



T.C.

SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN EPİLEPTİK NÖBET
MODELİNDE NOX-1 ENZİM İNHİBİSYONUNUN ETKİLERİNİN İN-
VİTRO VE İN-VİVO İNCELENMESİ**

Dr. Ahmet Ozan KALECİ

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

SİVAS

2025



T.C.

SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN EPİLEPTİK NÖBET
MODELİNDE NOX-1 ENZİM İNHİBİSYONUNUN ETKİLERİNİN İN-
VİTRO VE İN-VİVO İNCELENMESİ**

Dr. Ahmet Ozan KALECİ

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Ahmet ALTUN

SİVAS

2025



Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010/1-2 sayılı kararı ile kabul edilerek yürürlüğe girmiştir. Bu tez bu yönetmelik hükümlerine göre yazılmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez sürecimde bilimsel rehberliği, yönlendirmeleri ve desteğiyle bana yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Ahmet ALTUN'a; fahri danışmanım Doç. Dr. Ahmet Şevki TAŞKIRAN'a; bilgi birikimiyle her zaman ilham aldığım kıymetli hocam Prof. Dr. İhsan BAĞÇIVAN'a teşekkür ederim.

Elektrofizyoloji laboratuvarının kullanımına izin vererek çalışmama önemli katkı sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ercan ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı olarak uzmanlık sürecim boyunca akademik ve insani desteğini daima hissettiren Prof. Dr. Şahin YILDIRIM'a; bölümümüzün değerli hocaları Prof. Dr. Mustafa Kemal YILDIRIM, Prof. Dr. Bülent SARAÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Mesut PARLAK'a katkıları ve destekleri için şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışmasına sağladığı maddi katkı nedeniyle Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, T-2024-1052 numaralı proje kapsamında desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, sevgileriyle beni her zaman motive eden kıymetli annem Dr. Süreyya KALECİ, babam Dr. Nizamettin KALECİ, ablam Şule Merih TEKİR ve halam Yıldız KALECİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ahmet Ozan KALECİ

Sivas, 2025

ÖZET

PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN EPİLEPTİK NÖBET MODELİNDE NOX-1 ENZİM İNHİBİSYONUNUN ETKİLERİNİN İN- VİTRO VE İN-VİVO İNCELENMESİ

Ahmet Ozan KALECİ,

Tıbbi Farmakoloji A.B.D.

Sivas 2025

Bu çalışmanın amacı pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan nörotoksisite ve epileptik nöbet modellerinde, NADPH Oksidaz-1 (NOX-1) enzim inhibisyonunun sinir doku üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Çalışmanın *in vitro* aşamasında SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanıldı. PTZ ile oluşturulan toksisite sonrası NOX-1 inhibitörü ML-171'in hücre ölümü üzerindeki etkisini incelemek için hücreler altı gruba ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı; toksisite modeli oluşturmak amacıyla PTZ grubuna 24 saat süresince 30 mM PTZ uygulandı. Diğer deney gruplarına öncelikle farklı derişimlerde ML-171 veya valproik asit (VPA) uygulanmış, bu uygulamadan 3 saat sonra kombinasyon gruplarındaki hücrelere 30 mM PTZ eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı (XTT testi), total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS), apoptoz ve nekroz oranları (Annexin V flow sitometri) ve Bax, Bcl-2, bölünmüş kaspaz-3 düzeyleri (ELISA) ölçüldü.

Çalışmanın *in vivo* ayağında 230–250 g ağırlığında toplam 48 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlara PTZ (35 mg/kg, *i.p.*) ile kindling protokolü uygulanarak epileptik nöbet modeli oluşturuldu. Tutuşmuş sıçanlara elektrot yerleştirilerek ML-171'in farklı dozlarının elektrokortikogram (ECoG) kayıtları üzerindeki etkileri değerlendirildi. Deney sonunda tüm sıçanlar anestezi altında servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek hipokampal beyin dokuları çıkarıldı. Bu dokularda Bax, Bcl-2 ve bölünmüş kaspaz-3 düzeyleri ELISA yöntemiyle; oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS) ise spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ayrıca NOX-1 protein ekspresyonu olası değişimleri tespit etmek için için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Bulgulara göre, ML-171 hem hücre kültüründe hem de sıçan epilepsi modelinde oksidatif stres seviyelerini azalttı, hücre canlılığını artırdı ve apoptoz belirteçlerini baskıladı. Elektrokortikografi (ECoG) kayıtlarında ML-171'in nöbet şiddetini azalttığı ve jeneralize tonik-klonik nöbete (JTKN) giriş zamanı düşürdüğü gözlemlendi. VPA ve ML-171 uygulanan gruplarda hipokampal dokuda yapılan histopatolojik değerlendirmede piknotik-dejeneratif değişimlerin, immünohistokimyasal değerlendirmede ise NOX-1 ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak elde edilen bulgular, NOX-1 inhibitörü ML-171'in epileptik nöbet sonrası oluşan oksidatif stres, apoptoz ve elektrofizyolojik bozuklukları azalttığını ve potansiyel antiepileptik etkilere sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, Oksidatif Stres, PTZ, Apoptoz

ABSTRACT

IN-VITRO AND IN-VIVO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NOX-1 ENZYME INHIBITION IN A PENTYLENETETRAZOL-INDUCED EPILEPTIC SEIZURE MODEL

Ahmet Ozan KALECİ,

Department of Medical Pharmacology,

Sivas, 2025

The aim of this study is to investigate the effects of NADPH Oxidase-1 (NOX-1) enzyme inhibition on nervous tissue in neurotoxicity and epileptic seizure models induced by pentylenetetrazol (PTZ).

SH-SY5Y human neuroblastoma cell line was used in the in vitro phase of the study. Cells were divided into six groups to examine the effect of NOX-1 inhibitor ML-171 on cell death after PTZ-induced toxicity. No treatment was applied to the control group; 30 mM PTZ was applied to the PTZ group for 24 hours to create a toxicity model. First, ML-171 or valproic acid (VPA) was applied at different concentrations to the other experimental groups, and 30 mM PTZ was added to the cells in the combination groups 3 hours after this application. At the end of the 24-hour incubation period, cell viability (XTT test), total antioxidant level (TAS) and total oxidant level (TOS), apoptosis and necrosis rates (Annexin V flow cytometry) and Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3 levels (ELISA) were measured.

In the in vivo part of the study, a total of 48 male Wistar Albino rats weighing 230–250 g were used. An epileptic seizure model was created by applying a kindling protocol with PTZ (35 mg/kg, i.p.) to the rats. The effects of different doses of ML-171 on electrocorticogram (ECoG) recordings were evaluated by placing electrodes on the epileptic rats. At the end of the experiment, all rats were sacrificed under anesthesia by cervical dislocation and their hippocampal brain tissues were removed. Bax, Bcl-2 and cleaved caspase-3 levels in these tissues were measured by ELISA; Oxidative stress markers (TAS, TOS) were measured spectrophotometrically. In

addition, immunohistochemical staining was performed to detect possible changes in NOX-1 protein expression.

According to the findings, ML-171 reduced oxidative stress levels, increased cell viability and suppressed apoptosis markers both in cell culture and in the rat epilepsy model. Electrocorticography (ECoG) recordings showed that ML-171 reduced seizure severity and reduced the time to generalized tonic-clonic seizure. Histopathological evaluation of hippocampal tissue in the VPA and ML-171 groups revealed pyknotic-degenerative changes, while immunohistochemical evaluation showed decreased NOX-1 expression.

In conclusion, the findings show that the NOX-1 inhibitor ML-171 reduces oxidative stress, apoptosis and electrophysiological disorders that occur after epileptic seizures and may have potential antiepileptic effects.

Keywords: Epilepsy, Oxidative Stress, PTZ, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. EPİLEPSİ	5
2.1.1. Nöbet ve Epilepsi.....	5
2.1.2. Tarihçe	6
2.1.3. Epidemiyoloji.....	7
2.1.4. Sınıflama.....	7
2.1.5. Etiyoloji	10
2.1.6. Patofizyoloji.....	10
2.1.7. Tedavi	12
2.2. Oksidatif Stres Ve Epilepsi	15
2.3. Nadph Oksidazlar	17
2.4. Deneysel Epilepsi Modelleri	19
2.4.1. PTZ ile Oluşturulan Kindling Modeli.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. <i>In-Vitro</i> Çalışma Bölümleri	22
3.1.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	22
3.1.2. Hücre Kültürü Teknikleri.....	22

3.1.2.1. Hücre Hattının Açılması	22
3.1.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması	22
3.1.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	23
3.1.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	23
3.1.2.5. PTZ Toksikite Modelinin Oluşturulması ve Hücre Canlılık Tayini (XTT).....	23
3.1.2.6. Hücre Kültüründe Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçümü	25
3.1.2.7. Hücre Kültüründe Bax, Bcl-2, Bölünmüş Kaspaz 3 Seviyelerinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü.....	26
3.1.2.8. Total Protein Ölçümü.....	27
3.1.2.9. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayini	27
3.1.3. <i>In-Vivo</i> Çalışma Bölümleri	28
3.1.3.1. Deney Hayvanları	28
3.1.3.2. Deney Grupları	28
3.1.3.3. Stereotaksik Uygulama	32
3.1.3.4. Elektrofizyolojik Kayıtların Değerlendirilmesi	35
3.1.3.5. Biyokimyasal Analizler	36
3.1.3.6. Hipokampal Dokuda Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçümü	36
3.1.3.7. Hipokampal Dokuda Bax, Bcl-2, Bölünmüş Kaspaz 3 Seviyelerinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü	37
3.1.3.8. Total Protein Ölçümü.....	37
3.1.3.9. NOX-1 Protein Ekspresyonunun Tayini.....	37
3.1.4. İstatiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR	40
4.1. <i>In-Vivo</i> Çalışma Bulguları	40

4.1.1. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Hücre Canlılığına Etkisi.....	40
4.1.2. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde TAS ve TOS Üzerine Etkisi.....	42
4.1.3. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 Protein Düzeylerine Etkisi.....	44
4.1.4. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Flow Sitometri ile Apoptozis Üzerine Etkisi	46
4.2. <i>In-Vitro</i> Çalışma Bulguları.....	48
4.2.1. Epileptik Nöbet Bulguları.....	48
4.2.1.1. Modifiye Racine Skalası'na Göre Nöbet Evreleri.....	48
4.2.1.2. Grupların İlk Miyokolonik Jerk (İMJ) Süreleri.....	50
4.2.1.3. Grupların Epileptik Spike Sayısı.....	51
4.2.1.4. Grupların Jeneralize Tonik-Klonik Nöbete (JTK) Giriş Zamanı.....	52
4.2.1.5. Grupların Jeneralize Tonik-Klonik Nöbet Süresi.....	53
4.2.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları.....	54
4.2.2.1. Hipokampal Dokuda Total Oksidan (TOS) ve Total Antioksidan (TAS) Düzeyleri.....	54
4.2.2.2. Hipokampal Bax, Bcl-2 ve Bölünmüş Kaspaz-3 Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi.....	56
4.2.3. Histopatolojik Bulgular.....	58
4.2.4. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	60
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR.....	75

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Uluslararası Nöbet Sınıflaması (2025).....	9
Tablo 2. Anti-epileptik ilaçlar, etki mekanizmaları ve kullanıldıkları nöbet tipler....	14
Tablo 3. Deney Grupları.....	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3 1. LabChart programı ile ECoG kayıtlarının alınması.....	34
_Toc201856606 Şekil 3 2. ECoG kayıtlarında değerlendirilen parametreler	34
Şekil 4 1. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Hücre Canlılığına Etkisi.....	41
Şekil 4 2. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde TAS ve TOS Üzerine Etkisi.....	43
Şekil 4 3. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 Protein Düzeylerine Etkisi	45
Şekil 4 4. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Flow Sitometri ile Apoptozis Üzerine Etkisi	47
Şekil 4 5. Modifiye Racine Skalası'na Göre Nöbet Evreleri.....	49
Şekil 4 6. Grupların İlk Miyokolonik Jerk (İMJ) Süreleri	50
Şekil 4 7. Grupların Epileptik Spike Sayısı	51
Şekil 4 8. Grupların Jeneralize Tonik-Klonik Nöbete (JTKN) Giriş Zamanı.....	52
Şekil 4 9. Grupların Jeneralize Tonik-Klonik Nöbet Süresi	53
Şekil 4 10. Hipokampal Dokuda Total Oksidan (TOS) ve Total Antioksidan (TAS) Düzeyleri	55
Şekil 4 11. Hipokampal Bax, Bcl-2 ve Bölünmüş Kaspaz-3 Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi	57
Şekil 4 12. PTZ uygulaması sonrası CA1 ve CA3 hipokampal bölgelerinde hematoksilen-eozin boyası ile belirlenen histopatolojik hasar skorları.	59
Şekil 4 13. CA1 ve CA3 hipokampal bölgelerinde NOX-1 ekspresyon düzeylerinin immünohistokimyasal skorlaması.....	60

KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
AMPA	α -Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
ANI	Anti-nöbet İlaçları
ANOVA	Varyans Analizi
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BAX	Bcl-2 İlişkili X protein
BCL-2	B-hücre lenfoma 2 protein
BSA	Sığır Serum Albumin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle's mediumu
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA Metiltransferaz
DUOX	Dual Oksidaz
ECoG	Elektrokortikografi
EEG	Elektroensefalografi
ELİSA	Enzim bağlantılı immünosorbent analiz
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FBS	Fetal Bovine Serum
GABA	Gamma-Aminobutirik Asit
GABA-A	GABA-A reseptörü
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HDAC	Histon Deasetilaz
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
ILAE	Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği
İMJ	İlk Miyoklonik Jerk

JTKN	Jeneralize Tonik-Klonik Nöbet
MDA	Malondialdehit
MES	Maksimal Elektrokonvülsif Şok
ML-171	2-Asetilfenotiyazin
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NMDA	N-Metil-D-Aspartik Asit
NOX-1	NADPH Oksidaz-1
O₂⁻	Süperoksit Anyonu
OH⁻	Hidroksil Radikali
XO	Ksantin Oksidaz
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PKD	Pirüvat Dehidrogenaz Kinaz
PKC	Protein Kinaz C
PTZ	Pentilentetrazol
Rac1	Ras-ilişkili C3 botulinum toksin substrat 1
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCN1A	Sodyum Kanalı Tip 1A
SE	Status Epileptikus
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAS	Total Antioksidan Seviyesi
TLE	Temporal Lob Epilepsisi
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü alfa
TOS	Total Oksidan Seviyesi
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
VPA	Valproik Asit
WAG/Rij	Wistar Albino Glaxo/Rijswijk
XTT	2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid

1. GİRİŞ

Nöbet veya epileptik nöbet beyin dokusunda aşırı veya eş zamanlı anormal nöronal aktiviteye bağlı olarak belirti ve/veya semptomların geçici olarak ortaya çıktığı dönemi tanımlar (1). Nöbetler, aberan iyon kanalları aktivasyonu, anormal nörotransmitter salınımı, mikroglial aktivasyon ve nöroinflamasyon gibi patolojik faktörler tarafından etkilenmiş serebral nöronların anormal deşarji ile meydana gelir (2)Epilepsi ise herhangi tetikleyici bir etken olmadan başlayan tekrarlayıcı nöbetlerle karakterize bir santral sinir sistemi hastalığıdır(3) Epilepsi beyinde yer alan kortikal sinir ağlarında eksitatör ve inhibitör nörotransmisyonun dengesini bozarak nöronlarda hipersenkronizasyona yol açmakta bu durum kişinin motor ve kognitif fonksiyonlarında bozulmaya sebep olmaktadır (4) Tüm dünyada her yaş ve sosyoekonomik gruptan kişileri etkileyebilen epilepsiden muzdarip olan 70 milyon insanın yaşadığı tahmin edilmektedir. Hastalığın sebep olduğu fiziksel, bilişsel ve psikiyatrik komorbiditelere ek olarak kaza, yaralanmalar ve toplumsal damgalanma epilepsi hastalarının yaşam kalitesini önemli ölçüde olumsuz etkilemektedir (5). Tüm bu durumlar epilepsinin önemli bir halk sağlığı sorunu olduğuna işaret etmektedir.

Deneysel epilepsi modelleri epilepsi, epileptik nöbet ve epileptojenezin temel mekanizmalarının anlaşılması için geliştirilmiştir. Epilepsi ve epileptik nöbet modeli oluşturmak için literatürde kabul görmüş çok sayıda yöntem mevcuttur. GABA-A reseptörünün selektif antagonisti olan pentilentetrazol (PTZ), nöbet oluşturmak için kullanılan kimyasal bir ajandır. Hücre kültüründe akut nöbet modeli için uygulanan yöntemlerden biri nöron benzeri karakterdeki hücre hatlarını PTZ toksisitesine maruz bırakmaktır. (6).

Epilepsi ve nöbet için oluşturulan hayvan modelleri epilepsi patogenezinin temel mekanizmaları anlamamızı sağlamanın yanı sıra, yeni anti-epileptik ilaçların (AEİ) keşfinde ve geliştirilmesinde oldukça faydalıdır. (7). Bu modellerden biri olan tutuşma (kindling) modeli, elektriksel veya kimyasal subkonvülsif uyarıların tekrarlı uygulanmasıyla artan konvülsiyon cevabı ile sonuçlanan bir durumdur. PTZ'nin subakut dozlarda uygulanmasıyla oluşturulan kimyasal kindling, epilepsi oluşum sürecinde beyindeki nörobiyolojik süreçleri ve yapısal değişiklikleri araştırmak için yaygın olarak kullanılan modellerden biridir (8). PTZ ile indüklenen kimyasal tutuşma

modeli insan absans epilepsisi, miyoklonik, jeneralize tonik-klonik (primer jeneralize) ve ilaca dirençli epilepsiye karşılık olarak kabul edilmektedir (9).

Santral sinir sisteminde meydana gelen oksidatif/nitrativ stres ve nöroinflamasyon, demans, karsinogenez ve epilepsi gibi hastalıkların altında yatan neden olarak dikkat çekmektedir (10). Beyin hücrelerinin membran yapısında yoğun olarak bulunan poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna uğraması ve beyinde katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin nispeten düşük olması onları serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı vücuttaki diğer hücrelere göre çok daha korunmasız kılmaktadır (11). Beyinde nöbet gibi patolojik aktivitelere bağlı meydana gelen oksijen radikallerinin ani artışı, beynin zayıf antioksidan kapasitesi ile de doğrudan ilişkili şekilde serotonin, dopamin ya da norepinefrin gibi nörotransmitterleri de okside ederek fonksiyonlarını bozmaktadır (12). Reaktif oksijen radikallerinin iyon kanallarını etkilemesi önemli bir epilepsi mekanizması olup, semptomların hızla kötüleşmesi ile sonuçlanabilir. Buradaki ana mekanizma nöbetle meydana gelen apoptozise bağlı hücre ölümüdür (13). Epilepside ROS üretimi özellikle mitokondriyal disfonksiyon ve buna bağlı olarak NOX ve ksantin oksidaz (XO) aktivitesindeki artıştan kaynaklanmaktadır (14).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda oksidatif stresin hücrelerde yarattığı yıkımı önlemeye yönelik antioksidan kullanımı beklenen yararlı etkiyi çeşitli sebeplerden dolayı sağlayamamıştır. Bundan dolayı pek çok araştırmacı hücrel ROS kaynaklarının inhibisyonuna çözümler üretmeye yönelmiştir. Hücrel ROS kaynakları incelendiğinde sadece NADPH Oksidazlar'ın primer işlevi ROS üretimi olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple NADPH Oksidazlara yönelik çalışmaların oksidatif stres ve yarattığı doku tahribatına karşı korunmada terapötik potansiyeli bulunmaktadır.(15).

Birçok hücrede oksidatif stresin yarattığı yıkımın başlıca araçları olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynağı çeşitli doku dağılım ve aktivasyon mekanizmaları bulunan NADPH Oksidaz (NOX) enzim ailesidir. NOX enzim ailesi NADPH'dan edinilen elektronun transferiyle moleküler oksijenden süperoksit radikali üretimini katalizleyen, membrana yerleşik çok alt birimli enzim komplekslerinden oluşmaktadır. Çeşitli NOX izoformlarının aşırı aktivasyonunun dokularda oluşturduğu

sitotoksik ve apoptotik etkiler çok sayıda farklı çalışmada gösterilmiştir. NOX enzim ailesinin insanda tanımlanmış 7 izoformu bulunmaktadır (16).

NOX1, NOX ailesinin bir izoformudur. Kolon, santral sinir sistemi, kalp, kemik iliği ve kohlea gibi farklı dokularda ifadelendiği gösterilmiştir. Santral sinir sisteminde ise serebral korteks, hipokampus, serebellum, substansiya nigra, hipotalamus ve serebral damarlarda ifadelendiği bildirilmiştir (17). NOX1 izoformunun inme sonrası gelişen patolojik durumda ifadesinin arttığı ve iskemik nöronal ölüm gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (18) (19) (20). Buna ek olarak NOX1'in vasküler demansta gerçekleşen ROS'a bağlı hipokampal nöron kaybında da etkisi ortaya konulmuştur (21). Farelerde oluşturulan Alzheimer modelinde Alzheimer'in erken dönemlerinde beyinde NOX1 ekspresyonunun arttığı ve muhtemelen Alzheimer patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir (22). Paraquat uygulamasıyla oluşturulan Parkinson modellerinde hem in vitro ve hem de in vivo olarak NOX1 ekspresyonu artışına sebep olduğu (23), NOX1 gen ekspresyonu "knock out" edilmiş farelerde Parkinson hastalığının belirteçlerinden biri olan α -sinüklein protein ekspresyonunun ve agregasyonun belirgin bir biçimde düştüğü, buna ek olarak dopaminerjik nöron kaybının önemli ölçüde azaldığını gösteren bir çalışma da mevcuttur (24). Bir başka nörolojik hastalık olan amyotrofik lateral sklerozun farelerde oluşturulan modelinde NOX1 ve izoformu NOX2'nin genetik olarak susturulmasının sağ kalım süresini anlamlı olarak artırdığını gösteren başka bir çalışma daha mevcuttur (25)

ML-171, 2-asetilfenotiyazin olarak da bilinen spesifik bir NOX1 oksidaz inhibitörüdür. (26). ML171'in NOX1 katalitik alt birimini hedeflediği ancak sitozolik düzenleyicilerini (NOXO1, NOXA1 veya Rac) etkilemediği görülmektedir. ML171, serotonin ve adrenerjik reseptörlere karşı düşük potensli olarak bazı inhibitör etkiler de göstermektedir. Bu bileşiğin in vivo uygulamalar için uygun farmakokinetik ve güvenlik özelliklerine sahip olduğu öngörülmüştür (27).

ML-171 ve NOX-1 inhibisyonunun oksidatif stresle ilişkili çeşitli sinir sistemi rahatsızlıkları üzerine olumlu etkisinin olabileceğini işaret eden bu çalışmalara rağmen, epilepsi üzerine etkileri ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çeşitli güncel araştırmalarda elde edilen sonuçlar ve laboratuvarımızda yapılan ön çalışmalar ışığında ML-171'in epilepsi üzerine terapötik etkisinin olabileceği kanaatine

varılmıştır. Çalışmamızda, NOX-1 inhibitörü ML-171 molekülünün, PTZ toksisitesine maruz bırakılarak oluşturulan hücresel/nöronal hasar modelinde SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanılarak hücre canlılığı, koruyucu etki, oksidatif stres ve apoptozis üzerindeki in-vitro etkileri ile Wistar Albino ratlarda PTZ ile oluşturulan epileptik nöbetler üzerindeki in-vivo etkilerinin bütüncül olarak araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2. 1.Epilepsi

2.1.1. Nöbet ve Epilepsi

Nöbetler, beyinde anormal elektriksel etkinliğine bağlı olan olarak oluşan geçici beyin fonksiyon bozukluğu dönemleridir. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (International League Against Epilepsy, ILAE) 2005 yılında epileptik nöbeti “*beyin nöronlarında anormal, hipersenkronize ve aşırı deşarjları sonucu gelişen ani ve geçici klinik belirti ve/veya bulguların görüldüğü durum*” olarak tanımlamıştır (28) Nöbette görülen anormal nöronal aktivite bilinç değişikliği, kasılmalar, duyuşsal veya otonomik belirtiler gibi klinik bulgulara yol açar. Nöbetler provoke ya da provoke edilmeden ortaya çıkabilir. Provoke edilmeden ortaya çıkan nöbetler akut semptomatik nöbetler olarak da tanımlanmakta ve elektrolit bozuklukları, toksinler, kafa travması, enfeksiyöz süreçler, vasküler anomaliler, tümörler gibi altta yatan sebeplere bağlı olarak çıkmaktadırlar. Akut semptomatik nöbetler bazı durumlarda epileptogenez sürecine yol açsa da genellikle altta yatan neden tekrarlamadığı sürece tekrar gözlemlenmezler (29)

Epilepsi ise herhangi bir tetikleyici neden olmadan başlayan (provoke edilmemiş) nöbetleri tekrarlayıcı olarak üreten kronik bir sinir sistemi rahatsızlığı olarak tanımlanmaktadır. ILAE'nin 2014 yılında epilepsinin klinik tanımı için vardığı uzlaşya göre aşağıda verilen kriterlerden birini sağlamak kişinin epilepsi hastası olduğunu doğrular (30);

- 24 saatten uzun arayla ortaya çıkan tetiklenmemiş en az iki nöbetin varlığı
- Tetiklenmeden görülen bir nöbet (veya refleks nöbet) ve ilerleyen 10 yıl içerisinde tekrar nöbet görülme ihtimalinin %60'ın üzerinde olması
- Herhangi bir epilepsi sendrom tanısı almış olmak

2.1.2. Tarihçe

Epilepsi insanlık tarihinde bilinen en eski hastalıklardan biridir. Milattan önce 2000’li yıllara ait bir Akad tabletinde nöbet geçiren bir insan tasvirine rastlanmıştır ve bu şöyle betimlenmiştir: "*Boynunun sola döndüğü, el ve ayaklarının gerildiği, gözlerinin faltaşı gibi açıldığı ve ağzından köpükler aktığı, bilincinin yerinde olmadığı...*" Mezopotamya uygarlıklarında farklı nöbet tiplerini tanımlayan belgelere de rastlanmıştır. Epileptik nöbetler Mezopotamya geleneğinde kötücül ruhların veya tanrısal güçlerin kişide zuhur etmesi şeklinde algılanmış, tedavisi ruhani ve dinsel ritüellerle yapılmaya çalışılmıştır (31).

