

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

(DOKTORA TEZİ)

**İYON KANALI ANTİKORLARININ NÖRONAL MEMBRAN PROTEİN
EKSPRESYONU VE SAĞKALIM ÜZERİNE ETKİLERİ**

NEŞE AYŞİT ALTUNCU

**DANIŞMAN
PROF.DR. ERDEM TÜZÜN**

**SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ**

İSTANBUL-2017

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**İYON KANALI ANTİKORLARININ NÖRONAL MEMBRAN PROTEİN EKSPRESYONU VE
SAĞKALIM ÜZERİNE ETKİLERİ**

NEŞE AYŞİT ALTUNCU

2. DANIŞMAN
PROF.DR. GÜRKAN ÖZTÜRK

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü - Tıp Fakültesi, Aziz Sancar DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı, İleri Nörolojik Programında Doktora öğrencisi Neşe AYŞIT ALTUNCU tarafından Prof. Dr. Erdem TÖZÜN'ün danışmanlığında hazırlanan "İyon Kanalı Antikorların Nöronal Membran Protein Ekspresyonu ve Sağkalım Üzerinde Etkileri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 27/02/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri-Danışman
Prof. Dr. Erdem TÖZÜN
İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Aziz Sancar DETAE
Sinirbilim Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Elif ÖZKÖK
İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Aziz Sancar DETAE
Sinirbilim Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Derya GEZEN AK
İstanbul Üniversitesi,
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Işıl AKSAN KURNAZ
Gebze Üniversitesi,
Temel Bilimler Fakültesi
Mol. Biyo. Genetik Anabilim Dalı



Jüri

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL
İstanbul Medipol Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

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

Neşe Aysit Altuncu (İmza)



İTHAF

Hayatımın her döneminde yanımda olan canım annem, ablama ve varlığını, özlemini her daim yüreğimde hissettiğim biricik babama ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bütün teşekkürlerin sahibine, O'nun en sevdiğine ve O'nun en sevdiklerine sonsuz teşekkür, saygı ve şükranlarımı sunarım

Tez çalışmalarım boyunca engin bilgisini, destegini ve sonsuz sabrını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, her zaman pozitif enerjisini bize yansıtan, çok iyi bir bilim adamı ve yönetici olan Prof. Dr. Erdem Tüzün'e,

Karsılaştığım her sorunda yanımda olup beni güçlendiren ekip arkadaşlarım Esra Nur Ekmekçioğlu, Gülsena Baydaş, Sadık Bay, Betül Polat, Fazlı Kemal Bayat, Nazlı Kuter, Hilmi Kaan Alkan, Erhan Mahmut Avşaroğlu, Burcu Kurt Vatandaşlar, Tuba Akgül Çağlar'a;

Bana bilgi ve deneyimlerini kararlılıkla aktaran sevgili arkadaşlarım Berrak Çağlayan, Sevilay Şahoğlu Göktaş, Arzuhan Koç Yıldırım, Melike Küçüklerden, Nurcan Orhan, Aysel Canan Ulusoy ve Pakize Yiğit'e;

Aynı aileden olmasak da kardeşim gibi gördüğüm Esra Çigdem Cezlan'a

Deneyimleri ile tezime ivme kazandıran Doç. Dr. Fahri Akbaş'a;

Bütün Remer çalışanlarına ve İstanbul Medipol Üniversitesine;

Atalarıma ve canım ülkeme;

Teşekkürü en çok hak eden, hayatım boyunca yanımda olan, sevgileri ile beni kuşatan ve kendilerinden razı olduğum rahmetli babam Yasin Ayşit, annem Nermin Ayşit ve canım abim kardeşlerim, İsmail, Gülergül ve Esengül Ayşit'e

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

<i>T.C.</i>	<i>İİ</i>
<i>TEZ ONAYI</i>	<i>İİİ</i>
<i>İTHAF</i>	<i>V</i>
<i>TEŞEKKÜR</i>	<i>VI</i>
<i>İÇİNDEKİLER</i>	<i>VII</i>
<i>ŞEKİLLER LİSTESİ</i>	<i>X</i>
<i>SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ</i>	<i>XII</i>
<i>ÖZET</i>	<i>XV</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>XVI</i>
<i>1. GİRİŞ VE AMAÇ</i>	<i>17</i>
<i>2. GENEL BİLGİLER</i>	<i>19</i>
2.1. Sinir Hücresi	<i>19</i>
2.2 Hippokampus Dokusu ve Özellikleri.....	<i>20</i>
2.3. Eksitator Aminoasitler	<i>23</i>
2.3.1 Glutamat.....	<i>24</i>
2.3.1.1. NMDA Reseptörleri	<i>27</i>
2.4. İyon Kanalları	<i>31</i>
2.4.1. Voltaj Kapılı İyon Kanalları	<i>31</i>
2.4.1.1. Potasyum Kanalları	<i>33</i>
2.5. Otoimmün Ensefalitler.....	<i>34</i>
2.5.1 Otoimmün Ensefalit Sendromları	<i>35</i>
2.5.1.1. Diğer Otoimmün Hastalıklar.....	<i>38</i>
2.5.1.2.Enfeksiyon Sonucu Meydana Gelen Ensefalitler.....	<i>38</i>
2.5.1.3 Nöronal Yüzey Otoantikorları ve İlişkili Nörolojik Sendromlar	<i>40</i>
<i>3. GEREÇ VE YÖNTEM</i>	<i>48</i>
3.1. Materyal	<i>48</i>
3.1.1. Deney Hayvanı.....	<i>48</i>
3.1.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri	<i>48</i>
3.2.Yöntem.....	<i>49</i>
2.1.1. 3.2.1. Çalışmada kullanılan vasatlar	<i>49</i>

3.2.2. Fareden Hippocampus Dokusunun çıkarılması	50
3.2.3. Hücre kültürü	51
3.2.4 Hücre Eldesi ve Sayımı.....	52
3.2.5 Pürifiye Antikor Eldesi	53
3.2.6. Hasta Serum Antikorlarının Nöron Membran Antijenlerine Bağlanması Gösterilmesi	54
3.2.7. Mikroskopik görüntüleme.....	55
3.2.8. IgG İnkübasyonu Sonrasında Nöronal Sağkalım Oranlarının Belirlenmesi	56
3.2.9. JC-1 Apoptoz Düzeyinin Belirlenmesi	57
3.2.9.1 JC-1	57
3.2.11 Ca Görüntülemeleri.....	64
3.3.4 İstatistiksel analizler.....	66
4. BULGULAR.....	67
4.1.Otoimmün Ensefalitlerin Klinik Özellikleri	67
4.2 Hasta Serum Antikorlarının Nöron Membran Antijenlerine Bağlanması Gösterilmesi	67
4.3 Hasta Serum IgG'si Uygulanan Primer Hippokampal Nöronların Sağkalım Oranı	70
4.3.1. Hippokampus Kültürleri ve Elde Edilen Hücre Miktarı	70
4.3.2 Hasta Serum IGG'si Uygulanan Primer Hippokampal Nöronların Sağkalım Oranlarının Belirlenmesi.....	72
4.4 JC-1 Apoptoz Düzeyinin Belirlenmesi	77
4.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Apoptatik Faktörlerin Sentezlenme Düzeylerinin Belirlenmesi.....	80
4.6 Fluo-4 Kalsiyum Görüntüleme	83
5.TARTIŞMA	87
KAYNAKLAR.....	92
FORMLAR	112
ETİK KURUL KARARI... ..	113
TELİF HAKKI İZNİ	3
ÖZGEÇMİŞ.....	4

TABLOLAR LISTESİ

Tablo 2.1.Otoimmün ensefalit ve klinik bulguları.....	21
Tablo 2.5.Epilepsi ile ilişkili anti-nöronal antikorlar ve klinik sendromlar.	27
Tablo 3.21. Sarf malzeme listesi.....	34
Tablo 3.2.Pürifiye antikor eklenerek yapılan deney modelleri.....	43
Tablo 3.3.Erken dönem nöron kültürlerinde JC-1 deney planı.....	45
Tablo 3.4.Gec dönem nöron kültürlerinde JC-1 deney planı.....	45
Tablo 3.5.Erken dönem nöron kültürlerinde RNA izolasyonu deney planı.	46
Tablo 3.6.Gec dönem nöron kültürlerinde RNA izolasyonu deney planı.....	47
Tablo 3.7.RNA saflık değerleri.....	48
Tablo 3.8.Erken ve gec dönem cDNA için eklenmesi gereken su miktarı...	49
Tablo 3.9 cDNA sentezi için kitin içeriğine göre hazırlanan karışım ve oranlar.	49
Tablo 3.10 Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü.....	50
Tablo 3.11.Genlerin ters ve ileri primerleri.....	51
Tablo 3.12Erken dönem nöron kültürlerinde Ca iyon akımı deney plan....	52
Tablo 3.13Geç dönem nöron kültürlerinde Ca iyon akımı deney plani.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Nöron anatomisi.....	4
Şekil 2.2. Hippokampal nöral ağ.....	6
Şekil 2.3. İyonotipik ve metabotropik glutamat reseptörlerinin yapısı.....	10
Şekil 2.4. İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptör alt tiplerini.....	11
Şekil 2.5. NMDA reseptörünün şematik modeli ve alt ünite konfigürasyonu.....	13
Şekil 2.6. NMDA reseptörlerinin yapısı ve alt birimi kompozisyonu.....	15
Şekil 2.7. Voltaj kapılı iyon kanallarının türleri.....	18
Şekil 2.8. Otoimmün ensefalitlere yol açan antikorların tipleri.....	26
Şekil 2.9. LGI-1'in pre-post sinaptik nöron reseptörleri.....	31
Şekil 3.1. Stereomikroskop.....	36
Şekil 3.2. Yenidoğan fareden hippocampus dokusunun çıkarılması.....	37
Şekil 3.3. Muse cihazı.....	38
Şekil 3.4 Lazer taramalı konfokal sistemi.....	42
Şekil 4.2.1. Bir hafta inkübe edilen nöronlara insan immünglobülini ve ticari antikor LGI-1'in kolokalizasyonu.....	55
Şekil 4.2.2. Bir hafta inkübe edilen nöronlara insan immünglobülini ve ticari antikor NR-1'in kolokalizasyonu.....	56
Şekil 4.3.1. Hipokampus dokusundan elde edilen hücre miktarı.....	57
Şekil 4.3.2. Hipokampal nöronlar inkübasyon sonrası görüntüleri.....	58
Şekil 4.3.2.1. 0. gün primer hippocampal nöron kültürlerinde IgG uygulanmasından sonrası sağkalım oranı.....	60
Şekil 4.3.2.2. Hipokampus hücre kültürlerinin kontrol grubu 1,3,7, gün PI görüntüleri	61
Şekil 4.3.2.3. Hipokampus hücre kültürlerinin LGI-1 grubu 1,3,7, gün PI görüntüleri.....	62

Şekil 4.3.2.4. Hipokampus hücre kültürlerinin LGI-1 grubu 1,3,7, gün PI görüntüleri.....	63
Şekil 4. 4.1. Hipokampal nöron kültürlerinde 3 günlük IgG uygulaması ve JC-1 analiz sonuçları.....	64
Şekil 4.4.2. Hipokampal nöron kültürlerinde 3 günlük IgG uygulaması ve JC-1 görüntüleri.....	65
Şekil 4.4.3. 7. gün Hipokampal nöron kültürlerinde 3 günlük IgG uygulaması ve JC-1 görüntüleri.....	66
Sekil 4.5.1. Caspase 3, Bax ve BCL2 ‘nin primer nöron kültürlerinde ekspresyon düzeyleri.....	68
Şekil 4.5.2. NR-1 ve LGI-1’in nin primer nöron kültürlerinde ekspresyon düzeyleri.....	69
Şekil 4.6.1. Ca görüntülemeleri ve RFU değerleri.....	71
Şekil 4.6.2. Erken dönem IgG uygulaması ve Ca görüntüleri.....	72
Şekil 4.6.3. Geç dönem IgG uygulaması ve Ca görüntüleri.....	73

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler

° C Santigrat Derece

Sm Santimetre

dk Dakika

Hz Hertz

kDa Kilo Dalton

kg Kilogram

L Litre

mg Miligram

ml Mililitre

mm Milimetre

mM Milimolar

rpm Dakikadaki devir sayısı

µl Mikrolitre

µm Mikrometre (Mikron)

µm² Mikrometrekare

ADAM 22 **A** Disintegrin **And** Metalloprotease domain 22

ADAM 23 **A** Disintegrin **And** Metalloprotease domain 23

ADEM Akut dissemine ensefalomyelit

ALLE Anti-LGI1 otoantikör ilişkili limbik ensefalit

AMPAR alfa-amino-3- hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit reseptörü

AMPAR: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit reseptörü

BE Bickerstaff ensefaliti

BOS Beyin omurilik sıvısı

CASPR2: Contactin-associated protein-like 2;

C-J Creutzfeldt-Jakob

CNQX 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3 dione

DAG diasilgliserol

EAA Eksitör aminoasitlerin

EMG elektromyografide

GABA Gamma-aminobütirik asit

GABAR gama-aminobutirik asit reseptörü

GAD Glutamik asit dekarboksilaz

GBS Guillain-Barré sendromu

GlyR glisin reseptörü

GZ-PZR Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

HSV Herpes simpleks

IP3: inositol (1,4,5) -trifosfat

iGluR: iyonotropik glutamat reseptörü

JC-1- cationic carbocyanine dye

KHAK Küçük hücreli akciğer kanseri

KİS Katı kişi sendromu (veya Stiff Person Sendromu)

LE Lupus eritematozus

LGI1 Lösinden zengin glioma inaktive proteini-1

MAPK mitojenle aktive protein kinaz

MFS Miller-Fisher sendromu

MGlur metabotropik glutamat reseptörü

MNS Merkezi sinir sisteminin

MS Multiple skleroz

MTS: Mezial temporal skleroz.

NAAG N-asetilaspartilglutamat

NMDAR N-metil-D-aspartat reseptörü

NMDAR: N-metil-d-aspartat reseptörü

ODTLE otozomal dominant temporal lob epilepsisine

OİH Otoimmün hastalıklar

PERM Progresif ensefalomyelit rijidite ve miyoklonus

PI Propidyum iyodür

PKC protein kinaz C

PLC fosfolipaz C

PLD fosfolipaz D

SLE Sistemik lupus eritematozus

VGKCs Voltaj kapılı potasyum kanalları

ÖZET

Altuncu Aysit, N. (2017) iyon kanalı antikorlarının nöronal membran protein ekspresyonu ve sağkalım üzerine etkileri İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, SİNİRBİLİM ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Sinir sisteminde meydana gelen hasarlar çoğunlukla geri dönüşümsüz dejeneratif süreçleri de beraberinde getirir. Son dönemlerde eksitator aminoasitlerin ve iyon kanallarının nöron hasarında özellikle önemli rol oynadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca merkezi sinir sisteminin çoğu hastalık modelinde eksitator aminoasit reseptör antagonistlerinin nöral dokuya etkileri de ortaya konmaktadır. Bu bağlamda özellikle iyon kanalı antikoru ilişkili otoimmün ensefalitler ön plana çıkmaktadır. Klinik ve radyolojik bulgular otoimmün ensefalit sendromlarında antikorların patogenezdaki rollerinin moleküler değişikliklerle sınırlı olmadığını, nöron ölümüne yol açan toksik etkilerinin de bulunduğunu düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında otoimmün ensefalit antikorlarının nöron ölümüne yol açan etkilerinin gösterilmesi amaçlandı.

Bu tez kapsamında hipokampus dokusu ayrıştırılarak primer nöron kültürleri elde edildi. Lösinden zengin glioma inaktif 1 (LGI1) veya N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) antikoru pozitif serum örneklerinden IgG izole edilerek farklı yaşlardaki nöron kültürlerine uygulandı ve propidyum iyodür (PI) boyama yöntemi ile nöronal ölüm oranları belirlendi. Gözlenen IgG uygulamasına bağlı nörotoksik etkinin apoptoz ile ilişkisinin araştırılması için JC-1 boyaması uygulandı ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile apoptozla ilişkili moleküllerin ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Son olarak otoimmün ensefalit antikorlarına bağlı apoptotik ölümlerin sebebinin aydınlatılması amacıyla hücre içi kalsiyum akım düzeyleri ölçüldü ve IgG uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında karşılaştırıldı. LGI1 ve NMDAR antikoru pozitif IgG uygulanan nöronlarda kalsiyum akımının sağlıklı IgG uygulanan nöronlara kıyasla azaldığı gözlemlendi.

Çalışmamızın sonuçları otoimmün ensefalitlere sebep olan antikorların hastalık mekanizmalarının ekspresyon değişikliği ile sınırlı olmadığını ve apoptotik nöronal ölümün de hastalık mekanizmaları arasında olduğunu göstermektedir. Bulgularımız nöronal apoptozun kalsiyum toksisitesine bağlı olmadığını düşündürmektedir. İyon kanalı işlev bozukluğu ile nöron ölümü arasındaki ilişkilerin ileride yapılacak çalışmalarla araştırılmasının altında glutamat ve potasyum kanalı işlev bozukluğu yatan geniş bir merkezi sinir sistemi hastalıklar grubunun patogenezi aydınlatılacak nitelikte olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Hipokampus, Otoimmün ensefalit, LGI-1, NMDAR, Apoptoz

ABSTRACT

Altuncu Ayşit,N.. (2017). Effects of ion channel antibodies on neuronal membrane protein expression and survival. İstanbul University, Institute of Health Science,Neuroscience . Doctoral Thesis. İstanbul

Nervous system injuries usually cause irreversible degenerative processes. Lately it has been shown that excitatory amino acids and ion channels play a great role in neuronal injury. Also the effects of excitatory amino acid receptor antagonists on the neural tissue in many of the central nervous system disease models have been proven. In this context especially ion channel antibody associated autoimmune encephalopathies are indicated. Clinical and radiological findings conclude that the antibodies in autoimmune encephalitis syndromes not only play a part in pathogenesis by causing molecular changes, but also have toxic effects leading to neuronal death. In this study our aim was to show the lethal effects of autoimmune encephalitis antibodies on neurons.

In our study primary neuron cultures were isolated from hippocampal tissue. Neuron cultures at different days in vitro were treated with immunoglobulin G (IgG) that was isolated from serum samples positive for either leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI1) or N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antibodies. Propidium iodide (PI) was used to detect neuronal cell death. To understand whether apoptosis was involved in the neurotoxic effects caused by IgG treatment, JC-1 dye and real time polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect the apoptosis associated molecule expressions were both used. Lastly intracellular calcium flow levels were measured and compared between the groups in order to understand the reason for the apoptotic death related to autoimmune encephalitis antibodies. A lower calcium flow in neurons treated with LGI1 and NMDAR antibody positive IgG was observed compared to the calcium flow in neurons treated with healthy IgG.

Our results show that autoimmune encephalitis antibodies cause diseases not only by changing molecular expressions but also by causing apoptotic neuronal death. Also our results indicate that neuronal apoptosis in this case is not caused by calcium toxicity. We believe that further studies investigating the relationship between ion channel dysfunction and neuronal death might explain the pathogenesis of a wide spectrum of central nervous system diseases that are related to glutamate and potassium channel dysfunctions.

Key Words: hippocampus, Autoimmune encephalitis, LGI-1,NMDAR, Apoptosis.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Merkezi sinir sistemi hastalıklarının fizyopatolojisi üzerinde son yıllarda giderek çoğalan çalışmalar birincil ve ikincil yaralanmanın önemini göstermiştir. Birincil hasar iskemik olay veya travma sonucunda oluşan nöral doku zedelenmesi olup bu olgularda koruyucu yöntemler dışında tedavi yöntemi bulunmamaktadır. İkincil hasar ise yaralanmanın ardından hücre seviyesinde dakikalar içinde gelişmeye başlayan birçok karmaşık olayları içerir. Bu olayların sonucunda ortaya çıkan zincirleme reaksiyonla nöral doku hasarı giderek artar ve dramatik olarak yayılır. Bu nedenle ikincil hasarın önlenmesi tedavinin ana amacını oluşturur.

Son dönemlerde eksitator aminoasitlerin ve iyon kanallarının özellikle nöron hasarı sonrası önemli rol oynadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte merkezi sinir sisteminin çoğu hastalık modelinde eksitator aminoasit reseptör antagonistleri ile yapılan çalışmalarda nöral dokuya etkileri de ortaya konmaktadır. Bu kapsamda son on yıl içerisinde tanınmaya başlanmış otoimmün ensefalitler dikkati çekmektedir. Otoimmün ensefalitler aralarında glutamat ve GABA reseptörleri ile potasyum kanalı alt birimlerinin olduğu geniş bir nöronal membran antijeni ailesine karşı gelişen otoantikorların nöron işlevleri ile etkileşmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu antikorlar hedef reseptör veya iyon kanalının membran ekspresyon düzeylerini değiştirmekte ve psikoz, epileptik nöbet, hareket bozukluğu, katatoni, hemipleji-kuadripleji, afazi, ataksi, duygudurum değişikliği ve bellek kaybı gibi bulgulara sebep olmaktadır. Otoimmün ensefalit olgularında en sık saptanan antikorlar N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) ve lösinden zengin glioma inaktive proteini-1 (LGI1) antikorlarıdır.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda NMDAR ve LGI1 antikorlarının sadece nöron membranında bağlandıkları antijenin ekspresyonunu değiştirdiği ve antikorların bağışıklık sistemini baskılayıcı yöntemlerle temizlenmelerinin ardından hedef antijen ekspresyonunun normale dönmesi ile nöronal işlev bozukluğunun sonlandığı ileri sürülmüştür. Halbuki NMDAR ve LGI1 ensefalitlerinde sıklıkla hipokampal ve kortikal atrofi gözlenmekte ve olguların %5-7 kadarı duygudurum bozukluğu, psikoz, amnezi ve afazi gibi sekel nöropsikiyatrik bulgularla sonlanmaktadır. Bu bulgular otoimmün ensefalit patogenezinin

nöronal moleküler değişikliklerle sınırlı olmadığını, antikörlerin nöron ölümüne yol açan toksik etkilerinin de bulunduğunu düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında otoimmün ensefalit antikörlerinin nöron ölümüne yol açan etkilerinin gösterilmesi amaçlandı. Bu amaçla fare hipokampuslarından primer nöron kültürleri elde edildi. LGI1 veya NMDAR antikoru pozitif serum örneklerinden IgG izole edilerek farklı yaşlardaki nöron kültürlerine uygulandı ve propidyum iyodür (PI) boyama yöntemi ile nöronal ölüm oranları belirlendi. Gözlenen IgG uygulamasına bağlı nörotoksik etkinin apoptoz ile ilişkisinin araştırılması için JC-1 boyaması uygulandı ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile apoptozla ilişkili moleküllerin ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Son olarak otoimmün ensefalit antikörlerine bağlı apoptotik ölümün sebebinin aydınlatılması amacıyla hücre içi kalsiyum akım düzeyleri ölçüldü ve IgG uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında karşılaştırıldı.

Bulgularımız otoimmün ensefalitlere sebep olan antikörlerin hastalık mekanizmalarının ekspresyon değişikliği ile sınırlı olmadığını düşündürmektedir. Söz konusu antikörler sadece otoimmün ensefalit olgularında değil epilepsi, psikoz ve demans olgularında da saptanmıştır. Ayrıca NMDAR ve potasyum kanalı işlev bozukluğu pek çok nörolojik ve psikiyatrik hastalığın altında yatan temel faktörlerdir. Bu sebeple, iyon kanallarını baskılayan antikörlerin kullanıldığı çalışmaların bu hastalıkların patogenezi hakkında da fikir vermesi mümkündür.

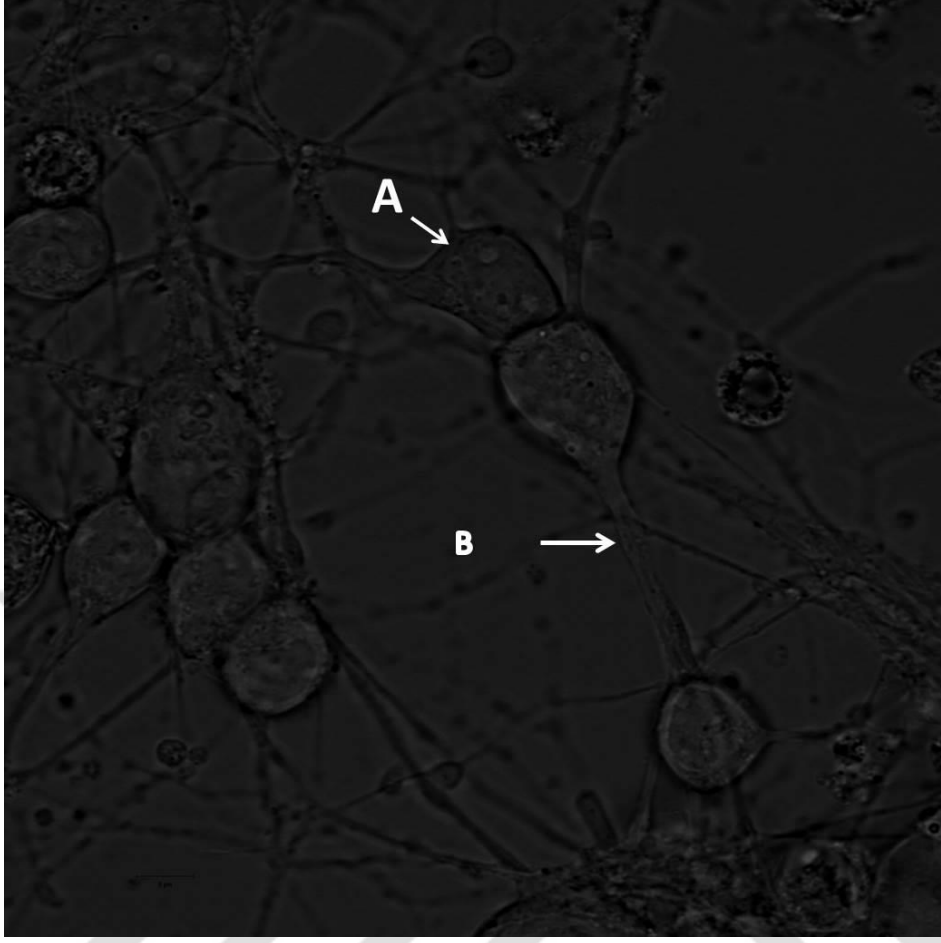
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Hücresi

Sinir sistemi elektro-kimyasal sinyaller yoluyla bilgi işleyen ve ileten elektrikle uyarılabilen özelleşmiş hücrelerden meydana gelir. Nöron adı verilen bu hücreler asla bölünmez ve herhangi bir sebeple meydana gelen hücre ölümünün ardından yeni hücreler oluşmaz. Nöronlar, üç temel bölümden oluşurlar; soma veya hücre gövdesi, dendritler ve aksonlar (Junqueira ve ark., 1993). Hücre gövdesi çekirdek içerir ve neredeyse tüm nöronal proteinlerin ve zarların sentezi alanıdır. Bazı proteinler dendritlerde sentezlenir, ancak ribozom içermeyen aksonlar ve akson terminallerinde protein üretilmez (Şekil 2.1.).

Çoğu nöron, hücre gövdesinden dışarıya uzanan ve diğer nöronların akson ucundan kimyasal sinyaller almak üzere uzmanlaşmış birden fazla dendrite sahiptir. Dendritler bu sinyalleri küçük elektriksel dürtülere dönüştürür ve onları hücre gövdesi yönünde içe doğru iletir. Nöronal hücre vücutları ayrıca sinapslar oluşturabilir ve böylece sinyalleri alabilir (Miller ve ark., 2003; Wong ve ark., 2002).

Akson, akson tepeciği denilen özel bir bölgede hücre gövdesinden oluşur. Motor nöronlarda ve internöronlarda, akson tepeciğinde aksiyon potansiyeli başlatılmıştır. Sonunda, birçok akson, sinir impulsunu hızla iletmelerine yardımcı olan, miyelin adı verilen özel yalıtıcı bir madde ile kaplıdır. Miyelin asla dendritlerde bulunmaz. Sonuna doğru, akson birçok dallara bölünür ve akson terminalleri (veya sinir terminalleri) olarak bilinen safir kabarıklıkları geliştirir. Bu akson terminalleri hedef hücreler üzerinde bağlantılar kurar (Goldberg ve ark., 2002; Lindsay ve ark., 1985).



Şekil 2.1. Bir nöronun anatomisi. A: Hücre gövdesi, B: Akson. (Tez kapsamında yapılan hipokampus nöron kültürlerinin 40 x objektif görüntüsü.)

Nöronlar, yapılarına göre; multipolar, bipolar, unipolar ve psödounipolar olmak üzere dört gruba ayrılır. İşlevlerine göre ise duyu nöronları, motor nöronlar ve ara nöronlar olarak sınıflandırılırlar (Kierszenbaum, 2006).

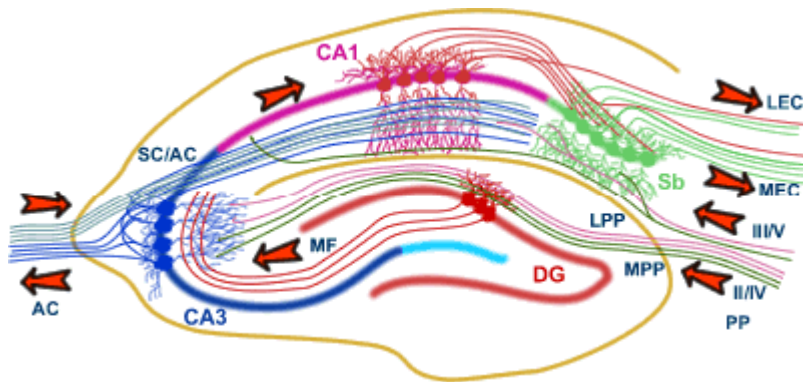
2.2 Hipokampus Dokusu ve Özellikleri

Hipokampus, beyindeki her iki yanından birinde medial temporal lobda yer alan beynin bir parçasıdır. Hipokampus, öğrenme ve hafıza sürecinde önemli bir role sahiptir (El-Falougy ve Benuska, 2006). Hipokampus, cinsel ve duygusal davranışların düzenlenmesinde limbik sistemin bir parçası olarak da işlev görür (El-Falougy ve Benuska, 2006). Bu nedenle, hipokampus, epilepsi, Alzheimer hastalığı ve depresyon gibi birden fazla nörolojik bozuklukla ilişkilidir (Benedetti ve diğerleri, 2006; Blume, 2006; Scheff ve Price, 2006).

Hipokampus temporal lobun medial kısmında bulunur ve lateral ventrikülün temporal hornu ile yakın komşuluk içindedir (Barr ve ark, 1988; Amaral ve ark,1990). Kesitlerde C harfi şeklinde olan bu yapı ortalama 5 cm uzunluğundadır. Görünümü itibariyle denizatına benzetildiğinden hipokampus adı verilmiştir (Songur ve ark, 2001; Arıcı ve ark, 2001). Hippocampusun dış yüzü koc boynuzuna benzemesinden dolayı “cornu ammonis” olarak adlandırılmıştır. Ammon koc baslı bir mısır tanrısıdır ve hipokampus bölümleri bu sebepten ötürü CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak kısaltılarak adlandırılmıştır.

Embriyonik dönemde koronoid fissür çevresinde bulunan nöral progenitör hücreler çoğalması ve göç etmesi ile hipokampusün gelişimi başlar (Collins, 1995; Sadler ,1995; Seres, 2007). Embriyonun 13-14.haftaları civarında hipokampus temporal lobun medial yüzeyinde hipokampal fissür ile çevrilmiştir (Songur, 2001) 15 ve 16. haftalarda hipokampal sulkus açık olmasına rağmen dentat girus ve kornu ammonis içe doğru katlanmaya başlar. CA1, CA2 ve CA3 alanları çizgisel bir şekildedir (Altman ve Das, 1965; Cameron ve McKay, 2001; Ming ve Song, 2011). Dentat girus dar ve U şeklinde bir anatomik yapıda bulunur ve sürekli hücre göçü gerçekleşir. 18 ile 20.haftalarda ise fetal hipokampus giderek erişkin hipokampusuna benzemeye başlar (Sadler, 1990). Embriyonel dönemde hemisfer duvarı kalınlaşırken, diğer yandan da ventrikülün medial kenarına doğru bir çıkıntı yapar ve bu çıkıntı hipokampusu meydana getirir.

