



**ABSANS EPİLEPSİLİ WAG/RİJ SIÇANLARDA  
N-(P-AMİLSİNAMOİL) ANTRANİLİK ASİTİN  
HİPOKAMPAL ENDOPLAZMİK  
RETİKULUM STRESİ VE  
KAN-BEYİN BARIYERİ BÜTÜNLÜĞÜ  
ÜZERİNE NÖROPROTEKTİF  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gül Büşra KAYA**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Halil DÜZÖVA  
Doktora Tezi – 2021**

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

**ABSANS EPİLEPSİLİ WAG/RİJ SIÇANLARDA N-(P-AMİLSİNNAMOİL)  
ANTRANİLİK ASİTİN HİPOKAMPAL ENDOPLAZMİK RETİKULUM  
STRESİ VE KAN-BEYİN BARIYERİ BÜTÜNLÜĞÜ ÜZERİNE  
NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gül Büşra KAYA**

**Fizyoloji Anabilim Dalı**  
**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Halil DÜZOVA**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-  
2019-1856 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA**

**2021**

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Epilepsi.....	4
2.1.1. Epileptogenez.....	5
2.1.2. Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırılması.....	7
2.1.3. Epidemiyoloji.....	10
2.1.4. Epilepsi Patofizyolojisi .....	11
2.2. Absans Epilepsi.....	13
2.2.1. Absans Epilepsinin Sınıflandırılması.....	14
2.2.2. Absans Epilepsi Patofizyolojisi .....	15
2.2.3. Absans Epilepsi Deneysel Hayvan Modelleri .....	21
2.2.4. Tipik Absans Epilepsi Deneysel Hayvan Modelleri.....	23
2.2.5. Absans Epilepside Meydana Gelen Davranışsal Değişiklikler.....	26
2.3. Beyinde Bulunan Bariyerler.....	27
2.3.1. Bariyer Özelliği Taşımayan Beyin Alanları .....	29
2.3.2. Kan-Beyin Bariyeri ve Genel Özellikleri .....	30
2.3.3. Kan-Beyin Bariyerinde Bulunan Bağlantı Yapıları.....	32
2.3.4. Kan-Beyin Bariyerinde Bulunan Destek Yapıları .....	35
2.3.5. Kan-Beyin Bariyerinde Madde ve İlaç Taşınması.....	41
2.3.6. Kan-Beyin Bariyeri ve Epilepsi İlişkisi .....	43
2.3.7. Kan-Beyin Bariyeri Patofizyolojisi .....	45
2.4. Endoplazmik Retikulum.....	47
2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi .....	48
2.4.2. Glukoz Regüle Edici Protein 78 (GRP78).....	49
2.4.3. Endoplazmik Retikulum Stresinde Aktiflenen Sinyal Yolakları.....	50
2.4.4. Endoplazmik Retikulum Stresi-Epilepsi İlişkisi.....	53
2.5. N-(p-amilsinamoil) Antranilik Asit (ACA) ve Etki Mekanizması.....	56
2.6. Hidrokortizon ve Etki Mekanizması.....	60

2.6.1. GABA-A Reseptörleri ve Nörosteroidlerle İlişkisi.....	62
3. MATERYAL VE METOT.....	66
3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlık Süreci.....	66
3.2. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması.....	66
3.3. WAG/Rij Sıçanlarda Oluşan Spontan Nöbetlerin İzlenmesi.....	67
3.4. Deney Hayvanlarında Ağırlık ve Yem Tüketimi Takibi.....	69
3.5. Deney Hayvanlarında Perfüzyon-Fiksasyon İşlemi.....	69
3.6. Western Blot Analizi.....	72
3.6.1. RIPA Liziz Tampon Çözeltili Protokolü.....	72
3.6.2. SDS Analizi.....	74
3.6.3. Western Blot Protokolü.....	76
3.7. İmmünohistokimyasal Analiz.....	77
3.8. İstatistiksel Analizler.....	80
4. BULGULAR.....	81
4.1. Deney Hayvanlarında Spontan Nöbetlerin Değerlendirilmesi.....	81
4.2. Deney Hayvanlarının Tartım Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	82
4.2.1. Grup İçi Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması.....	82
4.2.2. Gruplar Arası Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması.....	83
4.3. Deney Hayvanlarının Grup İçi Yem Tüketimlerinin Değerlendirilmesi.....	83
4.4. Deney Hayvanlarında Western Blot Yöntemi İle Elde Edilen ER Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	85
4.4.1. ATF4 Western Blot Analizi Sonuçları.....	85
4.4.2. ATF6 Western Blot Analizi Sonuçları.....	87
4.4.3. CHOP Western Blot Analizi Sonuçları.....	89
4.4.4. GRP78 Western Blot Analizi Sonuçları.....	92
4.5. Deney Hayvanlarında İmmünohistokimyasal Analizler Sonucu Elde Edilen Kan- Beyin Bariyeri Belirteçlerinin Değerlendirilmesi.....	94
4.5.1. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) Düzeyinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	95
4.5.2. Zonula Okludens-1 (ZO-1) Düzeyinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	97
4.5.3. Okludin Düzeyinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	101
5. TARTIŞMA.....	105
5.1. ACA'nın Absans Epilepside Spontan Nöbetler Üzerine Etkisi.....	105

5.2. ACA'nın Absans Epilepside Vücut Ağırlığı ve Yem Tüketimi Üzerine Etkisi...	107
5.3. ACA'nın Absans Epilepside ER Stres Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	108
5.3.1. ATF4 Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	109
5.3.2. CHOP Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	110
5.3.3. ATF6 Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	111
5.3.4. GRP78 Seviyelerinin Değerlendirilmesi .....	112
5.3.5. ACA'nın ER Stresi Üzerine Genel Etkisinin Değerlendirilmesi.....	113
5.4. ACA'nın Absans Epilepside Kan-Beyin Bariyeri Bütünlüğü Üzerine Etkisi.....	113
5.4.1. GFAP Seviyelerinin Değerlendirilmesi .....	114
5.4.2. ZO-1 ve Okcludin Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	115
5.4.3. ER Stres ve Kan-Beyin Bariyeri Bütünlüğü Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	117
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	118
KAYNAKLAR.....	120
EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ.....	141
EK 2. ÖZGEÇMİŞ.....	142

## TEŞEKKÜR

TDK-2019-1856 nolu doktora tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Doktora tez çalışmalarım süresince benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, değerli bilgileriyle tezime katkı sağlayan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Halil DÜZÖVA'ya, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana katkı sağlayan bölümümdeki tüm öğretim üyesi hocalarıma,

Tez çalışmamın deney aşamasında Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi'nin tüm imkânlarından yararlanmamı sağlayan, engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, akademik disipliniyle, duruşuyla örnek aldığım kıymetli hocam Koç Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet KAYA'ya çok teşekkür ederim. Koç Üniversitesi Sınır Bilim Laboratuvarı'nda çalıştığım süre zarfında, benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşan, yol gösteren güler yüzlü hocam Dr. Arzu TEMİZYÜREK'e ve orada bulunan tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım süresince benden desteğini esirgemeyen ve tüm laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan kıymetli hocam İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Deneyimin her aşamasında titizlikle çalışan ve benden yardımlarını esirgemeyen sevgili kardeşlerim İnönü Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Arş. Gör. Muhammed DÜNDAR ve yüksek lisans eğitimini sürdüren sevgili eşi Feyza DÜNDAR'a,

Çalışmamın deney aşamasında değerli bilgileriyle bana katkı sağlayan İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Hasan GÖKÇE'ye, Prof. Dr. Neşe KARADAĞ SOYLU'ya, çalışmama bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan, doktora eğitimini sürdüren Tıbbi Patoloji Laboratuvar Sorumlusu Şef Mustafa HÜZ'e çok teşekkür ederim. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Emek GÜLDOĞAN'a ve Arş. Gör. İpek BALIKÇI ÇİÇEK'e teşekkür ederim.

Çalışmamın tüm aşamalarında bana yardımcı olan, bilgileriyle yol gösteren kıymetli abim İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanı Arş. Gör. Faruk DİŞLİ'ye,

Tezimin deney sürecinde yardıma koşan Öğr. Gör. Dr. Perihan GÜRBÜZ'e, bölümümüz doktora öğrencilerinden sevgili arkadaşlarım Öğr. Gör. Kübranur KORKMAZ ve Arş. Gör. Yücehan YILMAZ'a, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde görev yapan arkadaşım uzman biyolog Asiye BEYTUR'a, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olan arkadaşım Merve DURHAN'a, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca akademik eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan, güler yüzüyle, içten sevgisiyle beni kucaklayan İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde görev yapan canım ablam Sibel ONUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Parlak zekâsını ve bilgilerini kullanarak, çalışmamda kullandığım perfüzyon-fiksasyon cihazını tasarlayıp, deney sürecimi başarıyla gerçekleştirmemi sağlayan, çalışkanlığıyla ve karakteriyle gurur duyduğum, sevgisiyle yüreğimi ısıtan canım kardeşim Fzt. Berkay KAYA'ya en kalbi sevgilerimle teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden ilgi ve sevgilerini esirgemeyen, en zor zamanlarımda bana güç verip, elimi tutarak ayağa kaldıran, her şeyden önce iyi ve saygılı bir insan, daha sonra başarılı bir birey olmanın gerekliliğini öğreten, her konuda bana güvenip inanan, evlatları olmaktan her zaman gurur duyduğum canım anneme ve babama,

Tez çalışmalarım süresince gösterdikleri anlayış, sabır ve desteklerinden dolayı sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

**Gül Büşra KAYA**

## ÖZET

### **Absans Epilepsili WAG/Rij Sıçanlarda N-(p-amilsinnamoil) Antranilik Asitin Hipokampal Endoplazmik Retikulum Stresi ve Kan-Beyin Bariyeri Bütünlüğü Üzerine Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması**

**Amaç:** Absans epilepsi, genellikle kısa süreli bilinç kaybıyla karakterize nörolojik bir hastalıktır. Çalışmada amaç; ACA'nın absans epilepside koruyucu etkinliği olup olmadığını, ER stres ile KBB bütünlüğüne etkisini ortaya koymaktır. Ayrıca epilepsi tedavisinde kullanılan ancak ciddi yan etkileri olan hidrokortizonun, ACA'yla etkilerini karşılaştırarak, tedavide alternatif ajan olup olmayacağını saptamaktır. ER stres ve KBB bozulmasında patofizyolojik mekanizmayı açıklamak, epilepsi tedavisinde yeni yaklaşımların oluşumuna katkı sağlamaktır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada 32 adet WAG/Rij dişi ve erkek sıçan kullanılarak, kontrol, DMSO+PBS, hidrokortizon ve ACA şeklinde 4 gruba ayrıldı (n=8). Kontrol grubundaki sıçanlara bir madde verilmedi. DMSO+PBS grubuna DMSO+PBS çözeltisi, ACA grubuna; 25 mg/kg/gün ACA, hidrokortizon grubuna 2.25 mg/kg/gün hidrokortizon (i.p.) günde bir kez, tek doz verildi. Sıçanların nöbetleri izlenerek, ağırlıkları ile yemler tartıldı. Perfüzyon-fiksasyondan sonra, dekapite edilen sıçanların hipokampus ve somatosensoriyel kortekslerindeki ATF4, ATF6, CHOP ve GRP78 seviyeleri Western Blot ile ölçüldü. ZO-1, GFAP ve okludin seviyeleri immünohistokimyasal olarak incelendi.

**Bulgular:** ACA, absans epilepsi nöbet sayısını ve ER stres indikatörlerini azaltmada daha etkili olurken, hidrokortizonun KBB hasarı üzerine daha koruyucu bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** ACA'nın absans epilepsi nöbet sayısını ve ER stresi azaltmada daha etkili olduğu, KBB bozulması üzerine hidrokortizon gibi koruyucu rolü olduğu bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Absans epilepsi, ACA, ATF4, ATF6, CHOP, ER stres, GFAP, GRP78, hidrokortizon, KBB, okludin, WAG/Rij sıçan, ZO-1.



## ABSTRACT

### **Investigation of Neuroprotective Effect of N-(p-amylicinnamoyl) Anthranilic Acid on Hippocampal Endoplasmic Reticulum Stress and Blood-Brain Barrier Integrity in WAG/Rij Rats with Absence Epilepsy**

**Aim:** Absence epilepsy is a neurological disease characterized by short-term loss of consciousness. Purpose of the study; to reveal whether ACA has a protective effect in absence epilepsy, ER stress, BBB impairment. To determine whether hydrocortisone, which is used in the treatment of epilepsy but has serious side effects, can be an alternative agent in the treatment by comparing effects with ACA. To explain the pathophysiological mechanism in ER stress and BBB, contribute to the formation of new approaches in epilepsy treatment.

**Material and method:** In the study, 32 WAG/Rij female, male rats were divided into 4 groups; control, DMSO+PBS, hydrocortisone, ACA (n=8). No substance was given to rats in control group. DMSO + PBS solution to DMSO + PBS group, ACA group; ACA of 25 mg/kg/day, hydrocortisone (i.p.), 2.25 mg/kg/day were administered once a day as a single dose to hydrocortisone group. Seizures of the rats were monitored, feeds and their weight were weighed. After perfusion-fixation, ATF4, ATF6, CHOP, GRP78 levels in the hippocampus and somatosensory cortex of decapitated rats were measured by Western Blot. ZO-1, GFAP, occludin levels were examined by immunohistochemistry.

**Results:** ACA was more effective in reducing the number of absence epilepsy seizures and ER stress indicators, while hydrocortisone was found to have a more protective effect on BBB damage.

**Conclusion:** It was found that ACA was more effective in reducing number of absence epilepsy seizures and ER stress, and had a protective role like hydrocortisone on BBB impairment.

**Key Words:** Absence epilepsy, ACA, ATF4, ATF6, BBB, CHOP, ER stress, GFAP, GRP78, hydrocortisone, occludin, WAG/Rij rat, ZO-1.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µg</b>	:Mikrogram
<b>µV</b>	:Mikrovolt
<b>ABC</b>	:ATP bağlayıcı taşıyıcılar
<b>ACA</b>	:N-(p-amilsinnamoil) antranilik asit
<b>ACTH</b>	:Adrenokortikotropik hormon
<b>ADO</b>	:Adenozin molekülü
<b>AEİ</b>	:Antiepileptik ilaçlar
<b>AJ</b>	:Adherens bağlantı
<b>AMPA</b>	:Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropriyonik asit
<b>AQP-4</b>	:Aquaporin-4
<b>ASE</b>	:Absans status epileptikus
<b>ATF 3</b>	:Aktive edici transkripsiyon faktörü 3
<b>ATF 4</b>	:Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
<b>ATF 6</b>	:Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
<b>ATP</b>	:Adenozin trifosfat
<b>BCRP</b>	:Meme kanseri direnç proteini
<b>BIP</b>	:İmmunoglobulin bağlayıcı protein
<b>BOS</b>	:Beyin-omurilik sıvısı
<b>bZIP</b>	:Temel-lösin fermuarlı transkripsiyon faktörü
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	:Kalsiyum iyonu
<b>cADPR</b>	:Siklik adenozin difosfat-riboz
<b>CAM</b>	:Hücre adezyon molekülü
<b>cAMP</b>	:Siklik adenozin monofosfat
<b>CHOP</b>	:C/EBP homolog protein
<b>CICR</b>	:Kalsiyum kaynaklı kalsiyum salınması
<b>Cl<sup>-</sup></b>	:Klor iyonu
<b>COX</b>	:Siklooksijenaz
<b>CX37</b>	:Konneksin-37
<b>DA</b>	:Dopaminerjik aktivite
<b>DBS</b>	:Derin beyin stimülasyonu
<b>DDD</b>	:Diken dalga deşarjları

<b>DMSO</b>	:Dimetilsülfoksit
<b>DNA</b>	:Deoksiribonükleik asit
<b>EEG</b>	:Elektroensefalogram
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	:Ökaryotik translasyon başlama faktörü 2 alfa
<b>EPSP</b>	:Eksitator postsinaptik potansiyeli
<b>ER</b>	:Endoplazmik retikulum
<b>ERAD</b>	:Endoplazmik retikulum ilişkili bozulma
<b>ESAM</b>	:Endotelial hücre yapışma molekülü
<b>FFI</b>	:İleri beslemeli inhibisyon
<b>FNJE</b>	:Febril nöbet- jeneralize epilepsi
<b>FNTLE</b>	:Febril nöbet-temporal lob epilepsisi
<b>GABA</b>	:Gama amino bütirik asit
<b>GABA<sub>AR</sub></b>	:Gama amino bütirik asit A reseptörü
<b>GAERS</b>	:Strazburg'tan genetik absans epileptik sıçan
<b>GFAP</b>	:Glial fibriler asidik protein
<b>GHB</b>	:Gama-hidroksibütirik asit
<b>GLU</b>	:Glutamat
<b>GLUT-1</b>	:Glukoz taşıyıcısı-1
<b>GRP78</b>	:Glukoz regüle edici protein 78
<b>HRP</b>	:Horseradish peroksidaz
<b>Hz</b>	:Hertz
<b>IgG</b>	:İmmünoglobulin G
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	:İnterlökin-1beta
<b>ILAE</b>	:Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği
<b>IN</b>	:Ara nöron
<b>IP<sub>3</sub></b>	:İnositol trifosfat
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	:İnositol trifosfat reseptörü
<b>IRE1</b>	:İnozitol gerektiren enzim 1
<b>İPSP</b>	:İnhibitör postsinaptik potansiyeli
<b>JAM</b>	:Bağlantı adezyon molekülü
<b>K<sup>+</sup></b>	:Potasyum iyonu
<b>KBB</b>	:Kan-beyin bariyeri
<b>kDa</b>	:Kilodalton

<b>km</b>	:Kilometre
<b>LSR</b>	:Lipoliz stimüle lipoprotein
<b>m<sup>2</sup></b>	:Metrekare
<b>Mbp</b>	:Miyelin bazik proteini
<b>MDM2</b>	:Mürin çifti 2
<b>MDR-1</b>	:Çoklu ilaç geni-1
<b>mM</b>	:Milimolar
<b>MMP</b>	:Matriks metaloproteinaz
<b>mPFC</b>	:Mediyal prefrontal korteks
<b>mRNA</b>	:Mesajcı ribonükleik asit
<b>MRP</b>	:Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein
<b>MSS</b>	:Merkezi sinir sistemi
<b>Na<sup>+</sup></b>	:Sodyum iyonu
<b>Nm</b>	:Nanometre
<b>NMDA</b>	:N-metil-D- aspartat
<b>nRE</b>	:Talamus çekirdekleri alanı
<b>Nrf2</b>	:Nükleer faktör-eritroid bağlantılı faktör 2
<b>nRT</b>	:Retiküler talamik çekirdek
<b>PBS</b>	:Fosfat tampon çözeltisi
<b>PDK</b>	:Paroksizmal depolarizasyon kayması
<b>PECAM-1</b>	:Trombosit endotelyal hücre adezyon molekülü-1
<b>PERK</b>	:Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz
<b>P-gp</b>	:P-glikoprotein
<b>PLA<sub>2</sub></b>	:Fosfolipaz A <sub>2</sub>
<b>PN</b>	:Ana nöron
<b>PTZ</b>	:Pentilentetrazol
<b>REM</b>	:Hızlı göz hareketi
<b>RyR</b>	:Ryanodin reseptörü
<b>s</b>	:Saniye
<b>SE</b>	:Status epileptikus
<b>SERCA</b>	:Sarko-endoplazmik retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPaz
<b>SoCx</b>	:Somatosensöriyel korteks
<b>SR</b>	:Sarkoplazmik retikulum

<b>SRN</b>	:Spesifik röle çekirdeği
<b>SRP</b>	:Sinyal tanıma partikülleri
<b>SSS</b>	:Serebrospinal sıvı
<b>SUDEP</b>	:Epilepside ani beklenmedik ölüm
<b>TJ</b>	:Sıkı bağlantı
<b>TLE</b>	:Temporal lob epilepsisi
<b>TNAP</b>	:Dokuya özgü olmayan alkalın fosfataz
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:Tümör nekroz faktör-alfa
<b>TRN</b>	:Talamusun retiküler çekirdeği
<b>TRPM2</b>	:Transient reseptör potansiyel melastatin-2
<b>UPR</b>	:Katlanmamış protein yanıtı
<b>VE</b>	:Vasküler endotel
<b>WAG/Rij</b>	:Rijswijk'ten Wistar Albino Glakso
<b>XBP1</b>	:X-box bağlayıcı protein 1
<b>ZO</b>	:Zonula okludens

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil no	Sayfa no
Şekil 2.1. Epileptogenez sürecinin işleyişi. ....	7
Şekil 2.2. ILAE 2017 yılı nöbet tipleri sınıflandırması .....	9
Şekil 2.3. Epilepsi patofizyolojisinde rol aldığı düşünülen mekanizmalar .....	13
Şekil 2.4. Jeneralize absans nöbetleri hakkında öne sürülen teoriler. ....	17
Şekil 2.5. Absans epilepsi nöbetlerindeki nöronal devrelerin şematik gösterimi.....	18
Şekil 2.6. Kortikotalamik ağ çerçevesinin şematik olarak gösterilmesi.....	19
Şekil 2.7. GABA(B) reseptörünün heterodimerik yapısının şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.8. Nörovasküler ünitenin şematik gösterimi.....	28
Şekil 2.9. Farklı tipteki beyin bariyerleri.....	29
Şekil 2.10. Bariyer özelliği taşımayan beyin alanları.....	30
Şekil 2.11. Kan-beyin bariyerinin genel yapısı ve hücrel bileşenleri.....	32
Şekil 2.12. Beyin endotelyal bağlantıları.....	34
Şekil 2.13. Aktif nöronların mikrogliyal hücreler tarafından inhibisyonu .....	37
Şekil 2.14. Mikrogliyal inhibisyon mekanizması.....	38
Şekil 2.15. Nörovasküler ünitenin organizasyonu.....	40
Şekil 2.16. Kan-beyin bariyerinde madde taşınım yolları .....	42
Şekil 2.17. Kan-beyin bariyerinde ilaç taşınım yolları.....	43
Şekil 2.18. Normal ve patolojik koşullarda KBB'deki sinyal iletimi.....	46
Şekil 2.19. ER'nin genel yapısı .....	47
Şekil 2.20. UPR sinyalizasyon yolları .....	52
Şekil 2.21. UPR'nin epilepsi ile ilişkili patolojik süreçlerdeki rolü.....	56
Şekil 2.22. N-(p-amilsinnamoil) antranilik asitin kimyasal yapısı.....	57
Şekil 2.23. TRPM2 kanalının moleküler ve aktivasyon özellikleri.....	59
Şekil 2.24. Hidrokortizonun kimyasal yapısı .....	60
Şekil 2.25. Kortikosteroidlerin anti-inflamatuar etki mekanizması .....	61
Şekil 2.26. Tipik GABA-A reseptörü yapısı ve alt birim bileşimi.....	63
Şekil 2.27. Seçilmiş GABA-A reseptör alt birimlerinin farmakolojik rolleri .....	64
Şekil 3.1. Deney hayvanları için özel olarak tasarlanmış perfüzyon-fiksasyon cihazı. .	71

<b>Şekil 3.2.</b> Deney hayvanları üzerinde perfüzyon-fiksasyon işleminin uygulanma aşamaları.....	71
<b>Şekil 3.3.</b> Perfüzyon-fiksasyon işlemi sonrasında çıkarılan beyin dokusu.....	72
<b>Şekil 3.4.</b> Beyin dokusunda analizleri yapılacak olan hipokampus ve somatosensoriyel korteks alanları.....	73
<b>Şekil 3.5.</b> Beyin dokularını parçalama işleminde kullanılan sonikatör. ....	74
<b>Şekil 3.6.</b> Elektrofez ile jellerin yürütülmesi. ....	75
<b>Şekil 3.7.</b> Protein analizi sonucu elde edilen jel fotoğrafları. ....	76
<b>Şekil 3.8.</b> Beyin dokularından elde edilen koronal kesitlerin parafinle bloklanması. ....	77
<b>Şekil 3.9.</b> Parafine gömülü beyin dokularının mikrotom cihazıyla kesilmesi ve lama aktarılması.....	78
<b>Şekil 3.10.</b> Lama aktarılan beyin dokusu kesitlerinin boyanma işlemi. ....	79
<b>Şekil 4.1.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoriyel korteks ATF4 protein analizlerinin WB jel görüntüleri.....	85
<b>Şekil 4.2.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoriyel korteks ATF6 protein analizlerinin WB jel görüntüleri.....	88
<b>Şekil 4.3.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoriyel korteks CHOP protein analizlerinin WB jel görüntüleri.....	90
<b>Şekil 4.4.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoriyel korteks GRP78 protein analizlerinin WB jel görüntüleri.....	93
<b>Şekil 4.5.</b> Tüm gruplara ait somatosensoriyel korteks kesitlerinde GFAP boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri.....	95
<b>Şekil 4.6.</b> Tüm gruplara ait hipokampus kesitlerinde GFAP boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri.....	96
<b>Şekil 4.7.</b> Tüm gruplara ait somatosensoriyel korteks kesitlerinde ZO-1 boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri. (Boyalı olan damar endotel hücreleri ok ile gösterilmiştir.).....	98
<b>Şekil 4.8.</b> Tüm gruplara ait hipokampus kesitlerinde ZO-1 boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri. (Boyalı olan damar endotel hücreleri ok işareti ile gösterilmiştir.).....	99

- Şekil 4.9.** Tüm gruplara ait somatosensoriyel korteks kesitlerinde okludin boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri. (Boyalı olan damar endotel hücreleri ok işareti ile gösterilmiştir.).....101
- Şekil 4.10.** Tüm gruplara ait hipokampüs kesitlerinde okludin boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri. (Boyalı olan damar endotel hücreleri ok işareti ile gösterilmiştir.).....103





## TABLULAR DİZİNİ

Tablo no	Sayfa no
<b>Tablo 2.1.</b> Deneysel tipik absans epilepsisi kriterleri. ....	22
<b>Tablo 2.2.</b> Kemirgen modellerinde ve insanda tipik absans epilepsi nöbetlerinde görülen özellikler.....	25
<b>Tablo 3.1.</b> WAG/Rij sıçanlarda nöbet takibi esnasında görülen davranışlar .....	68
<b>Tablo 3.2.</b> ACA grubunda bulunan sıçanların örnek nöbet takip çizelgesi.....	69
<b>Tablo 3.3.</b> RIPA liziz tampon çözeltisinin hazırlanması.....	74
<b>Tablo 3.4.</b> Yürütme jelinin hazırlanması.....	75
<b>Tablo 3.5.</b> Yükleme jelinin hazırlanması. ....	75
<b>Tablo 4.1.</b> Deney hayvanlarında izlenen spontan nöbet sayılarının gruplar arası değerlendirilmesi.....	81
<b>Tablo 4.2.</b> WAG/Rij dişi ve erkek sıçanlara ait 1. ve 5. tartım sonuçları. (Ortanca (en küçük-en büyük).....	82
<b>Tablo 4.3.</b> WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların 1. ve 5. tartımlarından elde edilen vücut ağırlıklarının grup içi karşılaştırılması.....	82
<b>Tablo 4.4.</b> WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların gruplar arası vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.....	83
<b>Tablo 4.5.</b> WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların grup içi yem tüketimlerinin karşılaştırılması (Ortanca (en küçük-en büyük).....	84
<b>Tablo 4.6.</b> WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların grup içi yem tüketimlerinin karşılaştırılması (Ortanca (en küçük-en büyük).....	84
<b>Tablo 4.7.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoriyel korteks ATF4/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri (Ortanca (en küçük-en büyük).....	86
<b>Tablo 4.8.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoriyel kortekste ATF4 seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	86
<b>Tablo 4.9.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoriyel korteks ATF6/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri. (Ortanca (en küçük-en büyük).....	89
<b>Tablo 4.10.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoriyel kortekste ATF6 seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	89

<b>Tablo 4.11.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampüs ve somatosensoriyel korteks CHOP/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri. Ortanca (en küçük-en büyük).....	91
<b>Tablo 4.12.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampüs ve somatosensoriyel korteksteki CHOP seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	92
<b>Tablo 4.13.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampüs ve somatosensoriyel korteks GRP78/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri. Ortanca (en küçük-en büyük).....	94
<b>Tablo 4.14.</b> WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampüs ve somatosensoriyel korteksteki GRP78 seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	94
<b>Tablo 4.15.</b> GFAP ile boyanmış somatosensoriyel korteks ve hipokampüs koronal kesit örneklerinin boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	97
<b>Tablo 4.16.</b> ZO-1 ile boyanmış somatosensoriyel korteks ve hipokampüs koronal kesit örneklerinin boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	100
<b>Tablo 4.17.</b> Okludin ile boyanmış somatosensoriyel korteks ve hipokampüs koronal kesit örneklerinin boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırılması...	104

# 1. GİRİŞ

Epilepsi; beyinde bilişsel, psikolojik, sosyal sorunlara da eşlik eden ve nöbet geliştirmeye yatkın olma şeklinde tanımlanan, yaygın nörolojik bir hastalıktır (1). Absans epilepsi, aura veya postiktal durum içermeyen nöbetlerle karakterizedir. Absans nöbetleri, jeneralize nöbetler olarak adlandırılan tüm beyne yayılan nöbetlerdendir ve kısa süreli bilinç kaybı mevcuttur (2). Absans epilepsi nöbetleri erişkinlerde de görülebilir ama nispeten nadirdir. Sıklıkla 6-12 yaş arasında görülür. Çocukların ailelerinin % 25-40'ında benzer nöbetlerin görüldüğü bildirilmiştir (2, 3). Bu nöbetler, elektroensefalografi (EEG) özellikleri ile ilişkili olarak, ani başlangıçlı ve sonlandırılmalıdır. Bununla birlikte, bilateral senkronize, ani diken-dalga deşarjlarıyla (DDD) karakterizedir. Çocukluk çağı absans epilepsisi, okul çağındaki çocuklar arasında görülen diğer epilepsi türlerine göre daha yaygındır (3).

Fizyolojik koşullar altında, beyin parankiminde optimal nöronal esas fonksiyon, beyin mikrodamarlarının endotel hücrelerinden oluşan kan-beyin bariyeri (KBB) tarafından sağlanmaktadır (4). KBB, temel olarak beyin kılcal kapiller endotel hücreleri tarafından oluşturulur ve beyin homeostazisini düzenler. Epilepsi, beyin tümörleri ve septik ensefalopati dahil olmak üzere, çeşitli nörolojik hastalıklarda KBB bozulması görülmektedir (5). KBB'de bulunan ve parasellüler taşıma yolunu sınırlayan proteinler başlıca; klaudin-1, -3, -5 ile -12 ve okludindir. Zonula okludens (ZO) -1, -2 ve -3, aktin, glial fibriler asidik protein (GFAP) ve vinkulin ise sıkı bağlantı proteinlerine destek veren yapılardır. Beyin mikrodamarlarında, spesifik KBB marker proteini olan glukoz taşıyıcı-1 ekspresyonunun epileptogenez süreçlerinde azaldığı rapor edilmiştir (6). Buna ilaveten, KBB'de birleşme proteinleri olan ZO-1 ve okludinin, epileptik nöbetler üzerine etkinliğinin araştırıldığı deneysel çalışmalar kısıtlı sayıdadır.

Endoplazmik retikulum (ER), salgılama işlevinin yanı sıra, zar proteinlerinin üretilmesi ve katlanmasından sorumludur. Protein katlanmasının bozulması veya ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, ER stresi olarak bilinen patolojik bir duruma neden olur (7). Bir sinyal iletim yolu olan ve katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan uyarlamalı bir yanıtı tetikler. Bununla birlikte, kronik ER stresi altında, UPR apoptozise yol açan sinyalleri ortaya çıkarır ya da hücre ölümüne neden olabilir.

Bu stresi engellemek için öncelikle katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler sitoplazmada proteozomlar tarafından yıkılmaya çalışılır (ERAD mekanizması).

ER stres, ERAD mekanizmasıyla düzeltilemeyecek düzeyde ise, hücrede ER stresi engelleyebilmek ve tekrar ER homeostazisini oluşturmak için UPR olarak adlandırılan yolağın aktif hale getirilmesi gerekmektedir (8). Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), proteinlerin üretimindeki artış nedeniyle; eIF2 $\alpha$ /ökaryotik başlangıç faktörü 2 $\alpha$ 'yı (eIF2 $\alpha$ ), aktive edici transkripsiyon faktör4 (ATF4) yoluyla mitokondriyal apoptozu idare eden proapoptotik transkripsiyon faktörü olan C/EBP homolog proteinini (CHOP) uyarır (9). CHOP'un güçlü uyarılması, hücrenin büyümesinde duraklamaya ve apoptozise sebep olmaktadır. Bu nedenle, CHOP, ER stresinde hücrede apoptozisin aktive olmasında önemli rol oynar. ATF4, birçok hücre tipinde yüksek düzeyde eksprese edilir; fakat ER stresi sırasında eIF2 $\alpha$  fosforile olmadan etkili bir şekilde translasyonu gerçekleşemez. ATF6 ise ER stres ile karşılaşıncı posttranskripsiyonel modifikasyona uğrar ve ER katlanma kapasitesini yükselterek, strese karşı koruma sağlamaya çalışır (10).

İmmunglobulin bağlayıcı protein (BIP), glikozla düzenlenen protein (GRP78) olarak da bilinen, monomerik veya dimerik formda bulunan bir proteindir. Oligomerik formu, depo şeklidir. Monomerik formu ise şaperon görevi görmektedir. GRP78, ER dışında nükleus ve mitokondride de bulunmaktadır. ER'de kalsiyum miktarının azalması ve glikozillenmemiş proteinlerin birikmesi gibi stres durumlarında hücre yaşamının sürdürülebilmesinde kritik rol oynamaktadır (11).

Son çalışmalarla, kronik stresin protein katlama sürecini bozabileceği ve bunun sonucu olarak ER stresin kronik strese bağlı nöropatojenezde bir rolünün olduğu öne sürülmüştür. Bu çalışmalarda korteks, hipokampus ve amigdala dahil olmak üzere merkezi sinir sisteminde (MSS) birçok beyin bölgesinde, ER stresinin meydana geldiği bildirilmektedir (12). Bununla birlikte, ER stresin nörolojik hastalıkların patogenezinde katkıda bulunduğu moleküler mekanizmalar kesin değildir. Özellikle epileptik nöbetler üzerindeki etkilerinin altında yatan moleküler yollar büyük ölçüde belirsiz kalmaktadır. Bu nedenle, epileptik nöbetlerin neden olduğu ER stres mekanizmasının daha iyi anlaşılması, ER stres ile epilepsi arasındaki potansiyel bağlantıyı ortaya çıkarmak, yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi için oldukça önemlidir.

Kortikosteroidlerin, MSS'deki transkripsiyon düzenleyici olarak görev yapan steroid reseptörleri ile etkileşime girdiği, bununla birlikte voltaja duyarlı kalsiyum kanalları üzerinden etki ettiği düşünülmektedir (13). Epilepside kortikosteroidlerin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Her ne kadar kortikosteroidler tekrarlayan nöbetleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılsa da, bu nöbetleri tedavide kullanımları için fikir birliği protokolü yoktur.

Monoterapi olarak veya antiepileptik ilaçlarla bir arada birkaç farklı tipte kortikosteroid kullanılmaktadır. Hidrokortizon, prednizolon ve metilprednizolon gelişmiş bilişsel işlevlerin tedavisinde etkili olarak tanımlanmıştır (14). Fakat farklı kortikosteroidlerin farklı antiepileptik mekanizmaları olup olmadığını belirlemek ve bu mekanizmalardaki kortikosteroid yapısının ve altünitelerinin rolünü tespit etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

N-(p-amilsinamoil) antranilik asit (ACA), ilk olarak fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitörü şeklinde tarif edilmiştir. Ancak elektrofizyolojik kayıtlar, ACA'nın geçici reseptör potansiyel melastatin-2 (TRPM2) kanal blokeri olarak tanımlanmasına da olanak sağlamıştır. Beyinde yaygın olarak bulunan TRPM2 kanalları, doğrudan oksidatif stres ile aktive edilerek inflamasyon, sitokin salınımı ve nöronal ölüm gibi süreçlerde rol oynamaktadır (15). Ancak literatürde, ACA'nın absans epilepside ER stres ve kan-beyin bariyeri bütünlüğü üzerine nöroprotektif bir etkisinin olup olmadığına dair bir çalışma mevcut değildir. Bu bağlamda ACA'nın diğer nörolojik hastalıklarda olduğu gibi, epileptik nöbetler üzerine nöroprotektif etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Epilepsi tedavisinde antikonvülsan bir ilaç olarak kullanılan hidrokortizonun çok sayıda yan etkisi (uykusuzluk, alerjik reaksiyonlar, vücudun çeşitli yerlerinde ödem oluşması gibi) olması sebebiyle onun yerine, ACA'nın alternatif bir ajan olarak kullanılıp kullanılamayacağı da diğer bir araştırma konusudur. Mevcut tez çalışmasında amaç, epilepsi tedavisinde kullanılan kortikosteroid yapısındaki hidrokortizon ile çeşitli nörolojik hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalarda, nöroprotektif özelliği gösterilmiş olan ACA'nın, absans epilepsi için önem arz eden hipokampus ve somatosensoriyel kortekste ER stres ve KBB bütünlüğü üzerine koruyucu etkinliğinin olup olmadığını araştırmaktır. Bu değerlendirmeler yapılırken, dişi ve erkek WAG/Rij sıçanlarda cinsiyet ayrımı da dikkate alınmış ve ACA'nın cinsiyet bazında da etki düzeyleri arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur. Bu çalışmayla, absans epilepside KBB bütünlüğü ve ER stres üzerine etkili olan olası patofizyolojik mekanizmaların bu çalışma ile net olarak ortaya konulması, epilepsinin fizyopatolojisinde ve epilepsi tedavisi konusunda yeni yaklaşımların oluşmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Epilepsi

Epilepsinin tarihçesine bakıldığında, bu kavramın esasen bir hastalık olduğu fikrinin ilk kez eski Babil İmparatorluğu ve Mısır'da ortaya çıktığı görülmektedir (16). Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) tarafından nöbetler, “Beyindeki anormal aşırı veya eş zamanlı nöronal aktiviteye bağlı belirtilerin geçici olarak ortaya çıkması” şeklinde tanımlanmıştır (17). Dünya çapında bu durumdan mustarip olan yaklaşık 65 milyon insan vardır. Epileptik nöbetlerle ilişkili olarak mortalite oranlarının artması ve komorbiditeler ortaya çıkmaktadır. Bu durumlar da epilepsili kişilere ekonomik anlamda büyük bir külfet getirmektedir (17, 18). Genel olarak hastalığın seyrine bakıldığında, epileptik nöbet geçiren kişilerin günlük aktiviteleri oldukça sınırlıdır ve bu bireyler öğrenmede zorluk yaşamaktadırlar. Zira bu hastalığın insidansı oldukça yüksek olup, şu anki tedavi olanakları sınırlı ve yetersizdir (19).

Epilepside nöbet aktivitesi parsiyel veya jeneralize şekilde görülebilmektedir. En yaygın nöbetler, beyinde her iki hemisferi birlikte etkileyen jeneralize nöbetlerdir. Aksine parsiyel nöbetler beyinde özgün bir alan ile sınırlıdır ve belirli bir odaktan tetiklenmektedir (20).

Travmatik beyin hasarı, enfeksiyon, intraserebral kanamalar, tümör, kortikal displasi gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklar, kompleks febril nöbetler ya da status epileptikus (SE) nöbetleri gibi uzamış akut semptomatik nöbetler, beyinde ciddi hasarlara sebep olmakta ve neticede epilepsi vakalarını meydana getirmektedir. Bu vakalarda genel olarak etioloji bilinmektedir ve bu oran yaklaşık %40'tır (21). Epilepsi, insanlardaki mevcut olan risk faktörlerinin tespit edilebildiği beyin ile alakalı tek hastalıktır. Durum böyle olsa da, risk grubundaki kişilerde epilepsi oluşumuna tamamen engel olabilecek profilaktik bir tedavi yöntemi hali hazırda mevcut değildir (21, 22).

Epilepsi, 24 saat veya daha uzun bir süre içerisinde inme ya da kafa travması vb. sistemik/akut etkinin olmadığı durumlarda genellikle nöbet geçirme şeklinde görülür. ILAE'ye göre epilepsi, spesifik durumlarda ortaya çıkar.

Bu durumlardan bazıları: (a) sebebi bilinmeyen ve 24 saat ara ile oluşan en az iki nöbet meydana gelmesi, (b) kişinin önündeki 10 yıl içerisinde iki nöbet geçirmesinin ardından (Bu oran en az % 60'tır.) ilerleyen zamanlarda nüks etme şeklinde devam eden çok sayıda nöbet geçirmesi ihtimali, (c) epilepsi sendromu tanısı konulmasıdır (22). Epileptik nöbet aşamaları ise; preiktal dönem (nöbetten önce), iktal dönem (nöbet sırasında), interiktal dönem (art arda oluşan nöbetler arası) ve postiktal dönemler (nöbet sırasında hastalarda normal farkındalık düzeyine geçiş yapma dönemi) şeklinde meydana gelir.

İktal aşamada sıklıkla, hastanın konuşması ve komutları takip etme yeteneği, ekstremitelerinin duruşu, hastanın yaralanmalarının sürüp sürmediği (örneğin; dil ısırma, düşme), halsizlik, afazi vb. durumlar gözlemlenmektedir (23).

### **2.1.1. Epileptogenez**

Genel tanımıyla epileptogenez, “latent periyot” olarak isimlendirilen epileptik uyarının başladığı zaman ile ilk nöbetin oluştuğu zaman aralığı olarak ifade edilmektedir. Yaklaşık 130 sene önce ilk defa, 1881 yılında Gowers isimli bir bilim insanı, beyin hasarıyla epilepsi nöbetinin başlangıcı arasında aylarca süregelen ve nöbet olmaksızın meydana gelen latent bir aralığın oluştuğunun farkına varmıştır. Bu vakit alıcı süreç de epilepsiyi beraberinde getirmektedir. Farklı epilepsi hastalarında değişen uzunluğa sahip ve neticede kronik bir epilepsi tablosuna sebep olan hasarla tetiklenen süreç “epileptogenez” şeklinde tanımlanmaktadır (24).

Şekil 2.1’de gösterildiği gibi, epileptogenez sürecini tek bir mekanizma üzerinden düşünmek ve tanımlamak doğru değildir. Esasen bu süreç; nörokimyasal ve yapısal olarak oluşan birçok değişiklik ile karakterizedir (25). Epileptogenez sürecini temel olarak 3 aşamada inceleyebiliriz; (a) ilk hasarın oluştuğu evre, (b) latent periyot, (c) kronik epilepsinin oluştuğu faz. Status epileptikus (SE) ile indüklenmiş hayvan modellerinin kullanılmasıyla, çoğu hücrede ölüm, gliozis, nörogenezis ile ekstraselüler matriksin tekrar düzenlenmesi ve anjiyogenezis gibi süreçler hakkında sonuçlar elde edilmiştir. Bunlara ilave olarak, Strazburg’tan genetik absans epileptik sıçan (GAERS) ve Rijswijk’ten Wistar albino Glakso (WAG/Rij) sıçan gibi posttravmatik hasar ile oluşturulan hayvan modelleri de çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır (26).

Epileptogenez sürecinde en iyi tanımlanan ve en çok etkilenen bölgeler; amigdala, serebellum, parahipokampal korteks ile talamus da dahil olmak üzere çeşitli beyin bölgeleridir (27, 28). Birçok farklı hastalıkta da epilepside olduğu gibi, nörogenezin düzeyleri değişebilmektedir.

Nörogenez kronik hastalıklarda azalma göstermekle birlikte, çoğunlukla erişkin memelilerde hipokampusun dentat girusunda bulunan subgranüler bölge ile lateral ventrikülün subventriküler alanında görülmektedir (29, 30).

Epileptojenik hasar oluşumunun ardından glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonundaki artışla beraber ekstraselüler proteinler, kemokin ve sitokinlerde de artış olur ve artan bu maddeler gliyozise sebep olarak, epileptogenez sürecinin başlamasına ortam hazırlar (31).

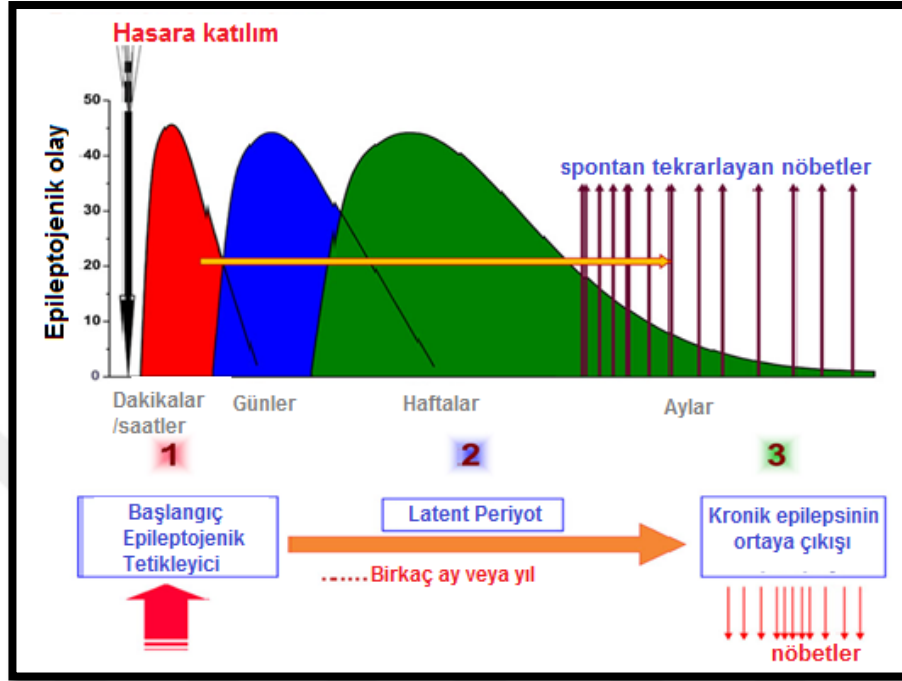
KBB geçirgenliğinin artması ile beyin parankimi içerisine salınan immün hücreleri tarafından salınan çeşitli maddeler direkt hasarlanma meydana getirerek, reaktif gliozisi tetikler. Reaktif gliozis; nöronal hasara karşın glial hücrelerdeki morfolojik ve fizyolojik değişiklikler şeklinde tanımlanabilir. Reaktifleşmiş glialardan salınan sitokinler, amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolproprionik-asit (AMPA)reseptörlerinin yoğun olarak sentezlenmesini ve uyarıcı nötransmisyonu artırabilirler. Sonuçta nöbetler, gliyozise ve nöbetlerin kısır döngüde devamına neden olarak, gliotik süreci şiddetli hale getirebilir (32). Gliaların epileptogenez sürece katkısı olmasına rağmen, bu konuda hala cevaplanmayı bekleyen sorular mevcuttur.

Epileptogenez sürecinde, sıçanlarda hipokampusun CA1 bölgesinde yer alan piramidal hücrelerin aksonlarında ve insanda entorhinal kortekste, filizlenmeler olduğu gösterilmiştir. Bu filizlenmelere glutaminerjik nöronlara ilaveten, gama amino bütirik asit (GABA)'erjik inhibitör aksonlarda da rastlanmıştır. Bu konuda beyin dışı başka herhangi bir organda inceleme yapılmamıştır (33).

Epileptik nöronlar, GABA-A reseptörü aracılığıyla GABAerjik nörotransmisyonu duyarlılıkta kısa ya da uzun süren adaptif değişiklik gösterebilirler ve eksitatör/inhibitör dengesini bozarak, anti-epileptik ilaçlar ile hedeflenen iyileşmeyi zorlaştırırlar. Bu konuda yapılan en son çalışmalarla, GABA-A reseptörlerindeki epileptogenetik değişikliklere, reseptörlerin açılıp kapanmasında görev alan iskelet proteinlerinin değişmesinin sebep olduğunu ve bunun sonucunda GABAerjik sinapsları direkt olarak etkileyerek, inhibitör GABAerjik akımı bozduğuna yönelik bir görüş ortaya konmuştur (34).



Bu çalışmalara ek olarak; östrojenler, kortikosteroidler, progesteron ve nörosteroidlerin de nöbet aktivitesi üzerine etki ettiği açığa çıkarılmıştır (35); fakat mekanizma tam olarak aydınlatılmış değildir.



Şekil 2.1. Epileptogenez sürecinin işleyişi (Reddy D.S. 2013'ten Türkçeleştirilmiştir.) (35).

### 2.1.2. Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırılması

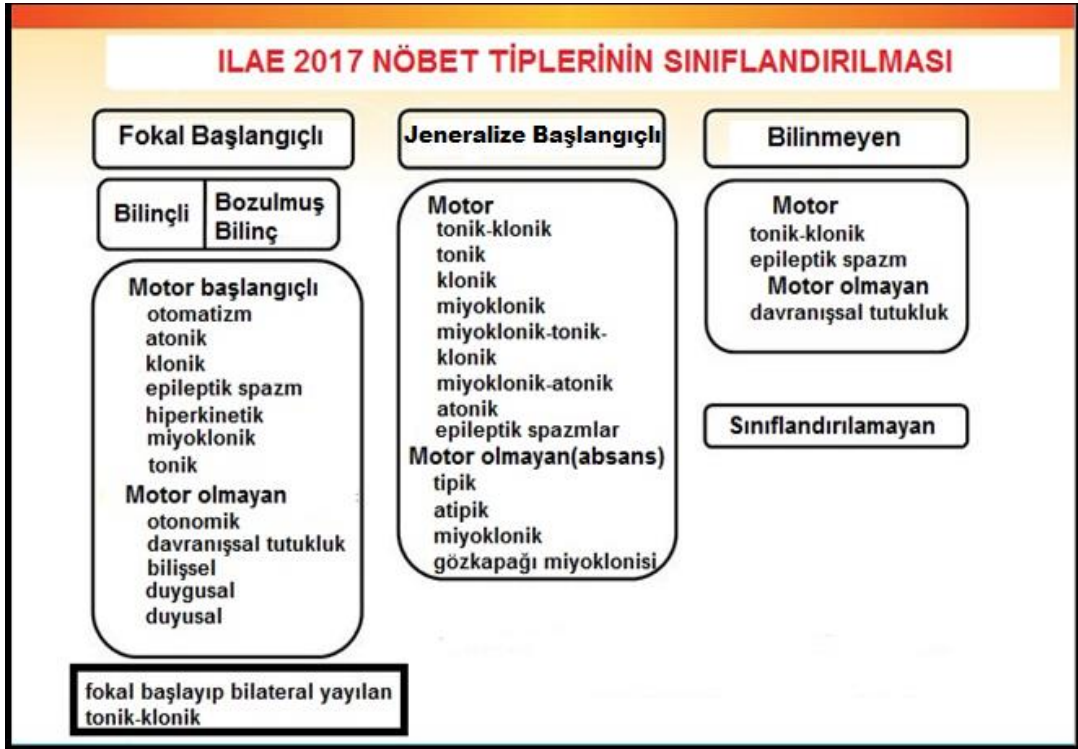
Epilepsi nöbetlerinin sınıflandırılmasının ilk olarak 1909 başlamış ve 1960 yılından itibaren Henri Gastaut tarafından yeni bir epilepsi sınıflandırılması önerilmiştir (36).