Antik Mısır’da ise MÖ. 1700’lü yıllara ait bir buluntu olan Edwin Smith Papirüsü’nde ise kafa travmasını takiben gelişen nöbet benzeri durumların tasvirine rastlanmıştır. Bu Antik Mısırlıların Mezopotamyalılardan farklı olarak epileptik nöbetlerin doğaüstü sebeplerden çok somut sebeplere dayandığı keşfettiğini göstermiştir (32).

Antik Yunan’da Hipokrates “Kutsal Hastalık Üzerine” adlı eserinde nöbetlerin doğaüstü güçlerle ilişkilendirilmesine karşı çıkararak döneminde kabul gören anlayışa meydan okumuş ve epilepsinin beyinle ilişkili tıbbi bir rahatsızlık olduğunu belirtmiştir. Epilepsinin post-travmatik ve kalıtsal olabileceğini, bulaşıcı olmadığını, aura adı verilen ön belirtilerinin olabileceğini dile getirerek çağının çok ötesinde gözlemler dile getirmiş ancak çağlar boyu sürecek Aristoteles kaynaklı yanlış algıları ve genel inanışları değiştirmeyi başaramamıştır (33).

19. yüzyılda modern nörolojinin doğuşu ile epilepsiye bilimsel yaklaşımda günümüzde anlamıyla ortaya çıktı. 1849’da İngiliz nörolog Robert Bentley Todd’un beyinde elektriksel bir güç varlığını ve epileptik nöbetlerin beyin elektrik “deşarjları” ile oluşabileceğini iddia etti. 1857’de ilk antileptik ajan olan potasyum bromürün Charles Locock tarafından kullanılması, 1870’te Richard Caton’un hayvan beyinlerinden elektrik kaydı ölçmesi, takiben John Hughlings Jackson fokal nöbet teorisini geliştirmesi, 1929’da Hans Berger’in ilk insan elektroensefalografi kaydını tanımlaması bu dönemdeki devrimsel ilerlemelere destek olmuştur (34).

2.1.3. Epidemiyoloji

Tüm dünyada her yaş ve sosyoekonomik gruptan kişileri etkileyebilen epilepsiden muzdarip olan 50 ila 70 milyon insanın yaşadığı tahmin edilmektedir (5). Çeşitli çalışmalar insan popülasyonunda aktif epilepsi hastalığı prevalansını %0,4–1,0 arasında ölçmüş olup her bir ülkeden gelen veriler arasında farklar da bulunmakla birlikte genellikle düşük ve orta gelir seviyesine sahip ülkelerde prevalans ve insidans daha yüksek ölçülmüştür. Bu durum söz konusu ülkelerdeki tanı ve tedaviye erişim olanaklarının kısıtlılığı ve trafik kazası ve şiddete bağlı travmaların daha sık yaşanması gibi faktörlerle ilişkilendirilmektedir. ABD’de erişkinlerde aktif epilepsi prevalansı %1 olarak bildirilmiştir (35). Türkiye’de ise sınırlı popülasyonlar üzerinde yapılan saha çalışmalarında aktif epilepsi prevalansı %0,7 ila %1 Arasında bildirilmiştir(36).

Epilepsi her yaş grubunu etkilese de insidans ve prevalansının dağılımına bakıldığında 0-14 yaş aralığında ve 70 ve üstü yaş gruplarında zirve yapmaktadır. İlerleyen yaşla birlikte epilepsi mortalitesi de yükselmektedir (37). Hastalığın sebep olduğu fiziksel, bilişsel ve psikiyatrik komorbiditelere ek olarak kaza, yaralanmalar ve toplumsal damgalanma epilepsi hastalarının yaşam kalitesini önemli ölçüde olumsuz etkilemektedir Tüm bu durumlar epilepsinin önemli bir halk sağlığı sorunu olduğuna işaret etmektedir (38).

2.1.4. Sınıflama

Epilepsi hastaları için nöbetlerin doğru sınıflandırılması hastaların tanı ve tedavi kritik öneme sahiptir. Sınıflama doğru ve tedavi başarısında belirleyici rol oynamaktadır. Nöbetin tipi klinik ve elektroensafalografik gözlemlerden yola çıkarak belirlenmektedir (39).

18. yüzyılda yaşamış İsviçreli hekim Samuel-Auguste Tissot tarafından *Traité de l'Épilepsie* isimli çalışmasında ILAE tarafından ilk defa *grand état* (jeneralize tonik-klonik nöbet) ve *petit état* (absans nöbet) tanımlarını yaparak modern nöbet sınıflamasını ilk adımını atmıştır. Bu çalışmadan yola çıkan Fransız hekim Jean-Étienne Dominique Esquirol tarafından tanıtılan *grand mal* ve *petit mal* nöbet ayrımı 20. Yüzyıl sonuna kadar klinisyenler tarafından yaygın biçimde kullanıldı (40). Uluslararası geçerliliği olacak bir nöbet sınıflaması ilk kayda değer girişim Fransız epileptolog Henri Gastaut’un çabalarıyla oluşturulan kılavuzla 1969’da gerçekleşti. Bu

kılavuzu takiben 1981’de oluşturulan ve nöbetleri başlangıç şekillerine göre parsiyel ve jeneralize olarak ayıran sınıflama epileptik nöbet sınıflamasında modern ve uluslararası geçerli bir yaklaşımın gelişmesini sağlamıştır. ILAE 1981’de oluşturduğu nöbet sınıflamasına 1989’da epilepsiler ve epilepsi sendromlarını da dahil etmiştir. Literatürde ve pratik uygulama yaygın kabul gören bu sınıflama hastanın nöbet esnasındaki bilinç durumuna dayalı olarak kurulduğu için tüm nöbet türlerini kapsamakta yeterli görülmemiştir (41).

ILAE nöbet sınıflaması epilepsi üzerine bilgi birikiminin artışıyla 2017 ve 2025 yıllarında yapılan major güncellemelerle son halini almıştır. Güncel sınıflamaya göre nöbetler dört ana başlıkta toplanmıştır: Fokal, Jeneralize, Belirlenemeyen (fokal mi jeneralize mi olduğu tespit edilemeyen) ve Sınıflandırılmayan Nöbetler (42).

Fokal nöbetler beynin bir yarımküresindeki sınırlı bir ağdan kaynaklanan nöbetlerdir. Fokal nöbetler sırasında hasta bilinci (farkındalığı) tam açık olabilir veya kısmen/ tamamen bozulabilir; bilinç durumu fokal nöbetlerin alt tür ayrımında önemlidir. Jeneralize nöbetler başlangıç anından itibaren her iki beyin yarımküresini de içeren yaygın ağlar üzerinden ortaya çıkmaktadır. Bilincin her zaman bozulduğu ve motor bulguların da genellikle şiddetli olduğu gözlenmektedir. Bilinmeyen başlangıçlı nöbetler genellikle geçici bir sınıflama olarak kabul edilmektedir. Hastanın nöbetine ilişkin EEG kaydı, video kaydı veya nöbet anına şahit olan kişinin bulunmaması hastanın nöbeti bu sınıfa sokar. İlerleyen zamanlarda elde edilen klinik ve elektrofizyolojik verilerden hareketle hastanın nöbeti fokal veya jeneralize nöbet olarak sınıflandırılması olasıdır. Tüm verilere rağmen hastanın nöbetinin tipinin belirlenemediği nadir durumlarda nöbet “*Sınıflandırılmayan Nöbetler*” başlığına dahil edilir (43).

2025 ILAE nöbet sınıflamasında bazı kavramsal yenilikler getirilmiştir. Bunlardan başlıcaları şunlardır(42):

- Ana sınıflamadaki başlıklardan *başlangıç (onset)* terimi terkedildi.
- Sınıflayıcı (classifiers) ve Tanımlayıcı (descriptors) kavramları tanıtıldı: Sınıflayıcılar nöbetin başlangıç yeri, bilinç durumu ve nöbet tipi gibi nöbetin biyolojik alt yapısını tarif ederken, Tanımlayıcılar nöbetin semptomları ve seyri gibi klinik belirtilerini ayrıntılı olarak tanımlamakta kullanılacaktır.
- Farkındalık (awareness) yerine bilinç durumunun (consciousness) nöbet

sınıflamasında kullanılmasına karar verildi.

- 2017 sınıflamasında 63 adet nöbet tipi tanımlanmasına karşılık 2025'te toplamda 21 nöbet tipi olduğu kabul edilmiş, ciddi bir sadeleşmeye gidilmiştir.

Tablo 1.Uluslararası Nöbet Sınıflaması (2025)

<p>1. Fokal Nöbetler</p> <p>1.1. Bilinç korunmuş fokal nöbet</p> <p>1.2. Bilinç bozulmuş fokal nöbet</p> <p>1.3. Bilateral tonik-klonik nöbete ilerleyen fokal nöbet</p> <p>2. Odağı Bilinmeyen Nöbetler</p> <p>2.1. Bilinç korunmuş nöbet</p> <p>2.2. Bilinç bozulmuş nöbet</p> <p>2.3. Bilateral tonik-klonik nöbet</p> <p>3. Jeneralize Nöbetler</p> <p>3.1. Absans nöbetleri</p> <p>3.1.1. Tipik absans nöbeti</p> <p>3.1.2. Atipik absans nöbeti</p> <p>3.1.3. Myoklonik absans nöbeti</p> <p>3.1.4. Göz kapağı myoklonisi ile / olmadan absans</p> <p>3.2. Jeneralize tonik-klonik nöbetler</p> <p>3.2.1. Myoklonik-tonik-klonik nöbet</p> <p>3.2.2. Absanstan tonik-klonik nöbete geçiş</p> <p>3.3. Diğer jeneralize nöbetler</p> <p>3.3.1. Jeneralize myoklonik nöbet</p> <p>3.3.2. Jeneralize klonik nöbet</p> <p>3.3.3. Jeneralize negatif myoklonik nöbet</p> <p>3.3.4. Jeneralize epileptik spazm</p> <p>3.3.5. Jeneralize tonik nöbet</p> <p>3.3.6. Jeneralize atonik nöbet</p> <p>3.3.7. Jeneralize myoklonik-atonik nöbet</p> <p>4. Sınıflandırılmayan Nöbetler</p>
--

2.1.5. Etiyoloji

Akut (semptomatik nöbetler) beyinde geçici bir bozukluk oluşturan iskemik veya hemorajik inme, akut kafa travması, yüksek ateş, alkol yoksunluğu ve hipoglisemi gibi akut sağlık problemlerine bağlı olarak çıkmakta, neden ortadan kaldırıldığında genellikle tekrar etmemektedir. Bu nöbetler tekrarlayıcı ve tetikleyici sebep olmaksızın ortaya çıkan nöbetlere yatkınlıkla karakterize edilen epilepsi rahatsızlığından ayrı ele alınmaktadır (44).

ILAE 2017 sınıflandırmasında epilepsileri etiyojik olarak altı ana başlıkta toplamıştır. Bunlar; genetik, yapısal, enfeksiyöz, metabolik, immün ve bilinmeyen etiyojilerdir. Bununla birlikte epileptogenez sürecinin multifaktöriyel özelliği göz önünde bulundurulduğunda bir epilepsi hastasının hastalığı birden fazla etiyojik başlığa dahil edilebilir (45).

Epilepsi hastalığının etiyojisi hastanın yaşı başta olmak demografik özellikleriyle sıklıkla paralellik gösterir. Gelişmiş ülkelerde ve yaşlı nüfusta inme, travma ve tümör gibi beyin anatomisinde tahribat yaratan durumlar yaygınlığına bağlı olarak en sık rastlanan etiyoji yapısal etiyoji iken, çocukluk çağında genetik etiyoji, gelişmemiş ülkelerde ise enfeksiyöz etiyoji ön plandadır (46).

Gelişen teknoloji ve birlikte ilerleyen tanı yöntemlerine rağmen günümüzde pek çok hastanın epilepsi etiyoji net bir biçimde saptanamamaktadır. Bilinmeyen etiyoji başlığı altında toplanan bu durumdaki hastalar çeşitli çalışmalarda tüm hastalar arasında %30-50 arasında bir orana sahiptirler. Bununla birlikte devam araştırmalarla yakın gelecekte bu oranın düşmesi ve hastalardaki tedavi başarısının yükselmesi beklenmektedir (47).

2.1.6. Patofizyoloji

Epileptik nöbetlerin beyin dokusunda yer alan sinir ağlarında eksitasyon ve inhibisyon mekanizmasındaki denge kaybindan ortaya çıktıkları bilinmektedir. Nöronlar fizyolojik durumdan daha kolay, daha sık ve daha kontrolsüz biçimde elektrik aktivite göstermesi (nöronal hipereksitabilite) ve gelişen bu aktivitenin sayıca aşırı miktarda nöronu da kendisiyle eşgüdümlü olarak aktivite üretmeye teşvik etmesi (nöronal hipersenkronizasyon) epileptik nöbetin altında yatan temel mekanizmalar olduğu da gösterilmiştir. Bununla birlikte sağlıklı beyin dokuda nöronal

hipereksitabilite ve hipersenkronizasyon olgularının gelişimini başlatan patolojik süreçler hala tam olarak aydınlatılamamıştır ve yoğun bir araştırma konusudur (48).

Tek bir nöbet oluşum ve gelişimi kapsayan sürece iktogenez, nöbetlerin tekrarlayıcı karakter kazanmasını ve provoke edilmeden oluşmasını başlatan sürece ise epileptogenez adı verilmektedir. Epileptogenez daha uzun bir süreci kapsamakta ve tam olarak aydınlatılamasa sıklıkla travmatik beyin hasarı, inme, beyin tümörü gibi beyin dokusunda ciddi tahribat yaratan durumlar izleyen latent bir dönemde gerçekleşen bir olgu olduğu gözlemlenmiştir. Epileptogenez döneminde beyin dokusunda nöronal hasar ve onu izleyen gliyozis, sinaptik ve aksonal reorganizasyon, anormal sinaptik plastisite ve nörogenez gibi biyopatolojik yeniden yapılanma mekanizmaları gözlemlenmiştir (49).

Güncel araştırmalar nörotransmitter sistem dengesindeki bozulmaların ve sinapti iletimde gerçekleşen bozulmaların nöronal hipereksitabilite mekanizmasında kritik öneme sahip olduğunu işaret etmektedir. Epileptik nöronlarda astroglial glutamat alım yeteneğinde kayıp olduğu gösterilmiştir. Nöbet sırasında sinaptik aralıkta aşırı glutamat birikimi ve eksitotoksitesitesi ve buna bağlı gelişen NMDA ve AMPA reseptörlerinin hiperaktivasyonu, hücre içi kalsiyum girişinin artışıyla sonuçlanır. Hücre içine aşırı kalsiyum girişi çeşitli sinyal transdüksiyon yollarını aktive ederek hem nöronal hasarı hem de sonrasında gelişecek epileptiform deşarjları destekler (50).

Benzer şekilde iyon kanalı ekspresyonlarındaki değişimler ve özellikle genetik mutasyonlarla tetiklenen iyon kanalı yapı ve işlev bozuklukları nöronal hipereksitabilite gelişimi açısından suçlanmıştır. Bu duruma başlıca örnek SCN1A geninde yer alan mutasyonlardır. Söz konusu gende gelişen mutasyonlar GABAerjik inhibitör ara nöronlarda kayıplara yol açarak şiddetli febril nöbetlere ve entelektüel geriliğe yol açmaktadır. SCN1A geninde yer alan mutasyonlar başta Dravet sendromu olmak üzere pek çok kanalopati ile ilişkilir (51).

Paroksizmal Depolarizasyon Kayması (PDK), nöronal membran potansiyelinin anormal biçimde uzamış olarak devam eden depolarizasyonunu ifade eder. Bu durum sıklıkla geliştiği nörona ek olarak etrafındaki nöronları ateşlemekte ve epileptojenik odaklar oluşumunda rol almaktadır. PDK'ler epileptik beyin yapısının gelişimi için bir işaret kabul edilmektedir (52).

Epilepsi patogenezinde rol oynadığı düşünölen bir başka mekanizma da nöroinflamasyondur. Mikroglia ve astrosit aktivasyonuyla proinflamatuvar sitokin salınımı artışı (IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi) GABA/glutamat dengesini glutamat lehine bozarak epileptik nöbete yatkınlığı artırır. İnflamasyon şiddetine bağılı kan beyin bariyerinde gerçekleşen tahribatında epileptik nöbete yatkınlık artırdığı düşünölmektedir (53).

Epileptik nöbetler sırasında zirve yapan enerji tüketimi mitokondriyal strese ve aşırı oksijen tüketimine sebep olmaktadır. Mitokondriyal solunumun aşırı artışı reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretimi ve bu moleküllerin hücre zarı lipidlerine, hücre proteinlerine ve nükleik asit yapılarını tahrip etmesiyle sonuçlanır. Nöronların zar yapısında yüksek oranda bulunan lipid içeriğı ve katalaz ile glutatyon peroksidaz gibi başlıca antioksidan enzimlerin beyindeki aktivitesinin görece düşük olması, bu hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı savunmasız hale getirmektedir (14).

Genetik sebeplere ek olarak DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA ekspresyonu değışiklikleri gibi epigenetik değışiklerinde epileptogenez sürecinde önemi vardır. Epigenetik regölasyona müdahale eden HDAC inhibitörleri, DNMT inhibitörleri ilaçlarla yapılan hayvan çalışmalarıında olumlu sonuçlar elde edildiğı bildirilmiştir (54).

2.1.7. Tedavi

Epilepsi rahatsızlığının tedavisinde kullanılan ilaçlar antikonvülzanlar ya da antiepileptikler olarak isimlendirilmiştir. Bununla birlikte her nöbetin konvülsiyon içermemesi, her konvülsiyonun ise bir epileptik nöbetten kaynaklanmıyor oluşu antikonvülzan teriminin; kullanılan ilaçlar epilepsiyi küratif özellikten çok semptomatik şekilde tedavi ettiğinin farkedilmesi ile antiepileptik teriminin kullanımın kavramsal olarak doğru olmadığı, doğru adlandırmanın anti-nöbet ilaçlar (ANI) olması gerektiğı kabul edilmiştir (55).

Uzun yıllar boyunca tüm epilepsi tiplerinin tedavisi için tek bir ilaç geliştirilmesi hedeflenmiş, ancak epilepsi rahatsızlığının multifaktöriyel etiyojisi ve patogenezi dikkate alındığında spesifik bir ilaçla tedavinin mümkün olmadığı görölmüştür. Süregelen çalışmalara ve bilgi birikimine rağmen epilepsi türleri patogenezi hakkında

bilgi seviyesi yeterli seviyede değildir. Bununla birlikte 1857’de Bromür, 1912’de Fenobarbitalin anti-nöbet etkinliklerinin tesadüfi keşfiyle ANİ olarak kullanılmasıyla başlayan ilaç geliştirme süreci, günümüzde hastalara çok sayıda, farklı tiplerde ve etkinliklerde ANİ’yi erişilebilir tedavi haline gelmesini sağlayacak şekilde ilerlemiştir(56).

ANİ temel etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmakla birlikte bu sınıflamalar ilaçların sahip olduğu çoklu etki mekanizmasını ihmal etmektedir. Günümüzde kullanılan ANİ için odaklandıkları temel etki mekanizmalarına sınıflandırma başlıkları şunlardır(57);

- a) Voltaj-kapılı kanallara etki
 - i) Voltaj kapılı kapılı Na^+ kanallarının blokajı
 - ii) Voltaj kapılı kapılı Ca^{+2} kanallarının blokajı
 - iii) Voltaj kapılı kapılı K^+ kanallarının blokajı
- b) GABAerjik inhibitör sisteme etki
- c) Glutamaterjik eksitator sisteme etki
- d) Presinaptik Nörotransmitter Salıverilmesinin Modülasyonu

Tablo 2.Anti-epileptik ilaçlar, etki mekanizmaları ve kullanıldıkları nöbet tipleri

İlaç Adı	Etki Mekanizması	Etkili Olduğu Nöbet
Sodyum valproat	GABA artışı, sodyum/kalsiyum kanalı blokajı	Genel, fokal, Lennox-Gastaut
Karbamazepin	Sodyum kanal blokajı	Fokal, jeneralize tonik-klonik
Lamotrijin	Sodyum kanal blokajı, glutamat baskısı	Fokal, jeneralize, Lennox-Gastaut
Levetirasetam	SV2A üzerinden sinaptik modülasyon	Fokal, jeneralize, juvenil miyoklonik
Topiramet	GABA artışı, sodyum kanal blokajı, glutamat antagonizması	Fokal, jeneralize, Lennox-Gastaut
Etosüksimid	T-tip kalsiyum kanal blokajı	Absans nöbetleri
Klonazepam	GABA-A reseptör aktivasyonu	Absans, miyoklonik, Lennox-Gastaut
Vigabatrin	GABA transaminaz inhibisyonu	İnfanal spazm, dirençli fokal nöbet
Gabapentin	Kalsiyum kanal modülasyonu	Fokal nöbet
Lakozamid	Sodyum kanal yavaş inaktivasyonu	Fokal nöbet
Brivarasetam	SV2A bağlanması	Fokal nöbet
Perampanel	AMPA reseptör antagonizması	Fokal, jeneralize tonik-klonik
Rufinamid	Sodyum kanal inaktivasyonu	Lennox-Gastaut
Kannabidiol (CBD)	TRPV1, GPR55 vb. modülasyonu	Dravet, Lennox-Gastaut
Fenitoin	Sodyum kanal blokajı	Fokal, jeneralize tonik-klonik, status epileptikus
Fenobarbital	GABA-A reseptör aktivasyonu	Fokal, jeneralize, yenidoğan nöbetleri
Primidon	GABA artışı	Fokal, jeneralize
Zonisamid	Sodyum/kalsiyum kanal blokajı	Fokal nöbet
Tiagabin	GABA geri alım inhibitörü	Fokal nöbet
Pregabalin	Kalsiyum kanal modülasyonu	Fokal nöbet
Stiripentol	GABA artışı, GABA-A modülasyonu	Dravet sendromu
Fenfluramin	Serotonin salınımı, sigma-1 modülasyonu	Dravet, Lennox-Gastaut
Cenobamat	Sodyum kanal blokajı, GABA artışı	Fokal nöbet
Okskarbazepin	Sodyum kanal blokajı	Fokal nöbet
Eslikarbazepin	Sodyum kanal blokajı	Fokal nöbet
Klobazam	GABA-A reseptör aktivasyonu	Lennox-Gastaut

2.2. Oksidatif Stres Ve Epilepsi

Oksidatif stres, canlı organizmada oksidan üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu ortaya çıkan ve hücreler düzeyinde hasara yol açabilen bir durum olarak tanımlanır (58). Düşük düzeydeki ROS fizyolojik hücreler sinyaller iletiminde görev alabilirken, yüksek düzeyde ROS üretimi proteinler, lipitler ve DNA gibi makromoleküllere zarar verir (13). Beyin dokusu, yüksek oksijen tüketimi ve zengin doymamış yağ asidi içeriği nedeniyle oksidatif hasara özellikle hassastır (58). Endojen antioksidan kapasitenin yetersiz kaldığı durumda ortaya çıkan oksidatif stres, nörodejenerasyon ve hücre ölümü ile sonuçlanabilecek biyokimyasal değişiklikleri tetikleyebilir.

Son yıllarda, oksidatif stresin epilepsideki rolü üzerine artan sayıda kanıt ortaya konmuştur. Hem epilepsi hastalarında hem de deneysel hayvan modellerinde, oksidatif strese ait biyobelirteçlerin belirgin şekilde yükseldiği rapor edilmiştir (59). Örneğin, status epileptikus geçiren hastaların kan örneklerinde antioksidan enzim düzeylerinin düştüğü (SOD, katalaz ve GSH seviyelerinde azalma) ve oksidatif hasar ürünlerinin arttığı gösterilmiştir (60). İlave olarak, dirençli epilepsi hastalarında C vitamini düzeyleri ile nöbet sıklığı arasında ters, oksidatif hasar göstergesi 3-nitrotirozin düzeyleri ile nöbet sıklığı arasında doğru orantı saptanmıştır (61). Bu bulgular, epilepsi patofizyolojisinde oksidatif dengenin bozulduğunu ve kronik nörolojik hasarın bir kısmının oksidatif strese bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Epileptik nöbetlerin kendisi de metabolik olarak yoğun bir süreç olup oksidatif stres ile yakından ilişkilidir. Nöbet sırasında beyinde artan hipermetabolik aktivite, oksijen ve glukoz tüketiminin yükselmesine yol açar ve bu durum ROS üretimini tetikleyebilir (59). Uzun süreli nöbetlerin ardından mitokondriyal fonksiyonların bozulması ROS üretiminin arttığı ve antioksidan savunmaların tükendiği saptanmıştır. Örneğin deneysel status epileptikus sonrasında mitokondriyal elektron taşıma zinciri enzimleri (örn. kompleks I, α -ketoglutarat dehidrogenaz) inhibe olurken, beyin etkilenen bölgelerinde glutatyon (GSH) düzeylerinin azaldığı ve okside formu GSSG'nin arttığı gösterilmiştir (62). Beyindeki majör antioksidanlardan biri olan GSH'nin bu şekilde tükenmesi, hücrelerde indirgenme-oksidasyon dengesinin bozulmasına yol açarak nörodejenerasyon, kognitif bozulma ve nöronal ölümle sonuçlanabilmektedir. Nitekim, antioksidan enzim glutatyon peroksidaz-4'ün kaybının lipid

peroksidasyonunu tetiklediği ve deneysel epilepsi modellerinde ferroptozis olarak adlandırılan demir bağımlı hücre ölümüne yol açtığı bildirilmektedir (63). Bu veriler, nöbetlerin oksidatif stres yaratabileceği ve oluşan oksidatif hasarın sonraki nöbetlerin oluşumunu kolaylaştırabileceği yönünde bir kısır döngü olabileceğini düşündürmektedir.

