

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE
HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK DÖNEMİNDE LİTYUM-
PİLOKARPİNLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
STATUS EPİLEPTİKUS MODELİNDE
REKOMBİNANT İNSAN ERİTROPOİETİNİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR . ŞULE ÇAĞLAYAN SÖZMEN**

**TEZ DANIŞMANI
PROF . DR . A . SEMRA HIZ**

İZMİR-2010

İÇİNDEKİLER:

| | |
|--|-----------|
| TABLolar DİZİNİ..... | IV |
| RESİMLER DİZİNİ..... | IV |
| KISALTMALAR..... | V |
| ÖZET | 1 |
| SUMMARY..... | 3 |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ..... | 5 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 6 |
| 2.1. Nöbet Tanımı | 6 |
| 2.2. Epilepsi Tanımı..... | 6 |
| 2.3. Çocukluk Çağı Epilepsisinde Epidemiyoloji..... | 6 |
| 2.4. Çocukluk Çağı Epilepsilerinde Prognoz | 7 |
| 2.5. Çocukluk Çağı Epilepsilerinde Patofizyoloji | 7 |
| 2.5.1. Genetik Nedenler | 7 |
| 2.5.2. Kortikal Gelişmedeki Anormallikler ve Nörokutan Bozukluklar | 8 |
| 2.5.3. Serebral Palsi | 9 |
| 2.5.4. Hipokampal Skleroz..... | 9 |
| 2.5.5. Postinfektif Epilepsi..... | 9 |
| 2.5.6. Akut Beyin Hasarı Sonrası Nöbetler ve Epilepsi | 9 |
| 2.6. Çocukluk Çağı Epilepsilerinde Sınıflandırma | 9 |
| 2.7. Epilepside Tanı | 14 |
| 2.8. Epilepside Tedavi..... | 14 |
| 2.9. Status Epileptikus..... | 15 |
| 2.9.1 Status Epileptikus Tanımı | 15 |
| 2.9.2 Status Epileptikus Sıklığı | 15 |
| 2.9.3 Status Epileptikusta Etiyoloji | 16 |
| 2.9.4 Status Epileptikus Sınıflaması..... | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 2.9.5 Status Epileptikus Patogenezi..... | 18 |
| 2.9.6 Status Epileptikusta Hayvan Modelleri..... | 19 |
| 2.9.7 Status Epileptikusta Serebral Hasarlanma Mekanizmaları | 20 |
| 2.9.8 Status Epileptikusta Klinik Bulgular | 21 |
| 2.9.9 Status Epileptikusta Tedavi | 22 |
| 2.9.10 Status Epileptikusta Nöronkoruyucu Ajanlar ve Umut Verici Tedaviler..... | |
| 2.9.11 Eritropoietin ve Nöron Koruyucu Etkinliği..... | 26 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM | 28 |
| 3.1. Hayvan Modeli ve İlaç Uygulaması | 28 |
| 3.1.1 Çalışma Grupları..... | 28 |
| 3.1.2 Lityum-Pilokarpin ile SE Oluşturulması..... | 28 |
| 3.1.3 r-Hu-Epo'nun Uygulanması | 29 |
| 3.2. Histolojik değerlendirme..... | 29 |
| 3.2.1 Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü | 29 |
| 3.2.2 Krezil Viole Boyama Yöntemi | 30 |
| 3.2.3 Hipokampal Nöron Yoğunluğunun Değerlendirilmesi..... | 30 |
| 3.2.4 TUNEL Tekniği İle Boyama Metodu | 30 |
| 3.2.5 Kaspaz-3 İmmun İşaretleme Yöntemi | 31 |
| 3.3 Araştırmada Kullanılan İstatiksel Yöntemler..... | 31 |
| 4.SONUÇLAR..... | 32 |
| 4.1 Nöbet Skorlaması..... | 32 |
| 4.2 Nöron Sayımı..... | 32 |
| 4.3 TUNEL Boyaması..... | 33 |
| 4.4 Kaspaz-3 İmmun İşaretleme Yöntemi..... | 35 |
| 5.TARTIŞMA | 36 |
| 6.SONUÇLAR..... | 42 |

7.KAYNAKLAR.....43

TABLULAR DİZİNİ

| No | Başlık | Sayfa No |
|----|--|----------|
| 1 | Epileptik nöbetlerin klinik ve EEG sınıflaması..... | 10 |
| 2 | Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflandırması | 12 |
| 3 | Epilepsi tipine göre ilaç seçimi | 15 |
| 4 | Status epileptikusun etiyolojik sınıflandırması | 17 |
| 5 | Status epileptikus sınıflaması..... | 17 |
| 6 | Status epileptikus tedavisinde kullanılan ilaçlar | 23 |
| 7 | Status epileptikusta tedavi basamakları | 24 |
| 8 | Deneysel nöbet modellerinde antiepileptik ilaçların antiepileptojenik Etkileri | 25 |
| 9 | Gruplara göre nöron sayım ortalamalarının karşılaştırılması..... | 32 |
| 10 | TUNEL pozitif hücrelerin oranları..... | 34 |
| 11 | Hipokampusun GD bölgesinde kaspaz pozitif hücrelerin oranları | 35 |

RESİMLER DİZİNİ

| No | Başlık | Sayfa No |
|----|---|----------|
| 1 | İntraperitoneal enjeksiyon..... | 28 |
| 2 | Lityum-pilokarpin uygulaması sonrasında ön ekstremitte klonusu..... | 29 |
| 3 | Hipokampusun histolojik görünümü | 30 |
| 4 | Hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde krezil viole boyamasıyla nöron sayımları..... | 33 |
| 5 | Hipokampusun GD bölgesinde TUNEL pozitif hücreler | 34 |
| 6 | Hipokampusun GD bölgesinde kaspaz pozitif hücreler | 35 |

KISALTMALAR

SE: status epileptikus

SSS: santral sinir sistemi

Epo: eritropoietin

Rekombinant insan eritropoietin : r-Hu-Epo

EEG: elektroensefalografi

MRG: manyetik rezonans görüntüleme

TLE: temporal lob epilepsisi

ILAE : Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği

GABA: gama aminobütirik asit

DPH: fenitoin

CLZ: klonazepam

CBZ: karbamazepin

ETS: etosüksimid

VPA: valproik asid

TPM: topiramat

LTG: lamotrijin

OCBZ: okskarbazepin

LEV: levetirasetam

AMPA: alfa-amino-3-hidroksil-5-metil-isoksazol-propionat

GD: girus dentatus

TUNEL: terminaldeoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick end-labeling

BDNF: beyin kökenli nörotrofik faktör

NT: nörotrofin

VEGF: vasküler endotelyal büyüme faktörü

PBS: fosfat tampon solüsyonu

DAB: diaminobenzidin

TEŐEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında geçirdiğim uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım başta Anabilim Dalı Başkanım Sayın Prof.Dr.Hale Ören olmak üzere tüm değerli hocalarıma, tezin planlanması ve hazırlanmasında her aşamada desteğini aldığım çok sevdiğim tez hocam Prof.Dr.A.Semra Hız'a, tezle ilgili özverili çalışmalarından dolayı Doç.Dr.Kazım Tuęyan ve Uzm.Dr.Bařak Baykara'ya, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarıma, her koşulda beni destekleyen kardeşime, yetişmemde büyük emeği olan, sevgisini ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen canım annem ve babama, eğitimim boyunca moral kaynağım olan eşime teőekkür ederim.

Dr.şule Çağlayan Sözmen

2010

ÇOCUKLUK DÖNEMİNDE LİTYUM-PİLOKARPİNLE OLUŞTURULAN DENEYSEL STATUS EPİLEPTİKUS MODELİNDE REKOMBİNANT İNSAN ERİTROPOİETİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Status epileptikus nörolojik bir acildir. Status epileptikus hipokampusda nekrotik ve apoptotik hücre ölümüne neden olur. Bu nöron kaybı epilepsi gelişimine ve bilişsel bozukluklara neden olabilir. Eritropoietinin santral sinir sistemindeki nöron koruyucu etkileri gösterilmiştir. Çocukluk dönemindeki sıçanlarda oluşturulan status epileptikus modelinde nöron koruyucu ajanlar üzerine yapılan çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, rekombinant insan eritropoietinin lityum-pilokarpinle oluşturulan status epileptikus modelinde hipokampus üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya annelerinin yanında tutulan postnatal 21. gündeki Wistar cinsi 21 erkek sıçan dahil edildi. Üç grup oluşturuldu: 1-Kontrol grubu 2-Lityum-pilokarpinle oluşturulan status epileptikus 3-Lityum-pilokarpinle oluşturulan status epileptikus ve eritropoietin ile tedavi edilen grup. Eritropoietinle tedavi edilen gruba pilokarpin enjeksiyonundan 40 dakika sonra 10 U/g intraperitoneal rekombinant insan eritropoietini uygulandı. Enjeksiyonlara 5 gün devam edildi. Sıçanlar 5. günde feda edildi ve beyin dokuları alındı. Sıçanların hipokampusundaki morfolojik değişiklikler nöron sayımıyla ve apoptoz açısından TUNEL ve kaspazla değerlendirildi. Ortalama nöron sayımları ve immunohistokimyasal skorların karşılaştırılmasında one-way ANOVA testi kullanıldı

Bulgular: Histopatolojik değerlendirmede hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve girus dentatus bölgelerinde nöron sayımlarının status epileptikus grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu görüldü (tüm karşılaştırmalar için $p=0.001$). Eritropoietinle tedavi edilen grupta, status epileptikusla karşılaştırıldığında hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve girus dentatus bölgelerinde nöron sayıları anlamlı olarak artmıştı (tüm karşılaştırmalar için $p=0.001$). Hipokampusun CA1 ve girus dentatus bölgelerinde status epileptikus grubunda kontrol grubuna göre TUNEL pozitif hücreler artmıştı (tüm karşılaştırmalar için $p=0.001$). Eritropoietinle tedavi edilen grupta status epileptikus grubuyla karşılaştırıldığında hipokampusun CA1 ve girus dentatus bölgelerinde TUNEL pozitif hücrelerin sayısı anlamlı olarak azalmış bulundu (tüm karşılaştırmalar için $p=0.001$). Kaspaz-3 immun boyama metodu

için gruplardan rastgele birer örnek seçildi. Kaspaz-3 pozitif hücre oranları kontrol grubunda CA1 bölgesinde % 0.5, girus dentatus bölgesinde %0.75, status epileptikus grubunda CA1 bölgesinde 2.25, girus dentatus bölgesinde %2.5 ve eritropoietinle tedavi edilen grupta CA1 bölgesinde 1.25, girus dentatus bölgesinde %1.75'di. Eritropoietinle tedavi edilen grupta status epileptikus grubuna göre kaspaz pozitif hücrelerin oranı artmasına rağmen istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

Sonuç: Eritropoietinin lityum pilokarpinle sıçanlarda oluşturulan status epileptikus modelinde hipokampuste nöron sayılarını anlamlı derecede koruduğu ve apoptozu azalttığı saptandı. Bu deneysel çalışma eritropoietinin status epileptikusta nöron koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Status epileptikus, sıçan, eritropoietin, nöron koruma

ASSESSMENT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN EFFICIENCY ON EXPERIMENTAL CHILDHOOD STATUS EPILEPTICUS INDUCED BY LITHIUM-PILOCARPIN

SUMMARY

Purpose: Status epilepticus is a neurological emergency. Status epilepticus triggers a mixture of apoptotic and necrotic cell death within the hippocampus. This neuronal loss may induce the development of epilepsy and result in cognitive impairments. Erythropoietin mediates a number of biological actions within the central nervous system and has been shown to be neuroprotective. There is a few studies on neuroprotective agents in status epilepticus rat models in childhood. In the present study, we were investigated the effects of recombinant human erythropoietin on hippocampus of rat after lithium-piocarpin induced status epilepticus.

Materials and methods: Dam reared totally 21 Wistar male rats in postnatally 21. day were included in the study. Animals were classified into three groups: 1-Control group, 2-Lithium-pilocarpin induced status epilepticus, 3- Lithium-pilocarpin induced status epilepticus and erythropoietin treated group. Erythropoietin treated group received recombinant human erythropoietin 10U/g intraperitoneally 40 minutes after pilocarpine injection. Injections had continued for 5 days. Rats were sacrificed and brain tissues were collected at 5th day. Morphological changes in the hippocampi of rats were examined with respect to neuronal loss and neuronal apoptosis via TUNEL and caspase 3. One way ANOVA test was used for comparison of mean neuron numbers and immunohistochemical scores.

Results: Histopathological examination showed that, the number of neurons of CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus regions in hippocampus were less in the status epilepticus group in comparison with the control group ($p=0.001$ for all comparisons). When compared with the status epilepticus group, the number of neurons of CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus regions of hippocampus in the erythropoietin treated group statistically significantly increased ($p=0.001$ for all comparisons). The number of TUNEL positive cells in the CA1 and dentate gyrus regions of hippocampus of status epilepticus group were increased when compared with the control group ($p=0.001$ for all comparisons). We found that in the erythropoietin treated

group the number of TUNEL positive cells in CA1 and dentate gyrus regions of hippocampus was significantly decreased when compared with status epilepticus group ($p=0.001$ for all comparisons). One sample was randomly chosen for each of the group for caspase-3 immune staining method. The ratios of caspase 3 in control group were 0.5% for CA1 and 0.75% for dentate gyrus, in status epilepticus group were 2.25% for CA1 and 2.% for dentate gyrus, in erythropoietin treated group 1.25% for CA1 and 1.75% for dentate gyrus. Although the number of caspase positive neurons of CA1 and dentate gyrus were less in the erythropoietin treated group when compared with the status epilepticus, it was not statistically evaluated.

Conclusion: Erythropoietin significantly preserved the number of neurons and decreased apoptosis in the model of status epilepticus induced by lithium-pilocarpin. This experimental study indicates that erythropoietin administration can be neuroprotective in status epilepticus.

Key words: Status epilepticus, rat, erythropoietin, neuroprotection

1.GİRİŞ VE AMAC

Epilepsi beyindeki anormal epileptik aktiviteden kaynaklanan tekrarlayıcı nöbetlerle karakterize bir hastalıktır. Tüm çocukların yüzde biri 14 yaşına kadar en az bir afebril nöbet geçirirken, 11 yaşında %0.1-%0.8'inde epilepsi gelişmektedir (1,2). Status epileptikus (SE), bir nöbetin aynı tip nöbeti gösteren hastaların çoğunda durmaması veya santral sinir sistemi (SSS) fonksiyonlarının interiktal dönemde düzelmediği, tekrarlayan nöbetlerle karakterli bir durumdur (3). SE çocuklarda daha sık görülmekte olup olguların %50'sinden fazlası iki yaşın altındadır (4). Retrospektif çalışmalar erişkin dönemdeki dirençli epilepsi olgularının %80'nin çocukluk çağında, SE veya uzamış febril konvülziyon epizodları geçirdiğini göstermektedir (5). SE'un hayvan modellerinde nöbet oluşumu haricinde birçok davranışsal ve bilişsel işlev bozukluğuna da yol açtığı gösterilmiştir (6-8). Bu nedenle SE sırasında veya sonrasında uygulanabilen nöron koruyucu tedaviler gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Eritropoietin (Epo) böbrekler tarafından sentezlenen, eritroid öncüllerini apoptoza karşı koruyarak kırmızı kan hücrelerini arttıran bir hormondur. Epo ve reseptörü insan ve kemirgen beyinde, kültürdeki nöron hücrelerinde, astrositlerde, oligodendrositlerde, mikroglia ve endotel hücrelerinde sentezlenir. Epo'nun reseptör aracılıklı mekanizma ile kan beyin bariyerini geçtiğinin gösterilmesi SSS'deki potansiyel etkilerine dikkat çekmiştir. Epo'nun SSS ve periferik sinir sisteminde nöron koruyucu rolü olduğu düşünülmektedir (9). Epo'nun sinir sistemindeki bu rolü hematopoietik dokudaki öncül hücreler üzerine olan etkilerine benzemektedir ve çok yönlüdür. Hipoksi ve nörolojik hasar Epo ve Epo reseptörlerinin santral sinir sistemindeki üretimini artırır (10-11). İnme hastalarına akut dönemde rekombinant insan eritropoietin (r-Hu-Epo) uygulanmasının beyin dokusunu iskemiden koruduğu kanıtlanmıştır (12). Ayrıca r-Hu-Epo'nun periferik olarak uygulandığında da kan beyin bariyerini geçtiği bilinmektedir (13).