Hipokampus dokusunun CA1 subikuluma, CA4 ise dentat girusa en yakın olan alandır. CA1 bölge nöronları entorinal korteksten veya CA3 bölgesinden bilgileri alır ve işler (Amaral ve Witter,1989). Sağlam bir CA3 ve CA1- CA3 bağlantısı hafıza için mutlaka gereklidir çünkü CA1 bölgesi bellek için gereklidir (Nakazawa ve ark, 2002, 2004; Gold ve Kesner, 2005; Kesner, 2007). CA3 bölgesi Schaffer kollateral lifleri aracılığı ile CA1 bölgesiyle bağlantılıdır (Nakashiba ve ark, 2008). CA1 bölgesinin çıktıları subikulum, entorinal korteks ve prefrontal kortekse uzanır. CA1 ise iki yerden girdi (input) alır; birincisi (büyük kısmı) CA3'den gelir, çok az kısmı ise entorinal korteksten gelir (İzgi ve Erbaş, 2015). CA1 bölgesi kortikal, CA3 ve entorinal korteksten gelen bilgiler arasında uyumsuzluk olup olmadığına bakar (Vinogradova, 2001). CA1 ve CA3'deki bölgelerindeki hücre sayıları ergenlikten yetişkinliğe geçiş sürecinde artmaktadır (Suzuki ve ark, 2005). Bu durum dönemde uzaysal öğrenme ve belleği geliştiğini gösterir (Tien ve ark,1992).



Şekil 2.2. Hipokampal Ağ: Hipokampus, Dentate Girus (DG) ve CA3 piramidal nöronlar ile Perforant yolu (PP) - lateral ve mediale bölünmüş olarak Entorhinal Cortex (EC) 'dan girdi girişi ile temelde tek yönlü bir ağ oluşturur. CA3 nöronları ayrıca, Yosunlu Elyaf (Mossy Fibers, MF) yoluyla GM'den bilgi almaktadır. CS1 piramidal hücrelere Axafons'u Schaffer Collateral Pathway (SC) aracılığıyla gönderirler ve aynı zamanda Associational Commisural (AC) Yoluyla kontralateral hipokampustaki CA1 hücrelerine de gönderirler. CA1 nöronları ayrıca Perforant Path'dan doğrudan giriş alır ve aksonları Subiculuma (Sb) gönderir. Bu nöronlar, ana hipokampal çıktıyı bir döngü oluşturarak EC'ye geri gönderirler.

Beynin birçok bölgesinden duyu lifi alan hipokampus ağı ve bellek sistemleri arasında sıkı bir bağlantı kurar (Raisman ve ark, 1965; Sendrowski ve Sobaniec, 2013). Hipotalamus, talamus ve septal sahaya forniks aracılığıyla duyuları iletmektedir. Ayrıca hipokampus subkortikal alanlarla olan bağlantısı sayesinde, beynin birçok bölgesi ile iletişim halindedir (Moser ve Moser, 1998; Lisman ve Grace, 2005). Öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde önemli role sahip olan hippocampus, yeni elde edilen bilgilerin depolanması ve anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde görev alır (Spiers, Maguire, & Burgess, 2001). Bu nedenle hipokampusta meydana gelebilecek bir hasar, belirtilen fonksiyonlarda bozukluklara neden olabilir (Chamber ve ark, 2004). Hipokampus lezyonlarında, anıların kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe alınmasında sorun olduğu gözlenmiştir ve sembolik anıların hafızada tutulmasının da mümkün olamayacağı ifade edilmiştir (Arıncı ve Elhan, 2001; Songur ve ark, 2001). Yaşlanma ile hipokampustaki hücrelerde azalma olduğuna ve buna bağlı demans olduğuna inanılıyordu (Glasper ve Gould,

2013). Ancak son dönemlerdeki çalışmalar yaş ile hipokampal hücre sayısında herhangi bir ilişki olmadığını göstermiştir. Yalnızca Alzheimer hastalığında CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki piramidal hücrelerde azalma olduğu keşfedilmiştir (Padurariu ve ark, 2012). Özellikle CA3 ve dentat girusdaki hasarlanmalarda bilinen objelerin yer değiştirmesi ve konumlandırılmaları konusunda sorunlar baş gösterir. Bu durum CA1 hasarlarında görülmez (Moser ve ark, 2015; Moser ve ark, 2008). Hipokampusun epileptik nöbetlerin önemli bir kaynağı olduğu düşünülmektedir (Isaacson, 2002). Hipokampal skleroz, özellikle CA1’de piramidal hücre kaybı, reaktif gliosis, dentat girusa granüler hücre yaygın inflamasyon ve mossy (yosunsu) liflerde reorganizasyon ile karakterize edilir (Sendrowski ve Sobaniec, 2013) ve temporal lob epilepsilerinde sık görülür (Seress ve ark, 2009). Ancak temporal lob epilepsilerinde her zaman hipokampusda hasar veya anomali varlığı gösterilememiştir. Ayrıca hipokampal hasarın epileptik nöbetler sonucu mu olduğu yoksa nöbetlerin bu hasar sonucu mu ortaya çıktığı kesin olarak bilinmemektedir. Ancak hipokampusun beynin elektriksel olarak en uyarılabilir bölgesi olduğu bilinmektedir (İzci ve Erbaş, 2015) B vitamini eksikliği ve alkol kullanımının hipokampusdaki nöronlarda kalıcı hasara neden olduğunu gösterilmiştir (Korkotian, 2015; Troen, 2008). Kronik alkol kullanımı hipokampusdaki nöronal ağda ciddi değişikliklere neden olmakta ve matür dentritlerin yoğunluğunu azaltmaktadır (Du, 2014; Korkotian, 2015). Böylelikle öğrenme ve hafıza bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Formaldehitin de solunum yoluyla alınması halinde hipokampusta ciddi hasarlara yol açabileceği dolayısıyla kalıcı nörotoksisiteye neden olabileceği belirtilmiştir. Özellikle alınan formaldehit hipokampusda ciddi hasara neden olabilir (Kuş, 2007; Özmen ve ark, 2014)

2.3. Eksitator Aminoasitler

Organizmada en fazla bulunan nörotransmitterler aminoasit transmitterlerdir (Wikinski ve Acosta 1995). Memeli beynindeki en bol ve en önemli eksitator amino asit glutamattır ve tüm sinapsların %40’ı tarafından kullanılır (Kandel 2014). Eksitator aminoasitlerin (EAA) ilk ortaya çıkışı 1957 yılında rastlantısal gözlemler sonucu Lucas (Lucas ve ark, 1957) ve Newton (Choi,1988) isimli araştırmacılar sayesinde bulunmuştur. Yirmi yıl sonra Olney ve Sharpe (Olney ve Sharpe, 1989) sonradan eksitotoksisite olarak adlandırılacak bu nörotoksik etkinin yalnızca glutamat ve retinal nöronlar ile sınırlı olmadığını, EAA’lerin santral nöronlar üzerinde genel bir etki oluşturduklarını bildirmişlerdir (Lucas ve ark, 1957; Gillissen ve ark, 2000). Son dönemlerde EAA’ların toksisitesi glutamat reseptör fonksiyonlarının ortaya konulması ve etkili glutamat antagonistlerinin gelişimi ile

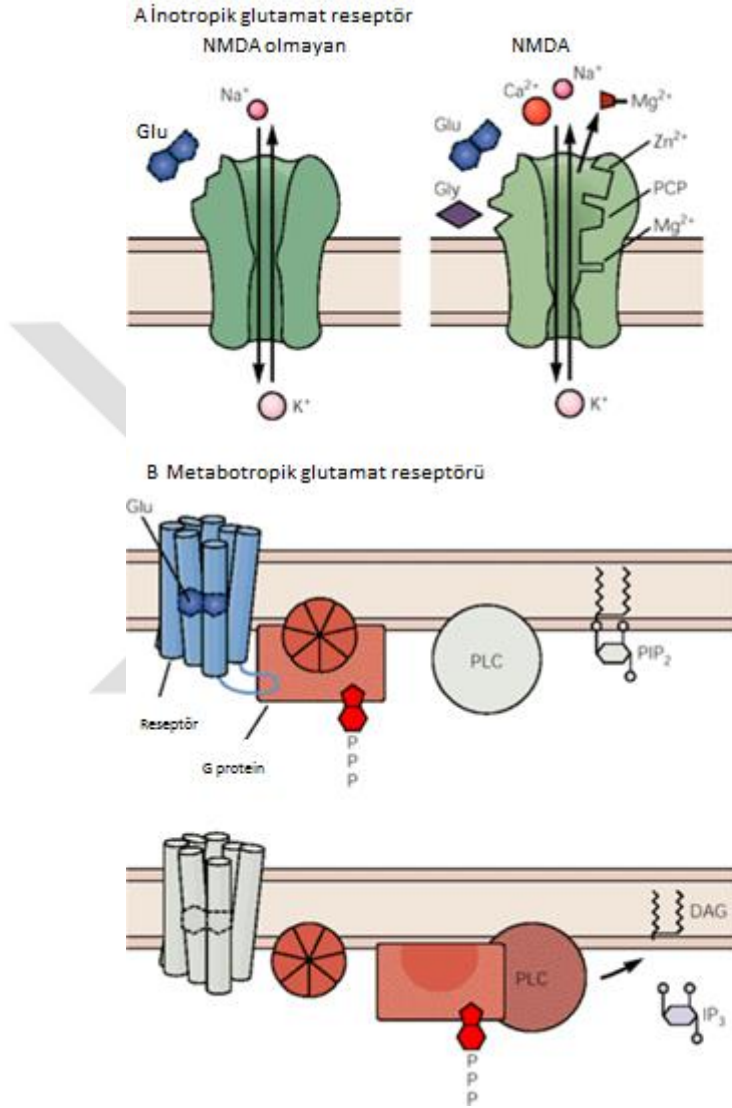
desteklenmiştir (Watkins ve ark, 1990). Günümüzde kafa travması, spinal travma, serebral iskemi, epilepsi ve kronik dejeneratif hastalıkların fizyopatogeneğinde eksitotoksik yangının önemi kabul edilmektedir (Margerison ve ark,1960; Alberts ve ark, 1989; Beal,1989; Choi,1988; Siesjö, 1988-1991). Ayrıca aspartat, N-asetilaspartilglutamat (NAAG), sisteat ve homosisteat da eksitator nörotransmitterlerdir

2.3.1 Glutamat

Glutamat ve aspartat gibi EAA'ler memeli santral sinir sisteminin ana nörotransmitterleridir (Watkins ve ark, 1990). Beyinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar (glutamat 10 mmol/l ve aspartat 4 mmol/L) (Danbolt, 2001; Featherstone ve Shippy, 2008). Sinir terminallerindeki sinaptik geçişi yönlendirir ve nöron içine iyon geçişini kontrol ederler. Nöronal yaşam, sinaptogenesis, nöronal plastisite, birçok nörodejeneratif hastalık öğrenme ve hafıza üzerinde etkili bulunmuşlardır (Beal, 1992; Choi, 1988; Coyle ve ark, 1981; Farooqui ,19919; Koek,1988; Meldrum ,2000 Nishizawa, 2001). EAA'ler normal süreçte sinir iletiminde önemli sorumlu oldukları halde, nörotoksisitenin de potansiyel kaynağıdır (Meldrum, 2000). Aşırı glutamat artışı kalsiyum dengesini bozar ve eksitotoksititeye neden olur. Bununla birlikte anormal glutamat düşüklüğü de hücre uyarımının bozulmasına yol açar (Ye ve ark, 1999). Glutamat ve benzeri aminoasitlerin nöronun stoplazmasında dendridlerde, glialarda akut şişmeye ve kademeli olarak nöronal dejenerasyona yol açtıkları gösterilmiştir (Beal, 1992; Choi,1988; Limbrick, 2003; Siesjö,1990;1992). Bu nedenle fizyolojik şartlarda sinaptik boşlukta glutamat seviyelerini düzenleyen bir mekanizma bulunmaktadır.

Glutamat postsinaptik hücre yüzeyindeki etkilerini kendilerine özgü reseptörlerle etkileşime girerek oluşturur. (Managhan ve ark, 1986; Monaghan ve ark, 1989; Muller ve ark,1988; Young ve ark,1990). Glutamat reseptörleri sadece merkezi sinir sisteminde değil ayrıca otokrin ve parakrin etkileri çevresel dokularda örneğin kemik, testis, pankreas adrenal, pineal bezler ve pankreasda da etkilidirler (Hinoi,2005). Glutamerjik sinyal yolağının merkezi sinir sisteminde öğrenme motor kontrol ve duyuşal işlemlerde kritik rolleri vardır. Bununla birlikte aşırı glutamat salgısının travma, epilepsi, inmeye yol açtığı bununla birlikte nörodejeneratif hastalıklardan Alzheimer ve MS(Multiple skleroz) hastalığına yol açtığı rapor edilmiştir (Dirnagl ve ark, 1999; Kostic, 2013; Mehta, 2013; Meldrum, 2000; Obrenovitch

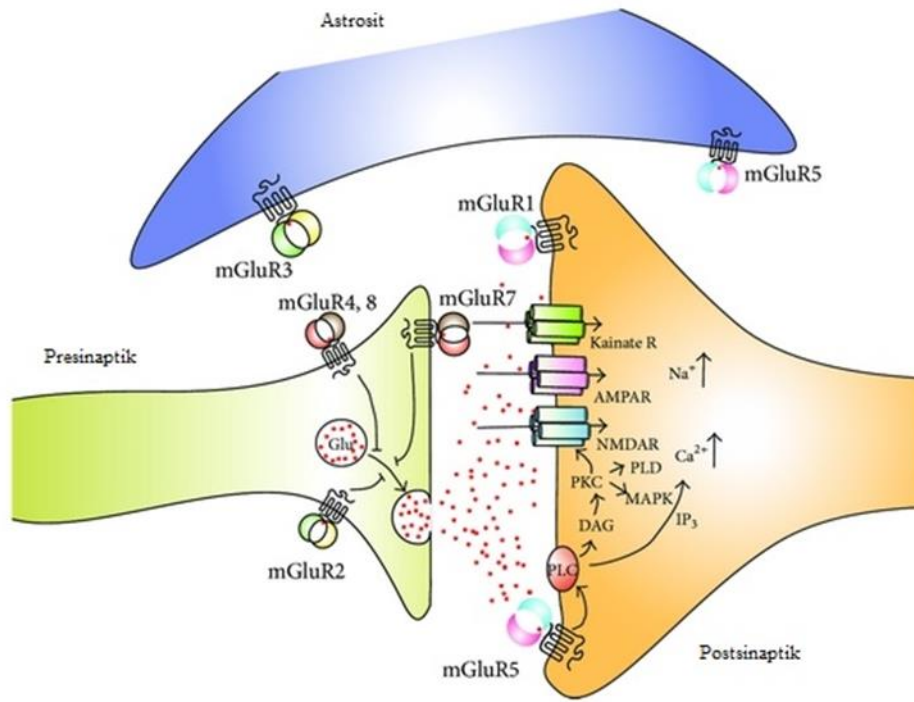
ve Urenjak, 1997; Wiilard ve ark, 2013). Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik olarak ikiye ayrılır (Kew ve ark, 2005; Sato ve ark, 1999).



Şekil 2.3. İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerinin yapısı

İyonotropik reseptörler uyarıldıklarında hücre membranından hücre içine iyon geçişini doğrudan etkileyen reseptörlerdir. Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} olan farklı geçirgenlikleri nedeniyle N-methyl-Daspartate (NMDA), AMPA ve Kainat olmak üzere 3'e ayrılırlar (Karakas ve ark, 2015; Niswender, 2010; Treyllanis, 2010). Sentetik agonistlere göre isimlendirilmişlerdir. NMDA glutamat reseptörleri APV (2-amino-5-phosphonovaleric asit) ile spesifik olarak

bloke olurlar. Ancak AMPA ve kainat reseptörleri de CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3 dione) ile bloke olurlar. Bu nedenlerle AMPA ve Kainat reseptörleri non-NMDA reseptörü olarak da isimlendirilirler (Kandel, 2013). Glutamatın iyonotropik reseptörlere olan etkisi eksitasyon olarak sonuçlanırken, metabotropik reseptörler üzerinden etkisi eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektedir.



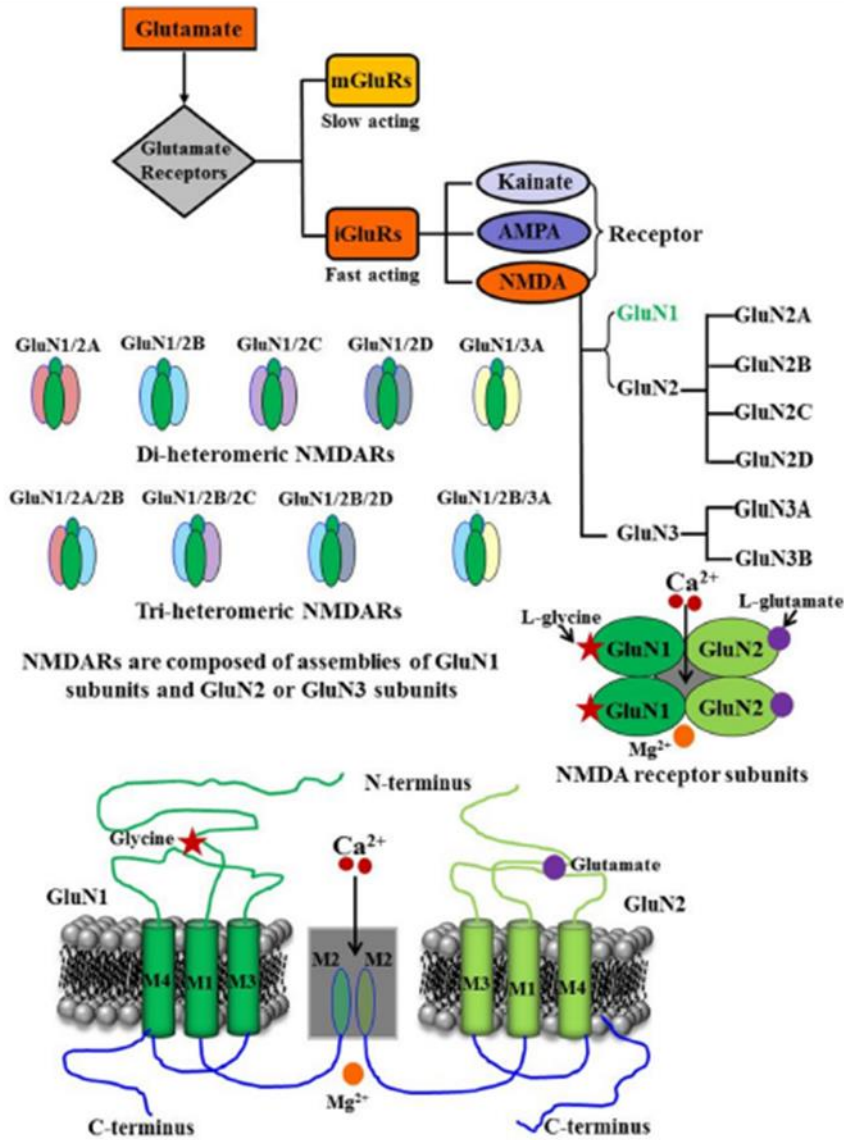
Şekil 2.4. İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptör alt tiplerinin şematik gösterimi, bunların hücre içi fonksiyonu ve sinaptik lokalizasyonu. AMPAR: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit reseptörü, DAG: diasilgliserol, iGluR: iyonotropik glutamat reseptörü, IP3: inositol (1,4,5) -trifosfat, MAPK: mitojenle aktive protein kinaz, MGluR: metabotropik glutamat reseptörü, NMDAR: N-metil-d-aspartat reseptörü, PKC: protein kinaz C, PLC: fosfolipaz C, PLD: fosfolipaz D (Novartis Pharma AG'nin izni ile çoğaltılmıştır, 2008 Novartis).

2.3.1.1. NMDA Reseptörleri

NMDA reseptörleri hipokampus (stratum radiatum), striatum, talamus ve serebral ve serebellar korteksde yüksek miktarda bulunur (Cotman ve Monaghan, 1989; Cotman ve ark., 1989). Dünya üzerinde birçok laboratuvarın gayretleri sonucu en fazla bilgi sahibi olunan reseptör kompleksidir. Monovalan katyonlara ek olarak, Ca^{++} iyonunun da hücre membranından geçişini sağlar. Diğer iyonotropik reseptörlere kıyasla Ca^{++} 'a karşı en az 5 kez daha fazla geçirgen olduğu gösterilmiştir (Schneggenburger ve ark, 1993). NMDA reseptörleri iyonotipik glutamat reseptörleri (iGlu), a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-isoxazopropionicacid (AMPA) ve Kainat ile birlikte sinir sisteminde uzun süreli hafıza, depresyon, öğrenme süreçlerinde hızlıca regülasyonu sağlarlar (Morris ve ark, 1986; Collingridge, 1987; Mondadori ve ark, 1989; Morris, 1989).

NMDA reseptör alt ünitelerini sınıflandırmak için özel bir nomenklatür geliştirilmiştir (Collingridge ve ark, 2009). Bu reseptörler hetero-tetramerik, 7 homolog genle ilişkili iki sınıf alt üniteye sahipler: GluN1, GluN2A-GluN2D, ve GluN3A-GluN3B GluN3B (Moriyoshi ve ark, 1991; Kutsuwada ve ark, 1992; Meguro ve ark, 1992; Monyer ve ark., 1992; Laube ve ark., 1998; Dingledine ve ark., 1999; Cull-Candy ve ark., 2001).

NMDA reseptörlerinin çoğunluğu iki GluN1, iki GluN2A-D alt ünitesi ve baska bir alt ünitenin bileşimiyle oluşur. Buna ek olarak GluN3 alt ünitesi (GluN3A ve GluN3B), GluN2 nin katılımı olmaksızın GluN1 ile birleşerek fonksiyonel reseptörler geliştirebilirler.



Şekil 2.5 NMDA reseptörünün şematik modeli ve alt ünite konfigürasyonu. NMDA reseptörleri, iyonotropik glutamat alıcılardan birini temsil eder; GluN1 alt birimleri ve GluN2 ve / veya GluN3 altbirliklerinden oluşur. Fonksiyonel NMDA reseptörleri iki GluN1 alt birimi ve iki GluN2A-D birimleri, GluN3 altbirimleri (GluN3A ve GluN3B), diğer GluN2 alt birimleri içermez, aktiveptör oluşturmak için GluN1 alt birimleri ile bir araya gelebilir. GluN1 altbirimleri -agonist glisin bağlanma alanını taşıırken, glutamat GluN2 alt birimine bağlanır. Mg^{2+} Ca^{2+} geçirgen gözenekleri bloke eder. NMDA Reseptör, ortak bir zar topolojisini, geniş bir ekstra hücreli amino terminal alanını, üç transmembran segmenti (M1, M3 ve M4), yeniden giren gözenek halkasını paylaşır(M2) ve bir hücre içi sitoplazmik C terminal etki alanındadır (Kumar A.,2015).

NMDA reseptör kanallarının üç özelliği vardır.

1- Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler (50 pS) ve Na^+ ve K^+ un yanısıra Ca^{2+} a da geçirgendirler.

2- Kanalin açılması bir ko-faktör olarak glisinin ekstraselüler olarak bulunmasına bağlıdır. Kanal sadece glisinin varlığında çalışır. Normal koşullarda ekstraselüler glisin yoğunluğu NMDA kanal reseptörünün çalışabileceği miktarlarda bulunmaktadır.

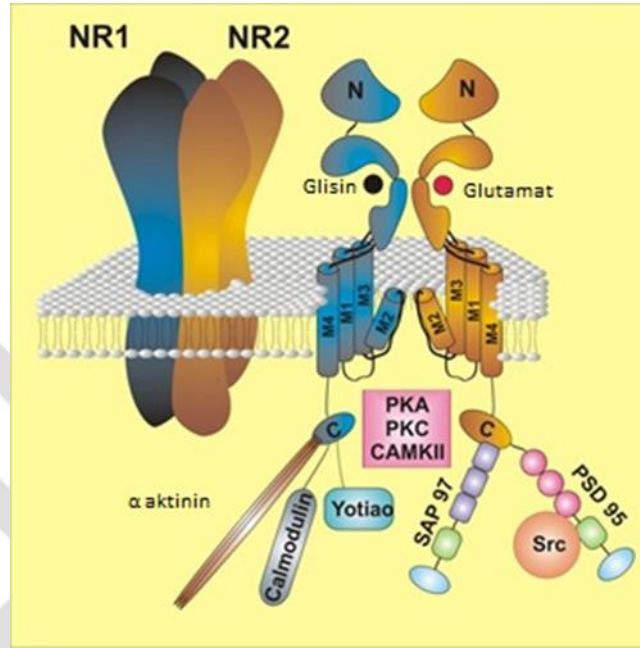
3- Açılması kimyasal haberciye olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu, diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir (Kandel ; 2013).

NMDA reseptörleri merkezi sinir sisteminde yaygın olarak dağılmışlardır. Merkezi sinir sisteminin (MSS) gelişimi, solunum ve hareket için ritim üretilmesi ve öğrenme, hafıza ve nöroplastisitenin altında yatan süreçler için kritik öneme sahiptirler. Sonuç olarak, anormal ekspresyon seviyeleri ve değişen NMDAR fonksiyonu, çeşitli nörolojik bozukluklar ve patolojik koşullarla ilişkilendirilmiştir. (Coyle ve ark, 1981). NMDA reseptörünün aşırı stimüle olduğu nörolojik hastalıkların (epilepsi, serebral iskemi) tedavisinde ayrı bir değeri olduğu düşünülmektedir (Johnson,1989; Orrenius ve ark, 1996). Bu nedenle, NMDAR'lar inme, hipoksi, iskemi, kafa travması, Huntington, Parkinson ve Alzheimer hastalığı, epilepsi, nöropatik ağrı, alkolizm, şizofreni ve duygudurum bozuklukları dahil olmak üzere birçok MSS bozukluğu için önemli terapötik hedeflerdir (Kemp ve ark, 2002; Brown ve ark, 2006).

2.3.1.1.1.NR2A ve NR2B

NMDA reseptörlerinin alt üniteleri beyin farklı bölümlerinde gelişim sürecinde farklı zamanlarda sentezlenirler (Watanabe ve ark, 1992; Sans ve ark,2000). Öyle ki yetişkin memelilerin beyinde ve kortikal, striatal, serebeller ve spinal kord gelişiminde katkıda bulunurlar. Yetişkin beyinlerde alt ünitelerin yerleşimi ve düzeni ekstra sinaptik reseptörlerin çoğunlukla NR2B kombinasyonu bulunması ve NR2A kombinasyonunu kapsayan sinaptik bağlantılar ile sağlanmış olabilir (Stocca ve Visini, 1998 Tovar ve Westbrook,1999; Kohr, 2006). Farklı alt ünite üyelerinin farklı heterodimer yapıları aynı nöronun farklı sinapslarında bulunabilirler (Kohr, 2006). Sözgelimi NR2 alt aile üyelerinden NR1/NR2A/NR2B hippocampus nöronlarının sinapslarında NR1/NR2A/NR2C serebeller granüllerin sinapslarında, NR1/NR2B/NR2D substantia nigranın dopaminerjik nöronlarında bulunurlar (Cull-Candy, 2001).

NR2A yenidoğan dönemde çok yüksek miktarda sentezlenir ve yetişkinlik evresine kadar sürekli devam eder. Diğer taraftan NR2B ise yenidoğan 7. günde baslar ve takip eden 2-3 haftada maksimum düzeye ulaşır (Monyer ve ark., 1994; Sheng ve ark, 1994).



Şekil 2.6 NMDA reseptörlerinin yapısı ve alt birimi kompozisyonu. NMDA reseptörleri dört alt üniteden oluşur (tetramerik düzenleme) - genellikle her biri NR1 ve NR2 veya NR3 alt ünitelerinin iki kopyasını içerir. Her bir altbirim, bir hücre dışı N-terminal alanı, dört zar bölgesi ve bir hücre içi C-terminal bölgesi içerir. N-terminal alanının en çıkıntılı kısmı, protonlar, poliaminler (spermin, spermidin), nörosteroidler, Zn^{2+} Cu^{2+} vs gibi farklı modülatör bileşikler için çeşitli bağlanma alanları oluşturur. Agonist (glutamat) ve koagonist (glisin) için bağlanma bölgeleri, sırasıyla NR2 ve NR1 alt birimlerinin N-terminal alanının merkezinde yer alır. Reseptör proteinin transmembran kısmı, üç transmembran alanından (M1, M3, M4) oluşur ve M2, hücre içi yanından zarın içine girip çıkmakta ve iyon kanal gözenekini oluşturan tekrar giren bir halkadır. Büyük C-terminal bölgesi, sinyalleme molekülleri ve protein kaçakçılığına dahil proteinler, fosforilasyon veya defosforilasyon gibi pek çok hücre içi proteinle etkileşime aracılık eder. NR1 ve NR2 alt birimlerinin bazılarıyla etkileşimleri gösterilmiştir.

2.4. İyon Kanalları

İyon kanalları membran protein kompleksleridir ve işlevleri iyonların biyolojik zarlar boyunca difüzyonunu kolaylaştırmaktır (Gastone 2001). İyon kanalları, membranda 3-5Å çapta delikler oluşturarak iyon hareketlerini hareketi (Akay ve ark, 2010). Plazma membranı 6 – 8 nm kalınlıkta, lipid ve proteinlerden oluşmuş. Yüzey çift katlı fosfolipid tabaka ve bunun içine gömülü membran proteinleri. Çift katlı lipid tabaka ise hidrofilik başve hidrofobik kuyruktan oluşmaktadır

Bir kanal, değişik kontrol mekanizmalarının etkisi altında üç farklı fonksiyonel durumda bulunabilir: Kapalı ve aktive edilebilir (dinlenim) Açık (aktif) Kapalı ve aktive edilemez (refrakter) (Bernard G. ve Shevell M., 2008). İyon akımı sayesinde membran potansiyeli kanallar boyunca iletilir ve hücrenin elektriksel uyarılabilirliği gerçekleşir. Bununla birlikte iyon kanalları ile hücresel olaylardan birisi de ozmotik dengenin yani hücresel pH'nın düzenlenir. İyon kanallarının üç önemli özelliklerinden dolayı sinir sisteminin normal hücresel fonksiyonları için çok önemlidirler 1- İyon geçişine çok hızlı cevap verirler, 2- Seçici olarak iyon geçişine izin verirler, 3-: voltaj-kapılı kanallar, ligand-kapılı kanallar mekanik-kapılı kanallar ile (basınç ve gerilme) özel elektriksel, kimyasal ve mekanik uyarılara cevap verirler. Bunlara ek olarak dinlenim (istirahat) kanalları; dinlenim sırasında iyon geçişine izin verirler. Ayrıca, kanallardan akan iyonlar Ca^{2+} gibi bir ikincil habercinin kaynağı olarak hücre içi sinyallemeye katılabilir (Cannon, 2007).

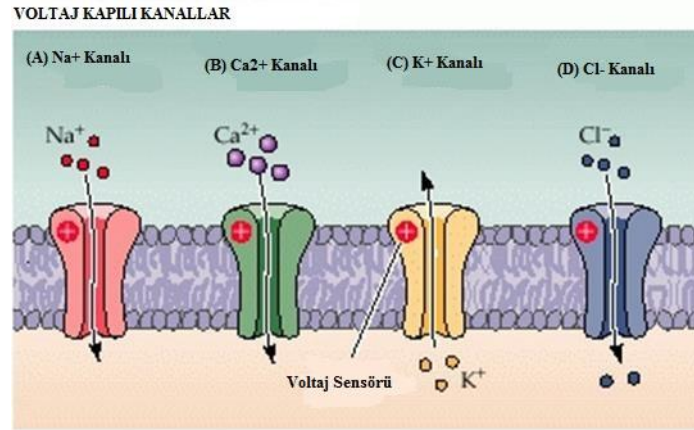
İyon kanalları her biri farklı bir gen tarafından kodlanan farklı alt birimlerden oluşur. Ligand (nörotransmitter) kapılı ve voltaj kapılı olmak üzere iki majör alt sınıfı vardır (Bernard ve ark, 2008).