ILAE (Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği), epilepsinin ve nöbetlerin sınıflandırılması ile ilgili yeni çalışmalar düzenleyerek, epileptik nöbetlerin tedavisi ve araştırılması ile ilgili olarak güncel sınıflandırmalar yapmayı sürdürmektedir. Bu yeni sınıflandırmalarla, epilepsi nöbet tiplerinin tekrar gözden geçirilerek belirlenebilmesi sağlanmış, ayrıca nöbete neden olan etmenler ortaya konmuş ve böylece sınıflandırmalar prognozda ciddi anlamda bir yol gösterici olmuştur.

Bunlara ilave olarak, nöbet sınıflandırmalarının entellektüel faaliyetlerde bozukluk, otizm, öğrenme güçlüğü vb. riskler yanında ani ölüm riskleri hakkında da (Sudden Unexpected Death in Epilepsy- SUDEP) bilgilendirici olması oldukça önemlidir.

ILAE tarafından 1985 senesinde “Epilepsi ve Epileptik Sendromlar” adı altında bir sınıflandırma yapılmış ve uzun bir süre boyunca bu sınıflandırma tartışılarak, yankıları sürmüştür. Ardından ILAE, 1989 senesinde yeni bir sınıflandırmaya imza atmış ve bu tüm dünyada geniş kitlelere ulaşmıştır (37). Günümüzde yapılan bilimsel çalışmalar, epilepsi hastalığının teşhis ve tedavisine güncel yaklaşımlar kazandırmış olduğu için, her ne kadar eski epilepsi sınıflandırma çalışmaları uzun süre kullanılıp kabul görmüş olsa da, bu hastalığın altında yatan mekanizmaların değişmesi sonucunda yeni bir sınıflandırma yapılma ihtiyacı doğmuştur. Bu sebeple ILAE tarafından 2017 yılında daha çok etiyolojik özelliklerin olduğu yeni bir epilepsi sınıflandırması yapılmış ve epileptik nöbetlere güncel bir yaklaşım kazandırılmıştır (38). Bu yeni sınıflandırma 3 aşamadan oluşmaktadır ve anti-epileptik ilaç tedavisine yol gösterebilmesi açısından her aşamada mutlaka etiyoloji göz önünde bulundurularak, sınıflandırmaya dahil edilmiştir.

Şekil 2.2.’de gösterildiği gibi, ilk aşamada nöbetler (fokal, jeneralize ve bilinmeyen) şeklinde, ikinci olarak epilepsi tipleri (fokal, jeneralize, kombine fokal-jeneralize ve buna ek olarak bilinmeyen epilepsi grubu) ve son olarak da epileptik sendromlar sınıflandırmaya dahil edilmiştir (37, 38).



**Şekil 2.2.** ILAE 2017 yılı nöbet tipleri sınıflandırması (Fischer ve ark. 2017'den Türkçeleştirilmiştir.) (37).

Fokal nöbetler; beyin belirli bir bölgesinde başlamakta olup, nöbet esnasında bireyin beyninde görülen elektriksel aktivitenin olduğu yere göre değişim gösterir. Nöbet tanısı hastanın bilincinin yerinde olup olmadığına göre konulmaktadır. Bunun ardından, nöbet esnasında hastada yaşanan olaylar göz önünde bulundurularak “motor başlangıçlı” ya da “motor başlangıcı olmayan” nöbet tanımlaması yapılır (37).

Motor başlangıçlı olan nöbetler; otomatizm, atonik, klonik, epileptik spazmlar, hiperkinetik, miyoklonik, tonik nöbetler adı altında incelenir. Motor başlangıcı olmayan nöbetler incelendiğinde ise; otomatik, davranışsal tutukluk, bilişsel, duygusal ve duyusal şeklinde kategorize edildiği görülmektedir. Fokal başlangıçlı nöbetler, zaman içerisinde bütün beyin bölgelerine yayılım gösteren elektriksel aktivite şeklinde görülebilmektedir (38).

Jeneralize nöbetlerde; beyin her iki hemisferinde eş zamanlı deşarjlar ortaya çıkmaktadır. Bu nöbetler “motor” ve “motor olmayan (absans)” nöbetler şeklinde 2'ye ayrılmıştır. Motor nöbetler kendi içerisinde; tonik-klonik, tonik, klonik, miyoklonik, miyoklonik-tonik-klonik, miyoklonik-atonik, atonik ve epileptik spazmlar şeklinde isimlendirilerek sıralanmıştır. Tonik nöbetler esnasında vücudun tümü aynı anda sertleşip

gevşeme gösterirken, klonik nöbetlerde ise yüzde ve vücudun tümünde ritmik şekilde sallanma ve buna eşlik eden kasılıp gevşemeler görülür. Tonik-klonik nöbetlerde sırasıyla tonik, ardından klonik faz görülmektedir. Hasta, nöbet esnasında bilinç kaybına uğrar. Miyoklonik nöbetlerde daha çok üst ekstremitelerde çok kısa süreli, ani, fleksiyon ya da ekstansiyon kasılmaları görülmektedir. Atonik nöbetlerde ise kişinin kaslarında ani gerginlik kaybı olur ve ardından kişi yere yığılır. Epileptik spazmlar, genel olarak çocuklarda görülmekte olup, ellerde ve bacaklarda ani hareket ile kafayı o esnada öne atma şeklinde gözlemlenebilmektedir.

Nöbetin başlangıcı belirlenemeyen, belirtileri anlaşılamayan epilepsiler de “bilinmeyen başlangıçlı epilepsiler” olarak sınıflandırmaya dahil edilmiştir (38, 39).

### **2.1.3. Epidemiyoloji**

Dünya’da çok sık rastlanılan nörolojik rahatsızlıklardan biri de hiç şüphesiz epilepsidir. (40). Epilepsi hastalarının %70 kadarı anti-epileptik ilaçlar (AEİ) ile tedaviye iyi yanıt vermekte ve bu sayede atakların kontrol edilmesi sağlanabilmektedir.

Düşük ve orta gelirli ülkelerde özellikle de kırsal kesimlerdeki hastaların, iyi bir prognoza rağmen %73.3’lük kısmı tedavi olanaklarından yararlanamamakta veya tedavi düzgün şartlarda sürdürülememektedir. Türkiye’de epilepsi prevalansı % 0.8 ile %1.7 arasında değişim göstermektedir fakat bu anlamda yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır (41).

Yapısal ya da metabolik tip epilepsi görülen hastalarda ise nedeni tam olarak belirlenmemiş olmakla beraber yaşam beklentisi 10 yıla kadar düşmüştür (42). Mortalite oranı, yüksek gelirli ülkelerde yaşayan epilepsi hastalarında, genel nüfusa göre 2 ile 5 kat daha fazla görülürken, düşük gelirli ülkelerde bu oran yaklaşık olarak 37 kat artış göstermektedir (43). Epilepsi ve psikiyatrik bozukluklar gibi komorbiditelerin altta yatan sebeplerinin araştırılmasında, özellikle de epilepsi nöbetlerinin başlangıcından sonraki ilk yıllarda görülen yüksek mortalite belirleyici rol oynamaktadır (42).

Son 20 yıl içerisinde çok sayıda yeni AEİ kullanıma hazır hale getirilmiş olsa da, epilepsi hastalarının bazılarının ataklarında kontrol sağlanamamaktadır. Bu da ne yazık ki epilepsi hastalarında sıklıkla görülen “ani beklenmedik ölüm” (SUDEP) riskindeki artışı beraberinde getirmektedir (44). Yapılan araştırmalarla yüksek gelirli ülkelerde

epilepsiden dolayı meydana gelen ölümlerin en yaygın nedeninin, beklenmedik ani ölümler olduğu saptanmıştır (45).

Bir yılda epilepsi tanısı alan hasta sayısının son dönemlerde git gide artış göstermekte olduğu, her yıl da tahmini olarak 2.4 milyon insana bu tanının konduğu rapor edilmiştir (45, 46). Kontrolsüz jeneralize tonik-klonik nöbetler, diğer nöbet tiplerine göre ölüm oranı artışında yedi kat daha fazla risk faktörü oluşturmaktadır. Diğer risk faktörleri ise erken başlangıçlı (<16 yaş) ve uzun süreli nöbetlerdir (> 15 yaş) (47). Genel popülasyona kıyasla, gençlerde epilepsi ile ilişkili ani ölüm riski, 16 ile 24 kat artış göstermektedir (48).

Epilepsi yükünü artıran bir diğer unsur da komorbiditelerdir. Bu durum hastalarda ilaç seçimini ve buna ilaveten prognozu zorlaştırmaktadır. Epilepsiye; öğrenme güçlüğü, depresyon, dikkat eksikliği gibi durumlar da eşlik edebilmektedir (49). Epilepsili kişilerin yaklaşık 1/3'üne depresif bozukluk ya da anksiyete tanısı konulmaktadır (50, 51).

#### **2.1.4. Epilepsi Patofizyolojisi**

Epileptik nöbetlere neden olan anormal ve geçici senkronizasyon, nöronda başlangıç bölgesi olarak tanımlanan epileptik odaklar ve bağlantı yerlerinde değişik işaretler oluşturabilmektedir. Bu durum da nöronlarda iletişimi bozmaktadır. Epileptik nöbetlerin, nöronal odakta uyarımın artması ya da inhibisyonda meydana gelen azalmadan dolayı olduğu düşünülmektedir (51). Epileptik nöbetin başlaması, yayılımı ve sonlandırılmasında birbirinden farklı nöronal ağlar işlev görebilir. Bunun yanı sıra birtakım epigenetik faktörler (nöbetler, ilaçlar, stres, inflamasyon gibi) ağ dinamiklerini ve sinyal yollarını, beyindeki gelişimsel süreç açısından önemli ölçüde etkileyebilirler (52, 53).

Yapılan *in vivo* ve insan çalışmalarında kortikal nöronlarda, membran potansiyellerinde ve ateşlemede, depolarizasyona neden olan postsinaptik potansiyelde anormal uzama ve büyüme olduğu gösterilmiştir. Paroksizmal depolarizasyon kayması (PDK) olarak bilinen bu durum, nöronal ateşlemeyi tetiklemektedir ve bununla birlikte ateşlenmiş nöronlar da çevrelerindeki nöronları ateşleyebilme kapasitesine ulaşırlar (54). Epileptojenik odakta var olan "pacemaker" hücreler ateşleme özelliğine sahiptir. PDK'nın, MSS'deki temel eksitator nörotransmitterleri olan glutamat ve aspartat ile temel inhibitör nörotransmitteri olan GABA arasındaki dengenin bozulması sonucu

oluştugu düşünülebilir. PDK oluşumunda etkili olan diğer faktörün de iyon kanallarında meydana gelen bozulmadan olabileceği fikri oluşmuştur (55).

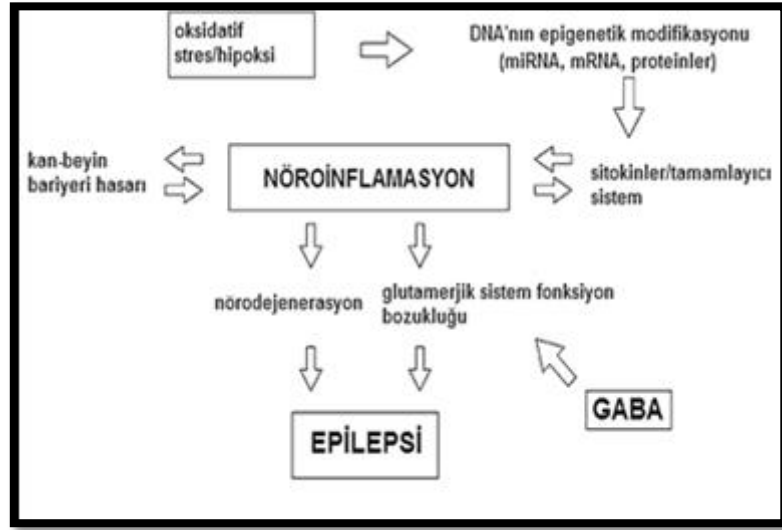
Nörotransmitterler, sinaptik alana boşalarak, bağlı oldukları reseptöre özgü bölgesel postsinaptik potansiyeli oluştururlar. Glutamaterjik yani eksitator özellikteki sinapslarda sodyum iyon ( $Na^+$ ) kanalları ve  $Ca^{2+}$  kanalları açılarak, postsinaptik alanda depolarizasyon ile eksitator postsinaptik potansiyeli (EPSP) meydana gelir. GABAerjik yani inhibitör olan sinapslarda ise postsinaptik alanda klor iyonu ( $Cl^-$ ) ya da potasyum iyonu ( $K^+$ ) kanalları açılarak, hiperpolarizasyon ile inhibitör postsinaptik potansiyeli (İPSP) meydana gelir. EPSP ve İPSP'ler ritmik olarak birleşir ve senkronize bir şekilde elektroensefalogram (EEG) ile kaydedilen ritmik deşarjları oluşturur (55, 56).

Bir epileptik nöbet oluştuğunda, kortikal nöronlar tekrarlayıcı aktivasyon ve hipersenkron oluştururlar. EEG'de oluşan diken-dalgalar artan eksitasyonu, bunu seyreden yavaş dalgalar ise cevap olarak meydana gelen inhibisyonu temsil eder. PDK'lar, EPSP'ye benzerdir ama çok hızlı ve çok sayıda deşarj oluşturmaları, geniş amplitüde sahip olmaları nedeniyle EPSP'lerden ayrılırlar (57).

Epileptik nöbet oluşumunun en fazla rastlandığı beyin bölgeleri, hipokampus ve neokortekstir. Bu nedenle, hipokampus; düzenli sinaptik eksitator devrelere sahip olması nedeniyle epileptik nöbetlerin elektrofizyolojik yönden araştırılmasında yoğun olarak kullanılan bir alandır. Hipokampusta sıklıkla incelenen alanlar; dentat girus, Ammon boynuzu alt bölgeleri, CA1, CA2 ve CA3 alanları, entorhinal korteks ve subikulum şeklindedir. Bu alanlar yüksek düzeyde uyarıcı niteliktedir (58).

Çeşitli epileptik sendromlarında genetik faktörlerin rol oynadığı da birçok çalışmada gösterilmiştir. Genellikle oluşan gen mutasyonları sonucunda birtakım iyon kanallarının ekspresyonlarında artış veya azalış durumunun meydana gelmesiyle, nöronlardaki iyon dengesi değişir ve nöronal uyarılabilirlik ile ateşleme bu mekanizma sonucu ciddi anlamda etkilenir. Örnek verilecek olursa; SCN1A geninde görülen bir mutasyon, voltaj kapılı  $Na^+$  iyon kanalı üzerine etki etmekte ve bu da juvenil miyoklonik epilepsi, febril nöbet-temporal lob epilepsisi (FNTLE) ve febril nöbet- jeneralize epilepsi (FNJE) olmak üzere üç ayrı epileptik sendromun oluşumunda rol oynamaktadır (59-61).

Şekil 2.3'te gösterilmiş olan ve epileptik nöbet oluşumunda etkili olduğu düşünülen olası mekanizmalar; a) eksitator sistemin uyarımında artış, b) inhibitör sistemde oluşan yetersiz aktivite, c) oluşan yeni nöronal döngülerin aktiflenmesi, d) hücre membranında yer alan iyon kanallarının sayısı, e) nöroinflamasyon, oksidatif stres ile nöronal hasarın meydana gelmesidir (61).



**Şekil 2.3.** Epilepsi patofizyolojisinde rol aldığı düşünülen mekanizmalar (Kobylarek ve ark. 2019'dan Türkçeleştirilmiştir.) (61).

## 2.2. Absans Epilepsi

Absans nöbet tipleri ilk kez Poupart tarafından 1705 yılında tanımlanmış olup, daha sonraki süreçte 1770 yılında Tissot, absans epilepsiye yeni bir tanım getirmiştir. 1824 yılında Calmeil ilk defa “epileptik absans” kavramından söz etmiştir.

Esquirol, 1838 yılında jeneralize *grand mal* nöbetlere karşılık *petit mal* terimini ilk kez kullanmış olup, absans nöbetler hakkında ilk detaylı bilgiler ise 1881 yılında Gowers tarafından verilmiştir. Hans Berger tarafından 1920'lerde hayata geçen elektroensefalografi ile EEG kayıtları alınmış, klinikte absans iktal deşarjlar hakkında bilgi sahibi olunmuştur (62, 63). EEG kullanımının yanı sıra kullanılmaya başlanan video monitörizasyonu ile absans epilepsinin detaylı olarak incelenmesi sağlanmıştır. Tüm bu gelişimsel süreci takiben ILAE, yaptığı çalışmalarla terminolojiye ve sınıflandırmaya yeni katkılar sağlamıştır (64).

Başlangıç yaşı 3-13 yaş arasında değişen absans epilepsi nöbetlerinin, genellikle 6-7 yaş arasında pik yaptığı ifade edilmiştir (65). Nöbet insidansının yüksek olması ve özellikle absans epilepsi türünün çocukluk çağında da görülmesi, uzun seneler sürmesinden dolayı, bireylerde hem sosyo-kültürel hem de ekonomik hayatın olumsuz yönde etkilenmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle, absans epilepsi için etkili bir farmakolojik tedavi süreci geliştirilmesi ve bu bağlamda fazla sayıda çalışma yapılması

gerekmektedir (66). Absans epilepsiler insanda ve hayvanda nöbetleri en iyi biçimde tanımlanabilen epilepsi türüdür (66-68).

Absans nöbetler aniden ortaya çıkan diken-dalga deşarjları (DDD) ile tanımlanır. Hareketsizlik, uyarana cevap vermeme, kayıtsızlık, geçici bilinç kaybı, bakakalma gibi durumlarla karakterize edilir ve nöbet oluşumunun ardından bu olaylarda düzelme olamamaktadır. Klinik olarak ayırt edebilme açısından absans nöbetlerdeki en önemli özelliğın “boş bakış” olduğu belirtilmiştir. İlk olarak Gibbs ve arkadaşları, absans epileptik nöbetlerin ardından EEG üzerinde 3 Hz (Hertz)'lik diken ve yavaş dalga kompleksinin, bilincin bozulması ile bağlantısı olduğunu saptamıştır (69).

### **2.2.1. Absans Epilepsinin Sınıflandırılması**

Absans nöbetler, jeneralize motor olmayan nöbet tipleri içerisinde yer almaktadır. ILAE 1981'de, absans nöbetleri bilinçte bozulma ile beraber hafif klonik, atonik, tonik veya otonomik bileşenlerin bulunduğu nöbetler olarak sınıflandırmıştır. Bu nöbetler ILAE'nin 2017'de yaptığı son sınıflandırmaya göre; tipik, atipik, göz kapağı miyoklonisi ve miyoklonik absans epilepsiler şeklinde kategorize edilmiştir (70, 71).

#### **Tipik Absans Nöbetleri**

Tipik bir absans nöbet, şiddeti zamanla değişiklik gösteren, aniden başlayan ve kişinin bilincinde farklılıklar ortaya çıkartan jeneralize nöbettir. Bu absans nöbetler esnasında hafızada genel olarak bozulmalara rastlanırken, ergenlik dönemindeki bireylerde bilincin biraz da olsa daha iyi korunduğu ifade edilebilir (71). Tipik olarak başta, göz kapaklarında, kaşlarda ve yüzdeki değişik kısımlarda klonik hareketlere rastlanmaktadır. Miyoklonus durumu ise ekstremitelerde az görülür. Nöbet öncesi dönemde ellerde ve ağızda çoğunlukla otomatizmlere rastlanır. Bu durumların uzun süre boyunca devam etmesi söz konusu olabilmektedir. Bireylerde zaman içerisinde absans status epileptikus (ASE) durumuna da rastlanmaktadır. ASE, davranışsal ve bilişsel değişiklikleri içeren, konvulsif özellik taşımayan, devamlı ya da aralıklı şekilde nöbetlerin olduğu idiyopatik jeneralize epileptik nöbetler arasında yer alan bir nöbet tipidir (71, 72). Tipik absans nöbet tipinde diken-dalgalar iktal evre esnasında mutlaka



gözlemlenmelidir. Ergenlikte görülen absans epileptik nöbetlerde, diken-dalga deşarjları; düzenli olmayan, daha süratli (3.5-6 Hz) ve jeneralize çoklu dalgalar halinde gözlemlenir (72).

### **Atipik Absans Nöbetleri**

Atipik absans epilepsi nöbetleri, jeneralize nöbet sınıfında yer almaktadır. Bu nöbetlerde ani başlangıcın az oluşu ve bilinç kaybının daha fazla görülmesi, onu tipik absans epilepsiden farklı kılar (72). Bacaklar ve gövdede kademeli çöküş, başın kas tonusunda kayması ve hafif miyoklonik gerginlik, absans epilepsili bireylerde rastlanan genel özelliklerdir.

Atipik absans nöbetler, epileptik ensefalopatisi olan ve ciddi boyutta öğrenme güçlüğü çeken, Lennox-Gastaut Sendromu olan çocuklarda görülmektedir. Bu çocuklarda nörolojik yetersizlik ileri safhadadır. EEG'de ortaya çıkan iktal paternler, tipik absans nöbetlerle kıyaslandığında daha yavaştır ve genel olarak 1,5-2,5 Hz aralığındaki dalgalarla karakterizedir (73).

Çocukluklarda görülen tipik absans nöbetlerinde düzenli seyreden 3 Hz'lik jeneralize diken-dalgalar görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, başlangıç yaşı 20 aylık olan 8 bebekte tipik absans nöbetleri incelenmiş ve EEG'de 3-4 Hz diken-dalga deşarjları olduğu rapor edilmiştir. Bebeklerin hepsi ilaç tedavisine cevap vermiş ve böylece 2-7 yıl içinde nöbet aktivitesi durdurulmuştur. Bu nedenle, 3 yaşından önce görülen absans epilepsi uygun bir prognoz gösterir (74, 75).

### **2.2.2. Absans Epilepsi Patofizyolojisi**

Absans epilepsi, idiyopatik jeneralize epilepsilerin bir alt tipidir ve absans nöbetlerin kortikotalamik sistemdeki etkileşimlere bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Genel olarak, idiyopatik jeneralize epilepsiler ve çocukluk çağında meydana gelen epilepsi nöbetlerini açıklamak için, DDD oluşumunda esas olan temel mekanizmaların aydınlatılması çok önemlidir (75).

Absans epilepsi patofizyolojisini araştırmak amacıyla inbred/transgenik hayvanlar ile insanlar üzerinde çalışma yapılmakta, genellikle benzer sonuçlar elde edilmektedir. Fakat çalışmalarda davranışsal etkenler, absans epilepsi için geliştirilmiş ilaçlara karşı

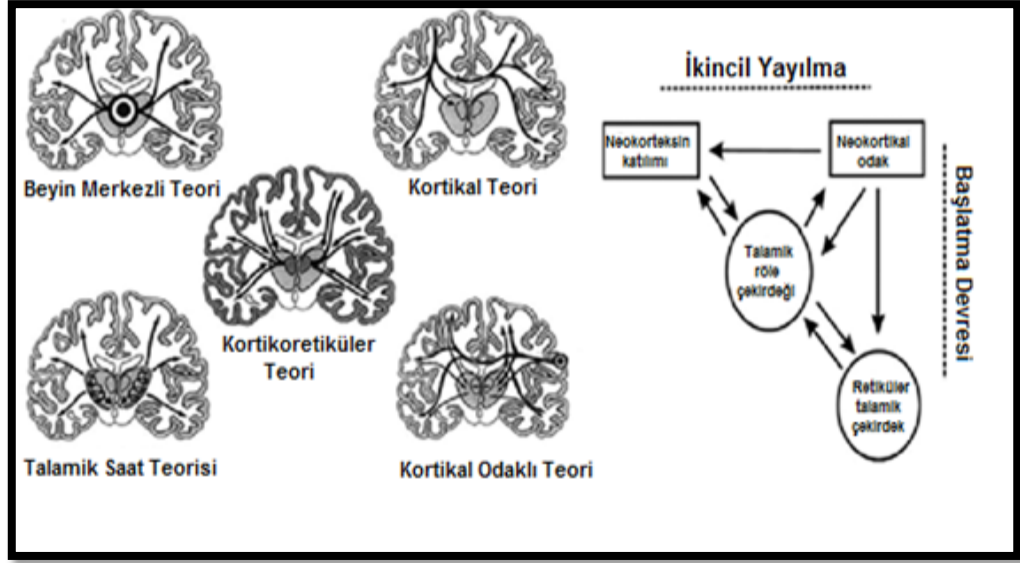
bilinmeyen duyarlılıkların gelişmesi sebebiyle, deneysel protokollerin mutlaka dikkatle kontrol edilmesi sağlanmalıdır. Bu anlamda deneylerden elde edilen sonuçları açıklarken de olası fizyopatolojik farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır (76).

Şekil 2.4'te gösterildiği gibi, farklı dönemlerde jeneralize absans nöbetler için patofizyolojik özellikleri dikkate alınarak 5 farklı teori ortaya konulmuştur. 1954 yılında açıklanan beyin merkezli teoriyle, talamus orta hattında meydana gelen deşarjların, subkortikal bir uyarı odağının derinliklerinden köken aldığı ifade edilmiştir. "Talamik saat" teorisi de 1991 yılında açıklanmış ve buna göre; retiküler talamik çekirdek, kortekste oluşacak ritmik iletiler için; "Talamik saati tetikleyen (pacemaker) hücrelere sahiptir." görüşü bildirilmiştir.

Başka araştırmacılara göre, absans nöbetlerin meydana gelmesinde, kortekste oluşan deşarjlar en temel rolü oynamaktadır. Buna ilaveten, DDD'nin korteks içinde hızlı bir şekilde jeneralize ve fokal başlangıçlı olduğu ifade edilmiştir (76).

Bir başka teori de, 1968'de kabul edilen kortikoretiküler teoridir. Bu teoriye göre; DDD'lerde yer alan iğlerin (spindle) oluşmasında, talamokortikal mekanizmalar etkin rol oynamaktadır. DDD'lerin beyin merkezli mi frontal korteksten mi şekillendiği tartışması 60'lı yıllara rastlamaktadır (77-80). Bu tartışmalara karşı Gloor, kortikoretiküler hipotezi öne sürerek ortak bir fikir geliştirmiştir. Bu teoriye göre; hipereksitabilite oluşan beyin korteksinde, talamusta meydana gelen ritmik iğ osilasyonları DDD'ye çevrilir.

Epileptik sıçanların üzerinde yapılan bir çalışmada, DDD'lerin oluşması için, sağlam fonksiyona sahip bir talamokortikal ağın olması gerektiği rapor edilmiştir (81). Çalışmada, çoklu diken-dalgalarda sinyallere ilişkin analizler incelenmiş, kortikotalamik bağlantılar yorumlanmış ve sonuç olarak somatosensöriyel odakta tutarlı bağlantılar tespit edilmiştir. Bu yorumlardan da anlaşılacağı gibi, nöbet başlangıcında talamus, korteks tarafından tetiklenmekte, ardından talamus ve korteks birlikte ritmik deşarjları ayarlayıp, güçlendirmektedir (82).

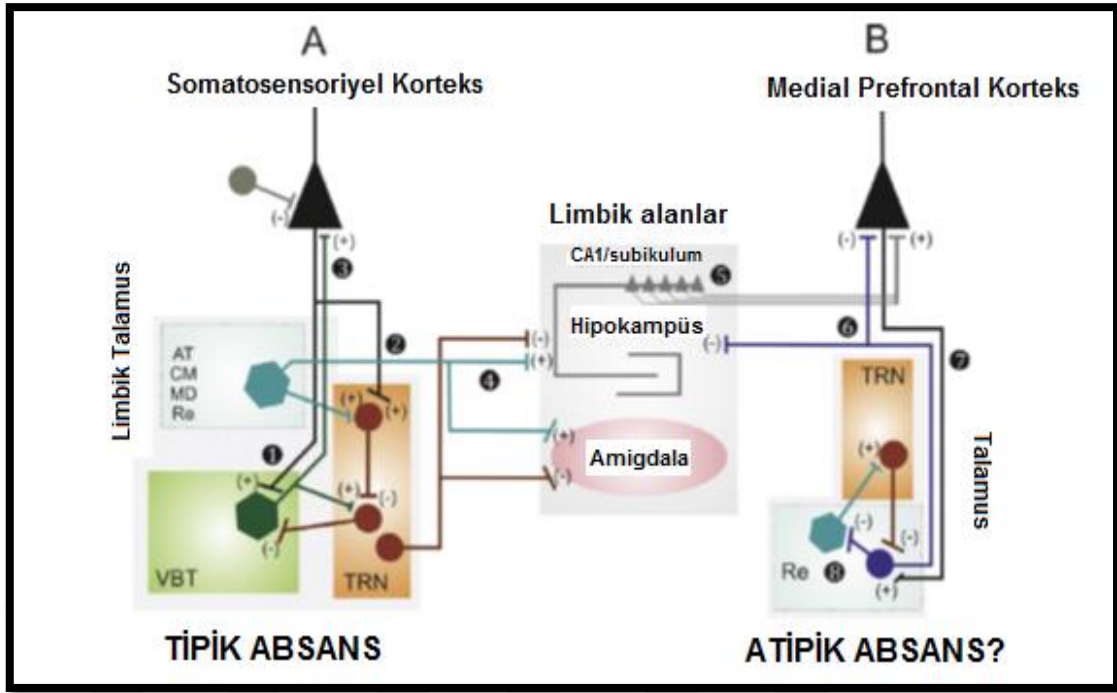


**Şekil 2.4.** Jeneralize absans nöbetleri hakkında öne sürülen teoriler (Bertram 2013 ve Meeren ve ark. 2005'ten Türkçeleştirilmiştir.) (81, 82).

WAG/Rij sıçanlar üzerinde yapılmış bir çalışmayla, genetik olarak spontan şekilde ortaya çıkan DDD'lerin ilk olarak somatosensöryel kortekste oluştuğu, daha sonra talamik çekirdeğe geçmeden evvel çabucak diğer kortikal alanlara yayıldığı gösterilmiştir (83).

Retiküler talamik çekirdekte (nRT)'de meydana gelen senkronize ve güçlü DDD'ler, kortikotalamik girdilerle birlikte EPSP patlamalarına sebep olur. Öncesinde oluşan hiperpolarizasyon, eşiği düşük olan T-tipi  $Ca^{2+}$  potansiyeli ve EEG diken dalgalarının her birine karşılık gelen yüksek frekanslı ve uzun süreli oluşan aksiyon potansiyellerinin patlama yapmasını tetikler (84).

Şekil 2.5'te şematize edilen hipoteze göre; atipik nöbetleri tetikleyen epileptiform aktivitede, nöbetler mediyal prefrontal korteks (mPFC) tabakalarında (5.ve 6.) başlar ve talamus çekirdeklerinin konuşlandığı alanlara (nRE) projeksiyon yapar. Buradan tekrar mPFC'ye dönüş yapar. Sonrasında monosinaptik bağlantı kurularak hipokampusün CA1 bölgesi ile iletişim sağlanır. Yansımali olarak ilerleyen bu devre, nRE ve nRT GABAerjik nöronlar arasındaki karşılıklı iletişim ile düzenlenir. Döngünün tamamlanması ve bitişi, talamokortikal bölgenin 4. tabakadaki nöronlarla bağlantı kurmasıyla olur (85).

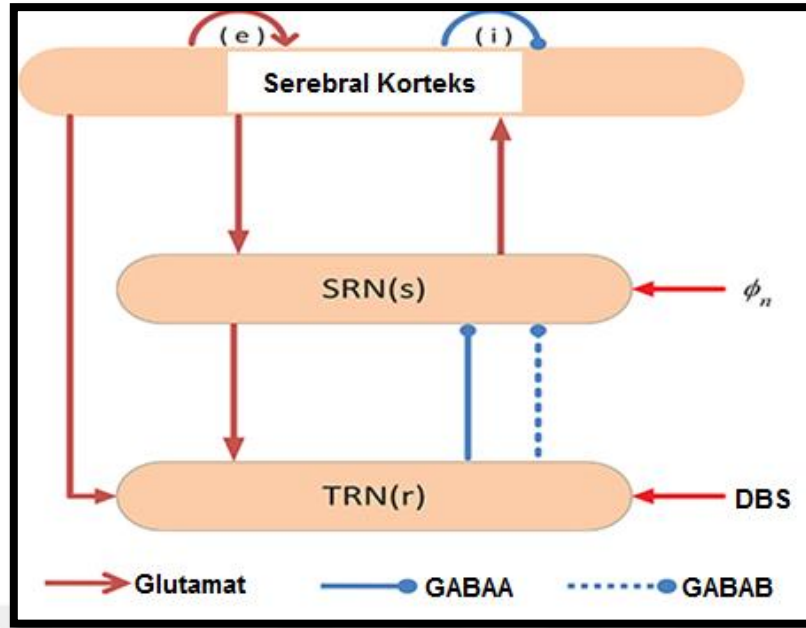


**Şekil 2.5.** Absans epilepsi nöbetlerindeki nöronal devrelerin şematik gösterimi (Onat ve ark. 2013'ten Türkçeleştirilmiştir.) (85).

(A) İyi yapılandırılmış tipik absans nöbetlerinin nöronal devre şeması. (B) Atipik absans nöbetlerinin varsayılmış devresi. (-) inhibisyonu, (+) uyarıcıyı belirtir. Şemada gösterilen limbik sistem alanları; **AT:** Anterior Talamik Bölge, **CM:** Sentromediyal Bölge, **MD:** Medial Dorsal Bölge, **Re:** Reinuens Çekirdeği, **VBT:** Ventrobazal Talamus, **TRN:** Talamusun Kaudal Retiküler Nükleusu.

Kortikotalamik ağlardaki ileri beslemeli inhibisyonları (FFI) açıklamaya yönelik yapılan çalışmalar, ağ bağlantıları ile ilgili detaylı bakış açılarının oluşmasını sağlamıştır. Kortikotalamik sistemi kapsayan biyofiziksel ortalama alan modeliyle, absans nöbet kontrolünde talamik FFI'ların etkisi olduğu şematize edilerek gösterilmiştir (86, 87).

Şekil 2.6'da anatomik olarak gösterilen nöral projeksiyonlarla birlikte, talamik FFI'lar "mikrodevre motifi" şeklinde isimlendirilmiştir. Genellikle ağlardaki bağlantılar eksitator özellik gösteren glutamat ve inhibitör işlev gösteren GABA ile yönlendirilir. Buna göre kortikotalamik ağda dört temel nöral hücre popülasyonunun varlığından söz edilmektedir: a) eksitator piramidal nöron popülasyonu (e), b) inhibitör ara nöron popülasyonu (i), c) talamusun retiküler çekirdeği (TRN) (r), d) spesifik röle çekirdeği. (SRN) (s) (88).



**Şekil 2.6.** Kortikotalamik ağ çerçevesinin şematik olarak gösterilmesi (Chen ve ark. 2014'ten Türkçeleştirilmiştir.) (89).

Ağ iki bileşen içerir: (I) serebral korteks, (II) talamus. Derin beyin stimülasyonu (DBS). Uyarıcı projeksiyonlara kırmızı oklarla gösterilen glutamat aracılık ederken, engelleyici projeksiyonlara sırasıyla, mavi kalın, yuvarlak başlı ve kesik çizgilerle temsil edilen GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> reseptörleri aracılık eder.

Bu çerçeveye göre, TRN'ye ait nöronlar, beyin korteksinden gelen uyarıcı sinyalleri alarak, GABA aracılı inhibitör sinyaller ise talamusun SRN'lerine iletilir. GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> inhibisyonları ile değişik zamanlarda oluşturulan inhibisyon, etkin bir şekilde çeşitli nöronlarda çoklu ateşlemeleri tetikleyebilir. Bu inhibisyon mekanizması ile kortikotalamik sistem içindeki absans nöbetlerin başlaması sağlanmış olur (89).

İleri düzeydeki araştırmalarla, TRN-SRN yolağı üzerinde GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> aracılı inhibisyonların, absans nöbetler üzerine düzenleyici etkinliğinin olduğu kanıtlanmıştır. Neokorteks ve talamusun her ikisinde, nöronların aşırı uyarımı ve sonucunda oluşan epileptik nöbetlerde FFI kaybının rolünün olduğu yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (90). Ayrıca GABA<sub>A</sub>erjik pallidokortikal ve nigro-talamik yolları kullanan bazal gangliyonların, absans nöbet kontrolünde etkinlik gösterdiği çalışmalarla ortaya konmuştur.

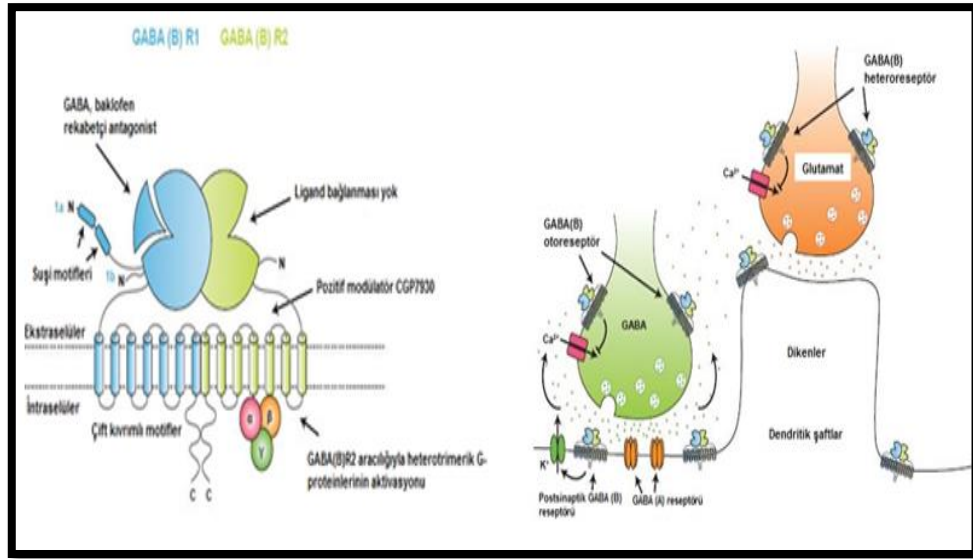
Sonuç olarak, kortikotalamik sistemdeki bu yolakların devre dışı bırakılmasıyla, DDD'lerin etkinliğinin azalacağı, böylece absans nöbetlerin engellenebileceği düşüncesi yaygın hale gelmiştir (89).

Şekil 2.7'de gösterildiği gibi, beyindeki esas inhibitör nörotransmitter olarak bilinen GABA; ligand kapılı iyon kanallarına ek olarak (GABA<sub>AR</sub> ve GABA<sub>CR</sub>) G-

proteine bağlanmış haldeki metabotropik reseptörleri ( $GABA_{BR}$ 'ler) etkinleştirir.  $GABA_{AR}$  ve  $GABA_{CR}$ 'nin aktiflenmesiyle,  $Cl^-$  iyonlarının akışının gerçekleşmesi ve sonunda da süratli bir şekilde inhibitör İPSP oluşumu sağlanır (91).  $GABA_B$  reseptörünün ( $GABA_{BR}$ ); R1a, R1b ve R2 olmak üzere üç alt ünitesi mevcuttur. Bu reseptörün yapısı heteromultimerdir. G-protein aracılı  $K^+$  kanalı elemanları ile sürekli ve yavaş inhibitör cevapları yönlendirir. Bazı deneysel çalışmalarda,  $GABA_{BR}$  antagonistlerinin nöbetleri baskıladığı, agonistlerinin ise nöbet şiddetini artırdığı rapor edilmiştir (91, 92).

Sinaptik sinyallemede ve glutamaterjik aktivasyon üzerinde antiepileptiklerin oluşturduğu patojenik değişiklikler, genetik modellerde somatosensoriyel kortekste (SoCx) tespit edilmiştir. GAERS'in neokorteksindeki NMDA'dan kaynaklı sinaptik bağlantılar geniş ölçüde dağılım göstermiştir ve uzun sürmektedir (93).

Absans nöbetlerin epileptogenezini açıklamaya yönelik yapılan moleküler çalışmalarda çeşitli iyon kanallarında bozuklukların meydana geldiği gösterilmiştir. Voltaj-kapılı iyon kanallarında ve sinaptik sinyallemede meydana gelen bu bozuklukların, SoCx ve yakınındaki alanlarda epileptik nöbetlere sebep olduğu da vurgulanmıştır. WAG/Rij sıçanların SoCx'inde, genel olarak voltaj-kapılı sodyum (Nav1.1, Nav1.6) kanallarının mesajcı ribonükleik asitlerinde (mRNA) bir artış olduğu tespit edilmiştir (94).



**Şekil 2.7.** GABA(B) reseptörünün heterodimerik yapısının şematik gösterimi (Cryan ve ark.2005'ten Türkçeleştirilmiştir.) (91).

Fonksiyonel GABA (B) reseptörleri, GABA (B) R1 ve GABA (B) R2 reseptörlerinin, C terminalindeki sarmal bobin motifleri ve transmembran ile hücre dışı alanların etkileşimi vasıtasıyla oluşturulur. Ligand bağlanması GABA (B) R1 ile elde edilirken, GABA (B) R2 allosterik modülasyona uğrar ve G-proteinini aktive eder. Beyinde iki GABA (B) R1 izoformu, GABA (B) R1a ve GABA (B) R1b şeklinde eksprese edilir. GABA (B) R1a'da iki "Suşi motifli" vardır ve bunlar GABA (B) R1b'de yoktur. GABA (B) reseptörleri hipokampus membranları üzerinde; presinaptik, postsinaptik ve de ekstrasinaptik olarak bulunur. GABA salma terminallerinde, presinaptik GABA (B) otoreseptörleri, GABA'nın salınımını inhibe eder ve heteroreseptörler ise diğer birkaç nörotransmitterin (örneğin glutamat) salınımını inhibe eder. Postsinaptik membranda GABA (B) reseptörleri, K<sup>+</sup> kanallarını aktive eder ve GABA (A) reseptör aktivitesini inhibe eden yavaş İPSP'leri indükler. Ekstrasinaptik membranlardaki reseptörler muhtemelen yakındaki sinapslardan GABA'nın salınması ile aktive edilir (91, 93).

### 2.2.3. Absans Epilepsi Deneysel Hayvan Modelleri

Absans epilepsi ile ilgili yapılan çalışmalardaki bilgilerin büyük çoğunluğuna, yapılan hayvan deneyleriyle, özellikle de sıçan ile farelerle oluşturulan genetik modeller sayesinde ulaşılmaktadır. Ayrıca, birtakım hastaların fenotiplerinin daha şiddetli oluşu, (oluşan bilişsel bozukluklar), bu nedenle de beyin fonksiyonlarının çok daha iyi ölçüde açıklanabilmesi ve absans epilepsi oluşum mekanizmasının öğrenilmesi gerekliliği, anti-epileptogenetik çalışmalara olan ihtiyacı kaçınılmaz yapmaktadır. Tipik absans epilepsisinin çocukları ve ergenleri etkileme oranları birbirinden oldukça farklıdır ve bu sebeple insandaki etiyojyiyi etik nedenlerle incelemek zordur (95). Tipik absans epilepsi modeli için geçerli kriterler Tablo 2.1.'de verilmiştir. Genetik ve art arda epileptik nöbet

geçiren hayvanlarla çalışmanın yanı sıra, bu hayvanlarda görülen özelliklerin hastalığın insandaki doğal ve klinik özelliklerine de benzer oluşu, epilepsi çalışmaları için önemli imkânların oluşmasını sağlar. Bu modeller sayesinde, absans epilepsinin evrimsel sürecini, fizyopatolojisini anlamak ve açıklayabilmek daha da kolay hale gelir.

**Tablo 2.1.** Deneysel tipik absans epilepsisi kriterleri (96).

<b>a) Tekrarlanabilirlik ve öngörülebilirlik</b>
<b>b) Ölçülebilirlik</b>
<b>c) GABA<sub>A</sub>erjik ilaçlar tarafından nöbetlerin şiddetinin değiştirilebilmesi</b>
<b>d) Tek bir gelişimsel profil göstermesi</b>
<b>e) GABA<sub>B</sub> reseptör antagonistleri tarafından bloke edilebilmesi</b>
<b>f) EEG ölçümlerinin ve davranışların insan durumuna benzer olması</b>
<b>g) Uygun farmakolojik özellikler taşıması</b>
<b>h) Hipokampüste absans jeneralize DDD'lerin izlenebilmesi</b>
<b>i) Talamokortikal mekanizmalara katılımı</b>

EEG'de davranışsal tutulum ile ilişkisi dikkate alınarak, farelerde ve sıçanlarda spontane oluşan DDD kayıtları alınmış ve bu sayede çeşitli genetik hayvan modelleri tanımlanmıştır (96). Deneysel hayvan modellerinin absans epilepsinin patofizyolojisinin anlaşılmasına olan katkıları özetlenecek olursa; i) Hareketsiz haldeki veya serbest hareket eden hayvanlarda sürekli ve düzenli DDD'leri kaydedebilme olanağı vardır. ii) Epilepsi nöbeti görülen ve nöbet aktivitesi olmayan alanlardan alınan kayıtlardaki veriler kıyaslanabilmektedir. iii) Epileptik nöbetlerin başlangıç evresinde, deney hayvanlarının özellikleri detaylıca incelenebilmektedir (96).

Deneysel modeller arasında, üzerinde en yaygın çalışılanlar WAG/Rij ile GAERS ırklarına mensup sıçanlardır. Absans epilepsinin patofizyolojisi araştırmalarında,



çoğunlukla monojenik mutasyonların olduğu fareler tercih edilmektedir. Fakat farelerde elektrofizyolojik yöntem kullanımı oldukça sınırlıdır. Bütün genetik absans epilepsi modellerinde, deney hayvanlarının frontal ve pariyetal kortekslerinden EEG kayıtları alınmakta, bu kayıtlarda da ani başlangıçlı-bitişli, senkronize ve çift taraflı DDD'lere rastlanmaktadır (97).

Genetik olarak belirlenmiş sıçan suşlarının farmakolojik modellere göre en büyük avantajı, insandaki spontan DDD'lerin kronikliğine benzerliğidir. Ek olarak, genetik modeller, elektriksel stimülasyonla veya farmakolojik müdahalelerle harici olarak manipüle edilen nörotransmisyonun, yanlış değerlendirmeye yol açabileceği metodolojik önyargıdan kaçınır. Genetik faktörlerin, absans epilepsisi de dahil olmak üzere idiyopatik jeneralize epilepsilerde belirgin bir rolünün olduğu gösterilmiştir (98).

#### **2.2.4. Tipik Absans Epilepsi Deneysel Hayvan Modelleri**

Tipik absans epilepsi nöbetleri, uzun süren jeneralize ve konvulsif olmayan nöbetler sınıfında yer almaktadır. Epilepsi nöbeti geçiren insanlar ile hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar, tipik absans nöbetlerinin serebral korteksteki belli alanlardan kaynaklandığını rapor etmiştir. Ancak, nöbetlerin gerçekleştiği alanların hücresel ve bölgesel ağ oluşum mekanizmaları net şekilde açıklanamamıştır (99).

#### **Strazburg'tan Genetik Absans Epilepsili (GAERS) Sıçan Modeli**

Araştırmacılar, Wistar sıçanlarının 6-12 aylıkken üreme kolonilerinde % 31 oranında diken-dalga tipi EEG deşarjları oluşturduğunu gözlemlemiştir (98). Daha sonra bu Wistar sıçanları seçilerek melezlenmiş ve DDD'lerin sayısı göz önünde bulundurularak "Strazburg'tan Genetik Absans Epileptik Sıçanları (GAERS)" olarak adlandırılan bir ırk oluşturulmuştur. Böylece seçilen ebeveynlerin 3-4 nesil boyunca üremesiyle, sıçanların % 100'ünün etkilendiği bir tür meydana getirilmiştir (99).

GAERS modelinde sıçanlar, EEG'de ani başlangıçlı ve sonlanmalı kendiliğinden 7-11 Hz'lik DDD'ler oluşturur. Bu deşarjlarla hayvanlarda tipik olarak donakalma ve hareketsizlik gözlenir. Gama-hidroksibütirik asit ve GABA, DDD'lerin oluşumunda GAERS'lerde önemli bir etki yapar.

Bununla birlikte; pentilentetrazol (PTZ) ve penisilin ile DDD'ler çok daha şiddetli bir hal almaktadır. Bu sıçanların DDD'leri, fasial somatosensör korteksinden başlayarak iki hemisfere yayılım gösterir (100).

GAERS modelinde nöbetlerin genel olarak somatosensöriyel kortekste olduğu görülmüş, ayrıca nöbet esnasında oluşan deşarjların kortikal alanın 5. ve 6. tabakasında yer alan nöronlarda başladığı bildirilmiştir (101).

### **Wistar Albino Glaxo / Rijswijk (WAG/Rij) Sıçan Modeli**

WAG/Rij ırkı sıçanlar, 1924'te Londra'daki Glaxo Laboratuvarları'nda A.L. Bacharach tarafından Wistar stokundan üretilen WAG suşundan türetilmiştir. WAG/Rij, kardeş-kuşak çiftleşmesinin 130'dan fazla nesildir yürütüldüğü bir melez suştur. Bu çizginin dışında WAG/Cpb, WAG/Kyo, WAG/Mbl ve WAG/Orl suşları gibi başka alt çizgiler de oluşturulmuştur. 1986 yılında, tüm yetişkin WAG/Rij sıçanlarının, hafif klinik semptomlara eşlik eden DDD'ler geliştirdiği keşfedilmiştir (102).

Hem pasif uyanıklık, dikkatsizlik, hem de uyku ve uyanış arasındaki geçiş sırasında, 6 aylık dişi ve erkek WAG/Rij sıçanlarda, günde ortalama 300-400 deşarj meydana gelir. Bu deşarjlar; aktif uyanıklık, derin yavaş dalga uykusu ve REM uykusu sırasında nadiren ortaya çıkabilirler (103). Bu kortikal EEG belirtileri, 2-3 aylıktan önce gözlenemez. DDD faaliyeti 1-30 s süren patlamalardan ve 7-10 Hz ani dalga frekansından oluşur (104, 105).

Çift taraflı simetrik sivri dalgalar, fronto-parietal alandan başlayarak tüm kortekste yayılım gösterir. Nöbetler, yüz miyoklonik refleksler, bıyıkların seğirmesi, nefes almayı hızlandırma, baş eğme ve göz seğirmesi gibi fenomenolojik semptomlarla birlikte görülür (106).