Epo'nun nöron koruyucu rolü konusunda birçok hipotez ortaya konmuştur. Epo nörotrofik, antiinflamatuvar, antiapoptotik etkinlik gösterir (14). Yang ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmalarda SE öncesi Epo uygulanmasının Morris su tankı testinde bilişsel bozuklukları düzelttiği ve hipokampusta apoptozu azalttığı gösterilmiştir (15).

Nöron koruyucu ajanların etkinliklerinin araştırılmasında deneysel epilepsi modelleri sık olarak kullanılmaktadır. Pilokarpin ile uyarılmış nöbet modellerinin nöbet aktivitesi ile ilişkili davranışsal, nörokimyasal özellikleri göstermede ve nöropatolojiyi araştırmada uygun olduğu görülmüştür (16). Deneysel beyin hasarı oluşturulan modellerde, nöbetin hipokampus gibi beynin hassas alanlarında apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Nöbet sonrası oluşan apoptozisin Bcl-2 proteinlerinde azalma ve kaspaz aktivasyonundaki artışa bağlı olduğu bulunmuştur (17).

Çocukluk çağında sık karşılaşılan ve ileride kronik olarak epilepsi gelişimine yol açabilen SE konusunda çocukluk dönemindeki sıçanlarda yapılan çalışma sayısı kısıtlı olmakla birlikte kullanılan nöron koruyucu ajanlar da yine erişkin dönemindeki sıçanlarda denenmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında çocukluk çağında oluşturulan SE modelinde r-Hu-Epo'nun hipokampal hasar üzerine olan etkinliğinin araştırılmasını amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Nöbet Tanımı

Nöbet beyindeki anormal elektriksel aktivite sonucunda belli bir süreliğine oluşan paroksizmal motor, duysal, psişik ve/veya otonom değişikliktir.

2.2 Epilepsi Tanımı

Epilepsi çocukluk çağının en sık görülen ve tekrarlayan nöbetlerle karakterize kronik hastalıklarından biridir. Tanımı 24 saatten daha uzun aralıklarla iki veya daha fazla tetiklenmemiş nöbet varlığıdır (18).

2.3 Çocukluk Çağı Epilepsisinde Epidemiyoloji

Tüm dünyada 15 yaş altı 10.5 milyon çocuğun aktif epilepsisi olduğu tahmin edilmekte olup bu sayı tüm epilepsili hastaların %25'idir. Yapılan çalışmalarda çocukluk çağı epilepsisinin yıllık insidansı gelişmekte olan ülkelerde 100 000'de 61-124 ve gelişmiş ülkelerde 100 000'de 41-50'dir (19).

2.4 Çocukluk Çağı Epilepsilerinde Prognoz

İlk tetiklenmemiş fokal ya da jeneralize tonik klonik nöbet geçiren çocuklarda kümülatif tekrarlama riski ilk 8 yıl için %8 iken, ilk 5 yıldan sonraki risk sadece %3'tür. Çok değişkenli analizlerde tekrarlama riskinin semptomatik nedene, elektroensefelografi (EEG) anormalliğine, nöbetin uykuda olmasına, geçirilmiş febril nöbetlere ve postiktal pareziye bağlı olduğu gösterilmiştir. Tedavi ile tekrarlama oranlarını değiştirmemektedir (20).

Epilepsili çocukların büyük bir çoğunluğu prognoz açısından dört ana grupta incelenir. İlk grup benign epilepsilerdir. Örnek olarak benign rolandik epilepside birkaç yıl içinde iyileşme olur. İkinci grup ilaca duyarlı epilepsilerdir. Örneğin absans epilepsili çocukların çoğunda ilaçla kolayca nöbet kontrolü sağlanır ve birkaç yıl içinde spontan iyileşme olur. Üçüncü grup ilaç bağımlı epilepsilerdir. Örneğin juvenil miyoklonik epilepsi ve semptomatik fokal epilepsilerin çoğunda ilaçla nöbet kontrolü sağlanır fakat spontan iyileşme olmaz. İlaç kesimini relaps takip eder ve tedavi hayat boyudur. Dördüncü grup ilaca dirençli (ya da refrakter) epilepsilerdir ve kötü prognozludurlar. İlaça direnç genellikle ilk olarak verilen uygun tedaviye yanıtızlıkla belirlenir (21).

2.5 Çocukluk Çağı Epilepsilerinde Patofizyoloji

2.5.1 Genetik nedenler

Tek gen mutasyonları epilepsiye neden olabilir ve klinikte farklı fenotiplerle ortaya çıkarlar. Tam tersi olarak benzer fenotipler farklı genotiplerden köken alabilir. Fenotipik çeşitliliğin, fenotipik görünümü belirleyen modifiye edici genlere, polimorfizmlere ve çevresel faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (22).

Kromozomal anormallikler çocuklardaki epilepsinin önemli bir nedenidir. Kesin bir nedeni olmayan idyopatik epilepsilerde kromozomal çalışma yapılması gerekmektedir. Epilepsi bir semptom olabilir veya klinik ve EEG özellikleri belirleyici olabilir. 15q11-q13 delesyonundan kaynaklanan Angelman sendromu miyoklonik ve absans status ile ilişkilidir ve valproat, etosüksimid ve benzodiazepinlerle kombinasyona yanıt verebilir. Kromozom 20'de ring olan hastalarda uzamış tekrarlayan nöbetler nedeniyle tanı alırlar ve ilaç tedavisine dirençlidirler (23,24).

2.5.2 Kortikal Gelişmedeki Anormallikler ve Nörokutan Bozukluklar

İlaça dirençli çocukluk çağı epilepsilerinin %40'na serebral korteks malformasyonları neden olur. Hemimegalensefalide, bir serebral hemisferde kalın korteks ve geniş kıvrımlar vardır. Erken dönemde başlayan sık nöbetler belirgin gelişimsel geriliğe neden olur ve erken dönemde hemisferektomi yapılmalıdır. Fokal kortikal displazide korteksin laminar yapısında anormallikler vardır. Anormal ve balon nöronlar içerir. Beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) fokal kortikal kalınlık ve yüksek sinyal intensitesi olabileceği gibi, normal de olabilir. Fokal kortikal displazi genellikle infantil spazmlara veya fokal epilepsiye neden olur. İlaça dirençli olduğu durumlarda erken cerrahi tedavi önerilir (25). Agiri-pakigiri-band spektrumu kıvrımların olmaması (agiri) veya azalmış kıvrımlar (pakigiri) ve subkortikal band heterotopi ile karakterizedir. DCX gen mutasyonları, LCX gen mutasyonları ve/veya delesyonları vakaların çoğunda vardır. Reelin veya ARX gen mutasyonları nadirdir. Sıklıkla infantil spazmlar olur (26).

Şizensefali morfogenez bozukluğuna bağlı olarak serebral hemisferlerde tek taraflı veya bilateral yarıkların görülmesidir. Nadiren EMX2 gen mutasyonları vardır. Polimikrogiri kortikal katlantılar ve kalınlaşmalardan oluşur. Küçük alanlar görüntüleme gözden kaçabilir. Hastaların %65'inde durdurulamayan nöbetler vardır. Bilateral perisilviyan, pariyetal-okspital veya frontoparietal polimikrogiri ailesel olabilir. Frontoparietal polimikrogiri GPR56 gen mutasyonlarından kaynaklanır (27).

Tuberoskleroz SSS, deri ve böbrekle ilişkili otozomal dominant bir bozukluktur. Kortikal tuberler T2 ağırlıklı beyin MRG'de görülebilir fakat miyelinizasyonu tamamlanmamış infantlarda görülmeyebilir. TSC1 ve TSC2 genleri vakaların çoğunda vardır. Hastaların %60'ında epilepsi olur. İnfantil spazmlar siktir ve vigabatrine yanıt verir. Seçilmiş vakalarda cerrahi ile iyi nöbet kontrolü sağlanır (28).

Sturge-Weber sendromu ailesel olmayan bir fakomatozdur. Leptomeninkslerin venöz anjiomasına deride homolateral nevus flammeus eşlik eder. Hastaların %50'sinde tek taraflı konvülfif status eşlik eder ve bu hastalarda kalıcı hemiplejiye neden olur. Olguların yaklaşık %40'nda cerrahi tedavi gerekir (29).

2.5.3 Serebral Palsi

Serebral palsisi olan çocukların %34-%94'üne epilepsi eşlik eder. Gururaj ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada serebral palsi tanısı olup nöbet geçiren hastaların %33.9'unda SE görülmüştür (30).

2.5.4 Hipokampal Skleroz

Hipokampal skleroz veya mezial temporal skleroz bu yapılarda nöronal kayıp ve gliozisi anlatan terimlerdir. Hipokampusda özellikle CA1 ve CA4'deki nöron kaybına yeni lif oluşumu eşlik eder, bu da lokal epileptogenezi kolaylaştırır. Hipokampal skleroz %80 vakada tek taraflıdır. Yeni başlangıçlı temporal lob epilepsisi (TLE) olan çocukların %21'nin beyin MRG'sinde hipokampal skleroz saptanmıştır ve bunların %57'sinin dirençli nöbetleri vardır. Hipokampal skleroz nedeniyle TLE olan hastaların %78'nde cerrahi sonrası tam iyileşme olur (31).

2.5.5 Postinfektif Epilepsi

Epileptik nöbetler SSS'nin akut enfeksiyonu ya da komplikasyonu olarak ortaya çıkabilir. SSS enfeksiyonu geçiren hastaların yaklaşık %5'inde epilepsi gelişmekle birlikte enfeksiyonların çeşitleri ve sıklığı coğrafik alanlara göre değişir (32).

2.5.6 Akut Beyin Hasarı Sonrası Nöbetler ve Epilepsi

Kafa travması ile başvuran çocukların yaklaşık %3-10'u 24 saat içinde erken post-travmatik nöbet geçirir. Basit kafa travması sonrası nöbet geçirenlerde prognoz çok iyidir ve geç dönemdeki nöbetlerle ilişkili değildir. Fokal nörolojik belirtiler, deprese kafatası fraktürü, beyin ödemi ve akut subdural hematom yüksek riskle ilişkilidir. Beş yaş altı çocuklarda SE riski yüksektir (33).

2.6 Çocukluk Çağı Epilepsilerinde Sınıflandırma

Nöbetler temel olarak jeneralize ya da fokal olmak üzere iki ana grupta incelenir. Jeneralize nöbetler tonik, klonik, tonik-klonik, miyoklonik, atonik ve dalma nöbetleri şeklinde olabilir. Tonik nöbetlerde tonus artışı ya da rijidite mevcuttur. Klonik nöbetler ritmik kas kontraksiyonları, miyoklonik nöbetler ise ani şok benzeri kasılmalarla karakterizedir. Tonik-klonik nöbetlerde ilk olarak tonik ve bunu takip eden klonik faz gözlenir. Atonik nöbetler ise ani tonus kaybı ve buna eşlik eden düşmeler ile kendini gösterir. Fokal başlangıçlı nöbetler

basit ya da kompleks olabilir. Basit fokal nöbetlerde bilinç kaybı olmaz. Fokal nöbetler motor ve duysal, otonomik ya da psişik belirtilerle karakterize olabilir. Bazen nöbetler fokal başlayıp sekonder jeneralizasyon gösterebilir. Nöbetlerin sınıflaması sadece klinik bulgulara dayanılarak değil, iktal ve interiktal EEG bulguları değerlendirildikten sonra yapılabilmektedir. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) sınıflaması Tablo 1’de gösterilmiştir (1,34).

Tablo 1. Epileptik nöbetlerin klinik ve elektroensefalografik sınıflaması (ILAE 1981)

I-Parsiyel (fokal, lokal) nöbetler

A.Basit Parsiyel Nöbetler (bilinç durumu bozulmaksızın)

| | |
|--|--|
| 1-Motor semptomlu a)Fokal motor b)Yayılan fokal motor c)Versif d)Postural e)Fonatuvar (vokalizasyon veya konuşmanın durması) | 2-Somatosensoryel veya özel duysal semptomlu a)Somatosensoryel b)Görsel c)İşitsel d)Kokuyla ilişkili e)Tatla ilişkili f)Vertigo hissi |
| 3-Otonomik semptomlu | 4-Psişik semptomlu a)Disfazik b)Disamnezik (ör: deja-vu) c)Bilişsel belirtiler (hayal durumu, zaman hissinin bozulması) d)Affektif (korku, öfke v.b.) e)İllüzyonlar (ör:makropsi) f) Halüsinasyonlar (ör:müzik parçaları) |

B.Kompleks Parsiyel (bilinç bozukluğu ile giden)

| | |
|--|--|
| 1-Basit parsiyel başlangıcı izleyen bilinç bozukluğu a)Basit parsiyel özelliklerin ardından bilinç bozukluğu b)Otomatizmlerle giden | 2-Bilinç durumunun başlangıçtan itibaren değişmesi a)Sadece bilinç değişikliği ile giden b)Otomatizmlerle giden |
|--|--|

C.Sekonder jeneralize nöbete dönüşen parsiyel nöbet

| |
|---|
| 1-Basit parsiyel nöbetin jeneralize nöbete dönüşmesi 2- Kompleks parsiyel nöbetin jeneralize nöbete dönüşmesi 3-Basit parsiyel nöbetin kompleks parsiyel nöbete dönüşmesi ve ardından jeneralize nöbete dönüşmesi |
|---|

II-Jeneralize nöbetler (konvülzif veya non-konvülzif)

| | |
|--|--|
| A.1-Tipik absans a)Sadece bilinç bozukluğu ile giden b)Hafif klonik componentli c)Atonik componentli d)Tonik componentli e)Otomatizmlı f)Otonomik componentli | 2-Atipik absans a)Tonus değışikliği tipik absansdan daha belirgin olan b)Başlangıç ve/veya sonlanmanın ani olmaması |
| B.Miyoklonik nöbetler (tek veya çok) | C.Klonik nöbetler |
| D.Tonik nöbetler | E.Tonik-klonik nöbetler |
| F.Atonik nöbetler (astatik) | |

III-Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler

ILAE 1989 sınıflamasında ise epileptik sendrom, belli semptom ve bulgular serisinin bir arada olması ile ortaya çıkan epileptik bozukluk şeklinde tanımlanmıştır. Nöbet tipi, etiyoloji, anatomi, tetikleyici faktörler, başlangıç yaşı, epilepsinin ağırlığı ve kronikliği, diurnal ve sirkadian siklus ve prognoz sendrom sınıflamasında kullanılan özelliklerdir. Epileptik nöbetler ve sendromlar arasındaki bu ayrım uzun süredir benimsenmiş ve klinik olarak kullanılabilir bir prensip olduğu kabul edilmiştir. ILAE 1989 sınıflandırması Tablo 2 'de gösterilmiştir (1,35,36).