2.4.1. Voltaj Kapılı İyon Kanalları

Voltaj-kapılı iyon kanalları büyük, geniş bir gen ailesinin üyeleridir. Bu ailedeki birçok iyon kanalı membran depolarizasyonuna yanıt olarak açılır (Hernanades 2009). Bu sınıftaki iyon kanalları Voltaj kapılı Na^+ , K^+ Ca^{2+} ve Cl kanallarıdır akson membranındaki iyonik akım, membranın sodyum ve potasyum iyonlarına geçirgenliğinin değişmesine dayalıdır (Aidley ve ark, 1996). Voltaj kapılı iyon kanalları genelde, iyonların elektrokimyasal gradyanlarının altına gidebileceği bir merkezi gözenek olacak şekilde düzenlenmiş birkaç alt birimi kapsar. Benzer şekilde boyutlandırılmış ve yüklü iyonlar bazen kendileri boyunca ilerleyebilir, ancak

kanallar iyonla özgü olma eğilimindedir. Voltaj kapılı iyon kanallarının işlevselliği, üç temel ayrı birimne atfedilir: gerilim sensörü, gözenek veya iletken yol ve kapak (Bezanilla, 2005). Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} kanalları, merkezi gözenek etrafında düzenlenmiş dört transmembran α -altbiriminden oluşur (Lodish ve ark, 2000). S1-S6 olarak adlandırılan membrana yayılmış bölümler, özel işlevleri olan alfa heliks formlarını alırlar. Beşinci ve altıncı transmembran segmentler (S5 ve S6) ve gözenek halkası, kanalın geçidi ve gözenekini içeren iyon iletiminin başlıca rolünü üstlenirken, S1-S4 voltaj algılama bölgesi olarak görev yapmaktadır (Bezanilla, 2005). Dört altbirim aynı olabilir veya birbirinden farklı olabilir. Dört merkezi α -altbirimine ilaveten, hücre zarının iç yüzeyinde bulunan ve zarı geçmeyen ve α -altbirimleri ile birlikte birleştirilen, oksidoredüktaz aktivitesi olan düzenleyici β -altbirimleri de bulunmaktadır. (Gulbis ve ark, 1999). Özellikle S4 alt aile üyeleri farklı voltaj sensörleri içerirler (Bernard ve ark, 2008).

Voltaj kapılı aile üyelerinin birçok rolleri vardır. Potasyum kanalları aksiyon potansiyeli sonrasında dinlenme potansiyeli ve repolarizasyonu sağlarlar. Sodyum kanalları aksiyon potansiyelinde sorumludurlar. Kalsiyum kanalları ise kalp ve düz kaslarda oluşan aksiyon potansiyelinden sorumludurlar. Ayrıca kalsiyum kanalları; nörotransmitter salınımında, kaslar arasında iletişimde ve hücre içinde ikinci mesajcı olarak görev yaparlar (Bernard ve ark, 2008).



Şekil 2.7. Voltaj kapılı iyon kanallarının türleri. Voltaj kapılı kanalların örnekleri, Na^+ (A), Ca^{2+} (B), K^+ (C) ve Cl^- (D) 'ye karşı seçici olarak geçirgen olanları içerir.

2.4.1.1. Potasyum Kanalları

Voltaj kapılı potasyum kanallarını membranın depolarizasyonu aktive eder. Bu kanallar açıldıkları takdirde konsantrasyon gradyanı boyunca potasyum iyonlarını elektrik alana karşı iletir. Bu dışa yönelen akım, membranın repolarizasyonuna neden olur. Potasyum kanalı birbirine eş olmayan alt birimlerden oluşan bir heteromultimerdir. Heteromultimer oluşturma yeteneği, potasyum kanallarının işlev çeşitliliğine olanak tanır. Omurgalılarda sekizi tipik voltaja bağımlı kanal yapı özellikleri gösterecek şekilde, yani sensör, toksin bağlama bölgesi ve tek bir iyon ileten delik içerecek şekilde, 13 alt ailesi tanımlanmıştır. Değişkenlikler gösteren yapısal özellikleri sebebiyle kanallar, delik bölgelerinin sayısına ve transmembran segmentlere karşılık gelen helikal yapıların sayısına göre sınıflandırılır. Bu transmembran segmentler voltaj kapılı kanallarda T veya S, ligand-kapılılarda M olarak adlandırılır (Aidley ve ark, 1996; Lehmann ve ark, 1999).

Potasyum kanal alt birimleri tetramer oluşturur ve bunun oluşumu T1 domeni denen N-ucu ile S1 segmenti arasında sitoplazmik bölgede bir polipeptide bağımlıdır. Bu çeşitliliğin sebebi, farklı alt aile özelliklerinin aktifleşme ve inaktifleşme hızındaki değişiklikleri etkilemesidir.

Potasyum kanal ailesinin 14 alt üyesi bulunmaktadır. İyon kanalları sinir hücrelerinde birçok negatif ve pozitif etkilere sebep olmaktadırlar. (Krick ve ark 2001; Xia ve ark. 2002) . Özellikle Potasyum kanal ailesi hücre içerisinde konsantrasyona değişime bağlı olarak caspasz ailesini aktive ederler (Thompson ve ark. 2001) ve böylelikle apoptoz süreci baslar (Villalba ve ark. 1997).

2.4.1.1.1. KV1.1

Kv1.1 potasyum alt aile elemanı hippokampal nöronların akson terminallerinde lokalizedir ve hem aksiyon potansiyelinin oluşturarak nörotransmittlerlerin serbest kalımını sağlar. (Brew ve ark., 2003; Geiger ve Jonas, 2000; Hsiao ve ark, 2009; Shuve ark, 2007; Wenzel ve ark., 2007). Bu alt ailenin fonksiyon kaybı epilepsi ile ilişkilendirilir. Son dönemlerdeki bir çok çalışma Kv1.1 ile *LGI1* geninin lateral temporal lob epilepsisine neden olduğunu göstermiştir (Zhou ve ark , 2009).

2.4.1.1.2 Lösinden Zengin Glioma İnaktive Proteini-1 (LGI-1 Leucine-rich Glioma Inactivated 1)

Lösinden zengin glioma inaktive proteini-1 (LGI-1 Leucine –rich Glioma Inactivated1) yetişkin merkezi sinir sisteminde sentezlenir (Head ve ark, 2007; Ribeiro ve ark, 2008) çoğunlukla temporal korteks ve hippocampusda yer alır. LGI-1 presinaptik uçta ADAM23 (A Disintegrin And Metalloprotease domain 23) ile postsinaptik uçta ise ADAM22 (A Disintegrin And Metalloprotease domain22) ile bağlantı halindedir. Son dönemlerdeki çalışmalar göstermiştir ki; LGI1 merkezi sinir sistemi hücrelerinin stoplazmasında, dendritlerinde ve aksonlarında yer alır hücre nükleusunda yer almaz (Malatesta ve ark., 2009). LGI-1’de meydana gelen anormallik ile temporal lob epilepsisine yol açtığı belirtilmiştir (Kalachikov ve ark, 2002; Morante-Redolat ve ark, 2002). Öyle ki LGI1 negatif farelerin postnatal üçüncü haftada ölümcül epilepsiden öldüğü ve sinaptik iletimde LGI1’in önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Fukata ve ark, 2010).

2.5. Otoimmün Ensefalitler

Otoimmün hastalıklar (OİH), farklı dokulara karşı humoral immün cevap aracılığıyla gelişen kronik heterojen bir hastalık grubudur. OİH’da başlıca özelliklerden biri, sistemik dolaşımda ya da farklı bazı dokularda otoantikorların bulunmasıdır. Etiyolojide çevresel faktörlerin de çok etkin olduğu, kişiye özgü antijenlerde gen regülasyon bozukluğu nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir (Gibson ve ark, 2010). Son dönem yapılan çalışmalarda, otoimmün hastalıklarda görülebilen hareket bozukluklarının immün mekanizmalar (T hücre ve diğer immün mekanizmalar) nedeni ile ortaya çıktığı anlaşılmıştır (Shah ve ark, 2004). Otoimmün ensefalitler; başlangıç dönemlerde bellek bozukluğu, kişi algısının bozulması ve sık nöbetlerle karakterize paraneoplastik ya da immünolojik etiyolojili bir grup sendromdur (Irani ve ark, 2011). Otoimmün ensefalitler enfeksiyon nedeniyle oluşan ensefalitler ile klinik muayene , görüntüleme, laboratuvar testlerinin benzer olması nedeniyle çok sık karıştırılır. Hastalarda haftalar ve aylar sonra ortaya çıkan hafıza ve bilişsel sorunlar baş gösterir. Hastalığın başlangıç seyrinde nöronal antikorlar ile çalışılması doğru teşhis için çok önemlidir. Sistemik otoimmün hastalıklar merkezi sinir sisteminde otoimmün hastalıklar ve paraneoplastik sendromlar ile ilişkilendirilmektedir (Prüss ve ark,2010; Lancaster ve Dalmau, 2012). Bu hastalıkların patolojileri birbirlerine benzemekle beraber bir takım antikorların merkezi sinir sistemi proteinlerine yönelik olması nedeniyle kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu antikorlar membran reseptörlerine ve merkezi sinir sistemi hücrelerinin

yüzeyinde yer alan iyon kanalı proteinlere karşı direkt hareket etmektedirler (Bien ve ark, 2012).

Otoimmün ensefalitlerin farklı patofizyolojiye sahip alt tipleri vardır. Hastalığın patofizyolojisinin iyi anlaşılması ile uygulanacak tedavi şekli de değişkenlik gösterir. Sözgelimi Anti Hu paraneoplastik hastalık olan ve intraselüler antijen ve antikor ile ilişkilidir. Bu hastalık genellikle kanser ile ilişkilendirilir ve nöronların T hücrelerine karşı cevabını içerir. Nöronların bu mekanizma ile kısa sürede ölmeleri immün cevabın kontrol edilmesini zorlaştırır.

Otoimmün ensefalitlere bir başka örnek ise hücre yüzeyinde farklı epitoplari ve diğer prerinler ile bağlantısı olan olan iyon kanallarıdır. Bu gruba en güzel örnek NMDA reseptörleridir. Antikorlar NMDA reseptör ensefalatinde patojeniktir, sinaptik bağlantılarda geri dönüşebilir etkiye neden olurlar ve bu etki kısmen nöron ölümüne neden olur. Bu hastalık grubun da ayrıca tümör ile ilişkilendirilmesi çok önemlidir. Sözgelimi; NMDA reseptör ensefaliti hastalar hayatlarını hastalığın stabil kalması halinde rahat devam ettirebiliyorlar.

Özellikle voltaj kapılı potasyum kanalları ile ilişkilendirilen NMDA reseptörleri ve 2 Lsinden Zengin Glioma İnaktive Proteini-1 rapor edilmiştir (Titulaer ve ark, 2013).

2.5.1 Otoimmün Ensefalit Sendromları

Otoimmün ensefalit, tanımlanması zor olan birkaç farklı sendromlar ile meydana gelebilir. Klasik görüş Subakut ensefalit oluşur (bir kaç gün hafta) bilinç düzeyini progresif azalma dalgalanmalar görülür. Viral ensefalitlerin dışında yer alan tüm ensefalit tipleri tablo da belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Otoimmün ensefalit sendromları ve klinik bulguları

Klinik bulgu	İlişkili otoantikör bozuklukları
Psikoz	NMDAR, AMPAR, GABA-B-R
distoni, chorea	NMDAR, Sydenham chorea, D2R
hiperekpleksia	GlyR
Status epileptikus	Çoğunlukla GABA-B-R ve GABA-A-R ama NMDAR daha yaygın
Yeni başlangıçlı tip 1 diyabet	GAD65
Fasciobrachial dystonic seizures	lösinden zengin glioma inaktive proteini-1 (LGI-1)
Neuromyotonia, kas spazmları, Fasikülasyonlar	Caspr2
Stiff-person sendromu	GAD65, GlyR, Amphiphysin (GAD65sert ekstremitelerde ve GlyR'de PERM'de ve yaygın amfizisin, meme kanseri olan kadınlarda görülür)
MSS	DPPX
kranial nöropatiler	Ma2, Hu, Miller-Fisher, Bickerstaff (Aynı zamanda Sarkoidoz, Lyme, TB gibi enfeksiyonlar)
Serebellit	GAD65, PCA-1 (Yo), ANNA-1 (Hu), DNER (Tr), mGluR1, VGCC

Otoimmün ensefalitlerde psikiyatrik bulgular hastalığın erken evresinde görülür. Bahsedilen psikolojik bulgular psikoz, saldırganlık, uygunsuz cinsel davranışlar, panik ataklar kompulsif, korku olarak görülür. Bu semptomlar hızlı ve aniden baş gösterir. Anti NMDA, anti AMPA ve anti GABA ensefalitlerinde de bu bulgular görülür (Dalmau ve ark, 2011; Höftberger ve ark, 2013).

Hareket bozuklukları birçok ensefalit türünde görülebilir. Otoimmün ensefalit olguların çoğunda NMDA reseptörlerine karşı antikorların geliştiği gözlemlenmiştir (Dalmau ve ark, 2007). NMDA reseptörleri nöronal eksitabilitiyi düzenlemekte önemli bir role sahiptirler. Bununla birlikte anti NMDA reseptör ensefalitlerinde çocuklarda erken dönemde hareket bozuklukları yetişkinlerde ise psikolojik sorunlar baş gösterir (Armangue ve ark, 2013). Otoimmün nedenli Katı kişi sendromu (KİS veya Stiff Person Sendromu) ilk olarak Moersch ve Woltman tarafından 1956'da tanımlanan bir hastalıktır. Glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimine karşı gelişen antikorların sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Solimena ve ark, 1994). GAD aynı zamanda pankreas beta hücrelerinde de bulunmaktadır. Bununla birlikte tip 1 diyabetli hastalarda düşük seviyede Anti GAD

antikorları saptanmıştır ve KİS’lu hastaların %30’unda diyabet hastalığı da bulunmaktadır (Daw ve ark, 1996). Merkezi sinir sistemi nedenli kas katılığı olarak da tanımlanır. Genellikle idyopatik gelişir bazen de Hashimoto tiroiditi, Graves hastalığı, Myastenia Graves, Vitiligo, Pernisiyoz anemi gibi otoimmün hastalıklarla ilişkili olarak ortaya çıkabilir (Özbek, 2010).

Glisin ligand bağımlı iyon kanalı ailesi üyesi olup heteropentamerik reseptörleri ve iki alt ünitelerden oluşan proteinlerdir (Carvajal-González ve ark, 2014). Glisin reseptörleri beyin sapı, medulla spinalis ve retina’da bulunurlar (Baer ve ark, 2009; Lynch ve ark, 2004). Reseptör aktivasyonu, membran potansiyelinin hiperpolarizasyonu ve eksitasyonda azalma değiştirir. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda glisin reseptör alfa 1 antikollarının erişkin ve çocuk hastalarda omurilik ve beyin sapı hastalıkları, progresif ensefalomiyelit rijidite ve miyoklonus (PERM) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mas ve ark, 2011; Damásio ve ark, 2013). Bu hastalarda epileptik nöbetler görülebildiği gibi, “stiff-person” sendromu, LE (lupus eritematosus) ve optik nöropati de bildirilmiştir (Mas ve ark, 2011; McKeon ve ark, 2013).

Serebellar yıkım, zaman geçtikçe ilerleyen baş dönmesi, sersemlik ve hastada denge problemleri ile ortaya çıkar. Serebellar dejenerasyon ile ilişkili kanserler akciğer, meme, over ve lenfoma ve ilişkili antikollar anti-Yo, Tr, Hu, Ma2 ve Ri’dir. Anti-Yo ve anti-Tr pozitif hastalarda merkezi sinir sisteminin diğer bölgeleri pek etkilenmez. Anti-Hu pozitif hastalarda Voltaja Bağlı Kalsiyum Kanal antikolları görülebilmektedir Serebellar dejenerasyon tedaviye en dirençli paraneoplastik sendromlardandır ama hızlı ve etkin tedavi semptomların ilerlemesini ve diğer MSS (merkezi sinir sistemi) bölgelerinin tutulmasını önler (Dalmau ve ark, 2008; Bataller ve ark, 2004; Petersan ve ark, 1992).

Isaacs’ sendromu (edinsel nöromyotoni) periferik sinirler kaynaklı motor ünite de görülen kas seğirmesi, kramp, miyokimi, pseudomyotoni ve hafif güçsüzlükle karakterize nadir görülen bir hastalıktır (Sukajintanakarn ve ark, 2006). Hastalığın tanısı istirahat ve uykuda devam eden miyokimi ve bu miyokimilerin elektromyografide (EMG) gösterilmesi ile konulur. Vakaların bir kısmında konfüzyon, halüsinasyon ve uykusuzluk gibi santral sinir sistemi bulguları da eşlik edebilir. (Gürgöze ve ark, 2006). Genellikle genç erişkinlerde ortaya çıksa da herhangi bir yaşta da görülebilir. Hastalığın oluşum mekanizmasının Voltaj kapılı potasyum kanallarına (VGKCs) karşı oluşan otoantikollar ve buna bağlı olarak periferik sinirlerde oluşan hasar nedeniyle aşırı uyarılabilirlik geliştiği kabul edilmektedir (Roland Dominic ve ark, 2006). Hastaların çoğu bazı immunolojik hastalıklara bağlı ya da kimyasal intoksikasyonlara bağlı ortaya çıktığı da bildirilmiştir (Sukajintanakarn ve ark, 2006). İsaacs sendromunu paraneoplastik nörolojik sendromlar içinde değerlendirmek te

mümkündür. Dolayısıyla bu vakaların etyolojisinde timoma (Sukajintanakarnve ark, 2006) ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi hastalıkları bulmak mümkündür.

2.5.1.1. Diğer Otoimmün Hastalıklar

Akut dissemine ensefalomyelit (ADEM) yaygın olmayan, iltihaplı demiyelinizan bir hastalıktır (Stonehouse ve ark, 2003). Beyin ve omurilikte yaygın lezyonlar görülmektedir. Genellikle çocuklar ve genç erişkinlerde ortaya çıkar (Lancaster, 2005). MS ile ayırıcı tanı yapmak gerekebilir ve BOS ile ensefalit tanısı konulabilir.

Sistemik lupus eritematozus (SLE) nedeni tam bilinmeyen, otoimmün ve multisistemik bir hastalıktır (Cervera ve ark, 1993). Lupus, dolasım ve boşaltım sistemlerinde yer alan organlar dahil vücudun birçok bölgesinde tutulum görülebilir. Sinir sisteminde nöropati, vaskülit , miyelit , venöz sinüs trombozu neden olur (Sanna ve ark, 2000). Nöropsikiyatrik lupus nöbetleri, psikoz veya nörovasküler ile tezahür eder. Lupus nedeniyle meydana gelen ölümlerin büyük cogunlugunda hastalarda hem otoimmün hem de enfeksiyon nedeniyle ensefalit görülmektedir (Chiewthanaku ve ark, 2012).

Bickerstaff ensefaliti (BE); bir Guillain-Barrè sendromu (GBS) varyantı olan Miller-Fisher sendromu (MFS)'ndan bilinç değişiklikleri ve kranial nöropati bulguları ile ayrılmaktadır. Serum anti-GQ1b düzeylerinin sıklıkla yüksek bulunması, Miller-Fisher sendromu (MFS) ile ortak bir immünpatogenezi düşündürmektedir (Shahrizaila ve Yuki, 2013).

2.5.1.2.Enfeksiyon Sonucu Meydana Gelen Ensefalitler

Ensefalitler beyinin iltihaplanması olarak tanımlanır ve ateş başağrısı sık görülmektedir. Akut ensefalit vakalarının başlıca sorumlusu genellikle viruslar görülmektedir. Beyin dokusu ensefalit nedeniyle meydana gelen hasarlar sonrasında yavaş ve iz bırakarak iyileşir. Hastanın yaşı, hastalığa karşı vermiş olduğu immun yanıt, etken patojenin görülme sıklığı ve miktarı hastalığın şiddetini önemli oranda belirler. Bazı enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar ve tümörler benzeri klinik görünümlere neden olabilirler.

2.5.1.2.1 Viral Ensefalitler

Birçok ensefalitin sebebi viral enfeksiyonlardır. En fazla görülen virüsler HSV, VZV, enterovirüs ve Batı Nil virüsü (Venkatesan, 2015). Viral ensefalitler patojenizlerine göre iki gruba ayrılırlar:

1-Beyin parankim dokusunun virüsler tarafından enfekte edilmesi ile ortaya çıkan klinik tablodur.

2- Sistemik enfeksiyon sonucu meydana gelen viral ensefalit grubudur.

Virüsler merkezi sinir sisteminin birçok bölgesinde lokalize enfeksiyon yapabilirler. Togavirüsler, Arboviruslardır ve HSV tip 1,2, en sık rastlanan viral ensefalit etkenleridirler. Çocukluk hastalıklarından kızamık, suçiçeği, kızamıkçık enfeksiyonlarını takiben ensefalit gelişebilir.

Majör DNA viral ensefalitlerine en iyi örnek Herpes ve Adenovirüsler verilebilmektedir. Bununla birlikte RNA ensefalit virüsleri Togaviridae Alfa virus Arbovirus, Flaviviridae Flavivirus (arbovirus), Bunyavirus (arbovirus) Reoviridae Orbivirus (arbovirus), Picornaviridae (enterovirus), Paramikso viruslar (exantematöz viruslar), Orthomiksovirus, Rhabdoviridae, Retroviridae, Arenaviridae virüsleri de en iyi örneklerdir.

2.5.1.2.2.Bakteriyel Ensefalitler

Bakteriyel enfeksiyon bazı ensefalitler sonrası ortaya çıkarlar. İmmün yanıtlara bağlı olarak ensefalitler birkaç hafta sonra da ortaya çıkabilirler. Listeria, streptococcus alt tipleri, Lyme hastalığı ve tüberküloz bakteriyel kaynaklı ensefalitlere neden olurlar.

2.5.1.2.2.1 Mikoplazma Ensefalit

Mikoplazma pneumonia enfeksiyonlarının seyri esnasında % 5 -%10 arasında nörolojik tutulum izlenir. Mikoplazma pneumonia enfeksiyonlarını takiben birkaç hafta içerisinde nörolojik komplikasyonlar ortaya çıkar.

2.5.1.2.2.2. Listeria Meningoensefaliti

Listeria monocytogenes gram pozitif çomaktır. Yenidogan ve immün sistemi yetersiz kişilerde, yaşlılarda menenjit ve ensefalite neden olurlar.

2.5.1.2.2.3. Lejyoner Hastalığı

Legionella pneumonia enfeksiyonlarının seyri sırasında nörolojik komplikasyonlar sıklıkla hastalığa eşlik eder.

2.5.1.2.2.4. Kedi Tırmığı Ensefaliti

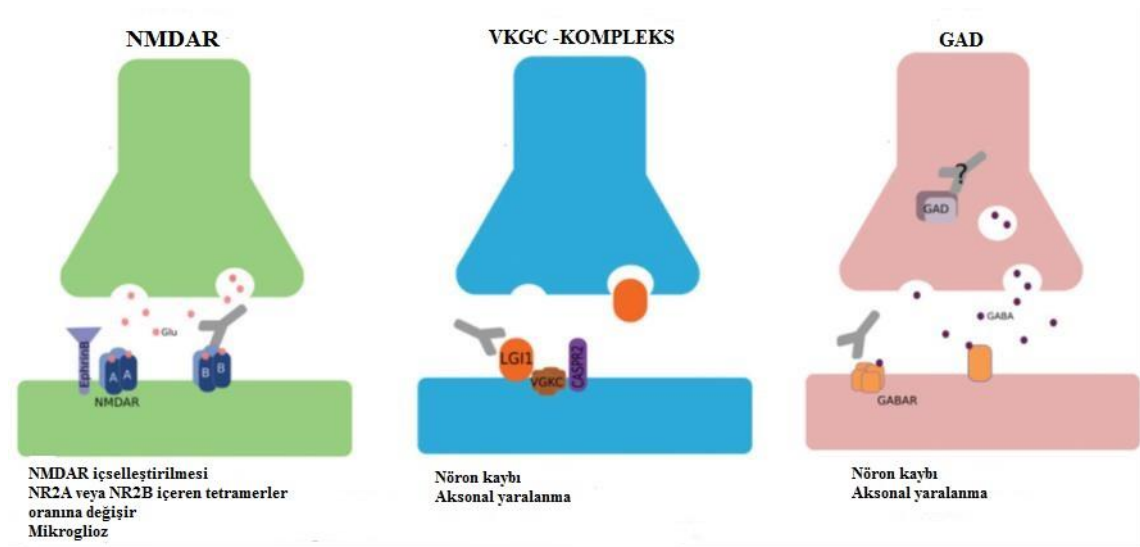
Bartonella henselae bakterisinin kedileri enfekte etmesiyle döngü başlar. Enfekte kedilerin tırmalaması ile insanlara bulaşır. Tırmalamayı takiben bölgesel lenfadenopati gelişir, bunu ateş, ensefalopati ve epileptik nöbetler izler.

2.5.1.2.2.5. Brusella Meningoensefaliti

Brucella abortus, *melitensis* veya *suis* hastalığa sebep olan bakterilerdir. Enfekte olan hayvan ile temas veya enfekte süt kullanımı ile insanlara bulaşır.

2.5.1.3 Nöronal Yüzey Otoantikorları ve İlişkili Nörolojik Sendromlar

İyon kanalı ya da reseptör proteinleri, otoantikorlar gibi vucutta hastalık oluşturmaya adaydırlar (Cojocar, 2010). Voltaj bağımlı potasyum kanal (VGKC) kompleksi N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR), alfa-amino-3- hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit reseptörü (AMPA), gama-aminobutirik asit reseptörü (GABAR) ve glisin reseptörüne (GlyR) karşı gelişen nöronal yüzey antikorları epilepsi ile ilişkili başlıca otoantikorlardır. Ayrıca hücre içi (Cojocar, 2010) antijenlere karşı gelişen antikorlar da glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi antikorları ve onkonöral antikorlar] epilepsi hastalarında saptanabilen diğer otoantikorlardır (Çoban ve Tüzün, 2016).



Şekil 2.8 Otoimmün ensefalitlere yol açan antikörlerin üç tipi listelenmiştir. N-methyl D-aspartate reseptör (NMDAR)-Abs (solda): Ab-mediated NMDAR içselleştirilmesi ve sinaps NR2A veya NR2B içeren tetramerler oranına değişir. Mikrogliaz ve lenfositik infiltrasyon patogenezinde rol oynamaktadır. Voltaj kapılı potasyum kanal (VGKC)-kompleksi Abs (ortada): Birkaç antijenler nöron kaybı, aksonal yaralanma ve kompleman aktivasyonunun neden sıkı VGKC kompleksi ile ilişkili olan ve iki ile hedeflenebilir. En önemli hedef leucine-rich, glioma inactivated 1 (LGI1). Nöron kaybı ve aksonal yaralanma Hem glutamik asit dekarboksilaz (GAD) AIE (sağda) ile hastaların hippocampusünde tespit edilmiştir. Patogenezi daha az açık olmakla birlikte bazı durumlarda, antikörler, alternatif hücre yüzey proteini hedeflemektedir.

Tablo 2.5 Epilepsi ile ilişkili anti-nöronal antikörler ve klinik sendromlar

Antijen	Demografik özellikler	Klinik sendromlar	Tümör ilişkisi	Epilepsi ile ilişkisi
NMDAR	Kadın > erkek; Ortalama yaş:20	Limbik ensefalit ,hareket bozukluğu,otonomik bozukluklar	Teratom (%20-50)	%80 olguda epileptik nöbet,izole nöbet sık,'extremeldelta brush' bulgusu, temporal nöbet
LGI1	Erkek >kadın; ortalama yaş:60	Limbik ensefalit	Timoma (<%10)	Fasiobrakial distonik nöbet,izole nöbet nadir,
CASPR2	Erkek >kadın; ortalama yaş:60	Limbik ensefalit , Morvan sendromu ,nöromiyotini	Timoma, KHAK (%30-40)	Temporal nöbetler sık,izole nöbet sık,
AMPAR	Kadın > erkek; Ortalama yaş:60	Limbik ensefalit	KHAK,Timoma, meme kanseri(%70)	Sık epilepsi atakları, izole nöbet yok, temporal nöbetler sık
GABAR	Erkek=kadın ortalama yaş:60	Limbik ensefalit, serebellar dejenerasyon ,opsoklonus myklonus	KHAK(%50)	İzole nöbet mümkün
Glyr	Erkek >kadın; ortalama yaş:45	Progresif ensefalomiyelit, rijidite, myoklonus (PERM)	Timoma, Hodgkin	İzole nöbet sık, MTS'de
GAD	Erkek = kadın; Ortalama yaş: 40	Limbik ensefalit, stiff-person sendromu,	Çok nadir	izole nöbet mümkün Temporal nöbet sık,
Onkonöral antijenler (Hu, CV2, Ri, Ma2, amfifizin)	Erkek = kadın; Ortalama yaş: 60	Limbik ensefalit ensefalomiyelit, beyinsapı ensefaliti, serebellar dejenerasyon, opsoklonus- miyoklonus	jinekolojik tümörler,KHAK, meme kanseri (>%95), testis kanseri,	İzole nöbet çok seyrek

Tablo 2.5 AMPAR: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit reseptörü; CASPR2: Contactin-associated protein-like 2; GABAR: γ -aminobütirik asit reseptörü; GlyR: Glisin reseptörü; LGI1: leucine-rich glioma inactivated 1; NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptörü; GAD: Glutamik asit dekarboksilaz; KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri; MTS: Mezial temporal skleroz.

2.5.1.3.1. Anti-NMDAR Antikoru

NMDAR Ligand bağımlı katyon kanalı ve iyonotropik glutamat reseptörlerinin alt tipidir. NMDAR Glisin bağlayan NR1 ve glutamat bağlayan NR2 alt ünitelerinden oluşan heteromer yapısında bir reseptördür (Hunt ve Castillo, 2012; Waxman ve Lynch, 2015). NMDAR amigdala, hipotalamus, prefrontal korteks , hipokampus nöronlarında olmak üzere yüksek yoğunlukta eksprese edilmektedir ve sinaptik geçiş nöronal plastisitede önemli rol oynar (Çoban ve Tüzün 2016). Anti NMDAR antikoru 2007 yılında over kanser ile ilişkili ensefaliti olan genç kadın hastalarda tanımlanmıştır (Dalmau ve ark , 2017). Anti-NMDAR antikoru ile ilişkili LE sıklıkla 40 yaşın altındaki kadınlarda görülmekle birlikte; erkeklerde, çocuklarda ve yaşlılarda da sıklıkla herhangi bir kanser tipi olmadan da görülebilir (Irani ve Vincent, 2011; Titulaer ve ark, 2013).

2.5.1.3.1.1 Anti NMDA Reseptör Ensefalit

Anti NMDA reseptörler ensefalitleri en fazla görülen ve ilk tanımlanan ensefalit grubudur (Dalmau ve ark, 2007). Anti NMDAR ensefalitleri ile ilgili olarak birçok laboratuvar da çalışmalar yapılmaktadır. Bu kadar çok çalışma yapılmasının nedeni sebebi saptanamayan ensefalitlerin yarısının anti-NMDAR ensefaliti olabileceğinin gösterilmiş olmasındandır (Gable ve ark, 2012). HSV, varisella zoster ve Batı Nil virüsleri sonra görülen ensefalitler ile karşılaştırıldığında sıklığın dört kat fazla olduğu saptanmıştır (Gable ve ark, 2009). N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü, sırasıyla glisin ve glutamata bağlanan NR1 ve NR2 adlı iki alt birime sahiptir (Dalmau ve ark, 2008) Her iki nörotransmitter de eksitator özellik taşır. Bu reseptörler beyin dışında da birçok organda yaygın şekilde bulunur. Bu organların otoimmün etkilenmelerinde reseptörlerin tetiklenmesine bağlı ensefalite yol açabileceği düşünülmektedir (Irani ve ark, 2010). HSV sonrası %30 hastada anti-NMDAR ensefaliti geliştiğini bildiren literatür kaynakları da bulunmaktadır (Prüss ve ark, 2012). Reseptörlerin aşırı aktivasyonunda epilepsi, demans, inme benzeri semptomlar gözlenirken, bu reseptörlerin az çalışmasında ise şizofrenide ortaya çıkan semptomlar görülür (Dalmau ve ark, 2008; Titulaer ve ark, 2013).

NMDA reseptörüne karşı oluşan antikor ile meydana gelen ensefalit günümüzde iyi tanımlanmış olmasına rağmen, çocuklarda görülme olasılığı çok yüksektir. Anti-NMDAR ensefalitlerinin %35-40'ını çocuk hastalar oluşturmaktadır (Florance ve ark, 2009). Sebebi bilinmeyen ensefalitlerde %50'ye varan sıklıkta bildirilmektedir (Titulaer ve ark, 2013). Çocuk yaş grubunda kız cinsiyet baskınlığı mevcut olup, yaş ilerledikçe tümör görülme olasılığı %50'lere kadar artmaktadır (Tituluer ve ark, 2013). Erkeklerde ise tümör birlikteliği %5 civarında olup, testis teratomu şeklindedir (Tituluer ve ark, 2013 ;Irani ve ark, 2010). Özellikle 21 yaşında bayanlarda çok görülmektedir (Linnoila ve ark, 2014). Hastalık ilk olarak viral olarak seyretmeye baslar, psikiyatrik sorunlar ve beraberinde uykusuzluk ile ilerler.

