

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TEMPORAL LOB EPİLEPSİ PATOGENEZİNDE
ENFLAMASYONLA İLGİLİ GENLERİN
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

ÖZKAN ÖZDEMİR

**DANIŞMAN
PROF. DR. UĞUR ÖZBEK**

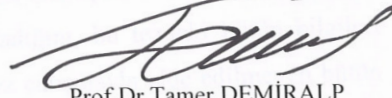
**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

20 / 07 / 2010



Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Müdür

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : İmmünoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : İmmünoloji
Tez Sahibi : Özkan Özdemir
Tez Başlığı : TEMPORAL LOB EPİLEPSİ PATOGENEZİNDE ENFLAMASYONLA İLGİLİ GENLERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI
Sınav Yeri : İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)
Sınav Tarihi : 16 / 07 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

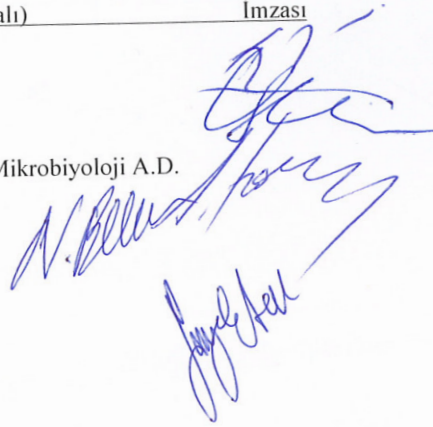
1. Prof. Dr. Günnur Deniz İ.Ü. DETAE İmmünoloji A.D.

2. Prof. Dr. Uğur Özbek İ.Ü. DETAE Genetik A.D.

3. Prof. Dr. Selim Badur İ.Ü. İ.T.F. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.

4. Doç. Dr. Nerses Bebek İ.Ü. İ.T.F. Nöroloji A.D.

5. Doç. Dr. Gaye Erten İ.Ü. DETAE İmmünoloji A.D.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Ozkan Ozdemir

İTHAF

“Tüm sevdiklerime”

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemimde her türlü bilgisini, deneyimini ve desteğini benimle paylaşan, yakınlığını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Uğur Özbek' e,

Bu çalışmanın oluşturulmasında ve başından sonuna kadar her aşamasında en az benim kadar emeği olan, bilgisi ve sabrıyla beni hep destekleyen Sayın Doç. Dr. Nerses Bebek' e,

Bu tezi yapmama olanak tanıdığı, bilgi ve deneyimini esirgemediği için Sayın Prof. Dr. Günnur Deniz'e,

Bütün yüksek lisans dönemim boyunca beni hep destekleyen Sayın Prof Dr. Betül Baykan'a,

Çalışmanın her aşamasında özellikle moleküler genetik konusunda bana bilgi, yardım ve tecrübeleriyle destek olmuş, her sorumda ve sorunumda bana detaylı bilgiler vermiş olan Sayın Dr. Müge Aydın Sayitoğlu, Yrd. Doç Dr. Naci Çine ve Uzm. Bio. Özden Hatırnaz' a,

Hastaların uzun yıllar takibi, cerrahiye hazırlanışını sağlayan Sayın Prof. Dr. Ayşen Gökyiğit, Doç. Dr. Candan Gürses' e,

Hastaların cerrahi tedavilerini üstlenen ve dokuların toplanmasını sağlayan Prof. Dr. Ali Canbolat, Prof. Dr. Murat İmer, Dr. Aykut Karasu ve Dr. Altay Sencer başta olmak üzere tüm İ.T.F. Nöroşirurji A.D. öğretim üyelerine,

Kontrol otopsi olgularının toplanmasına destek veren Uzm. Dr. İbrahim İzin ve Dr. Sinem Akat'a,

Hocalığı ve sıcak kişiliğiyle her zaman desteğini gördüğüm Sayın Doç. Dr. Burçak Vural'a,

Lisans ve yüksek lisans döneminde beni her zaman toparlayan değerli arkadaşım Bio. Sinem Özdemirli ve eğlenceli kişiliğiyle hep yanımda yer almış Tbb. Bio. Emrah Yücesan'a,

Yüksek lisans dönemim boyunca çalışmalarımda hep destek olmuş değerli arkadaşım Uzm. Tbb. Bio. Yücel Erbilgin'e

Bu çalışmanın son dönemlerinde aramıza katılmış olan, gerek bilimsel gerek sosyal desteklerini hep yanımda gördüğüm Dr. Sibel Uğur ve Uzm Bio. Feyza Nur Tuncer'e ve İ.Ü. DETAE' deki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her istediğimde ne olursa olsun yardıma koşan Ceren Özdemir ve Tuğçe İnam'a,

Maddi ve manevi ellerindeki bütün imkanları tüm hayatım boyunca bana sunmuş olan annem Serap Özdemir ve babam Mustafa Özdemir'e,

Teşekkür Ederim...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4620

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Epilepsiler	2
2.1.1. Giriş.....	2
2.1.2. Epilepsilerin insidans ve prevalansı	2
2.1.3. Epilepsilerin Sınıflandırılması	3
2.1.3.1. Epilepsi nöbetlerinin klinik ve elektroensefalografik sınıflandırması, (ILAE 1981) [13].....	5
2.1.4. Epilepsi Sendromlarının Belirlenmesi	6
2.1.4.1. Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması (ILAE, 1989) [14].....	6
2.2. Mezyl Temporal Lob Epilepsisi (MTLE)	8
2.3. Epileptogenez	13
2.4. Merkezi Sinir Sisteminde (MSS) Doğal ve Edinsel İmmünite	15
2.4.1. Merkezi Sinir Sisteminde Proenflamatuvar Sinyaller	15
2.4.2. Enflamasyonda Kan-Beyin Bariyerinin Rolü.....	16
2.5. Sitokinler ve İmmün Sistem	18
2.5.1. Sitokinler ve Merkezi Sinir Sistemi	21
2.5.2. Sitokinler ve Nörotransmitterler	23
2.5.3. Temporal Lob Epilepsisinde Sitokinler.....	24
2.6. İncelenen Genlerin Özellikleri	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Kullanılan Materyal	27
3.1.1. Hastalar.....	27

3.1.2. Sağlıklı Kontrol Dokuları	27
3.1.3. Kimyasallar	28
3.1.4. cDNA sentez materyali	29
3.1.5. Kullanılan tampon ve çözeltiler	29
Etidyum Bromür	29
3.1.6. Kullanılan cihazlar	30
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Klinik yöntem	30
3.2.2. Cerrahi yöntem	31
3.2.3. Örneklerin toplanması	31
3.2.4. Moleküler genetik yöntem	31
3.2.4.1. Dokuların homojenizasyonu	31
3.2.4.2. Fikol ile periferik kandan mononükleer hücrelerin izolasyonu	32
3.2.4.3. RNA izolasyonu	33
3.2.4.4. RNA kalite tayini	33
3.2.4.5. cDNA sentezi	33
3.2.4.6. Pozitif kontrollerin hazırlanması	34
3.2.4.7. Referans genlerin belirlenmesi	35
3.2.4.8. Gerçek zamanlı kantitatif floresan PZR ile gen ekspresyonu analizi	35
3.2.4.9. Genlerin belirlenmesi	36
3.2.4.10. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	36
3.2.5. İstatistiksel analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. Klinik Bulgular	42
4.1.1. Hastaların Genel Özellikleri	42
4.1.1.1. Özgeçmiş Özellikleri	42
4.1.1.2. Soygeçmiş Özellikleri	43
4.1.1.3. Nöbet Özellikleri:	43
4.1.1.4. Tedavi	44
4.1.1.5. Lezyon durumu	44
4.1.1.6. Cerrahi Tedavi	44
4.1.1.7. Cerrahi Sonrası Takip	45
4.1.1.8. Kontrol Otopsi Olguları	45
4.2. Genetik İnceleme Bulguları	46
4.2.1. Referans Genler	46

4.2.2. Sitokinlerin mRNA Ekspresyonunun Kantifikasyonu	47
4.2.3. Sitokinlerin mRNA ekspresyonlarının hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırılması.....	52
5. TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR	62
FORMLAR	69
ETİK KURUL KARARI	73
ÖZGEÇMİŞ	74

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Hastaların cerrahi öncesi değerlendirilmesi.....	11
Tablo 2-2 Cerrahi tedavinin komplikasyonları [23].....	12
Tablo 2-3 Cerrahi tedavinin kontrendikasyonları [23].....	12
Tablo 2-4 Kan-beyin bariyeri yıkımına neden olan durumlar [51-52].....	18
Tablo 2-5 Doğal Bağışıklığın Sitokinleri [29].....	20
Tablo 2-6 Beyinde ekspresyonu bilinen sitokinler ve reseptörleri ([58]’ den uyarlanmıştır).....	22
Tablo 2-7 İncelenen genlerin özellikleri.....	25
Tablo 3-1 Hastaların Çalışmaya alınma kriterleri.....	28
Tablo 3-2 Kontrol otopsi olgularının çalışmaya alınma kriterleri	28
Tablo 3-3 cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon çözeltisi	34
Tablo 3-4: Genetik incelemesi yapılan genlerin listesi	36
Tablo 3-5: Kullanılan primerlerin nükleotid dizileri, boyları ve ürün boyları.....	37
Tablo 4-1: Hasta ve Kontrol olgularının genel özellikleri.....	42
Tablo 4-2: Hastaların klinik, prognoz, ve uygulanan cerrahi tedavi özellikleri	44
Tablo 4-3: Otopsi olgularının klinik özellikleri ve ölüm nedenleri	46
Tablo 4-4: Otopsi olgularının <i>ABL</i> ve <i>Siklofilin</i> genlerine göre rölatif mRNA ekspresyonu değerleri.....	47
Tablo 4-5: Hipokampal skleroz olgularında <i>ABL</i> ve <i>Siklofilin</i> genlerine göre rölatif mRNA ekspresyon değerleri.....	48
Tablo 4-6: Ekspresyon değerleri normal dağılımdan farklı olan olguların özellikleri....	52
Tablo 4-7 : Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarının istatistiki değerleri ve Mann-Whitney U testi sonuçları	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Rochester, Minnesota’ daki epilepsi vakalarının insidans, prevalans ve kümülatif insidans değerleri [11].	3
Şekil 2-2 : Mezyal temporal skleroz MRG [16] (Bu şekil St. Joseph’s Hospital and Medical Center’ in internet sitesinden alınmıştır)....	9
Şekil 2-3 Epileptogenez gelişim şeması.....	13
Şekil 2-4 Merkezi Sinir Sisteminde Sitokinler ve Nörotransmitterler ([58]’ den adapte edilmiştir).....	23
Şekil 3-1 Fikol yöntemi kullanılarak tam kandan mononükleer hücre izolasyonu.....	32
Şekil 3-2: Primerler ve amplifikasyon bölgelerinin şematik görünümü	40
Şekil 3-3: IL1- β için PZR amplifikasyon eğrilerini gösteren Light Cyler 480 yazılımı görüntüsü.	40
Şekil 3-4: IL1- β ile çalışan PZR için Light Cyler 480 yazılımında “Melting Curve” analizi görüntüsü.	41
Şekil 4-1: İncelenen referans genlerin mRNA ekspresyon değerleri	47
Şekil 4-3: Hipokampal skleroz ve kontrol olgularının gen ekspresyonları dağılım grafikleri (Standart sapmadan yüksek olan değerler (*) ile ifade edilmiştir)	51
Şekil 4-4: İstatistiki olarak anlamlı çıkan genler; <i>IL1-β</i> , <i>TNF-α</i> , <i>IFN-γ</i> ve <i>TGF-β</i> için dağılım grafikleri.....	54
Şekil 4-5: İstatistiki olarak anlamlı bulunmayan genler; <i>IL6</i> , <i>IL10</i> ve <i>IL12</i> genleri için dağılım grafikleri.....	54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propionik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

EEG: Elektroensefalografi

FN: Febril Nöbet

GABA: Gama-aminobüritik asit

HS: Hipokampal skleroz

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

İJE: İdyopatik Jeneralize Epilepsi

KBB: Kan-beyin bariyeri

KBZ: Karbamazepin

KPN: Kompleks Parsiyel Nöbet

LEV: Levetirasetam

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

mRNA: Messenger ribonükleik asit

MSS: Merkezi sinir sistemi

MTLE: Mezyl Temporal Lob Epilepsisi

MTS: Mezyl Temporal skleroz

NMDA: N-metil-D-aspartik asit

NO: Nitrik oksit

OD: Optik Dansite

RT-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SAH: Selektif amigdalohipokampektomi

SE: Status Epileptikus

TGF: Transforming growth factor

TLE: Temporal lob Epilepsisi

TNF: Tümör nekroz faktör

ÖZET

Özdemir, Ö. (2010). Temporal Lob Patogenezinde Ekspresyonla İlgili Genlerin Ekspresyonlarının Araştırılması İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Temporal lob epilepsisinde, hipokampusta mevcut değişikliklerin kompleksliği olayın patogenezinde birçok gen ve sinyal yolağının rol aldığını düşündürmektedir. Bu patogeneizde yer alan enflamasyon süreci, hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Enflamasyon, damarlı dokularda lökositlerin ve plazma proteinlerinin enfeksiyon, toksin veya doku yaralanma bölgesine göçü ve aktivasyonunu içeren bir doğal immün sistem reaksiyonudur. Sitokinler ise enflamasyon sırasında hücreler arası haberleşmeyi sağlayan proteinlerdir ve doğal-adaptif immün yanıtın koordinasyonunu sağlama açısından önemlidir. Bu çalışmada, uygun süre ve kombinasyonlarda uygulanan antiepileptik tedaviye dirençli, mezyal temporal lob epilepsi tanısı konmuş, 20-63 yaşları arasındaki toplam 4 kadın ve 5 erkek hastanın tıbbi endikasyon sonucu amigadalohipokampektomi sonrası elde edilen doku materyalleri kullanılmıştır. Dokulardan elde edilen RNA örneklerinden ters transkriptaz PZR yöntemi ile cDNA sentezlendikten sonra enflamasyon sürecinde yer alan genlerin ekspresyonları gerçek-zamanlı PZR yöntemi ile kantitatif olarak incelendi. Kontrol dokusu olarak epilepsi dışı nedenlerle ölümü gerçekleşmiş 9 kadavradan otopsi sırasında alınan hipokampus materyali kullanıldı. Sonuçların normalizasyonunda genorm analizi sonucunda belirlenen *abl* ve *siklofilin* genleri kontrol geni olarak seçildi. Rölatif ekspresyon değerleri delta delta CT yöntemi ile hesaplandı. Sonuçlar “Mann-Whitney U testi” kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Yapılan analizde, hasta bireylerin dokularındaki IL12, IL10, IL6 ekspresyon düzeylerinin sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken (sırasıyla; $P=0.73$, $P=0.59$, $P=0.24$) hastalardaki IL1- β , TNF- α , IFN- γ ve TGF- β ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre anlamlı bir artış gösterdiği saptandı ($P=0.001$, $P=0.0006$, $P=0.007$, $P=0.027$). Bunun yanında IL1- α , IL2 ve IL17’ nin ekspresyonuna hasta ve sağlıklılarda rastlanmamıştır. Bu çalışmada ortaya çıkan sonuçlar hipokampal sklerozlu MTLE hastalarında lokal bir immün atak olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Hipokampal skleroz, Epilepsi, Temporal Lob, Enflamasyon, Sitokinler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4620

ABSTRACT

Ozdemir, O (2010). Investigating the Expression of Inflammation Related Genes in Temporal Lobe Epilepsy Pathogenesis. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. Master Thesis. İstanbul.

In temporal lobe epilepsy it is thought that various genes and signalling pathways take place due to presence of complex changes in hippocampus during the pathogenesis of disease. The inflammation period in this pathogenesis has been exhibited by the studies of animal models. In this study, we used hippocampus materials which are obtained from post amygdalohippocampectomy period after medical indication of 4 women and 5 men patients who are diagnosed with mesial temporal lobe epilepsy and resistant to antiepileptic treatment applied in convenient time and combinations. RNA samples, isolated from these tissues were used for the synthesis of cDNAs by reverse transcriptase PCR method, in order to quantify the inflammation-related gene expressions by real-time PCR. As control tissue, hippocampus material were taken during autopsy from 9 different cadaver of which the reason of death excluding neurological reasons. In the normalization of results, *abl* and *cyclophilin* genes were used. Relative expression values were calculated with deltaCt method. Results were compared statistically by using "Mann-whitneyU" test.

In the analysis of the expression levels of IL12, IL10, IL6, it has been depicted that these genes do not show any significant differences in the materials of epileptic versus autopsy tissues ($P=0.73$, $P=0.59$, $P=0.24$). On the other hand, it is determined that the expression of IL1-beta, TNF-alfa, IFN-gama and TGF-beta in patients indicate significant increase according to healthy controls ($P=0.001$, $P=0.0006$, $P=0.007$, $P=0.027$). In addition to these, there was no expression of IL1-alfa, IL2 and IL17 detected neither in patients or in healthy individuals.

Results in this study show that an increased level of inflammation-related gene expression participates in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy.

Key Words: Hippocampal sclerosis, epilepsy, temporal lobe, inflammation, cytokine

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 4620

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, toplumda % 1 sıklıkla görülen, kronik nörolojik bir hastalıktır. Epilepsi hastalarının % 40' ının tedaviye direnç göstermesi bunun toplumsal bir sağlık sorunu olduğunu göstermektedir. Epilepsinin bir çok farklı etiyolojisi olmakla birlikte, altta yatan bir beyin hasarına bağlı olarak gelişen semptomatik parsiyel epilepsilerde ilaca direnç oldukça artmaktadır. Beynin belirli bir bölgesinden gelen uyarılara bağlı olarak tetiklenen epilepsilerin % 60-70 kadarı temporal lob kaynaklıdır ve bu tür epilepsilerde en sık rastlanan patoloji hipokampal sklerozdur (mezyal temporal skleroz, MTS). İlaçla tedaviye en sık direnç gösteren sendrom olan MTS cerrahi tedavi ile % 70 oranında tedavi edilebilmektedir.

MTS etiopatogenezi, yapılan birçok araştırmaya rağmen henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Epileptogenez sürecine bağlı olarak meydana gelen bir başlangıç hasarının bu sendromun başlamasında önemli bir etken olduğu düşünülmektedir. Epileptogenezde bir başlangıç hasarını takiben bir nöbetsiz (sessiz) dönem ve sonrasında remisyonu takiben gelişen spontan, tekrarlayıcı nöbetler meydana gelir. Cerrahi tedaviyle çıkarılan hipokampus dokusu üzerinde yapılan araştırmalar bu konuda bir çok bilinmeyenin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Epileptogenez sürecinde, hipokampusta meydana gelen aksonlardaki filizlenmeler, sinaptik reorganizasyonlar ve hücre ölümü, yaş, cins ve genetik faktörlerin etkisindedir.

Temporal lob epileptogenezi ile ilgili araştırmalar bu süreçte ortaya çıkış ve nöbet gelişimi açısından farklı mekanizmaların yer aldığını göstermektedir. Bu mekanizmaların temporal lob epilepsisini ortaya çıkaran histopatolojik bulgu olan hipokampal skleroz gelişiminde de etkili olduğu düşünülmektedir. Ancak özellikle enflamatuvar süreçlerin hangilerinin hipokampal skleroz gelişiminde yer aldığı açıklığa kavuşturulmamıştır. Günümüzde epilepsi tedavisi yalnızca nöbetlerin önlenmesi (antiepileptik tedavi) ile sınırlıdır. Epileptogenez mekanizması ile ilgili bilinmeyenlerin açığa çıkarılması antiepileptojenik ajanların geliştirilmesi ve epileptogenez sürecinin engellenmesi açısından önemlidir. Bu çalışma ile temporal lob epileptogenezi açısından önemli olduğunu düşündüğümüz enflamasyon sürecinde yer alan genlerin ekspresyonlarının hasta ve sağlıklı dokularda rölatif olarak karşılaştırılması ile yeni verilere ulaşılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsiler

2.1.1. Giriş

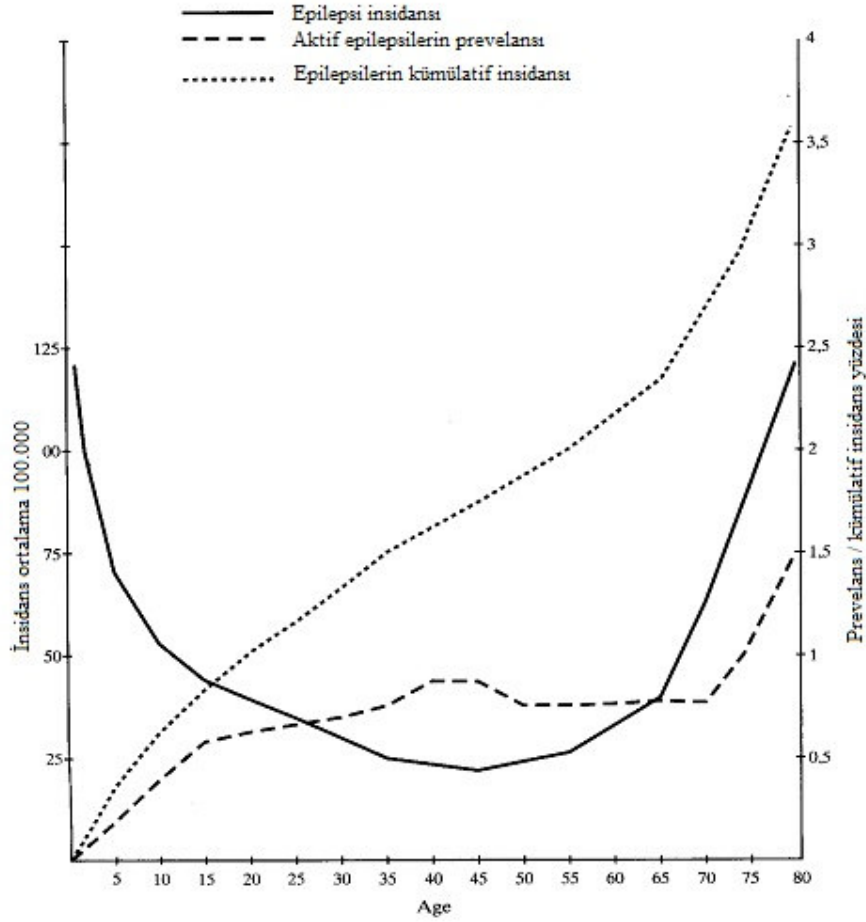
Epilepsi, artmış nöronal uyarılabilirlik sonucu gelişen, tekrarlayan nöbetlerle karakterize olan ve beyin fonksiyonlarının geçici olarak etkilendiği nörolojik bir durumdur [1].