Tablo 2. Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması (ILAE, 1989)

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

1.1. İdyopatik (yaş bağlı başlangıç)

- Sentrotemporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi
- Oksipital paroksizmlı çocukluk çağı epilepsisi
- Primer okuma epilepsisi

1.2.Semptomatik

- Temporal lob epilepsisi
- Frontal lob epilepsisi
- Parietal lob epilepsisi
- Oksipital lob epilepsisi
- Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsiyalis kontinuası
- Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar

1.3. Kriptojenik

II. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar

2.1. İdyopatik (yaş bağlı başlangıç-yaş sırasına göre sıralanmıştır)

- Selim ailesel yenidoğan konvülziyonları
- Selim yenidoğan konvülziyonları
- Süt çocukluğunun selim miyoklonik epilepsisi
- Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi)
- Juvenil absans epilepsisi
- Juvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petit mal)
- Uyanırken gelen grand mal nöbetli epilepsi
- Diğer jeneralize idyopatik epilepsiler
- Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler

2.2. Kriptojenik veya semptomatik (yaş sırasına göre)

- West sendromu (infantil spazmlar, Blitz-Nick-Salaam Kraempfe)
- Lennox-Gastaut sendromu
- Miyoklonik astatik nöbetli epilepsi
- Miyoklonik absanslı epilepsi

2.3. Semptomatik

2.3.1. Nonspesifik etioloji

- Erken miyoklonik ensefalopati
- (Supression-burst)' lu erken infantil epileptik ensefalopati
- Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler

2.3.2. Spesifik sendromlar

III. Fokal veya jeneralize oldukları belirlenemeyen epilepsiler

3.1. Jeneralize ve fokal konvülziyonlu epilepsiler

- Yenidoğan konvülziyonları
- Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi
- Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgali epilepsi
- Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)
- Diğer belirlenemeyen epilepsiler

3.2. Net jeneralize veya fokal konvülziyon özelliği olmayanlar

IV. Özel sendromlar

4.1. Duruma bağlı nöbetler

- Febril konvülziyonlar
- İzole nöbet veya izole status epileptikus
- Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler

2.7 Epilepside Tanı

Tanıda öykü en önemli yol göstericidir. Öykü aileden ve çocuktan, mümkün olduğu kadar da, nöbeti gören kişiden alınır. Özellikle nöbet sırasında çocuğun hissettikleri nöbet tipinin tanımlanmasında çok önemlidir. Öykü gelişim basamaklarını, ilaç kullanımını, nöbetlerin çocuk ve aile üzerine olan etkilerini içermelidir. Nöbetlerin tanımlanması için ilk baştaki iktal belirtiler, tüm nöbet, postiktal durum, tetikleyen faktörler sorgulanmalıdır. Anne babalardan nöbetleri taklit etmeleri ya da videoya çekmeleri istenmelidir. Klinik incelemede nörolojik, deri ve göz bulgularına dikkat edilmeli, baş çevresi ölçülmelidir. Deride hipo-hiperpigmente lekeler, hemanjiomlar, aşırı kıllı bölgeler, göz bulguları, kulak deformiteleri, organomegali, genital anormallikler, ekstremitelerde anormallikler not edilmelidir. Bilişsel ve sosyal gelişim, kaba ve motor kapasiteleri, refleksler, serebellar bulgular, yürüme ve konuşma anormallikleri incelenmelidir.

EEG paroksizmal anormallikleri gösterebilir. Bununla birlikte, tanı tamamen EEG'ye dayalı değildir. Sağlıklı çocukların %5-8'inde interiktal EEG'de anormallikler gözlenir. Uyku EEG'si rutin EEG pozitifliğini %60'dan %90'a çıkarır. Aralıklı fotik stimülasyon ve hiperventilasyon çocuklarda gereklidir. Video EEG kayıtları, eş zamanlı EEG, elektromiyogram, elektrokardiyogram, respirogram ve elektro-okülogram kompleks klinik belirtileri anlamada çok önemlidir. Klinik öykü inandırıcı ise interiktal EEG'nin normal olması epilepsiyi dışlamaz (1,37).

2.8 Epilepside Tedavi

Epilepsi uzun süreli tedavi gerektiren bir tablodur. İlaç tedavisi epilepsili hastalarda ilk uygulanan tedavi yöntemidir. Antikonvülzif ilaçlara dirençli olgularda ketojenik diyet ve cerrahi tedavi de uygulanmaktadır. İlaç tedavisinde hedef, vücuda zarar vermeden nöbet gelişimini engellemektir.

Antikonvülzan ilaçlar hücresele seviyede 3 farklı mekanizma ile etki gösterirler.

- 1- Voltaj bağımlı iyon kanalları üzerinden (Na, K, Cl, Ca)
- 2- Gama aminobütirik asit (GABA) aracılı inhibitör nörotransmitterleri artırarak
- 3- Eksitatör (özellikle glutamat) uyarıları azaltarak

İlaç seçiminde nöbet türü, hastanın yaşı, başka bir sistemik hastalığının var olup olmadığı, ilacın kullanım şekli, sosyoekonomik koşullar, ilacın yan etkileri göz önüne alınmalıdır. İdeal bir antikonvülzan birçok nöbet türünde etkili olmalı, emilimi ve dağılımı hızlı olmalı, eliminasyon yarılanma zamanı uzun olmalı, etkilerine karşı tolerans gelişmemeli,

diğer antiepileptiklerle ilaç etkileşimine girmemeli, günde 1 ya da 2 dozda kullanılabilirmeli, yan etkisi ve teratojenik etkileri olmamalı, anne sütüne geçmemeli ve fiyatı ucuz olmalıdır.

İlk keşfedilen antiepileptik fenobarbitaldir. Bunu takiben fenitoin (DPH), klonazepam(CLZ), karbamazepin (CBZ), etosüksimid (ETS), valproik asit (VPA) bulunmuştur. Bu ilaçlar uzun yıllardır ilk basamak olarak ve en sık kullanılan antiepileptiklerdir. Son 20 yılda vigabatrin, topiramet (TPM), gabapentin, felbamat, lamotrigin (LTG), okskarbazepin (OCBZ) ve levetirasetam (LEV) gibi yeni antiepileptikler kullanıma girmiştir.

Epilepsi tipine göre ilaç seçimi Tablo 3’de görülmektedir (38,39).

Tablo 3. Epilepsi Tipine Göre İlaç Seçimi

| Nöbet Tipi | Başlangıç Tedavisi | İkinci Seçenek |
|--------------|--------------------|--------------------------|
| Tonik-klonik | VPA | CBZ, OCBZ, LTG, DPH, TPM |
| Miyoklonik | VPA | CLZ, LTG, LEV |
| Absans | VPA, ETS | LTG, TPM, LEV |
| Parsiyel | CBZ, OCBZ | VPA, LTG, TPM |
| Atonik | VPA | LTG, TPM |

2.9 Status Epileptikus

2.9.1 Status Epileptikus Tanımı

SE, SSS’nin temel fonksiyonlarına geri dönmeksizin 30 dakikadan daha uzun süren tekrarlayıcı nöbetlerle tanımlanan bir nörolojik acildir. Bu tanıma nöbetler arasında bilincin tam kazanılmadığı iki veya daha fazla nöbet geçirilmesi de dahil edilebilir (40). SE epizodlarının %70’i ilk nöbet şeklinde olurken epilepsili çocukların %27’sinde tekrarlayan epizodlar görülür (41).

2.9.2 Status Epileptikus Sıklığı

SE insidansı Amerika Birleşik Devletleri’nde 1-19 yaş arası çocuklarda 100 000’de 10-58 arasında değişir (42). Yapılan iki çalışmada bir yaş altı infantlarda daha yüksek bir insidans saptanmıştır (135.2/100 000 ve 156/100 000). SE epilepsili çocuklarda sık görülür ve sıklığı %9.1 ile %27 arasında değişir (43-45).

2.9.3 Status Epileptikusta Etiyoloji

SE genellikle SSS'ni etkileyen olayların neden olduğu akut bir bulgu olarak ya da semptomatik epilepsinin alevlenmesiyle oluşur (46). SE nedeni olan hastalık en önemli prognostik faktördür. Febril status (vakaların %20-30'u) akut SSS enfeksiyonu ve nöbet öyküsü olmaksızın gelişir. Uzak semptomatik SE özellikle kortikal displazi ve epileptik ensefalopatisi olan çocuklarda görülür. İdyopatik SE herhangi bir etken olmadığında ya da idyopatik epilepside görülür (47). Akut semptomatik konvülfif SE, SSS'ni etkileyen akut hastalığın komplikasyonu olarak ortaya çıkar ve 1 yaş altı SE'lu çocukların %75'inde ve 3 yaş altındakilerin %28'inde görülür. Akut semptomatik SE %20'ye ulaşan yüksek mortalite oranlarına neden olur. Gelişmemiş ülkelerde SSS enfeksiyonları SE'un gözden kaçırılan bir nedenidir. Travma, hipoksik iskemik hasar ve metabolik/elektrolit bozuklukları daha nadir nedenlerdir. İlaç bırakma SE'u tetikleyen bir nedendir. Diğer taraftan antiepileptik ilaçlar uygun seçilmezse veya paradoks reaksiyon gelişirse SE'u tetikleyebilir (48). SE'un etiyolojik nedenlere yönelik sınıflandırması Tablo 4'de gösterilmiştir (49,50).

Tablo 4: Status Epileptikusun Etiyolojik Sınıflandırması

| Tip | Tanım | Örnekler |
|---|---|---|
| Akut semptomatik (%26) | Akut hastalık sırasında olan SE(akut SSS etkisi) | Menenjit, ensefalit, elektrolit bozukluğu, sepsis, hipoksi, travma, intoksikasyon |
| Uzak semptomatik (%33) | SSS etkilenmesi öyküsü olan hastada akut provakasyon olmaksızın SE | SSS malformasyonu, daha önce olan travmatik beyin hasarı, kromozomal bozukluk |
| Akut presipitasyonla olan uzak semptomatik (%1) | Kronik ensefalopati ile olan SE(akut provokasyonla birlikte) | SSS malformasyonu veya daha önce olan SSS etkilenmesiyle birlikte enfeksiyon, hipoglisemi, hipokalsemi veya intoksikasyon |
| Progresif ensefalopati (%3) | Altta yatan ilerleyici SSS hasarı ile olan SE | Mitokondriyal hastalıklar, SSS lipid depo hastalıkları, amino-veya organik asidopatiler |
| Febril (%22) | Febril hastalık provakasyonu ile olan SE (menenjit veya ensefalit gibi direkt SSS enfeksiyonları ekarte edildikten sonra) | Üst solunum yolu enfeksiyonları, sinüzit, sepsis |
| Kriptojenik (idyopatik)(%15) | Akut tetikleyici SSS etkilenmesi, sistemik metabolik bozukluk olmaksızın SE | Tanımlanabilen nedeni yoktur |

2.9.4 Status Epileptikus Sınıflaması

Status epileptikus sınıflaması motor bulguların olup olmamasına ve bunların tedavi ve mortalite oranlarına etkilerine göre yapılmıştır. Tablo 5’te SE sınıflaması görülmektedir (39).

Tablo 5.Status Epileptikus Sınıflandırması

| |
|---|
| I.Konvülfif Status Epileptikus 1.1.Jeneralize Tonik Tonik-Klonik Klonik Miyoklonik |
|---|

1.2.Fokal (parsiyel)

Fokal motor
Fokal motor sekonder jeneralizasyon ile
Epilepsia parsialis continua
Diğer

II.Non- Konvülfif Status Epileptikus

2.1Absans

Tipik
Atipik

2.2Fokal status epileptikus

Duysal semptomatoloji ile
Afektif semptomatoloji ile
Kompleks parsiyel status epileptikus
Uyku sırasında devamlı yavaş diken ve dalga

2.9.5 Status Epileptikus Patogenezi

Hangi nöbetlerin SE'a ilerlediğinin mekanizması net değildir. İnsanlarda ve hayvanlarda nöbetler birkaç saniye veya dakika sürerek kendini sınırlar. Bu da nöbet aktivitesini durdurmada güçlü mekanizmalar olduğunu gösterir. SE'daki temel patoloji başlamış olan nöbetin durdurulamamasıdır. İnsan ve hayvan çalışmalarında EEG'nin SE'a nasıl ilerlediği önemli bir gözlemdir. İlk olarak tekrarlayan nöbetler devamlı nöbet aktivitesine döner ve sonuçta aralıklı epileptiform deşarjlar olur. Elektriksel uyarıyla SE modeli oluşturulan çalışmalarda da, daha uzun uygulanan uyarının kendini devam ettiren SE'a neden olduğu gösterilmiştir. Bu gözlemlerle birlikte nöbetin durmasını sağlayan mekanizmaların tekrarlayan nöbetlerde yetersiz olduğu düşünülmektedir (51).

SE'ü uyaran modellerde güçlü ve devamlı bir uyarı yaratılarak, inhibitör fonksiyon yetersizliği oluşturulur. Gelişmekte olan beyinde özellikle uyarıcı sinapslar daha erken geliştiklerinden, küçük yaşlarda nöbet eşliğinin düşük olduğu ve nöbete yatkınlığın arttığı bilinmektedir (52). Çalışmaların çoğu GABAerjik sistemde fonksiyon bozukluğu meydana getirmeyi hedefler. Nöbetlerin GABA-A reseptörünün fosforilasyonunda ve sentezinde değişiklik yaptığı gösterilmiştir. Nöbetin potasyum-klor taşıyıcısı üzerine olan etkileri daha az hiperpolarize veya daha depolarize GABA-A reseptörüyle ilişkili potansiyallere neden olur. İnternöronların akut kaybı ve fonksiyon bozukluğu görülür. Adenozinerjik, kannabinoid ve peptiderjik inhibitör mekanizmalardaki fonksiyon bozukluğu da rol oynar (53). Peptidlerin hipokampal eksitabilite üzerine güçlü etkileri vardır. SE sırasında inhibitör peptidlerden

(ör.galanin) eksitatör peptidlere (ör.substans P) kayma olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda alfa-amino-3-hidroksil-5-metil-isoksazol-propionat (AMPA) reseptör altünitesinin eksitatör sinapslarda sentez ve salınımında SE sırasında değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Nöbetler HCN1 gibi iyon kanallarının fonksiyon ve/veya sentezindeki değişikliklerin sonucunda nöron uyarılabilirliğinde akut değişikliklere neden olur. Bu da dendritik uyarının artmasına ve daha fazla bir postsinaptik potansiyel uyarısına neden olur (54).