Klinik bulgular nöropsikiyatrik semptomlar, hareket bozuklukları, nöbetler, otonomik disfonksiyon, insomni, konuşma bozuklukları gibi çok değişkendir. Tedaviye erken başlanılmasına olumlu yanıt ile hastalığın tanınması daha da önem kazanmaktadır (Dalmau ve ark, 2008; Irani ve ark, 2010). Hastaların $\frac{3}{4}$ 'ü erken dönemde tanınmamakta ve psikiyatri bölümlerine yönlendirilmektedir.

Laboratuvar bulgularında BOS (beyin omurilik sıvısı) ya da serumda anti-NMDAR antikorunun gösterilmesi hastalara tanı konulmasını kolaylaştırmaktadır. BOS'da hastaların çoğunda protein artışı da görülebilir (Florance ve ark,2009; Lizuka ve Sakai, 2008). Çocuklarda tanı sırasında kraniyal MRG olguların %55'inde anormal olmasına karşın, özellikle hastalığın bir tutulum yeri yoktur (Dalmau ve ark, 2008). Ancak genellikle T2 kesitlerde hipokampal ve mesial temporal bölgelerde sinyal artışı şeklindedir.

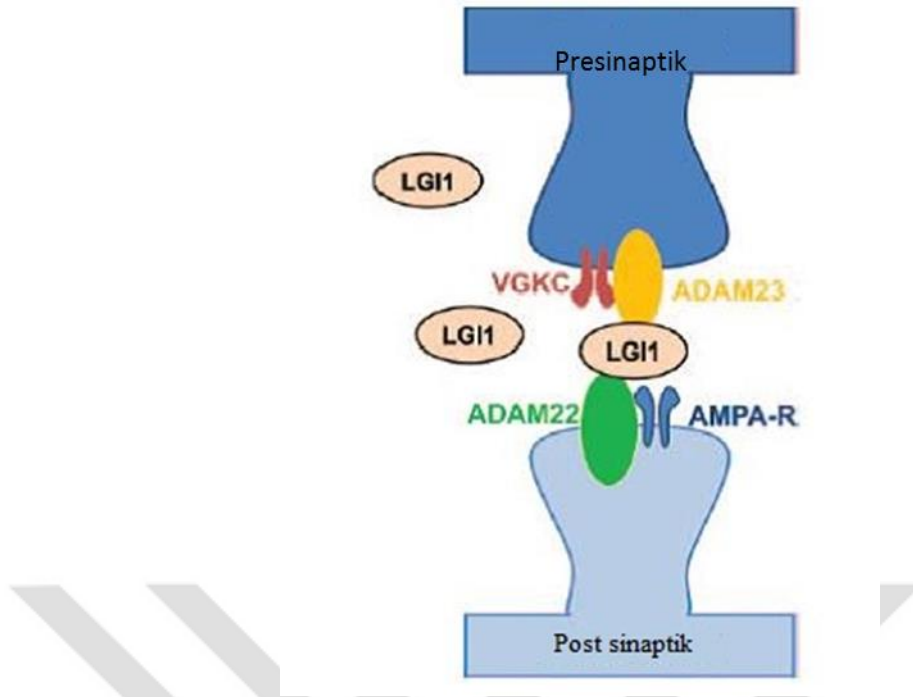
2.5.1.3.2. Anti Voltaja Bağımlı Potasyum Kanalı (VGKC) Kompleksi

Voltaja bağımlı potasyum kanalı (VGKC) antikorları kompleksi hücre yüzey membranlarında bulunup ve nöronal eksitabilitede anahtar protein olarak görev alırlar (Bien ve Sheffer, 2011). Ancak otoantikorların çoğunlukla Kv1 alt ünitelerinden ziyade Voltaja bağımlı potasyum kanalı kompleksinin nöronal membranda stabilizasyonunu ve uygun konfigürasyonunu sağlayan yakın komşuluktaki “2 Lösinden Zengin Glioma İnaktive Proteini-1” (LGI1) ve “kontakt ilişkili protein 2” (CASPR2) proteinlerine bağlandıkları gösterilmiştir. Bu antikorlar özellikle edinsel nöromiyotoni, Lupus erityozis ve nadir olarak da Morvan sendromu olan hastalarda saptanmıştır (Bien ve Sheffer, 2011).

Limbik ensefalit ve temporal lob epilepsisi olan hastaların çoğunun LGI1 antikoru taşıdıkları saptanmıştır (Lai ve ark, 2010). Hastalık sıklıkla 30-80 yaş arasında ve %65 oranında erkeklerde görülür. Yüksek miktarda antikor taşıyan hastaların bazılarında temporal lob nöbetleri ya da diğer tipik Lupus Eritematozus (LE) belirtilerinden önce yüz ve kolda distonik nöbetler (fasiobrakial distonik nöbetler) ortaya çıkabilir. Gün içinde çok sayıda olabilen nöbetler eş zamanlı yüzde buruşma ve aynı taraf kolda distoni şeklindedir.

2.5.1.3.2.1 Lösinden Zengin Glioma İnaktive Proteini-1 (LG1) Ensefaliti

Anti-LGI1 otoantikor ilişkili limbik ensefalit (ALLE) nedeninin voltaja bağlı potasyum kanalı olduğu düşünülmekteydi. Ancak yapılan çalışmalar ile antikorların potasyum kanalı Kv1.1 veya Kv1.4 subünitleriyle reaksiyona girmedikini, LGI1'e bağlandığını gösterildi (Lai ve ark, 2010). LGI1, 63 kDa'luk bir peptittir ve 10q24'e lokalizasyon gösteren bir gen tarafından kodlanmaktadır (Ottman ve ark, 1995). İlerleyen yıllarda gliomadaki kanser hücrelerinin hayatta kalım ve apoptozuyla ilişkili olarak görevinin olduğu anlaşılmıştır (Chernova ve ark, 1998). LGI-1 adını da buradan almaktadır. Lösinden Zengin Glioma İnaktive Proteini-1 (LGI-1) 'in bu gendeki mutasyonların aslında otozomal dominant temporal lob epilepsisine (ODTLE) yol açmaktadır (Ottman ve ark, 1995). LGI1'in presinaptik bölgeden salındıktan sonra, presinaptik ADAM23 ve postsinaptik ADAM22 reseptörlerine bağlanarak bir transsinaptik protein kompleksinin oluşumunu sağladığı ve bu şekilde sinaptik transmisyonun gücünü düzenlediği düşünülmektedir (Fukata ve ark, 2010). Bununla birlikte nörit gelişimi ve dendrit düzenlenmesiyle de ilişkili olduğu ve bu nedenle kortikogenezde rolü olabileceğini düşündüren bulgular da vardır (Cowell, 2014).



Şekil 2.9. LGI1 presinaptik nöronda ADAM23 ve postsinaptik nöronda ADAM22 bağlanan nöronal proteindir. Bu şekilde LGI1 presinaptik Kv1 potasyum kanalı ve postsinaptik hücre iskeleti proteinleri ile ilişki içindedir. LGI1 postsinaptik protein kompleksleri ile presinaptik protein kompleksleriyle ince ayarlı sinaptik iletim için gerekli olduğu belirtilmektedir. AMPAR -amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic asit reseptör (Lancaster ve ark;2011).

Anti-LGI1 otoantikor ilişkili limbik ensefalit (ALLE) hafıza problemleri, bazı nöropsikiyatrik semptomlar, davranış bozuklukları ve temporal lob nöbetleri gibi limbik sistemin tutulumuna işaret eden klinik belirtilerle ortaya çıkar (Lai ve ark, 2010). 2010 yılında Anti-LGI1 otoantikor ilişkili limbik ensefalit Lai ve ark tarafından farklı yaş gruplarında oldukça ayrıntılı bir şekilde tanımlandı (Lai ve ark, 2010). ALLE 30 yaşından 80 yaş üstü hastalara kadar geniş bir yaş aralığında ve kadınlara oranla erkeklerde iki kat daha sıklıkta görülür (Irani ve ark, 2010; Lai ve ark, 2010; Shin ve ark, 2013).

Klinik olarak amnezi, konfüzyon, bilinç değişiklikleri ve nöbetlerin yanı sıra daha ender olarak uyku ve otonom sinir sistemi etkilenmesine bağlı bozukluklar da meydana gelmektedir. Hastaların %80'inden fazlasında görülen nöbetler önemli bir bulgudur. İrani ve ark'na göre, ALLE'nin klinik olarak ortaya çıkmasından önce ipsilateral kol ve yüzde, ani ve kısa süreli kasılmayla giden ve gün içinde pek çok kez tekrarlayabilen, yazarların fasiyo-brakial distonik nöbet adını verdikleri oldukça karakteristik bir semiyolojik bulgu ortaya

çıkmaktadır (Irani ve ark, 2011). Bugün için halen bir tür nöbet mi yoksa hareket bozukluğu mu olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Genel olarak nöbetlerin AEİ'lere oldukça dirençli oldukları söylenebilir (Çoban ve Tüzün, 2016).

Laboratuvar bulgularına bakıldığında hiponatremi oldukça sık görülür ve uygunsuz ADH sendromu ile ilişkilendirilmektedir (Irani ve ark, 2010; Lai ve ark, 2010; Shin ve ark, 2013). BOS'ta protein artışı (%28) veya lenfositik pleositoz (%17) görülebilmektedir. Kraniyal MRG'de bilateral mesial temporal T2A sinyal artışı hiperintensitesi %84 oranında saptanmaktadır (Irani ve ark, 2010; Lai ve ark, 2010; Shin ve ark, 2013; Flanagan ve ark, 2015) ancak hastalığın başlangıç döneminde MRG normal olabilir. FDG-PET çalışmalarında hastaların yaklaşık %70'inde bazal ganglia ve/veya temporal lobda glikoz metabolizmasında (ağırlıklı olarak hipermetabolizma şeklinde) bozukluk bildirilmektedir (Irani ve ark, 2010; Lai ve ark, 2010; Shin ve ark, 2013; Malter ve ark, 2014).

Caspr2 merkezi ve çevresel sinir sisteminde sentezlenen membran proteindir. Stoplazmada potasyum kanalları için kümelenmiş ve miyelenmiş akson boğumlarında yer alır (Horresh ve ark, 2008). CNTNAP2 geni Caspr 2 proteinin kodunu içerir ve bu gende meydana gelen mutasyon epilepsi, şizofreni ve diğer birçok hastalık ile ilişkilendirilmektedir (Friedman ve ark, 2008; Strauss ve ark, 2006). Genellikle erkeklerde ve 60'lı yaşarda çok görülür (Irani ve ark, 2010; Lancaster ve ark, 2011). Merkezi sinir sisteminde yaygın olarak kognitif ve hareket bozuklukları görülür (Irani ve ark, 2010; Lancaster ve ark, 2011; Becker ve ark, 2012). Serebellar semptomlar iyice açıklanmıştır. Periferik sinirde hiperekstrabilete beraberinde kramplar ve faskilasyonlara neden olur. Hem merkezi hem de periferik sinir de meydana gelen bu anormalliklere uykusuzluk olarak da bilinen Morvan sendromu da eşlik eder. Morvan sendromu Caspr2 antikoru ile ilişkilendirilmektedir. Diğer ağrı ve kilo kaybı gibi semptomların da Caspr2 antikoru nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Irani ve ark, 2010; Lancaster ve ark, 2011; Klein ve ark, 2013). Caspr2 antikorunun neden olduğu ensefalitin semptomları Creutzfeldt-Jakob hastalığının semptomlarına benzer ve bazı CJ hastalarının serumlarında Caspr2 antikoru pozitif bulunmuştur (Rossi ve ark, 2015 ; Zuhorn ve ark, 2014). Tümör varyansı bu hastalarda % 32 dir (Irani ve ark, 2010; Lancaster ve ark, 2011; Rossi ve ark, 2015). Timüs timörü bu hastalarda çok yaygındır ve bunun yanı sıra hastalarda myasthenia gravis 'de görülmektedir. Bunun dışında özellikle akciğer tümörü ve endometrial karsinoma rapor edilmiştir (Tüzün ve ark, 2013; Vynogradova ve ark, 2014). Tümör tedavisi nörolojik gelişimi için gereklidir. Ayrıca, tümörlü olmayan hastalarda immünoterapi yararlı

gibi görünmektedir (Irani ve ark,2010; Lancaster ve ark, 2011) .



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı

Tez çalışmasında deney hayvanı olarak İstanbul Medipol Üniversitesi Restoratif ve Rejeneratif Tıp Araştırmaları Merkezi’den temin edilen yenidoğan Balb-C ırkı albino fareler kullanıldı.

3.1.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

Kullanılan sarf malzeme listesi Tablo 3.1’ de bulunmaktadır.

Tablo 3.1. Sarf malzeme listesi

Sarf Malzemesi	Firma	Katalog Numarası
L15	Sigma	L5520
Neuro Basal A (NBA)	Gibco	A12475
Hibernate A	Gibco	A1247501
Papain	Sigma	P4762
Deoksiribonükleaz I (DNAz)	Sigma	D4513
Fetal dana serumu (FCS)	Sigma	F9665
Poly-L-lizin	Sigma	P6282
Laminin	Sigma	L2020
B27 supplementi	Invitrogen	17504-044
Antibiyotik-antimikotik solüsyonu	Sigma	A5955
Fosfat Tamponu	Sigma	P3288
Muse system check kit	Milipore	MCH100101
Muse Count Viability Assay Kit	Milipore	MCH100102
JC-1	Molecular Probes	T3168
Alexa Fluor 488 –anti human immunoglobulin	Invitrogen	A11013
Sığır serum albumini (BSA)	Sigma	A9418
Triton X	Merck	K26456203 924

Sodyum Azid	Sigma	S8032
Tween 20	Merck	S95415 814
Keçi serumu	Sigma	G6767
Caspr2	Abcam	Ab33994
Rabbit anti NR-1	Abcam	ab17345
Fluo4	Molecular Probes	F14201
ReliaPrep RNA Cell MiniPrep	Promega	Z6010
iscript cDNA synthesis	Bio-Rad	1708891
Propidium İyodür	Sigma	P4864
iTaq Universal SYBR green supermix	Bio –Rad	1725124

3.2.Yöntem

2.1.1. 3.2.1. Çalışmada kullanılan vasatlar

3.2.1.1. Diseksiyon Vasatı

Hibernate A, içerisine %1 oranında glutamin ve aynı oranda antibiyotik-antimikotik solusyonunun aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Diseksiyon süresince vasat soğuk olarak kullanıldı.

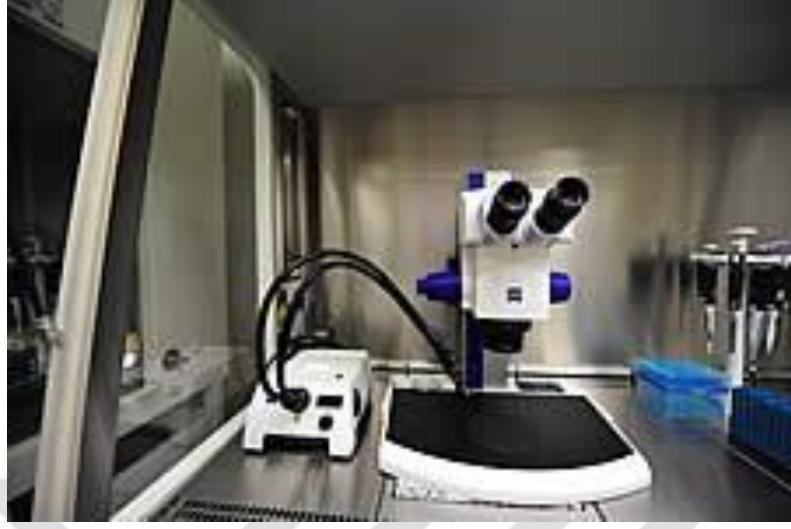
3.2.1.2 . 1.Kültür Vasatı

L15 içerisine %1 glutamin, %1 antibiyotik-antimikotik ve %2 oranlarında B27 supplementinin aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Kültür süresince vasat +4° C sıcaklıkta kullanıldı.

2.Kültür vasatı

Neurobasal A (NBA), içerisine %1 glutamin, %1 antibiyotik-antimikotik ve %2 oranlarında B27 supplementinin aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Kültür süresince vasat 37° C sıcaklıkta kullanıldı.

3.2.2. Farenden Hipokampus Dokusunun Çıkarılması



Şekil 3.1 Stereo Mikroskop

Farelerin anestezisi karbondioksit ile yapıldı ve ardından hayvan servikal transeksiyon ile öldürüldü. Tüm beyin Hibernate A içeren silikon tabanlı diseksiyon tabağına alındı. Çalışmanın amacına uygun olarak hipokampus aseptik koşullarda, stereo mikroskop altında çıkarıldı. Bir hayvandan 2 adet hipokampus dokusu elde edildi. Dokular hücre kültürü yapıncaya kadar soğuk L15 vasatında bekletildi.



Şekil 3.2. Yenidoğan fareden hipokampus dokusunun çıkarılması. 1: Çalışmanın amacına uygun olarak postnatal 4 fareler kullanıldı. 2-3: Yenidoğan farenin kafatası bedeninden ayrılarak Hibernate A içeren silikon tabanlı diseksiyon alındı ve derisi sabitlenerek beyin çıkarıldı. 4: Tüm beyinden iki adet hipokampus dokusu çıkarıldı.

3.2.3. Hücre kültürü

Hücre kültürü basamakları

Enzimatik parçalamaya papain enzimi ile başlandı (% 0,75). Dokular bu enzimle 40 dakika buzdolabında ajitatorde inkübe (50 Hz) edildi.

%10 FBS içeren L15 hazırlandı ve 1ml eppendorf tüpe eklendi. Mekanik ayrıştırma dokuların tiriturasyonu ile yapıldı ve kültüre %1 oranında DNase (6µl) eklenerek 15 dk boyunca 50 Hz frekansta ajitasyon ile oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra santrifüj ile (800rpm g'de 3 dk) ayrışan hücreler çöktürüldü, süpernatant atıldı ardından pellet %10 FBS içeren L15 (3000 μ l) ile çözüldü.

800 rpm'de 3 dk tekrar +4 $^{\circ}$ C'de yapıldı ve santrifüj ile hücreler dibe toplandı, süpernatantın büyük bir bölümü atıldı, geriye kalan içinde hücre pelleti çözüldü ve nihai olarak 600 μ l süspansiyon elde edildi.

Elde edilen nöronlar, öncesinde oda sıcaklığında 2 saat %10 poly-l lizin ile kaplanan 35 mm'lik Petri kaplarına ekildi (ekim öncesinde kültür kapları steril distile su ile yıkandı ve kurutuldu). Hücreler, öncelikle NBA içinde 600 μ l süspansiyon olarak ekildi; hücrelerin tabana yapışması için, 2 saat etüvde inkübasyondan sonra vasat 1,5 ml'ye tamamlandı. Kültürler %5 CO₂ ayarlı 37 $^{\circ}$ C'lik etüvde inkübasyona alındı.

3.2.4 Hücre Eldesi ve Sayımı



Şekil 3.3 Elde edilen nöronların sayıları ve hayatta kalım oranlarının belirlemek amacıyla Muse cihazı kullanıldı.

Muse sayım cihazı ile sofistike, pahalı ve özel işlem gerekmeden yüksek kantitatif sonuçlar elde edilerek hücre analizi yapılabilmektedir. Tek hücre düzeyinde nicel bilgiler basit, zahmetsiz çalışma imkanı sağlar. Sistemde kapiller yardımı ile çalışır ve düzgün veri alınabilmesi için öncesinde sistemi kalibre etmek gerekir. Muse cihazı, optimize edilmiş Muse Tahlillerini kullanarak veri toplama ve analiz için entegre bir dokunmatik ekran ve yazılıma sahiptir. Mikrokapiller akış hücresi, çapraz 2-60 mikron süspansiyon ve yapışkan

hücrelerin elde edilmesi için tasarlanmıştır. Muse, floresan reaktifleri kullanır ve her hücre için üç parametrenin ölçülmesi için algılanır, az veya hiç numune hazırlama gerekmez. Muse tahlilleri, hassas hücre sayımlarının yanı sıra aşağıdakileri içeren kritik hücre parametrelerinin tek hücreli ölçümü için mevcuttur. Cihaz yardımı ile canlılık, apoptoz, hücre döngüsü, otofaji gibi hücrede meydana gelen olayları tespit edebilmektedir. Kontrol kiti ile 3 defa kalibre edildikten sonra hücre analizine başlandı.

Ardından her gün yapılan kültürlerin fotoğrafları çekildi.

3.2.5 Pürifiye Antikor Eldesi

Çalışmada kullanılan otoimmün ensefalit ve sağlıklı kontrol kan örnekleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul biriminden alınan 03.11.2016 tarihli ve 398379 sayılı Etik Kurul kararı ile elde edilmiştir. Santrifüj ile serum eldesi sonrasında IgG izolasyonuna geçilmiştir.

MagSi-Protein A ve G600, 1.0 Kit ile IgG izolasyonu yapıldı.

3.2.5.1 Manyetik Boncuk Hazırlanması

Öncelikle manyetik boncuklar hazırlandı.

Manyetik boncuklar vorteks yardımıyla süspanse edildi.

Gerekli total hacimde boncuk solüsyonu 10 µl halinde tüplere bölündü ve tüpler manyetik tablet üzerine yerleştirilerek 1-2 dk. beklendi.

Manyetik tablet kaldırılmadan, tüplerde boncukların geride bıraktığı sıvı pellete dokunmadan dikkatlice çekildi. Manyetik tablet üzerinden alınan tüplere boncukların kurumalarına izin vermeden yıkama solüsyonu eklendi ve vorteks yardımıyla süspanse edildi.

3.2.5.2. Antikor Saflaştırılması

1- Manyetik boncuklar vorteks yardımıyla süspanse edildi.

2- 1,5'lik eppendorf tüplere 100 µl manyetik boncuk solüsyonundan eklendi.

3- Boncuklar bağlama gerçekleştirmek üzere 1 kez yıkamaya tabi tutuldu ve 90 µl bağlama solüsyonu eklendi.

Pipetleme yapılarak serum örneğinden 10 µl alınarak bağlama solüsyonun üzerine eklendi +4 °C’ de geceboyu çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

Tüpler çalkalayıcıdan sonra manyetik tablet üzerine yerleştirilerek 1-2 dk. Beklendi.

Manyetik tablet üzerinden kaldırılmadan, tüplerde boncukların bıraktığı sıvı pellete dokunmadan dikkatlice çekildi ve tüplere 100 µl yıkama solüsyonu eklenerek dikkatlice homojenize edildi.

Tüplere 50’ ser µl düşük pH ayırma solüsyonu eklenerek çalkalayıcıda 5 dk. Inkübasyona bırakıldı.

Tüpler çalkalayıcıdan manyetik tablet üzerine alındı ve 1-2 dk. bekletildi ve sonra manyetik tablet üzerinden kaldırılmadan, tüplerde boncukların geride bıraktığı IgG’leri içeren sıvı pellete dokunmadan dikkatlice çekildi ve temiz tüpe alındı -20 °C’ de saklandı.

Bradford yöntemi ile pürifiye IgG konsantrasyonu 10-15 µg / µl olarak belirlendi.

3.2.6. Hasta Serum Antikorlarının Nöron Membran Antijenlerine Bağlanmasının Gösterilmesi

Ensefalit ve sağlıklı kontrol olgularının serumlarındaki IgG’lerin nöronal membran antijenlerine bağlandığı özel bir yöntem ile gösterildi. Bu yöntemde primer hipokampal nöron kültürleri permabilizasyon uygulanmadan serum antikorları ile karşılaştırıldığından sadece membran antikorlar saptanmakta ve hücre içi anijenlere karşı gelişmiş antikorlar gözlenmemektedir. Bu yöntemle NMDAR ile LGI-1 pozitif serum antikorlarının 1,2,3 ve 4 haftalık primer nöron kültürü hücrelerine bağlanıp bağlanmadığı gösterildi.

Inkübasyonun 1,2,3.ve 4. haftalarında NR-1 ve LGI-1 ‘in hücre lokalizasyonlarını yerlerini öğrenmek amacıyla immünohistokimyasal işlemler yapıldı.

3.2.6.1. Serum Eklenmesi ve Tespit İşlemi

Hippocampus kültürleri inkübasyonun kültür vasatı uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında fosfat tuz tamponu (PBS) ile 2 defa yıkandı.

Ardından hücreler yine oda sıcaklığında 1:250 oranında hasta serumu ile bir saat inkübe edildi.

% 4’lük taze hazırlanmış paraformaldehit ile 15 dakika boyunca tespit edildi.

Alexa Fluor 488-conjugated anti-human immunoglobulin (IgG) ile 45 dakika oda sıcaklığında tekrar inkübe edildi.

PBS ile 2 defa yıkama yapıldıktan sonra Petri kabına blok solüsyonu (%3 sığır serum albumini (BSA), %0,1 Triton X, %0,1 sodyum azid, %1 keçi serumu) eklenerek +4 °C’de 30 dakika bekletildi.

3.2.6.2. Birincil Antikor Uygulaması

NR-1, LGI-1 antikorları sulandırma solüsyonu (%3 BSA, %1 keçi serum, % 0,1 sodyum azid, % 0,1 Tween 20) ile 1/100 olarak hazırlandı. Antikorlar tek tek eklendi ve oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. Primer antikor uygulamasından sonra 5 kez PBS ile yıkama yapıldı.

3.2.6.3 İkincil Antikor Uygulaması

Sekonder antikorlar kullanılmadan önce 1/100 oranında sulandırma solüsyonuyla sulandırıldı ve preparatlar bunlarla tek ya da ikili kombinasyonlar halinde +4 °C’de 45 dakika inkübe edildi. Ardından DAPI ile inkübe edildi, PBS ile 5 kez yıkandı ve görüntülendi.

3.2.7. Mikroskopik görüntüleme

3.2.7.1 Konfokal Mikroskop ile Görüntü Alınması

Hücre kültürüyle in vitro ortama alınan nöronlardan işleme tabi tutulacaklar inkübasyonun 24.72. ve 168. saatinde hücreler lazer taramalı konfokal mikroskobu (LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile görüntülendi. Görüntüleme sırasında 20X büyütme bir objektif kullanıldı.

Mikroskop üzerinde bulunan dijital kamera ile alınan görüntüler bilgisayar ortamına aktarılabilmektedir. Tablo üzerinde bulunan ve preparatın içine yerleştirildiği inkübasyon kutusu destek üniteler sayesinde hücreler için fizyolojik şartları sağlayacak atmosfer şartlarını sağlamaktadır (37°C, %5 CO₂, nem). Sistemde kullanılan bilgisayar programı (Zen black) mikroskobun tüm fonksiyonlarının bilgisayar ortamında düzenlenebilmesine olanak sağlamaktadır. Bu programla preparatların x, y, z koordinatları ile birlikte çeşitli pozisyonlar kaydedilebilmekte ve görüntü alma aralığı, süresi ile görüntü özellikleri (renk ayarı, parlaklık, çözünürlük gibi) ayarlanabilmektedir. Görüntü alınırken ve iki görüntü alımı arasında objektifler, filtreler ve ışık ayarı gibi çalışmanın özelliğine göre daha önce kaydedilen bu

özellikler otomatik olarak değiştirilebilir. Ayrıca bu programda hücreleri canlı olarak bilgisayar ortamında izleme olanağı da bulunmaktadır.



Şekil.3.4. Laser taramalı konfokal mikroskop sistemi.

3.2.8. IgG İnkübasyonu Sonrasında Nöronal Sağkalım Oranlarının Belirlenmesi

Elde edilen hücrelere inkübasyonun 2. Saatinde 0.2 µl (şekil 3.7) pürifiye antikorlar ve Propidium iyodür (PI) eklendi. Propidium iyodür sağlıklı hücrelere giremeyen, ölü hücrelerde nükleik asidlere bağlanarak çekirdeği kırmızı floresan renge boyayan bir maddedir. Kültürün 24.saatinde ölü-canlı hücreleri tespit edebilmek için PI % 0.5 oranında kullanıldı ve 24.72. ve 168. saatinde konfokal mikroskopta görüntü alındı.

Sağkalım oranları aşağıdaki formül ile hesaplandı (Vershuren ve ark, 1997).

NMDAR IgG varlığında sağkalım (%)=(NMDAR IgG ile inkübe edilen 12 petrideki PI negatif hücre sayısı/ IgGsiz 12 petrideki hücre sayısı) * 100

Deney Grupları	Pürifiye antikor miktarı	
Kontrol Grubu		İnkübasyonun 24. Saatinde görüntü alındı
		İnkübasyonun 72. Saatinde görüntü alındı
		İnkübasyonun 168. Saatinde görüntü alındı
Sağlıklı IgG	0.2 µl	İnkübasyonun 24. Saatinde görüntü alındı
		İnkübasyonun 72. Saatinde görüntü alındı
		İnkübasyonun 168. Saatinde görüntü alındı
LGI-1 IgG	0.2 µl	İnkübasyonun 24. Saatinde görüntü alındı
		İnkübasyonun 72. Saatinde görüntü alındı
		İnkübasyonun 168. Saatinde görüntü alındı
NR-1 IgG	0.2 µl	İnkübasyonun 24. Saatinde görüntü alındı
		İnkübasyonun 72. Saatinde görüntü alındı
		İnkübasyonun 168. Saatinde görüntü alındı

Tablo 3.2. Pürifiye antikor eklenerek yapılan deney modelleri

3.2.9. JC-1 Apoptoz Düzeyinin Belirlenmesi

3.2.9.1 JC-1

Membran-geçirgen JC-1 boyası, mitokondriyal sağlığı izlemek için apoptoz çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. JC-1 boya, yeşil (~ 529 nm) ile kırmızıya (~ 590 nm) kadar bir floresans emisyon kaymasıyla gösterilen, mitokondriyumda potansa bağlı birikimi sergiler. Sonuç olarak, mitokondriyal depolarizasyon, kırmızı / yeşil floresans yoğunluğu oranında bir azalma ile gösterilir. Potansiyele duyarlı renk kayması, kırmızı fluoressan J-kümelerinin konsantrasyona bağlı oluşumundan kaynaklanmaktadır.

Plazma membran potansiyelinden etkilenen diğer mitokondriyal lekelerin aksine, JC-1'in yeşil ile kırmızı fluoressan oranı sadece membran potansiyeline bağlıdır ve tek bileşenli fluoressanı etkileyebilecek mitokondriyal büyüklüğü, şekli ve yoğunluğu gibi diğer faktörlere

bağlı değildir. Floresans oranı tespiti, araştırmacıların membran potansiyelini karşılaştırmalı olarak ölçmelerini ve uygulanan uyarana cevap veren bir popülasyonda mitokondriyanın yüzdesini belirlemelerini sağlar.

Programlanmış hücre ölümünün erken aşamalarının ayırıcı bir özelliği, aktif mitokondrinin bozulmasıdır. Bu mitokondriyal parçalanma zar potansiyelindeki değişiklikler ve mitokondriyanın oksidasyon-indirgenme potansiyelindeki değişimleri içerir. Zar potansiyelindeki değişiklikler, iyonların ve küçük moleküllerin geçişine izin veren mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (MPTP) açılmasından kaynaklanıyor olarak varsayılmaktadır. Sonuçta oluşan iyonların dengelenmesi solunum zincirinin ayrışmasına ve sitokuma sitokuma salınmasına yol açar.

JC-1 ile yapılan boyamalarda yeşil /kırmızı sinyal oranı apoptotik eğilimin derecesini göstermektedir. Çalışmanın amacına göre iki ayrı grupta JC-1 boyası kullanıldı.(Tablo 3.3. ve 3.4).

3.2.9.2.1 Erken Dönem Hipokampus Nöron Kültürlerinde Apoptatik Değişimlerin JC-1 ile Gösterilmesi

Hipokampus dokusunun kültürleri yapıldı ve inkübasyonun 72. Saatinde JC-1 ile boyanarak 30 dk etüvde inkübe edildi. Ardından besiyeri ile yıkanarak konfokal mikroskop yardımı ile görüntü alındı.