1900' lü yılların başından itibaren tıp alanındaki gelişmeler doğrultusunda yapılan çalışmalarda epilepsi hastalığının kalıtsal temelleri ortaya konmuş, teknolojiye ilerlemeler doğrultusunda gelişen beyin görüntüleme teknikleri, elektrofizyolojik incelemeler ve uygulanan cerrahi tedaviler ile hastalığın etiyopatogenezi ile ilgili bilgiler birikmeye başlamıştır [2]. Üretilen epileptik hayvan modelleri [2], ikiz çalışmaları [3], insan genomunun aydınlatılmasına yönelik çalışmalar [4] teknolojinin gelişmesine paralel olarak, artan bir hızla hastalığın gelişim mekanizmalarını açıklamaya yönelik bilgi birikimine katkıda bulunmaktadır. Öncelikle Mendel tipi kalıtım gösteren hastalıklar incelenmeye başlanmış ve bu hastalıklara sebep olan gen mutasyonları belirlenmiştir. Bazı idiyopatik jeneralize epilepsiler, Unverricht-Lundborg tipi progresif miyoklonus epilepsisi bu gelişmelere örnek olarak verilebilir[5-6].

2.1.2. Epilepsilerin insidans ve prevalansı

Epilepsilerin genel olarak toplumdaki insidansı %0,5-3 arasında değişmektedir[7]. Fakat bazı nöbet tiplerinde etnik köken önem taşıyabilmektedir. Örneğin Japonya' da febril nöbet insidansı %5 gibi bir oranla diğer toplumlara göre oldukça yüksektir [8].

Dünya' da 50 milyon kadar epilepsili birey olduğu tahmin edilmektedir[9]. Amerika Birleşik Devletleri' nde Febril nöbet ve diğer hastalıklarla birlikte görülen nöbetler hariç 3 milyon epilepsi hastası bulunmaktadır ve her yıl 120.000' i 18 yaşın altında olmak üzere 300.000 insan ilk nöbetini geçirmektedir[10]. Epilepsi nöbetlerinin 2/3' ü çocukluk çağında başlamakta, insidans 60 yaşından sonra tekrar artmaktadır (Şekil 2.1.)[1].



Şekil 2-1: Rochester, Minnesota’ daki epilepsi vakalarının insidans, prevalans ve kümülatif insidans değerleri [11].

Ülkemizde yapılan epilepsi epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar belirgin bir farklılık göstermemektedir. İstanbul’ da yapılan kesitsel ve olgu kontrollü bir çalışmada basit rastlantısal örnekleme yöntemi ile seçilen evler tek tek gezilerek, anket yöntemi ile bireylerden %2.65’ inin epilepsi açısından şüpheli olduğu saptanmıştır. Nöroloji uzmanı tarafından öykü alınarak, muayene ve EEG’ den yararlanılarak epilepsi tanısı alanlar belirlenmiştir. Olguların % 41,2’ si parsiyel, %47’ si jeneralize, %11,8’ i parsiyel ya da jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsilerdir[12].

2.1.3. Epilepsilerin Sınıflandırılması

Epilepsi beynin normal işlevlerini yerine getirmede rol oynayan beyin hücreleri ve beyin çeşitli kısımları arasında iletişimi sağlamakla yükümlü elektriksel aktivitenin bozulması ve karakteristik tekrarlayan nöbetlerle ortaya çıkar [13].

Epilepsiler köken aldığı nedenlere göre 4 ana başlıkta gruplandırılır:

1. **İdyopatik epilepsiler:** Beyinde hücreler arası elektriksel faaliyetin bozulmasına yol açabilecek herhangi bir neden (tümör, gliosis, damar tıkanması, kanama, post-travmatik doku kaybı, gelişim anormallikleri, vs.) olmaksızın, doğrudan kişideki genetik yatkınlık sonucu ortaya çıkan epilepsilerdir.
2. **Semptomatik epilepsiler:** Geçirilmiş, geçirilmekte olan ya da gelişmekte olan bir beyin hastalığının verdiği hasar sonucu ortaya çıkan diğer bir değişik bir lezyona bağlı gelişen epilepsilerdir. Antiepileptik tedaviye cevap değişkendir ve spontan sonlanma olasılığı düşüktür. Benzer lezyona sahip her insan epilepsi nöbeti geçirmediği için genetik yatkınlığın rol oynadığı düşünülmektedir.
3. **Kriptojenik epilepsiler:** Tüm araştırmalara ramen sebebi tespit edilemeyen ya da sebebi bilinmeyen ancak semptomatik epilepsi özellikleri gösteren epilepsilerdir.
4. **Sistemik metabolik ya da toksik nedenli epilepsi nöbetleri:** Vücut metabolizmasını değiştiren bazı hastalıklar veya bazı ilaç ve maddelerin kullanımı sırasında beyin dolaylı olarak etkilenmesi sonucunda ortaya çıkan epilepsi nöbetleridir. Buna kandaki şeker seviyesinin aşırı yüksek veya aşırı düşük olması veya böbrek yetmezliği gibi durumlar örnek olarak verilebilir. Bu grup kronik epilepsi hastalığı olarak ele alınmaz. Nöbetlere neden olan sistemik durumların ortadan kaldırılması ile epilepsi nöbetlerinin önlenmesi sağlanır.

Epilepsiler ayrıca, nöbetlerin beyinde kaynaklandığı yere göre parsiyel (fokal) ve jeneralize olarak sınıflandırılırlar. Parsiyel epilepsiler beyin belirli bir lobundan kaynaklanırlar. Elektriksel deşarjın bölgesine göre değişen klinik özellikler gösterirler. Bu semptom ve belirtiler frontal, temporal, parietal veya oksipital lob kaynaklı olabilirler. Jeneralize epilepsiler ise beyin tüm bölgelerinin nöbet aktivitesine katıldığı durumlardır. Her iki nöbet tipi de idyopatik ya da semptomatik kökenli olabilir. Epilepsi sınıflamaları bu önemli ayrımlara dayanarak yapılmaktadır [14].

2.1.3.1. Epilepsi nöbetlerinin klinik ve elektroensefalografik sınıflandırması, (ILAE 1981) [13]

I- Parsiyel (fokal) nöbetler

A. Basit parsiyel nöbetler (bilinç durumu bozulmaksızın)

- 1- Motor semptomlu (hareketlerle ilişkili bulgular söz konusudur)
- 2- Somatosensoryel veya özel duysal semptomlu
- 3- Otonomik semptomlu
- 4- Psişik semptomlu

B. Kompleks parsiyel nöbetler (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 bozulması
 - a) Sadece bilinç bozukluğu ile giden
 - b) Otomatizmlerle giden

C. Sekonder jeneralize nöbete dönüşen parsiyel nöbetler

- 1- Basit parsiyel nöbetin (A) jeneralize nöbete dönüşmesi
- 2- Kompleks parsiyel nöbetin (B) jeneralize nöbete dönüşmesi
- 3- Basit parsiyel nöbetin kompleks parsiyel nöbete dönüşmesi ve ardından jeneralize nöbete dönüşmesi

II - Jeneralize nöbetler (konvülsif veya konvülsif olmayan)

A. Absans nöbetleri (dalma nöbetleri)

- 1- Tipik Absans nöbetleri
- 2- Atipik absans

B. Miyoklonik nöbetler

C. Klonik nöbetler

D. Tonik nöbetler

E. Tonik-klonik nöbetler

F. Atonik nöbetler (astatik) (ani düşme nöbetleri)

III-Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler

Yeterli bilgi olmayışı nedeni ile yukarıdaki kategorilere dahil edilemeyen nöbetlerdir. Çığneme, ritmik göz hareketleri gibi bazı yenidoğan dönemi nöbetleri bunlardandır.

1. Parsiyel : kısmi
2. Somato : vücut; sensoryel - duyu ile ilişkili
3. Otonomik: kalp hızı, terleme gibi otonom fonksiyonlarla ilişkili
4. Psikik: korku sıkıntı, mutluluk hissi gibi belirtiler
5. Otomatizm; kişinin kontrolü altında olmayan yarı amaçlı hareketler. Örneğin yalanma, yutkunma hareketleri, elbiseleri çekiştirme ve sarhoş gibi yürüme şeklinde hareketler.
6. Sekonder jeneralize : sınırlı bir bölgeden başlayıp yaygın hale dönüşen (genelde tonik-klonik nöbet).

2.1.4. Epilepsi Sendromlarının Belirlenmesi

Epilepsileri sınıflandırırken nöbet tipi ve sıklığı, nöbetin başlangıç yaşı, aile hikayesi göz önünde bulundurulur, EEG ve beyin görüntüleme gibi tekniklerle nöbet lokalizasyonları anatomik olarak belirlenir. Bunların yanında nörolojik muayene, hastalığın etiyolojisinin (idyopatik, semptomatik ya da kriptojenik) belirlenmesi de önem taşır.

Epileptik sendromların tanımlanması doğru tanı ve tedavi açısından çok önemlidir. 1989 yılında ILAE tarafından ilk defa sınıflandırılan epileptik sendromlar yine ILAE tarafından çeşitli zamanlarda yenilenerek güncel kalması sağlanmaktadır.

2.1.4.1. Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması (ILAE, 1989) [14]

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

1.1. İdyopatik (yaşa bağlı başlangıç)

- *Sentrotemporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi
- *Oksipital paroksizmlili 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 devam eden parsiyal epilepsisi
- *Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar

1.3. Kriptojenik

II. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar

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

- *Selim ailesel yenidoğan konvülsiyonları
- *Selim yenidoğan konvülsiyonları
- *Süt çocukluğunun selim miyoklonik epilepsisi
- *Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi)
- *Jüvenil absans epilepsisi
- *Jüvenil 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 etyoloji

- *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 konvülsiyonlu epilepsiler

- *Yenidoğan konvülsiyonları
- *Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi
- *Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgalı epilepsi

*Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)

*Diğer belirlenemeyen epilepsiler

3.2. Net jeneralize veya fokal konvülsiyon özelliği olmayanlar

IV. Özel sendromlar

4.1. Duruma bağlı nöbetler

*Febril konvülsiyonlar

*İzole nöbet veya izole status epileptikus

*Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler

2.2. Mezyal Temporal Lob Epilepsisi (MTLE)

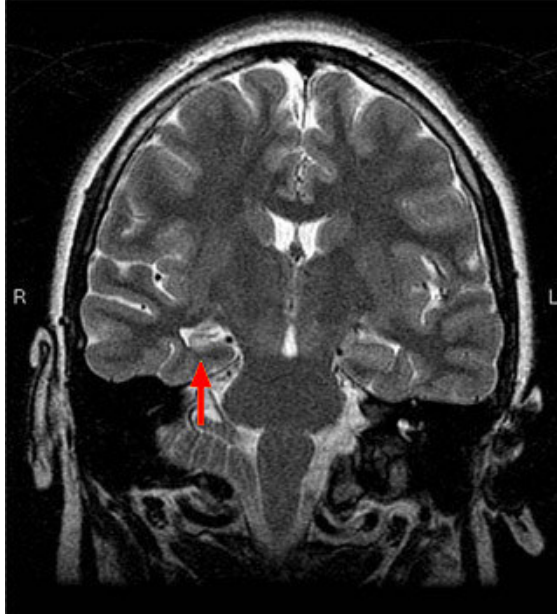
2.2.1 Klinik Özellikler

Mezyal temporal lob epilepsisi tüm parsiyel epilepsilerin en yaygın türüdür ve bu grupta en sık rastlanan patoloji mezyal temporal sklerozdur (MTS) [7]. MTS' de ailede epilepsi öyküsüne sık rastlanır. Başlangıç yaşı 10' lu yaşlardır, ergenlik-gençlik döneminde remisyonu takiben nöbetler yeniden başlar. Sık izole auralar, basit ve/veya kompleks parsiyel veya sekonder jeneralize nöbetler görülür ve bu tablo ilaç tedavisine sıklıkla yanıtıdır. Otonomik belirtiler, bilinç değişikliği ve otomatizmalar belirgindir. Basit parsiyel nöbetler veya aura, sıklıkla epigastrik yükselen bir his, otonomik, emosyonel, psikik, kognitif semptomlar veya gastatuvar duyular ile şekillenir. Sonrasında genellikle donuk bakma şeklinde kompleks parsiyel nöbete ilerler ve bu sırada orolimenter ve kompleks otomatizmler görülür. Nöbetler arası dönemde (interiktal) davranış bozuklukları ve depresyon gibi psikiyatrik tablolar eşlik edebilir [15].

MTLE' nin elektroensefalografi (EEG) incelemelerinde nöbetler arası dönemde iki yanlı bağımsız ön temporal bölgede diken/keskin dalga aktivitesi tipiktir. Nöbet aktivitesi çoğunlukla ön temporal bölgede 5-7 Hz ritmik aktivite şeklinde başlar ve genellikle frekans ve amplitüd değişiklikleri ile yayılım gösterir [15].

Magnetik rezonans görüntüleme (MRG) ile bir taraf hipokampusun daha küçük olduğu gözle ya da ölçülerek (volumetrik analiz) ile saptanır. MTS, MRG ile ince kesitler ile incelendiğinde hipokampusun iç yapısının bozulmuş olduğu görülür. Bozulma bazen bilateral olabilir, normal insanlarla kıyaslama yapmak gerekmektedir.

Bazen tüm hipokampusun küçük olduğu ve temporal boynuzun daha geniş olduğu dikkati çeker (Şekil 2-2).



Şekil 2-2 : Mezyal temporal skleroz MRG [16]

(Bu şekil St. Joseph's Hospital and Medical Center' in internet sitesinden alınmıştır)

MTS' nin köken aldığı hipokampus bir gri cevher tabakası olup lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Gelişimsel olarak en eski beyin kısımlarındandır. Beyinde limbik sistemle ilgili ana merkezlerden biridir, temel görevi hafıza ve öğrenmedir. Ayrıca kokunun kortikal merkezidir ve yeni edinilen bilgilerin depolanmasında rol oynar. Hasarlanması durumunda kısa süreli hafıza uzun süreli hafızaya dönüşemez. Hastadaki lezyon eğer sağ hipokampustaysa görsel, sol hipokampusta ise sözel hafıza etkilenir [17].

Hipokampusa tüm duyularla ilişkili doğrudan veya dolaylı olarak çok sayıda afferent lif gelir. Bu duyular hipokampusu forniks foluyla terk eder. Miyelinli liflerden meydana gelen forniks, talamus, hipotalamus ve septal sahada sonlanır [18].

Mezyal temporal skleroz (MTS) temporal lobun iç-yan yapıları olan amigdala ve hipokampustaki değişikliklerle ortaya çıkar. Bu hastalıkta hipokampusta en az % 30 hücre kaybı görülür. Dentat granüler hücre yosunsu liflerinde dallanma vardır. Eşlik eden ikinci bir patoloji olarak heterotopi ve hamartomalar eşlik edebilir, mikrodisejenezi sıktır [19].

Epilepsilerde nöbetlerin önlenmesi için uzun yıllar boyunca çeşitli antiepileptik ilaçların kullanılması gerekmektedir. Ancak hastaların bir bölümünde

antiepileptik ilaçlar 2'li, 3'lü kombinasyonlar halinde kullanılmasına rağmen nöbetlerin önüne geçilemez ve ayda en az 1 olmak üzere nöbetler görülmeye devam eder. Bu durum “ilaç tedavisine dirençli, refrakter epilepsiler” olarak adlandırılır. Teknolojinin gelişmesine paralel olarak cerrahi alanda olanakların artması ile son yıllarda dirençli epilepsilere bir alternatif tedavi metodu olarak cerrahi tedaviler gündeme gelmiştir. Semptomatik parsiyel epilepsilerin %20'si tedaviye dirençli grubu oluşturur [7, 15]. MTS tedaviye dirençli epilepsiye en sık neden olan sendromdur ve cerrahi tedavi ile %70-90 oranında başarı sağlanır [15]

2.2.2. Mezyl Temporal Skleroz Patolojisi

Temporal lob cerrahisi uygulanmaya başlandıktan sonra elde edilen hipokampus materyelinde yapılan çalışmalar histopatolojik değişiklikler ve epileptogenez açısından faydalı bilgiler sunmuştur. Nöropatolojik olarak en sık saptanan bulgu (yaklaşık tedaviye dirençli TLE'li hastaların 2/3'ü) Ammon boynuzu sklerozudur. CA1, CA3 ve CA4 bölgelerinde nöron kaybı görülür. CA2 ve dentat girus granül hücreleri nörodejenerasyona daha az duyarlıdır [17]. Nöronal hücre kaybı olan bu alanlarda fibriler astrogliazis ve skleroz görülür. Diğer değişiklikler dentat girusun (DG) yerel bilaminasyonu, Cajal-Retzius benzeri internöronlar ve yosunsu (mossy) lif filizlenmesidir [18]. Bu bölgede glial ve glionöral malformasyonlar (tümör vs) başta olmak üzere diğer patolojiler TLE'lerin 1/3'ünü oluşturur. Bu patolojilerde nöronal hücre kaybı ve astrogliazis görülmez.

Dentat granüler hücre nörogenezisi ve akson büyümesi DG'un normal gelişimi ve epileptogenez sırasındaki reorganizasyonun ana unsurlarıdır. Gelişim sırasında DG hücre prekürsörleri embriyonik subventriküler zondan hipokampal oluşuma göç eder, hiler bölgede subgranüler zonu oluşturur. Yeni farklılaşan DG hücreleri hilus ve CA3 bölgesine “mossy fiber” aksonları uzatırlar ve subgranüler zondan (SGZ) daha derindeki granüler hücre tabakalarına göç ederler. Bu olay postnatal 2. haftada maksimumdur ve erişkin yaşa kadar azalarak devam eder [19].

Fare modelinde pilokarpınle indüklenen status epileptikus sonrasında nörogenez hızı artar. Bu artış 2-3 günde ortaya çıkar 10-14 gün süresince yüksek düzeydedir, birkaç haftada normal seviyeye düşer. Aynı dönemde DG hücre “mossy fiber” aksonlarında aşırı filizlenme görülür ve daha alt moleküler tabakalarla sinaptik bağlantılara yol açar. 7. günde Timm boyasıyla görünür hale gelir [20].

Gelişim ve epilepsi ilişkili nörogenezis ve akson büyümesinin benzerliği bu normal ve aberan DG plastisitesi arasında paralellik olduğunu göstermektedir. Bu olasılık embriyonik nöral hücre adezyon molekülü, tenascin-C, ve basic helix-loop-helix (bHLH) ailesi üyeleri, gibi gelişimsel düzenlenen moleküllerin SE sonrası re-eksprese olduğunu gösteren çalışmalar ile desteklenmiştir. Hipokampus homojenatında yapılan çoklul gen PZR analizi, diğer birçok geni (normal gelişim ve kainik asit sonrası modellerde aynı artmış ekspresyon düzeyi ile) belirlemiştir [20-21].

2.2.3. Epilepsi Cerrahisi

Dirençli epilepsisi olan hastaların ameliyatla tedavi edilebilme olasılıklarını araştırmak için klinik öykü, nöbet belirtileri, nörolojik muayene, elektrofizyolojik incelemeler (EEG, video-EEG), beyin görüntüleme (MR görüntüleme, PET, vb.) ve nöropsikolojik testler gibi uygulamaların tümüne başvurulur. Bunların yanında hastalar hakkında psikiyatrik değerlendirme de yapılır. Tüm bu incelemeler sonucunda ilaca direnç gösteren epilepsi nöbetlerinin, beyin hangi bölgesinden kaynaklandığı şüpheye yer bırakmadan tespit edilebiliyorsa ameliyat kararı alınır, hastaya bu konudaki tüm riskler, epilepside uygulanan ameliyat şekilleri, ameliyatın olası sonuçları, epilepsinin seyri ve tedavisi bakımından komplikasyonları ve kontrendikasyonları anlatılarak operasyon önerilir.

Tablo 2-1 Hastaların cerrahi öncesi değerlendirilmesi [22]

• Detaylı öykü (nöbet özellikleri, aura, vs.) • EEG, video-EEG monitorizasyon, gerektiğinde invazif EEG • Beyin görüntüleme (MR görüntüleme, volümetrik MR, MR-spektroskopi, fonksiyonel MR) • Fonksiyonel görüntüleme (SPECT - Single Photon Emission Computerized Tomography, PET – Positron Emission Tomography) • Kortikal stimülasyon (intraoperatif, ekstraoperatif) • Nöropsikolojik testler, Wada testi • Psikiyatrik değerlendirme

Epilepsi cerrahisinin amacı nöbetin kaynaklandığı odağın ortadan kaldırılması ya da nöbet deşarjının yayılımının önlenmesidir [21]. Yöntem olarak anterior temporal

lobektomi ve anteromedial temporal rezeksiyon veya selektif amigdalohipokampektomi uygulanır. Yöntemler açısından merkezler arasında farklı sonuçlar bildirilmesine rağmen genelde uygulanan yöntem selektif amigdalohipokampektomidir [23].

Cerrahi tedavi sonrası hastalarda bazı komplikasyonlar (Tablo 2-2) ve kontrendikasyonlar görülebilir (Tablo 2-3). Fakat tecrübeli merkezlerde cerrahi komplikasyon oranı %1-2' yi geçmemektedir.

Tablo 2-2 Cerrahi tedavinin komplikasyonları [22]

• Enfeksiyon • Hematom • Vasküler yaralanmalar • Beyin şişmesi • Hidrosefali • Önemli beyin bölgelerinin yaralanması • Çok nadir ölüm • Nörolojik bozukluklar • Nöropsikolojik bozukluklar
--

Tablo 2-3 Cerrahi tedavinin kontrendikasyonları [22]

• İlerleyici nörodejeneratif hastalık • Akut psikiyatrik hastalık • Medikal tedavinin yetersiz uygulanmış olduğu yani dirençliliğin netleşmediği vakalar • Kontrilateral lobda geçirilmiş rezeksiyon • Bilateral lobda nöbet başlangıcı (rölatif) • İntrakarotid amobarbital (Wada) testinde ipsilateral bellek hakimiyeti saptanması
--

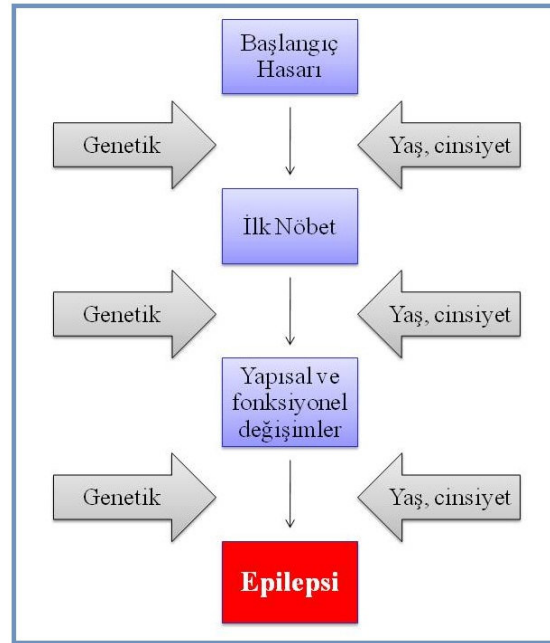
Hasta başlangıçta ayda bir daha sonra 3-6 ayda bir, ilerleyen dönemlerde senede bir defa poliklinik kontrolleri ile izlenir. İlk bir yıl içinde EEG, MR görüntüleme

kontrolleri, nöropsikolojik ve psikiyatrik değerlendirme yapılır. İki yıl sonra antiepileptik ilaçların azaltılarak tamamen kesilmesi planlanır.