WAG/Rij sıçan modeli, sıçanlarda klinik ve elektroensefalografik semptomların eş zamanlı olarak ortaya çıkması ve DDD'nin varlığı sırasında yanıt verme hızındaki azalma açısından "yüz geçerliliği" özelliğini sağlamaktadır. Bu modelin ayrıca, konvulsif epilepside ilaç etkinliğinde özgüllük gösterdiği ancak absans epilepsisinde bu durumun geçerliliği olmadığı öngörülmektedir (106). İlaçlar insandaki diken-dalga aktivitesini etkilemekte, sıçanlarda da aynı etkiyi göstermektedir.

Uyku döneminde alınan kayıtlarla, diken-dalga deşarjları arasındaki ilişki, hem insan hem de sıçanlarda nöbet aktivitesinin kökenine bağlı olarak incelendiğinde, bu

modelin yapısal olarak geçerliliğini göstermektedir. Bu nedenle WAG/Rij modeli absans epilepsi araştırmalarında kullanıma uygundur (102).

WAG/Rij ve GAERS modelleri izomorfik özellikleri bakımından, tipik absans epilepsisinin en fazla kabul gören genetik sıçan modelleridir (95, 107). Elektrofizyolojik DDD'leri ve davranışsal (davranışsal tutulma) özellikleri, tipik absans epilepsisi olan insanlarda gözlenenlere yüksek derecede uygunluk göstermektedir. İnsandaki DDD oluşumunda yer alan genetik kalıtım ve serebral yapılardaki benzerlikler, GAERS'in homolog bir absans epilepsisi modeli olabileceğini düşündürmektedir. Model aynı zamanda elektroensefalik kayıtlarda kolayca tespit edilebilen spontan tekrarlayan nöbetler nedeniyle farklı entegrasyon seviyesindeki nöbetlerin oluşumunda yer alan nöral devreleri aynı anda keşfetmeye yardımcı olur (107).

GAERS ve WAG/Rij'deki DDD'ler, 7-11 Hz temel frekansı ile çok benzer, yüksek genlikli asimetrik senkronize ritmik aktiviteler gösterir. WAG/Rij sıçan modeli, epileptik hastaların farmakoterapisi hakkında tahminler yapılmasını sağlar ve bu nedenle bu tür, insan absans epilepsisinin geçerli bir modeli olarak kabul edilir. Tablo 2.2'de gösterildiği gibi epileptik sıçanların absans nöbetlerinin EEG kayıtları, insan epileptik hastaları ile paralel özellikler göstermektedir. Bu modeller, klinik durumlara yakın absans nöbetlerin doğal sürecini incelemek için idealdir (108).

**Tablo 2.2.** Kemirgen modellerinde ve insanda tipik absans epilepsi nöbetlerinde görülen özellikler (104).

		Sıçan / fare	İnsan
EEG	Bilateral senkronize DDD	+	+
	DDD sıklığı	7-11 Hz	2.5-4 Hz
	Talamus & korteks DDD'si	+	+
	Hipokampus DDD'si	-	-
İktal davranış	Donakalma, miyoklonus	+	+
	DDD süresince hareket	-	-
	Tam EEG, davranışsal korelasyon	+	+
Farmakoloji	ETO, VPA, TMD	+	+
	GABA (A)&(B) reseptörleri	+	+
	GABA (B) reseptörü	+	Veri yok
	Ciddi bilişsel bozukluk	-	-

### **Gama- Hidroksibütirik asit (GHB) Kemirgen Modeli**

GHB kemirgen modelinde talamokortikal alanda oluşan çift taraflı 7-9 Hz'lik DDD'ler görülür. DDD'lerin oluşum mekanizması ve patogenezi G-proteinler aracılığıyla eder. Bu modelin yüksek ihtimalle presinaptik GABA<sub>B</sub> reseptörü şeklinde görev yaptığı düşünülmektedir. GHB verilen sıçanlarda, diğer modellerde olduğu gibi DDD'ler hipokampüste gözlenmemektedir. Bazı çalışmalarda GHB ile oluşan absans nöbetlerin başlaması ve devam ettirilmesinde, GluR2 alt biriminin etkin olabileceği de belirtilmiştir (107).

### **Letarjik (lh/lh) Farelerle Oluşturulan Deney Modeli**

Bu modelde, GABA<sub>BR</sub> antagonistleri nöbetler üzerinde inhibisyona neden olurken, GABA<sub>BR</sub> agonistleri absans nöbetleri tetikler. Bu modelde absans nöbetlerin talamokortikal bölgelerde oluşmasında ve yayılımında siklik adenozin monofosfat (cAMP) ile deoksiribonükleik asit (DNA) bağlanma aktivatör protein-1 artışının etkili olduğu da ifade edilmiştir (109). GABA<sub>BR</sub> antagonistleri ile yapılan çalışmalarda, bu antagonist aracılığıyla oluşan sinaptik yanıtlarla fareler üzerinde absans nöbetlerin oluşabileceğinden bahsedilmiştir (110).

### **2.2.5. Absans Epilepside Meydana Gelen Davranışsal Değişiklikler**

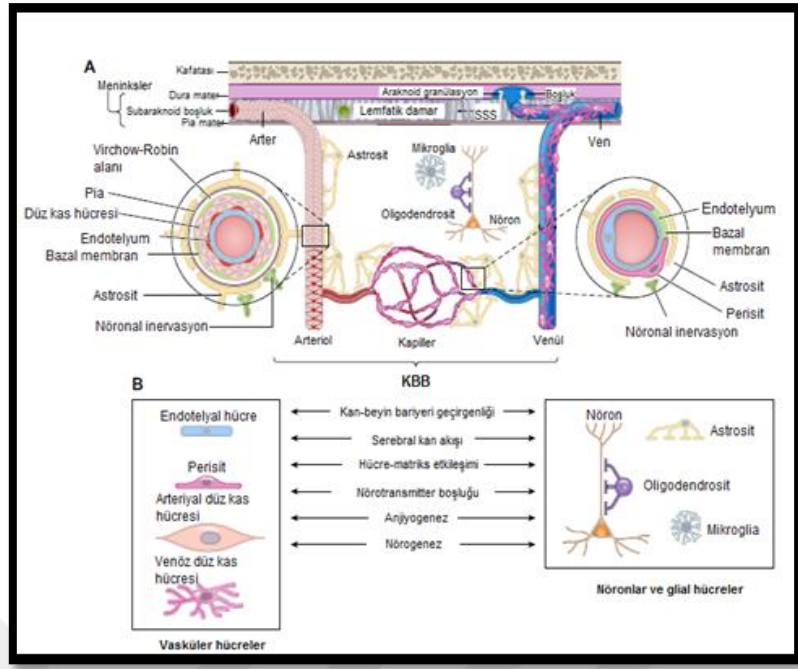
Epileptik nöbetlerde en çok rastlanan durumlardan biri hiç şüphesiz bilişsel bozukluklardır. Çoğunlukla çocukluk çağında görülen epilepsi nöbetlerinde; konuşma zorluğu, psikiyatrik bozukluklar ve bilişsel fonksiyonlarda gerileme görülmekte, dikkat sorunları, depresyon ve özgüven sorunu vs. durumları da bunlara eşlik etmektedir. Limbik sistem, DDD'lerin oluşum sürecinde aktif olarak görev almaktadır. Özellikle çocukluk çağında görülen absans nöbetlerde beynin bütün kısımlarının aktif olduğu görülmüştür. Genel olarak talamokortikal ve limbik bölgeler ile temporal lobun birbirleriyle bağlantılı şekilde aktiflendiği birçok deneysel çalışmayla ortaya konmuştur. Özetle limbik bölgelerin neredeyse tamamının absans nöbetlerin oluşum mekanizmasına katıldığı ifade edilmiştir (111, 112).

### 2.3. Beyinde Bulunan Bariyerler

Beyinde, nöronal iç dengenin ve MSS'nin korunmasından sorumlu çeşitli bariyerler mevcuttur. Şekil 2.9'da gösterilen bu bariyerler; araknoid bariyer, KBB ve koroid pleksustaki endim hücrelerinden meydana gelen kan-beyin omurilik sıvı (BOS) bariyeri şeklinde sıralanabilir. KBB; beyin kan damarlarındaki endotel hücrelerinden köken alır (113). Ayrıca parasellüler ve transsellüler taşıma sistemlerini kullanarak, beyin içerisine madde geçişinin sınırlı olmasını sağlar. Bununla birlikte endotel hücreleri, üzerine oturdukları bazal lamina, perisit gibi yapılar ile birlikte işlev görerek, beyin tamamındaki yapıları zehirli maddelerin etkilerinden korumaktadır. Reseptörler ve taşıyıcı proteinler sayesinde genellikle transsellüler yol kullanılarak, beyin parankimine gereksinim duyulan maddelerin geçişi gerçekleşmiş olur. Bu sayede nöronal iç denge sağlanır ve sürdürülür (114, 115).

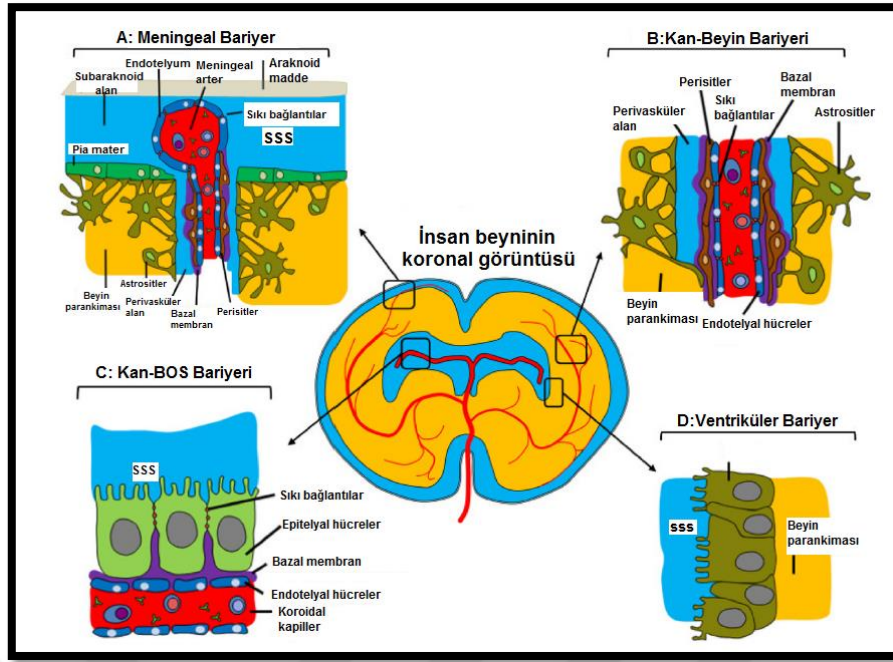
Şekil 2.8'de gösterilen nörovasküler üniteye bakıldığında, KBB'yi oluşturan endotel hücreleri ile astrosit, perisit, mikroglia, nöronlar ve oligodendroglia yapılarının iletişim halinde olduğu görülür. Bununla birlikte, epileptik nöbetlerin nasıl meydana geldiğinin tam olarak anlaşılması ve epileptogenez sürecinin fizyopatolojik sürecinin aydınlatılması için, KBB'nin çok önemli bir yapı olduğu düşünülmektedir. KBB'nin işlevinde ortaya çıkan değişimlerin nöbetlerin tetikleyicisi mi olduğu ya da nöbetlerin ardından oluşan KBB bozulmasının nöbetin şiddetini ve sıklığını artırmada rolünün olup olmadığı henüz net olarak açıklanamamıştır (115).

Bazı çalışmalar sonucunda, KBB'de meydana gelen bozulmanın, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda görülen semptomlardan önce oluşmaya başladığı konusunda bir takım veriler elde edilmiştir. Beyin kapillerinde meydana gelen hasar ile ilgili yapılan bir çalışmada; Alzheimer hastalığına ilişkin bilişsel bozukta oluşan semptomlardan önce, erken evrede, nörovasküler olarak KBB'de bozulma meydana geldiği, buna bağlı olarak mikrotübül ilişkili proteinleri olan tau ve amiloid- $\beta$  proteini ile etkilerin ne seviyede olduğu yapılan analizlerle (BOS, nörogörüntüleme, nöropatolojik analizleri) açıklanmıştır. Bu çalışma sonucunda, Alzheimer hastalığı ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda, hastalığın klasik olarak bilinen belirteçleri dışında, kişilerin beyinlerindeki hipokampus alanında, nörovasküler hasarların ve KBB bozukluklarının hastalığın başlangıcında bir biyobelirteç olarak işlev görebileceği düşüncesi oluşmuştur (116).



**Şekil 2.8.** Nörovasküler ünitenin şematik gösterimi (Sweeney ve ark. 2019'dan Türkçeleştirilmiştir.) (115).

**A)** Nörovasküler ünite, endotelial hücreler ve beyin kılcal damarları, venüller ve prekapiller arteriollerin üzerindeki perisitler gibi duvar hücrelerini içeren vasküler hücrelerden oluşur; arteriyoller, küçük arterler ve damarlar üzerindeki vasküler düz kas hücreleri; astrositler, mikroglia ve oligodendrositler gibi glial hücreler ve nöronlar. Endotelial ve duvar hücrelerindeki moleküler ekspresyon paternleri, arteriyo-kılcal venöz heterojenite (zonasyon) yaratarak, vasküler dallanma seviyelerinde farklılık gösterir. Penetrant arterler seviyesinde (sol iç kısım), endotelial hücreler damar duvarının iç tabakasını oluşturur. Bazal membran, endotelden 1 ila 3 vasküler düz kas hücresi katmanından pia aracılığıyla ayrılır. Virchow-Robin alanı, astrositik son ayakların oluşturduğu pia ve glia sınırlayıcıları arasındadır. Arteriyolar düzeyde, vasküler düz kas hücreleri, tek bir katmana indirgenirken, endotel tabakası, penetrant arterlerin ve kılcal damarların endoteliyle bir süreklilik gösterir. Kılcal seviyede (sağ taraf), perisitler ve endotel hücreleri bir bazal membranı paylaşır ve farklı tiplerde hücresel bağlantılar sergiler. Hem arteriyolar hem de kılcal damar duvarı astrositik uç ayağı ile kaplıdır. Vasküler düz kasların, perisitlerin ve astrositlerin hepsinde nöronal innervasyon vardır. KBB, nörovasküler ünite içinde merkezi olarak konumlandırılır ve vasküler ağaç boyunca uzanan, beyin kılcal damarları seviyesinde ve arteriyovenöz eksen boyunca düşük paraselüler /transselüler geçirgenliği ifade eden sıkıca kapatılmış endotel tabakasından oluşur. **B)** Nörovasküler ünitenin farklı hücreleri, KBB bütünlüğünü, serebral kan akışını, hücre dışı matris etkileşimlerini ve nörotransmitter klirensini düzenler ve anjiyogenez ile nörogeneze de katılır.



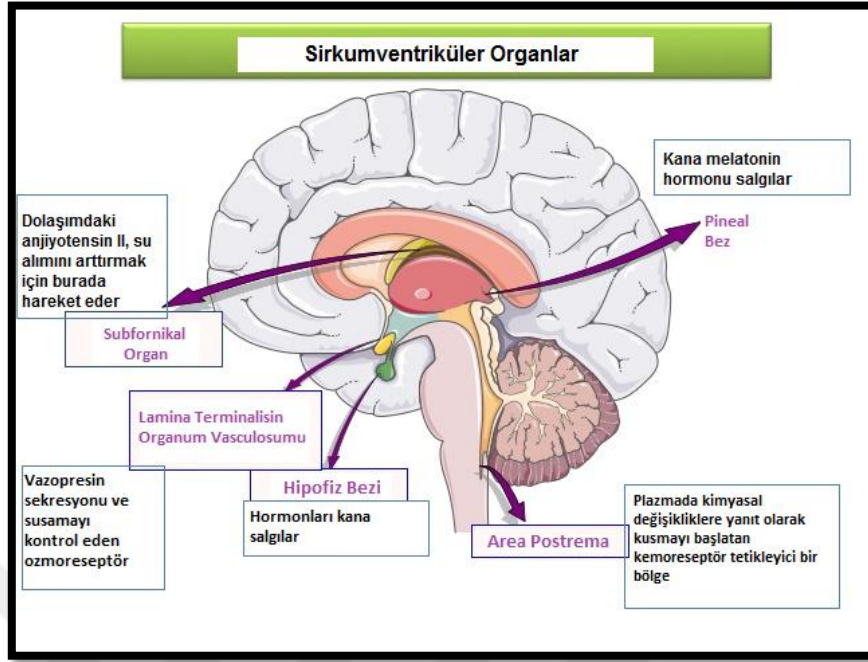
**Şekil 2.9.** Farklı tipteki beyin bariyerleri (Schmitt ve ark.2017'den Türkçeleştirilmiştir.) (116).

**A:** Meningeal bariyer. Subaraknoid boşluk, serebrospinal sıvı (SSS) ile ayrılan araknoidi ve pia materini ayırır. Pia mater, beyin ve omurluğun yüzeyine sıkıca yapışan meningeal zarftır. Pia mater'in altında, beyin parankimasının yakınında/üstünde, astrositik uç ayakları içeren glial sınırlayıcı membran bulunur. Pia mater, MSS parankimine yayılan/nüfuz eden bir kan damarı ağı (enine kesit gösterilmiştir) içerir. Kan damarları sıkı bağlantılar ile birbirine bağlı endotel hücreleri tarafından oluşturulur. **B:** KBB. Beynin daha derin yapılarına sızan daha küçük kan kılcal damarlarından oluşur (yan görünüm enine kesiti). Perivasküler boşluğun perisitleri bitirdiği ve astrositik ucun bazal endotelial hücreler etrafında ayakları kapladığı ve birlikte nörovasküler üniteyi oluşturduğu postkapiller venüldür. Not: Tanımın aksine, tüm endotel hücreleri perisitler tarafından çevrelenmez. **C:** Koroid pleksus. **D:** Beyin parankimini BOS içeren ventriküllerden ayıran geçirgen ventriküler bariyer.

### 2.3.1. Bariyer Özelliği Taşımayan Beyin Alanları

Beyinde MSS'nin sirkumventriküler ve ventriküler bölgelerinde bariyer özelliği olmaksızın yarar sağlayan ve çok önemli görevleri olan alanlar da mevcuttur. Şekil 2.10'da gösterilen bölgeler; subfornikal organ, pineal bez, lamina terminalisin organum vaskulosumu, nörohipofiz ve area postrema'dır. Sistem içerisinde 4 ayrı boşluk yer almaktadır. Boşluklar; BOS üretiminde görev alan koroid pleksustaki 2 adet lateral ventrikül ve kapiller damarlardan oluşan üçüncü ve dördüncü ventriküllerdir. Sirkumventriküler organlar, üçüncü ve dördüncü ventrikül duvarlarının etrafında yer almaktadır. Zengin damarlanma yapısına sahip bu organlar, kapiller damarlar ve kan

akımı aracılığıyla, beyin parankimine madde taşınımı için direkt bağlantı sağlamaktadır (117).



Şekil 2.10. Bariyer özelliği taşımayan beyin alanları (Xin ve ark. 2012'den Türkçeleştirilmiştir.) (117).

### 2.3.2. Kan-Beyin Bariyeri ve Genel Özellikleri

Kan-beyin bariyeri tanımı, ilk kez Alman bir mikrobiyolog olan Paul Ehrlich tarafından 1902 yılında yapılmıştır. Bilim insanı, bu konu ile ilgili yaptığı bir çalışmada, deney hayvanlarına intravenöz olarak tripan mavisi enjeksiyonu yaptığında, beyin dışındaki tüm organların boyandığını keşfetmiştir.

Yıllar sonra öğrencisi Edwin, tripan mavisini bu sefer köpek ve tavşanların BOS'una vererek yalnızca beyin parankiminin boyandığını görmüştür. Bu sayede Goldman, KBB'nin var olduğunu teyit etmiştir (118, 119).

1940 yılında Broman ise, KBB'nin beyindeki kapiller endotel hücrelerinin bir araya gelip farklılaşmasıyla oluştuğu bir yapı olduğunu açıklamıştır (119). 1960'lı yılların sonuna doğru elektron mikroskopunun biyolojide kullanımı yaygınlaşmış, Reese ve Karnovsky KBB ile ilgili yaptıkları deneysel çalışmada, farelere Horseradish peroksidaz (HRP) belirtecini verip, boyanın beyin parankimine geçiş yapmadığını görmüşlerdir. Bununla birlikte HRP, intravenöz enjeksiyonla BOS'a verildiğinde ise beyindeki ekstrasellüler sıvıdan geçip, astrositlere kadar gelmiş, bazal membranın arka kısmına



ulaşmıştır. KBB varlığının bu şekilde teyit edilmesinin ardından, sürdürülen birçok deneysel çalışmayla da bu yapının çok çeşitli ve son derece özelleşmiş bölgelerden oluştuğu ortaya konmuştur (120).

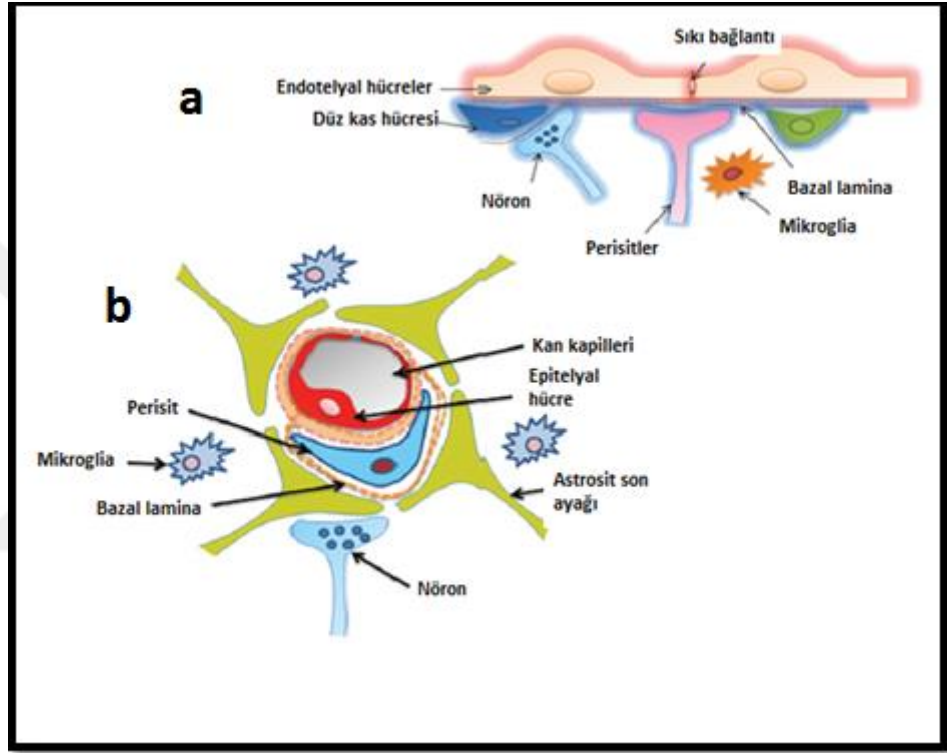
Erişkin bir insanda bulunan beyin kapilleri, 650 km uzunluğunda, 100 milyar kapillerden meydana gelmiş bir damar ağı şeklindedir. Bu ağın, yüzey alanı ortalama 12-18 m<sup>2</sup>'dir (121). Bu da beyindeki tüm hacmin % 0.1'ine karşılık gelmektedir. Beyindeki mikrodamarları ortalama olarak 5-100 mikron çapa ve 4-10 mikron lümen çapına sahiptir ve damarlar yaklaşık % 95 oranında KBB özelliği taşımaktadır. Bir nöronla bir kapiller damar arası mesafe ortalama 8-10 nm'dir. Bu bilgiden dolayı, "Neredeyse nöronların her birinin, bir kapiller damarı vardır." şeklinde bir fikir yürütülmektedir (122). Buna ilave olarak, yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bilgiye göre, bir nöron sitoplazması içinden, bir kapiller damarın geçtiği rapor edilmiştir (123-125).

KBB endotel hücreleri, kan ile beyin arasında çeşitli maddelerin taşınımını gerçekleştiren son derece önemli ve özgün yapılar içermektedir. Sıkı bağlantı yapılarının oluşturduğu fiziksel bariyer, tek/çift yönlü işlev gören taşıma sistemleri, taşınan çeşitli özellikteki maddeleri metabolize eden enzimatik bariyer ve immünolojik bariyer, önemli görevler üstlenmiş olan endotel hücre yapılarıdır (126, 127).

KBB, periferik kapillerler vasıtasıyla beyin parankimine tüm maddelerin geçiş yapmasına müsaade etmez. Ayrıca KBB, sıkı bağlantıları ve enzimatik bariyerleri ile parankimdeki nöronal/glial hücrelere madde transferlerinin detaylı olarak denetlenmesini sağlar (127). KBB'nin sahip olduğu bu bariyerlerden dolayı da, tedavi maksadıyla kullanılan birtakım ilaçların, etkili dozda beyne geçişi sağlanamamaktadır. Bu yapı, beyin dokusu ve kan damarları arasında sınırlı bir bölge oluşturur. KBB, konsantrasyon gradiyentlerine göre yalnızca yağda ve suda eriyebilen küçük molekül ağırlıklı maddelerin geçişini gerçekleştirir. Eğer bir madde, 400-700 Dalton'dan büyük ve suda erir özellikte ise, KBB onun beyne geçişine izin vermez. Bu sayede, KBB'nin nöronal dengenin sağlanması ve muhafaza edilmesinde ne kadar istikrarlı hareket ettiği ortaya çıkmaktadır (128).

Şekil 2.11'de gösterildiği gibi; astrosit, bazal membran, perisit ve nöronlar, KBB'ye yapısal ve işlevsel olarak destek olmaktadır. Bu yapıların tamamı KBB'nin nörovasküler ünitesini oluşturmaktadır. Genel olarak, beyin kapiller endotel hücreleri bazal membran ve perisitlerle etkileşim halindedir. Astrositlerin oluşturduğu laminin 1, 2 ve kollajen 4 ile endotel hücrelerince oluşturulan laminin 4 ve 5, bazal membranı oluşturan temel bileşenlerdir (129).

Bariyer özelliği gösteren beyin damar endotel hücrelerinde fenestra yoktur ve bunlar çok az miktarda pinositotik vezikül barındırır. Bunlara ek olarak, bu hücrelerin aralarında yüksek elektriksel direnç gösteren sıkı bağlantılar mevcuttur (129, 130). Bariyer özellikli endotel hücreleri, kendi reseptörleri ile birlikte taşıyıcı proteinleri oluşturabilme özelliğine sahiptir.  $K^+$  ve  $Na^+$ 'un taşınımını gerçekleştiren  $Na^+-K^+-ATP'$ az, glukoz taşınımını sağlayan glukoz taşıyıcısı-1 (GLUT-1) ile bazı makromolekülleri taşımada rol oynayan transferrin ve insülin reseptörleri bunlara örnek verilebilir (131).



**Şekil 2.11.** Kan-beyin bariyerinin genel yapısı ve hüresel bileşenleri (Panche ve ark.2015'ten Türkçeleştirilmiştir.) (129).

a) Kan-beyin bariyerinin genel yapısı. b) Kan-beyin bariyerinin hüresel bileşenleri.

### 2.3.3. Kan-Beyin Bariyerinde Bulunan Bağlantı Yapıları

KBB endotel hücrelerinde sıkı bağlantı (TJ) ve adherens bağlantıları (AJ) şeklinde isimlendirilen yapılar mevcuttur. Hücrenin olgunlaşması ve çeşitli etmenlere karşı korunmasında hücreler arası iletişimi sağlayan AJ'ler görev alır. TJ'ler de parasellüler olarak çözülmüş maddelerin ve iyonların taşınımını denetler. Böylece bu bağlantılar sayesinde endotel hücredeki sinyallerin alınımı kontrol edilir.

Koroid pleksus epiteli, beyin kapiller endoteli ve araknoid epitel hücreleri arasındaki TJ'ler, kan yoluyla gelen polar maddeler ve büyük moleküllerin beyin parankimine geçişine izin vermez (132, 133).

Şekil 2.12'de gösterildiği gibi, bazolateral membrana en yakın, AJ proteinleri, vasküler endotelyal (VE)-kaderin ve trombosit endotelyal hücre adhezyon molekülü-1 (PECAM-1), homofilik endotel-endotelyal bağlantıları kabaca 20 nm genişliğinde bir alan oluşturur. AJ'ler sitoplazma iskeletine bağlanır (115). Bu sayede reseptör sinyalini kontrol etmenin yanı sıra lenfositlerin, monositlerin ve nötrofillerin transendotelyal göçünü de düzenlemeye yardımcı olur. VE-kaderinin tirozin fosforilasyonu, lökositlerin beyin transendotelyal infiltrasyonu için gereklidir. Konneksin-37 (CX37), CX40 ve CX43 içeren gap junctionları, endotelyal hücreler arasında tek taraflı kanallar oluşturur. Dağılımlarında türe bağlı farklılıklar olsa da, endotelyal hücreler arası iletişimin sağlanması bu kanallar vasıtasıyla gerçekleşir. Ayrıca beyin endotel boşluğunda bulunan gap junctionlar, sıkı bağlantı bütünlüğünü koruma işlevi görür (134-136).

Diğer bağlantı molekülleri, endotelyal hücre yapışma molekülünü (ESAM) içerir ve yapısal olarak bağlantı adhezyon molekülleri-A (JAM)-A, B ve C'ye benzerlik gösterir. Bu moleküller bağlantı bütünlüğünü korur ve lökositlerin transendotelyal göçünü düzenler (137).

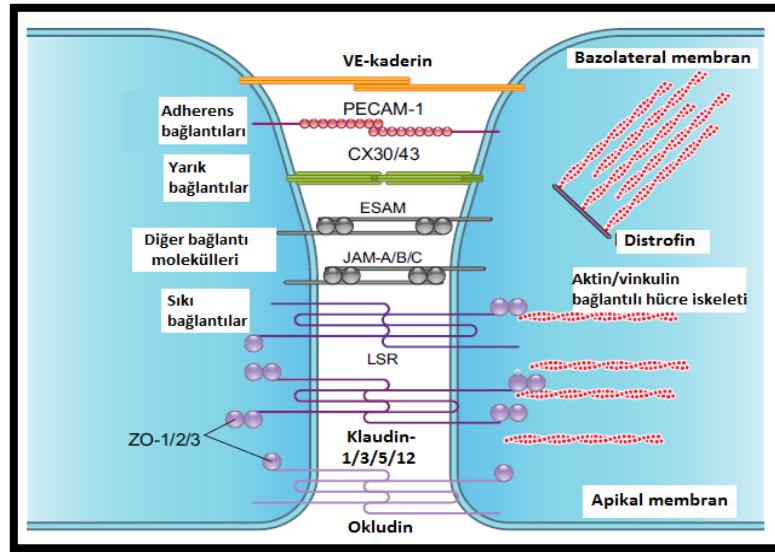
Adherens ve TJ yapısı içinde olan proteinler; klaudin-1, 3, 5 ve 12, okludin ile zonula okludens (ZO)-1, 2 ve 3'tür. Bunların yanı sıra singulin gibi çok sayıda protein, destek görevi görmektedir (115). Ayrıca TJ'lerde bağlantı adhezyon molekülleri ile adherens bağlantılarda yer alan kaderin proteinleri, hücrelerin birbirleriyle bağlantı kurmasını ve sitoplazmaya;  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gama) katenin ile bağlanmasını sağlar. Adhezyon moleküllerinde tek bir transmembran bölge mevcutken, klaudinler ve okludinde 4 transmembran bölge vardır (138).

TJ içinde yer alan klaudin proteini, komşu endotel hücreleri arasında iletişim kurarak parasellüler geçirgenliği sağlamaktadır ve 22 kDa ağırlığındadır. İntrasellüler alanda, ZO-1, ZO-2 ve ZO-3'ün PSD-95 (postsinaptik yoğunluk-95) protein bölgesiyle iletişime geçer. Klaudin proteininin şu an için bilinen 20 adet izoformu vardır. Sıkı bağlantılar arasında klaudin-1 ve 5, işlevleri en iyi bilinen proteinlerdir (139). Ayrıca lipoliz stimüle lipoprotein (LSR) / angulin-1 de, klaudin ve okludinler gibi çözünmüş maddeler ile iyonların tek katlı endotelyal membrandan parasellüler olarak difüzyonunu kısıtlayan sıkı bağlantı proteinleri arasında yer alır (115).

Okludin; 65 kDa ağırlığında olup, ilk keşfedilen TJ proteinidir. F-aktin ile de direkt olarak bağlantı halindedir ve  $Ca^{+2}$  dan bağımsız çalışmaktadır. Okludin proteininin C-sonlanması en fazla ZO-1 proteiniyle bağlantı kurar. Okludinin endotelial membrandaki yoğunluğu ve varlığı elektriksel dirençteki artışla paralellik gösterir (140).

Glial fibriler asidik protein (GFAP), astrositler dahil olmak üzere olgun glial hücrelerin hücre iskeletine destek olan ve dolayısıyla beyin hasarı için potansiyel bir belirteç olan filamenttir. Önceki çalışmalar, travmatik beyin hasarını takiben GFAP ekspresyonunda bir artış olduğunu göstermiştir (141). Ayrıca, disfonksiyonel astrositlerin epilepsi patofizyolojisindeki rolüne ilişkin artan bir bilgi birikimi vardır. Hem insan hem de hayvan epilepsi modellerinden elde edilen kanıtlar, nöbet olaylarının aktivasyonunda, astrositlerin boşluklarında yer alan bağlantı proteinlerindeki ve glutamat taşıyıcılarındaki değişiklikler nedeniyle aşırı uyarılabilirliğin aktive olduğunu göstermektedir (142).

Singulin yalnızca TJ'lerin endotel ve epitel hücrelerinde mevcut olan bir proteindir. Bu proteinin 140 ve 160 kDa ağırlığında iki farklı izoformu vardır. Globüler baş kısmı ve ZO-2, ZO-3, JAM, F-aktin ile miyozin etkileşim halindedir (115). Hücre iskeletinde temel bir protein olarak bulunan aktin, TJ proteinleriyle iletişime geçerek, parasellüler geçirgenliğin denetlenmesinde önemli bir işleve sahiptir. Distrofin de tıpkı aktin ve vinkulin gibi, endotelial hücre iskelet ağının sürdürülmesini sağlayan bir yapıdır (143).



**Şekil 2.12.** Beyin endotelial bağlantıları (Sweeney ve ark. 2019'dan Türkçeleştirilmiştir) (115).

#### **2.3.4. Kan-Beyin Bariyerinde Bulunan Destek Yapıları**

KBB geçirgenliğinin kendisi beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin, biyokimyasal özellikleri tarafından kontrol edilmesine rağmen, beyin mikrovasküler biyolojisi genel olarak bu hücrelerin bazal membranın yanı sıra, mikroglia, astrositler, nöronlar ve perivasküler perisitler gibi komşu glial hücrelerle etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bunlar, MSS' nin hem sağlığı hem de fonksiyonu için gerekli olan nörovasküler üniteyi oluşturmaktadır (144).

#### **Bazal Membran**

Bazal membran, KBB'nin önemli bir parçasıdır. Beyin mikrovasküler endotel hücreleri çevreler ve perisitleri sarar. Ayrıca bazal membran, hücreleri yerinde sabitler ve çevredeki beyin yerleşik hücrelerle bağlantı kurar (144). Beyin mikrovasküler endotel hücreler, perisitler ve astrositler, farklı hücre dışı matris sınıflarından oluşan moleküllerden oluşan 3 tane laminanın oluşturduğu bazal membranı oluşturmak ve sürdürmek için işbirliği yaparlar. Bunlar yapısal proteinler (kollajen ve elastin), özel proteinler (fibronektin ve laminin) ve proteoglikanlardır (145).

Bazal membran ayrıca, hücre adezyon molekülleri (CAM) olarak bilinen matriks yapışma reseptörlerinin yanı sıra kapsamlı ve karmaşık bir matriks oluşturan sinyal proteinlerini içerir (146). Bu moleküller vasküler hücrelerde, nöronlarda ve destekleyici glial hücrelerde eksprese edilir ve KBB' nin korunması için gereklidir. Bazal membranın bozulması, mikrovasküler endotel hücre iskeletinde değişikliklere yol açar ve bu da TJ proteinlerini ve bariyer bütünlüğünü etkiler. Ayrıca, matriks metaloproteinazların bazal membranı sindirdiği bilinmektedir. Buna göre, hücre dışı matriksin bozulması, çeşitli patolojik koşullarda artan KBB geçirgenliği ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir (144, 147).

#### **Nöronlar**

Nöronların KBB fenotipi üzerindeki gelişimsel rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Bununla birlikte, nöronlar, beyin mikrovasküler endotel hücreleri için benzersiz enzimlerin ekspresyonunu indükler.

Metabolik gereksinimlere yanıt olarak kan damarlarının işlevini düzenleyebileceğine dair bazı kanıtlar vardır (148). Ayrıca, beyin mikrovasküler endotelial hücreleri ve astrositik süreçler arasında doğrudan noradrenerjik, serotonerjik, kolinerjik ve GABAerjik nöronlar mevcuttur. Olgunlaşmış endotelial hücrelerin sabit beyin mikro ortamında uygun nöronal aktiviteyi mümkün kılan çift taraflı bir fonksiyonu vardır (149).

Nörovasküler ünite önemli bir rol oynayan nöronlar, kendi işlevleri dışında, travma ve iskemi gibi nöronal hasara neden olan hastalıklarda bozulan KBB üzerine etki ederler. Patolojik bir durum söz konusu iken, nöronların beslenmeleri azaldığında kendi sitoplazmalarından kapiller damar geçişine izin verdikleri ifade edilmektedir. Akut hipertansiyonla lokus seruleusta bir hasar olduğu zaman, noradrenerjik innervasyon bozulur ve bunun sonucunda KBB geçirgenliğinde değişim meydana gelir. Bu alandaki bilgiler henüz netleşmediği için, konu üzerine çalışmalar sürdürülmektedir (148).

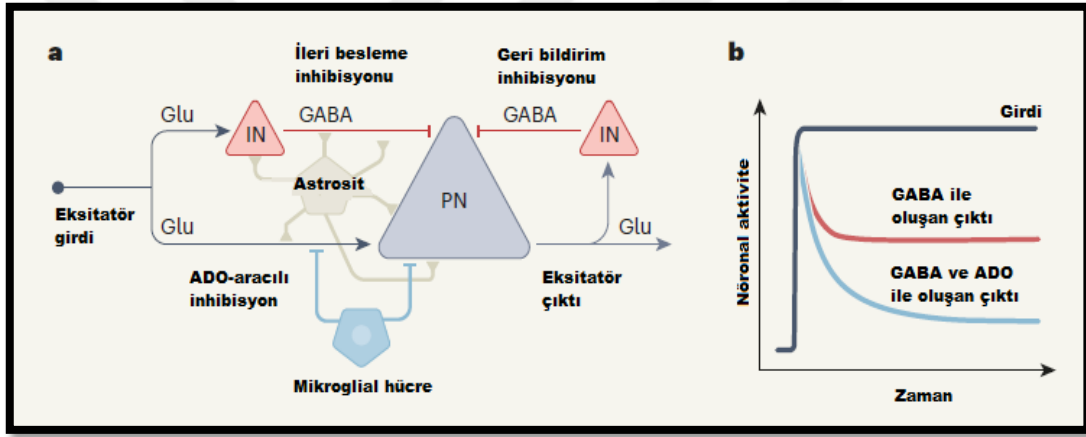
### **Mikroglialar**

Mikroglia, MSS'nin bağışıklık tepkilerinde, yerel mikro ortamın araştırılmasında ve MSS'nin homeostatik bozukluğuna yanıt olarak fenotipin değiştirilmesinde çok önemli bir rol oynar. Aslında bu hücreler, kendilerini dinlenme halinde ve aktive edilmiş mikroglia olarak iki şekilde gösterir. Dinlenirken, hücrelerin gövdeleri küçüktür ve incedir. Aksine, aktif mikroglia ise fagositik bir morfolojiye sahip hale gelir (147). Diğer organlardaki makrofaj popülasyonuna göre, bu hücrelerin çeşitli efektör fonksiyonları mevcuttur (146). Mikroglia perivasküler alanda bulunduğu için, beyin mikrovasküler endotelial hücreleri ile etkileşime girerek, KBB özelliklerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (149).

Mikrogliaların önceden bilinmeyen bir rolü de, beynin bilgiyi işlemesine yardımcı olmak için aktif nöronlara olumsuz geri bildirim sağlamaktır. Beyindeki nöral devreler, gecikmiş inhibisyonla birlikte, nöronal uyarımlara (hücre zarı boyunca elektriksel potansiyelde pozitif bir değişiklik) dayanır. İnhibisyon, bilgiyi kodlamak için nöronal aktiviteyi optimum aralıkta tutmak, beynin enerji kullanımını ve hesaplamayı en aza indirmek ile yararlı nöronal çıktılar elde etmek için çok önemlidir. Şekil 2.13'te gösterilen mekanizmada olduğu gibi, inhibisyonda, nöronun membran potansiyelini daha negatif hale getirmek için nörotransmitter molekülleri (GABA amino asiti gibi) salgılayan ve ara

nöron (IN) olarak nöronal bir alt tipin aracılık ettiği bilinmektedir. Ayrıca, astrositlerden de nörotransmitter salımı yapıyor olabileceği düşünülmüştür (150).

Badimon ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada farelerde büyüme faktörü reseptör proteini olan CSF1R'nin aktivasyonunu bloke ederek, mikroglia oluşumunu engellemeyi sağlamıştır. Mikroglia olmayan durumda, hayvanlara nörostimulan verdiklerinde, ilaçların, hiperaktif nöronal uyarılmanın göstergesi olan uzun süreli epileptik nöbetler ürettiği tespit edilmiştir. Aynı ilaçları alan vahşi tip hayvanlarda nöbetler gözlenmemiş, bu da mikroglialının normalde nöronal aktivite üzerinde fren niteliğinde durdurucu bir etki uyguladığını ispatlamıştır (151). Mikroglial süreçlerde, ATP moleküllerinin salınmasıyla aktif nöronlar hücre gövdelerine (çekirdeği barındıran) çekilerek, hem normal olarak hem de patolojik koşullarda nöronal aktivite azaltılır.



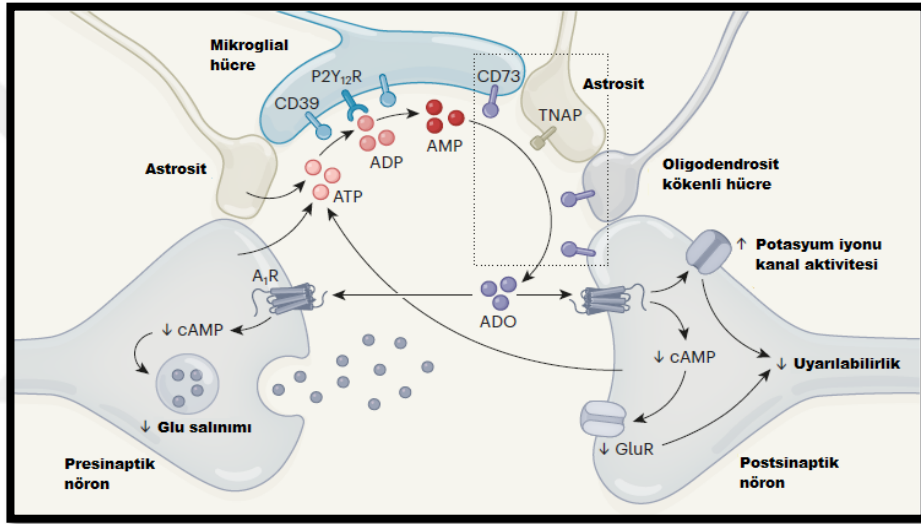
**Şekil 2.13.** Aktif nöronların mikroglial hücreler tarafından inhibisyonu (Pfeiffer ve Attwell 2020'den Türkçeleştirilmiştir.)(150).

**a:** Bir ana nörona (PN) odaklanan genel bir nöronal devre. Hem PN hem de devreye bir uyarıcı giriş, uyarıcı nörotransmitter molekülü olan glutamati (Glu) serbest bırakır. Ara nöronlar (IN), inhibitör nörotransmitter GABA'yı serbest bırakır. Astrositler tarafından üretilen nörotransmitterler, nöronal devrelerde ince ayar yapar. Devre ayrıca adenozin molekülü (ADO) tarafından inhibe edilir ve ADO kısmen mikroglial hücreler tarafından üretilir. **b:** Devreye giriş arttığında, GABA aracılı inhibisyon, hızlı bir zaman ölçeğinde çıktıyı azaltır. Mikroglia kaynaklı ADO, inhibisyona daha yavaş bir bileşen ekler.

Şekil 2.14'te gösterildiği gibi, mikroglial enzim CD39, ATP'yi ADP'ye ve sonra AMP'ye dönüştürür. ADP, sadece mikroglialda bulunan P2Y<sub>12</sub> reseptör proteinlerini aktive eder. Araştırmacılar, mikroglia yokluğunun, adenozin molekülünün (ADO) ekstrasellüler seviyelerini düşürdüğünü bulmuşlardır (151). Farmakolojik olarak bloke olan CD39 veya CD73 AMP'yi ADO'ya dönüştürerek, ADO seviyelerini düşürür. Ayrıca,

CD39 aktivitesinin bloke edilmesi, nörostimülanlara yanıt olarak farelerin nöbetlere duyarlılığını artırmıştır.

Bu gözlemler sonucunda ADO, nöronal aktiviteyi azaltan mikroglialdan türetilmiş faktör şeklinde tanımlanmıştır. ADO, A<sub>1</sub> reseptörlerine etki ederek uyarılabilirliği azaltır. Bu reseptör, hücre içi haberci molekülün cAMP konsantrasyonunu düşürerek, uyarıcı nörotransmitter olan glutamatın salınmasını da engeller. A<sub>1</sub> reseptörleri, bu etkilere ilave olarak, zar potansiyellerini negatif tutmak için nöronal zarlardaki K<sup>+</sup> kanallarını aktive eder ve böylece nöronları uyarılmadan tutar. Mikroglia aracılı negatif geri bildirim yoksa, epileptik nöbetler ortaya çıkabilir. Bu geri bildirim sisteminin nörolojik veya psikiyatrik hastalıklara katkıda bulunabileceğine dair ipuçları da mevcuttur (150).



**Şekil 2.14.** Mikroglial inhibisyon mekanizması (Pfeiffer ve Attwell 2020'den Türkçeleştirilmiştir.)(150).

Mikroglialının etkisini gösterdiği mekanizma, aktif nöronlar ve bunlarla ilişkili astrositler tarafından salınan ve mikroglial enzim CD39 tarafından ADP'ye dönüştürülen ATP molekülünü içerir. ADP, mikroglial süreçleri tekrar tekrar aktif olan nöronlar arasındaki sinaptik bağlantılara çekmek için, P2Y<sub>12</sub> reseptör (P2Y<sub>12</sub>R) proteinlerine etki eder. CD39 ayrıca ADP'yi, daha sonra ADO'ya dönüştürülecek olan AMP'ye çevirir. Bu adım, mikroglia, oligodendrosit kökenli hücreler veya nöronlar üzerindeki CD73 enzimi ve/veya astrositler üzerindeki dokuya özgü olmayan alkalın fosfataz (TNAP) enzimi tarafından katalize edilebilir (Belirsiz olan kısım, kesikli kutu içerisinde gösterilmiştir.). ADO, A<sub>1</sub> reseptörlerine (A<sub>1</sub>R'ler) etki ederek nöronal aktiviteyi baskılar. Bunlar siklik AMP (cAMP) moleküllerinin konsantrasyonunu düşürür. Bu da presinaptik nöronlarda Glu salınımını azaltır ve postsinaptik nöronlarda Glu reseptörlerinin (GluR'ler) yanıtını azaltır. Ayrıca A<sub>1</sub>R'ler potasyum iyon kanallarını aktive eder ve böylece nöronal uyarılabilirliği azaltır.



## Perisitler

Perisitler (vasküler düz kas hücreleri, duvar hücreleri veya miyofibroblastlar olarak da bilinir), endotel ile yakın fiziksel bir ilişkiye sahip olan kılcal damarların ve kılcal damar sonrası venüllerin önemli hücresel bileşenleridir (152). Endotelyel hücreler ile aynı bazal membranı paylaşırlar. Perisitler, kılcal damarların %22 ile %32'sini kaplarlar. Mikro perdeler üzerindeki perisitlerin yeri ve kapsama derecesi, farklı mikrodamar tipleri arasında önemli ölçüde değişmekte olup, bunun ara endotelyal kavşakların sıklık derecesi ile ilişkili olduğu görülmektedir (153). Vasküler perisit, bir dizi proteoglikan da dahil olmak üzere, bazal membranın çoğu elemanını sentezler. Ek olarak, perisit sentezi ve laminal proteinlerin salınmasının, KBB'nin farklılaşmasında kritik bir adım olduğu düşünülmektedir (152).

Perisitlerin mikrovasküler endotel ile doğru şekilde birleştirilmesi, yapısal desteği ve kavşak bütünlüğünü korumak için gereklidir (153). Perisitler ve endotelyal hücreler birbirleri ile gap junctionlar, TJ'ler, yapışma plakaları ve çözünür faktörler gibi aparatlarla iletişim kurar (154). Perisitlerin, kan damarlarında endotelyal hücrelerin proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını düzenlediği öne sürülmüştür (148). Bunların yanı sıra, perisitlerin P-glikoprotein (P-gp) fonksiyonel aktivitesini indükleyebileceği ve düzenleyebileceğine dair kanıtlar vardır (155). Ayrıca, perisitler ve bazal membran vasküler endotelyal hücreleri arasındaki etkileşimler, büyüme faktörlerinin salgılanması veya hücre dışı matriksin modülasyonu yoluyla vasküler sistemin yeniden modellenmesi ve sürdürülmesi için önemlidir. Perisitlerin KBB üzerinden taşınmaya da dahil olduğuna dair kanıtlar vardır (156).

