



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA LİTYUM-PILOKARPİN İLE OLUŞTURULAN
TEMPORAL LOB EPİLEPSİSİ MODELİNDE NÜKLEER
MANYETİK REZONANS (NMR) SPEKTROMETRİSİ
KULLANILARAK GERÇEKLEŞTİRİLEN METABOLOMİK
PROFİLLEME İLE EPİLEPTOGENEZ SÜRECİNE AİT OLASI
BİYOBELİRTEÇLERİN BELİRLENMESİ**

FATMA MERVE ANTMEN
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güldal Süyen

İSTANBUL-2025



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA LİTYUM-PİLOKARPİN İLE OLUŞTURULAN
TEMPORAL LOB EPİLEPSİSİ MODELİNDE NÜKLEER
MANYETİK REZONANS (NMR) SPEKTROMETRİSİ
KULLANILARAK GERÇEKLEŞTİRİLEN METABOLOMİK
PROFİLLEME İLE EPİLEPTOGENEZ SÜRECİNE AİT OLASI
BİYOBELİRTEÇLERİN BELİRLENMESİ**

FATMA MERVE ANTMEN
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güldal Süyen

İSTANBUL-2025

BEYAN

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

10.03.2025

Fatma Merve Antmen

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez sürecim boyunca her zaman yanımda olan; bilimsel bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana yol gösteren, iyi ve başarılı bir bilim insanı olma yolunda tüm imkânları sağlayan ve her koşulda destekleyici yaklaşımıyla beni teşvik eden değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güldal Süyen'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisine kıymetli rehberliği ve desteği için sonsuz minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Bu tezi gerçekleştirmemi sağlayan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Mustafa Serteser'e, özellikle metabolitlerin istatistiksel analizi konusunda her aşamada bilgi, destek ve tecrübelerini sunarak sorularımı yanıtlayan Sayın Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal ve Prof. Dr. Osman Uğur Sezerman'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Hande Yapışlar, Doç. Dr. Meltem Kolgazi ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ergen'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Zorlu deney süreçlerinde yanımda olan ve her zaman desteklerini hissettiren değerli arkadaşlarım Dr. Ekin Döngel Dayanç ve Dr. Emir Matpan başta olmak üzere, çalışmalarına katkı sağlayan tüm kıymetli ekip arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim.

Hayatımın her anında, her koşulda yanımda olan, bana koşulsuz sevgi ve destek sunan canım annem Gülin Tansev ve canım babam Ali Esat Tansev'e tüm kalbimle sonsuz teşekkür ediyorum. Maddi ve manevi desteğinizle her zorluğu aşmamı sağladınız ve bana daima güç verdiniz. Sizin desteğiniz olmasaydı bugünlere gelmem mümkün olmazdı. Son olarak, sevgili eşim Anıl Berkay Antmen ve canım kızım Fatma Aslı Antmen'e, her zaman yanımda olduğunuz, bana inancınızla verdiğiniz güç, destek ve sevgi için sonsuz teşekkür ediyorum. Varlığınız, bu süreçte bana en büyük motivasyon kaynağı oldu. Sizler benim en büyük şanssınız, iyi ki varsınız.

Bu çalışma, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 79, Proje Kodu: TDK-2023-79).



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER	5
2.1 Epilepsi	5
2.1.1 Epilepsi tanımı ve tarihçesi.....	5
2.1.2 Epilepsi epidemiyolojisi	6
2.1.3 Epilepsilerin sınıflandırılması	7
2.1.3.1 Nöbet tipine göre sınıflandırma	8
2.1.3.2 Epilepsi tipine göre sınıflandırma	9
2.1.3.3 Epilepsi sendromuna göre sınıflandırma	11
2.1.3.4 Etiyolojiye göre sınıflandırma	11
2.1.3.4.1 Yaygın yapısal etiyolojiler	11
2.1.3.4.2 Epilepsinin genetik nedenleri	12
2.1.3.4.3 Epilepsinin enfeksiyöz nedenleri	12
2.1.3.4.4 Epilepsinin ve nöbetlerin metabolik nedenleri	12
2.1.3.4.1 Epilepsinin immün nedenleri	13
2.1.3.4.2 İdiyopatik durumlar.....	13
2.1.4 Temporal lob epilepsisi (TLE).....	14
2.1.4.1 TLE'nin klasik patolojik özellikleri.....	15
2.1.4.1.1 Hipokampal skleroz (HS)	15
2.1.4.1.2 Fokal kortikal displazi (FKD)	18
2.2 Epileptogenez	18
2.2.1 Status epileptikus (SE)	21
2.3 Deneysel Temporal Lob Epilepsisi Hayvan Modelleri	21
2.3.1 Kainik asit (KA) modeli	21
2.3.2 Pilokarpin modeli	23
2.3.3 Lityum-pilokarpin modeli	24
2.4 Metabolomik	25
2.4.1 Metabolomik yaklaşımlar	26

2.4.2	Metabolomikte analitik teknikler	27
2.4.2.1	Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi	29
2.4.3	Epilepsi ve epileptogenezde NMR spektroskopisi ile metabolik incelemeler	32
2.5	Biyobelirteç Nedir?	34
2.5.1	Biyobelirteçlerin sınıflandırılması	35
2.5.2	Epilepsi, epileptogenez ve biyobelirteç çalışmaları	36
3	GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1	Deney Hayvanları	39
3.2	Kimyasallar	39
3.3	Grup Büyüklüğünün Belirlenmesi	40
3.4	SE İndüksiyonu	41
3.5	Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması	42
3.6	NMR Spektrometrisi için Numunelerin Hazırlanması ve NMR Süreci	43
3.7	İstatistiksel Analiz	43
4	BULGULAR	45
4.1	Epileptogenez Sürecinde Plazmaya Ait Metabolik Profillemeye Bulguları... ..	45
4.1.1	Plazmadaki metabolik değişimlerin genel profili	45
4.1.2	Plazmadaki belirli metabolitlerin değişimi	46
4.1.3	Plazma metabolitlerinin metabolik yolak analizi	51
4.1.3.1	Glisin, serin ve treonin metabolizması	51
4.1.3.2	Birincil safra asidi biyosentezi	52
4.1.3.3	Piruvat metabolizması	52
4.1.3.4	Glikoliz/Glikoneogenez	52
4.1.3.5	Arjinin ve prolin metabolizması	52
4.2	Epileptogenez Sürecinde İdrara Ait Metabolik Profillemeye Bulguları	53
4.2.1	İdrardaki metabolik değişimlerin genel profili	53
4.2.2	İdrardaki belirli metabolitlerin değişimi	54
4.2.3	İdrar metabolitlerinin metabolik yolak analizi	65
4.2.3.1	Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	65
4.2.3.2	Gliksilat ve dikarboksilat metabolizması	66
4.2.3.3	Glisin, serin ve treonin metabolizması	66
4.2.3.4	TKA döngüsü	66
4.2.3.5	Pirüvik asit (piruvat) metabolizması	67
4.2.3.6	Glikoliz/glukoneogenez	67
4.2.3.7	Pirimidin metabolizması	67
4.2.3.8	Pentoz fosfat yolağı	67
4.2.3.9	Kafein metabolizması	68
4.2.3.10	Taurin ve hipotaurin metabolizması	68
4.2.3.11	Pürin metabolizması	68
4.2.3.12	Selenokomponent metabolizması	68
4.2.3.13	Primer safra asidi biyosentezi	69
4.3	Epileptogenez Sürecinde Öne Çıkan Metabolik Yolaklar ve İlgili Metabolitler	70

5	TARTIŞMA.....	72
6	SONUÇ.....	94
7	KAYNAKLAR.....	95
8	EKLER.....	116
	EK 1. Etik Kurul Onayı.....	116
9	ÖZGEÇMİŞ.....	118



KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
ATP	Adenozin trifosfat
1-MH	1-metilhistidin
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CA	Cornu Ammonis
Ca⁺²	Kalsiyum
COSY	Korelasyon spektroskopisi
CRT	Kreatin taşıyıcı protein
DG	Dentat girus
DHODH	Dihidroorotat dehidrojenaz
DHP	Dihidroprimidinaz
DMG	N,N-dimetilglisin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMSO₂	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAm	DNA metilasyonu
DPC	DNA-protein çapraz bağları
DPD	Dihidroprimidin dehidrojenaz
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EEG	Elektroensefalogram
ERK1/2	Hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar 1 ve 2
FKD	Fokal kortikal displazi
FMO	Flavin monooksijenaz
GABA	γ -aminobütirikasit
GAERS	Genetik absans epilepsili sıçanlar
GK	Gaz kromatografisi
GlyR	Glisin reseptörü
GlyT	Glisin taşıyıcıları
GPRC6	G protein-bağlı reseptör sınıf C grup 6
HF	Hipokampal formasyon

HMBC	Heteronükleer çoklu bağ tutarlılığı
HMGB1	Yüksek hareketlilik grubu kutu proteini 1
HS	Hipokampal skleroz
HSQC	Heteronükleer tekli kuantum tutarlılığı
IL-1β	İnterlökin 1 β
ILAE	Uluslararası Epilepsi ile Mücadele Ligi
IP3	İnositol trifosfat
2B	İki boyutlu
KA	Kainik asit
KAR	KA reseptörü
KBB	Kan beyin bariyeri
KD	Katlanma değişiklikleri
KS	Kütle spektrometrisi
LDH	Laktat dehidrojenaz
m/z	Kütle-yük oranı
MCT	Monokarboksilat taşıyıcıları
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sistemi
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mTLE	Mezial TLE
NAPDH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (Hidrojenli)
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMR	Nükleer manyetik rezonans
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOESY	Nükleer Overhauser etki spektroskopisi
nTLE	Neokortikal TLE
OPLS-DA	Ortogonal kısmi en küçük kareler diskriminant analizi
PTZ	Pentilentetrazol
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDH	Süksinat dehidrojenaz

SE	Status epileptikus
SK	Sıvı kromatografisi
SSADH	Süksinik semialdehit dehidrojenaz
STN	Spontan tekrarlayan nöbetler
SUDEP	Ani beklenmedik epilepsi ölümü
TKA	Trikarboksilik asit
TLE	Temporal lob epilepsisi
TMA	Trimetilamin
TMAO	Trimetilamin-N-oksit
TMAU	Trimetilaminüri
UMP	Uridin monofosfat
VEEG	Video EEG
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
YFO	Yüksek frekanslı osilasyonlar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. ILAE 2017 kapsamında epilepsilerin sınıflandırılması	8
Şekil 2. ILAE 2017 nöbet tipleri sınıflandırması: genişletilmiş versiyon.....	9
Şekil 3. Temporal lobun nöroanatomik gösterimi ve ilgili nöbet semptomları ve psikiyatrik semptomlar: (A) işitsel halüsinasyonlar; (B) görselhalüsinasyon; (C) visseral-duyusal veya otonom semptom; (D) depresyon; (E) anksiyete bozuklukları, depresyon; (F) kaçınma davranışı ve korku tepkisi	14
Şekil 4. İnsan beyнинin limbik sistemi: hipokampus, amigdala ve talamus	16
Şekil 5. Hipokampusün çok katmanlı yapısı.....	16
Şekil 6. Hipokampus ve bölgesel anatomi şeması	17
Şekil 7. Epileptogenez süreci	19
Şekil 8. Genomik, transkriptomik ve proteomik gibi çeşitli omik bilimlerine genel bir bakış (BioRender.com ile oluşturuldu.): Metabolomik, genomun nihai çıktısını temsil ederken, çevresel faktörlerden gelen girdileri de içerir.....	26
Şekil 9. Metabolik araştırmalar için iş akışı (BioRender.com ile oluşturuldu.).....	27
Şekil 10. NMR spektrometresinin şematik sunumu: manyetik alan, mıknatıs ve dedektör gibi çeşitli bileşenler arasındaki ilişki	30
Şekil 11. Güç analizi verileri.....	41
Şekil 12. Plazma örneklerinde epileptogenezin üç farklı zaman noktası için iki bileşenli OPLS-DA modelinin skor grafiği: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf için NMR verileri.....	46
Şekil 13. Plazma örneklerinde önemli ölçüde değişmiş metabolitler: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf NMR verileri için t-testi istatistikleri.....	47
Şekil 14. NMR plazma metabolitleri verilerinin volkan grafiği analizi: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf	50
Şekil 15. İdrar örneklerinde epileptogenezin üç farklı zaman noktası için iki bileşenli OPLS-DA modelinin skor grafiği: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf için NMR verileri.....	54
Şekil 16. İdrar örneklerinde önemli ölçüde değişmiş metabolitler: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf NMR verileri için t-testi istatistikleri.....	56

Şekil 17. NMR idrar metabolitleri verilerinin volkan grafiği analizi: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf 63

Şekil 18. Epileptogenezde etkin metabolik yollar ve ilgili kilit metabolitler..... 71



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. NMR spektroskopisi ve KS tekniklerinin metabolomik araştırmalarda analitik bir araç olarak avantajları ve sınırlamaları.....	29
Tablo 2. Biyobelirteç kategorileri, tanımı ve temel özellikleri	35
Tablo 3. Wamil ve arkadaşları (1989) tarafından uyarlanan Racine'nin (1972) ölçeği.....	42
Tablo 4. Epileptogenezin akut fazı için, plazmada $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler	48
Tablo 5. Epileptogenezin latent fazı için, plazmada $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler	48
Tablo 6. Epileptogenezin kronik fazı için, plazmada $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler	49
Tablo 7. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatikselsel olarak önemli ölçüde değişen plazma metabolitleri.....	51
Tablo 8. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatikselsel olarak önemli ölçüde değişen plazma metabolitleri ve metabolik yollar.....	53
Tablo 9. Epileptogenezin akut fazında, idrarda $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler	57
Tablo 10. Epileptogenezin latent fazında, idrarda $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler	59
Tablo 11. Epileptogenezin kronik fazında, idrarda $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler	61
Tablo 12. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatikselsel olarak önemli ölçüde değişen idrar metabolitleri.....	64
Tablo 13. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatikselsel olarak önemli ölçüde değişen idrar metabolitleri ve metabolik yollar.....	69

ÖZET

Sıçanlarda Lityum-Pilokarpin ile Oluşturulan Temporal Lob Epilepsisi Modelinde Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometrisi Kullanılarak Gerçekleştirilen Metabolomik Profilleme ile Epileptogenez Sürecine Ait Olası Biyobelirteçlerin Belirlenmesi

Temporal lob epilepsisi (TLE), sıklıkla beyin hasarı sonrası gelişen, tekrarlayan ve kendiliğinden oluşan nöbetlerle karakterize bir epilepsi türüdür. Epileptogenez olarak adlandırılan bu süreçte, normal beyin yapısı zamanla epileptik hale gelir. Tanıda elektroensefalogram (EEG) kullanılsa da, epilepsi gelişme riskini önceden tahmin etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, periferal örneklerle tespit edilebilecek biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında, lityum-pilokarpin ile indüklenen sıçan TLE modelinde epileptogenezin akut, latent ve kronik evrelerinde plazma ve idrar metabolomik profili NMR spektroskopisiyle analiz edilmiştir. SE, lityum klorür ve düşük doz tekrarlayan pilokarpin enjeksiyonlarıyla indüklenmiştir. Kan ve idrar örnekleri sırasıyla SE sonrası 48. saat, 1. ve 6. haftada toplanmıştır. Elde edilen veriler MetaboAnalyst 6.0 ile analiz edilmiş, OPLS-DA ve volkan grafikleriyle anlamlı metabolit değişimleri değerlendirilmiştir. Bulgular, farklı evrelere özgü metabolit değişimlerini ortaya koymuştur. Plazma analizlerinde, akut fazda dimetil sülfoksit ve kreatinin düzeyleri azalırken, glisin ve kreatin düzeyleri artmıştır. Latent fazda yalnızca pirüvik asitte artış gözlenmiştir. Kronik fazda ise laktik asit, pirüvik asit ve süksinik asit düzeylerinde artış saptanmıştır. İdrar örneklerinde, akut fazda asetik asit, timol ve trimetilamin gibi metabolitler artarken, TCA döngüsüyle ilişkili birçok metabolit azalmıştır. Teobromin, taurin ve allantoin düzeyleri hem akut hem de latent fazda düşmüştür. Kronik fazda ise pimelik asit, tigliglisin ve ksanturik asit düzeylerinde azalma izlenmiştir. Bu metabolitler, glikoliz, TCA döngüsü ve amino asit metabolizmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, epileptogenez evrelerinin belirlenmesi ve uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutarken, TLE'nin altında yatan mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Epileptogenez, Metabolomik, NMR, Biyobelirteç, Sıçan

ABSTRACT

Determination of Potential Biomarkers of the Epileptogenic Process by Metabolomic Profiling Using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometry in a Lithium Pilocarpine-Induced Temporal Lobe Epilepsy Model in Rats

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a common form of epilepsy characterized by recurrent, spontaneous seizures, often following an initial brain injury. This transformation, known as epileptogenesis, involves the gradual development of a normal brain into an epileptic one. Although electroencephalography (EEG) is the standard diagnostic tool, it lacks predictive power in identifying individuals at risk of developing epilepsy. Therefore, there is a critical need for peripheral biomarkers that can reflect the different stages of epileptogenesis. In this study, a lithium-pilocarpine-induced rat model of TLE was used to investigate plasma and urine metabolomic profiles during the acute, latent, and chronic phases of epileptogenesis. Status epilepticus (SE) was induced through lithium chloride and repeated low-dose pilocarpine injections. Blood and urine samples were collected at 48 hours, 1 week, and 6 weeks post-SE. Metabolites were analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and data were processed via MetaboAnalyst 6.0, employing OPLS-DA and volcano plot analyses. The results revealed distinct phase-specific metabolic changes. In plasma, acute phase showed decreased dimethyl sulfoxide and creatinine, with increased glycine and creatine; latent phase showed elevated pyruvate only; while the chronic phase showed increased lactate, pyruvate, and succinate. Urine samples indicated elevated acetic acid, thymol, and trimethylamine during the acute phase, alongside significant reductions in TCA cycle metabolites. Theobromine, taurine, and allantoin levels decreased in both acute and latent phases, while pimelic acid, tiglylglycine, and xanthurenic acid levels decreased during the chronic phase. These findings contribute to identifying stage-specific metabolic biomarkers and elucidating the underlying mechanisms of epileptogenesis in TLE.

Keywords: Epileptogenesis, Metabolomics, NMR, Biomarker, Rat

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelindeki epilepsi vakalarının önemli bir kısmını oluşturan temporal lob epilepsisi (TLE), yetişkinlerde en sık görülen fokal epilepsi türü olarak kabul edilmektedir ve genellikle cerrahi tedavi gerektiren dirençli epilepsi vakalarıyla ilişkilidir (1, 2). TLE, temporal lobdan kaynaklanan, tekrarlayıcı ve kendiliğinden gelişen nöbetlerle karakterizedir (3). Epilepsinin ortaya çıkış nedeni birçok hastada tam olarak bilinmese de, inme, travmatik beyin yaralanmaları, enfeksiyonlar, genetik mutasyonlar ve otoimmün hastalıklar gibi beyin fonksiyonlarını etkileyen çeşitli faktörler bu duruma yol açabilmektedir (4). TLE hastalarında nöbetlerin sık görülmesinin yanı sıra, hastaların önemli bir bölümünün antiepileptik tedavilere yanıt vermediği bilinmektedir (5-7). Bu durum, epilepsi araştırmalarında antiepileptik ilaçların hangi hastalarda etkili olabileceğini öngörmek ve hastalığın ilerleyişini değerlendirmek amacıyla epilepsi ile ilişkili biyobelirteçlerin tanımlanmasına yönelik bir gereksinim doğurmaktadır.

Epileptogenez, sağlıklı bir beyinde spontan tekrarlayan nöbetlerin (STN) oluştuğu ve epilepsiye yol açan hücrel olayların kaskadını içeren süreç olarak tanımlanır. Bu süreç üç ana döneme ayrılır: (1) beyinde inme veya travmatik beyin hasarı gibi zarar verici bir olayın meydana geldiği akut dönem, (2) hasara bağlı moleküler ve hücrel değişimlerin gerçekleştiği ancak epileptik nöbetlerin gözlemlenmediği latent dönem ve (3) STN'nin ortaya çıktığı kronik dönem (8-10). İnsanlarda latent dönemin aylarca hatta yıllarca sürebileceği dikkat çekicidir (10). Bugüne dek, beyne zarar veren bir olayın ardından bireyin epileptogenez sürecine girip girmediğini belirleyebilecek bir biyobelirteç keşfedilememiştir. Ayrıca, epileptogenezin her bir aşamasını temsil edebilecek özgün biyobelirteçler de henüz tanımlanmamıştır. Bu nedenle, epilepsi gelişiminin önlenmesi veya nöbetlerin seyrinin hafifletilmesi amacıyla yeni anti-epileptojenik stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacak şekilde, epileptogenez sürecini ve evrelerini yansıtan biyobelirteçlerin belirlenmesi acil bir ihtiyaçtır.

Epilepsi mekanizmaları, beyni STN'ye yatkın hale getiren ve nöral devrelerde anatomik veya moleküler değişikliklere neden olan biyolojik süreçleri kapsamaktadır

(8). Ancak, normal bir nöronal devrenin nasıl nöbete duyarlı hale geldiği ya da epileptogenezin hangi mekanizmalarla tetiklendiği halen tam olarak anlaşılamamıştır (11). Bunun yanı sıra, epilepsi etiyolojisinden bağımsız olarak, nöbetlerin başlaması (iktogenez), uzun süre devam etmesi ve ardından iyileşme sürecinin desteklenmesi, beynin yüksek düzeyde enerji ihtiyacı doğurmasına yol açmaktadır. Temel ve translasyonel çalışmalar, epileptik nöbetlerin ve beyin metabolizmasının birbirini etkileyen karmaşık ve çift yönlü bir ilişkiye sahip olduğunu ve bu ilişkinin nöbetlerin zararlı etkilerini artıran bir kısır döngü oluşturduğunu ortaya koymaktadır (12).

Metabolomik, farklı fizyolojik durumları ve çevresel değişimlere verilen yanıtları anlamada kritik bir bilim dalıdır. Özellikle sağlık ve hastalık koşullarında metabolitlerin, biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde kilit rol oynayan temel bileşenler olarak önemli bilgiler sunduğu bilinmektedir (13-15). Bu bağlamda, metabolomik yaklaşımlar, hastalık mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi açısından vazgeçilmez bir araç olarak öne çıkmaktadır. Son yıllarda, epilepsinin metabolik bir etiyoloji ile tetiklenebileceği rapor edilmiştir (16, 17). Ayrıca, epileptik nöbetlerin metabolik değişikliklere yol açtığı da ifade edilmektedir (17). Mevcut literatür verileri, metabolomiklerin epilepsi tanısını destekleyici bir yöntem olarak kullanılabilirliğini ve yeni nesil anti-nöbet tedavi hedeflerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir (18).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, temel amacımız epileptogenezin her dönemine özgü metabolit farklılıklarını belirlemek ve epileptogenez sürecine ilişkin potansiyel biyobelirteçleri tanımlamaktır. Bu amaç doğrultusunda, klinikte uygulanabilirliği yüksek ve non-invaziv olan plazma ve idrar örnekleri kullanılarak bu metabolit farklılıkları detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Ayrıca, her döneme özgü olarak belirlenen metabolitlerin rol oynadığı hücresel mekanizmaların aydınlatılması da çalışmanın bir diğer önemli hedefi olmuştur. Ek olarak, epileptogenezin her dönemine özgü olarak tanımlanan metabolit farklılıkları ve bu metabolitlerin ilişkili olduğu metabolik yollar, bireyler arasındaki biyokimyasal varyasyonları ortaya koyarak epilepsiye yönelik kişiselleştirilmiş tanı ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ışık tutacaktır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Epilepsi

2.1.1 Epilepsi tanımı ve tarihçesi

Dünya çapında 70 milyondan fazla insanı etkileyen epilepsi, tahmin edilemeyen sıklıklarla ve tekrarlayan epileptik nöbetler oluşturmak için kalıcı eğilim gösteren nörolojik bir bozukluktur. Uluslararası Epilepsi ile Mücadele Lig'i (ILAE) tarafından 2014 yılında detaylı olarak yapılan tanımlamaya göre; 24 saat ara ile açığa çıkan en az iki spontane, herhangi tetikleyici etkisi olmayan faktörün (alkol, ilaçlar vb.) bulunmadığı nöbetlere sahip olanlar, bir spontane nöbet ve iki nöbetten sonra ilerleyen 10 yıl içerisinde en az %60 olasılıkla rekürren nöbetlerin açığa çıkması riskine sahip olanlar ve bir epilepsi sendromu tanısı alan kişileri epilepsi hastası olarak tanımlamaktadır (3).

Epilepsi, pek çok nörobiyolojik, bilişsel ve psikolojik etkileri bünyesinde barındırdığı için özellikle bir hastalıktan ziyade bir bozukluklar ailesi olarak ifade edilir (3, 19). Epilepsi tanısının doğru olarak konulabilmesi için hastadan ve tanıklarından detaylı bir öykü alınmalıdır çünkü tek bir nöbet öyküsü o kişinin epilepsi hastası olduğunu yansıtmamaktadır. Bunun nedeni çoklu, epileptik olmayan paroksizmal olayların nöbetleri taklit edebilmesidir (20). İlk nöbetinde değerlendirilen 219 hasta ile yapılan bir araştırma ile hastaların %17'sinin epileptik değil "nöbet taklidi" geçirdiği tespit edilmiştir (21).

Epilepsinin tarihçesi insan varlığı kadar eski olmakla birlikte, epileptik nöbetin detaylı olarak ilk tanımı, Mezopotamya'da bulunan Akad dilinde yazılmış olan M.Ö. 2000'den kalma bir tablette yer almaktadır (19). Akabinde, çeşitli epileptik nöbet türlerini tanımlayan ve nöbet türlerinin farklı sonuçlarına göre kategorize eden bir tablet Babilliler tarafından tanımlanmıştır (22, 23). Ancak, antik çağ süresince, tıp dünyasında bile epilepsinin fiziksel bir hastalık olarak tanımlanmasından ziyade, gizli ve şeytani etkilerden kaynaklandığına dair yaygın bir görüş kabul görmüştür (24, 25).

Bu görüş, Hipokrat tarafından net bir şekilde reddedilmiştir ve epilepsinin beyin bir bozukluğu olduğuna dair hipotez öne sürülmüştür (22). Rönesans dönemi ile birlikte özellikle anatomi, patoloji, kimya ve eczacılık alanlarındaki hızlı gelişmeleri takiben epilepsi fiziksel bir hastalık süreci olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (25). 19. yüzyılın sonlarında, İngiliz nörolog John Hughlings Jackson tarafından epilepsinin ilk bilimsel sınıflandırması yapılmıştır. Jackson, nöbetlerin başladığı beyin bölgesine göre epilepsiyi sınıflandırmış ve bu sınıflandırma, modern epileptolojinin temelini oluşturmuştur (26). Ardından, kuruluşu olan 1909 yılından günümüze ILAE, epilepsilerin sınıflandırılmasını sürekli olarak geliştirmektedir (16). Aynı zamanda 1900'lü yıllarda tıp alanındaki gelişmeler sayesinde gerçekleştirilen çalışmalar ve özellikle beyin aktivitesini ölçmek için kullanılan elektroensefalogram (EEG) tekniğinin keşfi ile epilepside açığa çıkan patolojik beyin fonksiyonları hakkında yeni klinik bilgiler elde edilmiştir (27, 28). Ek olarak teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, epileptik hayvan modellerinin geliştirilmesi, ikizler üzerinde yapılan araştırmalar ve insan genomunun incelenmesi gibi çalışmalar, hastalığın nasıl geliştiğine dair anlayışımızı hızla artırmaktadır (28-30).

2.1.2 Epilepsi epidemiyolojisi

Epilepsi ve nöbetler, dünya genelinde milyonlarca kişiyi etkileyerek hem sağlık hem de ekonomik açıdan toplumlara önemli bir yük oluşturmaktadır. Epilepsinin epidemiyolojisini kavramak, risk altında olan grupların tespit edilmesi, koruyucu önlemlerin alınması ve genel olarak hastalığın yönetiminin geliştirilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir.

Epilepsi; her yaş grubundan, ırktan, sosyal sınıftan ve coğrafi konumdan insanı etkilemektedir (31). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2024 verilerine göre, dünya genelinde her yıl tahminen 5 milyon kişiye epilepsi teşhisi konulmaktadır (32). Bir sistematik inceleme ve meta-analiz çalışmasına göre, epilepsinin insidans oranı her 100.000 kişi için yılda 61,4 olarak belirlenmiş olup, %95 güven aralığı 50,7 ile 74,4 arasında değişmektedir (33). Düşük/orta gelirli ülkelerde insidans oranı (139,0/100.000), yüksek gelirli ülkelerdeki orana (48,9/100.000) göre daha yüksek

bulunmuştur. Bu durum, risk altındaki popülasyonların farklı yapıları ve düşük/orta gelirli ülkelerde perinatal risk faktörlerine, merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonlarına ve travmatik beyin hasarına daha fazla maruz kalma oranlarının daha yüksek olmasıyla açıklanabilmektedir. Ayrıca, yüksek gelirli ülkelerde en düşük sosyoekonomik sınıflarda ve aynı popülasyon içinde farklı etnik kökenlere sahip insanlarda epilepsi insidansı daha yüksek tespit edilmiştir (34).

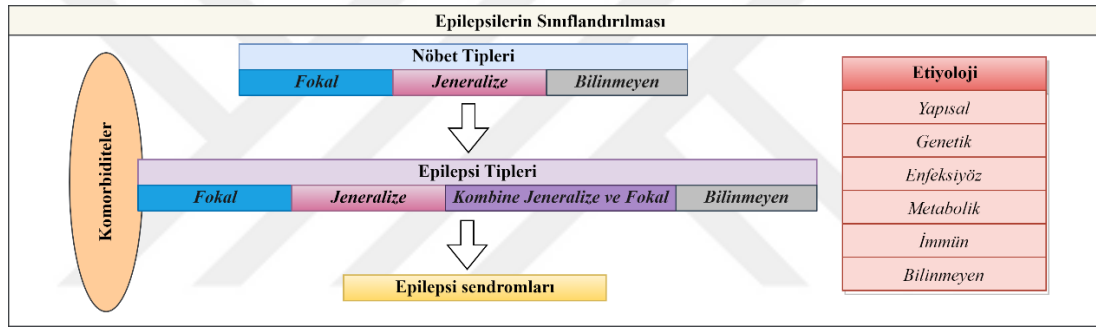
Epilepsi prevalansı, risk ve etken faktörlerin coğrafi dağılımı, teşhis anındaki nöbet frekansı ve hesaplamalarda yalnızca aktif epilepsi vakalarının (aktif yaygınlık) mı yoksa remisyonunda olanların da (yaşam boyu yaygınlık) mı göz önünde bulundurulduğuna göre ülkeden ülkeye büyük değişiklikler göstermektedir. Günümüze kadar elde edilen veriler doğrultusunda; epilepsinin yaşam boyu genel prevalansının 7,60/1.000 kişi, aktif epilepsi prevalansının ise 6,38/1.000 kişi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca epilepsinin insidans verilerine benzer şekilde, hem yaşam boyu genel prevalans hem de aktif prevalans düşük/orta gelirli ülkelerde yüksek gelirli ülkelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur (33).

2.1.3 Epilepsilerin sınıflandırılması

Epilepsi sınıflandırması, nöbetlerle başvuran bir bireyi değerlendirirken kritik bir klinik araçtır. Her klinik görüşmeyi etkilerken, etkisi klinik alanın ötesine, klinik ve temel epilepsi araştırmalarına ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine kadar uzanır. Sınıflandırma, birçok amaç için hizmet eder: Hastanın yaşadığı nöbet türünü, bu bireyde daha olası olan diğer nöbet türlerini, nöbetlerinin potansiyel tetikleyicilerini ve çoğu zaman prognozlarını anlamak için bir çerçeve sağlar. Sınıflandırma ayrıca öğrenme güçlükleri, zihinsel engellilik, otizm spektrum bozukluğu gibi psikiyatrik özellikler ve ani beklenmedik epilepsi ölümü (SUDEP) gibi mortalite riski dâhil olmak üzere komorbiditelerin riskleri hakkında da bilgilendirir. Sınıflandırmanın, antiepileptik tedavilerin seçimini sıklıkla yönlendirdiği dikkate değerdir (16).

Epilepsi sınıflandırmasında, klinisyen öncelikle nöbetin türünü belirlemektedir. Ardından, hastanın epilepsi türü sınıflandırılmakta ve birçok durumda belirli bir

epilepsi sendromu teşhisi konulabilmektedir. Aynı derecede önemli olan, hastanın epilepsisinin nedeninin teşhis sürecinin her aşamasında titizlikle belirlenmeye çalışılmasıdır. Nöbet türünün ve epilepsi türünün sınıflandırılması, EEG ve nörogörüntüleme çalışmaları gibi araştırmaların sonuçlarını, epilepsinin altında yatan nedenleri araştıran diğer çalışmalarla birlikte dikkate alınmalıdır. Bu kapsamda, 2017 yılında ILAE, 1989'da onaylanan son ILAE Epilepsi Sınıflandırmasından bu yana yapılan ilk büyük epilepsi sınıflandırmasını yayınlamıştır (16, 35). Günümüzde kullanılmakta olan bu yeni epilepsi sınıflandırmasında; nöbet tipi, epilepsi tipi ve epilepsi sendromu olmak üzere üç seviyeli bir yapı oluşturulmuştur (Şekil 1). Aynı zamanda, mümkün olduğunca, bireyin epilepsisinin etiolojisiyle birlikte bu üç seviyede de teşhis aranmalıdır (16).



Şekil 1. ILAE 2017 kapsamında epilepsilerin sınıflandırılması (16)

2.1.3.1 Nöbet tipine göre sınıflandırma

Nöbetler üç özelliğe göre sınıflandırılmaktadır: nöbetin beyindeki başlangıcı, nöbet sırasındaki farkındalık derecesi ve vücut hareketinin düzeyi (16, 36). Bu kapsamda ilk olarak bir nöbet, başlangıç türüne göre fokal ya da jeneralize başlangıçlı olarak iki ana kategoriye ayrılmaktadır. İkinci bir ayırım, kişinin bilincinin açık olup olmadığına dayanmaktadır. Son olarak, nöbetler başlangıçta motor (hareketle ilgili) ya da motor dışı (hareketsiz) özellikler gösterebilmektedir. Bu bilgilere dayanarak nöbetler üç ana grupta sınıflandırılabilir (Şekil 2):

- 1) Odaklanmış başlangıçlı nöbetler, üç alt tipe ayrılır:
 - a) Bilincin korunmuş/bozulmuş olması,

- b) Motor/motor dışı başlangıç,
c) Fokal başlangıçlıdan bilateral tonik-klonik nöbetlere dönüş.
- 2) Jeneralize başlangıçlı nöbetler, motor veya motor dışı (varlık) başlangıcı olan nöbetleri içermektedir.
- 3) Bilinmeyen başlangıçlı nöbetler, motor/motor dışı ya da sınıflandırılmayan şekilde olabilmektedir.

FOKAL	JENERALİZE	BİLİNMEYEN
Bilincin korunmuş/bozulmuş olması		
Motor başlangıçlı Otomatizma Atonik Klonik Epileptik spazm Hiperkinetik Miyoklonik Tonik	Motor Tonik-Klonik Klonik Tonik Miyoklonik Miyoklonik Tonik-Klonik Miyoklonik Atonik Atonik Epileptik spazm	Motor Tonik-Klonik Epileptik spazm
Motor başlangıçlı olmayan Otonomik Hareket tutukluğu (duraklama) Bilişsel Emosyonel Duyusal	Motor olmayan (absans) Tipik Atipik Miyoklonik Göz kapağı miyoklonisi	Motor olmayan Hareket tutukluğu (duraklama)
Fokal başlangıçlıdan bilateral tonik-klonik nöbetlere dönüş		Sınıflandırılmamış

Şekil 2. ILAE 2017 nöbet tipleri sınıflandırması: genişletilmiş versiyon (36)

2.1.3.2 Epilepsi tipine göre sınıflandırma

Epilepsi dört ana tipe sınıflandırılmıştır: 1) fokal; 2) jeneralize; 3) kombine jeneralize ve fokal; 4) bilinmeyen (Şekil 1).

Fokal epilepsiler, tek bir beyin yarıküresini etkileyen nöbetler ve bozukluklar grubunu içermektedir. Bu durumda hem tek bir odaktan (unifokal) hem de birden fazla odaktan (multifokal) kaynaklanan nöbetler görülebilmektedir. Fokal epilepsilerde gözlemlenebilen nöbet çeşitliliği şöyle sıralanabilir (16):

- Bilinçli Fokal Nöbetler: Bu nöbetler sırasında hastalar, çevrelerinde olup bitenlerin tamamen farkındadır.
- Bilinç Bozukluğuyla Fokal Nöbetler: Bu durumda hastaların bilinci kısmen kapalı olabilir, bu da çevrelerini tam olarak algılamamalarına yol açar.
- Motor Fokal Nöbetler: Bu tür nöbetlerde, genellikle bir kol veya bacak gibi vücudun belirli bir bölümünde kontrol dışı hareketler görülür.
- Motor Olmayan Fokal Nöbetler: Hareket etkilenmezken, duyuşsal ya da duyuşsal tepkilerde değişikliklerle kendini gösteren nöbetlerdir.
- Fokal'dan Bilateral Tonik-Klonik Nöbetlere Geçiş: Başlangıçta fokal olan nöbet, giderek genişleyerek iki beyin yarımküresini de etkileyen tonik-klonik nöbetlere dönüşebilir.

Bu tür epilepsilerin teşhisi genelde klinik muayene ile konmakta ve EEG testi sırasında görölen fokal epileptiform aktivite gibi spesifik bulgularla desteklenmektedir.

Jeneralize epilepside ise, hastanın EEG testinde genellikle genelleştirilmiş dalga-diken aktivitesi gözlemlenmektedir. Bu aktivite, beynin her iki yarımküresinde eş zamanlı nöbet aktivitesini göstermektedir. Jeneralize epilepsi çeşitleri arasında absans, miyoklonik, atonik, tonik ve tonik-klonik nöbetler bulunmaktadır (16, 36).

Kombine jeneralize ve fokal epilepsi tipi, bir hastanın hem fokal hem de jeneralize nöbetlere sahip olduğu bir durumdur ve genellikle video EEG (VEEG) ile teşhis edilir (36). Bu durum genellikle şiddetli epilepsileri olan bebeklerde veya çocuklarda görölmektedir. Dravet sendromu ve Lennox-Gastaut sendromu, her iki nöbet türünün de meydana geldiği yaygın örneklerdendir (16).

“Bilinmeyen” terimi ise hastanın epilepsiyeye sahip olduğunun anlaşıldığı ancak klinisyenin, mevcut bilgilerin yetersiz olması nedeniyle epilepsi türünün fokal mi yoksa jeneralize mi olduğunu belirleyemediği durumları ifade etmek için kullanılmaktadır. Eğer nöbet türü bilinmiyorsa, benzer nedenlerle epilepsi türü de bilinmeyen olarak sınıflandırılabilir (16, 37).

2.1.3.3 Epilepsi sendromuna göre sınıflandırma

Epilepsilerin sınıflandırılmasında, tanı sürecinde mümkün olduğunda üçüncü adım, bir epilepsi sendromunun tanımlanmasıdır (16). Epilepsi sendromu; nöbet türleri, EEG'deki değişimler, beyin görüntülemesindeki anormallikler ve genetik analizler gibi özelliklerden oluşan bir kümedir; bu özellikler bir araya geldiğinde tanımlanabilir bir desen ortaya çıkmaktadır. Çeşitli sendromlar hayatın farklı evrelerinde görülebilmekte ve doğru tanı, olası sonuçlar hakkında değerli bilgiler sunabilmektedir (37).