2.3. Epileptogenez

Epileptogenez normal bir beynin uzun süreli bir transformasyon sonucu epilepsi geliştirme sürecidir [24]. Bu süreçte beyinde yavaş yavaş gelişen, tespit edilebilir bir lezyona bağlı olarak, parsiyel ya da jeneralize nöbetlerle ortaya çıkan semptomatik epilepsiler meydana gelir [25]. Epileptogenez travmatik beyin hasarları, inme, enfeksiyon vb. durumlarda ortaya çıkar ve başlangıç nöbeti ile spontan nöbetler oluşana kadar beyinde gerçekleşen bir dizi olayı kapsar [26] (Şekil 2-3).

Epileptogenez, sonucunda spontan nöbetler meydana gelen, hücresel ve moleküler seviyede gerçekleşen bir dizi olaylar bütünüdür. Beyinde oluşan bir başlangıç hasarından sonra aylar hatta yıllar süren nöbetsiz bir dönem (latent periyot) meydana gelir. Bu nöbetsiz dönem sırasında beyinde sonrasında epilepsi gelişimine neden olan yapısal ve fizyolojik değişiklikler meydana gelir. Nöronal ağlardaki hipereksitasyonu sağlayan değişimler ve ilk epileptik semptomların ortaya çıkışı bu sırada olur [27].



Şekil 2-3 Epileptogenez gelişim şeması

Epileptogenezde meydana gelen değişiklikler henüz tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir. Ancak latent periyotta ortaya çıkan olayların, nöronal hipereksitabilitenin artması ve buna bağlı spontan nöbetlerin ortaya çıkışı ile sonuçlanan, hücre ölümü, aksonal filizlenmeler, nörotransmitterlerin salgılanmasında meydana gelen değişiklikler ve nörogenез gibi durumları içerdіęi düşünölmektedir [25]. Epileptogenezle ilgili insan ve epileptik hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda piramidal nöronların öldüğü ve bu bölgelerde yeni sinaptik bağlantıların ortaya çıktığı anlaşılmıştır [27]. Sağlıklı bir insanın bir beyinde GABAerjik ve glutamaterjik mekanizmalar nöronal eksitabilitenin bir denge içinde oluşmasını sağlarlar. Epileptogeneз sürecinde meydana gelen nöronal hipereksitabilite, bu dengenin sağlanmasında görevli olan nöronların kaybı, inhibitör mekanizmada görevli olan GABA seviyesindeki azalma ya da GABA_A reseptörlerindeki duyarlılığın azalması ve bunlara bağlı olarak meydana gelen düşük inhibisyon sonucu olabilir [27]. Epileptogeneз sürecine katılan başka bir durumda nöronların yüzeylerinde bulunan biyokimyasal reseptörlerdeki (nötrofin reseptörü, iyonotropik glutamat reseptörü, metabotropik glutamat reseptörü) aktivasyon olduğu düşünölmektedir. Bu reseptörlerdeki artış ortamdaki Ca⁺² konsantrasyonunu arttırarak birer tirozin kinaz enzimi olan Src ve Fyn aktivasyonunu arttırarak hipereksitabiliteye sebep olabilir [24]. Meydana gelen bir beyin hasarından sonra nörotransmitterlerin aşırı salınımı epileptogenezde büyük bir rol oynamaktadır. Aşırı glutamat salınımı intraselöler Ca⁺² konsantrasyonunu hızla arttırarak nöronların aşırı depolarize olmasını sağlar ve buna bağlı hücre hasarlanmaları ve ölümlerinin meydana gelmesine sebep olur [28]. Ancak glutamaterjik aktivite başlangıç hasarında ve daha sonra meydana gelen epilepsi sırasında görölmesine karşın latent periyotta görölmemektedir [28]. Nöron hipereksitabilitesinde rol oynayabilecek diğer bir faktör ise ekstraselöler Ca⁺² konsantrasyonundaki azalma ve bununla ilişkili glial hücrelerdeki ATPaz aktivitesindeki azalma olabilir [27].

İnsandaki MTS ve epileptogeneз ilişkisindeki bilgiler halen yetersizdir. Hastalığın karmaşık doğası, çoklu faktörlere ve başlangıç hasarına bağlanmaktadır. Bu nedenle hastalığın fizyopatolojisinin anlaşılması güç olsa da sürecin durdurulması, etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından son derece önemli ve gereklidir.

2.4. Merkezi Sinir Sisteminde (MSS) Doğal ve Edinsel İmmünite

İmmün sistem ve bununla ilişkili enflamatuvar reaksiyonlar enfeksiyonlara bağlı olan veya enfeksiyonlara bağlı olmayan hasarların onarılmasında ve dokuların korunmasında önemli bir role sahiptir. İmmün sistem, patojenik ajanlarla ilk olarak karşılaşan ve bunlara karşı primer bir koruma engeli oluşturan “doğal immünite” ve sonrasında daha yavaş olarak devreye giren ancak patojenlere karşı daha etkili bir savunma sağlayan “edinsel immünite” olarak iki grupta incelenir [29]. Adaptif immün sistem doğal immün sistemden farklı olarak antijen sunan hücreler (ASH) tarafından sunulan spesifik antijen kısımlarını tanıyarak aktif hale geçerler. Bununla birlikte doğal immün sistemin elemanları monosit/makrofaj, mikroglialar gibi daha çok fagositik hücrelerden oluşmakta iken adaptif immün sistemin en önemli hücreleri B ve T lenfositleridir. İmmün sistem hücreleri arasındaki koordinasyon ya hücresel temasla ya da sitokin adı verilen protein yapıdaki çözünen maddelerle sağlanır [29].

Merkezi sinir sistemi, kan-beyin bariyerinin etkinliği nedeniyle konvansiyonel lenfatik drenajdan mahrum kalır. Düşük seviyelerde bulunan monosit ve lenfosit konsantrasyonları, beyinde meydana gelen enflamatuvar reaksiyonların MSS’nin kendisi tarafından oluşturulduğunu gösterir. Bunun yanında gerek olduğunda edinsel immünite elemanları periferdeki dokulardan MSS’ye gelerek burada etkinliklerini gösterirler. Bu nedenlerle MSS immünolojik olarak ayrıcalıklı bir bölge olarak kabul edilmektedir. Doğal ve edinsel immün sistem arasındaki bağlantı sitokinler ve Toll Benzeri reseptörleri içeren geniş bir enflamatuvar medyatör grubu ile sağlanır [29].

2.4.1. Merkezi Sinir Sisteminde Proenflamatuvar Sinyaller

Enflamasyon, damarlı dokularda lökositlerin ve plazma proteinlerinin enfeksiyon, toksin veya doku yaralanma bölgesine göçü ve aktivasyonunu içeren doğal immün sistemin kompleks bir reaksiyonudur [29]. Enflamasyon kan damarlarında lökosit göçünü arttıran değişiklikler ile başlamaktadır. Lokal edinsel immün yanıtlar enflamasyonu arttırabilmektedir. Enflamasyon, enfeksiyonların kontrolünde ve doku tamirinin arttırılmasında koruyucu etkinliğe sahipken aynı zamanda doku hasarı ve hastalıklara da neden olabilmektedir [29].

Beyindeki enflamasyon süreci fizyolojik olarak tespit edilemeyecek ya da oldukça zor tespit edilebilecek bir dizi molekülün (sitokinler ve diğer enflamatuvar

medyatörler) ortama salınmasıyla karakterize edilir. Bu moleküller immün sistem hücreleri tarafından üretilmesine karşın MSS’de beyin parenkimal hücreleri (mikroglia, astrosit, nöron), kan-beyin bariyeri hücreleri ve koroid pleksus hücreleri tarafından da üretilirler [29].

Merkezi sinir sisteminde, deneysel olarak enflamasyona yol açmanın en iyi yollarından biri, bir gram-negatif bakteri membran bileşeni olan ve sistemik bir enfeksiyonu taklit edebilme yeteneğinde olan lipopolisakkaritleri (LPS) kullanmaktır. LPS mikroorganizmalar tarafından üretilen ve spesifik reseptörler (Toll-benzeri reseptör-TLR) tarafından tanınan patojen bağlantılı yapılardır. Toll-benzeri reseptörler böceklerden memelilere kadar her canlının immün sistem hücrelerinde eksprese olan, evrimsel olarak korunmuş, tip1 trans-membran proteinleri ailesinin üyelerindendir [29]. Bu reseptörlerin ve kostimulatörlerin (örn. CD14) uyarılması antijen sunan hücrelerin aktif hale geçmesini sağlar. TLR aktivasyonu, nükleer faktör_κ B (NF_κB) gibi sinyal ileti yollarının transkripsiyon faktörlerini uyararak birçok sitokin, kemokin, kompleman sistemi molekülleri, siklooksigenaz-2 gibi faktörleri kodlayan proenflamatuvar genleri aktive eder [30-32]. TLR2 ve TLR4 ekspresyonu merkezi sinir sistemindeki parenkimal mikrogliyalarda, makrofajlarda, koroid pleksus’ ta ve ventriküllerin epidermal hücrelerinde gösterilmiştir [32-33]. Bu reseptörler, LPS uyarımı sonrasında MSS’de artarak beyin hücrelerinde enflamatuvar yanıtı sebep olur [34].

Merkezi sinir sisteminde immün yanıt TLR’lerin endojen ligandlara bağlanması sonucunda da tetiklenebilir [29]. Örneğin hasar gören hücreler (ısı şoku proteinleri, ekstraselüler matriksteki degradasyonlar) ya da hasar görmüş bir kan beyin bariyeri geçen moleküller bir mikrogliyal aktivasyona sebep olabilir. Bu durum gösterir ki beyin sadece enfeksiyöz ajanlara değil travmatik ya da eksitotoksik yaralanma, iskemi veya nöbetler gibi uyaranlara da immün cevap geliştirir [35-36].

2.4.2. Enflamasyonda Kan-Beyin Bariyerinin Rolü

Kan beyin bariyeri (KBB), beyni kanda dolaşan zararlı maddelerden ve toksinlerden korurken, serebral hücre fonksiyonları için gerekli besinlerin geçişine izin veren, özelleşmiş, karmaşık, selüler bir sistemdir [37]. İlk defa Alman mikrobiyolog P. Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. KBB kapiller damarların endotel hücreleri, perisitler (damar çeperinin dış tarafındaki hücreler), astrositler, bazal membran, koroid pleksus ve pia-araknoid zarlar gibi bileşenlerden meydana gelmiştir. Beyin kapillerlerini oluşturan endotelial hücrelerde “tight-junction” (TJ) adı verilen sıkı bağlantı bölgeleri bulunur.

TJ'ler paraselüler permeabilitenin düşmesine neden olan, diğer dokulara göre 50-500 kat daha yüksek bir elektriksel direnç oluştururlar [38]. TJ'lerde okludin, klaudin, E-kadherin, "junctional adhesion molecule" (JAM), aktin ve zonula okludinler (ZO1, 2, 3) gibi protein kompleksleri iki bazal mebranın birbirine yapışmasını sağlar [39-41].

Enflamasyon sürecinde KBB'nin endotelial hücreleri, dolaşımdaki immün sistem hücreleri, beyindeki parenkimal mikroglialar ve astrositler tarafından üretilen yüksek miktardaki sitokin, beyin mikro-dolaşımında adhezyon moleküllerinin ekspresyonlarında artış, metalloproteinazların aktivasyonu, araşidonik asit yıkımı gibi durumlara sebep olur [42-44]. Kan beyin bariyeri permeabilitesinin artmasına yol açan bu olaylar henüz tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir.

Kan-beyin bariyeri ve kan-serebrospinal sıvı bariyerinden lökositlerin transmigrasyonu enflamatuvar faktörlerin etkisi ile olur. Kan-beyin bariyeri ve kan-serebrospinal sıvı bariyerinden sitokinlerin etkisi ile enflamatuvar cevap oluşturulmasının mekanizmalarından biri serebrovasküler endotel epitelinde selektin ve adhezyon molekülleri olan ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), VCAM-1 (vascular CAM), PECAM-1 (platelet endotelial CAM) ve bunların reseptörlerinde meydana gelen artıştır. Bu moleküllerin lökosit yüzeylerindeki integrinlerle olan interaksiyonları, lökositlerin serebrovasküler endotel yüzeyinde toplanması ve sonuçta perivasküler alan, serebrospinal sıvı ve merkezi sinir sistemi parenkimasına geçişini sağlar. Bunun yanında mikroglial hücreler, kan-beyin bariyerindeki endotelial hücreler ve koroid pleksus epitelindeki hücreler T lenfositlerine antijen sunma özelliği bulunan hücrelerdir [45-47]. Enflamasyon sürecinde MHC-1 ve MHC-2 (major histocompatibility complex) ile bunların kostimülatörlerini üreterek bir adaptif immün yanıt geliştirebilirler. Merkezi sinir sistemi antijenleri koroid pleksus' ta ve meninks' te bulunan naif T hücrelerine dendritik hücreler tarafından sunulabilirler [48].

Normal fizyolojik koşullarda kan-beyin bariyeri plazmadaki maddeler ve immün sistem hücrelerinin santral sinir sistemine girişine engel olur [49]. Fakat enfeksiyonlar, travma, iskemik ve nöbetler gibi MSS hasarlanmasına yol açan durumlar KBB fizyolojisi ve yapısının değişmesine yol açar. Özellikle KBB bütünlüğündeki bir bozulma (tablo) ve eşlik eden bir enflamasyon süreci, geç dönem başlayan epileptik sendromlarla ilgili birçok nörolojik durumu ortaya çıkarır [50].

Tablo 2-4 Kan-beyin bariyeri yıkımına neden olan durumlar [51-52]

Parasellüler açılma (tight-junctionların açışması)	Hiperosmolarite, asidik pH, ensefalopati, deneysel otoimmün ensefalit, multipl skleroz, enflamasyon (enflamasyonun kimyasal mediatörleri; TNF- α , IL1- β , histamin, serotonin, bradikinin, trombin ve reaktif oksijen örnekleri), iskemi (hücre içi Ca ⁺⁺ artışı ve protein kinaz C artışı), kurşun, alüminyum, iskemi sonrası reperfüzyon, elektromanyetik alanlar, sistemik lupus eritematozis (SLE).
Pinositik aktivite artışı	Akut hipertansiyon, mikrodalga radyasyon, hepatik ensefalopati, iskemi, nöbetler, inme, beyin hasarı, tümörler, hipervolemi, immobilizasyon stresi, hipotermi (<16 °C), post-radyasyon, hiperbarik durumlar, ensefalopati, civa, anjiotensin, trisiklik antidepresanlar, menenjit, multipl skleroz, lenfostatik ensefalopati
Por oluşumu	Trisiklik antidepresanlar (klorpromazin, nortriptilin), iskemi
Hastalık veya toksinlerin uyardığı besin taşınamındaki değişiklikler	Diabetes mellitus (glut-1), Alzheimer hastalığı (b -amiloid), Wernike-Korsakof sendromu (tiamin), ailesel mental gerilik (glukoz), yeme bozuklukları (insülin ve leptin), inme (glut-1), multipl skleroz (ICAM-1), alüminyum (Alzheimer hastalığı ve lipofilik bileşiklere permeabilite artışı ile ilgili protein taşıyıcılarının inhibisyonu), hipertansiyon (kolin)

2.5. Sitokinler ve İmmün Sistem

Daha önceden de anlatıldığı gibi immün sistem doğal ve edinsel immünite olmak üzere iki grupta incelenir. Doğal immünite immünojen uyarılara karşı anında bir yanıt oluştururken edinsel immünite ise uyarının antijenik kısımlarını tanıyarak daha yavaş fakat çok daha etkili “uyarana spesifik” bir yanıt oluşturur. Endojen ya da ekzojen uyarılarla karşılaşan immün sistem hücreleri ve diğer hücreler sitokinler olarak tanımlanan ve doğal direnç kapsamında gerçekleşen hücresel reaksiyonları yönlendiren proteinleri salgırlar. Lökositlerin kendi aralarında ve diğer hücrelerle iletişimde rol oynayan sitokinler, immün yanıt ile enflamasyonu düzenleyen çözünmüş proteinlerdir. Geleneksel olarak lökositler tarafından sentezlenmeleri ve lökositlere etki ettikleri için

sitokinlerin büyük bölümüne interlökinler denilmiştir. Fakat günümüzde erişilen bilgiler sitokinlerin daha çok lökositler dışındaki hücreler tarafından salgılandığı ortaya çıkarmıştır dolayısıyla bu isimlendirmenin çok doğru bir isimlendirme değildir [29].

Tüm sitokinler immünojen bir uyarı sonucu az miktarda üretilir ve hedef hücrelerin yüksek afiniteli reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. Birçok sitokin sentezlendikleri hücrelerde bir etki gösterirken (otokrin etki) bazı sitokinler salgılandıkları hücre yakınlarındaki hücelere etki gösterirler (parakrin etki). Örnek olarak doğal direnç sitokinlerinden olan TNF ve interlökin-1 (IL-1) enfeksiyon bölgesine nötrofil ve makrofajları çekmekle yükümlüdür. Aşağıdaki tabloda doğal immün sistem sitokinleri ve bunların etkileri özetlenmiştir [29].

Doğal direnç önceden de anlatıldığı gibi savunmada oynadığı önemli rollerin yanında gerekli durumlarda edinsel immüniteyi de harekete geçirme yeteneğindedir. Edinsel immün sistem, genel olarak aktive olmak için bir antijenik uyarıya ihtiyaç duyan B ve T hücreleri ve bunların aktivitelerini kapsar. Yalnız bu hücreler aktive olmak için antijenik uyarı yanında “ikincil uyarı” adı verilen moleküllere ihtiyaç duyarlar.

Tablo 2-5 Doğal Bağışıklığın Sitokinleri [29]

Sitokin	Ana kaynak hücre/hücreler	Ana hücresel hedefler ve biyolojik etkiler
Tümör nekroz faktör (TNF)	Makrofajlar, t hücreleri	Endotelyal hücreler: aktivasyon (enflamasyon, koagülasyon) Nötrofiller: aktivasyon Hipotalamus: ateş Karaciğer: akut faz proteinleri sentezi Kas, yağ: katabolizma Pekçok hücre tipi: apoptoz
Interlökin-1 (IL-1)	Makrofajlar, endotelyal hücreler, bazı epitelyal hücreler	Endotelyal hücreler: aktivasyon (enflamasyon, koagülasyon) Hipotalamus: ateş Karaciğer: akut faz proteinleri sentezi
Kemokinler	Makrofajlar, endotelyal hücreler, T lenfositler, fibroblastlar, trombositler	Lökositler: kemotaksi, aktivasyon
Interlökin-12 (IL-12)	Makrofajlar, dendritik hücreler	Doğal öldürücü hücreler ve t hücreleri: IFN- γ sentezi, artmış sitolitik aktivite T hücreleri: T _H 1 farklılaşması
Interferon-γ (IFN-γ)	Doğal öldürücü hücreler, T lenfositleri	Makrofajların aktivasyonu, bazı antikor yanıtlarının uyarılması
Tip i interferonlar (IFN-α, IFN-β)	IFN- α : makrofajlar IFN- β : fibroblastlar	Tüm hücreler: antiviral korunma, artmış sınıf I MHC ekspresyonu Doğal öldürücü hücreler: aktivasyon
Interlökin-10 (IL-10)	Makrofajlar, T hücreleri (T _H 2)	Makrofajlar: IL-12 yapımının inhibisyonu, eş-uyaran ve sınıf II MHC moleküllerinin ekspresyonlarında azalma
Interlökin-6 (IL-6)	Makrofajlar, endotelyal hücreler, T hücreleri	Karaciğer: akut faz proteinleri sentezi, B hücreleri: antikor yapıcı hücrelerin çoğalması
Interlökin-15 (IL-15)	Makrofajlar ve diğerleri	Karaciğer: akut faz proteinlerinin sentezi B hücreleri: antikor yapıcı hücrelerin çoğalması
Interlökin 18 (IL-18)	Makrofajlar	Doğal öldürücü hücreler ve T hücreleri: IFN- γ sentezi

Doğal direnç, B ve T lenfositlerinin aktive olabilmesi için gereken “ikincil uyarı” moleküllerini de sağlar. Örneğin mikroorganizmalara yanıt olarak doğal öldürücü hücreler tarafından üretilen IFN- γ , bir antijen sunan hücre olan dendritik hücreleri ve

yine antijen sunabilme yeteneğinde olan makrofajları uyarak T lenfositlerini aktive eden ikincil tip sinyal oluştururlar. Birincisi her iki hücre grubunun yüzeyinde eksprese olan yüzey molekülleridir; eş-uyaranlar adı verilen bu yapılar naif T hücrelerinin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanarak, T lenfositlerinin uyarılmasında antijene eşlik ederler. İkinci olarak yine dendritik hücreler ve makrofajlar salgıladıkları IL-12 ile naif T hücrelerini efektör T hücrelerine dönüştürürler. Bunların dışında yine doğal immün sistemin elemanlarından biri olan kompleman sistemi de benzer mekanizmalarla humoral yanıt için ikincil sinyali oluştururlar [29].

Doğal direnç önceden de anlatıldığı gibi savunmada oynadığı önemli rollerin yanında gerekli durumlarda edinsel immüneyi de harekete geçirme yeteneğindedir. Edinsel immün sistem, genel olarak aktive olmak için bir antijenik uyarıya ihtiyaç duyan B ve T hücreleri ve bunların aktivitelerini kapsar. Yalnız bu hücreler aktive olmak için antijenik uyarı yanında “ikincil uyarın” adı verilen moleküllere ihtiyaç duyarlar. Doğal direnç, B ve T lenfositlerinin aktive olabilmesi için gereken “ikincil uyarı” moleküllerini de sağlar. Örneğin mikroorganizmalarayanıt olarak doğal öldürücü hücreler tarafında üretilen IFN- γ , bir antijen sunan hücre olan dendritik hücreleri ve yine antijen sunabilme yeteneğinde olan makrofajları uyarak T lenfositlerini aktive eden ikincil tip sinyal oluştururlar. Birincisi her iki hücre grubunun yüzeyinde eksprese olan yüzey molekülleridir; eş-uyaranlar adı verilen bu yapılar naif T hücrelerinin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanarak, T lenfositlerinin uyarılmasında antijene eşlik ederler. İkinci olarak yine dendritik hücreler ve makrofajlar salgıladıkları IL-12 ile naif T hücrelerini efektör T hücrelerine dönüştürürler. Bunların dışında yine doğal immün sistemin elemanlarından biri olan kompleman sistemi de benzer mekanizmalarla humoral yanıt için ikincil sinyali oluştururlar [29].

Sonuçta doğal direnç, savunmanın ilk aşamasını oluşturmasının yanı sıra, B ve T lenfositlerinin aktivasyonunda ikincil uyarıları sağlayarak edinsel immüneyin savunmaya katılmasını sağlarlar [29].

2.5.1. Sitokinler ve Merkezi Sinir Sistemi

Sitokinler, MSS içerisinde immün cevap oluşumu, nöronların hayatta kalmaları ve fonksiyonlarına etki eden işlevlere sahiptir. Sitokinlerin dengesi ise MSS ve periferel organların etkisindedir. Beyinde nöronlar tarafından salgılanan nörotransmitterler sitokin dengesi üzerine etkiyebilir [53]. Nöro-immün interaksiyonlar sitokinlerin ve

immün sistem hücreleri tarafından salınan diğer ürünlerin etkisiyle nöronların işlevlerini, farklılaşmalarını ve hayatta kalımlarını etkiler.