Oksidatif stresin epileptogenez üzerindeki etkisi de önemlidir. Epileptogenez, beyni etkileyen ilk hasar ile kalıcı epilepsi oluşumu arasındaki süreç olup, bu latent (gizli) dönemde hücrel ve moleküler düzeyde kapsamlı değişiklikler gerçekleşir. Bu süreçte aşırı ROS/RNS üretimi ve buna bağlı sinyal yolları, nöroinflamasyonu tetikleyerek nöron kaybı, anormal nörojenez ve azalmış nöbet eşiği gibi patolojik değişimlere yol açabilmektedir (64). Özellikle nöroinflamasyon ve oksidatif stresin birbirini beslediği, inflamatuvar sitokinlerin üretiminin glutatyon tükenmesi ve mitokondriyal disfonksiyon gibi oksidatif mekanizmaları başlattığı gösterilmiştir (65). Bu nedenle epileptogenez yavaşlatmak veya durdurmak amacıyla oksidatif stresi azaltmaya yönelik stratejiler üzerinde durulmaktadır. Nitekim bazı antioksidan bileşiklerin (ör. resveratrol) deneysel modellerde anti-epileptojenik etki göstererek, latent dönemde uygulandığında kronik nöbet gelişimini azalttığı bildirilmiştir (64). Bu veriler, oksidatif stresin sadece nöbetlerin bir sonucu değil, aynı zamanda epilepsinin gelişiminde bir etken olduğunu da ortaya koymaktadır.

Epilepside oksidatif stresin kaynağı olarak birden fazla mekanizma rol oynar. Reaktif türlerin üretimi hem mitokondriyal yollar hem de mitokondri-dışı enzimler aracılığıyla gerçekleşebilir. Mitokondriyal yollar sırasında tüketilen oksijenin küçük bir kısmı elektron taşıma zincirinden sızarak süperoksit (O_2^-) oluşturur; bu molekül daha sonra dismutasyon reaksiyonlarıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) gibi ikincil ROS'lara dönüşebilir. Epileptik nöbet modellerinde, özellikle status epileptikus sonrasında mitokondriyal kompleks I'in inhibisyonu ve artmış mitokondri kaynaklı süperoksit üretimi gözlenmiştir (66). Bununla birlikte, mitokondri dışı kaynaklar da nöbetlerin tetiklediği önemli ROS üretim yollarıdır. Örneğin, ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS), siklooksijenaz ve lipooksijenaz gibi enzimler ile sitokrom P450 sisteminin yanı sıra NADPH oksidazlar da nöbet aktivitesiyle birlikte aşırı aktive olarak oksidan üretimini artırır. Bu enzimlerin farmakolojik inhibisyonunun deney hayvanlarında nöbetlerin yol açtığı

nöronal hasarı azalttığı gösterilmiştir (67). Dolayısıyla, oksidatif stresin kontrol altına alınmasında hem mitokondriyal fonksiyonların desteklenmesi hem de mitokondri dışı ROS kaynaklarının baskılanması potansiyel tedavi yaklaşımları olarak değerlendirilmektedir.

Bu bağlamda, NOX enzim ailesi özellikle dikkat çekmektedir. NADPH oksidazlar, hücrel membranlar üzerinde elektron transferi yoluyla moleküler oksijeni süperoksit radikaline indirgeme yeteneğine sahip enzimlerdir. Oluşan süperoksit, spontan veya enzimatik dismutasyon ile H_2O_2 gibi daha stabil ROS moleküllerine dönüşerek hücrede redoks sinyalleme ve hasar mekanizmalarında rol oynar(68).

2.3.Nadph Oksidazlar

NADPH oksidazlar, zar üzerinde konumlanmış çok alt birimli enzim kompleksleridir ve hücre içi ROS üretiminden sorumludurlar. NOX ailesinin yedi izoformu olduğu belirlenmiştir (NOX1–5, DUOX1, DUOX2). Bu enzimlerin temel işlevi, sitozoldeki NADPH'den elektron alarak bu elektronu membranın dış yüzeyindeki oksijene taşımak ve süperoksit anyonu üretmektir. Oluşan süperoksit ve türevleri (örneğin H_2O_2) oksidatif stres yoluyla hücrel hasara ve sinyal bozukluklarına neden olabilir (69)

Her NOX izoformu, FAD, iki heme grubu ve NADPH bağlanma bölgeleri içeren bir yapıya sahiptir. NOX enzimlerinin işlevsel hale gelmesi için bir membran alt birimi (örneğin NOX2 izoformunun gp91^{phox} ve p22^{phox} alt birimleri) ile sitozolik düzenleyici alt birimlerin (p47^{phox}, p67^{phox} veya bunların homologları NOXO1, NOXA1) birleşmesi gerekir. Küçük GTPaz Rac1 de NOX kompleksinin aktivasyonunda önemli rol oynar. Bu multienzimatik yapı ve düzenleyici etkileşimler, NOX aktivitelerinin hücrel uyarılara özelleşmiş ve sıkı kontrollü şekilde gerçekleşmesini sağlar(70).

NOX enzimlerinin ürettiği süperoksit, hücre içinde hızla hidrojen peroksite dönüşür. Süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla dönüştürülen H_2O_2 hücre zarından geçebildiği için hem üretici hücreyi hem de komşu hücreleri etkileyebilir. Örneğin bir derleme makalesi, NOX'ların NADPH'dan elektron alarak süperoksit (O_2^-) oluşturduğunu ve bunun büyük ölçüde enzimatik yolla H_2O_2 'ye dönüştüğünü

belirtmektedir. Normal şartlarda bu ROS üretimi sinyal iletiminde görev alırken, aşırı ROS birikimi lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi toksik etkilere yol açar (65).

Merkezi sinir sisteminde (MSS) NOX enzimleri çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilir. Yapılan çalışmalarda, NOX1'in nöronlar, astrositler, mikroglia ve beyin endotelyum hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir. Bu bulgu, NOX sisteminin MSS'de geniş bir dağılımı olduğunu ortaya koyar. Özellikle mikroglialarda NOX1 ve NOX2 birlikte bulunmakta, ancak farklı uyarılara yanıt vererek ayrı işlevler üstlenebilmektedir. MSS'deki bu çeşitlilik, NADPH oksidazların sinir sistemi fizyolojisi ve patolojisinde çok yönlü roller üstlenebileceğini gösterir(71).

Epilepsi bağlamında, NADPH oksidazların ürettiği ROS'un epileptojenik süreçlerde rol oynadığı düşünülmektedir. Örneğin aşırı glutamaterjik uyarının NMDA reseptörleri aracılığıyla NOX aktivasyonunu tetikleyerek süperoksit ve H₂O₂ üretimini artırdığı bilinmektedir. Bu ROS artışı, hayvan modellerinde nöronal hiperaktiviteyi ve nöbet benzeri aktiviteyi tetiklerken, NOX inhibitörleri epileptiform aktiviteyi azaltmıştır. Farelerde PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde NOX inhibitörü uygulanması, oksidatif stresi ve nörodejenerasyonu azaltarak nörolojik bozuklukları hafifletmiştir (72). Ayrıca epilepsi hastalarında ve hayvan modellerinde NOX2 başta olmak üzere NOX1 ve NOX4 izoformlarının ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu veriler, NADPH oksidazların epileptik aktivite sonrası ROS kaynağı olarak önemini vurgulamaktadır (65).

NOX1 izoformu, özellikle nöroinflamasyon ve nörodejenerasyon süreçlerinde dikkat çekicidir. NOX1; inflamatuvar ağrı yanıtında, mikroglial konak savunmasında ve nöral büyüme süreçlerinde rol oynamıştır. *In vitro* çalışmalar, NOX1 aktivasyonunun protein kinaz C (PKC) fosforilasyonu ve Rac1 aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir(73). Ayrıca fare ve sıçan inme modellerinde NOX1 aktivitesinin yükselmesinin nöronal hücre ölümüne katkıda bulunduğu bildirilmiştir (74). Dolayısıyla NOX1, sinir sistemi glial hücrelerinden kaynaklanabilen oksidatif stresi artırarak nörolojik hasarı kolaylaştırabilen önemli bir bileşen olarak değerlendirilmektedir.

NADPH oksidaz aktivitesinin inhibisyonu, nöroprotektif stratejiler arasında incelenmiştir. Örneğin apocynin gibi fenolik bileşikler NOX aktivitesini inhibe ederek

süperoksit üretimini önemli ölçüde azaltır. İn vivo çalışmalarda apocynin tedavisi, beyin travması, inme ve epilepsi modellerinde oksidatif hasarı azaltmış ve nöronal ölümleri baskılamıştır. Çalışmalar, travmatik beyin hasarı veya nöbet sonrası gelişen oksidatif hasarın apocynin ile tedavisinin hipokampal nöronal canlılığı artırdığını göstermiştir (75). Bu bulgular, NADPH oksidaz kaynaklı oksidatif stresin nöroprotektif tedavi hedefi olabileceğini düşündürmektedir.

2.4.Deneysel Epilepsi Modelleri

Epilepsi araştırmalarında farklı nöbet tiplerini ve epileptojenik süreçleri yansıtmak amacıyla çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir. Bu modeller genel olarak akut nöbet testleri (örn. maksimal elektroşok [MES], tek doz PTZ), kronik kindling modelleri (elektriksel veya kimyasal tekrar uygulamalar) ve status epileptikus (SE) modelleri olarak sınıflandırılabilir (76). Örneğin MES ve subkutan PTZ testi, yeni antiepileptik ilaç adaylarının etkinliğini belirlemede yaygın şekilde kullanılır. Başarıyla antinöbet etkisi gösterilen bileşikler daha sonra amigdala veya hipokampus kindling, işitmeyle indüklenen nöbet (odyojenik) gibi kronik model testlerine tabi tutulur (77). Bu yolla hem akut nöbetleri önleyici ilaçlar değerlendirilir, hem de epileptogenez mekanizmalarına ışık tutulur(78).

Kimyasal indüklemeli kronik modeller arasında pilokarpin ve kainik asit gibi ajanlarla oluşturulan SE modelleri öne çıkar. Bu modellerde, yüksek doz pilokarpin veya kainik asit uygulamasıyla status epileptikus benzeri bir tablo oluşturulur; takiben latent bir periyottan sonra spontan tekrar eden konvülsiyonlar gözlenir. Bu yöntemler özellikle insan temporal lob epilepsisi (TLE) fenotipine benzer kronik epilepsi oluşum mekanizmalarını çalışmak için kullanılır(79). Ayrıca genetik yatkınlığa dayalı modeller (ör. WAG/Rij gibi genetik nonkonvülsif test modelleri) ve seçici toksin veya optogenetik tekniklerle elde edilen özgül epilepsi varyantları üzerine çalışan modeller de geliştirilmiştir. Bu özel modeller belirli epilepsi tiplerinin patofizyolojisini incelemek için yüksek özgünlük sunar. Sonuç olarak, deneysel epilepsi modelleri; akut nöbet değerlendirmesi, kronik epileptogenez araştırmaları ve yeni tedavi stratejileri geliştirme çalışmalarına zemin hazırlayacak şekilde çeşitlenmektedir (80).

Kimyasal kindling ise laboratuvar hayvanlarında tekrarlı subkürsel konvülzan dozlarının uygulanmasına dayanan bir yöntemdir. Örneğin pentilentetrazol (PTZ) ile kimyasal kindlingde, konvülzan etki yaratmayan küçük dozda PTZ aralıklı enjeksiyonlar şeklinde verilir. Zamanla bu alt eşik dozlar birikimli etkiyle hayvanda daha ciddi klonik-tonik nöbetlere yol açar. PTZ ile oluşturulan bu kronik kindling protokolü, epileptogenez araştırmalarında yaygın bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu modelde her PTZ uygulaması tek başına tam bir nöbet oluşturmaz; ancak yineleyen uygulamalar beyindeki duyarlılığı artırarak giderek şiddetli nöbetlere neden olur. Böylece kademeli bir şekilde kronik epilepsi hali gelişir ve epilepsiyeye duyarlılık artar. Ayrıca elektriksel kindling (amigdala veya hipokampus stimülasyonu) modellerinde olduğu gibi kimyasal kindling de epileptogenez sürecindeki sinaptik değişiklikler ve nöronal hassaslaşmanın incelenmesine olanak tanır(81)

2.4.1. PTZ ile Oluşturulan Kindling Modeli

Pentilenetrazol (PTZ), GABA_A reseptör antagonistidir ve tek dozda uygulandığında klonik nöbetler tetikler. PTZ tutuşma modelinde ise, her biri nöbete neden olmayan subkonvülzan dozlarda (örneğin 30mg/kg, i.p.) PTZ tekrarlı olarak hayvana uygulanır. Bir çalışmada 28 gün boyunca günde 30 mg/kg PTZ enjeksiyonu ile Wistar sıçanlarında kindling oluşturulmuştur. Bu yaklaşımda, her PTZ uygulamasının ardından hayvan belirli bir süre gözlenerek nöbet şiddeti puanlanır. Yeterli sayıda tekrarlı uygulama ve nöbet değerlendirmesi sonrasında hayvanlar “tutuşmuş” (kindled) hale gelir. PTZ tutuşma modeli, kronik epilepsi modelinin bir örneği olarak kabul edilir ve deney hayvanlarında epileptogenez, nörodejenerasyon ile ilişkili komorbiditeler ve ilaç direnci çalışmalarında sıkça kullanılır. Özellikle TLE’de benzer nöronal hasar profili gösterebildiği ve tedaviye dirençli epilepsi patofizyolojisini taklit edebildiği bildirilmiştir (82)

PTZ tutuşma protokolünün avantajlarından biri cerrahi işlem gerektirmemesi ve nispeten kolayca uygulanabilmesidir. İntrakraniyal elektrot yerleştirme ihtiyacı olmadan, genel davranışsal nöbet değerlendirmeleri yapılabilir. Ayrıca bu modelde kümülatif PTZ uygulamaları sonucunda anti-epileptik ilaçlara karşı tolerans gelişimi

gözlenebilir; bu da modelin ilaç direnci (refrakter epilepsi) mekanizmalarını çalışmak için uygun olduğunu göstermektedir(83). Örneğin, ilaca dirençli epilepsiye benzer özellikler göstermesi bu modelin temel avantajlarından biridir. Diğer taraftan PTZ kindling, genel nöbetlerle karakterize olduğundan odaklı kısmi epilepsi formlarını tam olarak yansıtmasa da geniş çapta nörotoksosite ve nöronal plastisite değişiklikleri gözlemlemek için uygundur. Nörodejeneratif sonuçları ve dentat girus'daki nöronal hasarı da içeren bir model olması, PTZ kindling'in ilaç denemeleri ve patoloji çalışmalarında kullanımını teşvik eder (82).

PTZ kindling modeli, oksidatif stres ve inflamasyon çalışmaları için de uygun bir modeldir. Tekrarlayan PTZ uygulamaları beyinde serbest radikal üretimini artırır; bu durum artmış lipid peroksidasyonu (MDA düzeylerinde yükselme) ve azalmış antioksidan enzim aktivitesi (SOD, GPx) ile karakterizedir. Örneğin bir çalışmada PTZ kindling sonrası sıçan plazmasında MDA artışı ve SOD, GPx aktivitelerinde azalma gözlenmiştir(84). Bu sonuçlar, PTZ ile oluşturulan kronik nöbet modelinin oksidatif hasar mekanizmalarının incelenmesinde yararlı olduğunu gösterir. Ayrıca PTZ kindling ile mikroglial inflamasyon ve sitokin düzeylerinde de artış bildirilmektedir. PTZ ile kindling sonrası NF- κ B yolunu aktive eden inflammatuar uyarımı, IL-1 β , IL-18, TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımıyla sonuçlanır ve bu durum nöbetlerin şiddetini ve hipokampal inflamasyonu artırır(85). Bu bulgular, PTZ kindling modelinin sadece nöbet oluşumunu değil aynı zamanda nöbet sonrası inflammatuar cevapları da çalışmaya olanak sağladığını göstermektedir. Dolayısıyla bu model antioksidan ve anti-inflamatuar müdahalelerin epilepsi üzerindeki etkilerini araştırmak için uygun bir zemindir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *In-Vitro* Çalışma Bölümleri

3.1.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edilen SH-SY5Y (CRL-2266; insan nöroblastom) hücre hattı kullanılmıştır. Penisilin/streptomisin (10,000U/mL), yüksek glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle's medium (DMEM/F-12, 1:1), Fetal Sığır Serum (FBS), Tripsin-EDTA çözeltisi, ML-171 (selektif NOX-1 inhibitörü) ve hücre kültürü için gerekli çeşitli sarf malzemeleri kullanılmıştır.

3.1.2. Hücre Kültürü Teknikleri

3.1.2.1. Hücre Hattının Açılması

-86°C'de kriyotüpler içerisinde muhafaza edilen SH-SY5Y hücreleri 37°C'lik su banyosunda erime gerçekleşene kadar bekletilmiştir. Kriyotüpte FBS, DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve hücre karışımı içeren sıvı 15 ml'lik falkon tüpler içerisine aktarılmış ve üzerine 15 ml'ye kadar DMEM eklenmiştir. Falkon tüpler 800 rpm (dakika devir sayısı) dönüş hızında 4 dakika boyunca santrifüj edilerek hücrelerin falkon tüp tabanında "pellet" biçiminde çökmesi sağlanmıştır. İşlem sonrası hücreler üzerinde toksik etkilere sahip DMSO içeren süpernatant pipetaj yoluyla uzaklaştırılmıştır ve hücre pelleti %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sığır serumu içeren DMEM ile resüspanse edilerek ve 25 cm²'lik flaslara ekilmişlerdir.

3.1.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

SH-SY5Y hücre hattı steril koşullar altında 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatör içerisinde nemlendirilmiş ortamda, 25 cm²'lik flaslarda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sığır serumu içeren F12...DMEM hücre kültür besiyerinde çoğalmaya bırakılmıştır. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasaj yapılmış, gereklilik durumunda besiyerleri değiştirilmiştir.

3.1.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

%80 ve üzeri yoğunluğa ulaşan hücrelerin üst fazları uzaklaştırılarak PBS (fosfat tamponlu salinle) ile yıkama yapılmıştır. Hücreler üzerine 0,5 ml tripsin ilave edilerek 2-3 dk boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Tripsin etkisiyle süspanse duruma geçen hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. Hücrelerin bulunduğu falkon tüplere nötral DMEM ilave edilmiş ve 800 rpm de 4 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan pellet üzerindeki tripsin içeren süpernatant uzaklaştırılarak karışım besiyeri ile resüspanse edilip 3×10^5 hücre olacak şekilde tekrar flasklara ekilmiştir ve yeteri kadar karışım besiyeri eklenerek inkübatörde tekrar çoğalmaya bırakılmıştır. Hücrelerin üçüncü pasaja ulaşması sonrası çalışmalara başlanmıştır.

3.1.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücre kültürü çalışmasının bitiminde flasklarda bulunan hücrelerin üzerinden üst fazın uzaklaştırılması, PBS ile yıkama ve tripsin uygulaması sonunda süspanse duruma geçirilen hücreler 15 ml'lik falkonlarda alınmış ve üzerlerine nötral DMEM eklenmiştir. Falkon tüplerde 800 rpm'de 4 dk boyunca santrifüj edilmesi ve süpernatantın ayrılmasıyla elde edilen hücre pelletlerine %90 FBS ve %10 DMSO içeren karışımdan 1 ml eklenmiş, resüspanse edilen hücreler kriotüplere aktarılmıştır. Aşamalı olarak soğutulan kriotüpler - 86°C'de muhafaza edilerek ileride yapılacak çalışmalar için saklanmıştır.

3.1.2.5. PTZ Toksikite Modelinin Oluşturulması ve Hücre Canlılık Tayini (XTT)

SH-SY5Y hücreleri ilaç uygulaması öncesi her bir hücre için ayrı olarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 100 µL DMEM içinde yaklaşık 10×10^3 sayıda hücre bulunacak şekilde ekilmiş ve hücre adezyonu için 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuklarda bulunan hücrelerin üst fazı toplandıktan sonra her bir kuyucuğa içinde deney grubuna uygun derişimde etken madde içeren 100 µL şeffaf (renksiz) DMEM eklenmiştir.

İlaç uygulamasına başlamadan önce pentilentetrazol (PTZ) ve NOX-1 inhibitörü ML-171 DMEM içinde çözdürülecek ve stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışmamızda nöroprotektif ve antioksidatif etkileri gösterilmiş valproik asit (VPA)

referans ilaç (pozitif kontrol) olarak kullanılmak üzere temin edilmiş ve hücrelere uygulanmıştır (86).

Bu işlemde hücreler ML-171'in olası nöroprotektif etkisini değerlendirmek için altı farklı gruba ayrılmıştır.

Literatür araştırmasında incelenen *in vitro* çalışmalardan ve laboratuvarımızda gerçekleştirilmiş ön çalışmalardan yola çıkılarak, ML-171 için kullanılacak dozlar: 10, 20, 40, 80 ve 160 µM olarak belirlendi (87)

Hücre kültürü için deney grupları şu şekilde oluşturulmuştur;

Kontrol grubu: Hücrelere herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

PTZ grubu: Hücreler 24 saat 30 mM PTZ ile inkübasyona bırakılmıştır.

ML-171 grubu: Hücrelere 3 saat 10, 20, 40, 80 ve 160 µM derişiminde ML-171 uygulanmıştır.

ML-171 + PTZ grubu: Hücrelere önce 3 saat 10, 20, 40, 80 ve 160 µM derişiminde ML-171 uygulanmış, ardından 24 saat 30 mM PTZ ile inkübe edilmişlerdir.

VPA Grubu: Hücrelere 3 saat 0,5, 1 ve 2 mM derişiminde VPA uygulanmıştır.

VPA + PTZ grubu: Hücrelere önce 3 saat 0,5, 1 ve 2 mM derişiminde VPA uygulanmış, ardından 24 saat 30 mM PTZ ile inkübe edilmişlerdir.

NOX-1 inhibitörü ML-171'in PTZ ile oluşturulmuş nöbet modelinde hücre canlılığı üzerine etkisi XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) yöntemiyle araştırılmıştır. Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'nin mitokondriyal enzimler yoluyla turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır. Elde edilen turuncu renkli çözelti, suda çözünebilir özellikte olup belirli dalga boylarında spektrofotometre ile ölçülebilmektedir. Spektrofotometrik absorbans değeri, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır.

İlaç uygulaması sonrası deney grupları için uygun inkübasyon süresini tamamlandıktan sonra her kuyucuğa 50 µL XTT solüsyonu eklenerek hücreler 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, homojen bir dağılım sağlamak amacıyla plakalar kısa süreli çalkalandıktan sonra, bir ELISA mikroparka

okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, Birleşik Krallık) tarafından 450 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Cihazdan elde edilen optik dansite (O.D.) değerlerinden kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edildi. Aşağıdaki formülden yararlanılarak her kuyucuk için hücre canlılık oranları hesaplandı:

$$\% \text{ Hücre canlılık} = (\text{Konsantrasyon O.D.} / \text{Kontrol O.D.}) \times 100$$

XTT uygulamasının tamamlanmasıyla SH-SY5Y hücre hattı için kullanılan ilaçların %50 maksimal etkin konsantrasyon değerleri hesaplandı ve elde edilen veriler çalışmanın sonraki aşamalarında yer alan ELISA (bax, bcl-2, bölünmüş kaspaz 3), TAS ve TOS, flow sitometri (Annexin V apoptoz tayini) deneylerinde ilaç derişimi belirlenmesinde yol gösterici olarak kullanıldı.

3.1.2.6. Hücre Kültüründe Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçümü

Altı kuyucuklu kültür plaklarına ekilerek çoğaltılan SH-SY5Y hücrelerine, hücre yoğunluğu yaklaşık 5×10^5 hücre/kuyucuk düzeyine ulaştığında, 24 saat boyunca PTZ (30 mM) ile ML-171 ve VPA'nın %50 maksimal etkin konsantrasyonları uygulandı. Kontrol grubunu temsil eden kuyucuğa müdahalede bulunulmadı.

24 saat inkübasyon sonunda tripsinize edilerek steril falkon tüplerinde toplanan hücreler 10 dakika süreyle 2000 rpm'de santrifüj edildi. Tüp dibine çökmüş hücre bileşenleri üst faz (süpernatant) atıldıktan sonra PBS ile süspanse edildi ve hücre yoğunluğunun yaklaşık olarak 1 milyon/ml olması sağlandı.

Hücre zarlarının tahrip edilmesi ve böylece hücre içeriğinin dışarı çıkması için hücreler 3 kez tekrarlanan dondurma (-80 °C) ve eritme (oda sıcaklığı) işlemine tabi tutuldu. Elde edilen hücre-lizat süspansiyonu 4 °C sıcaklıkta 4000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant içerikleri kullanılarak toplam antioksidan durumunun (TAS) ve toplam oksidan durumunun (TOS) tayini için toplandı.

Toplam antioksidan kapasite (TAS) ve toplam oksidan seviyeleri (TOS), Dr. Özcan Erel tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntemlere dayalı olarak, Rel Assay Diagnostics® (Gaziantep, Türkiye) firmasına ait ticari kitler aracılığıyla ölçüldü.

TAS testi, Fenton reaksiyonu ile başlatılan serbest radikal üretimini temel alır. Bu süreçte oluşan hidroksil radikalleri, ortamda bulunan dianisidil radikallerinin absorbansını artırarak bir renklenme oluşturur. Numunede bulunan antioksidan bileşikler ise bu serbest radikal reaksiyonlarını baskılar. Kit içerisinde yer alan ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) radikalleri, örnekteki antioksidanlar tarafından indirgenerek renk kaybına uğrar. Özellikle koyu mavi-yeşil renkteki ABTS radikali, antioksidan etkilerle renksiz hâle gelir. Bu renk değişimi, 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek toplam antioksidan kapasite hesaplanır. Sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L cinsinden ifade edilir.

TOS testi ise örnekteki oksidan moleküllerin $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ dönüşümünü başlatması esas alınır. Oluşan ferrik iyonlar, reaktif içerisindeki ksilenol orange ile kompleks oluşturarak renkli bir ürün meydana getirir. Bu kromojenik kompleksin spektrofotometrik olarak 530–560 nm aralığında ölçülmesiyle toplam oksidan düzeyine ulaşılır. Kalibrasyon için standart olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılır ve sonuçlar $\mu\text{mol } H_2O_2$ eşdeğeri/L cinsinden raporlanır.

Bu çalışmada hücre içi oksidatif dengeyi daha doğru yansıtabilmek adına, elde edilen TAS ve TOS değerleri, hücre örneklerindeki toplam protein miktarına normalize edilmiştir. Bu amaçla, Bradford protein tayin kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanılarak her örneğin protein konsantrasyonu belirlenmiş ve sonuçlar $\mu\text{mol } H_2O_2$ Eq/mg protein veya mmol Trolox Eq/mg protein cinsinden raporlanmıştır.