Literatürde; çocukluk çağı absans epilepsisi, ergenlik çağı absans epilepsisi, juvenil miyoklonik epilepsi, West sendromu ve Dravet sendromu gibi pek çok tanınmış sendrom bulunmaktadır; ancak, ILAE tarafından sendromların resmi bir sınıflandırması henüz yapılmamıştır (16, 37, 38).

2.1.3.4 Etiyolojiye göre sınıflandırma

Epilepsiye yol açabilen birçok altta yatan hastalık mekanizması olmasına rağmen, dünya genelinde vakaların yaklaşık yarısında hastalığın nedeni hala bilinmemektedir (32). Bir hastanın epilepsi nedeninin saptanması; epilepsi tanısı, prognoz değerlendirmesi ve tedavi yönetimi açısından oldukça önemlidir. Epilepsinin neden ortaya çıktığı birçok hastada bilinmemekle birlikte; inme, travmatik beyin hasarı, enfeksiyon, genetik mutasyonlar ve otoimmün hastalıklar gibi beyin fonksiyonunu etkileyebilecek her türlü faktör epilepsiye neden olabilmektedir (39).

2.1.3.4.1 Yaygın yapısal etiyolojiler

Korteksi etkileyen herhangi bir yapısal lezyon nöbetlere ve epilepsiye neden olabilmektedir. Yapısal nedenler arasında HS, beyin tümörleri, kortikal gelişim bozuklukları, damar anomalileri, glial doku skarlanması ve beyindeki iltihabi durumlar başlıca kategorileri oluşturmaktadır (40).

2.1.3.4.2 Epilepsinin genetik nedenleri

Geçmişte epilepsinin etiolojisinde genetik faktörler nadiren dikkate alınıyordu. Ancak, birçok epilepsi geninin keşfi bu bakış açısını kökten değiştirmiştir (39). Epilepsilerin büyük çoğunluğu monogenik bir kökene sahip değildir. Yaygın olarak görülen genetik jeneralize epilepsiler ve fokal epilepsiler gibi durumlar, çevresel etkenlerin varlığına bakılmaksızın, birden çok genin etkileşimi sonucu ortaya çıkan karmaşık bir kalıtım paterni gösterir. Bu, hastalığın poligenik bir yapıda olduğunu, yani birden fazla genin varyasyonunun hastalığın gelişimine katkı sağladığını ifade eder. Bu gen varyantları tek başlarına zayıf etkilere sahip olabilir, fakat birleştiğinde epilepsiye yol açacak etkileşimler sergileyebilir. Bu varyantların nasıl bir araya gelip nöbet eşiğini düşürdüğü ve epilepsinin patogenezinin nasıl katkıda bulunduğu konusu hala tam olarak çözümlenmemiştir (40).

2.1.3.4.3 Epilepsinin enfeksiyöz nedenleri

Bakteriyel, viral, fungal ve parazitik kaynaklı beyin enfeksiyonları, dünya genelinde nöbetlerin ve epilepsinin başlıca sebepleri arasında yer almakta ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde daha sık rastlanmaktadır. Bu enfeksiyonlar, beyin dokusunun doğrudan zarar görmesi, mikroorganizmaların toksin üretimi ve iltihaplanma sürecinin tetiklenmesi gibi çeşitli yollarla nöbetlere yol açabilmektedir. Bunun yanı sıra, beyin enfeksiyonları olan hastalarda nöbetler, ölüm riskini artıran bağımsız bir faktör olarak kabul edilmektedir (40). Ek olarak, şiddetli sistemik enfeksiyonlar, doğrudan beyni etkilemese bile, pireksi, sitokin salınımı, metabolik işlev bozukluğu ve otoimmünitinin tetiklenmesi yoluyla da nöbetlere zemin hazırlayabilmektedir (41).

2.1.3.4.4 Epilepsinin ve nöbetlerin metabolik nedenleri

Nöbet ve epilepsi vakalarının metabolik kökeni hem edinsel hem de genetik (konjenital) faktörlere bağlı olabilmektedir. Edinsel metabolik nedenler arasında, çeşitli organ yetmezlikleri (karaciğer, böbrek, pankreas gibi), beslenme eksiklikleri,

otoimmün durumlar (tip 1 diyabet mellitus, otoimmün kaynaklı serebral folat eksikliği gibi) ve ekzojen ilaçlar ile toksinlere maruz kalma bulunmaktadır (42). Bu faktörler genellikle, beyinde kalıcı hasar oluşturmadıkça, epilepsi yerine akut nöbetlere yol açmaktadır ve bu nöbetler sıklıkla hipoglisemi veya hiperamonaemi gibi durumlarla ilişkilendirilir. Özellikle genç yetişkinlerde, alkol gibi ekzojen toksinler nöbetlerin en sık rastlanan nedenlerinden biridir (43). Metabolik bozukluklar, epilepsi için nadir bir etken olmakla birlikte, doğuştan gelen metabolizma sorunları durumunda epilepsi ve nöbetler sıkça görülen bir durumdur ve 200'den fazla genetik metabolik hastalık epilepsi ile ilişkilendirilmiştir (44). Bu durumlar nadir olmasına karşın, epileptik nöbetlerin nöbet önleyici ilaçlara genellikle düşük düzeyde yanıt vermesi, ancak metabolik düzeltmelerle iyi sonuçlar alınabilmesi dikkate değerdir. Genel bilgilere göre, beyin metabolizmasındaki aksaklıklar, vitamin veya kofaktör eksiklikleri, toksin birikimi, anormal birikintiler, nörotransmitter sistemlerindeki bozulmalar veya kortikal gelişimle ilgili malformasyonlar gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak epileptik nöbetler açığa çıkmaktadır (45-47).

2.1.3.4.1 Epilepsinin immün nedenleri

Bağışıklık sisteminin beyne yönelik saldırısı sonucu ortaya çıkan otoimmün ensefalit gibi durumlar, epileptik nöbetleri tetikleyebilmektedir. Otoimmün epilepsi, nadir bir durum olmayıp, tedavi edilebilir bir özellik taşımaktadır. Bu durum, beyin korteksindeki otoantijenlere yönelik antikorların veya sitotoksik T hücrelerin saldırısı sonucu meydana gelmekte ve erken dönemde uygulanan immünoterapi ile kontrol altına alınabilir potansiyele sahiptir (48). Ancak, hücre içi antikora yönelik antikorlarla ilişkili nöbetler immün supresyona kötü yanıt verir ve genellikle kronik epilepsiye dönüşebilmektedir (40).

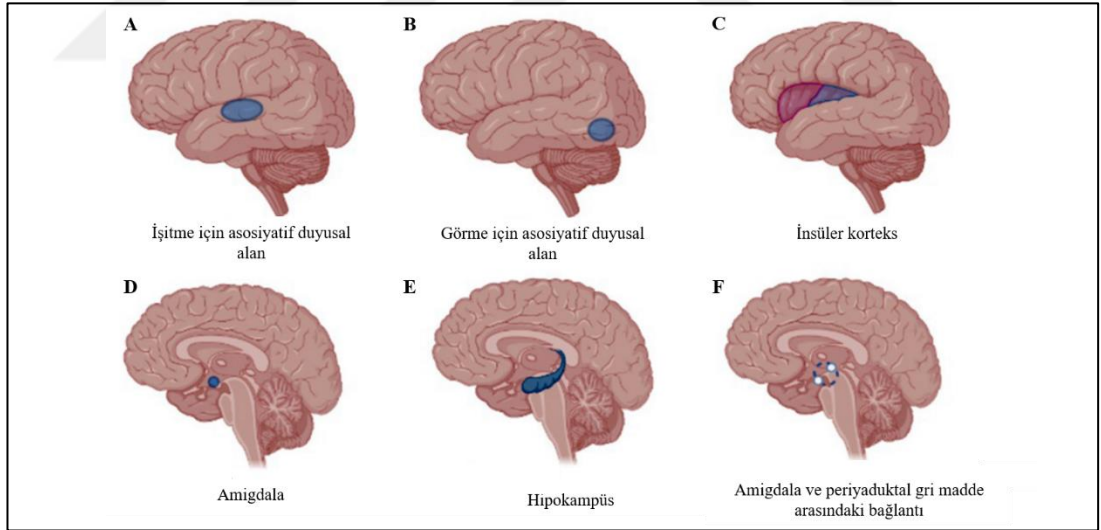
2.1.3.4.2 İdiyopatik durumlar

İdiyopatik epilepsi, altta yatan belirgin bir nedenin tespit edilemediği epilepsi türlerini ifade eder. Bu durumlar genellikle genetik yatkınlıkla ilişkilendirilmekte,

ancak spesifik genetik varyasyonlar veya çevresel faktörler her zaman net bir şekilde belirlenmemektedir.

2.1.4 Temporal lob epilepsisi (TLE)

Temporal lob epilepsisi (TLE), fokal başlangıçlı epilepsiler arasında en yaygın olanıdır ve cerrahi olarak tedavi edilen dirençli epilepsi vakalarının yaklaşık üçte ikisini oluşturmaktadır (1, 2). ILAE sınıflandırmasına göre TLE, mezial temporal lob epilepsisi (mTLE) ve lateral veya neokortikal temporal lob epilepsisi (nTLE) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (16). mTLE en sık görülen alt tür olmakla birlikte, nöbetler genellikle hipokampus, entorinal korteks, amigdala ve parahipokampal girus gibi beyin yapılarından kaynaklanmaktadır. nTLE'de yer alan beyin yapıları ise süperiyor, mediyal ve inferiyor temporal çevreyi, temporalokspital ve temporal-pariyetal kavşakları ve işitme, görme ve dil işlevleri için asosiyatif duyuşsal alanları içeren temporal neokortekstir (49-51) (Şekil 3).



Şekil 3. Temporal lobun nöroanatomik gösterimi ve ilgili nöbet semptomları ve psikiyatrik semptomları: (A) işitsel halüsinasyonlar; (B) görme halüsinasyon; (C) visseral-duyuşsal veya otonom semptom; (D) depresyon; (E) anksiyete bozuklukları, depresyon; (F) kaçınma davranışı ve korku tepkisi (51)

TLE'li hastalarda tipik olarak stereotip otomatizmler, dil değişiklikleri ve tek taraflı distonik duruş ile ilişkili bilinç kaybı ile karakterize fokal bozulmuş farkındalık

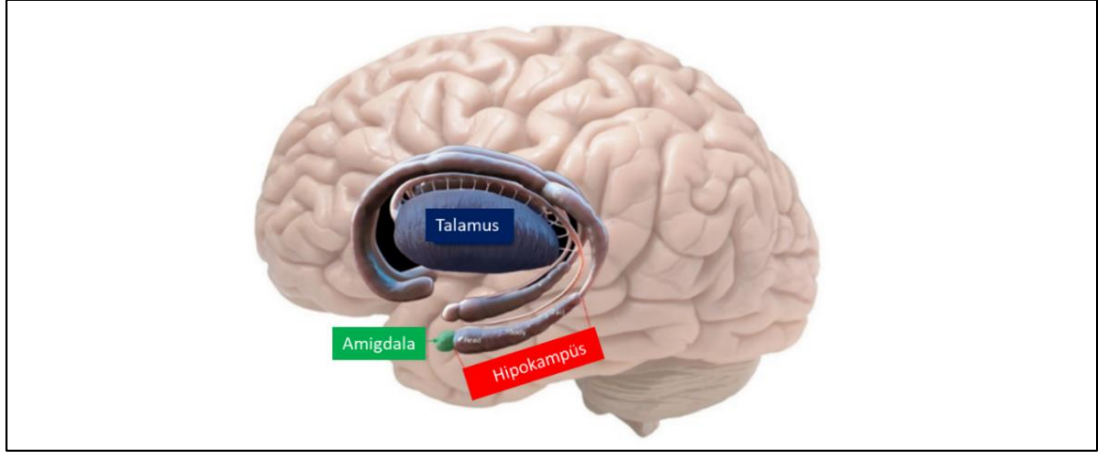
nöbetleri görülmektedir. Ek olarak, fokal bozulmuş farkındalık nöbetlerinden önce de sıklıkla epileptik bir aura veya viseral-duyusal veya otonomik semptomlar, bilişsel veya duygusal semptomlar görülmektedir (51). Nörolojik özelliklere ek olarak, TLE sıklıkla psikiyatrik komorbiditelerle ilişkilidir. TLE'li hastalarda psikiyatrik bozuklukların yaygınlığı, özellikle pediatrik popülasyonda, genel epilepsiye göre daha yüksektir. Genellikle bilişsel, öğrenme ve davranış bozukluğunun eşlik ettiği anksiyete, depresyon ve interiktal distimi, TLE'li çocuk hastalarda tekrarlayan psikiyatrik bozukluklardır (51, 52).

2.1.4.1 TLE'nin klasik patolojik özellikleri

TLE klinik olarak temporal lobdan kaynaklanan spontan tekrarlayan nöbetlerin ilerleyici gelişimi ile karakterizedir. HS ve fokal kortikal displazi (FKD) TLE'nin önemli yapısal nedenleridir (53).

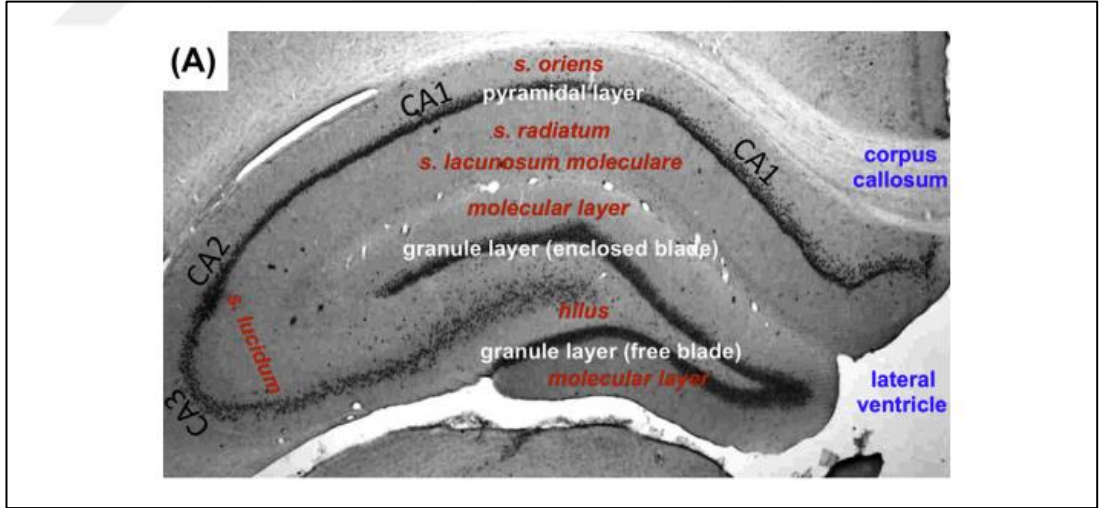
2.1.4.1.1 Hipokampal skleroz (HS)

Hipokampus, hem insan hem de deneysel epilepside en kapsamlı şekilde araştırılan beyin bölgesidir (10). HS ve epilepsi arasındaki ilişki yaklaşık iki yüzyıldır bilinmektedir. 20. yüzyılın ortalarından bu yana ise, temporal lob rezeksiyonlarından alınan cerrahi örnekler bu alandaki bilginin ilerlemesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (54). HS, modern tıp için önemli bir zorluk teşkil eden ilaca dirençli mTLE'nin altında yatan en yaygın patolojiyi temsil etmektedir. HS, ergenlerde ve yetişkinlerde inatçı TLE vakalarının yaklaşık %56-70'ini oluşturmaktadır (54, 55). HS ve kronik nöbetler arasındaki ilişki iyi bilinmektedir, ancak HS'nin kronik nöbetlerin bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu konusunda uzun süredir devam eden bir tartışma vardır (10). Ek olarak, HS'ye neden olan hasar hala belirsiz olmakla birlikte, erken çocukluk dönemindeki ateşli nöbetlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (56). Beyinde, limbik sistemle ilgili ana merkezlerden biri olan hipokampus, temporal lobun derinliklerinde yer alan karmaşık bir beyin yapısıdır (Şekil 4). Hipokampusün öncelikle işlevi hafıza ve öğrenme süreçlerini yönetmektir (57).



Şekil 4. İnsan beyninin limbik sistemi: hipokampus, amigdala ve talamus (58)

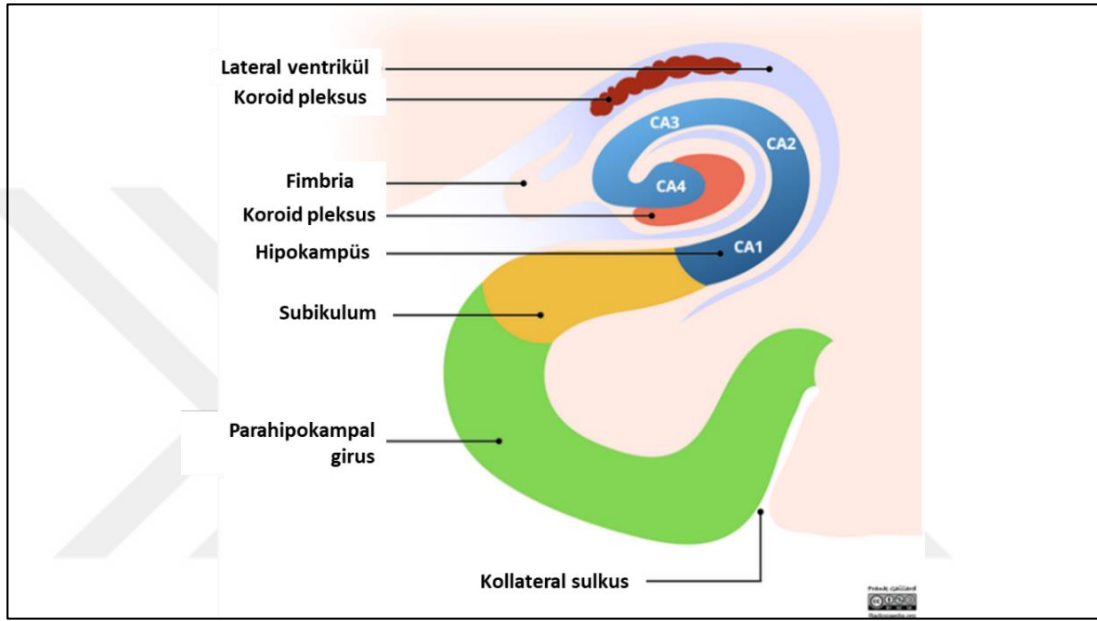
Hipokampus, çok katmanlı bir yapıya sahiptir. Katmanların ayırt edilmesinde kullanılan kriterlere bağlı olarak, genellikle üç ila beş katman hücre ve lif içerdiği kabul edilmektedir. Hipokampusun temel olarak yapısı uyarıcı glutamaterjik ana nöronları (piramidal ve granül hücreler) ve inhibitör γ -aminobütirikasit (GABA)-erjik ara nöronlardan oluşmaktadır (59).



Şekil 5. Hipokampusun çok katmanlı yapısı (59)

Hipokampus, beynin evrimsel olarak en eski kısımlarından biridir. Lateral ventrikülün alt boynuzunun tabanı boyunca uzanır ve yaklaşık 5-8 cm boyunda gri cevherden oluşan bir tabakadır. Koronal kesitlerde “C” harfi biçiminde görülebilmektedir. Denizatına olan benzerliği nedeniyle bu adı almıştır. Ayrıca, dış

yapısının koçboynuzunu andırması sebebiyle eski dönemlerde Ammon'un boynuzu, yani “cornu ammonis” olarak da isimlendirilmiştir (60, 61). Cornu Ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak ifade edilebilen hipokampus, hücre yapısındaki değişikliklere göre CA1, CA2, CA3 ve CA4 gibi farklı bölgelerden oluşmaktadır. Bunlardan CA1 subikulum'a, CA4 ise dentat girusa (DG) en yakın olan bölgedir (Şekil 6).



Şekil 6. Hipokampüs ve bölgesel anatomi şeması (62)

HS'nin tipik özellikleri arasında CA1 ve CA4 bölgelerinde nöron kaybı ve gliozis yer almaktadır (63). Günümüzde HS, nöronal kayıp ve gliozis derecelerine göre sınıflandırılmaktadır. ILAE, bu sınıflandırmayı hipokampal alt bölgelerdeki nöron kayıplarını değerlendirmek için tekrarlanabilir, yarı kantitatif bir ölçek ile yapmaktadır. Bu sınıflandırma, yosunsu lif filizlenmesi ve nöronal değişikliklerden bağımsız olarak nöronal kayıp ve gliozis paternlerine dayanmaktadır. HS tip 1, en yaygın görülen tip olup, TLE-HS vakalarının %60-80'ini oluşturmaktadır. HS Tip 1'de, CA1 bölgesi %80'den fazla hücre kaybı ile en ciddi şekilde etkilenirken, CA2 (%30-50 hücre kaybı), CA3 (%30-90 nöron kaybı) ve CA4 (%40-90 nöron kaybı) daha az etkilenmektedir. HS tip 1'de, DG granül hücrelerinin yaklaşık %50-60'ı kaybolmaktadır. HS tip 2, ağırlıklı olarak CA1'de nöronal hücre kaybı ve gliozis ile karakterizedir ve piramidal hücrelerin neredeyse %80'ini etkilemektedir. Ayrıca, CA2

ve CA3'te %20'den az ve CA4'te %25'ten az hafif hücre kaybı görülebilmektedir. Tip 2'de DG'de belirgin granül hücre kaybı gözlenmemektedir. HS tip 3'te ise CA4'ün yaklaşık %50'sinde ve DG'nin %35'inde hücre kaybı gözlenirken, CA3 (%30'dan az), CA2 (%25'ten az) ve CA1 (%20'den az) orta derecede etkilenmektedir (64).

2.1.4.1.2 Fokal kortikal displazi (FKD)

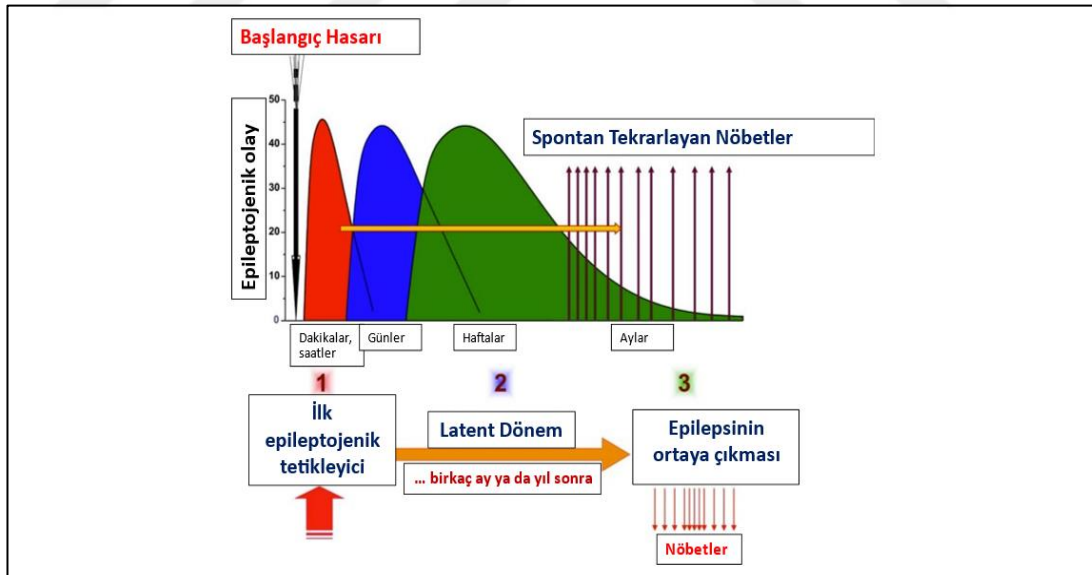
FKD, beyin hücrelerinin tipik yapısında ve gelişiminde yerel bozulmalarla karakterize edilen bir bozukluktur. Bu bozuklukta etkilenen başlıca hücreler nöronlardır. İlk olarak 1971 yılında tanımlanan FKD, kortikal gelişimin erken evresinde ortaya çıkar ve nöroglial proliferasyon ve farklılaşma, nöronal migrasyon ve kortikal yeniden yapılanma sırasındaki anormalliklerden kaynaklanmaktadır (65, 66). FKD, çocukluk döneminden yetişkinliğe kadar her yaş grubunda epilepsinin önemli bir sebebi olarak kabul edilmektedir. Epilepsi hastalarında FKD'nin klinik bulgusu, FKD'nin epilepsi gelişimiyle nedensel bir ilişkisi olduğunu göstermektedir (67). FKD incelemelerinde hem artmış uyarıcı aktivite hem de azalmış inhibitör durum gözlemlenmiştir. Moleküler düzeyde yapılan araştırmalar, FKD kaynaklı hiperaktiviteyi açıklamak için çeşitli potansiyel mekanizmalar ortaya koymuştur. Bu mekanizmalardan biri, kalsiyum (Ca^{+2}) taşınmasında rol oynayan eksitator glutamat reseptörleri olan N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin değişen ifadesini içermektedir (68). FKD patogenezinde artmış uyarıcı aktivitenin yanı sıra inhibisyonda azalma da gözlenmektedir. Displastik lezyonlarda inhibitör GABAerjik nöronların yokluğu deneysel FKD modeli ve hastalardan cerrahi olarak izole edilen dokularla da doğrulanmıştır (69, 70).

2.2 Epileptogenez

Normal, sağlıklı olarak kabul edilen beynin fonksiyonel değişim yaşayarak anormal elektrik aktivite göstermeye başlaması ve buna bağlı olarak artan nöbet yatkınlığı göstermesiyle spontan tekrarlayan nöbetler (STN) geliştirmesini ve bu nöbetlerin gerçekleştiği ve ilerleyiş gösterdiği dönemi kapsayan süreç “epileptogenez” olarak adlandırılmaktadır (8, 71). Epileptogenez süreci ilk olarak beyinde hasar

yaratan bir durum ardından başlamaktadır. Bu tip durumlara nörolojik enfeksiyonlar, travmatik beyin hasarları, iskemi, intraserebral kanama ve status epileptikus (SE) örnek verilebilmektedir (72).

Epileptogenez süreci; akut, latent ve kronik dönem olmak üzere üç evreden oluşmaktadır (Şekil 7). Akut dönem, beyinde hasar yaratan bir olayın (inme, travmatik beyin hasarı vb.) meydana geldiği evredir. Latent dönem ise, hasar kaynaklı moleküler ve hücrel değişikliklerin meydana geldiği ancak, epileptik nöbetlerin gözlemlenmediği evredir. Son olarak kronik dönem ise, STN'lerin gözlemlendiği evredir (8, 72). Literatürde epileptogenez sürecinde ilk nöbetlerin açığa çıkması ve ilerleyişi hayvan modellerinde birkaç hafta olabilirken, insanlarda bu sürenin yılları kapsayabileceği belirtilmiştir (71, 72). Bu durumun anti-epileptojenik terapötik müdahaleler için bir zaman aralığı tanımlamakla birlikte, bu zaman aralığında meydana gelen ve STN açığa çıktığında bu nöbetlerin nüks etmesine ve ilerlemesine yol açan patojenik değişikliklerin keşfedilmesi için son derece önemli olduğu dikkat çekmektedir (4).



Şekil 7. Epileptogenez süreci (9)

Epileptogenez sırasında meydana gelen değişiklikler hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Epileptogenez, nöronal uyarılabilirliği kademeli olarak

değiştiren, kritik bağlantıları oluşturan ve ilk spontan nöbet meydana gelmeden önce karmaşık yapısal değişiklikler gerektirebilecek dinamik bir süreçtir. Bu değişiklikler arasında nörodejenerasyon, nöroenez, gliosis, aksonal hasar veya filizlenme, dendritik plastisite, kan beyin bariyeri (KBB) hasarı, beyin dokusuna inflamatuvar hücrelerin katılımı, ekstraselüler matrisin yeniden düzenlenmesi ve bireysel nöronal hücrelerin moleküler yapısının yeniden organizasyonu yer alabilmektedir. Önemli olarak, son deneysel ve hasta verileri, epileptojenik bir hasarın tetiklediği moleküler ve hüresel değişikliklerin epilepsi teşhisinden sonra da devam edebileceğini, ancak epileptik sürecin farklı evrelerinde niteliksel ve niceliksel olarak farklılık gösterebileceğini ileri sürmektedir (73).

Epileptogenezle ilgili insan ve epileptik hayvan modelleri üzerine yapılan araştırmalar, piramidal nöronların öldüğünü ve bu bölgelerde yeni sinaptik bağlantıların oluştuğunu göstermektedir. Sağlıklı bir beyinde, GABAerjik ve glutamaterjik mekanizmaların nöronal eksitabiliteyi dengede tuttuğu bilinmektedir. Ancak epileptogenez sürecinde, nöronal hipereksitabilite ortaya çıkmaktadır. Bu durumun, dengeyi sağlayan nöronların kaybı, inhibitör mekanizmadaki GABA seviyesinin azalması veya GABA_A reseptörlerinin duyarlılığının düşmesi sonucu oluşan düşük inhibisyonla ilişkili olduğu düşünülmektedir (74).

Epileptogenez sürecine katılan bir diğer faktör, nöronların yüzeylerindeki biyokimyasal reseptörlerin (nörotrofin reseptörü, iyonotropik glutamat reseptörü, metabotropik glutamat reseptörü) aktivasyonudur. Bu reseptörlerin artışı, ortamdaki Ca⁺² konsantrasyonunu yükselterek tirozin kinaz enzimlerinin aktivasyonunu artırabilmekte ve bu da hipereksitabiliteye yol açabilmektedir. Ek olarak, beyin hasarı sonrasında nörotransmitterlerin aşırı salınımı da epileptogenezde önemli bir rol oynamaktadır. Bu kapsamda aşırı glutamat salınımı, hücre içindeki Ca⁺² konsantrasyonunu hızla artırarak nöronların aşırı depolarizasyonuna yol açmaktadır. Bu durumu takiben hücre hasarı ve ölümü gözlemlenebilmektedir (75). Nöronal hipereksitabilitede etkili olabilecek bir diğer faktörün ise, ekstraselüler Ca⁺² konsantrasyonundaki düşüş nedeniyle glial hücrelerdeki ATPaz aktivitesinde azalma olabileceği belirtilmiştir (74).

2.2.1 Status epileptikus (SE)

TLE kesin nedeni çoğu zaman bilinmemekle birlikte, genellikle beyin hasarı gibi erken tetikleyici faktörlerle ilişkilendirilmektedir. SE, bu tetikleyici faktörlerden biridir. SE, en az beş dakika süren sürekli nöbet aktivitesi veya aralarında normal bilince dönüş olmaksızın tekrarlanan nöbetler olarak tanımlanmaktadır ve bu durumun mezial temporal skleroz ve TLE gelişimiyle ilişkili olduğu uzun süredir bilinmektedir (76, 77). Bu bağlamda, hücresel düzeyde SE esas olarak GABA_A reseptörleri aracılığıyla GABA tarafından aracılık edilen normal inhibitör mekanizmalar bozulduğunda ortaya çıkmaktadır. İnhibisyondaki bu bozukluklar, eksitator geribildirim mekanizmalarının aktivasyonuna yol açarak büyük nöron gruplarının tekrarlayan ve senkronize ateşlenmesine neden olmaktadır. Nöbet aktivitesi devam ettikçe, GABAerjik fonksiyon bozulmaya devam etmektedir. Esas olarak glutamat tarafından yönlendirilen bu devam eden uyarıcı aktivite, nihayetinde nöronal hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (78).

2.3 Deneysel Temporal Lob Epilepsisi Hayvan Modelleri

TLE, bu kadar yaygın bir hastalık olmasına rağmen, literatürdeki veriler patofizyolojiyi çözümlmek için maalesef yeterli değildir. Bu nedenle, epileptogenez sürecini aydınlatılabilmek, mevcut tedavi seçeneklerini iyileştirebilmek ve yeni tedavi stratejileri geliştirebilmek için TLE'yi taklit eden deneysel hayvan modellerinin araştırmalarda kullanılması önem taşımaktadır. Deneysel TLE modelinde, epileptik nöbetler genellikle şiddetli elektriksel uyarı veya kimyasal maddelerle (örneğin, kainik asit (KA), pilokarpin) tetiklenmiş SE sonrasında ortaya çıkmaktadır (79). Bu süreci, genellikle birkaç gün veya hafta sürebilen bir latent dönem izler ve sonunda STN'ler gelişir.

2.3.1 Kainik asit (KA) modeli

L-glutamatın sıklık bir analogu ve iyonotropik KA reseptörlerinin (KARs) agonisti olan KA'nın hipokampal piramidal nöronlara zarar verdiği ilk kez 1978'de

Nadler ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (80). Ardından, KA'nın epilepsi modeli oluşturmak için kullanımı Ben-Ari ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (81, 82). Günümüzde, KA modeli, TLE gelişimi ve ilişkili patofizyolojik değişikliklerin incelenmesi, farmakoterapi ve farmakorezistansın çalışılması için yaygın olarak kullanılmakta olan hayvan modellerinden biridir (83).

Glutamaterjik α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) ve KAR agonisti olarak işlev gören KA, depolarizasyona ve kademeli hücre ölümüne neden olmaktadır (84). KA, beyin dokusuna ulaştıktan sonra birçok farklı mekanizma devreye girmektedir. Bu süreçte KA'nın KAR'lara bağlanması membran depolarizasyonuna ve hücre ateşlenmesine neden olur. Aşırı ateşleme ozmotik dengesizliğe ve sonuç olarak postsinaptik membranın yırtılması gerçekleşir. Bununla birlikte, hücre içine Ca^{+2} akışı, fosfolipaz, endonükleazlar ve proteazlar gibi çoklu enzim aktivasyonuna neden olur ve bunların hepsi çeşitli hücre yapılarına zarar verir. Artan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun bir diğer etkisi de mitokondriyal fonksiyonların bozulması ve aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimidir (4). Süreç içerisinde tüm bu mekanizmalar birbirini güçlendirir ve sonunda apoptoz meydana gelir (85).

TLE modelini oluşturmak amacıyla KA, sistemik yoldan (30-60 dakika içerisinde 6–15 mg/kg) veya intra-hipokampal (fokal) enjeksiyon yoluyla (5-60 dakika içerisinde 0.4–2.0 μ g) uygulanabilir. İntra-hipokampal uygulama, limbik yapılardan başlayarak diğer beyin bölgelerine yayılan epileptiform deşarjların oluşumuna yol açar ve daha düşük ölüm oranları ile ilişkilendirilir (86). Buna karşın, sistemik uygulama daha yüksek ölüm oranlarına neden olabilir; ancak bu durum, tek doz yerine saatlik 5 mg/kg'lık çoklu dozlarla kontrol edilebilir. Bu yöntem, tutarlı nöbetlerin yanı sıra yosunsu lif filizlenmesini ve STN gelişimini destekler (87).

KA uygulaması, öncelikle limbik sistem, amigdala, medial talamus, septum ve korteksi etkiler, ancak nöbetlerin başlangıç noktası, KAR yoğun olarak bulunduğu hipokampusur. En yoğun hücre kaybı hipokampusun CA1 bölgesinde görülür (88, 89). Bununla birlikte, hipokampusun CA2 bölgesi ve DG'nin granüler hücreleri bu

etkiden korunmuş görünmektedir. Ek olarak, entorhinal korteks, talamus ve serebral korteks gibi diğer bölgelerde de indüksiyondan 24 saat sonra nöronal kayıplar izlenir (90).

2.3.2 Pilokarpin modeli

Bu model, Turski'nin yaptığı çalışmada, sıçanlara 400 mg/kg ve farelere 300-350 mg/kg dozlarında intraperitoneal pilokarpin uygulanmasının, 1-2 saat içinde limbik nöbetler ve davranışsal değişikliklerin ardından SE ve nörodejenerasyonu başarıyla tetiklediği şeklinde rapor edilmiştir (91, 92).

Pilokarpin ile indüklenen SE'nin etki mekanizması, muskarinik M1 reseptörünün aktivasyonuna bağlıdır ve nöbetler, M1 reseptör aktivasyonunu takiben NMDA reseptörlerinin devreye girmesiyle sürdürülür (93). Fosfolipaz C bağımlı inositol trifosfat (IP3) salınımıyla aktive edilen hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar 1 ve 2'nin (ERK1/2) fosforilasyonu, bağımsız olarak NMDA reseptör aracılı oksidatif stresi tetikler. IP3 aracılığıyla hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki artış ve NMDA reseptörleri aracılığıyla artan hücre içi Ca^{+2} girişi, NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (Hidrojenli)) oksidazın aktivasyonuna ve süperoksit üretimine yol açar. Bu durum, hücre yüzeyindeki NMDA reseptörlerinin oksidatif olarak modifikasyonuna ve reseptör fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Bu olaylar, NMDA reseptörü ile yakın ilişki içinde olan nöronal nitrik oksit sentazın (nNOS) yerel aktivasyonunu tetikleyebilir. Bu şekilde, NMDA reseptör kanalları üzerinden Ca^{+2} girişi NADPH oksidazın aktivasyonu ile süperoksit üretimine, Ca^{+2} 'in mitokondriler tarafından alınması ve nitrik oksit (NO) üretimi ise hücre ölümüne neden olur (94, 95). Ayrıca pilokarpin, interlökin 1 beta (IL-1 β) seviyelerinin artması sonucu KBB'ye zarar vererek nöbetlerin ilerlemesine de neden olur (96).

Pilokarpin, sistemik yolla ya da beynin içine intra-hipokampal (fokal) enjeksiyon yöntemiyle uygulanabilir. İntra-hipokampal enjeksiyon, sistemik uygulamaya kıyasla daha düşük ölüm oranlarına neden olmaktadır (97, 98). Düşük dozlarda (100 mg/kg) uygulandığında nörodejenerasyon, piriform korteks ve anterior olfaktör nükleus ile

sınırlı kalırken, 200 mg/kg doz ciddi limbik motor nöbetlere, 400 mg/kg doz ise birçok hassas beyin bölgesinde yoğun nörodejenerasyona yol açmaktadır (91, 92). Bu kapsamda, SE'nin başlamasından 24–72 saat sonra, hipokampusun CA1 ve CA3 bölgeleri, amigdala ve piriform korteks, pilokarpinin neden olduğu nöronal hasara en duyarlı bölgeler olarak tespit edilmiştir (91, 92, 99). Pilokarpin ve kainik asit modelleri arasındaki en dikkat çekici fark, pilokarpin modelinin daha hızlı etkisidir. Pilokarpin kaynaklı SE'den sonra 3 saat içinde nöronal hasar gözlemlenebilirken, KA modelinde aynı bölgelerdeki beyin lezyonları SE indüksiyonundan 8 saat sonra görülmektedir (100).

Pilokarpin uygulamasının ardından gelişen SE, tonik-klonik nöbetlerle kendini gösterir ve bunu takip eden nöbetsiz bir latent dönemin ardından, STN'lerle karakterize edilen kronik epilepsi evresi başlar (97). Oluşturulan bu dönemde, akut dönem SE'yi takip eden 24-48 saat içinde meydana gelecek şekilde tanımlanmıştır. Bunu takip eden latent dönemin 4 ila 44 gün sonra gerçekleşeceği ve ardından kronik dönemin geleceği kabul edilmektedir (99, 101, 102).

2.3.3 Lityum-pilokarpin modeli

Pilokarpin modelinde, bu konvülzanın lityum (3 mEq/kg) ve pikrotoksin gibi diğer ilaçlarla kombinasyonu kullanılarak çeşitli varyasyonlar geliştirilmiştir. Lityum-pilokarpin kombinasyonu en yaygın olarak kullanılan yöntem olmuştur. Lityum, manik-depresif hastalığın tedavisinde geniş ölçüde kullanılan bir ruh dengeleyici olarak bilinir ve daha yakın zamanlarda akut beyin hasarları ve kronik nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (103).