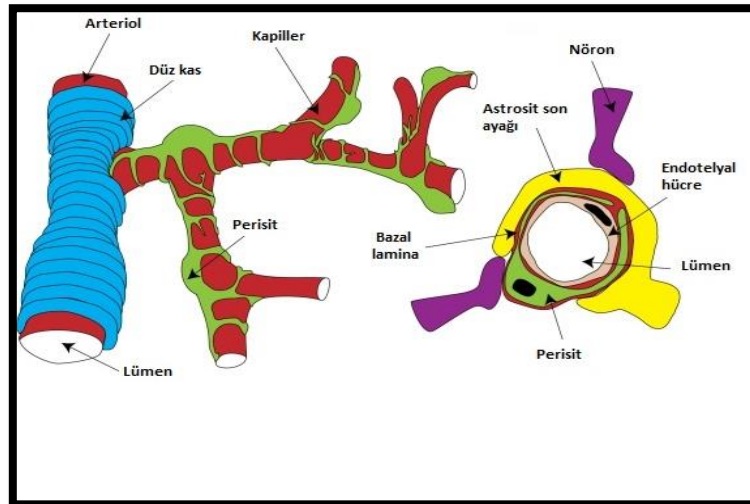
Perisitler, vasküler düz kas hücrelerinin bir özelliği olan  $\alpha$ -düz kas aktininin zengin içeriğine sahiptir; bu da perisitlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kasılma kabiliyetleri olabileceğini düşündürür. Perisitlerin hücresel süreçlerinin ara endotelyal eklemler üzerindeki fiziksel temasları,  $\alpha$ -düz kas aktin içerikleri ile birleştiğinde, perisitlerin kan akışını kontrol etmede ve kavşak geçirgenliğini düzenlemede fonksiyonel rolüne işaret eder (155). Perisitlerin hipoksiye ve travmatik beyin hasarına hızlı tepki olarak, beyin mikrodamarlarından uzaklaştığı gösterilmiştir. Bu nedenle, bu koşulların her ikisi de artan KBB geçirgenliği ile ilişkilidir (157). Perisitlerin ortamdan ayrılmasının neden olduğu KBB bozulması, onların kavşak geçirgenliğinde rolü olduğu fikrini güçlendirir (155).

## Astroditler

Astroditler, uç ayakları KBB endotelinin dış yüzeyine ve ilgili bazal membran zarına yakın temas halinde olan ve ince lamellerden oluşan glial hücrelerdir (127). Beyin mikrovasküler endotelial hücrelerinde yk seçiciliğinde bir artışla beraber, proteoglikan sentezini teşvik etmede ve KBB fonksiyonlarının uyarılmasında önemli bir rol oynar (127, 128). Astroditlerdeki nöronal hre gövdelerinin, beyin kılcal damarlarına yakın olması, fonksiyonel nörovasküler ünitedeki elementler arasında etkileşimlerin sağlanması için çok önemlidir (148).

MSS'nin bazı bölgelerinde mikrodamarlar astroditik koruyucu kılıftan yoksundur ancak glia sınırlayıcılarından veya subaraknoid serebro-spinal sıvıdan kaynaklanan çözünebilir faktörlerden dolayı, KBB'nin özelliklerini yansıtıkları görülmektedir (127). alışmalar, astroditlerin geçici bir fokal kaybı takiben *in vivo* olarak bariyer bütünlüğü kaybını ve yeniden değişimini göstermiştir (157).

Astroditler ile temassız olarak yapılan kültür çalışmalarında, insan bariyer endotelial hre özelliklerine benzer şekilde, TJ proteinlerinden ZO-1 ve okludin ile beyin mikrovasküler endotelial hre genelinde transendotelial geçirgenliğin azaltılması sağlanmıştır. şekil 2.15'te gösterildiği gibi astroditler, özellikle ayak sonlanmaları aracılığıyla endotel hücrelerine gönderdikleri sinyallerle, TJ yapılarını etkileyerek KBB'nin sağlımlığını korumasına katkıda bulunurlar (156).



**şekil 2.15.** Nörovasküler ünitenin organizasyonu (Hamilton ve ark. 2010'dan Türkçeleştirilmiştir.) (156).

Astrositlerin hücre / hücreler arası su dağılımı ve iyon dengesinin denetlenmesinde etkin görevleri vardır. Astrosit ayakçıklarında bulunan aquaporin-4 (AQP-4), beynin su ve elektrolit dengesini korumasını sağlar (126). Astrositler, parankimin hücrelerarası bölgesinden  $K^+$  u temizler ve yoğun  $K^+$  varlığıyla epilepsiden kaynaklanan hasarların önlenmesine katkı sağlar (156).

### 2.3.5. Kan-Beyin Bariyerinde Madde ve İlaç Taşınması

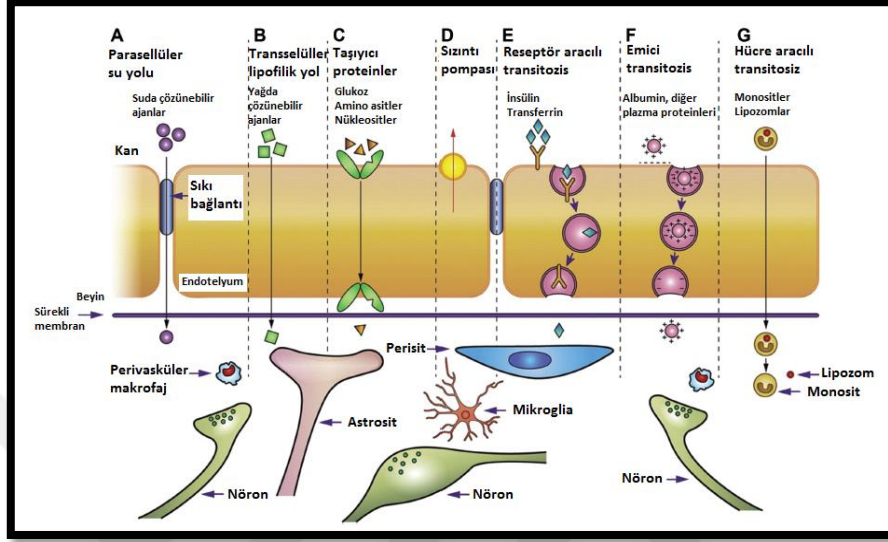
Kanda bulunan çeşitli maddelerin KBB'den geçişi ile beyin parankimine giriş mekanizmasında etkili olan çok sayıda etmen vardır. KBB üzerine etki eden etmenler; molekülün konformasyonel değişim kabiliyeti, maddenin molekül ağırlığı, hücresel sekresyon, akıma karşı afinite, taşıyıcılara karşı afinite, hücrenin enzimatik sabitliği, hidrojen bağlayıcı potansiyeller şeklinde ifade edilebilir (158). Bunların yanı sıra; plazma protein bağlayıcıların afinitesi, beyin kan akımı, sistemik enzimatik sabitlik ve hali hazırdaki patolojik koşulların etkinliği de madde taşınım mekanizmasını etkilemektedir (159).

Taşıma sistemleri genel olarak bariyer tipteki endotel hücrelerinin luminal yüzünde yer almaktadır ve kanla temas halindedir. Bu yolla da beynin ihtiyacına bağlı olarak gereken çeşitli maddelerin taşınımını gerçekleştirirler. Beyinde sentezlenen çeşitli maddeler ile artık ürünlerin kana geçişini sağlayan taşıyıcılar da endotel hücrelerinin beyin parankimine bakan abluminal yüzünde yer almaktadır (158, 159).

Madde taşınma mekanizmasında kullanılan taşıma yöntemleri; basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, primer aktif taşıma, sekonder aktif taşıma ve kaveolar veziküler taşıma şeklindedir. Bu taşıma yöntemlerinin bir veya birkaçı aynı anda kullanılabilir. KBB'den taşınacak maddenin bariyerden geçişi; yağda çözünebilmesi, difüzyon yeteneğinin olması, molekül ağırlığı ve elektriksel yükü gibi etmenlere bağlıdır. Şekil 2.16'da gösterildiği gibi, sıkı bağlantılarda parasellüler yol tercih edilirken, oksijen, karbondioksit, barbitürat ve etanol gibi lipofilik moleküller transsellüler yolu kullanarak rahatlıkla endotel lipid membranlardan difüzyonla geçebilirler (159).

Beyindeki bariyer tipte bulunan damar endotel hücreleri luminal ve abluminal tarafında bulunan taşıyıcı proteinler vasıtasıyla çift yönlü çalışır. Bu sayede gerekli olan maddeleri beyne yönlendirir ve atık maddeleri de kan damarı lümenine taşıma işlemini gerçekleştirir.

Bu hücreler; peptid, iyonlar, besin maddeleri ve ATP-bağlayıcı taşıyıcılar (ABC) gibi taşınacak maddeye özgü işlev gören taşıyıcılar içermektedir (160). ABC'ler fizyolojik koşullarda, beyne terapötik ilaçların geçiş hızını sınırlamaktadır. Bu sebeple ABC, bu ilaçların etkin dozda beyne geçişini engelleyen en temel taşıyıcıdır (160, 161).



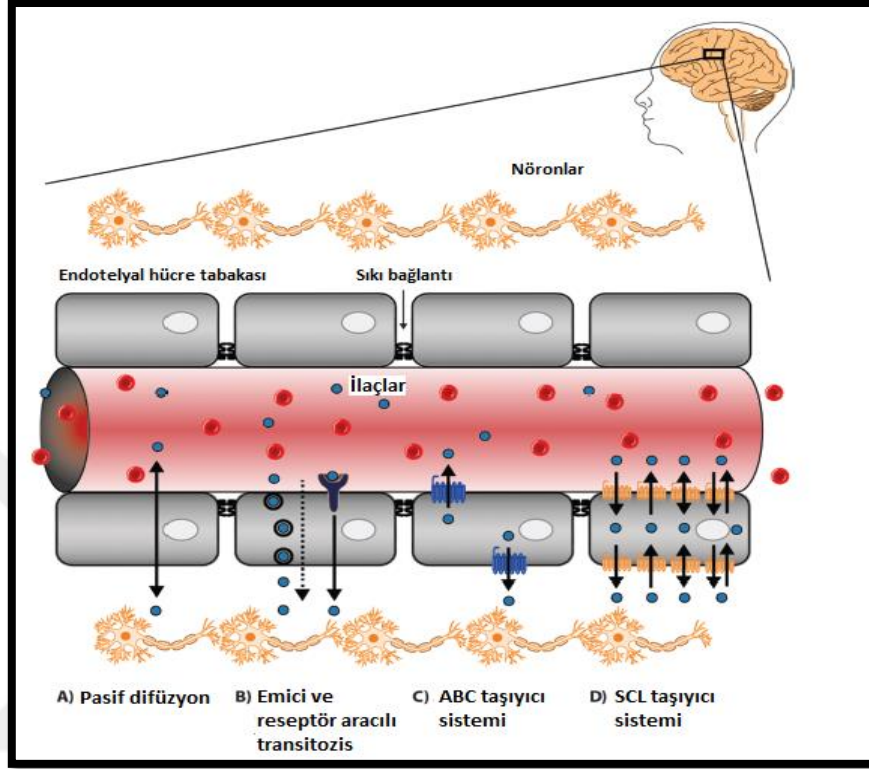
**Şekil 2.16.** Kan-beyin bariyerinde madde taşınım yolları (Herda ve ark. 2014'ten Türkçeleştirilmiştir.) (159).

Taşıyıcı proteinler, madde taşınım işlevlerini aktif ve/veya kolaylaştırılmış difüzyonla gerçekleştirmektedir. Bu sayede glukoz ve aminoasitler endotel hücre membranındaki taşıyıcı proteinleri kullanırken; leptin, insülin ve transferrin gibi büyük moleküllü maddeler reseptör aracılı transitozis ile hücreye geçiş yapar (162, 163).

Reseptör ya da taşıyıcı özellikteki proteinler; monokarboksilat, nötral aminoasit, lipoprotein, mannoz-6-fosfat, albumin, toll benzeri glukoz taşıyıcıları, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), transferrin ve IL-1'den meydana gelir. Büyük molekül ağırlığına sahip ve hidrofilik özellikteki protein / peptidler, genel olarak adsorptif-aracılı transitozis veya spesifik reseptör-aracılı taşınım yolunu kullanırlar (164).

Şekil 2.17'de gösterildiği gibi, bariyer tipteki kan kapiler damar endotel hücrelerinin luminal ve abluminal yüzeylerinin her ikisinde yer alan, KBB'nin endotel hücre sitoplazmasına geçiş yapan ve kandan gelen çeşitli maddelerin yeniden kana gönderilmesini sağlayan, tek yönlü işlev gören pompalar mevcuttur. Bu yapılar; meme kanseri direnç proteini (BCRP), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (MRP) ve çoklu ilaç direnç geni-1(MDR-1)'dir. MDR-1, p-gp olarak da tarif edilmektedir (164, 165).

Bu reseptörün yapımında tümör varlığında ve dirençli epilepsi durumlarında artış olduğu, ayrıca reseptörün substratı olarak bilinen antiepileptik ilaçları yeniden kana pompaladığı yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir (165).



**Şekil 2.17.** Kan-beyin bariyerinde ilaç taşınım yolları (Dickens ve ark. 2016'dan Türkçeleştirilmiştir.)(164).

(A) Pasif difüzyon: Transselüler difüzyon durumunda, kabul edilen kural, bir bileşiğin lipofilikliği ne kadar yüksek olursa, KBB'den pasif difüzyon o kadar fazla olur. (B) Emici ve reseptör aracılı transitozis: İnsülin ve albümin gibi proteinler, spesifik reseptör aracılı endositoz ve transitoz yolları ile KBB yoluyla taşınabilir. (C) ABC taşıyıcı sistemi: ABC, farmakolojik ajanların etkin dozda beyine geçişini engelleyen en temel taşıyıcı sistemidir. (D) SLC taşıyıcı sistemi: SLC taşıyıcı ailesinin sekonder aktif ve kolaylaştırıcı taşıyıcıları, beynin içine ve dışına bileşiklerin giriş-çıkışında rol oynayabilir.

### 2.3.6. Kan-Beyin Bariyeri ve Epilepsi İlişkisi

Epileptik nöbetlerin aracılık ettiği KBB disfonksiyonuna sebep olan mekanizma / mekanizmalar henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Son çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında, epilepsinin patolojisi ile etiyolojisinin yalnızca nöronal disfonksiyonla ilgili olmadığı ifade edilmiştir.

Bunun yanı sıra; glial disfonksiyonun, bağışıklık yanıtındaki farklılaşmaların, beyinde kalıcı olarak meydana gelen inflamasyonunun ve KBB'de oluşan fonksiyon bozukluğunun da epilepsi patofizyolojisinde büyük oranda etkileri olduğundan söz edilmektedir (166, 167).

KBB'deki bozulmalar ile birlikte, kandan gelen birçok maddenin geçişinde artış meydana gelmektedir. Bununla beraber, KBB'deki geçirgenliğin artmasının epilepsi nöbetlerinin sebeplerinden biri olabileceği düşünülmektedir. Esas olarak, epileptik nöbetlerin meydana gelmesinde KBB, bir sebep veya sonuç olarak epilepsi sürecine dahil olabilmektedir (168). Çünkü yapılan araştırmalarda, KBB'de meydana gelen hasarın, hem nöbetlerin bir sonucu hem de nöbetleri tetikleyen bir etmen olabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca KBB disfonksiyonunun çeşitli nörolojik hastalıkların sadece ilerleyen aşamalarında değil, aynı zamanda hastalıkların erken evrelerinde de görüldüğü bilinmektedir (169).

Yapılan bir çalışmada, KBB'de ortaya çıkan işlevsel bozukluğun temelinde, beyin kapiller kan damarlarında meydana gelen zayıflığın olduğu ve bunun da nöbetleri tetiklediği açıklanırken, nöbet şiddetindeki artışla beraber, bunun bariyerdeki sızıntıyı başlattığı ve pozitif geri beslemeyle nöbet oluşumuna katkıda bulunduğu ifade edilmiştir. Çalışmada ayrıca, bariyer sızıntısının refrakter epileptik nöbetlerde antiepileptik ilaçlara karşı bir direnç oluşturduğu da açıklanmıştır (170). Bu açıklamaya göre; albümin ve buna benzer serum proteinleri, bariyer sızıntısı olan alandan yaklaşık bir haftalık süre içerisinde beyne girerek, beyin parankiminde yer alan antiepileptik ilaçlara bağlanmaktadır. Bu proteinler serbest antiepileptiklerin beyindeki konsantrasyonunu düşürerek, beyin içerisindeki seviyelerini sınırlandırır. Sonuç olarak antiepileptik ilaçların etkinliğinin önemli ölçüde azalmasına sebep olur (169, 170).

KBB bütünlüğünde meydana gelen bozulmanın sonucu olarak, nöbetler esnasında oksidan maddelerin artışı, sitokin seviyelerindeki ve kan basıncındaki artış gibi durumların meydana geldiği bilinmektedir (170, 171).

Temporal lob epilepsili hastalardan alınan hipokampal kesitlerde mikrovasküler yoğunluk, sıkı bağlantı kaybı ve immunoglobulin G (IgG) kaçağının arttığı saptanmış ve bu durum, epileptik kemirgen modellerinde de görülmüştür (172). KBB disfonksiyonu nöbet sıklığı ile pozitif korelasyon göstermektedir ve nöron kaybından bağımsızdır. Ayrıca bu durum, epileptik bölgelere lokalizedir. Bu da KBB'nin epileptik bozukluklara katkıda bulunan bir rolü olduğunu gösterir (173). Epilepsi ve KBB yıkımı arasındaki bağlantının çift yönlü olduğu bilinmektedir. Travmatik beyin hasarı ve altta yatan

inflatuar reaksiyonların neden olduğu KBB yıkımı, epilepsiyi tetikleyebilir (174). Öte yandan, KBB geçirgenliğindeki değişiklikler, epilepsinin ilerlemesine yol açabilir ve bu da tedaviyi zorlaştırır. Çoklu anti-enflatuar tedavi stratejileri, KBB bütünlüğünü korumanın yararlı bir etkisinin olabileceğini göstermiştir (175).

İlginç bir şekilde, ER stresinin nöbetlerin neden olduğu KBB bozulmasında rol oynadığı bildirilmiştir. Ko ve arkadaşları, SE'yi takiben hasarlanan endotel hücrelerinde GRP78 ve p-PERK düzeylerinin SE ile indüklenen vazojenik ödemde önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Ayrıca, ER stresini hedefleyen modülasyonun SE'de endotel hücre fonksiyonunun geri kazanılması için potansiyel bir strateji olabileceğini öne sürmüşlerdir (176).

### **2.3.7. Kan-Beyin Bariyeri Patofizyolojisi**

KBB normal şartlar altında sıkı bir bariyer olmasına rağmen, patolojik durumlara maruz kaldığında fizyolojik işlevleri olumsuz yönde etkilenmekte ve kanda çok sayıda bulunan ve istenmeyen çeşitli maddelerin beyin parankimine geçişi gerçekleşmektedir (177). Kandaki maddeler, pinositotik vezikül sayısındaki artışla birlikte transsellüler yolu kullanarak ve / veya TJ'lerin açılmasıyla parasellüler yolu kullanarak beyne geçiş yapar. Patolojik koşullar başlıca; Alzheimer hastalığı, akut ve / veya kronik hipertansiyon, beyin tümörleri gibi hastalıklar olup, bunlar KBB geçirgenliğini yüksek oranda artırmaktadır (177, 178).

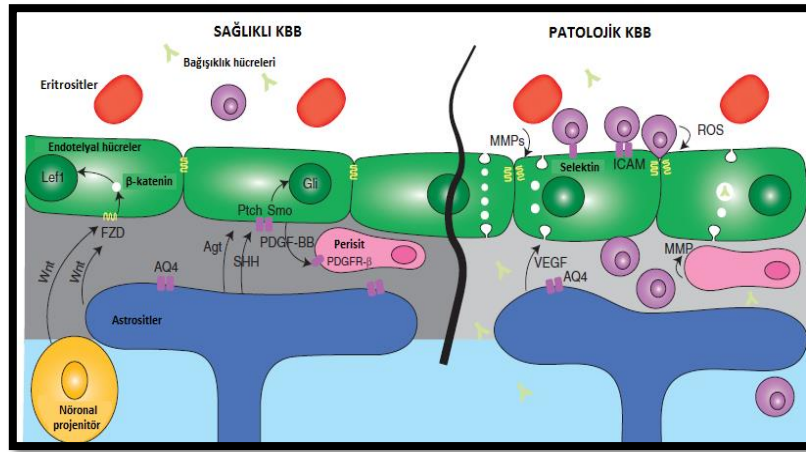
Patolojik durumlarda birçok etmen ilaçların biyoyararlanımında değişikliklere de sebep olmaktadır. KBB'yi genel olarak etkileyen reseptörün bulunduğu yer, enzimlerde meydana gelen değişimler ve protein taşıyıcıları, ilaçların geliştirilmesinde en etkili faktörlerdir. Yani KBB'deki bu değişikliklerle kaveolar aracılı pinositik aktivitenin artışı, TJ'lerin açılması, bazal membran stabilitesinde azalma, toksinlerin veya hastalıkların besin taşınımında yaptığı değişiklikler ile porların oluşması ilaçlardan yararlanma derecesini artırıp azaltabilmektedir (178).

KBB'yi belirlenen süre zarfında açıp, yeniden kapamak nörodejenerasyona sebep olan hastalıkların tedavi edilebilmesi için çok önemli ve gereklidir. Bu maksatla yapılan çalışmalarda, hiperozmolar mannitol ile KBB geçirgenliği yüksek düzeyde arttırılırken, ardından uygulanan magnezyum tedavisiyle KBB yeniden düzeltilmeye çalışılmıştır (177). Buna ilave olarak, KBB'nin özellikle endojen etkili maddelerle açılması konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Kullanılan endojen maddelere; histaminler, serbest radikaller, bradikininler örnek verilebilir (179).

KBB bütünlüğü ve geçirgenliğindeki değişiklikler başlıca; epilepsi, inflamasyon, sepsis, beyin tümörleri gibi KBB yetmezliğinin görüldüğü patolojik durumlarda oluşur. Bunlara ilaveten, elektromanyetik alanda ortaya çıkan iyonize mikrodalga ve radyasyona maruz kalınması durumunda da KBB geçirgenlik değişimleri görülür (177, 179). Bazı araştırmacılar, KBB'yi normal şartlarda geçemeyen fakat hastalığın tedavisi için verilmesi gereken bir takım ilaçların, karotis arterden hipertonic üre çözeltisi verilmek suretiyle KBB engelini aşarak uygulanmasını sağlamaktadır (180).

KBB'de meydana gelen patolojik durumlarda GLUT-1 eksikliğinin beyin enerji seviyeleri ve fonksiyonuyla etkileşime girerek, hasar görmüş KBB ile birlikte nöbetleri tetiklediği ifade edilmiştir (177). Ayrıca beyin transkripsiyonel faktör değişimleri, K<sup>+</sup> tamponlanmasında oluşan sorunlar, astrogliozis gibi astrosit ve perisit aktivitesini etkileyen durumlarda, KBB'deki hasar sonucu uyarılabilirlik artmakta, bunun sonucunda da epileptik nöbetler meydana gelmektedir (174).

Şekil 2.18'de gösterildiği gibi, yapılan son çalışmalarla, nöbetler esnasında salınan glutamat, bariyer tip endotel hücrelerinde matriks metaloproteinaz (MMP) aktivite seviyelerinde ve ekspresyonunda artışa neden olmakta, bu da bariyer sızıntısı oluşumunu tetiklemektedir (181).



**Şekil 2.18.** Normal ve patolojik koşullarda KBB'deki sinyal iletimi ( Daneman ve Alexandre 2015'ten Türkçeleştirilmiştir) (181).

Yapılan bir çalışmada, glutamatın sitozolik fosfolipaz A<sub>2</sub> aracılığıyla MMP seviyelerinin artırdığı ve TJ protein ekspresyon seviyelerini azaltarak bariyer sızıntısına neden olmasıyla nöbetleri tetiklediği rapor edilmiştir (180, 181).

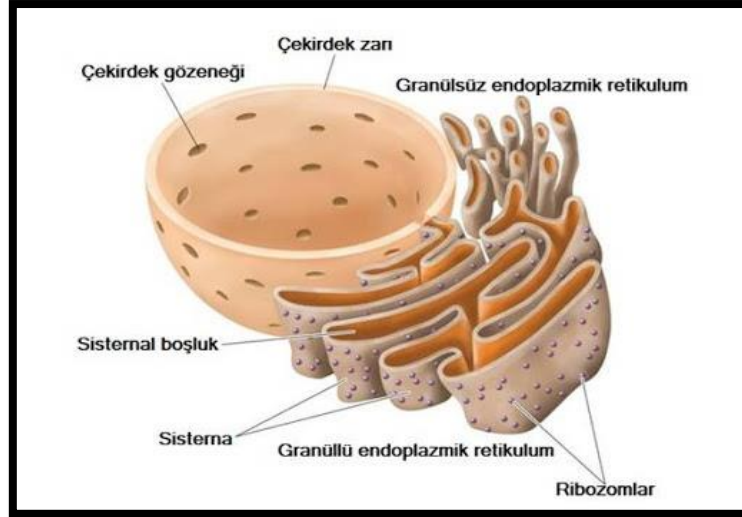


MMP'ler, yüksek ihtimalle nörovasküler ünite içerisinde beyin kapiler damarlarını çevreleyen hücre dışı matriksi sindirmekte, endoteli kaplayan TJ proteinlerini de parçalayarak, bariyer bütünlüğünü bozmaktadır (182, 183).

#### 2.4. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum (ER), ilk kez Porter ile arkadaşları tarafından nükleus etrafında birbirleriyle bağlantılı bir ağ meydana getiren membran veziküllerini tanımlamada kullanılmıştır. ER, yaklaşık olarak hücre hacminin yarısını oluşturmaktadır ve ökaryotik hücreler için oldukça önemli bir organeldir. Genel yapısı Şekil 2.19'da verilen ER'de, sisterna olarak tanımlanan kese görünümlü ağlar mevcuttur. Bu ağsal yapılar, hücre iskeletinde büyük oranda yayılım göstermektedir. ER'nin orta kısmında mevcut olan sisternal boşluk, lümen yapısını meydana getirir. Fosfolipit membran kesintisiz olarak devam edip, nükleus zarı ile bağlantı kurar (184).

ER, işlevi ve yapısı bakımından kompleks bir organeldir. Hücre içerisinde  $Ca^{2+}$ 'un depo edilmesi ve denetimli bir şekilde salınabilmesi, protein sentezi ve katlanması, post translasyonel modifikasyonlar, protein taşınımı ile steroid ve lipidlerin sentezlenmesi dahil olmak üzere çok sayıda önemli rolü mevcuttur (184, 185).



Şekil 2.19. ER'nin genel yapısı (186).

ER; yapı itibariyle granüllü ER ve düz ER olarak 2 alt sınıftan meydana gelir. Granüllü ER'ler çok sayıda ribozomdan oluşurken, düz ER'de az miktarda ribozom yer almaktadır ve granüllü ER'den daha komplekstir. Çoğunlukla steroid sentezlenmesinin yoğun şekilde gerçekleştirildiği hücrelerde yer alır. Granüllü ER yoğun olarak protein sentezinin gerçekleştiği hücrelerde mevcuttur. Düz ER'nin bir türü olan sarkoplazmik retikulum (SR) ise kas hücrelerinde bol miktarda bulunmakta ve kas kasılması süresince denetimli  $Ca^{2+}$  salınmasında görev almaktadır (187, 188).

Genel olarak golgi aygıtının ve nükleusun etrafında bulunan granüllü ER'nin dış membranında, protein sentezinde görev alan ribozomlar yer almaktadır. Granüllü ER, membran proteinleri ve salgılanan proteinleri de içine alan çok sayıda proteinin bir araya getirilmesi ile translasyonunda rol oynamaktadır (189). Meydana gelen yeni polipeptitler, sinyal dizileri içermektedir. Oluşan bu dizilerin, n-terminalleri üzerinde yer alan sinyal tanıma partikülleri (SRP) ile tespiti sağlanmaktadır. SRP tanınması ile ribozomların granüllü ER'ye bağlanması sonucunda yeniden oluşan polipeptitlerin translokasyonu gerçekleştirilmektedir. Peptidazlarla, sinyal dizisi granüllü ER lümeninde kesilmekte ve bu olayı takiben protein senteziyle oluşturulmuş proteinlerin katlanması ile birleştirilmesi işlemleri gerçekleştirilmektedir (190).

Granüllü ER, çoğunlukla membran proteinlerinin ve salgı yolundaki proteinler de dahil olmak üzere ökaryotik proteomunun 1/3'lük kısmının sentezini gerçekleştirir. Şaperonlar, ER lümeninin sahip olduğu oksidatif ortam ve katlanma katalizörleri, meydana gelen polipeptitlerin düzgün bir şekilde katlanması ve bir araya getirilmesi için birbirleriyle uyumlu halde çalışmalarını sürdürmektedir (191).

#### **2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi**

ER, transkripsiyon sonrasında meydana gelen modifikasyonlar da dahil olmak üzere, salgı ve membran proteinlerinin doğru katlanması gibi hücrelerde meydana gelen çok sayıda fonksiyonun kontrol edildiği ve gerçekleştirildiği bir organeldir. Genel olarak proteinlerin işlevlerini uygun şekilde yürütebilmeleri için, doğru katlanmaları ve üç boyutlu yapılarının oluşturulması gerekmektedir. ER'de protein katlanmalarında görevli olan çok sayıda protein mevcuttur. ER, mevcut polipeptid zincirlerini, kendisinde mevcut olan işlevsel moleküller vasıtasıyla çeşitli işlemlerden geçirir ve ardından proteinleri katlama işlemini başlatır (191).

ER içerisinde katlanan proteinler oldukça karmaşık bir yapıya sahipken, sitoplazmada katlanan proteinler basit yapılu proteinlerdir. “ER stresi” şeklinde tanımlanan yanlış katlanmış protein birikimi ile katlanmamış protein yanıtı (UPR) meydana gelmektedir. Bu olayın sonucunda; translasyonun azalması, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanması, bunu takiben katlanmamış protein yıkımını (ERAD) içeren bir süreç gerçekleşir. Meydana gelen bu olaylar aracılığıyla, proteostaz (ökaryotik protein homeostazisi) dengede tutulmaya çalışılmaktadır (192).

ER, adaptasyon ile stresin azaltılmasında etkin bir rol oynayamadığında proteostazis gerçekleşemez. Sonuç olarak süregelen ER stresıyla otofaji yolları etkinlik göstermeye başlar. Otofaji ile birlikte proteostazis gerçekleşemezse, hücreler tarafından hücre ölümü tercih edilir. Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin aşırı birikmesi sonucu, protein katlanma kapasitesinde bir artış meydana geldiğinde, UPR, doku homeostazisini sürdürmek ve stres altındaki hücreyi saf dışı bırakmak için apoptozis olayını başlatır (192, 193).

#### **2.4.2. Glukoz Regüle Edici Protein 78 (GRP78)**

Glukoz regüle edici protein 78 (GRP78), 78 kDa ağırlığındadır. Yapı bakımından monomerik ve dimerik formlara sahiptir. Monomerik formu genellikle şaperon olarak görev yapmaktadır. GRP78, ER organelinin yanı sıra hücrede mitokondri ve çekirdekte de yer almaktadır. ER stresi gerçekleştiğinde, hücre yaşamının sürdürülebilmesi için bu protein oldukça önemli bir role sahiptir (192).

GRP78; ER’de translasyon işleyişinin düzenlenmesi, protein katlanmasının düzenli bir biçimde sağlanabilmesi, apoptozis mekanizmasının düzenlenmesi, sensör yanıtı oluşturulması ve protein yıkımının gerçekleştirilmesi gibi oldukça önemli işlevlere sahiptir. Ayrıca GRP78, ER’de en çok  $Ca^{+2}$  bağlayabilen şaperonlardandır. Bu özelliği ile proteinlerin doğru katlanmasını düzenlemenin yanı sıra, yanlış katlanmış / katlanmamış proteinlerden dolayı ortaya çıkan ER stresinin düzeltilmesinde kilit bir rol oynamaktadır (193).

GRP78, hücre içerisinde ER stresi bulunmazken; PERK, IRE1 ve ATF6 yolları transmembran proteinleriyle bağlantılı olarak, proteinlerin inaktif şekilde tutulmasını sağlar. Yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ya da ER stresine neden olacak bir durumla karşı karşıya kalındığında, ERAD mekanizması devreye girer.

Bununla birlikte, homeostaz sağlanamayacak olursa; GRP78, UPR ile indüklenir ve homeostazisi yeniden sağlayabilmek için çalışır (194). GRP78, ER'de bir stres durumu ortaya çıktığında, bağlantılı olduğu PERK, ATF6, IRE1 ve transmembran proteinlerinden ayrılıp lümene gider. Aktif hale geçen transmembran proteinleri de UPR yolağını indükler. Bu sayede protein katlanmasının doğru şekilde yapılması düzenlenerek, hücre ölümü önlenmiş olur (195).

### **2.4.3. Endoplazmik Retikulum Stresinde Aktiflenen Sinyal Yolakları**

UPR aktivasyonu; PERK, ATF6 sinyal yolağı ve IRE1 (diğer adıyla IRE1 $\alpha$ /XBP-1 yolağı) şeklinde isimlendirilen 3 farklı sinyal yolağı ile gerçekleştirilir (192, 193). Şekil 2.20'de aktiflenen UPR sinyal yolakları detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

#### **Protein Kinaz RNA Benzeri ER Kinaz (PERK) Sinyal Yolağı**

PERK, UPR aktivasyonunu başlatmada etkin bir görevi olan, ER içerisinde bulunan ve ER stresinin algılanmasında rol oynayan, tip 1 transmembran protein sınıfına mensup bir proteindir. Sitozolik kinaz domaini ve NH<sub>2</sub>-terminaline sahiptir. Bu protein, eIF2 $\alpha$ 'yı fosforilleyen ve böylece translasyon işlemini yavaşlatan önemli bir mediyatör olarak işlev görür (194). Hatalı proteinlerin birikmesiyle, PERK yoluyla protein translasyonda azalma gerçekleştirilir ve bunun sonucunda UPR genleri artar (195).

PERK, başka bir ER stres sensörü olan IRE1 yolağıyla, aktivasyonu ve yapısından dolayı benzerlikler göstermektedir ancak; PERK'in endoribonükleaz aktivitesi IRE1'den daha düşük seviyededir. ER stresin başlamasının ardından, protein katlanmalarında yardımcı rol oynayan GRP78 (glukoz regüle edici protein 78) lümene gönderilmektedir. Bu olayı takiben, sitozolik domainde otofosforilasyon ile trans-dimerizasyon meydana gelerek, PERK aktivasyonu başlatılır (196).

PERK aktivasyonunun ardından eIF2 $\alpha$ 'nın 51. pozisyonunda yer alan serinin fosforilasyon olayı meydana gelir. Fosforillenme sonucunda, genel olarak hücrede translasyon sonlanır. Fakat ATF4 (aktive edici transkripsiyon faktörü 4) gibi özelleşmiş mRNA'larda translasyon sürer ve mRNA sayısında artış meydana gelir. Sonuç olarak, PERK aktivasyonu sayesinde ER stresine karşı konulup, katlanmamış proteinler düzeltilmiş ve hücredeki protein yükü azaltılmış olur (197).

### **Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4 (ATF4) Sinyal Yolağı**

ATF4, 351 amino asitten oluşan, transkripsiyon faktörü bZIP (temel-lösün fermuarlı transkripsiyon faktörü) ailesinin bir üyesidir. ATF4'ün nükleusa girmesiyle; C/EBP Homolog Protein (CHOP), aktive edici transkripsiyon faktörü 3 (ATF3) ve çeşitli aminoasitlerin taşınması sağlanır (198). Bunlara ilave olarak, önemli bir antioksidan olan glutatyonun biyosentezinde ve oksidatif strese karşı direnç gösteren genlerin transkripsiyonunda aktif şekilde görev alır. CHOP, transkripsiyonel olarak ATF4 ile aktif hale getirilir. Kuvvetli bir apoptozis sinyali şeklinde çalışarak, hücre ölümünü başlatır (194).

PERK, en önemli transkripsiyon faktörlerinden birisi olarak işlev gören Nrf2 (nükleer faktör-eritroid bağlantılı faktör 2)'yi de fosforillemektedir. Nrf2, normal şartlar altında sitoplazmada inaktif ve kompleks halde bulunur. ER stresinin meydana gelmesiyle fosforillenir. Bu sayede aktif hale geçen Nrf2, nükleusa geçiş yapar. Aktif hale gelen Nrf2'nin görevleri arasında; enzimlerin detoksifikasyonunu sağlamak, immün sinyalizasyonunu gerçekleştirmek, antioksidanların ve hücrelerin büyümesi ile gelişmesinde rol oynayan genlerin indüklenmesi yer almaktadır (194, 195).

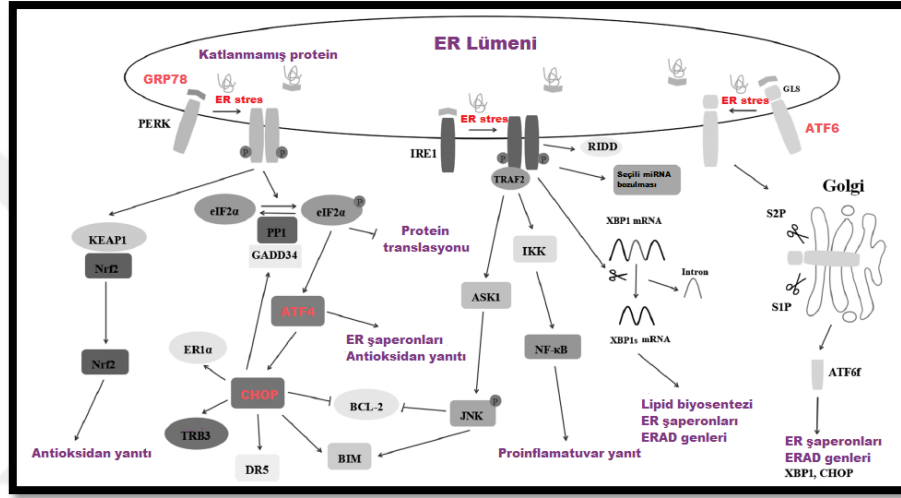
### **Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) Sinyal Yolağı**

ATF6, ER lüminal ve sitozolik domain içeren tip II transmembran proteindir. NH<sub>2</sub>-terminal DNA bağımlı domaini sitozole, COOH terminali ER lümenine dönük şekilde bulunur. Normal şartlar altında, GRP78 ile birlikte ER membranında inaktif halde bulunmaktadır. GRP78, ER stresinin hemen ardından katlanmaya yardımcı olmak için lümeden ayrılır. GRP78'in lümeden ayrılmasıyla birlikte ATF6, Golgi aygıtına geçiş yapar. Orada metalloproteaz 2 ve serin proteaz 1 aracılığıyla kesilerek aktif forma dönüşümü sağlanır (197).

ATF6'nın aktivasyonundan sonra, nükleusa geçişi gerçekleşir ve bu sayede de protein katlanmasında görev alan hedef genler aktif hale getirilir. Böylece proteinlerin sentezinde artış meydana gelir. Ardından ER katlanma fonksiyonu başlatılarak, strese karşı koruma sağlama mekanizması oluşturulur. Aktive olan hedef genlerin içerisinde GRP94, protein disülfid izomeraz, GRP78, XBP1, CHOP, Herp ve kalretikulin gibi genler yer almaktadır (198).

## İnozitol Gerektiren Enzim 1 (IRE1) Sinyal Yolağı

IRE1, bifonksiyonel enzim aktivitesine sahip olan ve sitozolik domaininde endoribonükleaz ile serin/treonin protein kinaz etkinliğı gösteren tip 1 transmembran proteinidir. IRE1, aynı zamanda UPR'nin en iyi şekilde korunan sinyal ağıdır. Memelilerde IRE-1 $\alpha$  ve IRE-1 $\beta$  olmak üzere 2 adet izoformu mevcuttur. IRE-1 $\alpha$  ekspresyonu her hücrede olurken, IRE-1 $\beta$  ekspresyonu yalnızca akciğerlerle, bağırsak epitel hücrelerinde gerçekleşmektedir (195).



Şekil 2.20. UPR sinyalizasyon yolları (Fu ve ark. 2020'den Türkçeleştirilmiştir.)(199).

Katlanmamış protein tepkisi. Katlanmamış proteinlerin birikmesi, GRP78'in, PERK, IRE1 ve ATF6'nın lümenal alanlarından ayrılmasına neden olur ve üç proteinin aktivasyonuna yol açar. **ER**: endoplazmik retikulum, **GRP78**: 78-kDa glukoz düzenleyici protein, **PERK**: protein kinaz R benzeri ER kinaz, **IRE1**: inositol gerektiren enzim 1, **ATF6**: aktive edici transkripsiyon faktörü 6, **GLS**: Golgi lokalizasyon dizileri, **KEAP1**: Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1, **Nrf2**: nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2, **eIF2 $\alpha$** : ökaryotik çeviri-başlatma faktörü 2 alfa, **ATF4**: transkripsiyon faktörü 4'ün etkinleştirilmesi, **CHOP**: C / EBP homolog protein, **BCL-2**: B hücreli lenfoma-2, **BIM**: Bcl-2 etkileşimli aracı, **DR5**: ölüm reseptörü 5, **GADD34**: büyümeyi durdurma ve DNA hasarını indükleyebilir protein 34, **TRB3**: Tribbles ile ilgili protein 3, **ERO1 $\alpha$** : endoplazmik retikulum oksidoredüktin 1 $\alpha$ , **PP1**: protein fosfat 1, **XBP1**: X box bağlayıcı protein 1, **ERAD**: ER ile ilişkili bozunma, **RIDD**: düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozulma, **TRAF2**: tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2, **ASK1**: apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1, **JNK**: c-Jun N-terminal kinaz, **miRNA**: mikroRNA, **mRNA**: haberci RNA, **IKK**: I $\kappa$ B $\alpha$  kinaz, **S1P**: site-1 proteaz, **S2P**: site-2 proteaz.

IRE1, GRP78 ile beraber iken inaktif halde bulunur. ER stresi meydana geldiğinde, GRP78 IRE1'den ayrılır. Böylece kinaz ve endoribonükleaz aktivitelerinin otofosforilasyonu gerçekleşerek, IRE1 etkinleşmesi meydana gelir (196).

Aktive olmuş IRE1, XBP1'in (X-Box Bağlayıcı Protein 1) mRNA'sından, 26 nükleotidi bulunan bir kısmın eklenmesini uyarır. mRNA'nın eklenen kısmından

dönüştürülen XBP1, nükleusa geçiş yapar. Böylece XBP1, ER homeostazını düzenlemek amacıyla ERAD'da görev alan genlerin transkripsiyonunu ve protein katlanmasını artırarak, ER stresinin azaltılmasında etkinlik gösterir (197).

#### **2.4.4. Endoplazmik Retikulum Stresi-Epilepsi İlişkisi**

##### **PERK Yolağı-Epilepsi İlişkisi**

Daha önce yapılan çalışmalarla, insan epilepsisinde ve deneysel epilepsi modellerinde PERK sinyal yolunun düzensiz hale geldiği gösterilmiştir. Sıçanlarda oluşturulan SE modelinde p-PERK, p-eIF2 $\alpha$  ve CHOP ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır (200). Kainik aside bağlı nöbetleri olan farelerin hipokampusünde de p-eIF2 $\alpha$  ve ATF4 seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (201). Ayrıca başka bir çalışmada da CHOP ekspresyonunun yükseldiği rapor edilmiştir (202). Pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen akut nöbet modelinde GRP78, p-eIF2 $\alpha$  ve CHOP seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır (203).

CHOP'un proapoptotik rolünün olmasının dışında, epilepside nöroproteksiyon için baskılanması konusunda dikkatli olunmalıdır. Yapılan bir çalışmada, upregüle edilmiş CHOP'un, SE'den sonra nöronal sağ kalımı teşvik edebileceği ve CHOP<sup>-/-</sup> farelerin, vahşi tip CHOP<sup>+/-</sup> farelere kıyasla hipokampal nöron ölümünde artış gösterdiği öne sürülmüştür (204). CHOP'un sağ kalım fonksiyonu için temel mekanizma, mürin çifti 2'yi (MDM2) hedefleyerek p53 fonksiyonu üzerindeki inhibitör etkisi olabilir. CHOP'un nöbetlerin neden olduğu nöronal ölümden dolayı karşıt ve paradoksal rolünü nasıl değiştirdiği henüz bilinmemektedir.

Daha önce yapılan bir çalışmada, uzun süreli ER stresi üzerine, UPR'de işlev gören üç yolak aktivitesinin farklı olduğu ve PERK sinyallemesinin uzun süre devam ettiği bildirilmiştir (205). PERK yolağının başlıca CHOP indükleyicisi olması nedeniyle, kalıcı PERK aktivasyonu CHOP üretimini artırabilir ve böylece hücre ölümü sürecini yönetebilir. Bu nedenle, CHOP'un nöbetlerden sonra hücre kaderi üzerindeki etkileri, ilave çalışmaları gerektiren bireysel UPR dal aktivitesinin süresi ve yoğunluğu ile ilişkili olabilir. Apoptozisin kontrolüne ek olarak, CHOP'un miyelin bazik proteini (Mbp) gibi miyelinle ilişkili proteinlerin ekspresyonunu düzenlediği de gösterilmiştir. Miyelin kılıf hasarının epileptogenez sırasında erken bir patolojik özellik olduğu belirtilmiş ve çalışmalar, nöbetlerden sonra miyelinle ilişkili proteinlerde önemli bir azalma olduğunu

göstermiştir (206). Yapılan bir çalışmada, CHOP'un, miyelinle ilişkili genlerin transkripsiyonunu inhibe ederek ve SE sonrası aksonal yeniden şekillenmeyi etkileyerek nöbet duyarlılığını artırabileceği öne sürülmüştür (207).

### **IRE1 Sinyal Yolağı-Epilepsi İlişkisi**

Çeşitli çalışmalar ile IRE1 sinyallesinin epilepside upregüle edildiği ileri sürülmüştür. Bu çalışmalardan birinde, XBP1'in mRNA seviyesinin, kainik asit ile indüklenen SE'li farelerin hipokampusünde önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (208). Başka bir çalışmada ise, insan TLE'sinde IRE1 $\alpha$  sinyallesinin rolü araştırılmış, TLE'li hastaların hipokampusünde IRE1 $\alpha$  aracılı yolağın upregüle edildiğini bulmuşlardır (209). Öte yandan, artan XBP1 seviyesi, ER içindeki protein katlama kapasitesini ve yanlış katlanmış proteinlerin bozunmasını artırarak, hücrenin hayatta kalmasını destekleyebilir. Bununla birlikte, IRE1 sinyallesinin aktivasyonu, epilepside hücre apoptozuna göre sitoplazma koruyuculuğu üzerine daha seçici bir etkiye sahip olabilir.

Bu etkilerin yanında, IRE1 aracılı sinyallemenin,  $\gamma$ -amino bütirik asit A reseptörlerini (GABA<sub>AR</sub>) etkilediği de gösterilmiştir. GABA<sub>AR</sub>'ler, memeli MSS'de uyarıcı-inhibe edici dengenin sürdürülmesinde önemli bir rol oynayan ana inhibitör ligand-kapılı iyon kanallarıdır (210, 211). Yapılan bir çalışmada, GABA<sub>AR</sub>  $\alpha$ 1 alt biriminde mutasyonun neden olduğu azalan yüzey protein seviyesinin, idiyopatik epilepsi patogenezinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (212).

### **ATF6 Sinyal Yolağı-Epilepsi İlişkisi**

Literatürde, ATF6 sinyali ile epilepsinin ilişkilendirildiği az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde kainik asit ile indüklenen SE'li farelerin hipokampusünde ATF6 protein seviyesinin arttığı bildirilmiştir (204). Çalışmadan elde edilen sonuçlara bakıldığında, ATF6 sinyalinin nöbetlerde nöroprotektif etkiye neden olduğu görülmektedir.

Başka bir çalışmada ise ATF6 $\alpha$  delesyonunun kainat kaynaklı nöbetlerin neden olduğu nöronal hasarı şiddetlendirdiği ve altta yatan mekanizmanın Ca<sup>2+</sup> homeostazının ve nöronal aktivitenin düzenlenmesi ile ilişkili olabileceği ortaya çıkarılmıştır (213). Buna göre, ATF6 $\alpha$ 'nın eksitotoksisteye karşı yeni bir terapötik hedef olabileceği öne sürülmüştür. IRE1 aracılı sinyallemeye benzer şekilde, ATF6 yolunun aktivasyonu da

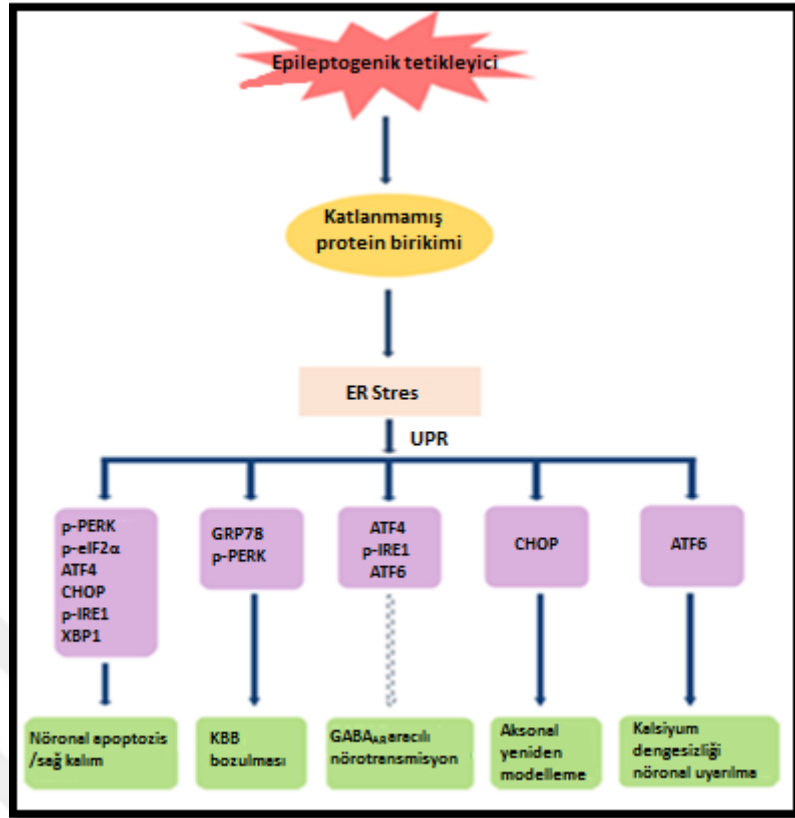


GABA<sub>AR</sub>'ın  $\alpha 1$  (A322D) alt biriminin yüzey trafiğini artırabilir (214). Bu nedenle, eksitotoksisteye karşı ATF6 sinyalinin nöroproteksiyonu, daha fazla çalışma gerektiren GABA<sub>AR</sub> aracılı nörotransmisyonun düzenlenmesinde rol oynayabilir.  $\gamma$ -amino bütirik asit B reseptörü (GABA<sub>BR</sub>) aracılı sinaptik sinyal yollarının düzensizliğinin epilepside rol oynadığı bilinmektedir (215).

### **ATF4 Sinyal Yolağı-Epilepsi İlişkisi**

Yapılan çalışmalarda, ATF4'ün GABA<sub>BR</sub> üzerine düzenleyici etkinliği olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalardan birinde, ATF4'ün GABA<sub>BR1 $\alpha$</sub> 'yı uyarıcı ve GABA<sub>BR1 $\beta$</sub>  aktivitesini inhibe edici olarak etki gösterdiği rapor edilmiştir (216). ATF4, GABA<sub>BR</sub> alt birim dimerizasyonunu bloke edebilir ve fonksiyonel heterodimerik GABA<sub>BR</sub> oluşumunu baskılayabilir.