Nöron ölümü özellikle hipokampusun hilus bölgesinde olur. Tüm bu anatomik ve fizyolojik değişikliklerin SE'a ne ölçüde katkıda bulunduğu bilinmemektedir. Fakat bu değişiklikler SE sonrası haftalar, aylar sonra ortaya çıkabilecek yeni nöbetlere zemin oluşturmaktadır (51).

2.9.6 Status Epileptikusta Hayvan Modelleri

SE hayatı tehdit eden, önemli sonuçları olan az anlaşılmış bir nörolojik acildir. GABA'nın etiolojide rol oynadığının anlaşılması ilk olarak 1954'de bebeklerde piridoksin eksikliğinin nöbete neden olduğu ve bunun piridoksinle durdurulabildiğinin kanıtlanmasıyla bulundu. Bu GABA'nın inhibitör etkisi olduğunun ilk ipucu oldu. Bunun üzerine Purpura ve Gonzalez-Monteagudo (1960) ve Meldrum ve ark. (1973) yaptığı çalışmalarda normal hayvanlarda GABA sentezinin bozulmasının SE'a neden olduğunu gösterdi. Daha sonra birçok çalışmada tesadüfen farklı kemokonvülzanların kimyasal yapılarından bağımsız olarak benzer şekilde SE ve yaygın beyin hasarına yol açtıkları bulundu. Sloviter ve Damiano (1981) tarafından eksitatör kemokonvülzan kainik asidin granül hücrelerinde epileptiform deşarj yapmadan önce granül hücre inhibisyonunu azalttığı kanıtlandı. Sloviter ve Damiano (1981) ve McIntyre ve ark. (1982) SE'nin elektriksel uyarı ile başlatılabildiğini belirtti. Sloviter ve ark. (1991) tüm bu modellerde SE öncesinde ve sırasında inhibisyon yetersizliği olduğunu ve hasar sonrası inhibisyon yetersizliği/aşırı uyarının hipokampal nöronlarda hasara yol açtığını gösterdi. Provenzale ve ark. (2008) nöbetlerin beyin hasarı üzerine olan etkileriyle ilgili yaptıkları çalışmada, uzamış nöbetlerin hem matür hem de immatür beyinde hasar yaptığını gösterdi. (52)

Kemokonvülzan ajanlardan kolinerjik muskarinik agonist pilokarpinin sıçanlarda sistemik uygulanmasının deneysel SE modeli için uygun olduğu saptanmış ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu model nöbet ilişkili davranışsal ve nörokimyasal özellikleri göstermede ve nöropatolojiyi araştırmada kullanılmaktadır. Pilokarpin ile oluşturulan SE'da

kolinerjik sistem aktivasyonu, nöron kaybı ve spontan nöbet aktivitesinin nöbetle uyarılan glutamat salınımı nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Pilokarpinin yaygın beyin hasarı, eksitotoksik ve iskemik hasar yapıcı etkileri ve ölümcül olması nedeniyle pilokarpin öncesi kullanılan lityumla pilokarpin duyarlılığı 10 kat arttırılarak uygulanacak pilokarpin dozu azaltılır (55).

Pilokarpin indüksiyonu SE sonrası latent dönem sonunda spontan tekrarlayıcı fokal ve sekonder jeneralize nöbetler oluşturarak insanlardaki TLE'ne benzer anatomik değişikliklere yol açar. TLE hipokampal sklerozla ilişkilidir ve hipokampusün CA1 bölgesinde ciddi nöron kaybına, CA2, CA3 ve girus dentatus(GD) granül hücre katında orta derecede hasara neden olur. Lityum-pilokarpin modeli özellikle SE'un yarattığı hipokampal hasarı göstermede kanıtlanmış olması nedeniyle tercih edilen güvenilir bir SE modelidir (56).

2.9.7 Status Epileptikusta Serebral Hasarlanma Mekanizmaları

SE'un insan ve hayvan çalışmalarında önemli derecede serebral hasar yaptığı ve özellikle de hipokampusda karakteristik hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. SE sonrası glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile oluşan kalsiyum artışı hücre içi organellerin şişmesine ve yırtılmasına, proteolitik enzimlerin aktivasyonuna ve selektif hücre ölümüne neden olmaktadır (15). Beyin hasarının deneysel modelleri nöbetlerin hipokampusda nekrotik ve apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini göstermiştir. Nekroz hücrelerin pasif olarak şişmesi ve lizisiyken, apoptotik hücre ölümü aktif, programlı hücre ölümüdür (57). Apoptoz; sitoplazmik yoğunlaşma, hücre içi organellerin korunması, DNA parçalanması ve hücrenin apoptotik cisimcikler şeklinde fagosite edilmesiyle karakterizedir (58). Nöbetle uyarılmış nöron ölümü DNA'nın endonükleazlarla nükleozomal parçalara ayrılmasıyla gerçekleşir (DNA parçalanması). Bu parçalar histolojik kesitlerde terminaldeoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick end-labeling (TUNEL) ile gösterilebilir. TUNEL boyası; DNA hasarı ile ortaya çıkan tek ve çift iplikli DNA kırıklarının serbest uçlarını işaretler. Bu yöntem nöron ölümünü göstermede yaygın olarak kullanılır (59).

TUNEL boyaması hücre ölümü mekanizmasını göstermeksizin boyanan hücrelerde fazla miktarda DNA kırıkları olduğunu gösterir. Bu nedenle TUNEL boyamasının diğer histolojik veya biyokimyasal metodlarla kombine edilmesi hücresel değişikliklerin tanımlanması için gereklidir (60). Apoptoz intrensek ve ekstresek yollarla tetiklenir. Ekstresek yolda, TNF ailesinin hücre yüzeyinde sentezlenen ölüm reseptörlerinin

aktifleşmesiyle hücre içinde ölüm-uyaran sinyal kompleksi oluşur. Bu kompleks Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associated death domain(FADD)), kaspaz 8 veya 10 gibi hücreiçi molekülleri içerir (61). Özellikle kaspaz 3 bu yolağın aktifleşmesinde anahtar role sahiptir. Kaspaz-3 hücreiçi (mitokondriyal) kaspaz-9 ve Fas-ilişkili kaspaz 8'in aktifleşmesinde rol oynar ve sonuçta apoptoz için karakteristik olan DNA parçalanmasına neden olan enzimler aktive olur. Kaspaz-3'ün aktifleşmesinin nöbetle uyarılmış hücre ölümünden sorumlu olduğu düşünülmektedir (59). İntrensek yolak, hücreiçi organellerin veya DNA hasarının ardından tetiklenir. Bu yolağı hücreiçi kalsiyum, serbest oksijen radikalleri, hücre ölümünü inhibe eden (ör.Bcl-2, Bcl-x ve Bcl-w) ve hücre ölümüne neden olan (ör.Bax, Bid ve Bim) proteinlerin arasındaki dengesizlik tetikler (58).

SE'den hemen sonra hipokampusun CA1, CA3, GD bölgelerinde anormal sinaptik yeniden düzenlenme, GABAerjik sistemin inhibisyon fonksiyonunda ve plastisitede kayıp görülür. Tüm bu değişiklikler epileptogenezi başlatır. Epileptogenez terimi normal nöronal ağın kronik aşırı uyarılabilir duruma geçmesidir. SE'un oluşturduğu beyin hasarı 'latent dönem' olarak adlandırılan epilepsi öncesi dönemin oluşmasına neden olarak epileptogenezde önemli rol alır. Latent dönem sonunda kronik TLE gelişir. TLE temporal lobdan köken alan motor nöbetlere, öğrenme ve hafıza bozukluklarına neden olur.

Epilepsisi olan hastaların yaklaşık %25'inde antiepileptik ilaçlarla kontrol edilemeyen nöbetler vardır. Antiepileptik ilaçlar genellikle hastalığın prognozunu etkilemeksizin semptomatik tedavi sağlarlar. Bu nedenle SE sonrası epileptogenezi önleyecek latent dönemde etkili alternatif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinin gerekli olduğu bildirilmektedir (62).

2.9.8 Status Epileptikusta Klinik Bulgular

Jeneralize konvülsif SE'da hastalar bilinçleri kapalı olarak tonik, klonik veya tonik-klonik kasılmalar ile başvurur. Nöbet uzadıkça klinik bulgular silikleşir ve yüzde, ekstremitelerde silik kasılmalar haline dönüşebilir. Bu nedenle bu hastaların dikkatli bir şekilde muayene edilmeleri gerekmektedir. Bu dönemde de EEG'de iktal deşarjlar devam etmektedir. Kasılmalar simetrik veya asimetric olabilir. Belirgin motor aktiviteden silik kasılmalara dönüşme, gelişen ağır ensefalopati sonucu motor iletimin bozulmasından kaynaklanır. Klinik olarak durmuş ancak elektrografik olarak nöbetleri devam eden hastalarda nörolojik zedelenmenin devam ettiği gösterildiğinden, bu zedelenmenin önlenmesi için SE

tedavisine devam edilmelidir (63,64).

SE uzadıkça sistemik etkileri belirginleşmektedir. SE'un sistemik etkileri erken dönem ve geç dönem etkiler olarak ikiye ayrılabilir. Erken dönemde aşırı adrenalin ve noradrenalin salınımına bağlı hipertansiyon, taşikardi, hiperglisemi, laktik asid artışı görülebilir. Aşırı sempatik aktivite taşikardi ve ölümcül aritmilere neden olabilir. Hayvan deneylerinde pulmoner vasküler direncin artması akciğer ödemeine neden olmaktadır, insanlarda ise solunum sayısı ve tidal volüm değişiklikleri gözlenebilmektedir. Nöbet süresi 30 dakikayı geçince kan basıncı ve glukoz düşmeye başlar, hipertermi ve solunum yetmezliği belirginleşir (44,65).

2.9.9 Status Epileptikusta Tedavi

SE yüksek morbiditesi ve mortalitesi nedeniyle hızlı ve etkin bir şekilde tedavi edilmelidir. Tedavi dört aşamada yapılmalıdır:

- 1. Vital bulguların korunması*
- 2. Nöbeti durdurmak için ilaç tedavisinin düzenlenmesi*
- 3. Status epileptikus nedeninin saptanması*
- 4. Takipte gelişebilecek yeni nöbetlerin önlenmesi*

Vital fonksiyonların korunmasında tedavi prensipleri tüm acil durumlarda aynıdır. Öncelikle hava yolunun açılması, solunum ve dolaşımın sağlanması gerekmektedir. Nöbetin tonik-klonik fazında siyanoz ve apne atakları olmasına karşın solunum SE'un erken döneminde yeterlidir. Solunum yetmezliği genellikle dirençli SE'da tedavinin uzaması ile ilaç yan etkisi olarak ortaya çıkar. Hava yolu aspire edilerek temizlenmeli, nazal kanül veya maske ile %100 oksijen verilmelidir. SE'da kullanılan ilaçlar ve özellikleri tablo 6'da , tedavi aşamaları tablo7'de gösterilmiştir (46,66) .

Tablo 6. Status Epileptikus Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

| İLAC | YÜKLEME DOZU | DEVAM DOZU | YARILANMA ÖMRÜ | YAN ETKİ |
|---------------|--|------------------------------|----------------|--|
| Diazepam | 0.3 mg/kg iv. (en fazla 10mg/doz) | 2mg/kg/doz | 28-54 saat | Solunum baskılanması, hipotansiyon |
| Lorazepam | 0.1 mg/kg i.v. (2mg/dk, 2-4mg/doz) | - | 8-25 saat | Solunum baskılanması |
| Fenitoin | 15-20mg/kg i.v. (SF içinde 1 mg/kg/dk) | - | 24-48 saat | Allerji, aritmi, hipotansiyon |
| Fosfofenitoin | 20 mg/kg i.v. (3 mg/kg/dk) | - | 24 saat | Hipotansiyon |
| Fenobarbital | 15-20mg/kg i.v. (2 mg/kg/dk) | - | 70 saat | Solunum baskılanması |
| Midazolam | 0.2 mg/kg i.v. | 1-10µ/kg/dk (infüzyon) | 1-2 saat | Solunum baskılanması, hipotansiyon |
| Pentobarbital | 5-15 mg/kg i.v. | 1-5 mg/kg/saat (infüzyon) | 10-20 saat | Hipotansiyon |
| Valproat | 20-40 mg/kg i.v. | 3 mg/kg/dk (infüzyon) | 15 saat | Hipotansiyon, kollaps, hepatotoksisite |
| Tiopental | 3-5 mg/kg i.v. | 3-5 mg/kg/saat (infüzyon) | 12-36 saat | Hipotansiyon |
| Propofol | 1 mg/kg i.v. | 4mg/kg/saat | 2 saat | Metabolik asidoz, pankreatit |

Tablo7. Status epileptikusta tedavi basamakları

Uzamış Epileptik Nöbet (5 Dakika)

- 1.Vital bulgular değerlendirilir.
2. Hava yolu açılır, % 100 oksijen verilir.
3. Damar yolu açılır, tam kan sayımı, biyokimya, toksikoloji, antiepileptik ilaç düzeyleri için kan alınır ve dolaşım için yaşına uygun sıvı takılır. Hipoglisemi için parmak ucundan kan şekeri düzeyi bakılır, kan şekeri düşükse % 10 glukoz 4 cc i.v. verilir.
4. Damar yolu açılabilmişse intravenöz diazepam 0.3 mg/kg (en fazla 10 mg) veya lorazepam 0.1 mg/kg (en fazla 4 mg), damar yolu açılmıyorsa diazepam (2-5 yaşa 0.5 mg/kg, >6 yaşa 0.3 mg/kg) rektal yapılır ve damar yolu açılır.

Erken SE (5-20 dakika)

- 5.On dakika sonra nöbet devam ediyorsa i.v. 0.3 mg/kg diazepam veya 0.1 mg/kg lorazepam aynı dozda tekrar edilir.

Yerleşmiş SE (20-60 dakika)

- 6.İkinci diazepam uygulamasından on dakika sonra, nöbet aktivitesi devam ediyorsa fenitoin 15-20 mg/kg infüzyon şeklinde (serum fizyolojik içinde 1 mg/kg/dk'yı geçmeyecek şekilde) verilir.
7. Fenitoin verilmeye başlandıktan 20 dakika sonra nöbet durmadıysa intravenöz fenobarbital 20 mg/kg (2 mg/kg/dk yavaş) verilir.
8. Üç yaş altı çocuklarda piridoksin 100 mg i.v. verilir.

Dirençli SE (>60 dakika)

Fenitoin ve fenobarbital verildikten sonra nöbet devam ediyorsa (nöbetin başlangıcından 60 dakika sonra) dirençli SE kabul edilir.