Biyokimyasal olarak lityum; enzimler, transkripsiyon ve büyüme faktörleri gibi çeşitli unsurları düzenlemektedir (104). Klinik ve deneysel modeller, lityumun nöroprotektif etkilerinin altında yatan karmaşık mekanizmalar olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmalar arasında, apoptozu, iltihabı ve oksidatif stresi önleyen hayatta kalma molekülleri ve nörotrofik faktörlerin indüksiyonu yer almaktadır (105-107).

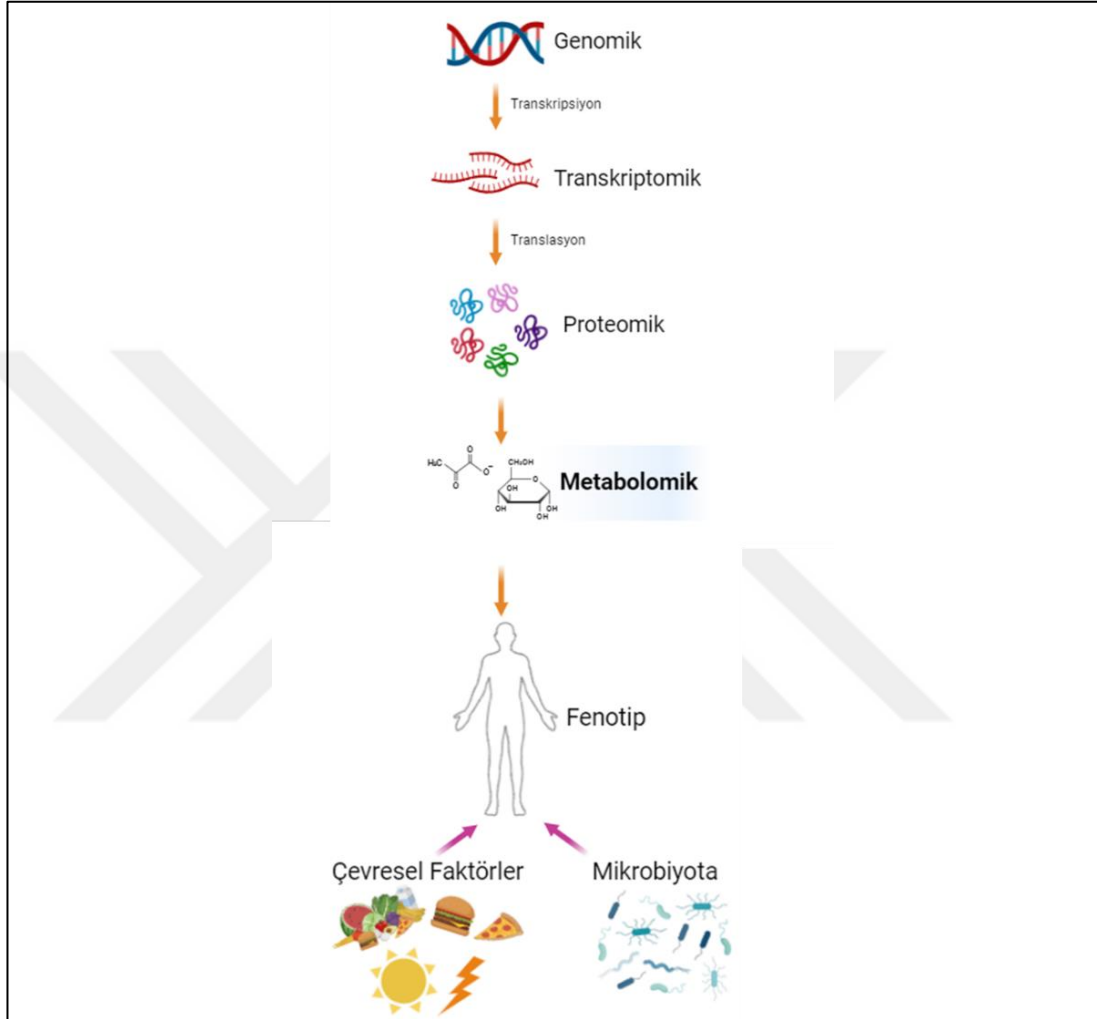
Lityum, genellikle SE indüksiyonundan 24 saat önce uygulanmakta ve nöbetleri indüklemek için gerekli olan pilokarpin dozunu (30 mg/kg) belirgin bir şekilde azaltmaktadır. Lityum-pilokarpin modeli ile yalnızca pilokarpin uygulanan hayvanlar arasında gözlemlenen davranışsal değişiklikler oldukça benzerdir: sabit bakış, baş sallama, göz kırpmaya ve "ıslak köpek titremeleri" olarak bilinen hareketlerle karakterize edilmektedir. Her biri yaklaşık 30-45 saniye süren ve her 2-5 dakikada bir tekrarlanan nöbetlerin genellikle 30 dakika sonra ortaya çıktığı belirtilmektedir (108-110). Bununla birlikte, lityum-pilokarpin ile tedavi edilen hayvanların SE başlangıcına kadar geçen sürede değişkenliğin azaldığı bildirilmiştir (108). SE sonucu oluşan nöronal hasar da, lityum-pilokarpin ve yüksek doz pilokarpin modellerinde büyük ölçüde benzerdir (108). Bu nedenle, lityum-pilokarpin ve yüksek doz pilokarpin tedavileri davranışsal, metabolik, elektrografik ve nöropatolojik olarak ayırt edilemez durumdadır. En belirgin fark, pilokarpin öncesinde lityum uygulanmış sıçanlarda pilokarpine karşı artan duyarlılık olarak görülmektedir (108). Ayrıca, lityum ön uygulaması yapılan sıçanlarda tonik-klonik nöbetler ve SE gelişiminde başarı oranı %100 iken, yüksek doz pilokarpin kullanılan modellerde bu oran yaklaşık %60 olarak bildirilmiştir (111).

2.4 Metabolomik

Metabolomik, biyolojik sistemlerdeki metabolitlerin kapsamlı analizine odaklanan hızla gelişen bir araştırma alanıdır. Bu disiplin, bir organizma, doku veya hücre tarafından belirli koşullar altında üretilen tüm metabolitlerin nitel ve nicel değerlendirilmesini içerir. Metabolomik, çeşitli fizyolojik durumları ve çevresel değişimlere verilen yanıtları anlamak için hayati öneme sahiptir ve bu sayede sağlık ve hastalık mekanizmalarına dair önemli bilgiler sunar (13-15).

Metabolomikğin önemi, genomik ile fenotipik ifade arasındaki boşluğu doldurma yeteneğinde yatmaktadır (Şekil 8). Metabolitleri analiz ederek, araştırmacılar genetik ve çevresel faktörlerin biyolojik işlevleri nasıl etkilediğini daha net bir şekilde anlayabilmektedir. Örneğin, metabolomik, hastalıklar için biyobelirteçlerin belirlenmesinde, metabolik yolların aydınlatılmasında ve organizmalardaki genetik modifikasyonların etkilerinin anlaşılmasında önemli bir rol oynamıştır (112-114).

Ayrıca, kişiselleştirilmiş tıpta da uygulamaları bulunmaktadır; bu alanda metabolik profiller, bireylerin metabolik tepkilerine dayalı olarak kişiye özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir (13, 15).



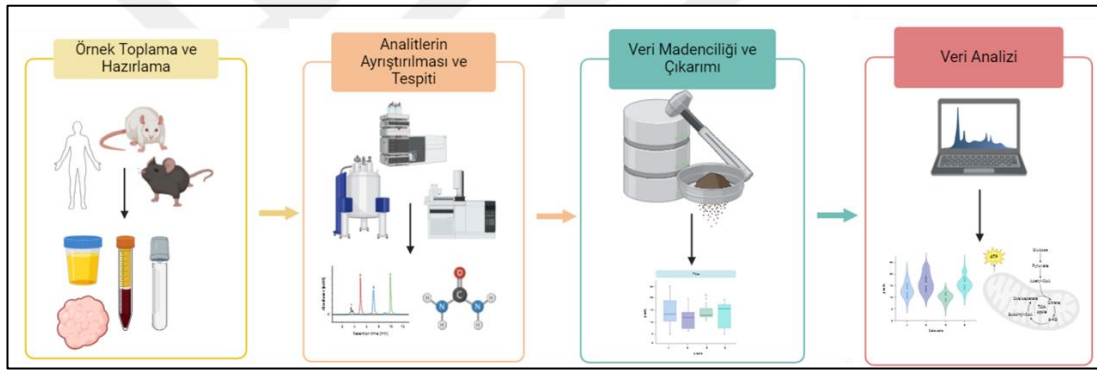
Şekil 8. Genomik, transkriptomik ve proteomik gibi çeşitli omik bilimlerine genel bir bakış (BioRender.com ile oluşturuldu.): Metabolomik, genomun nihai çıktısını temsil ederken, çevresel faktörlerden gelen girdileri de içerir (115, 116)

2.4.1 Metabolomik yaklaşımlar

Metabolomik araştırmalar genel olarak, hedefsiz (global) ve hedefli metabolomik olmak üzere iki yaklaşıma ayrılır. Hedefsiz metabolomik, "tarafsız" veya "yönlendirilmemiş metabolomik" ya da "metabolik parmak izi" olarak da bilinir ve bu yöntemin amacı, bir örnekteki olabildiğince çok metaboliti tespit ederek metabolit

örüntüsüne dayalı fenotiplerin sınıflandırılmasını sağlamaktır. Buna karşılık, "yönlendirilmiş metabolomik" veya "metabolik profil çıkarma" olarak da bilinen hedefli metabolomik, belirli bir metabolit setine ya da trikarboksilik asit (TKA) döngüsü metabolitleri veya lipitler gibi küçük molekül sınıflarına odaklanır. Hedefli deneylerde net tanımlama ve kesin miktar belirleme kritik öneme sahiptir. Hedefsiz çalışmalardan farklı olarak, hedefli metabolomik, kritik biyolojik yolları doğrulamak veya hedefsiz bir çalışmayı teyit etmek amacıyla hipoteze dayalı olarak yürütülür (117).

Her iki yaklaşımda da ortak olarak, bir metabolomik deney sırasıyla örnek toplama ve hazırlama, analitlerin ayrıştırılması ve tespiti, veri madenciliği ve çıkarımı ve veri analizi olmak üzere dört aşamada gerçekleştirilir (Şekil 9).



Şekil 9. Metabolik araştırmalar için iş akışı (BioRender.com ile oluşturuldu.)

2.4.2 Metabolomikte analitik teknikler

Literatürde birçok hedefli ve hedefsiz metabolomik yöntem bildirilmiştir. Ancak, tek bir analitik platformun tüm metabolomik bilgiyi tek bir analizde yakalayamadığı anlaşılmıştır (118). Bu amaçla en yaygın olarak kullanılmakta olan analitik teknikler, kütle spektrometrisi (KS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi olarak tanımlanmıştır (116, 119). Her ikisinin de kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (120). KS tabanlı metabolomik analizler genellikle biyolojik örneğin karmaşıklığını azaltmak amacıyla bir ayırma aşaması ile başlar, bu da farklı molekül gruplarının farklı zaman dilimlerinde KS ile analiz edilmesini mümkün kılar (119).

KS, iyonize olmuş bileşiğin kütle-yük oranı (m/z) ve göreceli yoğunluğunu temel olarak spektral veriler elde eder. Kromatograf ile birleştirildiğinde ise, bir özellik ayrıca karakteristik bir tutunma süresi ile tanımlanır. Bu, bir moleküler türün kromatografik kolondan ayrıldığı ve KS detektörü tarafından tespit edildiği zamandır (120). KS teknolojisinde en yaygın kullanılan ayırma teknikleri sıvı kromatografisi (SK) ve gaz kromatografisi (GK) kolonlarıdır; bu yöntemler sırasıyla SK-KS ve GK-KS olarak adlandırılır (121). KS, metabolitlerin doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlar. Kromatografik ayırma yöntemleriyle birlikte kullanıldığında, KS'nin ayırma kapasitesi daha da artar. Ayrıca, KS kısa analiz süreleriyle (genellikle 5 ila 140 dakika arasında) çalışabilir ve hem niteliksel hem de niceliksel seçici analizler yapabilme imkânı sunar. Ancak, KS'nin başlıca dezavantajları arasında cihazların yüksek maliyeti ve örneklerin kütle spektrometresine girmeden önce ayrıştırma veya saflaştırma işlemlerine ihtiyaç duyması yer alır (119).

NMR spektroskopisi, belirli atom çekirdeklerinin manyetik özelliklerinden yararlanarak katı veya sıvı örneklerdeki moleküllerin yapısını, kimliğini, konsantrasyonunu ve davranışını tahribatsız bir şekilde analiz eden, bilgi açısından zengin bir yöntemdir (122). Bir numunenin, atom çekirdeklerinin dış bir manyetik alandaki enerji Emilimi ve yeniden yayılması prensibine dayanan bir spektroskopi tekniğidir (123). NMR'de bir özellik, kimyasal kayma-yoğunluk değeri çifti olarak tanımlanır (120). NMR tarafından üretilen spektral veriler, metabolitlerin konsantrasyonunu belirlemek ve kimyasal yapısını karakterize etmek için kullanılabilir. NMR spektroskopisinin en büyük avantajları arasında tahribatsız ve invaziv olmayan özelliklerine ek olarak numunelerin kolay hazırlanabilirliği ve yüksek tekrarlanabilirliği yer almaktadır (124). Ayrıca NMR spektroskopisi, sadece birkaç dakikalık kısa bir süre içerisinde eş zamanlı olarak yüksek sayıda metabolit tespit edebilme kapasitesi ve düşük maliyetli oluşuyla da metabolomik araştırmalar kapsamında çok değerlidir (18, 125). Tablo 1, NMR spektroskopisinin KS ile karşılaştırıldığında avantajlarını ve sınırlamalarını özetlemektedir.

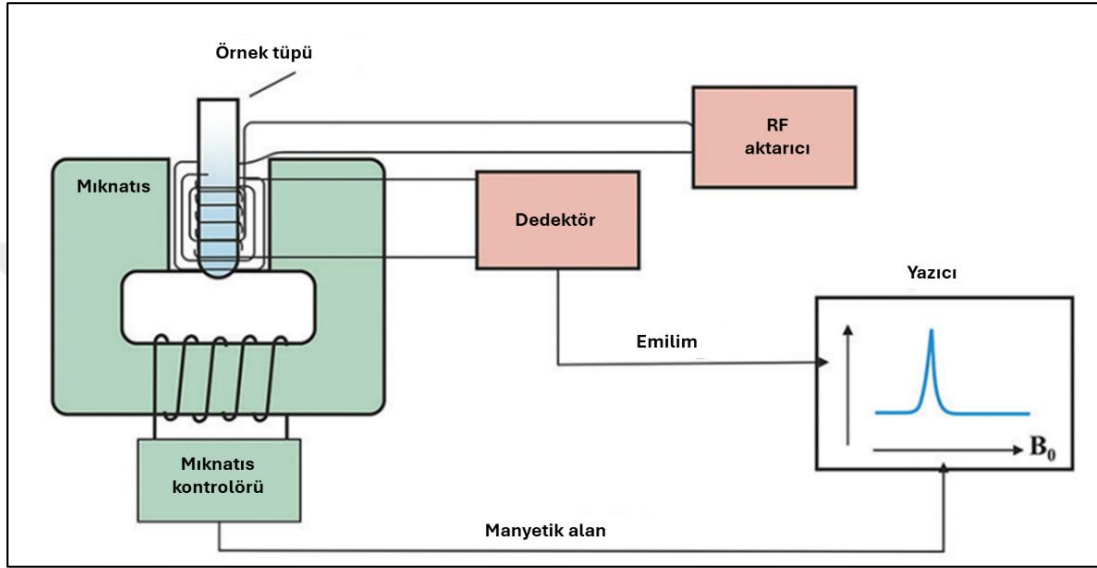
Tablo 1. NMR spektroskopisi ve KS tekniklerinin metabolomik araştırmalarda analitik bir araç olarak avantajları ve sınırlamaları (125)

Özellik	NMR	KS
Duyarlılık	Düşük, ancak daha yüksek alan gücü, kriyo ve mikro problar ve dinamik nükleer polarizasyon ile iyileştirilebilir.	Yüksek, ancak kompleks ve tuzlu karışımlarda iyon baskılanması yaşayabilir.
Örnek Ölçümü	Tüm örnek tek bir ölçümde analiz edilir.	Farklı metabolit sınıfları için genellikle farklı kromatografi teknikleri gereklidir.
Örnek Geri Kazanımı	Yok edici değildir; örnek uzun süre saklanabilir, aynı örnek üzerinde birden fazla analiz yapılabilir.	Yok edici bir tekniktir.
Tekrar Edilebilirlik	Çok yüksek	Orta derecede
Örnek Hazırlığı	Minimum örnek hazırlığına ihtiyaç duyar.	Daha karmaşıktır; farklı SK kolonları ve iyonizasyon koşullarının optimize edilmesi gerekir.
Deney Süresi	Tek boyutlu ¹ H-NMR için 5 dakika	En basit analiz için 10 dakikadan fazla (GK-KS veya SK-KS kullanılarak)
Doku Örnekleri	Evet, doku örnekleri doğrudan analiz edilebilir.	Hayır, doku ekstraksiyonu gerektirir.
Hedef Analiz	Hedeflenmiş analizler için daha zayıftır.	Hedeflenmiş analizler için üstündür.
Moleküler Dinamik ve Difüzyon	Moleküler difüzyon ve dinamikleri incelemek için kullanılabilir.	Moleküler difüzyon ve dinamikleri incelemek için kullanılamaz.

2.4.2.1 Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

NMR spektroskopisi, atom çekirdeklerinin manyetik alan ile etkileşimini inceleyen bir tekniktir. Bu teknikte, metabolitler içindeki atom çekirdeklerinin doğal manyetik özelliklerinden yararlanır. Şekil 10'da gösterildiği gibi, bir örnek güçlü bir manyetik alana maruz bırakılıp, radyo frekansı darbeleri uygulandığında NMR, metabolitlerin kimyasal yapısı ve konsantrasyonu hakkında önemli bilgiler sağlar (126). NMR spektroskopisi moleküllerin değil, çekirdeklerin özelliklerini ölçtüğü için, farklı kimyasal sınıflar arasında NMR tepkisi eşit olur. Belirli deneysel koşullarda NMR, ilgili ¹H-NMR sinyallerinin entegrasyonu yoluyla metabolitlerin mutlak miktarını belirlemeye olanak tanır (127, 128). Bu şekilde, NMR ile doğrudan yapılan

analizler, yüksek verimli metabolomik çalışmalara son derece uygundur ve geniş bir metabolit yelpazesini nicel ve tarafsız bir şekilde tespit etme avantajı sunar. KS ile karşılaştırıldığında, NMR daha geniş bir dinamik tespit aralığına sahiptir ve KS analiz sonuçları büyük ölçüde iyonizasyon koşulları ve kullanılan cihazlara bağlı olduğundan, NMR daha az yanlıdır.



Şekil 10. NMR spektrometresinin şematik sunumu: manyetik alan, mıknatıs ve dedektör gibi çeşitli bileşenler arasındaki ilişki (129)

NMR spektroskopisinde, bir bileşik manyetik bir alana yerleştirilir ve bileşikteki izotoplar (örneğin ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O) radyasyonu emerek rezonansa girerler. Rezonans frekansı, izotopların küçük molekül içindeki konumuna bağlı olarak değişir. NMR spektrumundaki rezonans zirveleri, kimyasal değişiklikleri yansıtan spektral yoğunluklar ve frekanslarla ilişkilidir. Ortaya çıkan NMR spektrumu, farklı pozisyonlarda ve yoğunluklarda tepe noktalarından oluşur ve her bileşik kendine özgü bir desen sergiler. NMR'deki kimyasal kaymalar, dahili bir referansa göre raporlanır. KS'den farklı olarak, NMR her türlü proton, karbon, azot veya oksijen içeren bileşiği tespit edebilir, örneği analiz sırasında yok etmez ve neredeyse hiç örnek hazırlığı gerektirmez. Bu sayede, kapsamlı bir örnek hazırlığına gerek kalmadan bileşiklerin konsantrasyonları belirlenip değerlendirilebilir. NMR'nin en önemli avantajlarından biri, tek bir deneyde çeşitli kimyasal türleri tespit edebilme ve ayırt etme yeteneğidir (117, 124).

NMR diğerk spektroskopik yöntemlere göre daha düşük duyarlılığa sahiptir ve sinyal örtüşmesi gibi sorunlarla karşılaşabilir. Bu noktada, çok boyutlu NMR spektrumlarının kullanımı, tek boyutlu NMR'de ortaya çıkan birçok sorunu gidermeye ve daha ayrıntılı yapısal bilgi sağlamaya yardımcı olur (130, 131). Bu kapsamda, iki boyutlu (2B) NMR teknikleri, farklı çekirdeklerden gelen sinyalleri ilişkilendirerek moleküllerin yapısını ve etkileşimlerinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına olanak tanır. Bu teknikler, moleküler yapı hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlar. Literatürde öne çıkan 2B NMR spektrası aşağıda listelenmiştir (131, 132):

- Korelasyon Spektroskopisi (COSY): Bu teknik, birbirine spin ile bağlanmış protonları ilişkilendirir ve iki boyutlu bir spektrum oluşturur. Sinyaller, karşılık gelen protonlar arasında bir bağ varsa birbirine bağlı olur. COSY, molekül içindeki proton-proton etkileşimlerini belirlemede faydalıdır.
- Nükleer Overhauser Etki Spektroskopisi (NOESY): NOESY, birbirine bağlı olmasa da uzaysal olarak yakın olan protonlar arasındaki etkileşimleri tespit eder. Bu teknik, atomların molekül içindeki uzaysal düzenlenişini anlamak için oldukça değerlidir.
- Heteronükleer Tekli Kuantum Tutarlılığı (HSQC): HSQC, protonlar ile doğrudan bağlı oldukları heteroatomlar (örneğin, ^{13}C) arasındaki bağlantıları gösterir. Özellikle karmaşık karışımlardaki sinyallerin hangi protonlara hangi karbonların bağlı olduğunu anlamakta faydalıdır.
- Heteronükleer Çoklu Bağ Tutarlılığı (HMBC): HMBC, doğrudan bağlanmamış fakat bir veya daha fazla bağ ile ayrılmış protonlar ve karbonlar arasındaki uzun menzilli ilişkileri gözlemler. Bu teknik, büyük moleküllerin bağ yapılarını belirlemede yardımcı olur.

Tüm bu bilgiler ışığında NMR, çeşitli kimyasal türleri tek bir deneyde tespit etme yeteneği, esnekliği ve kullanım kolaylığı sayesinde metabolomik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir teknik haline gelmiştir ve biyolojik örneklerin karmaşık metabolik profillerini anlamada değerli bir katkı sunmaktadır.

2.4.3 Epilepsi ve epileptogenezde NMR spektroskopisi ile metabolik incelemeler

Son yıllarda, metabolik bir etiyolojinin epilepsiyi tetikleyebileceği rapor edilmiştir (16, 17). Bunun yanı sıra, epileptik nöbetlerin metabolik değişikliklere yol açtığı da belirtilmiştir (17). Mevcut literatür verileri, metabolomik yaklaşımların epilepsi tanısını destekleyebilecek hızlı bir yöntem olabileceğini ve yeni anti-nöbet tedavi hedeflerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (18).

Literatürde, NMR spektrometrisi kullanılarak epilepsi hayvan modelleri üzerine yapılan metabolomik araştırmalar oldukça sınırlı sayıda yer almaktadır. Bu kapsamda, ilk olarak 2005 yılında Shirayama ve arkadaşları, sıçanlarda amigdaloïd-kindling epilepsi modelini kullanarak hipokampüsteki enerji metabolizması ve amino asit içeriğindeki değişiklikleri ¹H-NMR spektrometrisi ile incelemiştir. Bu çalışma, sıçan hipokampus örneklerinde amigdaloïd-kindling'in amino asit metabolizmasını etkilediğini, ancak enerji metabolizmasında bir değişikliğe yol açmadığını göstermiştir (133). 2008 yılında Rabeson ve çalışma arkadaşları, farelerde oluşturdukları akut kimyasal kindling modeline ait *ex vivo* fare beyin dokusu örneklerinden metabolik profil analizini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada, epileptik nöbet geçiren farelerde alanin, aspartat ve glutamat metabolizmasının, kontrol gruplarına kıyasla değişiklik gösteren metabolik yollar olduğu belirlenmiştir (134). Aynı yıl, Liu ve çalışma arkadaşları, sıçanlarda sağ dorsal hipokampusun elektriksel uyarılmasıyla oluşturulan TLE modelinde, epileptogenezinin erken döneminde pek çok beyin bölgesinde metabolik anormalliklerin ortaya çıktığını göstermiştir (135). 2010 yılında Carmody ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, sıçanlarda pentilentetrazol (PTZ) ile epilepsi indüklenmiş ve serebellum, beyin sapı, prefrontal korteks ve hipokampüsten elde edilen beyin ekstraktlarının metabolomik analizleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, ¹H-NMR spektrometrisi ile elde edilen veriler her beyin bölgesi için farklı metabolik profiller ortaya koymuş; nöbetlerin enerji gereksinimindeki artış, nörotransmitter dengesindeki değişiklikler, nöronal kayıp ve gliozisde artış ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (136). 2013 yılında Smeland ve arkadaşları, pilokarpin enjeksiyonu ile indüklenen TLE fare modelinde SE'den 3,5-4

hafta sonrasındaki kronik dönemdeki farelerin serebral korteks ve hipokampal formasyon (HF) doku örneklerinin metabolik profilini incelemiştir. Bu çalışma, insan TLE ve sıçan kronik epilepsi modellerinde bildirilen metabolik değişikliklere benzer şekilde, HF'de glutamat seviyelerinde azalma ve beyinde mitokondriyal metabolik işlev bozukluğu olduğunu göstermiştir. Ayrıca, TKA döngüsünün ara ürünleri ve bunlardan türetilen önemli metabolitlerin – özellikle serebral kortekste glutamat, glutamin ve aspartat; HF'de ise sitrat, süksinat, malat, GABA ve aspartat – yenilenme/aktifleşme döngüsünde azalma tespit edilmiştir. Bu bulgular, SE geçiren farelerde hem serebral korteks hem de HF'de TKA döngüsünün bozulmuş fonksiyonunu doğrulamış ve bozulmuş mitokondriyal fonksiyonların hedeflenmesinin ilaca dirençli epilepsi tedavisi için umut verici bir strateji olabileceği önerilmiştir (137). 2014 yılında Wei ve çalışma arkadaşları tarafından yürütülen bir araştırmada, anisatin ile nöbet tetiklenen farelerin korteks ve beyin ekstraktlarında nöbetlerde ortaya çıkan metabolik olaylar incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda, nörotransmisyon, nöromodülasyon, oksidatif stres, enerji, amino asit ve nükleik asit metabolizmalarında bozukluklara neden olan çeşitli metabolitler tespit edilmiştir. Ayrıca, bu araştırma, ilaçların toksisitesi üzerine mekanistik çalışmalarda metabolik yaklaşımların önemini ve gücünü vurgulamıştır (138). 2015 yılında Fauvelle ve çalışma arkadaşları, genetik absans epilepsili sıçanlar (GAERS) ile epileptik olmayan kontrol sıçanlar üzerinde çalışarak, nöbetlerin başlamasından önceki postnatal dönem ve nöbet sergileyen erişkin dönemi içeren iki yaş grubunda metabolik karşılaştırmalar yapmıştır. Bu çalışma sonucunda, serebral olgunlaşma sürecinde glutamat, glutamin, siklo-inositol, alanin ve glutatyonun değişim gösterdiği belirlenmiştir. Erişkin sıçanlarda somatosensör ve motor korteksten elde edilen verilere göre, epileptik olmayan kontrol sıçanlarında siklo-inositol, taurin ve fosfoetanolamin seviyelerinin daha yüksek olduğu ve GAERS ile kontrol sıçanları arasında farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu metabolik fenotipin absans epilepsisinin mevcut patofizyolojik hipotezi ile uyumlu olduğu ve kontrol sıçanlarının varsayılan direncini desteklediği, nöbetlerin başlangıcından önce gözlemlenmiştir (139). 2016 yılında Li ve çalışma arkadaşları, farelerde anisatin kaynaklı konvulsif nöbetlerde diazepamın nöroprotektif etkileri ile ilişkili metabolik olayları araştırmıştır. Farelerin piriform korteks ve serebellum metabolik profilleri üzerinde yapılan analizler, diazepamın

bozulan nörotransmitter ve nöromodulator metabolizmasını yeniden düzenleyerek, oksidatif stresi hafifleterek ve anisatinin neden olduğu amino asit ve nükleik asit metabolizmasındaki bozuklukları iyileştirerek konvulsif nöbet geçiren farelere rahatlama sağlayabileceğini göstermiştir (140).

Literatürdeki veriler ışığında, metabolomik analizlerde çoğunlukla epilepsili bireylerden alınan kan örnekleri ve epileptik modellerden elde edilen beyin örnekleri kullanılmaktadır. Ancak, idrar gibi diğer biyolojik örneklerin de kolay erişilebilir olmaları ve MSS hastalıklarıyla olan yakın ilişkileri nedeniyle metabolik araştırmalar açısından değerli bir seçenek olabileceği belirtilmektedir. Sonuç olarak, epilepsinin farklı evrelerinde toplanan bu farklı örnek türlerinin birlikte analiz edilmesinin, hastalığın gelişimi sırasında metabolomda meydana gelen değişikliklerin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceği dikkat çekmektedir (18).

2.5 Biyobelirteç Nedir?

Biyobelirteç terimi, "biyolojik belirteç" ifadesinin kısaltılmış halidir. Bir biyobelirteç, biyolojik bir durumun veya koşulun ölçülebilir bir göstergesidir. Vücut tarafından bir hastalığa, terapötik bir müdahaleye veya çevresel bir etkene yanıt olarak üretilen bir madde olarak da tanımlanabilir. Biyobelirteçler, araştırma ve tedavi geliştirme, tanı güçlüklerinin üstesinden gelme, prognoz belirleme gibi birçok alanda önemli rol oynar. Bu belirteçler, kan, idrar veya doku örnekleri gibi çeşitli biyolojik materyallerden elde edilebilir ve proteinler, genler ve metabolitler gibi molekülleri içerebilir (141, 142). Aynı zamanda moleküler, histolojik, radyografik ve fizyolojik özelliklere sahip olabilir (143). İdeal bir biyobelirtecin hassas, spesifik, doğru ve non-invaziv olması gerekir. Bununla birlikte, ideal bir biyobelirtecin uzun süre boyunca etkisini sürdürebilmesi ve stabil olması, ayrıca analiz platformunun erişilebilir, hızlı, tekrarlanabilir ve ekonomik açıdan uygun olması çok önemlidir (142, 143).

Biyobelirteçler, her hastanın kişisel özelliklerine göre tedavi planlamayı hedefleyen hassas tıbbın gelişiminde kritik bir rol üstlenmektedir. Biyobelirteçlerin klinik uygulamalara dâhil edilmesi, hastalıkların daha etkili teşhis edilmesine,

öngörülmesine ve tedavi edilmesine olanak tanıyarak hasta bulgularını iyileştirir. Biyobelirteçlerin en büyük avantajlarından biri, hastaların hedefe yönelik tedavilere uygun olarak seçilmesine olanak tanınmasıdır. Belirli hastalıklarla ilişkili biyobelirteçleri belirleyerek, klinisyenler tedaviden en fazla yarar görecektir hastaları seçebilir, böylece tedavi etkinliğini artırırken olası yan etkileri en aza indirebilir (144, 145). Bu doğrultuda, araştırmalar yeni biyobelirteçler ve bunların uygulamalarını ortaya koydukça, kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin potansiyeli giderek artacak ve bu da pek çok tıbbi alanda daha olumlu sağlık sonuçlarına ulaşılmasını mümkün kılacaktır.

2.5.1 Biyobelirteçlerin sınıflandırılması

Biyobelirteçler, klinik uygulamalarda ve araştırmalarda üstlendikleri rollere göre sınıflandırılabilir. Başlıca sınıflandırmalar arasında duyarlılık/risk biyobelirteçleri, tanısal biyobelirteçler, izleme biyobelirteçleri, prognostik biyobelirteçler, prediktif biyobelirteçler ve farmakodinamik/yanıt biyobelirteçleri ve güvenlik biyobelirteçleri yer alır (146). Her bir kategori, kişiselleştirilmiş tıp bağlamında farklı bir amaca hizmet eder ve tedavilerin hastaya özel olarak uyarlanabilme yeteneğini artırır. Tablo 2’de her biyobelirteç kategorisinin tanımı ve temel özellikleri sunulmuştur.

Tablo 2. Biyobelirteç kategorileri, tanımı ve temel özellikleri

Biyobelirteç Kategorisi	Tanım	Temel Özellikler
Duyarlılık/Risk Biyobelirteci	Mevcut durumda hastalık belirtisi göstermeyen bir bireyde, hastalığın gelişme olasılığını gösteren biyobelirteçtir.	Hastalığa yatkınlığı belirlemek için kullanılır; önleyici stratejilerde yaygındır.
Tanısal Biyobelirteç	Hastalığı tespit etmek, doğrulamak veya hastalığın alt türlerine sahip bireyleri belirlemek için kullanılan biyobelirteçtir.	Hastalığın varlığını doğrulamak veya alt tür sınıflandırması için kullanılır.
İzleme Biyobelirteci	Hastalığın durumu, tedavi etkileri veya çevresel maruziyetleri değerlendirmek için tekrarlanan ölçümlerle kullanılan biyobelirteçtir.	Tedavi izleme ve hastalık ilerlemesini takip etmek için kullanılır; zaman içinde tekrar edilen ölçümler yapılır.

Tablo 2. Biyobelirteç kategorileri, tanımı ve temel özellikleri (devam)

Biyobelirteç Kategorisi	Tanım	Temel Özellikler
Prognostik Biyobelirteç	Klinik bir olayın, hastalık tekrarlamasının veya ilerlemesinin olasılığını belirlemek için kullanılan biyobelirteçtir.	Özellikle tanı konmuş bireylerde hastalık sonuçlarını tahmin etmek için kullanılır.
Prediktif Biyobelirteç	Bir tedaviden olumlu ya da olumsuz bir etki görme olasılığı yüksek bireyleri belirlemek için kullanılan biyobelirteçtir.	Tedaviye yanıtı tahmin ederek hastaların tedavi seçiminde yardımcı olur.
Farmakodinamik/Yanıt Biyobelirteci	Bir tıbbi ürün veya çevresel ajana maruz kaldıktan sonra biyolojik bir yanıt oluştuğunu gösteren biyobelirteçtir.	Tedavi etkinliğini değerlendirmek için kullanılır; biyolojik aktiviteyi ölçmede rol oynar.
Güvenlik Biyobelirteci	Bir tedavi veya maruziyetten kaynaklanan zararlı etkilerin olasılığını gösteren biyobelirteçtir.	Tedavilerin olumsuz etkilerini belirlemek ve izlemek için kullanılır.

2.5.2 Epilepsi, epileptogenez ve biyobelirteç çalışmaları

Epileptojenik biyobelirteçlere olan ihtiyaç, epilepsinin teşhis ve tedavisinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu biyobelirteçler, potansiyel epileptojenik yaralanmalar sonrası tedaviye ihtiyaç duyan hastaların belirlenmesine yardımcı olur. Aynı zamanda, olası anti-epileptojenik tedavilerin etkinliğini doğrulamak açısından da önemlidir. Epilepsinin ilerleyen formlarını tespit ederek, bu tür vakalarda daha agresif tedavi yöntemlerinin, örneğin cerrahi müdahalelerin gerekip gerekmediğini ortaya koyarlar. Son olarak, tedavi sonrası hastalığın tamamen iyileşip iyileşmediğini veya önlenip önlenemediğini teşhis etme konusunda da kritik bir işlev üstlenirler (143). Bu nedenlerle, epileptojenik biyobelirteçlerin geliştirilmesi, hastalık yönetiminde büyük bir ihtiyaç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Epileptogenez, yapısal beyin hasarının ardından moleküler ve hücrel değişikliklerin tetiklenmesiyle kendiliğinden nöbetlerin ortaya çıkmasına yol açan bir süreçtir. Bu süreçte nörodejenerasyon, nörogenez, akson ve miyelin hasarı, gliyoz, inflamasyon, anjiyogenez ve kanalopatiler gibi patolojik değişiklikler görülür (73). Bu patolojiler, nöbetlere yol açan bir hücrel ve moleküler ortam oluşturur ve tedaviyle

modüle edilebilir. Epileptojenik dokular, kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), beyin dokusu analizi veya görüntüleme ve elektrofizyoloji yöntemleriyle ölçülebilen biyobelirteçler salgılar. Epileptogenez ve biyobelirteç keşfi, genetik faktörler, mikrobiyota ve çevresel etkenlerden etkilenir. Bu nedenle, biyobelirteç keşfi için multidisipliner ve çok yönlü bir yaklaşım gereklidir (143).

Epileptogenez üzerine yapılan araştırmalar, genetik, moleküler analiz, görüntüleme ve elektrofizyoloji alanlarında farklı biyobelirteçlerin potansiyelini ortaya çıkarmıştır. *CD-40-1C/T* ve *Rs671* gen mutasyonları gibi bazı genetik belirteçlerin, fel sonrası epilepsi riskini artırdığı belirlenmiştir (147, 148). Ancak, bu çalışmalar küçük örnek gruplarıyla yapılmıştır ve bu genetik belirteçlerin hasta sınıflandırmasında kullanılabilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra, mikroRNA'lar epileptogenez sürecinde gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadıkları için gelecek vadeden biyobelirteçler olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, epilepsi gelişme riskini gösterebilecek potansiyel belirteçler olarak değerlendirilmektedirler (149). Bu bilgilere ek olarak, epileptogenez teşhisinde gelecek vadeden iki moleküler biyobelirteç daha tanımlanmıştır. Plazma yüksek hareketlilik grubu kutu proteini 1 (HMGB1) seviyelerindeki artışın, epilepsi geliştirecek hayvanları ayırt etmede etkili olduğu tespit edilmiştir (150). Bununla birlikte, benign çocukluk ağı epilepsi sendromu olan çocuklarda, sa örneklerinde kortizol seviyelerinin yükseldiği ve bu artışın ilk nöbetten önce kronik stresin bir işareti olabileceği belirtilmiştir (151). Öte yandan, gelişmiş nörogörüntüleme teknikleri, özellikle difüzyon manyetik rezonans görüntüleme (MRG), epilepsi gelişme riski ile ilişkili olabilecek beyin yapısındaki değişiklikleri tespit etmek için kullanılmaktadır. Örneğin, akut talamik hasarın, travma sonrası epileptogenez için prognostik bir biyobelirteç olarak önerildiği ve belirli beyin bölgelerinin yaralanma sonrası epilepsi geliştirmeye daha yatkın olabileceği belirtilmiştir (152). Ayrıca, EEG ile tespit edilen yüksek frekanslı osilasyonlar (YFO'lar), nöbet eğilimi ve hastalık şiddeti için potansiyel biyobelirteçler olarak araştırılmaktadır. Bu osilasyonların, altta yatan epileptojenik süreçleri yansıtabileceği öne sürülmektedir (153, 154). Ek olarak, güncel araştırmalar, ekstraselüler veziküllerin epileptogenez ile ilişkili biyobelirteçler taşıyabileceğini göstermektedir. Bu çalışmalara göre, travmatik beyin hasarı ve SE

esnasında ekstraselüler veziküllerin sayısında ve içeriğinde meydana gelen değişiklikler, altta yatan patofizyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir ve bu veziküller potansiyel tanı araçları olarak kullanılabilir (155).

