

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
NÖROBİLİM ANABİLİM DALI**

**PENTİLENTETRAZOL İLE İNDÜKLENEN KINDLING
MODELİNDE VALPROİK ASİTİN SİTOKROM P450
ENZİM SİSTEMİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Ufuk YÜKSEL**

**Danışman
Prof. Dr. Füsun Ferda ERDOĞAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2023
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
NÖROBİLİM ANABİLİM DALI**

**PENTİLENTETRAZOL İLE İNDÜKLENEN KİNDLİNG
MODELİNDE VALPROİK ASİTİN SİTOKROM P450
ENZİM SİSTEMİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Ufuk YÜKSEL**

**Danışman
Prof. Dr. Füsun Ferda ERDOĞAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2022-11683 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2023
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Ufuk YÜKSEL

İmza:



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Pentilentetrazol ile İndüklenen Kindling Modelinde Valproik Asitin Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Ufuk YÜKSEL

Danışman

Prof. Dr. Füsun Ferda ERDOĞAN

Nörobilim Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Füsun Ferda ERDOĞAN

İmza

Prof. Dr. Füsün Ferda ERDOĞAN ve Dr. Ayça LEKESİZCAN danışmanlığında **Ufuk YÜKSEL** tarafından hazırlanan “**Pentilentetrazol ile İndüklenen Kindling Modelinde Valproik Asitin Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü **Nörobilim Anabilim Dalında Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2023

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. Füsün Ferda ERDOĞAN

Üye : Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

Üye : Doç. Dr. Sabiha Zeynep AYDENK KÖSEOĞLU

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresince desteğini, kendi bilgi ve birikimini her zaman sabırla ve güleryüzü ile paylaşan her zaman iyiki dememe sebep olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Füsün Ferda ERDOĞAN'a,

Deneysel süreçler ve laboratuvar çalışmalarındaki bilgi ve yardımlarından ötürü Öğr. Gör. Dr. Ayça LEKESİZCAN'a,

Tüm deneysel süreçte yapılan çalışmalarda emeği bulunan güleryüzü ile bizlere örnek olan Uzm. Diyetisyen Ravza TOSUNBAYRAKTAR'a,

Yüksek lisans boyunca geçmiş tecrübelerinden yararlandığım önceki dönem mezunlarımızdan Gıda Yüksek Mühendisi Sadice SARIÇİÇEK'e,

Tez çalışmalarımızın konuları itibariyle ortak yönlerinin bulunması nedeniyle özellikle deneysel süreçler başta olmak üzere bazı konularda bereber çalıştığım azmi ve hırsıyla kendisine hayran bırakan çalışma arkadaşım Ruveyda AKMEŞE'ye,

Güleryüzü ve yardım sever yaklaşımlarından ötürü Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi yönetimi ve personeline,

Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi yönetimi ve personeline,

Çalışmalarımı düzenli ve eksiksiz şekilde yapabilmem için elinden geleni yapan erciyes üniversitesi hastanesi gastroentroloji servis sorumlusu Meral YÜKSEL'e ve ekip arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimim süresince varlıkları ile bana güç veren, desteklerini esirgemeyen aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

**PENTİLENTETRAZOL İLE İNDÜKLENEN KINDLING MODELİNDE
VALPROİK ASİTİN SİTOKROM P450 ENZİM SİSTEMİ VE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ufuk YÜKSEL

Erciyes Üniversitesi, Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü

Nörobilim Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

Yüksek Lisans Tezi, TEMMUZ 2023

Danışman: Prof. Dr. Füsün Ferda ERDOĞAN

İkinci Danışman Öğr. Gör. Dr. Ayça LEKESİZCAN

ÖZET

Amaç: Bu çalışmadaki amacımız beyindeki Sitokrom P450 (CYP450) enzim sistemini daha iyi anlamak, epilepside valproik asit (VPA) ve sodyum fenilbütirat (4-PBA) kullanımının bu enzim sistemi üzerindeki etkinliğini ve ER stresi ile olan ilişkisini belirlemek ve 78-kDa glikozla düzenlenen protein (GRP78), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), memeli rapamisin hedefi (mTOR), nükleer factor kappa B (NFkB), DNA hasarına neden olan transkript 3 (CHOP), lösin açısından zengin glioma-inaktif 1 (LGI1) gibi genlerin sentezleri üzerine etkilerini belirleyerek kısıtlı olan literatüre katkı sağlamaktır.

