YIN HZ, WEISS JH. Zn^{2+} permeates Ca^{2+} permeable AMPA/Kainate channels and triggers selective neural injury. *NeuroReport*, 6: 2553-2556, 1995.
74. MOLNAR P, NADLER JV. Synaptically-released zinc inhibits N-methyl- D- aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. *Brain Research*, 910: 205-207, 2001.
75. VOGT K. et al. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 26, 187-196, 2000.
76. LEE JY, COLE TB, PALMITER RD, KOH JY. Accumulation of zinc in degenerating hippocampal neurons of ZnT3-Null mice after seizures: evidence against synaptic. *The Journal of Neuroscience*, 20: RC79, 1-5, 2000.
77. FREDERICKSON CJ, SUH SW, SILVA D, FREDERICKSON CATHY J, THOMPSON RB. Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. *J. Nutr.*, 130: 1471-1483, 2000.
78. PALMITER RD, COLE TB, QUAIFE CF, FINDLEY SD. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:14934-14939, 1996.
79. WENZEL HJ, COLE TB, BOM DE, SCHWARTZKROÏN PA, PALMITER RD. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 12676-12681, 1997.
80. PAXINOS G, WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edition, Academic Press, California, 1997.

81. RACINE R. Modification of seizure activity by electrical stimulation, II motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 32: 281-294, 1972.
82. HOSFORD DA, WANG Y. Utility of the lethargic (lh/lh) Mouse model of absence seizures in predicting the effects of lamotrigine, vigabatrin, tiagabine, gabapentin and topiramate against human absens seizures. *Epilepsia*, 38: 408-414, 1997.
83. GRABENSTATTER HL, FERRARO DJ, WILLIAMS PA, CHAPMAN PL, DUDEK FE. Use of chronic epilepsy models in antiepileptic drug discovery: The effect of topiramate on spontaneous motor seizures in rats with kainate induced epilepsy. *Epilepsia*, 46(1): 8-14, 2005.
84. EDMONDS HL Jr, JIANG YD, ZHANG PY. Anticonvulsant activity of topiramate and phenytoin in a rat model of ischemia induced epilepsy. *Life Science*, 59: 127-131, 1996.
85. WHITE HS, BROWN SD, WOODHEAD JH, SKEEN GA, WOLF HH. Topiramate modulates GABA evoked current in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. *Epilepsia*, 41(1): 17-20, 2000.
86. HAUGVICOVA R, KUBOVA H, SKUTOVA M. Anticonvulsant action of topiramate against motor seizures in developing rats. *Epilepsia*, 41: 1235-1240, 2000.
87. SILLS GJ, LEACH JP, KILPATRICK WS. Concentration effect studies with topiramate on selected enzymes and intermediates of the GABA shunt. *Epilepsia*, 41(1):30-34, 2000.
88. KOHLING R, VREUGDENHIL M, BRACCI E. Ictal epileptiform activity is facilitated by hippocampal GABA_A receptor mediated oscillations. *Journal of Neuroscience*, 20: 6820-6829, 2000.
89. PETROFF OAC, HYDER F, MATTSON RH. Topiramate increases brain GABA, homocarnosine and pyrrolidinone in patients with epilepsy. *Neurology*, 52: 473-478, 1999.
90. PLACIDI F, TOMBINI M, ROMIGI A, BIANCHI L, IZZI F, SPERLI F, MATTIA D, CERVELLINO A, MARCIANI MG. Topiramate: effect on EEG interictal abnormalities and background activity in patients affected by focal epilepsy. *Epilepsy Research*, 58: 43-52, 2004.
91. ANDRE V, MARESCAUX C, NEHLIG A, FRITSCHY JM. Alterations of hippocampal gabaergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 11: 452-468, 2001.
92. ROCH C, LEROY C, NEHLIG A, NAMER IJ. Magnetic resonance imaging in the study of the lithium pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia*, 43: 325-335, 2002.
93. NOYAN B. Temporal lob epilepsisinde L-Arjinin ve CaEDTA'nın etkileri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 31(1): 15-19, 2005.