Epileptojenik sürecin karmaşıklığı dikkate alındığında, antiepileptojenik bir ajanın maliyet-etkin bir klinik denemesinde tek bir biyobelirtecin yeterli olmayacağı; bunun yerine, hassasiyeti ve özgüllüğü artırmak için bir biyobelirteç profiline ihtiyaç duyulacağı öngörülmektedir (143).



3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışmada 48 adet, 250-450 g ağırlığında genç erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Bu sıçanlardan 30 adedi Acıbadem Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ACUDEHAM), 18 adedi İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Deney başlamadan önce, sıçanlar laboratuvar ortamına 7 gün süreyle alıştırmıştır. Ayrıca, sıçanların ortama alışmalarını sağlamak ve dış stres faktörlerini en aza indirmek amacıyla bir dokunma protokolü uygulanmıştır. Bu, sıçanların 5 gün boyunca her gün 5 dakika süreyle elle tutulması yoluyla gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar, oda sıcaklığında ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde (ışıklar sabah 7:00'de açılacak şekilde) tutulmuş ve yiyecek ve suya sınırsız erişim sağlamıştır. Kullanılan hayvan sayısını azaltmak ve hayvanların acı çekmesini en aza indirmek için her türlü çaba gösterilmiştir. Epilepsi çalışmalarının doğası gereği zor, uzun süreli ve karmaşık yapısı nedeniyle, SE sonrası sıçanlarda beslenme ve su alımı konusunda zorluklar ortaya çıkmıştır. Bu durum, sıvı alımını sağlamak için gerekli destek verilerek ve yiyeceklerin ıslatılarak kafeslere yerleştirilmesiyle çözülmüştür. Ayrıca, hayvanlarda olası tahriş veya yaralanmayı önlemek amacıyla, SE indüklenen her sıçan bu süreç boyunca ayrı bir kafeste tutulmuştur. Hayvan bakımı, deneysel protokoller ve ötenazi ile ilgili tüm işlemler, Acıbadem Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (onay numarası: HDK-2022/80).

3.2 Kimyasallar

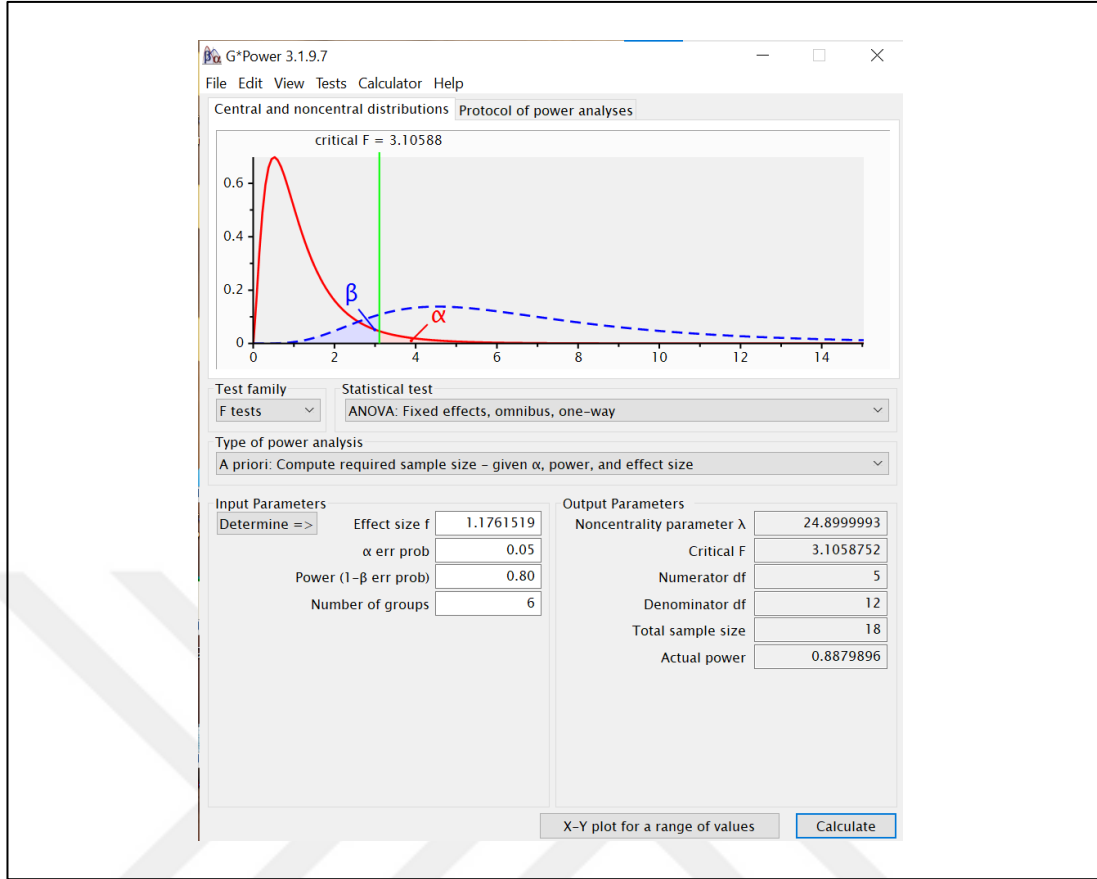
Lityum klorür, metilskopolamin ve pilokarpin hidroklorür Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, ABD)'den temin edilmiştir. Ayrıca, tiyopental sodyum Türkiye'de Menarini Group'un bir parçası olan İbrahim Etem'den temin edilmiştir. Uygulama için 3 mEq/kg lityum klorür enjekte edilebilir su ile karıştırılmış ve intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Hem 1 mg/kg metil skopolamin hem de 20 mg/kg pilokarpin

hidroklorür %0,9 salin solüsyonu içinde hazırlanmış ve intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Benzer şekilde, 30 mg/kg tiyopental sodyum enjekte edilebilir su içinde hazırlanarak intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Uygulanan ilaç dozları önceki çalışmalara göre seçilmiştir (156, 157).

3.3 Grup Büyüklüğünün Belirlenmesi

Çalışmanın ana amacı; epileptogenezin tüm dönemlerine ait toplanacak olan plazma ve idrar örneklerinde metabolit ölçümünü gerçekleştirmektir. Literatüre göre, bu kapsamda gerçekleştirilen metabolit tarama deneylerinden beklenen etki göz önünde bulundurularak güç analizi G Power 3.1 programı kullanılarak tamamlanmıştır (158, 159). Yapılan güç analizinin sonucunda (Şekil 11) ve sıçanlarda TLE modelinin mortalitesinin yüksek olması nedeniyle bu projede toplam 48 tane sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar rastgele 6 gruba ayrılmıştır. En nihayetinde, aşağıda listelenmiş olan deney grupları ile çalışma tamamlanmıştır:

1. TLE-Akut Dönem Grubu (SE-48h, n=5): Bu gruptaki sıçanlarda SE oluşturulmuş ve epileptogenezin akut döneminde kan ve idrar örnekleri toplanmıştır.
2. Kontrol-Akut Dönem Grubu (C-48h, n=3): Bu gruptaki sıçanlarda SE oluşturulmamış, ancak epilepsi grubu ile uyumlu akut dönemde kan ve idrar örnekleri toplanmıştır.
3. TLE-Latent Dönem Grubu (SE-1hf, n=5): Bu gruptaki sıçanlarda SE oluşturulmuş ve epileptogenezin latent döneminde kan ve idrar örnekleri toplanmıştır.
4. Kontrol-Latent Dönem Grubu (C-1hf, n=7): Bu gruptaki sıçanlarda SE oluşturulmamış, ancak epilepsi grubu ile uyumlu akut dönemde kan ve idrar örnekleri toplanmıştır.
5. TLE-Kronik Dönem Grubu (SE-6hf, n=8): Bu gruptaki sıçanlarda SE oluşturulmuş ve epileptogenezin kronik döneminde kan ve idrar örnekleri toplanmıştır.
6. Kontrol-Akut Dönem Grubu (C-6hf, n=6): Bu gruptaki sıçanlarda SE oluşturulmamış, ancak epilepsi grubu ile uyumlu akut dönemde kan ve idrar örnekleri toplanmıştır.



Şekil 11. Güç analizi verileri

3.4 SE İndüksiyonu

Bu çalışmada, sıçanlarda tekrarlayan düşük dozda lityum klorür-pilokarpin hidroklorür intraperitoneal enjeksiyonları kullanılarak SE indüklenmiş ve TLE modeli oluşturulmuştur (157). Deney grubundaki tüm sıçanlara, 3 mEq/kg lityum klorür intraperitoneal enjeksiyonundan 20 saat sonra pilokarpin hidroklorür (20 mg/kg; intraperitoneal) uygulanmıştır. SE oluşana kadar her 30 dakikada bir 20 mg/kg pilokarpin hidroklorür enjekte edilmiştir ve bu işlem en fazla 5 dozla sınırlandırılmıştır. Periferik kolinerjik etkileri engellemek için, ilk pilokarpin hidroklorür enjeksiyonundan 30 dakika önce metilskopolamin (1 mg/kg; intraperitoneal) uygulanmıştır. Hayvanlardaki SE durumu, Tablo 3'te gösterildiği üzere, davranışsal olarak Wamil ve arkadaşları (1989) tarafından uyarlanan Racine'nin (1972) ölçeğinin değiştirilmiş bir versiyonuna göre değerlendirilmiştir (160, 161). Ölüm oranını azaltmak amacıyla, SE'nin başlamasından 90 dakika sonra sıçanlara 30

mg/kg tiyopental sodyum intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir ve gerektiğinde 10 dakika arayla en fazla iki ek doz uygulanmıştır.

Tablo 3. Wamil ve arkadaşları (1989) tarafından uyarlanan Racine'nin (1972) ölçeği

Evre	Gözlemlenen Belirtiler
1	Akinezi, sabit bakış ve salya akması
2	Baş ve ön ayaklarda klonus, "ıslak köpek" titremeleri
3	Ön ayaklarda klonus, arka ayaklar üzerinde doğrulma
4	Genel kasılmalar, arka ayaklar üzerinde doğrulma ve düşme, SE
5	Ölümlü sonuçlanma

3.5 Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması

Epileptogenez indüksiyonunun ardından sıçanlardan plazma örnekleri alınarak, epileptogenezin akut, latent ve kronik evrelerindeki metabolik değişiklikler incelenmiştir. Epileptogenezin farklı evrelerine işaret eden zaman dilimleri, önceki çalışmalar dikkate alınarak belirlenmiştir (101, 159, 162). Bu doğrultuda, SE'den sonra sırasıyla 48 saat, 7 gün ve 6 hafta olmak üzere akut, latent ve kronik evrelerde kan örnekleri toplanmıştır. Sıçanların venöz kanı, izofluran (1–2% oksijen) ile düşük seviyeli anestezi altında altında kalp ponksiyonu yöntemi kullanılarak heparin ile yıkanmış şırıngalarla toplanmış ve steril etilendiamintetraasetik asit (EDTA) kan toplama tüplerine aktarılmıştır. Toplanan kan örnekleri hemen işleme alınmış ve plazma elde etmek amacıyla 4°C'de, 2500 × g'de 15 dakika süreyle iki kez santrifüj edilmiştir. İzole edilen plazma örnekleri de sıvı azotta hızla dondurulmuş ve daha sonraki analizler için -80°C'de saklanmıştır (163).

Epileptogenezin yukarıda belirtilmiş olan evrelerine ait idrar örneklerinin elde edilmesi için ise metabolik kafesler kullanılmıştır. Bu kapsamda her bir sıçan epileptogenezin hedeflenen evresi ile uyumlu zamanda bir gün boyunca metabolik kafeste barındırılmıştır ve 24 saatlik idrar örneği toplanmıştır (164). Toplanan idrar örnekleri 4°C'de 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatantlar aşağıda ayrıntılı olarak anlatılan analizlerde kullanılmak üzere sıvı azotta hızla dondurularak ileriki analizler için -80°C'de saklanmıştır.

3.6 NMR Spektrometrisi için Numunelerin Hazırlaması ve NMR Süreci

NMR analizi öncesinde -80°C 'de saklanan plazma ve idrar örnekleri 4°C 'de çözdürülmüştür. Kısa bir vorteksi takiben, numuneler 4°C 'de 5 dakika boyunca $14.000 \times \text{g}$ 'de santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant, plazma için bir mikrosantrifüj tüpünde eşit hacimde ($300 \mu\text{L}$) tampon çözeltisi (doğrudan Bruker'den temin edilmiştir) ile, idrar örnekleri için ise $900 \mu\text{L}$ süpernatant ve $100 \mu\text{L}$ tampon çözeltisi (doğrudan Bruker'den temin edilmiştir) karıştırılmıştır. Bu karışımlar ($600 \mu\text{L}$ ve $1000 \mu\text{L}$) daha sonra ileri analiz için 5 mm SampleJet NMR tüplerine aktarılmıştır (165, 166). Spektroskopik analizler 600 MHz frekansında çalışan bir Bruker Avance III HD serisi spektrometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrometre 5 mm geniş bantlı ters prob ile donatılmış ve numune soğutması için Bruker SampleJet robotik sisteminin (5°C sıcaklıkta ayarlanmış) entegrasyonu ile daha da geliştirilmiştir. Analizlere, literatürde açıklanan protokole göre titiz bir kalibrasyon prosedürü izledikten sonra başlanmıştır (167). Referans standartları elde etmek için "In vivo Konsantrasyon Ölçümleri için Elektronik Referans Metodu" yöntemi uygulanmıştır (166). ^1H NOESY spektrumları, plazma için 41, idrar için ise 150 adet hastalıkla ilişkili küçük metabolitin otomatik metabolit anotasyonu ve kantifikasyonu için hazırlanmış bir veri seti oluşturmak amacıyla, sağlanan B.I.QUANT-PSTM ve B.I.QUANT-URTM (B.I.: Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Almanya) yöntemi kapsamında kullanılmıştır (165, 166, 168).

3.7 İstatiksel Analiz

Metabolitlerin istatistiksel analizi, MetaboAnalyst 6.0 (www.metaboanalyst.ca, Ocak–Ağustos 2024 tarihleri arasında birçok kez erişildi) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (169). ^1H -NMR tabanlı metabolomik verilerin analizine başlamadan önce, veri filtreleme ve veri bütünlüğü kontrolleri yapılarak temel verilerin eksiksizliği ve doğruluğu sağlanmıştır. Bu kontroller, bileşik konsantrasyonları veya tepe yoğunlukları için negatif olmayan değerlerin doğrulanmasını ve veri boşluklarının giderilmesini içermiştir. Veriler, MetaboAnalyst 6.0'daki normalizasyon modülü kullanılarak normalize edilmiştir. Veriler, logaritmik

dönüşüm (taban 10) ile işlenmiş ve otomatik olarak ölçeklendirilerek normalizasyon sağlanmıştır. TLE model grupları ile bunlara karşılık gelen kontrol grupları arasındaki farklılıkları incelemek amacıyla çok değişkenli analiz, ortogonal kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (OPLS-DA) modeli ile yapılmıştır. Ayrıca, keşifsel veri analiz sürecinin bir parçası olarak tek değişkenli analiz de gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Epileptogenez ile ilişkili potansiyel metabolitleri belirlemek amacıyla, 1.5'lik bir eşik değeri ile katlanma değişiklikleri (KD) analizi yapılmıştır. Eşik değerler, önceki araştırmalara dayandırılarak seçilmiştir (159). Biyolojik ve istatistiksel önemlerine göre kilit özellikleri belirlemek için volkan grafiği analizi uygulanmış, KD kriteri (x) 1.5 ve t-testi eşik değeri (y) 0.05 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, aksi belirtilmediği durumlar hariç, gruplar arasında $KD \geq 1.5$ ve $p \leq 0.05$ olan değişkenler anlamlı kabul edilmiştir. Metabolik yolak analizi için ise MetaboAnalyst 6.0 ve KEGG metabolik yolak veritabanı (*Rattus norvegicus*) kullanılmıştır.

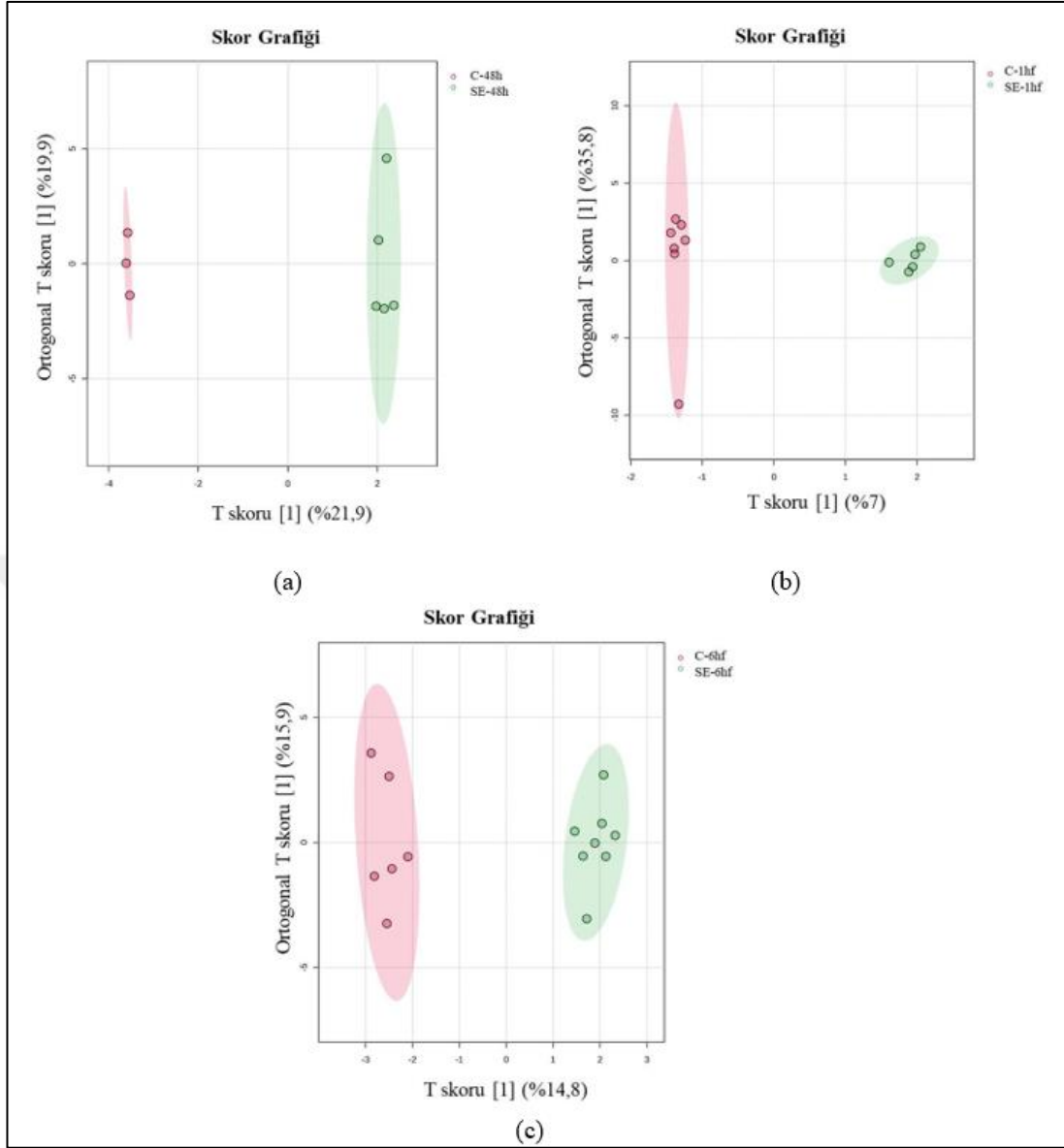
4 BULGULAR

Bu tez çalışmasında, lityum-pilokarpin modeli kullanılarak TLE modeli oluşturulan sıçanlarda, epileptogenez süreci için olası biyobelirteçlerin belirlenebilmesi adına, epileptogenezin her bir evresinde plazma ve idrar örnekleri toplanmış ve metabolomik profillemeye yapılmıştır. Bu süreçte, grup örneklem büyüklüğünün belirlenmesi için yapılan güç analizi sonucunda, her grubun en az 3 hayvandan oluşması gerektiği belirlenmiştir. Ancak, deney sırasında yüksek mortalite oranları nedeniyle, başlangıçta 48 hayvan ile başlanan çalışmada, kalan 34 hayvan ile araştırma tamamlanmıştır.

4.1 Epileptogenez Sürecinde Plazmaya Ait Metabolik Profillemeye Bulguları

4.1.1 Plazmadaki metabolik değişimlerin genel profili

OPLS-DA modeli, epileptogenez sürecinin üç farklı aşamasında önemli farklılıklar göstermiştir. Bu farklılıklar sırasıyla SE-48h ve C-48h grupları (ortogonal T skoru = %19.9, T skoru = %21.9, Şekil 12a), SE-1hf ve C-1hf grupları (ortogonal T skoru = %35.8, T skoru = %7, Şekil 12b) ve SE-6hf ve C-6hf grupları (ortogonal T skoru = %15.9, T skoru = %14.8, Şekil 12c) arasında gözlemlenmiştir.

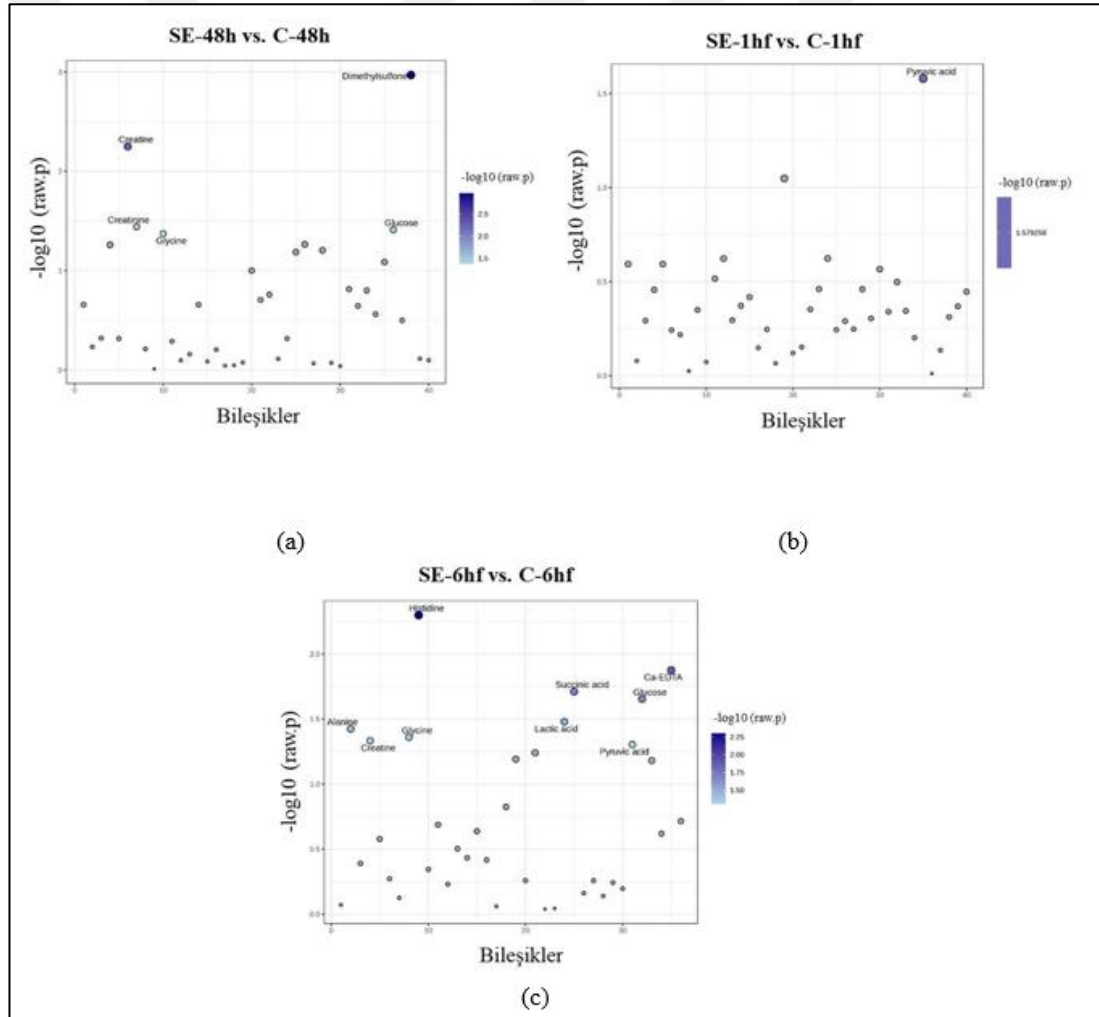


Şekil 12. Plazma örneklerinde epileptogenezin üç farklı zaman noktası için iki bileşenli OPLS-DA modelinin skor grafiği: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf için NMR verileri

4.1.2 Plazmadaki belirli metabolitlerin değişimi

Metabolitler, sağlık ve hastalık süreçlerinde yer alan karmaşık biyokimyasal süreçlerin anlaşılmasında kritik roller oynar. Epileptogenez sürecinde plazma metabolik profilinde olası değişiklikleri incelemek amacıyla, SE ve kontrol grupları karşılaştırılmıştır. Bu amaçla veri seti tek değişkenli analize tabi tutulmuştur. SE ve kontrol grupları arasındaki metabolik özelliklerdeki anlamlı farklılıkları doğrulamak

için Student's t-testi ve KD analizleri ($p \leq 0.05$ ve $KD \geq 1.5$) kullanılmıştır. t-testi sonuçlarına göre, SE-48h grubunda C-48h grubuna kıyasla dimetilsülfon (DMSO₂), kreatinin ve glikoz konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenirken, kreatin ve glisin konsantrasyonlarında artış görülmüştür (Şekil 13a). Epileptogenezisin latent dönemini temsil eden SE-1hf grubunda, C-1hf grubuna kıyasla sadece pirüvik asit konsantrasyonunda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 13b). SE-6hf grubunda ise histidin, kalsiyum-etilendiamintetraasetik asit (Ca²⁺-EDTA) ve glikoz konsantrasyonlarında anlamlı azalmalar olurken; süksinik asit, laktik asit, alanin, glisin, kreatin ve pirüvik asit konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir (Şekil 13c).



Şekil 13. Plazma örneklerinde önemli ölçüde değişmiş metabolitler: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf NMR verileri için t-testi istatistikleri

Epileptogenez ile ilişkili olabilecek metabolitleri belirlemek amacıyla, 1.5 eşik değerine sahip KD analizi yapılmıştır. KD değeri ≥ 1.5 olan metabolitler, epileptogenezin akut, latent ve kronik fazları için sırasıyla Tablo 4, 5 ve 6'da listelenmiştir.

Tablo 4. Epileptogenezin akut fazı için, plazmada $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler

Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log ₂ (KD)
2-Oksoglutarik asit	12.622	36.579
Asetoasetik asit	92.824	32.145
Dimetilsülfon (DMSO ₂)	0.2	-23.219
Kreatinin	0.22222	-21.699
Aseton	0.23878	-20.663
Sarkozin	0.24444	-20.324
Kreatin	35.944	18.457
2-Aminobütirik asit	0.29483	-17.621
Gliserol	0.42424	-1.237
Etanol	0.42857	-12.224
Lizin	0.42857	-12.224
Pirüvik asit	22.105	11.444
Treonin	20.349	1.025
Asetik asit	0.5432	-0.88043
Laktik asit	18.209	0.86468
Asparajin	1.08	0.848
2-Hidroksibütirik asit	1.08	0.848
Alanin	16.074	0.68469
Ornitin	0.63214	-0.66168
Glisin	15.355	0.6187
3-Hidroksibütirik asit	15.074	0.59206

Tablo 5. Epileptogenezin latent fazı için, plazmada $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler

Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log ₂ (KD)
2-Hidroksibütirik asit	0.16903	-25.647
Prolin	44.318	21.479
Gliserol	0.40878	-12.906

Tablo 5. Epileptogenezin latent fazı için, plazmada $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler (devam)

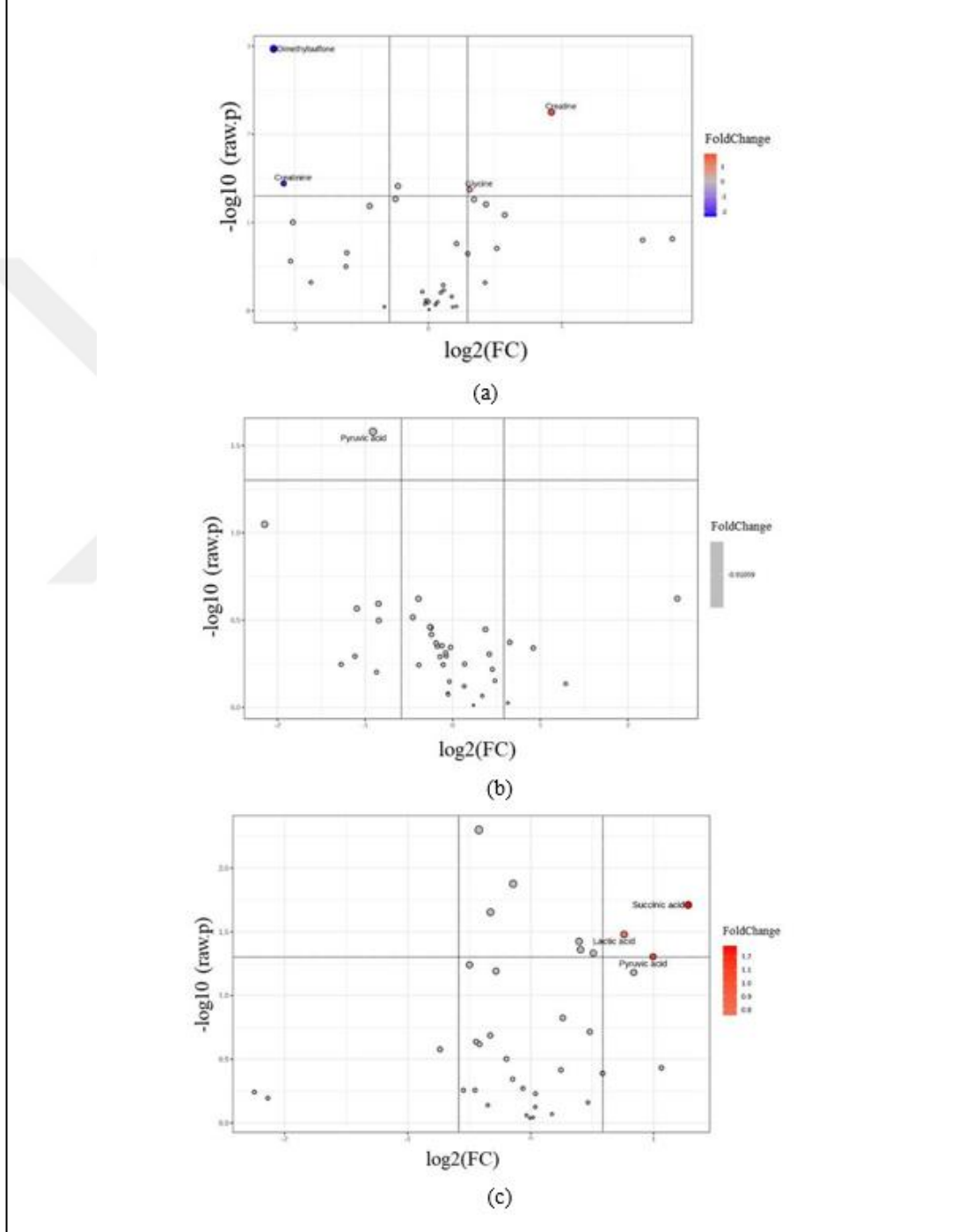
Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log ₂ (KD)
Ornitin	24.182	12.739
2-Aminobütirik asit	21.691	11.171
Kolin	21.356	10.946
2-Oksoglutarik asit	0.52835	-0.92043
Pirüvik asit	18.798	0.91059
Aseton	18.273	0.86969
Etanol	1.08	0.848
Asparajin	1.08	0.848
3-Hidroksibütirik asit	1.08	0.84436
Lizin	0.63636	-0.65208
Glutamik asit	0.64665	-0.62893

Tablo 6. Epileptogenezin kronik fazı için, plazmada $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler

Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log ₂ (KD)
Asetoasetik asit	0.21086	-22.456
Aseton	0.22751	-2.136
Süksinik asit	24.292	12.805
Ornitin	20.893	1.063
Pirüvik asit	19.929	0.99484
Gliserol	1.787	0.83751
Laktik asit	16.925	0.75916
Kreatinin	0.6	-0.73697

Yukarıdaki bulgulara ek olarak, her epileptogenez fazı ile ilişkili potansiyel metabolitlerin önemini kontrol etmek için volkan grafiği analizi yapılmıştır. Şekil 14a'da, SE-48h grubunda kontrol grubuna kıyasla DMSO₂ ve kreatinin konsantrasyonlarının azaldığı, kreatin ve glisin konsantrasyonlarının ise arttığı gösterilmiştir. Epileptogenezin latent fazı ile ilgili olarak SE-1hf grubunda, kontrol grubuna kıyasla pirüvik asit konsantrasyonunda hafif bir artış gözlenmiştir (Şekil 14b). SE-6hf grubunda ise volkan grafiği analizine göre süksinik asit, laktik asit ve pirüvik asit konsantrasyonlarında anlamlı artışlar tespit edilmiştir (Şekil 14c). Tablo 7,

epileptogenez ile anlamlı şekilde ilişkili bulunan metabolitleri ve ilgili istatistiksel sonuçları listelemektedir. Metabolik profildeki değişiklikler esas olarak SE sonrası 48. saat ve 6. haftada meydana gelmiştir. Özellikle SE sonrası 6. haftada tüm metabolik özelliklerde önemli artışlar kaydedilmiştir (Şekil 14c ve Tablo 7).



Şekil 14. NMR plazma metabolitleri verilerinin volkan grafiği analizi: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf

Tablo 7. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde değişen plazma metabolitleri

Gruplar	Metabolitler	KD	log ₂ (KD)	p	-log(p)	Artmış/Azalmış
C-48h vs SE-48h (Akut önem)	DMSO ₂	0.2	-2.321	0.001	2.969	Azalmış
	Kreatinin	0.222	-2.169	0.036	1.442	Azalmış
	Glisin	1.535	0.618	0.042	1.372	Artmış
	Kreatin	3.594	1.845	0.005	2.250	Artmış
C-1hf vs SE-1hf (Latent dönem)	Pirüvik asit	1.879	0.910	0.026	1.579	Artmış
	Laktik asit	1.692	0.759	0.033	1.479	Artmış
C-6hf vs SE-6hf (Kronik dönem)	Pirüvik asit	1.992	0.994	0.049	1.304	Artmış
	Süksinik asit	2.429	1.280	0.019	1.710	Artmış

4.1.3 Plazma metabolitlerinin metabolik yolak analizi

Metabolik yolak analizi, MetaboAnalyst 6.0 ve KEGG metabolik yolak veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 8, anlamlı değişiklikler gösteren metabolitleri ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$ kriterlerine uyan) ve $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olan metabolik yolları listelemektedir. Hem akut hem de kronik fazlarda metabolitler ve yollar arasında anlamlı ilişkiler gözlenmiştir. Ancak latent fazda metabolit temelli yolak etkileri anlamlı bulunmamıştır.

4.1.3.1 Glisin, serin ve treonin metabolizması

Akut fazda, glisin ve kreatin metabolitlerinin konsantrasyonlarında anlamlı artışlar gözlenmiştir. Bireysel metabolit analizinden bağımsız olarak yapılan yolak analizi, glisin, serin ve treonin metabolizması yolunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koymuştur. Glisin ve kreatin metabolitlerinin bu yolakta yer aldığı dikkat çekicidir. Latent ve kronik fazlarda ise glisin, serin ve treonin metabolizmasında anlamlı metabolit değişiklikleri bulunmamıştır.

4.1.3.2 Birincil safra asidi biyosentezi

Bireysel metabolit analizinden bağımsız olarak yapılan yolak analizi, SE-48h ve C-48h grupları arasında “birincil safra asidi biyosentezi” yolunda anlamlı değişiklikler ortaya koymuştur. Kriterlerimize ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$) göre anlamlı bulunan metabolitler arasında yalnızca glisin bu yolakta yer aldığı dikkat çekicidir. Birincil safra asidi biyosentezi yolunda, latent ve kronik fazlarda anlamlı metabolit değişiklikleri gözlenmemiştir.

4.1.3.3 Piruvat metabolizması

Piruvat metabolizması ile ilgili anlamlı değişiklikler, yalnızca SE sonrası 6 hafta (kronik faz) döneminde laktik asit ve pirüvik asit metabolitlerinin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir. Buna karşılık, akut ve latent fazlarda bu yolakla ilgili anlamlı metabolit değişiklikleri gözlenmemiştir.

4.1.3.4 Glikoliz/Glikoneogenez

Kronik fazda laktik asit ve pirüvik asit metabolitlerindeki artışlarla ilişkili olarak glikoliz/glikoneogenez metabolik yolunda anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Ancak, akut ve latent fazlarda glikoliz/glikoneogenez yollarında önemli değişiklikler tespit edilmemiştir.

4.1.3.5 Arjinin ve prolin metabolizması

Önceden belirlediğimiz kriterlere ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$) göre anlamlı olarak değişen metabolitlerden yalnızca pirüvik asit, kronik fazda arjinin ve prolin metabolizması ile ilişkilendirilmiştir. Pirüvik asit düzeyi, SE sonrası 6 hafta grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla artış göstermiştir.