- 9.Midazolam 0.2 mg/kg yükleme, ardından 1 µg/kg/dk midazolam infüzyonu her 5-15 dakikada bir arttırılarak toplam 10 µg/kg/dk'ya kadar veya klinik ve EEG'de nöbet aktivitesi durana kadar arttırılır.
 - 10.Pentobarbital (5-15 mg/kg) i.v. bolus, 1-5 mg/kg/saat infüzyon devam edilir.
 11. Tiopental (3-5 mg/kg) i.v. bolus, 3-5 dakikada bir (maksimum 10 mg/kg) etki (izoelektriksel koma) çıkana kadar verilir. 3-5 mg/kg/saat infüzyon devam edilir.
-

2.9.10 Status Epileptikusta Nöronkoruyucu Ajanlar ve Umut Verici Tedaviler

SE, inme, kafa travması, ensefalit veya çocukluk çağı febril nöbetleri gibi beyin etkilenmelerinden bir süre sonra kronik epileptik nöbetler başlayabilmektedir. Birçok epileptojenik değişikliğin latent period sırasında geliştiğine inanılmaktadır. Kronik TLE gelişimi ilk beyin hasarından (SE gibi) yıllar sonra ortaya çıkabilir. Bu dönem genetik faktörlerin, hücre içi elektrolit bozukluklarına yol açan glutamat aracılı toksisitenin, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun, oksidatif stresin, büyüme faktörlerindeki azalmanın ve sitokin salınımındaki artışın olduğu nekrotik ve apoptotik hücre ölümü ile sonuçlanan dinamik bir süreçtir. Bu dönemde etkili tedavi stratejileri ile kronik epilepsiye neden olan nöron hasarının ilerlemesi önlenir. Bozulan nöron sisteminin tamirine yönelik etkili stratejiler anormal sinaptik reorganizasyon gelişimini de önler (62).

Nöbeti baskılayan antiepileptik ilaçların çoğu antiepileptojenik değildir. Bunlardan sadece bazı konvansiyonel ve yeni antiepileptikler etkili nöbet baskılanmasının yanında nöron koruyucu etkilere sahiptir. Tablo 8’de bazı anti-epileptik ilaçların deney hayvanı modellerindeki epileptojenik etkileri görülmektedir (67,68).

Tablo 8. Deneysel Nöbet Modellerinde Antiepileptik İlaçların Antiepileptojenik Etkileri

| Anti-epileptik ilaç | Epileptogenez üzerine etki |
|---------------------|----------------------------|
| Benzodiazepinler | +/- |
| Fenobarbital | + |
| Valproat | +/- |
| Topiramet | + |
| Gabapentin | +/- |
| Lamotrijin | + |
| Felbamat | + |
| Levetirasetam | +/- |
| Tiagabin | + |
| Vigabatrin | + |

(+)Nöron koruyucu etki mevcut; (+/-) değişken veri

Çeşitli nörotrofik faktörlerin nöron sağkalımı, farklılaşma, nörotransmitter sentezi, sinaptik plastisite ve eksitabilite üzerine güçlü etkileri vardır. Epilepsi ile ilişkili en önemli nörotrofik faktörler fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3), sinir büyüme faktörü (NGF) ve vasküler endotelial büyüme

faktörüdür (VEGF). Nörotrofik faktörlerin en iyi bilinen alt grubu nörotrofinlerdir. BDNF, NT-3 ve NGF gibi nörotrofinlerin akson büyümesi ve sinaptik plastisite üzerine olan etkileri ile beyin hasarı ve iskemide nöron koruyucu oldukları gösterilmiştir (69).

Beyin hasarı sonrası aşırı serbest radikal salınımına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresin epilepsi gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Epilepsi tedavisinde oksidan hasarı azaltan tedaviler dikkat çekmiştir. Kırmızı üzümde bulunan resveratrolün hücre kültürü ve hayvan modellerinde güçlü nöroprotektif etkisinin oksidatif stresi azaltmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (70).

Hormonların da sinir sistemine olan periferik ve endojen etkileri bilinmektedir. Özellikle östrojen ve progesteron gibi gonadal steroidlerin ve bunların öncüllerinin nörotransmitter reseptörleri üzerine direkt etkileri olduğu bilinmektedir. Endojen nörosteroid metabolizmasının büyüme ve beyin olgunlaşması üzerine etkileri vardır. Overleri alınmış sıçanlarda yapılan bir çalışmada kronik östrodiol uygulanmasının SE sonrası piramidal hücre kaybını azalttığı gösterilmiştir. Sirkadiyen ritim, immunité, yaşlanma sürecinin yavaşlaması ve kanser önleyici etkileri olduğu bilinen melatoninin de nöron korumada etkili olduğu ve eksikliğinde nöbet sonrası oluşan nöron hasarının arttığı bilinmektedir (71).

2.9.11 Eritropoietin ve Nöron Koruyucu Etkinliği

Epo'nun antiapoptotik etkinliği ile eritroid öncül hücrelerin yaşamını ve olgunlaşmasını sağladığı bilinmektedir. Bununla birlikte son yıllarda Epo'nun nöron koruyucu ve immunomodülatuar etkileri de ön plana çıkmıştır. Epo'nun SSS'deki rolü Epo reseptörlerinden yoksun farelerde nöronal öncül hücrelerin sayısında azalma ve ağır apoptoz olduğunun gösterilmesiyle kanıtlanmıştır (72).

Epo uzun süredir son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların anemi tedavisinde kullanılmaktadır. Anemiyi düzeltmesinin yanında bu hastaların bilişsel yetilerinde de düzelme görülmüştür (73). Bu dönemde Epo'nun molekül büyüklüğünden dolayı kan-beyin bariyerini geçemeyeceği düşünüldüğünden ve beyin kökenli Epo üretimi ve SSS'nde Epo reseptör sentezi bilinmediğinden bu etki Epo'nun eritropoezdeki artışa bağlı olarak kanın oksijen taşıma kapasitesini arttırmasına bağlanmıştır (74). Daha sonraki çalışmalarda Epo ve reseptörünün nöron, glial hücreler, endotelial hücreler gibi beyindeki farklı hücre tiplerinde sentezlendiğinin ortaya çıkmasıyla, ekzojen uygulanan Epo'nun bilişsel fonksiyonları

etkileyebileceği düşünülmüştür.

Epo'nun SSS'nde iskemik, hipoksik, metabolik hasar sonrası nöron koruyucu etkisi gösterilmiştir. Epo SSS'nde reaktif oksijen türleri ve glutamat gibi doku hasarı yaratan molekülleri sınırlayarak, vazospazmı azaltarak, inflamasyonu ve nörotransmitterleri düzenleyerek, anjiogenezi uyararak ve apoptozu sınırlayarak çeşitli mekanizmalarla etki gösterir (75).

Epo'nun etkinliği birçok deneysel modelde çalışılmıştır. Geçici beyin iskemi modelinde hipokampusun CA1 bölgesinde nöron ölümünü azalttığı ve bilişsel işlevleri koruduğu gösterilmiştir (76). Deneysel subaraknoid kanama modelinde akut dönemde uygulanan Epo'nun mortaliteyi azalttığı ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı bildirilmiştir (77). Otoimmün ensefalopati modelinde, 'myelin basic protein' ile immunizasyondan 3 gün sonra başlanan intraperitoneal Epo'nun otoimmün ensefalopati başlama zamanını geciktirdiği gösterilmiştir (78). Tek taraflı siyatik sinir kesisinin oluşturulduğu yenidoğan sıçanlarda 2 hafta uygulanan sistemik Epo'nun motor nöron kaybını azalttığı bulunmuştur (79). Göz içi basıncı arttırarak oluşturulan retinal iskemi modeli öncesi ve sonrasında uygulanan Epo'nun histopatolojik hasarı ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (80).

Epo nöron yaşam süresini apoptozu inhibe ederek arttırır. Epo hücredeki reseptörüne bağlanınca Janus tirozin kinaz-2 (JAK-2) fosforile olur ve aktifleşir. Bu da sekonder sinyal moleküllerinin aktifleşmesine neden olur. Bu moleküller sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 5 aktivatörü (STAT5), Ras mitojen aktive edici protein kinazı (MAPK) , ERK-1/-2 ve PI3K/Akt aktivasyonuna neden olur. Epo ayrıca antiapoptotik protein Bcl'yi arttırırken, apoptozda önemli rol alan kaspaz-3'ü inhibe eder. Epo yeni damar yapılarının oluşumuna neden olarak beyin perfüzyonunu da arttırmaktadır. Beyindeki kapiller endotel hücrelerinde Epo reseptörü bulunmaktadır ve Epo'nun kapillerler üzerine doz bağımlı mitojenik etkileri vardır. Epo ayrıca VEGF'nin neden olduğu kapiller permeabilite artışına karşı da koruyucudur (81).

Çocukluk çağında sık görülen SE'un yaygın olarak görülen sekelleri entelektüel fonksiyonlarda azalma, kalıcı nörolojik hasarlar ve devam eden tekrarlayıcı nöbetlerdir (15). Bu çalışma ile tüm bu bilgiler ışığında lityum-pilokarpinle uyarılan çocukluk çağındaki sıçanlarda oluşturulan SE modelinde r-Hu-Epo'nun hipokampal hasar ve böylece SE sonrası görülen uzun dönem sekellerin azaltılmasına yönelik etkilerini araştırmayı amaçladık.

3.GEREC VE YÖNTEM

3.1 Hayvan Modeli ve İlaç Uygulaması

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleeri Etik Kurulu'nda 84-2008 No ile onay alınan bu çalışma, aynı üniversitenin Deneysel Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmaya postnatal 21. günde olan 21 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar alındı. Hayvanlar postnatal 21. güne kadar anneleri ile aynı kafeste bırakıldı daha sonra ayrılarak gruplandırıldı. Ondört sıçanda SE oluşturuldu. SE oluşturulmayan diğer 7 sıçan ise kontrol grubu olarak alındı. SE oluşturulan sıçanların 7 tanesine serum fizyolojik ve kalan 7 tanesine r-Hu-Epo (Eprex 4000IU/ml) 10U/gr intraperitoneal olarak uygulandı (Resim1) (17). SE oluşturulmayan kontrol grubuna eşit miktarda serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol ve çalışma gruplarındaki hayvanlar sonrasında histolojik çalışma için feda edildi.

Resim 1. intraperitoneal r-Hu- Epo enjeksiyonu



3.1.1. Çalışma Grupları

Grup 1: kontrol + intraperitoneal serum fizyolojik (n=7) (K)

Grup 2: status epileptikus + intraperitoneal serum fizyolojik (n=7) (SE+SF)

Grup 3: status epileptikus + intraperitoneal r-Hu-Epo (n=7) (SE+Epo)

3.1.2 Lityum-Pilokarpin ile SE oluşturulması

Glien ve ark. yaptığı çalışmada lityum-pilokarpin ile uyarılmış nöbet oluşturmak ve mortaliteyi azaltmak için tek dozda 30 mg/kg veya bölünmüş dozlar halinde 10 mg/kg'dan başlayarak nöbet oluşumu saptanana kadar pilokarpin verilebileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada SE sonrası düşük mortalite sağlamak için 15mg/kg'dan pilokarpin uygulandı (82). Hayvanların 14'üne postnatal 21. günde 3 mEq/kg intraperitoneal olarak lityum klorür, bundan 20–22 saat sonra 15 mg/kg pilokarpin hidroklorid intraperitoneal olarak verildi. Pilokarpinden yarım saat önce periferik kolinomimetik etkileri önlemek amacıyla 10 mg/kg atropin intraperitoneal olarak verildi (83).

İzlenecek değişiklikler Racine skalasına göre yapıldı ve Evre 3 ve üzerindeki değişiklikler nöbet olarak kabul edildi (Resim 2) (84).

- Ağız ve yüz hareketleri (Evre 1)
- Baş sallama (Evre 2)
- Ön ekstremitte klonusu (Evre 3)
- Şahlanmayla birlikte ön ekstremitte klonusu (Evre 4)
- Şahlanma ve düşmeyle olan ön ekstremitte klonusu (jeneralize motor konvülziyonlar) (Evre5)

Resim 2 Lityum pilokarpin uygulaması sonrası görülen ön ekstremitte klonusu



3.1.3. r-Hu-EPO'nun uygulanması

Pilokarpin enjeksiyonundan 40 dakika sonra r-Hu-Epo (Eprex 4000IU/ml) 10U/gram intraperitoneal olarak 5 gün boyunca uygulandı (17,82). Tüm sıçanlar 5. gündeki enjeksiyonu takiben eter anestezisi ile feda edilerek beyin dokuları çıkarıldı.

3.2. Histolojik Değerlendirme

3.2.1Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

%10'luk formaldehit ile tespit edilen beyin dokuları, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla bir gece akarsu altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 15'er dakika %60'dan %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika iki değişim ksilende tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 15 dakika 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 30'ar dakika parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü.

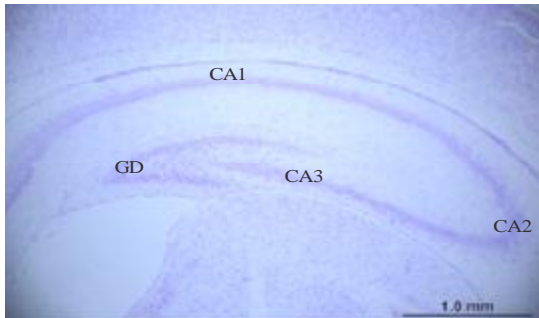
3.2.2 Krezil Viole Boyama Yöntemi

Kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra 30'ar dakika, iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Krezil viole asetat solüsyonunda 20 dakika tutuldu. %96 alkolde yıkandıktan sonra ksilolde şeffaflaştırma yapıldı, entellan ile kapatıldı.

3.2.3 Hipokampal Nöron Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

Nöron sayımı yapılacak örnekler rutin histolojik takip işleminden sonra krezil viole ile boyanarak elde edilen kesitler mikroskopta incelenerek (Olympus BH-2 Tokyo) görüntüleri büyütmesi 3,3 video kamera (JVC TK-890E, Japan) aracılığıyla bilgisayara aktarılarak analiz edildi. Paxinos ve Watson'un sıçan beyin atlasına (85) göre 9. plate prefrontal korteks, 21., 23., 25. plate'e göre alınan koronal kesitlerden hipokampusun CA1, CA2, CA3, girus dentatus bölgelerinde sağ ve sol hemisferde ayrı ayrı nöron sayımı yapıldı (86). Resim 3'de hipokampusun histolojik görünümü ve bölgeleri gösterilmektedir.

Sekil 3Hipokampusun Histolojik Görünümü



3.2.4 TUNEL Tekniği ile Boyama Metodu (Apopitoz Değerlendirmesi)

Doku kesitleri apoptotik hücreleri göstermek amacı ile TUNEL tekniği ile boyandı. Bu teknik için 'in situ cell death detection TUNEL system', POD kiti (Roche,Almanya) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 3 değişim ksilen ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Kesitler 15 dakika 20 µg/ml proteinase K ile inkübe edildikten sonra, distile su ile 5 dakika yıkandı. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (Merck, Almanya) uygulandıktan sonra 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline Solution, PBS, Pleasanton, CA) ile yıkanan kesitler TdT-enzimi 37°C de 1 saat enkübe edildi. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkanan kesitler anti-streptavidin-peroksidaz

ile 30 dakika enkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB, Roche Diagnostics, Almanya) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Harris hematoksilen ile zemin boyaması yapılan kesitler %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30'ar dk 3 değişim ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

3.3.5 Kaspaz-3 İmmun İşaretleme Yöntemi (Apopitoz Değerlendirmesi)

Kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra 30'ar dakika, iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, Fransa) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde 37°C, 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont) ile muamele edildi. Primer antikor sıçan spesifik anti-kaspaz-3 (1:100; Neomarkers, Fremont) antikoru bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco,A.B.D.) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB kullanılarak görünür hale getirildi. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Almanya) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı

3.4 Araştırmada Kullanılan İstatiksel Yöntemler

İstatistik değerlendirme için SPSS 11.5 (Chicago, IL) program kullanıldı. İstatiksel anlamlılığı yansıtan değer olarak p değeri <0.05 olarak seçildi. Deney grupları sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılarak hesaplandı. Ortalama nöron sayımları ve immunohistokimyasal skorların karşılaştırılmasında one-way ANOVA (Benferonni'nin çoklu karşılaştırmalar için düzeltmesi kullanılarak) ile karşılaştırıldı.