Başka bir çalışmada ise ATF4'ün, aktin dinamiklerinin önemli bir düzenleyicisi olan Cdc42'nin ekspresyonunu düzenleyerek GABA<sub>BR</sub> trafiğini kontrol edebileceği ve böylece nöronal uyarılabilirliği etkileyebileceği rapor edilmiştir (217). Bu nedenle, ATF4'ün anormal ekspresyonu, GABA<sub>BR</sub> aracılı nörotransmisyonun düzenlenmesi yoluyla epilepsinin patogeneğinde rol oynayabilir. Literatürde bu konudaki veriler oldukça kısıtlı olduğu için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. UPR'nin epilepsi ile ilişkili patolojik süreçlerdeki rolü şekil 2.21'de şematik olarak gösterilmiştir.



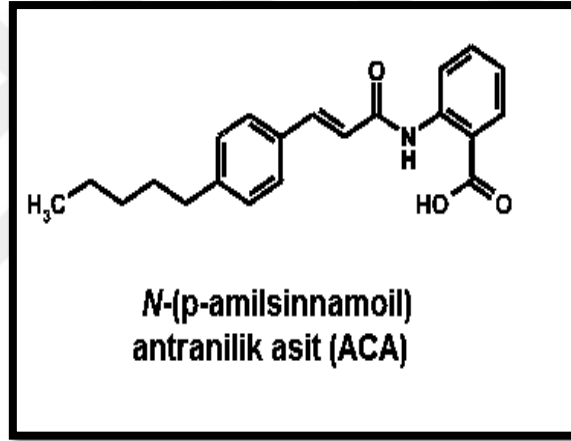
**Şekil 2.21.** UPR'nin epilepsi ile ilişkili patolojik süreçlerdeki rolü (Fu ve ark. 2020'den Türkçeleştirilmiştir.) (199).

UPR medyatörlerinin epilepsi ve nöbetlerle ilişkili patolojik süreçlere katılımı. **ER:** Endoplazmik retikulum. **UPR:** Katlanmamış protein yanıtı. **GRP78:** 78-kDa ağırlığındaki glikoz düzenleyici protein. **p-PERK:** Fosforile protein kinaz R benzeri-ER kinaz. **p-IRE1:** Fosforile inozitol-gerektiren enzim 1. **ATF6:** Aktive edici transkripsiyon faktörü 6. **p-eIF2α:** Fosforile ökaryotik translasyon başlatıcı faktör-2 alfa. **ATF4:** Aktive edici transkripsiyon faktörü 4. **CHOP:** C/EBP homolog protein. **XBP1:** X-box-bağlayıcı protein 1. **KBB:** Kan-beyin bariyeri. **GABA<sub>A</sub>R:** γ-amino bütirik asit reseptörü. **Ca<sup>2+</sup>:** Kalsiyum iyonu. (Noktalı ok, UPR medyatörleri ile patolojik süreç arasındaki bilinen bağlantının epilepsi ve nöbetlerde henüz doğrulanmadığını gösterir.)

## 2.5. N-(p-amilsinnamoil) Antranilik Asit (ACA) ve Etki Mekanizması

Kimyasal yapısı ilk olarak 1974'te tanımlanmış olan N-(p-amilsinnamoil) antranilik asit (ACA), beyaz renkte ve katı formdadır. 337.4 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Kimyasal formülü C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub> şeklindedir (218). Kimyasal yapısı şekil 2.22'de gösterilmiş olan ACA, dimetilsülfoksit (DMSO) ya da alkolde çözünebilir fakat suda çözünmez.

Genel olarak TRPM2 kanal blokörü şeklinde tanımlanmıştır. Bu özelliğine ilaveten fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) enzimini bloke ettiği de bilinmektedir. ACA, kanal ve enzim blokörü olması sebebiyle, hücrenin içerisinde etkinlik gösterir. Oksidatif stres ürünleri olarak bilinen, adenozin difosfat riboz ve hidrojen peroksit seviyesi yükseldiğinde, IP<sub>3</sub>, G proteine bağlanıp, hücre organellerinden aşırı bir miktarda Ca<sup>+2</sup> salınımına sebep olur. ACA da Ca<sup>+2</sup> salınımını azaltıcı yönde etki ederek, oksidatif stres düzeyini düşürmede rol oynar. PLA<sub>2</sub> inhibitörü olarak aktif rol oynayan ACA'nın, sonraki deneysel çalışmalarla pankreas adacıklarında glikozun varlığı ile meydana gelen insülin salgısını antagonize edici yönde etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır (219). Ayrıca, ACA ve ACA benzeri kimyasal yapıya sahip birçok maddenin, kalp-damar sisteminde yer alan hücrelerde ve pankreasta bulunan beta hücrelerinde ikincil haberciler ile araşidonik asiti bloke ettiği de rapor edilmiştir (220).



**Şekil 2.22.** N-(p-amilsinnamoil) antranilik asitin kimyasal yapısı (Harteneck ve ark. 2007'den Türkçeleştirilmiştir.)(220).

Yapılan birçok çalışma ile ACA'nın çeşitli transient reseptör potansiyel (TRP) kanallarını bloke ettiği rapor edilmiştir (221). Bloke ettiği TRP kanalları sınırlı sayıda olduğu için, spesifik olarak TRPM2 kanal blokörü şeklinde tanımlanmış ve *in vitro* ortamda en çok tercih edilen TRPM2 kanal blokörü olmuştur (222).

TRP kanalları ilk olarak 1989 yılında genetik çalışmalar esnasında keşfedilmiştir. *Drosophila* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde yapılan bir çalışma esnasında tanımlanmıştır (223). *Trp* gen mutasyonu olan fotoreseptörler, ışığa devamlı maruz kaldıklarında, fazik olarak (transient) voltaj değişikliğine sebebiyet verdikleri için, kanallar bu isimle anılmaktadır.

Buna ilaveten, hücre içine göre hücre dışında yoğun olarak bulunan  $Ca^{+2}$  ve  $Na^{+}$  iyonlarına, aynı anda geçirgen oldukları için,  $Ca^{+2}$  kanalları tanımı yerine genel olarak katyon kanalları ifadesi kullanılmaktadır.

TRP kanalları; direkt plazma zarlarında yer alan  $Ca^{+2}$  giriş kanalları gibi çalışmaktadır. Tanımlanmış bütün işlevsel TRP kanalları (TRPM4 ve TRPM5 hariç)  $Ca^{+2}$ 'a geçirgenlik gösterir.  $Mg^{+2}$  için de aynı durum söz konusudur (224).

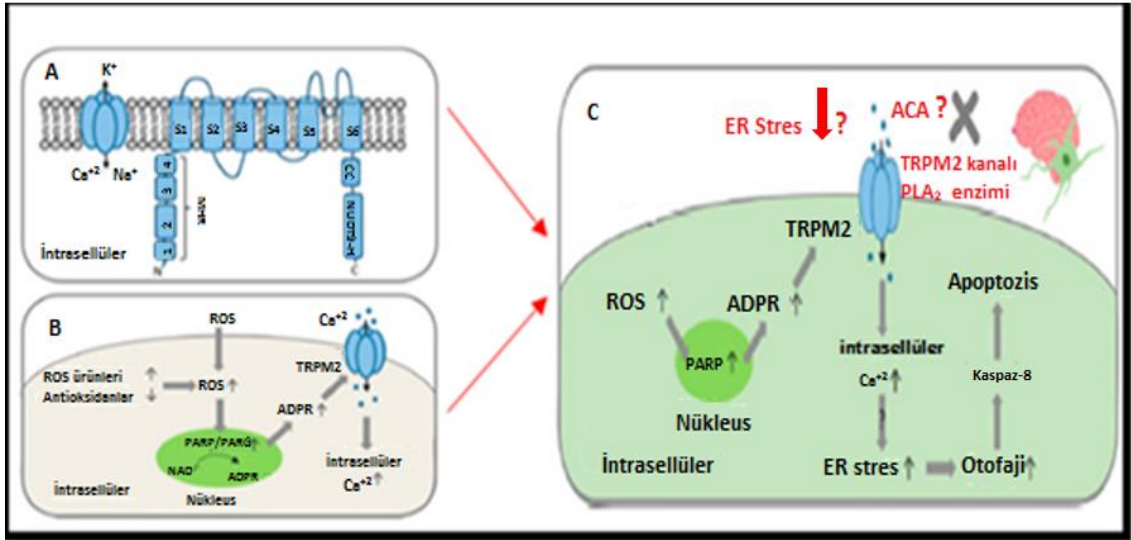
TRPM2 kanal ekspresyonu ilk olarak 1998'de kanser (melastatin) hücrelerinde gerçekleştirilmiş olup, sonrasında yapılan pek çok çalışma ile de beyindeki çeşitli bölgelerde ve nöronlarda yüksek seviyede var olduğu saptanmıştır (225). TRPM2 kanallarının memelilerin beyinlerinde yüksek ekspresyonu olduğuna dair önemli kanıtlar vardır. Bunlara ilaveten, kanalların nöronal olmayan hücrelerde de kuvvetli ekspresyonun olduğu düşünülmüştür. Olah ve arkadaşları, hipokampal kesitlerdeki incelemelerinde piramidal ve CA1 nöronlarında işlev gören çok sayıda TRPM2 katyon kanalının mevcut olduğunu rapor etmiştir (225-227)

Oksidatif stres ile aktif hale geldiği rapor edilen ilk TRP kanalı, TRPM2'dir. TRPM2, hücre içinde oluşan kuvvetli  $Ca^{+2}$  akımıyla birlikte, pozitif geri bildirim mekanizmasının devreye girmesiyle, çok sayıda TRPM2 kanalının aktif hale gelmesini tetiklemektedir (228). Mikonazole, clotrimazole, flufenamik asit ve 2-aminoetoksifenil borat, dolaylı TRPM2 kanal blokörlerinden bazılarıdır. ACA da bu dolaylı TRPM2 kanal blokerlerinden biridir (229). Doğrudan TRPM2 kanal blokajını sağlayan ve klinikte toksik etkisi olmaksızın kullanıma uygun olan kanal blokörü sayısı oldukça azdır.

Yapılan birkaç çalışmada, TRP kanalları KBB geçirgenliği ile ilişkilendirilmiş ve TRPM2 kanallarının varlığı, beyin mikrodamar endotel hücrelerinin primer sıçan kültürlerinde tespit edilmiştir (230). Yapılan bir çalışma ile insan pulmoner arter endotel hücre tabakalarında TRPM2 ekspresyonu doğrulanmış ve hidrojen peroksit maruziyetinin  $Ca^{2+}$  akışını ve artmış endotel hücre geçirgenliğini sağladığı gösterilmiştir (231).

Yapılan bir çalışmada, PTZ ile epilepsi modeli oluşturulan sıçanlarda ACA'nın, hipokampüsteki oksidatif stres düzeyi, apoptozis ve TRPM2 aktivasyonu üzerine etkinliği araştırılmıştır. Sonuçlarda, TRPM2 kanalından  $Ca^{+2}$  girişi olduğu durumda, hipokampüste apoptozis ve mitokondriyal oksidatif stres meydana geldiği ve ACA aracılı TRPM2 kanal inhibisyonunun, apoptozis ve mitokondriyal oksidatif stres değerleri üzerinde düzenleyici bir etken olduğu rapor edilmiştir (232).

Oksidatif stresi ve apoptozisi azaltıcı yönde etki eden, TRPM2 kanallarının ve PLA<sub>2</sub> enziminin blokleri olarak tanımlanan ACA'nın epileptik nöbetlerde, ER stres belirteçleri ve KBB bütünlüğü üzerine nasıl bir etkinliği olduğu konusunda soru işaretleri mevcuttur ve mekanizmanın hangi yollar üzerinden ilerlediği konusu henüz net olarak açıklanamamıştır. Şekil 2.23'te TRPM2 kanalının moleküler ve aktivasyon özellikleri gösterilmiştir.



**Şekil 2.23.** TRPM2 kanalının moleküler ve aktivasyon özellikleri (Malko ve Lin, 2020'den Türkçeleştirilmiştir.)(233).

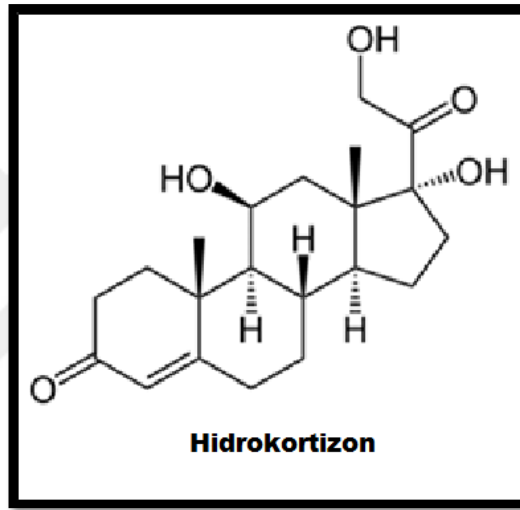
(A) S5 ve S6 arasında Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup>'a geçirgen bir gözenek oluşturan, yeniden giriş döngüsüne sahip 6 transmembran alanından (S1-S6) oluşan tetramerik yapıdaki TRPM2 kanalı ve alt biriminin temsili resmi. Hücre içi N-terminali dört MHR (1-4) içerir ve hücre içi C-terminali aCC tetramerizasyon alanı ve bir NUDT9-H alanı içerir. TRPM2 kanalı, hücre içi ADPR'nin iki bölgede, MHR1 / 2 ve NUDT9-H alanında ve Ca<sup>2+</sup> transmembran alanının hücre içi yüzüne bağlanmasıyla etkinleştirilir (gösterilmemiştir). (B) TRPM2 kanalının ROS tarafından etkinleştirilmesi. Hücre dışı ROS'a maruz kalma, artan hücre içi ROS üretimi veya azalmış antioksidan kapasiteden kaynaklanan hücre içi ROS birikimi, NAD<sup>+</sup>'ı ADPR'ye dönüştüren çekirdekte PARP ve PARG enzimlerinin aktivasyonunu indükler. ADPR, sitozole yayılır ve TRPM2 kanalını açar, Ca<sup>2+</sup> akışının hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunu artırmasına izin verir veya hücre içi organellerde (gösterilmemiştir) TRPM2 kanalını etkinleştirir. (C) Olası mekanizmada ACA'nın artan ER stresi üzerine nasıl bir etkinlik gösterdiği çalışmanın araştırma konularından birini oluşturmaktadır.

**ADPR:** ADP-riboz, **CC:** sarmal-sarmal, **MHR:** TRPM homoloji bölgeleri, **NAD<sup>+</sup>:** nikotinamid adenin dinükleotid, **NUDT9-H:** NUDT9 homolojisi, **PARG:** poli (ADPR) glikohidrolaz, **PARP:** poli (ADPR) polimeraz, **ROS:** reaktif oksijen türleri.

## 2.6. Hidrokortizon ve Etki Mekanizması

Hidrokortizon, hem glukokortikoid hem de mineralokortikoid agonisti olarak görev yapan bir maddedir. 1930’larda Edward Kendall tarafından keşfedilmiş olan bu madde, “Compound F/17-hidroksikortikosteron” olarak adlandırılmıştır.

1941’de ilk kez hidrokortizonun tıbbi kullanımı onaylanmış olup, Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaçlar listesinde bu maddeye yer verilmiştir (234). Beyaz renkte ve katı formda olan hidrokortizonun molekül ağırlığı 362.5 g/mol’dür ve kimyasal formülü  $C_{21}H_{30}O_5$ ’tir. Kimyasal yapısı şekil 2.24’te gösterilmiş olan hidrokortizon; DMSO, etanol gibi organik çözücülerde çözünür ancak suda çözünmez (235).



**Şekil 2.24.** Hidrokortizonun kimyasal yapısı (235).

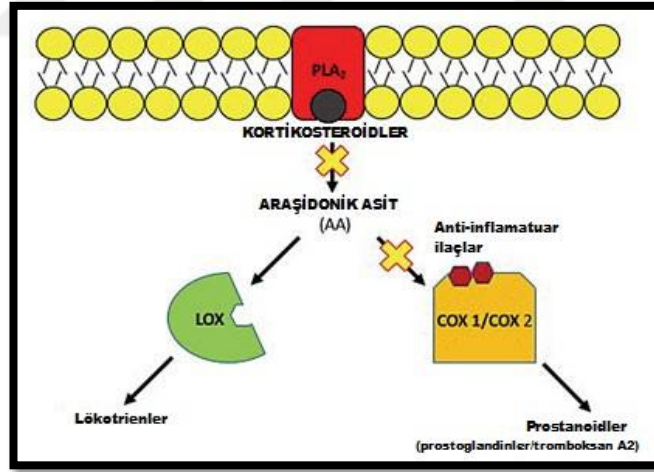
Hidrokortizon; 50 yılı aşkın süredir çeşitli epilepsi türlerinde tedavi maksadıyla ağırlıklı olarak kullanılan prednizolon ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) gibi, tedavide tercih edilen nörosteroidlerden biridir. Son 30 yılda yayınlanan çoğu raporda, geleneksel olarak kullanılan antikonvülsan ve anti epileptik ilaçların, özellikle de West Sendromu gibi tedaviye dirençli epilepsi sendromları ve epileptik ensefalopatiler üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır (236). Ancak diğer epilepsi türlerinin tedavisinde kullanılmakta olan hidrokortizon gibi kortikosteroidlerin esas etkilerinin araştırılmasına nispeten daha az ilgi gösterilmiştir. Ayrıca kortikosteroidlerin kan-beyin bariyeri üzerinde nasıl bir etkinliği olduğu ve bu etkinin mekanizması hakkında çok az bilgi mevcuttur.

Çeşitli hipotezler gözden geçirildiğinde; kortikosteroidlerin genel etkileri üzerine düşünülen unsurlar esas olarak; hücre içi-hücre dışı elektrolit oranlarındaki veya hücre içi

glikoz seviyelerindeki değişiklikler ile serebral kan dolaşımında azalmalar meydana getirdiği, serebral ödem, protein metabolizmasındaki değişikliklerdir. Bununla birlikte, intraserebral enzim aktivitesi ve anti-inflamatuar aktivitede hızlanmayı da artırdığı ihtimali üzerinde durulmaktadır (173).

Şekil 2.25'te gösterildiği gibi, kortikosteroidlerin anti-inflamatuar olarak etki mekanizması incelendiğinde; sitozolik steroid reseptörüne bağlanan hidrokortizon, oluşan reseptör-ligand kompleksi ile kendisini hedef genlerin promoter bölgesindeki birçok glukokortikoid yanıt elemanının bağlandığı hücre çekirdeğine yerleştirir.

DNA'ya bağlı reseptör daha sonra temel transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek, spesifik hedef genlerin ekspresyonunda artışa neden olur. Kortikosteroidlerin anti-inflamatuar etkilerini gösterirken; lipokortinleri, araşidonik asidi inhibe ederek, prostaglandinlerin ve lökotrienlerin biyosentezini kontrol eden PLA<sub>2</sub> inhibitör proteinlerini kullandığı düşünölmektedir. Bu sayede siklooksijenaz (hem COX-1 hem de COX-2) ekspresyonu da baskılanarak etkiyi güçlendirir. Başka bir deyişle inflamasyon, prostaglandinler ve lökotrienlerdeki iki ana ürün, hidrokortizon gibi glukokortikoidlerin etkisiyle inhibe edilir (237).



Şekil 2.25. Kortikosteroidlerin anti-inflamatuar etki mekanizması (Ricciotti ve FitzGerald, 2011'den Türkçeleştirilmiştir.)(238).

Epileptik nöbetler üzerine kortikosteroidlerin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Kortikosteroidlerin, transkripsiyonel düzenleyiciler olarak görev yapan MSS'deki steroid reseptörleri ile etkileşime girdiği ve voltaja bağımlı Ca<sup>2+</sup> kanallarını etkilediği de düşünölmektedir (239). Bu hipotezler göz önünde bulundurulduğunda,

hidrokortizon ve diğerkortikosteroidlerin epileptik nöbetleri durdurmada iki temel mekanizma üzerinden işlev yaptığı ihtimali yüksektir.

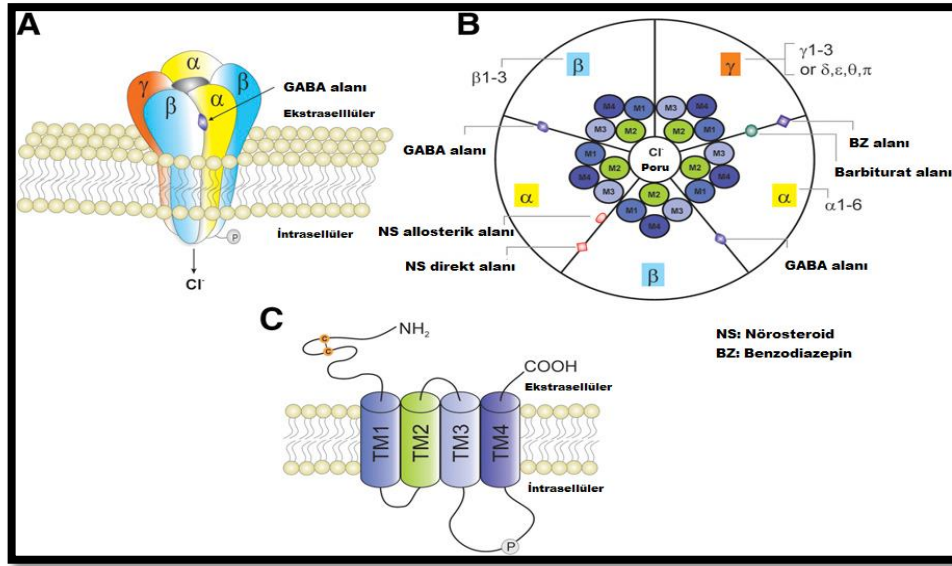
İlk ihtimal, kortikosteroidlerin PLA<sub>2</sub> enzimini üzerine inhibe edici etkisini kullanarak, epileptik nöbetlerde hipereksitabiliteye sebep olan Ca<sup>2+</sup> kanallarının aktivitesini azaltıp, anti-inflamatuvar etkiyle bağlantılı şekilde nöbetleri azalttığıdır. Bu şekilde KBB hasarını gidermede de etkili olabilir. Bununla bağlantılı olarak göze çarpan ikinci ihtimal ise; GABA reseptörleri aracılığıyla glutamerjik aktiviteyi azaltıp, Ca<sup>2+</sup> ve Na<sup>+</sup> kanallarının açılmasıyla meydana gelen eksitator potansiyeli düşürerek, Cl<sup>-</sup> ve K<sup>+</sup> kanallarını aktif hale getirip, inhibitör potansiyelin devreye girmesini sağlayabilirler. Bu sayede hücre içi-hücre dışı iyon dengesizliğini ortadan kaldırarak, antikonvulsan etki gösterebilirler.

### **2.6.1. GABA-A Reseptörleri ve Nörosteroidlerle İlişkisi**

Nöronal aktivitenin düzensizliği ve GABA-A reseptörlerinin bileşimindeki ve işlevindeki değişiklikler, epilepsi gelişimine katkıda bulunur. GABA, beyindeki postsinaptik GABA<sub>AR</sub>'leri aktive ederek, Cl<sup>-</sup> iyonlarının akışına ve nöronal uyarılabilirliği ve ateşlemeyi azaltmaya hizmet eden nöronların hiperpolarizasyonuna neden olarak, hızlı inhibe edici eylemler uygular. Şekil 2.26'da GABA-A reseptör alt birimleri gösterilmiştir.

Nörosteroid yapıdaki maddelerden biri olan hidrokortizon da GABA'nın  $\alpha$  ve  $\beta$  alt üniteleri üzerinden epileptik nöbetlerin inhibisyonunu sağlamaktadır (240). Spesifik olarak, GABA-A reseptör  $\alpha 1$  alt birimini (GABRA1) kodlayan gendeki ve GABA-A reseptörü  $\beta 3$  alt birimini (GABRB3) kodlayan gendeki mutasyonlar, esas olarak çocukluk çağı absans epilepsisi (CAE) ve juvenil miyoklonik epilepsi (JME) ile ilişkilidir. GABA-A reseptörü  $2\gamma$  alt birimini (GABRG2) kodlayan gendeki mutasyonlar ve GABA-A reseptör  $\delta$  alt birimini (GABRD) kodlayan gen, febril nöbetler (FS'ler) ile ilişkilidir (241).





**Şekil 2.26.** Tipik GABA-A reseptörü yapısı ve alt birim bileşimi (Chuang ve Reddy, 2018'den Türkçeleştirilmiştir.)(241).

(A) GABA-AR'ler  $\text{Cl}^-$  iyonuna geçirgen bir kanal oluşturan heteropolimerlerdir. (B) Pentamer yapısının üstten görünümü. GABA-AR'ler bilinen 19 alt birimden oluşmaktadır:  $\alpha 1-6$ ,  $\beta 1-3$ ,  $\gamma 1-3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  ve  $\rho 1-3$ . GABA-AR'lerin en genel stokiyometrisi iki  $\alpha$ , iki  $\beta$  ve bir  $\gamma$  içerir ve  $\gamma$  alt birimi  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  veya  $\pi$  ile değiştirilebilir. Her alt birimin dört transmembran domaini (TM) vardır. (TM1 – TM4). TM2'ler seçici bir kanal gözenağı oluşturur. GABA bağlanma alanları, alt birim  $\alpha$  ve  $\beta$  arasındaki bağlantı noktasında yer alırken, benzodiazepinler (BZ'ler)  $\alpha$  ve  $\gamma$  alt birimleri arasındaki arayüze bağlanır. Barbitürat bağlanma alanları, BZ bağlanma bölgesinden farklıdır. **Nörosteroidler (NS), allosterik ve doğrudan bağlanma alanları dahil olmak üzere iki varsayılan bağlanma yerine sahiptir. Allosterik bağlanma sahası,  $\alpha$  alt birim TM'lerinde yer alırken, doğrudan bağlanma alanı,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinin TM'leri içindedir.** (C) GABA-AR'ler, aynı zamanda nikotinik asetilkolin, glisin ve serotonin 5-HT<sub>3</sub> reseptörleri içeren ligand kapılı iyon kanallarının Cys-loop ailesine dahildir. Her alt birim, BZ'ler, barbitüratlar ve NS'ler dahil olmak üzere çeşitli ilaçlarla etkileşime giren bir uzun hücre dışı N terminaline sahiptir; dört TM (TM1 – TM4) ve TM1 ve TM2'yi bağlayan bir kısa hücre içi halka, TM2 ve TM3'ü bağlayan kısa bir hücre dışı halka, TM3 ve TM4'ü bağlayan ve fosforilasyon ile modüle edilebilen bir uzun hücre içi halka ve bir küçük hücre dışı C terminali.

Son yıllarda yapılan *in vitro* bir çalışmada, KBB sıkı bağlantı proteinlerinden olan okludin ve ZO-1'in sıgır retinal endotelial hücre tabakası boyunca immunohistokimyasal analizleri yapılmıştır. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, hidrokortizonun, hücre sınırında hem okludin hem de ZO-1 boyamasını etkili bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, 4 saatlik hidrokortizon tedavisinin, okludin fosforilasyonunu önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir. Diyabet hastalarında meydana gelen retinal ödemin tedavisinde hidrokortizonun etkinliğinin önemli olduğu ve tavsiye edildiği de çalışma sonucunda bildirilmiştir (242). Şekil 2.27'de epilepsi/nöbetler de dahil olmak üzere, GABA-A reseptörünün ilgili olduğu hastalıklar bir arada gösterilmiştir.

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\gamma 2$	$\delta$
Anksiyete								+	-
Öğrenme/hafıza					+				-/+
<b>NÖBET/EPİLEPSİ</b>	+	-	-		-		+		
Benzodiazepinlerin etkileri									
Motor aktivite bozulması	-	-	-		-				
Sedasyon	+	-	-		-	+			
Anksiyoliz	-	+	+		-				
Kas gevşemesi	-		+						
Antikonvülsan	+	-	-		-				
Nörosteroidlerin etkileri									
Motor aktivite bozulması	-								
Hipnoz	-								+
Anksiyoliz									+
Antikonvülsan									+
Diğer ilaçların etkileri									
Sedasyon					+				
Anestezi					+		+		-

+: İlgili                      -: İlgili değil

**Şekil 2.27.** Seçilmiş GABA-A reseptör alt birimlerinin farmakolojik rolleri (Carver ve ark. 2014'ten Türkçeleştirilmiştir.)(240).

Yapılan klinik bir çalışmada, annelerin gebelik sırasında yaşadığı yüksek stres düzeyinin, doğum sonrası nöbetlere ve infantil spazmlara neden olduğu bildirilmiştir (243). Deney hayvanlarında oluşturulan ve bir epilepsi modeli olan kindling modelinde, hayvanlarda betametazon ve deksametazon ile doğum öncesi tedavi yapılmış, sonuçta bu maddelerin hayvanlar üzerinde antikonvülsan etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (244). Yapılan diğer bir çalışmada ise prenatal dönemde deney hayvanlarına verilen betametazonun, yavrunun gelişmesi esnasında antikonvülsan etkinliği olan nöropeptid Y'nin hipokampal ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (245). Sonuç itibarıyla, her iki çalışma ile kindling epileptogenezinde prenatal dönemde betametazon veya deksametazon maruziyetinin, antikonvülsan etkilerinin olduğu elde edilen bulgularla desteklenmiştir.

ABC taşıyıcılarının, ilaç dağıtımı ve ilaçlara verilen yanıtta oldukça önemli olduğu giderek daha fazla kabul görmektedir. MDR-1/ABCB1 geninin kodlanmış ürünü olan p-gp, günümüzde klinikte kullanılan ve yapısal olarak da farklılık gösteren ilaçlar dahil olmak üzere, geniş bir substrat spesifikliğine sahip olması bakımından klinik açıdan da önem arz etmektedir (246). Ayrıca, bu taşıyıcının gastrointestinal sistem ve beyin kılcal endotelial hücreleri gibi belirli doku bölmelerindeki ekspresyonu, birçok ilacın oral emilimini ve MSS'ye girişini sınırlar.

KBB'nin varlığından dolayı kullanılan çeşitli ilaçlar ve dolaşımdaki moleküller beyne yalnızca iki işlemde biri yoluyla erişirler: 1) küçük polar olmayan moleküllerin KBB aracılığıyla serbest (pasif) difüzyon yoluyla lipit aracılı taşınması veya 2) katalize edilmiş taşıma (247). Ancak epileptik nöbetler, beyinde farklı hücre tiplerinde aşırı P-gp ekspresyonuna neden olmaktadır (248). Bu da epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçların yeterli dozda beyin hücrelerine geçişinde kısıtlılıklara sebep olmaktadır.

Hidrokortizon ile birlikte; deksametazon, kortikosteron, kortizol, aldosteron gibi kortikoidler de substrat olarak görev yapan ABC taşıyıcıları (P-gp (ABCB1) sınıfında yer alır. Bunlara ilaveten doxorubicine, daunorubicine gibi kansere karşı kullanılan ilaçlar, siklosporin A gibi immünsupresif etki yapan ilaçlar da bu sınıfa dahildir (249).

Glukokortikosteroidler; anti-inflamatuar ve antikonvülsan ilaçlar olarak yaygın şekilde kullanılsa da çok ciddi yan etkileri olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır. Kortikosteroid gibi anti-inflamatuar ve anti-alerjik ilaçlara dahi ürtikerden anafilaksiye kadar değişebilen aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişebilmekte, farklı ilaç formlarında farklı reaksiyonlar izlenebilmektedir. İştah artışı, sinirlilik, uykusuzluk, ayak bileklerinde ve ayaklarda ödem, göğüste ağrı ve yanma hissi, kas güçsüzlüğü, yara iyileşmesinde azalma ve kan şekeri seviyesinde artış gibi çok çeşitli yan etkileri mevcuttur (250).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlık Süreci

Bu çalışmada deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen tüm işlemler, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınan onay ile (10.07.2020 tarih, 2020/11-3 karar sayısı ve HADYEK kayıt no 2019/A-32) etik kurulda belirtilen deney protokülüne uygun şekilde yapıldı. Çalışmada; absans epilepsili WAG/ Rij ırkı, ortalama 250-300 gr ağırlığında, 6 aylık toplam 32 adet (16 adet dişi ve 16 adet erkek) sıçan kullanıldı.

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi'nden (KUTTAM), İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'ne nakil edildi. Nakil işlemlerinin hemen ardından, deney hayvanları uygun kafeslere konularak, 10 gün süreyle karantinaya alındı. Bu sayede sıçanların, nakledikleri İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin çevresel koşullarına uyumu sağlandı. Deney süresince sıçanların, 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık periyodunda, 20-22°C sıcaklık aralığı olan bir ortamda barınması sağlandı. Hayvanlara normal musluk suyu içirildi ve hayvanlar standart olarak pellet şeklinde hazırlanmış sıçan yemi ile *ad libitum* olarak beslendi.

Çalışmadaki deney hayvanlarının bakımı ve beslenmesi, spontan nöbetler ile vücut ağırlıklarının ve yem tüketimlerinin takip edilmesi, deney sonunda yapılan cerrahi işlemler, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. Western Blot analizleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda ve immünohistokimyasal analizler, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

#### 3.2. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Çalışmada gruptaki hayvan sayısı, % 95 güven düzeyinde, ( $\alpha=0.05$ ) ve % 80 güç ( $\beta=0.20$ ) ile karşılaştırılması esas alınarak belirlendi ve ZO-1 sıkı bağlantılarının protein seviyesi etki büyüklüğü 1.67 olarak öngörüldü. Grup başına alınması gereken deney hayvanı sayısı güç analiziyle en az 7 olarak hesaplandı (173).

Olası kayıplar nedeniyle, çalışmadan elde edilen sonuçların güvenilirliği ve geçerliliğinin etkilenmemesi için grup başına 8 hayvan çalışmaya dahil edildi. Gruplar oluşturulurken, sıçanlar tartılarak ağırlık ortalamaları birbirlerine en yakın olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Her bir ana grupta 8 adet (4 adet dişi ve 4 adet erkek) olmak üzere, toplamda 32 adet WAG/Rij türü sıçan, dişi ve erkek olarak ayrıldı ve kafeslere alındı. Deney grupları ve her grupta bulunan sıçanlara yapılan enjeksiyon uygulamaları aşağıda belirtildiği gibidir.

**Grup 1: WAG/Rij Kontrol grubu (n=8):** Bu grupta bulunan dişi ve erkek sıçanlara herhangi bir madde enjeksiyonu yapılmadı. Sıçanların spontan nöbetleri izlendi, vücut ağırlıkları ve tükettikleri yem miktarları tartıldı.

**Grup 2: WAG/Rij+DMSO+PBS grubu (n=8):** Bu grupta bulunan dişi ve erkek sıçanlara ACA'nın çözdürüldüğü aynı miktardaki % 6 oranında 0.2 ml/kg/gün DMSO (Corlo-Erba Milano, İtalya) ve 3.8 ml/kg/gün PBS (Sigma-Aldrich, Almanya), intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi. 13 günlük DMSO+PBS enjeksiyonu yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra, sıçanların spontan nöbetleri izlendi. Vücut ağırlıkları ve tükettikleri yem miktarları tartıldı.

**Grup 3: WAG/Rij +ACA grubu (n=8):** Bu grupta bulunan dişi ve erkek sıçanlara günde tek doz olmak üzere 25 mg/kg/gün ACA (Enzo Life Sciences, USA) intraperitoneal olarak (i.p) enjekte edildi. (1 ml hacimde dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde ve sulandırma işlemi %98 oranında fosfat tamponu çözeltisinde (PBS) yapıldı). 13 günlük ACA enjeksiyonu yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra, sıçanların spontan nöbetleri izlendi. Vücut ağırlıkları ve tükettikleri yem miktarları tartıldı.

**Grup 4: WAG/Rij+Hidrokortizon grubu (n=8):** Bu grupta bulunan dişi ve erkek sıçanlara günde tek doz olmak üzere 2.25 mg/kg/gün hidrokortizon (Sigma-Aldrich, Almanya), 0.2 ml DMSO içerisinde çözülerek intraperitoneal (i.p) şekilde enjekte edildi. 13 günlük hidrokortizon enjeksiyonu yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra, sıçanların spontan nöbetleri izlendi. Vücut ağırlıkları ve tükettikleri yem miktarları tartıldı.

### 3.3. WAG/Rij Sıçanlarda Oluşan Spontan Nöbetlerin İzlenmesi

WAG/Rij dişi ve erkek sıçanlarda 10 günlük karantina süreci bittikten sonra, gruplarda deney öncesi (herhangi bir madde enjeksiyonu yapılmadan) oluşan spontan absans epilepsi nöbetleri takip edildi. Nöbet takipleri gerçekleştirildikten sonra erkek ve dişi sıçanlar, ayrı kafeslere alındı. Nöbetlerin takip edildiği sıçanların sıralamasının karışmaması için, her bir sıçanın kuyruğuna numara yazıldı.

Sıçanların nöbet esnasında sergilediği davranışlar, video kamera ile izlendi.

Tablo 3.1.'de gösterildiği gibi, literatürde WAG/Rij sıçanlar için belirlenmiş ve kabul görmüş değerlendirme ölçeği kullanılarak, ölçekte belirtilen davranışlar izlendi. Listede nöbet davranışına ait bölüme, gözlemlenen davranışın sıklık derecelerine göre, her bir sıçan için işaret konuldu. Epileptik nöbetler, değerlendirme tablosuna bakılarak, WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların tümünde takip edildi. Aynı nöbet takibi, deney süresince ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS enjekte edilen sıçanlarda, deney öncesindeki nöbet ölçütleri esas alınarak yeniden gerçekleştirildi. Enjeksiyon öncesi ve enjeksiyon sonrası WAG/Rij dişi ve erkek sıçanlardaki nöbet değişimleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak veriler kayıt altına alındı.

**Tablo 3.1.** WAG/Rij sıçanlarda nöbet takibi esnasında görülen davranışlar (251).

Literatürde belirtilen davranışlar	Gözlemlenen davranışlar	Sıklık dereceleri
İmmobilizasyon	İmmobilizasyon	XXX
Bir noktaya odaklanma, donakalma	Bir noktaya odaklanma, donakalma	XXX
Uyarana karşı duyarsızlık	Uyarana karşı duyarsızlık	XX
Çiğneme hareketi	Çiğneme hareketi	X
Bıyık yapılarında titreme	Bıyık yapılarında titreme	X
Diş gıcırdatma		
Yanak kaslarının gevşemesi ile dilin dışarıya sarkması		
Başın sağa sola sallanması	Başın sağa sola sallanması	XXX
	Nöbet sırasında palpebranın titremesi	XXX
	Nöbet sırasında kulakların titremesi (sağ)	XXX
	Nöbet sırasında bulunduğu zeminin yalanması	X
	Nöbet sırasında pupil dilatasyonu	XXX
	Nöbet sırasında eksoftalmus	XXX

Tablo 3.2'de ACA grubuna ait örnek bir nöbet takip çizelgesi gösterilmektedir. Deney hayvanlarının karantina sürecinden sonra; ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS gruplarının spontan nöbet takipleri, enjeksiyon yapılmadan önce (karantina süresi bitiminde (11. gün) ve enjeksiyonların bitiminden 14 gün sonra (27.gün) yapıldı. Bu gruplardaki nöbet değişimleri, kontrol grubu ile kıyaslandı. Nöbet takipleri, 09.00-

12.00'de aynı saatte olacak şekilde gerçekleştirildi. Sıçanda görülen davranışlar, tabloda uygun alanlar işaretlenerek değerlendirildi.

**Tablo 3.2.** ACA grubunda bulunan sıçanların örnek nöbet takip çizelgesi.

ACA grubu	Bıyık yapılarında titreme	Uyarana karşı duyarsızlık	İmmobilizasyon	Bir noktaya odaklanma, donakalma	Başın sağa-sola sallanması
1. (dişi)	X	X	-	X	X
2. (dişi)	-	X	-	X	-
3. (dişi)	-	-	X	X	-
4. (dişi)	-	X	-	-	X
5. (erkek)	-	-	X	-	X
6. (erkek)	X	X	X	X	-
7. (erkek)	-	X	X	-	-
8. (erkek)	X	-	X	X	X

### 3.4. Deney Hayvanlarında Ağırlık ve Yem Tüketimi Takibi

WAG/Rij dişi ve erkek sıçanlarda 10 günlük karantina süreci bittikten sonra, tüm gruplardaki sıçanların günlük tükettikleri yem miktarları takip edildi. Ayrıca sıçanlar enjeksiyon öncesi de dahil olmak üzere, deney sonlanana kadar haftada bir tartılarak vücut ağırlıkları ve tükettikleri yem miktarları kayıt altına alındı.

### 3.5. Deney Hayvanlarında Perfüzyon-Fiksasyon İşlemi

WAG/Rij dişi ve erkek sıçanlarda 13 gün boyunca süren madde enjeksiyonu, nöbetlerin takip edilmesi, ağırlık ve yem tüketimi ölçümünün tamamlanmasının ardından, deney hayvanlarının dokuları cerrahi işlemle alınmadan önce, sıçanlara perfüzyon-fiksasyon işlemi uygulandı. 32 adet WAG/Rij türü dişi ve erkek sıçanın, 16 adedi Western Blot analizi için, 16 adedi ise immünohistokimyasal analiz için kullanılmak üzere iki gruba ayrıldı.

Deney hayvanları için kullanılan perfüzyon-fiksasyon cihazlarının çalışma prensipleri göz önüne alınarak, deney için özel bir perfüzyon-fiksasyon cihazı tasarlandı. Şekil 3.1'de gösterilen cihaza, perfüzyon işleminde kullanılacak solüsyonların serum fizyolojik sıvı ve paraformaldehit (SF ve PFA) konulması için iki cam şişe yerleştirildi

ve üzerlerine solüsyonların isimleri yazıldı. Şişelerin içerisine kalın plastik serum hortumu konuldu. Bu hortumun bir ucu ise belli bir hızda sıvının akışını sağlaması için küçük bir su motoruna bağlandı. İnce ve şeffaf serum hortumunun da bir ucuna intraket iğnesi takılarak, su motoruna bağlanması sağlandı. Bu sayede kalbe iğneyle girilmesi halinde sıvıların vücuda geçişi gerçekleştirildi. Ayrıca su motorunun çalışıp sıvının belli bir basınçta (ortalama 80 mmHg) kanül aracılığıyla kalpte dolaşımını ve tahliyesini sağlayabilmek amacıyla, elektriksel güç kaynağı olarak 12 voltluk (12V) küçük bir akü kullanıldı ve akünün su motoruyla bağlantısı sağlanarak sabitlendi.

Perfüzyon-fiksasyon işleminin hemen öncesinde sıçanlara yüksek doz ketamin ve ksilazin (150 ve 20 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu yapılarak sıçanlar anestezi altına alındı. Şekil 3.2’de gösterildiği gibi, hayvanların göğüs kafesi açıldı ve kalp açığa çıkarıldı. Western Blot analizi yapılacak sıçanlara kardiyak perfüzyon için, kalbin sol ventrikülünden girilerek sağ atriuma doğru ilerletilen kanül iğnesi, aorta içerisinde görünür hale geldiğinde, iğne sabitlendi. 75 ml SF bolus olarak verilmek üzere perfüzyona başlandı ve sağ atriyuma küçük bir kesi atılarak intravasküler kanın damar ağından uzaklaştırılması sağlandı. Sıçanlar perfüzyon-fiksasyon işleminin ardından dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Sağ ve sol hemisferdeki hipokampusler ve somatosensöriyel korteks alanları alınarak, WB analizinin yapılacağı güne kadar -80°C’de derin dondurucuda saklandı.

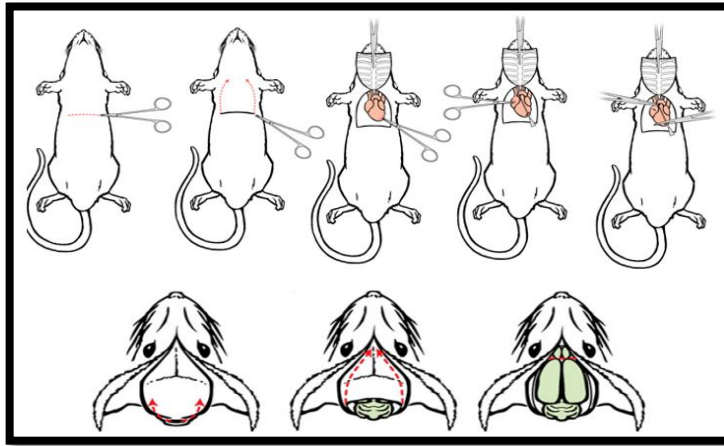
İmmünohistokimyasal analizlerde kullanılacak total beyin dokuları çıkarılmadan önce, sıçanlara yüksek doz ketamin ve ksilazin (150 ve 20 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu yapılarak sıçanlar anestezi altına alındı. Hayvanların göğüs kafesi açıldı ve kalp açığa çıkarıldı. Aynı perfüzyon işlemi uygulanan sıçanlara, SF yerine 10-15 dakika boyunca 200 ml fiksatif solüsyonu (0.1 M fosfat tampon (pH:7.4) içinde % 4 paraformaldehit (PFA)) verilerek perfüzyon-fiksasyon işlemi yapıldı. Yaklaşık 3 dk boyunca PFA ile damar ağındaki kan uzaklaştırıldıktan sonra, immünohistokimyasal analizler için, sıçanların beyin dokusu çıkarıldı.





**Şekil 3.1.** Deney hayvanları için özel olarak tasarlanmış perfüzyon-fiksasyon cihazı.

Şekil 3.2 ve şekil 3.3'te gösterildiği gibi, perfüzyon-fiksasyon tekniği ile fikse edilen ve literatüre uygun şekilde çıkarılan sıçan beyinleri, %10 tamponlu formalin fiksatifine konuldu. 24-48 saat arasında  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Sürenin sonunda çözelti üç kez değiştirilerek, ikişer saat süre ile dokular PBS'li tuz çözeltisi (pH 7.4) ile yıkandı ve analizlere hazır hale getirildi (252).



**Şekil 3.2.** Deney hayvanları üzerinde perfüzyon-fiksasyon işleminin uygulanma aşamaları (252).



**Şekil 3.3.** Perfüzyon-fiksasyon işlemi sonrasında çıkarılan beyin dokusu.

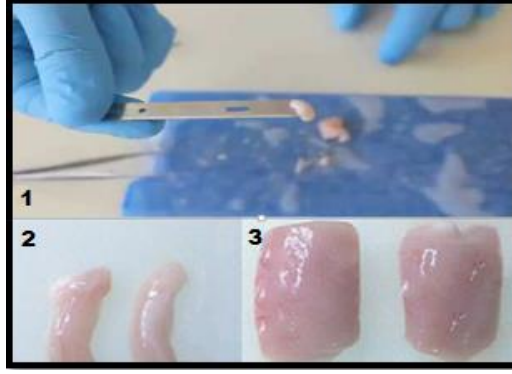
### 3.6. Western Blot Analizi

#### 3.6.1. RIPA Liziz Tampon Çözeltisi Protokolü

Sıçanlardan alınan beyin doku örnekleri için WB işlemi hazırlık aşamasında tablo 3.3'te gösterilen maddeler kullanılarak RIPA liziz tampon çözeltisi yapıldı ve buzdolabında +4°C'de önceden soğutuldu. Dokulardaki protein miktarlarının analizinden önce, her 20 mg beyin dokusuna (somatosensoriyel korteks ve hipokampus) 200 µl soğuk RIPA liziz tampon çözeltisi ve %1 proteaz inhibitör karışımı (Proteaz-Inhibitor Mix M, SERVA, Heidelberg Almanya) eklendi.

**Tablo 3.3.** RIPA liziz tampon çözeltisinin hazırlanması.

Stok	Hacim	Son hacim
5 M NaCl	3 mL	150 mM
0.5 M EDTA, pH 8.0	1 mL	5 mM
1 M Tris, pH 8.0	5 mL	50 mM
NP-40	1 mL	% 1.0
% 10 sodyum deoksikolat	5 mL	% 0.5
% 10 SDS	1 mL	% 0.1
dH2O	84 mL	

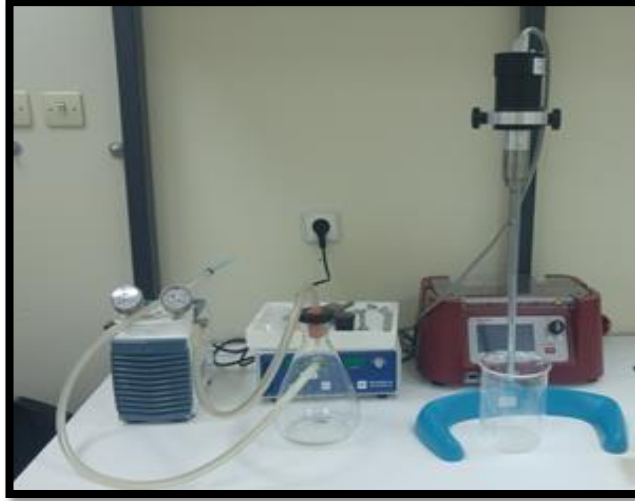


**Şekil 3.4.** Beyin dokusunda analizleri yapılacak olan hipokampus ve somatosensoriyel korteks alanları.

(1.Hipokampusün çıkarılması, 2.Sağ ve sol hipokampus, 3. Somatosensoriyel korteks alanı.)

Beyin dokuları 5 x 30 sn ile buz üzerinde sonikatörle (Hoefler Scientific, Kanada) parçalandı. Her sonikasyon işlemi sırasında belirli aralıklarla ependorf içindeki numune soğutuldu. Dokunun tamamen homojen hale gelmesi sağlandı. Elde edilen numune periyodik pipetleme ile 10-20 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Hücre kalıntılarının pellet haline gelmesi için, ependorf tüpü 15 dakika boyunca 14.000 rpm’de santrifüjlendi (Sigma 1-14 / ABD).

Alttağı pellete dokunulmadan oluşan süpernatantlar, yeni bir tüpe aktarıldı. Daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş 96’lık well’e, 5’er µl yüklenen örnekler üzerine Bradford’dan 245 µl eklendi. Boya ışıktan etkilenebileceği için üzeri alüminyum folyoyla kapatılarak, 15-20 dk çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletildikten sonra ölçüm alındı (Synergy™ H1Multi-Mode Microplate Reader, İrlanda) ve standart veri grafikleri elde edildi. Bu sayede total protein miktarları hesaplandı.