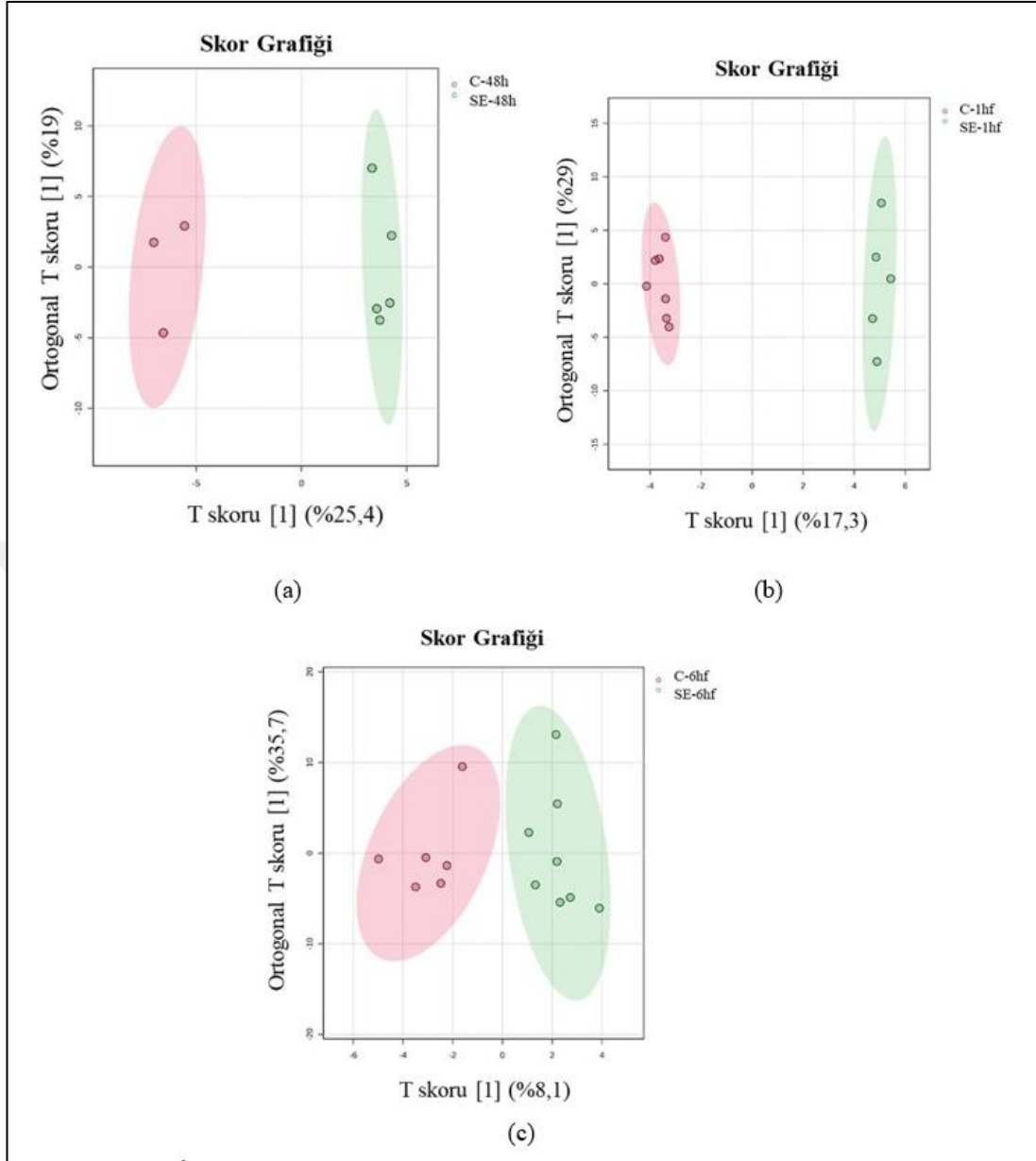
Tablo 8. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde değişen plazma metabolitleri ve metabolik yollar

Metabolik Yolak (KEGG) (<i>Rattus norvegicus</i>)	SE-48h vs. C-48h (Akut dönem)		SE-1hf vs. C-1hf (Latent dönem)		SE-6hf vs. C-6hf (Kronik dönem)	
	p	Metabolitler	p	Metabolitler	p	Metabolitler
Glisin, serin ve treonin metabolizması	0.015	Glisin Kreatin				
Primer safra asidi biyosentezi	0.042	Glisin				
Piruvat metabolizması					0.021	Laktik asit Pirüvik asit
Glikoliz/glukoneogenez					0.021	Laktik asit Pirüvik asit
Arjinin ve prolin metabolizması					0.029	Pirüvik asit

4.2 Epileptogenez Sürecinde İdrara Ait Metabolik Profillemeye Bulguları

4.2.1 İdrardaki metabolik değişimlerin genel profili

İdrar örnekleri ile yapılan OPLS-DA modeli, epileptogenezin üç farklı aşaması arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur: SE-48h ve C-48h grupları (ortogonal T skoru = %19, T skoru = %25,4, Şekil 15a), SE-1hf ve C-1hf grupları (ortogonal T skoru = %29, T skoru = %17,3, Şekil 15b) ve SE-6hf ve C-6hf grupları (ortogonal T skoru = %35,7, T skoru = %8,1, Şekil 15c).



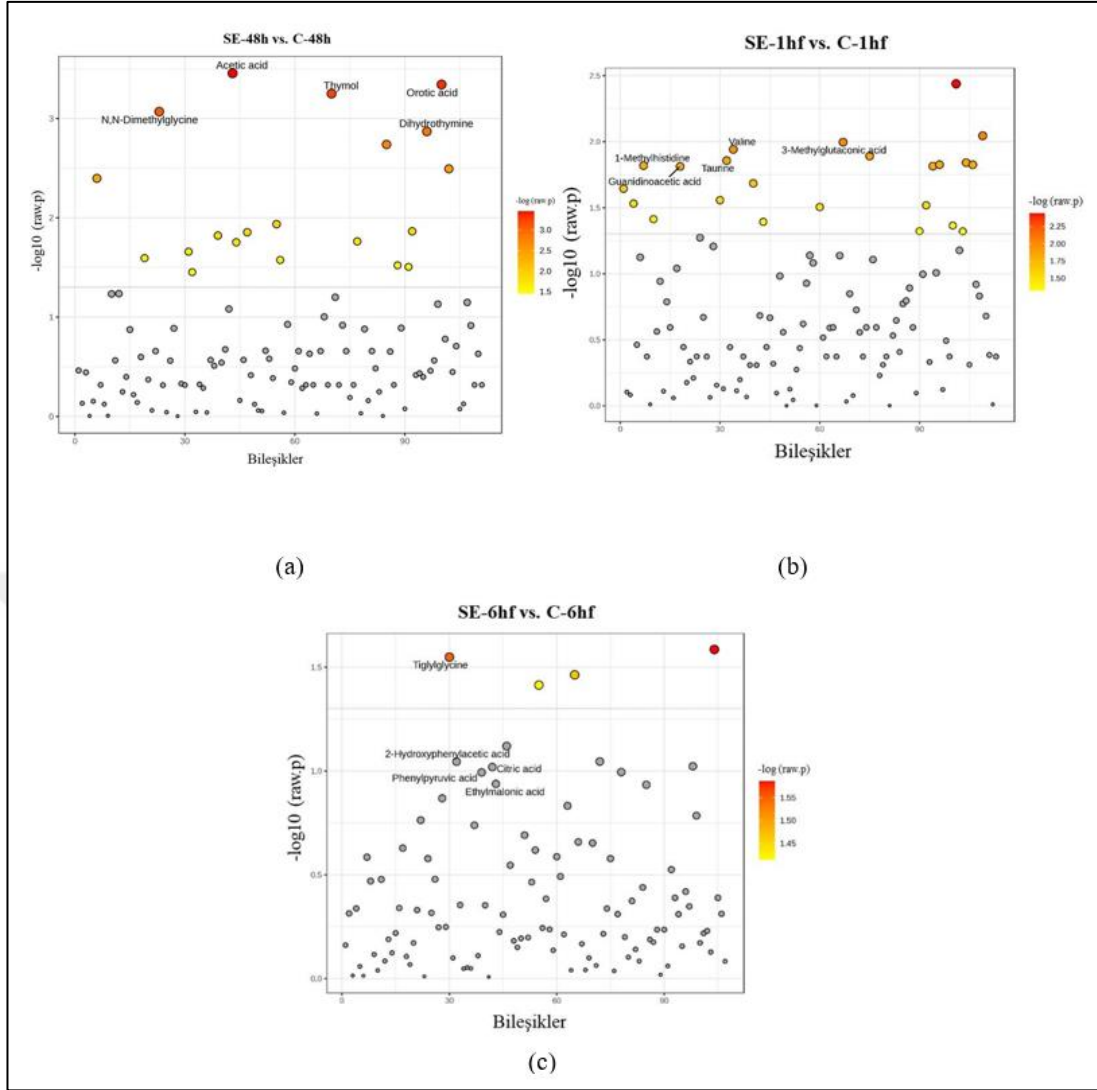
Şekil 15. İdrar örneklerinde epileptogenezin üç farklı zaman noktası için iki bileşenli OPLS-DA modelinin skor grafiği: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf için NMR verileri

4.2.2 İdrardaki belirli metabolitlerin değişimi

Metabolitler, biyokimyasal süreçlerin karmaşıklığını çözümüyle sağlık ve hastalık durumlarının daha iyi anlaşılmasını sağlar. Epileptogenez sürecinde idrar metabolik profilinde olası değişiklikleri incelemek amacıyla, SE ve kontrol grupları karşılaştırılmıştır. Bu amaçla veri seti tek değişkenli analize tabi tutulmuştur. SE ve

kontrol grupları arasındaki metabolik özelliklerdeki anlamlı farklılıkları doğrulamak için Student's t-testi ve KD analizleri ($p \leq 0.05$ ve $KD \geq 1.5$) kullanılmıştır.

SE-48h grubunda, C-48h grubuna kıyasla 1-metilhidantoin, 2-oksoglutarik asit, adenin, allantoin, sitrik asit, fumarik asit, hippurik asit, L-piroglutamik asit, N,N-dimetilglisin, orotik asit, pirüvik asit, tartarik asit, taurin, teobromin, tiglilisin ve trigonellin metabolitlerinin konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Bununla birlikte, SE-48h grubunda, asetik asit, dihidrotimin, timol ve trimetilamin metabolitlerinin konsantrasyonları, C-48h grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 16a). Epileptogenezin latent dönemini temsil eden SE-1hf grubunda ise C-1hf grubuna kıyasla yalnızca 1-metilhistidin konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. SE-1hf grubunda, C-1hf kontrol grubuna kıyasla neopretin, D-glukoz, 3-metilglutakonik asit, valin, glikolik asit, taurin, teobromin, kafein, urasil, allantoin, guanidinoasetik asit, hippurik asit, kreatinin, prolin betain, 1-metilguanidin, 4-piridoksik asit, pantotenik asit, alanin, siringik asit, inosin, 1-metilhidantoin ve oksipurinol metabolitlerinin konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar saptanmıştır (Şekil 16b). Kronik dönem analiz edildiğinde ise, SE-6hf grubunda, C-6hf grubuna kıyasla D-laktoz, pimelik asit, tiglilisin ve ksanturenik asit metabolitlerinin konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş belirlenmiş, ancak artış gösteren herhangi bir metabolit saptanmamıştır (Şekil 16c).



Şekil 16. İdrar örneklerinde önemli ölçüde değişmiş metabolitler: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf NMR verileri için t-testi istatistikleri

Epileptogenez ile ilişkili olabilecek, idrara yansıyan metabolitleri belirlemek amacıyla, 1.5 eşik değerine sahip KD analizi yapılmıştır. KD değeri ≥ 1.5 olan metabolitler, epileptogenezin akut, latent ve kronik fazları için sırasıyla Tablo 9, 10 ve 11’de listelenmiştir.

Tablo 9. Epileptogenezin akut fazında, idrarda $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler

Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log₂(KD)
Benzoik asit	43.705	5.4497
Trimetilamin	34.98	5.1285
Dihidrourasil	31.3	4.9681
Timol	20.513	4.3585
Dihidrotimin	17.792	4.1532
Sitrik asit	0.081913	-3.6
N,N-Dimetilglisin	0.086644	-3.5287
Orotik asit	0.088179	-3.5034
Allantoin	0.10589	-3.2393
Asetik asit	9.1855	3.1994
Urasil	0.13504	-2.8885
Fumarik asit	0.14091	-2.8272
DL-Alloizolösın	6.9253	2.7919
Taurin	0.14904	-2.7463
3-Hidroksibütirik asit	6.2851	2.6519
2-Oksoglutarik asit	0.1685	-2.5692
Hippürik asit	0.18588	-2.4276
L-Piroglutamik asit	0.19772	-2.3384
Glikolik asit	4.9651	2.3118
Sitozin	4.8923	2.2905
D-Galaktonik asit	0.21173	-2.2397
Timin	4.6909	2.2299
Adenin	0.22812	-2.1321
Trigonellin	0.22894	-2.1269
Tigliglisin	0.23301	-2.1015
D-Glikoz	0.23765	-2.0731
Neopterin	0.23989	-2.0596
Formik asit	3.7881	1.9215
Kolin	3.7619	1.9115
2-Hidroksifenilasetik asit	0.29104	-1.7807
Arjinin	3.4255	1.7763
N-Asetilfenilalanin	3.3872	1.7601
2- Furoilglisin	0.30426	-1.7166
Tartarik asit	0.30429	-1.7165
Propionik asit	3.0572	1.6122
4- Hidroksifenilaktik asit	3.0516	1.6096
L-Fukoz	3.0012	1.5855
Teobromin	0.33673	-1.5703
Parasetamol	0.33909	-1.5602
1-Metilhidantoin	0.36512	-1.4535
Asetoasetik asit	2.6804	1.4224
N- İzovaleroilglisin	2.6404	1.4008
3-Fenillaktik asit	0.38041	-1.3944

Tablo 9. Epileptogenezin akut fazında, idrarda $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler (devam)

Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log2(KD)
3- Hidroksiglutarik asit	2.6254	1.3926
Betain	0.39463	-1.3414
Metilmalonik asit	0.42302	-1.2412
Metionin	0.42857	-1.2224
2-Hidroksi-4-metilvalerik asit	0.42857	-1.2224
Bütirik asit	0.42857	-1.2224
D-Glukonic asit	0.42857	-1.2224
4-Hidroksifenilpirüvik asit	0.42857	-1.2224
Kafein	2.2878	1.194
Metanol	2.2271	1.1552
Pürüvik asit	0.45075	-1.1496
Alanin	2.2094	1.1437
Fenilalanin	0.45539	-1.1348
D-Laktoz	0.45752	-1.1281
Siringik asit	0.47699	-1.068
Fenilasetik asit	2.0575	1.0409
3-Metilglutakonic asit	2.0519	1.0369
1-Metilnikotinamid	0.4895	-1.0306
D-Galaktoz	2.0303	1.0217
L-Sitramalik asit	1.9516	0.96463
Fenilpirüvik asit	1.8096	0.85567
1-Metilhistidin	1.8	0.848
2-Metilsüksinik asit	1.8	0.848
3-Hidroksivalerik asit	1.8	0.848
Pimelik asit	1.8	0.848
3- Hidroksipropiyonik asit	1.8	0.848
Malik asit	1.8	0.848
1-Metiladenozin	1.8	0.848
D-Mannoz	1.8	0.848
Miyo-İnositol	1.8	0.848
Kreatin	1.7929	0.84229
3-Dimetilurik asit	0.56122	-0.83336
Propilen glikol	0.5736	-0.80188
Glisin	1.7404	0.7994
Kreatinin	1.7165	0.7795
Pantotenik asit	1.6383	0.71218
Oksipürinol	0.61067	-0.71154
L-İzolösin	0.62857	-0.66985
4-Aminobütirik asit	1.5752	0.65556
3- Hidroksiizovalerik asit	0.64777	-0.62645
2- Hidroksiizovalerik asit	1.5368	0.61992

Tablo 10. Epileptogenezin latent fazında, idrarda $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler

Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log2(KD)
Tiglitlisin	0.048578	-4.3635
Benzoik asit	0.18757	-2.4145
3-Metilglutakonik asit	0.18868	-2.406
1-Metilhistidin	4.2611	2.0912
Neopterin	0.27284	-1.8739
3-Metil-2-oksovalerik asit	0.27591	-1.8577
Fenilasetik asit	0.29675	-1.7527
Malik asit	2.9057	1.5389
Trimetilamin	2.8778	1.525
Dihidrotimin	0.37171	-1.4278
Timol	0.37841	-1.402
D-Glikoz	0.39546	-1.384
2-Hidroksiizovalerik asit	0.39612	-1.336
Teobromin	0.40343	-1.3096
D-Laktoz	0.41697	-1.262
Glisin	0.41906	-1.2548
D-Galaktoz	0.42087	-1.2486
Prolin betain	0.44384	-1.1719
Urasil	0.46255	-1.1123
1-Metilnikotinamid	0.46326	-1.1101
4-Hidroksifenilpirüvik asit	0.46667	-1.0995
Kreatin	2.1418	1.0989
Valin	0.46809	-1.0952
D-Mannoz	0.47201	-1.0831
Lösin	0.47377	-1.0778
1.3-Dimetilürük asit	0.47713	-1.0675
Taurin	0.47974	-1.0597
Timin	0.48523	-1.0433
1-metilguanidin	0.4859	-1.0413
Hippürik asit	0.48611	-1.0407
Glikolik asit	0.49544	-1.0132
N-Asetilfenilalanin	0.49872	-1.0037
Arjinin	0.50026	-0.99924
Pantotenik asit	0.51017	-0.97095
Guanidinoasetik asit	0.51046	-0.97013
N,N-Dimetilglisin	0.51694	-0.95195
Kafein	0.51759	-0.95013
Allantoin	0.52538	-0.92857
Orotik asit	0.52896	-0.91877
1-Metilhidantoin	0.5327	-0.90861
Oksaloasetik asit	0.53417	-0.90463
2-Oksoglutarik asit	1.8689	0.90216

Tablo 10. Epileptogenezin latent fazında, idrarda $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler (devam)

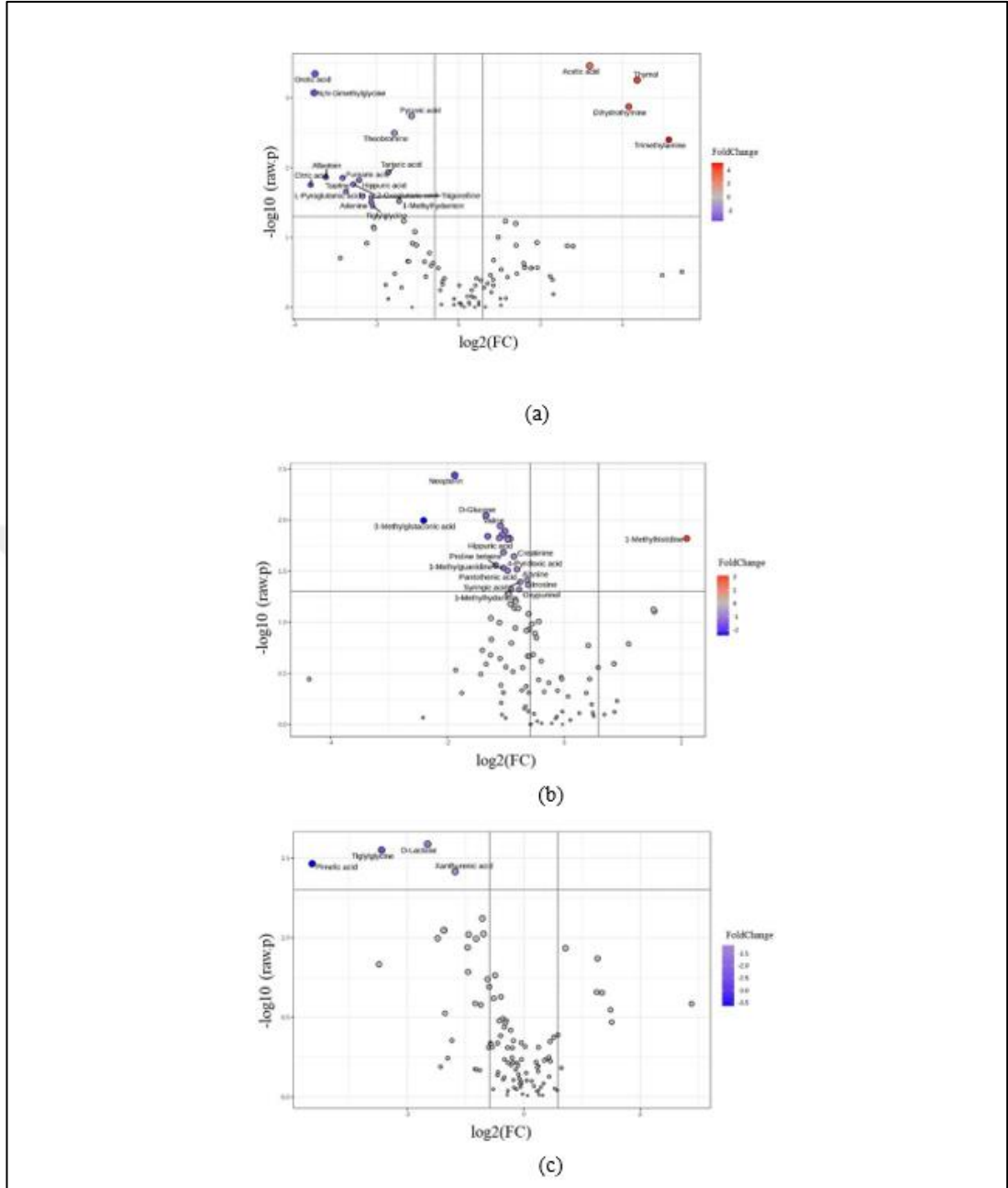
Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log2(KD)
Parasetamol	0.54391	-0.87857
Kreatinin	0.55068	-0.86072
Sitozin	1.8114	0.85711
Trigonellin	0.55488	-0.84974
Sistin	1.8	0.848
2-Metilsüksinik asit	1.8	0.848
D-Galaktonik asit	1.8	0.848
2-Ketobütirik asit	1.8	0.848
Süksinilaseton	1.8	0.848
Betain	0.55906	-0.83894
N-İzovaleroilglisin	0.56224	-0.83075
4-Piridoksik asit	0.57043	-0.80988
3-Hidroksiizovalerik asit	0.57841	-0.78983
Oksipürinol	0.58576	-0.77162
Siringik asit	0.59278	-0.75442
L-Triptofan	0.60433	-0.72659
3-Hidroksiglutarik asit	0.60896	-0.71558
Formik asit	1.608	0.6853
Fenilalanin	0.62224	-0.68446
L-Piroglutamik asit	0.63154	-0.66304
2-Furoilglisin	0.63636	-0.65208
Metionin	0.63636	-0.65208
N-Asetilglutamat	0.63636	-0.65208
4-Hidroksifenilaktik asit	0.63636	-0.65208
2-Hidroksi-4-metilvalerik asit	0.63636	-0.65208
3-Hidroksi-3-metilglutarik asit	0.63636	-0.65208
3-Hidroksipropiyonik asit	0.63636	-0.65208
2-Oksoizovalerik asit	0.63636	-0.65208
Dihidrourasil	0.63636	-0.65208
Miyo-İnositol	0.63636	-0.65208
Üridin	0.63693	-0.65079
Alanin	0.64244	-0.63837
N-Asetilaspartik asit	0.64712	-0.62789
İnozin	0.65154	-0.61808
Sarkozin	0.65246	-0.61605
Ksantürenik asit	0.65455	-0.61143
2-Oksoizokaproik asit	0.65645	-0.60725
Tartarik asit	0.65763	-0.60466
Sitrik asit	0.65918	-0.60126
3-Hidroksibütirik asit	0.66605	-0.5863

Tablo 11. Epileptogenezin kronik fazında, idrarda $\geq 1,5$ kat değişim gösteren metabolitler

Metabolitler	Kat Değişimi (KD)	log ₂ (KD)
Pimelik asit	0.080808	-3.6294
1-Metilhistidin	7.3571	2.8791
Bütirik asit	0.17885	-2.4832
Tiglisin	0.18451	-2.4382
D-Laktoz	0.31879	-1.6493
4-Aminobütirik asit	2.851	1.5115
İmidazol	2.8099	1.4905
4-Hidroksifenilpirüvik asit	0.35885	-1.4785
Kreatin	0.37199	-1.4267
2-Hidroksifenilasetik asit	0.38591	-1.3737
2-Ketobütirik asit	0.38777	-1.3667
Dihidrotimin	0.39207	-1.3508
D-Glikonik asit	2.5361	1.3426
Kolin	0.405	-1.304
Sarkosin	2.4044	1.2657
Timol	2.3835	1.2531
3-Fenillaktik asit	0.42552	-1.2327
Ksanturenik asit	0.44266	-1.1757
Etimalonik asit	0.51293	-0.96317
Timin	0.51528	-0.95657
Sitrik asit	0.51923	-0.94556
Adenin	0.56046	-0.83531
2-Hidroksiizovalerik asit	0.56099	-0.83395
Fenilpirüvik asit	0.56852	-0.81473
Lösin	0.57092	-0.80864
3-Hidroksiglutarik asit	0.59316	-0.7535
N-Asetilfenilalanin	0.6	-0.73697
2-Oksizovalerik asit	0.6	-0.73697
1-Metilnikotinamid	16.443	0.71746
Glutarik asit	0.61133	-0.70997
Teobromin	0.61982	-0.69008
Laktik asit	1.5643	0.64554
Hippurik asit	0.65055	-0.62027
3-Metil-2-oksovalerik asit	0.65899	-0.60168
Propiyonik asit	0.66312	-0.59265

Yukarıdaki bulguların yanı sıra, epileptogenezin her fazı ile ilişkili potansiyel metabolitlerin önemini kontrol etmek amacıyla volkan grafiği analizi yapılmıştır (Şekil 17). Tablo 12’de volkan grafiği analize ait tüm istatistiksel bilgiler listelenmiştir. SE-48h grubunda kontrol grubuna kıyasla metabolitlerin çoğunda azalma eğilimi

gözlemlenirken, yalnızca dört metabolitin artış göstermiş olması dikkat çekmektedir. Bu kapsamda akut dönemde; orotik asit, N,N-dimetilglisin, pürivik asit, teobromin, tartarik asit, allantoin, fumarik asit, hippürik asit, 2-oksoglutarik asit, sitrik asit, taurin, L-piroglutamik asit, trigonellin, 1-metilhidantoin, adenin ve tigliisin konsantrasyonları kontrollere kıyasla düşüş gösterirken; asetik asit, timol, dihidrotimin ve trimetilamin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir. Epileptogenezin latent döneminde ise, neopretin, D-glikoz, 3-metilglutakonik asit, valin, glikolik asit, taurin, teobromin, kafein, urasil, 1-metilhistidin, allantoin, guanidinoasetik asit, hippürik asit, kreatinin, prolin betain, 1-metilguanidin, 4-piridoksik asit, pantotenik asit, alanin, sirinik asit, inosin, 1-metilhidantoin ve oksipürinol konsantrasyonlarında kontrollere kıyasla azalma meydana gelmiştir. Kronik dönem incelendiğinde, D-laktoz, tigliisin, pimelik asit ve ksantürenik asit seviyeleri SE-6hf grubunda azalmıştır. Ancak, latent ve kronik dönemlerde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde hiçbir metabolit artış göstermemiştir. Epileptogenez sürecinde idrar metabolik profili genel olarak değerlendirildiğinde, değişiklikler esas olarak SE sonrası 48. saat ve 1. haftada meydana gelmiştir. Özellikle, yalnızca SE sonrası 48. saatte birtakım metabolik özelliklerde önemli artışlar kaydedilmiştir (Şekil 17a ve Tablo 12).



Şekil 17. NMR idrar metabolitleri verilerinin volkan grafiği analizi: (a) C-48h vs SE-48h, (b) C-1hf vs SE-1hf ve (c) C-6hf vs SE-6hf

Tablo 12. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde değişen idrar metabolitleri

Gruplar	Metabolitler	KD	log2(KD)	p	-log(p)	Artmış/ Azalmış
SE-48h vs. C-48h (Akut dönem)	Asetik asit	9.185	3.199	0.0003	3.456	Artmış
	Orotik asit	0.088	-3.503	0.0005	3.3419	Azalmış
	Timol	2.051	4.358	0.0006	3.251	Artmış
	N,N-Dimetilglisin	0.086	-3.528	0.0009	3.069	Azalmış
	Dihidrotimin	1.779	4.153	0.001	2.869	Artmış
	Pürivik asit	0.450	-1.149	0.002	2.738	Azalmış
	Teobromin	0.336	-1.570	0.003	2.493	Azalmış
	Trimetilamin	3.498	5.128	0.004	2.397	Artmış
	Tartarik asit	0.304	-1.716	0.012	1.936	Azalmış
	Allantoin	0.105	-3.239	0.014	1.864	Azalmış
	Fumarik asit	0.140	-2.827	0.014	1.854	Azalmış
	Hippürük asit	0.185	-2.427	0.015	1.821	Azalmış
	2-Oksoglutarik asit	0.168	-2.569	0.017	1.762	Azalmış
	Sitrik asit	0.081	-3.609	0.018	1.753	Azalmış
	Taurin	0.149	-2.746	0.022	1.659	Azalmış
	L-Piroglutamik asit	0.197	-2.338	0.025	1.594	Azalmış
	Trigonellin	0.228	-2.126	0.027	1.575	Azalmış
1-Metilhidantoin	0.36	-1.453	0.0301	1.522	Azalmış	
Adenin	0.228	-2.132	0.031	1.506	Azalmış	
Tigililglisin	0.233	-2.101	0.035	1.452	Azalmış	
SE-1hf vs. C-1hf (Latent dönem)	Neopterin	0.273	-1.874	0.004	2.438	Azalmış
	D-Glikoz	0.396	-1.338	0.009	2.045	Azalmış
	3-Metilgluta-konik asit	0.189	-2.406	0.010	1.996	Azalmış
	Valin	0.468	-1.095	0.011	1.942	Azalmış
	Glikolik asit	0.495	-1.013	0.013	1.891	Azalmış
	Taurin	0.48	-1.06	0.014	1.857	Azalmış
	Teobromin	0.403	-1.31	0.014	1.841	Azalmış
	Kafein	0.518	-0.95	0.015	1.826	Azalmış
	Urasil	0.463	-1.112	0.015	1.825	Azalmış
	1-Metilhistidin	4.261	2.091	0.015	1.819	Artmış
	Allantoin	0.525	-0.929	0.015	1.814	Azalmış
	Guanidinoase-tik asit	0.51	-0.97	0.015	1.8124	Azalmış
	Hippürük asit	0.486	-1.041	0.02	1.684	Azalmış
Kreatinin	0.551	-0.861	0.022	1.644	Azalmış	
Prolin betain	0.444	-1.172	0.028	1.557	Azalmış	

Tablo 12. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde değişen idrar metabolitleri (devam)

Gruplar	Metabolitler	KD	log2(KD)	p	-log(p)	Artmış/ Azalmış
SE-1hf vs. C-1hf (Latent dönem)	1-Metilguanidin	0.486	-1.041	0.029	1.531	Azalmış
	4-Piridoksik asit	0.57	-0.81	0.03	1.518	Azalmış
	Pantotenik asit	0.511	-0.971	0.031	1.505	Azalmış
	Alanin	0.642	-0.64	0.039	1.414	Azalmış
	Siringik asit	0.593	-0.754	0.04	1.393	Azalmış
	İnosin	0.652	-0.618	0.043	1.365	Azalmış
	1-Metilhidantoin	0.533	-0.91	0.048	1.322	Azalmış
	Oksipürinol	0.586	-0.772	0.048	1.321	Azalmış
SE-6hf vs. C-6hf (Kronik dönem)	D-Laktoz	0.319	-1.649	0.026	1.586	Azalmış
	Tigllisin	0.185	-2.438	0.028	1.549	Azalmış
	Pimelik asit	0.081	-3.629	0.034	1.463	Azalmış
	Ksantürenik asit	0.443	-1.176	0.039	1.414	Azalmış

4.2.3 İdrar metabolitlerinin metabolik yolak analizi

Metabolik yolak analizi, MetaboAnalyst 6.0 ve KEGG metabolik yolak veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 13, anlamlı değişiklikler gösteren metabolitleri ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$ kriterlerine uyan) ve $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olan metabolik yolları listelemektedir. Hem akut hem de latent dönemlerde metabolitler ve yollar arasında anlamlı ilişkiler gözlenmiştir. Ancak, kronik dönemde metabolit temelli yolak etkileri anlamlı bulunmamıştır.

4.2.3.1 Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması

Epileptogenezin akut döneminde, sitrik asit, pirüvik asit, fumarik asit ve 2-oksoglutarik asit metabolitlerinin düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Bireysel metabolit analizinden bağımsız olarak yapılan yolak analizi, “alanin, aspartat ve glutamat metabolizması” yolağının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koymuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan sitrik asit, pirüvik asit, fumarik asit ve 2-oksoglutarik asit metabolitlerinin hepsinin bu yolakta yer aldığı dikkat çekmektedir.

Latent ve kronik dönemlerde ise alanin, aspartat ve glutamat metabolizmasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.

4.2.3.2 Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması

Sitrik asit, pirüvik asit ve asetik asit düzeyleri, epileptogenezin akut döneminde anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir. Metabolitlerin tek tek analizlerinden bağımsız olarak gerçekleştirilen yolak analizi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması yolağının istatistiksel açıdan önemli olduğunu göstermiştir. Sitrik asit, pirüvik asit ve asetik asit metabolitlerinin değişikliklerinin yolakla uyumlu olduğu dikkat çekmektedir. Latent ve kronik dönemlerde ise glioksilat ve dikarboksilat metabolizmasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.2.3.3 Glisin, serin ve treonin metabolizması

Akut dönemdeki plazma bulgularıyla uyumlu olarak, idrar metabolitlerinin analizi sonucunda da “gliserin, serin ve treonin metabolizması” istatistiksel olarak önemli tespit edilmiştir. Glisin, serin ve treonin metabolizmasıyla uyumlu olarak, idrara yansıyan metabolitlerden N,N-dimetilglisin ve pirüvik asit metabolitlerinde değişiklikler belirlenmiştir. Latent ve kronik evrelerde ise bu yolda istatistiksel olarak değerli bir değişim tespit edilmemiştir.

4.2.3.4 TKA döngüsü

Metabolitlerin bireysel analizinden bağımsız olarak yapılan yolak analizi sonucunda SE-48h ve C-48h grupları arasında TKA döngüsünde anlamlı değişiklikler ortaya koyulmuştur. Kriterlerimize ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$) göre anlamlı bulunan metabolitler arasında 2-oksoglutarik asit, sitrik asit, pirüvik asit ve fumarik asit bulunmaktadır. TKA döngüsünde, latent ve kronik dönemlerde anlamlı metabolit değişiklikleri gözlenmemiştir.

4.2.3.5 Pirüvik asit (pirüvat) metabolizması

Metabolitlerin tek tek incelenmesinden bağımsız olarak gerçekleştirilen yolak analizi, SE-48h ve C-48h grupları arasında pirüvat metabolizması yolağında belirgin değişiklikler olduğunu göstermiştir. Bu kapsamda, özellikle pirüvik asit, fumarik asit ve asetik asit metabolitlerinin düzeylerinde önemli farklılıklar saptanmıştır ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$). Latent ve kronik dönemlerde ise pirüvat metabolizmasında diğer metabolit değişikliklerine dair anlamlı bir bulguya rastlanmamıştır.

4.2.3.6 Glikoliz/glukoneogenez

Akut dönemde pirüvik asit ve asetik asit, latent dönemde ise D-glikoz metabolitindeki değişimlerle bağlantılı olarak glikoliz/glukoneogenez yolu istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermiştir. Bununla birlikte, kronik dönemde bu yolak ile ilgili belirgin bir farklılık bulunamamıştır.

4.2.3.7 Pirimidin metabolizması

Metabolitlerin ayrı ayrı incelenmesinden bağımsız yürütülen yolak analizi, epileptogenezin yalnızca akut döneminde pirimidin metabolizmasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olduğunu göstermiştir. Bu fark, kriterlerimize ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$) göre esas olarak orotik asit konsantrasyonundaki değişim ile bağlantılı bulunmuştur.

4.2.3.8 Pentoz fosfat yolağı

Metabolitlerin ayrı ayrı incelenmesinden bağımsız olarak yürütülen yolak analizi, epileptogenez sürecinde sadece latent dönemde pentoz fosfat yolağında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunduğunu göstermiştir. Bu farklılığın, kriterlerimiz ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$) çerçevesinde D-glikoz seviyesindeki değişimle ilişkili olduğu belirlenmiştir.

4.2.3.9 Kafein metabolizması

Epileptogenez sürecinin hem akut hem de latent döneminde kafein metabolizmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Kriterlerimize ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$) göre; kafein metabolizmasıyla bağlantılı olarak incelenen metabolitlerden, teobromin akut ve latent dönemin her ikisinde de kafein ise yalnızca latent dönemde kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. Kronik dönemde kafein metabolizmasının değişimine yönelik bir bulguya rastlanmamıştır.

4.2.3.10 Taurin ve hipotaurin metabolizması

Taurin ve hipotaurin metabolizması da epileptogenezin akut ve latent dönemlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolik yollar arasındadır. $p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$ koşullarını sağlayacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolitlerden yalnızca taurin bu yolak ile ilişkili bulunmuştur. Taurin, SE'den sonra hem akut hem de latent dönemde önemli ölçüde azalmıştır.

4.2.3.11 Pürin metabolizması

Epileptogenez sürecinin hem akut hem de latent dönemlerinde pürin metabolizması istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermiştir. Kriterlerimiz ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$) doğrultusunda; pürin metabolizmasıyla ilişkili olarak incelenen metabolitlerden allantoin akut ve latent dönemlerin her ikisinde, inosin ise yalnızca latent dönemde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Kronik dönemde ise pürin metabolizmasında istatistiksel anlamda önemli bir değişim bulunmamıştır.

4.2.3.12 Selenokomponent metabolizması

Metabolitlerin ayrı ayrı analiz edilmesinden bağımsız olarak yapılan yolak analizi, epileptogenez sürecinin sadece latent döneminde selenokomponent metabolizmasında

istatistiksel açıdan kayda değer bir farklılık olduğunu göstermiştir. Bu farklılığın, kriterlerimiz ($p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$) kapsamında alanin düzeyindeki değişiklik ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

4.2.3.13 Primer safra asidi biyosentezi

Metabolitlerin bireysel incelemelerinden bağımsız olarak yapılan yolak analizi, epileptogenezin latent döneminde primer safra asidi biyosentezi yolunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olduğunu ortaya koymuştur. $p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$ kriterleri göz önünde bulundurularak analiz edilen metabolitler arasından yalnızca taurin bu yolak ile bağlantılıdır. Bunun yanı sıra, akut ya da kronik dönemde primer safra asidi biyosentezi yolunda farklılık tespit edilmemiştir.