Deney Grupları	
Kontrol Grubu	İnkübasyonun 72. saatinde JC-1 eklenerek 30dk sonra görüntü alındı.
Sağlıklı IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl sağlıklı IgG, 72. saatinde JC-1 eklenerek 30dk sonra görüntü alındı
LGI-1 IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl LGI-1 IgG, 72. saatinde JC-1 eklenerek 30dk sonra görüntü alındı
NR-1 IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl NR-1 IgG, 72. saatinde JC-1 eklenerek 30dk sonra görüntü alındı

Tablo 3.3 Erken dönem pürifiye antikor eklenen hipokampal nöronlarda apoptotik değişimlerin JC-1 gösterilmesi amacıyla yapılan deney planı.

3.2.9.2.2. Geç Dönem Hipokampus Nöron Kültürlerinde Apoptatik Değişimlerin JC-1 ile Gösterilmesi

Hipokampus dokusunun kültürü yapıldı ve 7 gün rejenere olmaları beklendi. İnkübasyonun 7. gününde pürifiye antikorlar eklendi ve üç gün sonra JC-1 ile boyandı. Ardından kendi besiyeri ile yıkanarak konfokal mikroskobu yardımıyla görüntü alındı (Tablo 3.9).

Deney Grupları	
Kontrol Grubu	İnkübasyonun 168. saatinde JC-1 eklenerek 30dk sonra görüntü alındı.
Sağlıklı IgG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl sağlıklı IgG, 168. saatinde JC-1 eklenerek 30dk sonra görüntü alındı.
LGI-1 IgG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl LGI-1 IgG, 168. saatinde JC-1 eklenerek 30dk sonra görüntü alındı.
NR-1 IgG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl NR-1 IgG, 168. saatinde JC-1 eklenerek 30dk sonra görüntü alındı.

Tablo 3.4 Geç dönem pürifiye antikor eklenen hipokampal nöronlarda apoptotik değişimlerin JC-1 gösterilmesi amacıyla yapılan deney planı

3.2.10 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Apoptotik Faktörlerin Sentezlenme Düzeylerinin Belirlenmesi

3.2.10.1. RNA İzolasyonu

Tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücrelerin sayımı yapılarak RNA izolasyonu yapılmak üzere kullanıldı. RNA izolasyonu ile ilgili özetler Tablo 3.14 ve 3.15 de gösterilmiştir.

3.2.10.1.1. Erken Dönem Hipokampus Nöron Kültürlerinde RNA İzolasyonu

Hipokampus dokusundan elde edilen nöronlar kültürlerine inkübasyonun 2. saatinde çalışmanın amacına uygun pürifiye IgG eklendi. Ardından inkübasyonun 3. gününde RNA izolasyonu yapıldı. (çizelde 3.5 deney planı özetlenmiştir).

Deney Grupları	
Kontrol Grubu	İnkübasyonun 72. saatinde RNA izolasyonu yapıldı
Sağlıklı IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl sağlıklı IgG, 72. saatinde RNA izolasyonu yapıldı
LGI-1 IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl LGI-1 IgG, 72. saatinde RNA izolasyonu yapıldı
NR-1 IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl NR-1 IgG, 72. saatinde RNA izolasyonu yapıldı

Tablo 3.5 Erken dönem hipokampus nöron kültür RNA izolasyonun özet deney planı.

3.2.10.1.2. Geç Dönem Hipokampus Nöron Kültürlerinde RNA izolasyonu

Hipokampus dokusundan elde edilen nöronlar kültürlerine inkübasyonun 7. gününde çalışmanın amacına uygun pürifiye IgG eklendi. Ardından antikorlar ile 3 gün inkübe edilen nöronlardan RNA izolasyonu yapıldı.(çizelde 3.6 deney planı özetlenmiştir).

Deney Grupları	
Kontrol Grubu	İnkübasyonun 168.saatinde RNA izolasyonu yapıldı
Sağlıklı IgG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl sağlıklı IgG, 168. saatinde RNA izolasyonu yapıldı
LGI-1 IgG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl LGI-1 IgG,168 . saatinde RNA izolasyonu yapıldı
NR-1 IgG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl NR-1 IgG,168. saatinde RNA izolasyonu yapıldı

Tablo 3.6 Geç dönem hipokampus nöron kültür RNA izolasyonun özet deney planı.

Hücre vasatı çekip alındı ve petri soğuk PBS ile yıkandı.

Hücreler yerinden kaldırılarak 15ml falkon tüpe alındılar ve 300 g de 5 saniye santrifüj edildi.

Hücreler tekrar soğuk PBS ile yıkandı ve 300g de 5 saniye santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası supernatant dikkatlice alındı ve başka tüpe aktarıldı.

5ul TG ve 500 µl BL Buffer pellete eklenerek dikkatlice pipetleme yapıldı.

Tüm örneklerin üzerine 170 µl isopropanol eklenerek 5 saniye inkübe edildi.

Bu arada RNA izolasyonuna özel tüpler hazırlandı ve örnekler yüklenerek lizis buffer eklendi.

Oda sıcaklığında 1400g de 30 saniye santrifüjlendi

Tüpler RNA yıkama solüsyonu eklendi ve 1400 g de 30 saniye santrifüjlendi

DNase karışımı 24µl of Yellow Core Buffer ,3µl 0.09M MnCl₂, 3µl of DNase I enzimi olacak şekilde hazırlandı.

Tüm örnekler toplamda 30 µl olan DNase karışımı örneklerin üzerine eklenerek oda sıcaklığında 15 dk. İnkübe edildi.

200 µl yıkama solüsyonu eklendive 1400 g de 15 saniye santrifüj edildi.

500 RNA yıkama solüsyonu eklenerek 1400 g de 30 saniye santrifüj edildi.

Ayrı bir tüpe aktarılan örnekler 300 µl RNA yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 1400 g de 2 dk santrifüjlendi.

50 µl RNA izole edildi

RNA izolasyonu yapıldıktan sonra. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Mass spektrometrede ölçüm yapıldı. 2µl yüklenen RNA örneklerinin konsantrasyonu 260 nm optik dansitesinden (OD), saflığı ise 260 nm/280 nm dalga boyundaki OD oranı tespit edildikten sonra -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.10.3 cDNA Sentez

İzole edilen RNA'ların miktarları mass spektrometrede ölçüldü ve elde edilen miktara göre RNA saflık değerleri hesaplandı. (Tablo 3.7).

Group: 0.5mm_2uL								
Sample	Well	Dilution	F	A260	A280	A230	260:280	260:230
1	D4	1.000	5.552	2.458	3.772	2.259	1.472	277.600
2	D5	1.000	2.024	1.090	1.764	1.857	1.147	101.200
3	D6	1.000	4.668	2.154	2.578	2.167	1.811	233.400
4	D7	1.000	3.368	1.464	1.534	2.301	2.196	168.400
5	D8	1.000	0.146	0.086	0.154	1.698	0.948	7.300
6	D9	1.000	0.368	0.182	0.262	2.022	1.405	18.400
7	D10	1.000	0.310	0.158	0.258	1.962	1.202	15.500
8	D11	1.000	1.016	0.478	0.662	2.126	1.535	50.800

Tablo 3.7 Elde edilen RNA saflık değerleri

RNA'dan cDNA elde için toplam hacmin 20 µl olması gerekmektedir. Bu sebeple RNA örneklerinin hepsinin 50 µg/ml olarak şekilde olacak şekilde hesaplama yapıldı. (Tablo 3.8)

Örnek	RNA miktarı	Su Miktarı
1 Erken dönem kontrol	0,18	14,82
2 Erken dönem sağlıklı IgG	0,49	14,51
3 Erken dönem LGI-1 IgG	0,214	14,786
4 Erken dönem NR-1 IgG	0,297	14,703
5 Geç dönem kontrol	6,849	8,151
6 Geç dönem sağlıklı IgG	2,717	12,283
7 Geç dönem LGI-1 IgG	3,22	11,78
8 Geç dönem NR-1 IgG	0,98	14,02

Tablo 3.8 Erken ve geç dönemlerde elde edilen RNA miktarlarına bağlı olarak eklenmesi gereken su miktarları.

İçerik	Miktar
5x iScript reaksiyon karışımı	4 µl
iScript revers transkriptaz	1 µl
Nükleaz su	Tablo 3.8 yapılan hesaba göre
RNA örneği	Tablo 3.8 yapılan hesaba göre

Tablo 3.9 cDNA sentezi için kitin içeriğine göre hazırlanan karışım ve oranlar.

Reaksiyon protokolü

Tüm örneklerin karışımı buz üzerinde hazırlandı ve reaksiyon karışımı

25°C, 5 dak,

42. °C 30 dak,

85°C 5 dak, opsiyonel olarak 4°C de örnekler bekletildi. Tüm örnekler 1/50 dilüsyon olacak şekilde kullanıldı.

Elde edilen cDNA örneklerinin yoğunlukları ve saflıkları NanoDrop ile spektrofotometrik olarak ölçülüp kalitelerinin kontrolü için housekeeping bir gen olan Cyclophilin geni ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak amplifiye edildi.

3.2.10.4. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu PCR (real-time PCR)

Sağkalımla ilişkili yollara ait faktörlerin Akt, Bcl-2, kaspaz 3, kaspaz 9, Box, mTOR ve iyon kanalı ilişkili proteinler olan ADAM22, ADAM23, NR1, NR2, Kv1.1, LGI1, CASPR2 faktörlerinin ekspresyonları real-time PCR ile belirlendi. Elde edilen tek zincir cDNA'nın amplifikasyonu için iTaq Universal SYBR green supermix RT-PCR yapıldı. Her bir PCR reaksiyonu için iTaq Universal SYBR green supermix reaksiyon karışımı, genlere özgü hazırlanan primer çiftleri ve cDNA örneği kullanılarak Bio- Rad cihazında Tablo 3.16 belirlenen protokole göre Tablo 3.17'deki genlerin ekspresyonlarının kantitatif analizi yapıldı. Çalışılacak genlerin mRNA dizilerine özgü primer çiftleri ile GAPDH housekeeping genleri kontrol olarak kullanıldı ve hedef genlerin örneklerdeki ekspresyon düzeyleri belirlendi.

	Döngü Sayısı	Hedef Sıcaklık	Bekletme Süresi		Döngü Sayısı	Hedef Sıcaklık	Bekletme Süresi
Ön-inkübasyon:	1	95°C	3dk	Çözülme Eğrisi:	1	65°C	0.5sn
Denatürasyon:	40	95°C	1dk			95°C	5sn
Uzama:		72°C	30sn				

Tablo3.10: RTPCR protokolü

Primer	İleri	Ters
AKT	TGGAGGACAACGACTACGG	ACACGATGTTGGCAA AGAA
NR2B	GCATTGCCCACAATGAGA AGAA	CACAGTCATAGAGCCCATCAA
KV1.1	GAAGAAGCTGAGTCGCAC TTCTCCAG	TTAAACATCGGTCAGGAGCTTGCTC
NR1	GTAGACGCGCATCATCTCAA	AACGACCACTTCACTCCAC
Caspase 3	TGACTGGAAAGCCGAAACTC	AGC CTC CAC CGG TAT CTT CT
Caspase9	AGT TCCCGGGTGCTGTCTAT	GCCATGGTCTTTCTGCTCAC
ADAM22	GGACGTCGAGAACGAAAGAG	CGAGGATGAAACTCAGCACA
ADAM23	TGCAGCATGGAGTCTGAAAC	TTGGGCTATGTGTGTACGGA
LGI-1	TGTCGCTGACAGTTCCAAAG	GGCGCTGAGAACTACTGGAC
CNTAP2	GCATGCAGCTCATTAG TA	CTTCACAGGAGGGCTCGTAG
FAS	AAGTTGCATCCACCCAAATC	CATCAGAAATTCAGCCCGTT
mTOR	CGGGTCTTCCTTGTGTGTGT	GAAACACTTCGGAGAGCTGG
Bax	TGAAGACAGGGGCCTTTTTG	AATTCGCCGAGACACTCG
BCL2A	GTCGCTACCGTCGTGACTTC	CAGACATGCACTACCCAGC
GAPDH	GGTGCTGAGTATGTCGTGGA	CGGAGATGATGACCCTTTTG

Tablo 3.11. Sağkalımla ilişkili yollara ait faktörlerin *Akt*, *Bcl-2*, *kaspaz 3*, *kaspaz 9*, *Box*, *mTOR* ve iyon kanalı ilişkili proteinler olan *ADAM22*, *ADAM23*, *NR1*, *NR2*, *Kv1.1*, *LGI1*, *CASPR2* genlerinin ileri ve ters primerleri.

3.2.11 Ca^{2+} Görüntülemeleri

Hipokampus dokusundan elde edilen nöronlarda pürifiye antikor muamelesi meydana gelen apoptozun kalsiyum toksisitesi ile ilişkisini göstermek amacıyla Ca^{2+} iyonu görüntüleme deneyleri yapıldı. Ca^{2+} görüntülemelerin yapılabilmesi için Fluo-4 AM kullanıldı. Tyrode's solüsyonu hazırlandı.

3.2.11.1. Tyrode's Solüsyonun Hazırlanması

140 NaCl, 5 KCl, 5 HEPES, 1 NaH_2PO_4 , 1 $MgCl_2$, 1.8 $CaCl_2$ and 10 glucose (pH 7.4) hazırlandı. Boyama solüsyonu hesaplandı.

Tyrode's solüsyonu 497 μ l

Fluo-4 1,5 μ l

Pluronic asit 1,5 μ l

Hücre kültürünün vasatı çekilip başka bir tüpe aktarıldı

Hücreler 1 ml HBSS yıkandı

Ardından 1ml Tyrode's solüsyonu ile yıkandı

Boyama solüsyonu eklenerek 30 dk. Oda sıcaklığında bekletildi.

Ardından boyama solüsyonu çekildi ve bir defa Tyrode's solüsyonu ile yıkandı.

Tekrar HBSS ile yıkandı ve hücre kültürünün vasatı eklenerek 30 dk. Etüvde inkübe edilerek görüntü alındı.

3.2.11.2 Fluo-4 ile Hücre kültürleri

Ca^{2+} görüntülemeleri için iki ayrı grup halinde deney tasarlandı (deney özetleri Tablo 3.16 ve 3.17 de özetlenmiştir).

3.2.11.2.1. Pürifiye Antikorların Erken Dönem Hippokampal Nöronlara Uygulanarak Ca^{2+} Görüntülemeleri

Hippokampus dokusu çıkarılarak nöron kültürü yapıldı ve inkübasyonun 2. saatinde pürifiye antikorlar eklendi. İnkübasyonun 72. Saatinde Fluo-4 boyaması yapılarak konfokal mikroskop yardımıyla görüntü alındı (Tablo 3.16 deney planı özetlenmiştir).

Deney Grupları	
Kontrol Grubu	İnkübasyonun 72. saatinde Fluo-4 ile boyandı sonra görüntü alındı.
Sağlıklı IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl sağlıklı IgG, 72. saatinde Fluo-4 ile boyandı alındı
LGI-1 IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl LGI-1 IgG, 72. Saatinde Fluo-4 ile boyandı sonra görüntü alındı
NR-1 IgG	İnkübasyonun 2. saatinde 0.2 µl NR-1 IgG, 72. saatinde Fluo-4 ile boyandı sonra görüntü alındı.

Tablo 3.12. Erken dönem hipokampus nöronlarına uygulanan pürifiye antikorların Ca^{2+} iyonu akım düzeyine olan etkileri gözlemlenmesi amacıyla düzenlenen deney planı.

3.2.6.2.2 Pürifiye Antikorların Geç Dönem Hippoakampal Nöronlara Uygulanarak Ca^{2+} Görüntülemeleri

Hippocampus dokusunun kültürü yapıldı ve 7 gün rejenere olmaları beklendi. İnkübasyonun 7. Gününde pürifiye antikorlar eklendi ve üç gün sonra Fluo-4 ile boyanarak konfokal mikroskobu yardımıyla görüntü alındı (Tablo 3.17).

Deney grupları	
Kontrol Grubu	İnkübasyonun 168. saatinde Fluo-4 ile boyandı sonra görüntü alındı.
Sağlıklı IgG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl sağlıklı IgG, 168. Fluo-4 ile boyandı sonra görüntü alındı.
LGI-1 IGG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl LGI-1 IgG, 168. Fluo-4 ile boyandı sonra görüntü alındı.
NR-1 IGG	İnkübasyonun 72. saatinde 0.2 µl NR-1 IgG, 168. Fluo-4 ile boyandı sonra görüntü alındı.

Tablo 3.13 Geç dönem hipokampus nöronlarına uygulanan pürifiye antikorların Ca^{2+} iyonu akım düzeyine olan etkileri gözlemlenmesi amacıyla düzenlenen deney planı.

3.3.4 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 yazılımı ile gerçekleştirildi. Öncelikle verilerin dağılımları Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edildi. Bunun sonucuna göre gruplar arası karşılaştırmalar için parametrik ve parametrik olmayan testler kullanıldı. Bunlar LSD posthoc karşılaştırmasıyla birlikte ANOVA, Tukey'in post-hoc, Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testleriydi. Ayrıca çeşitli gruplar arasındaki ilişkileri irdellemek için Pearson korelasyon analizi yapıldı.

4. BULGULAR

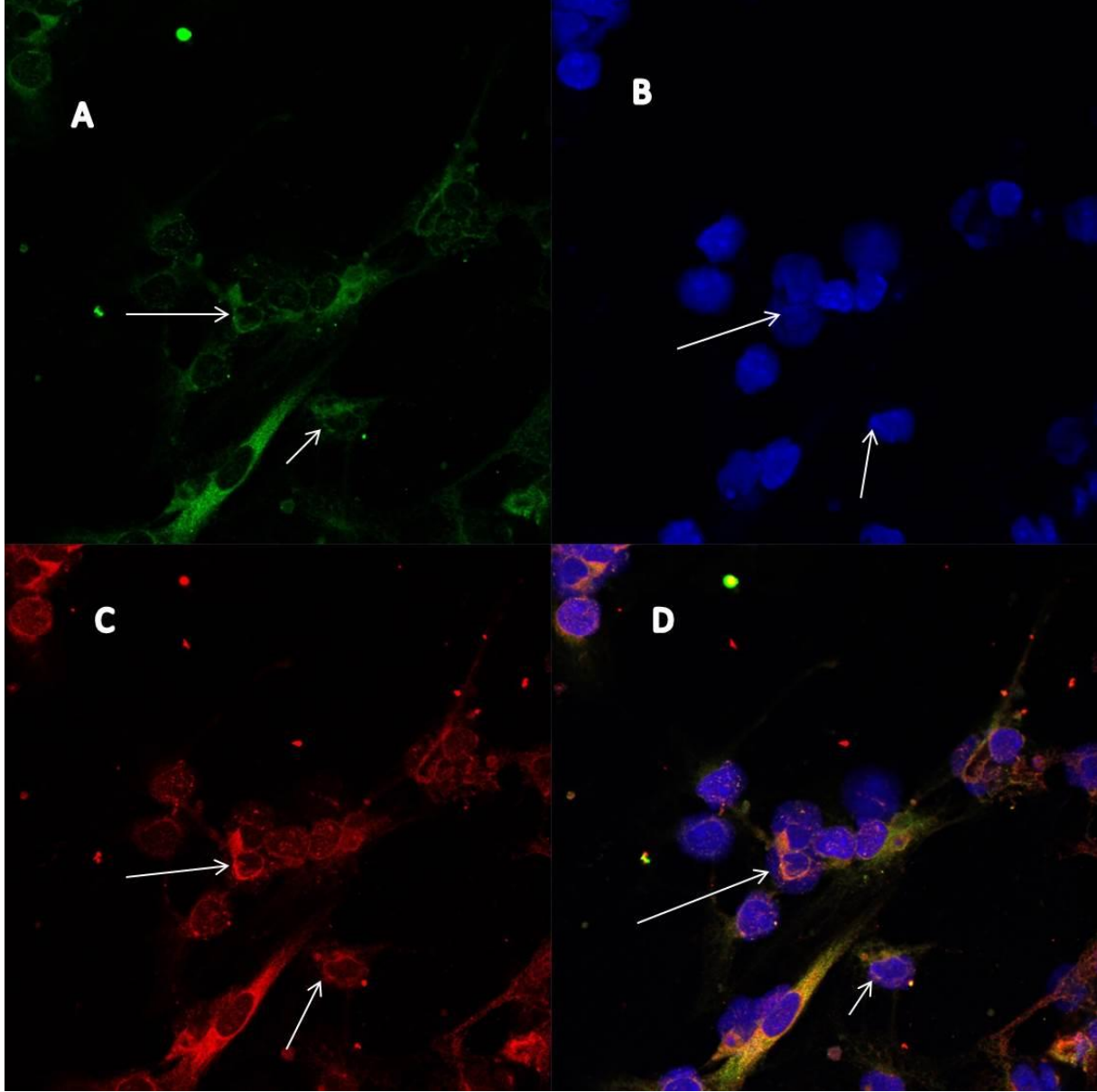
4.1.Otoimmün Ensefalitlerin Klinik Özellikleri

Deneylerde kullanılan otoimmün ensefalit örneklerinden biri NMDAR-NR-1 antikoru pozitif diğeri LGI-1 antikor pozitif birer olgudan alındı. Yaş ve cinsiyet otoimmün ensefalitlerin örneklerine benzeyen bir sağlıklı kontrol kullanıldı. Antikor tayinleri ticari bir kit ile gerçekleştirildi (Euroimmün ,Leubeck, ALMANYA)Serum örnekleri nörolojik aktif bulguların varlığında ve herhangi bir immün süpresif tedaviye başlamadan önce elde edildi. Serum örnekleri kullanılan dek -80 deece de saklandı. Bu kit ile NMDA reseptör, LGI1,CASPR2, AMPAR ,GABAR ve GAD antikorlarına bakıldı. Bunlardan NMDAR ve LGI-1 antikoru birer hastada pozitif bulundu. Bu olgularda diğerk antikorlar saptanmadı. Sağlıklı olguda ise hiçbir antikor saptanmadı. NMDAR antikor pozitif olan hasta 22 yaşında bir kadın hasta idi ve iki hafta önce başlayan sağ fokal motor status, somnolans ve fasiel diskinezi vardı. Bos incelemesinde 18/ul lökosit ve artmış protein saptandı ve MR İNCELEMESİ NORMALdi. EEG incelemesinde yaygın yavaş dalga saptandı. Steoit ve IVIG tedavisine yanıt vermeyen hasta üç hafta içinde kaybedildi. LGI-1 pozitif olan hasta 26 yaşında bir bayan hasta idi psikoz konfüzyon ve bradikinezi ile başvurdu. Bos incelemesinde protein ve hücre düzeyleri normaldi. EEG incelemesinde non-konvülzif statutus saptandı. Steoit ve IVIG tedavisine yanıt verdi. İki hastanın da BT ve PET incelemelerinde tümör saptanmadı.

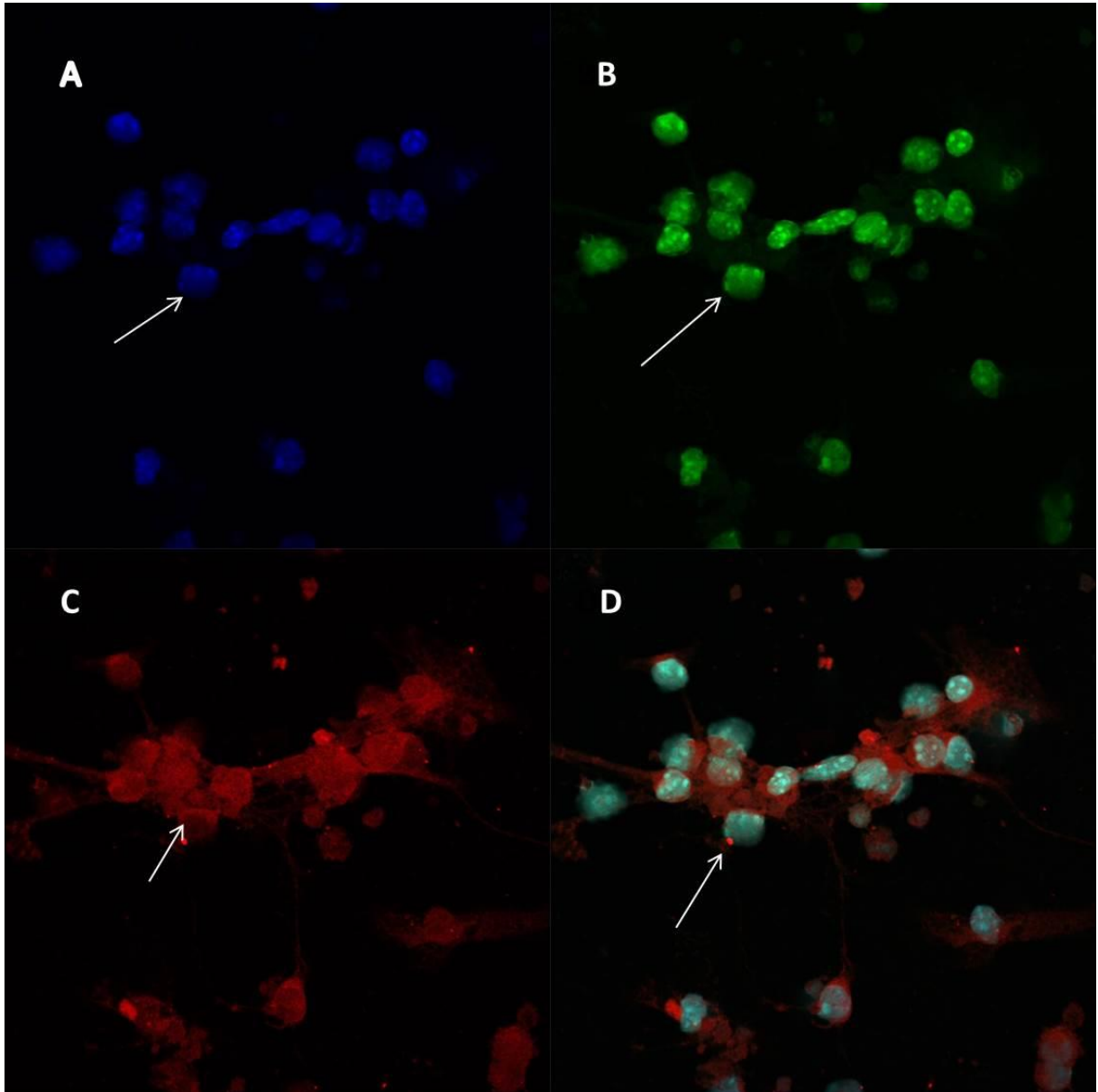
4.2 Hasta Serum Antikorlarının Nöron Membran Antijenlerine Bağlanmasının Gösterilmesi

Ensefalit ve sağlıklı kontrol olgularının serumlarındaki IgG'lerin nöronal membran antijenlerine bağlandığı özel bir yöntem ile gösterildi. Bu yöntemde primer hipokampal nöron kültürleri permabilizasyon uygulanmadan serum antikorları ile karşılaştırıldığından sadece membran antikorlar saptanmakta ve hücre içi anijenlere karşı gelişmiş antikorlar gözlenmemektedir. Bu yöntemle NMDAR ile LGI-1 pozitif serum antikorlarının 1,2,3 ve 4 haftalık primer nöron kültürü hücrelerine kuvvetli, bir şekilde bağlandıkları gösterildi. Bu bağlanmanın NMDAR ve LGI-1 özgü olduğunu göstermek için bir firmadan elde edilen ticari antikorlar ile kolokalizasyon çalışmaları yapıldı ve NMDAR ve LGI-1 antikorları ile hasta serum antikorlarının benzer bağlanma paternleri gösterdiği saptandı. Sağlıklı IgG veya ikincil (488 veya 546 Alexa konjuge anti-insan,tavşan ve fare IgG) antikor uygulanan

nöronlarda boyanma saptanmadı. NMDAR ve LGI-1 pozitif serum örneklerinin 1.2.3. ve 4. Haftalık nöronlara yüksek affinite ile bağlandıkları gözlemlendi.



Şekil 4.2.1: Kültürde bir hafta inkübe edilen hipokampus sinir hücrelerinin insan immünglobülini ve ticari antikor LGI-1 ile olan kolokalizasyonun lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi. A: Alexa Fluor 488-conjugated anti-human immunoglobulin (IgG) immünreaktivitesi ; B: Sinir hücrelerinde DAPI uygulaması; C:LGI-1 (Lösin zengin, glioma inaktive) ticari antikorun immünreaktivitesi ; D: Tüm görüntülerin immünreaktivitelerinin birleştirmiş halleri. 40 x yağlı objektif yardımıyla görüntü alındı

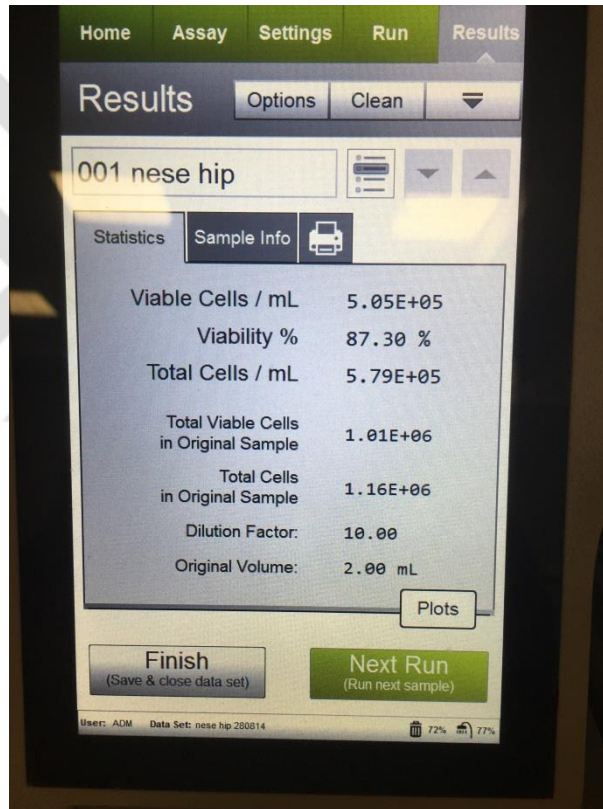


Şekil 4.2.2: Kültürde bir hafta inkübe edilen hipokampus sinir hücrelerinin insan immünglobülini ve ticari antikor NR-1 ile olan kolokalizasyonun lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi. A: Sinir hücrelerinde DAPI uygulaması; B: Alexa Fluor 488-conjugated anti-human immunoglobulin (IgG) immünreaktivitesi; C:NR-1 ticari antikorun immünreaktivitesi ; D: Tüm görüntülerin immünreaktivitelerinin birleştirilmiş halleri. 40 x yağlı objektif yardımıyla görüntü alındı.