**Şekil 3.5.** Beyin dokularını parçalama işleminde kullanılan sonikatör.

### 3.6.2. SDS Analizi

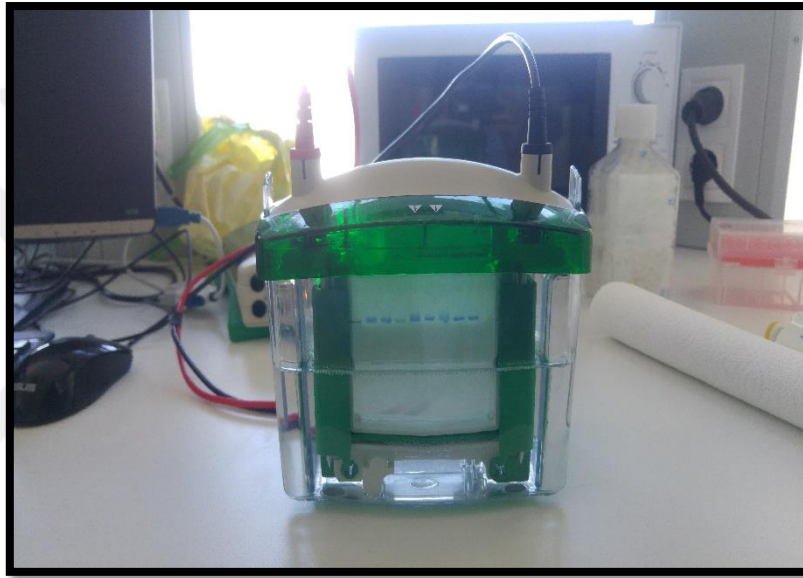
SDS jel tablo 3.5'te verilen protokole uygun olarak hazırlandı. 5X'lik yükleme tamponu toplam hacimde 1X olacak şekilde ayarlandı ve örneklerin üzerine eklendi. Boya hazırlanmadan önce,  $\beta$ -merkaptoetanol en son aşamada eklendi. Örnekler ve belirteç, kaynayan suda (veya 95-100 °C'de) 5 dk tutularak proteinlerin denatüre olması sağlandı. Bu sırada basınç nedeniyle açılmasını önlemek için, kapaklar parafilmle sıkıca sarılarak kapatıldı. Her kuyuda 40  $\mu$ g protein olacak şekilde yükleme yapıldı. Jel, 120 V'de 90-105 dk 1X jel yürütme tamponu içerisinde yürütüldü.

**Tablo 3.4.** Yürütme jelinin hazırlanması.

Reaktif maddeler	Kullanılan miktar
1.5 M Tris HCl (pH 8.8)	1250 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	2000 $\mu$ l
% 40'luk akrilamid/bis-akrilamid karışımı	1670 $\mu$ l
% 20'lik SDS	25 $\mu$ l
%10'luk APS (Taze hazırlanmalı)	25 $\mu$ l
TEMED	2.5 $\mu$ l

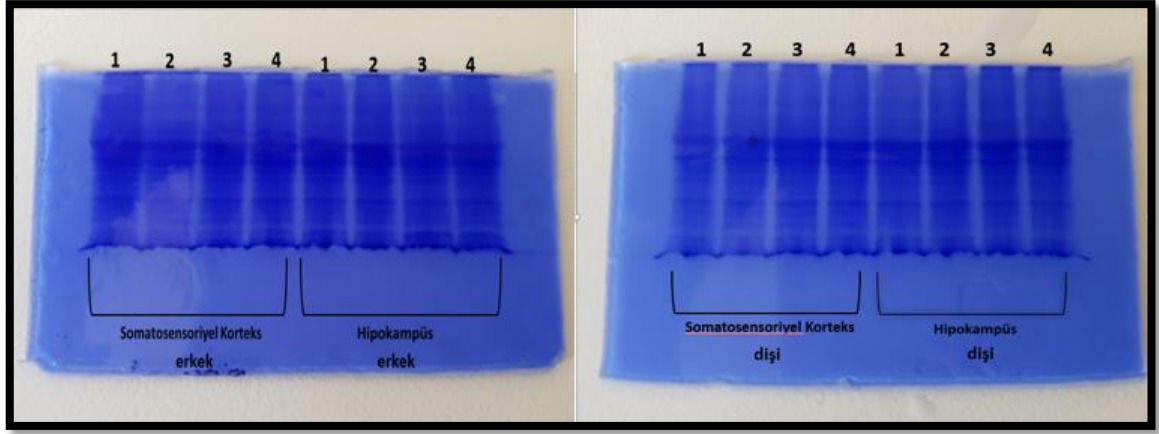
**Tablo 3.5.** Yükleme jelinin hazırlanması.

Reaktif maddeler	Kullanılan miktar
1 M Tris HCl (pH 6.8)	375 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	2088 $\mu$ l
% 30'luk akrilamid/bis-akrilamid karışımı	506 $\mu$ l
% 20'lik SDS	15 $\mu$ l
%10'luk APS (Taze hazırlanmalı)	15 $\mu$ l
TEMED	1.5 $\mu$ l



**Şekil 3.6.** Elektrofez ile jellerin yürütülmesi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jeller gece boyunca commasie blue ile muamele edildi (%1 Commasie brilliant blue R-250) ve boya çıkarma işleminin ardından şekil 3.7'de gösterilen jel görüntüleri, protein varlığı ve blotlamaya uygunluk açısından değerlendirildi. Dokuların protein yoğunluklarının Western Blot analizine uygun olduğu görüldü.



Şekil 3.7. Protein analizi sonucu elde edilen jel fotoğrafları.

### 3.6.3. Western Blot Protokolü

Örneklerin transferi için wattman kâğıtları ve PVDF membranı hazırlandı. PVDF 5.5 cm x 8.5 cm, wattman kâğıtları 7 cm x 9 cm olarak kesildi. Jel yürütülüp, membran metanol ile bir kez yıkandıktan sonra, üzerine önceden 1X'e indirilmiş metanol eklenmiş +4°C'de bekleyen transfer tampon çözeltisi eklenerek wattman kâğıtları da aynı şekilde ıslatıldı. Transfer tampon çözeltisi (10X); tris 58 gr, glisin 29 gr, SDS, 3.7 gr metanol, 200 ml su ile 1 L'ye tamamlandı.

Transfer işlemi transfer cihazında (Thermo Scientific, ABD) bulunan kayıtlı programlar kullanılarak 25V, 1.3A'da, 5-7 dk (protein büyüklüğüne bağlı olarak) süreyle gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığında membrana 2 saat %5 süt tozu ve %1 tween içeren PBS ortamında bloklama yapıldı (veya +4°C'de bir gece). Oda sıcaklığında 4 saat (tercihen +4°C de bir gece) primer antikor içeren bloklama tamponunda inkübe edildi. Primer antikor konsantrasyonu 1/1000 seyreltilerek hazırlandı ve uygulandı.

Antikor inkübasyonu bitince, 3 kez 15'er dakika 1X PBS-T ile yıkama işlemi yapıldı. 1 saat oda sıcaklığında 1/1000 sekonder antikor ile inkübe edildi.

Yine 3X 15 dk 1X PBS-T ile yıkama yapıldıktan sonra görüntü alındı (G.Box Chemi XRQ, Syngene, UK). Elde edilen görüntüler kullanılarak hedef protein yoğunlukları ile internal kontrol olarak seçilen  $\beta$ -aktin protein yoğunlukları (GeneTools (version 4.03.05, Syngene, UK) yazılımı kullanılarak kıyaslandı ve ATF4, ATF6, CHOP ve GRP78 (Santa Cruz, USA) rölatif ekspresyon seviyeleri belirlendi.

### 3.7. İmmünohistokimyasal Analiz

Perfüzyon-fiksasyon tekniği ile fikse edilen ve literatüre uygun şekilde çıkarılan sıçan beyinleri %10 tamponlu formalin fiksatifine kondu. 24-48 saat arasında +4 °C'de fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Süre sonunda üç değişim ikişer saat süre ile dokular fosfat tamponlu tuz çözeltisi (pH 7.4) ile yıkandı.

Makroskopik değerlendirme ile beyin dokusu hipokampus hedeflenerek örneklendi. Nöroanatomik işaretlere dayalı olarak beyin dokularına sekiz koronal düzlemde dokuz dilim elde etmek üzere hassas bir şekilde diseksiyon ve trim yapıldı. Özellikle sıçan beyinlerinde homolog beyin bölümleri elde etmek için gereken nöroanatomik bilginin yanı sıra ayırt edilebilen dış ve iç makroskopik yapılar referans noktaları olarak kullanıldı.

Şekil 3.8'deki gibi, fiksasyon sonrası diseksiyonu yapılan beyin dokuları 16 saatlik doku takip işlemine tabi tutuldu (Excelsior ES-Thermo doku takip cihazı). Dokulardan parafin blok oluşturma işlemi (Maxotech MX632 bloklama ünitesi) yapıldı. Şekil 3.9'da gösterildiği gibi, parafine gömülü dokulardan 4µ ölçüsünde kesildi (Leica tam otomatik RM 2255 mikrotom cihazı). Kesiti alınan beyin dokuları, rutin incelemede kullanılan hemotoksilen&eoziin (H&E) boya ile boyandı ve kapatılarak rutin preprasyon tamamlandı (Leica ST 5020 boyama-kapama cihazı).



Şekil 3.8. Beyin dokularından elde edilen koronal kesitlerin parafinle bloklanması.



**Şekil 3.9.** Parafine gömülü beyin dokularının mikrotom cihazıyla kesilmesi ve lama aktarılması.

Rutin H&E boyama protokolü deparafinizasyon basamağı 70 °C’de, cihaz fırın ünitesinde 16 dakika, sırayla üç istasyon ksilen basamağında toplam 12 dakika işlem yapılarak tamamlandı.

Hematoksilen boyama öncesi rehidratasyon işlemi, %96 oranında alkol ile başlanarak, düşen alkol dereceleri ile üç istasyonda toplam 9 dakika yapıldı. Kesitler boyama öncesi 1 dakika musluk suyunda bekledi. Mayer hematoksilen ile 13 dakika inkübe edildi. Mavileştirme basamağı, akan musluk suyu altında 3 dk süreyle yapıldı. Eozin solüsyonundan önce % 70 alkol istasyonunda 30 sn tutulan kesitler, 3 dk eozin boyasında tutuldu. Şekil 3.10’da görüldüğü gibi, üç istasyonla yükselen alkol derecelerinden ve ksilenden geçirilen kesitler, tam otomatik lamelle kapatılarak (Leica CV 5030 kapama cihazı) işlem tamamlandı.





**Şekil 3.10.** Lama aktarılan beyin dokusu kesitlerinin boyanma işlemi.

Somatosensoriyel korteks ve hipokampusun en iyi görüldüğü üçüncü ve dördüncü düzlemde çıkarılan beyin doku dilimleri (1-9 arası) seçilerek, immünohistokimyasal olarak incelenecek parametrelerin, seçili kesit seviyesinde H&E boyanma işlemi gerçekleştirildi. Pozitif şarjlı lam üzerine alınan doku kesitleri, ZO-1 (Polyclonal Antibody, katalog no: bs-1329R, Bioss Antibodies Inc, USA), okludin (anti-Okludin Polyclonal Antibody, katalog no: bs-1495R, Bioss Antibodies Inc, USA) ve GFAP (Polyclonal Anti-Glial Fibriler Asidik Protein, katalog no: GA52461-2CN, USA) proteinleriyle spesifik primer antikorlar çalışıldı.

Hedef proteinlerin işaretlenmesinde polimer HRP görüntüleme kiti (EnVision FLEX, High pH Link. HRP. Rabbit/Mouse. High pH, katalog no: K800021-2CN, USA) ve DAB kromojen kullanıldı. Boyama işlemi tam otomatik IHK cihazında (Dako Omnis otomatik boyama platformu) yapıldı.

Primer antikor süreleri 20 dakika, EDTA 20 dakika, polimer link (sekonder antikor) 30 dakika ve kromojen aşaması 30 dakika olarak uygulandı.

İncelemeye hazır preparatların boyama sonuçları (H&E, okludin, ZO-1, GFAP), ışık mikroskopunda (Olympus BX53, Japonya) değerlendirildi. Her üç parametre için protein ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile test grupları karşılaştırılarak, semikantitatif ölçüm şeklinde yapıldı ve istatistiksel analizi gerçekleştirildi. ZO-1 ve okludin boyamaları 4 derece şeklinde skorlandı. Derece 0: boyanma yok, derece 1: boyama şiddeti zayıf, derece 2: boyama şiddeti orta ve derece 3: boyama şiddeti güçlü. GFAP boyama

derecelendirmesi ise boyama şiddeti zayıf (derece 1) ve boyama şiddeti güçlü (derece 2) olarak iki kategoride değerlendirildi.

### **3.8. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analizlerde IBM SPSS Statistics Version 22.0 programı kullanıldı (253). Veriler ortanca (en küçük-en büyük), sayı (yüzde) şeklinde ifade edildi. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk testi ile yapıldı. Veriler normallik şartlarını sağlamadığından dolayı bağımsız örneklerde nitel veri analizi için Pearson Ki-Kare testi, nicel verilerin karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bağımlı grupların karşılaştırılmasında Wilcoxon testi uygulandı. İstatistiksel olarak elde edilen p değeri, 0.05'ten küçük ( $p < 0.05$ ) olduğu durumlarda anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Deney Hayvanlarında Spontan Nöbetlerin Değerlendirilmesi

Tablo 4.1’de deney hayvanlarında gruplar arası nöbet sayılarının değerlendirme sonuçları verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeye göre; kontrol grubuna kıyasla, ACA ve hidrokortizon grubunda nöbet sayısında anlamlı bir azalma olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). Özellikle ACA ile hidrokortizon grubu arasında yapılan değerlendirmede, ACA grubunda hidrokortizon grubuna kıyasla, nöbet sayılarında anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $p<0.05$ ). DMSO+PBS grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, DMSO+PBS grubuna göre de ACA ve hidrokortizon grubunda nöbet sayısında anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ( $p<0.05$ ). Dişi ve erkek sıçanlarda nöbet sayıları arasında cinsiyet anlamında bir farklılık görülmedi.

**Tablo 4.1.** Deney hayvanlarında izlenen spontan nöbet sayılarının gruplar arası değerlendirilmesi.

Gruplar	Spontan nöbet sayısı p değeri
Kontrol -DMSO+PBS	0.202
Kontrol-ACA	0.028
Kontrol-hidrokortizon	0.028
ACA-hidrokortizon	0.030
ACA- DMSO+PBS	0.028
Hidrokortizon- DMSO+PBS	0.028

( $p<0.05$  şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.)

## 4.2. Deney Hayvanlarının Tartım Sonuçlarının Değerlendirilmesi

### 4.2.1. Grup İçi Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Deney hayvanlarında haftada bir olacak şekilde, etkileri araştırılan maddelerin enjeksiyonları öncesi yapılan, ilk tartım olan 1. tartım ile etkileri araştırılan maddelerin enjeksiyonları sonrası yapılan ve en son tartım olan 5. tartım sonucunda elde edilen vücut ağırlıkları birbirleriyle kıyaslandı. Deney gruplarındaki dişi ve erkek sıçanların vücut ağırlıkları da kendi içinde karşılaştırılarak,  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tablo 4.2’de ve tablo 4.3’te yer alan istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre; dişi ve erkek sıçanlarda 1. ve 5. tartımlar arasında ve grup içi vücut ağırlıklarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

**Tablo 4.2.** WAG/Rij dişi ve erkek sıçanlara ait 1. ve 5. tartım sonuçları. Ortanca (en küçük-en büyük).

Gruplar	Dişi		Erkek	
	1.tartım	5.tartım	1.tartım	5.tartım
<b>Kontrol</b>	147 (130-183)	155 (135-184)	266 (214-281)	279 (224-301)
<b>DMSO+PBS</b>	156 (145-159)	162 (155-166)	261 (249-289)	256 (254-283)
<b>ACA</b>	177 (176-187)	189 (177-200)	292 (279-295)	323 (316-327)
<b>Hidrokortizon</b>	150 (137-158)	169 (158-200)	240 (217-260)	252 (233-271)

**Tablo 4.3.** WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların 1. ve 5. tartımlarından elde edilen vücut ağırlıklarının grup içi karşılaştırılması.

Gruplar	Dişi		Erkek	
	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri
<b>Kontrol</b>	-1.826	0.068	-1.826	0.068
<b>DMSO+PBS</b>	-1.841	0.068	-1.840	0.854
<b>ACA</b>	-1.826	0.068	-1.826	0.068
<b>Hidrokortizon</b>	-1.826	0.068	-1.826	0.068

( $p < 0.05$  şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.)

#### 4.2.2. Gruplar Arası Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Enjeksiyon öncesi yapılan ilk tartım ile enjeksiyon sonrası yapılan ve en son tartım olan 5.tartım esas alınarak, dişi ve erkek sıçanların vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırması yapıldı ve  $p<0.05$  değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 4.4'te gösterilen değerlendirme sonuçlarına göre; dişi sıçanların gruplar arası vücut ağırlıklarındaki artışlar karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark bulunmazken, ACA ve hidrokortizon grubundaki erkek sıçanlarda, kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ( $p<0.05$ ). Aynı şekilde hidrokortizon grubuna göre, ACA verilen gruptaki erkek sıçanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.4.** WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların gruplar arası vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.

Gruplar	Dişi		Erkek	
	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri
Kontrol-hidrokortizon	-1.732	0.083	-2.191	0.028
Kontrol-ACA	-0.583	0.561	-2.323	0.020
Kontrol -DMSO+PBS	-1.340	0.180	-1.155	0.248
Hidrokortizon-ACA	-1.162	0.245	-2.337	0.029
Hidrokortizon-DMSO+PBS	-1.023	0.306	-0.290	0.772
ACA- DMSO+PBS	0.000	1.000	-1.162	0.245

#### 4.3. Deney Hayvanlarının Grup İçi Yem Tüketimlerinin Değerlendirilmesi

WAG/Rij sıçanların enjeksiyon öncesi ve sonrası en son tükettikleri yem miktarları esas alınarak, gruplar kendi içinde, dişi ve erkek sıçanlar da ayrı ayrı değerlendirilip, tüketilen yem miktarları karşılaştırıldı ve  $p<0.05$  değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tablo 4.5'te ve tablo 4.6'da gösterilen değerlendirme

sonuçlarına göre; grupların kendi içinde ve dişi-erkek sıçan grupları arasında yem tüketimi değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Dişi-erkek sıçan grupları arasında ve grupların kendi içindeki yem tüketimi değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

**Tablo 4.5.** WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların grup içi yem tüketimlerinin karşılaştırılması. Ortanca (en küçük-en büyük).

Gruplar	Dişi		Erkek	
	enjeksiyon öncesi	enjeksiyon sonrası	enjeksiyon öncesi	enjeksiyon sonrası
<b>Kontrol</b>	40 (21-54)	42 (40-43)	55 (50-58)	52 (50-59)
<b>DMSO+PBS</b>	46 (23-60)	39 (34-45)	33 (22-43)	40 (28-50)
<b>ACA</b>	44 (20-66)	48 (43-54)	62 (57-67)	62 (60-65)
<b>Hidrokortizon</b>	40 (24-51)	49 (44-59)	60 (50-65)	54 (41-62)

**Tablo 4.6.** WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların grup içi yem tüketimlerinin karşılaştırılması.

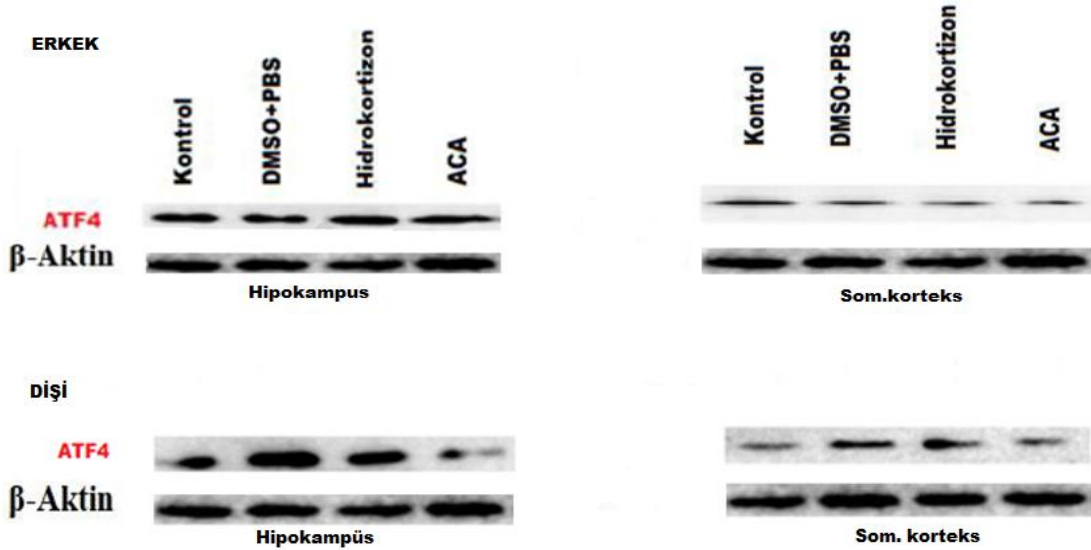
Gruplar	Dişi		Erkek	
	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri
<b>Kontrol (enjeksiyon öncesi- enjeksiyon sonrası)</b>	0.000	1.000	-1.633	0.102
<b>DMSO+PBS (enjeksiyon öncesi- enjeksiyon sonrası)</b>	-1.214	0.225	-0.405	0.686
<b>ACA (enjeksiyon öncesi- enjeksiyon sonrası)</b>	-0.405	0.686	0.000	1.000
<b>Hidrokortizon (enjeksiyon öncesi- enjeksiyon sonrası)</b>	-1.633	0.102	-0.944	0.345

#### 4.4. Deney Hayvanlarında Western Blot Yöntemi İle Elde Edilen ER Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

##### 4.4.1. ATF4 Western Blot Analizi Sonuçları

Şekil 4.1’de ATF4’e ait Western Blot jel görüntülerinde gösterildiği gibi; WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan hipokampus örneklerinde; absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, hidrokortizon ve ACA grubunda ATF4 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p<0.05$ ). Ayrıca ACA grubunda, hidrokortizon ve DMSO+PBS grubuna göre, ATF4 protein seviyesinde anlamlı bir düşüş olduğu bulundu ( $p=0.05$ ).

WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan somatosensoryel korteks örneklerinde; kontrol ve DMSO+PBS grubuna göre, ACA ve hidrokortizon grubunda ATF4 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ). Ancak hidrokortizon ve ACA grupları kıyaslandığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Tablo 4.8’de ATF4 protein seviyelerinin gruplar arası değerlendirme sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.1. WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoryel korteks ATF4 protein analizlerinin WB jel görüntüleri.

WAG/Rij dişi sıçanlardan alınan hipokampus örneklerinde; absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre; ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS grubunda ATF4 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı bulundu ( $p<0.05$ ). Hidrokortizon

grubunda, DMSO+PBS grubuna göre ATF4 protein seviyesi anlamlı bir azalma gösterdi (p=0.05). Aynı şekilde, ACA grubunda DMSO+PBS ve hidrokortizon grubuna göre ATF4 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı bulundu (p=0.05).

WAG/Rij dişi sıçanlardan alınan somatosensöriyel korteks örneklerinde; kontrol grubuna göre; hidrokortizon ve DMSO+PBS grubunda ATF4 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı görüldü (p<0.05). ACA grubunda, DMSO+PBS ve hidrokortizon grubuna göre ATF4 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı saptandı (p=0.05).

Her grubun kendi içinde dişi ve erkek sıçanları arasında yapılan karşılaştırmada, ATF4 protein seviyelerinde anlamlı bir fark görülmedi. Tablo 4.7’de erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel korteks ATF4/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel korteks ATF4/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri. Ortanca (en küçük-en büyük).

Gruplar	ERKEK		DİŞİ	
	Hipokampus	Somatosensöriyel korteks	Hipokampus	Somatosensöriyel korteks
<b>Kontrol</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>DMSO+PBS</b>	1.12 (0.98-1.16)	0.91 (0.85-1.02)	1.98 (1.87-2.07)	1.22 (1.14-1.34)
<b>ACA</b>	0.72 (0.67-0.75)	1.11 (1.08-1.30)	0.41 (0.36-0.47)	0.98 (0.86-1.06)
<b>Hidrokortizon</b>	1.11 (1.05-1.07)	1.01 (0.98-1.12)	0.68 (0.63-0.72)	1.23 (1.18-1.77)

Western Blot analizleri ATF4 için 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tekrar değerleri,  $\beta$ -aktin değerlerine oranlanmıştır.

**Tablo 4.8.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel kortekste ATF4 seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.

Gruplar	Hipokampus erkek		Som.korteks erkek		Hipokampus dişi		Som.korteks dişi	
	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri
<b>Kontrol-DMSO+PBS</b>	-0.686	0.487	-0.696	0.487	-2.087	0.037	-2.087	0.037
<b>Kontrol-hidr.</b>	-2.087	0.037	-0.696	0.487	-2.087	0.037	-2.087	0.037
<b>Kontrol-ACA</b>	-2.087	0.037	-2.087	0.037	-2.087	0.037	-0.696	0.487
<b>DMSO+PBS- hidr.</b>	-0.655	0.513	-1.091	0.275	-1.964	0.05	-0.655	0.513
<b>DMSO+PBS-ACA</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05
<b>Hidr.- ACA</b>	-1.964	0.05	-1.091	0.275	-1.964	0.05	-1.964	0.05

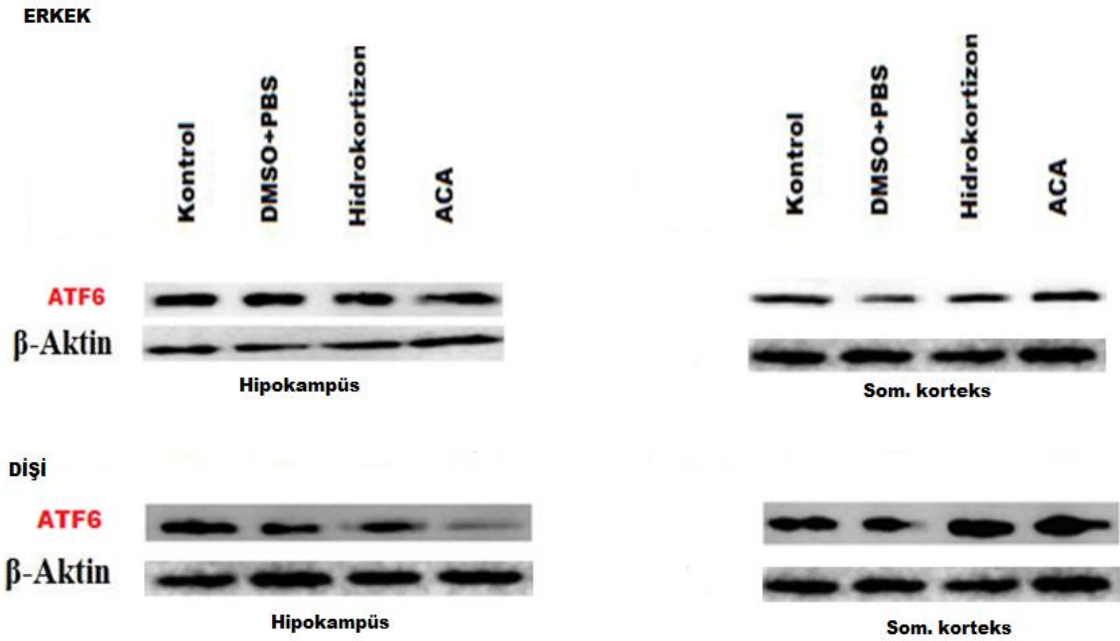
(p<0.05 ve p=0.05 şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.



#### 4.4.2. ATF6 Western Blot Analizi Sonuçları

Şekil 4.2’de ATF6’ya ait Western Blot jel görüntülerinde gösterildiği gibi; WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan hipokampus örneklerinde; absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, DMSO+PBS grubu arasında ATF6 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında; ACA ve hidrokortizon grubunda ATF6 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p<0.05$ ). Ayrıca DMSO+PBS grubuna göre, ACA ve hidrokortizon grubunda ATF6 protein seviyesinin anlamlı bir azalma gösterdiği saptandı ( $p=0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında, ACA grubunun ATF6 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı bulundu ( $p=0.05$ ).

WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan somatosensoriyel korteks örneklerinde; kontrol grubu ile kıyaslandığında DMSO+PBS grubunda ATF6 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu ile kıyaslandığında; ACA ve hidrokortizon grubunda ATF6 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ). Ayrıca DMSO+PBS grubuna göre, ACA ve hidrokortizon grubunda ATF6 protein seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu ( $p=0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında, ACA grubunun ATF6 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p=0.05$ ). Tablo 4.10’da ATF6 protein seviyelerinin gruplar arası değerlendirme sonuçları gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampüs ve somatosensoriyel korteks ATF6 protein analizlerinin WB jel görüntüleri.

WAG/Rij dişi sıçanlardan alınan hipokampüs örneklerinde absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna kıyasla; ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS grupları arasında ATF6 protein seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ( $p < 0.05$ ). DMSO+PBS grubu ile kıyaslandığında; ACA ve hidrokortizon gruplarında ATF6 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p = 0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile ACA grubu birbirleri ile kıyaslandığında, ACA grubunda hidrokortizon grubuna göre ATF6 protein seviyeleri bakımından anlamlı bir azalma görüldü ( $p < 0.05$ ).

WAG/Rij dişi sıçanlardan alınan somatosensoriyel korteks örneklerinde; kontrol grubuna kıyasla; ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS grupları arasında ATF6 protein seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ( $p < 0.05$ ). DMSO+PBS grubu ile kıyaslandığında; ACA ve hidrokortizon gruplarında ATF6 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p = 0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile ACA grubu birbirleri ile kıyaslandığında, ACA grubunda hidrokortizon grubuna göre ATF6 protein seviyeleri bakımından anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Her grubun kendi içinde dişi ve erkek sıçanları arasında yapılan karşılaştırmada, ATF6 protein seviyelerinde anlamlı bir fark saptanmadı. Tablo 4.9'da erkek ve dişi

sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel korteks ATF6/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri gösterilmiştir.

**Tablo 4.9.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel korteks ATF6/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri. Ortanca (en küçük-en büyük).

Gruplar	ERKEK		DİŞİ	
	Hipokampus	Somatosensöriyel korteks	Hipokampus	Somatosensöriyel korteks
<b>Kontrol</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>DMSO+PBS</b>	1.16 (0.99-1.17)	0.69 (0.77-0.95)	0.88 (0.78-0.93)	0.64 (0.62-0.72)
<b>ACA</b>	0.64 (0.59-0.67)	3.73 (3.65-4.2)	0.37 (0.25-0.53)	1.96 (1.68-2.01)
<b>Hidro kortizon</b>	0.76 (0.73-0.8)	1.26 (1.19-1.36)	0.58 (0.43-0.66)	1.61 (1.51-1.73)

Western Blot analizleri ATF6 için 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tekrar değerleri,  $\beta$ -aktin değerine oranlanmıştır.

**Tablo 4.10.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel kortekste ATF6 seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.

Gruplar	Hipokampus erkek		Som.korteks erkek		Hipokampus dişi		Som.korteks dişi	
	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri
<b>Kontrol-DMSO+PBS</b>	-0.696	0.487	2.087	0.037	-2.087	0.037	-2.087	0.037
<b>Kontrol-hidr.</b>	-2.087	0.037	2.087	0.037	-2.087	0.037	-2.087	0.037
<b>Kontrol-ACA</b>	-2.087	0.037	2.087	0.037	-2.087	0.037	-2.087	0.037
<b>DMSO+PBS- hydr.</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05
<b>DMSO+PBS-ACA</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05
<b>Hidr.- ACA</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.528	0.037	-1.528	0.127

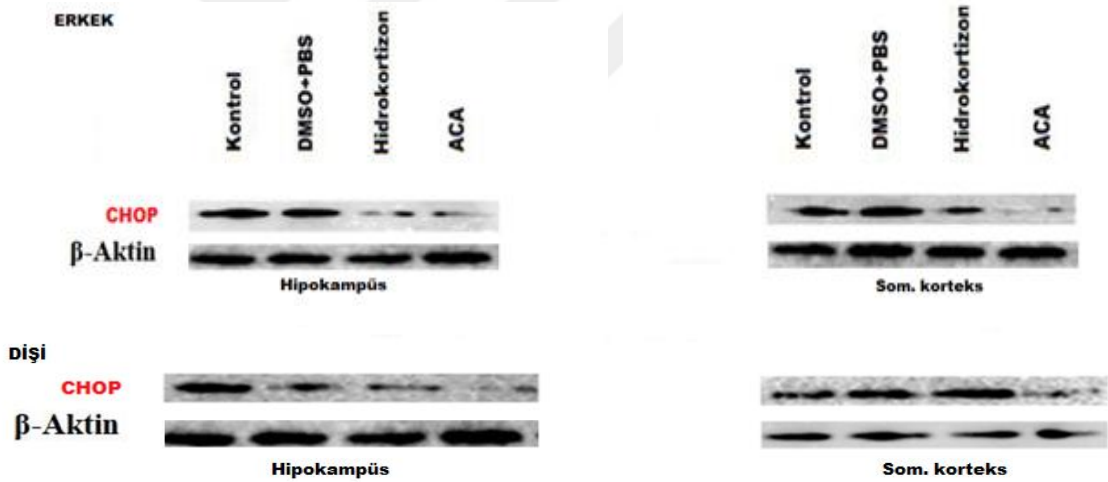
( $p < 0.05$  ve  $p = 0.05$  şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.)

#### 4.4.3. CHOP Western Blot Analizi Sonuçları

Şekil 4.3'te CHOP'a ait Western Blot jel görüntülerinde gösterildiği gibi; WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan hipokampus örneklerinde; absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, DMSO+PBS grubu arasında CHOP protein

seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol grubu ile DMSO+PBS grubuna göre kıyaslandığında; ACA ve hidrokortizon grubunda CHOP protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ). Ayrıca, ACA ve hidrokortizon grubunda CHOP protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı bulundu Hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında, ACA grubunun CHOP protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p=0.05$ ).

WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan somatosensoryel korteks örneklerinde; kontrol grubu ile kıyaslandığında DMSO+PBS grubunda CHOP protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ACA ve hidrokortizon grubunda ise kontrol ile DMSO+PBS grubuna göre, CHOP protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı bulundu ( $p<0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında, ACA grubunun CHOP protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı bulundu ( $p<0.05$ ). Tablo 4.12’de CHOP protein seviyelerinin gruplar arası değerlendirme sonuçları gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoryel korteks CHOP protein analizlerinin WB jel görüntüleri.

WAG/Rij dişi sıçanlardan alınan hipokampus örneklerinde kontrol grubuna kıyasla; ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS grupları arasında CHOP protein seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). DMSO+PBS grubu ile kıyaslandığında; ACA ve hidrokortizon gruplarında CHOP protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile ACA grubu birbirleri

ile kıyaslandığında, ACA grubunda hidrokortizon grubuna göre CHOP protein seviyeleri bakımından anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p=0.05$ ).

WAG/Rij dişi sıçanlardan alınan somatosensöriyel korteks örneklerinde; kontrol grubuna kıyasla; DMSO+PBS grubu arasında CHOP protein seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. DMSO+PBS grubu ile kıyaslandığında; ACA grubunda CHOP protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ) ancak DMSO+PBS grubu ile hidrokortizon grubu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Hidrokortizon grubu ile ACA grubu birbirleri ile kıyaslandığında, ACA grubunda hidrokortizon grubuna göre CHOP protein seviyeleri bakımından anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $p<0.05$ ).

Tablo 4.11’de erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel korteks CHOP/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri gösterilmiştir. Her grubun kendi içinde dişi ve erkek sıçanları arasında yapılan karşılaştırmada, CHOP protein seviyelerinde anlamlı bir fark saptanmadı.

**Tablo 4.11.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel korteks CHOP/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri. Ortanca (en küçük-en büyük).

Gruplar	ERKEK		DİŞİ	
	Hipokampus	Somatosensöriyel korteks	Hipokampus	Somatosensöriyel korteks
<b>Kontrol</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>DMSO+PBS</b>	0.99 (0.98-1.09)	1.68 (1.59-1.75)	0.63 (0.50-0.71)	1.12 (1.08-1.17)
<b>ACA</b>	0.10 (0.09-0.13)	0.57 (0.53-0.61)	0.27 (0.23-0.33)	0.37 (0.28-0.43)
<b>Hidrokortizon</b>	0.27 (0.24-0.31)	0.96 (0.95-0.99)	0.51 (0.48-0.56)	0.71 (0.66-0.78)

Western Blot analizleri ATF6 için 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tekrar değerleri,  $\beta$ -aktin değerine oranlanmıştır.

**Tablo 4.12.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampüs ve somatosensoriyel korteksteki CHOP seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.

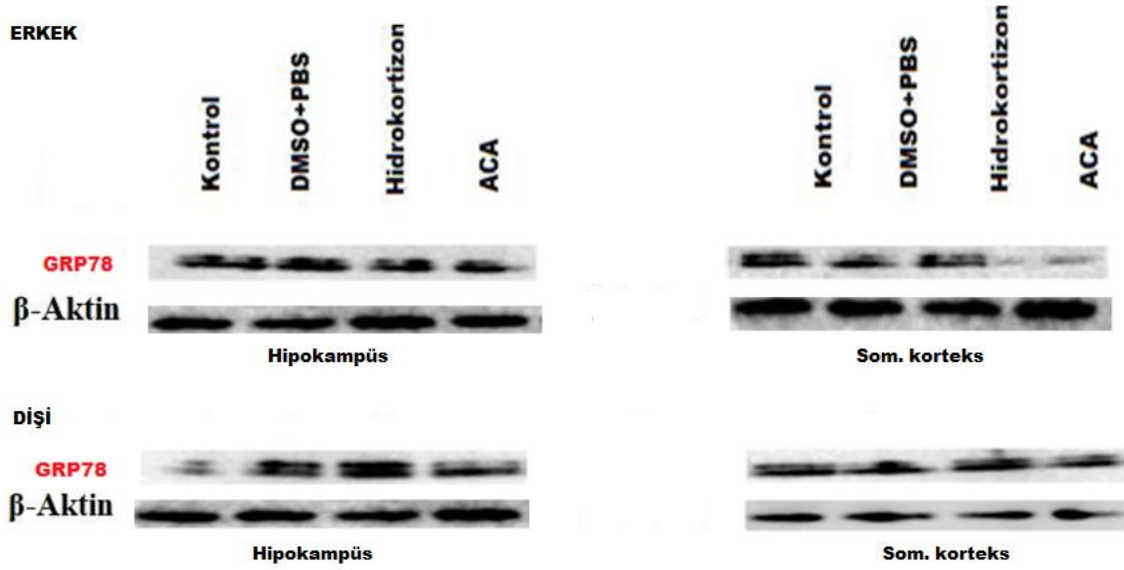
Gruplar	Hipokampüs erkek		Som.korteks erkek		Hipokampüs dişi		Som.korteks dişi	
	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri
<b>Kontrol-DMSO+PBS</b>	-0.696	0.487	2.087	0.127	-2.087	0.037	-2.087	0.127
<b>Kontrol-hidr.</b>	-2.087	0.037	2.087	0.037	-2.087	0.037	-2.087	0.037
<b>Kontrol-ACA</b>	-2.087	0.037	2.087	0.037	-2.087	0.037	-2.087	0.037
<b>DMSO+PBS- hidr.</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.091	0.037	-1.964	0.127
<b>DMSO+PBS-ACA</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.037	-1.964	0.037
<b>Hidr.- ACA</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.037	-1.964	0.05	-1.964	0.037

( $p < 0.05$  ve  $p = 0.05$  şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.)

#### 4.4.4. GRP78 Western Blot Analizi Sonuçları

Şekil 4.4'te GRP78'e ait Western Blot jel görüntülerinde gösterildiği gibi; WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan hipokampüs örneklerinde; absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, DMSO+PBS ile hidrokortizon grubu arasında GRP78 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında; ACA grubunda GRP78 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p < 0.05$ ). Ayrıca DMSO+PBS grubuna göre, ACA ve hidrokortizon grubunda GRP78 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı bulundu ( $p = 0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında, ACA grubunun GRP78 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p < 0.05$ ).

WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan somatosensoriyel korteks örneklerinde; kontrol grubu ile kıyaslandığında ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS gruplarında GRP78 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ( $p < 0.05$ ). Ayrıca DMSO+PBS grubuna göre, ACA ve hidrokortizon grubunda GRP78 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p = 0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında, ACA grubunun GRP78 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.4.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoryel korteks GRP78 protein analizlerinin WB jel görüntüleri.

WAG/Rij dişi sıçanlardan alınan hipokampus örneklerinde ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS gruplarına kıyasla; kontrol grubunda GRP78 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ( $p < 0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında; ACA ve DMSO+PBS grubunda GRP78 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p = 0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile ACA grubu birbirleri ile kıyaslandığında, ACA grubunda hidrokortizon grubuna göre GRP78 protein seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ).

WAG/Rij dişi sıçanlardan alınan somatosensoryel korteks örneklerinde; kontrol grubuna kıyasla; ACA ve DMSO+PBS grubunda GRP78 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunurken ( $p < 0.05$ ), ancak kontrol ve hidrokortizon grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. DMSO+PBS grubu, ACA ve hidrokortizon grupları ile kıyaslandığında; GRP78 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı bulundu ( $p = 0.05$ ). Hidrokortizon grubu ile ACA grubu birbirleri ile kıyaslandığında, ACA grubunda hidrokortizon grubuna göre GRP78 protein seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ). Tablo 4.13'te erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensoryel korteks GRP78/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri gösterilmiştir. Her grubun kendi içinde dişi ve erkek sıçanları arasında yapılan karşılaştırmada, GRP78 protein seviyelerinde anlamlı bir fark saptanmadı. Tablo 4.14'te GRP78 protein seviyelerinin gruplar arası değerlendirme sonuçları gösterilmiştir.

**Tablo 4.13.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel korteks GRP78/ $\beta$ -aktin protein seviyeleri. Ortanca (en küçük-en büyük).

Gruplar	ERKEK		DİŞİ	
	Hipokampus	Somatosensöriyel korteks	Hipokampus	Somatosensöriyel korteks
<b>Kontrol</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>DMSO+PBS</b>	1.35 (1.31-1.42)	1.10 (1.01-1.13)	1.25 (1.23-1.28)	1.08 (0.96-1.13)
<b>ACA</b>	0.01 (0.93-1.07)	0.57 (0.52-0.60)	1.09 (1.06-1.12)	0.71 (0.69-0.73)
<b>Hidro kortizon</b>	1.07 (0.99-1.11)	1.78 (1.69-1.86)	1.10 (1.02-1.11)	1.26 (1.21-1.38)

Western Blot analizleri ATF6 için 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tekrar değerleri,  $\beta$ -aktin değerine oranlanmıştır.

**Tablo 4.14.** WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlarda hipokampus ve somatosensöriyel kortekste GRP78 seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.

Gruplar	Hipokampus erkek		Som.korteks erkek		Hipokampus dişi		Som.korteks dişi	
	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri	z değeri	p değeri
<b>Kontrol-DMSO+PBS</b>	-2.087	0.487	2.087	0.037	-2.087	0.037	-0.696	0.037
<b>Kontrol-hidr.</b>	-0.696	0.487	2.087	0.037	-2.087	0.037	-2.087	0.487
<b>Kontrol-ACA</b>	-0.696	0.037	2.087	0.037	-2.087	0.037	-2.087	0.037
<b>DMSO+PBS- hidr.</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05
<b>DMSO+PBS-ACA</b>	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05	-1.964	0.05
<b>Hidr.- ACA</b>	-0.886	0.037	-1.964	0.037	-0.218	0.037	-1.964	0.037

( $p < 0.05$  ve  $p = 0.05$  şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.

#### 4.5. Deney Hayvanlarında İmmünohistokimyasal Analizler Sonucu Elde Edilen Kan-Beyin Bariyeri Belirteçlerinin Değerlendirilmesi

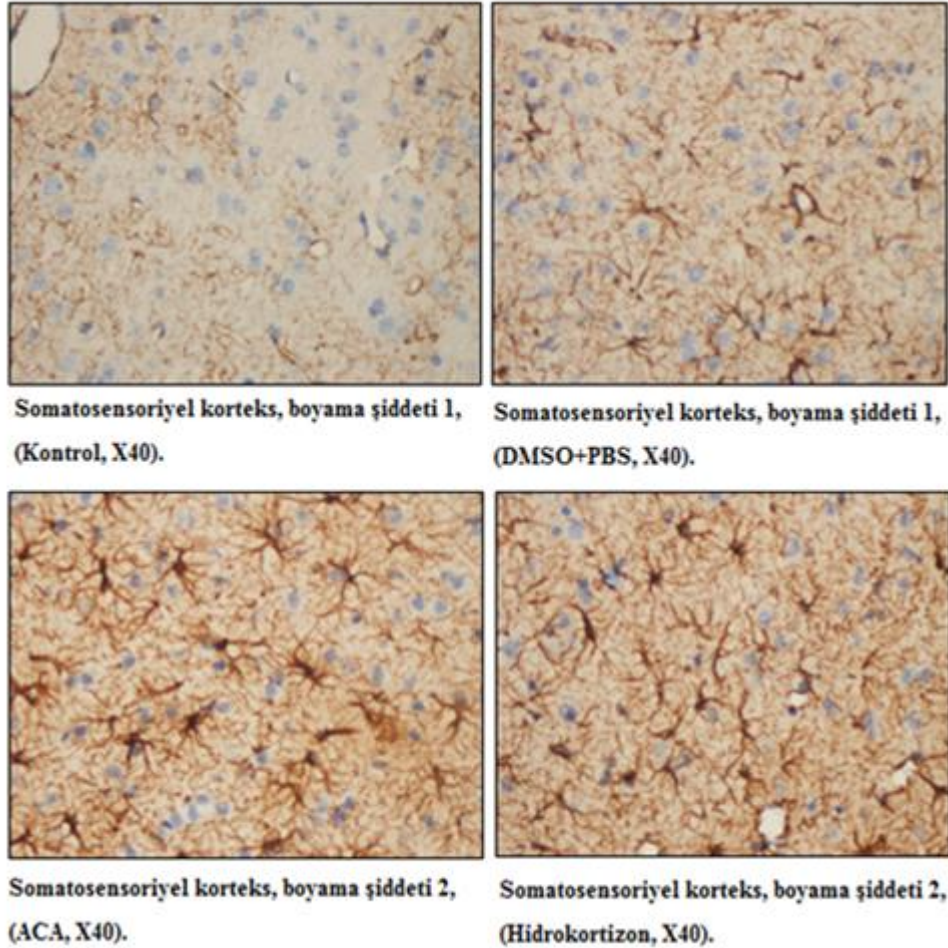
Yapılan histolojik incelemelerde, mikroskopik olarak hipokampus alt bölgeleri cornu amnois (CA alanları) ve dental girus granüler hücrelerinin normal görünümde olduğu görüldü. Piramidal tabakada yer alan nöronların da normal morfolojik özelliklere sahip olduğu izlendi. Bu nöronlar yuvarlak, büyük ve ökromatik nükleuslara sahipti.



Somatosensoriyel korteks endotelial hücre tabakalarında da normal bir görünüm olduğu tespit edildi.

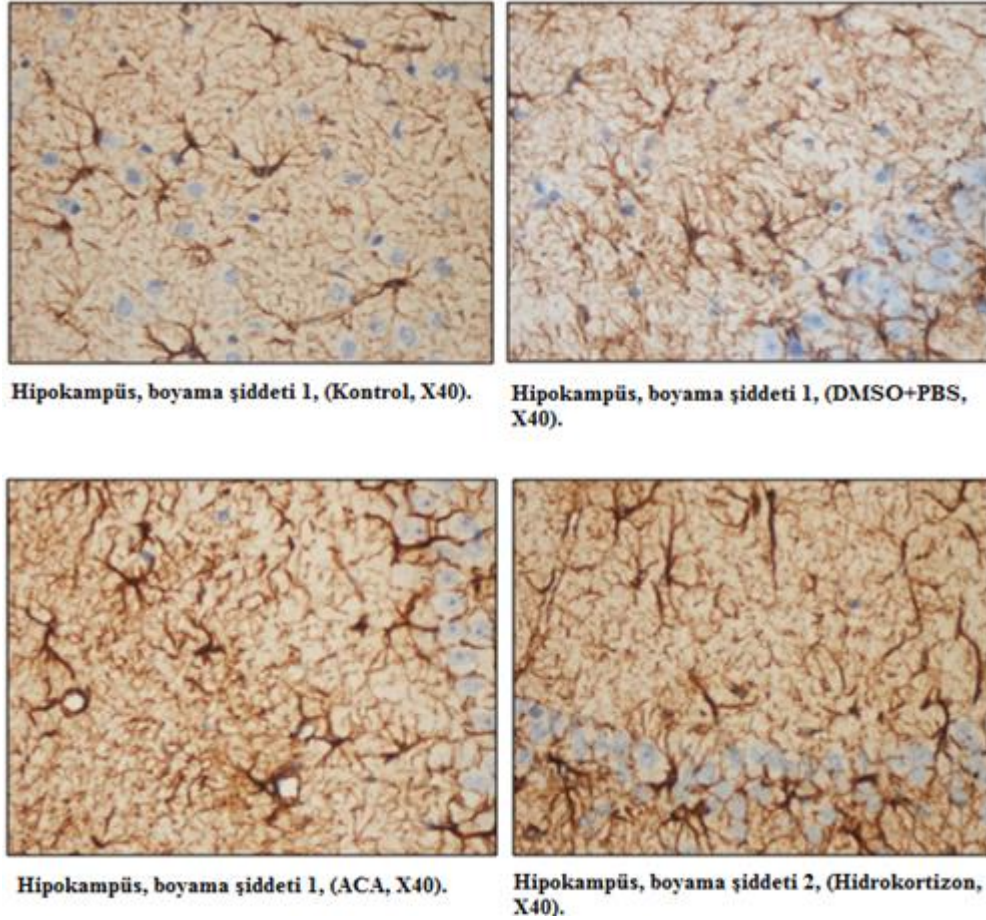
#### 4.5.1. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) Düzeyinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Şekil 4.5'te gösterildiği gibi, immünohistokimyasal boyamalardan elde edilen mikroskop görüntüleri incelendiğinde, ACA ve hidrokortizon grubundaki sıçanlardan alınan kesitlerde, somatosensoriyel korteks alanında GFAP'ın, kontrol grubu ve DMSO+PBS gruplarına göre göreceli olarak daha yüksek düzeyde eksprese edildiği izlenimi edinildi.



**Şekil 4.5.** Tüm gruplara ait somatosensoriyel korteks kesitlerinde GFAP boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri.

GFAP açısından somatosensoriyel kortekste boyanma şiddetinin, kontrol grubuna kıyasla, ACA ve hidrokortizon grubunda istatistiksel olarak daha yüksek düzeyde olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). ACA ile hidrokortizon gruplarının boyanma şiddetleri karşılaştırıldığında, aynı şekilde ACA grubunda boyanan glial hücre sayısında epileptik nöbetlere bağlı hasarı azalttığı tespit edildi ( $p<0.05$ ). Ayrıca DMSO+PBS grubuna kıyasla, ACA ile hidrokortizon grubunda somatosensoriyel korteks alanında glial hücrelerin boyanma şiddetinde de istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Şekil 4.6’da gösterildiği gibi, immünohistokimyasal boyamalarla elde edilen mikroskop görüntüleri incelendiğinde, hidrokortizon grubundaki sıçanlardan alınan kesitlerde hipokampal alanda GFAP’ın, kontrol gruplarına göre göreceli olarak daha yüksek düzeyde eksprese edildiği izlenimi edinildi.