3.1.2.7. Hücre Kültüründe Bax, Bcl-2, Bölünmüş Kaspaz 3 Seviyelerinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü

PTZ, kontrol ve maksimal etkin ilaç konsantrasyonları uygulanan gruplardaki SH-SY5Y hücrelerinde Bax, Bcl-2, bölünmüş kaspaz 3 (cleaved caspase-3) protein ifade seviyelerinin ölçümü için ticari ELISA kitleri kullanılmıştır.

6 kuyucuklu plakaya ekilen ve deney tasarımına uygun prosedürler uygulanan hücre grupları 24 saat sonunda kuyucuklardan toplanarak PBS ile seyreltilmiş ve

ardından hücre zar bütünlüğünü tahrip edilerek hücresel içeriğin serbestleşmesini sağlamak amacıyla tekrarlanan donma (-80 °C) ve erime (oda sıcaklığı) döngülerine tabi tutulmuştur.

Bu işlem sonrası, kit üreticisinin protokolüne göre her bir deney grubuna ait hücre lizatındaki Bax, Bcl-2 ve bölünmüş kaspaz 3 seviyeleri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri aracılığıyla, her bir grubun ilgili protein seviyeleri kantitatif olarak belirlenmiştir.

3.1.2.8. Total Protein Ölçümü

Gerek TAS ve TOS gerek ELISA sonuçlarının normalize edilebilmesi amacıyla her bir örnekteki toplam protein miktarı ölçüldü. Total protein tayini için Bradford yöntemi kullanıldı.

• Bradford Yöntemiyle Total Protein Tayini Basamakları

- Bovin serum albümininden (BSA) 5 µg/ml derişime sahip olacak şekilde stok çözeltisi hazırlandı. Çözelti seri dilüsyon yapılarak standart çözeltiler (5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 µg/ml) elde edildi.
- Hazırlanan her standart çözelti ve örneklerden 10 µL alınarak 96 kuyucuklu mikropłaka üzerine ikişer tekrar olacak şekilde pipetlendi. Ardından her bir kuyucuğa 200 µL hacimde ticari olarak temin edilmiş hazır Bradford reaktifi eklendi.
- Mikropłaka, mikropłaka okuyucu 595 nm dalga boyunda okutularak absorbanslar değerleri elde edildi. Standartların absorbanslarına göre doğrusal bir grafik oluşturuldu.
- Grafikte elde edilen doğrusal denklem yardımıyla örneklerin değerleri hesaplandı.

3.1.2.9. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayini

SHSY-5Y hücrelerinde PTZ ile oluşturulan nöronal hasar sonrası gelişen apoptotik süreci ve bu sürece ML-171'in etkisini göstermek için Annexin V & Dead Cell (Luminex) kiti kullanılarak flow sitometri yöntemiyle ölçüldü.

SH-SY5Y hücreleri altı kuyucuklu kültür plaklarına ekilerek çoğaltıldı. 5×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğuna ulaşıldığında PTZ (30 Mm) ile ML-171 ve VPA'nın %50 maksimal etkin konsantrasyon değerlerine uygun derişimi 24 saat boyunca kuyucuklara uygulandı. Kontrol grubunu temsil eden kuyucuğa müdahalede bulunulmadı. 24 saat inkübasyon sonunda tripsinize edilerek toplanan hücreler %1 fetal bovin serum (FBS) içeren fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı ve Annexin V& Dead cell reaktifi ile inkübe edildi. Üretici firmanın yönergelerine uyularak gerçekleştirilen işlemler sonrasında canlı, nekrotik, erken ve geç apoptotik hücreler Muse™ Hücre Analizörü (Millipore) kullanılarak tespit edildi.

3.1.3. *In-Vivo* Çalışma Bölümleri

3.1.3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda strese maruz bırakılmamış ve uluslararası standartlara uygun kafeslerde yetiştirilen 4 aylık 230-250 gram ağırlığında 48 adet erişkin erkek Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Deney hayvanları sestem yalıtılmış, 55 ± 6 nem içeren ve sıcaklığı 22 ± 1 °C olan bir odada uygun miktarda besin ve su sağlanarak bakımları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sirkadyen ritmin korunması için ortamın 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü sağlanmış, deneysel çalışmalar, sirkadiyen ritim değişiklikleri ve buna bağlı oluşabilecek etkilerden kaçınmak amacıyla her gün 09.00-12.00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, deneyin yapıldığı ortamın ses ve ışık düzeyi sürekli kontrol altında tutularak deneysel süreçlerin etkilenmemesi için standardizasyon sağlanmıştır.

Çalışma başlatılmadan önce, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan 05.01.2024 tarih ve 13 sayılı yazısı ile izin alınmıştır.

3.1.3.2. Deney Grupları

Pentilentetrazol ile tutuşturma (kindling) yöntemi ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde NOX-1 enzim inhibitörü ML-171'in epileptik nöbet ile nöbet sonrası oluşan nöronal hasar üzerine etkilerini ve bu etkilerin olası mekanizmalarını araştırmak üzere her grupta 8 hayvan olacak şekilde çalışma planı yapıldı. Çalışmada

kontrol grubunda dışında bulunan 40 sıçana tutuşma protokolü uygulandı. Tutuşma protokolü süresince 4 sıçan şiddetli nöbet sebebiyle kaybedildi, 1 sıçan ise tutuşmaya direnç gösterdi. Söz konusu hayvanlar araştırma dışı bırakılarak çalışmadaki deney gruplarında bulunan sıçan sayısı (n=7) güncellendi.

Tablo 3.Deney Grupları

Deney grupları	Grup başına hayvan adedi	Tekrar sayısı	Kullanılan toplam hayvan sayısı
Kontrol (Salin) Grubu	7	1	7
PTZ Grubu	7	1	7
400 mg/kg Valproik Asit (VPA) Grubu	7	1	7
0,1 mg/ kg ML-171 Grubu	7	1	7
1 mg/kg ML-171 Grubu	7	1	7
10 mg/kg ML-171 Grubu	7	1	7
Kullanılacak Toplam Hayvan Sayısı			42

Deney gruplarına uygulanan ilaç dozları ve deney basamakları aşağıda belirtilmiştir;

- I. Kontrol grubu:** Bu gruptaki sıçanlara 1 ml/kg hacimde %1 oranında DMSO içeren mısır yağı karışımı enjekte edilmiş, 60 dakika (dk.) sonra ise 1 ml/kg hacimde serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Takip eden 30 dk. süresince ECoG ve senkronize video kayıtları gerçekleştirilmiştir.
- II. Pentilentetrazol (PTZ) grubu:** Bu grupta yer alan sıçanlara ilaçların çözücüsü 1 ml/kg hacimde %1 oranında DMSO içeren mısır yağı karışımı

enjekte edilmiş, 60 dk. Sonra ise 35 mg/kg PTZ (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) serum fizyolojikte çözülerek enjekte edilmiştir. PTZ enjeksiyonundan sonrası 30 dk. boyunca ECoG ve senkronize video kayıtları gerçekleştirilmiştir.

III. VPA Grubu (400 mg/kg Valproik Asit): Bu grupta yer alan sıçanlara, ilaçların çözücüsü 1 ml/kg hacimde %1 oranında DMSO içeren mısır yağı karışımı ve doğrudan 400 mg/kg dozunda Valproik Asit (VPA) i.p. olarak enjekte edilmiş, 60 dk. Sonra ise 35 mg/kg PTZ (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) serum fizyolojikte çözülerek enjekte edilmiştir. PTZ enjeksiyonundan sonrası 30 dk. boyunca ECoG ve senkronize video kayıtları gerçekleştirilmiştir.

IV. ML-171 (0,1 mg/kg) Grubu: Bu gruptaki yer alan sıçanlara, NOX-1 enzim inhibitörü ML-171 0,1 mg/kg dozunda DMSO ve mısır yağı karışımında çözülerek, ilaç hacmi 1 ml/kg olacak şekilde i.p. olarak enjekte edilmiş, 60 dk. Sonra ise 35 mg/kg PTZ (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) serum fizyolojikte çözülerek enjekte edilmiştir. PTZ enjeksiyonundan sonrası 30 dk. boyunca ECoG ve senkronize video kayıtları gerçekleştirilmiştir.

V. ML-171 (1 mg/kg) Grubu: Bu gruptaki yer alan sıçanlara, NOX-1 enzim inhibitörü ML-171 1 mg/kg dozunda DMSO ve mısır yağı karışımında çözülerek, ilaç hacmi 1 ml/kg olacak şekilde i.p. olarak enjekte edilmiş, 60 dk. Sonra ise 35 mg/kg PTZ (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) serum fizyolojikte çözülerek enjekte edilmiştir. PTZ enjeksiyonundan sonrası 30 dk. boyunca ECoG ve senkronize video kayıtları gerçekleştirilmiştir.

VI. ML-171 (10 mg/kg) Grubu: Bu gruptaki yer alan sıçanlara, NOX-1 enzim inhibitörü ML-171 10 mg/kg dozunda DMSO ve mısır yağı karışımında çözülerek, ilaç hacmi 1 ml/kg olacak şekilde i.p. olarak enjekte edilmiş, 60 dk. Sonra ise 35 mg/kg PTZ (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)

serum fizyolojikte çözümlere enjekte edilmiştir. PTZ enjeksiyonundan sonrası 30 dk. boyunca ECoG ve senkronize video kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Deney Süreci ve PTZ ile Tutuşma (Kindling) Modeli Epilepsi Oluşturma Protokolü

Epileptik aktiviteyi taklit eden bir in vivo model oluşturmak amacıyla, kontrol grubu dışındaki tüm sıçanlara subakut pentilentetrazol (PTZ) uygulama protokolü uygulanmıştır. Bu amaçla, sıçanlara 33 gün boyunca, haftanın üç günü (Pazartesi, Çarşamba ve Cuma) olmak üzere toplam 15 kez, 35 mg/kg dozunda 1 ml/kg hacminde PTZ intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu yapılan hayvanlar üstü açık şeffaf pleksiglas (50x40x40 cm boyutlarında) kafeslere konulmuştur. Her enjeksiyonun ardından hayvanlar 30 dakika süreyle gözlemlenmiş ve davranışları Modifiye Racine Nöbet Skorlaması temel alınarak nöbet evrelerine göre puanlanmıştır (88)

Modifiye Racine skalasına göre, enjeksiyon sonrası 3 kez evre 5 ve üzeri nöbet geçiren sıçanlar "tutuşmuş" olarak kabul edilmiştir. Tutuşmuş olarak tanımlanan hayvanlara elektrofizyolojik kayıt alınabilmesi amacıyla, stereotaksik cerrahi prosedürü ile belirlenen koordinatlara intrakraniyal elektrotlar yerleştirilmiştir. Uygulanan cerrahi girişim sonrası hayvanlara yedi günlük bir iyileşme süreci tanınmıştır.

İyileşme döneminin ardından, deney gruplarına ait hayvanlara, VPA serum fizyolojik içerisinde, ML-171 ise DMSO oranı yüzde 5'i aşmamak üzere DMSO-Mısır yağı karışımı içerisinde çözümlere deney protokolünde belirtilen dozlarda i.p. yolla uygulanmıştır. Yağ solüsyonundan ilaç salınımının daha yavaş olması göz önünde bulularak ML-171 enjeksiyonundan 60 dakika, VPA enjeksiyonundan ise 30 dakika sonra epileptik nöbetin yeniden indüklenmesi amacıyla tüm gruplara 35 mg/kg dozunda PTZ enjeksiyonu tekrar uygulanmıştır. Hayvanlar, elektrotlar aracılığıyla kayıt sistemine bağlanarak, 30 dakika boyunca elektrokortikogram (ECoG) kayıtları alınmıştır. Bu sürede, nöbet davranışlarının objektif değerlendirilmesi için eş zamanlı video kayıtları da alınmıştır. İlaç enjeksiyonunun yapılmasından 24 saat sonra

hayvanlar anestezi altında servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiş, beyin dokuları hızla soğuk zemin üzerinde çıkarılarak beyin dokusu ve hipokampus bölgeleri izole edilmiştir. Elde edilen hipokampus örnekleri, fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7.4) içerisinde homojenize edilmiş, ardından +4 °C’de, 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantları ayrılmıştır. Bu süpernatantlar, biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80 °C’de saklanmıştır.

3.1.3.3. Stereotaksik Uygulama

Stereotaksik cerrahi girişimin öncesinde, sıçanlara genel anestezi amacıyla intraperitoneal (i.p.) yolla ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kombinasyonu uygulanmıştır. Anestezinin yeterliliği, kornea ve pençe çekme reflekslerinin kaybı ile değerlendirilmiştir. Anestezi sağlandıktan sonra hayvanın kranial bölgesindeki kıllar tıraş edilerek kafa derisi, batikon solüsyonu ile merkezden periferde doğru antisepsiyon kurallarına uygun şekilde temizlenmiştir.

Sıçan, stereotaksik çerçeveye yerleştirilmiş ve bregma ile lambda noktalarının aynı yatay düzlemde olacak şekilde konumlandırılması sağlanmıştır. 10 numaralı bistüri ile yaklaşık 3 cm uzunluğunda bir insizyon yapılmış, ardından deri altındaki kas, fasya ve tendon dokuları dikkatlice uzaklaştırılarak kafatası kemik dokusu açığa çıkarılmıştır. Yumuşak dokuda oluşan kanamalar steril gazlı bez ile kontrol altına alınmıştır.

Kanama kontrolünün sağlanmasını takiben kranial kemik yüzeyinde referans noktası olarak bregma belirlenmiş ve tüm koordinatlar bu noktaya göre tanımlanmıştır. Paxinos ve Watson’un sıçan beyin atlası (1998) temel alınarak elektrotların yerleştirileceği koordinatlar hesaplanmıştır:

- Pozitif elektrot: Bregmanın 4 mm anterioru ve orta hattın 3 mm sağ lateraline,
- Negatif elektrot: Bregmanın 4 mm posterioru ve orta hattın 3 mm sağ lateraline,
- Toprak elektrot (referans): Bregmanın 4 mm posterioru ve orta hattın 3 mm sol lateraline.

Belirlenen bu noktalarda çapı 1 mm olan el matkabı (drill) kullanılarak kranial kemikte delikler açılmıştır. Açılan deliklere, beyin zarları ile temas edecek şekilde

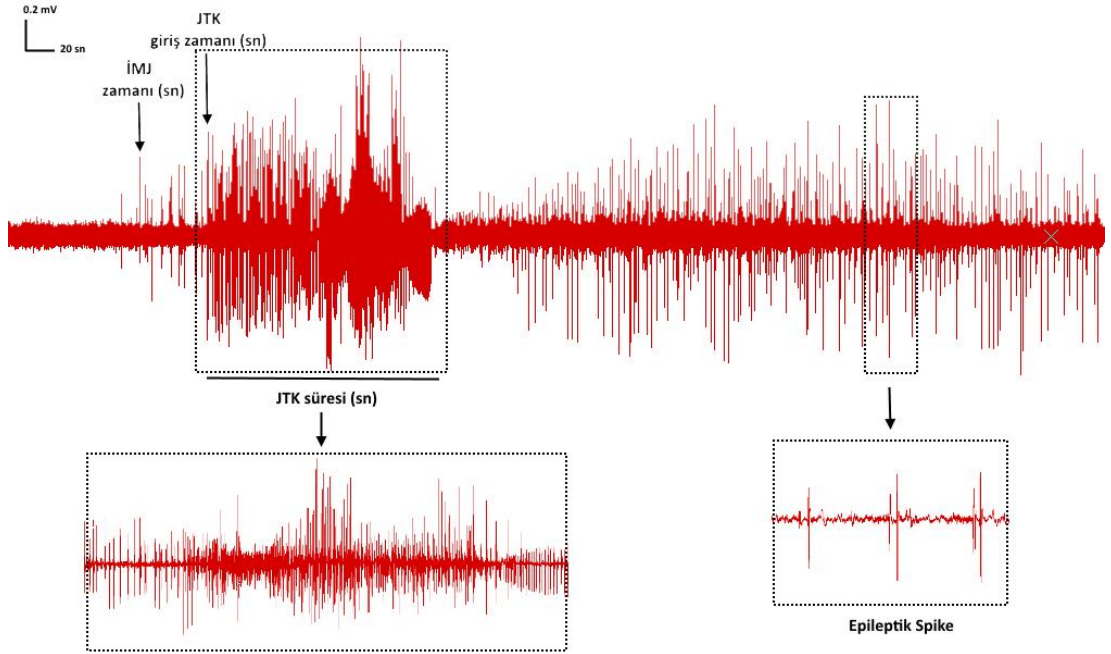
paslanmaz elik vidalar yerleştirilmiştir. Her bir vidaya önceden hazırlanmış elektrot kabloları bağlanmış ve bağlantılar açık devrede test edilerek sinyal iletimi kontrol edilmiştir.

Tüm elektrotlar, hareket ve enfeksiyonu önlemek amacıyla iki kat dental akrilik ile hayvan kafatasına sabitlenmiştir. Cerrahi uygulamanın ardından hayvanlar postoperatif iyileşme için 1 hafta süreyle gözlem altına alınmıştır. Enfeksiyon riskini azaltmak amacıyla, cerrahiden sonraki ilk 3 gün boyunca, günde 2 kez intraperitoneal olarak sultamisilin (50 mg/kg) uygulanmıştır.

ECoG kayıtları, yerleştirilen elektrotlardan elde edilen elektriksel sinyallerin ilk olarak BioAmp (AD Instruments, Avustralya) amplifikatör sistemi aracılığıyla yükseltilmesi ve daha sonra PowerLab 4/SP (AD Instruments, Avustralya) veri toplama sistemi ile dijital ortamda kaydedilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektrokortikogram (ECoG) verileri daha sonra analiz için kullanılmıştır.



Şekil 3 1.LabChart programı ile ECoG kayıtlarının alınması



Şekil 3 2.ECoG kayıtlarında değerlendirilen parametreler

3.1.3.4. Elektrofizyolojik Kayıtların Değerlendirilmesi

Deney gruplarındaki tüm hayvanlardan, 30 dakika süreyle eş zamanlı olarak elektrokortikogram (ECoG) ve video kayıtları alınmıştır. Bu kayıtlar, epileptik aktivitenin davranışsal ve elektrofizyolojik bulgularla eşleştirilmesi amacıyla paralel olarak değerlendirilmiştir. Verilerin analizi için PowerLab 4/SP kayıt sistemi ve LabChart v7.0.3 (AD Instruments, Avustralya) yazılımının yararlanılmıştır. İlk olarak, çevresel artefaktların ve ortam kaynaklı gürültülerin eliminasyonu amacıyla ECoG sinyalleri 1–34 Hz filtre uygulanarak dijital olarak filtrelenmiştir.

Her hayvan için, filtrelenmiş sinyaller üzerinden bazal ECoG eşik aktivite düzeyi hesaplanmıştır. Epileptik spike aktivitesi; zemin ECoG aktivitesinden en az üç kat daha büyük amplitüde sahip, ritmik yapıda ve diken frekansında progresyon gösteren dalga formları olarak tanımlanmıştır. Bu spike tanımı, LabChart yazılımında eşik değeri girilerek otomatik algılama için kullanılmıştır.

Değerlendirilen Parametreler:

- **İlk Miyoklonik Jerk (İMJ) Süresi:**

ECoG kayıtlarında tespit edilen ilk epileptik spike aktivitesi ile video kaydında gözlenen ilk miyoklonik kasılma (jerk) hareketi eşleştirilerek saniye cinsinden belirlenmiştir.

- **Spike Sayısı:**

30 dakikalık kayıt süresince, tanımlı eşik değerin üzerinde tespit edilen epileptik spike aktivitesi sayısal değerlere dönüştürülerek ölçülmüştür.

- **Jeneralize Tonik-klonik Nöbete Giriş Süresi:**

Jeneralize tonik-klonik nöbetin (JTKN) başlangıcı, video kaydındaki tonik postür ve klonik hareketlerin ECoG üzerinde diken-dalga kompleksleri ile eş zamanlı olarak gözlemlendiği ilk an olarak tanımlanmış ve saniye cinsinden belirlenmiştir.

- **JTKN Süresi:**

Video ve ECoG verileri eşleştirilerek tonik-klonik nöbetin başlangıcından sonuna kadar geçen süre ölçülmüş ve saniye olarak kaydedilmiştir.

3.1.3.5. Biyokimyasal Analizler

ECoG ve video kayıtlarının tamamlanmasından 24 saat sonra, deney grubundaki hayvanlar anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye öncesi, anestezi altındaki hayvanlara kardiyak yoldan PBS çözeltisi kullanılarak dolaşım perfüzyonu uygulanmış, dolaşım kan dokudan temizlenmiştir. Perfüzyon işlemi sonrası beyin dokusu buz üzerinde hızlı bir şekilde çıkarılmış ve hipokampus anatomik olarak izole edilmiştir. İzole edilen hipokampal dokular, numune etiketlemeleri yapılmış steril ependorf tüplerine alınmıştır.

Çıkarılan her bir hipokampal doku örneği hassas terazi ile tartılmış ve her 1 mg dokuya karşılık 9 µL PBS (pH: 7.4) gelecek şekilde tampon çözelti eklenmiştir (1:9). PBS eklendikten sonra örnekler buz üzerinde bekletilerek, manuel bıçaklı homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi, protein bozulmasını en aza indirmek amacıyla soğuk koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen homojenatlar, hücresel kalıntılardan arındırmak amacıyla 4 °C'de, 5000 × g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantlar, dikkatli şekilde üst fazdan alınarak kontaminasyon olmadan yeni ependorf tüplere aktarılmıştır. Her örnekten en az 500 µL süpernatant elde edilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen süpernatantlar, TAS, TOS ve ELISA kitleriyle ölçüm için kullanılabilecek kadar -80 °C'de kısa süreli olarak depolanmıştır.

3.1.3.6. Hipokampal Dokuda Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçümü

TAS ve TOS seviyeleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) ticari kitler kullanılarak, üretici firma protokolüne uygun şekilde spektrofotometrik yöntemle analiz edilmiştir.

- **TAS tayini:** Doku homojenatında bulunan antioksidanların ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) radikalini inhibe etme kapasitesi esas alınarak ölçülmüştür. Oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak 660 nm'de okunmuştur. Elde edilen sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak hesaplanmıştır.
- **TOS tayini:** Örneklerdeki oksidan moleküller, demir iyonlarını

serbestleştirerek, valin içeren kromojenle renkli kompleks oluşturur. Bu kompleksin absorbansı 530 nm dalga boyunda ölçülmüş ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L olarak ifade edilmiştir.

Her bir ölçüm 96 kuyucuklu mikropłaka üzerinde, örnekler ikili tekrarlar halinde çalışılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaz kalibrasyonu ve kontrol numuneleri üretici talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır.

3.1.3.7. Hipokampal Dokuda Bax, Bcl-2, Bölünmüş Kaspaz 3 Seviyelerinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü

Deney gruplarında yer alan sıçanlardan elde edilen hipokampus dokularında, Bax, Bcl-2 ve bölünmüş kaspaz-3 protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, ticari rat ELISA kitleri kullanılmıştır.

Elde edilen süpernatantlar, üretici firma protokollerine uygun şekilde, her bir hedef protein için ayrı 96 kuyucuklu ELISA plakalarında çalışılmıştır. Her bir ölçüm çift tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Her bir protein için oluşturulan standart eğriler yardımıyla, örneklerin konsantrasyonları hesaplanmış ve sonuçlar ng/mg toplam protein birimiyle ifade edilmiştir. Ölçüm öncesinde her örneğin toplam protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar bu değere göre normalize edilmiştir.

3.1.3.8. Total Protein Ölçümü

Deney gruplarında yer alan sıçanlardan elde edilen hipokampus dokularına ait deneysel verilerin normalize edilebilmesi ve elde edilen sonuçların karşılaştırılabilirliğinin artırılması amacıyla, her örnekte toplam protein miktarı belirlenmiştir. Bu ölçüm için, Bradford protein tayin yöntemi esas alınarak ticari bir kit (ABP Biosciences, Beltsville, ABD) kullanılmıştır.

3.1.3.9. NOX-1 Protein Ekspresyonunun Tayini

Histopatolojik Yöntem

Sıçanların nekropsileri yapılarak beyin dokuları %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Dokular rutin alkol-ksilol takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara alındı. Poly-lysinli lamlara alınan 4 μm 'lik kesitler hematoksilen-

eosin ile boyanarak cornu ammonis'in CA1, CA3 kısımlarındaki nöronlarda görülen piknotik ve dejeneratif değişimler yönünden semikantitatif olarak yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal Yöntem

Polilislinli lamlara alınan 4 µm'lik kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirilecek, PBS ile yıkandıktan sonra ise %3'lük H₂O₂' de 10 dk. tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonu ile 2x5 dk 500 watt' da muamele edildi. Daha sonra NOX1 (Affbiotech, Katalog no. DF8684) primer antikoru ile 1/250 dilusyon oranında +4 °C'de overnight olarak inkubasyona bırakıldı. Sekonder olarak; Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (Thermofischer, Katalog no: TP-125-HL) üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Kromojen olarak DAB (3,3' Diaminobenzidin) kullanıldı. Mayer's Hematoksilen ile zıt boya yapıldıktan sonra kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. İncelemede cornu ammonis (CA1/CA2, CA3) kısımlarındaki immunpozitiflikler semikantitatif olarak yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++)olarak değerlendirildi.

3.1.4. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen tüm veriler sayısal karşılığa dönüştürülerek istatistiksel analizlerde kullanıldı. ELISA, TAS/TOS ve XTT testlerinden elde edilen absorbans değerleri, kit protokollerinde belirtilen standart eğriler veya formüller aracılığıyla konsantrasyon (ng/mL, µM vb.) cinsinden sayısal değerlere çevrilmiştir. Flow sitometri analizlerinde Annexin V işaretlemesine göre apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri hesaplanmıştır. İmmünhistokimya ve histopatolojik boyamalardan elde edilen görüntüler, ImageJ programı kullanılarak "mean intensity" ve "pozitif hücre sayısı/skoru" gibi parametreler üzerinden nicel verilere dönüştürülmüştür.

Elektrofizyolojik veriler (spike sayısı, JTK süresi, IMJ süresi vb.) video-ECoG kayıtlarının analiz edilmesiyle sayısal forma getirilmiştir. Davranışsal nöbet analizleri Modifiye Racine Skalası'na göre evrelenmiş ve grup ortalamaları hesaplanmıştır.