Sitokinler MSS'ye 2 muhtemel yolla etki ederler. Bunlardan birincisi, periferel immün organlardan köken alan sitokinler kan-beyin bariyerinden geçerek beyinde lokal ya da sistemik bir etkiye neden olurlar [54]. İkinci olarak ise sitokinler MSS' deki nöronal hücreler tarafından üretilirler. Beyinde nöronlar ve glial hücreler tarafından üretilen sitokinler enfeksiyon, enflamasyon, iskemi ve diğer beyin hasarlanmaları gibi durumlarda kompleks anatomik, nöroendokrin, metabolik ve/veya davranışsal etkilerde bulunurlar [55-57]

Tablo 2-6 Beyinde ekspresyonu bilinen sitokinler ve reseptörleri ([58]' den uyarlanmıştır)

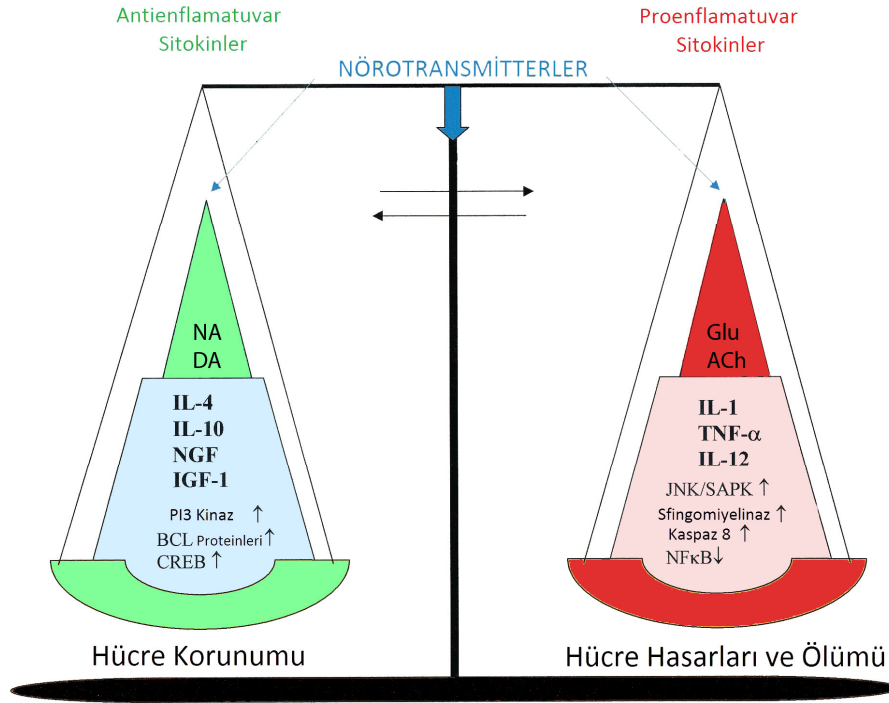
İsim	Tip	Nöronlar	Astrositler	Oligodendrositler	Mikroglialar
IL-1	TH1	S ; R	S ; R	S ; R	S ; R
IL-2	TH1	S ; R	bilgi yok	R	R
IL-3	TH1 V	S ; R	S ; R	R	R
	TH2				
IL-4	TH2	bilgi yok	R	R	R
IL-5	TH2	S ; R	S ; R	bilgi yok	S ; R
IL-6	TH1 V	S ; R	S ; R	bilgi yok	S ; R
	TH2				
IL-7	bilgi yok	bilgi yok	R	R	R
IL-7	bilgi yok	bilgi yok	R	R	R
IL-8	bilgi yok	R	S ; R	bilgi yok	R
IL-9	TH2	bilgi yok	R	bilgi yok	bilgi yok
IL-10	TH2	S ; R	bilgi yok	bilgi yok	S ; R
IL-11	bilgi yok	S	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok
IL-12	TH1	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok	S
IL-13	TH2	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok
IL-14	TH2	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok
IL-15	TH1	S	bilgi yok	bilgi yok	S
IL-16	TH1	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok
IL-17	TH1	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok
IL-18	TH1	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok	bilgi yok
TNF-a	TH1	R	S ; R	R	S ; R
IFN-γ	TH1		S ; R		R
TGF-B	TH2		S ; R	S ; R	S ; R
GM-CSF	bilgi yok	R	S ; R	R	R
M-CSF	bilgi yok	bilgi yok	S	R	S ; R

S: sitokin, R: reseptörleri

2.5.2. Sitokinler ve Nörotransmitterler

İmmünolojik bir aktivasyonun IL-1, IL-2, IL-6, IL12, TNF- α , IFN- γ ve MIP-1 α gibi sitokinlerin etkisiyle sempatik sinir sistemi elemanların nor-adrenalin, adrenalin ve dopamin gibi nörotransmitterleri salgılamasını sağladığı bilinmektedir [59-61]. MohanKumar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, IL-1 β salınımının hipotalamusta monoamin sentezlenmesinde değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir [62].

Normal “sağlıklı” bir beyinde proenflamatuvar sitokin salınımı düşüktür ve homeostazi antienflamatuvar sitokinlerin kontrolündedir. Fakat beyin hasarına yol açan patolojik durumlarda üretilen proenflamatuvar sitokinler ve diğer medyatörler (nitrik-oksit ve diğer serbest radikaller) beyindeki normal sinyalizasyonun bozulmasına neden olarak stres aktive protein kinazlar (JNK/SAPK) ve apoptotik kaspazların aktive olmasını sağlar [58] (Şekil 2-4).



Şekil 2-4 Merkezi Sinir Sisteminde Sitokinler ve Nörotransmitterler ([58]' den adapte edilmiştir)

2.5.3. Temporal Lob Epilepsisinde Sitokinler

Temporal lob epilepsisi (TLE) terimi beyin neokorteksi veya mezyal temporal lobdan köken alan, lezyona bağlı ya da bağımsız olarak gelişen fokal nöbetleri ifade eder. TLE sendromlarından biri olan hipokampal skleroz (HS) bağlantılı mezyal temporal lob epilepsisi (MTLE), hipokampusun CA1 ve dentat girus bölgesinde nöron kaybı ve gliosis ile karakterize edilir.

Sheng ve arkadaşlarının insan MTLE hastalarından cerrahi olarak çıkarılan hipokampus materyalinde yaptıkları çalışmada mikroglia-benzeri hücrelerde gösterdikleri IL-1 α artışı dikkat çekicidir [63]. Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada ise kimyasal ya da elektriksel yolla tetiklenen status epileptikus nöbetleri ardından yapılan mRNA ekspresyon tayini ve immünohistokimya incelemelerinde, nöbetten 30 dakika sonra, IL-1 β , TNF- α ve IL6' nın, normal sıçan beynine göre hem mRNA hemde protein seviyelerinde artmış olduğu tespit edilmiştir. Nöbetten 48-72 saat sonra bu sitokinlerin seviyeleri normal düzeye dönme eğilimi göstermesine karşın, IL-1 β seviyesinin nöbetten 60 gün sonra bile artmış durumda olduğu gözlenmiştir [64].

Sitokinlerin temporal lob epilepsi patogeneze katıldıkları bunlar gibi birçok çalışma ile gösterilmesine karşın patogeneze ne çeşit roller üstlendiği henüz tartışma konusudur. Bunun yanında proenflamatuvar sitokinlerle merkezi sinir sistemi arasındaki ilişkiler düşünüldüğünde bu sitokinlerin hücre ölümü, gliosis vb. patolojilerin gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir.

2.6. İncelenen Genlerin Özellikleri

Bu tez kapsamında proenflamatuvar sinyalizasyon, regülasyon ve doğal ve edinsel bağışıklık arasındaki koordinasyonu sağlama fonksiyonları açısından önem arz eden sitokinleri kodlayan genler mRNA ekspresyonları açısından incelenmiştir. Tablo 2-7' de bu sitokinler ve bunları kodlayan genler ile ilgili bilgi verilmiştir.

Tablo 2-7 İncelenen genlerin özellikleri

Gen adı	Kırılma Varyantı	cDNA (aminoasit)	Bulunduğu Lokus	Gen yapısı	Fonksiyonu
IL-1α	2	271	2q13	7 ekzon, 10,2 kb	Düşük yoğunlukta, bölgesel enflamatuvar olaylara aracılık eder. IL-1 β ile aynı reseptörlere bağlanır. Endotel hücre adezyon moleküllerinin indüklenmesi, endotelial hücreler ve makrofajlar tarafından kemokin yapımının uyarılması, karaciğerde akut faz reaktanlarının uyarılması ve ateş
IL-1β	8	269	2q14	7 ekzon, 7,15 kb	IL-1 α 'ya göre daha yüksek konsantrasyonda bulunur. Temel olarak aynı biyolojik etkilere sahiptir.
TNF-α	2	233	6p21.3	4 ekzon, 2,77 kb	Aktive mononükleer fagositler tarafından sentezlenir. Nötrofillerin ve monositlerin enfeksiyon bölgesine göçünün uyarılması ve bu hücrelerin stimülasyonu. Vasküler endotelial hücrelerini adezyon molekülleri sergilemeleri, makrofaj ve endotelial hücrelerin kemokin sentezlemeleri, karaciğerde akut faz reaktanlarının üretimi.
IL-2	2	153	4q26-28	4 ekzon, 5,26 kb	Antijenle aktifleşmiş T hücreleri tarafından yapışkan ve otokrin etki ile T hücre çoğalmasını ve antijen ile aktifleşmiş T hücrelerinin apoptotik ölümünü artırır. T hücre aracılı immün yanıtların hem düzenlenmesi hem de indüklenmesinde gereklidir. Doğal öldürücü ve B hücrelerinin farklılaşması ve çoğalmasında etkilidir.
IL-6	11	212	7p21	6 ekzon, 6,12 kb	Aktive mononükleer fagositler, endotelial hücreler, fibroblastlar gibi birçok hücre tipi tarafından sentezlenir. Doğal ve edinsel immünitinin ikisinde de etki gösterir. Hepatositlerde akut faz proteinlerinin sentezini, B lenfositlerinin büyümelerini uyarır.

IL-12	6	253	3q25.33-q26	7 ekzon, 7,26 kb	Mononükleer fagositler ve dendritik hücreler tarafından salgılanan ve hücre içi mikroplara karşı doğal immün yanıtın bir medyatörü olan ve bu mikroplara karşı hücre aracılı immün yanıtların temel indükleyicisi olarak görev yapar. Doğal öldürücü hücre aktivasyonu, doğal öldürücü ve T hücrelerinden IFN- γ salınımının artırılması, doğal öldürücü hücrelerin sitotoksik, T hücrelerinin sitolitik aktivitelerinin yükseltilmesi ve TH1 hücrelerinin gelişiminin artırılması gibi görevleri vardır.
IFN-γR1	6	489	6q23.3	7 ekzon, 21.97 kb	T lenfositler ve doğal öldürücü hücreler tarafından sentezlenen, temel fonksiyonu hem doğal immünitede hem de edinsel hücre aracılı immün yanıtların her ikisinde de makrofajların aktive edilmesini sağlar.
IL-10	3	178	1q31-q32	5 ekzon, 4.89 kb	Aktive makrofajlar ve bazı yardımcı T hücreleri tarafından sentezlenir. Temel görevi, aktive makrofajları inhibe ederek doğal ve hücre aracılı immün reaksiyonları düzenler.
TGF-β	1	390	19q13.1	7 ekzon, 23.17 kb	Aktive T hücreleri, mononükleer fagositler, ve diğer hücreler tarafından sentezlenir. T hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmaları ile makrofaj aktivasyonunu inhibe ederek proenflamatuvar sitokinlere karşı etkide bulunur.
IL-17A	1	155	6p12	3 ekzon, 4.25 kb	Fibroblastlar, endotelial hücreler, makrofajlar gibi hücrelerde salgılanarak proenflamatuvar reaksiyonlara katılırlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyal

3.1.1. Hastalar

Bu tez çalışması kapsamında medikal tedaviye direnç gösteren, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı'ndan takipli, gerekli tüm elektrofizyolojik, beyin görüntüleme ve klinik değerlendirme sonucunda mezyal temporal lob epilepsisi tanısı konmuş 20-63 yaş aralığındaki hastaların cerrahi olarak çıkarılan (selektif amigdalohipokampektomi $\pm$ anterior temporal lobektomi) hipokampus dokusu kullanılmıştır. Hastalar için cerrahi tedavi Şubat 2004- Nisan 2008 yılları arasında uygulanmıştır ve bu amaçla İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan alınan onay ekte sunulmuştur (2008/2697). Bu çalışma ile ilgili destek İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden alınmıştır. Tablo 3-1' de çalışmaya dahil edilme kriterleri sunulmuştur.

3.1.2. Sağlıklı Kontrol Dokuları

Bu çalışmada, bakılan genler açısından hastalarla karşılaştırmak üzere sağlıklı insanlardan elde edilen hipokampus materyali kullanılmıştır. Sağlıklı insanlardan hiçbir şekilde beyin dokusu elde etmek mümkün olmadığı için kullanılan materyal T.C. Adalet Bakanlığı, Adli Tıp Kurumu'nda yapılan otopsilerden elde edilmiştir. Bu olguların çalışmaya dahil edilebilmeleri için ölüm nedenlerinin merkezi sinir sistemine bağlı bir hasardan bağımsız olması ve ilk 24 saat içinde otopsinin yapılmış olma koşulu aranmıştır. Bu koşulları sağlayan 9 kontrol dokusu hasta-sağlıklı karşılaştırması yapmak üzere seçilmiştir.

Tablo 3-1 Hastaların Çalışmaya alınma kriterleri

-
- Uygun süre ve kombinasyonda kullanılan antiepileptik tedaviye dirençli
 - Beyin görüntüleme ve EEG incelemeleri ile mezyal temporal lob epilepsisi tanısı konmuş
 - Cerrahi tedavi uygulanmış (amigdalohipokampektomi $\pm$ anterior temporal lobektomi)
 - Bilgilendirilmiş onam formunu imzalayan
 - 20-63 yaşları arasında erkek veya kadın hasta
-

Tablo 3-2 Kontrol otopsi olgularının çalışmaya alınma kriterleri

-
- Santral sinir sistemini etkileyen bir olay haricindeki nedenlere bağlı bir ölüm olmaması
 - İlk 24 saat içinde otopsi uygulanmış olması
 - 18-65 yaşları arasında erkek veya kadın
-

3.1.3. Kimyasallar

B-Merkaptoethanol	Sigma, Almanya
Etil Alkol	Merck, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Bromfenol mavisi	Sigma, Almanya
Gliserol	Sigma, Almanya
Tris baz	Sigma, Almanya
Ponceau S	Sigma,Almanya
Sodyum florid	Sigma,Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Agaroz	invitrogen, İsviçre

3.1.4. cDNA sentez materyali

5X RT Buffer	MBI Fermentas, Litvanya
10 mM dNTP miks	MBI Fermentas, Litvanya
DTT	MBI Fermentas, Litvanya
RNaz inhibitör (20U/ μ l)	MBI Fermentas, Litvanya
Revers Transkriptaz (200 U/ μ l)	MBI Fermentas, Litvanya
Random primer	MBI Fermentas, Litvanya

3.1.5. Kullanılan tampon ve çözeltiler

Etidyum Bromür

Steril ddH₂O ile 10mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı.

Agaroz jel yükleme tamponu (50X)

10 ml steril ddH₂O içinde %0,25 Bromfenol mavisi, %30 gliserol olacak şekilde hazırlandı.

Tris-asetat EDTA-TAE (500 ml, 50X)

121 gr Tris baz, 28,5 ml glasiyal asetik asit, 50 ml EDTA 0,5M ddH₂O ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

Solüsyon D

10 ml EL (eritrosit lizis) çözeltisi içinde 100 μ l β -Mercaptoetanol eklendi.

Lysis Buffer

250 ml ddH₂O içinde 1mM Tris (pH:8) , 5M NaCl, 0.5M EDTA, 0.5M NaF, 25 ml %100 gliserol, 2.5ml NP40 olacak şekilde hazırlandı.

0.5 M Tris pH 6.8

15.1 gr Tris'e 250 ml'ye kadar ddH₂O eklenir. 5N HCl ile pH ayarı yapılır.

1.5M Tris pH 8.8

45.4 gr Tris'e 250 ml'ye kadar ddH₂O eklenir. 5N HCl ile pH ayarı yapılır.

Elektroforez Buffer

1000 ml ddH₂O içerisine 145 gr glisin, 30 gr tris, 50 ml %10 SDS eklenir.

3.1.6. Kullanılan cihazlar

Hassas terazi (Shimadzu)

Otomatik pipetler (Glison, Eppendorf)

Çeker ocak (Kermanlar)

Otoklav (Kermanlar)

Distile su cihazı (Millipore)

Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) (Arçelik, Sanyo, Bosch, Heraeus Sepatech)

Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)

Masaüstü mini santrifüj (Hettich, Eppendorf)

CCD kamera- bilgisayar donanımı (BIO-RAD)

Elektroforez aleti (Stratagene)

Güç kaynağı (Stratagene)

PZR cihazı (Techne)

Vorteks (Kermanlar)

Flow kabin (Thermo Scientific)

Spektrofotometre (Nanodrop)

VI-CELL cell viability analyzers (Beckman Coulter)

3.2. Yöntem

3.2.1. Klinik yöntem

Hastaların kişisel doğum, yaş, sosyal durum, mesleği, eğitim durumu gibi bilgilerin yanı sıra ayrıntılı özgeçmiş ve soygeçmiş özellikleri incelenmiştir. Nörolojik muayenenin yanı sıra tüm hastalar nöropsikolojik incelemeler yapılmıştır. Hastaların tedaviye yanıtları, kullandığı ilaçlar, EEG incelemeleri, kranyal MR görüntülemeleri ve cerrahi aday olarak değerlendirme sırasında nöbetlerin klinik ve elektrofizyolojik analizleri yapılmıştır. Cerrahi sonrası komplikasyonlar, nörolojik durum, nöbet, EEG ve görüntüleme takipleri yapılmıştır.

3.2.2. Cerrahi yöntem

Yapılan klinik değerlendirme ve laboratuvar bulguları sonrasında antiepileptik tedaviye dirençli olan hastalar cerrahi tedavi açısından incelenmiş ve epilepsi cerrahisi komisyonunda tartışılmıştır. Cerrahi tedavi öncesinde hasta ve hasta yakınları uygulanacak yöntem, komplikasyonları ve kontrendikasyonları açısından detaylı olarak bilgilendirilmiştir. Gerekli onay alındıktan sonra selektif amigdalohipokampektomi ve anterior temporal lobektomi yöntemi ile tedavi uygulanmıştır.

3.2.3. Örneklerin toplanması

Yazılı bilgilendirilmiş onam formu imzalandıktan sonra operasyon sırasında hazır bulunulmuş, cerrahi materyal serum fizyolojik içinde yıkandıktan sonra hemen sıvı azot tankı içine konarak -196 °C’ de dondurulmuş ve nöropatoloji laboratuvarında bulunan -80 °C sıcaklıktaki buzdolabına yerleştirilmiş ve takiben moleküler incelemenin yapılacağı Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalına azot tankı ile taşınarak tekrar -80 °C sıcaklıktaki derindondurucuya yerleştirilmiştir.

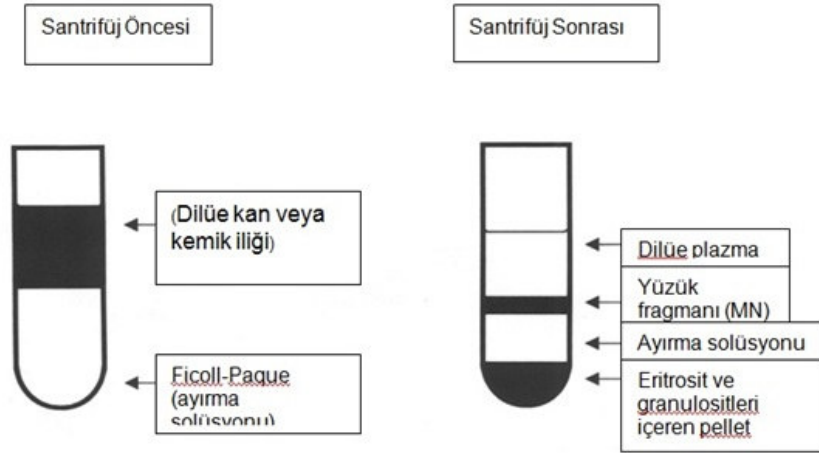
3.2.4. Moleküler genetik yöntem

3.2.4.1. Dokuların homojenizasyonu

Derin dondurucuda -80 °C’ da steril kaplarda saklanan beyin dokuları buz üzerine alındı. Doku homojenizasyonu için trizol kullanıldı (QIAzol Lysis Reagent, Qiagen science, USA). Her 100 mg doku için 1 ml trizol 15 ml’ lik falkon tüpe aktarıldı ve teflon uçlu homojenizatör ile doku partikülleri çıplak gözle görünmez oluncaya kadar parçalandı. Bu işlemten sonra homojenat 5 dakika oda sıcaklığında (15-25°C) beklemeye bırakıldı, 5 dakika sonunda 0,2 ml kloroform trizollü karışıma eklendi ve 15 saniye boyunca güçlü bir şekilde çalkalanarak iyice karışması sağlandı. Karışım tekrar oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildikten sonra 10000 rpm ve +4 °C’ da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılarak daha önceden koyulan her 1 ml trizol için 500 µl izopropanol eklendi, vorteks yardımı ile karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra karışım 10000 rpm ve +4 °C’ ta 10 dakika santrifüj edildi ve oluşan süpernatant atıldı. Oluşan çökeltiye her 1 ml trizol için 1 ml %75 etanol eklendi, pipetaj yapılarak çökeltinin etanol içinde dağılması sağlandı ve 7000 rpm’ de +4 °C’ da 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atılarak etanolün tamamen ortamdan uzaklaşması için kurumaya bırakıldı. Bu işlemin sonunda çökelti, RNA izolasyonu işlemine devam edilmek üzere 590 µl Rnase-free su ile sulandırıldı [65].

3.2.4.2. Fikol ile periferik kandan mononükleer hücrelerin izolasyonu

Pozitif kontrol amacıyla kullanmak üzere insanlardan alınan kan örneklerinden Fikol (Ficoll-hypaque) yöntemi kullanılarak lökosit izolasyonu yapılmıştır. Fikol ile ayırıştırma yöntemi yoğunluk gradientine dayanmaktadır. Pıhtılaşmamış kan veya kemik iliği örneği fosfat tampon çözeltisi ile (PBS) sulandırıldıktan sonra dikkatlice fikolun üzerine yayılır. 2060 rpm’de 15 dk. santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında tüpte 3 faz gözlemlenir. Örnekler; en altta sedimentasyona uğrayarak dibe çöken eritrositler ve yoğunlukları nedeniyle ayırıştırma solüsyonu olan fikolu geçebilen granülositler, orta fazda “buffy coat” adı verilen ve ayırıştırma fazının üstünde toplanan mononükleer hücreler (lenfosit, monosit, trombositler) en üst fazda ise plazma olacak şekilde ayrılırlar (şekil 3-1). Pasteur pipeti ile yeni tübe toplanan mononükleer hücreler trombositlerden uzaklaştırılmak için 2 defa PBS ile yıkanır. Elde edilen Lökosit pelleti 600µl SOLD (β -merkaptotanol + Guanidinium thiocyanate) içinde çözülerek, steril vidalı kapaklı tüpte -80°C ’de saklanır. Çalışmanın bu kısmında kullanılan materyalin tümü İ.Ü. DETAE, Genetik Anabilim Dalı laboratuvarına rutin moleküler inceleme amacıyla gelmiş ve istenen işlemler yapıldıktan sonra artan örneklerle ve bilgilendirilmiş onam formu imzalamış olan gönüllülerle sağlanmıştır.