Gereç ve yöntem: Çalışmamızda 56 adet dişi 8 haftalık BALB/c cinsi fare kullanıldı. Epilepsi kindling modeli oluşturmak için gün aşırı 14 enjeksiyon yapıldı. 14. son enjeksiyondan on gün sonra tek bir enjeksiyon daha olacak şekilde toplam 15 enjeksiyon yapılmıştır. Fareler Kontrol, 4PBA+PTZ, PTZ+VPA, VPA+PTZ, PTZ, 4PBA, VPA olarak yedi gruba ayrıldı ve PTZ enjeksiyonu ile eş zamanlı VPA ve 4PBA enjeksiyonları yapıldı. Enjeksiyonlardan sonra açık alan ve yüzmeye zorlama davranış testleri uygulandı ve beyin dokularında CYP450, CYP219, CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, LGI1, GRP78, CHOP, NFkB, KASPAZ3, BDNF ve mTOR proteinlerin ekspresyonu için Western blot ve immünohistokimyasal analizler yapıldı.

Bulgular: Yüzmeye zorlama davranış testinde kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. İmmünohistokimyasal protein analizlerinde BDNF, GRP78, KASPAZ3, NFkB, CYP450, CYP3A4 ve mTOR proteinleri beyinde gruplar arası anlamlı sonuçlar vermiştir. CHOP, LGI1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ise gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir.

Sonuç: Sonuç olarak bu çalışmada yüzmeye zorlama davranış testi sonucunda tüm gruplarda kontrol grubuna göre depresyon, korku benzeri davranışlar gözlemledik. CYP450, CYP2C19, CYP3A4 ve CYP1A1-2 ekspresyonu incelendiğinde karaciğerde yapılan bazı çalışmalara göre beyinde istatistiksel olarak anlamlı bir inhibasyon olmamış olup VPA'nın bu CYP proteinlerin zayıf inhibitörü olduğu ve bu yüzden anlamlı etkileşimler oluşturması beklenmeyen çalışmaları desteklemektedir. 4-PBA+PTZ grubunun GRP78 protein immünreaktivitesinde en az aktif gruplardan biri olması 4-PBA ile ER stresin inhibe edilebildiğini göstermiştir. PTZ grubunda nöronları koruyucu işlevi olan BDNF ve hücre sağkalımı için etkili olan mTOR ekspresyonunun minimal olması epilepside nöronal sağkalımın olumsuz etkilendiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: BDNF, Epilepsi, ER Stresi, Sitokrom P450, Valproik asit

**IN THE KINDLING MODEL INDUCED WITH PENTYLENTETRAZOL
INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VALPROIC ACID ON STRESS OF
THE CYTOCHROM P450 ENZYME SYSTEM AND ENDOPLASMIC
RETICULUM**

Ufuk YÜKSEL

**Erciyes University, Gevher Nesibe Genome and Stem Cell Institute
Neuroscience Master's Program**

Master Thesis, JULY 2023

Advisor: Prof. Dr. Füsun Ferda ERDOGAN

Second Advisor Lect. Sec. Dr. Ayça LEKESIZCAN

ABSTRACT

Aim: Our aim in this study is to better understand the Cytochrome P450 (CYP450) enzyme system in the brain, to determine the effectiveness of the use of valproic acid (VPA) and sodium phenylbutyrate (4-PBA) in epilepsy on this enzyme system and its relationship with ER stress, and to determine the 78-kDa glucose regulated protein (On the synthesis of genes such as GRP78), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), mammalian target of rapamycin (mTOR), nuclear factor kappa B (NFkB), DNA-damaging transcript 3 (CHOP), leucine-rich glioma-inactivated 1 (LGI1). To contribute to the limited literature by determining the effects of

Material and Method: In our study, 56 female 8-week-old BALB/c mice were used. To create an epilepsy kindling model, 14 injections were made every other day. A total of 15 injections were given, with a single injection ten days after the 14th last injection. Mice were divided into seven groups as Control, 4PBA+PTZ, PTZ+VPA, VPA+PTZ, PTZ, 4PBA, VPA, and simultaneous VPA and 4PBA injections were given with PTZ injection. After injections, open field and forced swim behavior tests were performed and Western blot and immunohistochemical analyzes were performed for the expression of CYP450, CYP219, CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, LGI1, GRP78, CHOP, NFkB, KASPAZ3, BDNF and mTOR proteins in brain tissues.

Results: There are significant differences between the control group and the other groups in the forced swimming behavior test. In immunohistochemical protein analysis, BDNF, GRP78, KASPAZ3, NFkB, CYP450, CYP3A4 and mTOR proteins gave significant results between groups in the brain. Expression levels of CHOP and LGI1 proteins did not differ significantly between groups.

Conclusion: As a result, in our study, we observed depression and fear-like behaviors in all groups as a result of the force-swimming behavior test compared to the control group. When the expression of CYP450, CYP2C19, CYP3A4 and CYP1A1-2 was examined, there was no statistically significant inhibition in the brain according to some studies performed in the liver, and this supports the studies that VPA is a weak inhibitor of these CYP proteins and therefore no significant interactions are expected. The fact that the 4-PBA+PTZ group was one of the least active groups in GRP78 protein immunoreactivity showed that ER stress could be inhibited by 4-PBA. The minimal expression of BDNF, which has a protective function on neurons, and mTOR, which is effective for cell survival in the PTZ group, indicates that neuronal survival is adversely affected in epilepsy.