4.SONUCLAR

4.1 Nöbet Skorlaması

Lityum-pilokarpin ile nöbet oluşturulan tüm hayvanlarda ilaç uygulamasından sonra 30 dakika içinde Racine sınıflamasına göre evre 3 ve üstünde nöbet aktivitesi gözlemlendi.

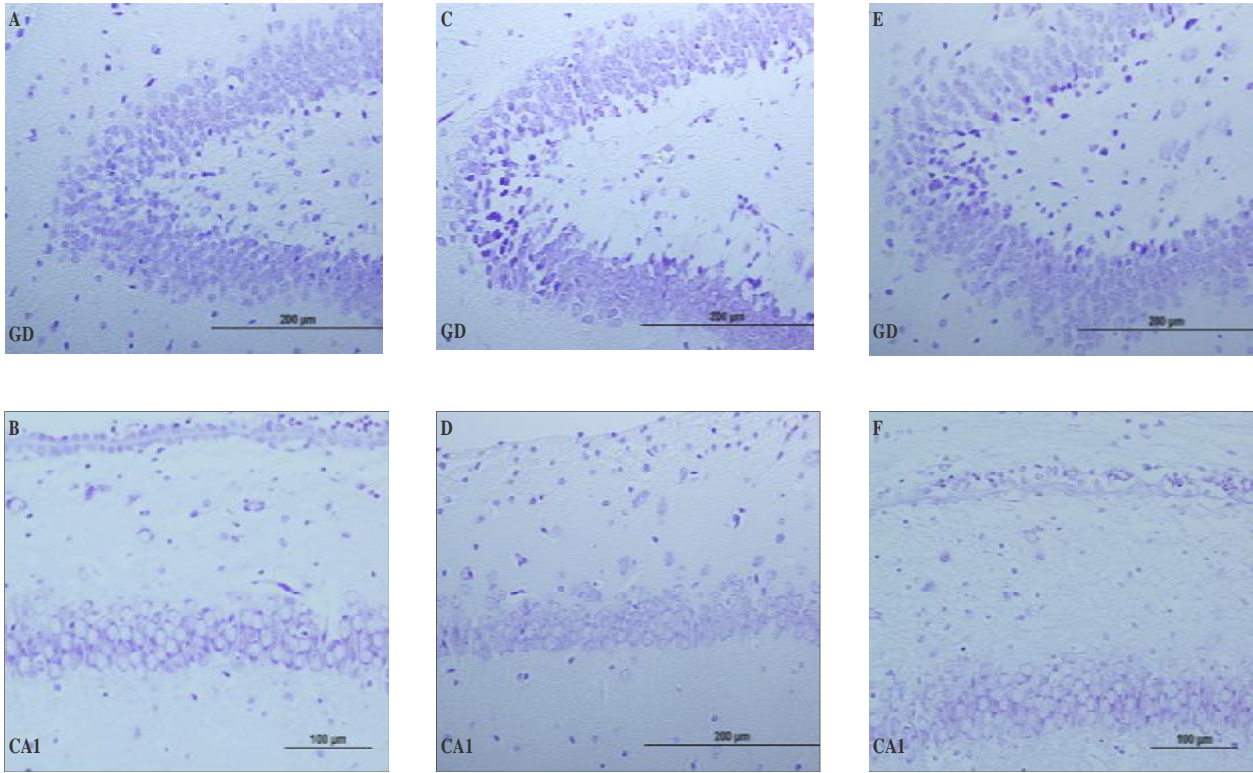
4.2 Nöron Sayımı

Her grubun ortalama nöron sayımları ve standart sapmaları tablo 9’da görülmektedir. SE+SF grubundaki nöron sayımları kontrol grubuna göre hipokampusun aynı bölgelerinde belirgin olarak azalmış bulundu (tüm ikili karşılaştırmalar için $p=0.001$). Ayrıca SE +Epo ile tedavi edilen grupta SE+SF uygulanan gruba göre hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve dentat girus bölgelerindeki nöron sayılarının anlamlı olarak daha fazla olduğu bulundu (tüm ikili karşılaştırmalar için $p=0.001$) (Tablo 9). Resim 4’de hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde krezil viole boyamasıyla nöron sayımları görülmektedir.

Tablo 9 Gruplara göre nöron sayım ortalamalarının karşılaştırılması

| Gruplar | <u>Nöron Sayıları</u> | | | |
|--------------------|------------------------------|------------|------------|------------|
| | CA1 | CA2 | CA3 | GD |
| 1-Kontrol | 37,2±1.19 | 41.31±0.68 | 25.18±1.06 | 70.27±2.05 |
| 2-SE+SF | 25.15±1.51 | 26.64±1.67 | 15.51±1.34 | 49.21±2.33 |
| 3-SE+Epo | 32.11±0.65 | 34.15±0.91 | 18.64±0.47 | 55.15±2.03 |
| p değerleri | | | | |
| 1 ile 2 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| 2 ile 3 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |

Sekil 4. Hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde krezil viole boyamasıyla nöron sayımları görülmektedir. Kontrol grubu (A,B), SE+SF grubu (C,D), SE+Epo grubu (E,F)



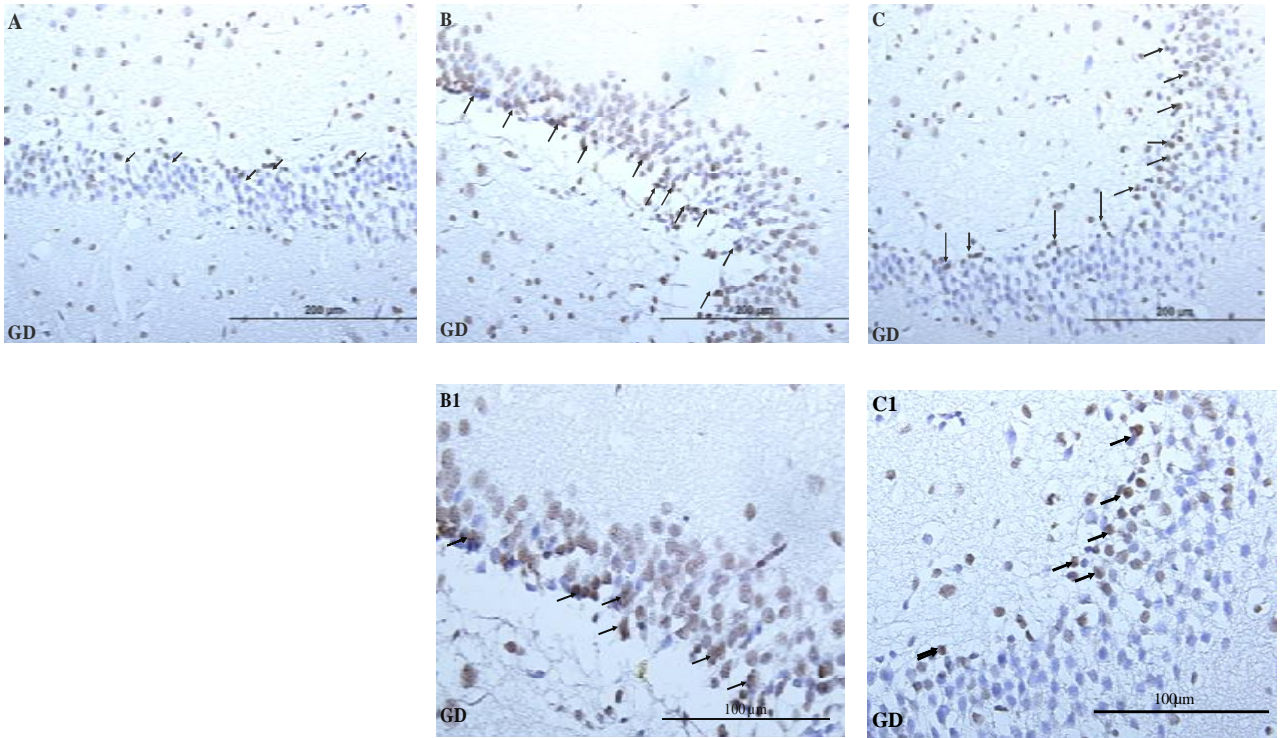
4.3 TUNEL Boyaması

SE'un neden olduğu apoptozu değerlendirmek için TUNEL boyası kullanıldı. SE+SF uygulanan grupta, kontrol grubuna göre hipokampusun CA1 ve dentat girus bölgelerinde TUNEL pozitif hücrelerin sayısında belirgin artış saptandı ($p=0.001$, $p=0.001$). SE+Epo ile tedavi edilen grupta, SE+serum fizyolojik uygulanan gruba göre TUNEL pozitif hücrelerin sayısı önemli ölçüde azalmış olarak saptandı ($p=0.001$, $p=0.001$) (Tablo10). Resim 5'te gruplarda hipokampusun GD bölgesinde TUNEL pozitif hücreler görülmektedir.

Tablo10. TUNEL pozitif hücrelerin oranları

| Gruplar | CA1(%) | GD(%) |
|--------------------|------------|------------|
| 1-Kontrol | 3.53±1.25 | 4.91±1.18 |
| 2-SE+SF | 13.58±0.62 | 17.58±0.87 |
| 3-SE+EPO | 9.00±0.25 | 12.41±0.52 |
| p değerleri | | |
| 1 ile 2 | 0.001 | 0.001 |
| 2 ile 3 | 0.001 | 0.001 |

Sekil 5 Hipokampusun GD bölgesinde TUNEL-pozitif hücreler görülmektedir (ok ile işaretli kahverengi hücreler). Kontrol grubu (A), SE+SF grubu (B,B1), SE+Epo grubu (C,C1) .



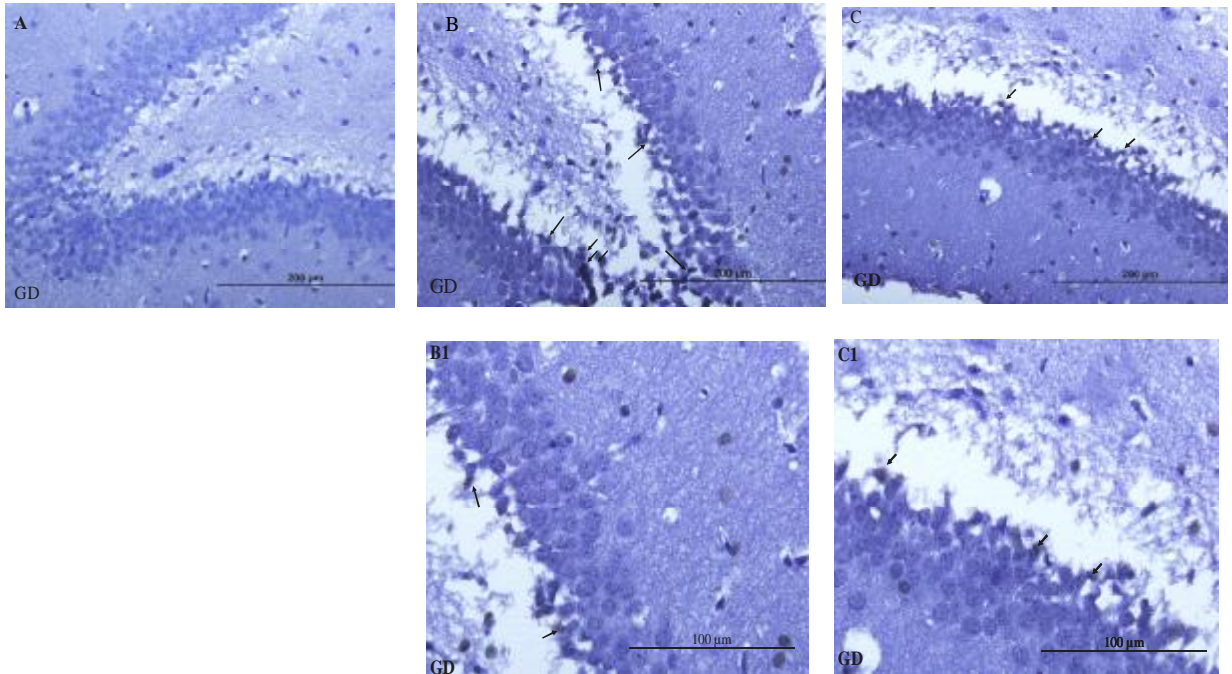
4.4.Kaspaz-3 İmmun İşaretleme Yöntemi

TUNEL yöntemi ile saptadığımız apoptoz her bir gruptan birer örnek seçilerek kaspaz-3 immün işaretleme yöntemi ile de değerlendirildi. Kontrol grubunda hipokampusun CA1 bölgesinde %0.5, dentat girusda %0.75 saptandı. SE+serum fizyolojik uygulanan grupta kaspaz-3 pozitif hücrelerin oranı hipokampusun CA1 bölgesinde %2,25, dentat girusda %2.5 saptandı. SE+Epo grubunda kaspaz-3 pozitif boyanan hücrelerin oranı hipokampusun CA1 bölgesinde %0.5, dentat girusda %1.75 bulundu. İstatiksel olarak değerlendirilememekle birlikte SE+Epo grubunda kaspaz-3 pozitif hücrelerin oranı SE+serum fizyolojik uygulanan gruba göre azalmış olarak saptandı (Tablo 11) (Resim 6).

Tablo 11 Hipokampusun GD bölgesinde kaspaz-pozitif hücrelerin oranları

| Gruplar | CA1(%) | GD(%) |
|-----------|--------|-------|
| 1-Kontrol | 0.5 | 0.75 |
| 2-SE+SF | 2.25 | 2.5 |
| 3-SE+EPO | 1.25 | 1.75 |

Resim6 Hipokampusun GD bölgesinde kaspaz pozitif hücrelerin görülmektedir (okla işaretli). Kontrol (A), SE+SFgrubu (B,B1), SE+Epo grubu (C,C1)



5.TARTIŞMA

SE sık görülen bir nörolojik acildir ve uzun dönemde kronik epilepsiye neden olabilir (87). Çocuklarda SE sonrası mortalite %0-43 arasında, epilepsi gelişimi %3.5-100, bilişsel ve davranış bozuklukları %0-83 arasında değişmektedir (88). En az 30 dakika süren nöbet sonrası epilepsi gelişim riski %25-40'dır (89).

SE ciddi limbik nöbetlere, kan-beyin bariyerinin açılmasına, lokal beyin ödemine, beyin içine kanamaya, mikroglia ve astrositlerin aktivasyonu sonrasında oluşan hipokampus, amigdala, entorhinal korteks ve diğer beyin alanlarında nöron hasarlanmasına neden olur (90-91). Hücre düzeyindeki yoğun nöbet aktivitesi N-metil-D-aspartat aracılı ve voltaj kapılı iyon kanalları ile aşırı kalsiyumun hücre içine girmesine neden olur. Hücre içi iyonlardaki artış SE sonrası akut nöron ölümünü tetikleyen biyokimyasal yolların oluşumuna neden olur (92). Özellikle hücre içi kalsiyum artışı reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve hücrede fonksiyon bozukluğuna neden olan katabolik enzimlerin aktivasyonuna neden olur (93). Nöbet aktivitesinin başlamasıyla GABA, glutamat, veya diğer amino aminler salınır ve tekrar yapılmalarını sağlayan mekanizmalar uyarılır (90). Bu dinamik nörokimyasal değişiklikler aksonlarda aşırı büyüme ve nöronların hasarlanması sonucunda nöron devrelerinin yeniden düzenlenmesine neden olarak ileride oluşabilecek epilepsi için zemin oluşturur (94).