**Şekil 4.6.** Tüm gruplara ait hipokampüs kesitlerinde GFAP boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri.

GFAP açısından hipokampüste boyanma şiddeti, kontrol grubuna kıyasla, hidrokortizon grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulundu

( $p < 0.05$ ). Diğer gruplar arasında hipokampal alandaki boyanma şiddetlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Tablo 4.15'te somatosensoriyel korteks ve hipokampüste GFAP boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları verilmiştir.

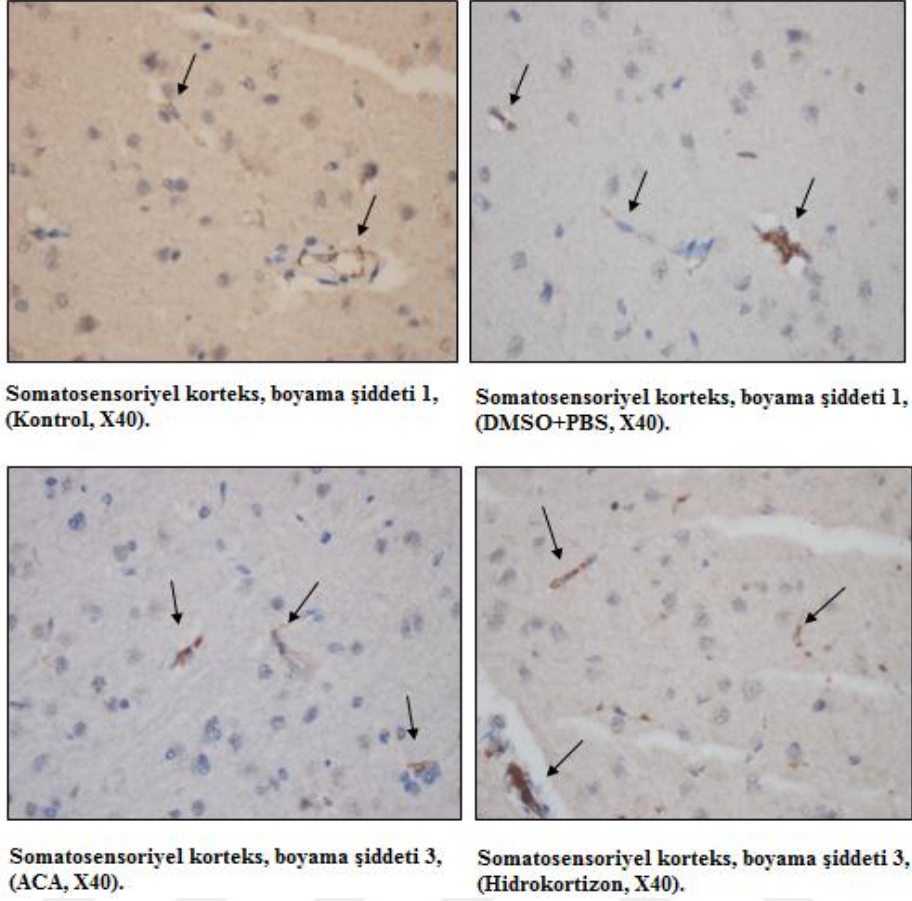
**Tablo 4.15.** GFAP ile boyanmış somatosensoriyel korteks ve hipokampus koronal kesit örneklerinin boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırılması.

Gruplar	Som.korteks	Hipokampus
	p değeri	p değeri
Kontrol -DMSO+PBS	0.102	0.285
Kontrol-ACA	0.028	0.102
Kontrol-hidro kortizon	0.028	0.028
ACA-hidro kortizon	0.028	0.465
ACA- DMSO+PBS	0.028	0.465
Hidro kortizon-DMSO+PBS	0.028	0.157

( $p < 0.05$  şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.)

#### 4.5.2. Zonula Okludens-1 (ZO-1) Düzeyinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

ZO-1, KBB'de yer alan ve destek görevi gören sıkı bağlantı proteinlerinden biridir. Şekil 4.7'de gösterildiği gibi, immünohistokimyasal boyamalardan elde edilen mikroskopik görüntülerde, kontrol ile DMSO+PBS grubunun somatosensoriyel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, ACA ve hidro kortizon gruplarına göre ZO-1 proteinlerinin daha düşük düzeyde eksprese edildiği izlenimi edinildi.



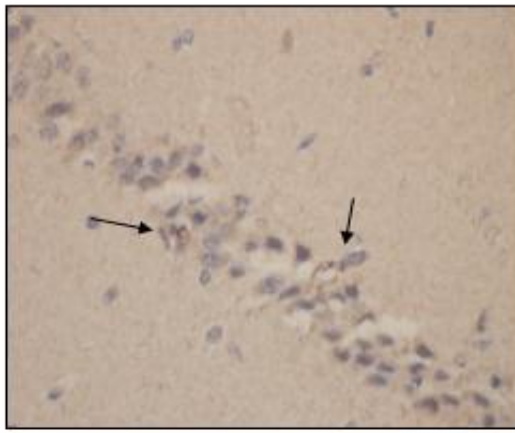
**Şekil 4.7.** Tüm gruplara ait somatosensoryyel korteks kesitlerinde ZO-1 boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri. (Boyalı olan damar endotel hücreleri ok işareti ile gösterilmiştir.).

Kontrol grubuna kıyasla, ACA ve hidrokortizon grubunda ZO-1 proteinleri açısından somatosensoryyel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin güçlü olduğu (boyama şiddeti 3) ve grupların aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubu ile DMSO+PBS grubunda ZO-1 proteinleri açısından somatosensoryyel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetinin zayıf olduğu bulundu (boyama şiddeti 1) ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

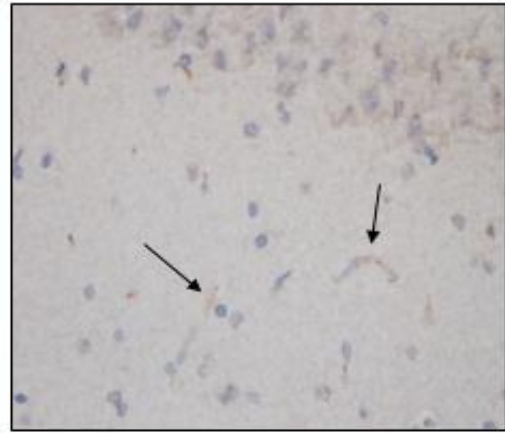
ACA ile hidrokortizon grubunda ZO-1 proteinleri açısından somatosensoryyel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetinin güçlü olduğu ve aynı şiddette olduğu bulundu (boyama şiddeti 3). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ACA ile hidrokortizon gruplarına kıyasla, DMSO+PBS grubunda ZO-1 proteinleri açısından somatosensoryyel kortekste yer alan damar endotel

hücrelerinde, boyama şiddetinin zayıf olduğu (boyama şiddeti 1) ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).

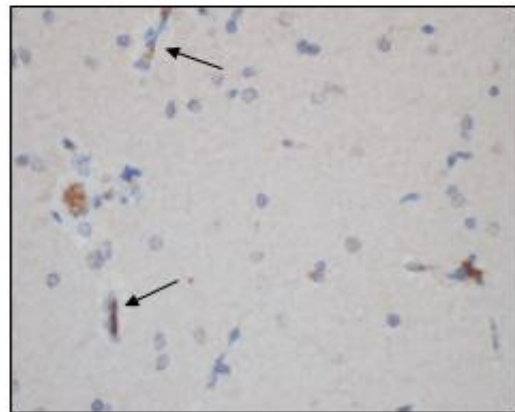
Şekil 4.8’de gösterildiği gibi, immünohistokimyasal boyamalar sonucu elde edilen, mikroskopik görüntüler incelendiğinde; hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, ZO-1 protein seviyesi bakımından kontrol ve DMSO+PBS gruplarının boyanma şiddetinin zayıf (boyama şiddeti 1) olduğu saptandı. ACA grubunda boyanma şiddetinin orta şiddette (boyama şiddeti 2) ve hidrokortizon grubunun boyanma şiddetinin ise güçlü (boyama şiddeti 3) olduğu görülmektedir.



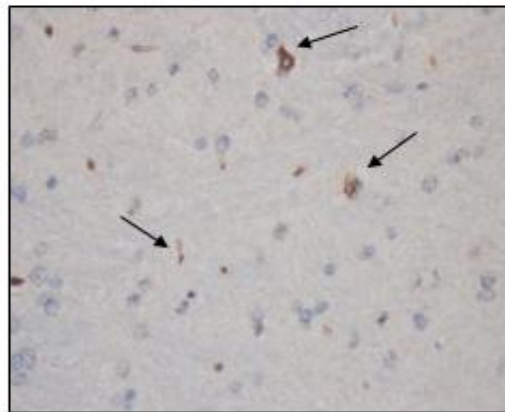
Hipokampüs, boyama şiddeti 1, (Kontrol, X40).



Hipokampüs, boyama şiddeti 1, (DMSO+PBS, X40).



Hipokampüs, boyama şiddeti 2, (ACA, X40).



Hipokampüs, boyama şiddeti 3, (Hidrokortizon, X40).

**Şekil 4.8.** Tüm gruplara ait hipokampüs kesitlerinde ZO-1 boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri. (Boyalı olan damar endotel hücreleri ok işareti ile gösterilmiştir.).

Kontrol grubuna kıyasla, ACA grubunda ZO-1 proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin orta şiddette olduğu (boyama şiddeti 2) ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ( $p=0.05$ ). Kontrol grubuna kıyasla, hidrokortizon grubunda ZO-1 proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetinin güçlü olduğu (boyama şiddeti 3) ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu ve DMSO+PBS grubunda ZO-1 proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetinin zayıf olduğu (boyama şiddeti 1) ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

ACA grubunda, hidrokortizon grubuna göre, ZO-1 proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetinin daha zayıf olduğu bulundu (boyama şiddeti 2). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ( $p=0.05$ ). Tablo 4.16'da somatosensoriyel korteks ve hipokampüste ZO-1 boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları verilmiştir.

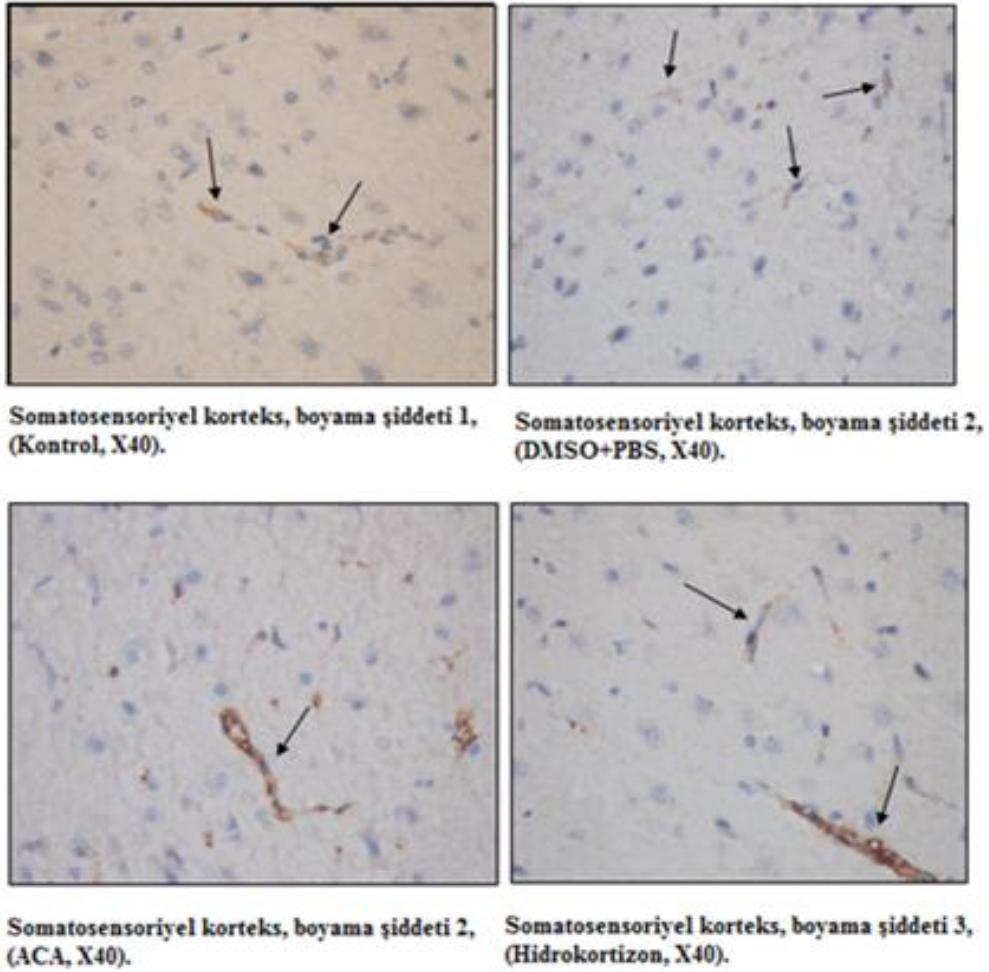
**Tablo 4.16.** ZO-1 ile boyanmış somatosensoriyel korteks ve hipokampus koronal kesit örneklerinin boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırılması.

Gruplar	Som.korteks	Hipokampus
	p değeri	p değeri
<b>Kontrol -DMSO+PBS</b>	0.202	0.465
<b>Kontrol-ACA</b>	0.028	0.05
<b>Kontrol-hidrokortizon</b>	0.028	0.028
<b>ACA-hidrokortizon</b>	1.000	0.05
<b>ACA- DMSO+PBS</b>	0.028	0.05
<b>Hidrokortizon-DMSO+PBS</b>	0.028	0.028

( $p<0.05$  ve  $p=0.05$  şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.)

### 4.5.3. Okludin Düzeyinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Okludin; KBB’de ilk keşfedilen ve destek görevi gören sıkı bağlantı proteindir. Şekil 4.9’da gösterildiği gibi, immünohistokimyasal boyamalardan elde edilen mikroskopik görüntüler incelendiğinde; kontrol grubunun okludin proteinleri açısından somatosensoriyel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin zayıf (boyama şiddeti 1) olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 4.9.** Tüm gruplara ait somatosensoriyel korteks kesitlerinde okludin boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri. (Boyalı olan damar endotel hücreleri ok işareti ile gösterilmiştir.).

Kontrol grubuna kıyasla, ACA grubunda okludin proteinleri açısından somatosensoriyel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin orta şiddette olduğu (boyama şiddeti 2) ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu ( $p=0.05$ ). Kontrol grubuna kıyasla, hidrokortizon grubunda okludin

proteinleri açısından somatosensoryel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin güçlü olduğu (boyama şiddeti 3) ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Kontrol grubuna kıyasla, DMSO+PBS grubunda okludin proteinleri açısından somatosensoryel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin orta şiddette olduğu (boyama şiddeti 2) ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ( $p=0.05$ ). ACA grubunda okludin proteinleri açısından somatosensoryel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin hidrokortizon grubuna göre daha düşük olduğu ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu ( $p=0.05$ ). ACA ile DMSO+PBS grubunda okludin proteinleri açısından somatosensoryel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin orta şiddette olduğu bulundu (boyama şiddeti 2) ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Hidrokortizon grubu DMSO+PBS grubu ile kıyaslandığında, hidrokortizon grubunun okludin proteinleri açısından somatosensoryel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin daha güçlü olduğu bulundu. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ( $p=0.05$ ).

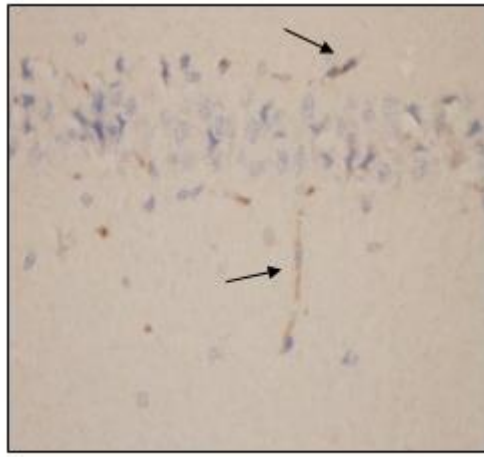
Şekil 4.10'da gösterildiği gibi, immünohistokimyasal boyamalar sonucu elde edilen mikroskopik görüntüler incelendiğinde; okludin proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, kontrol ve DMSO+PBS grubunun boyanma şiddetinin zayıf (boyama şiddeti 1) olduğu görüldü. ACA grubunun boyanma şiddetinin orta şiddette (boyama şiddeti 2) ve hidrokortizon grubunun boyanma şiddetinin de yüksek şiddette (boyama şiddeti 3) olduğu saptandı. Kontrol grubuna kıyasla, ACA grubunda okludin proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin orta şiddette olduğu (boyama şiddeti 2) ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ( $p=0.05$ ).

Hidrokortizon grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında, okludin proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin güçlü olduğu (boyama şiddeti 3) ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu ve DMSO+PBS grubunda okludin proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin zayıf olduğu bulundu (boyama şiddeti 1) ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ACA grubunda, hidrokortizon grubuna göre, okludin proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin daha zayıf olduğu (boyama şiddeti 2) görüldü ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu

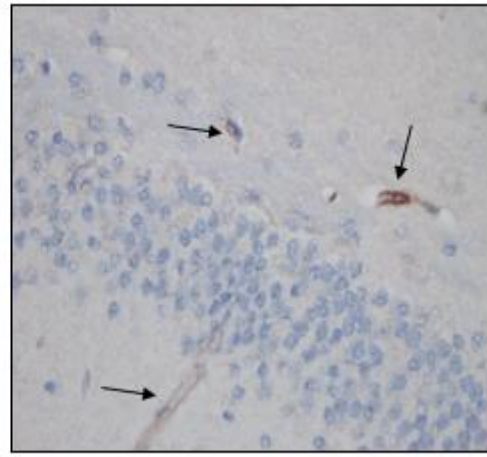


saptandı ( $p=0.05$ ). ACA grubunda, DMSO+PBS grubuna göre okludin proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin daha güçlü olduğu (boyama şiddeti 2) ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ( $p=0.05$ ).

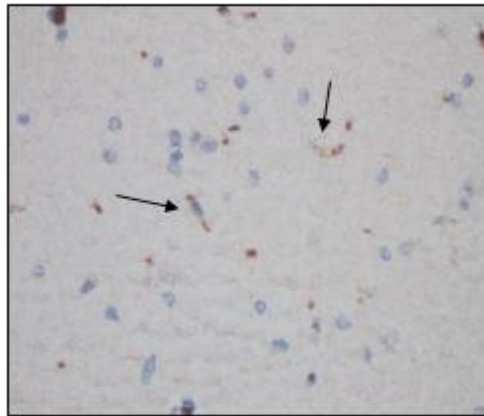
Hidrokortizon grubunda, DMSO+PBS grubuna göre okludin proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin daha güçlü olduğu (boyama şiddeti 3) ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ( $p<0.05$ ). Tablo 4.17’de somatosensoriyel korteks ve hipokampüste okludin boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları verilmiştir.



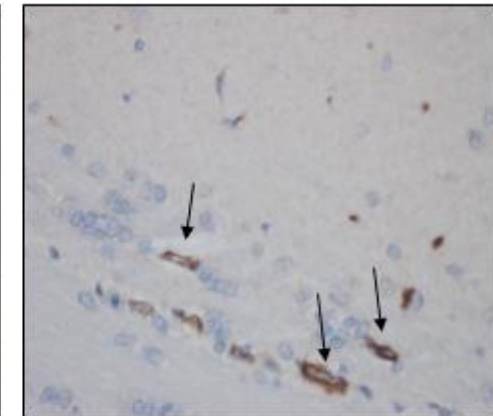
Hipokampüs, boyama şiddeti 1, (Kontrol, X40).



Hipokampüs, boyama şiddeti 1, (DMSO+PBS, X40).



Hipokampüs, boyama şiddeti 2, (ACA, X40).



Hipokampüs, boyama şiddeti 3, (Hidrokortizon, X40).

**Şekil 4.10.** Tüm gruplara ait hipokampüs kesitlerinde okludin boyama şiddetlerinin gösterildiği mikroskop görüntüleri. (Boyalı olan damar endotel hücreleri ok işareti ile gösterilmiştir.).

**Tablo 4.17.** Okludin ile boyanmış somatosensoriyel korteks ve hipokampus koronal kesit örneklerinin boyanma derecelerinin gruplar arası karşılaştırılması.

Gruplar	Som.korteks	Hipokampus
	p değeri	p değeri
<b>Kontrol-DMSO+PBS</b>	0.05	0.285
<b>Kontrol-hidro Kortizon</b>	0.028	0.028
<b>Kontrol-ACA</b>	0.05	0.05
<b>ACA-hidro Kortizon</b>	0.05	0.05
<b>ACA- DMSO+PBS</b>	0.202	0.05
<b>Hidro Kortizon-DMSO+PBS</b>	0.05	0.018

( $p < 0.05$  ve  $p = 0.05$  şeklinde gösterilen gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.)

## 5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızdaki öncelikli hedeflerden biri, daha önce nöroprotektif etkinliği olduğu çeşitli çalışmalarda vurgulanan ve TRPM2 kanalları ile fosfolipaz 2 enzimi blokörü şeklinde tanımlanan ACA'nın absans epilepsi nöbetleri üzerine koruyucu etkinliği olup olmadığını araştırmaktır. Aynı zamanda ACA'nın apoptozis ve oksidatif stres üzerine iyileştirici etkileri gibi bilinen etkileri dışında, absans epileptik nöbetler sonucunda meydana gelen endoplazmik retikulum strese ve beraberinde gelişen kan-beyin bariyerindeki bozulmalara nasıl etki ettiğini ortaya koymaktır.

Çalışmamızda ayrıca beyinde çeşitli alanlarda nörosteroid olarak görev yapan, antikonvülsan olarak epilepsi tedavisinde kullanılan hidrokortizonun etki düzeyleri de, ACA ile karşılaştırmalı olarak ele alınmıştır. Hidrokortizonun vücutta çok sayıda yan etkisi olması sebebiyle onun yerine, ACA'nın alternatif bir ajan olarak kullanılıp kullanılamayacağı da araştırılan diğer bir unsurdur. Özellikle nörodejenerasyonu azaltıcı etkinliği saptanmış olan ACA'nın, absans epilepside en çok etkilenen beyin bölgeleri olan hipokampus ve somatosensoriyel korteks alanında nöroprotektif etkinliği olup olmadığını ortaya koymak ve spontan nöbet sayıları üzerine nasıl etki ettiğini göstermek, tez çalışmamızın esas amaçlarından birini oluşturmaktadır. Bu değerlendirmeler yapılırken, dişi ve erkek WAG/Rij sıçanlarda cinsiyet ayrımı da dikkate alınmış ve ACA'nın cinsiyet bazında da etki düzeyleri arasında farklılık olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamız ile literatürde ilk kez, WAG/Rij ırkı absans epilepsili sıçanlarda, ACA'nın ER stres seviyeleri ve bununla bağlantılı olarak meydana gelen KBB bütünlüğünün bozulması üzerine nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Bu da çalışmamızın özgün değerli bir çalışma olduğunu göstermektedir. Tez çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular aşağıda tartışılmıştır.

### 5.1. ACA'nın Absans Epilepside Spontan Nöbetler Üzerine Etkisi

Çalışmamızda WAG/Rij sıçanlarda spontan absans nöbetler takip edilmiş ve absans nöbetler üzerine ACA'nın nöbet sayılarına olan etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bu etkinin antikonvülsan olarak tedavide hali hazırda kullanılmakta olan hidrokortizonun etki düzeyiyle kıyaslaması yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında, absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, ACA ve hidrokortizon grubundaki sıçanların nöbet sayılarının azaldığı görülmüş, en önemlisi ACA ile hidrokortizon grubu

karşılaştırıldığında, ACA grubundaki sıçanların nöbet sayılarında anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

Yaptığımız literatür taramasında, absans epilepsi nöbetleri üzerine ACA'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır; ancak daha önce yapılan bir çalışmada, PTZ ile epilepsi modeli oluşturulan *Wistar albino* cinsi sıçanlarda ACA verilen gruplarda kontrol grubuna göre nöbet atak sayılarının azaldığı tespit edilmiştir (232).

Sonuçlarımıza bakarak, ACA'nın absans epilepside spontan nöbet davranışlarını azaltıcı etkisinin olduğu ve nöbet sayılarında hidrokortizona kıyasla daha etkili olduğu yorumunu yapabiliriz. Çalışma sonucumuz, bu açıdan literatürde yer alan çalışmanın sonucuyla uyumludur. ACA'nın sergilediği muhtemel etki mekanizmasını yorumlayacak olursak; ACA, TRPM2 kanallarını ve PLA<sub>2</sub> enziminin etkinliğini bloke ederek hücre içine aşırı Ca<sup>2+</sup> salınımını azaltmış (232) ve hücre içerisinde meydana gelen aşırı Ca<sup>2+</sup> kaynaklı hipereksitabiliteyi engelleyerek, absans nöbetleri baskılamış olabilir.

Kortikosteroidlerin epilepsi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Yapılan bir çalışmada, sıçanlar üzerinde kindling modeliyle epilepsi nöbetleri oluşturulmuş ve sıçanlar doğmadan önce betametazon ve deksametazon ile tedavi edilmiştir. Çalışma sonucunda, kortikosteroid yapısındaki her iki maddenin de sıçanlar üzerinde antikonvülsan etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (244). Yapılan diğer bir çalışmada, sıçanlara prenatal dönemde betametazon verilerek, yavru gelişim döneminde antikonvülsan özellik gösteren nöropeptid Y'nin hipokampüste ekspresyonda artışa sebep olduğu saptanmıştır (245).

Son dönemde yapılmış bir diğer çalışmada; epileptik ensefalopatili hastalarda uyku sırasında sürekli devam eden diken-dalga deşarjları üzerine deksametazonun etkinliği ve tolere edilebilirliği araştırılmış, hastalar kapsamlı klinik ve EEG değerlendirmelerine dayalı olarak 4 haftalık deksametazon tedavisine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak, oral yolla alınan deksametazonun, uzun süreli tedavide etkili ve tolere edilebilir olduğu, epileptik ensefalopatide diken-dalga deşarjları üzerine iyi bir tedavi seçeneği olabileceği açıklanmıştır (254).

Biz de çalışmamızda, absans epilepsili WAG/Rij sıçanlara hidrokortizon vererek, sıçanlardaki spontan nöbet sayılarının düştüğünü saptadık. Dolayısıyla diğer çalışmalarda kullanılan kortikosteroid yapıdaki maddelerin antikonvülsan etkilerinde olduğu gibi, hidrokortizon da bu etkiyi absans epilepside göstermiştir. Yani çalışma sonuçlarımız, diğer çalışmalarla uyumludur. Hidrokortizonun nöbet aktivitesini azaltma etkinliği

konusunda düşündüğümüz muhtemel mekanizmalar ise; inhibitör bir nörotransmitter olan GABA<sub>A</sub> reseptörü üzerinden etki ederek (reseptörün  $\alpha 1$  ve  $\beta 3$  bölgelerine bağlanarak) eksitatör glutamerjik reseptörlerin absans nöbetlerde oluşturduğu hipereksitabiliteyi azaltabilir. İkinci muhtemel mekanizmada ise; steroid reseptörlerine bağlanarak, nöbetlere sebep olan hücre içindeki voltaja bağımlı aşırı Ca<sup>2+</sup> artışını da inhibe ettiği yönündedir. Dolayısıyla bu sayede hidrokortizon, hücre içi-hücre dışı arasındaki elektrolit dengesizliğinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilir.

## **5.2. ACA'nın Absans Epilepside Vücut Ağırlığı ve Yem Tüketimi Üzerine Etkisi**

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, grupların kendi içinde vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında tartımlar arasında ve dişi-erkek sıçanlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yaptığımız gruplar arası karşılaştırmada ise, ACA verilen gruptaki erkek sıçanlarda, absans epilepsili kontrol grubuna ve hidrokortizon grubuna göre vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Hidrokortizon grubunda kontrol grubuna göre vücut ağırlığında artış olmuş fakat ACA kadar etki göstermediği saptanmıştır.

Sıçanların yem tüketimleri ile ilgili yapılan değerlendirmede, grupların kendi içinde ve dişi-erkek sıçan grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla erkek sıçanlarda ACA verilen grupta vücut ağırlığı artışının yem tüketiminden kaynaklanmadığı, erkek sıçanlardaki bu iştahın onların doğasından kaynaklanmış olma ihtimali yüksektir. Ayrıca, çalışmada kullandığımız deney hayvanlarının sayısının sınırlı olması ve WAG/Rij ırkı absans epileptik sıçanları kullanmamızla ilişkili olarak da, vücut ağırlıkları ve yem tüketimi konusunda bulgular net olmadığı için, bu konuya ilişkin daha çok ve kapsamlı çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Stereotaksik yöntem ile *Sprague-Dawley* cinsi sıçanlarda nörodejenerasyon oluşturularak ACA'nın koruyucu etkinliğinin olup olmadığı konusunun araştırıldığı bir çalışmada, deney gruplarının vücut ağırlıkları deney süresi boyunca tartılmış ve kontrol grubuna göre ACA grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır (255). Söz konusu çalışmada stereotaksik aletle beyinde nörodejenerasyon oluşturulduğu için, cerrahi işlem sonrası sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla diğer

gruplarda kilo kaybı olma ihtimali yüksektir. Dolayısıyla vücut ağırlığındaki bu azalmanın cerrahi işlem sonrası sıçanlarda yeme davranışının azalmasından mı yoksa ACA'dan kaynaklı mı olduğu konusu net değildir.

Bilindiği gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan steroid yapıdaki ilaçlar, vücutta su ve elektrolit dengesini değiştirerek ve metabolik anlamda değişik etkilerin oluşmasına aracılık ederek, kişilerde vücut ağırlığı artışına neden olmaktadır (250). Yapılan bir çalışmada, ilaca dirençli epilepsisi olan 35 çocukta hidrokortizonun 6 aylık kullanımının ardından kronik etkilerine bakılmış, hidrokortizon verilen 16 çocukta (7 kız, 9 erkek) iştahı artırarak, hastaların % 47'sinde kilo alımına neden olduğu rapor edilmiştir (256). Çalışmamızda hidrokortizon ağırlık artışına neden olmuştur; ancak sıçanlara 13 gün gibi kısa bir sürede verildiği için, kronik etkinliği konusunda kesin bir yorum yapılamamaktadır.

### **5.3. ACA'nın Absans Epilepside ER Stres Seviyeleri Üzerine Etkisi**

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada ER stresin epileptik nöbetlerdeki moleküler mekanizmalarda ilişkili olduğu vurgulanmıştır ve beyin hücrelerinde meydana gelen ER stresin bir sonucu olarak, aktiflenen yolaklar üzerinden aşırı kalsiyum artışı, apoptosiz gibi olayların oluşumunun yanında, kan-beyin bariyerinde de bozulmaların meydana geldiği ifade edilmiştir (199).

Literatürde diğer epilepsi modellerinin ER stres ile bağlantısının açıklandığı deneysel çalışmalar olsa da, absans epilepsisi ile ER stres ilişkisi henüz açıklanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, ilk kez absans epilepsisi ile ER stres parametreleri ve bunun kan-beyin bariyeri bütünlüğü ile arasındaki bağlantı incelenmiştir.

Glikoz yoksunluğu, bozulmuş kalsiyum homeostazı, hipoksi, oksidatif hasar ve mutant protein ekspresyonu gibi çeşitli hücre içi ve hücre dışı faktörler, ER'nin işlevini bozabilir ve ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine yol açabilir. Bu da UPR (katlanmamış protein yanıtı) sinyali oluşumunu teşvik eder. ER stres meydana gelirken, aktiflenen sinyal yolaklarının etkinliği büyük önem taşımaktadır (PERK, IRE1 ve ATF6 sinyal yolağı) (257).

TRPM2 kanal blokörü olarak bilinen ACA, bunun yanında PLA<sub>2</sub> enzimini de bloke etme özelliğine sahiptir. Hem kanal hem de enzim blokörü olması nedeniyle, hücrenin içerisinde IP<sub>3</sub> yolağını kullanıp, Ca<sup>+2</sup> salınımında azalmaya neden olur (232). Hücre içerisinde bu yolla oluşan oksidatif stres mekanizmasını ve apoptozisi durdurucu

etkisinin yanı sıra, ER stresi de azaltıcı yönde etkinlik göstereceği de kuvvetli bir ihtimaldir.

Bu tarz etkilerin dışında, yapılan diğer bir çalışmada, ACA'nın, glikozla meydana gelen pankreas adacıklarındaki insülin salınımını antagonize ettiği de rapor edilmiştir (219). Bununla birlikte ACA ve onunla benzer kimyasal yapıya sahip pek çok maddenin, kalp-damar sisteminde bulunan hücrelerde ve pankreasın beta hücrelerinde ikincil haberciler ve araşidonik asit salınımını da inhibe ettiği açıklanmıştır (220).

### 5.3.1. ATF4 Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızın sonuçlarına göre; WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlardan alınan hipokampus örneklerinde, absans epilepsili kontrol grubuna göre, DMSO+PBS, hidrokortizon ve ACA grubunda ATF4 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. ACA grubunda hidrokortizon ve DMSO+PBS grubuna göre, ATF4 protein seviyesinde yine anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır. Sonuçlarımıza göre; genel olarak ACA'nın, hidrokortizona kıyasla hipokampal alandaki ATF4 seviyelerini düşürmede daha etkili olduğu yorumunu yapabiliriz.

Dişi ve erkek sıçanlardaki somatosensoryel korteks ATF4 seviyelerine bakıldığında ise, erkek sıçanlarda absans epilepsili kontrol grubuna göre ACA grubunda ATF4 seviyelerinin anlamlı olarak düştüğü, ancak hidrokortizon ile kıyaslandığında bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Dişi sıçanlarda ise kontrol grubu ile ACA grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiş, ancak ACA grubunda hidrokortizon grubuna göre ATF4 seviyelerinde anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla somatosensoryel kortekste genel olarak ACA'nın ATF4 seviyelerini düşürmede hidrokortizona üstünlüğü söz konusu değildir.

Yapılan çalışmalarda, ATF4'ün GABA<sub>B</sub>R reseptörü üzerinden düzenleyici olarak etki ettiği saptanmış, GABA<sub>B</sub>R1 $\alpha$ 'ya uyarıcı yönde ve GABA<sub>B</sub>R1 $\beta$  aktivitesini de durdurucu yönde etki ettiği rapor edilmiştir (216). Bununla bağlantılı olarak, ATF4'ün, özellikle GABA<sub>B</sub>R aracılığıyla inhibitör nörotransmisyonu olarak görev yaptığı da açıklanmıştır (217). Bu nedenle, ATF4'ün anormal ekspresyonu, GABA<sub>B</sub>R aracılı nörotransmisyonun düzenlenmesi yoluyla epilepsinin patogenezinde rol oynayabilir ve apoptozis yolaklarını aktif hale getirebilir. GABA<sub>A</sub>R'ler de MSS'de nöronlar üzerinde uyarıcı ve inhibe edici dengenin sürdürülmesinde etkin rol oynayan reseptörlerdir (212). Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre; hidrokortizon da bu reseptörler aracılığıyla,

absans epilepsi nöbetlerini azaltmada etkili olmuş ve yüksek ihtimalle ER stresi baskılamada rol oynamıştır.

Kainik asitle deneysel epilepsi modeli oluşturulan farelerin hipokampüsünde ATF4 seviyelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir (201). Yaptığımız çalışmada kontrol grubundaki absans epilepsili sıçanların hipokampüslerindeki ATF4 seviyelerinin yüksek oluşu, kainik asit modeli ile ilgili bu çalışmayı doğrular niteliktedir.

### 5.3.2. CHOP Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan hipokampüs örneklerinde; absans epilepsili kontrol grubu ile DMSO+PBS grubu arasında CHOP protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı, ACA ve hidrokortizon grubunda kontrol grubuna göre CHOP seviyesinde anlamlı bir azalmanın olduğu saptanmıştır. Hidrokortizon grubuna kıyasla, ACA grubunun CHOP protein seviyelerini anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. Dişi ve erkek sıçan hipokampüs örneklerinde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla sonuçlara bakılarak, ACA'nın hipokampal alanda CHOP protein seviyelerini düşürmede daha etkili olduğu söylenebilir.

Çalışmamızdaki WAG/Rij erkek sıçanlardaki somatosensoriyel korteks bulgularına baktığımızda; absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubu ile kıyaslandığında; ACA ve hidrokortizon grubunda CHOP protein seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu, hidrokortizon grubu ile kıyasladığımızda ise, yine ACA grubunda CHOP protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Dişi sıçanlardaki CHOP seviyeleri, erkek sıçanlardakiyle uyumluluk göstermiştir. Sonuç itibariyle hem hipokampüste, hem de somatosensoriyel kortekste ACA'nın, CHOP protein seviyelerini azaltıcı yönde etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

CHOP, ATF4 ile bağlantılı olarak apoptozisi başlatmada etkili olan ER stres belirteçlerinden biridir. Sıçanlarda oluşturulan SE modelinde p-PERK, p-eIF2 $\alpha$  ve CHOP ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir (200). Bir başka çalışmada ise pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen akut nöbet modelinde GRP78, p-eIF2 $\alpha$  ve CHOP seviyelerinde de artış olduğu saptanmıştır (203). Çalışmalar sonucunda PERK yolağını kullanarak, proapoptotik işlev gördüğü vurgulanan CHOP'un, ayrıca nöronlarda miyelinle ilişkili genlerin transkripsiyonu üzerine inhibe edici etkinliğinin olduğu ve SE'de bu yolla nöbet duyarlılığında artışa sebep olduğu da ifade edilmiştir (207). CHOP'un epilepsi nöbetlerinde, apoptotik süreci hangi mekanizma üzerinden



gerçekleştirdiği henüz tam olarak açıklanamamıştır ve bu konuda literatürde absans nöbetler üzerine bir çalışma mevcut değildir. Ayrıca absans epileptik nöbetlerde de CHOP protein seviyelerinin artması bakımından çalışmamız, literatürdeki diğer çalışmalarla uyumluluk göstermiştir.

### 5.3.3. ATF6 Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızdan ATF6 seviyelerine ilişkin olarak elde ettiğimiz sonuçlara göre; hem erkek hem de dişi WAG/Rij sıçanların hipokampuslerinde absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, ACA ve hidrokortizon grubunda ATF6 protein seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır. Yine hidrokortizon grubuna göre, ACA grubunda ATF6 protein seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu sonucu elde edilmiştir.

Somatosensoriyel alandaki ATF6 seviyelerini değerlendirdiğimizde ise; absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, DMSO+PBS, ACA ve hidrokortizon grubunda ATF6 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı, ayrıca hidrokortizon grubuna kıyasla, ACA grubunda ATF6 seviyelerinde düşüş meydana geldiği saptanmıştır. Dişi sıçanlarda ise bu sonuçlar, hidrokortizon grubu ile ACA grubu arasında ATF6 protein seviyeleri bakımından fark bulunmadığı için değişiklik göstermemiştir. Sonuçlar genel olarak yorumlanacak olursa, hipokampüste ACA'nın ATF6 seviyelerini azaltmada etkili olduğu ancak somatosensöriyel kortekste bu etkinliği tam olarak gösteremediği söylenebilir.

Genel olarak ATF6 ile epilepsi arasındaki bağlantının kurulduğu az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, kainik asit ile indüklenen SE modeli oluşturulan farelerde, hipokampal alanda, ATF6'nın protein seviyesinde artış olduğu saptanmıştır (204). Bir diğer çalışmada ATF6 $\alpha$ 'nın delesyonunun kainat kaynaklı nöbetlerde, nöronal hasarın, artan Ca<sup>2+</sup> seviyesiyle tetiklendiği öne sürülmüştür (213). Bununla birlikte ATF6'nın GABA<sub>AR</sub> sinaptik sinyallerinin düzenlenmesi üzerine de etkili olduğu düşünülmektedir (215). Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında, absans epileptik nöbetlerde ATF6 protein seviyelerinde bir artış meydana gelmesi, literatürdeki çeşitli epilepsi modelleri oluşturularak yapılan çalışmalarla uyumludur.

#### 5.3.4. GRP78 Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda, bu güne kadar yapılmış çalışmalardan farklı olarak, absans epilepsili WAG/Rij sıçanların hipokampuslerinde ve somatosensoriyel alanlarındaki GRP78 protein seviyelerini değerlendirdik. Çalışma sonuçlarına bakıldığında; WAG/Rij erkek sıçanlardan alınan hipokampus örneklerinde; kontrol grubuna göre, ACA grubunda GRP78 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı, hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında, ACA grubunda yine GRP78 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Dişi hipokampus GRP78 protein seviyeleri bakımından erkek sıçanlarla aynı sonuçları vermiştir. Absans epilepside de önceki çalışmalarla uyumlu olarak GRP78 protein seviyeleri artış göstermiş ve ACA, hidrokortizona kıyasla GRP78 protein seviyelerini düşürmede daha etkili olmuştur.

WAG/Rij erkek ve dişi sıçanlardan alınan somatosensoriyel korteks örneklerinde; kontrol grubuna kıyasla; ACA, hidrokortizon ve DMSO+PBS gruplarında GRP78 protein seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu, hidrokortizon grubu ile kıyaslandığında ise ACA grubunun GRP78 protein seviyelerini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır. Dolayısıyla absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda ACA, hem hipokampüste hem de somatosensoriyel kortekste spontan nöbetler nedeniyle yükselen GRP78 protein seviyelerini düşürmede etkili olmuştur.

GRP78; ER'de translokasyonun düzenlenmesini, protein katlanmasının düzenli şekilde yapılabilmesini sağlayan, apoptozis mekanizmasında ve proteinlerin yıkılmasında etkin bir rol oynaması bakımından çok önemli işlevleri olan düzenleyici bir proteindir. GRP78'in aynı zamanda ER'de en çok  $Ca^{+2}$  bağlayabilen şaperonlardan biri olduğu gösterilmiştir (193).

PTZ ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde farelerin hipokampuslerinde GRP78 protein seviyesinde bir artış olduğu saptanmıştır (203). Bunun yanı sıra PTZ ile epileptik nöbet oluşturulan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, hipokampus, korteks ve striatum bölgelerinde zamana bağlı olarak GRP78 ekspresyon seviyelerinde artış olduğu saptanmış (193), PTZ ile epilepsi modeli oluşturulan sıçan beyin endotel hücrelerinde de GRP78 seviyelerinde artış meydana geldiği gösterilmiştir (176). Temporal lob epilepsili olan hastalarda yapılan bir çalışmada da beyindeki hipokampus alanında GRP78 seviyelerinde artış olduğu rapor edilmiştir (208).

### 5.3.5. ACA'nın ER Stresi Üzerine Genel Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda, absans epilepside ACA'nın genel olarak ER stres üzerindeki azaltıcı etkinliğini araştırarak, bu maddenin ER stresi belirteçleri olan ATF4, ATF6, GRP78 ve CHOP protein seviyelerini düşürdüğü sonucunu elde ettik.

ATF4 ve CHOP birlikte çalışarak, ER stres mekanizması içinde yer alan ve özellikle apoptozisi başlatan proteinlerdir. ATF6 ise GRP78 ile bağlantılı şekilde işlev görerek, ER streste protein katlanma yanıtının oluşmasını sağlar. Ayrıca GRP78,  $Ca^{2+}$ 'u en çok bağlayan şaperondur (9-12).

Çeşitli epileptik nöbetlerde bu ER stres proteinlerinin seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Çalışmamızda ise amaçlanan, nöbetler sonucu artan ER stresi azaltmada etkili olan mekanizmayı açığa çıkarmaktır. Bu nedenle hidrokortizon ve ACA'nın ER stres seviyelerindeki etkilerini araştırarak, ACA'nın absans epilepsi nöbetleri sonucu artan ER stres protein seviyelerini düşürmede hidrokortizona göre daha etkili olduğunu saptadık. ACA'nın ER stresi azaltıcı yönde etkinlik gösterirken kullandığı olası mekanizmaları yorumlayacak olursak; ACA, hem TRPM2 kanallarını hem de PLA<sub>2</sub> enzimini bloke ederek, ER streste IP<sub>3</sub> yolağında uyarılma sonucu meydana gelen hücre içi  $Ca^{2+}$  artışını engelliyor olabilir. Bunun sonucunda nöbetlere neden olan aşırı  $Ca^{2+}$  artışını ve buna bağlı olarak nöbetler sonucunda meydana gelen ER stresi azaltıcı yönde etki ettiğini söyleyebiliriz.

Hidrokortizon ise antikonvülsan olarak gösterdiği etki mekanizmasını kullanarak, GABA<sub>A</sub> reseptörleri üzerinden aşırı  $Ca^{2+}$  artışını inhibe edip, bunun sonucunda oluşan ER stres üzerine baskılayıcı bir etki gerçekleştiriyor olabilir. Ayrıca PLA<sub>2</sub> enzimini inhibe ederek, anti-inflamatuar yanıt mekanizması üzerinden KBB hasarını gideriyor olabilir.

### 5.4. ACA'nın Absans Epilepside Kan-Beyin Bariyeri Bütünlüğü Üzerine Etkisi

Çalışmamızda ilk defa ACA ve hidrokortizonun karşılaştırmalı olarak, WAG/Rij absans epilepsili sıçanlarda hipokampal ve somatosensoriyel korteks alanlarındaki endotelial hücrelerde yer alan sıkı bağlantı protein seviyelerini (ZO-1 ve okludin) ve astrositler de dahil olmak üzere glial hücrelerde yer alan GFAP ekspresyon düzeyini nasıl değiştirdiğine bakıldı ve bu durumun ER stres parametreleriyle bağlantısı açıklanmaya çalışıldı.

KBB, yapısında yer alan sıkı bağlantılarla ve enzimatik bariyeri sayesinde parankimdeki nöronal ve glial hücrelere madde geçişinin kontrolünü sağlamaktadır (120). Bu yönüyle KBB, kan damarları ile beyin dokusu arasında sınırlı bir alan meydana getirir. Dolayısıyla, KBB bütünlüğünün korunması ve madde geçişinin denetlenebilmesi için sıkı bağlantılar oldukça önem taşımaktadır. KBB’de fonksiyon kaybının görülmesinin, farklı maddeler için geçirgenliğin artması ile birlikte, epileptogeneze neden olan inflamatuvar yanıtın tetiklenmesini ve nöronlarda aşırı uyarı artışını da beraberinde getirdiği düşünülmektedir. En önemlisi de ER stresin bu mekanizma içinde yer alarak, epileptik nöbetlerin sonucunda meydana gelen KBB bozulması ile de bağlantılı olduğu yorumu yapılmıştır (199). Yapılan bir çalışmada, GRP78 ve p-PERK seviyelerinin yükseldiği hasarlı endotel hücrelerinde, KBB geçirgenliğinin de önemli ölçüde arttığı ve bunun SE nöbetleri sonucunda oluşan vazojenik ödemin oluşumunda rol oynayabileceği rapor edilmiştir (176).

#### **5.4.1. GFAP Seviyelerinin Değerlendirilmesi**

GFAP seviyelerini saptamak için mikroskop görüntülerini incelediğimizde, ACA ve hidrokortizon grubundaki sıçanlardan alınan kesitlerde somatosensoriyel korteksteki GFAP’ın, absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubu ve DMSO+PBS gruplarına göre göreceli olarak daha yüksek düzeyde eksprese edildiği görülmüştür. Hidrokortizon grubundaki sıçanlardan alınan kesitlerde ise hipokampal alandaki GFAP’ın, kontrol gruplarına göre daha yüksek düzeyde eksprese edildiği saptanmıştır.

Hipokampal alandaki GFAP boyama şiddeti, kontrol grubuna kıyasla, hidrokortizon grubunda daha yüksek bulunmuştur; ancak diğer gruplar arasında hipokampal alandaki boyanma şiddetlerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde; hem somatosensoriyel korteksteki hem de hipokampüsteki GFAP seviyelerinin, ACA’ya kıyasla hidrokortizonla daha iyi korunduğu izlenimini edindik.

Daha önce, PTZ ile indüklenen deneysel epilepsi modeli oluşturulan sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, KBB üzerinde lipopolisakkaritin yapısal ve fonksiyonel etkileri araştırılmıştır (220). Sonuç olarak; serebral korteks, diensefalon ve serebellum alanlarında GFAP seviyelerinin, lipopolisakkarit verilen sıçanlarda daha yüksek seviyede olduğu görülmüş ve epileptik nöbetlerde KBB geçirgenliği üzerine lipopolisakkaritin koruyucu etkisinin olabileceği yorumu yapılmıştır.

Yaptığımız literatür taramasında, hidrokortizonun epilepsi nöbetlerinde GFAP seviyelerinin nasıl değiştiğiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz de çalışmamızda ACA ve hidrokortizonun koruyucu etkisine bakarak, absans epileptik nöbetlerde özellikle hipokampus ve somatosensoriyel kortekste GFAP seviyelerinde artışa neden olması sebebiyle, her iki maddenin de KBB üzerine koruyucu etkisi olabileceğini söyleyebiliriz.

#### **5.4.2. ZO-1 ve Okludin Seviyelerinin Değerlendirilmesi**

Çalışmamızdaki KBB bütünlüğündeki değişim değerlendirildiğinde, mikroskop görüntülerine bakılarak, absans epileptik sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre ACA ve hidrokortizon grubunda ZO-1 proteinleri açısından somatosensoriyel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde boyama şiddetinin güçlü olduğu saptanmıştır. Her iki grubun da kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. ACA ile hidrokortizon grubunda ZO-1 proteinleri açısından somatosensoriyel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetlerinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Sonuçlarımıza bakılarak, ACA ve hidrokortizonun somatosensoriyel korteks damar endotel hücrelerinde KBB üzerine koruyucu etkinliği olduğu söylenebilir.

Absans epileptik nöbetlerin görüldüğü kontrol grubuna göre, ACA grubundaki ZO-1 proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin orta şiddette (boyama şiddette) ve gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır.

