



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA PENİSİLİN İLE OLUŞTURULAN

EPİLEPSİYE ERİTROPOETİNİN ETKİSİ

Dr. ŞULE BULUR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DÜZCE-2010



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA PENİSİLİN İLE OLUŞTURULAN

EPİLEPSİYE ERİTROPOETİNİN ETKİSİ

Dr. ŞULE BULUR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. ŞERİF DEMİR

DÜZCE-2010

ÖNSÖZ

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilimdalı'nda hazırlamış olduğum tıpta uzmanlık tezimin tüm aşamalarında ve uzmanlık eğitimim süresince her türlü yardım ve desteğinden dolayı tez danışmanım Doç.Dr. Şerif DEMİR'e teşekkür ederim. Tıpta uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Yrd.Doç.Dr. Fatih GÖKÇE'ye, tez hazırlama aşamasındaki yardımları, deneylerin yorumlanması ve analizindeki katkılarından dolayı Yrd.Doç.Dr. Seyit ANKARALI'ya, istatistiki analizlerin yapılmasında yardımını esirgemeyen Doç.Dr. Handan ANKARALI'ya ve desteklerinden dolayı Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte olduğumuz çalışma arkadaşlarıma, tıpta uzmanlık eğitimi ve tez hazırlama dönemlerinde desteğini esirgemeyen sevgili eşim Dr. Serkan BULUR'a ve aileme teşekkür ederim.

Eylül, 2010

Şule BULUR

TÜRKÇE ÖZET

SIÇANLARDA PENİSİLİN İLE OLUŞTURULAN EPİLEPSİYE ERİTROPOETİNİN ETKİSİ

Çalışmamızda, sitokin bir hormon olan eritropoetinin (Epo) 2000-4000-6000 I.U./kg intraperitoneal (i.p.) dozlarının penisilinle oluşturulan deneysel epilepsi üzerine etkilerini elektrokortikografi (ECoG) kaydıyla incelemeyi amaçladık.

Deneylerde 200-250 gr ağırlığında, 39 adet Wistar-Albino cinsi, erkek erişkin sıçan kullanıldı. Deney grupları penisilin uygulanan kontrol (n=10) grubu, penisilin + 2000 I.U./kg Epo (n=10), penisilin + 4000 I.U./kg Epo (n=9), penisilin + 6000 I.U./kg Epo (n=10) grupları olarak planlandı. Üretan anestezisi altında ECoG kaydına başlandı. Kayıtlar devam ederken tüm hayvanlara 500 I.U./2.5 µl intrakortikal penisilin uygulanarak epileptiform aktivitenin oluşturulması sağlandı. Diken ve diken dalgaların kararlı hale gelmesinden sonra gruplara belirtilen dozlarda Epo enjeksiyonu i.p. olarak yapıldı. Kayıtlara 120 dakika daha devam edildi. Alınan kayıtların analizinde Epo öncesi 10 dakikalık ve Epo sonrası 10'ar dakikalık zaman periyotlarındaki diken dalgaların sayı/dk. ve genlik değerleri hesaplandı. Grupların Epo sonrası periyotlardaki değerlerinin başlangıç değerlerine göre değişimi istatistiksel olarak analiz edildi. Karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve anlamlı farklılıklar Tukey post hoc testi ile belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre epileptiform aktivitenin diken dalga sayı/dk ve genliğinde 2000 I.U./kg Epo'nun anlamlı değişikliğe neden olmadığı saptandı. Buna karşılık 4000 ve 6000 I.U./kg Epo'nun dakikadaki ortalama diken dalga sayısını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı bulundu ($p < 0,05$). Sırasıyla 4000 ve 6000 I.U./kg Epo gruplarında Epo'nun bu azaltıcı etkileri 11-60. dakikalar arası periyotlarda ve 21-60. dakikalar arası periyotlarda gözlemlendi. Her iki grupta da diken dalga genliğinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

Eritropoetinin sıçanlarda penisilin ile oluşturulan epileptiform aktiviteyi azaltıcı etkisi gelecekte bu maddenin antiepileptik özelliklerinden faydalanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Elektrokortikografi, epilepsi, eritropoetin, penisilin, sıçan.

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN ON THE PENICILLIN-INDUCED EPILEPSY IN RATS

We aimed to study the effects of dose 2000-4000-6000 I.U./kg intraperitoneal of erythropoietin (Epo) which is a cytokine hormone on penicillin induced epilepsy by electrocorticography (ECoG) records.

Thirty-nine adult, male Wistar-Albino rats weighing 200-250 g were used in experiments. Experimental groups planned as penicillin (control) grup, penicillin + 2000 I.U./kg Epo (n=10), penicillin + 4000 I.U./kg Epo (n=9), penicillin + 6000 I.U./kg Epo (n=10) groups. ECoG recordings were started under urethane anesthesia. While the record was taken epileptiform activity was achieved by application of 500 I.U./2.5 µl intracortical penicillin to all animals. After spike waves become stable indicated doses of Epo were injected intraperitoneally to the groups. More than 120 minutes were recorded. In the analysis of taken records, the spikes and spike waves (number/minutes) and amplitude values were evaluated 10 minutes before application of Epo and 10 minutes intervals in total 120 minutes after application of Epo. Intervals values of Epo after application compared to baseline values and changes were statistically analyzed. One way variance analysis was used for comparisons and different groups were evaluated by Tukey Post hoc test.

According to the results 2000 I.U./kg Epo did not cause significant changes in epileptiform activity of spike-waves (number/minute) and amplitudes. Whereas in 4000 and 6000 I.U./kg Epo groups compared to control the average number of spikes and sipkes waves (number/minutes) a statistically significant reduction was found ($p < 0,05$). Respectively in 4000 and 6000 I.U./kg Epo groups, the reduction effect of Epo was observed in the period between 11-60 minutes and 21-60. In both grups, no significant changes were observed in spike wave amplitudes.

The reducing effects of Epo on penicillin-induced epileptiform activity in rats suggest tahat antiepileptic properties of this material can be benefited in the future.

Key words: Electrocorticography, erythropoietin, epilepsy, penisillin, rat.

SİMGE ve KISALTMALAR

Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
ECoG	: Elektrokortikografi
EEG	: Elektroensefalografi
Epo	: Eritropoetin
EpoR	: Eritropoetin reseptörü
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
GAERS	: Strasbourg'dan genetik absans epilepsili sıçan
GABA	: Gamma aminobütirik asit
GEPR	: Genetik olarak epilepsiye eğilimli sıçan
GHB	: Gamma-hidroksi bütirat
HIF	: Hipoksik indüklenebilir faktör
i.c.	: İntrakortikal
i.p.	: İntraperitoneal
i.v.	: İntravenöz
ILAE	: Uluslar arası Epilepsi ile Savaş Derneği
JAK	: Janus kinaz
K ⁺	: Potasyum
MAPK	: Mitojen aktive eden protein kinaz
MES	: Maksimum elektroşok
NFκB	: Nükleer faktör kappa B
NMDA	: N-metil D- aspartat
NO	: Nitrik oksit
PI3K	: Fosfoinozitol 3 kinaz
PTZ	: Pentilen tetrazol
rHuEpo	: Rekombinant insan eritropoetini
s.c.	: Subkutan
SE	: Status epileptikus
SH2	: Src homolog 2
SSS	: Santral sinir sistemi
STAT	: Transkripsiyonun sinyal dönüştürücü ve aktivatörü
THIP	: Tetra hidroksi izoksazol piridin
TISH	: Telensefalik iç yapısal heterotopili mutant sıçanlar
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
WAG-Rij	: Wistar albino Glaxo-Rijswijk

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epilepsi.....	4
2.1.1. Epilepsi ve nöbet tanımı	4
2.1.2. Epilepsi insidans ve prevelansı	5
2.1.3. Epilepsinin sebepleri.....	5
2.1.4. Epilepsinin patofizyolojisi	7
2.1.5. Epilepsinin sınıflandırılması	9
2.2. Deneysel Modeller	13
2.2.1. Deneysel modellere genel bir bakış.....	14
2.2.2. Basit parsiyel nöbet modelleri.....	15
2.2.3. Kompleks parsiyal nöbet modelleri.....	15
2.2.4. Generalize absans nöbet modelleri.....	15
2.2.5. Generalize tonik-klonik nöbet modelleri	16
2.2.6. Status epileptikus modelleri	16
2.2.7. Penisilin modeli.....	16
2.3. Elektrokortikografi (ECoG) ve Elektroensefalografi (EEG).....	17
2.4. Eritropoetin	19
2.4.1. Eritropoetinin yapısı	19
2.4.2. Eritropoetinin sentez yeri.....	20
2.4.3. Eritropoetin salınımının düzenlenmesi.....	21
2.4.4. Eritropoetinin farmakokinetiği.....	23
2.4.5. Eritropoetin reseptörü	23
2.4.6. Eritropoetin ve reseptör etkileşimi	26
2.5. Eritropoetinin Etkileri.....	27
2.5.1. Nöroprotektif etkide sinaptik nörotransmisyonun düzenlenmesi	30
2.5.2. Antiapoptotik etki.....	31
2.5.3. Antioksidatif etki.....	32
2.5.4. Anjiogenik etki.....	33
2.5.5. Nörotrofik etki.....	33
2.5.6. Nörojenik etki.....	34
2.5.7. Antiinflamatuvar etki.....	35
2.6. Eritropoetinin Klinikte Kullanıldığı Durumlar	36
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	37
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplar	37
3.2. Kullanılan Araçlar.....	37
3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulanma Yolları.....	38
3.4. Deneylerin Yapılışı	39
3.4.1. Cerrahi operasyon.....	39
3.4.2. ECoG kaydı alınması.....	39
3.4.3. Epileptiform aktivitenin oluşturulması.....	40
3.4.4. Deney gruplarına madde uygulanması	40
3.4.5. Elektrofizyolojik kayıtların değerlendirilmesi	41
3.5. İstatiksel Analiz	41
4. BULGULAR	43

4.1. İntrakortikal Penisilin ile Oluşturulan Epileptiform Aktivitenin Özellikleri (Kontrol Grubu)	43
4.1.1. Diken dalga sayısına etkisi.....	44
4.1.2. Diken dalga genliğine etkisi.....	44
4.2. İntraperitoneal Uygulanan 2000 I.U./kg Epo'nun Penisilinin Oluşturduğu Epileptiform Aktiviteye Etkisi.....	45
4.2.1. Diken dalga sayısına etkisi.....	45
4.2.2. Diken dalga genliğine etkisi.....	45
4.3. İntraperitoneal Uygulanan 4000 I.U./kg Epo'nun Penisilinin Oluşturduğu Epileptiform Aktiviteye Etkisi.....	47
4.3.1. Diken dalga sayısına etkisi.....	47
4.3.2. Diken dalga genliğine etkisi.....	47
4.4. İntraperitoneal Uygulanan 6000 I.U./kg Epo'nun Penisilinin Oluşturduğu Epileptiform Aktiviteye Etkisi.....	48
4.4.1. Diken dalga sayısına etkisi.....	48
4.4.2. Diken dalga genliğine etkisi.....	49
4.5. Uygulanan Tüm Dozlardaki Epo'nun Penisilinin Oluşturduğu Epileptiform Aktiviteye Etkilerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları	50
4.5.1. Diken dalga sayısına etkisi.....	50
4.5.2. Diken dalga genliğine etkisi.....	52
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇLAR.....	60
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	70

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi, serebral orijinli tekrarlayan nöbetlerle karakterize klinik bir durumdur (1). Toplum nüfusunun %1-3'ünü etkileyen yaygın bir kronik nörolojik bozukluk olup genel popülasyonun yaklaşık %10'u hayatlarının bir döneminde bir veya birden fazla nöbet geçirmektedirler (2). Epileptik nöbet fizyolojik olarak, santral sinir sisteminin (SSS) elektriksel aktivitesinin ani, paroksizmal, yüksek ya da düşük frekanslı veya senkronize, düşük frekanslı, yüksek voltajlı elektirik deşarj ile sonuçlanan değişikliğıdir ve bu deşarj serebral korteksin herhangi bir yerinde veya subkortikal yapılarıdaki uyarılabilir nöron topluluğunun eş zamanlı tetiklenmesi ile oluşur. Uygun şartlar oluştuğunda tamamen normal bir serebral kortekte epileptik deşarj ortaya çıkabilmektedir (3). Tüm epilepsi tiplerinin genel özelliğı, sinir hücre gruplarının eş zamanlı ve kontrolsüz deşarjlarıdır. Bu deşarjları başlatan ve sürdüren mekanizmalar epilepsi tiplerine göre farklılıklar gösterir ancak henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (4).

Yapılan çalışmalar epilepsinin, uyarıcı ve inhibe edici girişlerin dengesinin değışimi sonrası meydana geldiğini göstermektedir. Bazı nöbet tipleri için talamusta yer alan T-tipi Ca^{++} kanallarının rolü kanıtlanmış olsa da çoğı epilepsi nöbetlerinin kortikal mekanizmalarla tetiklendiğı görüşü giderek ağırlık kazanmaktadır. Tüm çalışmalar gamma amino bütirik asitin (GABA) aracılık ettiğı inhibisyonun azaldığını, moleküler ve nöronal ağ düzeyinde plastisitede yeni düzenlemelerin olduğunu göstermiştir. Epilepsilerin çoğı bir veya daha fazla gen ile çevresel faktörlerin etkileşimini içeren kompleks genetik etyolojiye bağılı olarak gelişir. Ailesel özellik gösteren çoğı idiyopatik epilepsi türünde iyon kanalı genlerinde mutasyonlar ortaya konmakla birlikte bu tablolarda epileptogeneze yol açan mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Moleküler mekanizmaların ve genetik temelin anlaşılması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (5).

Epilepsi ile ilgili olarak insanlar üzerinde yapılabilecek çalışmalar sınırlıdır. Özellikle de hastalığın temeline yönelik incelemeler deneysel modellerin kullanımını zorunlu kılmaktadır. Hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalar epilepsinin patogenezinin aydınlatılmasında önemli rol oynamaktadır. Hayvan beynine irritan ve konvülsan maddelerin verilmesi ile parsiyel nöbetler oluşturulabilir (3). Penisilin

kaynaklı deneysel epilepsi modeli de bu modeller arasında sık kullanılanlardandır. Penisilin sistemik yoldan, korteks yüzeyine topikal olarak veya intrakortikal (i.c.) enjeksiyon yoluyla uygulanarak epilepside görülene benzer bir aktivite oluşturmaktadır. Penisilin beyindeki GABA inhibisyonunun ortadan kalkmasına ve beynin temel eksitator nörotransmitteri olan glutamatın uyarıcı etkilerinin baskın hale gelmesine neden olarak akut fokal epilepsi benzeri bir epileptik aktivite oluşturur (6).

Günümüzde antiepileptikler adı altında bir grup ilaç epilepsinin tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmaktadır (7). Ancak kullanılan tedavi protokollerindeki amaç genelde semptomları azaltmaya yöneliktir (8). Mevcut tedavi stratejileri, nöbetlerin sıklığını ve şiddetini azaltarak nöbet kontrolünü hedeflemektedir. Bunun yanında, operasyona uygun hastalarda cerrahi müdahale denenmektedir. Ayrıca henüz insanda epilepsi tedavisinde kullanımı olmayan ancak teropatik etkileri bilinen ve laboratuvarlarda deneysel olarak kullanılan birçok ajan mevcuttur (9). Eritropoetin (Epo) de bunlardan biridir.

Epo glikoprotein yapısında bir sitokin hormondur. Temel olarak eritropoezi kontrol eden, kemik iliğinde eritroid progenitor hücreleri uyaran ve eritrositlerin diferansiyasyonunu sağlayan hematopoetik bir büyüme faktörüdür. 1906 yılında Carnot ve DeFlandre alyuvarların üretiminin kontrolünü sağladığını düşündükleri bir humoral faktöre hemopoietin adını verdiler. Daha sonra, bu hormon Bonsdorff ve Jalavisto tarafından eritropoetin olarak isimlendirildi. Epo, Reissmann'ın çalışması ile hematopoezdeki rolünün ortaya konmasının ardından yeniden gündeme geldi. Erslev tavşanlarda yaptığı çalışmalarla Epo hakkında bilinen bilgilere yenilerini ekledi. 1957 yılına kadar Epo'nun etkilerine şüpheyle bakılırken. Jakobson ve arkadaşları tarafından bilateral nefrektomi yapılmış farelerde kanamaya eritropoetik cevabın gösterilmesi ve 1961 yılında Kuratowska ve arkadaşları ile Fisher ve Birdwell'in izole perfüze böbrekte üretilebildiğini tespit etmeleri üzerine Epo üzerine olan araştırmalar hız kazandı (10).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla Epo ve reseptörünün sinir sistemindeki varlığı ve nöronlar üzerine koruyucu etkisi araştırılmaktadır. Çalışmalarda Epo'nun hem epileptik hem de antiepileptik etki gösterdiği üzerinde durulmaktadır. Böbrek yetmezliği olan diyaliz hastalarında şiddetli anemi tedavisinde Epo uygulanması sonrasında nöbet insidansında hafif bir artış saptanmıştır. AIDS hastalarında

rekombinant insan eritropoetini (rHuEpo) tedavisi sonrası nöbet insidansında yüksek bir artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte rHuEpo tedavisi alan diğer hastalık gruplarındaki bireylerde nöbet insidansında bir artış saptanmamıştır. Bu artışın mekanizmasında böbrek yetmezliği, yapısal beyin hasarı ve AIDS'te görüldüğü gibi ciddi elektrolit bozukluğunun önemli bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda farklı deneysel epilepsi modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda Epo'nun antikonvulsan etkilere sahip bir madde olduğu ileri sürülmüştür. Elde edilen verilere göre Epo status epileptikus (SE) ve epileptik nöbetler üzerine azaltıcı etki göstermektedir. Sistemik Epo tedavisinin Bcl-2 ailesi'nin pro ve anti apoptotik proteinleri arasındaki dengeyi düzenleyip, nöronal apoptozda baskılanma meydana getirerek SE'nin akut fazında hipokampal nöronlar üzerinde belirgin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan bir neonatal nöbet modelinde postnatal 10. günde tek doz Epo verilmesinin nöbetlerin latensini uzattığı, hipokampal hücrelerde apoptozu azalttığı ve mortaliteyi etkilediği tespit edilmiştir. Epo'nun intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonundan 4 saat sonra lityum-pilokarpin ile oluşturulmuş bir SE modelinde, sıçanlarda kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığı, pentilen tetrazol (PTZ) ile oluşturulmuş bir nöbet modelinde kan beyin bariyeri kaçacağını sınırladığı ve tonik-klonik nöbetlerin şiddetini hafiflettiği bildirilmiştir (11). Bir kainik asit modeli SE çalışmasında ise sıçanlara kainik asit enjeksiyonundan 24 saat önce Epo verilmesinin nöbetlerin şiddetini azalttığı ve latensini uzattığı gösterilmiştir. Ayrıca nöbetlerin Epo verilmemiş olanlara göre daha az şiddetli (mortalitede % 45 azalma gözlenmiştir) ve daha kısa süreli olduğu bildirilmiştir. Epo'nun etki mekanizması henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte çeşitli teoriler ileri sürülmektedir (12).

Deneysel epilepsi modellerinde birçok maddenin prokonvulsan ve antikonvulsan etkileri araştırılmıştır. Epo'nun deneysel epilepsi modelleri üzerine etkilerine yönelik çalışmalar olsa da penisilin modeli deneysel epilepsi üzerine etkilerini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Biz de çalışmamızda Epo'nun nöbet sonrası çeşitli dozlarını deneyerek epilepsi üzerine etkisini görmeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

2.1.1. Epilepsi ve nöbet tanımı

Epilepsi terimi Yunanca ‘zaptetmek’ veya ‘saldırmak’ anlamına gelen “Epilambanein” kelimesinden gelir (13). Epilepsi tekrarlayan, provoke edilmemiş nöbetlerle karakterize, heterojen bir grup nörolojik bozukluğu tanımlamaktadır (14). Epilepsi SSS’de, kortikal veya subkortikal bölgelerde yer alan nöron gruplarının ani, anormal ve hipersenkron deşarjları sonucu ortaya çıkan, beyindeki sinir hücrelerinin aşırı uyarılabilirliğinden kaynaklanan ve genellikle tekrarlayıcı nitelikte olan bir klinik tablodur ve anormal deşarjların ortaya çıktığı veya yayıldığı nöronların somatik veya psişik fonksiyonları ile ilgili geçici bozukluklarla karakterizedir (15). Epilepsi ve nöbet birbirlerinin yerine kullanılabiliyor olsa da farklı kavramlardır. Nöbet beyinde anormal elektriksel deşarjlar sonucu zaman zaman ortaya çıkan, geçici nörolojik fonksiyon bozukluğunu tanımlar (1). Beyindeki nöronların genellikle sınırlı süreli, aşırı ve/veya hipersenkron aktivitesinin göstergesidir. Genel olarak nöbetler, beyindeki uyarıcı ve duraklatıcı sistemler arasındaki dengenin bozulması, uyarıcı sistemlerin aktivitelerinin artışı sonucunda meydana gelir (16). Gri maddedeki artmış, hızlı ve lokal elektriksel boşalımlardan köken alır. Klinikte belli bir süreyle sınırlı bilinç, davranış, duygu, hareket ve algılama fonksiyonlarında bir bozukluk gözlenir. Nöbetler zaman içinde her hasta için belli bir özellikte, genellikle spontan olarak veya bazı tetikleyen faktörler zemininde tekrarlar. Nöbetler arasında hasta genellikle normal yaşantısını sürdürür. Nöbet aralıkları ve tipleri son derece değişken olmakla birlikte aynı kişide genellikle aynı, bir veya belli birkaç nöbet tipi tekrarlama eğilimi gösterir (15). Araştırmalarda bir kez nöbet geçiren insanların %20-30’unda epilepsi gelişme riski olduğu saptanmıştır. Uygun şartlar oluştuğunda tamamen normal bir beyinde de epileptik nöbet deşarjı ortaya çıkabilmektedir (3).