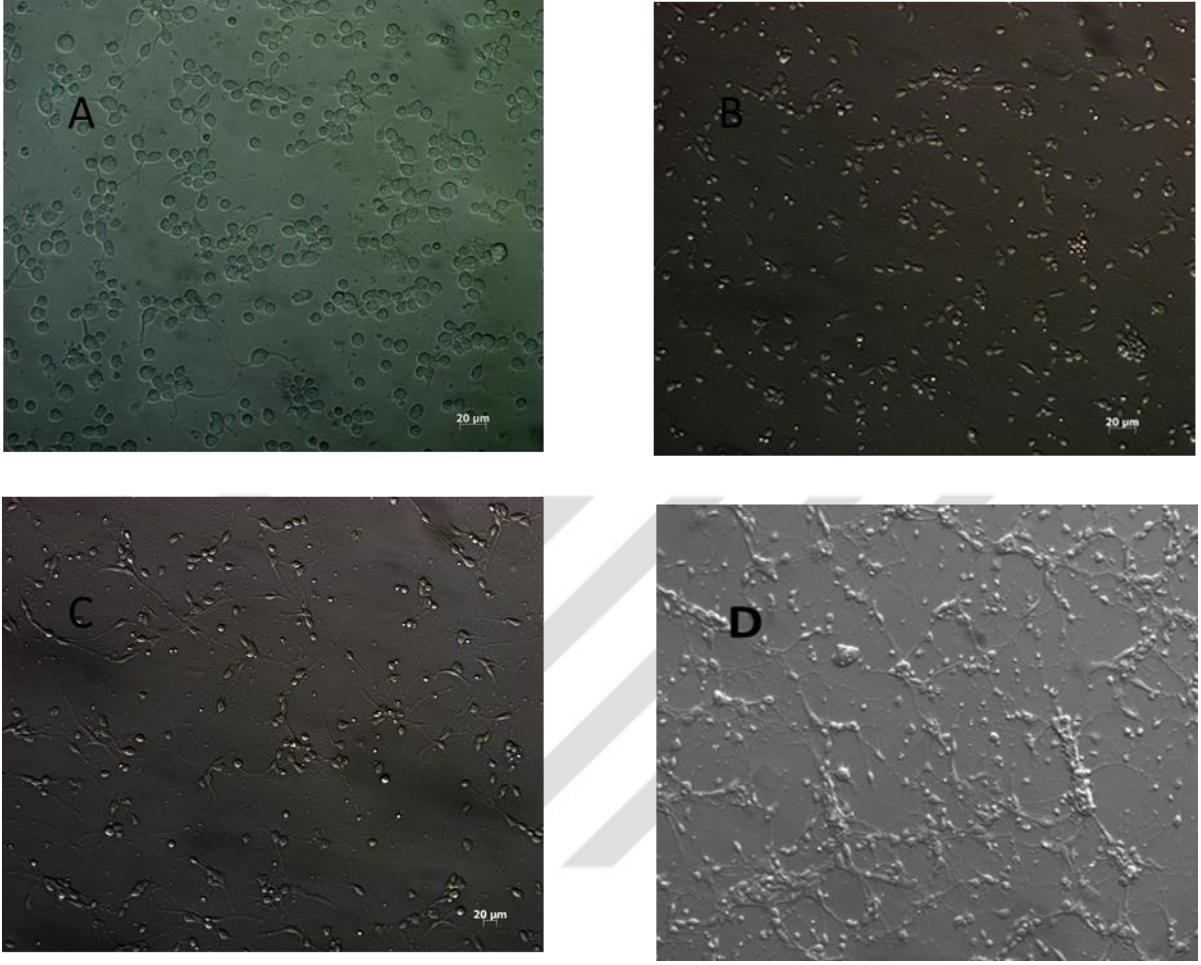
4.3 Hasta Serum IgG'si Uygulanan Primer Hipokampal Nöronların Sağkalım Oranı

4.3.1. Hipokampus Kültürleri ve Elde Edilen Hücre Miktarı

Hipokampus dokusundan elde edilen nöronlar tek tek ayrılmıştı totalde yarım milyon hücre elde edildi ve bunların ekilmeden önceki hayatta kalım oranları yaklaşık % 90 dı. 35 mm çapında cam tabanlı petrilere yaklaşık 125×10^3 hücre ekildi. İnkübasyonun 2.saatinde nöronlar akson uzatmaya başladılar. Glial hücrelerin oranı tüm deneylerde hücre oranlarının tüm deneylerde % 5 altındaydı. Tüm deney gruplarında nöron glia dağılımının morfolojik farklılık dışında kesin anlaşılabilmesi için nöron ve gliaya özgü antikorlar ile immünohistokimyasal boyamalar da yapıldı.



Şekil 4.3.1. Hipokampus dokusundan elde edilen hücre miktarı

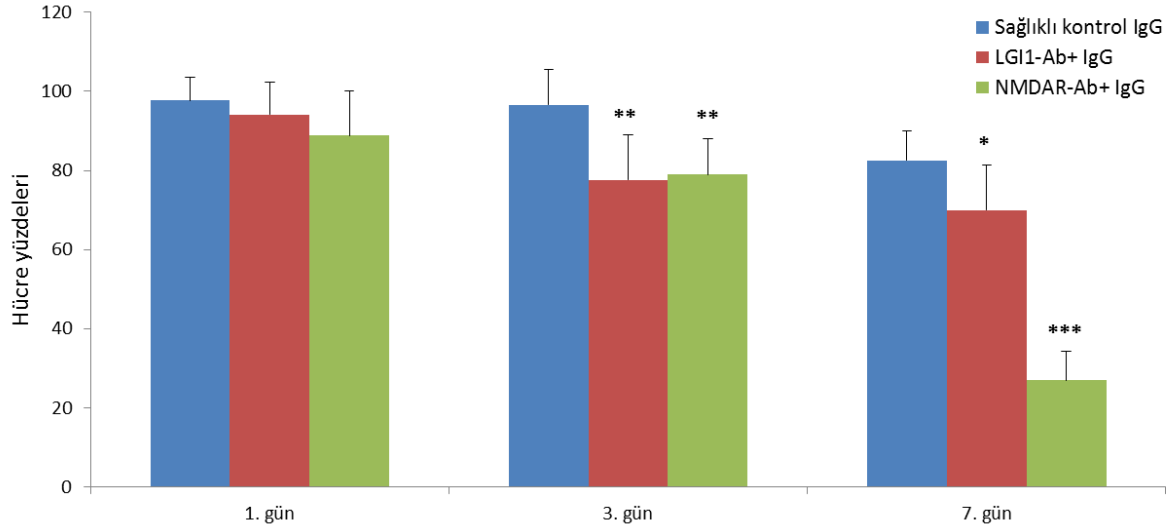


Şekil 4.3.2 : Hipokampal nöronlar inkübasyonun 2. saatinde petri tabanına yapışarak akson uzatmaya başladılar (A). Hipokampal nöronların 1. (B), 3. (C) ve 7. (D) gün ışık mikroskop görüntüleri. 2. Saat 20x; 1.3. ve 7. Gün görüntüleri ise 10x objektif ile çekildi.

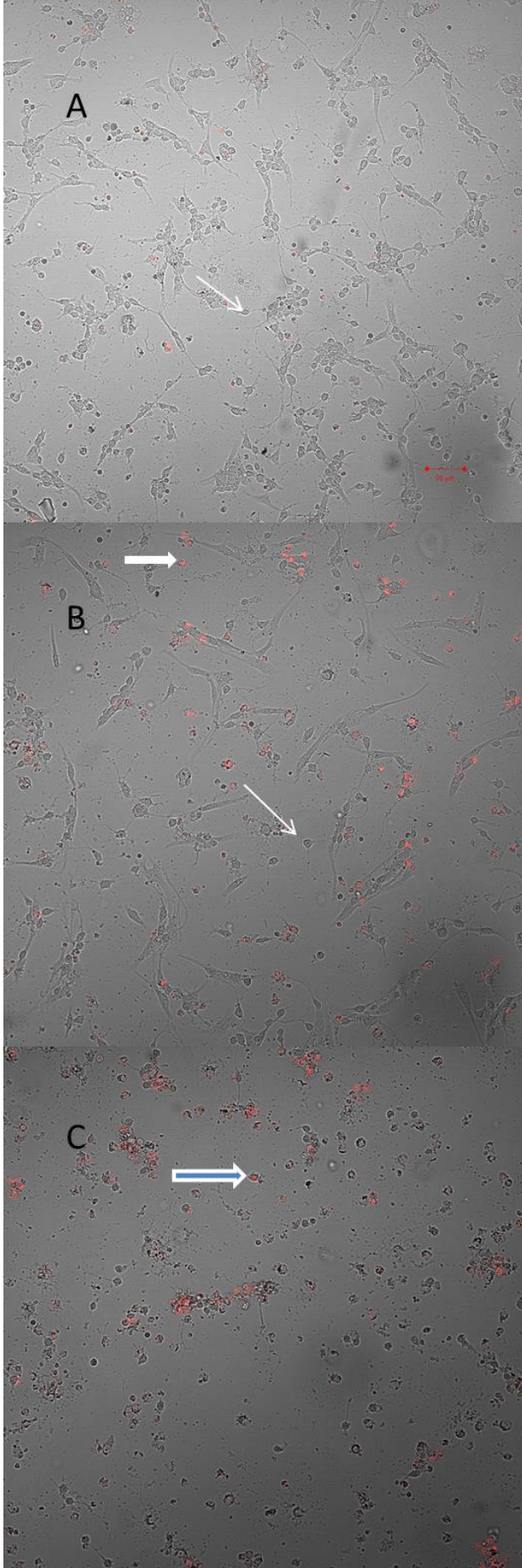
4.3.2 Hasta Serum IGG'si Uygulanan Primer Hippokampal Nöronların Sağkalım Oranlarının Belirlenmesi

İmmünohistokimya deneylerinde bir haftalık nöronlara otoimmün ensefalit antikorlarının bağlandığı gözlemlendi. Bir haftalık primer nöron kültürü ortamında glia sayısının az olması ve dolayısıyla glia-nöron etkileşiminin az olması nedeniyle inkübasyonun ilk 7 günlük kültürleri tercih edildi. Bununla birlikte yapılan kültürlerde 2. Haftada maksimum seviyede dejenerasyon gözlemlendi. Ayrıca 3. ve 4. haftalarda öncül hücrelerin artmasına bağlı olabilecek hücre yoğunluğu artışı saptandı. Dejenerasyon ve öncül hücre gibi faktörlerin sonuçlarımızı karıştırmasını engellemek için 0-7. gün kültürleri kullanıldı.

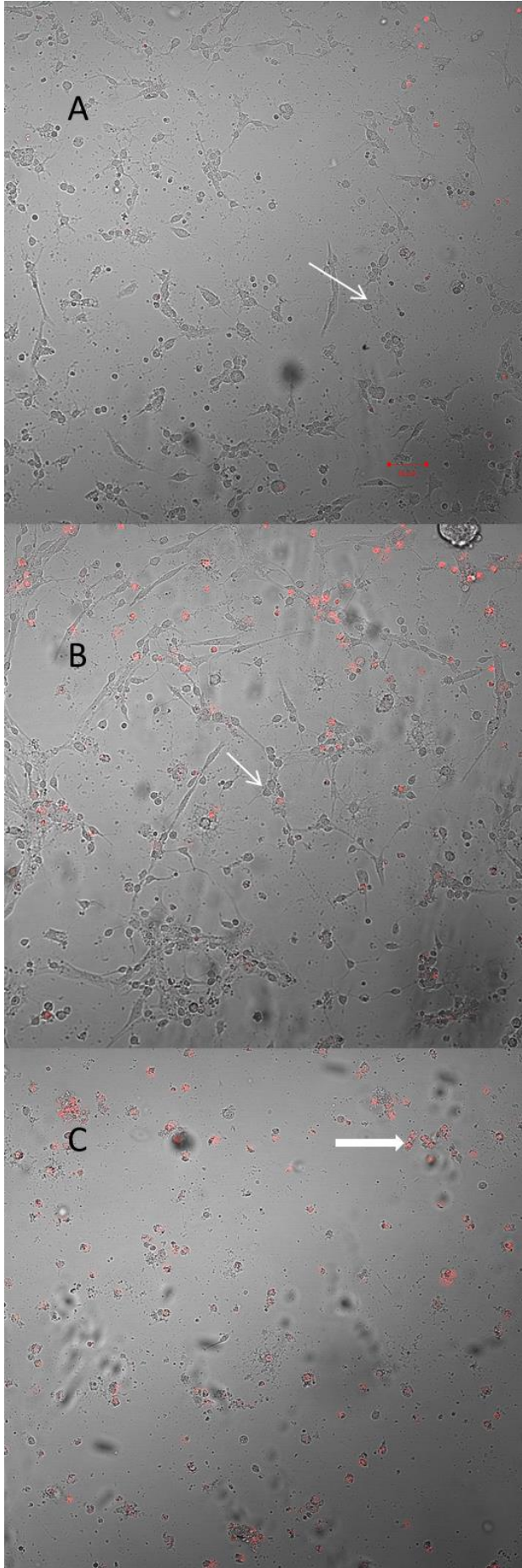
NMDAR ve LGI-1 antikoru pozitif serum örneklerinden IgG saflaştırıldı. Bu IgG'lerin nörotoksik etkilerinin gösterilmesi amacıyla Hipokampus nöronlarına inkübasyonun 2. saatinde 0.1 µl'e ve 0,2 µl'e pürifiye antikorları eklendi (10ug/ul konsantrasyonunda) ve 1,3. ve 7 günlerde nöron sayıları kaydedildi. Kontrol olarak IgG eklenmeyen ve sağlıklı IgG eklenen nöronlar kullanıldı. Her bir antikor parametresi 12 petri kullanıldı. Farklı günlerde elde edilen kontrol (IgGsiz) petrilere elde edilen nöron sayıları 100 olarak kabul edildi. Buna göre yöntemlerde gösterilen formül kullanılarak farklı günler için sağkalım oranları % cinsinden belirlendi. 0.2 mikrolitre dışında kullanılan antikor konsantrasyonları ön çalışma olarak belirtilecek ve maksimum hücre kaybı 0.2 ile elde edildiği için tüm deneylerde bu kullanıldı. Birinci günde sağlıklı ve hasta IgG ile inkübe edilmiş nöronların sağkalım oranları arasında fark saptanmadı (ANOVA ile $p=0.425$). Ancak 3. ve 7. Günde LGI-1 ve NMDAR antikoru pozitif IgG ile inkübe edilmiş nöronların sağlıklı IgG ile inkübe edilenlerden anlamlı derecede düşük sağkalım oranı gösterdiği saptandı (ANOVA ile 3. gün için $p=0.002$, 7. Gün için $p<0.001$).



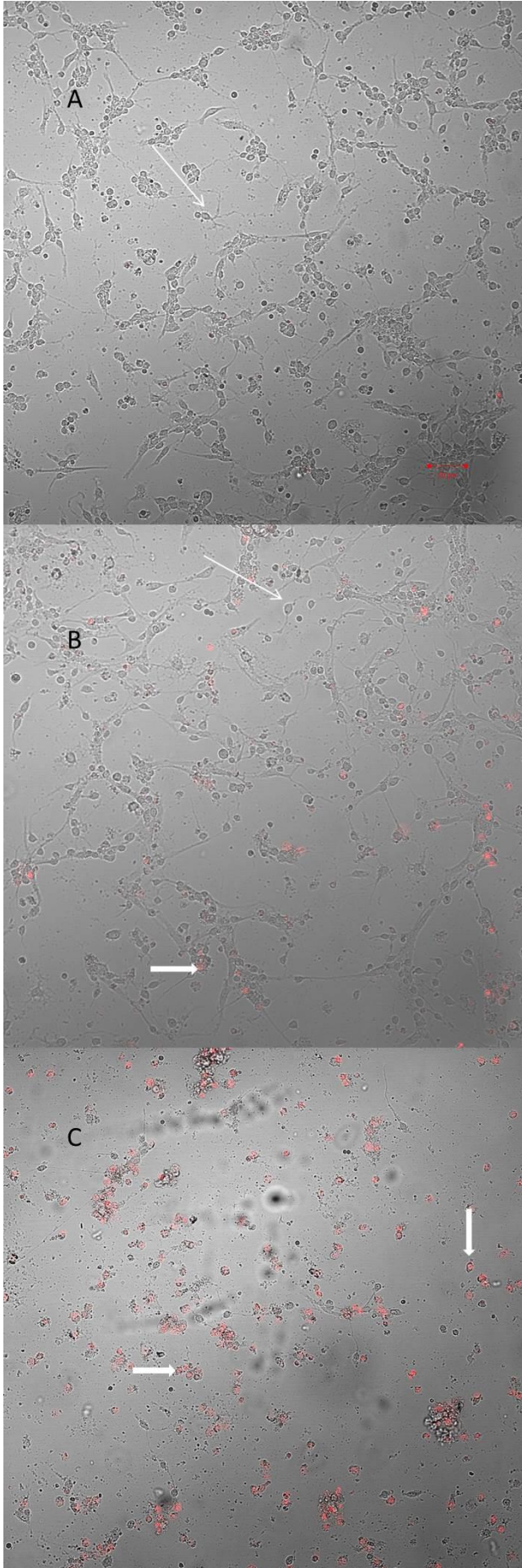
Şekil 4.3.2.1: 0. gün primer hippocampal nöron kültürlerinde IgG uygulanmasından sonra sağkalım oranları IgG uygulanmayan petrilereki sağkalım oranları % 100 olarak alındığı için şekle dahil edilmemiştir. Dikey barlar standart sapmayı göstermektedir. ANOVA ve Tukey'in post-hoc testi ile *, $p < 0,05$; **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$



Şekil 4.3.2.2. Hippokampus dokusundan elde edilen kontrol nöronlarına PI eklenerek inkübasyonun 1. (A) 3.(B) ve 7. gün (C) 20 x objektif kullanılarak görüntü alınmıştır..(ince oklar hayatta kalan nöronları; kalın oklar ise ölen nöronları göstermektedir)



Şekil 4.3.2.3. Hippokampus dokusundan elde edilen nöronları inkübasyonun 2. saatinde 0.2µl LGI-1 ab IgG ve PI eklenerek inkübasyonun 1. (A) 3.(B) ve 7. gün (C) 20 x objektif kullanılarak görüntü alınmıştır.(ince oklar hayatta kalan nöronları; kalın oklar ise ölen nöronları göstermektedir)

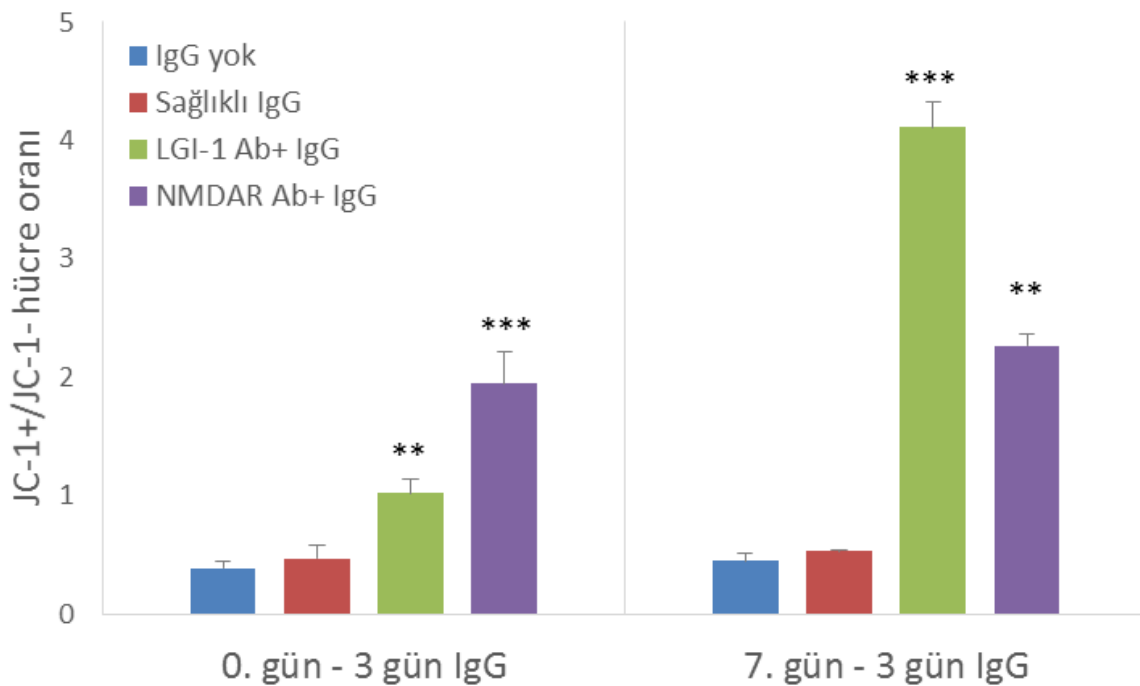


Şekil 4.3.2.4. Hipokampus dokusundan elde edilen nöronları inkübasyonun 2. saatinde 0.2µl NR -1 ab IgG ve PI eklenerek inkübasyonun 1. (A) 3.(B) ve 7. gün (C) 20 x objektif kullanılarak görüntü alınmıştır.(ince oklar hayatta kalan nöronları; kalın oklar ise ölen nöronları göstermektedir)

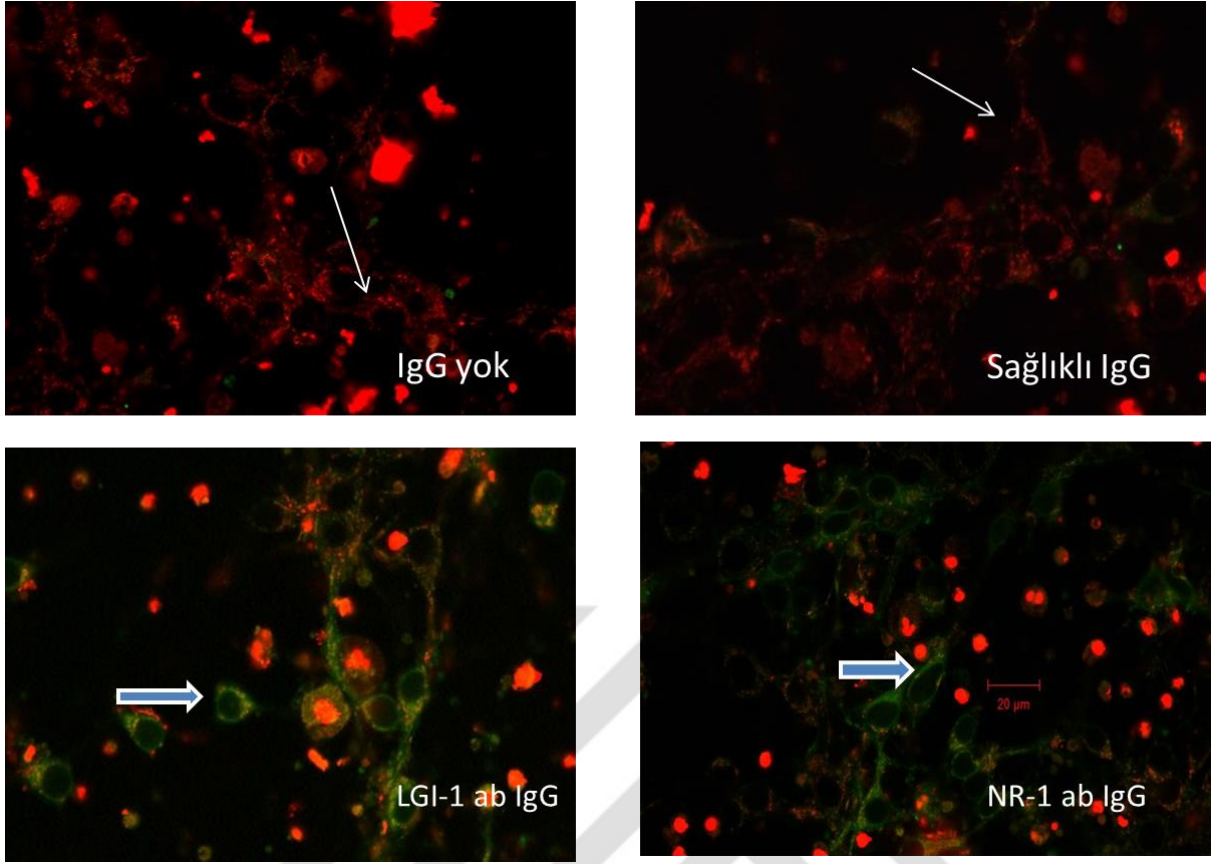
4.4 JC-1 Apoptoz Düzeyinin Belirlenmesi

IgG örnekleri ile yapılan toksisite deneylerinde nöronal ölünün 3. günde başladığı gözlemlendiği için tüm deneylerde üç günlük IgG inkübasyonu uygulandı. Toksisite deneylerinde saptanan nöron ölümünün apoptoz ile ilişkisinin gösterilmesi amacıyla JC-1 apoptoz testi yapıldı.

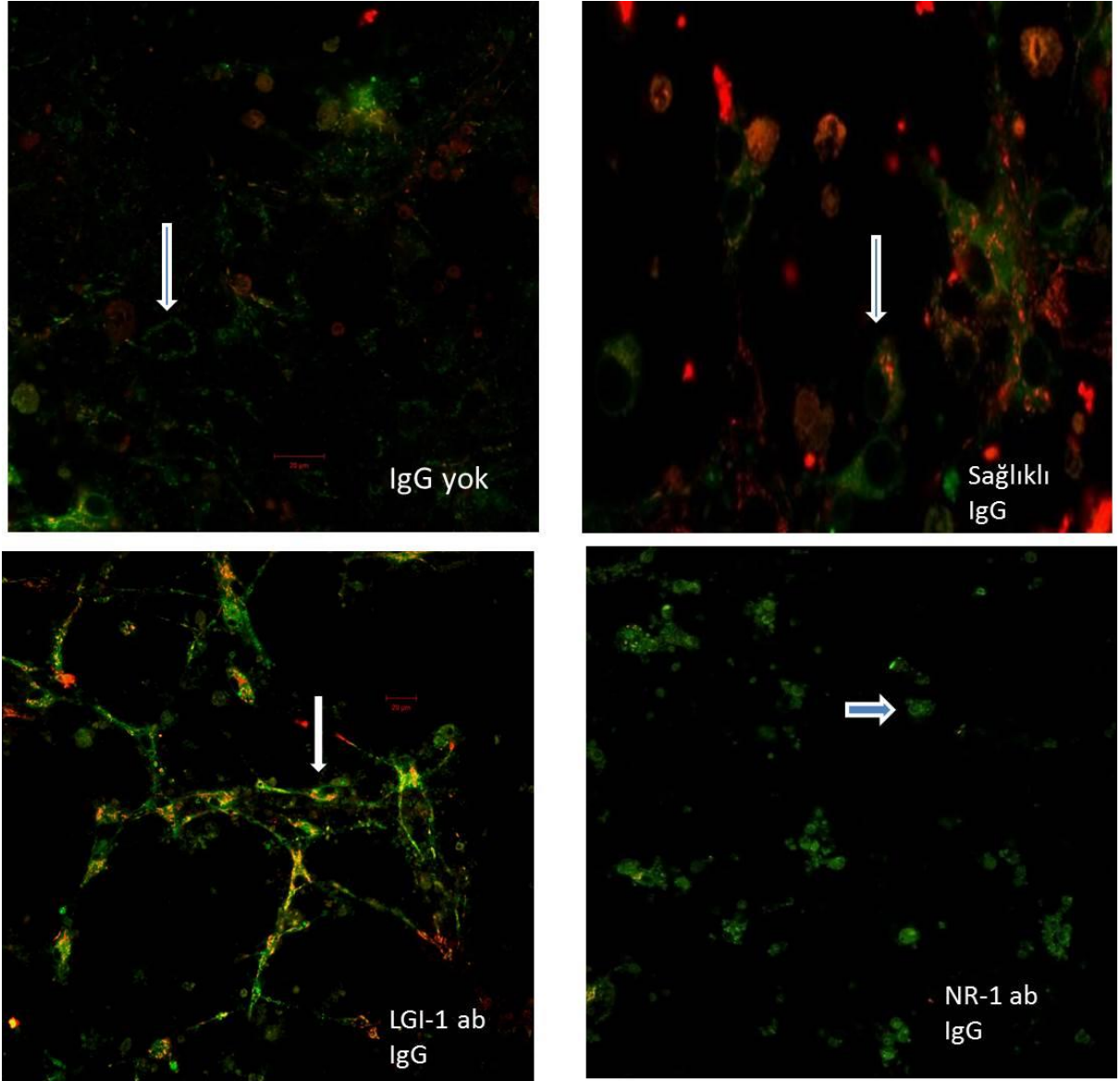
0 ve 7. gün kültürlerine sağlıklı, NMDAR antikor pozitif ve LGI-1 antikor pozitif IgG örnekleri uygulanarak 3. Günde JC-1 testi yapıldı. Hem 0. gün hem de 7. gün de LGI-1 antikor pozitif ve NMDAR antikor pozitif IgG uygulanan petrilere sağlıklı IgG uygulanan ve IgG uygulanmayan petrilere oranla anlamlı derecede yüksek JC-1 pozitif hücre saptandı (ANOVA ile 3. ve 7. gün için $p < 0.001$). Sağlıklı IgG uygulanan ve IgG uygulanmayan petrilere JC-1 pozitif hücre sayıları arasında anlamlı fark yoktu.



Şekil 4. 4.1. 0. ve 7.gün primer hipokampal nöron kültürlerinde 3 günlük IgG uygulanmasından sonra JC-1 pozitif (529nm, yeşil renk)/ JC-1 negatif (590nm, kırmızı renk). Dikey barlar standart sapmayı göstermektedir. ANOVA ve Tukey'in post-hoc testi ile IGG uygulanmayan kontrol grubuna göre **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$



Şekil 4.4.2 Hipokampus dokusundan elde edilen nöronları inkübasyonun 2. saatinde 0.2µl sağlıklı, LGI-1 ve NR -1 ab IgG eklenerek inkübasyonun 3gününde JC-1 boyaması 40 x yağlı objektif kullanılarak apoptoz düzeyleri belirlendi.(ince oklar hayatta kalan nöronları; kalın oklar ise ölen nöronları göstermektedir)



Şekil 4.4.3 Hipokampus dokusundan elde edilen nöronları inkübasyonun 7. gününde . 0.2µl sağlıklı, LGI-1 ve NR -1 ab IgG eklendi ve ardından 3gününde JC-1 boyaması boyaması 40 x yağlı objektif kullanılarak apoptoz düzeyleri belirlendi düzeyleri belirlendi (ince oklar hayatta kalan nöronları; kalın oklar ise ölen nöronları göstermektedir).

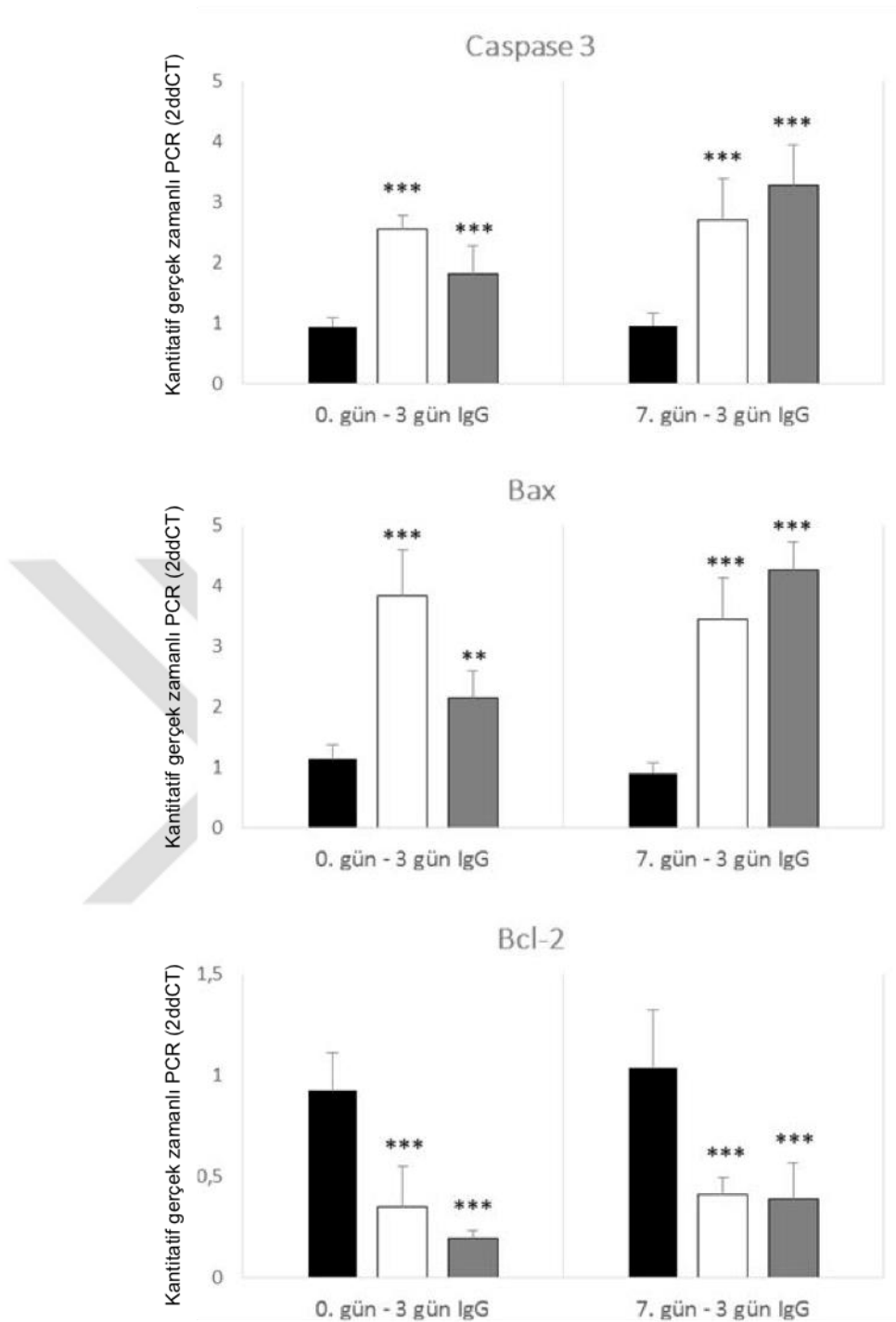
4.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Apoptatik Faktörlerin Sentezlenme Düzeylerinin Belirlenmesi

Sağkalım ve JC-1 deneylerinden sapladığımız hücre ölümü ve apoptozun doğrulanması amacıyla IgG uygulanmayan, sağlıklı IgG, LIG-1 IGG ve NMDAR IgG uygulanan hipokampal nöronlarda uygulamanın 3. gününde (önceki deneylerde apoptozun ilk saptandığı gün) temel apoptoz belirteçleri olan caspase3, BAX, ve BCL2 ‘nin m RNA ekspresyon düzeyleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile ölçüldü. Bu ölçümlerin sonucunda IgG uygulanmayan nöronlar temel alınarak 2ddCT (mRNA kat değişimi) değerleri elde edildi ve istatistiksel karşılaştırma yapıldı. Her bir IgG ve gün parametresi için 12 petri kullanıldı.