Elde edilen tüm sayısal veriler SPSS istatistik paket programı kullanılarak (Windows için SPSS 22.0 sürümü) analiz edilmiştir. Normal dağılıma uygunluk

Kolmogorov-Smirnov testi ile test edilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterdiği durumlarda, gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) uygulanmıştır. Anlamlı farklılık bulunan parametrelerde, farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Tukey HSD (post-hoc) testi kullanılmıştır. Bütün veriler ortalama \pm standart hata (Ort. \pm SH) biçiminde ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.



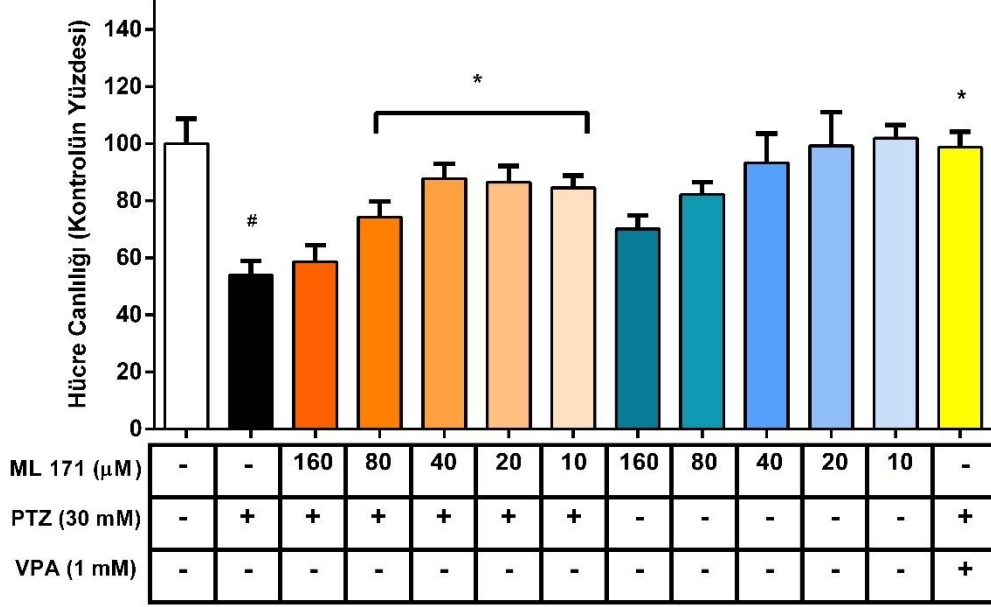
4. BULGULAR

4.1. *In-Vivo* Çalışma Bulguları

4.1.1. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Hücre Canlılığına Etkisi

Pentilentetrazol (PTZ) uygulaması, SH-SY5Y hücre hattında anlamlı düzeyde sitotoksositeye yol açmış ve XTT testi sonuçlarına göre hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. PTZ'ye eş zamanlı olarak farklı konsantrasyonlarda uygulanan NOX-1 inhibitörü ML-171'in, 40 ve 80 µM dozlarında belirgin hücre koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle bu doz aralığında, PTZ kaynaklı hücre hasarını anlamlı düzeyde baskıladığı ve hücre canlılığını yeniden kontrol seviyelerine yaklaştırdığı görülmüştür. ML-171'in tek başına uygulandığı gruplarda hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Pozitif kontrol grubu olarak dahil edilen valproik asit (VPA, 1 mM), PTZ'nin toksik etkilerine karşı anlamlı düzeyde hücre koruyuculuğu sağlamış ve modelin farmakolojik validasyonunu desteklemiştir.

XTT

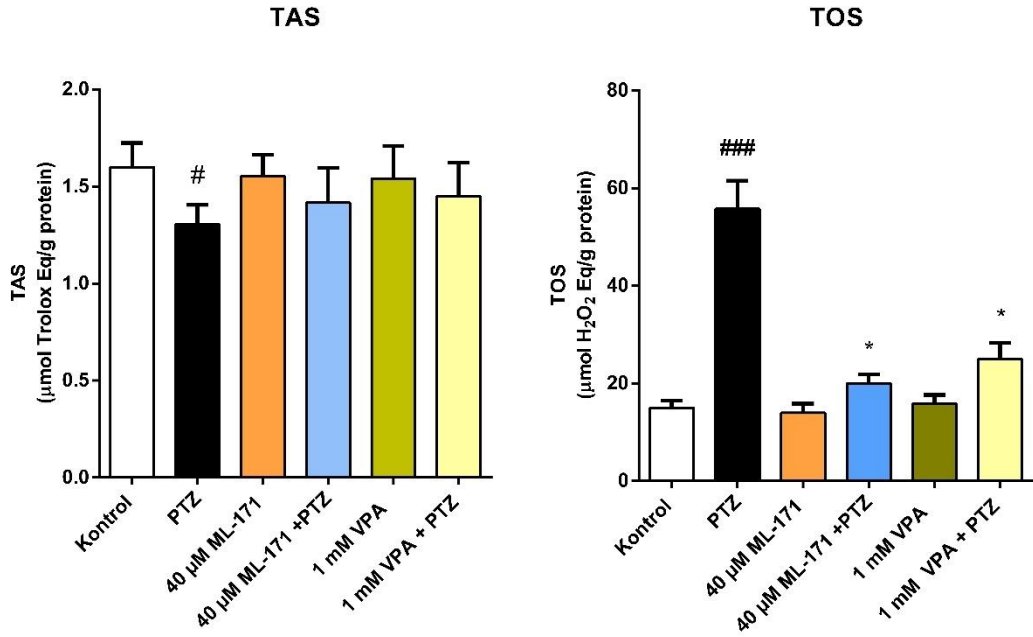


Şekil 4 1.NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Hücre Canlılığına Etkisi

PTZ (30 mM) uygulaması sonrası SH-SY5Y hücre hattında hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaltmıştır ($^{\#}p<0,001$). PTZ ile birlikte uygulanan ML-171'in 10,20, 40 ve 80 µM dozlarında hücre canlılığı anlamlı düzeyde artmış, sitoprotektif etki ortaya koymuştur ($*p<0,001$). VPA (1 mM) ile oluşturulan pozitif kontrol grubu da benzer şekilde anlamlı koruyucu etki göstermiştir ($* p<0,001$).

4.1.2. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde TAS ve TOS Üzerine Etkisi

PTZ, SH-SY5Y hücrelerinde total antioksidan kapasiteyi (TAS) anlamlı düzeyde baskılamış; buna karşılık olarak total oksidan seviyelerinde (TOS) belirgin bir artış meydana getirmiştir. Bu bulgular PTZ'nin hücre içi redoks dengesini prooksidan yöne doğru kaydırıldığını ortaya koymaktadır. PTZ'ye eş zamanlı olarak uygulanan 40 µM ML-171, TAS seviyelerini anlamlı şekilde geri kazandırmasa da TOS parametresinde belirgin bir azalma sağlamış, oksidatif yükü düşürmüştür. Bu durum, NOX-1 inhibitörü olan ML-171'in hücre içi oksidan üretimini azaltarak PTZ kaynaklı oksidatif stresi hafiflettiğini göstermektedir. Tek başına ML-171 uygulaması hem TAS hem TOS düzeyleri üzerinde anlamlı bir değişim oluşturmamıştır. Referans ajan olarak kullanılan VPA'nın ise özellikle TOS parametresinde güçlü bir düşürücü etki gösterdiği, TAS düzeylerinde ise kontrol grubuna yakın değerlere ulaştığı izlenmiştir. Bulgular, NOX-1 inhibitörünün oksidatif stres regülasyonunda farmakolojik bir ajan olarak potansiyel taşıdığını göstermektedir.

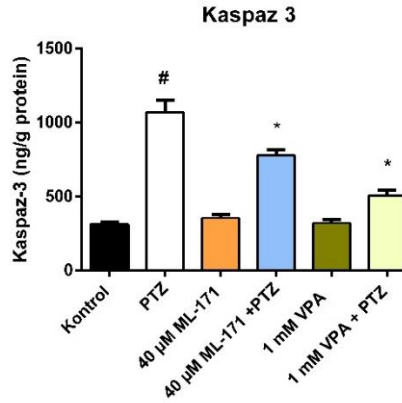
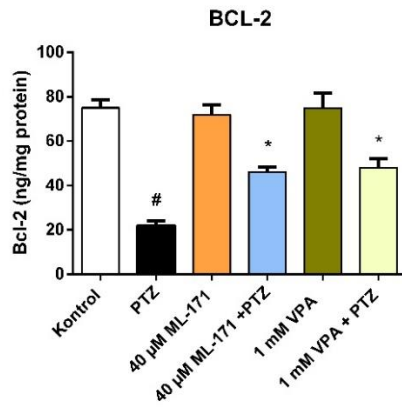
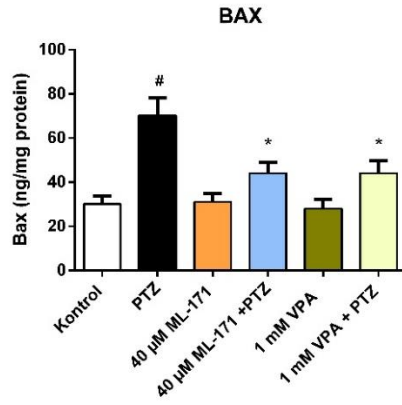


Şekil 4 2.NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde TAS ve TOS Üzerine Etkisi

PTZ uygulaması, SH-SY5Y hücrelerinde total antioksidan kapasiteyi (TAS) anlamlı düzeyde azaltırken ([#]p<0,05), total oksidan seviyelerini (TOS) belirgin şekilde artırmıştır(^{###}p<0,001). ML-171 (40 µM) ve valproik asit (VPA, 1 mM) uygulamaları, PTZ'ye bağlı TOS artışını anlamlı şekilde baskılamış (^{*}p<0,001)), ancak TAS düzeylerinde anlamlı bir geri dönüş sağlamamıştır.

4.1.3. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 Protein Düzeylerine Etkisi

PTZ uygulaması, SH-SY5Y hücre hattında apoptotik yanıtı tetikleyerek proapoptotik Bax ve yürütücü kaspaz-3 protein düzeylerini anlamlı şekilde artırmış, antiapoptotik Bcl-2 düzeylerini ise belirgin düzeyde baskılamıştır. NOX-1 inhibitörü ML-171'in 40 µM dozda uygulanması, PTZ ile oluşturulan bu apoptotik profili anlamlı düzeyde modifiye etmiş; Bax ve kaspaz-3 düzeylerinde azalma, Bcl-2 düzeylerinde ise yükselme sağlayarak proapoptotik sinyalleri baskılamıştır. ML-171'in tek başına uygulanması ise bu parametreler üzerinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Pozitif kontrol ajanı olarak değerlendirilen VPA da benzer şekilde apoptotik belirteçleri normalize edici etki göstermiştir. Elde edilen bulgular, ML-171'in PTZ kaynaklı mitokondriyal yolağa bağlı apoptotik hücre ölümünü hafiflettiğini ve antiapoptotik dengenin korunmasına katkı sağladığını göstermektedir.

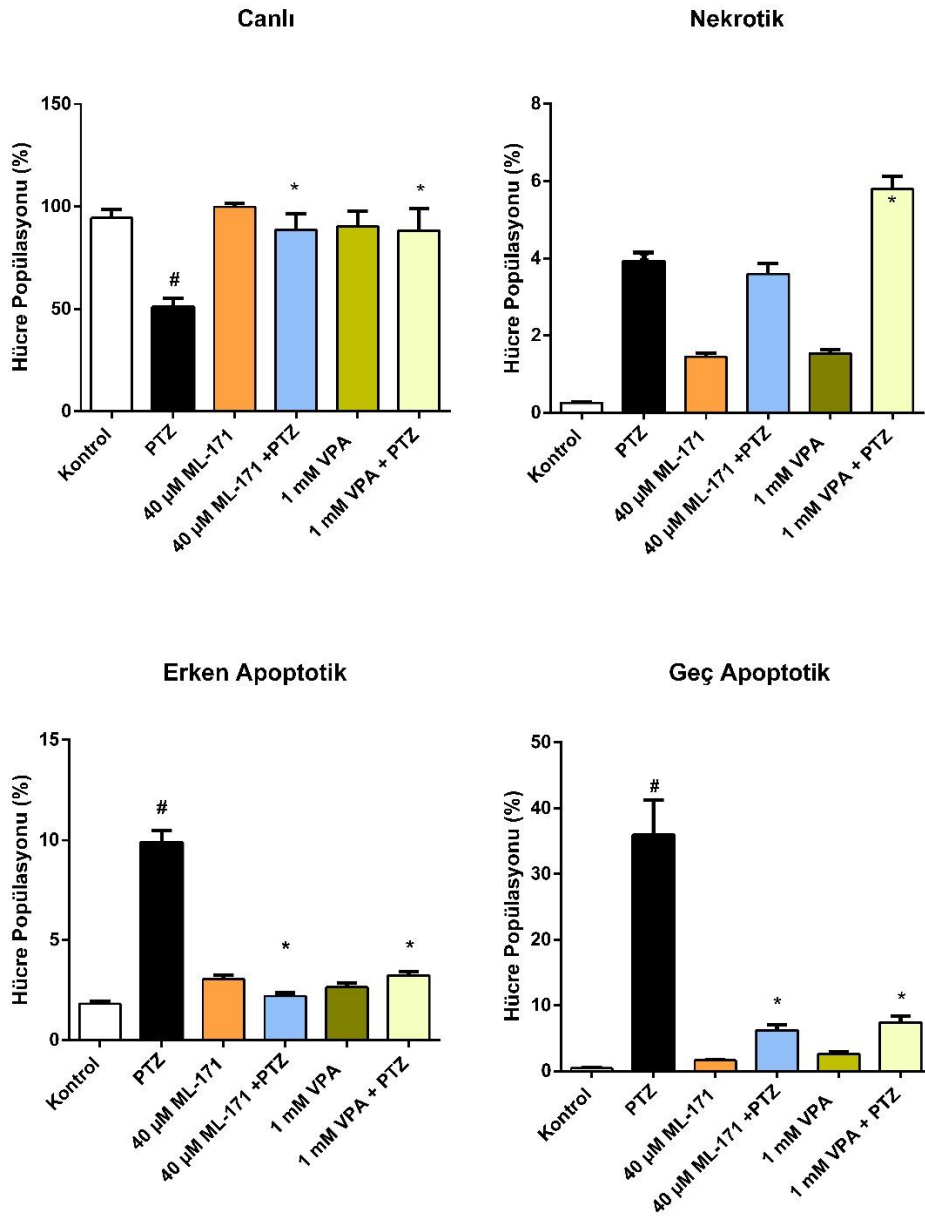


Şekil 4 3.NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 Protein Düzeylerine Etkisi

PTZ uygulaması, SH-SY5Y hücrelerinde proapoptotik Bax ve yürütücü kaspaz-3 düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artırmış^(#p<0,001), antiapoptotik Bcl-2 düzeylerini ise belirgin şekilde düşürmüştür^(#p<0,001). ML-171 (40 µM) ve VPA (1 mM) uygulamaları, bu değişiklikleri anlamlı düzeyde tersine çevirmiştir^(*p<0,001).

4.1.4. NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Flow Sitometri ile Apoptozis Üzerine Etkisi

PTZ uygulaması, SH-SY5Y hücrelerinde apoptoz ve nekroz gibi hücre ölümü mekanizmalarını tetiklemiş; canlı hücre oranında anlamlı azalma meydana gelirken, erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarında belirgin artış gözlenmiştir. Nekrotik hücre oranı da kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. NOX-1 inhibitörü ML-171'in 40 µM dozda uygulanması, PTZ'ye bağlı olarak indüklenen erken ve geç apoptoz oranlarını anlamlı düzeyde azaltmış; canlı hücre popülasyonunu belirgin biçimde artırmıştır. ML-171'in bu etkisinin, antioksidan savunmayı düzenleyici ve mitokondriyal yolağı stabilize edici özellikleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Nekrotik hücre oranında anlamlı bir düşüş gözlenmese de apoptoz üzerine olan baskılayıcı etkisi dikkat çekicidir. Pozitif kontrol ajanı olan VPA da benzer şekilde apoptotik hücre oranlarını anlamlı düzeyde azaltmış ve hücre canlılığını artırıcı etki göstermiştir. Bu bulgular, ML-171'in PTZ kaynaklı apoptotik süreci hafiflettiğini ve hücre bütünlüğünü koruyucu etkiler ortaya koyduğunu göstermektedir.



Şekil 4 4.NOX-1 İnhibitörü ML-171'in SH-SY5Y Hücrelerinde PTZ ile Oluşturulan Toksikite Modelinde Flow Sitometri ile Apoptozis Üzerine Etkisi

PTZ uygulaması sonrası SH-SY5Y hücrelerinde canlı hücre popülasyonu anlamlı düzeyde azalmış([#] $p < 0,001$), erken ve geç apoptotik oranlar ile nekrotik hücre yüzdesi anlamlı düzeyde artmıştır ([#] $p < 0,001$). ML-171 (40 µM) ve VPA (1 mM) uygulamaları, apoptotik hücre popülasyonlarını anlamlı düzeyde azaltmış ve hücre canlılığını artırmıştır (^{*} $p < 0,001$).

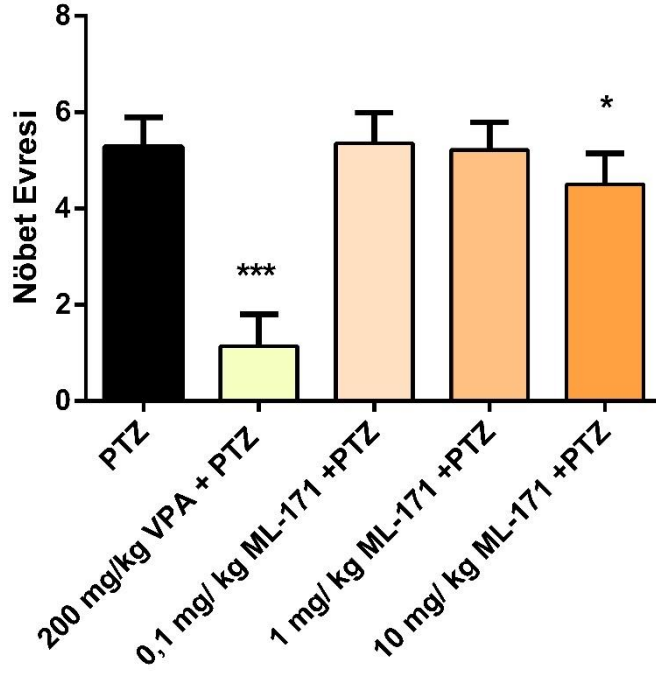
4.2.In-Vitro Çalışma Bulguları

4.2.1. Epileptik Nöbet Bulguları

4.2.1.1. Modifiye Racine Skalası'na Göre Nöbet Evreleri

PTZ ile tekrarlayan nöbet oluşturulan sıçan modelinde nöbet şiddeti Racine skalasına göre değerlendirilmiştir. PTZ uygulaması sonrası yüksek evreli nöbet aktivitesi gözlemlenmiş, epileptik modelin başarıyla oluşturulduğu doğrulanmıştır. Valproik asit (VPA) ile tedavi edilen grupta, Racine evreleri anlamlı düzeyde azalmış ve güçlü bir antikonvülzan etki göstermiştir. ML-171'in en düşük dozu olan 0,1 mg/kg bu etkiyi göstermemiştir. Orta dozda da fark izlenmemekle birlikte, 10 mg/kg ML-171 uygulaması PTZ'ye bağlı nöbet evrelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu bulgu, ML-171'in doz bağımlı bir antiepileptik etkiye sahip olabileceğini ve yüksek doz uygulamanın nöbet şiddeti üzerinde belirgin bir azalma sağlayabildiğini göstermektedir.

Racine Nöbet Evreleri

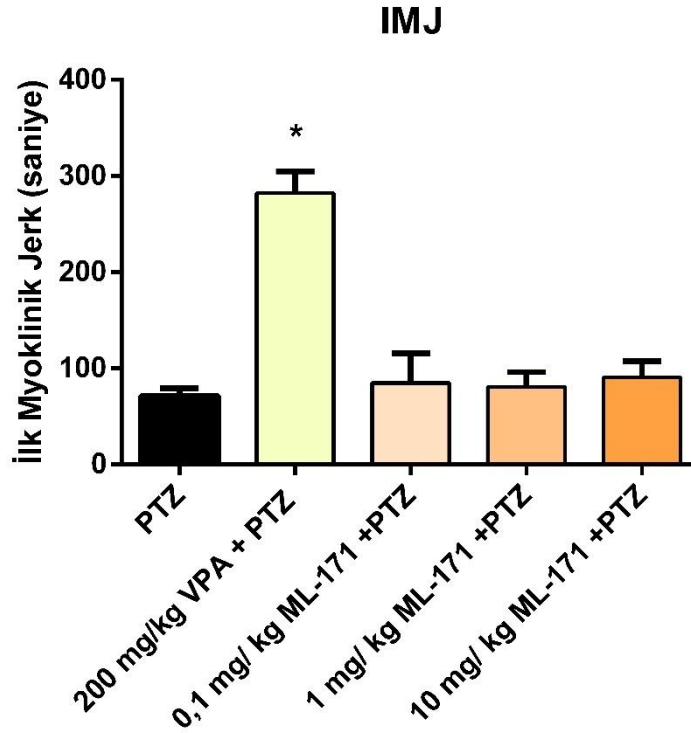


Şekil 4 5.Modifiye Racine Skalası'na Göre Nöbet Evreleri

Racine skalasına göre değerlendirilen ortalama nöbet evreleri, VPA+PTZ grubunda PTZ grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalmıştır (** $p < 0,001$). 10 mg/kg dozundaki ML-171 uygulaması da nöbet evrelerinde anlamlı bir azalma sağlamıştır (* $p < 0,05$). Diğer ML-171 dozlarında PTZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

4.2.1.2. Grupların İlk Miyokolonik Jerk (İMJ) Süreleri

PTZ uygulanan sıçanlarda nöbet başlangıcının değerlendirilmesi amacıyla ilk miyoklonik jerk (İMJ) süresi ölçülmüştür. PTZ grubu, nöbet aktivitesinin kısa sürede başladığı düşük eşikli bir model oluşturmuştur. VPA uygulanan grupta İMJ süresi anlamlı düzeyde uzamış, bu da nöbet eşiğinin yükseldiğini ve nöbet başlangıcının geciktiğini göstermiştir. ML-171 uygulanan gruplarda İMJ süresinde kısmi artışlar izlenmekle birlikte, yalnızca düşük ve orta dozlarda belirgin bir fark saptanmamıştır. Bu bulgular, NOX-1 inhibisyonunun nöbet eşiği üzerine olan etkisinin sınırlı olabileceğini, ancak yüksek doz ML-171 uygulamasının geciktirici bir eğilim gösterebileceğini düşündürmektedir.

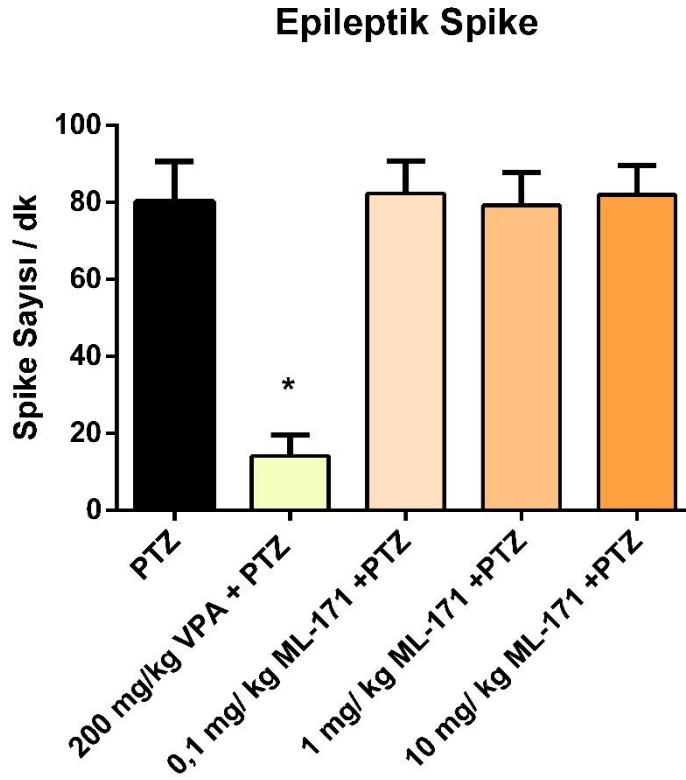


Şekil 4 6. Grupların İlk Miyokolonik Jerk (İMJ) Süreleri

PTZ ile oluşturulan modelde, VPA+PTZ grubunda İMJ süresi PTZ grubuna kıyasla anlamlı şekilde uzamıştır (* $p < 0,001$). ML-171'in uygulandığı dozlarda PTZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

4.2.1.3. Grupların Epileptik Spike Sayısı

Gruplar arasında nöbet aktivitesinin elektrofizyolojik olarak değerlendirilmesi amacıyla EEG kayıtları analiz edilerek dakikadaki epileptik spike sayıları karşılaştırılmıştır. PTZ uygulanan grupta yüksek frekanslı spike aktivitesi gözlenmiş ve bu durum modelin nöbet üretimindeki etkinliğini ortaya koymuştur. VPA ile tedavi edilen grupta spike sıklığı belirgin şekilde azalmış ve nöbet baskılanması elektrofizyolojik düzeyde de doğrulanmıştır. ML-171 ile tedavi edilen gruplarda ise spike frekansında anlamlı bir azalma izlenmemiştir. Spike aktivitesindeki bu devamlılık, NOX-1 inhibisyonunun nöbetin elektrofizyolojik komponenti üzerinde anlamlı baskılayıcı bir etki oluşturmadığını düşündürmektedir.