Keywords: BDNF, Cytochrome P450, Epilepsy, ER Stress, Valproic acid

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.EPİLEPSİ	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Tanım ve Epidemiyoloji	6
2.1.3. Etiyoloji	6
2.1.3.1. Yapısal	7
2.1.3.2. Genetik.....	7
2.1.3.3. Metabolik.....	7
2.1.3.4. Bağışıklık.....	8
2.1.3.5. Enfeksiyöz	8
2.1.3.6. İdiyopatik.....	8
2.1.4. Tanı.....	8
2.1.5. Sınıflandırma	9
2.1.6. Epilepsi ve Nöbet Oluşum Mekanizmaları.....	11
2.2. EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE ANTİEPİLEPTİK İLAÇLAR.....	14
2.2.1. Antiepileptik İlaçların Sınıflandırılması.....	14
2.2.2. Antiepileptik İlaçların Farmakokinetiği	15
2.2.3. Antiepileptik İlaçların Etki Mekanizmaları.....	17

2.2.4. Valproik asit	17
2.3. EPİLEPSİ ve ER STRESİ	21
2.3.1. PERK Yolu	24
2.3.2. IRE1 Yolu	25
2.3.3. ATF6 Yolu	25
2.3.4. Sitokrom P450	26
2.3.4.1. Sitokrom P450'lerin Genel Özellikleri	27
2.3.4.2. CYP1 Ailesi	28
2.3.4.3. CYP2 Ailesi	29
2.3.4.4. CYP3 Ailesi	29
2.3.5. Epilepsi ve LGI1	30
2.3.6. Epilepsi ve BDNF	31
2.3.6.1. BDNF İletimi	31
2.3.7. 4-Fenilbütirik Asit (4-PBA)	32
2.4. DENEYSEL EPİLEPSİ MODELLERİ	33
2.4.1. Kindling (tutuşma) Modeli	35
2.4.1.1. PTZ Kindling Modeli	35
2.5. EPİLEPSİ VE DAVRANIŞ TESTLERİ	36
2.5.1. Açık Alan Testi	36
2.5.2. Yüzmeye Zorlama Testi	36
3. GEREÇ-YÖNTEM	38
3.1. GEREÇLER	38
3.1.1. Demirbaş Malzemeler Aletler	38
3.1.2. Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler	39
3.2. DENEY HAYVANLARI	39
3.3. ÇALIŞMA TASARIMI	39
3.3.1. Çözeltilerin Hazırlanması ve Enjeksiyonu	41
3.3.1.1. PTZ	41
3.3.1.2. 4-PBA	41
3.3.1.3. VPA	41
3.4. DAVRANIŞ TESTLERİ	42
3.4.1. Açık Alan Testi	42

3.4.2. Yüzmeye Zorlama Testi	43
3.5. PROTEİN ANALİZLERİ	43
3.5.1. Western Blot	43
3.5.2. İmmunohistokimya	44
3.6. VERİ ANALİZİ VE İSTATİSTİKLER	45
4. BULGULAR	46
4.1. Deney Hayvanlarında Ağırlık Değişimi	46
4.2. Deney Hayvanlarında Nöbet Takibi	46
4.3. Açık Alan Testi Verileri ve Gruplar Arası Karşılaştırmaları	47
4.4. Yüzmeye Zorlama Testi Verileri ve Gruplar Arası Karşılaştırmaları	48
4.5. Western Blot Protein Analiz Verileri ve İstatistikleri	49
4.6. İmmünohistokimyasal Boyama ve Protein Analiz Verileri	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
6.KAYNAKLAR	60
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

4-PBA	: 4-Fenilbütirik Asit
ADAM22	: Metalopeptidaz alanı 22
AEİ	: Antiepileptik ilaç
AMPA	: a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
ASK1	: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1
ATF4	: Transkripsiyon faktörü 4
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CHOP	: DNA hasarına neden olan transkript 3
CYP450	: Sitokrom P450
EEG	: Elektroensefalografi
eIF2a	: Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: ER ile ilişkili bozunma
ERSE	: ER stres yanıt elemanı
GABA	: γ - aminobütirik asid
GLS	: Golgi yerelleştirme dizisi
GRP8	: 78-kDa glikozla düzenlenen protein
IKK	: I κ Ba Kinaz
ILAE	: Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği
IRE1	: İnositol gerektiren enzim 1
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
LGI1	: Lösin açısından zengin glioma-inaktive 1
MÖ	: Milattan önce