Şekil 3-1 Fikol yöntemi kullanılarak tam kandan mononükleer hücre izolasyonu

3.2.4.3. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu total RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı (RNeasy lipid tissue minikit, Qiagen science, USA). Homojenizasyon işlemi sonunda oluşan lizat 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemin ardından lizatın içine 200 µl kloroform eklendi, güçlü bir şekilde 15 saniye boyunca çalkalanarak 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 14000 rpm ve +4°C’ de santrifüj edildi. Sulu üst faz yeni bir tüpe aktarılarak 1:1 oranında %70 etanol eklendi ve vorteks cihazı ile etanolün iyice karışması sağlandı. Meydana gelen karışım RNeasy 2 ml filtreli tüplere aktarıldı ve 15 s, 10000 rpm’ de santrifüj edildi. Bu işlemin ardından filtreden geçerek tüpte biriken sıvı atıldı. Aynı işlem 700 µl RW1 yıkama çözeltisi ve ardından 500 µl RPE yıkama çözeltisi ile tekrarlandı. Benzer şekilde 500 µl RPE yıkama çözeltisi filtreli tüpe eklenerek bu sefer 2 dakika 10000 rpm’ de santrifüj edildi ve tüpün içinde biriken sıvı tekrar atıldı. Bu işlemin ardından 2 ml’ lik RNeasy tüpten filtre kısmı çıkartılarak yeni 1,5 ml’lik tüpe yerleştirildi ve içerisine 30-50 µl Rnase-free su konularak 14000 rpm’ de 1 dakika boyunca +4 derecede santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda RNA filtreden tüpe Rnase-free su içinde çözülerek aktarılmış oldu [66].

3.2.4.4. RNA kalite tayini

RNA konsantrasyonu ve kalitesinin tayini için spektrofotometre (nd-1000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) kullanıldı. Ölçüm için 2 µl RNA kullanıldı, 260, 230 ve 280 nm dalgaboylarında spektrofotometrik incelemesi yapıldı. Sonuçlar 260 nm konsantrasyonu, 260nm/280nm ve 260nm/230nm ise saflığı verecek şekilde yorumlandı. 260nm/280nm oranının kabul aralığı 1.9-2.0, 260nm/230nm oranının kabul aralığı ise 2.0-2.2 olarak değerlendirildi. Bu aralıklar dahilinde kalan RNA’lar saflık açısından çalışmaya elverişli kabul edildi.

3.2.4.5. cDNA sentezi

Her örnek 10µl de 1µg RNA olacak şekilde sulandırıldı. 1µl random primer eklenerek 70°C’de 10 dakika bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı ilave edilmek üzere buza alındı(Tablo 3-3) [67]. Bu karışım, ilk karışıma eklendikten sonra 37°C’de 1 saat ardından da 70°C’de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

Tablo 3-3 cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon çözeltisi**Reaksiyon Karışımı (örnek başına)**

- 5X RT Buffer 4µl
- 10 mM dNTP mix 1µl X
- DTT (0,1M) 4µl
- RNase inhibitör (20U/µl) 1µl
- Revers Transkriptaz (200 U/ µl) 1µl
- Toplam 9µl

3.2.4.6. Pozitif kontrollerin hazırlanması

PZR pozitif kontrolleri, incelemesi yapılan genlerin, incelenen örnekler açısından negatif olması durumunda, uygulanan tekniğin çalışıp çalışmadığını gözlemlemek için gereklidir. Bu çalışmada incelenen genlerden *TNF-α*, *IL-1α* ve *IL-1β* ile ilgili pozitif kontrol, İ.Ü. DETAE, Genetik Anabilim Dalına rutin moleküler inceleme için gelmiş, istenen çalışmalar yapıldıktan sonra kalan materyallerden 4 kronik miyeloid lösemi hasta RNA' sı "havuz" yapılarak elde edildi. Yapılan çalışmalarda KML (kronik myeloid lösemi) hastalarının serumlarında proenflamatuvar sitokinlerin yüksek miktarlarda bulunduğu bilinmektedir [68]. Bu noktadan hareketle 4 KML hastasının periferik kanından izole edilen RNA materyali karıştırılarak daha önce belirtilen koşullarda cDNA sentezi yapıldı ve kantitatif PZR metoduyla ekspresyonun pozitifliği tespit edildi.

İncelenecek diğer genler için pozitif kontrol bulmak amacı ile İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.' na tanı amacı ile gelen 10 adet H1N1 pozitif hasta RNA' sı değerlendirildi. Ancak çalışma açısından istenen kriterler bu örnekler ile sağlanamadığı için pozitif kontrol üretmek amacı ile insan periferik kan mononükleer hücreleri PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)(Sigma-Aldrich Co. 2009) ve iyonomisin (Sigma-Aldrich Co. 2009) ile stimüle edildi [69-70]. Bu işlem için 2 insan periferik kanından ficol ile ayırma yöntemi uygulanarak mononükleer hücreler izole edildi. İzole edilen hücreler RPMI 1640 medyum (GIBCO® RPMI Media 1640, 2010 Life Technologies) 2 mM glutamine (GlutaMAX™, 2010 Life Technologies) ve %10 at serumu (GIBCO® Horse Serum, 2010 Life Technologies) içeren hücre kültürü çözeltisine mililitresinde $1,5 \times 10^6$ hücre olmak üzere toplamda 6×10^6 hücre 24' lük

platelere ekildi. Ekimin 20. saatinde hücre medyumları değiştirilerek stimülatör maddeler (PMA: 1µg/ml, iyonomisin: 0,75 µg/ml) eklendi. Hücreler stimülasyon işleminin 24. Saatinde toplanarak daha önce belirtilen koşullarda RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. Stimüle edilmiş hücrelerin çalışılan genler açısından pozitifliği, gerçek zamanlı kantitatif PZR metodu kullanılarak, stimüle edilmemiş insan periferik kan mononükleer hücreleri ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi.

3.2.4.7. Referans genlerin belirlenmesi

Referans genler her dokuda eşit miktarda ekspresyonunun olduğu bilinen genlerdir. Verilerin normalizasyonu gerçek zamanlı PZR yönteminde gen kantifikasyonu için majör bir basamaktır [71]. Bu genlerin anlatım düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı PZR ile ölçülerek, excell bazlı GeNorm yazılımı (V3.4, Belgium) ile analiz edildi. GeNorm herbir deney için en uygun aday referans genlerin belirlendiği bir sistemdir. Alt yapıyı oluşturan prensipler ve formüller Vandesompele ve ark. tarafından tanımlanmıştır [72]. Bu çalışmada analizler sonucunda normalizasyon için *ABL*, *B-actin*, *GAPDH*, *siklofilin*, *HPRT*, *TBP*, *MRL* olmak üzere toplamda 7 referans geni analiz edilmiş ve *ABL*, *siklofilin* çalışma grubunda en stabil olan referans genler olarak belirlenmiştir (*Cylophilin* ve *ABL*). Bu çalışmada 5 hasta örneği ve 5 kontrol örneği kullanılmıştır. Amaç kantitatif PCR yöntemi öncesi örneklerimizde referans gen değerlendirmesinin yapılmasıdır. Her örnek duplike olarak çalışıldı ve rölatif ekspresyon değerleri Livak ve ark.'nın matematik modeline dayalı, delta-delta Ct metoduna göre hesaplanmıştır [73-74]. Elde edilen sayısal değerler Genorm programına yüklenerek analiz edildi. Şekil 3-2' de incelenen referans genlerin %mRNA olarak değerleri gösterilmiştir. Abl en stabil, HPRT ise en kararsız gen olarak dikkati çekmektedir.

3.2.4.8. Gerçek zamanlı kantitatif floresan PZR ile gen ekspresyonu analizi

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (Real-time PCR) nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottur. “Real-time PCR”da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probaların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır [75]. Amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Çift zincirli DNA’ya bağlanan “SYBR-Green I” floresan boya ekspresyon çalışmalarında basitliği nedeniyle en çok kullanılan metotlardan biridir [76].

3.2.4.9. Genlerin belirlenmesi

İncelenmesi planlanan genlere özgü primerlerin belirlenmesinde primer dizayn programı (CLC Main Workbench V 5.0.2 CLCbio, Danimarka) kullanılmış, ilgili yayınlardaki bilgiler ve internet sayfaları incelenmiştir. İncelenen genlerin listesi Tablo 3-4’ te, primer dizileri, ürün boyları Tablo 3-5’ te verilmiştir. Ayrıca primerler ve amplifikasyon bölgeleri Şekil 3-4’ te gösterilmektedir.

Tablo 3-4: Genetik incelemesi yapılan genlerin listesi

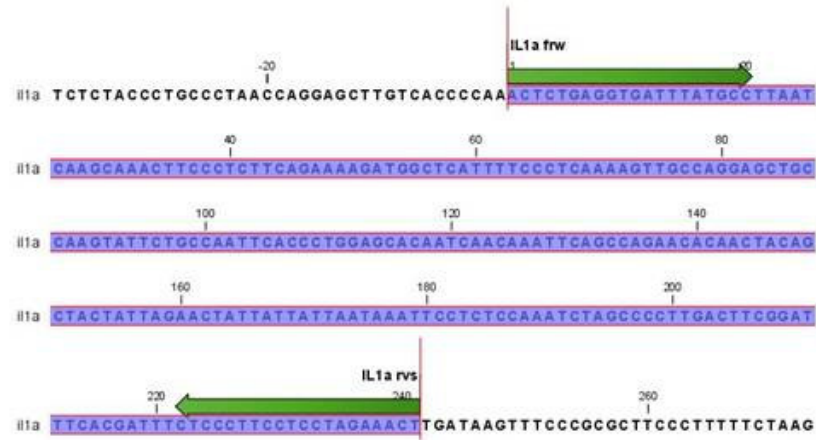
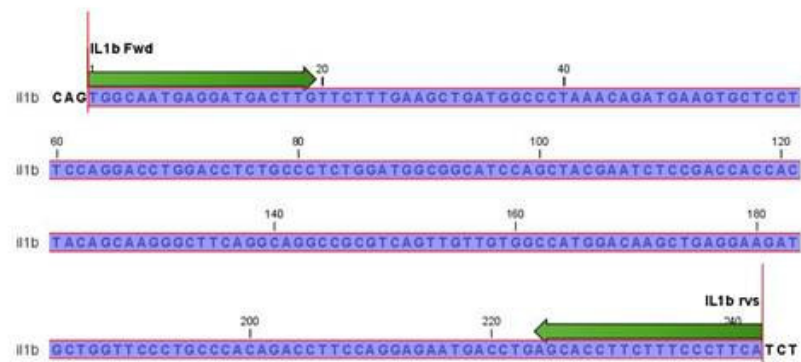
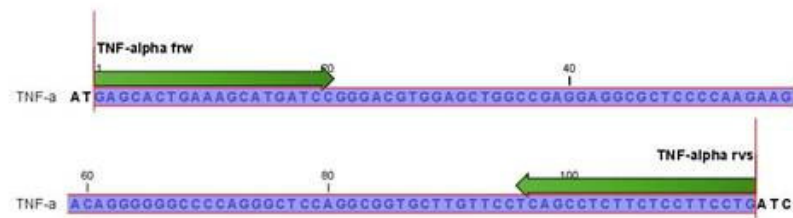
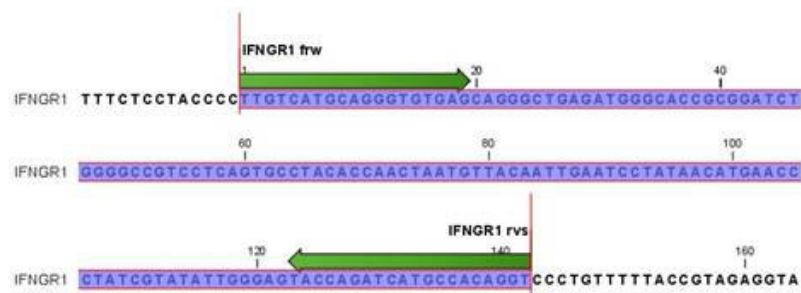
<i>IL1-α</i>	İnterlökin 1 alfa
<i>IL1-β</i>	İnterlökin 1 beta
<i>TNF-α</i>	Tümör nekroz factor alfa
<i>IFN-γR1</i>	İnterferon gamma reseptör 1
<i>IL2</i>	İnterlökin 2
<i>IL6</i>	İnterlökin 6
<i>IL12</i>	İnterlökin 12
<i>IL10</i>	İnterlökin 10
<i>TGF-β</i>	Transforming Growth Factor beta
<i>IL17</i>	İnterlökin 17

3.2.4.10. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

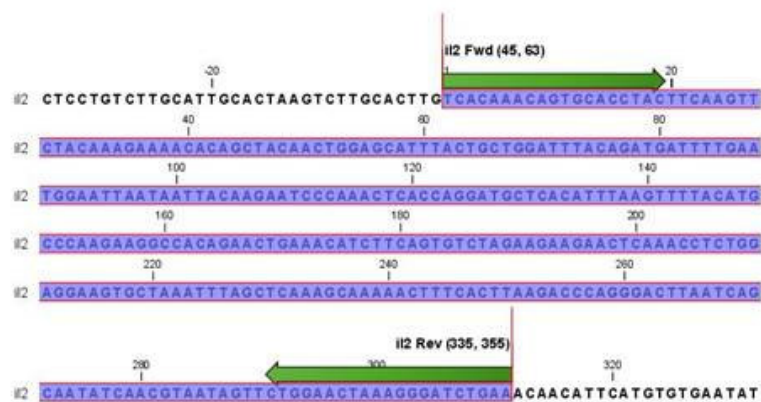
SYBR-Green I metodu (LightCycler ® FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Applied Science, İstanbul-Türkiye) için reaksiyon karışımı uygun primerlerle (1.5 μ l dH₂O, 1 μ l primer, 5 μ l master mix) hazırlanarak toplamda 7.5 μ l olarak 96 kuyu içeren plakalara konuldu. Hazırlanan plakalara daha önce sentezlenen cDNA’lar her kuyuya 2 μ l olacak şekilde dağıtıldı ve ekspresyon çalışması için gerçek zamanlı PZR cihazına konuldu (LightCycler ® 480 Real-Time PCR System, Roche Applied Science, İstanbul-Türkiye). Çoğaltılan DNA’nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek ve primer-dimer gibi ürünleri analizden çıkartabilmek için erime eğrisi analizi (“melting curve”) yapıldı (102,103).

Tablo 3-5: Kullanılan primerlerin nükleotid dizileri, boyları ve ürün boyları

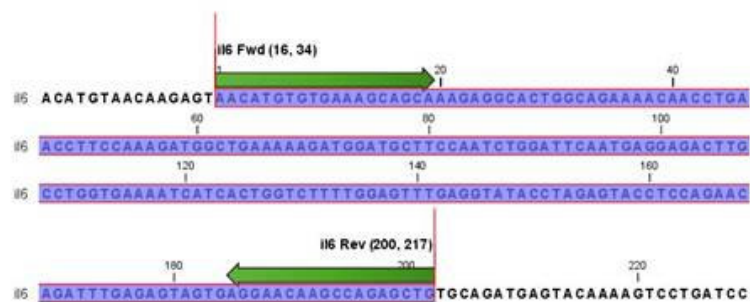
Gen Adı	Primer Dizisi	Primer Boyu	Ürün boyu
<i>IL1-α</i>	F 5'-ACTCTGAGGTGATTTATGCC-3'	20	241
	R 5'-AGTTTCTAGGAGGAAGGGAG-3'	20	
<i>IL1-β</i>	F 5'-TGGCAATGAGGATGACTTG-3'	19	242
	R 5'-TGAAGGGAAAGAAGGTGCT-3'	19	
<i>TNF-α</i>	F 5'-GAGCACTGAAAGCATGATCC-3'	20	115
	R 5'-CAGGAAGGAGAAGAGGCTGA-3'	20	
<i>IFN-γR1</i>	F 5'-TTGTCATGCAGGGTGTGAG-3'	19	142
	R 5'-ACCTGTGGCATGATCTGGTA-3'	20	
<i>IL2</i>	F 5'-TCACAAACAGTGCACCTAC-3'	19	311
	R 5'-TTCAGATCCCTTTAGTTCCAG-3'	21	
<i>IL6</i>	F 5'-AACATGTGTGAAAGCAGCA-3'	19	202
	R 5'-CAGCTCTGGCTTGTTCCCT-3'	18	
<i>IL12</i>	F 5'-TTACCATCTTTGCCTCTGCG-3'	20	270
	R 5'-TAACTTGGGTCTCTGTGGG-3'	19	
<i>IL10</i>	F 5'-TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA-3'	20	179
	R 5'-TGATGTCTGGGTCTTGGTTC-3'	20	
<i>TGF-β</i>	F 5'-AAGTGTTCCCTCCAAAGTGC-3'	20	102
	R 5'-TGGACATCACACACCCTTCT-3'	20	
<i>IL17</i>	F 5'-AGTGAAGGCAGGAATCACAA-3'	20	101
	R 5'-GGTTATGGATGTTTCAGGTTGA-3'	21	
<i>Siklofilin</i>	F 5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3'	24	127
	R 5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'	23	
<i>ABL</i>	F 5'-TTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTT-3'	25	277
	R 5'-CTGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT-3'	27	

IL1- α IL1- β TNF- α IFN- γ R1

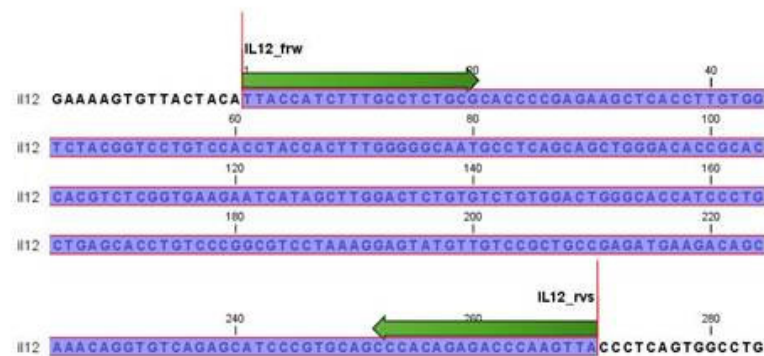
IL2



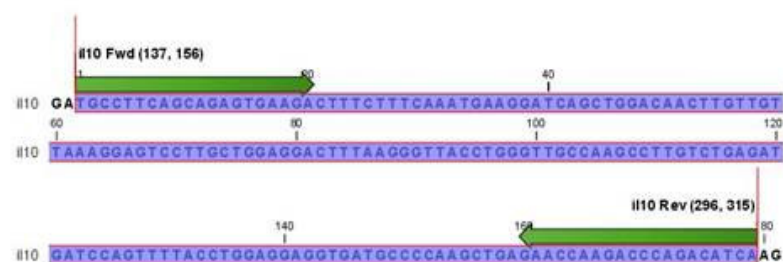
IL6

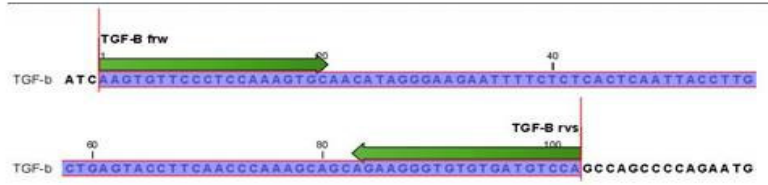


IL12

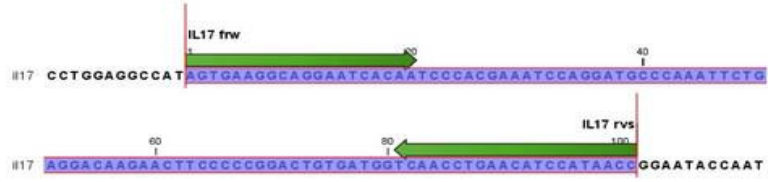


IL10



TGF- β 

IL17



Şekil 3-2: Primerler ve amplifikasyon bölgelerinin şematik görünümü

Şekil 3-3: IL1- β için PZR amplifikasyon eğrilerini gösteren Light Cycler 480 yazılımı görüntüsü.



Şekil 3-4: IL1- β ile çalışan PZR için Light Cycler 480 yazılımında “Melting Curve” analizi görüntüsü.

3.2.5. İstatistiksel analiz

Rölatif kantifikasyonda tek bir örnekte iki farklı dizinin (hedef gen ve referans gen) ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Örnek normalizasyonuna temel oluşturmak üzere bu çalışmada ABL ve siklofilin, geni referans olarak kullanıldı. Ekspresyon düzeyini rölatif olarak hesaplamak için çeşitli matematiksel modeller içinden $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile Graphpad ve SPSS yazılımları kullanıldı [74, 77]. Normal ve hasta dokularda elde edilen ekspresyon değerleri nonparametrik Mann Whitney U (MWU) testiyle değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

4.1.1. Hastaların Genel Özellikleri

Çalışmaya 4 kadın 5 erkek olmak üzere toplam 9 hasta katılmıştır. Yaş ortalamaları 36’ dır. Hastalara ait bazı özellikler Tablo 4.1.’ de özetlenmiştir.

4.1.1.1. Özgeçmiş Özellikleri

Doğum ve Kafa Travması: Hastaların ikisinin (H15, H24) 1,5 ve 2 yaşında kafa travması yaşadığı belirtildi. 2 hastanın ise daha önce, biri zor doğumla birlikte olmak üzere, menenjit geçirdiği belirtildi (H8, H21). Bunların dışında 1 hastanın doğumunun evde gerçekleştiği tespit edildi (H13).

Febril Nöbet: Hastaların 4’ ünde (% 44.5) febril nöbet öyküsü vardı. Bunlardan biri (H3) 2 yaşında 1 kere olmak üzere komplike febril nöbet geçirmişti. Bir diğer hasta (H8) 8 aylıkken sağ hemiparezi nedeniyle hastaneye kaldırılmıştı. H13’ ün, 7 aylıkken 7 saat süren bir sol hemikonvülziyon geçirdiği belirtildi, H24’ ün ise 6 aylıkken bir febril nöbet geçirdiği fakat süresi ve tarafının hatırlanmadığı bildirildi. Bunların dışında bir hastanın 2.5 yaşında baygın bulunduğu ve bir hafta hastanede yattığı belirtildi.

Psikiyatrik hastalık: Hastaların birinde majör depresyon, bir diğerinde obsesif kompulsif bozukluk olduğu saptandı. Bir hastada ise depresif uyum bozukluğu olduğu belirtildi.