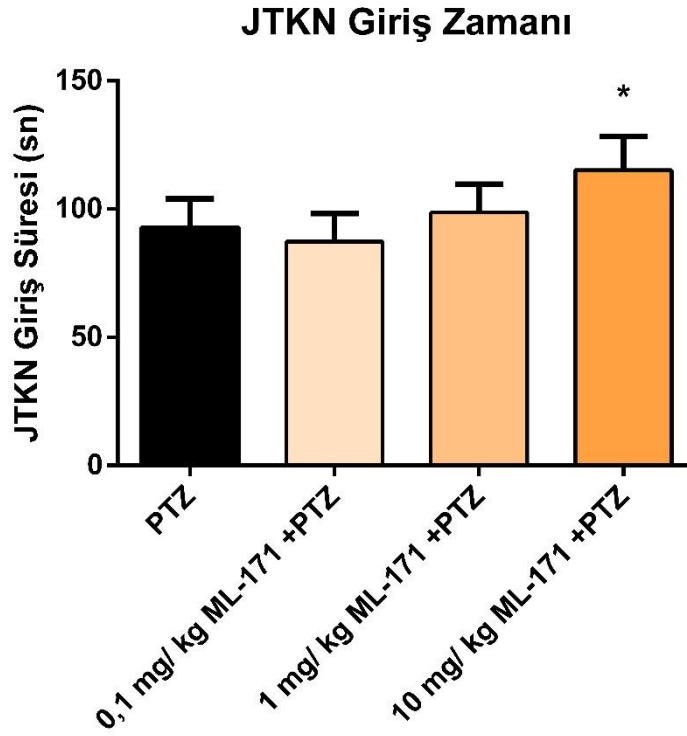


Şekil 4 7.Grupların Epileptik Spike Sayısı

Gruplar arasında karşılaştırılan epileptik spike frekansları, VPA+PTZ grubunda PTZ grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalmıştır (* $p < 0,001$). ML-171 uygulanan gruplarda spike frekansında anlamlı bir azalma izlenmemiştir ($p > 0,05$).

4.2.1.4. Grupların Jeneralize Tonik-Klonik Nöbete (JTK) Giriş Zamanı

PTZ ile oluşturulan modelde jeneralize tonik-klonik nöbetlerin başlamasına kadar geçen süre, nöbet eşiğini değerlendirmek amacıyla izlenmiştir. PTZ grubu, kısa sürede JTK nöbetlerin başladığı bir profil sergilemiştir. ML-171 ile tedavi edilen gruplarda nöbete giriş süresi dozla birlikte hafif düzeyde uzama eğilimi göstermiştir. En yüksek doz olan 10 mg/kg ML-171 grubunda bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. Bu bulgu, ML-171'in yüksek dozda nöbet başlangıcını geciktirici potansiyel taşıdığını göstermektedir. Düşük ve orta doz uygulamalar ise PTZ grubuna benzer sürelerle JTK nöbetlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

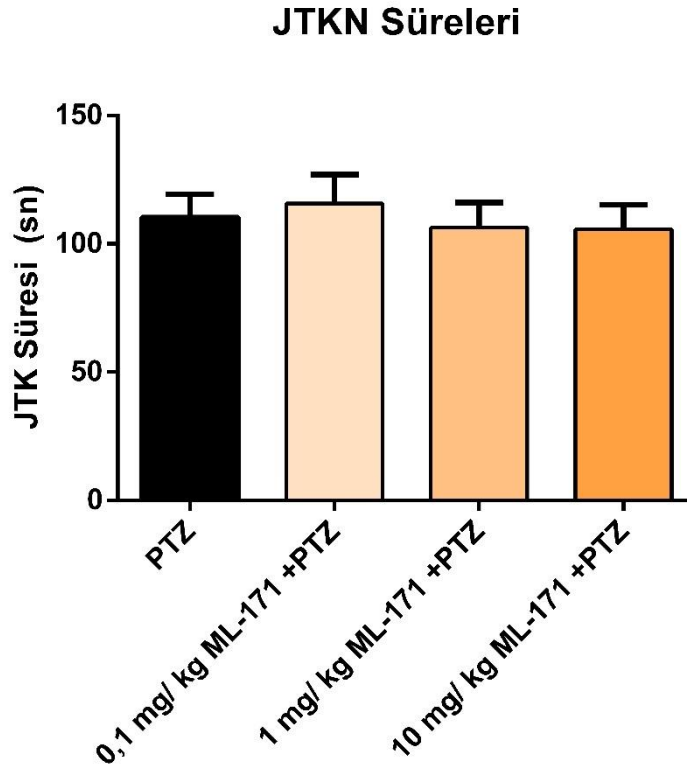


Şekil 4 8. Grupların Jeneralize Tonik-Klonik Nöbete (JTKN) Giriş Zamanı

JTK nöbetlerine giriş süresi, 10 mg/kg ML-171 uygulanan grupta PTZ grubuna göre anlamlı düzeyde uzamıştır (* $p < 0,001$). Diğer dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

4.2.1.5. Grupların Jeneralize Tonik-Klonik Nöbet Süresi

PTZ uygulaması ile oluşturulan nöbet modelinde, jeneralize tonik-klonik nöbetin süresi belirlenerek uygulanan tedavilerin nöbet şiddeti üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. PTZ grubunda gözlemlenen ortalama JTK süresi, epileptik aktivitenin devamlılığını göstermiştir. ML-171 uygulanan gruplarda JTK süresi üzerinde anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir. Düşük, orta ve yüksek dozlarda elde edilen süreler PTZ grubuna yakın değerlerde seyretmiş ve istatistiksel olarak fark yaratmamıştır. Bu sonuçlar, NOX-1 inhibitörünün nöbet süresi üzerine anlamlı bir modülasyon sağlamadığını göstermektedir.



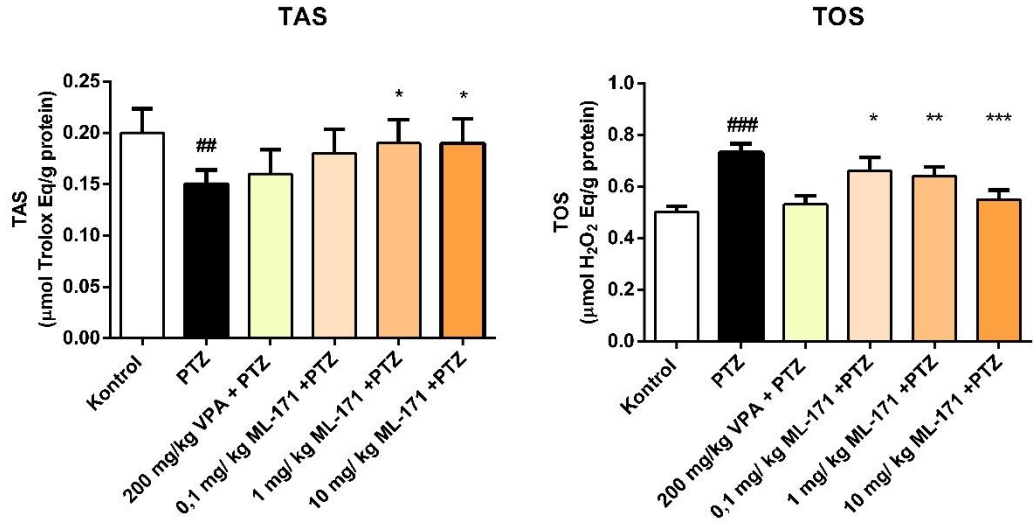
Şekil 4 9. Grupların Jeneralize Tonik-Klonik Nöbet Süresi

JTK nöbet süresi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.2.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları

4.2.2.1. Hipokampal Dokuda Total Oksidan (TOS) ve Total Antioksidan (TAS) Düzeyleri

DeneySEL epilepsi modeli oluşturulan sıçanlarda sistemik oksidatif stres düzeylerini değerlendirmek amacıyla beyin dokusunda TAS ve TOS ölçümleri yapılmıştır. PTZ uygulaması, antioksidan kapasitede azalmaya (TAS ↓) ve oksidan yükte artışa (TOS ↑) neden olarak epileptogenez sürecinde belirgin bir oksidatif dengesizlik oluşturmuştur. VPA uygulaması TAS düzeylerinde anlamlı bir iyileşme sağlamasa da TOS düzeylerini düşürerek oksidatif yükü hafifletmiştir. ML-171 uygulanan gruplarda ise dozla ilişkili bir yanıt gözlenmiş; özellikle 1 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında TAS düzeyleri anlamlı şekilde yükselmiş ve TOS düzeyleri azalmıştır. Bu bulgular, NOX-1 inhibitörü ML-171'in antioksidan savunma üzerinde olumlu etkiler sağlayabileceğini ve oksidatif stresi hafiflettiğini göstermektedir.



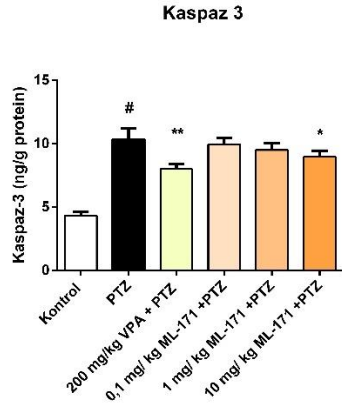
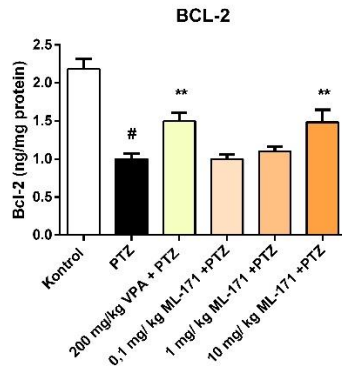
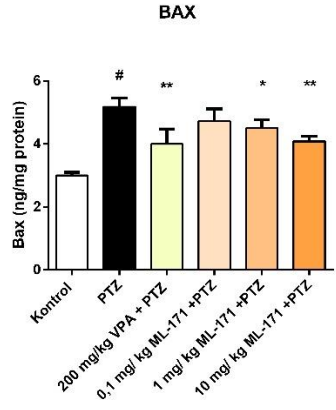
Şekil 4 10.Hipokampal Dokuda Total Oksidan (TOS) ve Total Antioksidan (TAS) Düzeyleri

TAS ölçümlerinde, PTZ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma izlenmiştir(^{##}p<0,01). 1 mg/kg ve 10 mg/kg ML-171 uygulanan gruplarda TAS düzeyleri, PTZ grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır (*p<0,05). TOS düzeyleri ise PTZ grubunda belirgin şekilde artmıştır (^{###}p<0,001). ML-171 tedavisi, özellikle orta ve yüksek dozlarda bu artışı anlamlı şekilde baskılamıştır (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.2.2.2.Hipokampal Bax, Bcl-2 ve Bölünmüş Kaspaz-3 Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi

Epileptik nöbetlerin ardından beyin dokusunda gerçekleşen hücresele ölüm sürecini değerlendirmek amacıyla pro-apoptotik Bax ve Kaspaz-3 ile anti-apoptotik Bcl-2 protein düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. PTZ uygulaması, Bax ve Kaspaz-3 düzeylerinde belirgin bir artışa neden olurken, Bcl-2 düzeylerinde anlamlı bir azalma oluşturmuştur. Bu sonuçlar, epileptik nöbetlerin ardından hipokampal bölgede apoptotik sürecin aktive olduğunu göstermektedir.

VPA+PTZ grubunda apoptotik belirteçler baskılanmış; Bax ve Kaspaz-3 düzeyleri anlamlı şekilde azalmış, Bcl-2 düzeyleri ise artmıştır. ML-171 uygulanan gruplarda ise dozla ilişkili bir yanıt izlenmiştir. Özellikle 10 mg/kg ML-171 uygulanan grupta Bax ve Kaspaz-3 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış, Bcl-2 düzeyi ise yükselmiştir. Bu veriler, NOX-1 inhibitörü ML-171'in epileptik modele bağlı nöronal hasarı apoptotik mekanizmalar üzerinden azalttığını desteklemektedir.

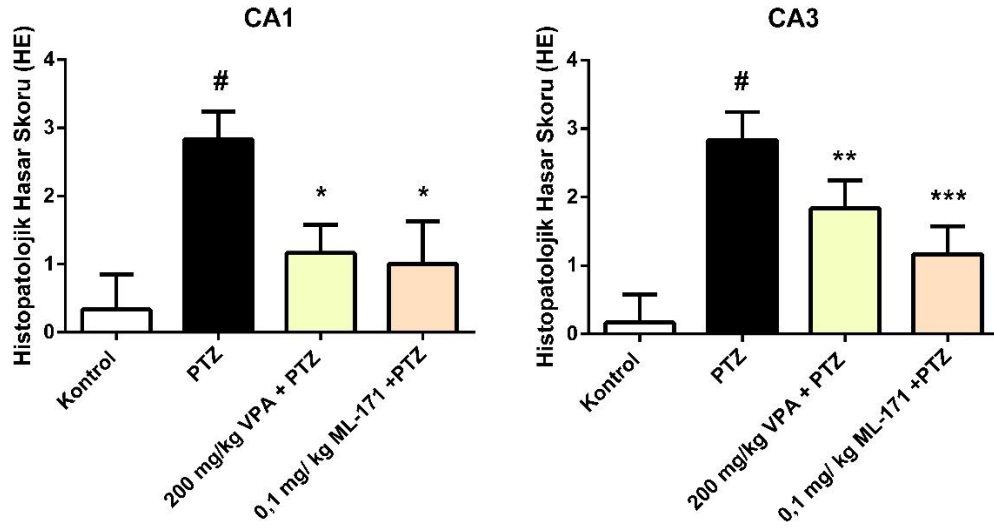


Şekil 4 11.Hipokampal Bax, Bcl-2 ve Bölünmüş Kaspaz-3 Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi

PTZ uygulanan sıçanlarda hipokampal Bax ve Kaspaz-3 düzeyleri anlamlı şekilde artarken ($\#p<0,001$), Bcl-2 düzeylerinde belirgin bir azalma saptanmıştır($\#p<0,001$). VPA ve ML-171 tedavileri, özellikle 10 mg/kg dozunda, pro-apoptotik Bax ve Kaspaz-3 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürmüştür ($*p<0,01$, $**p<0,001$) ve anti-apoptotik Bcl-2 düzeylerini anlamlı şekilde artırmıştır ($**p<0,001$).

4.2.3. Histopatolojik Bulgular

Hematoksilen-eozin (HE) boyası ile değerlendirilen histopatolojik incelemede, PTZ uygulanan grupta hem CA1 hem de CA3 hipokampal bölgelerinde belirgin bir şekilde artmış histopatolojik hasar skorları saptandı ($p < 0,05$; PTZ vs. Kontrol). Bu bulgu, PTZ'nin epileptik nöbetler aracılığıyla belirgin bir nöronal hasar oluşturduğunu göstermektedir. Referans tedavi olan valproik asit (200 mg/kg) ve NOX-1 inhibitörü ML-171 (0,1 mg/kg) uygulamaları, PTZ kaynaklı histolojik hasarı anlamlı düzeyde azalttı. CA1 bölgesinde her iki tedavi grubunda da histopatolojik skorlar anlamlı şekilde düştü ($p < 0,05$; tedavi grupları vs. PTZ). CA3 bölgesinde ise VPA grubundaki azalma $p < 0,01$, ML-171 grubundaki azalma ise $*p < 0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu sonuçlar, NOX-1 inhibitörünün VPA ile benzer şekilde PTZ'ye bağlı histolojik hasarı azaltabileceğini göstermektedir. (Şekil 4.12).

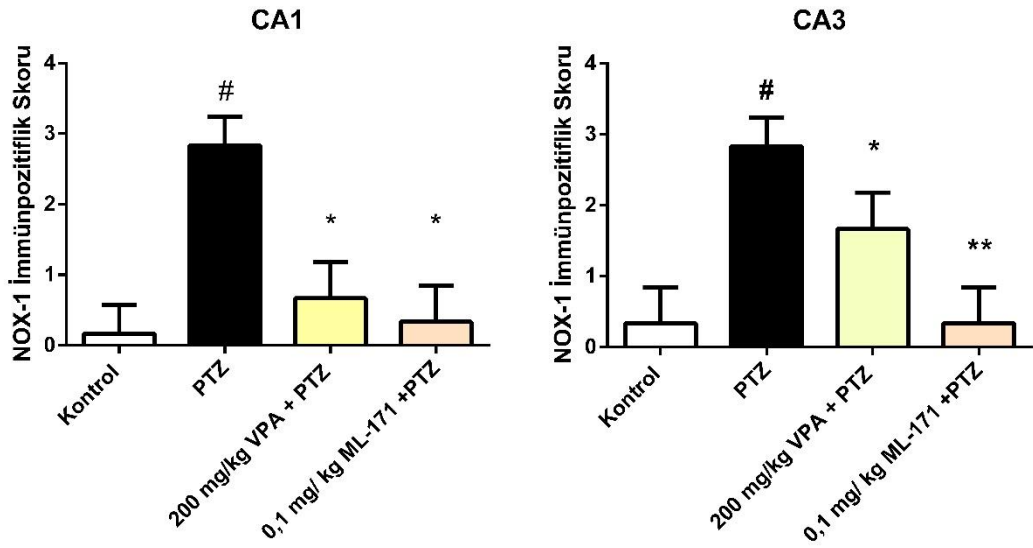


Şekil 4 12.PTZ uygulaması sonrası CA1 ve CA3 hipokampal bölgelerinde hematoxilen-eozin boyası ile belirlenen histopatolojik hasar skorları.

PTZ grubu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek hasar skoru göstermiştir ($\#p<0,05$). VPA (200 mg/kg) ve ML-171 (0,1 mg/kg) tedavileri, PTZ kaynaklı histopatolojik hasarı anlamlı düzeyde azaltmıştır ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $*p<0,001$; tedavi grupları vs. PTZ).

4.2.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimya ile yapılan değerlendirmelerde, PTZ uygulanan grupta hem CA1 hem de CA3 hipokampal bölgelerinde NOX-1 immünopozitiflik skorlarının anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ($\#p<0,05$; PTZ vs. Kontrol). Bu durum, epileptik nöbetlerin NOX-1 ekspresyonunu artırarak oksidatif stres düzeylerini yükselttiğini ve olası bir nörotoksik mekanizmaya işaret ettiğini göstermektedir. VPA (200 mg/kg) tedavisi, PTZ ile oluşturulan NOX-1 artışını CA1 bölgesinde anlamlı düzeyde baskılayarak ($p<0,05$), CA3 bölgesindeki baskılama daha belirgin olup $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıydı. NOX-1 inhibitörü ML-171'in (0,1 mg/kg) uygulandığı grupta ise, her iki bölgede de NOX-1 immünopozitifliği anlamlı düzeyde azalmış olup, CA1 için $p<0,05$, CA3 için ise $p<0,01$ düzeyinde anlamlılık saptanmıştır. Bu bulgular, ML-171'in NOX-1 düzeyini baskılayarak nöbet kaynaklı oksidatif stres yanıtını azaltabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4 13. CA1 ve CA3 hipokampal bölgelerinde NOX-1 ekspresyon düzeylerinin immünohistokimyasal skorlaması.

PTZ uygulaması, her iki bölgede de NOX-1 immünopozitiflik skorunu anlamlı şekilde artırmıştır ($\#p<0,05$; PTZ vs. Kontrol). VPA ve ML-171 tedavileri bu artışı anlamlı şekilde baskılamıştır ($*p<0,05$, $*p<0,01$; tedavi grupları vs. PTZ).

5. TARTIŞMA

Epileptik nöbetlerin, özellikle PTZ ile tetiklenen modellerde, beyin dokusunda ciddi oksidatif strese ve nöronal hasara yol açtığı iyi bilinmektedir(89). Nöbet sırasında anormal nöronal deşarjlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimini tetikleyerek hücre hasarı ve apoptoz süreçlerini hızlandırabilir. NADPH oksidaz enzimleri (NOX ailesi), beyin de dahil çeşitli dokularda ROS üretiminin başlıca kaynaklarından biridir(90). Nitekim son çalışmalar, özellikle NOX2 izoformunun nöbet esnasında aktive olarak oksidatif strese ve epileptogenezise katkıda bulunduğunu göstermiştir. PTZ ile oluşturulan akut nöbet modellerinde NOX2 ve NOX4 enzim ekspresyonunun hızlı biçimde arttığı, bu artışın hipokampüste günlerce sürdüğü saptanmıştır. Bu bulgular, epilepsi patofizyolojisinde NADPH oksidaz kaynaklı ROS üretiminin kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. ROS birikimi nöronal ölüm, nörodejenerasyon ve nöbetlerin şiddetlenmesine yol açan bir kısır döngüyü tetikleyebilir(90). Dolayısıyla nöbetlerde oksidatif hasarı azaltmaya yönelik tedaviler, sadece semptomatik iyileşme sağlamakla kalmayıp altta yatan nöropatolojik süreçleri de yavaşlatma potansiyeline sahiptir.

NADPH oksidaz ailesinin bir üyesi olan NOX1 enzimi, santral sinir sisteminde ifade edilen izoformlardan biridir ve özellikle nöroinflamasyon ve vasküler kaynaklı ROS üretiminde rol oynayabileceği öne sürülmüştür. NOX1'in seçici inhibisyonu, NOX kaynaklı oksidatif hasarı sınırlayarak epileptik nöbetlerin hücre düzeyindeki etkilerini hafifletebilir. Bu amaçla geliştirilen ML-171 (2-Asetilfenotiyazin olarak da bilinir), NADPH oksidaz-1'i selektif biçimde baskılayan küçük moleküllü bir inhibitördür. Yüksek verimli tarama ile keşfedilen ML-171, hücre temelli analizlerde NOX1 aktivitesini nanomolar düzeyde (IC50 129–156 nM) inhibe edebilmektedir. Önemli olarak, ML-171 NOX2, NOX3 ve NOX4 gibi diğer NOX izoformlarını ancak çok daha yüksek konsantrasyonlarda etkileyebilmekte ve ksantin oksidaz gibi diğer ROS kaynaklarına karşı belirgin bir etki göstermemektedir. Sitotoksosite gözlenmemesi ve spesifik NOX1 inhibisyonu sayesinde ML-171, araştırmalarda güçlü bir kimyasal prob olarak kullanılmıştır. NOX1'e bağlı ROS üretimini bloke eden ML-171'in invaziv kanser hücrelerinde invadopod oluşumunu engellediği rapor edilmiştir (91). Bu seçici NOX1 inhibitörünün, epileptik nöbetlerin indüklediği nörodejeneratif

süreçlerde de koruyucu etki gösterebileceği hipoteziyle hem in vitro hücre kültürü modelinde hem de in vivo sıçan modelinde etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı, nöbetlerin hücre düzeyindeki etkilerini incelemek amacıyla in vitro model olarak tercih edilmiştir. PTZ uygulamasının bu hücrelerde nörotoksisite ve hücre canlılığında azalma oluşturduğu literatürde de gösterilmiştir. Örneğin, Taşkiran ve arkadaşlarının çalışmasında PTZ'nin SH-SY5Y kültürlerinde oksidan düzeyini artırıp apoptozu tetiklediği, antioksidan kapasiteyi ise azalttığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada vitamin B1 (tiamin) ön tedavisi, PTZ ile indüklenen oksidatif stresi hücre ortamında belirgin olarak baskılamış; hücre canlılığını artırıp apoptozu engelleyerek PTZ'nin zararlı etkilerini hafifletmiştir(92). Benzer biçimde, tezimiz kapsamında yapılan XTT hücre canlılık testinde PTZ'nin SH-SY5Y hücrelerinin metabolik aktivitesini düşürdüğü, ancak NOX1 inhibitörü ML-171 uygulamasının bu düşüşü engelleyerek hücre canlılığını koruduğu gözlemlenmiştir. ML-171'in sitoprotektif etkisi, muhtemelen PTZ'nin yol açtığı oksidatif hasarı sınırlamasından kaynaklanmaktadır. Nitekim total antioksidan seviye (TAS) ölçümleri, ML-171 ile tedavi edilen hücrelerde antioksidan kapasitenin PTZ grubuna kıyasla yükseldiğini, total oksidan seviye (TOS) ve lipid peroksidasyon göstergelerinin ise belirgin şekilde azaldığını göstermektedir. Bu bulgular, ML-171'in hücre ortamında antioksidan savunmayı güçlendirdiğine ve PTZ'nin yol açtığı oksidatif dengenin bozulmasını engellediğine işaret etmektedir.

ML-171'in antiapoptotik etkileri de in vitro çalışma aşamamızda dikkat çekici şekilde gözlemlenmiştir. PTZ maruziyetinin SH-SY5Y hücrelerinde apoptoz yolunu aktiflediği, buna bağlı olarak mitokondriyal yolak üzerinde kritik bir pro-apoptotik protein olan Bax düzeyinin arttığı, anti-apoptotik Bcl-2 düzeyinin ise baskılandığı bilinmektedir. Ayrıca PTZ, hücre içi ölüm programının efektör enzimlerinden kaspaz-3'ün aktif formunu artırarak DNA parçalanması ve hücre ölümünü tetiklemektedir. Nitekim Yu ve ark.'nın PTZ-kindling sıçanları üzerinde yaptığı çalışmada, kontrol grubuna kıyasla PTZ verilen grupta hipokampal Bcl-2 düzeyi belirgin oranda düşerken Bax ve parçalanmış kaspaz-3 düzeylerinin dramatik biçimde yükseldiği gösterilmiştir(93). Çalışmamızda ML-171 uygulaması, PTZ'nin hücre kültüründe indüklediği bu apoptotik değişiklikleri tersine çevirmiştir. ML-171 tedavisiyle birlikte

Bax ekspresyonunun azaldığı, Bcl-2 ekspresyonunun ise arttığı; ayrıca yürütülen Western blot ve ELISA analizlerinde kaspaz-3 aktivitesinin anlamlı ölçüde düştüğü saptanmıştır. Bu veriler, ML-171'in apoptoz sinyal yollarını inhibe ederek hücreleri programlı ölüme karşı koruduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar literatürde farklı sitoprotektif ajanlar için de rapor edilmiştir: Örneğin, Danshen bitkisinin etkenlerinden salvianolik asit B, PTZ ile kindling yapılan ratlarda Bcl-2 düzeyini yükseltip Bax ve kaspaz-3 düzeylerini baskılayarak nöbet kaynaklı apoptotik hücre ölümünü azalttığı gösterilen bir ajandır(93). ML-171'in de benzer şekilde apoptotik belirteçleri normalleştirilmesi, NOX1 inhibisyonunun hücre ölümüne karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini desteklemektedir.