MSS	: Merkezi sinir sistemi
mTOR	: Memeli rapamisin hedefi
NF-kB	: Nükleer factor kappa B
NMDA	: N-metil-D-aspartat
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
p75 NTR	: p75 nörotrofin reseptörü
PERK	: Protein kinaz R benzeri ER kinaz
PHT	: Fenitoin
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PKB	: Protein kinaz B (Akt)
PTZ	: Pentilentetrazol
PXR	: Pregnan X reseptörü
RIDD	: IRE1'e bağlı bozunma
RNaz	: Endoribonükleaz
S1P	: bölge-1 proteaz
S2P	: bölge-2 proteaz
TRAF2	: Tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2
TrkB	: Tropomiyosin reseptör kinaz B
UPR	: Katlanmamış protein tepkisinin
XBP1	: X-box bağlayıcı protein 1

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Epilepsi genlerinin fonksiyonel kategorileri.....	13
Tablo 2.2.	Nöbet Önleyici İlaçların Farmakokinetik Profilleri.....	16
Tablo 2.3.	Antiepileptik ilaçların etki mekanizması	17
Tablo 2.4.	Deneyisel Epilepsi Hayvan Modelleri Ve Modelin Oluşturulmasında Kullanılan Yöntem Veya Etken Maddeler	34
Tablo 3.1.	Deney Grupları	40
Tablo 3.3.	İmmünohistokimyasal Boyama Tekniği	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Aziz Severin bir kadını 'düşen hastalık iblisinden' kurtarıyor	4
Şekil 2.2.	Sakikku adlı eski Babil tanrı kılavuzunu oluşturan 40 tabletlik bir dizinin 26. tableti	5
Şekil 2.3.	Epilepsi Etiyolojisi	7
Şekil 2.4.	ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması basit sürüm	10
Şekil 2.5.	ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması genişletilmiş sürüm	11
Şekil 2.7.	Valproik asit farmakokinetiğinde yer alan aday genlerin grafik gösterimi.	19
Şekil 2.8.	(VPA) farmakodinamiğinde yer alan aday genlerin grafik gösterimi.	20
Şekil 2.9.	Epileptogenez ER stres süreci.....	22
Şekil 2.10.	UPR sinyalleme dalları	23
Şekil 2.11.	Beynin çeşitli bölümlerindeki sitokrom P450 ekspresyonları	28
Şekil 2.12.	BDNF sinyal yolları.....	32
Şekil 3.1.	Açık Alan Testi	42
Şekil 3.2.	Yüzmeye Zorlama Testi.....	43
Şekil 4.1.	Gruplar arası ağırlık artış farkı.....	46
Şekil 4.2.	Açık alan testi. a) Farelerin merkezde bulunma süresi, b) Farelerin şahlanma sayısı, c) Farelerin dışkı sayısı, d) Farelerin geçtiği kare sayısı	47
Şekil 4.3.	Yüzmeye zorlama testi a) Aktif yüzmeye b) Mücadele c) Hareketsiz kalma.....	48
Şekil 4.4.	Western blot protein analizi. CHOP, pmTOR ve LGI1 proteinlerinin analizi için Western blot tekniği kullanılmıştır.....	49
Şekil 4.5.	Hematoksilen Eozin boyaması.....	49
Şekil 4.6.	BDNF, GRP78, KASPAZ3 proteinlerinin immünohistokimyasal boyaması	50
Şekil 4.7.	CYP3A4, CYP2C19, NFKB proteinlerinin immünohistokimyasal boyaması	51

- Şekil 4.8.** İmmünohistokimya BDNF, GRP78, KASPAZ3, NFKB, protein analizi a) BDNF b) GRP78 c) KASPAZ3 d) NFKP immünreaktivite grafikleri grafikleri *: $p<0.05$, **: $p<0.005$, ***: $p<0,0005$, ****: $p<0,0001$53
- Şekil 4.9.** İmmünohistokimya CYP450, CYP3A4, CYP2C19, CYP1A1-2, protein analizi e) CYP450 f) CYP3A4 g) CYP2C19 h) CYP1A1-2 immünreaktivite grafikleri *: $p<0.05$, **: $p<0.005$, ***: $p<0,0005$, ****: $p<0,0001$ 54



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi hastalığının varlığı insanlık tarihi kadar eskidir. Epileptik bir nöbetten ilk defa Mezopotamya bölgesinde milattan önce (MÖ) 2000 tarihli Akad dilinde yazılmış bir metinde görülmüştür. Eski mısır, babil ve antik yunan metinlerinde epilepsiden bahsedilmiştir (Magiorkinis ve ark., 2010).