2.1.2. Epilepsi insidans ve prevelansı

Gelişmiş ülkelerde epilepsi insidans değerleri 20-70/100.000 arasında değişmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde görülen insidans 64-122/100.000 civarındadır. Çok farklı sonuçlar olmasıyla beraber gelişmiş ülkeler için ortalama epilepsi prevelansı 6/1000'dir. Dünya Sağlık Örgütü protokolü ile gerçekleştirilen prevelans çalışmalarında gelişmekte olan ülkelerde bu oran ortalama 18.5/1000 olarak hesap edilmektedir (14). Epilepsi tüm dünya popülasyonunun %1-3'ünü etkilemektedir (17). Ayrıca insanların %7-8'i yaşamlarının bir döneminde, bir veya birden fazla sayıda nöbet durumu ile karşı karşıya kalmaktadır (18, 19). Çocuklarda ilk bir ay ve ilk bir yıl epilepsi insidansının en belirgin olduğu dönemdir. Gelişmiş ülkelerde beyin damar tıkanıklığı ya da tümörlerin görülme sıklığına bağlı olarak yaşla birlikte prevelans değerlerinin giderek arttığı ve en yüksek değerlere ileri yaşlarda ulaşıldığı izlenmiştir. Diğer taraftan gelişmekte olan ülkelerde en yüksek değerler ikinci ve üçüncü dekatlarda yoğunlaşmakta ve ileri yaşlarda oranlar daha düşük seyretmektedir (17, 20). Cinsiyete bağlı insidans farklılıkları belirgin olmamakla birlikte, erkeklerde epilepsinin daha fazla izlenmesi yönündedir. Epilepside cinsiyet farklılıkları üzerine yapılan bir çalışmada, lokalizasyonla ilişkili epilepsilerde cinsler arasında bir farklılık olmadığı, ancak semptomatik lokalizasyonla ilişkili epilepsiler erkeklerde, kriptojenik epilepsilerin kadınlarda daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. İdiyopatik jeneralize epilepsiler ise kadın popülasyonunda daha fazla izlenmiştir (14). Epilepsinin yaşamın çeşitli evrelerinde görülme sıklığı değişkendir; 20 yaş altında ve 60 yaş üzerinde daha sık görülür. Epilepsilerin, çocukluk döneminde genetik nedenlere, yaşlılık döneminde ise beyin damar tıkanıklığı ya da tümörlerin görülmesine bağlı olarak sıklığı artar (17).

2.1.3. Epilepsinin sebepleri

Epilepsinin etiyolojisinde pek çok neden mevcuttur, serebral nöronların fonksiyon ve yapısında değişikliğe sebep olabilen herhangi bir neden epilepsiye neden olabilir. Epilepsiye yatkınlık oluşturabilen yapısal değişikliklere neden olan bazı süreçler Tablo 1 'de belirtilmiştir. Birçok durumda sebep olarak bu tür süreçler

öne sürülmekte ancak doğrulanamamaktadır. Nörolojik görüntüleme yöntemlerinin ve genetik çalışmaların ilerlemesi ile epilepsiye neden olabilen daha birçok sebep tespit edilmiştir (21). Popülasyon temelli çalışmalarda epilepsinin nedenlerinden %68'i bilinmeyen uzak semptomatik nedenler, %31'i daha önceden geçirilmiş beyin hasarı olarak tespit edilmiştir. Uzak semptomatik nedenler arasında hastaların %13,2'sinde serebrovasküler hastalıklar, %5,5'inde gelişimsel gecikmeler, %4,1'inde kafa travması, %3,6'sında beyin tümörü, %2,6'sında enfeksiyon, %1,8'inde dejeneratif hastalıklar ve %5'inde diğer sebepler sayılmıştır (22, 23).

Tablo 1. Epilepsiye yatkınlık oluşturan yapısal beyin hastalıkları (21).

Konjenital
Heterotopi
Kortikal displazi
Dejeneratif
Alzheimer hastalığı
Enfeksiyonlar
Menenjit
Ensefalit
Abseler
Travma
Tümör
Vasküler
Vasküler malformasyonlar
İnme
Subaraknoid kanama

Provoke edilerek meydana gelen nöbetler sağlıklı beyinde de akut metabolik süreçler, akut nörolojik hakaret, ilaçlar ve aşırı fizyolojik koşullar gibi belirli faktörlere bağlı oluşabilir (2). Sık provoke edici faktörler Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Provoke edilebilen nöbetlerin genel sebepleri (21).

Metabolik anormallikler
Hipoglisemi
Hiperglisemi
Hiponatremi
Hipokalsemi
Alkol yoksunluğu
Akut nörolojik hasar
Enfeksiyon (menenjit, ensefalit)
İnme (iskemik, hemorajik)
Kafa travması
Yasadışı madde zehirlenmesi ve yoksunluğu
Nöbet eşliğini düşüren ilaçlar: Teofilin, trisiklik anti depresanlar
Çocuklarda yüksek ateş

2.1.4. Epilepsinin patofizyolojisi

Epileptogenez terimi, klinik belirti ile birlikte ya da herhangi bir klinik belirti olmaksızın elektroensefalografik olarak nöbet aktivitesinin kayıt edildiği tekrarlayıcı, yeterli sayıda nöronun ateşlenmesine bağlı, nöbet aktivitesinin oluşması olarak ifade edilir. Epileptogenez bir beyin hasarı sonrası beyindeki hücrel ve moleküler değişikliklere bağlı olarak uyarılabilirliğin artması ve tekrarlayıcı spontan nöbetlerin görülmesi olarak tariflenebilir (24). Epileptogenezden sorumlu hücrel mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Tüm epilepsi nöbetleri için aynı mekanizmadan söz edilememekle birlikte hepsi de artmış nöronal uyarılabilirlik ve senkronizasyon gibi ortak bir karakteristik özelliğe sahiptir.

Gerek hayvan deneylerinde gerekse insanda yapılan çalışmalarda kortikal nöronların membran potansiyellerinde ve ateşlenme şekillerinde bazı karakteristik bozukluklar saptanmıştır. Paroksizmal depolarizasyon kayması olarak bilinen bu durumda membranı depolarize eden postsinaptik potansiyelin anormal şekilde uzaması ve büyümesi söz konusudur ve bunun sonucu olarak nöronlar gruplar halinde ateşlenir ve etrafındaki nöronları benzer şekilde ateşleyebilecek bir kapasiteye ulaşırlar. Paroksizmal depolarizasyon kaymasının eksitator nörotransmitterler olan glutamat ve aspartat ile inhibitör nörotransmitter GABA

sistemleri arasındaki dengesizlikten kaynakladığı ileri sürülmektedir. Bunun dışında membranlardaki iyon kanallarındaki bozukluklarında paroksizmal depolarizasyon kaymasının ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Epileptojenik odak olarak adlandırılan beyin bölgelerinde yer alan pacemaker hücreler tam olarak bilinmeyen nedenlerle, artmış uyarılma ve anormal ateşlenme özelliği gösterirler ve etrafındaki hücreleri de ateşlenmeye ortak ederler. Bazı nöbet tipleri için talamusta yer alan T-tipi Ca^{++} kanallarının rolü kanıtlanmış olsa da bütün epilepsi nöbetlerinin kortikal mekanizmalarla tetiklendiği görüşü giderek ağırlık kazanmaktadır (15).

Epilepsi oluşumunda rolü olduğu kabul edilen güçlü hipotezler şunlardır (14):

1. Nöronal reseptörlerin yeniden organize olarak dağılımlarının değişimi (up yada down regülasyon),
2. GABA'erjik inhibisyonun paradoksal olarak fonksiyonel değişikliklere neden olması ve epileptik aktiviteyi arttırması.

Bununla beraber kortikal nöronların hücresel elektrofizyolojik özelliklerine ilişkin 5 noktanın epilepsiye eğilim yarattığı düşünülmektedir.

1. Sinaptik eksitasyon ve yavaş inaktive edici Ca^{++} iletkenliği ile ortaya çıktığı düşünülen uzamış depolarizasyona yanıt olarak kortikal nöronların yüksek frekanslarda ateşlenme yetileri.
2. Nöbet aktivitesinin oluşumu ve yayılımının altında yatan pozitif feedback mekanizmalarına olanak sağlayan tekrarlayan eksitator bağlantıların varlığı.
3. Hipokampus gibi nöbet aktivitesinden en kolay etkilenen belli korteks bölgelerindeki piramidal hücrelerin yoğun bir şekilde ve tek tip oryantasyonu.
4. Korteksteki sinaptik yolların karakteristiği olan N-Metil D-Aspartat (NMDA) cevapları dahil olmak üzere güçlü frekans potensiyasyon mekanizmaları.
5. Yüksek frekanslı aktivasyon tarafından oluşturulan tekrarlayan inhibitör sinapsların (GABA'erjik) belirgin zıt etkileri.

Jeneralize epilepsilerde beyin sapı retiküler formasyonundan, orta hat talamus nükleusları üzerinden taşınan difüz bir inputun aşırı uyarılabilir durumdaki kortekse etkisi üzerinde durulmakta ve bazı biyojenik aminlerin rolleri vurgulanmaktadır. Bazı araştırmacılar ise tetikleyici bölgenin büyük olasılıkla kortikal olduğunu ve anterograd veya retrograd yolla eş zamanlı aktivitenin talamusa yayıldığını

savunmaktadırlar. Ayrıca istirahat membran potansiyelinin bozulmasına neden olan primer bir nöronal membran defekti üzerinde durulmaktadır. Buna neden olduğu düşünülen mekanizmalar; potasyum (K^+) iletiminde bozukluk, voltaja duyarlı Ca^{++} kanallarında defekt veya ATPaz'a bağlı iyon transportunda bozukluk olarak özetlenmektedir. GABA'erjik inhibitör sistemlerinde primer defekt olasılığı veya eksitator nörotransmisyonunda rol alan reseptörlerin aşırı duyarlılığı ve düzenlenmesindeki olası bozukluklar üzerinde de durulmaktadır (15). Yapılan çalışmalarda epileptik odakta yer alan nöronların dendritik çıkıntılarında azalma olduğu, epileptojenik fokusta yeni sinapslar oluştuğu, astrositlerin artmasıyla gliosis oluştuğu gösterilmiştir (25). Epileptojenik odakta 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 (26). Bu mekanizmalar sonucunda nöronların membran potansiyelleri bozulmakta, bu nöronlar normalden daha kolay depolarize olmakta, bir başka deyişle nöronun uyarılma eşiği düşmektedir.

2.1.5. Epilepsinin sınıflandırılması

Epileptik nöbetleri ve sendromları sınıflandırma çabaları 20. yüzyılın başlarında başlamıştır. İlk kez 1964 yılında uluslararası epilepsi uzmanlarının toplanması ile bu çalışmalar hız kazanmıştır. ILAE (Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği) tarafından 1981'de yayınlanan Epileptik Nöbetlerin Klinik ve Elektrografik Sınıflaması (Tablo 3) ve 1989'da yayınlanan Epilepsiler ve Epileptik Sendromların Sınıflaması (Tablo 4) tüm dünyada kabul görmüş, nöbetlerin ve epileptik sendromların tanımlanmasında ortak bir dil oluşumunu sağlamıştır. Zamanla araştırmalarla sağlanan ilerlemeler sayesinde, yeni bilgi birikimlerinin sonucunda 1981'de önerilen Nöbetlerin Klinik ve Elektrografik Sınıflaması yetersiz hale gelmiştir. Lüders ve arkadaşları tarafından 1998'de öne sürülen Semiyolojik Nöbet Sınıflaması bu boşluğu doldurmaya yönelik ortaya atılmıştır ancak ILAE tarafından böyle bir sınıflamanın gerekliliği kabul edilmekle birlikte yaygın kullanımı için kesin

uzlaşaı sağlanamamıştır. ILAE'nin sınıflama komisyonu adına Dr. Engel tarafından 2001 yılında yayımlanan hem epileptik nöbetleri hem de epilepsileri içeren son sınıflama önerisine karşılık, komisyon tarafından ILAE'nin 1989 sınıflamasının kullanılmasının devam edilmesine karar verildiği bildirilmiştir (14).

Tablo 3. Epileptik Nöbetlerin Klinik ve Elektroensefalografik Sınıflaması (ILAE, 1981) (14).

I-Parsiyel Nöbetlerin Sınıflaması

A) Basit parsiyel nöbetler: Bilinç kaybı yok

1. Minör belirtilerle giden
 - a. İlerleme olmayan motor nöbetler
 - b. İlerleyen motor nöbetler
 - c. Versif
 - d. Postüral
 - e. Fonatuvar (vokalizasyon yada konuşmanın durması)
2. Somatosensoriyel ya da özel duyuşal belirtilerle giden
 - a. Somatosensoriyel
 - b. Görsel
 - c. İşitsel
 - d. Koku
 - e. Tat
 - f. Vertijinöz
3. Otonomik belirti ve bulgularla giden
4. Psişik belirtilerle giden
 - a. Disfazik
 - b. Disamnezik
 - c. Bilişsel
 - d. Affektif
 - e. İlizyonlar
 - f. Yapılanmış halüsinasyonlar

Tablo 3. Epileptik Nöbetlerin Klinik ve Elektroensefalografik Sınıflaması (ILAE, 1981) (14) (Devamı).

B) Kompleks parsiyel nöbetler: Bilinç bozukluğu ile ortaya çıkar.

1. Basit parsiyel başlangıcı izleyen bilinç bozukluğu
2. Bilinç durumunun başlangıçtan itibaren bozulması

C) Sekonder jeneralize nöbete dönüşen parsiyel nöbetler

1. Basit parsiyel nöbetlerin absans tipi jeneralize nöbetlere dönüşmesi
2. Kompleks parsiyel nöbetlerin miyoklonik tip jeneralize nöbetlere dönüşmesi
3. Basit parsiyel nöbetlerin kompleks parsiyel nöbete daha sonra jeneralize nöbete dönüşmesi

II) Jeneralize Nöbetlerin Sınıflaması

A) Absans nöbetler

1. Tipik
2. Atipik

B) Myoklonik nöbetler

C) Klonik nöbetler

D) Tonik nöbetler

E) Tonik-klonik nöbetler

F) Atonik nöbetler

III) Sınıflandırılmayan Nöbetler

Tablo 4. Epilepsilerin ve epileptik sendromların sınıflaması (ILAE, 1989) (14).

I) Lokalizasyona bağlı (fokal, parsiyel) epilepsiler ve sendromlar

1) İdiopatik (yaşa bağlı başlangıç)

- a. Sentrotemporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi
- b. Oksipital paroksizmlili çocukluk çağı epilepsisi
- c. Primer okuma epilepsisi

2) Semptomatik

- a. Temporal lob epilepsisi
- b. Frontal lob epilepsisi
- c. Parietal lob epilepsisi
- d. Oksipital lob epilepsisi
- e. Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsiyalis kontinuas'ı
- f. Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar

3) Kriptojenik

II) Jeneralize epilepsiler ve sendromlar

1) İdiopatik (yaşa bağlı başlangıç-yaş sırasına göre sıralanmıştır.)

- a. Selim ailesel yenidoğan konvülsiyonları
- b. Selim yenidoğan konvülsiyonları
- c. Süt çocukluğunun selim miyoklonik epilepsisi
- d. Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi)
- e. Jüvenil absans epilepsisi
- f. Jüvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petit mal)
- g. Uyanırken gelen grand mal nöbetli epilepsi
- h. Diğer jeneralize idiyopatik epilepsiler
- ı. Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler

2) Kriptojenik veya semptomatik (yaş sırasına göre)

- a. West sendromu (infantil spazmlar, Blitz-Nick-Salaam Kraempfe)
- b. Lennox-Gastaut sendromu
- c. Miyoklonik astatik nöbet epilepsisi
- d. Miyoklonik absans epilepsisi

Tablo 4. Epilepsilerin ve epileptik sendromların sınıflaması (ILAE, 1989) (14)
(Devamı).

3) Semptomatik
A) Spesifik olmayan etyoloji
a. Erken miyoklonik ensefalopati
b. Erken infantil epileptik ensefalopati (baskılanım-boşalım ile)
c. Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler
B) Spesifik sendromlar
III) Fokal veya jeneralize oldukları belirlenemeyen epilepsiler
1) Jeneralize ve fokal konvülsiyonlu epilepsiler
a. Yenidoğan konvülsiyonları
b. Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi
c. Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgalı epilepsi
d. Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)
e. Diğer belirlenemeyen epilepsiler
2) Net jeneralize veya fokal konvülsiyon özelliği olmayanlar
IV) Özel sendromlar
1) Duruma bağlı nöbetler (Gelegenheitsanfaelle)
a. Febril konvülsiyonlar
b. İzole nöbet veya izole status epileptikus
c. Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler

2.2. Deneysel Modeller

Epilepsinin fizyopatolojisini anlamak ve yeni tedavi seçenekleri oluşturmak amacıyla birçok deneysel epilepsi modeli geliştirilmiştir (27). İdeal bir deneysel epilepsi modelinde spontan olarak tekrarlayan nöbetler olmalı; nöbetler insan epilepsisi nöbetine benzemeli; modeldeki EEG'nin biçimi ilgili epilepsi çeşidindekine benzemeli; nöbetlerin frekansı, ilaçların etkisini akut veya kronik olarak test etmeye yetecek ölçüde olmalı; antiepileptik ilaçların farmakokinetiği

insandakine benzer olmalı ve antiepileptiklerin etkili oldukları plazma ve beyin seviyeleri, insanda ilgili nöbeti önleyen düzey kadar olmalıdır. Bu kriterlerin tümünü karşılayan tek bir model şimdilik bilinmemektedir (28).

2.2.1. Deneysel modellere genel bir bakış

Deneysel epilepsi modellerinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

1. Kimyasal ve farmakolojik konvülzan uygulamaları: Alimünyum, kobalt, tungstik asit, demir, PTZ, penisilin, pikrotoksin, strikнин, K^+ , ouabain, kainik asit, pilokarpin, insülin uygulamaları (29).
2. Elektriksel uyarı: Maksimum elektroşok (MES), elektrikle uyarılmış SE, elektriksel kindling (29).
3. Duyusal uyarı: Fotojenik, odiojenik nöbetler (29).
4. Genetik modeller: Genetik epilepsi eğilimli sıçan, Papio papio, Strasbourg'dan Genetik Absans Epilepsili Sıçanlar (GAERS), odiojenik fare, genetik olarak epilepsiye eğilimli sıçan (GEPR), nöbete eğilimli gerbil, WAG/Rij (Wistar albino Glaxo-Rijswijk), Fischer-344 sıçanları, tek gen mutasyonlu letarjik fare, Stargazer, Tottering ya da Mocha fare modelleri, telensefalik iç yapısal heterotopili mutant sıçanların (TISH) kullanımı (29, 30).
5. Otx1 Modeli: Otx1 tüm dorsal telensefalik korteksin gelişimi için gerekli olan temporal ve peririnal alanlarda daha belirgin bir etkiye sahiptir. Otx1 nöronal kimlik belirleme mekanizmalarını etkileyebilir. Ayrıca, Otx1 defektli fareler epileptik nöbetler sergilerler (29).
6. Dondurma ve hipertermi uygulamaları
7. Fiziksel travma yöntemleri
8. Beyin dilimleri modeli: Farklı türlerde çeşitli beyin bölgelerinden sağlanan doku kesitleri veya disosiyasyon nöronlar büyük ölçüde antikonvülzanlar ve konvülzanların etki mekanizmalarının anlaşılmasında katkıda bulunmuştur (31).
9. Kortikal displazi modeli olarak in utero radyasyon kullanımı: Uterus içine radyasyon modeli, normal kortikal gelişimin değişik basamaklarda engellenmesiyle kortikal displazi ortaya çıkarılmasını amaçlayarak geliştirilmiştir. Kortikal displaziyle ilişkili epilepsi araştırmalarında kullanılır (30).

Tüm bu modeller günümüze kadar insandaki koşulları taklit etme yoluyla hem fizyopatolojiyi hem de beynin fizyolojisi, anatomisi, biyokimyası ve genetiği gibi alanlarının bizzat kendilerinin anlaşılması yönünde çok değerli katkılar yapmışlardır (30). Epilepsi hayvan modelleri nöbetlerin majör katagorilerini yansıtır. Jeneralize nöbetler (absans, myoklonik ve tonik-klonik) ve parsiyal nöbetler (basit, kompleks ve sekonder jeneralize parsiyel nöbetler) (31).

2.2.2. Basit parsiyel nöbet modelleri

Beyin korteksi üzerine doğrudan penisilin, alimünyum hidroksit, kobalt, tungstik asit, çinko ve demir uygulanması

Elektriksel kindling

Kainik asit uygulaması

Tetanus toksini uygulaması

Soğutma

Hipertermik uygulama

Kan-beyin bariyeri modelleri

Neonatal hipoksi-iskemi modeli

Travmatik beyin hasarı modeli (27, 32).

2.2.3. Kompleks parsiyal nöbet modelleri

Sistemik, intraventriküler ve ya intrahipokampal kainik asit uygulaması

Sistemik yüksek doz pilokarpin uygulaması

Kindling model

Beyin dilimleri modeli

İntrahipokampal düşük doz tetanoz toksini kullanımı (31, 33).

2.2.4. Generalize absans nöbet modelleri

Düşük doz PTZ'nin sistemik kullanımı

Yüksek doz sistemik penisilin kullanımı

GAERS ve WAG-Rij suşu sıçanlar kullanılan genetik modeller
Tetrahidroksiizoksazol piridin'in (THIP) intraperitoneal (i.p.) kullanımı
Gamma-hidroksi bütirat (GHB) i.p. kullanımı
Kolestrol biyosentezinin spesifik inhibitörü AY9944 kullanımı
Metilazoksimetanol Modeli: Alkilleyici bir ajandır ve nöronal migrasyon bozukluğuna yol açar. Mitotik dönemde nöroblastları öldürür (30, 31).