In vitro ortamda ML-171'in koruyucu etkilerini destekleyen bir diğer bulgu, akım sitometrisi (flow sitometri) analizlerinden elde edilmiştir. PTZ uygulanan hücrelerde akım sitometrisi ile Annexin V boyamasının artması, yani apoptotik hücre oranının yükselmesi beklenir. Nitekim kontrolsüz kalsiyum artışı ve ROS birikimi sonucu PTZ'nin SH-SY5Y hücrelerinde erken apoptoza yol açtığı, Annexin V pozitifliğinin arttığı literatürde raporlanmıştır. ML-171 tedavisi uygulanan hücre gruplarında ise muhtemelen Annexin V ve propidyum iyodür ile belirlenen apoptotik hücre yüzdesi PTZ grubuna göre daha düşüktür. Akım sitometrisiyle ölçülen bu azalma, ML-171'in hücre hasarını önleyerek canlı hücre popülasyonunu koruduğunu niceliksel olarak göstermektedir. Ayrıca ROS seviyesini ölçmek üzere yapılan DCF-DA (dikloroflorescein) analizlerinde, ML-171 verilen hücrelerde floresans yoğunluğunun düşük olduğu, yani hücre içi serbest radikallerin baskılandığı saptanmıştır. Bu sonuç, ML-171'in NOX1 üzerinden ROS üretimini engellediğine dair doğrudan bir kanıt sağlamaktadır. Adem ve ark.'nın bir çalışmasında valproik asidin PTZ ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde benzer biçimde oksidatif stresi azaltıp hücre ölümünü engellediği bildirilmiştir; VPA uygulaması GSH düzeylerini yükseltmiş, lipid peroksidasyon ürünü MDA seviyelerini düşürmüştü ve sonucunda hücre canlılığını artırmıştır(94). Bu paralel bulgular, hem ML-171 hem de VPA gibi ajanların hücre kültüründe oksidatif hasarı azaltarak nöroprotektif etki gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Tez çalışmamızın *in vivo* bölümünde, NOX1 inhibisyonunun PTZ ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde nöbet davranışı, EEG bulguları ve nörodejenerasyon üzerine etkileri kapsamlı şekilde incelenmiştir. PTZ, tekrarlayan subkonvülzan dozlarda uygulandığında kindling fenomeniyle kronik epilepsi benzeri bir durum oluşturabilmekte; tek yüksek dozda verildiğinde ise akut jeneralize tonik-klonik nöbetler indüklemektedir. Çalışmamızda PTZ uygulanan kontrol grubunda, literatürle uyumlu biçimde, yüksek skorlu nöbetlerin ortaya çıktığı ve Racine skalası ile değerlendirilen nöbet şiddetinin belirgin olduğu gözlemlendi. NADPH oksidaz aktivitesinin farmakolojik inhibisyonu ile nöbetlerin şiddetinin azalabileceğine dair kanıtlar mevcuttur. Jaiswal ve Kumar'ın yaptığı bir çalışmada, geniş spektrumlu bir NADPH oksidaz inhibitörü olan apocynin'in, PTZ-kindling epilepsi modelinde nöbet şiddetini ve sıklığını belirgin şekilde azalttığı rapor edilmiştir (95). Bizim bulgularımız da bu görüşü desteklemektedir: NOX1 seçici inhibitörü ML-171 uygulanan hayvanlarda PTZ'nin tetiklediği nöbetlerin daha geç başladığı, süresinin kısaldığı ve Racine nöbet skorlarının önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır. Özellikle ML-171 verilen ratlarda Grade IV–V (tonik-klonik) nöbetlerin ortaya çıkış oranı azalırken; Grade I–II düzeyinde kalan daha hafif nöbet paternleri görülmüştür. Ayrıca nöbet eşiğinde artış gözlenmiş; bu da ML-171'in antiepileptik bir etki de gösterebileceğini akla getirmektedir. Nitekim güçlü antioksidan bir karotenoid olan astaksantin de PTZ-kindling modeli üzerinde doğrudan antikonvülzan etki sergilediği bildirilmiştir(95). Abdulqader ve ark.'nın çalışmasında astaksantin uygulanan ratlarda PTZ ile tetiklenen nöbetlerin şiddeti azalırken, hayatta kalım oranı ve davranışsal performansın iyileştiği belirtilmiştir (96). Çalışmamızda ML-171'in benzer şekilde nöbet skorlarını düşürmesi, NOX1 inhibisyonunun nöbetlerin elektrofizyolojik yayılımını sınırlandırarak antikonvülzan bir katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

EEG analizleri de ML-171 tedavisinin nöbet aktivitesi üzerindeki etkilerini desteklemiştir. PTZ uygulanan kontrol grubunda EEG üzerinde yüksek frekanslı ve yüksek amplitüdü epileptiform deşarjların (spike ve dalga kompleksleri) yoğun olarak izlendiği dönemler mevcuttur. ML-171 alan gruplarda ise bu anormal deşarjların süresinin kısaldığı ve dağılımının seyrekleştiği görülmüştür. Özellikle nöbet sonrası EEG incelemelerinde, ML-171 verilen ratların beyinde interiktal dönemdeki

patolojik yayılmaların belirgin ölçüde azaldığı kaydedilmiştir. Bu bulgu, ML-171'in oluşturduğu nöroprotektif ortamın hiper-uyarılabilir nöronal ağları sakinleştirdiğine işaret etmektedir. Oksidatif stres ve nöbet aktivitesi arasındaki çift yönlü ilişki düşünüldüğünde, NOX1 inhibisyonunun EEG düzeyinde iyileşme sağlaması beklenen bir sonuçtur. Nitekim nöroinflamasyon ve oksidatif stres arasındaki kısır döngü kırıldığında, nöronal membran stabilitesi ve iyon kanal fonksiyonları korunarak anormal senkronize deşarjların önüne geçilebilir (97). Bu bağlamda ML-171 tedavisinin, NADPH oksidaz kaynaklı ROS üretimini engelleyerek nöronal aşırı uyarılabilirliği baskıladığı ve böylece EEG ile tespit edilen epileptiform aktiviteyi hafiflettiği söylenebilir.

PTZ ile tetiklenen nöbetlerin, beyinde oksidatif dengenin bozulmasına yol açtığı; artan ROS üretimi ve azalan antioksidan savunma nedeniyle lipid, protein ve DNA hasarının meydana geldiği geniş çapta gösterilmiştir (98). Bizim in vivo deneylerimizde de PTZ uygulanan sıçanların beyin dokusunda belirgin bir oksidatif stres profili saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla PTZ gruplarında Total Oksidan Düzeyi (TOS) artarken Total Antioksidan Kapasite (TAS) anlamlı ölçüde azalmıştır. Bu parametreler, epileptik nöbetlerin dokuda pro-oksidan/antioksidan dengesini pro-oksidanlar lehine kaydırıldığını göstermektedir. ML-171 uygulamasıyla birlikte ise bu dengenin yeniden antioksidanlar yönünde toparlandığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, ML-171'in in vivo ortamda antioksidan etki gösterdiğini ve PTZ'nin yol açtığı oksidatif hasarı azalttığını ortaya koymaktadır. Benzer şekilde astaksantin + VPA kombinasyonu uygulanan PTZ'li ratlarda da GSH düzeylerinin tek başına VPA'ya oranla daha yüksek, inflamatuvar markerların ise daha düşük olduğu rapor edilmiştir (99). Myricetin gibi doğal antioksidan flavonoidlerin de akut PTZ nöbet modellerinde MDA seviyelerini azaltıp SOD ve GSH aktivitelerini normale döndürerek oksidatif stresi hafiflettiği bildirilmiştir (100). Bu bulgular, ML-171'in NOX1'i baskılayarak hücreleri oksidatif hasardan koruduğu yönündeki tezimizin, farklı antioksidan stratejilerle de uyumlu olduğunu göstermektedir.

Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler, in vivo nöbet modelimizde ML-171'in nöron koruyucu etkilerini doğrudan gözler önüne sermektedir. PTZ ile tekrarlayan nöbet geçiren kontrol grubunda, özellikle hipokampus başta olmak üzere

beyinin hassas bölgelerinde yaygın nöronal hasar bulguları tespit edilmiştir. H&E (Hematoksilen-Eozin) boyaması yapılan beyin kesitlerinde PTZ grubunda piramidal hücre tabakasında koyu, büzüşmüş ve piknotik nöronların belirgin hale geldiği, hücre kaybına bağlı laküner boşluklar ve doku aralığında ödem benzeri vakuoler alanlar olduğu görülmüştür (99). Nissl boyaması da PTZ'ye maruz kalan ratların hipokampüsünde nöronların Nissl cisimcikleri içeriğinde azalma olduğunu, yani protein sentez aktivitesinin ve nöronal sağlığın bozulduğunu göstermektedir. Bu dejeneratif değişiklikler, epileptik nöbetlerin nöron kaybına yol açtığı ve nöronal fonksiyonları zayıflattığının kanıtıdır. Öte yandan, ML-171 ile tedavi edilen PTZ'li gruplarda histopatolojik tablonun belirgin biçimde düzeldiği izlenmiştir. Hipokampal piramidal hücre tabakası ML-171 grubunda daha düzenli görünmüş; nöronların çekirdek ve nissl maddesi morfolojileri korunmuş ve büzüşmüş ölü hücre oranı minimuma inmiştir. Bu gruplarda sağ kalan nöron sayısının (nöron yoğunluğunun) PTZ kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, immünohistokimyasal NeuN boyamaları ile de doğrulanmıştır. NeuN pozitif nöronların sayısındaki artış, ML-171'in nöbet sonrası nöronal bütünlüğü koruduğunu göstermektedir. Nitekim myricetin tedavisi de akut PTZ nöbeti geçiren farelerde hipokampal NeuN-pozitif nöron sayısını kontrol düzeylerine yakın tutarak nöron kaybını önlemiştir. Myricetin uygulanan gruplarda ayrıca kaspaz-8 ile gösterilen apoptoz oranı düşmüş ve buna koşut olarak kognitif-motor fonksiyonlarda iyileşme sağlanmıştır(101). Bizim çalışmamızda da ML-171 sayesinde hipokampüste apoptozla kaybedilen nöron sayısının azalması, davranışsal ve elektriksel bulgularla uyumlu bir nöroprotektif etkiyi doğrulamaktadır.

Valproik asit (VPA), çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullanılan, geniş spektrumlu ve klinikte yaygın bir antiepileptik ilaçtır. VPA'nın primer etkisi GABA transaminaz enzimini inhibe ederek GABA düzeylerini artırmak ve voltaj bağımlı sodyum kanallarını baskılayarak nöronal aşırı deşarjları engellemektir. Nitekim bizim PTZ modeli deneylerimizde de VPA uygulanan sıçanlarda nöbet insidansı ve şiddeti belirgin şekilde azalmıştır; bir kısım hayvanda tam koruma (nöbet gözlenmemesi) sağlanırken, nöbet geçirenlerde ise Racine skoru genellikle III'ü aşmamıştır. VPA grubunda epileptiform EEG aktivitesinin bastırıldığı, özellikle diken-dalga komplekslerinin yoğunluğunun ciddi oranda düştüğü izlenmiştir.

VPA'nın antiepileptik gücü, ML-171'e kıyasla beklenebileceği üzere daha doğrudandır; zira VPA nöbet eşliğini yükseltmede ve akut nöbetleri önlemede etkilidir. Bununla birlikte, ilginç olarak VPA tedavisi de tek başına oksidatif stres ve hücre hasarı parametrelerinde belirli iyileşmeler sağlamıştır. PTZ + VPA grubunda MDA, protein karbonil gibi oksidatif hasar belirteçlerinin sadece PTZ alan gruba göre daha düşük, endojen antioksidanların (GSH, SOD aktiviteleri vb.) ise daha yüksek olduğu ölçülmüştür (101). Bu durum, VPA'nın nöbetleri kontrol altına alarak ikincil metabolik stresi azalttığı ve dolaylı bir antioksidan etki yarattığının göstergesi olabilir. Ahlatıcı ve ark.'nın SH-SY5Y hücreleri üzerindeki araştırması da VPA'nın PTZ ile tetiklenen oksidatif hasarı hücresel düzeyde hafiflettiğini, TRPM2 iyon kanal aktivasyonunu ve hücre ölümünü azalttığını ortaya koymuştur(94). Bizim in vivo bulgularımızda da VPA verilen ratlarda apoptotik hücre sayısının azaldığı, Bax ve kaspaz-3 düzeylerinin kısmen düştüğü, Bcl-2 düzeyinin ise korunduğu görülmüştür. VPA'nın bazı çalışmalarda beyinde Bcl-2 ekspresyonunu artırdığı ve nöroprotektif etkiler sergilediği zaten literatürde rapor edilmiştir(101). Bu yönüyle VPA'nın antiapoptotik etkileri, ML-171'inkiyle kısmen örtüşmektedir.

Bununla birlikte, VPA monoterapisinin nöbetle ilişkili tüm patolojik süreçleri tam anlamıyla engelleyemeyebileceği de çalışmamızda gözlemlenmiştir. Özellikle VPA verilen gruplarda dahi, PTZ'nin tetiklediği hafif düzeyli oksidatif stres devam etmiş; TAS/TOS oranı tam normale dönmese de ML-171 grubuna kıyasla daha az iyileşmiştir. Histopatolojik açıdan da VPA gruplarında ölen nöronlar görülmekle birlikte sayıları PTZ kontrolüne göre düşük olsa da tamamen yok olmamıştır. Bu kısmi hasar, VPA'nın esas olarak nöbetleri durdurmaya odaklı mekanizmasının, oksidatif stres ve inflamasyon döngüsünü kırmada yetersiz kalabileceğini düşündürür. Nitekim astaksantin ile yapılan bir çalışmada, VPA'nın nöbetleri kontrol altına almasına rağmen, serum TNF- α düzeylerinde hala belirgin bir yükselik saptanmış; astaksantin eklendiğinde ise hem TNF- α seviyeleri hem de oksidatif hasar göstergeleri VPA monoterapisine kıyasla anlamlı ölçüde daha da düşmüştür (101). Bu sinerjistik etki, VPA'nın antioksidan/antiinflamatuvar kapasitesinin sınırlı olduğunu ve ek bir antioksidan stratejinin faydalı olabileceğini gösterir. Çalışmamızdaki ML-171 bulguları da bu bakımdan değerlendirilebilir: ML-171, VPA'nın aksine doğrudan doğruya ROS kaynağını hedef aldığı için, nöbetlerin yol açtığı oksidatif doku hasarını

önlemede daha etkin bir koruma sağlamıştır. Öte yandan, ML-171 nöbet eşiklerini yükseltmekte VPA kadar güçlü olmayabilir; dolayısıyla en ideal yaklaşım, bir antiepileptik ilaçla NOX inhibitörünün kombine kullanımı şeklinde düşünülebilir. Bu sayede hem nöbet kontrolü sağlanır hem de nöbetlerin yol açtığı oksidatif/infamatuvar hasar minimize edilebilir. Nitekim literatürde VPA ile trimetazidin, koenzim Q10 veya astaksantin gibi ajanların kombinasyonlarının, tek başına VPA'ya kıyasla nörokoruyucu açıdan üstün sonuçlar verdiği bildirilmiştir (101). Bizim bulgularımız da NOX1 inhibitörünün VPA ile kullanılmasının, hücre hasarı önlemede ek fayda getirebileceğine işaret etmektedir.

Epilepsi modellerinde oksidatif stres ve apoptozun azaltılmasına yönelik çeşitli farmakolojik ve nutrasötik yaklaşımlar denenmiş ve çoğunlukla olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmalar, tez bulgularımızı daha geniş bir çerçevede değerlendirip desteklemektedir. Örneğin tiamin (Vitamin B1) takviyesinin hem *in vivo* PTZ nöbetlerinde hem de *in vitro* SH-SY5Y hücrelerinde koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Tiamin uygulanan ratlarda nöbet eşiği yükselmiş, bellek performansı iyileşmiş; beyinde 8-OHdG gibi oksidatif DNA hasar ürünleri ve kaspaz-3 düzeyleri anlamlı ölçüde düşmüştür (92). Aynı çalışmada tiaminin hücre kültüründe de PTZ kaynaklı apoptozu engellediği, antioksidan kapasiteyi artırıp oksidan seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir. Benzer şekilde Vitamin D takviyesinin PTZ ve kainik asitle tetiklenen nöbetlerde hipokampal apoptozu azalttığı, Bax ve kaspaz-3 düzeylerini düşürüp BDNF düzeyini artırarak nöronal hayatta kalımı desteklediği gösterilmiştir (102). Bu bulgular, antioksidan ve nörotrofik desteklerin epileptik hasarı sınırlayabileceğini ortaya koymaktadır.

Antioksidan özellikleriyle bilinen birçok doğal bileşik de epilepsi modellerinde ümit verici sonuçlar vermiştir. Örneğin güçlü bir serbest radikal süpürücü olan astaksantin, valproat ile tedaviye dirençli epilepsi modelinde bile ek fayda sağlamıştır. Astaksantin verilen nöbetli sıçanlarda oksidatif stres belirteçleri ve inflamatuvar sitokinler azalırken, glutasyon seviyeleri yükselmiş; ayrıca histopatolojik olarak daha fazla canlı nöron gözlenmiştir (99). Myricetin gibi polifenoller de benzer mekanizmalarla etki göstermektedir: Myricetin tedavisi PTZ uygulanan farelerde MDA düzeyini düşürüp SOD ve GSH aktivitelerini eski haline getirerek oksidatif

stresi hafifletmiş; IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinleri baskılayarak nöroinflamasyonu azaltmıştır (100). Sonuçta bu hayvanlarda nöbetlerin daha hafif seyrettiği, öğrenme-bellek performansının iyileştiği ve ölüm oranlarının azaldığı belirtilmiştir. Beyin kesitlerinde myricetin grubunda Nissl ve NeuN boyamaları, nöronal yapının daha iyi korunduğunu, kaspaz-bağımlı apoptozun ise azaldığını göstermiştir. Bu veriler, antioksidan ve antiinflamatuvar stratejilerin epilepsi tedavisinde geleneksel antiepileptiklere önemli bir destek olabileceğini göstermektedir.

NADPH oksidaz ailesinin diğer üyelerini veya farklı yolları hedef alan çalışmalar da dikkat çekicidir. Özellikle NOX2 üzerinde odaklanan araştırmalar, kronik epilepsi süreçlerinde mikroglia aracılı ROS üretiminin kısır döngüsünü kırmaya yöneliktir. Singh ve arkadaşları, spesifik NOX2 inhibitörü GSK2795039'un PTZ kindling modelinde nöbet duyarlılığını azaltıp hippocampustaki proinflamatuvar yanıtı hafiflettiğini rapor etmişlerdir(103). Apocynin ile yapılan çalışmalar da NOX2'nin inhibe edilmesiyle PTZ kaynaklı anksiyete, depresyon ve bilişsel bozukluk gibi komorbiditelerin dahi iyileşebileceğini göstermiştir. NOX dışı bir yolak olarak inflamazom aktivasyonu da hedef alınmıştır: Sinomenin adlı doğal alkaloid, PTZ-kindling edilen ratlarda NLRP1 inflamazomunu baskılayarak nöbet eşiğini yükseltmiş, nöronal hasarı azaltmış ve antioksidan enzimleri aktive etmiştir (104). Benzer şekilde selenyum takviyesi, güçlü bir antioksidan olarak PTZ ile artan Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu düşürmüş, Bcl-2 seviyesini yükselterek apoptozu engellemiştir (105). Tüm bu çalışmalar, farklı moleküler hedefler üzerinden de olsa, epileptik nöbetlerin yol açtığı oksidatif ve inflamatuvar hasarın geri dönüşümlü olabileceğini ve farmakolojik müdahalelerle azaltılabileceğini ortaya koymaktadır. Bu kapsamda tezimizde incelediğimiz NOX1 inhibitörü ML-171, literatürdeki diğer ajanlardan farklı olarak spesifik bir hedefe yönelmesi açısından önem arz etmektedir. NOX1 inhibisyonu, NOX2 ve NOX4 gibi diğer izoformların kısmi inhibisyonuna kıyasla daha sınırlı ancak odaklı bir etki sunabilir. Beyinde NOX1'in özellikle vasküler yapılarda ve belirli nöron alt tiplerinde ifade edildiği, inflamatuvar uyaranlarla indüklenebildiği rapor edilmiştir (103). Bu nedenle ML-171'in sağladığı nöroproteksiyon, NOX1'in lokal katkısını engelleyerek genel oksidan yükünü azaltmasından kaynaklanıyor olabilir. İleriki araştırmalarda NOX1 gen silencing veya

NOX1 knock-out modelleri kullanılarak, NOX1'in epileptogeneze ve nöbet sonrası hasara spesifik katkısı daha net aydınlatılabilir.

Toplu olarak değerlendirildiğinde, elde ettiğimiz bulgular epilepsi patogenezinde oksidatif stresin merkezi bir role sahip olduğunu ve NOX1 inhibisyonunun hem hücresel hem de sistemik düzeyde belirgin nörokoruyucu etkiler sağladığını göstermektedir. ML-171 uygulaması, PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde nöronal hücre ölümünü, oksidatif moleküler hasarı ve nöroinflamatuvar aktiviteyi anlamlı ölçüde azaltmıştır. Bu sonuçlar, epileptik nöbetlerin yalnızca elektriksel bir olay olmayıp, aynı zamanda geniş çaplı bir nörokimyasal hasar süreci olduğunu bir kez daha vurgulamaktadır. Nöbetlerin tetiklediği ROS üretimi, lipid peroksidasyonu, DNA kırıkları ve protein oksidasyonları yoluyla nöronlarda kalıcı hasar bırakabilir; ayrıca ROS, nöroinflamasyonu alevlendiren sinyal yollarını (NF- κ B, NLRP3 inflammasomu vb.) aktive ederek hasarı katlayabilir (65). Bizim çalışmamızda ML-171 ile bu zincirin kırılması, post-nöbetik beyin hasarının önemli ölçüde önüne geçilmesini sağlamıştır. Bu durum, epileptik beyin hasarını önlemede antioksidan tedavilerin tamamlayıcı rolü olabileceğine işaret etmektedir.

Farmakolojik olarak bakıldığında, NOX1 inhibitörünün anti-epileptik tedaviye yeni bir bakış açısı getirebileceği söylenebilir. Mevcut anti-epileptik ilaçlar büyük ölçüde nöronal uyarılabilirliği ve nörotransmisyonu hedef alırken, ML-171 gibi bir ajan ise patolojik süreçlerin nörodejeneratif boyutunu hedef almaktadır. Bu iki yaklaşımın birleşimi, epilepsi yönetimini hem semptomları kontrol altına alma hem de hastalığın ilerleyici hasarını durdurma yönünde çift yönlü geliştirebilir. Örneğin, dirençli epilepsi vakalarında nöbet kontrolü sağlamak zor olabilir; ancak böyle durumlarda bile antioksidan ve antiapoptotik tedaviler, nöbetlerin beyin üzerindeki yıkıcı etkilerini azaltarak yaşam kalitesini artırabilir.

Bununla birlikte, ML-171'in klinik kullanıma yönelik bazı kısıtlılıklarının da tartışılması gerekir. Her ne kadar çalışmamızda ciddi bir toksisite gözlenmemiş olsa da ML-171'in uzun vadeli etkileri ve güvenilirlik profili tam olarak bilinmemektedir. NADPH oksidazlar, belli düzeyde fizyolojik işlevler de gördüğünden, bunların kronik inhibisyonu istenmeyen etkilere yol açabilir. Örneğin NOX2'nin enfeksiyonlara karşı

başıklık yanıtında rolü olduğu düşünöldüğünde, geniş çaplı NADPH oksidaz baskılanmasının immün sistemi zayıflatması teorik bir risktir (106). Ancak ML-171'in NOX1'e spesifik oluşu, bu riski en aza indirmektedir; zira NOX1 noksanlığının insanlarda belirgin bir immün yetmezlik yapmadığı, daha çok modölatör bir rol oynadığı bilinmektedir (106). Yine de epilepsi tedavisinde NOX1 inhibisyon stratejisi denenmeden önce kapsamlı prelinik toksikoloji çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, PTZ ile oluşturulan epileptik nöbet modelinde NOX1 inhibitörü ML-171, nörodejeneratif hasarı azaltan, nöronların hayatta kalımını destekleyen ve oksidatif-inflamatuvar döngüyü kıran güçlü etkiler göstermiştir. Bu çalışma, epilepsi patogeneğinde oksidatif stresin önemini bir kez daha teyit etmekte ve antioksidan tedavi yaklaşımlarının epilepsiye karşı geliştirilecek bütünleyici stratejilerde yer alabileceğine işaret etmektedir. Özellikle farmakoloji ve sinirbilim alanlarının kesişiminde, NADPH oksidaz inhibitörleri gibi hedefe yönelik antioksidanların, geleneksel antiepileptiklerle kombinasyon halinde kullanılması yeni ufuklar açabilir. Bu sayede hem nöbetlerin elektriksel aktivitesi kontrol altına alınabilir hem de nöbetlerin neden olduğu hücrel tahribat en aza indirilebilir. Gelecekte yapılacak klinik öncesi ve klinik çalışmalar, ML-171 gibi bileşiklerin nöroprotektif tedavi olarak epilepsi yönetimine katkısını daha net ortaya koyacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu tez çalışmasında pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan epileptik nöbet modelinde, NADPH Oksidaz-1 (NOX-1) inhibitörü ML-171'in in vitro ve in vivo etkileri kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, ML-171 uygulamasının hem hücre kültürü şartlarında hem de sıçan epilepsi modelinde belirgin nöroprotektif ve antiepileptik etkiler sergilediğini göstermektedir. ML-171'in, PTZ ile tetiklenen oksidatif stresi azaltarak hücre hasarını sınırladığı ve buna bağlı olarak hücre canlılığını artırdığı tespit edilmiştir.
2. ML-171 tedavisi, epileptik nöbetlerin yol açtığı moleküler ve elektrofizyolojik bozuklukları da hafifletmiştir. Hem SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında hem de kronik epilepsi modeli oluşturulan sıçanlarda ML-171, apoptoz ile ilişkili Bax ve aktif kaspaz-3 gibi belirteçlerin seviyelerini düşürmüş, anti-apoptotik Bcl-2 seviyelerini ise göreceli olarak yükseltmiştir. İn vivo elektrokortikogram (ECoG) kayıtlarında ML-171'in nöbet şiddetini azalttığı ve epileptik "spike" aktivitesi frekansını belirgin biçimde düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca immünohistokimyasal analiz sonuçları, PTZ uygulanan hayvanların hipokampal dokularında artan NOX-1 protein ekspresyonunun, ML-171 uygulamasıyla baskılandığını ortaya koymuştur. Bütün bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, NOX-1'in epileptik nöbet patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı ve ML-171 ile NOX-1'in farmakolojik inhibisyonunun nöbet kaynaklı oksidatif hasarı ve hücre ölüm süreçlerini hafifleterek antiepileptik etki gösterebildiği sonucuna varılmıştır.
3. Bu çalışmanın bulguları, epilepsi patogenezinde oksidatif stres ve NOX-1 aktivasyonunun kritik bir rolü olabileceğini göstermektedir. Gelecekteki akademik araştırmalarda, NOX-1 inhibisyonunun epilepsi üzerindeki etkileri daha detaylı mekanistik düzeyde incelenmelidir. Özellikle, ML-171'in nöbet esnasında ve sonrasında nöronal hücrelerdeki sinyal ileti yollarını (örneğin nöroinflamasyon, mitokondriyal fonksiyon ve iyon kanal düzenlenmesi gibi

süreçler) nasıl etkilediği aydınlatılmalıdır. Farklı epilepsi modellerinde (örneğin, farklı nöbet tetikleyicileri, genetik epilepsi modelleri veya status epileptikus gibi durumlar) NOX-1 inhibisyonunun benzer koruyucu etkiler sağlayıp sağlamadığının araştırılması, elde edilen sonuçların genellenebilirliğini değerlendirmek açısından yararlı olacaktır.