Epilepsi tanım olarak beyindeki anormal aşırı veya senkronize nöronal aktiviteye bağlı olarak belirti ve/veya semptomların geçici olarak ortaya çıkması şeklinde tanımlanmaktadır (Fisher ve ark., 2005). Epilepsi tanısı için 24 saat arayla en az iki tane tetiklenmemiş nöbet geçirmiş olması gerekmektedir (Fisher ve ark., 2005). Epilepsi en yaygın nörolojik hastalıklardan biridir ve her yaştan, ırktan, sosyal sınıftan ve coğrafi bölgeden insanı etkiler. Epilepsi hastalığı her yaş gruplarında görülebilmektedir. Epilepsinin yıllık insidansı, yani her sene ilk defa görülen kişi sayısı 40-60/100.000'dir. ABD ve Avrupa'daki araştırmaların çoğu 45-55/100.000 oranında insidans olduğunu bildirmektedir. Ayrıca bu oranlar yaş gruplarına göre değişiklik göstermektedir. Küçük çocuklar, özellikle ilk bir yaş içerisinde ve 65 yaş üstü yaşlı insanlarda epilepsi riski daha yüksektir (Forsgren ve ark., 2018).

Tedavide antiepileptik ilaçlar çok önemlidir. Nöbet oluşumunu engelleyen ilaçlar 4 sınıfa ayrılır. 1) Voltaj kapılı sodyum, potasyum ve kalsiyum kanallarının modülasyonu 2)) γ - aminobütirik asid (GABA) aracılı inhibitör nörotransmisyonun çoğaltılması 3) Glutamat aracılı uyarıcı nörotransmisyonun zayıflaması 4) Presinaptik etkilerle nörotransmitter salınımının düzenlenmesi (Sills ve Rogawski, 2020).

Antiepileptik ilaçlar (AEİ) birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılmaktadır. Valproik asitte (VPA) birinci nesil antiepileptik ajan olup 1960 yılında kullanıma sunulmuştur.

Valproik asit, doğal olarak valerik asitten türetilen dallı kısa zincirli bir yağ asididir. VPA öncelikle epilepsi ve nöbetleri tedavi etmek için kullanılır, ancak aynı zamanda migren, bipolar bozukluk, ruh hali değişimleri, kaygı ve psikiyatrik bozukluklar için de kullanılır. Son araştırmalar, bir histon deasetilaz inhibitörü olarak etkisi nedeniyle kanser, HIV tedavisi ve nörodejeneratif hastalıklarda adjuvan olarak kullanımını araştırmıştır. (Puranik ve ark., 2013). Valproik asitin etki mekanizmasıyla ilgili hala bilinmezlikler mevcuttur (Davies, 1995).

Valproik asitin bilinen etki mekanizması sadece tek bir eylem üzerinden değil birden fazla eylem üzerinden gerçekleşir. Kalsiyum ve sodyum kanalları üzerindeki etkilerine ek olarak valproat, potasyum kanallarının voltaja bağlı geçirgenliğini artırabilir ve hiperpolarizasyona neden olabilir (Hakami, 2021).

Valproat şu anda yetişkinlerde ve çocuklarda hem jeneralize hem de parsiyel nöbetlerin tedavisinde etkinliği olan başlıca antiepileptik ilaçlardan biridir (Löscher, 1999).

Valproat, tüm bu etkilerinin yanı sıra birçok antiepileptik ilaç gibi sitokrom P450 (CYP450) enzimleriyle de yakından ilişkilidir. Buna rağmen Valproatın CYP izoformlarının in vitro aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisine ilişkin yalnızca sınırlı sayıda çalışma yayınlanmıştır (Wen ve ark., 2001).

Valproik asitin farmakokinetiğinde CYP2A6, CYP2B6 ve CYP2C9 genleri üzerine etkileri kanıtlanmıştır. (Puranik ve ark., 2013).

Sitokrom P450 (CYP450) enzimleri olarak bilinen hemoproteinleri içeren eşsiz savunma sistemleri 1960'lerden beri bilinmektedir. Sitokrom P450'ler, hayvanlar, böcekler, bitkiler, mantarlar, protistler, bakteriler, arkeler ve virüsler dahil olmak üzere yaşamın tüm alanlarında her yerde bulunan bir enzim ailesidir. Bugüne kadar, çeşitli önemli fizyolojik rollere sahip 52.675'in üzerinde CYP dizisi belgelenmiştir (Kuban ve Daniel, 2021).

Epilepsi gelişiminin kesin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Son yıllarda, bir dizi çalışma, endoplazmik retikulumda (ER) stresinin ve apoptozun, epilepsi ile ilişkili nörofizyolojik mekanizmalarda önemli roller oynadığını göstermiştir.