2.2.5. Generalize tonik-klonik nöbet modelleri

MES modeli
PTZ, pikrotoksin, striknin, bikukullin gibi kimyasal konvülzanların sistemik kullanımı ile oluşturulan modeller
Genetik modeller (31, 34).

2.2.6. Status epileptikus modelleri

Sistemik yüksek doz pilokarpin ya da lityum pilokarpin uygulanması
İntravenöz (i.v.) veya i.p. bukukillin kullanımı
Kobalt- homosistein kullanımı
Flutotil gazı kullanımı
Kainik asitin i.p. kullanımı
Soman ve tabun, siklosarin, sarin, VR, and VX gibi diğer kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımı
Beynin özel alanlarına elektriksel uyarı verilmesi (limbik sistem gibi) (29, 31, 33).

2.2.7. Penisilin modeli

İlk kez 1946'da denenmesinin ardından korteks veya diğer serabral yapılara topikal penisilin uygulaması akut epileptogenez oluşturulmasında kullanılan klasik bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntemde etkilenen bölgeden periyodik ve stereotipik, belirgin negatif diken dalgalar yükselir. Walden ve ark. korteks yüzeyine lokal penisilin uygulamışlar ve 4-5 dakika sonra elektrokortikografide (ECoG) epileptiform potansiyeller görüldüğünü bildirmişlerdir. Penisilin sistemik olarak

verildiğinde ise sistemik fokal epilepsi ile jeneralize absans epilepsi modelleri oluşmaktadır (35). Yapılan çalışmalarda sıçanlarda i.p. yolla penisilin G verilmesinin epileptik aktiviteye neden olduğu, kedilerde sistemik olarak verilen yüksek doz penisilin ile 30-60 dakikada jeneralize, bilateral, senkronize diken ve diken dalgalar olduğu ve aktivitenin 3-5 saat devam ettiğini gözlemlenmiştir (36, 37). Muhtemelen penisilin, dendritleri etkileyip, GABA'nın etkisini inhibe ederek epileptiform aktiviteye sebep olmaktadır. İn vitro çalışmalarda hipokampus dilimlerinde inhibitör postsinaptik potansiyelleri önleyip, presinaptik uçlardan asetilkolin ve glutamat salgısını artırdığı gösterilmiştir (38).

2.3. Elektrokortikografi (ECoG) ve Elektroensefalografi (EEG)

ECoG serebral korteks elektrik aktivitesini kaydetmek için direkt beynin yüzeyine yerleştirilen elektrotlar kullanarak yapılan bir uygulamadır, beynin elektriksel aktivitesinin ölçülmesi için özel bir yoldur (39). Wilder Penfield ve Herbert Jasper adlı iki beyin cerrahı ECoG kullanımına 1950'li yıllarda öncülük etmişlerdir (40).

ECoG'un amacı serebral kortekste şüpheli bir nöbet odağının lokalizasyonunu tespit etmektir. Aynı zamanda nöronal eşikleri belirlemek için kullanılır. ECoG invaziv bir yöntemdir çünkü elektrotların implantasyonu için kafatası içine cerrahi bir insizyon gerektirir. Serebral korteksten elektroensefalogram kaydı yapmak için elektrotlar epidural veya subdural olarak yerleştirilir (41). ECoG ve EEG aynı temeller etrafında faaliyet gösterir, ancak ECoG nöronal aktiviteyi algılamada beyni çevreleyen koruyucu dokuların çeşitli katmanlarının sınırlaması olmaksızın işlev görür, ECoG da EEG gibi yerel elektrik alanındaki değişiklikleri elektrotları kullanarak algılar (40).

EEG saçlı deri üzerine konulan elektrotlarla, beyindeki geniş bir nöron grubunun spontan elektriksel aktivitesindeki dalgalanmaların elektroensefalograf denen cihazla kaydedilmesi işlemidir. İlk olarak 1940'larda kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem beynin yapısal özelliklerinden çok o anki fonksiyonel durumunu yansıtır. EEG sinyalleri kortikal nöronların inhibitör ve eksitator

postsinaptik potansiyelleri tarafından oluşturulur. EEG'nin epileptik olgunun değerlendirilmesindeki katkıları üç maddede özetlenebilir.

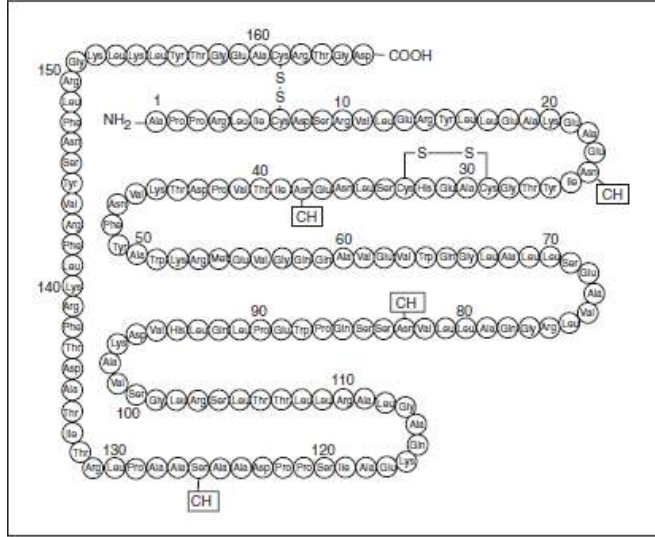
1. Klinik olarak konulmuş olan tanının desteklemek ve doğru tanı konmasına yardımcı olmak.
2. Nöbet kaydı sayesinde veya dolaylı bazı bulgularla nöbet tipi ve buradan hareketle epilepsi ve sendromunun belirlenmesini sağlamak
3. Odağın lokalizasyonunu tespit etmek.

EEG, epilepsi ve beyinle ilgili diğer paroksizmal hastalıklarda, toksik-metabolik ensefalopatilerde, ensefalitlerde, koma ve uyku hastalıklarında tanı ve izlem amacıyla kullanılır. Anormal EEG paternlerinin ortaya çıkarılabilmesi için hiperventilasyon, uyku ve fotik uyarmı kullanılan aktivasyon yöntemleridir. Klinik olarak nöbeti olan her hastada EEG anormalliği gösterilemeyebileceği gibi nöbet veya epilepsisi olmayan kişilerde de EEG anormalliği görülebilir. Nöbeti veya epilepsisi olan hastalarda EEG'lerde ortalama %70 oranında anormallik saptanır (15).

2.4. Eritropoetin

2.4.1. Eritropoetinin yapısı

Eritropoetin (Epo) esas olarak böbrekler tarafından üretilen, alyuvarların üretimini düzenleyen glikoprotein yapısında bir hormondur. Epo sınıf 1 sitokin ailesinin bir üyesi olup, 4 α -heliks bağı içeren, % 40 karbonhidrat yapıdan oluşan globüler bir glikopeptiddir. Moleküler ağırlığı 30.4 kDa'dır. Yirmidört. 38 ve 83. pozisyonlarda üç N-bağlı asparajin oligosakkariti ile ve 126. pozisyonda O-bağlı serin oligosakkariti içerir. Yedi ile 161 ve 29 ile 33. aminoasitler arasında yapıyı sabitleyen iki adet disülfid bağı bulunmaktadır. N-bağlı oligosakkaritler dolaşımdaki Epo'nun stabilizasyonu için gereklidir (42). İnsanlarda Epo mRNA 193 aminoasitlik bir protein kodlar, fakat N-terminalinden 23 aminoasidin ayrılması ve post translasyonel modifikasyon sırasında C-terminalinden arginin kaybı sonucunda matür protein, 165 amino asitlik bir yapıdan oluşur (43). İnsan üriner Epo'su ile rHuEpo'nun primer ve sekonder yapıları aynıdır, ancak rHuEpo ile karşılaştırıldığında üriner Epo ve serum Epo'sunun N- ve O- glikanları arasında minör kantitatif farklılıklar mevcuttur (48).



Şekil 1. Eritropoetinin 165 aminoasitlik sirküler yapısı (44).

2.4.2. Eritropoetinin sentez yeri

Eritropoetin fetal dönemde esas olarak karaciğer hepatositleri tarafından üretilir. Doğumdan sonra, dolaşımdaki miktarının büyük kısmı böbreklerin korteksinde yerleşmiş peritübüler fibroblast benzeri hücreler tarafından üretilir (42). Karaciğerde Epo salınımından sorumlu esas hücreler hepatositlerdir, ancak karaciğer sinizoidal boşluklarında yerleşik ito hücrelerinden de üretildiği bilinmektedir (45). Karaciğerden salınımı WT1 ve GATA ailesinin transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir (46).

Erişkinlerde, karaciğer parankiminde, dalakta, akciğerlerde, testislerde ve beyinde az miktar Epo mRNA saptanmıştır (42). Ayrıca astrositler, nöronlar, kadın genital sistemi, meme bezleri, plental trofoblastlar, kemik iliği makrofajları ve eritroid pregenitör hücrelerinde tespit edilmiştir. Epo'nun nöronal varlığı ilk PC12 sıçan feokromositoma ve SN6 septal kolinerjik hücrelerde tanımlanmıştır (47). İnsan embriyosu beyininden ve erişkin hipokampusünden yapılan biyopsilerde amigdala, temporal korteks ve çeşitli beyin bölgelerinde varlığı gösterilmiştir (42).

Tablo 5. Epo salınımının olduğu bilinen dokular (49).

Epo üretimi	Ekspresyon yerleri
Böbrek	Peritübüler hücreler
Karaciğer	Kupfer hücreleri ve hepatositler
Kemik iliği	Makrofajlar, eritroid progenitörleri
Dalak	
Üreme organları	
Kadın üreme organları	Uterus, tuba uterina, plasenta, overler
Testis	Sertoli ve peritübüler myeloid hücreler
Santral sinir sistemi	Nöronlar, astrositler, mikrovasküler endotel hücreleri

Tablo 6. Epo hedef hücreleri ve etkileri (48).

Doku	Epo-Sensitif Hücre Tipi	Fonksiyonu
Beyin	Astrosit	Doku hasarını azaltmak Fonksiyonel onarımı arttırmak
Göz		
Kalp	Kardiyomiyozit, Endotel	İnfarkt alanını küçültmek Kalp fonksiyonlarını korumak Kalp remodelizasyonunu azaltmak
Böbrek	Peritübüler hücreler Mezangial hücreler	Koruma Tübüler onarım
Damar	Endotel Düz kas	Yeni damarlanma; Organizasyon, proliferasyon, migrasyon
Mide	Gastrik mukoza	Proliferasyon
Mezenter Deri Uterus Over		Anjiogenez
Testis	Leydig hücreleri Sertoli hücreleri	
Karaciğer		

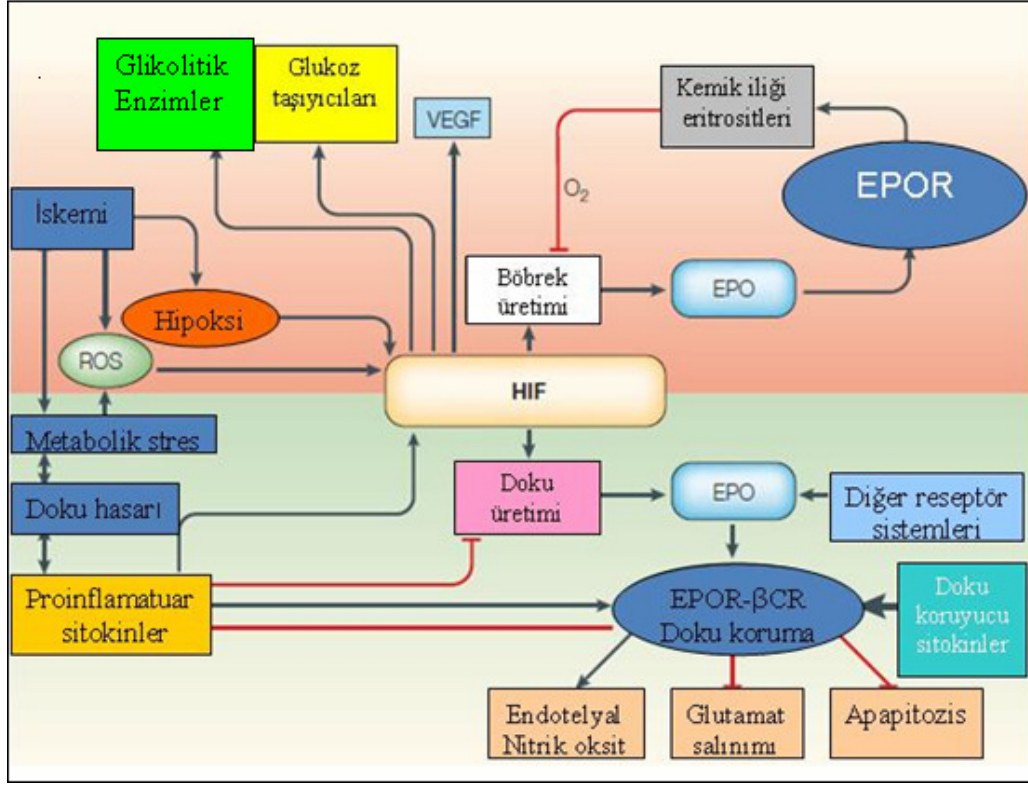
2.4.3. Eritropoetin salınımının düzenlenmesi

Epo'nun salınımında üç farklı sistem ortaya çıkmaktadır.

1. Endokrin veya hormonal sistem: Böbreklerden salınan Epo bir hormon gibi işlev görür; burada üretilir ve hedef dokuya gitmek için plazmaya geçer.
2. Lokal etki gösteren parakrin sistem: Beyinde, Epo üreten hücreler bulunmaktadır. Bu sistemde Epo komşu hücreler üzerindeki reseptörlerine bağlanarak etki eder.
3. Otokrin sistem: Beyinde kendisi kullanmak için Epo üreten bazı hücreler bulunmaktadır (44).

Eritropoetin salınımı hipoksi, anemi ve oksijen duyarlılık yolları ile uyarılır. Hipoksi Epo gen transkripsiyonunda bir artış meydana getirir. Hepatik Nükleer Faktör 4 ve Hipoksik İndüklenebilir Faktor (HIF) Epo için spesifik transkripsiyonel uyarıya neden olur (50). Beyinde, Epo sentezi çeşitli mekanizmalarla düzenlenir. Hem SSS hem de böbreklerde oksijen

konsantrasyonundaki azalmaya cevap olarak HIF'in hipoksiye bağıli aktivasyonu Epo salınımında artışa neden olur (51).



Şekil 2. Eritropoezde HIF'in merkezi rolü ve doku koruma etkilerini göstermektedir. Memelilerde, endojen Epo böbrek-kemik iliğı sisteminde veya lokal otokrin-parakrin sistemde etki gösterir. Her iki sistemde de HIF Epo salınımında önemli bir role sahiptir. Böbrek-kemik iliğı sisteminde renal hipoksi böbreklerden HIF salınımını uyarır ve böylece renal Epo üretimi artar. Yeni sentezlenen Epo dolaşıma geçer ve kemik iliğıne ulaşır, eritroid prekürsörlerini uyarır. Artmış eritrosit üretiminin bir sonucu olan dokulara artan oksijen sunumu negatif geri besleme şeklinde HIF'in etkisini azaltır. Doku hasarı metabolik stresi tetikler ve pro inflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olur, HIF aktive olur ve lokal Epo üretimi artar. Pro inflamatuvar sitokinler aynı zamanda Epo salınımını direk olarak inhibe edebilmektedir, fakat genelde Epo reseptör (EpoR) ekspresyonunu arttırarak etki gösterir. EpoR- βCR apoptozisi inhibe ederek, glutamat salınımını ve pro inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak doku hasarını hafifletir (51).

Hipoglisemi, güçlü nöronal depolarizasyon, artmış nöronal aktivite gibi metabolik bozukluklarda, mitokondriyal reaktif oksijen moleküllerinin artışına bağlı olarak HIF'in uyarılmasıyla serebral Epo üretiminde bir artış gözlenir. Bununla beraber astrositlerde üretimi insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü aracılığıyla doza bağımlı bir şekilde düzenlenir. İnterlökin-1 β , interlökin-6 ve tümör nekrozis faktör- α gibi proinflamatuvar sitokinler nöronlarda, astrositlerde ve mikroglia hücrelerinde Epo salınımını etkilemektedir (52).

2.4.4. Eritropoetinin farmakokinetiği

İnsanlarda normal serum Epo konsantrasyonu radyoimmünoassay yöntemle yapılan ölçümlerde 10-30 mU/ml olarak tespit edilmiştir. Bu değer 2-7 pmol/l'te karşılık gelmektedir. Yarılanma ömrü 5-9 saat olarak kabul edilmektedir. Rekombinant insan eritropoetin'i ile yapılan farmakokinetik çalışmalarla saptanan ortalama dağılım volümü 0.071 l/kg'dır. Endojen üretiminin normal miktarı 2-4 U/kg/24 saat olarak tahmin edilmektedir (45). Epo'nun diürenal bir dağılımı mevcuttur, gece yarısı Epo değeri sabahki değerinden yaklaşık % 40 daha fazladır. İnsanlarda rHuEpo, i.v. olarak verildiğinde doza bağlı seviyeler 1,5 saat içinde tespit edilir, i.v. yarılanma ömrü 5 saattir. Subkutan (s.c.) olarak verildiğinde ise serum en yüksek seviyesine 12-24 saat sonra ulaşır, s.c. yarılanma ömrü yaklaşık 20 saattir. Plazma Epo klirensi 10 ml/dk'dan azdır (53). Epo'nun yıkımı esas olarak karaciğer ve böbreklerde yapılmaktadır. Epo'nun %3-10 kadarı idrarla değişmeden atılır. Yıkımda esas fonksiyonu karaciğer üstlenmesine rağmen nefrektomi yapılan ya da üreterleri bağlanan köpeklerde Epo'nun yarı ömrünün uzaması, böbreklerin Epo metabolizmasında görev aldığını düşündürmektedir (54).

2.4.5. Eritropoetin reseptörü

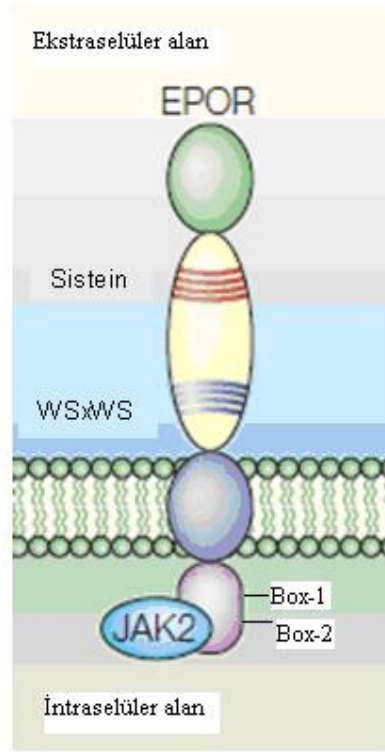
Epo reseptörü 66-78 kD arasında, sitokin reseptör süper ailesine ait bir yapıdır. EpoR geni D'Andrea ve arkadaşları tarafından 1989 yılında fare eritrolösemi hücrelerinden klonlanmıştır (55). Beyin, retina, kalp, böbrek, düz kas hücreleri, myoblast ve vasküler endotel gibi çeşitli yapılarda, nöronal hücreler üzerinde EpoR

varlığına rastlanmıştır (46). EpoR'ler sıçanların kortikal noronlarında yapılan kültürlerde, hipokampal nöronlarda sitokimyasal immüno boyama ve reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Santral sinir sisteminde majör Epo bağlanma alanları hipokampüs, kapsula interna, korteks ve orta beyin alanı olarak gözlemlenmiştir (47).

Tablo 7. EpoR yerleşimi (49).

EpoR alanları
Eritroid progenitorleri
Böbrek hücreleri
Endotel hücreleri
Vasküler düz kas hücreleri
Gastrik mukoza hücreleri
Leydig hücreleri
Astrositler

EpoR bir ekstraselüler ligand bağlanma bölgesi, bir hidrofobik transmembran alanı ve bir intraselüler (sitoplazmik) alan içeren bir yapıdan oluşur. Ekstraselüler ligand bağlanma bölgesi iki çift korunmuş sistein rezidüleri ve korunmuş bir WSXWS [tiroptofan-serin-X (X= herhangi bir aminoasit)- tiroptofan-serin] motif içerir. WSXWS kısmının doğru katlanma veya hücre yüzeyinde EpoR transportu için gerekli olduğu düşünülmektedir. Sitoplazmik kısımda oldukça iyi korunmuş iki motif (box 1 ve box 2) bulunur. İntraselüler alan intrinsik tirozin kinaz aktivitesi olmayan bir yapıdan oluşur (56, 57). Ancak EpoR'nin intraselüler kısmı JAK2 olarak bilinen bir tirozin kinaz ile bağlantılıdır ve proteinlerin fosforilasyonu bu yolla gerçekleşmektedir. Bu kısmın eksikliğinde Epo aracılı hücresel proliferasyon inhibe olur.



Şekil 3. Eritropoetin reseptör alt birimleri (EpoR).

EpoR'nin ekstraselüler kısmı bir yüksek afiniteli ve bir düşük afiniteli bağlanma bölgesine sahiptir (53). Plazma membranına yakın olarak uzanan, yaklaşık olarak sitoplazmik alanın yarısını oluşturan kısım, globin sentezinin uyarılması gibi proliferasyon ve diferensiyasyon için sinyal üretiminde gereklidir (58). Kalan kısmı sinyal üretimi için gerekli değildir ve aksine sinyalleri baskılar. Epo etkisini hücre yüzeyindeki reseptörlerinin iki molekülünün hemodimerizasyonuna neden olarak gösterir. Reseptörlerin defosforilasyonu da aktivasyonun sona ermesine neden olur.