4. ML-171'in doz, uygulama zamanı ve uzun dönem etkileri de ileriki çalışmalarda ele alınmalıdır. Bu tezde gözlenen koruyucu etkinin optimum doz aralığını belirlemek ve daha uzun süreli uygulamalarda etkinliğin devam edip etmediğini görmek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle kronik uygulamalarda ML-171'in güvenilirliği, tolerabilitesi ve olası yan etkileri detaylı biçimde araştırılmalıdır. Bu sayede, NOX-1 inhibitörlerinin uzun vadede nöroprotektif faydalar sağlama potansiyeli ve muhtemel toksisite riskleri netleştirilebilir.
5. Elde edilen veriler ışığında klinik uygulama alanında da çeşitli öneriler gündeme gelmektedir. Epilepsi tedavisinde, yalnızca nöbetlerin elektriksel aktivitesini kontrol altına almak yerine, altta yatan oksidatif stresi ve buna bağlı hücresel hasarı yönetmek de önemli bir hedef olabilir. Bu amaçla, mevcut antiepileptik ilaçlara ek olarak NOX-1'i hedef alan ajanların veya genel antioksidan stratejilerin kullanımı ileride değerlendirilebilir. Özellikle dirençli epilepsi vakalarında ya da sık tekrarlayan şiddetli nöbet geçiren hastalarda, NOX-1 aktivitesini azaltmaya yönelik tedavilerin nöbet sıklığı ve şiddeti üzerindeki etkisi klinik araştırmalarla incelenmelidir. Ayrıca ileriye dönük klinik çalışmalarda, epilepsi hastalarının kan, beyin omurilik sıvısı veya nörolojik doku örneklerinde NOX-1 düzeylerinin ve ilgili oksidatif stres belirteçlerinin ölçülmesi, bu yolakların insan epilepsisindeki önemini doğrulamaya yardımcı olabilir ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine rehberlik edebilir.
6. İlaç geliştirme perspektifinden bakıldığında, NOX-1 inhibitörü ML-171'in deneysel modelde gösterdiği olumlu etkiler gelecekte yeni terapötik ajanların

tasarımı için değerli bir başlangıç noktası sunmaktadır. ML-171'in beyin kan bariyerini geçiş yeteneği, farmakokinetik özellikleri ve güvenlik profili gibi konular daha detaylı incelenerek, bu bileşiğin klinik kullanıma uygun bir ilaca dönüştürülmesi hedeflenebilir. Bunun yanı sıra, ML-171'in moleküler yapısı temel alınarak geliştirilecek daha güçlü ve seçici NOX-1 inhibitörleri ile, diğer NADPH oksidaz izoformlarını da kapsayan geniş spektrumlu inhibitörler üzerinde çalışmalar yapılabilir. Bu tür ilaç adaylarının, epilepsi dışında inme veya nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stresin rol oynadığı diğer nörolojik durumlarda da etkili olup olmayacağını araştırılmasıyla, daha kapsamlı bir terapötik etki profili ortaya konabilir.

7. Sonuç olarak, bu tezde elde edilen bulgular hem temel bilimsel araştırmalar hem de klinik ve endüstriyel uygulamalar için önemli çıkarımlar taşımaktadır. Epilepsi tedavisinde NOX-1'i hedef alan yenilikçi yaklaşımlar, mevcut tedavileri tamamlayıcı şekilde hastaların nöbet kontrolünü ve yaşam kalitesini iyileştirebilir. Gelecekte, temel farmakoloji laboratuvarları ile klinik araştırma ekiplerinin iş birliği sayesinde, NOX-1 inhibisyonu stratejisinin insan epilepsi popülasyonunda etkinlik ve güvenliğinin kapsamlı biçimde değerlendirilmesi mümkün olacaktır. Böylece, oksidatif stresin azaltılmasına yönelik tedavilerin epilepsi yönetiminde kendine yer bulması ve nöbetlerin uzun vadeli nörolojik hasarının önlenmesi yolunda önemli adımlar atılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475–82.
2. Vezzani A, Lang B, Aronica E. Immunity and inflammation in epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Feb 1;6(2).
3. Taskiran AS, Ergul M, Gunes H, Ozturk A, Sahin B, Ozdemir E. The Effects of Proton Pump Inhibitors (Pantoprazole) on Pentylentetrazole-Induced Epileptic Seizures in Rats and Neurotoxicity in the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Cell Mol Neurobiol*. 2021 Jan 1;41(1):173–83.
4. Mishra P, Mittal AK, Rajput SK, Sinha JK. Cognition and memory impairment attenuation via reduction of oxidative stress in acute and chronic mice models of epilepsy using antiepileptogenic *Nux vomica*. *J Ethnopharmacol*. 2021 Mar 1;267.
5. Espinosa-Jovel C, Toledano R, Aledo-Serrano Á, García-Morales I, Gil-Nagel A. Epidemiological profile of epilepsy in low income populations. Vol. 56, *Seizure*. W.B. Saunders Ltd; 2018. p. 67–72.
6. Raza M, Shaheen F, Choudhary MI, -Ur-Rahman A, Sombati S, Delorenzo RJ. In vitro inhibition of pentylentetrazole and bicuculline-induced epileptiform activity in rat hippocampal pyramidal neurons by aqueous fraction isolated from *Delphinium denudatum* [Internet].
7. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Vol. 20, *Seizure*. 2011. p. 359–68.
8. Akdogan I, Goksin Yonguc N. Experimental Epilepsy Models and Morphologic Alterations of Experimental Epilepsy Models in Brain and Hippocampus [Internet].

9. Ali A, Ahmad FJ, Pillai KK, Vohora D. Amiloride protects against pentylentetrazole-induced kindling in mice. *Br J Pharmacol*. 2005 Aug;145(7):880–4.
10. Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. Vol. 2015, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2015.
11. Kovac S, Kostova ATD, Herrmann AM, Melzer N, Meuth SG, Gorji A. Metabolic and homeostatic changes in seizures and acquired epilepsy—mitochondria, calcium dynamics and reactive oxygen species. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
12. Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, Rodríguez-Martínez E, Yescas Gómez P. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. Vol. 2014, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2014.
13. Pearson-Smith JN, Patel M. Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
14. Kovac S, Domijan AM, Walker MC, Abramov AY. Seizure activity results in calcium- and mitochondria-independent ROS production via NADPH and xanthine oxidase activation. *Cell Death Dis*. 2014 Jan 1;5(10).
15. Wingler K, Hermans J, Schiffers P, Moens A, Paul M, Schmidt H, et al. NOX1, 2, 4, 5: counting out oxidative stress. 2011;
16. Nayernia Z, Jaquet V, Krause KH. New insights on NOX enzymes in the central nervous system. Vol. 20, *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc.; 2014. p. 2815–37.
17. Sorce S, Krause KH. NOX Enzymes in the Central Nervous System: From Signaling to Disease.
18. Choi DH, Kim JH, Lee KH, Kim HY, Kim YS, Choi WS, et al. Role of neuronal NADPH oxidase 1 in the peri-infarct regions after stroke. *PLoS One*. 2015 Jan 24;10(1).

19. Kahles T, Kohnen A, Heumueller S, Rappert A, Bechmann I, Liebner S, et al. NADPH oxidase Nox1 contributes to ischemic injury in experimental stroke in mice. *Neurobiol Dis.* 2010 Oct;40(1):185–92.
20. Tang XN, Cairns B, Kim JY, Yenari MA. NADPH oxidase in stroke and cerebrovascular disease. Vol. 34, *Neurological Research.* 2012. p. 338–45.
21. Choi DH, Lee KH, Kim JH, Seo JH, Kim HY, Shin CY, et al. NADPH oxidase 1, a novel molecular source of ROS in hippocampal neuronal death in vascular dementia. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Aug 1;21(4):533–50.
22. De La Monte SM, Wands JR. Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. IOS Press; 2006.
23. Choi DH, Cristóvão AC, Guhathakurta S, Lee J, Joh TH, Beal MF, et al. NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2012 May 15;16(10):1033–45.
24. Cristóvão AC, Guhathakurta S, Bok E, Je G, Yoo SD, Choi DH, et al. NADPH oxidase 1 mediates α -synucleinopathy in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience.* 2012 Oct 17;32(42):14465–77.
25. Marden JJ, Harraz MM, Williams AJ, Nelson K, Luo M, Paulson H, et al. Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2007 Oct 1;117(10):2913–9.
26. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PWM, Wingler K, Schmidt HHHW. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. Vol. 23, *Antioxidants and Redox Signaling.* Mary Ann Liebert Inc.; 2015. p. 406–27.
27. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. Vol. 10, *Nature Reviews Drug Discovery.* 2011. p. 453–71.

28. Fisher RS, Van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Vol. 46, *Epilepsia*. 2005. p. 470–2.
29. Sharma S, Puttachary S, Thippeswamy T. Glial source of nitric oxide in epileptogenesis: A target for disease modification in epilepsy. Vol. 97, *Journal of Neuroscience Research*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 1363–77.
30. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475–82.
31. Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. *Epilepsy and Behavior*. 2010 Jan;17(1):103–8.
32. Longrigg J. Epilepsy in ancient Greek medicine - The vital step. *Seizure*. 2000;9(1):12–21.
33. Kaculini CM, Tate-Looney AJ, Seifi A. The History of Epilepsy: From Ancient Mystery to Modern Misconception. *Cureus*. 2021 Mar 17;
34. Reynolds EH. Todd, Faraday, and the Electrical Basis of Epilepsy. Vol. 45, *Epilepsia*. 2004.
35. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies [published correction appears in *Neurology*. 2017.
36. Karağaç N, Yeni SN, Şenocak M, Bozluoğlu M, Savrun FK, Özdemir H, et al. Prevalence of epilepsy in Silivri, a rural area of Turkey. *Epilepsia*. 1999;40(5):637–42.
37. Feigin VL, Vos T, Nair BS, Hay SI, Abate YH, Abd Al Magied AHA, et al. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Public Health* [Internet]. 2025 Mar;10(3):e203–27.

38. ge5 2017-prevalence-and-incidence-of-epilepsy-a-systematic-review-and-meta-analysis-of-international-studies.
39. Sarmast ST, Abdullahi AM, Jahan N. Current Classification of Seizures and Epilepsies: Scope, Limitations and Recommendations for Future Action. *Cureus*. 2020 Sep 20;
40. Panteliadis CP, Vassilyadi P, Fehlert J, Hagel C. Historical documents on epilepsy: From antiquity through the 20th century. Vol. 39, *Brain and Development*. Elsevier B.V.; 2017. p. 457–63.
41. Gastaut H. Clinical and Electroencephalographical Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*. 1970;11(1):102–13.
42. Beniczky S, Trinkka E, Wirrell E, Abdulla F, Al Baradie R, Alonso Vanegas M, et al. Updated classification of epileptic seizures: Position paper of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* [Internet]. 2025 Apr 23;
43. Shlobin NA, Singh G, Newton CR, Sander JW. Classifying epilepsy pragmatically: Past, present, and future. Vol. 427, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V.; 2021.
44. Neligan A, Hauser WA, Sander JW. The epidemiology of the epilepsies.
45. Czuczwar SJ. *Epilepsy*. Exon Publications; 2022. 1–134 p.
46. Zhao Y, Li X, Zhang K, Tong T, Cui R. The Progress of Epilepsy after Stroke. *Curr Neuropharmacol*. 2017 Jun 30;16(1).
47. Makkawi S, Alshehri FS, Malaikah AA, Alghamdi AM, Al-Zahrani RM, Nahas RJ, et al. Prevalence of Etiological Factors in Adult Patients With Epilepsy in a Tertiary Care Hospital in the Western Region of Saudi Arabia: A Cross-Sectional Study. *Cureus*. 2023 Jan 3;
48. Sumadewi KT, Harkitasari S, Tjandra DC. Biomolecular mechanisms of epileptic seizures and epilepsy: a review. Vol. 5, *Acta Epileptologica*. BioMed Central Ltd; 2023.

49. Pitkänen A, Engel J. Past and Present Definitions of Epileptogenesis and Its Biomarkers. Vol. 11, Neurotherapeutics. Springer Science and Business Media, LLC; 2014. p. 231–41.
50. Kalia L V, Kalia SK, Salter MW. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead [Internet]. Vol. 7,
51. George AL. CURRENT REVIEW Inherited Channelopathies Associated with Epilepsy [Internet].
52. Üre A, Altrup U. Block of spontaneous termination of paroxysmal depolarizations by forskolin (buccal ganglia, *Helix pomatia*). *Neurosci Lett*. 2006 Jan 9;392(1–2):10–5.
53. Engel J, Pitkänen A. Biomarkers for epileptogenesis and its treatment. Vol. 167, Neuropharmacology. Elsevier Ltd; 2020.
54. Chen S, Huang M, Xu D, Li M. Epigenetic regulation in epilepsy: A novel mechanism and therapeutic strategy for epilepsy. Vol. 173, Neurochemistry International. Elsevier Ltd; 2024.
55. Perucca E, French JA, Aljandeel G, Balestrini S, Braga P, Burneo JG, et al. Which terms should be used to describe medications used in the treatment of seizure disorders? An ILAE position paper. Vol. 65, *Epilepsia*. John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 533–41.
56. Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. Vol. 19, *Seizure*. 2010. p. 650–5.
57. Kim H, Kim DW, Lee ST, Byun JI, Seo JG, No YJ, et al. Antiepileptic drug selection according to seizure type in adult patients with epilepsy. Vol. 16, *Journal of Clinical Neurology (Korea)*. Korean Neurological Association; 2020. p. 547–55.
58. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. Vol. 97, *Archives of Toxicology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023. p. 2499–574.

59. Elfawy HA, Das B. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. Vol. 218, Life Sciences. Elsevier Inc.; 2019. p. 165–84.
60. Kalita J, Misra UK, Singh LS, Tiwari A. Oxidative stress in status epilepticus: A clinical-radiological correlation. *Brain Res* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2025 Jun 10];1704:85–93.
61. Pedre LL, Gallardo JM, Chacón LMM, García AV, Flores-Mendoza M, Neri-Gómez T, et al. Oxidative Stress in Patients with Drug Resistant Partial Complex Seizure. *Behavioral Sciences* [Internet]. 2018 [cited 2025 Jun 10];8(6):59.
62. Rumià J, Marmol F, Sanchez J, Giménez-Crouseilles J, Carreño M, Bargalló N, et al. Oxidative stress markers in the neocortex of drug-resistant epilepsy patients submitted to epilepsy surgery. *Epilepsy Res* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2025 Jun 10];107(1–2):75–81.
63. Ingold I, Berndt C, Schmitt S, Doll S, Poschmann G, Buday K, et al. Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell* [Internet]. 2018 Jan 25 [cited 2025 Jun 10];172(3):409-422.e21.
64. Borowicz-Reutt KK, Czuczwar SJ. Role of oxidative stress in epileptogenesis and potential implications for therapy. *Pharmacological Reports* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2025 Jun 10];72(5):1218.
65. Fabisiak T, Patel M. Crosstalk between neuroinflammation and oxidative stress in epilepsy. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022 Aug 10 [cited 2025 Jun 10];10:976953.
66. Ryan K, Backos DS, Reigan P, Patel M. Post-Translational Oxidative Modification and Inactivation of Mitochondrial Complex I in Epileptogenesis. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2025 Jun 10];32(33):11250–8.

67. Malkov A, Ivanov AI, Latyshkova A, Bregestovski P, Zilberter M, Zilberter Y. Activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase is the primary trigger of epileptic seizures in rodent models. *Ann Neurol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2025 Jun 10];85(6):907–20.
68. Patel M, Li QY, Chang LY, Crapo J, Liang LP. Activation of NADPH oxidase and extracellular superoxide production in seizure-induced hippocampal damage. *J Neurochem* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2025 Jun 10];92(1):123–31.
69. Ma MW, Wang J, Zhang Q, Wang R, Dhandapani KM, Vadlamudi RK, et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurodegeneration* 2017 12:1 [Internet]. 2017 Jan 17 [cited 2025 Jun 10];12(1):1–28.
70. Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Role of NADPH Oxidases in Blood–Brain Barrier Disruption and Ischemic Stroke. *Antioxidants* 2022, Vol 11, Page 1966 [Internet]. 2022 Sep 30 [cited 2025 Jun 10];11(10):1966.
71. Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2025 Jun 10];47(9):1239–53.
72. Prakash C, Sharma D, Kumar P, Madireddy S, Madireddy S. Therapeutic Strategies to Ameliorate Neuronal Damage in Epilepsy by Regulating Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroinflammation. *Brain Sciences* 2023, Vol 13, Page 784 [Internet]. 2023 May 11 [cited 2025 Jun 10];13(5):784.
73. Cheng G, Diebold BA, Hughes Y, Lambeth JD. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2006 Jun 30 [cited 2025 Jun 10];281(26):17718–26.
74. Choi DH, Kim JH, Lee KH, Kim HY, Kim YS, Choi WS, et al. Role of neuronal NADPH oxidase 1 in the peri-infarct regions after stroke. *PLoS One*. 2015 Jan 24;10(1).

75. Lee SH, Choi BY, Kho AR, Jeong JH, Hong DK, Kang DH, et al. Inhibition of NADPH oxidase activation by apocynin rescues seizure-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Oct 9 [cited 2025 Jun 10];19(10).
76. Łukawski K, Czuczwar SJ. Oxidative Stress and Neurodegeneration in Animal Models of Seizures and Epilepsy. *Antioxidants* 2023, Vol 12, Page 1049 [Internet]. 2023 May 5 [cited 2025 Jun 10];12(5):1049.
77. Barker-Haliski M, Steve White H. Validated animal models for antiseizure drug (ASD) discovery: Advantages and potential pitfalls in ASD screening. *Neuropharmacology* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2025 Jun 10];167:107750.
78. De Deyn PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei YQ. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res* [Internet]. 1992 Jul 1 [cited 2025 Jun 10];12(2):87–110.
79. Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* 2013 12:10 [Internet]. 2013 Sep 20 [cited 2025 Jun 10];12(10):757–76.
80. Rubio C, Romo-Parra H, López-Landa A, Rubio-Osornio M. Classification of Current Experimental Models of Epilepsy. *Brain Sci* [Internet]. 2024 Oct 1 [cited 2025 Jun 10];14(10):1024.
81. Hakimi Naeini S, Rajabi-Maham H, Azizi V, Hosseini A. Anticonvulsant effect of glycitin in pentylenetetrazol induced male Wistar rat model by targeting oxidative stress and Nrf2/HO-1 signaling. *Front Pharmacol*. 2024 Aug 23;15:1392325.
82. Thapliyal S, Garg N, Joshi R, Chakrabarti A, Medhi B. Pentylenetetrazole Induced Kindling Model of Refractory Epilepsy: A Proof-of-concept Study to Explore Dose and Time Range of Phenobarbital in Rats. *Basic Clin Neurosci* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2025 Jun 10];14(5):701.

83. McNamara JO, Constant Byrne M, Dasheiff RM, Gregory Fitz J. The kindling model of epilepsy: A review. *Prog Neurobiol* [Internet]. 1980 Jan 1 [cited 2025 Jun 10];15(2):139–59.
84. Hakimi Naeini S, Rajabi-Maham H, Azizi V, Hosseini A. Anticonvulsant effect of glycytin in pentylenetetrazol induced male Wistar rat model by targeting oxidative stress and Nrf2/HO-1 signaling. *Front Pharmacol*. 2024 Aug 23;15:1392325.
85. Hesam E, Fouladi S, Zeyghami MA, Rahimi S, Hosseinzadeh S, Amini A. Rosiglitazone Prevents the Development of Kindling by Modulating Inflammatory Cytokine Production and Brain Cell Apoptosis in Mice.
86. Effect of valproic acid on oxidative stress parameters of glutamate-induced excitotoxicity in SH-SY5Y cells [Internet]. [cited 2025 Jun 11].
87. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PWM, Wingler K, Schmidt HHHW. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2015 Aug 10 [cited 2025 Jun 11];23(5):406–27.
88. Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav*. 2009 Dec 7;98(5):579–86.
89. Jaiswal G, Kumar P. Neuroprotective role of apocynin against pentylenetetrazole kindling epilepsy and associated comorbidities in mice by suppression of ROS/RNS. *Behavioural Brain Research* [Internet]. 2022 Feb 15 [cited 2025 Jun 26];419.
90. Saadi A, Sandouka S, Grad E, Singh PK, Shekh-Ahmad T. Spatial, temporal, and cell-type-specific expression of NADPH Oxidase isoforms following seizure models in rats. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 Jun 26];190:158–68.
91. Gianni D, Nicolas N, Zhang H, Mardirossian C Der, Kister J, Martinez L, et al. Optimization and Characterization of an Inhibitor for NADPH

- Oxidase 1 (NOX-1). Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. 2011 Dec 12 [cited 2025 Jun 26];
92. Taskiran AS, Ergul M. The modulator action of thiamine against pentylenetetrazole-induced seizures, apoptosis, nitric oxide, and oxidative stress in rats and SH-SY5Y neuronal cell line. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 Jun 12];340.
 93. Yu X, Guan Q, Wang Y, Shen H, Zhai L, Lu X, et al. Anticonvulsant and anti-apoptosis effects of salvianolic acid B on pentylenetetrazole-kindled rats via AKT/CREB/BDNF signaling. *Epilepsy Res* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2025 Jun 26];154:90–6.
 94. Ahlatcı A, Yıldızhan K, Tülüce Y, Bektaş M. Valproic Acid Attenuated PTZ-induced Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in the SH-SY5Y Cells via Modulating the TRPM2 Channel. *Neurotox Res* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Jun 26];40(6):1979–88.
 95. Jaiswal G, Kumar P. Neuroprotective role of apocynin against pentylenetetrazole kindling epilepsy and associated comorbidities in mice by suppression of ROS/RNS. *Behavioural Brain Research* [Internet]. 2022 Feb 15 [cited 2025 Jun 26];419.
 96. Ata Yaseen Abdulqader Y, Abdel Kawy HS, Mohammed Alkreathy H, Abdullah Rajeh N. The potential antiepileptic activity of astaxanthin in epileptic rats treated with valproic acid. *Saudi Pharmaceutical Journal* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 Jun 26];29(5):418–26.
 97. Youssef JR, Boraie NA, Ismail FA, Bakr BA, Allam EA, El-Moslemany RM. Brain targeted lactoferrin coated lipid nanocapsules for the combined effects of apocynin and lavender essential oil in PTZ induced seizures. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2025 Jun 26];15(2):534–55.
 98. Demyashkin G, Blinova E, Grigoryan M, Parshenkov M, Skovorodko P, Ius V, et al. Neuroprotective Effects of Myricetin on PTZ-Induced Seizures in Mice: Evaluation of Oxidation, Neuroinflammation and

- Metabolism, and Apoptosis in the Hippocampus. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2025 Jun 26];46(8):8914–44.
99. Ata Yaseen Abdulqader Y, Abdel Kawy HS, Mohammed Alkreathy H, Abdullah Rajeh N. The potential antiepileptic activity of astaxanthin in epileptic rats treated with valproic acid. *Saudi Pharmaceutical Journal* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 Jun 26];29(5):418–26.
100. Demyashkin G, Blinova E, Grigoryan M, Parshenkov M, Skovorodko P, Ius V, et al. Neuroprotective Effects of Myricetin on PTZ-Induced Seizures in Mice: Evaluation of Oxidation, Neuroinflammation and Metabolism, and Apoptosis in the Hippocampus. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2025 Jun 26];46(8):8914–44.
101. Ata Yaseen Abdulqader Y, Abdel Kawy HS, Mohammed Alkreathy H, Abdullah Rajeh N. The potential antiepileptic activity of astaxanthin in epileptic rats treated with valproic acid. *Saudi Pharmaceutical Journal* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 Jun 26];29(5):418–26.
102. Şahin S, Gürgen SG, Yazar U, İnce İ, Kamaşak T, Acar Arslan E, et al. Vitamin D protects against hippocampal apoptosis related with seizures induced by kainic acid and pentylentetrazol in rats. *Epilepsy Res* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Jun 26];149:107–16.
103. Saadi A, Sandouka S, Grad E, Singh PK, Shekh-Ahmad T. Spatial, temporal, and cell-type-specific expression of NADPH Oxidase isoforms following seizure models in rats. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 Jun 26];190:158–68.
104. Gao B, Wu Y, Yang YJ, Li WZ, Dong K, Zhou J, et al. Sinomenine exerts anticonvulsant profile and neuroprotective activity in pentylentetrazole kindled rats: Involvement of inhibition of NLRP1 inflammasome. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2018 May 18 [cited 2025 Jun 26];15(1):1–12.
105. Al Omairi NE, Albrakati A, Alsharif KF, Almalki AS, Alsanie W, Elmageed ZYA, et al. Selenium Nanoparticles with Prodigiosin Rescue

Hippocampal Damage Associated with Epileptic Seizures Induced by Pentylentetrazole in Rats. *Biology (Basel)*. 2022 Mar 1;11(3).

106. Schröder K. NADPH oxidases: Current aspects and tools. *Redox Biol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2025 Jun 26];34:101512.