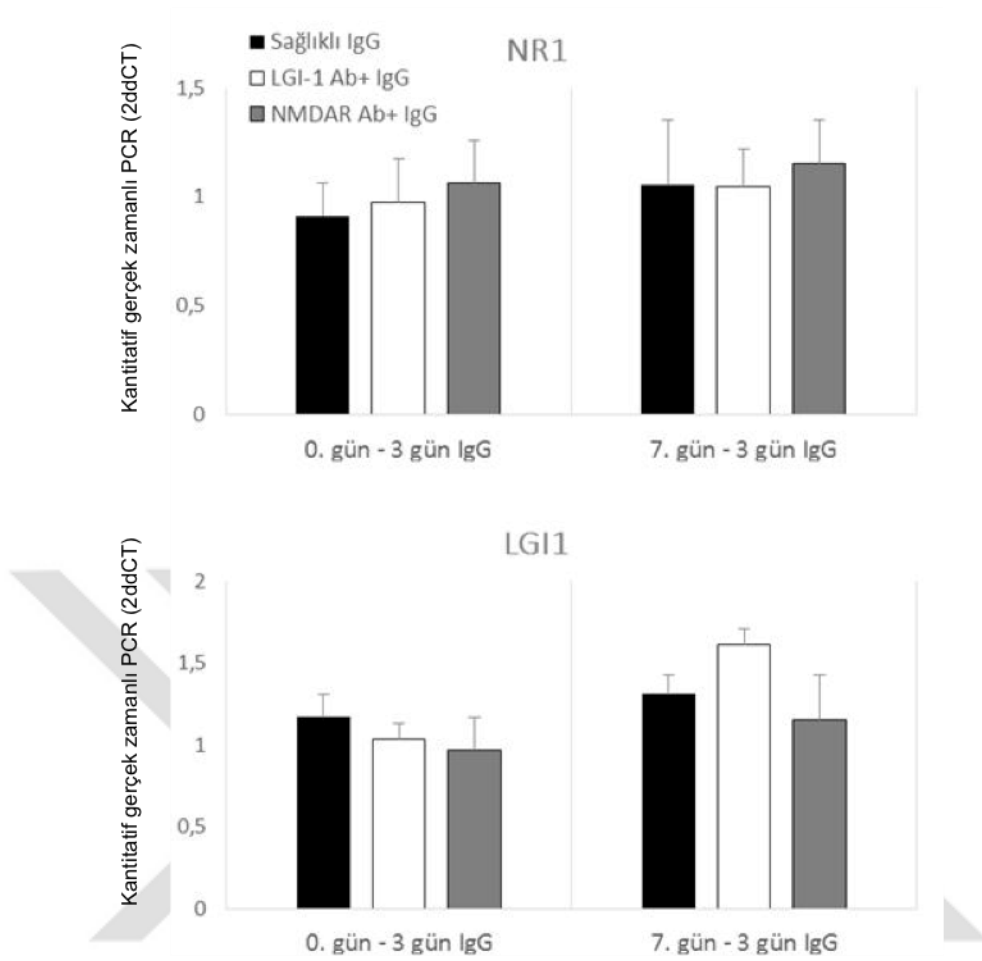
Hem 0. hem de 7. gün kültürlerinde proapoptatik caspase 3 ve Bax’ın ekspresyon düzeylerinin LIG-1 veya NMDAR IgG uygulanan nöronlarda sağlıklı IgG uygulanan nöronlara göre arttığı saptandı (ANOVA ile $p<0.001$).

Bununla paralel şekilde 0. ve 7. gün kültürlerinde LIG-1 ve NMDAR IgG uygulanan nöronlarda antiapoptatik BCL2’nin ekspresyon düzeyi anlamlı derecede azalmıştı (ANOVA ile $p<0.001$)

Apoptatik moleküllerin arttığını ve anti apoptatik moleküllerin azaldığını gösteren bu çalışma ile LIG-1 ve NMDAR IgG’nin apoptatik etkisi bir defa daha gösterilmiş oldu. Apoptoz yapıcı etkisinin otoantikorların hedef antijenlerinin ekspresyon değişikliği ile ilişkisini araştırmak için yapılan NR-1 ve LIG-1 mRNA ölçümlerinde 0. ve 7. gün kültürlerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. (ANOVA ile p değerleri NR-1 ekspresyonu için 0. Gün kültüründe $p=0.274$, 7. Gün kültüründe $p=0.196$. ANOVA ile p değerleri LIG-1 ekspresyonu için 0. Gün kültüründe $p=0.192$, 7. Gün kültüründe $p=0.412$).



Sekil 4.5.1. 0. ve 7. gün primer hipokampal nöron kültürlerinde 3 günlük IGG uygulanmasından sonra Caspase 3, Bax ve BCL2 ‘nin IgG uygulanmayan nöronlar temel alınarak hesaplanan relatif mRNA ekspresyon düzeyleri dikey barlar standart sapmayı göstermektedir. ANOVA ve Tukey’in post-hoc testi ile sağlıklı IgG uygulanan kontrol grubuna göre **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$



Şekil 4.5.2. 0. ve 7. gün primer hipokampal nöron kültürlerinde 3 günlük IgG uygulanmasından sonra NR-1 ve LGI-1 ‘nin IgG uygulanmayan nöronlar temel alınarak hesaplanan relatif mRNA ekspresyon düzeyleri dikey barlar standart sapmayı göstermektedir. ANOVA ve Tukey’in post-hoc testi ile sağlıklı IgG uygulanan kontrol grubuna göre **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

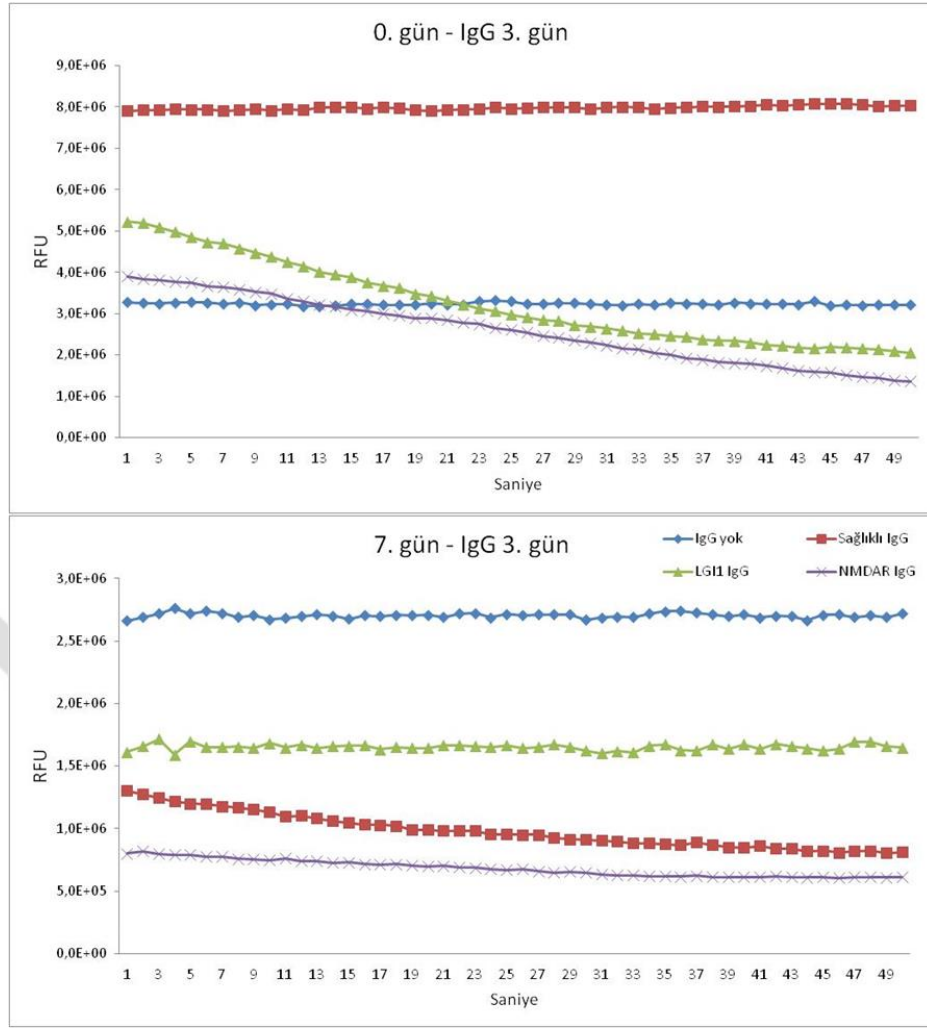
4.6 Fluo-4 Kalsiyum Görüntüleme

Önceki deneylerde saptadığımız nöronal apoptozun kalsiyum toksisitesi ile ilişkisini araştırmak için IgG uygulanan ve uygulanmayan nöronlarda Fluo-4 Kalsiyum görüntüleme ile spontan kalsiyum akım düzeyleri ölçüldü. . Hem 0.hem de 7. gün kültürlerinde farklı IgG uygulamaları yapılan nöronların kalsiyum akım düzeylerinin birbirlerinde anlamlı derecede farklı olduğu saptandı (Two –Way ANOVA $p < 0.001$).

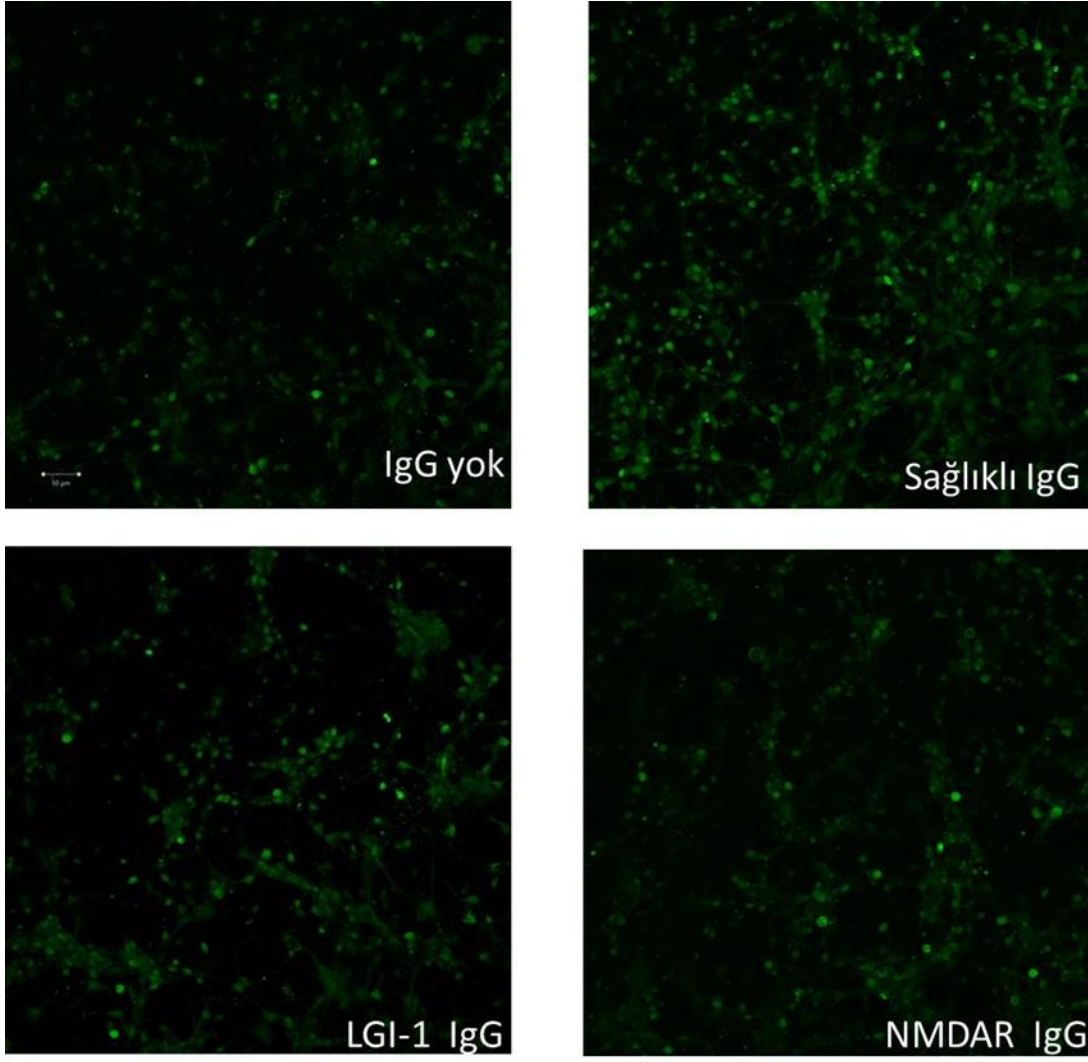
0. Günde IgG uygulanan nöronlardan sağlıklı IgG uygulaması yapılanların diğer üç gruptan anlamlı derecede yüksek kalsiyum akım düzeyine sahip olduğu saptandı (post hoc Bonferroni'nin testi ile $p < 0.001$). NR-1 IgG LGI-1 IgG uygulanan ve IgG uygulanmayan gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu. Bu sonuçlar sağlıklı IgG 'nin kalsiyum akımını arttırdığı ve NR-1 ve LGI-1 antikoru varlığının bu kalsiyum akımını artırıcı etkiyi ortadan kaldırdığını düşündürdü.

Bunların beraber sağlıklı IgG uygulanan ve IgG uygulanmayan nöronların spontan kalsiyum akımında zamana bağlı bir değişiklik gözlemlenmezken NR-1 ve LGI-1 antikoru pozitif IgG uygulanan nöronlarda 1. Ve 50. Saniyedeki ortalama kalsiyum akım değerlerinin anlamlı düzeyde farklı olduğu gözlemlendi (post hoc Bonferroni'nin testi ile $p < 0.001$).

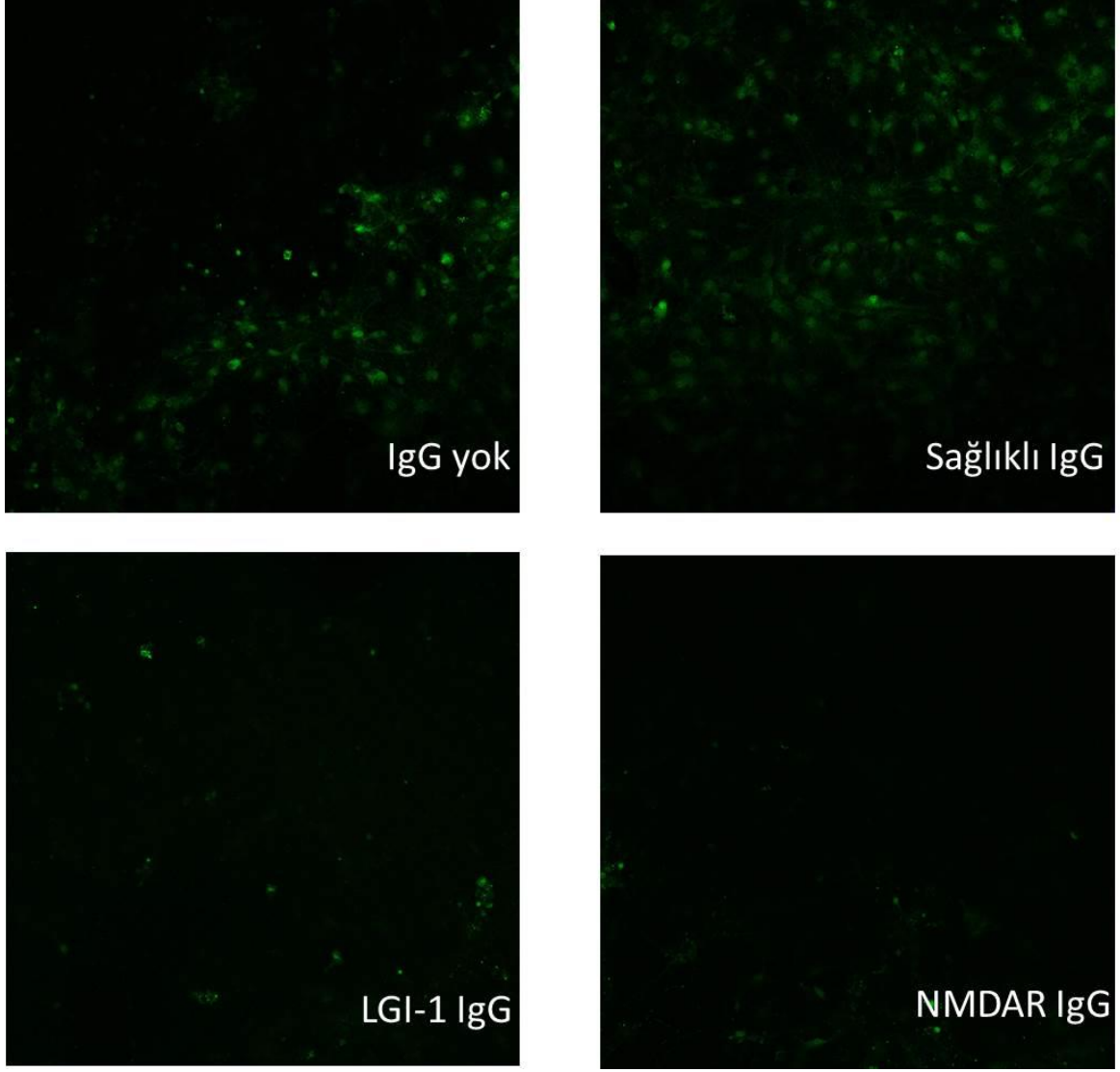
7. gün kültürlerinde IgG uygulanmayan nöronların kalsiyum akım düzeylerinde fark saptanmazken sağlıklı NR-1 ve LGI-1 IgG uygulanan nöronların kalsiyum akım düzeylerinin belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Two –Way ANOVA $p < 0.001$). Bunlardan LGI-1 IgG uygulanan nöronların kalsiyum akım düzeyleri sağlıklı ve NR-1 IgG uygulananlara göre anlamlı derecede yüksekti (post hoc Bonferroni'nin testi ile $p < 0.001$). Sağlıklı IgG ve NR-1 IgG uygulanan nöronlara bakıldığında iki grup arasında 14. saniyeye kadar anlamlı farklılık olduğu (post hoc Bonferroni'nin testi ile $p < 0.05$ ile $p < 0.001$ arasında). 15-50 saniye arasında ise anlamlı farklılığın kaybolduğu gözlemlendi.



Şekil 4.6.1 0. ve 7. gün primer hipokampal nöron kültürlerinde 3 günlük IgG uygulanmasından sonra Fluo-4 kalsiyum görüntülemeleri. Her grup için 200 er nöronun 50 saniye boyunca saniyede/ bir ölçülen RFU (relative fluorescen units) değerlerinin genel ortalaması görülmektedir. Two-way ANOVA 0. ve 7. günlerde $p < 0.001$.



Şekil 4.6.2 Hipokampal nöronlara inkübasyonun 2. saatinde IgG uygulanıp 3. gününde Ca²⁺iyon akımı ölçüldü. 20x objektif kullanılarak görüntü alındı.



Şekil 4.6.3 Hipokampal nöronlara inkübasyonun 7. gününde IgG eklendi ve 3 gün sonra Ca^{2+} iyonun akım değerleri ölçüldü. 20 x objektif kullanılarak görüntü alındı.

5.TARTIŞMA

NMDAR ve LGI1 ensefalitleri en fazla amnezi, epileptik nöbet ve psikoz ile ortaya çıkan, sıklıkla iki yanlı hipokampal atrofi ile sonuçlanan ve sekel olarak kalıcı hipokampal işlev bozukluğuna sebep olabilen hastalıklardır. Gelişen hipokampal atrofi, bellek bozukluğu, fokal temporal nöbet veya kişilik değişikliği gibi bulgulara sebep olabilir (Dalmau ve ark, 2007; Finke ve ark, 2016).

Günümüze kadar yapılan az sayıda çalışmada NMDAR antikörlerinin hasta olguların hipokampuslarında birikerek nöronal membran NMDAR ekspresyon internalizasyonuna sebep oldukları gösterilmiştir. Aynı şekilde primer hipokampal nöron kültürlerinde ve NMDAR antikoru pasif transferi yapılmış fare hipokampusunda da azalmış NMDAR ekspresyonu immünohistokimya ve western blot yöntemleriyle gösterilmiştir. Bu ekspresyon azalması ile eş zamanlı olarak farelerde bellek bozukluğu geliştiği de bilinmektedir (Planagumà ve ark, 2015).

LGI1 antikörlerinin uygulandığı primer nöron kültürlerinde ise nöronal sinapslarda LGI1-ADAM22 etkileşiminin engellenmesi sonucunda AMPA tipi glutamat reseptör ekspresyon düzeylerinde azalma meydana gelmiştir (Ohkawa ve ark, 2013).

Hücre kültürü deneylerinden ve bir kaç günlük pasif transfer uygulamalarından farklı olarak aylarca NMDAR ve LGI1 antikörlerine maruz kalan hasta hipokampusunda ise nöronal iyon kanalı ekspresyonlarının geçici azalmasına ek olarak belirgin hipokampal hücre kaybı gelişebilmektedir. Patoloji ve radyoloji çalışmaları bazı olgularda hücre kaybının kortikal nöronları ve bazal ganglion nöronlarını da kapsayabildiğini göstermektedir (Dalmau ve ark, 2007; Finke ve ark, 2016). Bununla beraber NMDAR ve LGI1 antikörlerinin nörotoksik etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda NMDAR ve LGI1 antikörlerine maruz kalan hipokampal nöronların önemli bir kısmının öldüğünü ve bunun en azından kısmen apoptotik mekanizmalarla olduğunu gösterildi. Sağlıklı IgG uygulanan hipokampal nöronlarda ise apoptotik ölüm çok az miktarda ve IgG uygulanmayan nöronlarla eşit düzeydeydi.

NMDAR'leri ile nöronal apoptoz arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Hipokampal nöronlar da dahil olmak üzere farklı anatomik bölgelere ait nöronların NMDAR aracılı mekanizmalarla geliştiği ve memantin gibi NMDAR antagonistleri ile nöronal ölümün engellendiği çeşitli hücre kültürü ve hayvan modeli deneylerinde gösterilmiştir (Chen ve ark,

2017; Ishimaru ve ark, 2016). İskemi-hipoperfüzyon hayvan modellerinde NMDAR antagonistlerinin nöronal apoptozu azaltıcı ve sağkalımı arttırıcı özellikleri bilinmektedir (Izumida ve ark, 2017; Ishimaru ve ark, 2016).

Bu sonuçlarla, NMDAR ekspresyonunu azalttığı bilinen NMDAR antikorlarının apoptozu arttırıcı etkisini gösteren çalışmamızın sonuçları çelişkili gibi görünmektedir. Ancak NMDAR işlevlerinin nöronal gelişmenin erken dönemlerinde nöronal apoptozu azaltıcı ve sağkalımı arttırıcı yönde geliştiği bilinmektedir. NMDAR işlevlerini veya ekspresyonunu azaltan kimyasal ve genetik işlemlerin nöronal progenitör hücre sağkalımını, proliferasyonunu ve migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Bagasrawala ve ark, 2016; Sha ve ark, 2013). Bununla uyumlu olarak intrauterin dönemde NMDAR antagonisti fensiklidine maruz bırakılma subventriküler progenitör hücre havuzunu azaltarak davranışsal ve bilişsel bozukluklara sebep olmaktadır (Toriumi ve ark, 2012).

Buna ek olarak NMDAR tüm glial hücre tipleri tarafından ifade edilmektedir. Bunlardan astrositler aşırı ekstraselüler glutamati eksitator aminoasit transporter (EAAT) molekülleriyle tamponlayarak glutamaterjik eksitotoksiteyi önlemektedirler (Kim ve ark, 2011). Ayrıca astrosit ve nöronlar arasındaki tripartit sinapslara nörotransmitter olarak salınan ATP moleküllerinin de nöronal sağkalımda rol oynadığı bilinmektedir (Burnstock, 2016). Bununla uyumlu olarak NMDAR'leri baskılanmış astrosit-nöron ko-kültürlerinde nöron sağkalımının azaldığı gösterilmiştir (Jimenez-Blasco ve ark, 2015). Dolayısıyla, NMDAR antikorlarının glial hücre sağkalımını azaltarak nöronlarda ölüm oranlarını arttırmaları mümkündür.

LGI1 molekülü ilk olarak bir glial tümör baskılayıcısı olarak dikkati çekmiş ve LGI1 ekspresyonu düşük tümörlerin daha hızlı seyirli ve malign özellikli olduğu gösterilmiştir (Gabellini ve ark, 2009; Zhu ve ark, 2014). Ayrıca mutasyon ile LGI1 işlevleri baskılanmış bir zebra balığı modelinde yaygın beyin alanlarında nöronal apoptoz ve epileptik nöbetler saptanmıştır (Teng ve ark, 2010). LGI1 mutasyonlarının saptandığı, işitme kaybı ve nöbetlerle seyreden bir otozomal dominant ailevi epilepsi hastalığı bulunmakta ve LGI1 reseptörü olan ADAM22 proteinini kodlayan gendeki mutasyonlar serebral atrofiye sebep olmaktadır (2 Klein ve ark, 2016; Walshe ve ark, 2008). Bu bulgular çalışmamızda saptadığımız LGI1 antikoru ilişkili nöronal ölüm ve apoptoz ile uyumlu gözükmektedir. Ayrıca önceki çalışmalarla uyumlu olarak LGI1 antikorları nöronal LGI1 ekspresyon düzeyini değiştirmemiştir (Ohkawa ve ark, 2013).

Nöronal gelişim ve başkalaşımın erken dönemlerindeki nöronlarda LGI1 ve NMDAR ekspresyonu bulunması ve moleküllerin eksikliği veya çalışmaması durumunda artmış nöron ölümünün ortaya çıkması anlamlıdır. Otoimmün ensefalit olgularında gelişen hipokampal atrofinin lokal progenitör hücreler tarafından kompanse edilmeye çalışılması ancak hastalığa sebep olan antikörlerin etkisiyle öterek bu kompensasyon işlevini yerine getirememeleri mümkündür.

NMDAR ve LGI1 antikörlerinin nöronal glutamat reseptör ekspresyonunu azalttığı bilinmektedir (Planagumà ve ark, 2015; Ohkawa ve ark, 2013). Bunun refleks olarak bir presinaptik glutamat sekresyonu artışına sebep olması mümkündür. Ayrıca antikörlerin glial hücreleri de öldürmeleri durumunda glutamat tamponlayan moleküller azalacak ve ekstraselüler kalsiyum konsantrasyonu yükselecektir. Bunun glutamaterjik nörotoksisteye sebep olması mümkündür. NMDAR ve LGI1 antikörleri tarafından uyarılan nöronal apoptozun altında yatan mekanizmaların anlaşılması için kalsiyum akım deneyleri yapıldı ve böylece hücre içine aşırı kalsiyum akımına bağlı nöronal ölüm olasılığı değerlendirildi. Ancak hem NMDAR hem de LGI1 antikoru uygulanan nöronlarda sağlıklı IgG uygulanan örneklerle kıyasla azalmış kalsiyum akım değerleri gözlemlendi. Bu sonuç NMDAR antikörlerinin NMDAR ekspresyonunu ve LGI1 antikörlerinin LGI1 ekspresyonunu azalttığını gösteren çalışmalarla uyumludur. Antikor etkisi altında glutamat reseptör düzeyleri azalmış nöronların hücre içine kalsiyum alımlarının azalmış olması beklenen bir sonuçtur.

Kalsiyum akımı çalışmalarında ilginç bir sonuç sağlıklı IgG uygulanan nöronlarda IgG uygulanmayan nöronlara göre artmış kalsiyum akımı saptanmasıydı. Antikörlerin ve immün komplekslerin CD20 ve Fcγ reseptörlerine bağlanarak kalsiyum akımını arttırdıkları gösterilmiştir (Walshe ve ark, 2008; Verma ve ark, 2011). Nöronların membranlarında düşük düzeyde de olsa ifade edildiği bilinen Fcγ reseptörlerinin artmış kalsiyum akımına sebep olup olmadığı gelecekteki çalışmalarda incelenmelidir.

Çalışmamızın önemli bir limitasyonu hasta sayısının antikor başına bir olgu ile sınırlı olmasıdır. Bu durum otoimmün ensefalitin nadir bir hastalık olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca bir kaç haftalık primer nöron kültürü ortamında gözlenebilecek nöronal rejenerasyon-dejenerasyon olaylarının sonuçları karıştırıcı bir etki yapmasını engellemek amacıyla 0. ve 7. gün kültürleri kullanıldı. Dolayısıyla sonuçlarımızın sadece çok erken yaştaki nöronlar için geçerli olması ve erişkin nöronlarda çalıştığımız antikörlerin aynı etkileri göstermiyor olmaları mümkündür. Bu sebeple çalışmamızın tercihen doku mimarisinin ve glia-nöron ilişkilerinin göreceli olarak korunduğu organotipik beyin kesit kültürlerinde yapılması

önerilebilir. Ayrıca NMDAR ve LGI1 antikorlarının glia sağkalımı ve glia-nöron etkileşimlerine olan etkilerinin ko-kültür çalışmaları ile incelenmesi uygun olacaktır.

Primer hipokampal nöron kültürleri permabilizasyon uygulanmadan serum antikorları ile karşılaştırıldığından sadece membran antikorlar saptanmakta ve hücre içi anijenlere karşı gelişmiş antikorlar gözlenmemektedir. Ancak çalışmamızda NMDAR alt aile üyelerinden NR1'in hem hasta serumu hem de ticari antikor uygulanan görüntülerde sadece hücre membranında değil hücre somasında da yer aldıkları görüldü. Hipokampus dokusunu ayırtırmak amacıyla ilk olarak papain enzimi kullanıldı. Ancak papain enzimin yüzey proteinlerini değiştirmenin yanı sıra hücre içi işlevleri de etkileyebildiği rapor edilmiştir (Cambier ve ark, 1977).

Sonuç olarak çalışmamızın sonuçları otoimmün ensefalit antikorlarının sadece işlevsel bozukluk yapmayıp nöron ölümüne de yol açtığını düşündürmektedir. Otoimmün ensefalitler nadir hastalıklar olmakla beraber iyon kanalı antikorlarının epilepsi ve psikotik hastalıklar gibi toplumda yaygın olarak gözlenen hastalıklarda da saptandığı bilinmektedir. Ayrıca glutamat reseptörü ve potasyum kanalı işlev bozuklukları pek çok nörolojik ve psikiyatrik hastalığın altında yatmaktadır. Bu sebeple çalışmamızın sonuçlarından toplum sağlığını olumsuz etkileyen geniş bir hastalık grubu ile ilgili çıkarımların yapılması mümkün olacaktır. Nöron kültürü ve patojenik antikorlarla yapılan çalışmalar progenitor hücrelerin sağkalımları ile ilgili de değerli bilgiler sağlayabilmektedir. Daha fazla sayıda olgu ile organotipik kesit kültürü ve hayvan modeli çalışmaları ile antikor, iyon kanalı ve nöronal sağkalım etkileşimleri ile ilgili daha geniş bilgi edinmek mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

Aidley DJ, Stanfield PR.(1996) *Ion channels: Molecules in action*. Cambridge University Press, Birinci baskı, Avustralya : 59-100,

Altman,J.and Das,G.D.(1965). Auto radiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335

Amaral DG, Insausti R: Hippocampal formation. Paxinos G (1990). *The Human Nervous System*. İkinci baskı. California:

Amaral, D. G., and Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591

Arıncı K, Elhan A. (2001) *Anatomi*. 3. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 318-321.

Armangue T, Titulaer MJ, Málaga I, Bataller L, Gabilondo I, Graus F, et al (2013). Pediatric anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis-clinical analysis and novel findings in a series of 20 patients. *J Pediatr*; 162:850-856.e2.

Baer K, Waldvogel HJ, Faull RL, Rees MI. (2009) Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: an immunohistochemical review. *Front Mol Neurosci*;2:25.