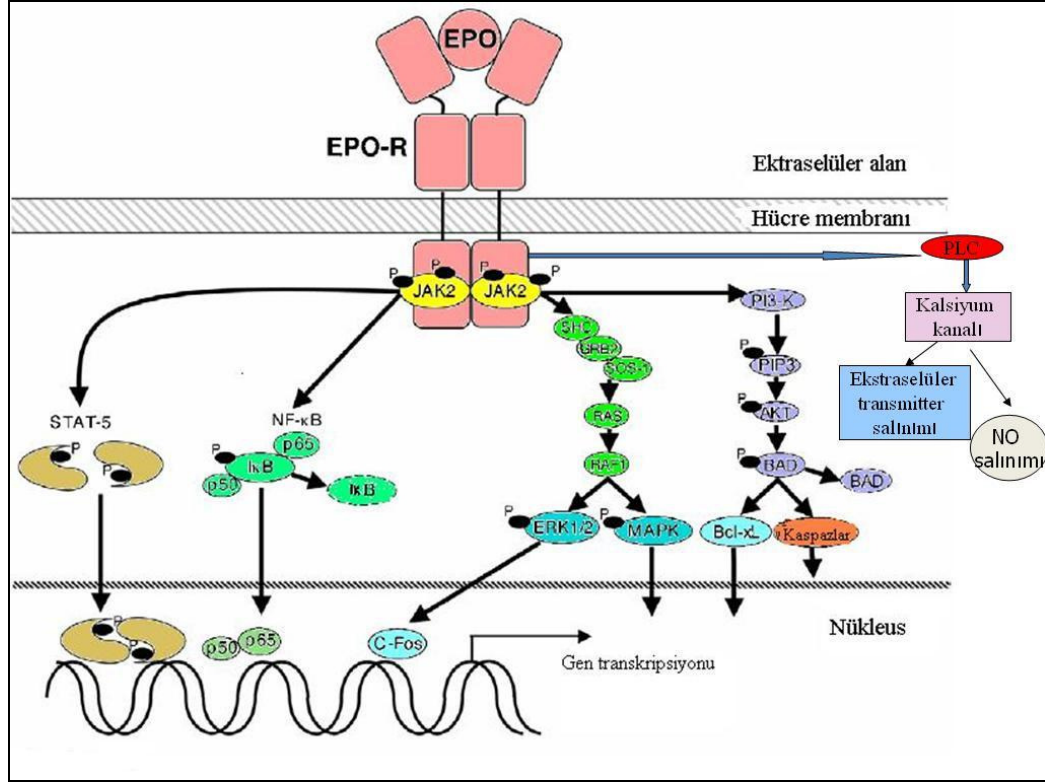
Nonhematopoetik dokulardaki Epo'nun biyolojik etkilerine aracılık eden hücre yüzey reseptör yapısı spesifik bir yapıyı gerektirmektedir. Beyin ve kalpteki Epo'nun doku koruyucu etkileri, interlökin-3 reseptör β cR alt ünitesi, ayrıca interlökin-5 ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör tarafından paylaşılan, ikinci bir ayrı reseptör bileşenini gerektirecek şekilde görünmektedir. β cR alt ünitesi ile EpoR arasındaki ilişki nöron benzeri hücrelerin lizatlarında proteinlerinin ortak immunopresipitasyonu ile gösterilmiştir (46).

2.4.6. Eritropoetin ve reseptör etkileşimi

Eritropoetin bağlandığı zaman, reseptörde dimerizasyon gerçekleşir ve bir seri hücre içi sinyal yolağı aktive olur. Aynı ailedeki diğer reseptörlerden farklı olarak EpoR, sinyal yolağını uyaran intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip değildir. Bu yüzden sinyalizasyonun, Epo'nun sitoplazmik kısmı ile ilişkili olan janus kinaz-2 (JAK2) olarak bilinen bir sitoplazmik tirozin kinaz aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Hücre içi sinyalizasyonun ilk basamağı JAK2 tirozin kinaz aktivasyonudur. JAK2 EpoR'yi ve STAT5 olarak isimlendirilen bir transkripsiyon faktörünü fosforile eder (59). JAK2'nin hücresel proliferasyonun düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. STAT5 nükleus translokasyonuna neden olur, hedef genin promotor bölgesinde belirli bir baz dizisini tanıyarak transkripsiyonu başlatır.

STAT5'e ek olarak reseptörün tirozin fosforilasyonu ile başlayan diğer bir yolak, Src homologu-2 (SH2) etki alanlı proteinler aracılığı ile aktive olur. İlk olarak bir SH2 ve Grb2'nin aracılık ettiği GTP/GDP değişim faktörü, plazma membranına göç eder ve bir ras proteinini GTP formuna dönüştürür. Ras proteininin aktivasyonundan sonra Raf- mutojen aktive protein kinaz (MAPK), ekstra selüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) 1/2 kaskadı aktive olur. Sonunda c-fos ve c-jun gibi onkogenlerin transkripsiyonu başlar (60).

Diğer bir yolakta Fosfoinozitol-3 kinaz (PI3K) reseptörün tirozin fosforile kısmına bağlanır ve ikinci haberciler uyarılır. PI3K sinyali Akt aktivasyonuna neden olur. Akt transkripsiyon ve hücre döngüsü sırasında anahtar bir role sahiptir. Akt aktivasyonu sitokrom c'nin salınımı ve kaspaz benzeri aktiviteler ile mitokondrial membran potansiyelinin korunmasında etkilidir. Bad fosforilasyonu ve Bcl-XL aktivasyonuna neden olur. JAK2'nin aktivasyonu aynı zamanda nükleer faktör kappa B(NFκB) inhibitörünün fosforilasyonuna ve NFκB'nin translokasyonuna neden olur (61). Epo, fosfolipaz C yoluyla Ca^{++} kanallarının aktivasyonunu düzenler, aynı zamanda eksitator nörotransmitter ve artan nitrik oksit (NO) üretimini azaltır (51).



Şekil 4. Epo sinyal yolakları (61).

2.5. Eritropoetinin Etkileri

Epo kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden proeritroblastların üretimini uyarmaktadır. Bu üretim düşük oksijen basıncında kaldığı sürece ya da yeteri kadar eritrosit yapılıp, dokulara yeterli miktarda oksijen taşınıncaya kadar devam eder. Ayrıca bir kez proeritroblastlar oluşunca Epo, bu hücrelerin farklı eritroblastik evreleri normalden daha hızlı geçmelerine neden olarak, yeni hücrelerin üretimini artırır. Epo azalmış oksijen koşullarında alyuvar üretimini uyaran esas faktördür (62). Ayrıca son yıllarda Epo'nun SSS üzerinde nöroprotektif etkisi olduğuna dair çeşitli yayınlar mevcuttur. Nöroprotektif mekanizması ile ilgili sorular henüz tam olarak cevaplanamamıştır. Reaktif oksijen molekülleri ve glutamat gibi doku hasarlayıcı moleküllerin üretimini sınırlandırarak, vazospazmı geri döndürerek, anjiyogenezi stimüle ederek, apoptozu azaltarak, inflamasyonu düzenleyerek ve kök hücre iyileşmesini sağlayarak etki ettiği bilinmektedir. Epo'nun,

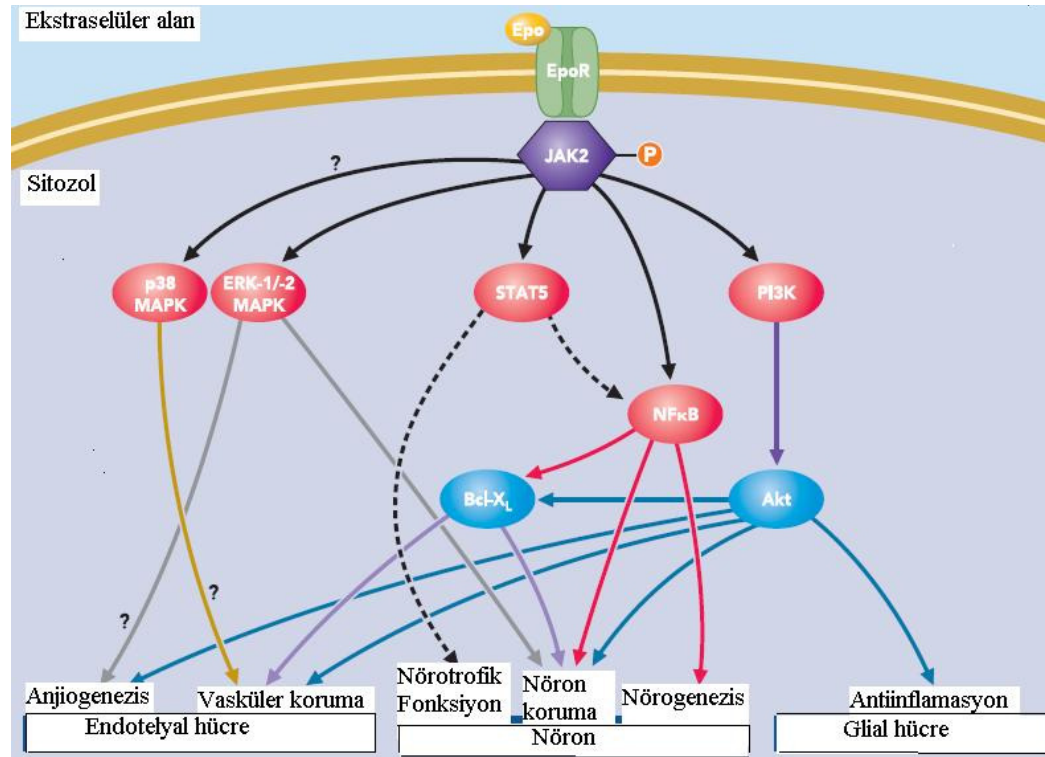
nöronlar üzerine koruyucu etkisinin bu mekanizmaların bir kombinasyonu ile olduğu düşünülmektedir (47).

Tablo 8. Epo'nun nöroprotektif etkisi için deneysel kanıtlar (48).

	Deneysel Modeller		Epo'nun Etkisi
	Deneysel koşul	Kullanılan hayvan	
Nöron	Beyin iskemisi	Sıçan, fare, gerbil	İskemiye tolerans ve nöronal sağ kalımda artış, öğrenme kapasitesinde iyileşme
	Retinal iskemisi	Sıçan, fare	Apopitozu azaltma
	Spinal hasar	Sıçan	Apopitozu ve inflamasyonu azaltma, fonksiyonel iyileşme
	Serebral kanama	Tavşan	Kan akımında ve nöronal fonksiyonlarda iyileşme
	Periferik sinir	Sıçan	Apopitozu azaltma ve onarımda artış
	Reaktif oksijen radikalleri	Sıçan	Reaktif oksijen moleküllerinin üretimini, apopitozu ve kaspaz aktivitesini azaltma
	Glutamat toksisitesi	Sıçan	Glutamat salınımını azaltma, nöronal sağ kalımda artış
	Gelişim ve matürasyon	Fare	Apopitozu azaltma, nöronal pregenitörlerin sayısında artış
Mikroglia	Beyin inflamasyonu	Sıçan	İnflamasyonu ve sitokin üretimini azaltma
Damarlar	Oksidatif stres	Sıçan	Reaktif oksijen moleküllerinin üretimini, apopitozu ve kaspaz aktivitesini azaltma, endotel üzerine koruyucu etki

Epo, EpoR üzerinde JAK-2'nin tirozin fosforilasyonunu indükleyerek bir dizi sinyal yolağının uyarılmasına neden olur. Bu sinyal mekanizmalarının beyin kaynaklı nörotrofik faktör ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi bazı büyüme faktörlerinin sitoprotektif etkileri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu etkiler nöron kuruyuculukta gereklidir. Bununla beraber bu sinyal yolları arasındaki ilişkiler eritroid hücrelerinde tanımlanamamıştır (63).

Epo'nun nörotrofik etkisini açıklamada birkaç mekanizma üzerinde durulmaktadır.



Şekil 5. Eritropoetin'in nöroprotektif etki mekanizması: Epo'nun reseptörüne bağlanmasıyla, JAK2 fosforile olur ve böylece reseptör aktivasyonu gerçekleşir. Bu aktivasyon STAT5, MAPK ve ERK-1/-2, PI3K/Akt ve NFκB gibi sekonder ikincil mesajcıların aktivasyonuna neden olur. ERK-1/-2 proteinleri Epo aracılı nöroprotektif etkide gereklidir ve anjiogeneizde önemli bir faktördür. Akt fosforilasyonu ile uyarılan PI3K, Epo aracılı anti-inflamasyon, vasküler koruma ve anjiogeneizde görevlidir. Bcl-XL Epo aracılı vasküler korumada ve nöroprotektif etki mekanizmasında yer almaktadır. NFκB Epo aracılı nöroprotektif etkide ve nörojenizde görev alan genlerin ekspresyonunu uyararak etki gösterir (12).

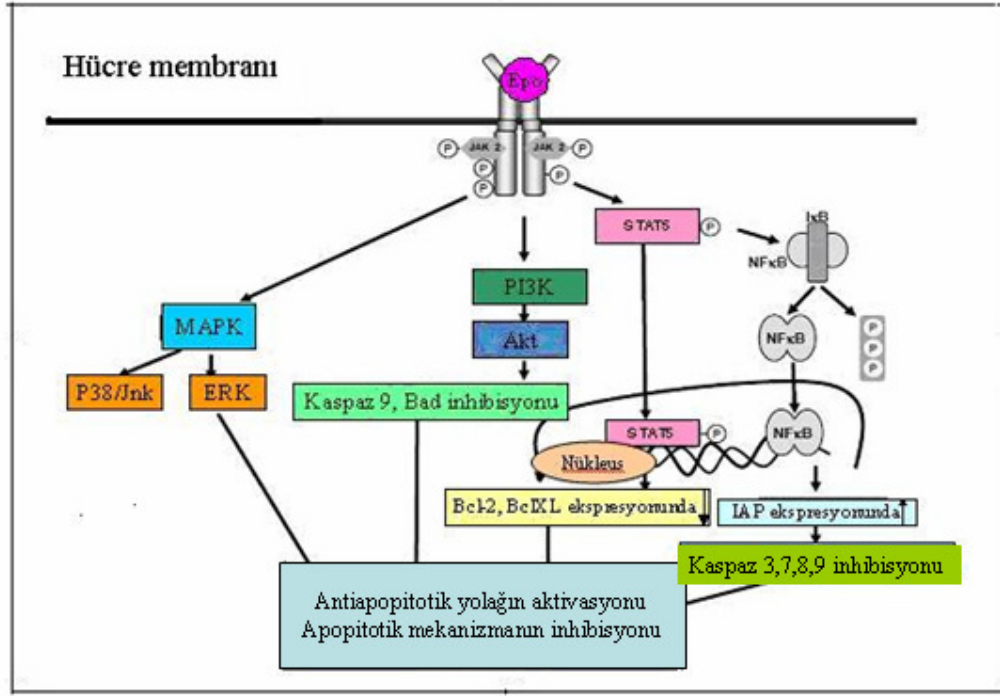
2.5.1. Nöroprotektif etkide sinaptik nörotransmisyonun düzenlenmesi

Epo, Ca^{++} akışı, membran depolarizasyonu ve nörotransmitter sentezi gibi sinir hücresinin çeşitli fonksiyonlarını düzenler. Hipokampal kesit kültürlerinde iskemi süresince ve sonrasında Epo'nun sinaptik transmisyonu arttırdığı gösterilmiştir. Epo'nun çeşitli nörotransmitterlerin stimülasyon veya inhibisyonuna neden olarak sinaptik plastisitede rol oynadığı düşünülmektedir. Epo Ca^{++} kanallarının aktivasyonu ile, membran depolarizasyonunu uyararak, MAPK aktivasyonunu stimüle ederek ve NO sentezini arttırarak, PC12 hücrelerinde tirozin hidroksilaz aktivitesini ve dopamin salınımı uyarır. Ayrıca Epo'nun NO üretimini stimüle ederek kısmi olarak nörotransmitter salınımına neden olduğu düşünülmektedir (64). NO'nun dopamin ve asetilkolin gibi farklı nörotransmitterlerin salınımını stimüle ettiği bilinmektedir. Bununla beraber sıçan hipokampal ve striatal kesit kültürlerinde NO varlığına bağımlı olmayan bir yol ile dopamin ve asetilkolin salınımını uyardığı gösterilmiştir (47). EpoR uyarılmasının JAK2 tirozin kinaz aktivasyonu aracılığıyla serebellar granül hücrelerinde ve hipokampal nöronlarda Ca^{++} bağımlı glutamat salınımını inhibe ederek hipokampal nöronları, iskemik nöronal hasardan koruduğu bildirilmiştir (65). Presinaptik ve postsinaptik mekanizmaların sırasıyla iskeminin erken ve geç fazlarıyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Epo presinaptik fonksiyonları inhibe ederek korumayı hızlı bir şekilde gerçekleştirmektedir.

Eritropoetin beyindeki birçok fonksiyonunu Ca^{++} kanallarının aktivasyonu aracılığı ile gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür. İnsan nöroblastom hücresi grubu SK-N-MC hücrelerinin patch-klamp çalışmalarında T-tipi Ca^{++} kanalları tespit edilmiştir. Epo plazma membran T-tipi voltaj bağımlı Ca^{++} kanalları aracılığıyla, Ca^{++} akışında bir artışa neden olarak, Ca^{++} hemeostazını değiştirerek, nöronal hücrelerle etkileşmektedir (66). PC12 nöronal hücrelerine Epo verilmesi intraselüler Ca miktarında ve monoamin konsantrasyonlarında bir artışa neden olmaktadır. Bu tespitler Epo'nun sinir sisteminde pek çok fonksiyonunun Ca^{++} kanalları aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir (63).

2.5.2. Antiapoptotik etki

Son zamanlardaki çalışmalar Epo'nun antiapoptotik etkisini birçok in vivo ve in vitro nöronal hasar modellerinde göstermiştir. Dışardan verilen Epo'nun beyinde iskemik alanları, endotelial koruma sağlayarak ve nöronal hücrelerin apoptotik ölümünü engelleyerek azalttığı tespit edilmiştir. Nöronal EpoR aktivasyonu, N-metil-D-aspartat indüksiyonu veya JAK-2 ve NFκB arasındaki etkileşimin tetiklenmesiyle açığa çıkan NO aracılığıyla olan apoptozdan koruma sağlar. Ayrıca Epo'nun rodent mikroglia hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda spontan apoptozdan da koruma sağladığı gösterilmiştir (47). Epo'nun antiapoptotik etkisini apoptotik süreçte rol oynayan genlerin ekspresyonunun farklı düzenlenmesi yoluyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Epo anoksi ve serbest radikaller ile meydana gelmiş nöronal hasarda, hücre ölümü ile ilişkili bir seri hücresel yolağın uyarılmasını düzenlemektedir. Bu düzenlemede Epo ilk protein kinaz B'nin aktivasyonu ile mitokondrial membran potansiyelini korur. Sonrasında Epo sitokrom c salınımı ile ilişkili kaspaz-8, kaspaz-1 ve kaspaz 3 salınımını inhibe eder. Akt 1 aktivasyonunu artırır, proapoptotik Bad proteinini fosforile eder. Böylece nöronal nükleer DNA bütünlüğünü sağlar (67). Epo'nun PC12 hücrelerinde antiapoptotik bcl-XL geninin ekspresyonunu arttırdığı ve pro-apoptotik bak geninin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Epo'nun nöronal hücrelerinin devamlılığını sağladığı bilinen bcl-XL'nin artışına neden olarak hipokampal nöronlarda gecikmiş nöronal ölümü engellediği ortaya konmuştur (63).



Şekil 6. Epo'nun antiapoptotik etki mekanizması (61).

2.5.3. Antioksidatif etki

Eritropoetin'in antioksidatif etkiye sahip olduğu bilinmektedir. NO aracılı salınan serbest radikallerin baskılanması veya bunların toksik etkilerinin antagonize edilmesi Epo'nun nöroprotektif etkilerinin temelini oluşturmaktadır. Eritropoetin'in nöronlarda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığı düşünülmektedir. Ek olarak fare astrosit hücre kültürleriyle yapılan çalışmalarda glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca eritrositlerdeki sitozolik katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin düzenleyerek ve lipid peroksidasyonu inhibisyonuna neden olarak oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstermesi antioksidan özelliğini desteklemektedir. Gerbillerde yapılan bir serabral iskemi ve sıçanlarda yapılan bir deneysel spinal kord yaralanması modelinde, sistemik Epo uygulanmasının iskemi sonrası lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (63).

2.5.4. Anjiogenik etki

Eritropoetin ile aktive olan neovaskularizasyonun uyarılması bir diğerk potansiyel koruma mekanizmasıdır (47). Eritropoetin mitozu uyarır ve endotelyal ve mezengial hücrelerin aktivasyon ve farklılaşmasına neden olur. Endotelyal hücre mitoz ve motilitesini uyarabilme özelliğı neovaskularizasyon ve yara iyileşmesinde önemlidir. Yeni damar formasyonu ile Epo hedef hücrenin oksijen alımını artırır. Eritropoetin hem normal hücrelerde hem de patolojik durumlarda anjiogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynar (68). İnsan beyinde bir enfarktüs sonrası, nöron ve glial hücrelere ek olarak vasküler endotel yoluyla Epo ve EpoR ekspresyonundaki artış, beyin hasarına vasküler cevapta Epo ve reseptörünün rolü olabileceğini düşündürmektedir. Eritropoetin beyinde iskemik alanın sınır bölgesinde kan akımını ve doku oksijenizasyonunu artırır. Endotel hücrelerinde anoksiye bağı vasküler hasarı engeller. Spesifik endotelyal reseptörlerine bağlanarak direkt olarak serebral arterler üzerine etki ettiğı böylece serebrovasküler tonüsün kontrolünde rolü olduğı düşünülmektedir (63).

Embriyonik gelişim sürecinde, Epo anjiogenezin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Epo ve EpoR'leri olmayan fare embriyolarının eritropoetik kusurun yanı sıra kranial damar sisteminin gelişiminin normale göre daha az olmasına bağı soluk görüldüğü gözlemlenmiştir (69). Eritropoetin insan erişkin miyokard endotel hücreleri üzerine vasküler endotelyal growth faktör'e (VEGF) denk anjiogenik potansiyele sahiptir. Ayrıca fare beyin endotel hücrelerinde kapiller damar sayısını arttırdığı tespit edilmiştir (70).