Epilepsi gelişimi üç aşamada olur: ilk hasar (ör:SE), latent dönem (epileptogenez), tekrarlayan nöbetler (semptomatik epilepsi). Latent dönem; ilk hasarla oluşturulan nöron hasarlanmasının ilerlemesiyle oluşabilen kronik epileptik nöbetler, öğrenme ve hafıza güçlükleriyle karakterize kronik epilepsiye gidişi önlemek için tedavi fırsatı sağlar (95). Daha önce yapılan çalışmalar nöron kaybının epileptogenez sırasında oluşan yeniden düzenlenmenin en önemli etkeni olduğunu göstermiştir (96). Bununla beraber, nöron koruyucu ajanların epileptogenezi önlemede kullanımı önem kazanmıştır (97). Bu ajanlarla epilepsi gelişimi tamamen önlenmese bile hastalığın daha hafif olması, daha kolay tedavi edilebilmesi ve kognitif etkilenmenin daha az olması sağlanabilir (98).

Nöronların korunmasıyla ilgili stratejilerde maksimum kazanç sağlanması için ilaçların doğru zamanda (SE'dan hemen sonra veya latent dönemin başında) ve yeterli dozda uygulanmaları gerekmektedir. Bu şekilde SSS'nin fonksiyonunu bozmadan endojen tamir

mekanizmalarını arttırmaları. Son zamanlarda yapılan hayvan ve insan çalışmaları SE sonrası nöronların korunması ve onarılması için nöron koruyucu ve antiepileptojenik stratejilere ışık tutmaktadır. Nöron koruyucu tedaviler üzerine yapılan çalışmaların çoğu deneysel hayvan modellerindeki nöron hasarı üzerine yapılmıştır (62). Kainik asid veya pilokarpin gibi kimyasal konvülzanlarla oluşturulan SE'da beyin birçok alanı etkilenmesine rağmen hipokampal bölgede plastisitenin fazla olması nedeniyle nöbetle uyarılmış hasara duyarlılık artmıştır (99). Akut nöbetlerden sonraki ideal nöron koruyucu stratejiler nöbetlere duyarlı beyin bölgelerindeki nöronları kurtarmaya yönelik olmalı ve SE'dan haftalar sonra oluşan kronik epileptik nöbetleri önlemede etkili olmalıdır (62). Çalışmamızda çocukluk dönemindeki sıçanlarda lityum-pilokarpinle uyarılan SE'dan hemen sonra uygulanan Epo'nun hipokampustaki hücre kaybına yönelik etkilerini nöron sayımıyla, apopitoza olan etkilerini TUNEL boyama ve kaspaz-3 immun işaretleme yöntemiyle değerlendirdik.

Çalışmamızda hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinde SE+SF uygulanan grupta kontrol grubuna göre nöron sayılarının anlamlı olarak azaldığı ve histolojik kesitlerde SE oluşturulan grupta doku bütünlüğünün belirgin bozulduğu görüldü. Dube ve arkadaşları lityum-pilokarpin ile uyarılmış SE oluşturdukları prepubertal dönemdeki 21 günlük sıçanlarda yaptıkları çalışmada hipokampusun CA3 bölgesi, amigdala, talamus ve entorhinal kortekste hücre kaybı olduğunu göstermişlerdir (100). Nadam ve arkadaşlarının erişkin sıçanlarda lityum-pilokarpin ile oluşturdukları modelde hipokampustaki nöron kaybının SE sonrası birinci günde yaklaşık %45, üçüncü günde %65'e vardığı görülmüştür (9).

Çalışmamızda hipokampustaki apopitozu göstermeye yönelik yapılan TUNEL boyamasında SE+SF uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TUNEL pozitif hücrelerin sayısının hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde anlamlı olarak arttığı görüldü. SE sonrası hipokampal hasar, Yang ve arkadaşlarının erişkin sıçanlarda lityum-pilokarpinle oluşturdukları modelde TUNEL pozitif hücrelerin pilokarpin verilen grupta kontrol grubuna göre 13.5 kat fazla olduğunun saptanmasıyla gösterilmiştir (15). Sankar ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada lityum pilokarpinle SE oluşturulan üç haftalık sıçanlarda hipokampusun GD bölgesindeki granüler hücrelerde TUNEL ile apopitotik hücrelerde artış saptanmıştır (101). Araki ve arkadaşlarının kemokonvülzan ajanlardan kainik asidin amigdala içine enjeksiyonuyla erişkin farelerde oluşturdukları SE'da hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerinde TUNEL ile gösterilen yaygın apopitoz saptanmıştır (102).

Apoptotik mekanizmayı göstermede ve TUNEL ile saptadığımız apoptozu doğrulamada kullandığımız kaspaz-3 immün işaretleme yöntemiyle de SE+SF uygulanan grupta kontrol grubuna göre hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde kaspaz pozitif hücrelerin oranlarında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artış saptandı. Narkilahti ve arkadaşlarının sıçanlarda kainik asid veya amigdalya elektriksel uyarı ile oluşturdukları SE modellerinde kaspaz-3 aktivitesinin nöbet sonrası 16-24. saatlerde hipokampus ve temporal bölgelerde belirgin arttığı görülmüştür (97). Lityum-pilokarpinle erişkin sıçanlarda oluşturulan başka bir modelde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SE görülen grupta kaspaz pozitif hücrelerin oranında hipokampusun CA1,CA2 ve CA3 bölgelerinde %74 ve GD bölgesinde %534 artış bulunmuştur (103).

SE+SF grubuyla kontrol grubunu nöron sayımı, TUNEL boyama sonuçları ve apoptozu doğrulayan kaspaz-3 immün işaretleme yöntemiyle karşılaştırdığımızda SE'un neden olduğu hipokampal hasar mekanizmalarını göstermede lityum pilokarpin modelinin çocukluk çağındaki sıçanlarda da uygun olduğunu ve çalışmamızda kullandığımız bu modelin literatür ile karşılaştırdığımızda uyumlu sonuçlar verdiğini saptadık.

Epo'nun SSS'nde eritropoezden bağımsız olarak birçok reseptörü ve biyolojik etkisi vardır (10). Bernaudin ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada farelerde serebral iskemi sonrasında Epo ve reseptörlerinin arttığı ve kalıcı orta serebral arter darlığından 24 saat sonra ventrikül içine uygulanan Epo'nun infarkt alanını belirgin azalttığı saptanmıştır (104). Kemirgenlerde yapılan başka bir deneysel serebral iskemi modelinde geçici orta serebral arter tıkanıklığında uygulanan sistemik Epo'nun infarkt alanını azalttığı gösterilmiştir (105). Çift-kör randomize klinik bir çalışmada inme hastalarında semptomların başlangıcından 8 saat içinde intravenöz olarak uygulanan r-Hu-Epo'nun prognozda belirgin iyileşme sağladığı gözlenmiştir (12). Başka bir çalışmada yenidoğan sıçanlarda oluşturulan hiperoksik beyin hasarında Epo uygulanan grupta hipokampusun CA1 ve dentat girus bölgelerinde, pariyetal kortekste apoptozun azaldığı görülmüştür (106).

Şizofrenide de nöron hasarı ve bilişsel yetilerde ilerleyici bozukluk olduğunun gösterilmesi ve antipsikotiklerin bu konuda etkilerinin olmaması nedeniyle bu alanda da Epo ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (107). Çok merkezli klinik bir çalışmada 3 aylık bir süre boyunca ek tedavi olarak verilen Epo'nun şizofreni ile ilgili bilişsel yetilerde iyileşme yaptığı gösterilmiştir (108). Sadece semptomatik tedavinin mümkün olduğu travmatik beyin hasarıyla

ilgili Brines ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada korteksine darbe alan farelerde darbe öncesi veya sonrası Epo uygulanmasının hasar sonrası 10. gündeki nekrozu azalttığı saptanmıştır (105). Sıçanlarda oluşturulan deneysel omurilik kontüzyon ve kompresyon hasarlarında Epo'nun fonksiyonel iyileşmeyi önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir (109). Perinatal beyin hasarının önemli nedenlerinden biri olan ve serebral palsi, mental gerilik, epilepsi ve öğrenme güçlükleri gibi ağır nörolojik sekellere neden olan serebral hipoksi-iskeminin yenidoğan sıçan modelinde de Epo tedavisinin uzun dönem bilişsel yetilerde ve beyin hasarında iyileşme sağladığı gösterilmiştir (110).

Çalışmamızda SE+Epo ile tedavi edilen grupta SE+SF uygulanan gruba göre hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerindeki nöron sayımları anlamlı olarak arttığı görüldü. Chu ve arkadaşlarının Sprague-Dawley türündeki erişkin sıçanlarda lityum pilokarpinle oluşturdukları SE sonrası uyguladıkları Epo'nun hipokampusun CA1, CA3 ve hilus bölgelerinde ortalama nöron kaybını, kan beyin bariyeri hasarını, nöronal inflamasyonun göstergesi olan mikrogliya hasarını ve spontan tekrarlayıcı nöbet riskini azalttığı saptanmıştır. Fakat bu çalışmada Epo'nun nöron koruyucu etkisi sadece nöron sayımı ile gösterilirken, nöronları hangi mekanizmayla koruduğu gösterilmemiştir (56). Nadam ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı başka bir çalışmada pilokarpin ile uyarılan SE sonrası astroglial Epo üretiminin arttığını ve r-Hu-Epo'nun astroglial hücrelerde Epo üretimini artırarak hipokampal nöron yaşam ömrünün arttırabileceği belirtilmiştir. Aynı çalışmada diazepam ile durdurulan SE sonrası verilen Epo'nun nöron kaybını azaltarak hipokampusda koruyucu olduğu gösterilmiştir (9). Fakat bu çalışmada nöbeti durdurmak için nöron koruyucu özelliği olan diazepamın kullanılması ve nöron koruma etkisinin sadece nöron sayımıyla gösterilmesi çalışmanın kısıtlı yönleridir (111). Bizim çalışmamızda SE'ü durdurmak için ilaç kullanılmadı ve başka bir ilaç etkileşim olmaksızın sadece Epo'nun hipokampus üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir.

SE+Epo ile tedavi edilen grupta SE+SF grubuyla karşılaştırıldığında hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde TUNEL pozitif hücrelerin sayısında anlamlı olarak azalma bulundu. Yang ve arkadaşlarının erişkin sıçanlarda yaptığı başka bir çalışmada pilokarpinden 4 saat önce uygulanan Epo'nun aynı dozda verilmesiyle TUNEL, Bim ve Bad (pro-apoptotik proteinler) pozitif hücrelerin sayısında azalma, Bcl-w ve Bcl-2 (anti-apoptotik proteinler) pozitif hücrelerin sayısında artış bulundu (17). Yun ve arkadaşlarının erişkin sıçanlarda yaptığı çalışmada lityum-pilokarpinle uyarılmış SE'dan 4 saat önce uygulanan Epo'nun

TUNEL pozitif hücrelerin sayısını azalttığını, bilişsel yetilerde iyileşme sağladığını, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinde artış ve pro-apoptotik Bax proteinlerinde azalma yaptığı saptandı (15). Bu çalışmalar Epo'nun nöron koruyucu etkinliğini göstermekle beraber klinik kullanımda SE zamanı tahmin edilemeyeceği için akut tedavide uygulanabilirlik açısından yetersizdi ve erişkin dönemdeki sıçanlarda yapılmıştı. Pilokarpinden sonra bir saat içinde nöbet geçiren hayvanların 1-2 hafta içinde kronik nöbet geliştirdiği ve bu sürecin epileptogenezde önemli olduğu bilinmektedir (60). Bu nedenle çalışmamızda ilk 5 gün Epo verilerek SE sonrası Epo'nun bu süreç üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

TUNEL boyasıyla değerlendirdiğimiz apoptozu her bir gruptan birer örnek seçerek kaspaz-3 immun işaretleme yöntemiyle doğruladık. Kaspazlar proteinleri aspartat rezidülerinden ayıran sistein proteazlardır ve hücre içindeki hedefleri hücre iskeleti proteinleri, DNA tamir proteinleri ve endonükleaz inhibitörleridir. Hücre içindeki proteinlerin kaspaz aracılıklı olarak bölünmesiyle hücrede büzülme, kromatinde yoğunlaşma, DNA parçalanması ve plazma membranında kabarcıklar oluşur (61). Çalışmamızda kaspaz-3 ile işaretlenen hücrelerin oranı SE+SF grubunda hipokampusun CA1 ve dentat girus bölgelerinde sırasıyla %2.25 ve %2.5 iken, aynı bölgelerde SE+EPO grubunda sırasıyla %1.25 ve %1.75 bulundu. SE ile ilgili olarak Wen ve arkadaşlarının erişkin sıçanlarda yaptığı çalışmada pilokarpin uygulanmasından 4 saat önce 10U/kg Epo intraperitoneal verilmesinin kaspaz -3 aktivasyonunu inhibe ederek hipokampal hücrelerde apoptozu önlediği gösterilmiştir (103). Bu çalışma da erişkin dönemdeki sıçanlarda yapılmıştı ve Epo'nun nöbet öncesi verilmesi nedeniyle nöbetle oluşan akut hasara yönelik etkilerini değerlendirmek açısından yetersizdi

Daha çok deneysel çalışmalarla SSS etkileri gösterilmiş olan Epo'nun nöron koruyucu etkisinin yanında hematopoietik etkilerinden kaynaklanan hematokritte ve protrombotik aktivitelere artış yapması ve hasarlı dokuya perfüzyonu azaltması klinik kullanımını kısıtlayan yan etkileridir. Bazı kanser tiplerinin Epo reseptörü içerdiği ve Epo uygulanmasından sonra mitotik aktivite gösterdiği de bildirilmiştir. Bununla birlikte eritropoietik aktiviteden yoksun fakat nöron koruyucu etkisi olan asiolaEpo'nun inme, spinal kord basısı ve periferik sinir hasarında rhEpo kadar etkili olduğu gösterilmiştir (112).

Sonuç olarak, bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan SE sonrası uygulanan Epo'nun çocukluk çağındaki sıçanlarda nöron sayımında artış sağlayarak ve apopitozu azaltarak nöron koruyucu etkileri olduğunu gösterdik. Bu çalışmanın sonuçları, sadece nöron koruyucu etkisi olan, eritropoietik aktivite ve ilişkili yan etkilerinden yoksun moleküllerin geliştirilmesiyle Epo'nun çocukluk ağı SE tedavisinde kullanılabileceğini dşndrmştir. Çalışmamızın bu alanda yapılacak ileri araştırmalara temel teşkil edeceği görüşünde yiz.