Tablo 4-1: Hasta ve Kontrol olgularının genel özellikleri

Genel Özellikler	Epilepsi Olguları	Otopsi Olguları
Cinsiyet (kadın/erkek)	4/5 (9)	1/8 (9)
Yaş ortalama (yıl)	36 (20-63)	42.8 (1-72)
Nebet Başlangıç Yaşı (yıl)	15.9 (7-34)	-
Ameliyat yaşı (yıl)	34.9 (19-63)	-
Nöbet-Ameliyat süresi	20.6 (9-35)	-

4.1.1.2. Soygeçmiş Özellikleri

Ailede epilepsi ve febril nöbet öyküsü: Toplam 9 hastanın 4' ünün ailesinde febril nöbet ya da epilepsi vardı. Ayrıca hiç bir hastanın soygeçmişinde akraba evliliğinin olmaması da dikkat çekiciydi. 4 hastanın birinin anneannesinde, diğerinin ise amca kızında epilepsi öyküsü (H8, H21), kalan ikisinin de birinin kızı diğerinin dayısında olmak üzere febril nöbet öyküsü vardı (H15, H13).

4.1.1.3. Nöbet Özellikleri:

Nöbetlerin başlama yaşı: Hastalardan 1' i hariç hepsinin nöbet başlama yaşı 7-34 yaş arasındaydı. Aralığın dışında kalan hastanın nöbetleri 1 yaşın altında 8 aylıkken başlamıştı. Hastaların 2' sinde birinde 9 yıl diğerinde 5 yıl olmak üzere nöbetsiz dönem tanımlanmaktaydı (H15, H19). Hastaların hiçbirinde SE ve remisyon öyküsü yoktu. Hastalara ait klinik özellikler Tablo 4-2' de özetlenmiştir.

Nöbet tipleri: Hastaların hepsinde kompleks parsiyel nöbetler (KPN) ve hastalardan biri hariç hepsinde bu nöbetlere eşlik eden sekonder jeneralize nöbetler (SJN) görülmektedir. Hastalardan ikisinde (H13, H15) SJN' ler tedavi sonrasında sona ermişti. Nöbetler içinde, yukarı doğru yükselen sıkıntı, daralma hissi, nefesi kesilecek gibi olma, bitkinleşme, ağız ve dudaklarda yalanma, yutkunma hareketleri, ellerde kasılmalar, otomatizmalar ve benzeri semptomlar dikkati çekmekteydi.

Nöbet sıklığı: Hastalardaki ameliyat öncesi nöbet sıklığı ortalama ayda 3.5 nöbet olmak üzere ayda 1-2 ile 6-8 arasında değişmekteydi.

Tablo 4-2: Hastaların klinik, prognoz, ve uygulanan cerrahi tedavi özellikleri

No	Doğum Yılı	Cinsiyet	Febril Nöbet	Özgeçmiş	Aile öyküsü	Nöbet başlama yaşı	Cerrahi taraf-Ameliyat şekli	Nöbet-Ameliyat süresi (yıl)	Ameliyat yaşı
H3	1972	K	+	N	Yok	11	Sol SAH	21	32
H6	1976	E	-	N	N	20	Sol SAH	9	29
H8	1983	E	+	Menenjit	Anneannede 65 yaşında epilepsi	7	Sol AH+ATL	17	24
H13	1975	K	+	Doğum	Dayıda FN	22	Sağ AH+ATL	10	32
H15	1945	K	-	KT	Kızında FN	34	Sol SAH	29	63
H19	1970	K	-	N	N	14	Sağ AH+ATL	24	38
H20	1962	E	-	N	İki dayıda psikiyatrik hastalık	10	Sol SAH	35	45
H21	1975	E	-	Menenjit	Amcaksızı epilepsi ile ölmüş	8 ay	Sol AH+ATL	31	32
H24	1988	E	+	KT-BK	N	7	Sol AH+ATL	9	19

4.1.1.4. Tedavi

Hastaların biri dışında (H19) hepsi 2’li veya 3’lü antiepileptik ilaç kombinasyonu ile tedavi altındaydı. Tedavi süreçleri içinde çeşitli ilaç kombinasyonları kullanılmıştı. Hastalar arasında en çok kullanılan antiepileptik ilaç karbamazepin (% 66.7) en az kullanılan ilaç ise fenobarbital idi (%11.1).

4.1.1.5. Lezyon durumu

Hastalara EEG, MRG ve diğer beyin görüntüleme tetkikleri sonucunda, 7’ sinde sol, 2’ sinde sağ tarafta olmak üzere hipokampal skleroz tanısı konmuştu.

4.1.1.6. Cerrahi Tedavi

Hastaların dördüne selektif amigdalohipokampektomi (SAH), beşine ise amigdalohipokampektomi ve anterior temporal lobektomi (AH+ATL) uygulanmıştır. SAH uygulanan hastaların dördünde de lezyon sol tarafta, AH+ATL uygulanan hastaların 3’ünde lezyon sol tarafta 2’ sinde ise sağ tarafta idi. Ameliyatların tamamı

İTF Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda epilepsi cerrahisi ile ilgilenen 4 öğretim görevlisi tarafından yapıldı. Hastaların ameliyat yaşı ortalaması 34,9 yıl' dı.

4.1.1.7. Cerrahi Sonrası Takip

Hastaların 6'sında cerrahi sonrası komplikasyon görüldü. Bunlardan H6' da 4.sinir felci, H15' te 3. sinir felci, H19' da menenjit, H20' de sol optik sinir geçici hasarı, H21' de sağ hemiparezi ve hemihipoestezi, H24' te ise parotit gözlenmiştir. Postoperatuar dönemde yapılan incelemelerde belirtilen komplikasyonlar dışında bir bulguya rastlanmamıştır. Operasyona bağlı mezyal temporal ve anterior bölgelerde ensefalomalazi alanları saptanmıştır.

Cerrahi sonrası takip süresi 4 ay ile 4 yıl arasında değişmekteydi. Hastalardan biri hariç (H3) hepsinde antiepileptik tedaviye devam edildi. 5 hastada operasyon sonrası nöbetler tamamen durmuştu. Bunun yanında H6' da 3. yılda ilaç kesimi ile nöbetler tekrar başlamıştı. Diğer hastalarda operasyon sonrası nöbet sıklığında değişken azalmalar vardı. Nöbet tiplerinde operasyon öncesi ve sonrası arasında bir değişiklik yoktu.

4.1.1.8. Kontrol Otopsi Olguları

Kontrol dokuları T.C. Adalet Bakanlığı, Adli Tıp Kurumu' nda görevli Uzm. Dr. Sinem Akat ve Uzm. Dr. İbrahim İzin tarafından yapılan otopsiler sırasında mezyal temporal bölgede hipokampus ve amigdala dokusunun çıkarılması ile elde edilmiştir. Olgulardan 8' i erkek 1 tanesi ise kadındır. Yaş ortalamaları 1 yaşında olan N4 dışında bırakıldığında 48 olarak hesaplanmaktadır. Bu olguların tamamının ölüm nedeni nörolojik nedenler dışındadır ve öykülerinde epilepsi bulunmamaktadır. Ölüm nedenleri kalp damar hastalığı, ateşli silah yaralanması, gastroenterit, kesici-delici alet yaralanması, ilaç intoksikasyonu gibi değişken nedenlerdir. Otopsi ölüm anından itibaren 24 saat içinde yapılmıştır. Alınan dokular hemen sıvı azot tankına konularak İ.Ü. DETAE' ye ulaştırılmıştır.

Tablo 4-3: Otopsi olgularının klinik özellikleri ve ölüm nedenleri

No	Cinsiyet	Boy (cm)	Ağırlık (kg)	Yaş (yıl)	Ölüm nedeni
N2	E	176	92	37	Kalp damar hastalığı
N3	E	182	76	34	Ateşli silah yaralanması
N4	E	76	9	1	Gastroenterit
N5	E	184	82	62	Kalp damar hastalığı
N6	E	180	76	50	Kesici-delici alet yaralanması
N7	E	170	67	73	Ası ile intihar
N8	E	160	68	38	Kalp damar hastalığı
N9	K	158	61	21	İlaç intoksikasyonu
N10	E	177	70	70	Femur kırığına bağlı yağ embolisi

4.2. Genetik İnceleme Bulguları

4.2.1. Referans Genler

Referans genler GeNorm yazılımı ile 7 referans gen arasından seçilmiştir. Yapılan analiz sonucunda ABL geni hipokampus dokusunda eksprese olması açısından en kararlı, HPRT ise en kararsız gen olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre ABL ve Siklofilin geni referans gen olarak seçilmiştir. Şekil 4-1' de incelenen referans genlerin mRNA ekspresyon değerleri ve GeNorm çıktısı gösterilmiştir.

								
Change Data	abl	B-aktin	GAPDH	siklofilin	HPRT	TBP	MRPL28	Normalisation Factor
N1	2.42E+01	1.91E+01	1.95E+01	1.93E+01	2.45E+01	2.96E+01	2.53E+01	0.9841
N4	2.70E+01	2.22E+01	1.92E+01	2.26E+01	2.72E+01	3.34E+01	2.78E+01	1.0918
N8	2.45E+01	1.81E+01	1.89E+01	1.92E+01	2.41E+01	2.72E+01	2.38E+01	0.9506
N9	2.50E+01	1.89E+01	1.97E+01	2.03E+01	2.62E+01	2.75E+01	2.71E+01	1.0054
N10	2.31E+01	1.72E+01	1.92E+01	1.83E+01	2.29E+01	2.56E+01	2.41E+01	0.9182
H14	2.90E+01	2.33E+01	1.80E+01	2.35E+01	2.92E+01	2.78E+01	3.05E+01	1.1029
H15	2.60E+01	2.03E+01	2.06E+01	2.06E+01	2.51E+01	2.80E+01	2.77E+01	1.0288
H16	2.37E+01	1.79E+01	1.84E+01	1.88E+01	2.40E+01	2.56E+01	2.54E+01	0.9400
H17	2.58E+01	2.00E+01	2.05E+01	2.01E+01	2.58E+01	2.75E+01	2.81E+01	1.0245
H21	2.33E+01	1.71E+01	1.81E+01	1.89E+01	3.28E+01	2.55E+01	2.55E+01	0.9706
M < 1.5	0.086	0.105	0.143	0.087	0.171	0.124	0.096	

Şekil 4-1: İncelenen referans genlerin mRNA ekspresyon değerleri

4.2.2. Sitokinlerin mRNA Ekspresyonunun Kantifikasyonu

MTLE hastalarından ve otopsi materyallerinden elde edilen beyin dokusu materyalinden yöntem kısmında anlatıldığı gibi RNA ve cDNA sentezi yapıldı, bunu takiben gerçek zamanlı PZR yöntemi ile Ct değerleri elde edildi. **Tablo 4-4'** te otopsi dokuları ve Tablo 4-5' te hastaların delta delta Ct yöntemi ile hesaplanan rölatif yüzde mRNA ekspresyon değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4-4: Otopsi olgularının ABL ve Siklofilin genlerine göre rölatif mRNA ekspresyonu değerleri

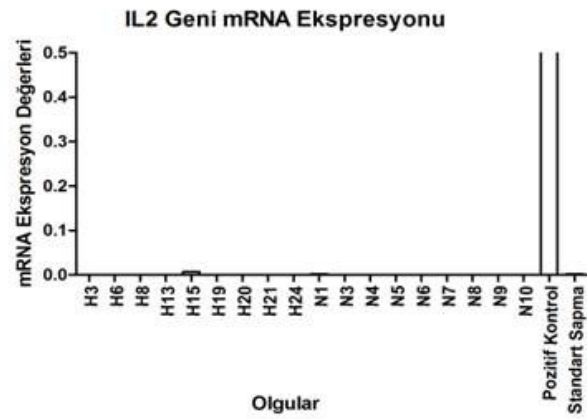
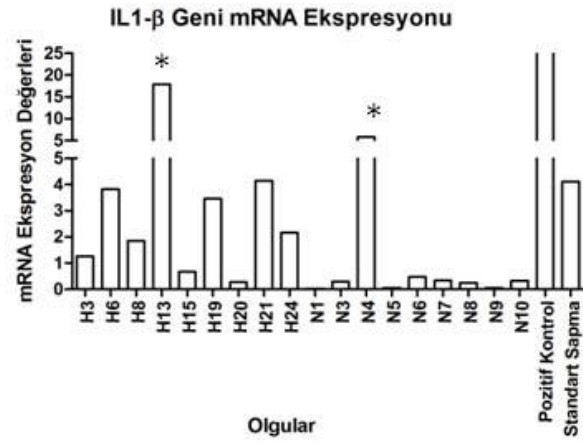
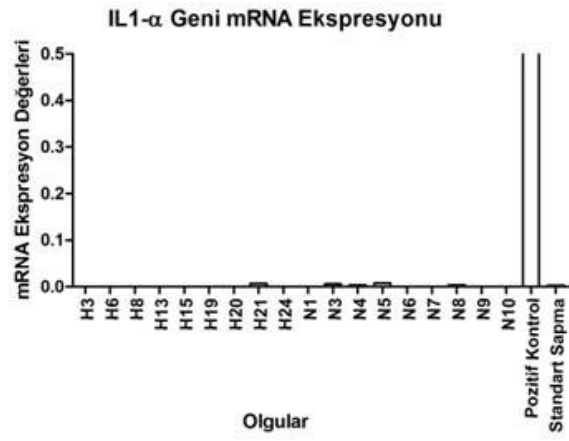
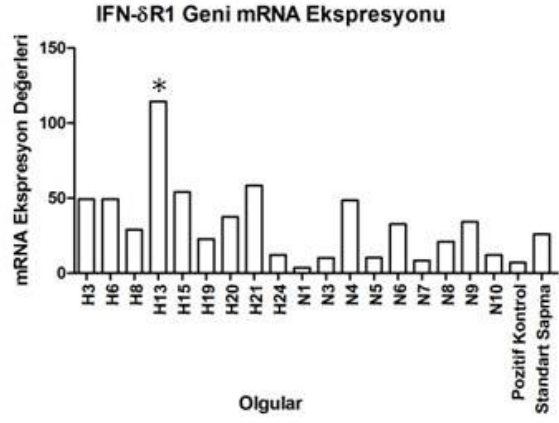
	<i>IL1-α</i>	<i>IL1-β</i>	<i>IL17</i>	<i>IL12</i>	<i>TGF-β</i>	<i>IL10</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL6</i>	<i>IFN-γR1</i>	<i>IL12</i>
N2	0,00001	0,0176	0,0921	0,0157	5,10	0,0054	0,0155	0,0058	3,5547	0,0022
N3	0,00597	0,2979	0,00	0,0257	17,18	0,0547	0,1821	0,0331	10,22	0,00
N4	0,0040	<u>5,84</u>	0,00	0,0250	20,48	0,0536	<u>7,8947</u>	0,00	48,53	0,00
N5	0,00770	0,0473	0,00	0,0250	12,20	0,0397	0,1995	0,0165	10,33	0,00
N6	0,00	0,4687	0,00	0,1698	27,79	0,0942	0,1443	0,0564	32,71	0,00
N7	0,00023	0,3355	0,00	0,00	17,87	0,0214	0,1538	0,00	8,48	0,00
N8	0,00378	0,2513	0,0119	0,0790	17,00	0,1024	0,4198	0,0204	21,01	0,00
N9	0,00004	0,0564	<u>4,5250</u>	0,0847	17,18	0,0128	0,1283	0,0351	34,13	0,00
N10	0,00	0,3287	0,0145	0,0857	9,16	0,0442	0,0208	0,0220	12,17	0,00
Standart Sapma	0.003	0.155	1.491	0.052	6.364	0.034	0.118	0.017	10.735	0.001

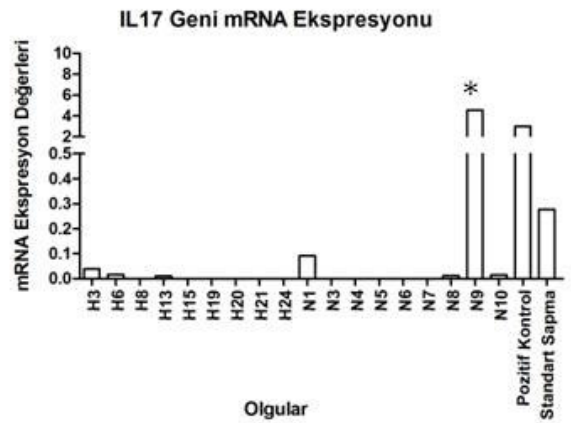
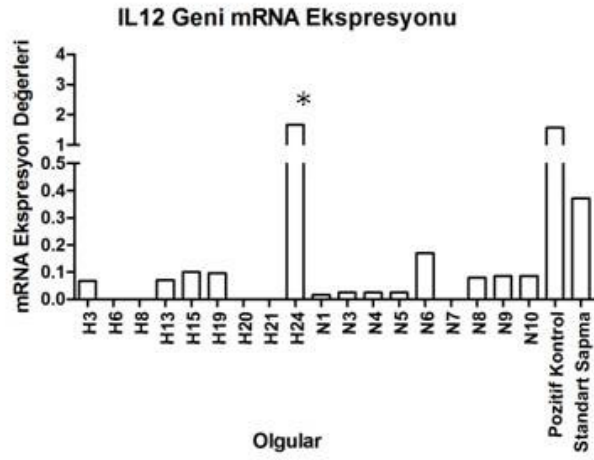
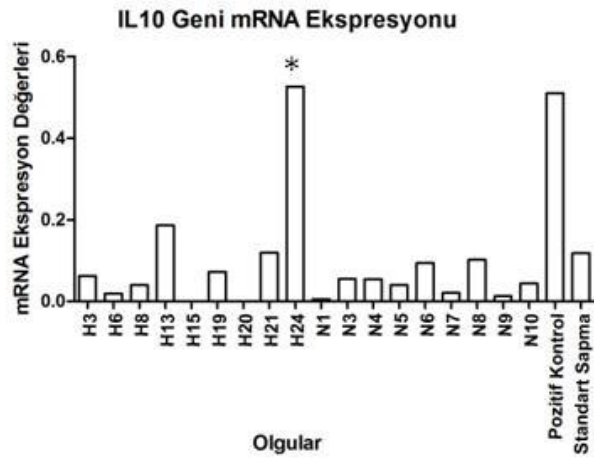
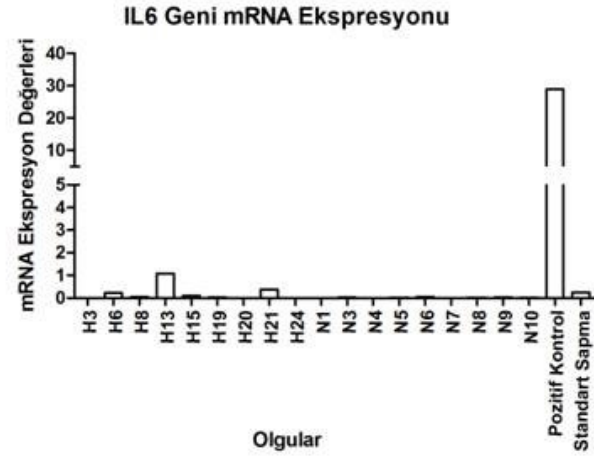
Not: Altı çizili olan sayılar, normal dağılımdan yüksek ekspresyon gösteren değerler

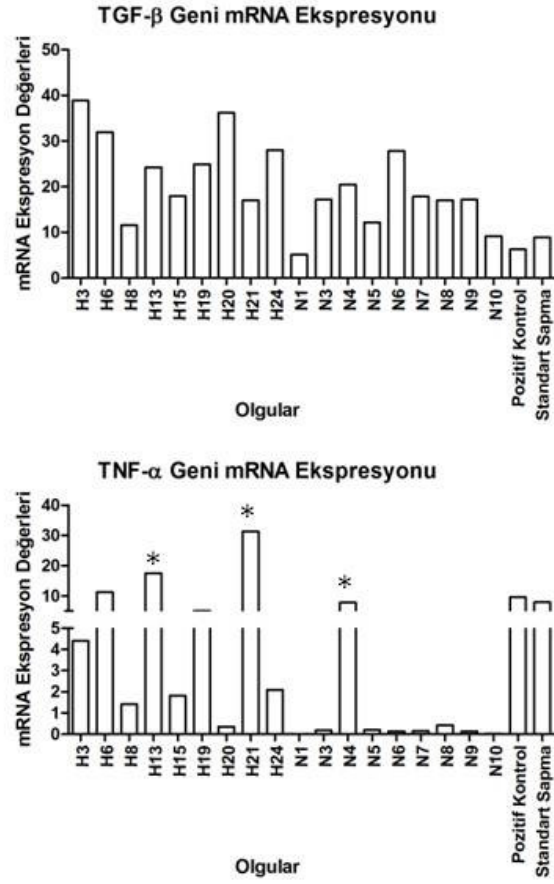
Tablo 4-5: Hipokampal skleroz olgularında *ABL* ve *Siklofilin* genlerine göre rölatif mRNA ekspresyon değerleri

	<i>IL1-α</i>	<i>IL1-β</i>	<i>IL17</i>	<i>IL12</i>	<i>TGF-β</i>	<i>IL10</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL6</i>	<i>IFN-γR1</i>	<i>IL12</i>
H3	0,0001	2,261	0,039	0,068	38,852	0,062	4,407	0,00	49,35	0,00
H6	0,00	3,818	0,016	0,00	31,950	0,019	11,296	0,234	49,27	0,00
H8	0,00	1,850	0,00	0,00	11,571	0,040	1,412	0,063	28,99	0,00
H13	0,00	<u>17,853</u>	0,011	0,070	24,219	0,186	<u>17,486</u>	1,082	<u>114,41</u>	0,00
H15	0,00	0,665	0,00	0,100	17,946	0,00	1,816	0,102	54,02	0,007
H19	0,00	3,464	0,00	0,096	24,890	0,072	5,107	0,039	22,82	0,00
H20	0,00	0,275	0,00	0,00	36,172	0,00	0,354	0,00	37,45	0,00
H21	0,007	4,140	0,00	0,00	17,024	0,119	<u>31,330</u>	0,381	58,26	0,00
H24	0,00	2,157	0,00	1,663	28,031	0,526	2,091	0,00	12,24	0,00
Standart Sapma	0,002	5,085	0,013	0,511	8,596	0,156	9,662	0,331	27,764	0,002

Not: Altı çizili olan sayılar, normal dağılımdan yüksek ekspresyon gösteren değerler







Şekil 4-2: Hipokampal skleroz ve kontrol olgularının gen ekspresyonları dağılım grafikleri
(Standart sapmadan yüksek olan değerler (*) ile ifade edilmiştir)

Tablo 4-6: Ekspresyon değerleri normal dağılımdan farklı olan olguların özellikleri