2.5.5. Nörotrofik etki

Eritropoetin molekülü içinde 17 amino asitlik bir spesifik nörotrofik dizi olduğı tespit edilmiştir. Bu kısmın, in vitro çalışmalarda hem farelerde NS20Y hem de insanlarda SK-N-MC nöroblastom hücrelerinde ve in vivo motor son plak çalışmalarda farklılaşmayı tetiklediğı, kolin asetil transferaz aktivitesini arttırdığı ve hücre ölümünü engellediğı gösterilmiştir. Nörotrofik etki Epo'nun uzun latensli etkilerindendir (63).

Diyabetik nöropatili hayvanlarda ve sinir kesisi sonrasında Epo verilmesinin periferik sinir liflerinin aksonlarının yenilenmesinde belirgin etkisi olduğu saptanmıştır (71). Kültürlerde Epo'nun nöronal büyüme ve kesik sinir yolları üzerine nörotrofik etkisi olduğu gözlemlenmiştir (51, 72).

2.5.6. Nörojenik etki

Eritropoetin'in uzun süreli etki mekanizmalarından bir diğeri nörogenezi düzenlemesidir. Eritropoetin'in nöronal kök hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasının kontrolünde rol sahibi olabileceği düşünülmektedir. Eritropoetin reseptörü erişkin subventriküler zonun yanı sıra nörogenez sırasında embriyonik germinal zonda da tespit edilmiştir (63). Eritropoetin erken gelişim sırasında genel bir morfojen ve n roenezisin uyarıcısıdır. Erişkinin lateral ventrikülünün içine Epo infüzyonu uygulanarak yapılan bir çalışmada subventriküler zonda nöronal kök hücre sayısında bir azalış, olfaktor bulbus inter nöronlarında ve olfaktor bulbusa yeni oluşturulan hücre göçünde bir artış gözlemlenmiştir.  n vitro ve in vivo çalışmalarda Epo kullanımıyla beyin kaynaklı nörotrofik faktör seviyelerinde bir artış, nörolojik fonksiyonlarda bir iyileşme saptanmıştır. Diğ r bir çalışmada EpoR kusuru olan farelerde nöronal pregenitor hücrelerinde azalma, n roenezde gerileme ve nöronal apoptozda bir artış tespit edilmiştir. Sıçanlarda oluşturulan bir travmatik beyin yaralanması modelinde, Epo verilmesiyle travmadan 14 gün sonra yeni oluşan nöron sayısında bir artış ve boyutsal hafızada iyileşme görülmüştür (73). Eritropoetin sıçan oligodendrositlerinde farklılaşma ve olgunlaşmaya neden olur, normal ve hasarlı erişkin santral sinir sisteminde miyelin onarımını sağlar. Yenidoğan ve erişkin hayvanlarda nöronal kök hücrelerinin farklılaşmasında önemli bir faktördür. Aynı zamanda Epo yaralanma sonrası iyileşme sürecinde rejenere nöronların göçünü düzenler (74).

2.5.7. Antiinflamatuvar etki

Son yıllardaki çalışmalarda Epo'nun antiinflamatuvar etkileri olduğu tespit edilmiştir. Eritropoetin'in nöronal kültür çalışmalarında ve bir deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde proinflamatuvar sitokin üretimini ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Primer olarak kaspaz 1'in regülasyonu ile mikrogial aktivasyon için gerekli nöronal apoptotik membran fosfolipid serin kısmını modüle eder. Böylece serebral mikrogial aktivasyonun inhibisyonu ile dış koruma sağlar ve nöronal fagositozdan korunmak için mikrogial fosfolipid serin reseptör ekspresyonunu baskılar (63).

Tablo 9. Epo'nun Fonksiyonları (12).

Fonksiyon	Açıklama
Nörotrofik etki	Erişkin sıçanların septal kolinerjik nöronlarında yenileme İn vitro dopaminerjik prekürsör nöronların devamlılıklarını sürdürmelerine ve farklılaşmalarına destek olma
Nörogenez	Hipoksiye bağlı Epo salınımında ön beyin nöronal kök hücrelerine direk etki gösterme
Antiinflamasyon	İnflamasyona neden olan mediatörlerin üretimini azaltma Serebral iskemide infarkt alanını küçültme Multiple sklerozda koruma Optik nöritte retinal ganglion hücrelerinin devamlılığını sağlama
Anjiyogenez	İnsan umbilikal veninde, adrenal kapiller endotel hücrelerinde, beyin kapiller endotel hücrelerinde mitojenik etkiye neden olma Sıçan aort halkalarında, fare endometriyumunda, tavuk embriyosu koryoallantoik zarında anjiogenik etki gösterme
Vasküler geçirgenlik	İn vitro, VEGF ile uyarılmış vasküler geçirgenlik artışına karşı kan beyin bariyerinde koruma

2.6. Eritropoetin'in Klinikte Kullanıldığı Durumlar

Eritropoetin'in tedavide kullanımı üzerine yapılan klinik araştırmalar ve hayvan modeli çalışmaları umut verici gelişmelerle sonuçlanmaktadır. Bir seri deneysel rodent modellerinde, sistemik verilen rHuEpo'nun kan beyin bariyerini geçtiği, nöronal yaralanmanın sonlandırılmasında ve bilişsel fonksiyonlarda etkili olduğu görülmüştür. Bir iskemik inme modelinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Epo'nun hasardan 24 saat önce veya inmeden 6 saat sonra verilmesinin doku hasarını belirgin şekilde azalttığı saptanmıştır. Bir künt travma dan 24 saat önce verildiğinde hasarı azaltmakta ve doku nekrozunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde küçülmeye neden olmaktadır. Deneysel bir otoimmün ensefalomyelit modelinde Epo ile tedavi sonrasında semptomların şiddetinin azaldığı ve belirgin olarak bir gerileme olduğu ortaya konmuştur. Epo aynı zamanda nöbetlerin şiddetini azaltmakta ve latensi düzenlemekte, nöronlardaki sağ kalımı arttırmaktadır (75).

rHuEpo'nun potansiyel klinikte kullanıldığı bazı durumlar; böbrek yetmezliği anemisi, kemoterapi ve radyasyon tedavisi sonrası iyileşme, prematürite anemisi, kronik anemiler, inflamasyon, enfeksiyon (AİDS, vb), neoplazi, aplastik anemi, myelodisplastik sendromlar, hemoglobinopatiler (örn: Orak hücreli anemi) olarak sıralanabilir (76) Ayrıca Epo'nun egzersiz toleransını arttırdığı, aşırı yorgunluğu hafiflettiği, SSS fonksiyonlarını iyileştirdiği, kalp büyümesini azalttığı, yaşamın günlük fonksiyonlarını gerçekleştirme yeteneğini arttırdığı, transplant alıcılarında alloimmunizasyon riskini azalttığı, koagülasyonu düzenlediği bilinmektedir (57).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi ve Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2010.04.01.039 sayılı proje olarak desteklendi. Çalışma için Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul'undan 14.10.2009 tarih ve 100/24 sayılı etik kurul onayı alındı.

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplar

Deneyler için, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış 40 adet Wistar-Albino cinsi, erkek erişkin sıçan kullanıldı. Bu sıçanlar Düzce Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Bu merkezde hayvanlar yem ve su kısıtlaması olmaksızın doğal aydınlık-karanlık döngüsünde 12-14 haftalık oluncaya kadar yetiştirildi. Hayvanlar deneysel çalışmalardan yaklaşık 1 hafta önce araştırma merkezinden alınıp anabilim dalımızdaki hayvan laboratuvarında aynı şartlar sağlanarak kontrol altında tutuldu. Deney hayvanları rastgele olarak seçilen 4 gruba ayrıldı. Gruplar 500 I.U. penisilinin uygulandığı kontrol grubu (n=10), penisilin + 2000 I.U./kg Epo grubu (n=10), penisilin + 4000 I.U./kg Epo grubu (n=10), penisilin + 6000 I.U./kg Epo grubu (n=10) olarak planlandı. Deney sürecinde ölen 1 denek çalışma dışı bırakıldı.

3.2. Kullanılan Araçlar

PowerLab 8/SP kayıt cihazı (ADInstruments, Australia)

BioAmp (ADInstruments, Australia)

Stereotaksik alet (Harward)

Terazi (A&D, HR-120, Japan)

Hassas terazi (A&D, Japan)

3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulanma Yolları

Penisilin G Potasyum

Moleküler formülü	: C ₁₆ H ₁₇ KN ₂ O ₄ S
Moleküler ağırlığı	: 372.48 gr/mol
Uygulanma yolu	: İntrakortikal
Uygulanma dozu	: 2,5 µl
Kullanılan çözücü	: Distile su

Eritropoetin

Kullanılan ajan	:Eprex Şırınga (Gürel-Türkiye)-Rekombinant insan eritropoetini
Etkin Bileşen	: Epoetin alfa (16,8 µg/0,5 ml)
Moleküler Formülü	: C ₈₁₅ H ₁₃₁₇ N ₂₃₃ O ₂₄₁ S ₅
Moleküler ağırlığı	: 18396.1 gr/mol
Uygulanma yolu	: İntraperitoneal
Uygulanma dozu	: 2.000 I.U./kg, 4.000 I.U./kg, 6000 I.U./0,5 kg
Yardımcı maddeler	: Polisorbat 80 (0,15 mg/0,5 ml) Sodyum klorür (2,192 mg/0,5 ml) Sodyum fosfat monobazik dihidrat (0,58 mg/0,5 ml) Sodyum fosfat dibazik dihidrat (1,115 mg/0,5 ml) Glisin (2,50 mg/0,5 ml) Enjeksiyonluk su (0,5 ml)

Üretan (Sigma Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)

Etkin madde	: Etil karbamat
Moleküler Formülü	: C ₃ H ₇ NO ₂
Moleküler ağırlığı	: 89.09 gr/mol
Uygulanma yolu	: İntraperitoneal
Uygulanma dozu	: 1.2 gr/kg
Kullanılan çözücü	: Distile su

3.4. Deneylerin Yapılışı

3.4.1. Cerrahi operasyon

Operasyon öncesinde tüm sıçanlar tartıldı ve 1.2 gr/kg üretan i.p. yoldan verilerek anestezide alındılar. Anestezinin derinliği pençe refleksleri ile kontrol edildikten sonra sıçanlar operasyon masasına sabitlendi. Sıçanın başının üst kısmındaki tüyler tıraş edildikten sonra hayvanın kafa derisi bistüri yardımıyla rostro-kaudal doğrultuda, ortalama 2-4 cm uzunluğundaki bir kesi ile açıldı. Kafatası kemikleri, lambda ve bregma noktaları ortaya çıkarıldıktan sonra bregma hattının solunda kalan kısmı bir tur motoruyla inceltiştirilerek, bu bölgedeki kafatası kemiği dikkatlice kaldırıldı. Sürtünmeden kaynaklanan ısınmayı önlemek maksadıyla zaman zaman kafatası üzerine serum fizyolojik damlatılarak ısı artışı engellenmeye çalışıldı. Kafatası kemiği tamamen uzaklaştırıldıktan sonra dura mater dikkatlice kaldırıldı. Ardından ECoG kaydı işlemine geçildi.

3.4.2. ECoG kaydı alınması

Stereotaksik cihaza sabitlenen sıçanlardan elektrofizyolojik kayıt için 2 adet Ag/AgCl top elektrot ve topraklama amacıyla 1 adet Ag/AgCl klemp elektrot kullanıldı. Top elektrotlardan pozitif olanı bregmanın önüne, negatif olanı ise bregmanın birkaç mm arkasına, toprak elektrot ise kayıt jeli sürülerek sol kulağa yerleştirildi. Elektrotlar ile alınan aktivite BioAmp (ADInstruments, Australia) arabiriminde yükseltiştirilerek PowerLab 8/SP (ADInstruments, Australia) veri kayıt sistemine aktarıldı. PowerLab beyin aktivitesi Chart 5.1.1 (ADInstruments, Australia) yazılımı ile görüntülendi ve deney sonrası analiz için bilgisayarda saklandı.

3.4.3. Epileptiform aktivitenin oluşturulması

İlk 5 dakikalık bazal aktivitenin görüntülenmesi sonrasında sol korteks'e Bregma noktasından 3 mm lateral, 2 mm posteriyor ve 2 mm ventrale bir Hamilton mikroenjeksiyonu aracılığıyla epileptiform aktivite oluşturmak üzere 500 I.U. doz ve 2.5 µl hacimde i.c. yoldan penisilin uygulandı. Beyine yapılan i.c. enjeksiyonlarda enjektör ucunun damarı zedelememesine dikkat edildi Oluşan epileptiform aktivite, enjeksiyondan ortalama $9,64 \pm 2,9$ dakika sonra ortaya çıktı. Deney protokollerinin uygulanmasının ardından deneklerin yaşamına dekapitasyon yöntemiyle son verilek deneyler sonlandırıldı.

3.4.4. Deney gruplarına madde uygulanması

Grup 1 (Kontrol grubu): Bu gruptaki deneklere (n=10) ürethan anestezisi altında 5 dakikalık bazal aktivite kaydı alınmasının ardından 500 I.U. penisilin 2,5 µl i.c. uygulanarak epileptiform aktivite oluşturulması sağlandı. ECoG aktivitesi penisilin enjeksiyonundan itibaren 175 dakika süreyle kaydedildi.

Grup 2 (Penisilin + Eritropoetin 2000 I.U./kg): Bu gruptaki deneklere (n=10) ürethan anestezisi altında 500 I.U. penisilin 2,5 µl i.c. uygulanarak epileptiform aktivite oluşturulması sağlandı. Bu aktivitenin diken dalga ve genliklerinin, enjeksiyondan 35 ± 15 dakika sonra kararlı bir seviyeye ulaşmasının ardından 2000 I.U./kg eritropoetin i.p. olarak verildi ve 120 dakika daha ECoG kaydı alındı.

Grup 3 (Penisilin + Eritropoetin 4000 I.U./kg): Bu gruptaki deneklere (n=9) ürethan anestezisi altında 500 I.U. penisilin 2,5 µl i.c. uygulanarak epileptiform aktivite oluşturulması sağlandı. Bu aktivitenin diken dalga ve genliklerinin, enjeksiyondan 35 ± 15 dakika sonra kararlı bir seviyeye ulaşmasının ardından 4000 I.U./kg eritropoetin i.p. olarak verildi ve 120 dakika daha ECoG kaydı alındı.

Grup 4 (Penisilin + Eritropoetin 6000 I.U./kg): Bu gruptaki deneklere (n=10) ürethan anestezisi altında 500 I.U. penisilin 2,5 µl i.c. uygulanarak epileptiform aktivite oluşturulması sağlandı. Bu aktivitenin diken dalga ve genliklerinin, enjeksiyondan 35 ± 15 dakika sonra kararlı bir seviyeye ulaşmasının

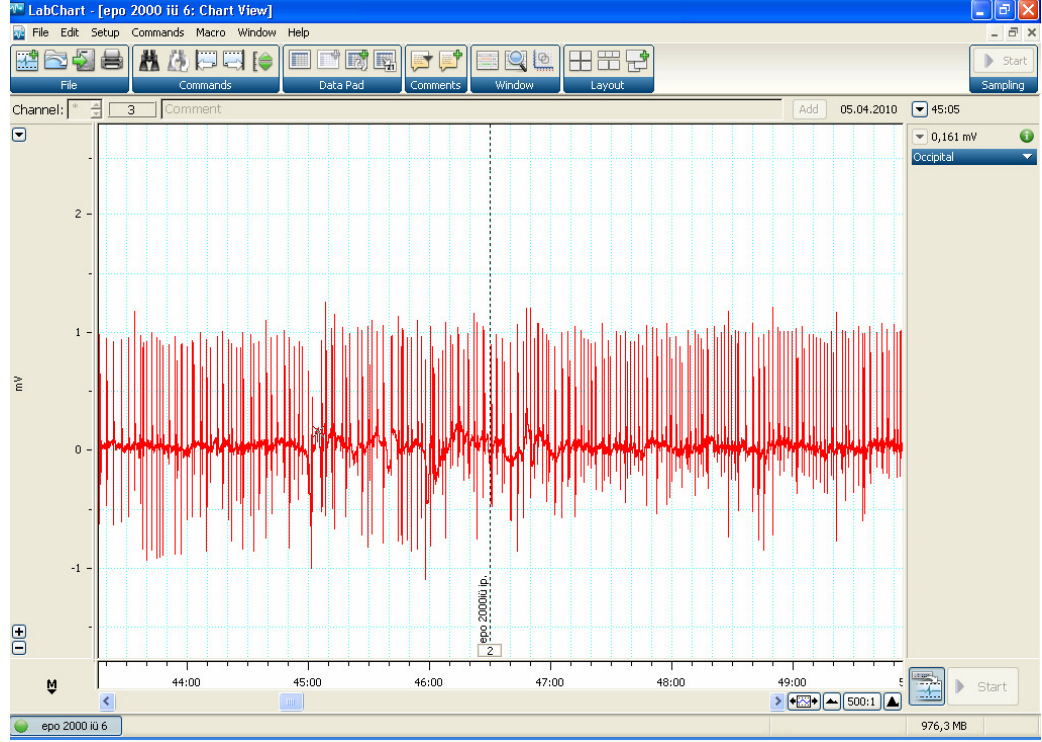
ardından 4000 I.U./kg eritropoetin i.p. olarak verildi ve 120 dakika daha ECoG kaydı alındı.

3.4.5. Elektrofizyolojik kayıtların değerlendirilmesi

Alınan elektrofizyolojik kayıtlar Chart 5.1.1 (ADInstruments, Avustralya) yazılımında bulunan makro ile birer dk'lık dilimlere ayrıldı. Dakika başına düşen diken dalga sayısı ve ortalama genlik değerleri makro sayesinde otomatik olarak hesaplandı. Bu işlemler tüm hayvanlardan elde edilen kayıtlar için tekrarlandı. Tüm elektrofizyolojik kayıtlar rakamsal verilere dönüştürüldükten sonra, Epo enjeksiyonundan önceki 10 dakika ile sonraki 1-120. dakikalar arasındaki değerlerin 10'ar dakikalık periyotlardaki diken dalga sayısı ve genlik değerlerinin ortalamaları hesaplanarak analizleri yapıldı.

3.5. İstatiksel Analiz

Alınan ECoG aktivitesi verileri değerlendirildiğinde, her bir grubun kendi içinde başlangıca göre çeşitli periyotlardaki değişimleri paired t-testi ile incelendi. Periyodik değişimler bakımından 4 grup arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve anlamlı farklılıklar Tukey post hoc testi ile değerlendirildi. Test sonuçlarında elde edilen p değeri 0,05'in altında ise bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel hesaplamalarda PASW 18.0 yazılımı kullanıldı. Elde edilen verilere ait tanımlayıcı değerler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak tablo ve grafikler halinde sunuldu.



Şekil 7. Beyin dalgalarının kaydında kullanılan paket program (Chart 5.1.1) ve bu programda kayıt anından bir görüntü



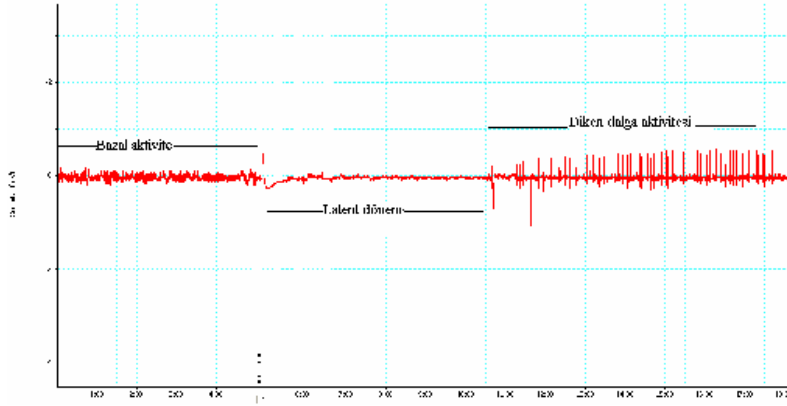
Şekil 8. Power Lab/8SP AD instruments düzeneği.