Tablo 13. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde değişen idrar metabolitleri ve metabolik yollar

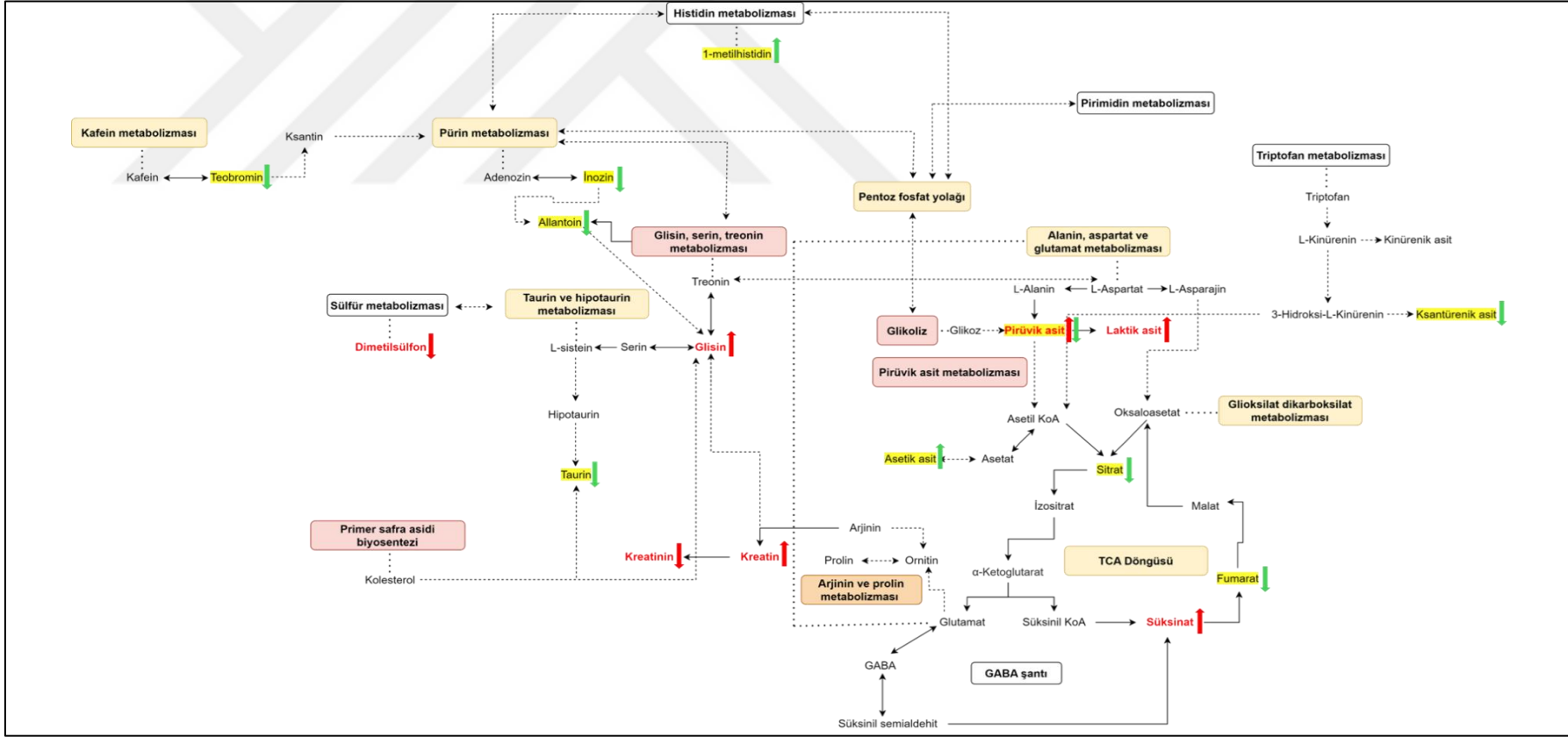
Metabolik Yolak (KEGG) (<i>Rattus norvegicus</i>)	SE-48h vs. C-48h (Akut dönem)		SE-1hf vs. C-1hf (Latent dönem)		SE-6hf vs. C-6hf (Kronik dönem)	
	p	Metabolitler	p	Metabolitler	p	Metabolitler
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	0.004	Sitrik asit Pirüvik asit Fumarik Asit 2-oksoglutarik asit				
Gliksilat ve dikarboksilat metabolizması	0.002	Sitrik asit Pirüvik asit Asetik asit				
Glisin, serin ve treonin metabolizması	0.014	N,N-dimetilglisin Pirüvik asit				
TKA döngüsü (Sitrat döngüsü)	0.018	2-oksoglutarik asit Sitrik asit Pirüvik asit Fumarik Asit				
Piruvat metabolizması	< 0.001	Pirüvik asit Fumarik Asit Asetik asit				

Tablo 13. Epileptogenezin farklı dönemlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde değişen idrar metabolitleri ve metabolik yollar (devam)

Metabolik Yolak (KEGG) (<i>Rattus norvegicus</i>)	SE-48h vs. C-48h (Akut dönem)		SE-1hf vs. C-1hf (Latent dönem)		SE-6hf vs. C-6hf (Kronik dönem)	
	p	Metabolitler	p	Metabolitler	p	Metabolitler
Glikoliz/glukoneogenez	0.012	Pirüvik asit Asetik asit	0.006	D-Glikoz		
Primidin metabolizması	0.011	Orotik asit				
Pentoz fosfat yolağı			0.009	D-Glikoz		
Kafein metabolizması	0.003	Teobromin	0.012	Teobromin Kafein		
Taurin ve hipotaurin metabolizması	0.022	Taurin	0.014	Taurin		
Pürin metabolizması	0.017	Allantoin	0.023	Allantoin İnosin		
Selenokomponent metabolizması			0.039	Alanin		
Primer safra asidi biyosentezi			0.031	Taurin		

4.3 Epileptogenez Sürecinde Öne Çıkan Metabolik Yollar ve İlgili Metabolitler

Epileptogenezin her bir aşamasında hem plazma hem de idrar metabolitlerinin bireysel incelemelerinden bağımsız gerçekleştirilen yolak analizi sonucunda belirlenen önemli metabolik yollar ve bu yollarla ilişkili, $p \leq 0.05$ ve $FC \geq 1.5$ kriterlerini karşılayan anahtar metabolitler Şekil 18'de özetlenmiştir. Sonuç olarak, epileptogenezin farklı dönemlerinde birçok metabolik yolak ve metabolit değişikliği göstermiştir.



Şekil 18. Epileptogenezde etkin metabolik yollar ve ilgili kilit metabolitler

(Kesik çizgili oklar iki metabolit arasındaki çok adımlı dönüşümleri, düz çizgili oklar ise tek adımlı dönüşümleri ifade etmektedir. Çift yönlü oklar çift yönlü dönüşümleri, tek yönlü oklar ise tek yönlü dönüşümleri göstermektedir. Kırmızı ile belirtilen metabolitler plazmada değişen metabolitleri, sarı ile vurgulananlar ise idrarda değişen metabolitleri işaret etmektedir. Kırmızı dikdörtgenler hem plazma hem de idrar örneklerinde etkilenen ana metabolik yolları, turuncu dikdörtgen yalnızca plazmada etkilenen yolu, sarı dikdörtgenler ise yalnızca idrarda etkilenen yollarını temsil etmektedir. Kırmızı oklar plazmada artan veya azalan metabolitleri, yeşil oklar ise idrardaki değişimleri göstermektedir.)

5 TARTIŞMA

Epilepsiye yol açan süreç olan epileptogenez, esasen gözlemlenen ilk kronik nöbetten önce başlar. Biyobelirteçlerin tanımlanması, epileptik öncesi durumdan epileptik duruma geçişi anlamak için çok önemlidir ve sadece semptomları yönetmek yerine TLE'nin temel nedenlerini hedefleyen tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Günümüzde, epileptojenik riski değerlendirecek moleküler belirteçler henüz tanımlanmamıştır. Mevcut araştırmalar, epilepsi riskinin erken ve hızlı tespit edilebilmesi için invaziv olmayan (non-invaziv) biyobelirteçlere olan ihtiyacın altını çizmektedir.

TLE hastalarında, bireyler arasında belirgin farklılıklar gösteren latent dönemin dinamik yapısı, bu süreci derinlemesine incelemek için güvenilir hayvan modellerinin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Önceki çalışmalar, farklı analitik yöntemler kullanarak epilepsi modellerinde metabolik düzensizlikleri araştırmıştır (159, 170). Ancak, literatürde şimdiye kadar ¹H-NMR spektroskopisini kullanarak lityum-pilokarpin ile indüklenen TLE sıçan modelinde epileptogenezin tüm aşamalarında (akut, latent ve kronik) plazma ve idrar örneklerinde geniş bir metabolit yelpazesini ve bu metabolitlerin bağlı olduğu metabolik yolları kapsamlı şekilde inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında; epileptogenezin her aşamasında potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi amacıyla, TLE'yi en iyi yansıtan modellerden biri olan lityum-pilokarpin ile indüklenen TLE sıçan modelinde, SE ardından üç ana epileptogenez döneminde plazma ve idrar metabolik profil değişimleri ve bağlantılı metabolik yollar ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Bu kapsamda, oldukça yenilikçi bir yaklaşım içerisinde, toplanan örneklerle zarar vermeden moleküler yapıların analizinde etkili bir yöntem olarak kabul edilen ¹H-NMR tekniği kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, epileptogenezin farklı dönemlerinde hem plazma hem de idrarda birtakım belirgin metabolit değişikliklerinin olduğunu ve birçok metabolik yolağın etkilendiğini göstermiştir.

Metabolitlerin biyobelirteç olarak avantajı, hastalık durumlarında değişebilen metabolik yollarla doğrudan ilişkiye sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu

özellik, hastalıklarla ilişkili spesifik metabolik imzaların belirlenmesini mümkün kılar. Çalışmamızda, epileptogenezin akut döneminde kontrollere göre önemli ölçüde daha düşük plazma konsantrasyonları ile DMSO₂ kilit bir metabolit olarak ön plana çıkmaktadır. Alternatif tıpta popüler bir besin takviyesi olan DMSO₂, bağırsak bakterileri ve endojen insan enzimleri tarafından metanetiol metabolizması yoluyla üretilen dimetil sülfoksitin (DMSO) birincil metabolitidir (171, 172). Literatürde henüz hiçbir çalışma DMSO₂'yi doğrudan epilepsiyle ilişkilendirmemiş olsa da, Alzheimer hastalığı dâhil olmak üzere diğer hastalık modellerinde yapılan araştırmalar, DMSO₂'nin anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerini vurgulamıştır (173). Çeşitli nöbet ve epilepsi modellerinde ise, DMSO'nun doza bağlı olarak hem nöbet indükleyici hem de nöbet önleyici etkileri olduğu gösterilmiştir (174, 175). Bu bağlamda, DMSO'nun birincil metaboliti olan DMSO₂, büyük ölçüde anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleri sayesinde anti-epileptojenik faydalar sağlayabilir. Ayrıca, DMSO₂'nin KBB'ye nüfuz etme kabiliyeti epileptogenezle mücadeledeki potansiyelini daha da artırmaktadır. DMSO₂'nin epileptogenezin yalnızca akut fazı sırasında ortaya çıkması, bu aşama için değerli bir biyobelirteç olarak potansiyelini vurgulamakla birlikte, takviyesi anti-epileptojenik stratejileri destekleyebilir. Ek olarak, bağırsak metabolizması yoluyla oluşması, bağırsak mikrobiyotası değişiklikleri ile epileptogenez arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu düşündürmekte ve yeni bir araştırma yolu sunmaktadır.

Epilepsi, hücrel enerji metabolizmasındaki değişiklikleri içerir ve nöbetler sırasında ATP ihtiyacının artmasına neden olur. Esas olarak böbreklerde ve karaciğerde amino asitlerden (metiyonin, glisin ve arjinin) sentezlenen kreatin; kan yoluyla beyne ve diğer dokulara taşınır ve ATP'nin yenilenmesine yardımcı olur (176). Çalışmamızda, epileptogenezin akut döneminde sıçanlarda yüksek plazma kreatin seviyeleri bulunmuştur, bu da daha yüksek enerji ihtiyacına telafi edici bir yanıt olduğunu düşündürmektedir. Benzer artışlar şizofreni hastalarında da gözlenmiştir (177). Bununla birlikte, harici kreatin uygulamasının nöbetleri geciktirdiği ve çeşitli modellerde GABAerjik nöronları desteklediği gösterilmiştir (178, 179, 180). Kreatin, beyne özgül bir taşıyıcı protein, kreatin taşıyıcı protein (CRT), aracılığıyla taşınır. KBB'nin bozulması, bu taşıyıcı proteinin işlevini etkileyebilir ve beyne kreatin alımını

değiştirebilir. Plazmada, artan kreatin seviyeleri, CRT'nin aracılık ettiği KBB boyunca bozulmuş kreatin taşınmasını da yansıtabilir ve KBB'nin %98'inde CRT bulunmamaktadır (181). CRT genindeki mutasyonlar nörolojik bozukluklar ve nöbetlerle bağlantılıdır (182). Dolayısıyla, nöbetler KBB ve CRT işlevini bozarak kreatin dengesizliklerine yol açabilir. Sonuç olarak, kreatinin epilepsi patofizyolojisindeki kesin rolü belirsizliğini korumaktadır. Kreatin metabolitinin yalnızca akut epileptogenez döneminde ve plazmada değişim göstermesi, onu potansiyel bir biyobelirteç olarak son derece değerli kılmaktadır.

Kreatin döngüsü, kreatin metabolitinin idrarla atılan kreatinine dönüşümüyle sona erer (181). Kreatinin ayrıca fosfokreatin dönüşümü yoluyla kreatinden spontan olarak da oluşabilir. Çalışmamızda, akut epileptogenez fazını temsil eden sıçanlarda plazma kreatinin seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuş olup, bu farklılık yalnızca bu fazda görülmüştür. Yüksek plazma kreatin seviyelerine karşın kreatininin düşük konsantrasyonu, muhtemelen kreatinden sabit oranda kreatinin üretilmesi, kreatininin etkin renal klirensi ve dokular tarafından kullanımıyla ilişkili olabilir. Vücudun düzenleyici mekanizmaları, kreatini metabolik ihtiyaçlar için kullanılabilir hale getirirken, kreatininin atık ürün olarak etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Literatürde, kreatininin demans ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar için potansiyel bir biyobelirteç olarak öne sürüldüğü bildirilmektedir (183, 184, 185). Akut dönemde, plazma kreatinin seviyelerinde gözlemlediğimiz düşüş, bu bulgularla uyumludur ve epileptogenez başlangıcının biyobelirteci olarak bir potansiyele işaret etmektedir. Ayrıca, kreatininin rapor edilen bağışıklığı baskılayıcı etkileri ve antibakteriyel özellikleri, bu molekülün atık ürün olmanın ötesinde rol oynayabileceğini düşündürmekte ve daha fazla araştırma gerektirmektedir (186, 187). Kreatininin, plazmada düşüş gösteren konsantrasyonuyla paralel olarak, idrarda kreatinin latent dönemde düşüş göstermiştir. Epilepsi ve epileptogenez ile ilişkili idrar kreatinin konsantrasyonunun incelenmesi mevcut literatürde oldukça sınırlıdır. Literatürdeki çalışmalar, daha düşük idrar kreatinin atılımının daha yüksek kardiyovasküler olaylar riski ve ölüm oranı ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (188, 189, 190). Gelecekteki araştırmalar, idrar kreatinin

seviyelerindeki değişimlerin nöbet aktivitesi veya epilepsinin ilerlemesiyle nasıl ilişkili olabileceğini daha kapsamlı bir şekilde incelemelidir.

Nörotransmitter olarak işlev gören glisin, çeşitli beyin bölgelerinde nöronal aktiviteyi büyük oranda inhibe eder ve gen ifadesi, protein yapısı ve işlevi gibi birçok biyolojik süreçte önemli bir role sahiptir (191). Çalışmamızda, epileptogenezin akut fazında sıçanlarda plazma glisin seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir ve bu artış sadece plazmada akut fazda ortaya çıkmıştır. Plazmadaki bulgumuzla uyumlu olarak, epilepsi hastalarından alınan BOS'taki yüksek glisin seviyeleri de dikkat çekmektedir (192). Glisin; glisin reseptörü (GlyR), NMDA reseptörleri, G protein-bağlı reseptör sınıf C grup 6 (GPRC6) gibi çeşitli endojen hedeflerle etkileşime girer. Bu nöromodülatör etkiler, hedeflere göre değişiklik gösterir; örneğin, GlyR'ye bağlanması inhibisyon oluştururken, NMDA reseptörü ile etkileşimi uyarımı teşvik eder (191). Glisin taşıyıcıları (GlyT1 ve GlyT2), Na⁺ ve Cl⁻ gradyanları aracılığıyla glisini hücre zarından taşır (193, 194). Literatürde, TLE'li insan ve sıçan hipokampusunda GlyT1 ekspresyonunun artışı rapor edilmiştir ve GlyT1'in inhibisyonu nöbet eşiğini artırdığı belirtilmiştir (195, 196, 197). Fare modellerinde ise GlyT1 inhibitörleri, kronik nöbetleri etkin şekilde baskılamaktadır (198). Son araştırmalar, glisinin klasik olmayan NMDA reseptörlerini aktive etmesinin KBB bütünlüğünü bozabileceğini ve endotel hücrelerinde aktin dağılımını değiştirebileceğini göstermektedir. Bu durum, yüksek glisin seviyelerinin akut fazda epileptik aktiviteyi artırabileceğini düşündürmektedir (199). Ayrıca, epilepsili hastalarda GlyR'ye karşı oto antikorların tespit edilmesi, glisinin GlyR ile bağlanmasını engelleyerek etkisini azaltabileceğini işaret etmektedir, bu da GlyR'yi anti-epileptojenik araştırmalar için ilginç bir hedef yapmaktadır (200). Ancak, başka bir glisin hedefi olan GPRC6 reseptörlerinin epilepsiye etkisi hakkında literatürde yeterli kanıt bulunmamaktadır. Çalışmamızdaki bulgular, glisin ve ilgili taşıyıcıların ve reseptörlerin epileptogenezin başlangıcında kritik bir rol oynadığını ve glisinin akut fazda biyobelirteç olarak potansiyel taşıdığını göstermektedir. Bu, mevcut literatürle de uyumludur ve GlyR ile GlyT ekspresyonundaki bozuklukları işaret etmektedir. Sonuç olarak, glisin ve ilişkili taşıyıcı ve reseptörlerin detaylı incelenmesi, epileptogenez biyobelirteçlerini tanımlamak ve yeni anti-epileptojenik tedaviler

geliştirmek için umut vaat etmektedir. Ayrıca glisin, epileptogenezin akut fazında önemli ölçüde değişmiş olan primer safra asidi sentezi yolunda da yer almaktadır. Bu bağlamda, karaciğerde kolesterolden sentezlenen safra asitlerinin birkaç enzimatik adımla konjuge edilmesine katılır. Dolayısıyla, glisin metabolizmasındaki değişiklikler ve bozukluklar primer safra asidi biyosentezini ve konjugasyon süreçlerini etkileyebilir (201).

Primer safra asidi biyosentez yolağı, plazma örneklerinde olduğu gibi, idrar örneklerinde yürütülen metabolik yolak analiz sonucunda da istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Bu kapsamda idrar örneklerinde taranan metabolitlerden yalnızca taurin bu yolak ile etkileşim halinde bulunmuştur. Erken dönemde yapılan çalışmalarda, çeşitli hayvan epilepsi modellerinde birincil epileptik odaklarda toplam doku taurin konsantrasyonunun azaldığı bulunmuş olsa da bu durum tüm modellerde tutarlı değildir (202, 203, 204, 205, 206, 207, 208). İnsan epileptik beyin örneklerinden elde edilen veriler de çelişkili sonuçlar sağlamıştır (209, 210, 211). Bu nedenle taurinin epileptogenezdeki rolü hala belirsizdir. Bu çalışmada taurin, epileptogenezin hem akut hem de latent döneminde idrarda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. Benzer bulgular, yeni başlangıçlı tedavi edilmemiş pediatrik epilepsi hastalarının idrar örneklerinde yalnızca taurin azalmasının epilepsi ile ilişkilendirildiği bir çalışmada da gözlemlenmiştir (212). Bu durum, taurinin epilepside biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği fikrini desteklemektedir. Taurin, sinir iletimi, osmoregülasyon, antioksidan etki, hücre gelişimini destekleyici faktörlerin aktivitesi ve kalsiyum hareketlerinin düzenlenmesi gibi birçok işlevde rol oynar. Bu özellikleri sayesinde, nöbet karşıtı ve sinir hücrelerini koruyucu bir ajan olarak görev yapabilir (209, 213, 214, 215). Taurin beyinde bol miktarda bulunur ve beyin dokusu, taurinin fizyolojik ve farmakolojik özellikleri için önemli bir hedef gibi görünmektedir (216, 217). Epileptogenez sürecinde idrarda taurin konsantrasyonunun azalması, beyinde taurine olan artan ihtiyaç, taurin eksikliğine yanıt olarak böbreklerde artan geri emilim mekanizmaları ve metabolik strese bağlı böbrek fonksiyonlarındaki değişikliklerle ilişkilendirilebilir. Bu faktörler bir araya gelerek, epilepsinin ilerleyişi sırasında idrardaki taurin seviyelerindeki değişimlere katkı sağlayabilir. Sonuç olarak, taurinin epilepsi patofizyolojisindeki rolü, idrardaki konsantrasyonunun epilepside

biyobelirteç olarak kullanımı ve anti-epileptik stratejilerde değerlendirilme potansiyeli umut vaat etmektedir. Taurin ve türevlerinin epilepsi tedavisinde yeni kapılar açabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda; plazma örneklerinde SE-48h grubu sıçanlarda, idrar örneklerinde ise SE-48h ve SE-1hf sıçanlarında kontrollere kıyasla gözlenen önemli metabolik farklılıklar glisin, serin ve treonin metabolizmasıyla yakından ilişkili gözükmektedir. Plazma örneklerinde bu yolak esas olarak kreatin ve glisin metabolitleriyle eşleşirken, idrar örneklerinde ise N,N-dimetilglisin ve pirüvik asit etkileşimde gözükmektedir. Literatürde, glisin, serin ve treonin metabolizması oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkilendirilmiş ve dışkı örneği analizlerine göre çocuklarda ateşli nöbetler bağlamında çok önemli olarak tanımlanmıştır (218). Epilepsi ve metabolomik üzerine yakın zamanda yapılan bir inceleme, epilepside bu yolun önemli ölçüde değiştiğinin altını çizerek epilepsinin patogenezinin anlaşılmasında ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesinde önemini ortaya koymuştur (18). N-metilglisin (sarkozin) ve N, N-dimetilglisin (DMG) gibi glisin türevleri, kolinin glisin metabolizmasında önemli ara ürünlerdir ve besin takviyesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (219, 220). Bu iki bileşiğin MSS'de farmakolojik aktiviteleri olduğu gösterilmiştir (221). DMG, oksidatif stresi azaltma, bağışıklık sistemini destekleme ve fiziksel-mental performansı artırma gibi etkileriyle öne çıkmaktadır (222, 223). 2014 yılında yapılan bir çalışmada, Alzheimer hastalarını sağlıklı bireylerden ayırmak için DMG dahil altı plazma metabolitinden oluşan bir biyobelirteç paneli tanımlanmıştır (224). Bu çalışmada ise akut dönemdeki sıçanların idrarında DMG seviyelerinde sağlıklı kontrollere kıyasla azalma tespit edilmiştir. Bu durum, SE sırasında DMG'nin nöronları koruma ve bağışıklık yanıtını destekleme amacıyla daha fazla kullanılması nedeniyle rezervlerinin azalabileceğini düşündürmektedir. DMG ayrıca metil gruplarının taşınması ve kullanılmasında önemli bir role sahiptir. Vücutta homosisteini metiyonine yeniden metilleme sürecine katkıda bulunur ve DNA, RNA, protein, lipid gibi biyomoleküllerin biosentezinde yer alan metilasyon reaksiyonlarını destekler (225). DNA metilasyonu (DNAm), beyin gelişimi ve hücre farklılaşması gibi süreçlerde kritik rol oynamakta olup, çevresel faktörler, hormonlar ve nöronal aktivite tarafından etkilenebilmektedir (226). Epilepsi ile ilişkili DNAm değişiklikleri hem

hayvan modellerinde hem de insanlarda gösterilmiştir (227, 228). Epileptogenezin yalnızca akut döneminde idrarda azalmış DMG seviyesi, metilasyon süreçlerindeki değişikliklere işaret edebilir. Örneğin, epileptogenezin erken aşamalarında DNA hipometilasyonu gözlenirken, kronik dönemde bazı genomik bölgelerde hipermetilasyon ve gen ifadesi arasındaki ilişki belirlenmiştir (226, 227, 228). Buna ek olarak, DMG'nin bağırsak mikrobiyotasına ait bir metabolit olduğu ve epilepside değişen mikrobiyota profilinin önem arz ettiği bildirilmiştir (229). Epileptik sıçanlarda idrarda DMG düşüklüğünün nedenlerini daha iyi anlamak için kapsamlı araştırmalar gereklidir. Bu tür bulgular, epilepsi patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Özellikle, DMG'nin epilepsi üzerindeki etkilerini ve epileptik nöbetlerdeki metabolik değişimleri inceleyen ileri biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Epileptogenez sürecinde hem plazma hem de idrar örneklerinde öne çıkan glisin, serin ve treonin metabolik yolunun, idrarda istatistiksel olarak anlamlı bulunan taurin ve hipotaurin metabolizmasıyla bağlantılı olduğu görülmüştür. İlginç bir şekilde, plazmada akut dönemde kontrollere kıyasla anlamlı bir düşüş gösteren DMSO₂, sülfür metabolizmasının bir bileşeni olup, glisin, serin ve treonin metabolik yolu ile taurin ve hipotaurin metabolizmasıyla dolaylı olarak ilişkili görünmektedir. Bu bulgular, akut ve latent dönemde değişim gösteren metabolitlerin bu metabolik yollar çerçevesinde birbiriyle etkileşimde olduğunu ortaya koymaktadır. Yolak analizinden elde edilen sonuçlarımız, glisin, serin ve treonin metabolizmasında özellikle SE'nin akut fazında belirgin değişiklikler meydana geldiğini işaret etmektedir. Bu durum, literatürle uyumlu olarak, ilk yaralanma sonrası epileptogenezin başlangıcında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Mitokondriyal disfonksiyon, travmatik beyin hasarı ve nöbetler gibi durumlarla ilişkili enerji metabolizmasındaki değişiklikler, pirüvik ve laktik asidin sinir sistemi hücrelerine enerji sağlamadaki kritik rolünü vurgulamaktadır (230). Glikozdan glikoliz yoluyla üretilen pirüvik asit, oksijen varlığında asetil-CoA'ya dönüştürülerek mitokondrideki TKA döngüsünü destekler (231). Ancak, oksijenin yetersiz olduğu durumlarda pirüvik asit, hastalık ve doku hasarı için bir biyobelirteç olarak kabul

edilen laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi tarafından laktik aside dönüştürülür ve bazı epileptik kindling modellerinde LDH aktivitesinde artış gözlenmiştir (232). Çeşitli çalışmalarda, pirüvik asidin inme, travmatik beyin hasarı ve hipoglisemi gibi nörolojik hastalıklar ve hayvan modellerinde nöroprotektif faydalar sağladığı gösterilmiştir (233, 234, 235). Günümüzde yalnızca metabolik bir yan ürün olarak görülmeyen laktik asit ise, enerji metabolizmasındaki işleviyle öne çıkmaktadır. Çalışmamız, sıçanların plazmasındaki pirüvik asit seviyelerinin epileptogenezin latent ve kronik dönemlerinde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığını, idrarda ise akut dönemde azaldığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, laktik asit ise sadece plazma örneklerinde, epileptogenezin kronik döneminde artış göstermiştir. Epileptogenez sırasında akut dönemde idrarda pirüvik asit konsantrasyonunun azalması, latent ve kronik dönemlerde plazmada artan pirüvik asit konsantrasyonu ile bir dizi metabolik ve hücresel yanıtla ilişkili olabilir. Akut dönemde epileptik nöbetlerin başlamasıyla beyin dokusunda enerji ihtiyacı hızla artar ve pirüvik asit mitokondriye yönlendirilerek enerji üretiminde kullanılır; bu da idrarda atılmasını azaltır. Oksijen yetersizliği durumunda ise pirüvik asit laktik aside dönüştürülerek anaerobik enerji üretimi sağlanır. Latent ve kronik dönemlerde ise hücresel oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve enflamasyonun artması nedeniyle enerji üretiminde aksaklıklar meydana gelir ve pirüvik asit yeterince işlenemediğinden plazmada birikmeye başlar. Bu dönemde pirüvat, glikoneogenez ve diğer metabolik süreçlerle daha az tüketilir ve hücre dışına çıkarak plazma seviyelerinde artışa yol açar. Bu değişiklikler, epileptogenezin farklı evrelerinde hücresel enerji metabolizmasındaki dengesizlikleri ve adaptasyon süreçlerini yansıtarak pirüvik asidin potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesini sağlar. Plazmada artan pirüvik asit seviyelerine paralel olarak yüksek laktik asit seviyeleri de hipoksik koşullara ve artan glikoliz aktivitesine işaret edebilir; ayrıca, kronik dönemde nöbet aktivitesiyle ilişkili kas aktivitesi de plazmada laktik asit birikimine yol açabilir. Bulgularımıza uygun olarak, epilepsili hastalarda ve epileptik modellerde laktik asit seviyelerinde sürekli bir artış gözlenmiştir (134, 136, 236, 237). Nöbetlerin hemen ardından hipokampus, BOS ve kanda laktik asit seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (238, 239, 240). Pirüvik asit ve laktik asidin beyin hücrelerine taşınması, monokarboksilat taşıyıcıları (MCT'ler) aracılığıyla gerçekleşir ve epilepsi modellerinde MCT ekspresyonunda değişiklikler kaydedilmiştir (241).

Araştırmalar, MCT1/MCT2 aracılığıyla n6ronlara laktik asit taşınmasının engellenmesinin farelerdeki n6betleri azalttığını ve laktatın birincil n6ronal yakıt olarak rol6n6 vurgulamaktadır (242). İnsanlarda ve pilokarpın sıçan modelinde yapılan çalışmalarda, TLE sırasında MCT4 ekspresyonunda bir azalma g6zlenmiştir (243). Son bulgular, laktatın yalnızca bir enerji kaynağı olarak değil, aynı zamanda bir sinyal molek6l6 olarak işlev g6rd6đ6n6 ve laktilasyon yoluyla epigenetik d6zenlemeye katılarak gen ifadesini ve inflamatuvar tepkileri etkilediğini g6stermiştir (244, 245, 246). Beyin h6crelerinde yaygın olan laktilasyon, n6ral aktivite ve stres tarafından d6zenlenmekte ve h6cresel fonksiyonları 6nemli 6l6de etkilemektedir (247). Alzheimer hastalığında, mikroglialarda oksidatif fosforilasyondan glikolize geçiş, laktat kaynaklı laktilasyonu içeren bir geri besleme mekanizması ile pro-inflamatuvar sinyali ve mikroglial disfonksiyonu tetiklemektedir (248). Sepsiste de, makrofajlar tarafından laktat alımı, pro-inflamatuvar 6zellikleri ile endotelial geçirgenliği artıran HMGB1'in laktilasyonuna yol açmaktadır. Bu g6zlemler, laktatın hem histon hem de histon olmayan laktilasyon yoluyla h6cresel işlevlerin d6zenlenmesindeki kapsamlı rol6n6 vurgulamaktadır. Epilepside laktilasyonun potansiyel rol6 tam olarak araştırılmamış olsa da, laktilasyonun epilepsi patofizyolojisinde etkili olabileceği d6ř6n6lmektedir. Epilepside bir biyobelirteç olarak yer alan ve sepsiste laktilasyondan etkilenen HMGB1 gibi proteinlerin rol6, laktilasyonun epilepsideki mekanizmalara etkisini incelemeye y6nelik araştırmaların 6nemini ortaya koymaktadır (249, 250). Metabolizma, epigenetik ve transkripsiyon sonrası d6zenleme arasındaki karmaşık ilişki, epileptogenezin anlaşılmasına katkı sağlayabilecek bir araştırma alanı sunmaktadır. Pir6vik ve laktik asit arasındaki etkileşim, plazma ve idrar sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, bu metabolitlerin seviyeleri ve MCT ekspresyonlarının izlenmesinin epileptogenezin ilerleyişi hakkında değerli bilgiler sağlayabileceğini d6ř6nd6rmektedir. Bununla birlikte, MCT'ler, epileptogenezini inhibe etmek veya geciktirmek için potansiyel terap6tik hedefler olarak 6ne çıkmaktadır ve epilepsi araştırmalarında gelecekteki 6nemini ortaya koymaktadır.

Mitokondri, 6zellikle ara metabolizma ve h6cresel enerji y6netiminde hayati bir role sahiptir. Kronik epilepside mitokondriyal disfonksiyonun anlaşılması, mitokondriyal oksidatif stresin n6betlerin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğunu

belirlemek açısından zorluk taşır. Süksinik asit, metabolik yollar arasında önemli bir bağlantı sağlayarak katabolik molekülleri bir araya getirir ve anabolik süreçleri tetikler (251). Özellikle TKA döngüsünün ve GABA şantının temel bileşenlerinden biridir. Bu çalışma, epileptogenezin kronik fazını temsil eden sıçanlarda plazma süksinat seviyelerinin kontrole kıyasla anlamlı şekilde arttığını göstermiştir. Literatürdeki çalışmalar, süksinat dehidrojenaz (SDH) tarafından ters kataliz dahil olmak üzere süksinat birikiminin potansiyel kökenlerine değinmiştir. Normalde SDH, hücrelerde fumarat üretmek için süksinatı dehidrojenize eder, ancak iskemi sırasında SDH'nin ters katalizi meydana gelir ve elektronların kompleks I'den geriye doğru akmasına neden olarak reperfüzyon sırasında nöronal hasara yol açar ve böylece ROT üretir (252). Bulgularımızla uyumlu olarak, bir başka çalışma, hipokampüsteki yüksek süksinat seviyelerinin kainik asit kaynaklı SE'li sıçanlarda oksidatif stresi artırabileceğini ve bu birikimin öncelikle fumaratı süksinata çeviren SDH'nin ters katalizine bağlı olduğunu öne sürmüştür (253). Benzer şekilde, idiyopatik epilepsisi olan köpekleri inceleyen bir çalışmada BOS örneklerinde artmış süksinik asit seviyesi tespit edilmiştir (254). Bazı çalışmalar ayrıca süksinik asidin kısmi bir NMDA agonisti olarak çalıştığını ve nöronal uyarılabilirliği artırarak nöbetleri tetikleyebileceğini ortaya koymuştur (255). Bu arada, süksinik asidin GABA ile yakın bir ilişkisi vardır, çünkü GABA öncelikle TKA döngüsü yoluyla glutamattan metabolize edilir. Ardından, GABA aminobütirik asit transaminaz tarafından süksinik semialdehide dönüştürülür ve daha sonra süksinik semialdehit dehidrojenaz (SSADH) tarafından süksinata oksitlenir. SSADH eksikliğinin zihinsel engellilik, motor bozukluklar ve epilepsi ile karakterize nadir bir nörometabolik bozukluk olduğu bilinmektedir. Literatürde, SSADH'yi kodlayan *ALDH5A1*'i içeren bir çalışma, SE gibi yüksek stres koşullarının *ALDH5A1* promotör bölgesinin önemli ölçüde aktivasyonuna yol açabileceğini ve bunun da SSADH üretimini artmasına neden olabileceğini öne sürmüştür (256). Bu durum, SE gibi yüksek stres koşullarında SSADH ekspresyonunun artarak süksinik asit birikmesine yol açabileceğini düşündürmektedir. Sıçan beyinlerinden elde edilen mitokondriler üzerinde yapılan bir çalışma, lipid peroksidasyonunun, TKA döngüsünde işlev gören SSADH'yi inhibe ederek GABA klirensinin azalmasına neden olabileceğini öne sürmektedir (257). Bu durum, hem TKA döngüsünün akışını azaltmış hem de GABA klirensini azaltmıştır ve

elektrofizyolojik verilere göre, ligand kapılı klorür kanallarının (GABA_A) işlevsel bozukluğu nedeniyle hücre dışı GABA'nın uyarıcı dönüşümüne neden olarak potansiyel olarak nöbete bağlı daha fazla hasara neden olabilir (258). Bu etkilere ek olarak, süksinik asit, daha yakın zamanda tanımlanan bir posttranslasyonel modifikasyon olan protein süksinilasyonundaki rolü ile de tanınmaktadır ve aynı zamanda kimyasal bir haberci olarak da görev yapmaktadır (251). Süksinilasyonun fizyolojik düzenleyici etkileri ve süksinik asidin bir kimyasal haberci olarak rolü henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Mevcut bulgular, süksinik asidin etkilerinin farklı mekanizmalar nedeniyle fizyolojik ve patolojik süreçler arasında değişiklik gösterebileceğini düşündürmektedir. Özellikle, süksinat birikiminin GABA ve glutamat dengesini bozarak SE patolojisini kötüleştirebilme potansiyeli değerlendirilmelidir. Literatürdeki farklı modellerde ve biyolojik örneklerde epilepsi ile ilişkilendirilen yüksek süksinik asit seviyeleri göz önüne alındığında, süksinik asit, epileptogenezin ilerlemesini izlemek için güçlü bir biyobelirteç adayı olarak öne çıkmaktadır.

Epileptogenezin plazmada latent ve kronik, idrarda ise akut evrelerinde gözlenen belirgin metabolik farklılıklar özellikle TKA döngüsüne yansımıştır. Sonuçlarımızla tutarlı olarak, STN'li farelerde hem serebral korteks hem de hipokampüste TKA döngüsünün işlevinde bozulmalar gözlenmiştir (137). Bu durum, mitokondriyal işlev bozukluğunun hedeflenmesinin ilaca dirençli epilepsiyi tedavi etmede umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir. TKA döngüsünü ayrıntılı incelememiz, glisin, serin ve treonin metabolizması ile TKA döngüsü arasındaki etkileşimi önemli bir odak noktası olarak öne çıkarmıştır. Bu amino asitlerin pirüvata dönüştürülmesi, anaplerotik substratlar olarak TKA döngüsü metabolitlerini desteklemede kritik bir rol oynar (259). Bu destek, TKA döngüsünün homeostazının korunması için hayati önem taşır. Glisin, serin ve treoninin pirüvata dönüşümü, hücresel sistemlerdeki metabolik esnekliğin yanı sıra hücresel işlev ve enerji üretimini optimize etmek için farklı metabolik yollar arasındaki karmaşık dengeyi vurgulamaktadır. Hem plazmada hem idrarda akut fazda önem kazanan glisin, serin ve treonin metabolizması ile özellikle idrarda akut fazda öne çıkan TKA döngüsü arasındaki etkileşim, epileptogenez sürecindeki metabolik düzenleme açısından dikkate değerdir. Bu etkileşimin daha

fazla araştırılması, metabolik düzenleme ve epileptogenez için yeni terapötik hedefler hakkında değerli bilgiler sağlayabilir. Plazma örneklerinde pirüvik asit ve laktik asit seviyelerindeki değişiklikler, epileptogenezin kronik fazında glikoliz/glukoneogenez ve piruvat metabolizması yolları üzerinde kayda değer bir etkiye işaret etmektedir. Öte yandan, idrar örneklerinde bu metabolik yollar özellikle akut dönemde öne çıkmaktadır. Bu kapsamda özellikle profillenen metabolitlerden sitrik asit ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada, epileptogenezin akut dönemini temsil eden sıçanların idrar örneklerinde, sitrik asit seviyesinin istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı gözlemlenmiştir. Bulgularımızla uyumlu olarak, farelerde yapılan akut kimyasal kindling modelinde de beyin dokularında düşük sitrat seviyeleri tespit edilmiştir (18). Sitrat, TKA döngüsünde yer alan ve enerji metabolizmasında kritik rol oynayan bir ara maddedir. Epilepsi durumunda nöronların aşırı uyarılması ve glutamat salınımı, sitrat ve glutamatın öncüsü olan 2-oksoqlutarat gibi TKA döngüsü ara ürünlerinin azalmasına yol açabilir. MSS bu ara maddelere artan bir talep gösterdiğinde, dolaşımdan karşılanarak KBB'yi geçebilir ve bu durum serum sitrat seviyelerindeki düşüşün idrara yansımaya neden olabilir.

Epileptogenezin akut dönemindeki idrar bulgularına ek olarak, TKA döngüsünde alan sitrik asit ile birlikte rol oynayan fumarik asit ve 2-oksoqlutarik asit metabolitlerinin de kontrollere göre istatistiksel olarak daha düşük seviyede bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular beraber ele alındığında, epilepside akut dönemde oksijenli solunum kapasitesinin azalması, nöbet sırasında artan enerji talebi, lokal hipoksi, mitokondriyal disfonksiyon ve metabolik değişiklikler sonucu beyin hücrelerinin enerji üretiminde geçici olarak anaerobik yolları kullanmasına neden olduğu düşünülebilir. Bu bağlamda, klinikte non-invaziv bir şekilde idrarda pirüvik asit, sitrik asit, 2-oksoqlutarik asit ve fumarik asit gibi küçük moleküllü metabolitlerin seviyelerinin izlenmesi, epileptogenezin akut fazının belirlenmesi için potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir. Aynı zamanda, bu metabolitin belirli aralıklarla izlenmesi, sürecin kontrol altında tutulmasına katkı sağlayabilir. Ayrıca, bu metabolitlerin değişimiyle uyumlu olarak, yalnızca yolak temelli gerçekleştirilen analizlerde de pirüvik asit, sitrik asit, fumarik asiti içeren başta TKA döngüsü olmak üzere farklı yolların değişimi de dikkat çekmektedir. Bu yollar arasında alanin,

aspartat ve glutamat metabolizması, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, glisin, serin ve treonin metabolizması, pirüvat metabolizması ve glikoz/glikoneogenez yolağı yer almaktadır.