Bagasrawala I, Zecevic N, Radonjić NV. (2016). N-Methyl D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid Affects Human Cortical Development. *Front Neurosci.* Sep 30;10:435.

Barr ML, Klerman JA (1988): *The human nervous system*. Beşinci baskı. Philadelphia: JB Lippincott Comp,: 266-269

Bataller L, Dalmau JO (2004). Paraneoplastic disorders of the central nervous system: update on diagnostic criteria and treatment. *Semin Neurol* ; 24:461-71.

Beal MF (1992) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses. *Ann Neurol* 31: 119-130.

Becker EB, Zuliani L, Pettingill R, Lang B, Waters P, Dulneva A, et al.(2012). Contactin-associated protein-2 antibodies in non-paraneoplastic cerebellar ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;83:437–40.

Bernard G, Shevell MI. (2008) Channelopathies: A review. *Pediatric Neurology*; 38: 73-85.

Bezanilla F (2005). Voltage-gated ion channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. 4 (1): 34–48

Bien CG, Scheffer IE.(2011). Autoantibodies and epilepsy. *Epilepsia*; 52 Suppl 3:18–22.

Bien CG, Vincent A, Barnett MH, et al.(2012) Immunopathology of autoantibody-associated encephalitides: clues for pathogenesis. *Brain*. 2012; 135:1622–1638. Pt 5.

Brew, H.M., Hallows, J.L., Tempel, B.L., (2003). Hyperexcitability and reduced low threshold potassium currents in auditory neurons of mice lacking the channel subunit Kv1.1. *J. Physiol*. 548, 1–20.

Brown DG, Krupp JJ.(2006). N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) antagonists as potential pain therapeutics. *Curr Topics Med Chem* ;6:749.

Burnstock G.(2016) An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology*. 2016 May;104:4-17.

Cambier J. S., Viteteta E.S, Kettman J. R., Wetzell G. M., Uhr J. W.(1977) Effect of Papain-Mediated Cleavage of Cell Surface IgD on Tolerance Susceptibility of Murine B Cells. *The Journal Of Experimental Medicine*.

Cameron H.A and McKay,R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol*. 435, 406–417.

Cannon SC. (2007) Physiologic Principles Underlying Ion Channelopathies. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4: 174-183.

Carvajal-González A, Leite MI, Waters P, Woodhall M, Coutinho E, Balint B, et al.(2014) Glycine receptor antibodies in PERM and related syndromes: characteristics, clinical features and outcomes. *Brain* ;137(Pt 8):2178–92.

Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydinoglu AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E.(1993) Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Medicine*; 72:113-124.

Chambers, R.A. et al. (2004) Simulated apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. *Neuropsychopharmacology* 29, 747–758

Chen B, Wang G, Li W, Liu W, Lin R, Tao J, Jiang M, Chen L, Wang Y. Memantine (2017) Attenuates Cell Apoptosis by Suppressing the Calpain-Caspase-3 Pathway in an Experimental Model of Ischemic Stroke. *Exp Cell Res.* : S0014-4827(16)30450-5.

Chernova OB, Somerville RP, Cowell JK.(1998) A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene* 17(22):2873–81.

Chiewthanakul P, Sawanyawisuth K, Foocharoen C, Tiamkao S. (2012).Clinical features and predictive factors in neuropsychiatric lupus. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2012;30:55-60.

Choi DW. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.

Choi DW (1998a) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS* 11: 465-469.

Cojocaru IM, Cojocaru M.(2010). Reactions of the immune system in epilepsy. *Maedica (Buchar)* ;5(3):201–6.

Collingridge,G.(1987).Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330,604–605.

Collingridge,G.L.,Olsen,R.W.,Peters,J.,andSpedding,M.(2009).A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56,2–5.

Collins P: Embryology and development. Williams PL (1995). *Gray's Anatomy*. 38. bask1. London: Churchill Livingstone,249

Cotman, C. W., Geddes, J. W., Bridges, R. J., and Monaghan, D. T. (1989). Nmethyl-D-aspartate receptors and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 10, 603–605. discussion: 618–620.

Cotman, C., and Monaghan, D. (1989). Multiple excitatory amino acid receptor regulation of intracellular Ca^{2+} . Implications for aging and Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 568, 138–148.

Cowell JK.(2014). LGI1: from zebrafish to human epilepsy. *Prog Brain Res*;213:159–79.

Coyle IT, Bird SI, Evans RH, Gulley RL, Nadler JV, Nicklas WJ, Olney JW (1981)Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specifity, and mechanism of action. *Neurosci Res Prog Bul* 119: 331-427.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. (2001).NMDAR subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobio.*;11:327.

Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al.(2008) Anti-NMDA receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*;7(12):1091-8.

Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R.(2011) Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 10:63

Dalmau J, Rosenfeld MR. (2008).Paraneoplastic syndromes of the CNS. *Lancet Neurol* 7: 327-40.

Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, et al.(2007). Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol.* 61(1):25–36.

Damásio J, Leite MI, Coutinho E, Waters P, Woodhall M, Santos MA, et al.(2013). Progressive encephalomyelitis with rigidity and myoclonus: the first pediatric case with glycine receptor antibodies. *JAMA Neurol*;70(4):498–501.

Danbolt N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–10510.1016

Daw K, Ujihara N, Atkinson M, Powers AC.(1996). Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus exhibit similarities and differences in epitope recognition. *J Immunol.* 156:818-25.

Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A.(1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends Neurosci.* 22,391–397.

Dong C, Rovnaghi CR, Anand KJ.(2014). Ketamine affects the neurogenesis of rat fetal neural stem progenitor cells via the PI3K/Akt-p27 signaling pathway. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 101(5):355-63.

Du A, Jiang H, Xu L, An N, Liu H, Li Y, Zhang R (2014).Damage of hippocampal neurons in rats with chronic alcoholism. *Neural Regen Res* 9(17):1610-5.

Eric Lancaster, Eugenia Martinez Hernandez, Josep Dalmau, (2011). Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins *Neurology* 2;77:179–189

Farooqui AA, Horrocks LA(1991). Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res Rev* 16: 171-191.

Featherstone D. E., Shippey S. A. (2008). Regulation of synaptic transmission by ambient extracellular glutamate. *Neuroscientist* 14, 171–18110.1177

Finke C, Kopp UA, Pajkert A, Behrens JR, Leypoldt F, Wuerfel JT, Ploner CJ, Prüss H, Paul F.(2016) Structural Hippocampal Damage Following Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis. *Biol Psychiatry.* 1;79(9):727-34.

Flanagan EP, Kotsenas AL, Britton JW, McKeon A, Watson RE, Klein CJ, et al.(2015). Basal ganglia T1 hyperintensity in LGI1-autoantibody faciobrachial dystonic seizures *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2, e161.

Florance NR, Davis RL, Lam C, Szperka C, Zhou L, Ahmad S, et al.(2009) Anti-N-methyl-Daspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol*;66(1):11-8.

Friedman JI, Vrijenhoek T, Markx S, Janssen IM, van der Vliet WA, Faas BH, et al.(2008).CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy. *Mol Psychiatry*;13:261–6.

Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, et al.(2010) Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci*;107(8):3799–804.

Gabellini N, Masola V, Quartesan S, Oselladore B, Nobile C, Michelucci R, Curtarello M, Parolin C, Palù G.(2006) Increased expression of LGI1 gene triggers growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Cell Physiol.* 207(3):711-21.

Gabellini N, Masola V.(2009) Expression of LGI1 Impairs Proliferation and Survival of HeLa Cells. *Int J Cell Biol*;2009:417197.

Gable MS, Gavali S, Radner A, Tilley DH, Lee B, Dyner L, et al.(2009) Anti-NMDA receptor encephalitis: report of ten cases and comparison with viral encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;28(12):1421-9.

Gable MS, Sheriff H, Dalmau J, Tilley DH, Glaser CA.(2012). The frequency of autoimmune Nmethyl-D-aspartate receptor encephalitis sur passes that of individual viral etiologies in young individuals enrolled in the California Encephalitis Project. *Clin Infect Dis*;54(7): 899-904

Gastone G. Celesia (2001) Disorders of membrane channels or channelopathies. *Clinical Neurophysiology* 112 2±18

Geiger, J.R., Jonas, P. (2000). Dynamic control of presynaptic Ca(2+) inflow by fastinactivating K(+) channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* 28, 927–939.

Gibson DS, Banha J, Penque D, Costa L, Conrads TP, Cahill DJ, O'Brien JK, Rooney ME.(2010) Diagnostic and prognostic biomarker discovery strategies for autoimmune disorders. *J Proteomics*, 18;73(6):1045-60.

Glasper ER, Gould E(2013). Sexual experience restores age-related decline in adult neurogenesis and hippocampal function. *Hippocampus* 23(4):303-312.

Gold, A.E.and Kesner,R.P. (2005). The role of the CA 3subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus* 15, 808–814.

Goldberg, J.L., Espinosa, J.S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G.T., Barres, B.A. (2002). Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron*, 33:689-702.

Gulbis JM, Mann S, MacKinnon R (1999). "Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit". *Cell*. **97** (7): 943–5

Guyton AC, Hall JE.(2001). *Tıbbi Fizyoloji*. Çavuşoğlu H (Çev. Ed.). 1. Baskı, İstanbul: Nobel.

Gürgöze MK, Poyrazoğlu MH, Mirza M ve ark.(2006). Mezengioproliferatif glomerulonefrit ile birlikte olan bir Isaacs sendromu vakası. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*; 49: 312-314.

Head, K., Gong, S. & Joseph, S. (2007) Defining the expression pattern of the LGI1 gene in BAC transgenic mice. *Mamm. Genome*, 18, 328–337.

Hernandes MS, Troncone LRP.(2009).Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *Journal of Neural Transmission*, 116: 1551-1560

Hinoi, E.; Takarada, T.; Ueshima, T.; Tsuchihashi, Y.; Yoneda, Y.(2004).Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur. J. Biochem.* 271, 1–13.

Horresh I, Poliak S, Grant S, Brecht D, Rasband MN, Peles E.(2008). Multiple molecular interactions determine the clustering of Caspr2 and Kv1 channels in myelinated axons. *J Neurosci*;28:14213–22.

Höftberger R, Titulaer MJ, Sabater L, Dome B, Rózsás A, Hegedus B, et al.(2013). Encephalitis and GABAB receptor antibodies: novel findings in a new case series of 20 patients. *Neurology*;81:1500-1506.

Hsiao, C.F., Kaur, G., Vong, A., Bawa, H., Chandler, S.H. (2009). Participation of Kv1 channels in control of membrane excitability and burst generation in mesencephalic V neurons. *J. Neurophysiol.* 101, 1407–1418.

Hunt DL, Castillo PE.(2012). Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr Opin Neurobiol*;22(3):496–508.

Iizuka T, Sakai F.(2008). Anti-nMDA receptor encephalitis--clinical manifestations and pathophysiology. *Brain Nerve*;60(9):1047-60

Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, et al.(2010a). Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain Sep*;133:2734–48.

Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al.(2010b) N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain*;133(Pt 6):1655-67.

Irani SR, Bien CG, Lang B.(2011). Autoimmune epilepsies. *Curr Opin Neurol*;24(2):146–53

Irani SR, Michell AW, Lang B, Pettingill P, Waters P, Johnson MR, et al(2011). Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol* 69:892–900

Irani SR, Vincent A.(2011). NMDA receptor antibody encephalitis. *Curr Neurol Neurosci Rep* ;11(3):298–304.

Isaacson RL.(2002). Unsolved mysteries: The hippocampus. *Behav Cogn Neurosci Rev* 1(2):87-107.

Ishimaru Y, Sumino A, Kajioka D, Shibagaki F, Yamamuro A, Yoshioka Y, Maeda S.(2016). Apelin protects against NMDA-induced retinal neuronal death via an APJ receptor by activating Akt and ERK1/2, and suppressing TNF- α expression in mice. *J Pharmacol Sci.* S1347-8613(16)30170-0.

Izumida H, Takagi H, Fujisawa H, Iwata N, Nakashima K, Takeuchi S, Iwama S, Namba T, Komatu Y, Kaibuchi K, Oiso Y, Arima H, Sugimura Y.(2017). NMDA receptor antagonist prevents cell death in the hippocampal dentate gyrus induced by hyponatremia accompanying adrenal insufficiency in rats. *Exp Neurol*.287(Pt 1):65-74.

Jansson LC, Åkerman KE.(2014) The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J Neural Transm (Vienna)*;121(8):819-36.

Jenny J. Linnoila, Myrna R. Rosenfeld, , and Josep Dalmau (2014). Neuronal Surface Antibody-Mediated Autoimmune Encephalitis *Semin Neurol.* 34(4): 458–466.

Jimenez-Blasco D, Santofimia-Castaño P, Gonzalez A, Almeida A, Bolaños JP.(2015) Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. *Cell Death Differ.* (11):1877-89.

Johnson G(1989). Recent advances in excitatory amino acid research. *Ann Rep Med Chem* 24: 41-50.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. (1993.) *Sinir dokusu ve sinir sistemi, Temel Histoloji*, 8.basım, Baris kitabevi, Istanbul, 152–180.

Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, et al.(2002) Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet Mar* ;30:335–41.

Kemp JA, McKernan RM.(2002). NMDAR pathways as drug targets. *Nature Neurosci* 5:1039.

Kesner,R.P.(2007). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn.Mem.* 14, 771–781.

Kew, J.N.; Kemp, J.A.(2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179, 4–29.

Kim K, Lee SG, Kegelmann TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB.(2011) Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol.* 226(10):2484-93.

Klein CJ, Lennon VA, Aston PA,McKeon A, O'Toole O, Quek A, et al.(2013). Insights fromLGI1 and CASPR2 potassium channel complex autoantibody subtyping. *JAMA Neurol* ;70:229–34.

Klein KM, Pendziwiat M, Cohen R, Appenzeller S, de Kovel CG, Rosenow F, Koeleman BP, Kuhlenbäumer G, Sheintuch L, Veksler R, Friedman A, Afawi Z, Helbig I.(2016). Autosomal dominant epilepsy with auditory features: a new LGI1 family including a phenocopy with cortical dysplasia. *J Neurol*;263(1):11-6.

Koek W, Woods JH, Winger GD(1988). MK-801, a proposed noncompetitive antagonists of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 969-974.

Kohr G.(2006). NMDAR function: Subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res.* 326:439.

Korkotian E, Botalova A, Odegova T, Segal M.(2015).Chronic exposure to alcohol alters network activity and morphology of cultured hippocampal neurons. *Neurotoxicology* 47:62-71.

Kostic M., Zivkovic N., Stojanovic I.(2013).Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity, *Rev. Neurosci.* 24 71–88

Krick S., Platoshyn O., Sweeney M., Kim H. and Yuan J. X. (2001) Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 280, C970–C979.

Kuş İ, Zararsız İ, Ögetürk M, Yılmaz HR(2007) Formaldehit nörotoksitesitesine bağlı hipokampusta gelişen oksidatif hasar ve melatonin hormonunun koruyucu etkisi: Deneysel bir çalışma. *Fırat Tıp Dergisi* 12(4): 256-260.

Kutsuwada,T.,Kashiwabuchi,N.,Mori,H.,Sakimura,K.,Kushiya,E.,Araki,K., Et al.(1992).Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358, 36–41.

Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al.(2010) Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* ;9(8):776–85.

Lancaster E, Dalmau J. (2012).Neuronal autoantigens—pathogenesis, associated disorders and antibody *Nature Reviews Neurology* 8, 380-390

Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, et al.(2011) Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol*;69:303–11.

Lehmann-Horn F, Jurkatt-Rott K.(1999).Voltage gated ion channels and hereditary disease. *Physiological Reviews*, 79(4): 1317-1372.

Limbrick DD, Sombati S, DeLorenzo RJ.(2003). Calcium influx constitutes the ionic basis for the maintance of glutamateinduced extended neuronal depolarization associated with hippocampal neuronal death. *Cell Calcium* 33(2): 69-91.

Lindsay, R.M., Thoenen, H., Barde, Y.A.(1985). Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor. *Dev Bio.*, 112:319-328.

Lisman, J.E. & Grace, A.A.(2005). The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46, 703–713.

Lisman,J.E.,Fellous,J.M.,andWang,X.J.(1998).A role for NMDA-receptor channels in working memory. *Nat.Neurosci.* 1,273–275.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000). "Section 21.3, Molecular Properties of Voltage-Gated Ion Channels". *Molecular Cell Biology (4th ed.)*. New York: Scientific American Books.

Lucas Dr, Newhuse JP.(1957). The toxic effect of sodium Lglutamate on the inner layers of the retina. *JAMA Arch Ophthalmol* 58: 193-201.

Lynch JW.(2004).Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* ;84(4):1051–95.

Malatesta, M., Furlan, S., Mariotti, R., Zancanaro, C. & Nobile, C. (2009) Distribution of the epilepsy-related Lgi1 protein in rat cortical neurons. *Histochem. Cell Biol.*, 132, 505–513.

Malter MP, Frisch C, Schoene-Bake JC, Helmstaedter C, Wandinger KP, Stoecker W, et al.(2014). Outcome of limbic encephalitis with VGKC-complex antibodies: relation to antigenic specificity. *J Neurol*;261:1695–705.

Managhan DT, Holets VR, Toy DW, Cotman CW.(1986). Anatomical distribution of four pharmacological distinct 3H-L-glutamate binding sites. *Nature* 321: 519-522.

Margerison JH, Corsellis JA.(1966). Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*; 89(3):499-530.

Martin,S.J.,Grimwood,P.D.,andMorris,R.G.(2000).Synaptic plasticity and memory :an evaluation of the hypothesis. *Annu.Rev.Neurosci.* 23,649–711.

Mas N, Saiz A, Leite MI, Waters P, Baron M, Castaño D, et al.(2011). Antiglycine-receptor encephalomyelitis with rigidity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;82(12):1399–401.

McKeon A, Martinez-Hernandez E, Lancaster E, Matsumoto JY, Harvey RJ, McEvoy KM, et al.(2013) Glycine receptor autoimmune spectrum with stiff-man syndrome phenotype. *JAMA Neurol*;70(1):44–50.

Meguro,H.,Mori,H.,Araki,K.,Kushiya,E.,Kutsuwada,T.,Yamazaki,M., etal.(1992).Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor Channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 357,70–74.

Mehta A., Prabhakar M. , KumarP. , Deshmukh R., Sharma P.L.(2013). Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders, *Eur. J. Pharmacol*698 6–18.

Meldrum, B.S.(2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *J. Nutr* 130, 1007s–1015s.

Miller, F.D., Kaplan, D.R.(2003). Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Curr Opin Neurobiol*, 13:391-398.

Ming, G.L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 29: 365–402,

Mondadori, C., Weiskrantz, L., Buerki, H., Petschke, F., and Fagg, G.E. (1989). NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning performance in animals. *Exp. Brain Res.* 75, 449–456.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540

Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Saenz A, Poza JJ, Galan J, et al. (2002). Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet* 11:1119–28.

Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354, 31–37.

Morris, R.G. (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* 9, 3040–3057.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774–776.

Moser EI, Kropff E, Moser MB. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci* 31:69–89.

Moser MB, Rowland DC, Moser EI. (2015). Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(2):a021808.

Moser, M.B. & Moser, E.I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608–619

Muller D, Joly M, Lynch G. (1988): Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 242: 1694–1697.

Muona M, Fukata Y, Anttonen AK, Laari A, Palotie A, Pihko H, Lönnqvist T, Valanne L, Somer M, Fukata M, Lehesjoki AE.(2016). Dysfunctional ADAM22 implicated in progressive encephalopathy with cortical atrophy and epilepsy. *Neurol Genet*. 2016 Jan 21;2(1):e46

Nakashiba, T. et al. (2008) Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* 319, 1260–1264

Nakazawa,K.,McHugh,T.J.,Wilson,M.A.,andTonegawa,S.(2004). NMDA receptors,place cells and hippocampal spatial memory. *Nat. Rev.Neurosci*. 5, 361–372.

Nakazawa,K.,Quirk,M.C.,Chitwood, R.A.,Watanabe,M.,Yeckel, M. F.,Sun,L.D.,etal.(2002). Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 297, 211–218.

Nishizawa Y: Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci* 69: 369-381, 2001.

Niswender CM, Conn PJ.(2010). Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. *Ann Rev Pharm Tox*; 50:295–322.

Obrenovitch T.P., Urenjak J. (1997).Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury, *J. Neurotrauma* 14 677–698

Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, Watanabe M, Watanabe O, Fukata M.(2013). Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. *J Neurosci*. 13;33(46):18161-74.

Olney JW, Sharpe LG.(1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*. 17;166(903):386.

Orrenius S, Ankarcrona M, Nicotera P.(1996). Mechanisms of calcium-related cell death. *Adv Neurol* 71: 137-151.

Ottman R, Risch N, Hauser WA, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, et al.(1995) Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet* 10(1):56–60.

Ozmen E, Ozsoy SY, Donmez N, Ozsoy B, Yumuşak N.(2014). The protective effect of L-carnitine against hippocampal damage due to experimental formaldehyde intoxication in rats. *Biotech Histochem* 89(5):336-341.

Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S.(2012).Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub* 24(2):152-158.

Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB.(1992). Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology* 42: 1931-7.

Planagumà J, Leypoldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Aguilar E, Titulaer MJ, Petit-Pedrol M, Jain A, Balice-Gordon R, Lakadamyali M, Graus F, Maldonado R, Dalmau J.(2015). Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain*;138(Pt 1):94-109.

Prüss H, Dalmau J, Harms L, et al.(2012).Retrospective analysis of NMDA receptor antibodies in testing. *Nat Rev Neurol.*; 8(7):380–390.

Prüss H, Finke C, Hölte M, Hofmann J, Klingbeil C, Probst C, et al.(2012). N-methyl-Daspartate receptor antibodies in herpes simplex encephalitis. *Ann Neurol*;72(6): 902-11.

Raisman G, Covan WM, Powell TPS.(1965). The extrinsic afferent, commissural and association of the hippocampus. *Brain* 88: 963-966.

Ribeiro, P.A., Sbragia, L., Gilioli, R., Langone, F., Conte, F.F. & LopesCendes, I. (2008) Expression profile of Lgi1 gene in mouse brain during development. *J. Mol. Neurosci*,35, 323–329.

Roland Dominic G. Jamora, T. Umapathi, Louis C.S. Tan.(2006). Case report Finger flexion resembling focal dystonia in Isaacs' syndrome. *Parkinsonism and Related Disorders*; 12: 61-63.

Rossi M,Mead S, Collinge J, Rudge P, Vincent A.(2015). Neuronal antibodies in patients with suspected or confirmed sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;86:692–4.

Sadler TW.(1990). *Langman's medical embryology*. Altıncı baskı, Baltimore: Williams & Wilkins Press: 356.

Sanna G, Piga M, Terryberry JW, Peltz MT, Giagheddu S, Satta L, et al.(2000) Central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: cerebral imaging and serological profile in patients with and without overt neuropsychiatric manifestations. *Lupus* ;9:573- 583.

Sans N, et al.(2000). A developmental change in NMDAR-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci.*;20:1260

Sato, H.; Tamba, M.; Ishii, T.; Bannai, S.(1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 11455–11458.

Schneggenburger R, Zhou Z, Konnerth A, Neher E.(1993).Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* 11: 133-143.

Sendrowski K, Sobaniec W(2013). Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacol Rep* 65(3):555-565,

Seress L, Abrahám H, Horváth Z, Dóczi T, Janszky J, Klemm J, Byrne R, Bakay RA.(2009). Survival of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus in humans with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg* 111(6):1237-1247.

Seress L.(2007). Comparative anatomy of the hippocampal dentate gyrus in adult and developing rodents, nonhuman primates and humans. *Prog. Brain Res*;163:23–41.

Sha S, Qu WJ, Li L, Lu ZH, Chen L, Yu WF, Chen L.(2013). Sigma-1 receptor knockout impairs neurogenesis in dentate gyrus of adult hippocampus via down-regulation of NMDA receptors. *CNS Neurosci Ther.*19(9):705-13.

Shah AB, Ramdass R.(2004). Immunological Movement Disorders.

Shahrizaila N, Yuki N.(2013). Bickerstaff brainstem encephalitis and Fisher syndrome: anti-GQ1b antibody syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;84:576-583.

Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L.A., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144–147

Shin YW, Lee ST, Shin JW, Moon J, Lim JA, Byun JI, et al.(2013). VGKC-complex/LGI1-antibody encephalitis: clinical manifestations and response to immunotherapy. *J Neuroimmunol*;265:75–81.

Shu, Y., Yu, Y., Yang, J., McCormick, D.A. (2007). Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K⁺ current. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 11453–11458.

Siesjö BK(1988).Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit C Med* 16: 954-963.

Siesjö BK.(1990).Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol* 30: 3-9.

Siesjö BK, Memezawa H, Smith ML.(1991).Neurocytotoxicity: pharmacological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 5: 755-767.

Siesjö BK.(1992).Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. I. Pathophysiology. *J Neurosurg* 77: 169-184..

Solimena M, Butler MH, De Camilli P.(1994).GAD, diabetes, and Stiff-Man syndrome: some progress and more questions. *J Endocrinol Invest*;17(7):509-20.

Songur A, Özen OA,Sarsılmaz M. (2001). Hipokampus. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 21(5):427-431.

Spiers, H. J., Maguire, E. A., & Burgess, N. (2001). Hippocampal amnesia. *Neurocase*, 7, 357–382.

Stocca G, Vicini S.(1998). Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDARs in developing rat cortical neurons. *J Physiol.* 507:13.

Stonehouse B, Gupte G, Wassmer E, Whitehouse WP.(2003). Acute disseminated encephalomyelitis: recognition in the hands of general paediatricians. *Arch Dis Child* 88: 122- 4.

Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, et al.(2006). Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like2. *N Engl J Med*;354:1370–7.

Sukajintanakarn D, Mitrabhakdi E, Phanthumchinda K.(2006). Acquired Neuromyotonia (isaacs syndrome): A Case Report with Autonomic Physiologic Studies. *J Med Assoc Thai* ,89(8): 1308-1312.

Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, Matsui M, Seto H, Ono T, Kurachi M.(2005).Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cereb Cortex* 15 (2):187–193.

Teng Y, Xie X, Walker S, Rempala G, Kozlowski DJ, Mumm JS, Cowell JK.(2010). Knockdown of zebrafish Lgi1a results in abnormal development, brain defects and a seizure-like behavioral phenotype. *Hum Mol Genet.* 2010 Nov 15;19(22):4409-20.

Thompson G. J., Langlais C., Cain K., Conley E. C. and Cohen G. M. (2001) Elevated extracellular [K⁺] inhibits death-receptor- and chemical-mediated apoptosis prior to caspase activation and cytochrome c release. *Biochem. J.* 357, 137–145.

Tien RD, Felsberg GJ, Crain B.(1992). Normal anatomy of the hippocampus and adjacent temporal lobe: high-resolution fast spin-echo MR images in volunteers correlated with cadaveric histologic sections. *AJR Am J Roentgenol* 159(6):1309-1313.

Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangué T, Glaser C, Iizuka T, et al.(2013). Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol*;12(2):157–65.

Toriumi K, Mouri A, Narusawa S, Aoyama Y, Ikawa N, Lu L, Nagai T, Mamiya T, Kim HC, Nabeshima T.(2012). Prenatal NMDA receptor antagonism impaired proliferation of neuronal progenitor, leading to fewer glutamatergic neurons in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology.*;37(6):1387-96.

Tovar KR, Westbrook GL.(1999). The incorporation of NMDARs with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*;19:4180.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R.(2010). Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharm Rev.* 62:405–496.

Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH.(2008).B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12474–12479.

Tuzun E, Kinay D, Hacohen Y, Aysal F, Vincent A.(2013). Guillain–Barre-like syndrome associated with lung adenocarcinoma and CASPR2 antibodies. *Muscle Nerve* 48:836–7.

Van Sonderen A, Thijs RD, Coenders EC, Jiskoot LC, Sanchez E, de Bruijn MA, van Coevorden-Hameete MH, Wirtz PW, Schreurs MW, Sillevs Smitt PA, Titulaer MJ.(2016).Anti-LGI1 encephalitis: Clinical syndrome and long-term follow-up. *Neurology*.87(14):1449-1456.

Venkatesan A.(2015). Epidemiology and outcomes of acute encephalitis. *Curr Opin Neurol*;28:277-282.

Verma S, Hoffmann FW, Kumar M, Huang Z, Roe K, Nguyen-Wu E, Hashimoto AS, Hoffmann PR.(2011). Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses. *J Immunol.* 15;186(4):2127-37.

Villalba M., Bockaert J. and Journot L. (1997) Concomitant induction of apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells following serum and potassium withdrawal. *Neuroreport* 8, 981–985

Vinogradova O.S. (2001).Hippocampus as Comparator: Role of the Two Input and Two Output Systems of the Hippocampus in Selection and Registration of Information *HIPPOCAMPUS* 11:578–598

Vynogradova I, Savitski V, Heckmann JG.(2014). Hemichorea associated with CASPR2 antibody. *Tremor Other Hyperkinet Mov* (N Y);4:239.

Walshe CA, Beers SA, French RR, Chan CH, Johnson PW, Packham GK, Glennie MJ, Cragg MS.(2008). Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 20;283(25):16971-84.

Watanabe M, et al.(1992). Developmental changes in distribution of NMDAR channel subunit mrnas. *Neuroreport.*;3:1138

Watkins JC, Krogsgaard LP, Honore T.(1990). Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci*; 11 (J):25-33.

Waxman EA, Lynch DR.(2005). N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* ;11(1):37–49

Wenzel, H.J., Vacher, H., Clark, E., et al.(2007). Structural consequences of Kcna1 gene deletion and transfer in the mouse hippocampus. *Epilepsia* 48, 2023–2046.

Wikinski SI1, Acosta GB.(1995).Role of excitatory amino acids in neuropathology. *Medicina*;55(4):355-65.

Willard S.S., Koochekpour S.(2013). Glutamate signaling in benign and malignant disorders: current status future perspectives, and therapeutic implications *Int. J. Biol. Sci.* 9 728–742.

Wong, R.O., Ghosh, A.(2002). Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci*, 3:803-812.

Xia S., Lampe P. A., Deshmukh M., Yang A., Brown B. S., Rothman S. M., Johnson E. M. Jr and Yu S. P. (2002). Multiple channel interactions explain the protection of sympathetic neurons from apoptosis induced by nerve growth factor deprivation. *J. Neurosci.* 22, 114–122

Ye, Z.C., Sontheimer, H. .(1999). Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res.* 59, 4383–4391.

Young AB, Fagg GE.(1990). Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *TIPS* 11: 126-133.

Zhou, Y.D., Lee, S., Jin, Z., et al.(2009). Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nat. Med.* 15, 1208–1214.

Zhu YH, Liu H, Zhang LY, Zeng T, Song Y, Qin YR, Li L, Liu L, Li J, Zhang B, Guan XY.(2014). Downregulation of LGI1 promotes tumor metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 35(5):1154-61.

Zuhorn F, Hubenthal A, Rogalewski A, Dogan Onugoren M, Glatzel M, Bien CG, et al. (2014). Creutzfeldt–Jakob disease mimicking autoimmune encephalitis with CASPR2 antibodies. *BMC Neurol*;14:227.

URL

<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/pathways/>

http://www2.biomed.cas.cz/d331/eng/glutamate_eng/glutamat_eng.html

<http://www.hindawi.com/journals/pd/2013/196028/fig1/>

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10883/

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)**

Sayı : 38328770 –48
Konu: Etik Kurulu Kararı

18/07/2014

Sayın Neşe AYŞİT

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “İyon Kanalı Antikorlarının Nöronal Membran Protein Ekspresyonu ve Sağkalımı Üzerine Etkileri” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:

-Karar Formu (1 sayfa)

18/07/2014-İ.FİL

Tel: (0216)681 51 37
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No: 19,34810
Kavacık/BEYKOZ



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
18/07/2014	28		Neşe AYŞİT

“İyon Kanalı Antikorlarının Nöronal Membran Protein Ekspresyonu ve Sağkalımı Üzerine Etkileri” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Doç. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1304

Konu : Prof. Dr. Betül BAYKAL hk.

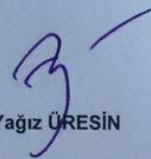
Tarih : 21.11.2016

Sayın Prof. Dr. Betül BAYKAL
Nöroloji Anabilim Dalı

İlgi : Nöroloji Anabilim Dalının 03/11/2016 gün ve 398379 sayılı yazı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2016/1295 dosya numaralı "Epilepsi Hastalarında İnflamasyonun Klinik Bulgular ile İlişkisi ve Tedavideki Rolü" başlıklı çalışma kurulumuzun 11/11/2016 gün ve 19 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