Gen	Ekspresyon değerleri farklı olan olgular
<i>IL1-β</i>	N4: 1 yaşında erkek. Ölüm nedeni: Gastroenterit H13: 34 yaşında kadın, 6 aylıkken 7 saat süreli FN, evde doğum, dayıda FN, 22 yaşında nöbetleri başlamış, 10 yıl sonra opere, sağ AH+ATL
<i>TNF-α</i>	N4: 1 yaşında erkek. Ölüm nedeni: Gastroenterit H13: 34 yaşında kadın, 6 aylıkken 7 saat süreli FN, evde doğum, dayıda FN, 22 yaşında nöbetleri başlamış, 10 yıl sonra opere, sağ AH+ATL H21: 33 yaşında erkek, 8 aylıkken memenjit tanısı ile hastaneye kaldırılmış, taburcu olduktan sonra jeneralize konvülzyon geçirmiş, 8 aylıkken nöbetleri başlamış, 30 yıl sonra opere, sol AH+AHL
<i>IL10</i>	H24: 20 yaşında erkek, 6 aylıkken febril nöbet geçirmiş, 1.5 yaşında kafa travması öyküsü var, nöbetler başladıktan 9 sene sonra opere, mental retardasyon var.
<i>IL12</i>	H24: 20 yaşında erkek, 6 aylıkken febril nöbet geçirmiş, 1.5 yaşında kafatravması öyküsü var, nöbetler başladıktan 9 sene sonra opere, mental retardasyon var.
<i>IL17</i>	N9: 21 yaşında kadın. Ölüm nedeni: İlaç entoksikasyonu
<i>IFN-γRI</i>	H13: 34 yaşında kadın, 6 aylıkken 7 saat süreli FN, evde doğum, dayıda FN, 22 yaşında nöbetleri başlamış, 10 yıl sonra opere, sağ AH+ATL

4.2.3. Sitokinlerin mRNA ekspresyonlarının hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırılması

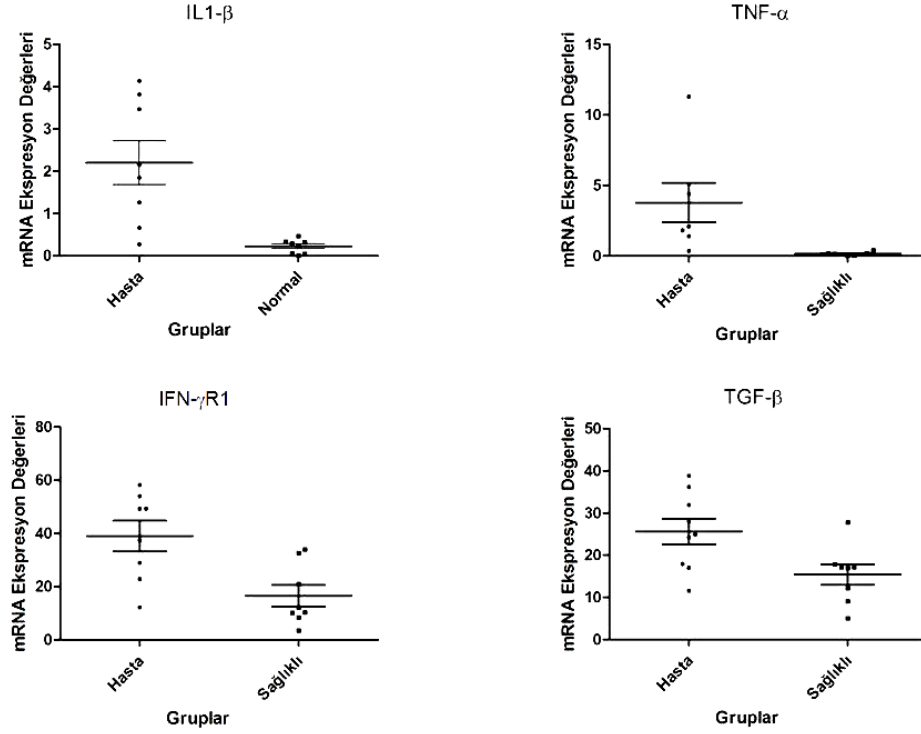
Bu veriler sayısal olarak ifade edilmekle birlikte, örneklemin birbirinden bağımsız ve rastgele seçilmiş ve bağımlı değişkene ilişkin ölçümlere göre oran ölçeğinde olması ve gaussian dağılım göstermemesi nedeniyle hasta ve kontrol olgularının değerleri, non-parametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır (98).

Yapılan istatistiki analizde, hasta bireylerin dokularındaki *IL12*, *IL10*, *IL6* ekspresyon düzeylerinin sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken (sırasıyla; $P=0.73$, $P=0.59$, $P=0.24$) hastalardaki *IL1- β* , *TNF- α* , *IFN- γ* ve *TGF- β* ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre anlamlı bir artış gösterdiği saptandı

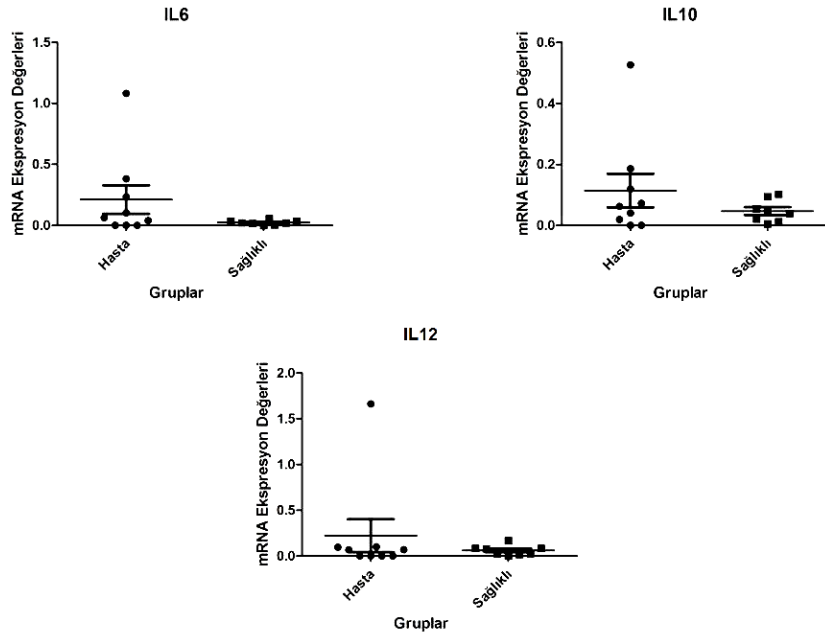
($P= 0.001$, $P= 0.0006$, $P= 0.007$, $P= 0.027$). Bunun yanında *IL1- α* ve *IL2*' nin ekspresyonuna mRNA düzeyinde rastlanmamışken, *IL17*' nin ekspresyonuna ise 2 sağlıklı kontrol dışında rastlanmamıştır. mRNA düzeyinde ekspresyonuna rastlanmamıştır. Bu bulgulara ilişkin sonuçlar Tablo 4-6' da özet olarak sunulmuştur.

Tablo 4-7 : Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarının istatistiki değerleri ve Mann-Whitney U testi sonuçları

	Standart Sapma (Hastalar)	Standart Sapma (Kontrol)	Geometrik Ortalama (Hastalar)	Geometrik Ortalama (Kontrol)	MWU, P Değeri	İstatistiki Anlamlılık
<i>IL1-β</i>	5,085	0,155	1,74	0,22	0,0019	Var
<i>IL12</i>	0,511	0,052	0,11	0,05	0,073	Yok
<i>TGF-β</i>	8,596	6,364	21,27	14,54	0,027	Var
<i>IL10</i>	0,156	0,034	0,07	0,03	0,596	Yok
<i>TNF-α</i>	9,662	0,118	2,58	0,17	0,0006	Var
<i>IL6</i>	0,331	0,017	0,13	0,02	0,24	Yok
<i>IFNγR1</i>	27,764	10,735	31,29	15,23	0,007	Var



Şekil 4-3: İstatistiki olarak anlamlı çıkan genler; *IL1-β*, *TNF-α*, *IFN-γ* ve *TGF-β* için dağılım grafikleri. *IL1-β* > P= 0.001, *TNF-α* > P= 0.0006, *IFN-γ* > P= 0.007, *TGF-β* > P=0.027



Şekil 4-4: İstatistiki olarak anlamlı bulunmayan genler; *IL6*, *IL10* ve *IL12* genleri için dağılım grafikleri. *IL6* > P=0.24, *IL10* > P= 0.60, *IL12* > 0.07

5. TARTIŞMA

Mezyal temporal skleroz, parsiyel epilepsiler içinde en sık karşılaşılan durumlardan biridir. MTLE hastalarının sıklıkla ilaca direnç göstermektedir ve cerrahi tedavide teknolojik gelişmelerle paralel olarak olumlu sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Cerrahi tedavi sonucu çıkarılan sklerotik doku hipokampal skleroz ve MTLE' nin patogenezinin aydınlatılmasına yönelik çalışmaların yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Bizim çalışmamızda tamamına MTLE ve hipokampal skleroz tanısı konmuş 4 kadın 5 erkekten oluşan 9 kişilik bir hasta grubu ile, T.C. Adli Tıp Kurumu' nda yapılan otopsiler sırasında hipokampus materyali çıkartılan 1 kadın 8 erkekten oluşan 9 kişilik sağlıklı kontrol grubu kullanılmıştır. Hasta grubunun yaşları 20-63 (Ort: 36) arasında, otopsi yapılan bireylerin yaşları ise 1-72 (Ort: 42,8) arasında değişmektedir. Otopsi materyalleri kullanılan bireylerin hiç birinin ölüm nedeninde veya öykülerinde nörolojik bir hastalık bulunmamaktadır.

Hastaların geçmişlerinde bulunan kafa travması, febril nöbet, zor doğum gibi öykülerin MTLE riskini arttırdığı bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda beyin hasarına neden olan bir çok durumda kan-beyin bariyerinin yapısında ve fizyolojisinde değişikliklerin meydana geldiği ortaya konmuştur [78]. Travmatik beyin zedelenmelerinde proenflamatuvar sitokin ekspresyonunda artışın meydana geldiği deneysel modellerde ve insanlarda gösterilmiştir [79]. Hasar görmüş kan-beyin bariyeri ve enflamatuvar atağın geç dönem epilepsi başlangıcına neden olan bir çok nörolojik hastalığın ortak özelliği olduğu bilinmektedir [50]. Hipokampus (özellikle CA1) bölgesi anatomik ve fizyolojik yapısı ve gelişimsel özellikleri nedeniyle beynin dış faktörlere en açık olan bölgesi olarak bilinmektedir. Çocukluk dönemindeki risk faktörlerinin bir başlangıç hasarına yol açarak epileptogenez sürecini başlattığı düşünülmektedir [22]. Epileptogenez sürecinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, birikmekte olan veriler kan-beyin bariyerinde meydana gelen bozulmanın ve enflamasyonun epileptogenez sürecine katıldığını ortaya koymaktadır.

Hasta grubumuzun tamamı, antiepileptik tedaviye 2, 3 ve bazen daha fazla ilacı içeren kombinasyonlar kullanıldığı halde direnç göstermektedir. Bazı antiepileptik ilaçların nöbetleri engelleyici etkisinin yanında antienflamatuvar etkisinin de olduğu bilinmektedir. Ji-Eun Kim ve arkadaşları, bizim hasta grubumuzda 2. en sık kullanılan ilaç olan levetiracetamin (LEV) epileptik ratların hipokampusunda IL1- β ve IL1- β R1 ekspresyonuna olan etkisini araştırdıkları çalışmada, LEV verilen ratların kontrol

grubuna göre IL1- β ve IL1- β R1 ekspresyonlarında azalma meydana geldiğini bulmuşlardır [80]. Bizim çalışmamızda da ameliyat öncesinde LEV kullandığı bilinen hastalarda IL1- β seviyesinin diğer hastalara göre bağıl olarak düşük olduğu dikkati çekmektedir.

Jankowsky ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, farelerde deneysel olarak tetiklenen nöbetlerin çok hızlı bir enflamatuvar cevabın ortaya çıkmasını ve sonraki aşamalarda ise epileptik aktivitenin başladığı bulunmuştur [36]. Ayrıca intra-serebral olarak enjekte edilen sitokinlerin nöbetlerin şiddetini arttırdığı bulunmuştur [81-82]. Bununla birlikte aynı şekilde enjekte edilen IL1 reseptör antagonisti (IL1Ra) güçlü bir anti-konvülzan etki göstermiştir. IL1 ailesinin nöronal eksitabiliteye olan etkileri birçok defa araştırılmıştır [83]. IL1RI, piramidal nöronların üzerinde NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri ile birlikte bulunurlar. IL1RI tarafından yönlendirilen glutamaterjik aktivite eksitotoksiste ve spontan nöbetlere yol açabilir [84]. IL1- β , kendi reseptörüne bağlanarak NMDA reseptörü aracılığıyla Ca^{++} girişini ve hücre yüzeyindeki AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) reseptörlerinin ekspresyonunu artırır [85-86]. IL1- β ayrıca astrositlere etki ederek glutamat geri alımını engeller [83, 87]. Çalışmamızda incelenen genlerden *IL1- α* 'nın ekspresyonuna hasta ve sağlıklı kontrol grubunda rastlanmamıştır. Bunun yanında *IL1- β* , hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir artış göstermektedir. Çalışmamızda hasta ve sağlıklı grupları arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilen *TNF- α* ekspresyonu da beyinde glutamat üretimini artırarak hipereksitabiliteye sebep olabilir [88]. Organotipik kesit kültürleri ile yapılan bir çalışmada IL1- β ve *TNF- α* 'nın dokuya etki ettiği süreye ve konsantrasyona bağlı olarak AMPA aracılı eksitotoksisteyi artırabildiği ya da azaltabildiği gösterilmiştir [89]. Bunlarla birlikte *TNF- α* tip1 reseptörleri (p55), bulundurdıkları hücre içi "death domain" ile çoğunlukla hücre hasarına katkıda bulunmaktadır [90-91]. Nöbetler, aktive edici faktörler ve bu reseptör arasındaki kompleksin oluşumunu teşvik ederek pre-apoptotik sinyallerin başlamasına yol açabilirler. Shinoda ve arkadaşları, epileptik fareler ile yaptıkları bir çalışmada *TNF- α* 'yı nötralize eden bir antikör kullanarak hipokampusta DNA hasarı olan hücrelerde bir azalma elde etmişlerdir [91]. *TNF- α* bu etkilerinin yanında düşük konsantrasyonlarda p75 reseptörü üzerinden nöroprotektif ve anti-konvülzan etkiye sebep olabilir. Nanomolar düzeyde rekombinant fare *TNF- α* 'sının epileptik fare hipokampusuna enjekte edildiği bir çalışmada nöbetlerde azalma gözlenmiştir [92].

Makrofaj aktive edici sitokin olarak bilinen IFN- γ , CD4⁺ T_H1' ler, CD8⁺ T hücreleri ve NK (doğal öldürücü hücreler) hücreleri tarafından salınarak doğal ve edinsel immün sistemde önemli roller almaktadır [93]. IFN- γ reseptörü ise, biri sitokine bağlanan, diğeri ise STAT1 sinyalizasyonunu aktive eden 2 homolog polipeptid zincirinden meydana gelmiştir. IFN- γ , reseptörü ile bağlandıktan sonra aktive olan STAT1, IFN γ bağlantılı genlerin (MHC, B7 ko-stimülatör proteini, IL12, vs.) transkripsiyon faktörlerine etki ederek bunların ekspresyonlarının artmasını sağlar. Ayrıca vasküler endotelial hücreleri ve TNF' in endotelial hücreler üzerine etkilerini uyarak T hücre adhezyonu ve enfeksiyon bölgesine ekstrasvazasyonunu sağlar [93]. Yapılan çalışmalarda, IFN- γ – IFN- γ R1 kompleksinin vasküler endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) üretimini arttırdığı bulunmuştur [94]. NO, enflamasyonda bir çok sitokin ve diğer aracı moleküllerin salınmasına etkide bulunan, hücre içi Ca⁺⁺ sinyalizasyonunda görev alan, gaz yapıda bir moleküldür [94-95]. Liu ve arkadaşları epileptik ratlarla yaptığı çalışmada NO seviyesinin status epilepticus (SE) başlangıcından sonra 30 dakika içinde yükseldiğini ve bu seviyenin SE sonrasındaki 7. güne kadar devam ettiğini ortaya koymuştur [96]. Leite ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada ise sklerotik hipokampus dokusunun, normal bir hipokampusa göre oldukça fazla NO sentetaz enzimi içerdiğini bulunmuştur [97]. IFN- γ ' nın yüksek ekspresyonu, hipokampusta dolaylı olarak NO sentezinin artmasına sebep olarak hücre içi Ca⁺⁺ dengesini bozabilir ve epileptoform aktiviteler gelişmesine sebep olabilir. Bizim çalışmamızda da *IFN- γ R1* ekspresyonu hasta ve sağlıklı grupları arasında kıyaslanmış ve literatürle uyumlu bir şekilde, hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir.

TGF- β , primer etki olarak immün sistemde T hücre farklılaşması ve proliferasyonunu ve makrofaj aktivasyonunu baskılar. Bu açıdan enflamasyonu baskılayıcı bir işlev görür [93]. Literatürde, nöbet aktivitesi ve TGF- β ilişkisinin araştırıldığı çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Morgan ve arkadaşları, ilk olarak 1993 yılında, fare hipokampusunda kainik asit stimülasyonu sonrasında TGF- β 1 mRNA'sının artmış olduğunu bulmuştur [98]. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise artış gösteren TGF- β ' nın mikroglia kaynaklı olduğu keşfedilmiştir [63]. Bunlar dışındaki çalışmalar da TGF- β ' nın temporal lob epilepsisi patogeneze artış göstererek katıldığı yönündedir [99-101]. Bizim çalışmamızda da *TGF- β* ekspresyonu hasta grubunda sağlıklı grubuna göre bir artış göstermiştir. TGF- β ' nın enflamasyon üzerine olan etkileri düşünüldüğünde eldeki bulgular, MTLE hastalarının TGF- β etki

mekanizmasında bir aksaklık olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Fakat bu yorumun yapılabilmesi için henüz yeterli bilgi birikmemiştir.

IL10 genel olarak aktive makrofajları ve dendritik hücre aktivitesini baskılayarak doğal immün sistem ve hücre aracılı immün yanıtı regüle eder [93]. Doğal immün sistemde IL10, IL12 sekresyonunu baskılayarak dolaylı olarak IFN- γ salınmasını ve buna bağlı olarak da intraselüler immünojenlere karşı yanıtın baskılanmasını sağlar. Bununla birlikte IL10 MHC sınıf II moleküllerinin ve ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonu inhibe eder. Godukhin ve arkadaşları, yaptıkları araştırmada epileptik sıçan hipokampusu içine enjekte edilen IL10' un fokal nöbetlerde azalma meydana getirdiğini bulmuşlardır [102]. Yapılan başka bir çalışmada ise hipoksi bağlantılı epileptoform aktiviteler gösteren hipokampus kesit kültürlerine düşük konsantrasyonda IL10 verildiğinde epileptoform aktivitenin tamamen yok olduğu bulunmuştur [103]. Bunların dışında IL10' un febril nöbet ile ilişkisini ortaya koya çalışmalar da mevcuttur. Bizim çalışmamızda ise *IL10* hasta ve sağlıklı kontrol populasyonları arasında, istatistiki olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bu bulgu literatürle uyum göstermektedir.

IL6, doğal ve edinsel immünitinin ikisinde de etkisi bulunan, mononükleer fagositlerden, vasküler endotelial hücrelerden, mikroglia, nöron ve astrosit gibi hücrelerden salınan bir sitokindir [93]. Doğal immün sistemde IL6 akut faz reaktanlarının sentezini uyarırken edinsel immün sistemde ise B lenfositlerinin farklılaşarak antikor üreten hücre haline dönüşmesinde etkilidir. Beyinde, kainik asit ile uyarılan nöbetlerin 2. ve 4. saatlerinde, düşük konsantrasyonda IL6 ekspresyonuna rastlanmıştır [104]. Bizim çalışmamızda *IL6*, hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bu bulgular, IL6' nın beyinde kronikleşen bir enflamasyon sürecinde etkin bir rol oynamadığını düşündürmektedir.

IL12, hücre içi mikroplara karşı erken doğal immün yanıtta ve hücre aracılı immün yanıtın başlamasında önemli rollere sahip olan bir sitokindir [93]. Özellikle naif T hücrelerinin CD4⁺ T hücrelerine dönüşmesinde ve T hücresi ve NK hücresi kaynaklı IFN- γ ve TNF- α üretiminin arttırılmasında etkisi vardır. IL12' nin beyinde mikroglia hücreleri tarafından salgılandığı bilinmektedir [93]. Turrin ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada IL12' nin pilokarpin ile nöbet tetiklenen farelerde düşük miktarda eksprese edildiğini göstermiştir [105]. Bizim çalışmamızdaki bulgular literatürle uyum göstermekle birlikte hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

IL17 ailesi çok yeni tanımlanmış bir sitokin ailesidir. İlk başlarda T hücresi kökenli bir sitokin olduğu düşünülmesine karşın, biriken bilgilerle doğal immün sistem hücreleri olan makrofajlar, dendritik hücreler, NK hücreleri, NKT' ler gibi bir çok hücre grubu tarafından üretildiği bulunmuştur [106]. Birçok otoimmün hastalığın patogeneze katılan IL17 enflamasyona da TNF- α ve IL1- β ekspresyonunu artırarak katıldığı düşünülmektedir [106]. İskemik hayvan modelleri ile yapılan bir çalışmada *IL17A* mRNA' sının iskemi sonrasında lokal ve sistemik olarak arttığı bulunmuştur [107]. Bizim çalışmamızda ise *IL17A* ekspresyonuna MTLE' de rastlanmamıştır ve otopsi örneklerinde ise yalnızca 2 olguda rastlanmıştır. Bu, *IL17A* ekspresyonunun MTLE hastalarının beyin dokusunda araştırılmasına yönelik ilk bulgu olması açısından önemlidir.

IL2, antijenle karşılaşmış T hücreleri tarafından yapılan, ve otokrin etki ile T hücre çoğalmasını ve antijen ile aktifleşmiş T hücrelerinin apoptotik ölümünü arttıran sitokindir [93]. Bu nedenle IL2, T hücre aracılı immün yanıtların hem düzenlenmesi hem de indüklenmesi için önemlidir. Pacifici ve arkadaşlarının yaptığı, değişik antiepileptik ilaçların, ilaç tedavisi gören epilepsi hastalarının serumlarındaki IL2 konsantrasyonuna etkisinin araştırıldığı çalışmada, kandaki IL2 konsantrasyonunun karbamazepin kullanan hastalarda, valporat ve fenobarbital kullanan hastalara ve sağlıklı kontrol grubuna göre sistemik bir artış gösterdiği bulunmuştur [108]. Bunun dışında epilepsi hastalarında IL2 ile ve MTLE ile ilgili yapılmış dikkat çekici bir araştırmaya raslanmamıştır. Bizim hasta grubumuzda ise *IL2* hasta ve sağlıklı grubunda bir ekspresyon göstermemiştir. Bu bulgu ile MTLE hastalarında hücrel immün yanıtın etkinliğinin olmadığı yorumu yapılabilir. Ancak bu yorumun desteklenebilmesi için bununla ilgili bir çok faktörün daha araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda hipokampus dokusundaki gen ekspresyonu, daha önce yapılan çalışmalarla genel olarak uyum sağlamaktadır. Ancak bu konuda yapılan araştırmalar oldukça az sayıdadır. Yapılan araştırma ve bu araştırmalarda kullanılan tekniklerin sayısı arttıkça ortaya çıkabilecek farklı sonuçlardan bahsedilebilir. Bunun teknik ve data analiz farklılıklarından ileri gelebileceği düşünülebilir [109].