Endoplazmik retikulum lümeninde proteinlerin katlamaması ya da yanlış kanlanmış olması sonucunda proteinlerin birikmesi ve metabolik bozukluklar, nöbetler, hücre içi

kalsiyum düzensizliği, oksidatif stres ve ER homeostazını etkileyen diğer bozukluklar gibi patolojik stresler ER stresine yol açabilir. Glikozla düzenlenen protein 78 (GRP78) ve C/-EBP homolog proteini (CHOP), ökaryotik hücrelerde ER stresi oluştuğunda ER stres belirteçleridir. GRP78 ve CHOP dengesi, ER stresinden sonra hücre kaderini etkiler. Kimyasal bir şaperon 4-Fenilbütirik Asit (4-PBA) ile kombinasyon halinde antiepileptik ilaç VPA ile tedavinin antikonvülsan ve nöroprotektif etkiler oluşturup oluşturmadığını değerlendirmek için hiçbir çalışma yapılmamıştır (Rzayev ve ark., 2022).

Vücutta fazla biriken diğer proteinler gibi fazla CYP450 proteinleri de ER strese neden olur. (Tatar ve Tatar, 2019). Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), beyin ve vücutta bol miktarda bulunur ve nöroprotektif işlevlere sahiptir. Epilepsi ile ilişkisinin nasıl geliştiğine dair bilgiler günümüzde çok sınırlıdır (Lin ve ark., 2020).

Bu çalışmadaki amacımız beyindeki CYP450 enzim sistemini daha iyi anlamak, epilepsinin ve Valproik asitin kullanımının bu enzim sistemi üzerindeki etkinliğini ve GRP78, CHOP, LGI1 gibi proteinler eşliğinde ER stresi ile olan ilişkisini belirlemek, tüm bu süreçte beyindeki BDNF sinyalinin rolünü tesbit edip kısıtlı olan literatüre katkı sağlamaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. EPİLEPSİ

2.1.1. Tarihçe

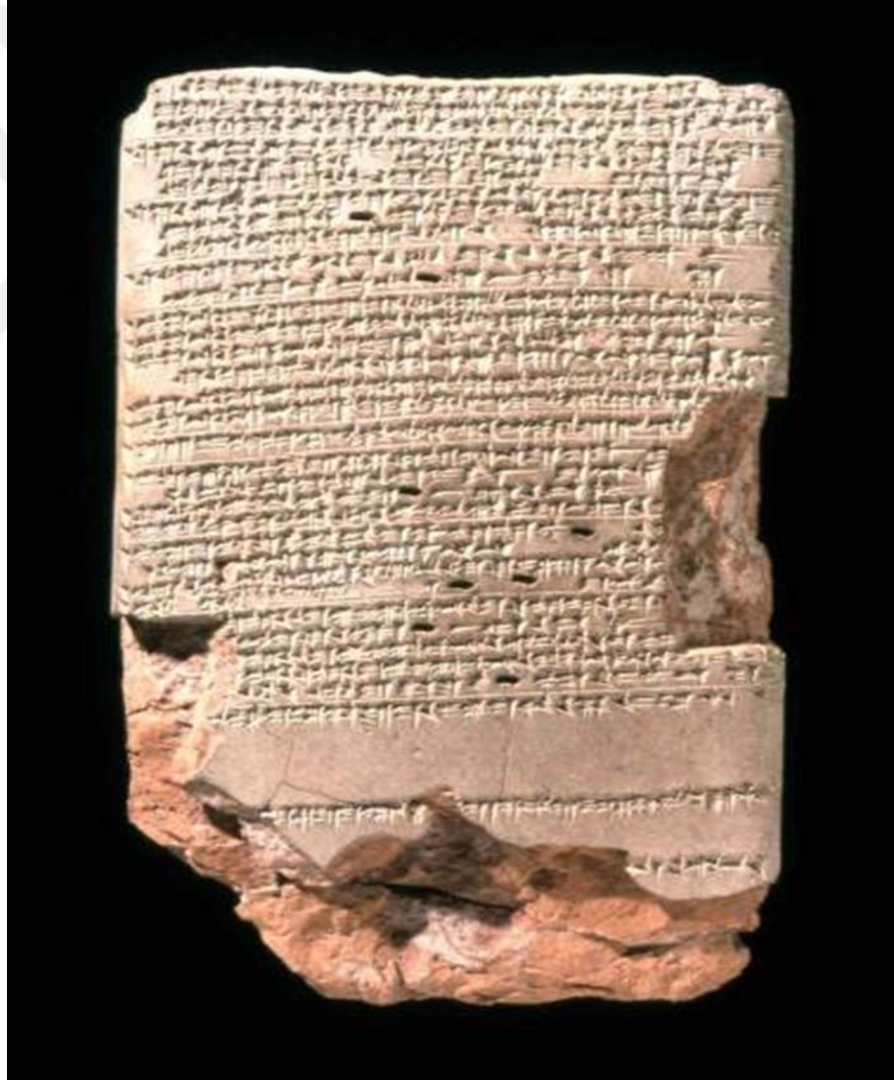
Epilepsinin klinik tablosu insanlık kadar eskidir. Epileptik nöbetlerin ilk tanımı, MÖ 2000'den kalma bir metinde yer almaktadır. Mezopotamya'da konuşulan Akad dilinde yazılmıştır. Epilepsi kelimesi Yunanca "ele geçirmek, sahip olmak, eziyet etmek" anlamına gelen epilambanein fiilinden gelir. Yıllar boyunca çeşitli yazarlar bu duruma birçok isim verdiler: Seliniasmos, ilahi hastalık, Herkül hastalığı (çünkü yarı tanrı Herkül'ü etkiledi) ve Satanizm. Bu dönemlerde cin kovucular epileptik semptomları olan bir hastayı “antasubbû” olarak teşhis etti (Magiarkinis ve ark., 2010). Tarihin çoğu için, nöbetlerin bedeni istila eden, şeytan çıkarma ve diğer dini ve manevi tedavileri gerektiren kötü ruhlardan kaynaklandığına inanılıyordu (Şekil 1) (Kaculini ve ark., 2021).