94. NOYAN B, JENSEN MS, DANSCHER G. The lack of effects of zinc and nitric oxide in initial satateof pilocarpine induced seizures. *Seizure*, 16: 410-416, 2007.
95. GIBSS JW, SOMBATI S, DELORENZO RJ, COULTER DA. Cellular actions of topiramate: blockade of kainate evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia*, 41(1): 10-16, 2000.
96. ZHANG X, VELUMIAN AA, JONES OT, CARLEN PL. Modulation of high voltage activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. *Epilepsia*, 41(1): 52-60, 2000.
97. ZONA C, CIOTTI MT, AVOLI M. Topiramate attenuates voltage gated sodium currents in rat cerebellar granule cells. *Neuroscience Letters*, 231: 123-126, 1997.
98. OZAWA S, KAMIYA H, TSUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 54: 581-618, 1998.
99. LEE SR, KIM DP, KIM JE. Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. *Neuroscience Letters*, 281: 183-186, 2000.

TEŞEKKÜR

Tezimin belirlenmesi aşamasından başlayarak her basamakta benden yardımlarını esirgemeyen, danışman hocam Doç. Dr. Behzat Noyan'a, laboratuvarlarını kullanmama izin veren ve kendimi bölümlerinin bir üyesi gibi hissetmemi sağlayan Fizyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Kasım Özlük başta olmak üzere tüm öğretim üye ve elemanlarına, asistanlığımın başından bu yana bana emek veren değerli hocalarım Prof. Dr. Kemalettin Yaman, Prof. Dr. Fahrünisa Cengiz, Prof. Dr. Nurten Galip, Doç. Dr. Cenk Aydın'a, deneylerim esnasında kullanma zorunluluğu olan bazı sarf malzemelerin teminini sağlayan Farmalokoji ve Klinik Farmakoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Vahide Savcı'ya, kriostatlarını kullanma olanağı sağlayan Patoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Ömer Yerci'ye ve Prof. Dr. Oktan Erol'a, kesit alırken yaşadığım her türlü zorluklara benimle katlanan değerli sağlık teknisyenleri Mukaddes Öztürk'e, sarf malzeme ihtiyacı ve mikroskop desteği açısından emeklerini ve bilgilerini benden esirgemeyen Histoloji Embriyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. İlkin Çavuşoğlu, Prof. Dr. Semiha Noyan, Doç. Dr. Zehra Minbay ve Doç. Dr. Özhan Eyigör'e, - 80 °C soğutucularını kullanmama olanak sağlayan Biyokimya ABD öğretim üyelerine, floresan boyamalarım esnasında mikroskoplarını kullanma olanağı sağlayan Tıbbi Genetik ABD Başkanı Yrd. Doç. Dr. Tuna Gülten'e ve Doç. Dr. Tahsin Yakut'a, manevi desteklerinden ötürü Uzm. Dr. Şehime Temel'e, boyamalarım esnasında bana her konuda destek olan Dr. Mutlu Karkucak'a, nöron sayımı esnasında bilgisayar ve mikroskoplarını kullanmama olanak sağlayan Anatomi ABD öğretim üyesi Doç. Dr. Ayberk Kurt ve Uzm. Dr. İlker Kafa'ya, tezimin istatistik kısmında benden yardımlarını esirgemeyen U. Ü. Vet. Fak. Zootekni ABD Öğretim Üyesi Doç. Dr. Faruk Balcı ve Vet Fak. Biyokimya ABD Araştırma Görevlisi Duygu Udum'a, laboratuvarında teknik anlamda başım her sıkıştığında yardımına koşan Fizyoloji ABD Teknisyeni Nizamettin Toprak'a, deneysel çalışmalarım boyunca her türlü yardımı sağlayan U. U. Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına özellikle Vet. Hek. Faruk Küçük yıldız, Erol İlhan ve Hüseyin Yılmaz'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu günlere gelmemdeki manevi ve maddi destekleri nedeni ile sevgili aileme, tezimin yazım aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen kardeşime, hafta sonları hayvan deneylerim esnasında bana yardımcı olan eşime, tezime başladığım günden bu yana elini hep

omzumda hissettiğim Deniz Hilhorst, Tolga Güler ve Nevriye Alkaya'ya sonsuz teŖekkrler....

ÖZGEÇMİŞ

1979 Bursa doğumluyum. 1991 yılında Altıparmak İlkokulu'nu bitirdikten sonra orta okul ve lise öğrenimimi 1996 yılında Bursa Atatürk Lisesi'nde tamamladım. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun olduktan sonra aynı yıl Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde doktora eğitimime başladım ve aynı yerde araştırma görevlisi kadrosuna atandım. Halen Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji ABD'nda doktora öğrencisi ve araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve Türk Fizyolojik Bilimler Derneği üyesiyim.