6. SONUÇLAR

1. Lityum pilokarpin ile deneysel olarak status epileptikus modeli oluşturulan çocukluk yaş grubundaki sıçanlardaki nöron sayımları SE oluşturulmayan kontrol grubuna göre hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinde anlamlı olarak azalmış bulundu.
2. Lityum pilokarpin ile deneysel olarak status epileptikus modeli oluşturulan çocukluk yaş grubundaki sıçanlarda status epileptikus oluşturulmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TUNEL pozitif hücrelerin sayısının hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde anlamlı olarak arttığı görüldü.
3. Lityum pilokarpin ile deneysel olarak status epileptikus modeli oluşturulan çocukluk yaş grubundaki sıçanlarda status epileptikus oluşturulmayan kontrol grubuna göre hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde kaspaz pozitif hücrelerde artış saptandı.
4. Lityum pilokarpin ile deneysel olarak status epileptikus modeli oluşturulan ve Epo ile tedavi edilen grupta status epileptikus oluşturularak serum fizyolojik uygulanan gruba göre hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerindeki nöron sayımlarının anlamlı olarak arttığı görüldü.
5. Lityum pilokarpin ile deneysel olarak status epileptikus modeli oluşturulan ve Epo ile tedavi edilen grupta status epileptikus oluşturularak serum fizyolojik uygulanan gruba göre hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde TUNEL pozitif hücrelerin sayısında anlamlı olarak azalma bulundu.
6. Lityum pilokarpin ile deneysel olarak status epileptikus modeli oluşturulan ve Epo ile tedavi edilen grupta status epileptikus oluşturularak serum fizyolojik uygulanan gruba göre hipokampusun CA1 ve GD bölgelerinde kaspaz pozitif hücrelerin oranlarında azalma saptandı.

7. KAYNAKLAR

1. Camfield PR, Camfield SC. Pediatric Epilepsy: An Overview. In: Pediatric Neurology Principles and Practice. Eds. Swaiman K, Ashwal S, Ferriero DM. 4th ed. Philadelphia Elsevier Publications 2006; pp 981-989.
2. Camfield PR, Camfield SC. Neurophysiology of Epilepsy. In: Pediatric Neurology Principles and Practice. Eds. Swaiman K, Ashwal S, Ferriero DM. 4th ed. Philadelphia Elsevier Publications 2006; pp 991-1005.
3. Blume WT, Luders HO, Mizrahi E, et al. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia* 2001; 42:1212–1218.
4. Shinnar S, Pellock JM, Moshe SL, et al. In whom does status epilepticus occur: age-related differences in children. *Epilepsia* 1997;38: 907-914.
5. Brown TR, Holmes GL. Epilepsy. *N Eng J Med* 2001; 344:1145–1151.
6. Cha BH, Silveira DC, Liu X, et al. Effect of topiramate following recurrent and prolonged seizures during early development. *Epilepsy Res* 2002;51: 217–232.
7. Cilio MR, Sogawa Y, Cha BH, Liu X, et al. Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model. *Epilepsia* 2003; 44: 518–528.
8. Rutten A, van Albada M, Silveira DC, et al. Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects. *Eur J Neurosci* 2002;16: 501–513.
9. Nadam J, Navarro F, Sanchez P, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine induced status epilepticus. *Neurobiology of Diseases* 2007;25:412-426.
10. Sirén AL, Knerlich F, Poser W, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001;101:271-276.
11. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:26-32.
12. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505.
13. Campana WM, Misasi R, O'Brien JS. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med* 1998;1:235-241.
14. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, et al. Erythropoietin receptor- mediated inhibition of

exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem* 2001;276:39469-39475.

15. Yang J, Jiang Tao Xu, Yuan Gui H, et al. Erythropoietin pre-treatment prevents cognitive impairments following status epilepticus in rats. *Brain Research* 2009;1282:57-66.

16. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett* 2000;22: 179-182.

17. Yang J, Huang Y, Yu X, et al. Erythropoietin preconditioning suppresses neuronal death following status epilepticus in rats. *Acta Neurobiol Exp* 2007;67:141-148.

18. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005;46:470-472.

19. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* 1993;34:453-68.

20. Shinnar S, Berg AT, Moshe SL, et al. The risk of seizure recurrence after a first unprovoked afebrile seizure in childhood: an extended follow-up. *Pediatrics* 1996;98:216-225.

21. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000;342: 314-319.

22. Wallace RH, Wang DW, Singh R, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na channel $\beta 1$ subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998;19: 366-370.

23. Singh R, Gardner RJ, Crossland KM, et al. Chromosomal abnormalities and epilepsy: a review for clinicians and gene hunters. *Epilepsia* 2002;43:127-40.

24. Augustijn PB, Parra J, Wouters CH, et al. Ring chromosome 20 epilepsy syndrome in children: electroclinical features. *Neurology* 2001;57:1108-1111.

25. Tassi L, Colombo N, Garbelli R, et al. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain* 2002;125:1719-1732.

26. Guerrini R, Carrozzo R. Epileptogenic brain malformations: clinical presentation, malformative patterns and indications for genetic testing. *Seizure* 2001;10: 532-47.

27. Guerrini R, Sicca F, Parmeggiani L. Epilepsy and malformations of the cerebral cortex. *Epileptic Disord* 2003;5(suppl 2):9-26.

28. Webb DW, Fryer AE, Osborne JP. On the incidence of fits and mental retardation in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1991;28:395-397.

29. Erba G, Cavazzuti V. Sturge-Weber syndrome: Natural history and indications for surgery. *J Epilepsy* 1990;3(suppl):287–91.
30. Gururaj AK, Sztriha L, Bener A, et al. Epilepsy in children with cerebral palsy. *Seizure* 2003;12:110-114.
31. de Lanerolle NC, Brines M, Williamson A, et al. Neurotransmitters and their receptors in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl* 1992;7:235–250.
32. Commission on tropical disease of the International League Against Epilepsy. Epilepsy in the tropics I. Epidemiology, socioeconomic risk factors and etiology. *Epilepsia* 1996;37:1128–1137.
33. Annegers JF, Grabow JD, Groover RV, et al. Seizures after head trauma: a population study. *Neurology* 1980;30:683–89.
34. ILAE classification of epilepsies: its applicability and practical value of different diagnostic categories. Osservatorio Regionale per L'Epilessia (OREp), Lombardy. *Epilepsia* 1996;37(11):1051-1059.
35. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1985; 26: 268-278.
36. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989;30:389-399.
37. Mizrahi EM. Electroencephalographic/polygraphic/video monitoring in childhood epilepsy. *J Pediatr* 1984;105:1-9.
38. Steinhoff B J, Hirsch E, Mutani R. The ideal characteristics of antiepileptic therapy: an overview of old and new AEDs. *Acta Neurol Scand* 2003;107:87-95.
39. Guerrini R. Epilepsy in children. *Lancet* 2006;367:499-524.
40. Blume WT, Luders HO, Mizrahi E, et al. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia* 2001; 42:1212–1218.
41. Sillanpaa M, Shinnar S. Status epilepticus in a population-based cohort with childhood-onset epilepsy in Finland. *Ann Neurol* 2002;52:303–310.
42. DeLorenzo RJ, Hauser WA, Towne AR, et al. A prospective, population based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology* 1996;46:1029–1035.

43. Coeytaux A, Jallon P, Galobardes B, Morabia A. Incidence of status epilepticus in French speaking Switzerland: (EPISTAR). *Neurology* 2000;55:693–697.
44. Hesdorffer DC, Logroscino G, Cascino G, et al. Incidence of status epilepticus in Rochester, Minnesota, 1965-1984. *Neurology* 1998;50:735–741.
45. Treiman DM. Electroclinical features of status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* 1995;12: 343–362.
46. Morton LD, Pellock JM. Status epilepticus. In: *Pediatric Neurology Principles and Practice*. Eds. Swaiman K, Ashwal S, Ferriero DM. 4th ed. Philadelphia Elsevier Publications 2006; pp 1091-1104.
47. Sofou K, Kristjansdottir R, Papachatzakis NE, et al. Management of prolonged seizures and status epilepticus in childhood: A systematic review. *J Child Neurology* 2009;24:918-926.
48. Gilbert DL, Gartside PS, Glauser TA. Efficacy and mortality in treatment of refractory generalized convulsive status epilepticus in children: a meta-analysis. *J Child Neurol* 1999; 14:602–609.
49. Hauser WA, Anderson VE, Loewenson RB, et al. Seizure recurrence after a first unprovoked seizure. *N Engl J Med* 1982;307:522–528.
50. Sahin M, Menache C, Holmes GL, et al. Outcome of severe refractory status epilepticus in children. *Epilepsia* 2001;42:1461–1467.
51. Walker M.C. Basic physiology of limbic status epilepticus. *Epilepsia* 2009;50(Suppl. 12):5–6.
52. Brooks-Kayal AR. Rearranging receptors. *Epilepsia* 2005;46(Suppl.7):29-38.
53. Wasterlain CG, Mazarati AM, Naylor D, et al. Short-term plasticity of hippocampal neuropeptides and neuronal circuitry in experimental status epilepticus. *Epilepsia* 2002;43(suppl 5):20–29.
54. Shah MM, Anderson AE, Leung V, et al. Seizure induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron* 2004;44:495–508
55. Curia G, Longo D, Biagini G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 2008;172:143–157.
56. Chu K, Jung KH, Lee ST, et al. Erythropoietin reduces epileptogenic processes following status epilepticus. *Epilepsia* 2008;49(10):1723-1732.
57. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 2003;283:1–16.
58. Henshall DC. Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and

- epilepsy. *Biochemical Society Transactions* 2007;35:421-423.
59. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 1992; 119:493–501.
60. Naegele JR. Neuroprotective strategies to avert seizure induced neurodegeneration in epilepsy. *Epilepsia* 2007; (Suppl. 2):107–117.
61. Henshall DC, Murphy BM. Modulators of neuronal cell death in epilepsy. *Curr Opin Pharmacol* 2007;8:1–7.
62. Acharya MM, Bharatti H, Shetty AK. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. *Progress in Neurobiology* 2008;84:363–404.
63. Treiman DM. Generalized convulsive status epilepticus in the adults. *Epilepsia* 1993 1993;34(suppl.1): 2-11.
64. Lowenstein DH, Aminoff MJ. Clinical and EEG feature of status epilepticus in the comatose patients. *Neurology* 1992;42:100-104.
65. Bassin S, Smith TL, Bleck TP. Clinical review: status epilepticus. *Crit Care* 2002;6:137-142.
66. Haspolat Ş. Status Epileptikus. In: Çocuk Nörolojisi. Eds. Çocuk Nörolojisi Derneği. 2. Baskı. Ankara 2010; pp 327-332.
67. Kalinin VV. Suicidality and antiepileptic drugs: is there a link? *Drug Saf* 2007;30:123–142.
68. Schmitz B. Effects of antiepileptic drugs on mood and behavior. *Epilepsia* 2006;47 (Suppl 2): 28–33.
69. Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 2001;63:125–149.
70. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The “French Paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Rad Biol Med* 2002;32:314–318.
71. Hoffman GE, Merchenthaler I, Zup SL. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine* 2006;29:217–231.
72. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 2002; 129:505–516.
73. Siren AL, Ehrenreich H. Erythropoietin: a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001; 251:179–184.

74. Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem* 1987; 262:17156–17163.
75. Genc S, Koroğlu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Research* 2004 ;1000: 19– 31.
76. Catania MA, Marciano MC, Parisi A. Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* 2002;437:147– 150.
77. Grasso G, Buemi M, Alafaci C, et al. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad* 2002;99:5627–5631.
78. Agnello D, Bigini P, Villa P, et al. Erythropoietin exerts anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2002;952:128– 134.
79. Iwasaki Y, Ikeda K, Ichikawa Y, et al. Protective effect of interleukin-3 and erythropoietin on motor neuron death after neonatal axotomy. *Neurol Res* 2008; 24: 643-646.
80. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia- reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99: 10659– 10664.
81. Rabie T, Marti HH. Brain Protection by Erythropoietin: A Manifold Task *Physiology* 2008;23: 263-274.
82. Glien M, Brandt C, Potschka H, et al. Repeated low- dose treatment of rats with pilocarpin: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Research* 2001;46: 111-119.
83. Suchomelovo L, Baldwin RA, Kubova H. Treatment of experimental status epilepticus in immature rats. *Pediatric Research* 2006;59: 237-242.
84. Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972;32: 281–294.
85. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 1986.
86. Kumral A, Yesilirmak DC, Sonmez U. Neuroprotective effect of the peptides ADNF and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 2006;1115(1):169-178.
87. Hesdorffer DC, Logroscino G, Cascino G, et al. Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Ann Neurol* 1998;44:908-912.
88. Raspall-Chaure M, Chin RF, Neville BG, et al. Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006; 5:769–779.
89. Eriksson KJ, Koivikko MJ. Status epilepticus in children: aetiology, treatment, and

outcome. *Dev Med Child Neurol* 1997;39: 652–658.

90.Sperk G, Lassmann H, Baran H, et al. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* 1983;10:1301–1315.

91.Du F, Williamson J, Bertram E, et al. Kynurenine pathway enzymes in a rat model of chronic epilepsy: immunohistochemical study of activated glial cells. *Neuroscience* 1993;55:975–989.

92.Fujikawa DG, Itabashi HH, Wu A, et al. Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy. *Epilepsia* 2000;41:981–991.

93.Acharya MM, Katyare SS. Structural and functional alterations in mitochondrial membrane in picrotoxin-induced epileptic rat brain. *Exp Neurol* 2005;192: 79–88.

94.Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, et al. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 1990;10:267–282.

95. Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 1995;118:105–118.

96.Clark S, Wilson WA. Mechanisms of epileptogenesis. *Advances in Neurology* 1999;79: 607–630.

97. Narkilahti S, Nissinen J, Pitkanen A. Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacology* 2003;44:1068–1088.

98. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25:577–583.

99.Rao MS, Hattiangady B, Reddy DS, et al. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci Res* 2006;83:1088– 1105.

100.Dube C, Boyet S, Marescaux C, et al. Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Experimental Neurology* 2001;167:227–241.

101.Sankar R, Shin DH, Liu H, et al. Patterns of status epilepticus induced neuronal injury during development and long term consequences. *J Neurosci* 1998;18(20):8382-8393.

102.Araki T, Simon RP, Taki W, et al. Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. *J. Neurosci Res* 2002; 69: 614–621.

103.Wen X, Hyang Y, Wang J. Erythropoietin preconditioning on hippocampus neuronal

apoptosis following status epilepticus induced by Li-pilocarpine in rats anti-caspase-3 expression. *Neurology India* 2006;54:58-63.

104. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:643–651.

105. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10526–10531.

106. Yiş U, Kurul SH, Kumral A, et al. Effect of erythropoietin on oxygen induced brain injury in the newborn rat. *Neuroscience Letters* 2008;448:245–249.

107. Lieberman JA. Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 729–739.

108. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, et al. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 206–220.

109. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 9450–9455.

110. Kumral A, Uysal N, Tugyan K. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Beh Brain Res* 2004;153:77-86.

111. Corbett D, Larsen J, Langdon KD. Diazepam delays the death of hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *Exp Neurol* 2008;214: 309-314.

112. Grasso G, Sfacteria A, Cerami A, et al. Erythropoietin as a Tissue-Protective Cytokine in Brain Injury: What Do We Know and Where Do We Go? *Neuroscientist* 2004;10(2):93-98.