Hidrokortizon grubunda ise ZO-1 proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetinin güçlü olduğu tespit edilmiştir. ACA grubunda, hidrokortizon grubuna göre, ZO-1 proteinleri açısından hipokampüste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetinin daha zayıf olduğu izlenimi edinilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçları genel olarak yorumladığımızda ZO-1 protein seviyesinin ACA ve hidrokortizon grubunda arttığı görülmüştür ve KBB üzerinde koruyucu özellikleri olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda, absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, ACA ve hidrokortizon gruplarındaki sıçanların somatosensoriyel korteks ve hipokampuslarından alınan örneklerde, okludin proteinleri açısından yer alan damar endotel hücrelerinde, boyanma şiddetinin arttığı ve gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. ACA'da boyanan endotel sayısının hidrokortizona göre daha az olduğu gösterilmiştir; ancak her iki grupta da absans epilepsili sıçanların bulunduğu kontrol grubuna göre

boyama şiddeti artmıştır. Literatürdeki çalışma sonuçlarından farklı olarak, kontrol grubuna kıyasla, DMSO+PBS grubunda okludin proteinleri açısından somatosensoryel kortekste yer alan damar endotel hücrelerinde, boyama şiddetinin artarak orta şiddette olduğu görülmüş ve gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan *in vitro* bir çalışmada, hidrokortizonun KBB sıkı bağlantı proteinlerden ZO-1 ve okludin sığır retinal endotel hücre tabakasında seviyeleri üzerine etkileri araştırılmış ve sonuçta hidrokortizonun, hücre sınırında hem okludin hem de ZO-1 boyamasını etkili bir şekilde arttırdığı görülmüştür (242). Çalışmamızın sonuçları, hipokampus ve somatosensoryel korteksteki endotel hücrelerinde de retinal endotel hücrelerinde olduğu gibi, hidrokortizonun ZO-1 ve okludin boyamalarını artırdığını göstermiştir. PTZ ile indüklenen deneysel epilepsi modeli oluşturulan sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada, KBB üzerinde lipopolisakkaritlerin etkisi araştırılmış ve serebral korteks, diensefalon ve serebellum alanlarında ZO-1 ve okludin seviyelerinin, lipopolisakkarit verilen sıçanlarda daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür (220). Bu çalışmada PTZ ile indüklenen epilepside lipopolisakkaritin koruyucu etkisine benzer şekilde, çalışmamızda da absans epilepside ACA ve hidrokortizonun ZO-1 ile okludin seviyelerini artırmada etkili olduğu sonucu elde edilmiştir.

Beyinde epileptik nöbetler meydana geldiğinde nöronların beslenmesi azalarak kapiller damar geçirgenliğinin artmasına neden olur. Bu da KBB bütünlüğünün bozulmasına ortam hazırlar (148).

Ayrıca nöronlar gibi, mikroglia ve astrositlerin de epilepsi nöbetleri sonucunda KBB'de ZO-1 ile okludin seviyelerinde bir azalma olduğunda, beyin endotel hücreleriyle iletişime geçerek KBB bütünlüğünü korumada etkili olduğu yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (149,156). Nöbetler esnasında, K<sup>+</sup>iyonlarının miktarının azalması, astrosit ile perisitlerin yapısındaki değişimlere neden olarak, KBB bozulmasında artışa neden olur (174).

Yapılan bir çalışmada, glutamatın PLA<sub>2</sub> enzimi aracılığıyla endotel hücre matriksinde yapısal bozulmalara neden olan MMP'nin salgısında artışa neden olduğu ve bunun da TJ protein seviyesinde azalmaya neden olarak epileptik nöbetleri tetiklediği rapor edilmiştir (180,181). Bu sonuçlardan yola çıkarak, çalışmamızda kullandığımız ACA ve hidrokortizonun PLA<sub>2</sub> enzim aktivitesini bloke ederek, absans epilepsi nöbetlerini ve ER stresi azalttığını, bu etkilerinin yanında KBB bütünlüğünü sağlayan nöronlarda, astrositlerde ve perisitlerde koruyucu bir etkinlik göstermiş olduklarını düşünebiliriz. Ayrıca, ACA ve hidrokortizon damar endotel yapısını korurken, hücre

içindeki iyon dengesini değiştirerek, GABA etkinliği ile glutamat aracılı MMP salgısını inhibe etmiş ve endotel hücrelerin etrafındaki matriks yapısına zarar veren MMP'nin etkisini bloke etmiş olabilir. Çalışmamızın sonuçlarına bakarak; absans epilepsi sonucunda kontrol grubundaki sıçanlarda oluşan endotelial hasarın giderilmesinde, ACA ve hidrokortizonun etkili olduğu ve bu maddelerin hem hipokampus hem de somatosensoriyel korteksteki KBB sıkı bağlantılarında koruyucu bir etkisinin olduğu yorumunu yapabiliriz.

#### **5.4.3. ER Stres ve Kan-Beyin Beriyeri Bütünlüğü Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi**

Olası mekanizmaları tekrar gözden geçirecek olursak; ACA, TRPM2 kanallarını ve PLA<sub>2</sub> enziminin etkinliğini bloke ederek, ER streste uyarılma sonucu meydana gelen hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışını baskılayıcı yönde etki ettiğini ve nöbet sayısını azalttığını söyleyebiliriz. Sonuç itibarıyla ACA'nın, nöroprotektif etkilerinin yanında, hem nöbetlere neden olan aşırı Ca<sup>2+</sup> artışını ve buna bağlı olarak meydana gelen artmış ER stresini azaltarak, KBB'de meydana gelen hasara karşı koruyucu etkinlik gösterdiğini ifade edebiliriz. ACA, KBB'deki koruyucu etkisini ZO-1 ve okludin ile GFAP ekspresyon seviyelerindeki artışla göstermiştir. Genel olarak, bahsedilen etkinlikler üzerinde ACA'nın hidrokortizona göre daha etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Öte yandan hidrokortizon da, steroid reseptörleri aracılığıyla PLA<sub>2</sub> enzimini inhibe ederek, KBB'nin yapısındaki sıkı bağlantı proteinlerinin bütünlüğünü koruyarak, inflamasyona neden olan maddelerin geçişini engelleyip, anti-inflamatuar etkinlik üzerinden KBB'yi koruyucu yönde etkinlik gösterebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda WAG/Rij sıçanlarda spontan olarak gerçekleşen absans epilepsi nöbetleri izlenmiş ve ACA'nın, antikonvülsan olarak kullanılan hidrokortizona etkileri kıyaslanarak nöbetler üzerine nasıl bir etkinlik gösterdiği araştırılmıştır. Sonuçlara göre; absans epilepside ACA'nın hidrokortizona kıyasla spontan nöbet sayılarını azalttığı saptanmıştır. Bu sebeple ACA'nın, nöbet aktivitesini baskılamada hidrokortizona alternatif olabileceği ihtimali kuvvetlenmiştir. Dişi ve erkek sıçanlarda meydana gelen nöbet sayılarında cinsiyet anlamında bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca çalışmamız, literatürde absans epilepsili sıçanlarda spontan nöbetler üzerine ACA'nın etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.
- Çalışmamızda, ayrıca WAG/Rij ırkı sıçanların günlük tükettikleri yem miktarları ve vücut ağırlıkları tartılarak, ACA'nın etkilerine bakılmıştır. Grupların kendi içinde vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, tartımlar arasında ve dişi-erkek sıçanlarda bir fark bulunmamıştır. Gruplar arası karşılaştırmada ise, ACA verilen gruptaki erkek sıçanlarda, hidrokortizon grubuna göre vücut ağırlıklarında daha fazla artış olduğu saptanmış ancak yem tüketiminin değişmediği görülmüştür. Denek sayımızın az oluşu ve WAG/Rij sıçanlarda çalışmamız sebebiyle net bir sonuç elde edilemediği için, yeni çalışmalar ile verilerin desteklenmesine ihtiyaç vardır.
- Çalışmamızda ER stres parametreleri değerlendirilirken, absans epilepsi nöbetlerinin en sık görüldüğü hipokampus ve somatosensoriyel korteks alanları tercih edilmiştir. Hipokampus örneklerinde; absans epilepsili sıçanlardan oluşan kontrol grubuna göre, hidrokortizon ve ACA grubunda ATF4 seviyesinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Genel olarak ACA'nın, hidrokortizona kıyasla hipokampal alandaki ATF4 seviyelerini düşürmede daha etkili olduğu görülmüş, ancak somatosensoriyel kortekste ACA'nın hidrokortizona üstünlüğü saptanmamıştır.
- WAG/Rij dişi ve erkek sıçanların hem hipokampus hem de somatosensoriyel kortekslerinde, ACA ve hidrokortizonun; ATF4'e benzer şekilde, ATF6, CHOP ve GRP78 protein seviyelerini de düşürdüğü saptanmıştır.



- KBB bütünlüğü üzerine ACA ve hidrokortizonun etkisini değerlendirebilmek amacıyla, hipokampus ve somatosensoriyel korteksten aldığımız koronal kesitlerde, genel olarak, ACA ve hidrokortizon grubunda damar endotel hücrelerindeki sıkı bağlantı proteinleri olan ZO-1 ve okludin ile astrositler de dahil olmak üzere glial hücrelerde yer alan bir protein olan GFAP'ın, ekspresyon seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Absans epilepsi nöbetleri sonucunda kontrol grubunun nöronlarında meydana gelen damar endotel hasarının giderilmesinde, ACA ve hidrokortizonun etkili olduğu ve bu maddelerin hem hipokampus hem de somatosensoriyel korteksteki KBB sıkı bağlantılarında koruyucu bir etkinlik gösterdiği yorumu yapılabilir.
- Çalışmamızda, düşük dozda kullanılmasına rağmen, DMSO+PBS grubunda bazı ER stres protein belirteçlerini azalttığı ve sıkı bağlantı protein ekspresyonlarında artışa neden olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmalarda, sonuçları etkilememeleri açısından DMSO kullanımında ve bu maddenin deney hayvanlarına verilen dozları konusunda dikkatli olunmalıdır.
- ACA'nın etki mekanizması düşünüldüğünde; TRPM2 kanal ve PLA<sub>2</sub> enzim blokörü olarak Ca<sup>2+</sup> salınımını azalttığını, bunun nöranal hipereksitabilitiyi ve nöbet oluşumunu azaltıyor olabileceğini söyleyebiliriz. Ca<sup>2+</sup> birikimi sonucu nöronlarda meydana gelen ER stresi azaltarak, KBB bozulmasını da bu yolla engelliyor olabilir.
- Epilepsi tedavisinde kullanılmakta olan hidrokortizonun, nöbet aktivitesini azaltmada, ER stresi ve KBB bozulmasında olan iyileştirici etkisini GABA<sub>A</sub> reseptörü üzerinden yaptığı, düşündüğümüz ilk olası mekanizmadır. İkinci olasılık ise, PLA<sub>2</sub> reseptörlerine bağlanıp, Ca<sup>2+</sup> salınımını azalttığı yönündedir.
- Sonuç olarak; absans epilepsideki patolojik mekanizmaların hangi yollar üzerinden gerçekleştirildiğini tam olarak açıklayabilmek için, ACA ve KBB disfonksiyonu-ER stres bağlantısına ilişkin daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu anlamda çalışmamız, literatüre önemli katkılar sağlayacaktır. Sonraki çalışmalarda ER stres ve KBB disfonksiyonlarıyla bağlantılı olası epileptik mekanizmaları açıklamada bakış açısını genişletebilir. ER stresini ve KBB hasarını azaltmayı hedeflediğimiz mevcut terapötik yaklaşımlar da anti-epileptik tedaviler için yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T. Epilepsy: new advances. *The Lancet* 2015, 385(9971):884-98.
2. Bosnyakova D, Gabova A, Kuznetsova G, Obukhov Y, Midzyanovskaya I, Salonin D. Time–frequency analysis of spike-wave discharges using a modified wavelet transform. *J of Neur Meth* 2006, 154(1-2):80-8.
3. Berg A, Panayiotopoulos C. *Diversity in Epilepsy and A Newly Recognized Benign Childhood Syndrome*. 2<sup>nd</sup> ed. USA, AAN Enterprises, 2000:120-2.
4. O'Connor T, Sadleir KR, Maus E, Velliquette RA, Zhao J, Cole SL, Vassar R. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* 2008, 60(6):988-1009.
5. Franco-Pérez J, Ballesteros-Zebadúa P, Manjarrez-Marmolejo J. Anticonvulsant effects of mefloquine on generalized tonic-clonic seizures induced by two acute models in rats. *J BMC Neuroscience* 2015, 16(1):1-8.
6. Shiha AA, de Cristobal J, Delgado M, de la Rosa RF, Bascunana P, Pozo MA, Garcia-Garcia L. Subacute administration of fluoxetine prevents short-term brain hypometabolism and reduces brain damage markers induced by the lithium-pilocarpine model of epilepsy in rats. *Brain Research Bulletin* 2015, 111:36-47.
7. Naidoo N. ER and aging-protein folding and the ER stress response. *Age Researc Rev* 2009, 8(3):150-9.
8. Riehl TE, Newberry RD, Lorenz RG, Stenson WF. TNFR1 mediates the radioprotective effects of lipopolysaccharide in the mouse intestine. *Ame J of Phys-Gastr Liver Phys* 2004, 286(1):166-73.
9. Nishikawa S-i, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J of Bioc* 2005, 137(5):551-5.
10. Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 2006, 13(3):385-92.
11. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2007, 8(7):519-29.
12. Sarvani C, Sireesh D, Ramkumar KM. Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases. *Phar Res* 2017, 119:412-21.

13. Buzatu M, Bulteau C, Altuzarra C, Dulac O, Van Bogaert P. Corticosteroids as treatment of epileptic syndromes with continuous spike-waves during slow-wave sleep. *Epilepsia* 2009, 50:68-72.
14. Inutsuka M, Kobayashi K, Oka M, Hattori J, Ohtsuka Y. Treatment of epilepsy with electrical status epilepticus during slow sleep and its related disorders. *Brain Develop* 2006, 28(5):281-6.
15. Perraud A-L, Knowles H, Schmitz C. Novel aspects of signaling and ion-homeostasis regulation in immunocytes: The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response. *Molecular Immun* 2004, 41(6-7):657-73.
16. Bennewitz MF, Saltzman WM. Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics* 2009, 6(2):323-36.
17. Liu JY, Thom M, Catarino CB, Martinian L, Figarella-Branger D, Bartolomei F, Sisodiya SM. Neuropathology of the blood-brain barrier and pharmaco-resistance in human epilepsy. *Brain* 2012,135(10):3115-33.
18. Coppola G, Iapadre G, Operto FF, Verrotti A. New developments in the management of partial-onset epilepsy: role of brivaracetam. *Drug Design Develop Ther* 2017, 11:643.
19. Temkin O. *The Falling Sickness: A History of Epilepsy From the Greeks to the Beginnings of Modern Neurology*, 5<sup>th</sup> ed. USA, JHU Press, 1994:43-5.
20. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protocols* 2007, 2(2):322-8.
21. Dichter MA. Posttraumatic epilepsy: the challenge of translating discoveries in the laboratory to pathways to a cure. *Epilepsia* 2009, 50:41-5.
22. Dichter MA. Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch of Neurology* 2009, 66(4):443-7.
23. Löscher W, Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharma Reviews* 2010, 62(4):668-700.
24. Alghamdi AAH, Alqahtani AQS, Alqahtani SY, Al-Arim MA, Almusa HA, Al-Arim MA, Almusa MA, El-Awad ME. Pattern and characteristics of childhood seizure disorders in a Secondary Care Hospital at Abha City, Aseer Region, KSA. *King Khalid University J of Health Scienc* 2019, 4(2):1.

25. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *C Spr Harbor Perspec in Bio* 2013, 61(12):1939-58.
26. Pitkänen A, McIntosh TK. Animal models of post-traumatic epilepsy. *J of Neuro* 2006, 23(2):241-61.
27. Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *The Lancet Neurology* 2002, 1(3):173-81.
28. Liu RS, Lemieux L, Bell GS, Sisodiya SM, Bartlett PA, Shorvon SD, Duncan JS. The structural consequences of newly diagnosed seizures. *Annals of Neurology: Off J of the Ame Neuro Assoc the Child Neuro Soc.* 2002, 52(5):573-80.
29. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J of Neuro* 2001, 21(18):7153-60.
30. Rikani AA, Choudhry Z, Choudhry AM, Zenonos G, Tariq S, Mobassarah NJ. Spatially regulated adult neurogenesis. *An of Neuro* 2013, 20(2):67.
31. Lukasiuk K, Dabrowski M, Adach A, Pitkänen A. Epileptogenesis-related genes revisited. *Prog in Brain Resear* 2006,158:223-41.
32. Patel DC, Tewari BP, Chaunsali L, Sontheimer H. Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Natur Revi Neuros* 2019, 20(5):282-97.
33. Elliott RC, Miles MF, Lowenstein DHJJoN. Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development-and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. *J of Neuro* 2003, 23(6):2218-27.
34. Chopp M, Li Y, Zhang J. Plasticity and remodeling of brain. *J of the Neur Sci* 2008, 265(1-2):97-101.
35. Reddy D. Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. *Front in Cell Neur* 2013, 7:115.
36. Gastaut H, Zifkin BJ. Classification of the epilepsies. *Drugs for Control of Epilepsy: Act on Neuro Net Invol in Seiz Disor* 1992, 349-60.
37. Fisher RS. The new classification of seizures by the International League Against Epilepsy 2017. *Cur Neuro Neuroscie Repor* 2017, 17(6):48.
38. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Zulberri SM. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 2017;58(4):512-21.

39. Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 2010, 51(5):883-90.
40. Newton CR, Garcia HH. Epilepsy in poor regions of the world. *The Lancet* 2012, 380(9848):1193-201.
41. Hirtz D, Thurman D, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri A, Zalutsky R. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology* 2007, 68(5):326-37.
42. Ding D, Wang W, Wu J, Yang H, Li S, Dai X, Sander JW. Premature mortality risk in people with convulsive epilepsy: long follow-up of a cohort in rural China. *Epilepsia* 2013, 54(3):512-7.
43. Galanopoulou AS, Buckmaster PS, Staley KJ, Moshé SL, Perucca E, Engel Jr J, Simonato J. Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology. *Epilepsia* 2012, 53(3):571-82.
44. Tomson T, Nashef L, Ryvlin P. Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. *The Lancet Neurology* 2008, 7(11):1021-31.
45. Balchen T, Berg M, Diemer NH. A paradox after systemic kainate injection in rats: lesser damage of hippocampal CA1 neurons after higher doses. *Neuro Letters* 1993, 163(2):151-4.
46. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, Jette N. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 2017, 88(3):296-303.
47. Holst AG, Winkel BG, Risgaard B, Nielsen JB, Rasmussen PV, Haunsø S, Tfelt-Hansen J. Epilepsy and risk of death and sudden unexpected death in the young: a nationwide study. *Epilepsia* 2013, 54(9):1613-20.
48. Sillanpää M, Shinnar S. Long-term mortality in childhood-onset epilepsy. *New England J of Medic* 2010, 363(26):2522-9.
49. Rai D, Kerr MP, McManus S, Jordanova V, Lewis G, Brugha TS. Epilepsy and psychiatric comorbidity: a nationally representative population-based study. *Epilepsia* 2012, 53(6):1095-103.
50. Gaitatzis A, Sisodiya SM, Sander JW. The somatic comorbidity of epilepsy: a weighty but often unrecognized burden. *Epilepsia* 2012, 53(8):1282-93.

51. Avanzini G, Manganotti P, Meletti S, Moshé SL, Panzica F, Wolf P, Capovilla G. The system epilepsies: a pathophysiological hypothesis. *Epilepsia* 2012, 53(5):771-8.
52. Ono T, Galanopoulou AS. *Epilepsy and Epileptic Syndrome. Neuro Diseases*, Springer, 2012, 99-113.
53. Buckmaster PS. Laboratory animal models of temporal lobe epilepsy. *Comparative Medicine* 2004, 54(5):473-85.
54. Acharya JN. Recent advances in epileptogenesis. *Current Science* 2002, 679-88.
55. Poon C, McMahon D, Hynynen K. Noninvasive and targeted delivery of therapeutics to the brain using focused ultrasound. *Neuropharmacology* 2017, 120:20-37.
56. Prinz M, Priller J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nature Neuroscience* 2017;20(2):136-44.
57. Timofeev I, Grenier F, Steriade M. Contribution of intrinsic neuronal factors in the generation of cortically driven electrographic seizures. *J of Neurophys* 2004, 92(2):1133-43.
58. Lacaille J-C, Mueller AL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J of Neuroscience* 1987, 7(7):1979-93.
59. Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Malafosse A. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+ 2. *Nature Genetics* 2000, 24(4):343-5.
60. Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Ito M, Nagafuji H, Fukuma G, Mitsudome A, Yamakawa K. Nav1. 1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. *Neurology* 2001, 57(4):703-5.
61. Kobylarek D, Iwanowski P, Lewandowska Z, Limphaibool N, Szafranek S, Labrzycka A, Kozubski W. Advances in the potential biomarkers of epilepsy. *Frontiers in Neurology* 2019,10.
62. Gibbs FA, Davis H, Lennox WG. The electro-encephalogram in epilepsy and in conditions of impaired consciousness. *Arc of Neuro Psych* 1935, 34(6):1133-48.
63. Penry JK, Porter RJ, Dreifuss R. Simultaneous recording of absence seizures with video tape and electroencephalography. A study of 374 seizures in 48 patients. *Brain: A J of Neurology* 1975, 98(3):427.

64. Zhao N, Liu C-C, Qiao W, Bu G. Apolipoprotein E, receptors, and modulation of Alzheimer's disease. *Bio Psychiatry* 2018, 83(4):347-57.
65. Richards DA, Manning J-PA, Barnes D, Rombola L, Bowery NG, Caccia S, Crunelli V. Targeting thalamic nuclei is not sufficient for the full anti-absence action of ethosuximide in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Research* 2003, 54(2-3):97-107.
66. Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Reviews Neurosci* 2004, 5(7):553-64.
67. Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Reviews Neurosci* 2017, 18(7):419.
68. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010, 51(4):676-85.
69. Vega C, Guo J, Killory B, Danielson N, Vestal M, Berman R, Spann MN. Symptoms of anxiety and depression in childhood absence epilepsy. *Epilepsia* 2011, 52(8):70-4.
70. Blumenfeld H. From molecules to networks: cortical/subcortical interactions in the pathophysiology of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 2003, 44:7-15.
71. Treiman DM. Electroclinical features of status epilepticus. *J of Clin Neurophysiology: Offi Publ of the Ameri Electroencep Soci* 1995, 12(4):343-62.
72. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Bio Psychiatry* 2015, 77(1):43-51.
73. Hughes JR. Absence seizures: a review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behavior* 2009, 15(4):404-12.
74. Shahar E, Genizi J, Nevo Y, Kaufman R, Cabot S, Zelnik N. Typical absence epilepsy presenting prior to age of 3 years: an uncommon form of idiopathic generalized epilepsy. *Euro J of Paediatr Neuro* 2007, 11(6):346-52.
75. Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Revie Neuro* 2002, 3(5):371-82.
76. Niedermeyer E. Primary (idiopathic) generalized epilepsy and underlying mechanisms. *Clinical Electro* 1996, 27(1):1-21.

77. Bancaud J, Talairach J. Clinical semiology of frontal lobe seizures. *Advances in Neurology* 1992, 57:3-58.
78. Hunter J, Jasper HH. Effects of thalamic stimulation in unanaesthetised animals: the arrest reaction and petit mal-like seizures, activation patterns and generalized convulsions. *Electro Clinical Neurophys* 1949, 1(1-4):305-24.
79. Jasper HH, editor Experimental studies on the functional anatomy of petit mal epilepsy. *Assoc Res Nerv Ment Dis* 1974, 2 (3-5):34-9.
80. Gloor P. Generalized Cortico-Reticular Epilepsies Some Considerations on the Pathophysiology of Generalized Bilaterally Synchronous Spike and Wave Discharge. *Epilepsia* 1968, 9(3):249-63.
81. Bertram EH. Neuronal circuits in epilepsy: do they matter? *Exp Neuro* 2013, 244:67-74.
82. Meeren HK, Pijn JPM, Van Luijtelaar EL, Coenen AM, da Silva FHL. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J of Neurosci* 2002, 22(4):1480-95.
83. Meeren H, van Luijtelaar G, da Silva FL, Coenen A. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch of Neurology* 2005, 62(3):371-6.
84. Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G, Pape H-C. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J of Neurosci* 1995, 15(4):3110-7.
85. Onat FY, van Luijtelaar G, Nehlig A, Snead III OC. The involvement of limbic structures in typical and atypical absence epilepsy. *Epilepsy Research* 2013, 103(2-3):111-23.
86. Han HA, Cortez MA, Snead III OC. *GABAB Receptor and Absence Epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of The Epilepsies*, 4<sup>th</sup> ed. US, National Center for Biotechnology Information, 2012:78-9.
87. Paz JT, Huguenard JR. Microcircuits and their interactions in epilepsy: is the focus out of focus? *Nature Neuroscience* 2015,18(3):351.
88. Chen M, Guo D, Xia Y, Yao D. Control of absence seizures by the thalamic feed-forward inhibition. *Front in Comp Neuro* 2017,11:31.
89. Chen M, Guo D, Wang T, Jing W, Xia Y, Xu P, Yao D. Bidirectional control of absence seizures by the basal ganglia: a computational evidence. *PLoS Comput Biol* 2014, 10(3):e1003495.



90. Lega BC, Halpern CH, Jaggi JL, Baltuch GH, Nod. Deep brain stimulation in the treatment of refractory epilepsy: update on current data and future directions. *Neuro of Disease* 2010, 38(3):354-60.
91. Cryan JF, Kaupmann K. Don't worry 'B'happy!: a role for GABAB receptors in anxiety and depression. *Trend in Pharma Sciences* 2005, 26(1):36-43.
92. Loddenkemper T, Pan A, Neme S, Baker KB, Rezai AR, Dinner DS, Lüders HO. Deep brain stimulation in epilepsy. *J of Clinical Neurophys* 2001, 18(6):514-32.
93. Klein JP, Khera DS, Nersesyan H, Kimchi EY, Waxman SG, Blumenfeld H. Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Research* 2004, 1000(1-2):102-9.
94. Vezzani A, Auvin S, Ravizza T, Aronica E. Glia–neuron interactions in epilepsy: inflammatory mediators. *Epilepsia* 2010, 51:55-8.
95. Willner P. Methods for assessing the validity of animal models of human psychopathology. *Animal Model in Psyc*, I: Springer, 1991:1-23.
96. III OCS.  $\gamma$ -Hydroxybutyrate model of generalized absence seizures: further characterization and comparison with other absence models. *Epilepsia* 1988, 29(4):361-8.
97. Kostopoulos GK. Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. *Clinical Neurophys* 2000, 111:27-38.
98. Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. Blood-brain barrier genomics. *J of Cereb Blood Flow Metabolism* 2001, 21(1):61-8.
99. Getova D, Bowery NG, Spassov V. Effects of GABAB receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. *Euro J of Pharma* 1997, 320(1):9-13.
100. Polack P-O, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, Charpier S. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J of Neurosci* 2007, 27(24):6590-9.
101. Chen BR, Kozberg MG, Bouchard MB, Shaik MA, Hillman EMA. A critical role for the vascular endothelium in functional neurovascular coupling in the brain. *J of the American Heart Assoc* 2014, 3(3):e000787.
102. Coenen A, Drinkenburg W, Peeters B, Vossen J, Van Luijckelaar E. Absence epilepsy and the level of vigilance in rats of the WAG/Rij strain. *Neuro Biobehav Review* 1991, 15(2):259-63.

103. Drinkenburg W, Van Luijtelaar E, Van Schaijk W, Coenen A. Aberrant transients in the EEG of epileptic rats: a spectral analytical approach. *Phys Behavior* 1993, 54(4):779-83.
104. Van Luijtelaar E. The WAG/Rij model for generalized absence seizures. *Advances in Epilep* 1989, 17:78.
105. Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wülfert EJEjop. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Euro J of Pharma* 1998, 353(2-3):191-206.
106. Snead III OC. Evidence for G protein modulation of experimental-generalized absence seizures in rat. *Neuro Letters* 1992, 148(1-2):15-8.
107. Snead III OC. Relation of the [3H]  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) binding site to the  $\gamma$ -aminobutyric acidB (GABAB) receptor in rat brain. *Bioch Pharma* 1996, 52(8):1235-43.
108. Depaulis A, David O, Charpier S. The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J of Neuro Methods* 2016, 260:159-74.
109. Lenck-Santini P-P. Cognitive and Behavioral Comorbidities in Epilepsy: The Treacherous Nature of Animal Models: TLE Models and Comorbidities. *Epilepsy Currents* 2013, 13(4):182-3.
110. Wirrell EC, Camfield CS, Camfield PR, Dooley JM, Gordon KE, Smith B. Long-term psychosocial outcome in typical absence epilepsy: sometimes a wolf in sheeps' clothing. *Arch of Ped Adolescent Med* 1997, 151(2):152-8.
111. Faure JB, Akimana G, Carneiro JE, Cosquer B, Ferrandon A, Geiger K, Nehlig A. A comprehensive behavioral evaluation in the lithium–pilocarpine model in rats: effects of carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia* 2013, 54(7):1203-13.
112. Sarkisova K, van Luijtelaar G. The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Progres in Neuro-Psychop & Bio Psyc* 2011, 35(4):854-76.
113. Isokawa M. Remodeling dendritic spines of dentate granule cells in temporal lobe epilepsy patients and the rat pilocarpine model. *Epilepsia* 2000, 41:14-7.
114. Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D'Orazio LM, Pachicano M, Zlokovic BV. Blood–brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nature Medicine* 2019, 25(2):270-6.

115. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back. *Phys Reviews* 2019, 99(1):21-78.
116. Schmitt G, Parrott N, Prinssen E, Barrow P. The great barrier belief: The blood–brain barrier and considerations for juvenile toxicity studies. *Repro Toxicology* 2017, 72:129-35.
117. Xin H, Sha X, Jiang X, Chen L, Law K, Gu J, Fang X. The brain targeting mechanism of Angiopep-conjugated poly (ethylene glycol)-co-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles. *Biomaterials* 2012, 33(5):1673-81.
118. Stewart P, Wiley M. Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier. *J of Comparat Neuro* 1981, 202(2):157-67.
119. Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD, Groothuis DR. Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Micro Res* 1999, 58(3):312-28.
120. Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Intervent* 2003, 3(2):90.
121. Schultz RL. An intraneuronal capillary in rat cerebral cortex. *J of Ultrastruct Res* 1967, 20(5-6):422-32.
122. Kepes JJ, Bridge JA, Flasschoen J. Penetration of neuronal perikarya by capillaries in chronic limbic encephalitis. *J of Neuro, Exp Neuro* 1990, 49(1):64-70.
123. Michalak Z, Lebrun A, Miceli MD, Rousset M-C, Crespel A, Coubes P, Rigau V. IgG leakage may contribute to neuronal dysfunction in drug-refractory epilepsies with blood-brain barrier disruption. *J of Neuro, Exp Neuro* 2012, 71(9):826-38.
124. Pardridge WM. *Introduction To The Blood-Brain Barrier: Methodology, Biology And Pathology*, 5<sup>th</sup> ed. England, Cambridge University Press, 2006: 87-94.
125. Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Researc* 2003, 314(1):119-29.
126. Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Malecki A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharma Rep* 2008, 60(5):600-22.
127. Hawkins BT, Davis TPJPr. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005, 57(2):173-85.
128. McCarty JH. Cell adhesion and signaling networks in brain neurovascular units. *Cur Opin in Hemato* 2009, 16(3):209.

129. Panche A, Chandra S, Ad D, Harke S. Alzheimer's and current therapeutics: A review. *Asian J Pharm Clin Res* 2015, 8(3):14-9.
130. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physi Reviews* 2004, 84(3):869-901.
131. Dejana E. Endothelial cell–cell junctions: happy together. *Nat Reviews, Molec Cell Bio* 2004, 5(4):261-70.
132. Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou A-P, Lampugnani MG, Greenwood J. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J of Cell Sci* 2008, 121(1):29-37.
133. Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M, Vestweber D. Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immuno* 2014, 15(3):223-30.
134. Garrido-Urbani S, Bradfield P, Imhof B. Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs). *Cell Tissue Res* 2014, 355(3):701-15.
135. Lamagna C, Meda P, Mandicourt G, Brown J, Gilbert RJ, Jones EY, Aurrand-Lions M. Dual interaction of JAM-C with JAM-B and  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Mol Bio of The Cell* 2005, 16(10):4992-5003.
136. Luissint A-C, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud P-O. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Flu Barriers of the CNS* 2012, 9(1):23.
137. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neuro of Disease* 2010, 37(1):13-25.
138. Ueno M. Mechanisms of the penetration of blood-borne substances into the brain. *Cur Neuropharma* 2009, 7(2):142-9.
139. Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neuro Research* 2009, 34(12):2067.
140. Kaur C, Ling E. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Cur Neurovasc Research* 2008, 5(1):71-81.
141. Glushakova OY, Glushakov AV, Mannix R, Miller ER, Valadka AB, Hayes RL. The use of blood-based biomarkers to improve the design of clinical trials of traumatic brain injury. *Handbook of Neuro Clin Trials*, 2<sup>nd</sup> ed. US, Elsevier, 2018:139-66.

142. Steinhäuser C, Grunnet M, Carmignoto G. Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2016, 323:157-69.
143. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008, 57(2):178-201.
144. Adibhatla RM, Hatcher JF. Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurolog Dis-Drug Target* 2008, 7(3):243-53.
145. Choi Y-K, Kim K-W. Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Reports* 2008, 41(5):345-52.
146. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J of Neuro Pharma* 2006, 1(3):223-36.
147. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud P-O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Bioch et Biophy Acta-Bio* 2009, 1788(4):842-57.
148. Dore-Duffy P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Cur Pharma Design* 2008, 14(16):1581-93.
149. Bagley RG, Weber W, Rouleau C, Teicher BA. Pericytes and endothelial precursor cells: cellular interactions and contributions to malignancy. *Cancer Research* 2005, 65(21):9741-50.
150. Pfeiffer T, Attwell D. Brain’s immune cells put the brakes on neurons. *Nature* 2020, 310(65):41-5.
151. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010, 330(6005):841-5.
152. Lai C-H, Kuo K-H, Leo JM. Critical role of actin in modulating BBB permeability. *Brain Research* 2005, 50(1):7-13.
153. Allt G, Lawrenson J. Pericytes: cell biology and pathology. *Cell Tissu Org* 2001, 169(1):1-11.
154. Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Kataoka Y. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood–brain barrier functions through transforming growth factor- $\beta$  production. *Brain Research* 2005, 1038(2):208-15.

155. Al Ahmad A, Gassmann M, Ogunshola O. Maintaining blood–brain barrier integrity: pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *J of Cell Phys* 2009, 218(3):612-22.
156. Hamilton NB, Attwell D, Hall CN. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front in Neuro* 2010, 2:5.
157. VanGilder RL, Rosen CL, Barr TL, Huber JD. Targeting the neurovascular unit for treatment of neurological disorders. *Pharma Therap* 2011, 130(3):239-47.
158. Grant GA, Abbott NJ, Janigro D. Understanding the physiology of the blood-brain barrier: in vitro models. *Physiology* 1998, 13(6):287-93.
159. Herda LM, Polo E, Kelly PM, Rocks L, Hudecz D, Dawson KA. Designing the future of nanomedicine: current barriers to targeted brain therapeutics. *Euro J of Nano* 2014, 6(3):127-39.
160. Grieb P, Forster R, Strome D, Goodwin C, Pape P. O<sub>2</sub> exchange between blood and brain tissues studied with 18 O<sub>2</sub> indicator-dilution technique. *J of Appl Phys* 1985, 58(6):1929-41.
161. Zhang Y, Pardridge WM. Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood–brain barrier. *J of Neuro* 2001, 76(5):1597-600.
162. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A, editors. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Sem in Cell & Develop Bio* 2015,82(4):123-7.
163. Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport* 2001, 12(16):3557-60.
164. Dickens D, Radisch S, Pirmohamed M. Drug Transporters at the Blood–Brain Barrier. *Drug Transport*, 2016: 151-83.
165. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino LJJoCR. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J of Control Release* 2016, 235:34-47.
166. Friedman A. Blood–brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg? *Epilepsia* 2011, 52:19-20.
167. Marchi N, Granata T, Alexopoulos A, Janigro D. The blood–brain barrier hypothesis in drug resistant epilepsy. *Brain* 2012, 135(4):211.

168. Nitsch C, Klatzo I. Regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. *J of The Neuro Sci* 1983, 59(3):305-22.
169. Öztaş B, Kaya M. The effect of acute hypertension on blood-brain barrier permeability to albumin during experimentally induced epileptic seizures. *Pharmac Research* 1991, 23(1):41-6.
170. Deshpande T, Li T, Herde MK, Becker A, Vatter H, Schwarz MK, Bedner P. Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* 2017, 65(11):1809-20.
171. Rigau V, Morin M, Rousset M-C, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, Lerner-Natoli M. Angiogenesis is associated with blood–brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* 2007, 130(7):1942-56.
172. Kim SY, Buckwalter M, Soreq H, Vezzani A, Kaufer D. Blood–brain barrier dysfunction–induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. *Epilepsia* 2012, 53:37-44.
173. Marchi N, Granata T, Freri E, Ciusani E, Ragona F, Puvenna V, Janigro D. Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. *PLoS One* 2011, 6(3):18200.
174. Kaya M, Gulturk S, Elmas I, Kalayci R, Arican N, Kocyildiz ZC, Sivas A. The effects of magnesium sulfate on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats. *Life Sci* 2004, 76(2):201-12.
175. Arican N, Kaya M, Yorulmaz C, Kalayci R, Ince H, Kucuk M, Elmas I. Effect of hypothermia on blood-brain barrier permeability following traumatic brain injury in chronically ethanol-treated rats. *Inter J of Neuro* 2006, 116(11):1249-61.
176. Ko A-R, Kim JY, Hyun H-W, Kim J-E. Endothelial NOS activation induces the blood–brain barrier disruption via ER stress following status epilepticus. *Brain Research* 2015,1622:163-73.
177. Zhang H, Gu YT, Xue YX. Bradykinin-induced blood–brain tumor barrier permeability increase is mediated by adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel. *Brain Research* 2007, 1144:33-41.
178. Tetzlaff K, Shank ES, Muth CM. Evaluation and management of decompression illness-an intensivist's perspective. *Inten Care Med* 2003, 29(12):2128-36.

179. Pm T, Edelsberg J. Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med* 1996, 334:1642-8.
180. Lischper M, Beuck S, Thanabalasundaram G, Pieper C, Galla H-J. Metalloproteinase mediated occludin cleavage in the cerebral microcapillary endothelium under pathological conditions. *Brain Research* 2010,1326:114-27.
181. Daneman R, Prat A. The blood–brain barrier. *C Spr Harbor Perspect in Bio* 2015, 7(1):204-12.
182. Palade GE. The endoplasmic reticulum. *The J Of Bio Bioch Cyto* 1956, 2(4):85.
183. Zhang K, Kaufman RJJN. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008, 454(7203):455-62.
184. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The J of Clin Invest* 2005, 115(10):2656-64.
185. Smirle J, Au CE, Jain M, Dejgaard K, Nilsson T, Bergeron J. Cell biology of the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus through proteomics. *C Spr Harbor Perspect in Bio* 2013, 5(1):015073.
186. Endoplasmic reticulum <https://www.britannica.com/science/endoplasmic-reticulum>. Son erişim tarihi:19.08.2020.
187. Görlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies K-U, Rapoport TA. A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 1992, 71(3):489-503.
188. Seiser RM, Nicchitta CV. The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis. *J of Bio Chem* 2000, 275(43):33820-7.
189. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Ann Review of Bioch* 2004, 73(1):1019-49.
190. Dobson CM, Šali A, Karplus M. Protein folding: a perspective from theory and experiment. *Ang Chemie Inter Edit* 1998, 37(7):868-93.
191. Murao N, Nishitoh H. Role of the unfolded protein response in the development of central nervous system. *The J of Bioch* 2017, 162(3):155-62.
192. Hussain SG, Ramaiah KV. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *Cur Science* 2007, 1684-96.
193. Colgan SM, Al-Hashimi AA, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. *Exp Rev in Molecul Med* 2011,13.
194. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports* 2006, 7(9):880-5.



195. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J of Bio Chem* 2002, 277(15):13045-52.
196. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*. 2009;14(8):996-1007.
197. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999, 397(6716):271-4.
198. Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Fougelle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trend in Endoc Metabol* 2012, 23(8):381-90.
199. Fu J, Tao T, Li Z, Chen Y, Li J, Peng LJ. The roles of ER stress in epilepsy: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Bio Pharma* 2020, 131:110658.
200. Chen J, Zheng G, Guo H, Shi Z. Role of endoplasmic reticulum stress via the PERK signaling pathway in brain injury from status epilepticus. *J of Molec Neurosc* 2014, 53(4):677-83.
201. Kim JS, Kim H, Yi C, Shin HJ, Han JW, Roh GS. Salubrinal, ER stress inhibitor, attenuates kainic acid-induced hippocampal cell death. *J of Neu Trans* 2014, 121(10):1233-43.
202. Sha Z, Sha L, Xu Q. Expressions of CCAAT/enhancer-binding Protein Homologous Protein and Calnexin in the Hippocampus of a Mouse Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Acta Academ Med Sin* 2016, 38(3):265-70.
203. Fu J, Peng L, Wang W, He H, Zeng S, Chen TC, Chen Y. Sodium Valproate Reduces Neuronal Apoptosis in Acute Pentylentetrazole-Induced Seizures via Inhibiting ER Stress. *Neuro Research* 2019, 44(11):2517-26.
204. Engel T, Sanz-Rodriguez A, Jimenez-Mateos EM, Concannon CG, Jimenez-Pacheco A, Moran C, Henshall DC. CHOP regulates the p53-MDM2 axis and is required for neuronal survival after seizures. *Brain Research* 2013, 136(2):577-92.
205. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Walter P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007, 318(5852):944-9.

206. Ye Y, Xiong J, Hu J, Kong M, Cheng L, Chen H, Jiang L. Altered hippocampal myelinated fiber integrity in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: a histopathological and stereological investigation. *Brain Research* 2013, 1522:76-87.
207. Sheedy C, Mooney C, Jimenez-Mateos E, Sanz-Rodriguez A, Langa E, Mooney C, Engel T. De-repression of myelin-regulating gene expression after status epilepticus in mice lacking the C/EBP homologous protein CHOP. *Inter J of Phys, Pathophys Pharma* 2014, 6(4):185.
208. Liu G, Guo H, Guo C, Zhao S, Gong D, Zhao Y. Involvement of IRE1 $\alpha$  signaling in the hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bul* 2011, 84(1):94-102.
209. Jiao Y, Deng X-L, Li G-Q. Effects of edaravone on IRE1 mRNA expression and neuronal apoptosis in the hippocampus of rats with status convulsivus. *J of Contemp Pediatr* 2009, 11(6):471-5.
210. Akerman CJ, Cline HT. Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. *Trends in Neurosc* 2007,30(8):382-9.
211. Vithlani M, Terunuma M, Moss S. The dynamic modulation of GABAA receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Phys Reviews* 2011, 91(3):1009-22.
212. Gallagher MJ, Ding L, Maheshwari A, Macdonald RL. The GABAA receptor  $\alpha 1$  subunit epilepsy mutation A322D inhibits transmembrane helix formation and causes proteasomal degradation. *Proceed of the Nat Acad of Sci* 2007, 104(32):12999-3004.
213. Kezuka D, Tkarada-Iemata M, Hattori T, Mori K, Takahashi R, Kitao Y, Hori O. Deletion of Atf6 $\alpha$  enhances kainate-induced neuronal death in mice. *Neuroch Inter* 2016, 92:67-74.
214. Fu Y-L, Han D-Y, Wang Y-J, Di X-J, Yu H-B, Mu T-W. Remodeling the endoplasmic reticulum proteostasis network restores proteostasis of pathogenic GABAA receptors. *PLoS One* 2018, 13(11):0207948.
215. Teichgräber LA, Lehmann TN, Meencke HJ, Weiss T, Nitsch R, Deisz RA. Impaired function of GABAB receptors in tissues from pharmacoresistant epilepsy patients. *Epilepsia* 2009, 50(7):1697-716.

216. Steiger JL, Bandyopadhyay S, Farb DH, Russek SJ. cAMP response element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream stimulatory factor differentially control hippocampal GABABR1a and GABABR1b subunit gene expression through alternative promoters. *J of Neuro Met* 2004, 24(27):6115-26.
217. Corona C, Pasini S, Liu J, Amar F, Greene LA, Shelanski ML. Activating Transcription Factor 4 (ATF4) regulates neuronal activity by controlling GABABR trafficking. *J of Neuro* 2018, 38(27):6102-13.
218. N-(p-amylocinnamoyl) anthranilic acid (ACA) <http://www.abcam.com/n-p-amylocinnamoylanthranilic-acid-ab141555.html>. Son erişim tarihi: 25.11.2020.
219. Konrad RJ, Jolly YC, Major C, Wolf BA. Inhibition of phospholipase A2 and insulin secretion in pancreatic islets. *Bioch et Biophys Acta-Molec Cell Res* 1992, 1135(2):215-20.
220. Harteneck C, Frenzel H, Kraft R. N-(p-amylocinnamoyl) anthranilic acid (ACA): a phospholipase A2 inhibitor and TRP channel blocker. *Cardi Drug Reviews* 2007, 25(1):61-75.
221. Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-amylocinnamoyl) anthranilic acid. *Brit J of Pharmacol* 2006, 148(3):264-73.
222. Chung KK, Freestone PS, Lipski J. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J of Neurophys* 2011, 106(6):2865-75.
223. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989, 2(4):1313-23.
224. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiolog Reviews* 2007, 87(1):165-217.
225. Cook NL, Vink R, Helps SC, Manavis J, van den Heuvel C. Transient receptor potential melastatin-2 expression is increased following experimental traumatic brain injury in rats. *J of Molecul Neuro* 2010, 42(2):192-9.
226. Lipski J, Park TI, Li D, Lee SC, Trevarton AJ, Chung KK, Bai JZ. Involvement of TRP-like channels in the acute ischemic response of hippocampal CA1 neurons in brain slices. *Brain Research* 2006;1077(1):187-99.

227. Olah ME, Jackson MF, Li H, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, MacDonald JF. Ca<sup>2+</sup>-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *The J of Phys* 2009, 587(5):965-79.
228. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003, 426(6966):517-24.
229. Gonzalez-Reyes LE, Ladas TP, Chiang C-C, Durand DM. TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity in vitro and electrographic seizures in vivo. *Exper Neuro* 2013, 250:321-32.
230. Brown RC, Wu L, Hicks K, O'neil RG. Regulation of blood-brain barrier permeability by transient receptor potential type C and type v calcium-permeable channels. *Microcirculation* 2008, 15(4):359-71.
231. Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Role of TRPM2 channel in mediating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Research* 2008, 102(3):347-55.
232. Nazıroğlu M. Epilepsi Nörobijolojisinde TRPM2 Katyon Kanallarının Rolünün Sıçan Hipokampus Sinir Hücrelerinde Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinir Bilimleri Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2018.
233. Malko P, Jiang L-H. TRPM2 channel-mediated cell death: an important mechanism linking oxidative stress-inducing pathological factors to associated pathological conditions. *Redox Biology* 2020, 101:755.
234. Charmandari E, Johnston A, Brook C, Hindmarsh P. Bioavailability of oral hydrocortisone in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J of Endoc* 2001,169(1):65-70.
235. Hydrocortisone-general structure [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-hydrocortisone-cortisol-1\\_fig151\\_287602840](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-hydrocortisone-cortisol-1_fig151_287602840). Son erişim tarihi: 11.12.2020.
236. Mackay M, Weiss S, Adams-Webber T, Ashwal S, Stephens D, Ballaban-Gill K, Snead O. Practice parameter: medical treatment of infantile spasms: report of the American Academy of Neurology and the Child Neurology Society. *Neurology* 2004, 62(10):1668-81.
237. Kneen R, Appleton R. Alternative approaches to conventional antiepileptic drugs in the management of paediatric epilepsy. *Arch of Disease in Childhood* 2006, 91(11):936-41.

238. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterio, Throm, Vasc Bio* 2011, 31(5):986-1000.
239. Joels M. Corticosteroid actions in the hippocampus. *J of Neuroendoc* 2001, 13(8):657-69.
240. Carver CM, Wu X, Gangisetty O, Reddy DS. Perimenstrual-like hormonal regulation of extrasynaptic  $\delta$ -containing GABAA receptors mediating tonic inhibition and neurosteroid sensitivity. *J of Neuro* 2014, 34(43):14181-97.
241. Chuang S-H, Reddy DS, Therapeutics E. Genetic and molecular regulation of extrasynaptic GABA-A receptors in the brain: therapeutic insights for epilepsy. *J of Pharmacol* 2018, 364(2):180-97.
242. Antonetti DA, Wolpert EB, DeMaio L, Harhaj NS, Scaduto Jr RC. Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J of Neuroch* 2002, 80(4):667-77.
243. Shang N-X, Zou L-P, Zhao J-B, Zhang F, Li H. Association between prenatal stress and infantile spasms: a case-control study in China. *Ped Neuro* 2010, 42(3):181-6.
244. Young NA, Teskey GC, Henry LC, Edwards HE. Exogenous antenatal glucocorticoid treatment reduces susceptibility for hippocampal kindled and maximal electroconvulsive seizures in infant rats. *Exper Neuro* 2006, 198(2):303-12.
245. Velišek L. Prenatal exposure to betamethasone decreases anxiety in developing rats: hippocampal neuropeptide y as a target molecule. *Neuropsychopharm* 2006, 31(10):2140-9.
246. Lin JH. How significant is the role of P-glycoprotein in drug absorption and brain uptake. *Drugs Today* 2004, 40(1):5-22.
247. Thomas S. Anti-HIV drug distribution to the central nervous system. *C Pharmac Design* 2004, 10(12):1313-24.
248. Volk H, Burkhardt K, Potschka H, Chen J, Becker A, Löscher W. Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neuroscience* 2004, 123(3):751-9.
249. Sun H, Dai H, Shaik N, Elmquist WF. Drug efflux transporters in the CNS. *Advanc Drug Del Reviews* 2003, 55(1):83-105.

250. Butani L. Corticosteroid-induced hypersensitivity reactions. *An of Allergy, Asth Immun* 2002, 89(5):439-45.
251. Depaulis A, Charpier S. Pathophysiology of absence epilepsy: Insights from genetic models. *Neuro Letters* 2018, 667:53-65.
252. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *JoVE* 2012, (65):3564.
253. Corp I. IBM SPSS statistics for windows, version 22.0. Armonk, NY: *IBM Corp* 2013.
254. Chen J, Cai F, Jiang L, Hu Y, Feng C. A prospective study of dexamethasone therapy in refractory epileptic encephalopathy with continuous spike-and-wave during sleep. *Epilepsy Behavior* 2016, 55:1-5.
255. Çakır M. Sıçanlarda Okadaik Asit ile Oluşturulan Nörodejenerasyona ACA'nın Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2016.
256. Grosso S, Farnetani M, Mostardini R, Cordelli D, Berardi R, Balestri P. A comparative study of hydrocortisone versus deflazacort in drug-resistant epilepsy of childhood. *Epilepsy Research* 2008, 81(1):80-5.
257. Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mole Life Sci* 2008, 65(6):862-94.