1. Kullanılan tekniklerin farklarından meydana gelen hassasiyetle ilgili sorunlar.
2. Hipokampus materyali dışında, hipokampusun alt bölgeleri, temporal ve entorinal korteks gibi farklı beyin bölgelerinin kullanılması.
3. Farklı kontrol ve referans materyelinin kullanılması: otopsi, cerrahi materyeli, veya deneysel modeller. Cerrahi kontrol dokuları normal hipokampus veya hipokampus dışı bölgelerden oluşabilmektedir [22].

4. Data normalizasyonu ve istatistiksel değerlendirmelerde olan farklılıklar.
5. Çalışmalarda hastaların homojen bir dağılım gösterecek şekilde seçilmemesi (yaş, cinsiyet, tedavi, etiyoloji, vb.) gibi faktörler çalışmaların birbirleri ile arasında meydana gelebilecek farklılıkları açıklayabilir.

Dokular üzerinde yapılan çalışmalarda sağlıklı kontrol dokusu, ulaşımının zor olması nedeniyle sorun teşkil etmektedir. Buna bağlı olarak otopsi dokuları sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan 9 otopsi olgusunun 8' i erkek 1' i kadındır. Ölüm nedenleri tamamen nrojik nedenlerin dışındadır ve hibirininyksnde epilepsi hastalığı bulunmamaktadır. Otopsirnekleri ile alışmaktaki temel sorun DNA kalitesi ve btnlğnn korunmasıdır. Biyopsi ve otopsi dokularının mRNA düzeyinde karşılaştırıldığı bir çalışmada otopsi dokularının, biyopsi dokularına oranla daha az mRNA içerdiği saptanmıştır [110]. Ancak aynı çalışmada kaliteli bir otopsi materyalinin mRNA ile ilgili çalışmalarda güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir. Bunun dışında Jamali ve arkadaşları MTLE ile ilgili yaptıkları çalışmada otopsi dokularından faydalanmıştır. Çalışmamızda otopsi materyalinde meydana gelebilecek bir mRNA degradasyonununnnne geçebilmek iinlm anından sonraki 24 saat içinde doku çıkarılarak sıvı azot ile dondurulmuştur.

Çalışmamızda saptanan klinik bulgular MTLE ve HS ile ilgili bildirilmiş yayınlarla uyum göstermektedir. Bu tez kapsamında araştırılan genlerden *IL1-β*, *IFN-γRI*, *TNF-α* ve *TGF-β* hasta-sağlıklı karşılaştırmasında istatistiki olarak anlamlı bir artış göstermişken, *IL10*, *IL12* ve *IL6* anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bunun yanında *IL17*, *IL2* ve *IL1-α*' nın ekspresyonuna hasta ve sağlıklı grubunda rastlanmamıştır. Bu bulgular ışıkında *IL1-β*, *IFN-γRI* ve *TNF-α* kan-beyin bariyeri yapısında değişikliğe neden olarak nöronal hipereksitabilitenin gelişmesine katkıda bulunabilir. Bunun yanında aynı sitokinlerin etkilerine bağlı olarak apoptotik sinyaller indüklenebilir. *TGF-β*' nın eksitotoksositeye karşı nöroprotektif etkisi düşünüldüğünde, HS ve MTLE patogenezi *TGF-β*' nın etki mekanizmasında yer alan bir aksaklığın da katıldığı düşünülebilir. Bu yorumun geçerlilik kazanması için daha geniş hasta gruplarında *TGF-β*' nın etki mekanizmasına yönelik araştırmaların moleküler ve fonksiyonel düzeyde yapılması gerekmektedir.

Epileptogenez süreci bir başlangıç hasarı, bunu takip eden nöbetsiz bir dönem ve beyinde meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler sonucu kronik nöbetlerle birlikte epilepsinin gelişmesine neden olan bir süreçtir. Hipokampal skleroz hastalarında uygulanan cerrahi tedavi epilepsi gelişiminden sonraki dönemde olduğu için, bu çalışma ve bu hastalıkla ilgili insanlar üzerinde yapılan çalışmaların, başlangıç hasarı ve

nöbetsiz döneme ait patogenezi ne kadar yansıttığı yalnızca hayvan modelleri ile yapılan araştırmalarla karşılaştırılarak yapılabilir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında elde edilen veriler ile hipokampal skleroz ve mezyal temporal lob epilepsi sürecinde enflamatuvar sitokinlerin rolü olduğu söylenebilir. Fakat, sklerotik hipokampus dokusunda meydana gelen enflamatuvar sitokin ekspresyonu artışının mezyal temporal lob epilepsisi sürecinin sebebi mi yoksa sonucu mu olduğunu belirlemek henüz mümkün değildir. Çalışmanın sonraki hedefleri arasında hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının genişletilerek mikroyarray yöntemi ile MTLE hastalarının tüm gen ekspresyon profillerini belirlemek, belirlenen genlerin protein seviyesindeki anlatımlarını belirlemek, epigenetik çalışmalarla gen ifadesine etki eden mekanizmaları araştırmak ve immünohistokimya, elektron mikroskopisi gibi yöntemlerle hastalığın patogenezinde oluşan mekanizmaların aydınlatılmasını sağlamak vardır.

KAYNAKLAR

1. Adams RD., V.M., Ropper AH. , Principles of neurology. Epilepsy and other seizure disorders, ed. V.M. Adams RD., Ropper AH. . Vol. sixth edition. 1997, New York.
2. Prasad, A.N., C. Prasad, and C.E. Stafstrom, Recent advances in the genetics of epilepsy: insights from human and animal studies. *Epilepsia*, 1999. **40**(10): p. 1329-52.
3. Berkovic, S.F., et al., Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol*, 1998. **43**(4): p. 435-45.
4. Strachan T, R.A., Human Molecular Genetics, ed. R.A. Strachan T. Vol. second edition. 2000, New York: Wiley-Liss.
5. Lehesjoki AE, K.M., Sistonen P, Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. **88**: p. 3696-3699.
6. Sander, T., The genetics of idiopathic generalized epilepsy: implications for the understanding of its aetiology. *Mol Med Today*, 1996. **2**(4): p. 173-80.
7. Engel, J., Jr., Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*, 2001. **7**(4): p. 340-52.
8. Tsuboi, T., Prevalence and incidence of epilepsy in Tokyo. *Epilepsia*, 1988. **29**: p. 103-110.
9. World Health Organization, W. Epilepsy, Key facts. 2010 Ocak 2009 [cited 2010 Nisan 2010]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>.
10. Epilepsy Foundation of America, E. Epilepsy and Seizure Statistics. 2010; Available from: <http://www.epilepsyfoundation.org/about/statistics.cfm>.
11. Dekker, P.A., et al., Epilepsy : a manual for medical and clinical officers in Africa. Rev. ed. 2002, Geneva: World Health Organization. 124 p.
12. Onal AE, T.Y., Ozturk MK, Gurses C. Baykan B, Gokyigit A, Ozel S, Epilepsy prevalence in rural area in Istanbul. *Seizure*, 2002. **11**: p. 397-401.
13. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, 1981. **22**(4): p. 489-501.
14. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, 1989. **30**(4): p. 389-99.
15. Williamson, P.D., et al., Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Ann Neurol*, 1993. **34**(6): p. 781-7.
16. BARROW neurological institute, S.J.s.H.a.M.C. Imaging of the brain. 2010 Haziran 2010]; Available from: http://www.thebarrow.org/Neurological_Services/Epilepsy/204363.
17. Kendal, C., et al., Glial cell changes in the white matter in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 1999. **36**(1): p. 43-51.

18. Parent, J.M. and D.H. Lowenstein, Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res*, 2002. **135**: p. 121-31.
19. Covolan, L., et al., Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus*, 2000. **10**(2): p. 169-80.
20. Elliott, R.C., et al., Differential regulation of basic helix-loop-helix mRNAs in the dentate gyrus following status epilepticus. *Neuroscience*, 2001. **106**(1): p. 79-88.
21. Yasargil MG, T.P., Roth P, selective amygdalohippocampectomy. Operative anatomy and surgical technique. *Adv Tech Stand Neurosurg.*, 1985. **12**: p. 93-123.
22. Bebek, N., Temporal lob patogeneziyle ilişkili genlerin ekspresyon analizi, in *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik A.D., Genetik Programı*. 2009, İstanbul Üniversitesi: İstanbul. p. 66-83.
23. Karasu, A., et al., Surgical outcome in hippocampal sclerosis following selective amygdalo-hippocampectomy. *Turk Neurosurg*, 2008. **18**(4): p. 374-9.
24. McNamara, J.O., Y.Z. Huang, and A.S. Leonard, Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE*, 2006. **2006**(356): p. re12.
25. Herman, S.T., Clinical trials for prevention of epileptogenesis. *Epilepsy Res*, 2006. **68**(1): p. 35-8.
26. Bertram, E., The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia*, 2007. **48 Suppl 2**: p. 65-74.
27. Armijo, J.A., et al., [Advances in the physiopathology of epileptogenesis: molecular aspects]. *Rev Neurol*, 2002. **34**(5): p. 409-29.
28. Aroniadou-Anderjaska, V., et al., Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res*, 2008. **78**(2-3): p. 102-16.
29. Abul K. Abbas, A.H.L., Temel İmmünoloji, İmmün sistemin işlev ve bozuklukları. *Doğal Bağışıklık*, ed. G.D. Yıldız Camcıoğlu. 2007, İstanbul.
30. Nguyen, M.D., J.P. Julien, and S. Rivest, Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*, 2002. **3**(3): p. 216-27.
31. Rivest, S., Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun*, 2003. **17**(1): p. 13-9.
32. Laflamme, N., et al., Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(4): p. 1127-38.
33. Chakravarty, S. and M. Herkenham, Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci*, 2005. **25**(7): p. 1788-96.
34. Rivest S, L.S., Vallieres L, et al, How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000. **223**: p. 22-38.
35. Allan, S.M. and N.J. Rothwell, Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(10): p. 734-44.
36. Jankowsky, J.L. and P.H. Patterson, The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol*, 2001. **63**(2): p. 125-49.

37. Gültürk S, İ.G., Tuncer E. , Kan-Beyin Bariyeri. Erciyes Tıp Dergisi, 2007. **29-2**: p. 147-154.
38. Butt, A.M., H.C. Jones, and N.J. Abbott, Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*, 1990. **429**: p. 47-62.
39. Nitta, T., et al., Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 2003. **161**(3): p. 653-60.
40. Haskins, J., et al., ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 1998. **141**(1): p. 199-208.
41. Nusrat, A., J.R. Turner, and J.L. Madara, Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(5): p. G851-7.
42. Pachter, J.S., H.E. de Vries, and Z. Fabry, The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003. **62**(6): p. 593-604.
43. Webb, A.A. and G.D. Muir, The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J Vet Intern Med*, 2000. **14**(4): p. 399-411.
44. Lossinsky, A.S. and R.R. Shivers, Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol*, 2004. **19**(2): p. 535-64.
45. Becher, B., A. Prat, and J.P. Antel, Brain-immune connection: immunoregulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*, 2000. **29**(4): p. 293-304.
46. Aloisi, F., F. Ria, and L. Adorini, Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*, 2000. **21**(3): p. 141-7.
47. Williams, K., X. Alvarez, and A.A. Lackner, Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia*, 2001. **36**(2): p. 156-64.
48. Karman, J., et al., Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens. *Immunol Lett*, 2004. **92**(1-2): p. 107-15.
49. Zucker, D.K., G.F. Wooten, and E.W. Lothman, Blood-brain barrier changes with kainic acid-induced limbic seizures. *Exp Neurol*, 1983. **79**(2): p. 422-33.
50. Krizanac-Bengez, L., M.R. Mayberg, and D. Janigro, The cerebral vasculature as a therapeutic target for neurological disorders and the role of shear stress in vascular homeostasis and pathophysiology. *Neurol Res*, 2004. **26**(8): p. 846-53.
51. Abbott, N.J., L.L. Mendonca, and D.E. Dolman, The blood-brain barrier in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2003. **12**(12): p. 908-15.
52. Kaya, M., et al., The effects of magnesium sulfate on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats. *Life Sci*, 2004. **76**(2): p. 201-12.
53. Vizi, E.S. and J.P. Kiss, Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, 1998. **8**(6): p. 566-607.
54. Watkins, L.R., S.F. Maier, and L.E. Goehler, Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci*, 1995. **57**(11): p. 1011-26.

55. Breder, C.D., et al., Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(24): p. 11393-7.
56. Sternberg, E.M., Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest*, 1997. **100**(11): p. 2641-7.
57. Watson, J., The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis. *J Exp Med*, 1975. **141**(1): p. 97-111.
58. Szelenyi, J., Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull*, 2001. **54**(4): p. 329-38.
59. Akiyoshi, M., Y. Shimizu, and M. Saito, Interleukin-1 increases norepinephrine turnover in the spleen and lung in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. **173**(3): p. 1266-70.
60. Besedovsky, H., et al., Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1975. **150**(2): p. 466-70.
61. Dunn, A.J., Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992. **261**(3): p. 964-9.
62. MohanKumar, S.M., P.S. MohanKumar, and S.K. Quadri, Specificity of interleukin-1beta-induced changes in monoamine concentrations in hypothalamic nuclei: blockade by interleukin-1 receptor antagonist. *Brain Res Bull*, 1998. **47**(1): p. 29-34.
63. Sheng, J.G., et al., Increased neuronal beta-amyloid precursor protein expression in human temporal lobe epilepsy: association with interleukin-1 alpha immunoreactivity. *J Neurochem*, 1994. **63**(5): p. 1872-9.
64. De Simoni, M.G., et al., Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*, 2000. **12**(7): p. 2623-33.
65. Matzilevich, D.A., et al., High-density microarray analysis of hippocampal gene expression following experimental brain injury. *J Neurosci Res*, 2002. **67**(5): p. 646-63.
66. Becker, A.J., et al., Correlated stage- and subfield-associated hippocampal gene expression patterns in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*, 2003. **18**(10): p. 2792-802.
67. de Lanerolle, N.C. and T.S. Lee, New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*, 2005. **7**(2): p. 190-203.
68. Anand, M., et al., Abnormal levels of proinflammatory cytokines in serum and monocyte cultures from patients with chronic myeloid leukemia in different stages, and their role in prognosis. *Hematol Oncol*, 1998. **16**(4): p. 143-54.
69. Ramos-Payan, R., et al., Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR Green I. *Scand J Immunol*, 2003. **57**(5): p. 439-45.
70. Katial, R.K., et al., Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998. **5**(1): p. 78-81.
71. Brooks-Kayal, A.R., Y.H. Raol, and S.J. Russek, Alteration of epileptogenesis genes. *Neurotherapeutics*, 2009. **6**(2): p. 312-8.

72. Vandesompele, J., et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
73. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
74. Cohen, A.S., et al., Dentate granule cell GABA(A) receptors in epileptic hippocampus: enhanced synaptic efficacy and altered pharmacology. *Eur J Neurosci*, 2003. **17**(8): p. 1607-16.
75. de Quervain, D.J., et al., A functional genetic variation of the 5-HT_{2a} receptor affects human memory. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(11): p. 1141-2.
76. Baulac, S., et al., Fever, genes, and epilepsy. *Lancet Neurol*, 2004. **3**(7): p. 421-30.
77. Ludwig, A., et al., Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur J Neurosci*, 2003. **18**(12): p. 3199-206.
78. Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard, The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 2004. **16**(1): p. 1-13.
79. Ziebell, J.M. and M.C. Morganti-Kossmann, Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 2010. **7**(1): p. 22-30.
80. Kim, J.E., et al., Levetiracetam inhibits interleukin-1 beta inflammatory responses in the hippocampus and piriform cortex of epileptic rats. *Neurosci Lett*, 2010. **471**(2): p. 94-9.
81. Vezzani, A., et al., Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci*, 1999. **19**(12): p. 5054-65.
82. Oprica, M., C. Eriksson, and M. Schultzberg, Inflammatory mechanisms associated with brain damage induced by kainic acid with special reference to the interleukin-1 system. *J Cell Mol Med*, 2003. **7**(2): p. 127-40.
83. Choi, J. and S. Koh, Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J*, 2008. **49**(1): p. 1-18.
84. Ravizza, T., et al., Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 2008. **29**(1): p. 142-60.
85. Beattie, E.C., et al., Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science*, 2002. **295**(5563): p. 2282-5.
86. Viviani, B., et al., Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci*, 2003. **23**(25): p. 8692-700.
87. Ye, Z.C. and H. Sontheimer, Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *Neuroreport*, 1996. **7**(13): p. 2181-5.
88. Bezzi, P. and A. Volterra, A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. **11**(3): p. 387-94.
89. Bernardino, L., et al., Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci*, 2005. **25**(29): p. 6734-44.

90. MacEwan, D.J., TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol*, 2002. **135**(4): p. 855-75.
91. Shinoda, S., et al., Formation of a tumour necrosis factor receptor 1 molecular scaffolding complex and activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 during seizure-induced neuronal death. *Eur J Neurosci*, 2003. **17**(10): p. 2065-76.
92. Balosso, S., et al., Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann Neurol*, 2005. **57**(6): p. 804-12.
93. Abul K. Abbas, A.H.L., *Cellular and molecular immunology*. fifth ed. 2005, New York.
94. Willenborg, D.O., et al., The contribution of nitric oxide and interferon gamma to the regulation of the neuro-inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 2007. **191**(1-2): p. 16-25.
95. Araujo, I.M. and C.M. Carvalho, Role of nitric oxide and calpain activation in neuronal death and survival. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005. **4**(4): p. 319-24.
96. Liu, J., et al., Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure*, 2010. **19**(3): p. 165-72.
97. Leite, J.P., et al., Loss and sprouting of nitric oxide synthase neurons in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia*, 2002. **43 Suppl 5**: p. 235-42.
98. Morgan, T.E., et al., TGF-beta 1 mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration. *Exp Neurol*, 1993. **120**(2): p. 291-301.
99. Cacheaux, L.P., et al., Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis. *J Neurosci*, 2009. **29**(28): p. 8927-35.
100. Friedman, A., D. Kaufer, and U. Heinemann, Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Res*, 2009. **85**(2-3): p. 142-9.
101. Lu, Y., et al., Increased expression of TGFbeta type I receptor in brain tissues of patients with temporal lobe epilepsy. *Clin Sci (Lond)*, 2009. **117**(1): p. 17-22.
102. Godukhin, O.V., S.G. Levin, and E.Y. Parnyshkova, The effects of interleukin-10 on the development of epileptiform activity in the hippocampus induced by transient hypoxia, bicuculline, and electrical kindling. *Neurosci Behav Physiol*, 2009. **39**(7): p. 625-31.
103. Levin, S.G. and O.V. Godukhin, Protective effects of interleukin-10 on the development of epileptiform activity evoked by transient episodes of hypoxia in rat hippocampal slices. *Neurosci Behav Physiol*, 2007. **37**(5): p. 467-70.
104. Minami, M., Y. Kuraishi, and M. Satoh, Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **176**(2): p. 593-8.
105. Turrin, N.P. and S. Rivest, Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis*, 2004. **16**(2): p. 321-34.
106. Onishi, R.M. and S.L. Gaffen, Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 2010. **129**(3): p. 311-21.
107. Moseley, T.A., et al., Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(2): p. 155-74.
108. Pacifici, R., et al., Cytokine production in blood mononuclear cells from epileptic patients. *Epilepsia*, 1995. **36**(4): p. 384-7.

109. Cossette, P., et al., Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet*, 2002. **31**(2): p. 184-9.
110. Bahn, S., et al., Gene expression profiling in the post-mortem human brain--no cause for dismay. *J Chem Neuroanat*, 2001. **22**(1-2): p. 79-94.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Tarih:

ÇALIŞMANIN KAPSAMI

1. “TEMPORAL LOB EPİLEPSİ PATOGENETİZİNDE ENFLAMASYON İLE İLGİLİ GENLERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI” adlı çalışma mezyal temporal lob epilepsisi (MTLE) ile ilgili bir çalışmadır. Bu çalışma, MTLE hastalığının genetiğini aydınlatmak, hastalığın gelişim sürecini tanımlamak ve hedef tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesini sağlamayı hedeflemektedir.
2. Yapılması planlanan genetik incelemelerde sizden daha önce ameliyat sırasında tetkik için alınmış olan beyin dokusu kullanılacaktır.
3. Alınan kan örneğinden DNA/RNA materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.
4. Saklanan örnekler epilepsi ilgili genler açısından protein ve gen ekspresyonları, mutasyon yönünden incelenecektir. Çıkan sonuçlar klinik parametreler ile ilişkilendirilip ilgili genlerin hedef tedavi için aday olup olamayacağı değerlendirilecektir.
5. Araştırma kapsamında yapılacak olan çalışmanın süresi 1 yıldır.
6. Çalışmaya 10 gönüllü hasta katılacaktır.
7. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir.
8. Elde edilen genetik bilgiler şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
9. Araştırma süresince sizden 1 defaya mahsus doku örneği alınacaktır ve bunun dışında invaziv bir işlem gerçekleştirilmeyecektir.
10. Kan alma sırasında oluşabilecek herhangi bir sorun karşısında ücretsiz olarak tıbbi destek sağlanacaktır.
11. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.

12. Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır.

13. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu talebiniz, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.

14. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabiliyorsunuz.

Kararınızdan önce size verilen bu bilgileri lütfen okuyunuz.

Yukarıdaki yazılı bilgileri okudum. MTLE hastalığının genetiğine yönelik araştırmalar için çalışmaya kan ve doku meteryali vermeyi kimsenin etkisi altında kalmadan kendi rızamla kabul ediyorum.

Hastanın Adı, Soyadı:

İmzası

Ebeveynin Adı, Soyadı:

İmzası

Aileden Sorumlu Kişinin Adı, Soyadı:

İmzası

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, Soyadı:

İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, Soyadı: Görevi: İmzası

Katılımcı/Hasta Beyanı

Sayın Prof. Dr. Uğur Özbek tarafından Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Uğur Özbek’i 0212-4142000/33312 No’lu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-soyadı

İmzası

Adresi

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı-soyadı

İmzası

Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı:

İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı

İmzası

Görevi

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 22/10/2008

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 10

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Uğur ÖZBEK'in üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Bio.Özkan ÖZDEMİR'in yürüteceği 2008/2697 protokol numaralı "Temporal lob epilepsi patogenetizinde enflamasyon ile ilgili genlerin ekspresyonlarının araştırılması" başlıklı deneysel tez çalışma dosyası kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, Araştırma Fonu tarafından desteklenmesi şartı ile uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

— **Prof.Dr. Nuran YILDIRIM**

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR

Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D.

+ **Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)**

Genel Cerrahi A.D.

+ **Prof.Dr. Neşe ÇOLAK (Katılmadı)**

İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

— **Fatma Ceyda DÖNMEZER**

Sivil Toplum Örgütü Üyesi

— **Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK**

Hukukçu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ÖZKAN	Soyadı	ÖZDEMİR
Doğ.Yeri	GEMLİK	Doğ.Tar.	19.11.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	29825263018
Email	ozkanozdemir@gmail.com	Tel	05056981603

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji A.D.	...
Lisans	Marmara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Özel Tan Lisesi, Bursa	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	iyi	70	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):