Epileptogenez sürecinde pirüvat metabolizması ve glikoliz/glukoneogenez yolağı, akut ve kronik dönemlerdeki metabolik değışimlerle hastalığın patofizyolojisinde kritik bir rol oynamaktadır. Akut dönemde idrar, kronik dönemde ise plazma örneklerinde gözlenen çarpıcı değışiklikler, bu yolağın epilepsi gelişimindeki önemini vurgulamaktadır. Pirüvat, glukoneogenez ve mitokondriyal metabolizmanın sürdürülmesinde önemli bir role sahiptir. Tek bir reaksiyonla oksaloasetata veya asetil-CoA'ya dönüşebilme özelliğı sayesinde, TKA döngüsünün akışını devam ettirmek için gerekli olan bu iki temel ara ürünün oluşumuna katkı sağlar (260). Pirüvat metabolizmasının düzenlenmesi, özellikle açlık veya enerji eksikliği durumlarında glikoz seviyelerinin korunması için büyük önem taşır. Pirüvat metabolizması, glikoliz ve glukoneogenez yolları arasında devamlı bir etkileşim mevcuttur ve bu etkileşim hücrenin enerji ihtiyaçlarına göre uyumlu bir şekilde düzenlenir. Böylece hücre, enerji üretimini verimli bir şekilde gerçekleştirirken aynı zamanda glikoz dengesini korur ve temel işlevlerini sürdürebilir. Kısa zincirli bir yağ asidi olan asetik asit, pirüvat metabolizması ve glukoneogenez üzerinde etkili olarak bu metabolik yollarla etkileşime girer. Asetik asit, asetil-CoA'ya dönüştürülerek TKA döngüsüne katılır ve bu şekilde glukoneogenez süreçlerini etkileyebilir. Bununla birlikte, özellikle enerji yetersizliği durumlarında, glikoz üretimi için ek substratlar sağlayarak glukoneogenez artırılabileceğı gözlemlenmiştir (261). Bu çalışmada, epileptogenezin akut dönemini temsil eden sıçanların idrar örneklerinde artmış asetik asit seviyeleri tespit edilmiştir. Dikkat çekici olarak, bu artış yalnızca akut dönemde belirlenmiştir. Bulgularımızla uyumlu olarak, epilepsi hastalarının beyin dokusu örneklerinde sağlıklı bireylere kıyasla artmış asetik asit seviyeleri gözlemlenmiştir (262). Benzer şekilde, idiyopatik epilepsili köpeklerin BOS örneklerinde de yüksek asetik asit düzeyleri rapor edilmiştir (254). Normal koşullarda asetik asit gibi organik asitlerin idrarda bulunması, vücudun doğal metabolik işlevlerinin bir sonucudur. Ancak idrarda artan asetik asit seviyeleri, çeşitli fizyolojik veya patolojik durumları işaret edebilir. SE ardından akut dönemde idrar örneklerinde artan asetik asit seviyeleri enerji metabolizmasındaki değışiklikler,

laktik asidoz ve ketozis ile ilişkilendirilebilir. SE sırasında beyin hücreleri normalden çok daha fazla enerji tüketir, bu da glikozun hızla tükenmesine ve vücudun enerji kaynağı olarak yağ asitleri ile proteinlere yönelmesine yol açar. Yağların oksidasyonu sırasında keton cisimleri ve asetik asit gibi asidik metabolitlerin üretimi artar ve bu maddeler idrarda tespit edilebilir. Ayrıca, artan kas aktivitesi ve enerji talebi, hücreleri anaerobik glikolize yönlendirerek laktik asidoza neden olabilir. Vücut, bu asidik yükü dengelemek için asetik asit gibi asidik metabolitlerin idrar yoluyla atılımını artırabilir. Ayrıca, bağırsaktaki mikrobiyal fermantasyon sonucu üretilen asetik asit, değişen bağırsak mikrobiyotası ile birlikte TLE patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabilir (263).

Hem idrar hem de plazma örneklerinde öne çıkmakta olan glisin, serin ve treonin metabolizması, pürin metabolizması ile dolaylı bir ilişki göstermektedir. Hücresel yolak analizleri, inosin, ürik asit ve allantoinin birlikte pürin metabolizmasının bir parçası olduğunu göstermektedir. Bu yolakta inosin, bir dizi reaksiyon sonucunda ürik asit üretimine katabolize olabilir ve ardından ürik asidin parçalanmasıyla allantoin oluşabilir. Allantoin, epileptogenezin hem akut hem de latent döneminde düşüş gösterirken, inosin yalnızca latent dönemde azalmıştır. Çoğu memelide allantoin, urat oksidaz enzimi tarafından ürik asidin oksidasyonu ile oluşurken, insanlarda bu enzim birkaç mutasyon nedeniyle etkin değildir. Bu nedenle insanlarda allantoin, birçok serbest radikalın etkisiyle ürik asidin enzimatik olmayan oksidasyonu sonucu oluşan temel bir üründür (264). Ürik asit, insanlarda pürin metabolizmasının son ürünü olarak güçlü bir antioksidan ve ROT temizleyicisi işlevi görür (265). Bu oksidatif reaksiyonlar sonucu oluşan allantoin ise idrarda stabil kalabilen başlıca üründür (264). Önemli olarak, allantoin, ürik asit seviyelerinden bağımsız olarak sistemik düzeydeki ROT'u yansıtır (266). Buna bağlı olarak, allantoin seviyelerinin oksidatif stresin derecesini yansıtan bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, allantoinin hafızayı güçlendirici, hipokampüste immatür nöronal hücre çoğalmasını sağlayan etkileri ve anti-inflamatuar, anti-nosiseptif, özelliklere sahip olduğunu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (267, 268). Literatürde, allantoin ve epileptogenez sürecini kapsayan bir çalışma henüz yer almamaktadır. Ancak, oldukça yakın zamanda yayınlanan bir araştırmada, allantoin uygulanmasının KA ile

indüklenen TLE fare modelinde nöronal dejenerasyonu iyileştirdiği bildirilmiştir (269). Epileptogenezin akut ve latent dönemlerinde idrarda tespit edilen allantoin seviyelerinin düşüklüğü artan oksidatif strese karşı antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliğinden kaynaklanıyor olabilir. Bu kapsamda antioksidan olarak görev alan ürik asidin allantoin'e dönüşümü etkilenebilir. Ayrıca, insanlarda urat oksidaz enziminin aktif olmaması göz önünde bulundurulduğunda, epileptogenezin akut ve latent dönemlerinde sıçanlarda bu enzimin aktivitesinde değişiklikler meydana gelmiş olabileceği unutulmamalıdır. İnozin, pürin biyosentezi ve yıkımı için temel bir metabolittir. Ayrıca RNA düzenlemesini, metabolik enzim aktivitesini ve sinyal yollarını düzenleyen biyoaktif bir molekül olarak da işlev görür (270). Son çalışmalar, inozinin çeşitli nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarda nöroprotektif ve nöromodülatör etkileri olduğunu göstermiştir (271). İnosinin oral uygulanması, Parkinson hastalığı gibi nörolojik durumların tedavisine yönelik klinik denemelerde araştırılmıştır; bu denemelerde, serum ve BOS'taki ürik asit seviyelerini yükselterek serbest radikalleri temizlediği ve nöroprotektif etki sağladığı bildirilmiştir (272). Bu bilgilere ek olarak, son yıllarda mikrobiyota ile inozin arasında mekanik bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (273, 274). Bu durumda, epileptogenez sürecinde değişen bağırsak mikrobiyotasının, bu metabolitlerin üretimini etkileyebileceği dikkate alınmalıdır. Epileptogenezin akut ve latent dönemlerinde idrarda gözlenen düşük allantoin seviyeleri, pürin metabolizması ve antioksidan savunma mekanizmalarının işleyişine dair bir gösterge olabilir. Bu nedenle, allantoin özellikle başlangıç hasarına bağlı epileptogenez sürecini izlemek ve tedaviyi yönlendirmek için değerli bir biyobelirteç potansiyeli taşır.

Esas olarak kafein metabolizması ile ilişkili olan teobromin, idrar söktürücü ve düz kas gevşetici bir maddedir ve MSS üzerinde ise çok az uyarıcı etkisi bulunmaktadır (275). Literatürde teobrominin epileptogenez ile ilişkisini ayrıntılı olarak ele alan bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, teobrominin adenosin reseptörlerini düzenleyerek farelerde hipokampal nöronların işlevini modüle edebileceği ve hasara karşı koruma sağlayabileceği öne sürülmüştür (276). Sıçanlarda geçici global serebral iskemisi modeli ile yapılan çalışmalarda, teobrominin lipid peroksidasyon belirteçlerini azaltıp glutatyon düzeylerini artırarak nöroprotektif etkiler sergilediği gösterilmiştir (277). Bu durum, teobrominin glutamaterjik ve

GABAerjik sinyalleşmeyi koruma potansiyeline işaret etmektedir. Ayrıca, başka bir çalışmada ise günlük teobromin alımı ile bilişsel performans arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (278). Sonuç olarak, teobrominin beyin üzerindeki etkileri hakkındaki araştırmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Teobrominin adenozin reseptörü antagonist etkisi, nöroprotektif özellikleri ve bilişsel işlevi geliştirme potansiyeli göz önünde bulundurulduğunda, epilepsi ve komorbiditeleri açısından önem taşıdığı düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, teobrominin epileptogenezin akut ve latent dönemlerinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde düşük seviyelerde olduğunu ve hastalığın prognoz takibinde değerli bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. Sağlık takviyesi olarak da değerlendirilebilecek teobromin, epileptogenez tedavisi için umut vaat etse de klinik etkinliğini anlamak adına daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Epilepsi bağlamında mitokondriyal disfonksiyon, pirimidin metabolizmasını etkileyebilecek önemli bir faktördür. Mitokondriler enerji metabolizmasının merkezinde yer alır ve pirimidinlerin *de novo* sentezine katılır. Bu süreçte, mitokondri zarında bulunan dihidroorotat dehidrojenaz (DHODH) enzimi rol oynar (279). Mitokondriyal disfonksiyon, nöroinflamasyonu ve oksidatif stresi daha da kötüleştirerek pirimidin metabolizmasını olumsuz etkileyen kısır bir döngü oluşturabilir (280). Orotik asit, pirimidin biyosentezinde önemli bir öncü molekül olarak görev yapar. Memelilerde, mitokondride bulunan DHODH enzimi tarafından üretilir ve ardından sitoplazmada yer alan uridin monofosfat (UMP) sentaz enzimi aracılığıyla UMP'ye dönüştürülür (281). Bu çalışma, epileptogenezin akut dönemine ait idrar örneklerinde orotik asit seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir. Bu durum, hücrelerin SE kaynaklı hasarı telafi etmeye ve yapısal bütünlüğünü korumaya çalışırken pirimidin metabolizmasındaki kaymayı yansıtabilir. Araştırmalar, oksidatif stresin urasil ve uridin gibi pirimidin metabolitlerinin birikimine yol açabileceğini ve bunun da genomik dengesizlik ve hücre fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (282). Artan oksidatif stresin DNA hasarına yol açabileceği bilinmektedir. Jarrett ve arkadaşları, akut SE nöbet aktivitesinin mitokondriyal DNA'da (mtDNA) tercihli olarak oksidatif hasar oluşturduğunu ve bu hasarı onarmak için mtDNA onarım mekanizması olan

mtBER'in aktive edildiğini bildirmiştir (283). Buna göre, DNA onarım mekanizmalarının devreye girmesiyle artan nükleotid tüketimi orotik asit kullanımının da artmasına neden olabilir. Bu bağlamda, epileptogenezin akut döneminde sıçanların idrarında tespit edilen düşük orotik asit seviyesi, beyin hücrelerinde artan metabolik ihtiyaç ve hücresel aktiviteyi işaret edebilir. Öte yandan, epilepsinin kronik fazında mtBER'in mtDNA hasarını onarmada yetersiz kalabileceği ve bunun mtDNA kararsızlığı ile mitokondriyal oksidatif stresin artmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (283). Orotik asit seviyesindeki bu akut dönem değişimleri, potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği gibi, anti-epileptojenik yaklaşımlar geliştirilmesinde de önemli bir hedef olabilir. Ek olarak, sıçanlarla yapılan bazı çalışmalarda orotik asidin gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (284, 285, 286). Bu bağlamda, orotik asit ve gen transkripsiyonu arasındaki ilişkinin epileptogenez sürecinde incelenmesi, epileptogenezin mekanizmasını daha iyi anlamamıza ve yeni terapötik hedefler geliştirmemize katkı sağlayabilir.

Epileptogenez süreci boyunca çoğu metabolit sağlıklı bireylere kıyasla idrarda azalma eğilimi gösterirken, yalnızca birkaç metabolit belirgin bir artış göstermiştir. Akut dönemde bu artışı sergileyen metabolitler arasında dihidrotimin, trimetilamin ve timol bulunurken, latent dönemde ise yalnızca 1-metilhistidin öne çıkmaktadır. Bu metabolitlerin farklı dönemlerdeki yükselişi, epileptogenez sürecinde yaşanan metabolik değişimlerin anlaşılması açısından önemli ipuçları sunmaktadır.

Dihidrotimin, timin nükleotidinin parçalanma sürecinde oluşan bir üründür. İlk olarak, dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) enzimi timine hidrojen ekleyerek 5,6-dihidrotimini oluşturur. Ardından, dihidropirimidinaz (DHP) enzimi, bu molekülün halka yapısını açarak parçalar (287). Literatürde dihidrotiminin epilepsi veya nöbetlerle doğrudan ilişkisini gösteren çalışmalar henüz mevcut değildir. Ancak, DHP eksikliği olan hastaların klinik tablosunun asemptomatikten nöbetler, zekâ ve büyüme geriliğine kadar değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295). Benzer şekilde, DPD eksikliği de nörolojik belirtilerle birlikte gastrointestinal sorunlar ve hipotoni gibi geniş bir spektrumda etkiler oluşturabilir

(296). Dihidropirimidinlerin hücresele seviyede DNA hasarına neden olabileceği düşünölmektedir. SE sonrası ortaya çıkan oksidatif stres, aşırı ROT üretimine bağlı olarak DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve mitokondriyal bozulmaya yol açabilir (297). 2020’de Basbaus ve arkadaşlarının çalışması, dihidropirimidin birikiminin DNA-protein çapraz bağları (DPC’ler) oluşturarak DNA replikasyonu ve transkripsiyonu etkileyebileceğini göstermiştir (287). Epilepsi ile DNA hasarı arasındaki ilişkiye dair genel çalışmalar mevcut olsa da DPC’ler ve epilepsi arasındaki bağlantıyı inceleyen çalışmalar çok sınırlıdır. İdrarda epileptogenezin yalnızca akut döneminde anlamlı düzeyde artış gösteren dihidrotimin, potansiyel bir biyobelirteç olarak dikkat çekmektedir.

Trimetilamin (TMA), bağırsak mikrobiyotası tarafından kolin veya karnitin açısından zengin gıdaların tüketimiyle üretilen bir metabolittir. Bağırsaklardan emilen TMA, portal dolaşımle karaciğere taşınır ve burada flavin monooksijenazlar (FMO’lar) aracılığıyla trimetilamin-N-oksit (TMAO)’ya dönüştürölür. TMAO daha sonra sistemik dolaşıma girer ve böbrekler yoluyla vücuttan atılır (298). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında epileptogenezin akut dönemini temsil eden sıçanlarının idrar örneklerinde artmış TMA seviyeleri tespit edilmiştir. Bulgularımızla uyumlu olarak, literatürde epilepsi ile ilgili iki vakada trimetilaminüri (TMAU) varlığı bildirilmiştir (299, 300). Ancak, TMAU ile epilepsi arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. TMAU ve epilepsi arasındaki potansiyel bağlantıyı inceleyen çalışmalar, TMA’nın bazı önemli etkilerini ortaya koymuştur. TMA, hücre içinde alkalileştirici bir etki yaparak yarık bağlantı kanallarını açabilir; bu da genel senkronizasyonu artırarak nöbet sürelerini uzatabilir ve boşalma sonrası dönemleri uzatarak nöbet hassasiyetini artırabilir (301). Ayrıca, antiepileptik ilaç olan levetirasetamin yetişkin gine domuzlarında CA3 nöronlarının aksiyon potansiyeli ve epileptik patlamalarının sıklığını azalttığı, ancak bu etkinin TMA kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (302). İlginç bir şekilde, TMA üretimi ile ilişkili olduğu düşünölen *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) miktarının epilepsi hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla arttığı tespit edilmiştir. Bağırsaktaki *K. pneumoniae* bolluğundaki bu artışın epileptik nöbetleri kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, *K. pneumoniae*’nın beyinle bir iletişim yolu olup olmadığı araştırılmış ve mikrogliyal hücre aracılı

enflamatuvar yanıtın aktivasyonunun nöbetlere karşı koruma sağlayabileceği bulunmuştur (303). Buna ek olarak, TMA üretimi ile ilişkili bir diğer bakteri olan *Eggerthella lenta*'nın çocuklarda dirençli epilepsi ile ilişkili bir tür biyobelirteç olarak öne çıktığı belirtilmiştir (304). Bu bulgulara ek olarak, fizyolojik koşullar altında TMAO'nun KBB bütünlüğünü desteklediği, öncüsü olan TMA'nın ise KBB'nin sıkı bağlantılarını bozduğu bildirilmiştir (305). Bu bağlamda idrar örneklerinde TMA, epileptogenezin yalnızca akut döneminde anlamlı bir artış göstererek potansiyel bir biyobelirteç adayı olarak öne çıkmaktadır. Epilepsinin akut döneminde TMA fazlalığı, nöbetlerin neden olduğu stres, bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler ve karaciğer fonksiyonlarındaki bozulmanın bir kombinasyonu sonucu oluşabilir. TMA ve TMAO'nun epileptogenezdeki rolü henüz net değildir; bu nedenle TMA metabolizmasının epileptogenezdeki etkisinin daha fazla vaka ve hayvan modeli çalışması ile araştırılması önem taşımaktadır.

Timol, ağırlıklı şekilde kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağdan elde edilir ve geniş bir farmakolojik etki yelpazesine sahiptir. Yapılan araştırmalar timolün antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (306, 307). Bu özellikleri, hem geleneksel tıpta hem de modern ilaç geliştirme çalışmalarında timolü dikkat çekici bir bileşik haline getirmektedir. Kimyasal yapısı sayesinde timol, iyon kanalları ve reseptörler gibi hedeflerle etkileşimde bulunarak terapötik kullanım potansiyelini artırmaktadır. Timolün epilepsi bağlamındaki önemli rollerinden biri, GABA_A reseptörleri ile etkileşimidir. Timol, GABA_A reseptörlerini aktive ederek nöronlarda hiperpolarizasyona yol açan klor iyonu girişini artırarak, nöronal uyarılabilirliği ve nöbet aktivitesini azaltabilmektedir (308). Ayrıca, timolün gidazepam gibi diğer antikonvülsanlarla birlikte kullanıldığında sinerjistik etkiler göstermesi, nöbet bozukluklarında yardımcı bir tedavi ajanı olarak potansiyelini desteklemektedir (309). Timol, GABA_A reseptörleri üzerindeki doğrudan etkilerinin yanı sıra, antioksidan özellikleriyle de nöroprotektif etkiler gösterebilir. Bu kapsamda timol, süperoksit dismutaz ve glutatyon gibi endojen antioksidanların seviyesini artırarak nöronal dokulardaki oksidatif hasarı azaltır. Bu antioksidan etkiler, nöbet aktivitesiyle ilişkili hasarı önleyerek beyin sağlığını destekleyebilir (310). Epileptik hayvanlarda akut dönemde idrardaki timol miktarının

artışının, SE sırasında yoğun nöbet aktivitesinin metabolizma ve atılım süreçlerinde değişiklikler kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Oksidatif stres, inflamasyon ve bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler ve artan nöroprotektif kullanım gibi durumlar, timolün metabolizmasını ve atılımını etkileyerek idrarda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına yol açabilir.

Epileptogenezin latent dönemine ait yapılan idrar analizinde, tüm metabolitlerin konsantrasyonları düşüş gösterirken, yalnızca 1-metilhistidin (1-MH) artış göstererek dikkat çekmektedir. Literatürde, epilepsi hastalarının post-mortem beyin dokularında 1-MH'nin azaldığı bildirilmiştir (262). 1-MH, histidin metabolizmasından üretilen ve iskelet kası metabolizmasının bir göstergesi olarak tanımlanan bir metabolittir (311, 312). Literatürde 1-MH ile epilepsi arasındaki ilişki kapsamlı bir şekilde incelenmemiş olsa da, 1-MH'nin özellikle kas metabolizması ve oksidatif stres bağlamındaki metabolik ve fizyolojik rollerine dayanarak bazı dolaylı bağlantılar kurulabilir. Kas protein döngüsünün bir biyobelirteci olarak görev yapan 1-MH; aktin ve miyozin gibi miyofibriller proteinlerin yıkımı sırasında serbest bırakılır (313, 314). Epilepsi gibi kas metabolizmasının artan fiziksel aktivite veya nöbetle ilişkili kas kasılmaları nedeniyle değişebileceği durumlarda, 1-MH seviyeleri kas protein döngüsündeki değişiklikleri yansıtabilir. Ayrıca, 1-MH'nin oksidatif stres bağlamındaki yeri dikkate değerdir. 1-MH, anserinin (beta-alanil-L-1-metilhistidin) bir yan ürünü olarak üretilir ve karnosin ve analoglarına ayrılır. Histidin içeren bir dipeptit olan karnosin, antioksidan özellikler sergileyerek nöronları oksidatif hasara karşı korur (315). Oksidatif stres, epilepsinin patofizyolojisinde önemli bir faktör olduğundan, histidin ve türevlerinin metabolizması, beyindeki oksidatif stres seviyelerini modüle etmede rol oynayabilir. Bu modülasyon, nöbetlere yatkınlık veya nöbet şiddeti üzerinde potansiyel olarak etkili olabilir. Buna bağlı olarak 1-MH, anserin ve karnosin gibi histidin metabolik yolundaki metabolitlerin epileptogenezin latent dönemini temsil eden biyobelirteçler olarak incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu metabolitler, epilepsi ile ilişkili mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Ancak, bu alanın tam anlamıyla aydınlatılabilmesi için daha derin ve kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır. Gelecekte yapılacak

çalışmalar, bu metabolitlerin epilepsi patogeneğinde oynadığı rollerin ve potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesine olanak tanıyacaktır

Epileptogeneğin kronik döneminde öne çıkan metabolitler arasında pimelik asit, tiglilisin, D-laktoz ve ksanturidik asit bulunmaktadır. Bu metabolitlerin epilepsi ve epileptogeneğ ile doğrudan ilişkileri net olarak tespit edilmemiş olsa da, çeşitli mekanizmalar yoluyla bu süreçte rol oynama potansiyeline sahip oldukları düşünülmektedir. Pimelik asit, özellikle biyotin biyosentezi sırasında önemli bir rol oynayan yedi karbonlu bir dikarboksilik asittir. Yağ asidi metabolizması ve enerji üretimiyle ilişkilidir (316). Bu doğrultuda, epilepsideki rolü mitokondri fonksiyonu ve oksidatif stres ile bağlantılı olabilir. Glisin türevi olan tiglilisin ise literatürde daha az incelenmiş bir amino asit türevidir. Metabolik olarak izolösinin asetil-CoA'ya tam olarak parçalanamadığı durumlarda biriktiği belirtilmiştir. Bu birikim, beta-ketotiaz gibi izolösin ve valin yıkımında rol oynayan enzimlerin eksikliği veya işlev bozukluğu durumlarında gözlenebilir (317). Biyolojik sıvılarda, özellikle idrarda tiglilisin seviyelerinin yükselmesi, metabolik dengesizlikleri işaret etmekle birlikte mitokondriyal işlev bozukluğu ile ilişkilendirilebilir. Öte yandan, bir şeker molekülü olan D-laktoz, karbonhidrat metabolizmasında rol oynar. Karbonhidrat metabolizması, beyin için enerji sağlanmasında kritik öneme sahiptir ve enerji homeostazındaki bozulmalar nöronal uyarılabilirliği artırabilir (318). D-laktozun epileptogeneğ ile doğrudan bağlantısı sınırlı olsa da enerji metabolizmasındaki rolü nöbet yönetimi açısından önemli olabilir. Ksanturidik asit ise triptofanın kinurenin yolu üzerinden metabolizması sırasında ortaya çıkan bir metabolittir. Kinurenin yolundaki düzensizlikler epilepsi patofizyolojisiyle ilişkilendirilmiş olup, ksanturidik asit seviyelerindeki değişimler eksitotoksikite ve nöbet aktivitesine katkıda bulunabilir. Literatürde, kronik levetirasetam uygulamasının, bir antikonvülsif metabolit olarak değerlendirilen kinurenik asit ve ksanturidik asidin astroglial salınımını artırdığı belirtilmiştir (319). Ek olarak, epileptik spazm kohortunda değerlendirilen BOS örneklerinde, ksanturidik asitte istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir artış gözlenmiştir. Ancak, bu grupta BOS kinurenik asit seviyelerinde ve kinurenin asit oranında belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Bu kapsamda, bu metabolitlerin ileriki

araştırmalarda detaylı olarak araştırılması ve daha iyi anlaşılması, epilepsi için biyobelirteç geliştirme ve tedavi hedefleri açısından değerli olabilir.



6 SONUÇ

Bu tez çalışmasında, lityum-pilokarpin ile indüklenen sıçan TLE modelinde epileptogenez sürecinin farklı evrelerine ait plazma ve idrar metabolomik profilleri detaylı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular, epileptogenez sürecinin tüm evrelerinde hem plazma hem de idrar örneklerinde anlamlı metabolit değişikliklerinin meydana geldiğini ve birçok metabolik yolağın bu süreçten etkilendiğini ortaya koymuştur. Özellikle pirüvik asit, hem plazma hem de idrar örneklerinde kritik bir metabolit olarak öne çıkmakta olup; idrarda akut dönemde, plazmada ise latent ve kronik dönemlerde anlamlı düzey değişiklikleri göstermesi açısından prognostik potansiyel taşımaktadır.

Analizler sonucunda belirlenen metabolik yolakların büyük oranda enerji metabolizmasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiş, bu da epileptogenez sırasında enerji dengesinin önemli ölçüde etkilendiğini düşündürmektedir. Tüm bu veriler, epileptogenez sürecinin oldukça dinamik ve çok aşamalı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, tek bir biyobelirteçten ziyade, daha hassas ve özgül sonuçlar elde edebilmek adına biyobelirteç profillerine ihtiyaç duyulabileceği öngörülmektedir. Elde edilen bulgular, epileptogenez evrelerinin belirlenmesi ve TLE'ye yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından literatüre önemli katkılar sunmaktadır.

7 KAYNAKLAR

1. Blair RD. Temporal lobe epilepsy semiology. *Epilepsy research and treatment*. 2012;2012.
2. Maizuliana H, Usui N, Terada K, Kondo A, Inoue Y. Clinical, semiological, electroencephalographic, and neuropsychological features of “pure” neocortical temporal lobe epilepsy. *Epileptic Disorders*. 2020;22(1):55-65.
3. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-82.
4. Devinsky O, Vezzani A, O'Brien T, Jette N, Scheffer I, De Curtis M, et al. *Epilepsy Nat Rev Dis Primers* 4: 18024. 2018.
5. Allone C, Buono VL, Corallo F, Pisani LR, Pollicino P, Bramanti P, et al. Neuroimaging and cognitive functions in temporal lobe epilepsy: A review of the literature. *Journal of the neurological sciences*. 2017;381:7-15.
6. Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ. Drug-resistant epilepsy. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(10):919-26.
7. Luan H, Liu L-F, Tang Z, Zhang M, Chua K-K, Song J-X, et al. Comprehensive urinary metabolomic profiling and identification of potential noninvasive marker for idiopathic Parkinson's disease. *Scientific reports*. 2015;5(1):13888.
8. Goldberg EM, Coulter DA. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(5):337-49.
9. Reddy DS. Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;7:115.
10. Thom M. Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2014;40(5):520-43.
11. Do Canto AM, Donatti A, Geraldis JC, Godoi AB, Da Rosa DC, Lopes-Cendes I. Neuroproteomics in epilepsy: what do we know so far? *Frontiers in molecular neuroscience*. 2021;13:604158.
12. Rho JM, Boison D. The metabolic basis of epilepsy. *Nature Reviews Neurology*. 2022;18(6):333-47.
13. Drupad K. Trivedi RG. *Metabolomics for Biomedical Research*: Elsevier; 2020.
14. Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev*. 2011;40(1):387-426.
15. Trabado S, Al-Salameh A, Croixmarie V, Masson P, Corruble E, Fève B, et al. The human plasma-metabolome: Reference values in 800 French healthy volunteers; impact of cholesterol, gender and age. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173615.
16. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-21.

17. Wang D, Wang X, Kong J, Wu J, Lai M. GC-MS-Based metabolomics discovers a shared serum metabolic characteristic among three types of epileptic seizures. *Epilepsy Res.* 2016;126:83-9.
18. Lai W, Du D, Chen L. Metabolomics provides novel insights into epilepsy diagnosis and treatment: a review. *Neurochemical research.* 2022;47(4):844-59.
19. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *The lancet.* 2019;393(10172):689-701.
20. Johnson EL. Seizures and Epilepsy. *Med Clin North Am.* 2019;103(2):309-24.
21. Jackson A, Teo L, Seneviratne U. Challenges in the first seizure clinic for adult patients with epilepsy. *Epileptic Disorders.* 2016;18(3):305-14.
22. Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy & behavior.* 2010;17(1):103-8.
23. Kaculini CM, Tate-Looney AJ, Seifi A. The history of epilepsy: from ancient mystery to modern misconception. *Cureus.* 2021;13(3).
24. Ladino LD, Rizvi S, Téllez-Zenteno JF. Epilepsy through the ages: an artistic point of view. *Epilepsy & Behavior.* 2016;57:255-64.
25. Gross RA. A brief history of epilepsy and its therapy in the Western Hemisphere. *Epilepsy research.* 1992;12(2):65-74.
26. Hogan RE, Kaiboriboon K. John Hughlings- Jackson's Writings on the Auditory Aura and Localization of the Auditory Cortex. *Epilepsia.* 2004;45(7):834-7.
27. Wolf P. History of epilepsy: nosological concepts and classification. *Epileptic Disorders.* 2014;16(3):261-9.
28. Prasad AN, Prasad C, Stafstrom CE. Recent advances in the genetics of epilepsy: insights from human and animal studies. *Epilepsia.* 1999;40(10):1329-52.
29. Gibbs RA. The human genome project changed everything. *Nature Reviews Genetics.* 2020;21(10):575-6.
30. Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Annals of neurology.* 1998;43(4):435-45.
31. Beghi E. The epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology.* 2020;54(2):185-91.
32. Organization WH. Epilepsy. 2024 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>].
33. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology.* 2017;88(3):296-303.
34. Beghi E, Hesdorffer D. Prevalence of epilepsy—an unknown quantity. *Epilepsia.* 2014;55(7):963-7.
35. Epilepsy A. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia.* 1989;30:389-99.
36. Sarmast ST, Abdullahi AM, Jahan N. Current classification of seizures and epilepsies: scope, limitations and recommendations for future action. *Cureus.* 2020;12(9).

37. Brodie MJ, Zuberi SM, Scheffer IE, Fisher RS. The 2017 ILAE classification of seizure types and the epilepsies: what do people with epilepsy and their caregivers need to know? *Epileptic Disorders*. 2018;20(2):77-87.
38. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. Wiley Online Library; 2010.
39. Devinsky O, Vezzani A, O'Brien TJ, Jette N, Scheffer IE, de Curtis M, et al. Epilepsy. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18024.
40. Balestrini S, Arzimanoglou A, Blümcke I, Scheffer IE, Wiebe S, Zelano J, et al. The aetiologies of epilepsy. *Epileptic Disorders*. 2021;23(1):1-16.
41. Vezzani A, Fujinami RS, White HS, Preux P-M, Blümcke I, Sander JW, et al. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta neuropathologica*. 2016;131:211-34.
42. Angel MJ, Young GB. Metabolic encephalopathies. *Neurologic clinics*. 2011;29(4):837-82.
43. Sander J, Hart Y, Shorvon S, Johnson A. Medical science: National General Practice Study of Epilepsy: newly diagnosed epileptic seizures in a general population. *The Lancet*. 1990;336(8726):1267-71.
44. Rahman S, Footitt EJ, Varadkar S, Clayton PT. Inborn errors of metabolism causing epilepsy. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2013;55(1):23-36.
45. Campistol J, Plecko B. Treatable newborn and infant seizures due to inborn errors of metabolism. *Epileptic Disorders*. 2015;17(3):229-42.
46. Dulac O, Plecko B, Gataullina S, Wolf NI. Occasional seizures, epilepsy, and inborn errors of metabolism. *The Lancet Neurology*. 2014;13(7):727-39.
47. Wolf NI, Bast T, Surtees R. Epilepsy in inborn errors of metabolism. *Epileptic disorders*. 2005;7(2):67-81.
48. Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Conte M, Gallo A, Attanasio G, et al. Autoimmune epilepsy. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(3):221-5.
49. Maillard L, Vignal JP, Gavaret M, Guye M, Biraben A, McGonigal A, et al. Semiologic and electrophysiologic correlations in temporal lobe seizure subtypes. *Epilepsia*. 2004;45(12):1590-9.
50. Pascual MRQ, editor *Temporal lobe epilepsy: clinical semiology and neurophysiological studies*. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*; 2007: Elsevier.
51. Vinti V, Dell'Isola GB, Tascini G, Mencaroni E, Cara GD, Striano P, et al. Temporal lobe epilepsy and psychiatric comorbidity. *Frontiers in neurology*. 2021;12:775781.
52. Gaitatzis A, Trimble M, Sander JW. The psychiatric comorbidity of epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2004;110(4):207-20.
53. Tatum IV WO. Mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of Clinical Neurophysiology*. 2012;29(5):356-65.
54. Malmgren K, Thom M. Hippocampal sclerosis—origins and imaging. *Epilepsia*. 2012;53:19-33.
55. Prayson RA. Pathology of epilepsy. *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*: Elsevier; 2018. p. 617-32.

56. Blümcke I, Kistner I, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, et al. Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta neuropathologica*. 2009;117:535-44.
57. Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2012;15(4):239-46.
58. Sparaco M, Pascarella R, Muccio CF, Zedde M. Forgetting the unforgettable: transient global amnesia part II: a clinical road map. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(14):3940.
59. Spencer RL, Bland ST. Hippocampus and hippocampal neurons. *Stress: physiology, biochemistry, and pathology*: Elsevier; 2019. p. 57-68.
60. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: yapısı ve fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg*. 2015;25(3):287-95.
61. Songur A, Özen OA, SARSILMAZ M. Hipokampus. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2001;21(5):427-31.
62. Gaillard F, HA, Elfeky M., et al. Hippocampus. 2023.
63. DeToledo J, Kim I, Tantikittichaikul S. Translational Correlation: Temporal Lobe Epilepsy and Hippocampal Sclerosis. *Conn's Translational Neuroscience*: Elsevier; 2017. p. 45-7.
64. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013;54(7):1315-29.
65. Kabat J, Król P. Focal cortical dysplasia—review. *Polish journal of radiology*. 2012;77(2):35.
66. Mohsin SN, Grezenko H, Khan S, Eshete FD, Shrestha S, Kamran M, et al. Bridging Development and Disruption: Comprehensive Insights into Focal Cortical Dysplasia and Epileptic Management. *Cureus*. 2023;15(9).
67. Wang VY, Chang EF, Barbaro NM. Focal cortical dysplasia: a review of pathological features, genetics, and surgical outcome. *Neurosurgical focus*. 2006;20(1):1-7.
68. Ying Z, Babb T, Mikuni N, Najm I, Drazba J, Bingaman W. Selective coexpression of NMDAR2A/B and NMDAR1 subunit proteins in dysplastic neurons of human epileptic cortex. *Experimental neurology*. 1999;159(2):409-18.
69. Spreafico R, Tassi L, Colombo N, Bramerio M, Galli C, Garbelli R, et al. Inhibitory circuits in human dysplastic tissue. *Epilepsia*. 2000;41:S168-S73.
70. Ferrer I, Oliver B, Russi A, Casas R, Rivera R. Parvalbumin and calbindin-D28k immunocytochemistry in human neocortical epileptic foci. *Journal of the neurological sciences*. 1994;123(1-2):18-25.
71. Dudek FE, Staley KJ. The time course and circuit mechanisms of acquired epileptogenesis. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet] 4th edition. 2012.
72. Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ. Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(10):a022822.
73. Pitkänen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*. 2011;10(2):173-86.

74. Armijo JA, Valdizan E, De Las Cuevas I, Cuadrado A. Advances in the physiopathology of epileptogenesis: molecular aspects. *Revista de neurologia*. 2002;34(5):409-29.
75. Aroniadou-Anderjaska V, Fritsch B, Qashu F, Braga MF. Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res*. 2008;78(2-3):102-16.
76. Treiman DM. Clinical trials for status epilepticus. *Adv Neurol*. 1998;76:173-8.
77. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, et al. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015;56(10):1515-23.
78. Noe KH, Manno EM. Mechanisms underlying status epilepticus. *Drugs Today (Barc)*. 2005;41(4):257-66.
79. Onat F. Deneysel Araştırma Modelleri Uygulama El Kitabı. 1. Baskı ed. Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.; 2021. 112-7 p.
80. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature*. 1978;271(5646):676-7.
81. Ben-Ari Y, Lagowska J. [Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid]. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*. 1978;287(8):813-6.
82. Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La Salle G. A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res*. 1979;163(1):176-9.
83. Nirwan N, Vyas P, Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Rev Neurosci*. 2018;29(7):757-70.
84. Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*. 2009;158(1):309-23.
85. Rusina E, Bernard C, Williamson A. The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. *eNeuro*. 2021;8(2).
86. Carriero G, Arcieri S, Cattalini A, Corsi L, Gnatkovsky V, de Curtis M. A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia*. 2012;53(11):1917-27.
87. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol*. 2007;35(7):984-99.
88. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci*. 2000;23(11):580-7.
89. Rao MS, Hattiangady B, Reddy DS, Shetty AK. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res*. 2006;83(6):1088-105.
90. Drexel M, Preidt AP, Sperk G. Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. *Neuropharmacology*. 2012;63(5):806-17.

91. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983;9(3):315-35.
92. Turski WA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia.* 1983;39(12):1408-11.
93. Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):13311-6.
94. Di Maio R, Mastroberardino PG, Hu X, Montero L, Greenamyre JT. Pilocarpine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. *Neurobiol Dis.* 2011;42(3):482-95.
95. Szczurowska E, Mareš P. NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiol Res.* 2013;62(Suppl 1):S21-38.
96. Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, et al. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol Dis.* 2009;33(2):171-81.
97. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008;172(2):143-57.
98. Furtado Mde A, Braga GK, Oliveira JA, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia.* 2002;43 Suppl 5:37-9.
99. Mello LE, Covolan L. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsy Res.* 1996;26(1):123-9.
100. Covolan L, Mello LE. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.* 2000;39(2):133-52.
101. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 1995;16(1-2):33-7.
102. Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse.* 1989;3(2):154-71.
103. Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H. Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci.* 2005;99(4):307-21.
104. Lenox RH, Hahn CG. Overview of the mechanism of action of lithium in the brain: fifty-year update. *J Clin Psychiatry.* 2000;61 Suppl 9:5-15.
105. Chuang DM. Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Crit Rev Neurobiol.* 2004;16(1-2):83-90.
106. Mehrafza S, Kermanshahi S, Mostafidi S, Motaghinejad M, Motevalian M, Fatima S. Pharmacological evidence for lithium-induced neuroprotection against methamphetamine-induced neurodegeneration via Akt-1/GSK3 and CREB-BDNF signaling pathways. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22(8):856-65.