4. BULGULAR

Çalışmamızda toplam 39 hayvandan oluşan deney gruplarında penisilinin oluşturduğu epileptiform aktiviteye 2000 I.U./kg (n=10), 4000 I.U./kg (n=9) veya 6000 I.U./kg (n=10) dozlarında i.p. uygulanan Epo'nun etkileri araştırıldı. Epo grupları ve kontrol grubuna ait diken dalga sayısı ve genlik değerlerinin zaman periyotlarındaki değişimi değerlendirildi. Her bir deney grubu için grup içindeki farklılıklar, zaman periyotlarındaki değişimlerin başlangıç değerleri ile ve gruplar arası farklar birbirleri ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

4.1. İntrakortikal Penisilin ile Oluşturulan Epileptiform Aktivitenin Özellikleri (Kontrol Grubu)

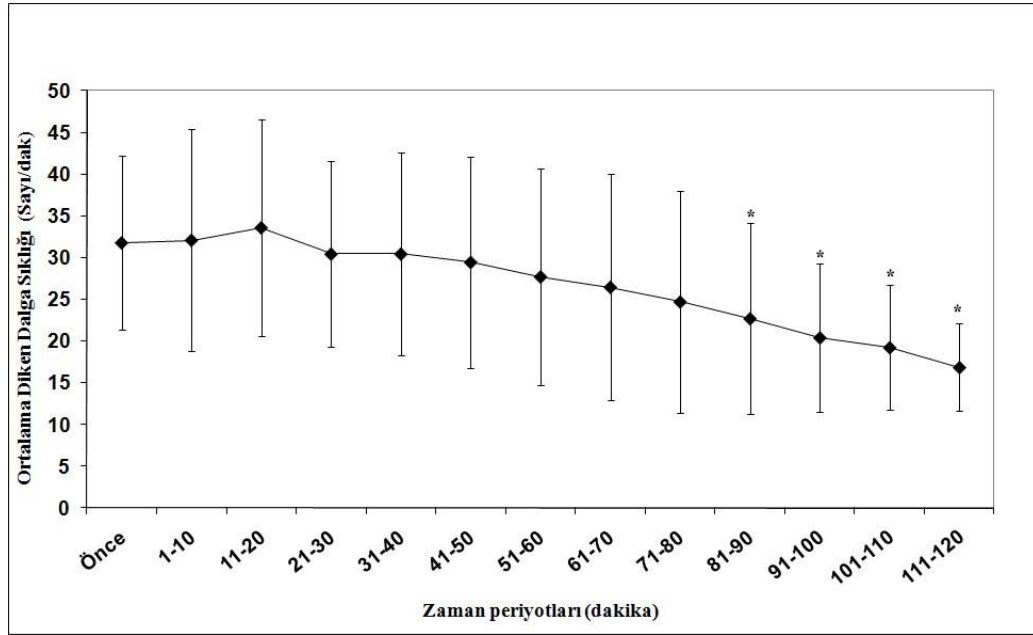
Epileptiform aktivite oluşturmak için penisilin 500 I.U. dozda i.c. olarak uygulandı. Penisilin enjeksiyonundan sonra başlayan ve bazal aktiviteye göre daha düşük genlikte dalgalarla kendisini gösteren sessiz dönem, ortalama $9,64 \pm 2,9$ dakika sürdü. Bu dönemin sonunda ECoG kayıtlarında genellikle belirgin bir geçiş dönemi olmadan, diken ve diken-dalga kompleksleri ile karakterize olan epileptiform aktivite ortaya çıktı (Şekil 8).



Şekil 8. Penisilin enjeksiyonundan sonra ECoG kaydında gözlenen değişimler. Kesik çizgilerle ifade edilen alan i.c. penisilin verildiği zamandır. Penisilin verilmesinden hemen sonra gelen ve yaklaşık 5-6 dakika süren bazal aktiviteye göre genlik değerlerinde belirgin azalmanın görüldüğü latent dönem, ardından ortaya çıkan epileptik dikenler görülmektedir.

4.1.1. Diken dalga sayısına etkisi

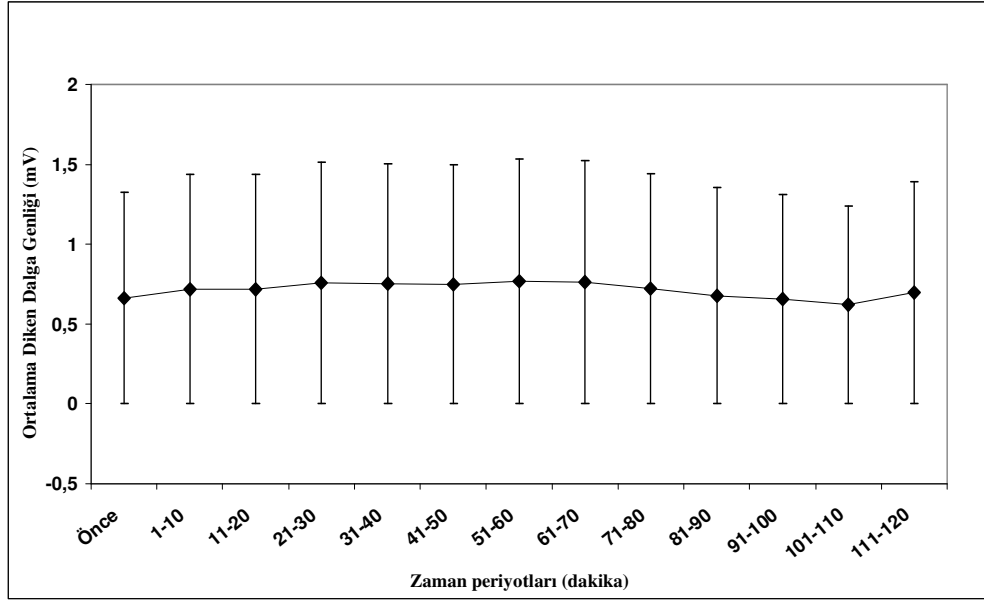
Kontrol grubundan alınan kayıtların her 10 dakikadaki diken dalga sayılarının ortalamaları grup içinde değerlendirildiğinde, zamanla azalma eğilimi gösterdi ve 81. dakikadan itibaren bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 9).



Şekil 9. Kontrol grubundan alınan ECoG kayıtlarının dakikadaki diken dalga sayılarının her 10 dakikalık periyotlardaki ortalama $\pm$ SD değerlerinin zamansal değişimini göstermektedir [(*) istatistiksel olarak anlamlı zaman periyotlarını temsil etmektedir ($p < 0,05$)].

4.1.2. Diken dalga genliğine etkisi

Kontrol grubundan ($n=10$) alınan kayıtların her 10 dakikadaki diken dalga genliklerinin ortalamaları grup içinde değerlendirildiğinde zamanla azalma eğilimi göstermekteydi. Ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 10).



Şekil 10. Kontrol grubundan alınan ECoG kayıtlarının diken dalga genliklerinin her 10 dakikalık periyotlardaki ortalama $\pm$ SD değerlerinin zamansal değişimini göstermektedir.

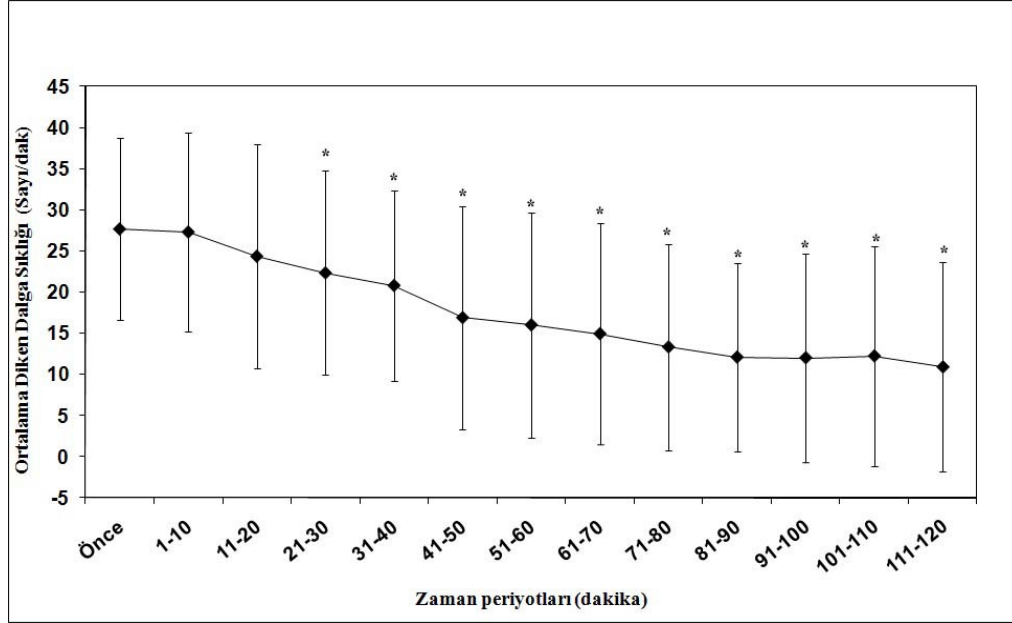
4.2. İntraperitoneal Uygulanan 2000 I.U./kg Epo'nun Penisilinin Oluşturduğu Epileptiform Aktiviteye Etkisi

4.2.1. Diken dalga sayısına etkisi

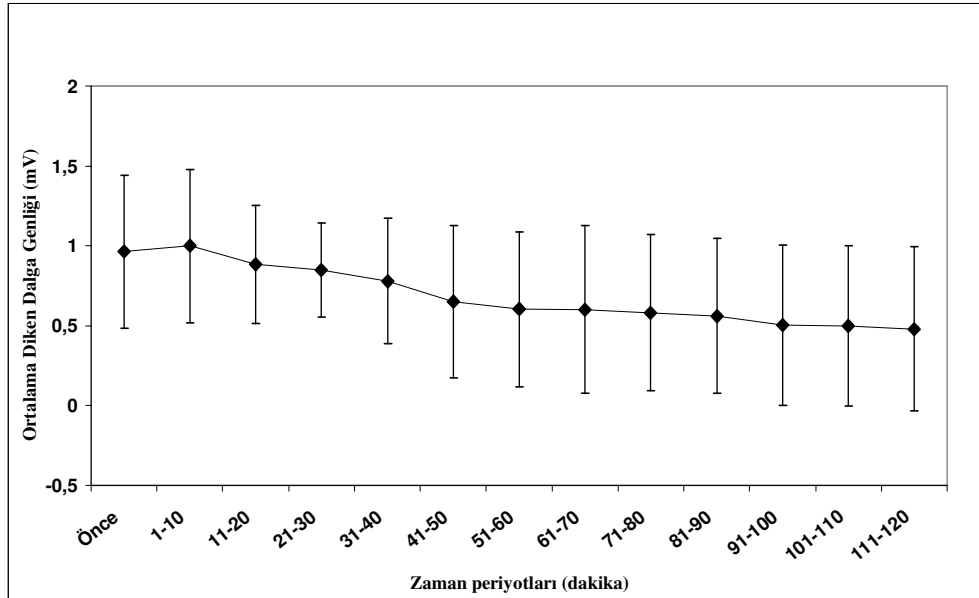
Epo 2000 I.U./kg (n=10) grubundan alınan kayıtların her 10 dakikalık periyotlardaki diken dalga sayılarının ortalamaları grup içinde değerlendirildiğinde zamanla bir azalma eğilimi göstermekteydi. Bu azalış belirtilen dozda Epo enjeksiyonunun ardından 21-120. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı ($p < 0,05$), (Şekil 11).

4.2.2. Diken dalga genliğine etkisi

Epo 2000 I.U./kg (n=10) grubundan alınan kayıtların her 10 dakikalık periyotlardaki diken dalga genliklerinin ortalamaları grup içinde değerlendirildiğinde zamanla bir azalma eğilimi göstermekteydi. Ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$), (Şekil 12).



Şekil 11. İntraperitoneal uygulanan 2000 I.U./kg Epo'nun dakikadaki diken dalga sıklığına etkisi. 2000 I.U./kg Epo grubundan alınan ECoG kayıtlarının dakikadaki diken dalga sayılarının her 10 dakikalık periyotlardaki ortalama $\pm$ SD değerlerinin zamansal değişimini göstermektedir [(*) istatistiksel olarak anlamlı zaman periyotlarını temsil etmektedir ($p < 0,05$)].

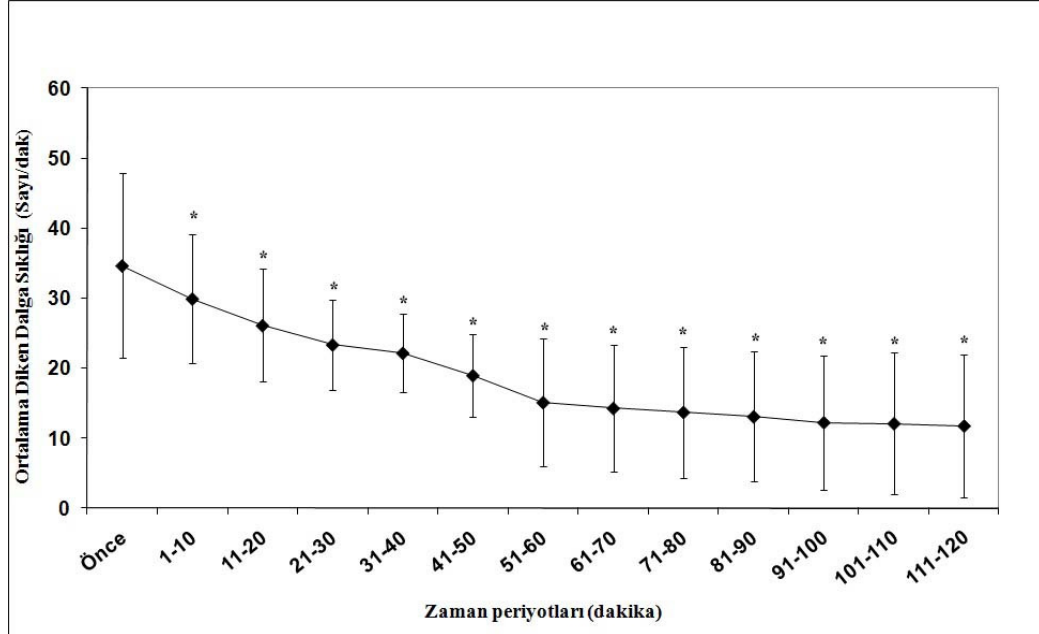


Şekil 12. İntraperitoneal uygulanan 2000 I.U./kg Epo'nun dakikadaki ortalama diken dalga genliğine etkisi. 2000 I.U./kg Epo grubundan alınan ECoG kayıtlarının diken dalga genliklerinin her 10 dakikalık periyotlardaki ortalama $\pm$ SD değerlerinin zamansal değişimini göstermektedir.

4.3. İntraperitoneal Uygulanan 4000 I.U./kg Epo'nun Penisilinin Oluşturduğu Epileptiform Aktiviteye Etkisi

4.3.1. Diken dalga sayısına etkisi

Epo 4000 I.U./kg (n=9) grubundan alınan kayıtların her 10 dakikalık periyotlardaki diken dalga sayılarının ortalamaları grup içinde değerlendirildiğinde, belirtilen dozda Epo enjeksiyonunun ardından 1-120. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p < 0,05$), (Şekil 13).

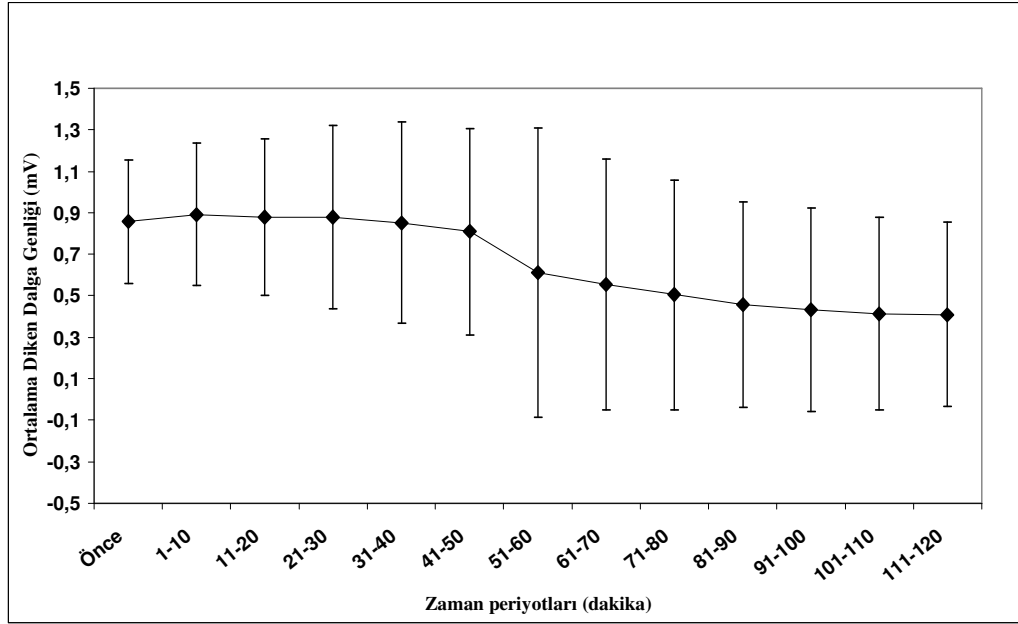


Şekil 13. İntraperitoneal uygulanan 4000 I.U./kg Epo'nun dakikadaki diken dalga sıklığına etkisi. 4000 I.U./kg Epo grubundan alınan ECoG kayıtlarının dakikadaki diken dalga sayılarını her 10 dakikalık periyotlardaki ortalama $\pm$ SD değerlerinin zamansal değişimini göstermektedir [(*) istatistiksel olarak anlamlı zaman periyotlarını temsil etmektedir ($p < 0,05$)].

4.3.2. Diken dalga genliğine etkisi

Epo 4000 I.U./kg (n=9) grubundan alınan kayıtların her 10 dakikalık periyotlardaki diken dalga genliklerinin ortalamaları grup içinde değerlendirildiğinde

zamanla bir azalma eğilimi göstermekteydi. Ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$), (Şekil 14).

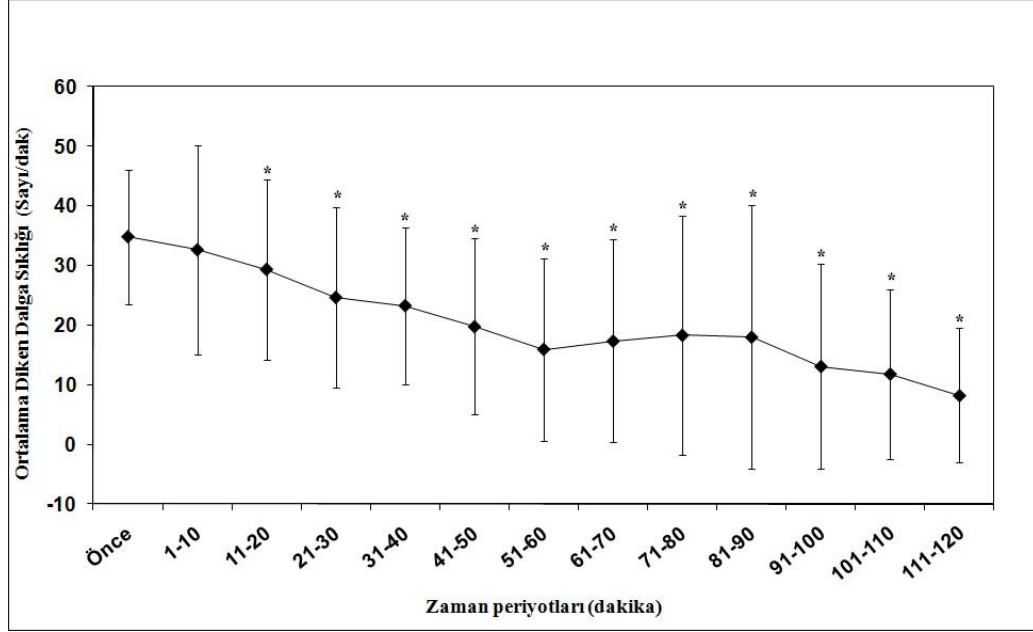


Şekil 14. İntraperitoneal uygulanan 4000 I.U./kg Epo'nun dakikadaki ortalama diken dalga genliğine etkisi. Eritropoetin 4000 I.U./kg grubundan alınan ECoG kayıtlarının diken dalga genliklerinin her 10 dakikalık periyotlardaki ortalama $\pm$ SD değerlerinin zamansal değişimini göstermektedir.

4.4. İntraperitoneal Uygulanan 6000 I.U./kg Epo'nun Penisilinin Oluşturduğu Epileptiform Aktiviteye Etkisi

4.4.1. Diken dalga sayısına etkisi

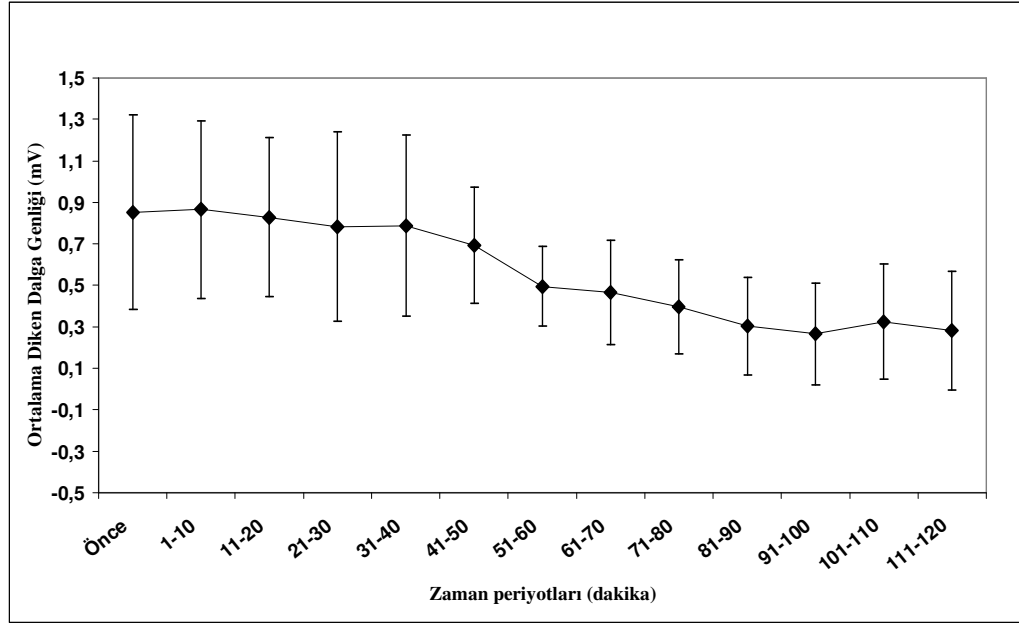
Epo 6000 I.U./kg ($n=10$) grubundan alınan kayıtların her 10 dakikalık periyotlardaki diken dalga sayılarının ortalamaları grup içinde değerlendirildiğinde, belirtilen dozda Epo enjeksiyonunun ardından 11-120. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0,05$), (Şekil 15).



Şekil 15. İntraperitoneal uygulanan 6000 I.U./kg Epo'nun dakikadaki ortalama diken dalga sıklığına etkisi. 6000 I.U./kg Epo grubundan alınan ECoG kayıtlarının dakikadaki diken dalga sayılarının her 10 dakikalık periyotlardaki ortalama $\pm$ SD değerlerinin zamansal değişimini göstermektedir [(*) istatistiksel olarak anlamlı zaman periyotlarını temsil etmektedir ($p < 0,05$)].