Şekil 2.1. Aziz Severin bir kadını 'düşen hastalık iblisinden' kurtarıyor (Kaculini ve ark., 2021).

Babilliler, epilepsiyi açıklayan metinler içeren Sakikku isimli bir teşhis kılavuzu yazdılar (Şekil 2). Bu kılavuzda Babilliler farklı nöbet türlerini tanımlamış ve doğalarına göre sınıflandırmışlardır. Tablet ayrıca miqtu (düşme), hayyatu (uygun) ve sibtu (nöbet) gibi epilepsi ile ilgili terimleri de tanımlamaktadır. Bu yazılarda antik dönemin epilepsi hakkında biraz bilgisi olduğunu göstermektedir.

Bu hızlı kasılmaların bedeni ele geçiren kötü ruhlardan kaynaklandığına inanıldığı için tedavi çoğunlukla manevi müdahaleyi içermektedir. MÖ 1700 civarında yayınlanan Edwin Smith Cerrahi Papirüs'te açıklandığı gibi, eski Mısır'da da epilepsi kanıtı bulundu (Kaculini ve ark., 2021).



Şekil 2.2. Sakikku adlı eski Babil tanı kılavuzunu oluşturan 40 tabletlik bir dizinin 26. tableti (Kaculini ve ark., 2021).

Epilepsinin bir hastalık olarak ilk resmi tanımı, klasik eseri On the Sacred Disease'de tıbbın babası olarak bilinen MÖ 460-375 yıllarında yaşamış olan Hipokrat yapmıştır. Bu eserde Hipokrat epilepsinin ilahi yönüne şu sözlerle meydan okuyor: “Bence bu hastalık diğerlerinden daha ilahi değil; diğer hastalıklarla aynı yapıya ve bireysel hastalıkları ortaya çıkaran nedene sahiptir” (Magiarkinis ve ark., 2010). Modern epilepsi tedavilerinde 19. yüzyılın başlarında epilepsi için farmakolojik tedaviler dikkat çekmeye başladı. 1912'de Alfred Hauptmann fenobarbitalin antikonvülsan özelliklerini keşfetti. Daha sonraki senelerde etosuksimit, karbamazepin, valproik asit ve bazı benzodiazepinler dahil olmak üzere çok sayıda antiepileptik ilaç piyasaya sürüldü.

2.1.2. Tanım ve Epidemiyoloji

Bir epileptik nöbet, beyindeki anormal aşırı veya senkronize nöral aktiviteye bağlı olarak belirti ve/veya semptomların geçici olarak ortaya çıkmasıdır.

Epilepsi, epileptik nöbetlere kalıcı bir yatkınlık ve bu durumun nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçları ile karakterize edilen bir beyin bozukluğudur. Epilepsinin tanımının oluşması için en az bir epileptik nöbet gerektirir (Fisher ve ark., 2005). Epilepside epidemiyolojik çalışmalar, hastalığın yaygınlığı, sebepleri ve neticeleri ile alakalı malumat sağlar. Epilepsi hastalığı her yaş gruplarında görülebilmektedir. Epilepsi, dünya genelinde 70 milyondan fazla kişiyi etkileyen en yaygın ciddi beyin hastalıklarından biridir. Epilepsinin yıllık insidansı, yani her sene ilk defa görülen kişi sayısı 40-60/100.000'dir. ABD ve Avrupa'daki araştırmaların çoğu 45-55/100.000 oranında insidans olduğunu bildirmektedir. Ayrıca bu oranlar yaş gruplarına göre değişiklik göstermektedir. Küçük çocuklar, özellikle ilk bir yaş içerisinde ve 65 yaş üstü yaşlı insanlarda epilepsi riski daha yüksektir (Forsgren ve ark., 2018; Thijs ve ark., 2019).