107. Rowe MK, Chuang DM. Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*. 2004;6(21):1-18.
108. Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*. 1987;23(3):953-68.
109. Honchar MP, Olney JW, Sherman WR. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science*. 1983;220(4594):323-5.
110. Jope RS, Morrisett RA, Snead OC. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Exp Neurol*. 1986;91(3):471-80.
111. Goffin K, Nissinen J, Van Laere K, Pitkänen A. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Exp Neurol*. 2007;205(2):501-5.
112. Bhinderwala F, Lei S, Woods J, Rose J, Marshall DD, Riekeberg E, et al. Metabolomics analyses from tissues in Parkinson's disease. *Metabolomics: Methods and Protocols*. 2019:217-57.
113. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2016;17(7):451-9.
114. Worley B, Powers R. Multivariate analysis in metabolomics. *Current metabolomics*. 2013;1(1):92-107.
115. Letertre MP, Giraudeau P, De Tullio P. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in clinical metabolomics and personalized medicine: current challenges and perspectives. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8:698337.
116. Steuer AE, Brockbals L, Kraemer T. Metabolomic Strategies in Biomarker Research-New Approach for Indirect Identification of Drug Consumption and Sample Manipulation in Clinical and Forensic Toxicology? *Front Chem*. 2019;7:319.
117. Wang JH, Byun J, Pennathur S, editors. Analytical approaches to metabolomics and applications to systems biology. *Seminars in nephrology*; 2010: Elsevier.
118. Dinis-Oliveira RJ. Metabolomics of drugs of abuse: a more realistic view of the toxicological complexity. *Bioanalysis*. 2014;6(23):3155-9.
119. Chen Y, Li E-M, Xu L-Y. Guide to metabolomics analysis: a bioinformatics workflow. *Metabolites*. 2022;12(4):357.
120. Beisken S, Eiden M, Salek RM. Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(1):97-109.
121. Theodoridis G, Gika HG, Wilson ID. Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. *Mass Spectrom Rev*. 2011;30(5):884-906.
122. NMR 101 [Available from: <https://www.bruker.com/en/resources/library/application-notes-mr/nmr-101.html>].
123. Hoult DI, Bhakar B. NMR signal reception: Virtual photons and coherent spontaneous emission. *Concepts in Magnetic Resonance: An Educational Journal*. 1997;9(5):277-97.
124. Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387(2):525-7.

125. Emwas A-HM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*. 2013;9:1048-72.
126. Emwas AH, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Gowda GAN, et al. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*. 2019;9(7).
127. Moco S, Bino RJ, De Vos RCH, Vervoort J. Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trac-Trend Anal Chem*. 2007;26(9):855-66.
128. Simmler C, Napolitano JG, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;25:51-9.
129. Zia K, Siddiqui T, Ali S, Farooq I, Zafar MS, Khurshid Z. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Medical and Dental Applications: A Comprehensive Review. *Eur J Dent*. 2019;13(1):124-8.
130. Forseth RR, Schroeder FC. NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function. *Curr Opin Chem Biol*. 2011;15(1):38-47.
131. Mahrous EA, Farag MA. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. *J Adv Res*. 2015;6(1):3-15.
132. Damodaran K. Recent advances in NMR spectroscopy of ionic liquids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2022;129:1-27.
133. Shirayama Y, Takahashi S, Minabe Y, Ogino T. In vitro ¹H NMR spectroscopy shows an increase in N-acetylaspartylglutamate and glutamine content in the hippocampus of amygdaloid-kindled rats. *J Neurochem*. 2005;92(6):1317-26.
134. Rabeson H, Fauvelle F, Testylier G, Foquin A, Carpentier P, Dorandeu F, et al. Quantitation with QUEST of brain HRMAS-NMR signals: application to metabolic disorders in experimental epileptic seizures. *Magn Reson Med*. 2008;59(6):1266-73.
135. Liu H, Fang F, Zhu H, Xia SA, Han D, Hu L, et al. Metabolic changes in temporal lobe structures measured by HR-MAS NMR at early stage of electrogenic rat epilepsy. *Exp Neurol*. 2008;212(2):377-85.
136. Carmody S, Brennan L. Effects of pentylenetetrazole-induced seizures on metabolomic profiles of rat brain. *Neurochem Int*. 2010;56(2):340-4.
137. Smeland OB, Hadera MG, McDonald TS, Sonnewald U, Borges K. Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(7):1090-7.
138. Wei DD, Ge D, Guo PP, Wang JS, Li MH, Yang MH, et al. A bird's eye view of anisatin induced convulsive seizures in brain by a (¹H) NMR based metabolic approach. *Mol Biosyst*. 2014;10(11):2923-34.
139. Fauvelle F, Boccard J, Cavarec F, Depaulis A, Deransart C. Assessing Susceptibility to Epilepsy in Three Rat Strains Using Brain Metabolic Profiling Based on HRMAS NMR Spectroscopy and Chemometrics. *J Proteome Res*. 2015;14(5):2177-89.
140. Li P, Wei DD, Wang JS, Yang MH, Kong LY. (¹H) NMR metabolomics to study the effects of diazepam on anisatin induced convulsive seizures. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;117:184-94.

141. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol*. 2017;76:9.23.1-9..17.
142. Sireesha V, Fatima F, Sultana S, Kumar MSS, Pravarsha Y, Tatikonda RR. A Comprehensive Review on Biomarker and Its Role in Diseases. *Cardiology and Angiology: An International Journal*. 2024;13(1):75-81.
143. Engel J, Jr., Pitkänen A. Biomarkers for epileptogenesis and its treatment. *Neuropharmacology*. 2020;167:107735.
144. Bakker E, Starokozhko V, Kraaijvanger JW, Heerspink HJ, Mol PG. Precision medicine in regulatory decision making: Biomarkers used for patient selection in European Public Assessment Reports from 2018 to 2020. *Clinical and translational science*. 2023;16(11):2394-412.
145. Hendrikse NM, Llinares Garcia J, Vetter T, Humphreys AJ, Ehmann F. Biomarkers in medicines development—From discovery to regulatory qualification and beyond. *Frontiers in Medicine*. 2022;9:878942.
146. Cagney DN, Sul J, Huang RY, Ligon KL, Wen PY, Alexander BM. The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. *Neuro-Oncology*. 2018;20(9):1162-72.
147. Pitkänen A, Löscher W, Vezzani A, Becker AJ, Simonato M, Lukasiuk K, et al. Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *The Lancet Neurology*. 2016;15(8):843-56.
148. Pitkänen A, Roivainen R, Lukasiuk K. Development of epilepsy after ischaemic stroke. *The Lancet Neurology*. 2016;15(2):185-97.
149. Vasilieva AA, Timechko EE, Lysova KD, Paramonova AI, Yakimov AM, Kantimirova EA, et al. MicroRNAs as potential biomarkers of post-traumatic epileptogenesis: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(20):15366.
150. Walker LE, Frigerio F, Ravizza T, Ricci E, Tse K, Jenkins RE, et al. Molecular isoforms of high-mobility group box 1 are mechanistic biomarkers for epilepsy. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(6):2118-32.
151. Stavropoulos I, Pervanidou P, Gnardellis C, Loli N, Theodorou V, Mantzou A, et al. Increased hair cortisol and antecedent somatic complaints in children with a first epileptic seizure. *Epilepsy & Behavior*. 2017;68:146-52.
152. Manninen E, Chary K, Lapinlampi N, Andrade P, Paananen T, Sierra A, et al. Acute thalamic damage as a prognostic biomarker for post-traumatic epileptogenesis. *Epilepsia*. 2021;62(8):1852-64.
153. Burelo K, Ramantani G, Indiveri G, Sarnthein J. A neuromorphic spiking neural network detects epileptic high frequency oscillations in the scalp EEG. *Scientific Reports*. 2022;12(1):1798.
154. Mishra NK, Engel J, Liebeskind DS, Sharma VK, Hirsch LJ, Kasner SE, et al. International Post Stroke Epilepsy Research Consortium (IPSERC): a consortium to accelerate discoveries in preventing epileptogenesis after stroke. *Epilepsy & Behavior*. 2022;127.

155. Karttunen J, Heiskanen M, Lipponen A, Poulsen D, Pitkänen A. Extracellular vesicles as diagnostics and therapeutics for structural epilepsies. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(6):1259.
156. Cunha AOS, Mortari MR, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, Dos Santos WF. Glutamate binding is altered in hippocampus and cortex of Wistar rats after pilocarpine-induced Status Epilepticus. *Neuroscience letters*. 2007;424(1):51-4.
157. Glien M, Brandt C, Potschka H, Voigt H, Ebert U, Löscher W. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy research*. 2001;46(2):111-9.
158. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G. Statistical power analyses using G* Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior research methods*. 2009;41(4):1149-60.
159. Heischmann S, Quinn K, Cruickshank-Quinn C, Liang L-P, Reisdorph R, Reisdorph N, et al. Exploratory metabolomics profiling in the kainic acid rat model reveals depletion of 25-hydroxyvitamin D3 during epileptogenesis. *Scientific reports*. 2016;6(1):31424.
160. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1972;32(3):281-94.
161. Wamil A. Beneficial effects of ACTH (4-10) on pilocarpine induced seizures. *Neurosci Res Comm*. 1989;4:109-16.
162. Gitai DLG, Dos Santos YDR, Upadhyya R, Kodali M, Madhu LN, Shetty AK. Extracellular vesicles in the forebrain display reduced miR-346 and miR-331-3p in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Molecular neurobiology*. 2020;57:1674-87.
163. Hanifa MA, Skott M, Maltesen RG, Rasmussen BS, Nielsen S, Frøkiær J, et al. Tissue, urine and serum NMR metabolomics dataset from a 5/6 nephrectomy rat model of chronic kidney disease. *Data in Brief*. 2020;33:106567.
164. Wang D, Zhang P, Wang X, Wang Y, Zhou Z, Zhu W. NMR-and LC-MS/MS-based urine metabolomic investigation of the subacute effects of hexabromocyclododecane in mice. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23:8500-7.
165. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature protocols*. 2007;2(11):2692.
166. Crook AA, Powers R. Quantitative NMR-based biomedical metabolomics: Current status and applications. *Molecules*. 2020;25(21):5128.
167. Jiménez B, Holmes E, Heude C, Tolson RF, Harvey N, Lodge SL, et al. Quantitative lipoprotein subclass and low molecular weight metabolite analysis in human serum and plasma by ¹H NMR spectroscopy in a multilaboratory trial. *Analytical chemistry*. 2018;90(20):11962-71.
168. Lodge S, Nitschke P, Loo RL, Kimhofer T, Bong S-H, Richards T, et al. Low volume in vitro diagnostic proton NMR spectroscopy of human blood plasma for lipoprotein and metabolite analysis: application to SARS-CoV-2 biomarkers. *Journal of proteome research*. 2021;20(2):1415-23.

169. Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic acids research*. 2021;49(W1):W388-W96.
170. Meier L, Bruginski E, Marafija JR, Caus LB, Pasquetti MV, Calcagnotto ME, et al. Hippocampal metabolic profile during epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy. *Biomed Chromatogr*. 2024;38(4):e5820.
171. Butawan M, Benjamin RL, Bloomer RJ. Methylsulfonylmethane: applications and safety of a novel dietary supplement. *Nutrients*. 2017;9(3):290.
172. Joung YH, Darvin P, Kang DY, Sp N, Byun HJ, Lee C-H, et al. Methylsulfonylmethane inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in BMMs by suppressing NF- κ B and STAT3 activities. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159891.
173. Abdel-Rafei MK, Thabet NM. Modulatory effect of methylsulfonylmethane against BPA/ γ -radiation induced neurodegenerative alterations in rats: influence of TREM-2/DAP-12/Syk pathway. *Life Sciences*. 2020;260:118410.
174. Carletti F, Ferraro G, Rizzo V, Cannizzaro C, Sardo P. Antiepileptic effect of dimethyl sulfoxide in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience letters*. 2013;546:31-5.
175. Widmann M, Lieb A, Mutti A, Schwarzer C. Dimethyl sulfoxide's impact on epileptiform activity in a mouse model of chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*. 2023;197:107235.
176. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological reviews*. 2000;80(3):1107-213.
177. Koike S, Bundo M, Iwamoto K, Suga M, Kuwabara H, Ohashi Y, et al. A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. *Translational psychiatry*. 2014;4(4):e379-e.
178. Andres RH, Ducray AD, Huber AW, Pérez- Bouza A, Krebs SH, Schlattner U, et al. Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. *Journal of neurochemistry*. 2005;95(1):33-45.
179. Kim DW, Yeo S-I, Ryu HJ, Kim J-E, Song H-K, Kwon O-S, et al. Effects of creatine and β -guanidinopropionic acid and alterations in creatine transporter and creatine kinases expression in acute seizure and chronic epilepsy models. *BMC neuroscience*. 2010;11:1-12.
180. Okwuofu EO, Ogundepo GE, Akhigbemen AM, Abiola AL, Ozolua RI, Igbe I, et al. Creatine attenuates seizure severity, anxiety and depressive-like behaviors in pentylenetetrazole kindled mice. *Metabolic Brain Disease*. 2021;36:571-9.
181. Dean PJA, Arikan G, Opitz B, Sterr A. Potential for use of creatine supplementation following mild traumatic brain injury. *Concussion*. 2017;2(2).
182. Leuzzi V, Mastrangelo M, Battini R, Cioni G. Inborn errors of creatine metabolism and epilepsy. *Epilepsia*. 2013;54(2):217-27.
183. Jiang Y, Zhu Z, Shi J, An Y, Zhang K, Wang Y, et al. Metabolomics in the development and progression of dementia: a systematic review. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:343.

184. Tsuruoka M, Hara J, Hirayama A, Sugimoto M, Soga T, Shankle WR, et al. Capillary electrophoresis- mass spectrometry- based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients. *Electrophoresis*. 2013;34(19):2865-72.
185. Yang G, Wang LZ, Zhang R, Zhang XY, Yu Y, Ma HR, et al. Study on the Correlation between Blood Urea Nitrogen, Creatinine Level, Proteinuria and Parkinson's Disease. *Neurology India*. 2023;71(6):1217-21.
186. Leland KM, McDonald TL, Drescher KM. Effect of creatine, creatinine, and creatine ethyl ester on TLR expression in macrophages. *International immunopharmacology*. 2011;11(9):1341-7.
187. McDonald T, Drescher KM, Weber A, Tracy S. Creatinine inhibits bacterial replication. *The Journal of Antibiotics*. 2012;65(3):153-6.
188. Di Micco L, Quinn RR, Ronksley PE, Bellizzi V, Lewin AM, Cianciaruso B, et al. Urine creatinine excretion and clinical outcomes in CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;8(11):1877-83.
189. Ix JH, de Boer IH, Wassel CL, Criqui MH, Shlipak MG, Whooley MA. Urinary creatinine excretion rate and mortality in persons with coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Circulation*. 2010;121(11):1295-303.
190. Oterdoom LH, Gansevoort RT, Schouten JP, de Jong PE, Gans RO, Bakker SJ. Urinary creatinine excretion, an indirect measure of muscle mass, is an independent predictor of cardiovascular disease and mortality in the general population. *Atherosclerosis*. 2009;207(2):534-40.
191. Aguayo-Cerón KA, Sánchez-Muñoz F, Gutierrez-Rojas RA, Acevedo-Villavicencio LN, Flores-Zarate AV, Huang F, et al. Glycine: the smallest anti-inflammatory micronutrient. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(14):11236.
192. Niu D, Sun P, Zhang F, Song F. Metabonomic analysis of cerebrospinal fluid in epilepsy. *Annals of Translational Medicine*. 2022;10(8).
193. Erdem FA, Ilic M, Koppensteiner P, Gołacki J, Lubec G, Freissmuth M, et al. A comparison of the transport kinetics of glycine transporter 1 and glycine transporter 2. *Journal of General Physiology*. 2019;151(8):1035-50.
194. Roux MJ, Supplisson S. Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron*. 2000;25(2):373-83.
195. Chen R, Okabe A, Sun H, Sharopov S, Hanganu- Opatz IL, Kolbaev SN, et al. Activation of glycine receptors modulates spontaneous epileptiform activity in the immature rat hippocampus. *The Journal of physiology*. 2014;592(10):2153-68.
196. Eichler SA, Kirischuk S, Jüttner R, Schafermeier PK, Legendre P, Lehmann TN, et al. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(6b):2848-66.
197. Shen H-Y, Van Vliet EA, Bright K-A, Hanthorn M, Lytle NK, Gorter J, et al. Glycine transporter 1 is a target for the treatment of epilepsy. *Neuropharmacology*. 2015;99:554-65.

198. Kalinichev M, Starr KR, Teague S, Bradford AM, Porter RA, Herdon HJ. Glycine transporter 1 (GlyT1) inhibitors exhibit anticonvulsant properties in the rat maximal electroshock threshold (MEST) test. *Brain research*. 2010;1331:105-13.
199. Epping L, Schroeter CB, Nelke C, Bock S, Gola L, Ritter N, et al. Activation of non-classical NMDA receptors by glycine impairs barrier function of brain endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(9):479.
200. Wiessler A-L, Talucci I, Piro I, Seefried S, Hörlin V, Baykan BB, et al. Glycine receptor β -targeting autoantibodies contribute to the pathology of autoimmune diseases. *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation*. 2024;11(2):e200187.
201. Di Ciaula A, Garruti G, Baccetto RL, Molina-Molina E, Bonfrate L, Portincasa P, et al. Bile acid physiology. *Annals of hepatology*. 2018;16(1):4-14.
202. Craig CR, Hartman ER. Concentration of amino acids in the brain of cobalt- epileptic rat. *Epilepsia*. 1973;14(4):409-14.
203. Emson P. Biochemical and metabolic changes in epilepsy. Taurine and neurological disorders: Raven Press New York; 1978. p. 319-38.
204. Hansen S, Perry TL, Wada JA, Sokol M. Brain amino acids in baboons with light-induced epilepsy. *Brain Research*. 1973;50(2):480-3.
205. Iwata H, Yamagami S, Lee E, Matsuda T, Baba A. Increase of brain taurine contents of E1 mice by physiological stimulation. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1979;29(4):503-7.
206. Koyama I. Amino acids in the cobalt-induced epileptogenic and nonepileptogenic cat's cortex. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1972;50(8):740-52.
207. Van Gelder N, Edmonds Jr H, Hegreberg G, Chatburn C, Clemmons R, Sylvester D. Amino acid changes in a genetic strain of epileptic beagle dogs. *Journal of Neurochemistry*. 1980;35(5):1087-91.
208. Van Gelder NM. Antagonism by taurine of cobalt induced epilepsy in cat and mouse. *Brain Research*. 1972;47(1):157-65.
209. Oja SS, Saransaari P. Taurine and epilepsy. *Epilepsy research*. 2013;104(3):187-94.
210. Perry TL, Hansen S, Kennedy J, Wada JA, Thompson GB. Amino acids in human epileptogenic foci. *Archives of Neurology*. 1975;32(11):752-4.
211. Van Gelder N. Rectification of abnormal glutamic acid levels by taurine. Raven Press New York; 1976. p. 293-302.
212. Akiyama T, Saigusa D, Inoue T, Tokorodani C, Akiyama M, Michiue R, et al. Exploration of urine metabolic biomarkers for new-onset, untreated pediatric epilepsy: A gas and liquid chromatography mass spectrometry-based metabolomics study. *Brain and Development*. 2024;46(4):180-6.
213. Kang YS, Ohtsuki S, Takanaga H, Tomi M, Hosoya Ki, Terasaki T. Regulation of taurine transport at the blood–brain barrier by tumor necrosis factor- α , taurine and hypertonicity. *Journal of neurochemistry*. 2002;83(5):1188-95.

214. Ochoa-de la Paz L, Zenteno E, Gullias-Cañizo R, Quiroz-Mercado H. Taurine and GABA neurotransmitter receptors, a relationship with therapeutic potential? Expert review of neurotherapeutics. 2019;19(4):289-91.
215. Wu J-Y, Prentice H. Role of taurine in the central nervous system. Journal of biomedical science. 2010;17:1-6.
216. Jangra A, Gola P, Singh J, Gond P, Ghosh S, Rachamalla M, et al. Emergence of taurine as a therapeutic agent for neurological disorders. Neural Regeneration Research. 2024;19(1):62-8.
217. Ommati MM, Rezaei H, Socorro R-M, Tian W, Zhao J, Rouhani A, et al. Pre/postnatal taurine supplementation improves neurodevelopment and brain function in mice offspring: A persistent developmental study from puberty to maturity. Life Sciences. 2024;336:122284.
218. Yang L, Tian J. Changes of intestinal flora in children with febrile seizure. Medicine. 2023;102(20):e33730.
219. Porter DH, Cook RJ, Wagner C. Enzymatic properties of dimethylglycine dehydrogenase and sarcosine dehydrogenase from rat liver. Archives of biochemistry and biophysics. 1985;243(2):396-407.
220. Wittwer A, Wagner C. Identification of the folate-binding proteins of rat liver mitochondria as dimethylglycine dehydrogenase and sarcosine dehydrogenase. Flavoprotein nature and enzymatic properties of the purified proteins. J Biol Chem. 1981;256(8):4109-15.
221. Lee M-Y, Lin Y-R, Tu Y-S, Tseng YJ, Chan M-H, Chen H-H. Effects of sarcosine and N, N-dimethylglycine on NMDA receptor-mediated excitatory field potentials. Journal of Biomedical Science. 2017;24:1-11.
222. Graber CD, Goust JM, Glassman AD, Kendall R, Loadholt CB. Immunomodulating properties of dimethylglycine in humans. Journal of Infectious Diseases. 1981;143(1):101-5.
223. Takahashi T, Sasaki K, Somfai T, Nagai T, Manabe N, Edashige K. N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves in vitro development of bovine embryos. Journal of Reproduction and Development. 2016;62(2):209-12.
224. Wang G, Zhou Y, Huang F-J, Tang H-D, Xu X-H, Liu J-J, et al. Plasma metabolite profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Journal of Proteome Research. 2014;13(5):2649-58.
225. Kharbanda KK. Methionine metabolic pathway in alcoholic liver injury. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. 2013;16(1):89-95.
226. Berger TC, Taubøll E, Heuser K. The potential role of DNA methylation as preventive treatment target of epileptogenesis. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2022;16:931356.
227. Kobow K, Kaspi A, Harikrishnan K, Kiese K, Ziemann M, Khurana I, et al. Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. Acta neuropathologica. 2013;126:741-56.
228. Miller-Delaney SF, Das S, Sano T, Jimenez-Mateos EM, Bryan K, Buckley PG, et al. Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. Journal of Neuroscience. 2012;32(5):1577-88.

229. Upadhyaya S, Banerjee G. Type 2 diabetes and gut microbiome: at the intersection of known and unknown. *Gut microbes*. 2015;6(2):85-92.
230. Proia P, Di Liegro CM, Schiera G, Fricano A, Di Liegro I. Lactate as a metabolite and a regulator in the central nervous system. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(9):1450.
231. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cellular and molecular life sciences*. 2014;71:2577-604.
232. Fei Y, Shi R, Song Z, Wu J. Metabolic control of epilepsy: a promising therapeutic target for epilepsy. *Frontiers in Neurology*. 2020;11:592514.
233. Lee J-Y, Kim Y-H, Koh J-Y. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(20):RC171.
234. Moro N, Ghavim SS, Harris NG, Hovda DA, Sutton RL. Pyruvate treatment attenuates cerebral metabolic depression and neuronal loss after experimental traumatic brain injury. *Brain research*. 2016;1642:270-7.
235. Suh SW, Aoyama K, Matsumori Y, Liu J, Swanson RA. Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment. *Diabetes*. 2005;54(5):1452-8.
236. Boguszewicz Ł, Jamroz E, Ciszek M, Emich-Widera E, Kijonka M, Banasik T, et al. NMR-based metabolomics in pediatric drug resistant epilepsy—preliminary results. *Scientific reports*. 2019;9(1):15035.
237. Wei C, Li Y, Yao H, Liu H, Zhang X, Guo R. A metabonomics study of epilepsy in patients using gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Molecular Biosystems*. 2012;8(8):2197-204.
238. Cavus I, Kasoff WS, Cassaday MP, Jacob R, Gueorguieva R, Sherwin RS, et al. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Annals of neurology*. 2005;57(2):226-35.
239. Chatzikonstantinou A, Ebert AD, Hennerici MG. Cerebrospinal fluid findings after epileptic seizures. *Epileptic Disorders*. 2015;17(4):453-9.
240. Magnusson C, Herlitz J, Höglind R, Wennberg P, Edelvik Tranberg A, Axelsson C, et al. Prehospital lactate levels in blood as a seizure biomarker: a multi- center observational study. *Epilepsia*. 2021;62(2):408-15.
241. Leroy C, Pierre K, Simpson IA, Pellerin L, Vannucci SJ, Nehlig A. Temporal changes in mRNA expression of the brain nutrient transporters in the lithium–pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Neurobiology of disease*. 2011;43(3):588-97.
242. Forero-Quintero LS, Deitmer JW, Becker HM. Reduction of epileptiform activity in ketogenic mice: the role of monocarboxylate transporters. *Scientific Reports*. 2017;7(1):4900.
243. Liu B, Niu L, Shen M-Z, Gao L, Wang C, Li J, et al. Decreased astroglial monocarboxylate transporter 4 expression in temporal lobe epilepsy. *Molecular neurobiology*. 2014;50:327-38.
244. Kambe Y. Recent behavioral findings of pathophysiological involvement of lactate in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2022;1866(7):130137.

245. Muraleedharan R, Gawali MV, Tiwari D, Sukumaran A, Oatman N, Anderson J, et al. AMPK-regulated astrocytic lactate shuttle plays a non-cell-autonomous role in neuronal survival. *Cell reports*. 2020;32(9).
246. Wu H, Huang H, Zhao Y. Interplay between metabolic reprogramming and post-translational modifications: from glycolysis to lactylation. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1211221.
247. Hagihara H, Shoji H, Otabi H, Toyoda A, Katoh K, Namihira M, et al. Protein lactylation induced by neural excitation. *Cell reports*. 2021;37(2).
248. Pan R-Y, He L, Zhang J, Liu X, Liao Y, Gao J, et al. Positive feedback regulation of microglial glucose metabolism by histone H4 lysine 12 lactylation in Alzheimer's disease. *Cell metabolism*. 2022;34(4):634-48. e6.
249. Walker LE, Sills GJ, Jorgensen A, Alapirtti T, Peltola J, Brodie MJ, et al. High-mobility group box 1 as a predictive biomarker for drug-resistant epilepsy: A proof-of-concept study. *Epilepsia*. 2022;63(1):e1-e6.
250. Yang K, Fan M, Wang X, Xu J, Wang Y, Tu F, et al. Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis. *Cell Death Differ*. 2022;29(1):133-46.
251. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2016;1857(8):1086-101.
252. Boylston JA, Sun J, Chen Y, Gucek M, Sack MN, Murphy E. Characterization of the cardiac succinylome and its role in ischemia–reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;88:73-81.
253. Zhang Y, Zhang M, Zhu W, Yu J, Wang Q, Zhang J, et al. Succinate accumulation induces mitochondrial reactive oxygen species generation and promotes status epilepticus in the kainic acid rat model. *Redox Biology*. 2020;28:101365.
254. Hasegawa T, Sumita M, Horitani Y, Tamai R, Tanaka K, Komori M, et al. Gas chromatography-mass spectrometry-based metabolic profiling of cerebrospinal fluid from epileptic dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014;76(4):517-22.
255. Roehrs C, Garrido-Sanabria E, Da Silva A, Faria L, Sinhorin V, Marques R, et al. Succinate increases neuronal post-synaptic excitatory potentials in vitro and induces convulsive behavior through N-methyl-d-aspartate-mediated mechanisms. *Neuroscience*. 2004;125(4):965-71.
256. Tsortouktzidis D, Schulz H, Hamed M, Vatter H, Surges R, Schoch S, et al. Gene expression analysis in epileptic hippocampi reveals a promoter haplotype conferring reduced aldehyde dehydrogenase 5a1 expression and responsiveness. *Epilepsia*. 2021;62(1):e29-e34.
257. Nguyen E, Picklo Sr MJ. Inhibition of succinic semialdehyde dehydrogenase activity by alkenal products of lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2003;1637(1):107-12.
258. Pan JW, Kuzniecky RI. Utility of magnetic resonance spectroscopic imaging for human epilepsy. *Quantitative imaging in medicine and surgery*. 2015;5(2):313.

259. Hara Y, Kume S, Kataoka Y, Watanabe N. Changes in TCA cycle and TCA cycle-related metabolites in plasma upon citric acid administration in rats. *Heliyon*. 2021;7(12).
260. Gray LR, Sultana MR, Rauckhorst AJ, Oonthonpan L, Tompkins SC, Sharma A, et al. Hepatic mitochondrial pyruvate carrier 1 is required for efficient regulation of gluconeogenesis and whole-body glucose homeostasis. *Cell metabolism*. 2015;22(4):669-81.
261. Perry RJ, Camporez J-PG, Kursawe R, Titchenell PM, Zhang D, Perry CJ, et al. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell*. 2015;160(4):745-58.
262. Lalwani AM, Yilmaz A, Bisgin H, Ugur Z, Akyol S, Graham SF. The biochemical profile of post-mortem brain from people who suffered from epilepsy reveals novel insights into the etiopathogenesis of the disease. *Metabolites*. 2020;10(6):261.
263. Moffett JR, Puthillathu N, Vengilote R, Jaworski DM, Namboodiri AM. Acetate revisited: a key biomolecule at the nexus of metabolism, epigenetics, and oncogenesis—part 2: acetate and ACS2 in health and disease. *Frontiers in physiology*. 2020;11:580171.
264. Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I. Urinary biomarkers of oxidative status. *Clinica chimica acta*. 2012;413(19-20):1446-53.
265. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(11):6858-62.
266. Tolun AA, Zhang H, Il'yasova D, Sztáray J, Young SP, Millington DS. Allantoin in human urine quantified by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 2010;402(2):191-3.
267. Ahn YJ, Park SJ, Woo H, Lee HE, Kim HJ, Kwon G, et al. Effects of allantoin on cognitive function and hippocampal neurogenesis. *Food and chemical toxicology*. 2014;64:210-6.
268. Florentino IF, Silva DP, Galdino PM, Lino RC, Martins JL, Silva DM, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2016;186:298-304.
269. Farsani ME, Shahmir AH, Seyedebrahimi R, Ababzadeh S, Moslehi A, Tafaraji J. Protective Effects of Allantoin on Neural Cells of Hippocampal Region and Cognitive Function in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. 2024.
270. Kim IS, Jo E-K. Inosine: a bioactive metabolite with multimodal actions in human diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1043970.
271. Nascimento FP, Macedo-Júnior SJ, Lapa-Costa FR, Cezar-Dos-Santos F, Santos ARS. Inosine as a Tool to Understand and Treat Central Nervous System Disorders: A Neglected Actor? *Front Neurosci*. 2021;15:703783.
272. Schwarzschild MA, Ascherio A, Beal MF, Cudkovicz ME, Curhan GC, Hare JM, et al. Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol*. 2014;71(2):141-50.

273. Brown EM, Arellano-Santoyo H, Temple ER, Costliow ZA, Pichaud M, Hall AB, et al. Gut microbiome ADP-ribosyltransferases are widespread phage-encoded fitness factors. *Cell host & microbe*. 2021;29(9):1351-65. e11.
274. Wang T, Gnanaprakasam JR, Chen X, Kang S, Xu X, Sun H, et al. Inosine is an alternative carbon source for CD8⁺-T-cell function under glucose restriction. *Nature metabolism*. 2020;2(7):635-47.
275. Mukherjee PK. *Quality control and evaluation of herbal drugs: Evaluating natural products and traditional medicine*: Elsevier; 2019.
276. Valada P, Alçada-Morais S, Cunha RA, Lopes JP. Thebromine targets adenosine receptors to control hippocampal neuronal function and damage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(18):10510.
277. Bhat JA, Gupta S, Kumar M. Neuroprotective effects of theobromine in transient global cerebral ischemia-reperfusion rat model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021;571:74-80.
278. Gao L, Ge W, Peng C, Guo J, Chen N, He L. Association between dietary theobromine and cognitive function in a representative American population: A cross-sectional study. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 2022;9(3):449-57.
279. Malla B, Cotten S, Ulshoefer R, Paul F, Hauser AE, Niesner R, et al. Teriflunomide preserves peripheral nerve mitochondria from oxidative stress-mediated alterations. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2020;11:2040622320944773.
280. Malla B, Liotta A, Bros H, Ulshöfer R, Paul F, Hauser AE, et al. Teriflunomide preserves neuronal activity and protects mitochondria in brain slices exposed to oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(3):1538.
281. Löffler M, Carrey E, Zameitat E. Orotate (orotic acid): An essential and versatile molecule. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2016;35(10-12):566-77.
282. Mangione R, Giallongo C, Duminuco A, La Spina E, Longhitano L, Giallongo S, et al. Targeted Metabolomics Highlights Dramatic Antioxidant Depletion, Increased Oxidative/Nitrosative Stress and Altered Purine and Pyrimidine Concentrations in Serum of Primary Myelofibrosis Patients. *Antioxidants*. 2024;13(4):490.
283. Jarrett SG, Liang L-P, Hellier JL, Staley KJ, Patel M. Mitochondrial DNA damage and impaired base excision repair during epileptogenesis. *Neurobiology of disease*. 2008;30(1):130-8.
284. Griffin JL, Bonney SA, Mann C, Hebbachi AM, Gibbons GF, Nicholson JK, et al. An integrated reverse functional genomic and metabolic approach to understanding orotic acid-induced fatty liver. *Physiological Genomics*. 2004;17(2):140-9.
285. Jung E-J, Kwon S-W, Jung B-H, Oh S-H, Lee B-H. Role of the AMPK/SREBP-1 pathway in the development of orotic acid-induced fatty liver. *Journal of lipid research*. 2011;52(9):1617-25.
286. Wang Y-M, Hu X-Q, Xue Y, Li Z-J, Yanagita T, Xue C-H. Study on possible mechanism of orotic acid-induced fatty liver in rats. *Nutrition*. 2011;27(5):571-5.

287. Basbous J, Aze A, Chaloin L, Lebdy R, Hodroj D, Ribeyre C, et al. Dihydropyrimidinase protects from DNA replication stress caused by cytotoxic metabolites. *Nucleic acids research*. 2020;48(4):1886-904.
288. Assmann B, Hoffmann G, Wagner L, Bräutigam C, Seyberth H, Duran M, et al. Dihydropyrimidinase deficiency and congenital microvillous atrophy: Coincidence or genetic relation? *Journal of inherited metabolic disease*. 1997;20:681-8.
289. Duran M, Rovers P, De Bree P, Schreuder C, Beukenhorst H, Dorland L, et al. Dihydropyrimidinuria. *The Lancet*. 1990;336(8718):817-8.
290. Duran M, Rovers P, De Bree P, Schreuder C, Beukenhorst H, Dorland L, et al. Dihydropyrimidinuria: a new inborn error of pyrimidine metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*. 1991;14:367-70.
291. Hamajima N, Kouwaki M, Vreken P, Matsuda K, Sumi S, Imaeda M, et al. Dihydropyrimidinase deficiency: structural organization, chromosomal localization, and mutation analysis of the human dihydropyrimidinase gene. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;63(3):717-26.
292. Henderson M, Ward K, Simmonds H, Duley J, Davies P. Dihydropyrimidinase deficiency presenting in infancy with severe developmental delay. *Journal of inherited metabolic disease*. 1993;16(3):574-6.
293. Ohba S, Kidouchi K, Sumi S, Imaeda M, Takeda N, Yoshizumi H, et al. Dihydropyrimidinuria: the first case in Japan. *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VIII*. 1994:383-6.
294. Putman C, Rotteveel J, Wevers R, Van Gennip A, Bakkeren J, De Abreu R. Dihydropyrimidinase deficiency, a progressive neurological disorder? *Neuropediatrics*. 1997;28(02):106-10.
295. Sumi S, Kidouchi K, Hayashi K, Ohba S, Wada Y. Dihydropyrimidinuria without clinical symptoms. *Journal of inherited metabolic disease*. 1996;19:701-2.
296. Dihydropyrimidinuria [Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/38874>].
297. Shekh-Ahmad T, Kovac S, Abramov A, Walker M. Reactive oxygen species in status epilepticus. *Epilepsy & behavior*. 2019;101:106410.
298. He S, Jiang H, Zhuo C, Jiang W. Trimethylamine/trimethylamine-N-oxide as a key between diet and cardiovascular diseases. *Cardiovascular Toxicology*. 2021;21(8):593-604.
299. McConnell H, Mitchell S, Smith R, Brewster M. Trimethylaminuria associated with seizures and behavioural disturbance: a case report. *Seizure*. 1997;6(4):317-21.
300. Pellicciari A, Posar A, Cremonini MA, Parmeggiani A. Epilepsy and trimethylaminuria: a new case report and literature review. *Brain and Development*. 2011;33(7):593-6.
301. Gajda Z, Gyengési E, Hermes E, Ali KS, Sente M. Involvement of gap junctions in the manifestation and control of the duration of seizures in rats in vivo. *Epilepsia*. 2003;44(12):1596-600.
302. Leniger T, Thöne J, Bonnet U, Hufnagel A, Bingmann D, Wiemann M. Levetiracetam inhibits Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange of adult hippocampal CA3 neurons from guinea-pigs. *British journal of pharmacology*. 2004;142(7):1073.

303. Lin P, Lin A, Tao K, Yang M, Ye Q, Chen H, et al. Intestinal *Klebsiella pneumoniae* infection enhances susceptibility to epileptic seizure which can be reduced by microglia activation. *Cell Death Discovery*. 2021;7(1):175.
304. Lee K, Kim N, Shim JO, Kim G-H. Gut bacterial dysbiosis in children with intractable epilepsy. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;10(1):5.
305. Hoyles L, Pontifex MG, Rodriguez-Ramiro I, Anis-Alavi MA, Jelane KS, Snelling T, et al. Regulation of blood–brain barrier integrity by microbiome-associated methylamines and cognition by trimethylamine N-oxide. *Microbiome*. 2021;9:1-21.
306. Liu Y, Yan H, Yu B, He J, Mao X, Yu J, et al. Protective effects of natural antioxidants on inflammatory bowel disease: thymol and its pharmacological properties. *Antioxidants*. 2022;11(10):1947.
307. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi- Rad M, Contreras MdM, Segura- Carretero A, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy research*. 2018;32(9):1688-706.
308. Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo- oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British journal of pharmacology*. 2003;140(8):1363-72.
309. Nesterkina M, Kravchenko I. Synthesis and pharmacological properties of novel esters based on monocyclic terpenes and GABA. *Pharmaceuticals*. 2016;9(2):32.
310. Saila MH, Ch MD, Thakur S. Neuroprotective Outcome of Thymol against Global Cerebral Ischemia Reperfusion injury in Albino Rats. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(38A):38-48.
311. Hakuno D, Hamba Y, Toya T, Adachi T. Plasma amino acid profiling identifies specific amino acid associations with cardiovascular function in patients with systolic heart failure. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117325.
312. Moro J, Tomé D, Schmidely P, Demersay T-C, Azzout-Marniche D. Histidine: A systematic review on metabolism and physiological effects in human and different animal species. *Nutrients*. 2020;12(5):1414.
313. Aranibar N, Vassallo JD, Rathmacher J, Stryker S, Zhang Y, Dai J, et al. Identification of 1-and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by nuclear magnetic resonance-based metabolic profiling. *Analytical biochemistry*. 2011;410(1):84-91.
314. Kochlik B, Gerbracht C, Grune T, Weber D. The influence of dietary habits and meat consumption on plasma 3- methylhistidine—a potential marker for muscle protein turnover. *Molecular nutrition & food research*. 2018;62(9):1701062.
315. Hu Z, Fan S, Liu M, Zhong J, Cao D, Zheng P, et al. Objective diagnosis of post-stroke depression using NMR-based plasma metabolomics. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2019;867-81.
316. Manandhar M, Cronan JE. Pimelic acid, the first precursor of the *B acillus subtilis* biotin synthesis pathway, exists as the free acid and is assembled by fatty acid synthesis. *Molecular microbiology*. 2017;104(4):595-607.

317. Wang X, Yang S, Yang G, Lin J, Zhao P, Ding J, et al. Novel risk score model for non-proliferative diabetic retinopathy based on untargeted metabolomics of venous blood. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1180415.
318. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*. 2010;88(1):23-45.
319. Fukuyama K, Okada M. Effects of levetiracetam on astroglial release of kynurenine- pathway metabolites. *British journal of pharmacology*. 2018;175(22):4253-65.



8 EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı



EK 1. Etik Kurul Onayı (devam)



9 ÖZGEÇMİŞ