4.4.2. Diken dalga genliğine etkisi

On hayvandan oluşan 6000 I.U./kg Epo grubundan alınan kayıtların her 10 dakikalık periyotlardaki diken dalga genliklerinin ortalamaları grup içinde değerlendirildiğinde zamanla bir azalma eğilimi göstermekteydi. Ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$), (Şekil 16).



Şekil 16. İntraperitoneal uygulanan 6000 I.U./kg Epo'nun dakikadaki ortalama diken dalga genliğine etkisi. 6000 I.U./kg Epo grubundan alınan ECoG kayıtlarının diken dalga genliklerinin her 10 dakikalık periyotlardaki ortalama $\pm$ SD değerlerinin zamansal değişimini göstermektedir.

4.5. Uygulanan Tüm Dozlardaki Epo'nun Penisilinin Oluşturduğu Epileptiform Aktiviteye Etkilerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları

4.5.1. Diken dalga sayısına etkisi

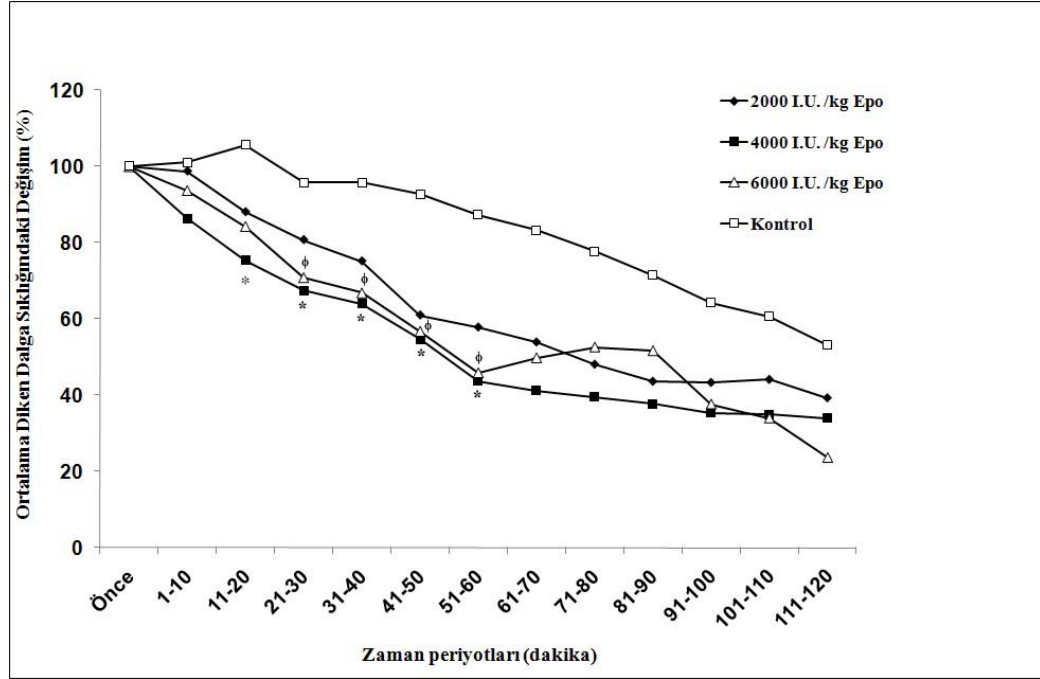
Epo dozlarının enjeksiyonundan sonra alınan 120 dakikalık kayıtlar değerlendirildiğinde 2000 I.U./kg dozda Epo'nun dakikadaki ortalama diken dalga sayısında yaptığı azalmanın, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0,05$). Epo'nun 4000 I.U./kg dozunun dakikadaki ortalama diken dalga sayısı üzerine azaltıcı etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 11-60. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edildi ($p < 0,05$). Epo'nun 6000 I.U./kg dozunun dakikadaki ortalama diken dalga sayısında yaptığı azaltıcı etki, kontrol grubuna göre 21-60. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Zaman periyotlarında ölçülen dakikadaki ortalama diken dalga sayılarına

ait tanımlayıcı istatistikler ve Epo grupları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait sonuçlar Tablo 10’da verilerek Şekil 17’de gösterildi.

Tablo 10. Zaman periyotlarındaki dakikadaki diken dalga sayılarının gruplara göre ortalama ve standart sapma değerleri. (P değeri: Başlangıç ölçümlerine göre farklılıkların değerlendirilmesi)

Zaman Periyotları (dk)	Kontrol grubu (n=10)	2000 IU/kg (n=10)	4000 IU/kg (n=9)	6000 IU/kg (n=10)	P değeri
	Ort ± SD	Ort ± SD	Ort ± SD	Ort ± SD	
Önce	31,78 ± 10,3	27,70 ± 11,0	34,64 ± 13,2	34,80 ± 11,2	
1 – 10	32,09 ± 13,2	27,34 ± 12,0	29,92 ± 9,2	32,61 ± 17,5	0,229
11 – 20	33,58 ± 12,9	24,38 ± 13,5	<u>26,11 ± 8,0</u>	29,33 ± 15,1	0,018
21 – 30	30,44 ± 11,1	22,35 ± 12,3	<u>23,35 ± 6,4</u>	24,64 ± 15,1	0,034
31 – 40	30,44 ± 12,0	20,81 ± 11,5	<u>22,16 ± 5,5</u>	<u>23,25 ± 13,2</u>	0,027
41 – 50	29,45 ± 12,6	16,88 ± 13,5	<u>18,95 ± 5,9</u>	<u>19,73 ± 14,7</u>	0,034
51 – 60	27,72 ± 13,0	16,01 ± 13,6	<u>15,11 ± 9,0</u>	<u>15,94 ± 15,3</u>	0,037
61 – 70	26,47 ± 13,5	14,93 ± 13,4	14,27 ± 9,1	17,31 ± 16,9	0,099
71 – 80	24,71 ± 13,2	13,31 ± 12,5	13,70 ± 9,3	18,29 ± 20,0	0,224
81 – 90	22,71 ± 11,4	12,07 ± 11,4	13,07 ± 9,3	17,97 ± 22,0	0,310
91 – 100	20,42 ± 8,8	11,99 ± 12,6	12,23 ± 9,6	13,08 ± 17,1	0,196
101-110	19,25 ± 7,4	12,21 ± 13,3	12,09 ± 10,0	11,80 ± 14,2	0,191
111-120	16,87 ± 5,2	10,86 ± 12,7	11,76 ± 10,1	8,18 ± 11,2	0,133

Tablodaki koyu renkli, altı çizili alanlar, etki açısından gruplar arasındaki istatistik olarak anlamlı farkın bulunduğu değerleri göstermektedir ($p < 0,05$). Onbirinci dakikadan itibaren 60. dakikaya kadar 4000 I.U./kg Epo dozunun azaltıcı etkisi (başlangıca göre değişim) kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Yirmibirinci dakikadan 60. dakikaya kadar ise 6000 I.U./kg Epo dozu kontrol grubundan anlamlı derecede farklı azaltıcı etki göstermiştir.



Şekil 17. Epo dozlarının dakikadaki diken dalga sıklığına etkileri. 2000-4000-6000 I.U./kg Epo ve kontrol gruplarından alınan kayıtların dakikadaki diken dalga sıklıklarının her 10 dakikadaki değerlerinin ortalamalarının % değişimi görülmektedir [(*) 4000 I.U./kg Epo grubu için, (φ) 6000 I.U./kg Epo grubu için istatistiksel olarak anlamlı zaman periyotlarını temsil etmektedir ($p < 0,05$)].

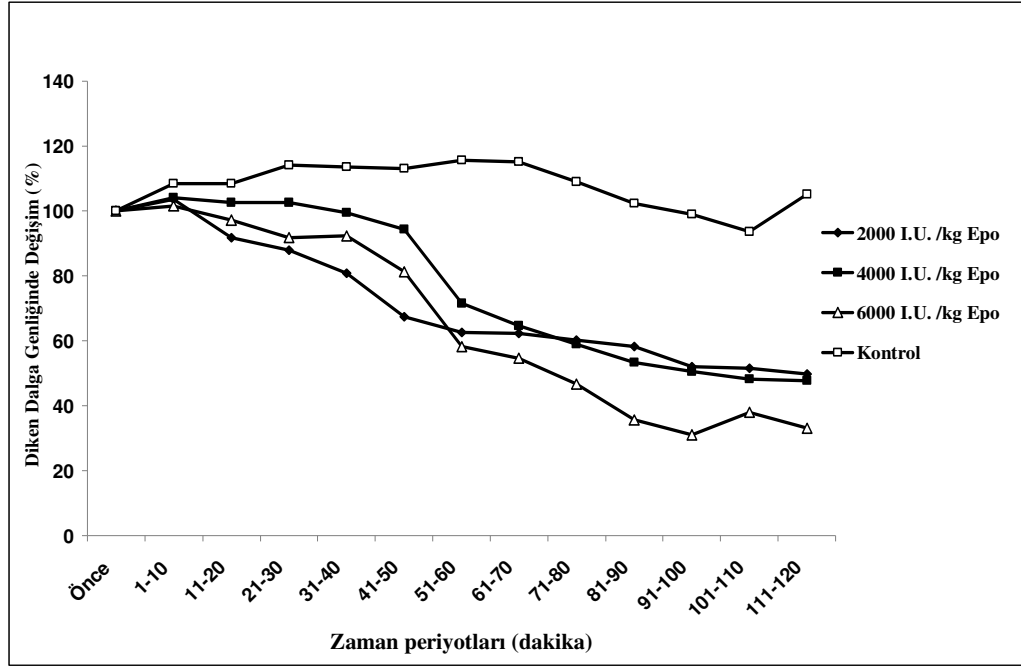
4.5.2. Diken dalga genliğine etkisi

Epo dozlarının uygulanmasından sonra alınan 120 dk'lık kayıtlar boyunca tüm gruplarda genlik değerlerinde olan azalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). Farklı zamanlarda ölçülen genlik değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler ve 2000 I.U./kg, 4000 I.U./kg ve 6000 I.U./kg Epo grupları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait sonuçlar Tablo 11'da verilerek Şekil 18'de gösterildi.

Tablo 11. Zaman periyotlarındaki dakikadaki diken dalga genliklerinin gruplara göre ortalama ve standart sapma değerleri. (P değeri: Başlangıç ölçümlerine göre farklılıkların değerlendirilmesi)

Zaman (Dk)	Kontrol grubu (n=10)	2000 IU/kg (n=10)	4000 IU/kg (n=9)	6000 IU/kg (n=10)	P değeri
	Ort $\pm$ SD	Ort $\pm$ SD	Ort $\pm$ SD	Ort $\pm$ SD	
Önce	0,66 $\pm$ 0,2	0,96 $\pm$ 0,4	0,85 $\pm$ 0,2	0,85 $\pm$ 0,4	
1 – 10	0,71 $\pm$ 0,3	0,99 $\pm$ 0,4	0,89 $\pm$ 0,3	0,86 $\pm$ 0,4	0,979
11 – 20	0,71 $\pm$ 0,3	0,88 $\pm$ 0,3	0,87 $\pm$ 0,3	0,82 $\pm$ 0,3	0,713
21 – 30	0,75 $\pm$ 0,3	0,84 $\pm$ 0,2	0,88 $\pm$ 0,4	0,78 $\pm$ 0,4	0,598
31 – 40	0,75 $\pm$ 0,3	0,77 $\pm$ 0,3	0,85 $\pm$ 0,4	0,78 $\pm$ 0,4	0,533
41 – 50	0,74 $\pm$ 0,3	0,65 $\pm$ 0,4	0,80 $\pm$ 0,4	0,69 $\pm$ 0,2	0,319
51 – 60	0,76 $\pm$ 0,3	0,60 $\pm$ 0,4	0,61 $\pm$ 0,6	0,49 $\pm$ 0,1	0,266
61 – 70	0,76 $\pm$ 0,2	0,60 $\pm$ 0,5	0,55 $\pm$ 0,6	0,46 $\pm$ 0,2	0,226
71 – 80	0,72 $\pm$ 0,2	0,58 $\pm$ 0,4	0,50 $\pm$ 0,5	0,39 $\pm$ 0,2	0,190
81 – 90	0,67 $\pm$ 0,2	0,56 $\pm$ 0,4	0,45 $\pm$ 0,4	0,30 $\pm$ 0,2	0,182
91 – 100	0,65 $\pm$ 0,2	0,50 $\pm$ 0,5	0,43 $\pm$ 0,4	0,26 $\pm$ 0,2	0,168
101 –110	0,62 $\pm$ 0,2	0,49 $\pm$ 0,5	0,41 $\pm$ 0,4	0,32 $\pm$ 0,2	0,231
111 –120	0,69 $\pm$ 0,2	0,48 $\pm$ 0,5	0,41 $\pm$ 0,4	0,28 $\pm$ 0,2	0,110

Epo uygulandıktan sonra 10'ar dakikalık ortalama genlik değerlerinin her bir gruptaki başlangıca göre meydana gelen değişimleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 18. Epo dozlarının dakikadaki diken dalga genliklerine etkisi. 2000-4000-6000 I.U./kg Epo ve kontrol gruplarından alınan kayıtların diken dalga genliklerinin her 10 dakikadaki değerlerinin ortalamalarının % değişimi görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda 2000 IU/kg, 4000 IU/kg ve 6000 IU/kg Epo dozlarının penisilin kaynaklı epileptiform aktivite üzerine etkileri araştırılmış ve Epo'nun muhtemel bir antiepileptik ajan olarak kabul edilebilirliği sorgulanmıştır.

Epilepsi, beynin uyarıcı ve baskılayıcı dengelerinin bozulmasıyla meydana gelen nöronal deşarjlarla karakterize bir nörolojik hastalık grubunun genel adıdır (79). Epileptiform aktivitenin temelinde GABA reseptörleri üzerinden etki gösteren duraklatıcı aktivitenin ortadan kalkması veya zayıflamasının olduğu düşünülmektedir. Beyindeki uyarıcı nörotransmitterlerden glutamatın salınımındaki artış sonucunda NMDA reseptörlerinde aşırı bir aktivasyon ve buna bağlı olarak hücre içine kalsiyum girişiyle beraber aşırı kalsiyum birikimi meydana gelmekte ve epileptiform aktivite ortaya çıkmaktadır (80, 81).

Penisilin modeli epilepside kortekse doğrudan uygulanan penisilin, bir GABA reseptör antagonisti olan bikukulin ile yapısal benzerliğine bağlı olarak korteksteki GABA inhibisyonunu doza bağlı olarak zayıflatmakta ve böylece uyarıcı sistemler lehine bozulan denge, epileptik aktiviteye yol açmaktadır. Bu aktivite, membranda gözlenen depolarizasyon kaymaları ile başlamakta, daha sonra aşırı miktarda aksiyon potansiyelinin oluşması ile sürmektedir (82, 83, 84) ve ECoG kaydında penisilin uygulamasını takip eden birkaç dakikalık sessizlik döneminin ardından, gittikçe genliği yükselen diken ve diken dalgalar şeklinde kendini göstermektedir (6). Bizim çalışmamızda da, penisilinin, kortikal GABA sisteminin etkisini baskılayarak, inhibisyon dengesini bozmak yoluyla, artmış uyarıcı aktiviteye bağlı epileptiform aktiviteye neden olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızdaki ECoG kayıtlarında gözlenen penisiline bağlı epileptiform aktivite kayıtları, yukarıdaki bilgilerle benzerdi. Anestezi altındaki sıçanların beyin korteksi içine 2,5 µl penisilin uygulanması sonrasında $9,64 \pm 2,9$ dakika içinde korteks yüzeyinden diken ve diken-dalga bileşenleri şeklinde bir epileptiform aktivite kaydedildi. Bu aktivitenin yaklaşık yarım saat içinde maksimum genliğine ve sıklığına ulaştığı ve toplam kayıt süremiz olan 3 saat boyunca devam ettiği gözlemlendi.

Epo'nun epilepsiyle ilişkisi farklı deneysel modeller kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır ancak, literatürde penisilin modeli deneysel epilepsiye Epo'nun etkilerini gösteren elektrofizyolojik bir çalışma bulunmamaktadır.

Elde edilen bulgulara göre araştırmacıların bir kısmı Epo'nun prokonvulsan bir madde olduğunu ileri sürerken, önemli bir kesimde antikonvulsan etkilere sahip olduğunu ifade etmektedirler. Literatürde nöronlarda reseptörleri olduğu ve nöron koruyucu etkisi bilinen EPO'nun çok az bir kısmının (%1) kan beyin bariyerini geçebilmesi sebebiyle nöroprotektif etkisinin gözlenebilmesi için yüksek dozda kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır. Deneysel çalışmalarda 500-5000 I.U./kg arası Epo dozları tercih edilmiştir (85-90). Biz de doz seçimi yaparken bu literatür bilgisini esas alarak denenmemiş dozlarda Epo'nun etkisini araştırdık. Çalışmamızda korteks içine penisilin uygulamasıyla epileptiform aktive sağlandıktan 30 dakika sonra i.p. 2000 I.U./kg, 4000 I.U./kg ve 6000 I.U./kg dozlarında Epo'nun etkilerini inceledik.

Chu ve ark.'nın (91) sıçanlarda Li-pilokarpin ile oluşturulmuş SE'nin hemen sonrasında 5000 I.U./kg i.p. Epo'nun spontan tekrarlayan nöbet riskini azalttığını, hipokompüste EpoR'yi arttırdığını, dentat girus, CA1-CA3'te nöronal ölümü ve mikroglyal aktivasyonu azalttığını, hilusta ektopik granül hücre jenerasyonunu inhibe ettiğini ve CA1'de yeni glial hücrelerin oluşumunu engellediğini, kan beyin bariyeri kaçağını sınırladığını tespit etmişlerdir. Wen ve ark. (92) yaptıkları bir çalışmada sıçanlardan alınan video görüntülerinin analiziyle Li-pilokarpin modeli SE'de 1000 I.U./kg i.p. Epo uygulamasının nöbet şiddetini azalttığını bildirmişlerdir. Nöbet şiddetini gösteren diğer bir parametre diken dalga sayısındaki azalmadır. Bizim çalışmamızda 2000 IU./kg i.p. Epo dakikadaki diken dalga sayısında anlamlı bir azalma oluşturmadı ancak, 4000 I.U./kg ve 6000 I.U./kg dozlarında i.p. Epo dakikadaki diken dalga sayısında anlamlı bir azalmaya neden oldu. Bu bulgumuz Chu ve Wen'in bulgularını desteklemektedir (91, 92).

Çalışmamızdan farklı olarak yapılan deneysel modellerde, özellikle de in vitro çalışmalarda eksitotoksisite hasarı (93) iskemi (94, 95) NO veya NMDA maruziyetine karşı (94, 96) Epo'nun koruyucu etkisi için hasar öncesinde verilmesi tercih edilmiştir. Epo'nun nöroprotektif etki gösterebilmesi için uzun bir latens dönemi gerektiği bildirilmiştir. Benzer olarak epilepside de genel prensip Epo'nun

nöbet öncesinde verilmesiyle koruyucu etki gösterdiğine yöneliktir (77). Nadam ve ark. (97) Li-pilokarpin ile oluşturulmuş SE'den 24 saat öncesinde 5000 I.U./kg i.p. Epo uygulamasının SE gelişmesini (latensi) geciktirdiğini, nöbet şiddetini azalttığını bulmuşlardır. Üzümlü ve ark. (98) PTZ ile oluşturulmuş bir nöbet modelinden 24 saat öncesinde 3000 IU/kg i.p. Epo uygulamasının total nöbet süresini kısalttığını, tonik-klonik nöbet şiddetini azalttığını, serebellum ve kortikal alanlarda kan beyin bariyeri geçirgenliğini sınırladığını bulmuşlardır.

Biz ise çalışmamızda penisilin ile oluşturulan epilepsi modelinde Epo dozlarını, epileptiform aktivitenin başlangıcından yaklaşık 30 dk. sonra uyguladık. Epo enjeksiyonunun ardından 4000 IU/kg Epo dozunda 11. dakikadan itibaren 6000 IU/kg Epo dozunda ise 21. dakikadan itibaren diken dalga sayısında anlamlı bir azaltıcı etki saptandı, Epo'nun etkisinin ortaya çıkması için uzun bir latent süre gerekmedi ve bu etki 60. dakikaya kadar devam etti.

Epo'nun epileptik aktiviteyi baskılayıcı mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Epo'nun antiepileptik etkilerini, anormal nörojeniz üzerinde nöroprotektif ve baskılayıcı etkilerinin sinerjik sonuçları ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Epo'nun nörotrofik özelliklere sahip olduğu ve doğrudan hasarlı bölgelere nöronal kök hücre mobilizasyonu sağladığı bilinmektedir (78). Epilepsi sürecinde EpoR artışı ve anti-apoptotik hücre ölümünün azalması Epo'nun epilepsideki nöroprotektif etkilerinin altında yatan iki mekanizma olarak düşünülmektedir. Yang ve ark. (99) Li-pilokarpin uygulaması ile oluşturdukları SE'den 4 saat öncesinde 10 IU/g i.p. Epo uygulamasının SE'nin akut fazında hipokampus CA1-CA3 alanlarındaki hücre ölümünü sınırladığını, antiapoptotik moleküller olan Bcl-2, Bcl-w'de artma, apoptotik moleküller olan Bim ve Bid'de azalma, apoptotik süreçte rol oynayan kaspaz 3 aktivasyonunda inhibisyona neden olarak hipokampus hücrelerini SE sonrası apoptozdan koruduğunu göstermişlerdir. Sargın ve ark. (100) yaptıkları bir çalışmada kortikal lezyon sonrası i.p. tek doz 5000 I.U./kg Epo'nun mikrogial hücre sayısını azalttığını ve erken Epo uygulaması ile kalıcı mikrogliozisin engellendiğini tespit etmişlerdir.

Bazı çalışmalarda Epo'nun doğrudan nörotransmitterlerin salınımını düzenlediği gösterilmiştir (65). Won ve ark. (101) sıçan spinal kord hücre kültür çalışmasında kainik asit ile oluşturulan toksisite hasarından 48 saat sonra Epo

uygulamasının spinal GABA’erjik nöronlar üzerine koruma sağladığı bir GABA-üretici enzim olan glutamat dekarboksilaz (GAD67) seviyelerini ve GABA’erjik nöron yüzeylerindeki EpoR’leri arttırdığını bulmuşlardır. Hasar sonrası Epo ile tedavinin GABA’erjik nöronlar üzerine olan etkisinin EpoR bağımlı JAK2 sinyal iletim yolu ile olduğunu ileri sürmüşlerdir. Epo penisilin modeli epilepside de baskılanmış GABA inhibisyonunu antagonize ederek antikonvulsan etki gösteriyor olabilir.

Morishita ve ark. (102) yaptıkları bir hücre kültürü çalışmasında Epo’nun hipokampal ve kortikal nöronları NMDA reseptör aracılı glutamat toksisitesinden koruduğunu göstermişlerdir. Gunnarson ve ark. (103) bir hücre kültürü çalışmasında 24 saat öncesinde Epo verilmesinin grup 1 metabotrofik glutamatın etkilerini antagonize ettiğini ve nörolojik semptomları azalttığını bulmuşlardır. Masuda ve ark.’nın (102) yaptıkları bir hücre kültürü çalışmasında ise glutamat maruziyetinden 24 saat öncesinde Epo verilmesinin glutamata bağlı nöronal hücre ölümünü düşük dozlarda azalttığı ancak yüksek dozlarda etkili olmadığını bulmuşlar ve Epo’nun etkilerinin doz ve zaman bağımlı olduğunu söylemişlerdir. Kawakami ve ark.(104) serebellar granül hücreleri ve hipokampal nöronlardan yaptıkları hücre kültürü çalışmasında Epo’nun Ca^{++} bağımlı glutamat salınımını azalttığını tespit etmişlerdir. Epilepsinin oluş mekanizmasında önemli bir rolü olan glutamatın inhibe edilmesi antiepileptik etki açısından önemli bir bilgidir. Biz de Epo’nun yaptığımız deneysel çalışmada böyle bir etki gösterdiği düşüncesindeyiz.

Sanaka ve ark. (105) yaptıkları bir hücre kültürü çalışmasında Epo’nun NO’ya bağlı hücre ölümünü azalttığını göstermişlerdir. Epo’nun muhtemel etkisi için NO aracılı serbest O_2 radikallerinin oluşumunu azalttığı veya toksik etkisini antoganize ettiğini söylemişlerdir. Ayrıca Epo’nun NO üretimini stimüle ederek kısmi olarak nörotransmitter salınımına neden olduğu düşünülmektedir (64).

Yapılan bazı çalışmalarda da Epo’nun nöbetlerin başlangıcı ile birlikte verilmesi halinde etkili olmadığı görülmüş, Epo’nun doğrudan antikonvulzan özelliğinin olmadığı, muhtemel antiepileptik etkilerinin daha yavaş uyum süreçleri gerektiren gen değişiklikleri ve/veya sinaptik ağda olan değişiklikler ile meydana geldiği düşünülmüştür. Ancak bizim çalışmamızda nöbet sonrası 4000 ve 6000 I.U./kg dozunda Epo uygulamasının diken dalga sayısında anlamlı bir azalmaya

neden olduğu tespit edilmiştir. Bu bize Epo'nun epilepside akut etkisinin de olabileceği ve nöbet esnasında uygulanan Epo nun nöbet şiddetini azaltabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda 4000 I.U./kg ve 6000 I.U./kg Epo dozlarının epilepsi şiddetini azalttığı saptanmıştır. Bu bulgu ile literatürdeki sonuçlar benzerlik göstermektedir. Kullanılan epilepsi modellerinin farklılığı, farklı beyin bölgelerinin çalışılması, maddelerin veriliş yollarının farklı olması, doz farklılıkları değişik sonuçlar ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir.

Bu bulgular çerçevesinde Epo'nun epileptiform aktivitede nasıl bir rol oynadığının kesin olarak bilinebilmesi için daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmalardan elde edilen veriler Epo'nun nöroprotektif antiepileptik bir ajan olarak araştırılabileceği yönündedir. İnsanlarda SSS'de EPO'nun patofizyolojik olaylardaki rolünün açıklığa kavuşturulması, nöron koruyucu etki mekanizmalarının aydınlatılması ve etki nedenlerinin ortaya konmasıyla klinikte kullanıma girmesi hızlanacaktır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

1. Kontrol grubundan alınan kayıtların 10'ar dakikalık periyotlardaki diken dalga sayılarının ortalamaları ve genlikleri grup içinde değerlendirildiğinde, zamanla başlangıca göre bir azalma eğilimi göstermekteydi. Bu durum zamana bağlı olarak penisilinin etkisinin azalmasıyla ortaya çıkan beklenen bir sonuçtu.
2. Epo'nun uygulanan tüm dozlarında, grup içinde değerlendirildiğinde ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dakikadaki diken dalga genliği üzerine bir etkisinin olmadığı tespit edildi.
3. Epo 2000 I.U./kg dozunun uygulandığı grup kendi içinde değerlendirildiğinde ortalama diken dalga sayısında Epo enjeksiyonu sonrasında 21-120. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Ancak Epo 2000 I.U./kg grubunun azaltıcı etkileri diğer gruplardan anlamlı derecede farklı değildi.
4. Epo 4000 I.U./kg dozunun uygulandığı grup kendi içinde değerlendirildiğinde Epo enjeksiyonu sonrası 1-120. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı. Ek olarak Epo 4000 I.U./kg grubunun azaltıcı etkisi kontrol grubuna göre 11-60. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlıydı.
5. Epo 6000 IU/kg dozunun uygulandığı grup kendi içinde değerlendirildiğinde 11-120. dakikalar arasında görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı iken, kontrol grubuna göre Epo enjeksiyonu sonrasında 21-120. dakikalar arasındaki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı.
6. Çalışmamızda daha önce çalışılmamış bir epilepsi modeli üzerinde, farklı dozlarda Epo'nun akut dönemde antiepileptik etkisini araştırdık ve Epo'nun epilepsinin şiddetini azalttığını tespit ettik.

7. KAYNAKLAR

1. Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2007 Jul; 7(4):348-54.
2. Shneker BF. Epilepsy. *Fountain NB Dis Mon.* 2003 Jul; 49(7): 426-78.
3. Öztekin N. Epilepsi Fizyopatolojisi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi.* 2004; 2(2).
4. Dichter MA. The epilepsies and convulsive disorders, in: Isselbacher KJ, ed, *Harrison's Principle of Internal Medicine.* 13th ed. New York: McGraw-Hill; 1994. s. 2223-33.
5. Yavuz EN, Baykan B. Epilepsi, Moleküler Mekanizmalar Ve İlgili Nöromediatörler. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Özel Dergisi.* 2010; 3(1).
6. Marangoz C. Deneysel epilepsi modelleri. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* 1997; 14(3): 147-186.
7. Dannhardt G, Kiefer W. New antiepileptics in development. *Pharm Unserer Zeit.* 2007; 36(4):306-310.
8. Shin C, McNamara JO. Mechanisms of epilepsy. *Annual Rev. Of. Med.* 1994; 45:379-379.
9. Ayyıldız M, Yıldırım M, Agar E, Baltacı AK. The effect of leptin on penicilin induced epileptiform activity in the rats. *Brain Research Bulletin.* 2006; 68 (5):374-8.
10. Fisher JW. Pharmacologic modulation of erythropoietin production. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1988; 28:101-22.
11. Liu XB, Wang JA, Yu SP, Keogh CL, Wei L. Therapeutic strategy of erythropoietin in neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008 Jun; 7(3):227-34.
12. Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda).* 2008 Oct; 23:263-74.
13. Brodie MJ, Schacter SC, Kwan P. *Epilepsy.* 3rd ed. London: Health Press; 2008.
14. Bora İ, Yeni S, Gürses C, ed, *Epilepsi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri; 2008. s. 3-13/68-71/89-102.

15. Baykan B, Gürses C, Gökyiğit A. Nöroloji. 2. Basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. s. 279-308.
16. Martin JH. The collective electrical behavior of cortical neurons: the electroencephalogram and the mechanisms of epilepsy. *Principles of Neural Science*. 1991; 3:777–791.
17. Annegers J.F. Epidemiology and genetics of epilepsy. *Neurologic Clinics*. 1994; 12:15-29.
18. El S. Classifications and epidemiologic considerations of epileptic seizures and epilepsy. *Neuroimaging Clin N Am*. 1995; 5:513–26.
19. Karis JP. Epilepsy. Expert Panel on Neurologic Imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008 Jun; 29(6):1222-4.
20. Bell GS, Sander JW. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure* 2001; 16:165–170.
21. Theodore HW, Porter RJ. Epilepsi. Ekmekçi H, Çalıyurt O, ed, 3.Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001.
22. Annegers JF, Rocca WA, Hauser WA. Causes of epilepsy: contributions of the Rochester epidemiology project. *Mayo Clin Proc*. 1996 Jun; 71(6):570-5.
23. Hauser WA, Annegers JF. Risk factors for epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*. 1991; 4:45-52.
24. Pitkänen A, Kharatishvili I, Karhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, Nairismägi J, Gröhn O, Nissinen J. Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia*. 2007; 48 Suppl 2:13-20.
25. Jiang M, Lee CL, Smith KL, Swann JW. Spine Loss and Other Persistent Alterations of Hippocampal Pyramidal Cell Dendrites in a Model of Early-Onset Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*. 1998; 18(20):8356-8368.
26. Heinemann U, Konnerth A, Pumain R, Wadman WJ. Extracellular calcium and potassium concentration changes in chronic epileptic brain tissue. *Adv Neurol*. 1986; 44:641-61.
27. Louis ED, Williamson PD, Darcey MT. Experimental Models Of Chronic Focal Epilepsy: A Critical Review Of Four Models. *The Yale Journal Of Biology And Medicine*. 1987 May-Jun; 60(3):255-272.

28. Loscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res.* 1988 May-Jun; 2(3):145-81.
29. Giuliano G, Avanzini DM, Engel J. Animal Models of Acquired Epilepsies and Status Epilepticus. In: Engel J, Pedley TA. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. s. 415-440.
30. Onat F, Aker RG. Epilepside Deneyisel Modeller. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Özel Dergisi*. 2008;1(2).
31. Ettinger AB, Kanner AM. *Psychiatric Issues in Epilepsy: A Practical Guide to Diagnosis and Treatment*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. s. 17-38.
32. Walker MC, White HS, Sander JW. Disease modification in partial epilepsy. *Brain*. 2002 Sep; 125(Pt 9):1937-50.
33. Jefferys JG. Models and mechanisms of experimental epilepsies. *Epilepsia*. 2003; 44 Suppl 12:44-50.
34. Bender RA, Baram TZ. Epileptogenesis in the developing brain: what can we learn from animal models? *Epilepsia*. 2007; 48(suppl 5):2-6.
35. Grondahl TO, Langmoen IA. Epileptogenic effect of antibiotic drugs. *J Neurosurg*. 1993 Jun; 78(6):938-43.
36. Lehmenkuhler A, Kersting U, Nicholson C. Diffusion of penicillin in agar and cerebral cortex of the rat. *Brain Res*. 1988 Mar 15; 444(1):181-3.
37. Taylor CD, Gloor P. Behavioral alterations associated with generalized spike and wave discharges in the EEG of the cat. *Exp Neurol*. 1984 Jan; 83(1): 167-86.
38. Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL. *Models of seizures and epilepsy*. London: Elsevier; 2006.
39. Ishibashi H, Simos PG, Wheless JW, Baumgartner JE, Kim HL, Castillo EM, Davis RN, Papanicolaou AC. Localization of ictal and interictal bursting epileptogenic activity in focal cortical dysplasia: agreement of magnetoencephalography and electrocorticography. *Neurol Res*. 2002 Sep; 24(6):525-30.

40. Palmini A. The concept of the epileptogenic zone: a modern look at Penfield and Jasper's views on the role of interictal spikes. *Epileptic Disord.* 2006 Aug;8 Suppl 2:S10-5. Erratum in: *Epileptic Disord.* 2008 Jun; 10(2):191.
41. Meng L, Frei MG, Osorio I, Strang G, Nguyen TQ. Gaussian mixture models of ECoG signal features for improved detection of epileptic seizures. *Med Eng Phys.* 2004 Jun; 26(5):379-93.
42. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 2004 Aug; 43(8):649-59.
43. Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist.* 2004; 9 Suppl 5:18-30.
44. Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist.* 2003; 8 Suppl 1:15-8.
45. Iain C, Eckardt M, Eckardt KU. Hematological Disorders. Davison AM, ed, Oxford Textbook of Clinical Nephrology, volume 1, 3rd ed, New York:Oxford University Press; 2005. s. 1807-26.
46. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol.* 2008 Apr; 141(1):14-31.
47. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system.. *Brain Res.* 2004 Mar 12; 1000(1-2):19-31.
48. Cariou A, André S, Claessens YE. Extra-hematopoietic effects of erythropoietin. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2008 Sep; 8(3):173-8.
49. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 May; 22(5):503-14.
50. Adamson JW, Logo DL, Çev. Kılınç Y. Anemiler ve Polistemiler In; Brunswold E, Favci AS, Kasper DL, Hauser SL, Long DL, Jamason JL, ed, Çev. Sağ Y. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. Cilt-1. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004 s. 660-66.
51. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun; 6(6):484-94.
52. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia and

- oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Apr; 60(4):386-92.
53. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003 Jan; 228(1):1-1.
 54. Donald W. Seldin, Gerhard H. Giebisch. Hematopoiesis and The Kidney: Physiology and Patophysiology, 2nd ed, New York: Raven Press; 1992. s. 1553-93.
 55. Yoshimura A, Misawa H. Curr. Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Opin Hematol.* 1998 May; 5(3):171-6.
 56. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14 Suppl 2:22-8.
 57. Molineux G, Foote MA, Elliott SG. Erythropoietins and Erythropoiesis Molecular, Celular, Preclinical and Clinical Biology. 2003. s. 21
 58. Ohashi H, Maruyama K, Liu YC, Yoshimura A. Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:158–162.
 59. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell.* 1993; 74:227–236.
 60. Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell.* 1995; 80:726–738.
 61. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007 Nov; 64(2):159-71. Epub2007 May 4.
 62. Guyton A, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H, Çağlayan B, Ed, 11. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007. s. 422-423.
 63. Genc S, Köroğlu TF, Genc K. Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor Neurol Neurosci.* 2004; 22(2):105-19.
 64. Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem.* 1999 Jun; 72(6):2565-72.
 65. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers

- neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19; 276(42):39469-75. Epub 2001 Aug 14.
66. Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*. 2005; 87(1):15-8. Epub 2004 Aug 27.
 67. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ*. 2004 Jul; 11 Suppl 1:S37-44.
 68. Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest*. 2003 Oct; 33(10):891-6.
 69. Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM, Wu H. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*. 2004 Dec 1; 276(1):101-10.
 70. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 2004 Jul; 35(7):1732-7. Epub 2004 Jun 3.
 71. Campana WM, Myers RR. Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci*. 2003 Sep; 18(6):1497-506.
 72. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Béhé M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Brück W, Rütter E, Cerami A, Becker W, Sirén AL. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2004 Jan; 9(1):42-54.
 73. Lu GW, Yu S, Li RH, Cui XY, Gao CY. Hypoxic preconditioning: a novel intrinsic cytoprotective strategy. *Mol Neurobiol*. 2005; 31(1-3):255-71.
 74. Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res*. 2002 Dec; 44(4):391-403.
 75. Cerami A, Brines ML, Ghezzi P, Cerami CJ. Effects of epoetin alfa on the central nervous system. *Semin Oncol*. 2001 Apr; 28(2 Suppl 8):66-70.
 76. Fisher JW. Erythropoietin. In: Massry SG, Glasscock RJ. *Textbook of nephrology*. 3rd ed. Maryland USA: Williams and Wilkins; 1995. s. 191-197.

77. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Proc Natl Acad Sci USA. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. 2000 Sep 12; 97(19):10526-31.
78. Eid T, Brines M. Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence?. Clin Breast Cancer. 2002 Dec; 3 Suppl 3:S109-15.
79. Dichter MA. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development. Epilepsia. 1994; 35 Suppl 4:S51-7.
80. Straub H, Köhling R, Speckmann EJ. Picrotoxin-induced epileptic activity in hippocampal and neocortical slices (guinea pig): suppression by organic calcium channel blockers. Brain Res. 1994 Sep 26; 658(1-2):119-26.
81. Walden J, Grunze H, Mayer A, Düsing R, Schirrmacher K, Liu Z, Bingmann D. Calcium-antagonistic effects of carbamazepine in epilepsies and affective psychoses. Neuropsychobiology. 1993; 27(3):171-5.
82. Wong RK, Prince DA. Science. Dendritic mechanisms underlying penicillin-induced epileptiform activity. 1979 Jun 15; 204(4398):1228-31.
83. Avoli M, Brancati A, Pacitti C, Barra PF. Neuronal responses to putative neurotransmitters during penicillin epileptogenesis. Neuroscience. 1982; 7(8):1955-61.
84. Bernasconi R, Lauber J, Marescaux C, Vergnes M, Martin P, Rubio V, Leonhardt T, Reymann N, Bittiger H. Experimental absence seizures: potential role of gamma-hydroxybutyric acid and GABAB receptors. J Neural Transm Suppl. 1992; 35:155-77.
85. K Maiese, F Li and Z Z Chong. Erythropoietin in the brain: can the promise to-protect be fulfilled? Trends Pharmacol Sci 2004; 25:577-83.
86. Jelkman W. Erythropoietin: Structure, control of production, and function. Physiol Rev 1992; 72:449-89.
87. Kumral A, Baskin H, Gokmen N, Yilmaz O, Genc K, Genc S, Tatli M.M, Ozer E, Ozkan H. Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: Is it an explanation for the protective role of erythropoietin?, Biol. Neonate. 2004; 85(1):51-54.

88. Kumral A, Baskin H, Duman N, Yılmaz O, Tatlı M, Ozer E, Gokmen N, Genc S, Ozkan H. Erythropoietin protects against necrotizing enterocolitis of newborn rats by the inhibiting nitric oxide formation. *Biol. Neonate.* 2003; 84(4):325-329.
89. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta E.G, Talan M.I. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100(20):11612-11617.
90. Nemoto T, Yokota N, Keane W.F, Rabb H. Recombinant erythropoietin rapidly treats anemia in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2001; 59(1):246-251.
91. Chu K, Jung KH, Lee ST, Kim JH, Kang KM, Kim HK, Lim JS, Park HK, Kim M, Lee SK, Roh JK. Erythropoietin reduces epileptogenic processes following status epilepticus. *Epilepsia.* 2008 Oct; 49(10):1723-32. Epub 2008 May 8.
92. Wen X, Huang Y, Wang. Erythropoietin preconditioning on hippocampus neuronal apoptosis following status epilepticus induced by Li-pilocarpine in rats through anti-caspase-3 expression. *J. Neurol India.* 2006 Mar; 54(1):58-63; discussion 63.
93. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience.* 1997 Jan; 76(1):105-16.
94. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Dec 9; 253(1):26-32.
95. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Jun; 19(6):643-51.
96. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C. Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. *News Physiol Sci.* 2000 Oct; 15:225-229.
97. Nadam J, Navarro F, Sanchez P, Moulin C, Georges B, Laglaine A, Pequignot JM, Morales A, Ryvlin P, Bezin L. Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat

- hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis.* 2007 Feb; 25(2):412-26. Epub 2006 Dec 12.
98. Uzüm G, Sarper Diler A, Bahçekapili N, Ziya Ziylan Y. Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures. *Life Sci.* 2006 Apr 25; 78(22):2571-6. Epub 2005 Dec 15.
 99. Yang J, Huang Y, Yu X, Sun H, Li Y, Deng Y. Erythropoietin preconditioning suppresses neuronal death following status epilepticus in rats. *Neurobiol Exp (Wars).* 2007;67(2):141-8.
 100. Sargin D, Hassouna I, Sperling S, Sirén AL, Ehrenreich H Uncoupling of neurodegeneration and gliosis in a murine model of juvenile cortical lesion. *Glia.* 2009 May; 57(7):693-702.
 101. Won YJ, Yoo JY, Lee JH, Hwang SJ, Kim D, Hong HN. Erythropoietin is neuroprotective on GABAergic neurons against kainic acid-excitotoxicity in the rat spinal cell cultures. *Brain Res.* 2007 Jun 18; 1154:31-9. Epub 2007 Apr 10.
 102. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience.* 1997 Jan; 76(1):105-16.
 103. Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, Brismar H, Brines M, Cerami A, Andersson U, Zelenina M, Aperia A. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Feb 3; 106(5):1602-7. Epub 2009 Jan 21.
 104. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19; 276(42):39469-75. Epub 2001 Aug 14.
 105. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Apr 14; 95(8):4635-40.

8. EKLER

Ek 1. Etik kurul belgesi.



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL
DENEY HAYVANLARI ALT KURULU

Tarih: 14.10.2009
No:100/24

Sayın Dr. Şerif DEMİR

Aşağıda belirtilen araştırmanız Etik Kurulumuz tarafından ilgili yönetmelik ve yönergeler uyarınca evrensel etik kurallar çerçevesinde değerlendirilmiş ve oybirliği ile “uygun” bulunarak Etik Komite onayı verilmiştir.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Başkan

Doç. Dr. M. Tevfik YAVUZ

Protokol No: 2009-24

Araştırmanın Adı: “Sıçanlarda Eritropoietinin Penisilinin Oluşturduğu Epilepsiye Etkisi”

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi
Konuralp 81620 DÜZCE
☎:380 542 11 28 Faks:380 542 11 29