2.1.3. Etiyoloji

Hastanın ilk epileptik nöbetini geçirdiği andan itibaren, doktor hastanın epilepsinin etiyojisini belirlemeye çalışmalıdır. Tedaviye etkileri üzerinde durularak bir dizi etiyojik grup tanımlanmıştır (Scheffer ve ark., 2017).



Şekil 2.3. Epilepsi Etiyolojisi (Scheffer ve ark., 2017).

2.1.3.1. Yapısal

Yapısal etiyolojinin arkasındaki kavram, iyi düzenlenmiş çalışmalara dayalı olarak, epilepsi ile ilişkili yapısal anormalliklere sahip olma riskinin büyük ölçüde artmasıdır (Scheffer ve ark., 2017). Yapısal etiyoloji, nörogörüntüleme yapısal anormallikler ve elektroensefalografi (EEG) verileri ile birlikte nöbet belirti ve bulgularının görülmesiyle belirlenir ve bu anormalliğinde nöbetlerin olası sebebi olduğunu düşündürür (Pack, 2019).

2.1.3.2. Genetik

Genetik epilepsi kavramı, nöbetlerin doğrudan epilepsinin temel semptomları olan bilinen veya şüphelenilen genetik mutasyonlardan kaynaklandığını belirtir. Genetik etiyolojinin neden olduğu epilepsi oldukça değişkendir ve çoğu durumda altta yatan genler hala bilinmemektedir(Scheffer ve ark., 2017). Genetik epilepsi çeşitlidir ve liste her sene uzar. Daha da önemlisi, genetik mutlaka kalıtsal anlamına gelmemelidir. Bazı epilepsi türleri kalıtsal olsa da, birçoğu etkilenen bireylerde de novo (yeni) mutasyonlara sekonder gelişir. Genel olarak, genetik etiyoloji, bilinen mutasyonlara sahip sendromlar, destekleyici veriler, aile öyküsü ve klinik belirtiler veya genetik bir etiyolojiyi düşündüren çalışmalardan elde edilen kanıtlar ile tanımlanır. (Pack, 2019).

2.1.3.3. Metabolik

Birçok metabolik bozukluğun epilepsi ile ilişkisi vardır. Metabolik epilepsi kavramı, nöbetlerin, epilepsinin ana semptomu olarak bilinen veya şüphelenilen metabolik bozuklukların doğrudan bir sonucu olarak ortaya çıkmasıdır (Scheffer ve ark., 2017).

2.1.3.4. Bağışıklık

Bağışıklık epilepsi kavramı, nöbetlerin doğrudan bir bağışıklık bozukluğundan kaynaklanması ile açıklanabilir. (Scheffer ve ark., 2017). İmmün etiyojisi olan hastalarda immünoterapi düşünölmelidir. (Pack, 2019).

2.1.3.5. Enfeksiyöz

Enfeksiyöz etiyojisi dünya genelinde en sık görölen etiyojidir. Enfeksiyöz etiyojisi kavramı, doğrudan hastalığın ana semptomu olduğu bilinen bir enfeksiyonun neden olduğu nöbetlerdir. Enfeksiyöz etiyojisi, ensefalit veya menenjit gibi akut bir enfeksiyonun parçası olarak meydana gelen konvülsiyonlardan ziyade epilepsili bir hastayı ifade eder (Pack, 2019; Scheffer ve ark., 2017).

2.1.3.6. İdiyopatik

İdiyopatik epilepsi sebebinin hala bilmediği anlamına gelmektedir. Birçok insan belirgin bir sebep olmadan epilepsiye sahiptir. Epilepsi hastalarının üçte birine kadar belirgin bir nedeni yoktur. Bir neden olabilir, ancak mevcut tıbbi testler ve yetersiz kaynaklar nedeniyle tanımlaması sınırlı olabilir. Etiyojisi bilinmeyen hasta oranının azalması ve yeni sınıflama sisteminin yapısının epilepsinin daha iyi anlaşılması için bir çerçeve sağlaması beklenmektedir (Pack, 2019; Scheffer ve ark., 2017).

2.1.4. Tanı

Bir hastanın klinik tablosunu değerlendirirken epileptik nöbet geçirip geçirmediği ile ilgili karar vermek ilk adımdır. Literatürde yanlış teğhis edilen hastalarda antiepileptik ilaçların kullanımı %25 olarak belirtilmektedir. Hasta ve nöbeti görenlerden olay hakkında detaylı bilgi elde edilmeli (nöbet öncesi, başlangıcı, ilerleyişı, nöbet sonrası, mümkünse video kaydı), öz geçmiş ve soy geçmiş özellikleri öğrenilmelidir. Nörolojik muayene, fizik muayene, nörogörüntöleme, EEG ile epilepsi tanısı desteklenir. Hastanın hayatında iş kaybı, ehliyet kaybı, uzun bir süre ya da ömür boyu ilaç kullanımına sebep olunacağı için detaylı bir değerlendirmeden sonra tanı konulması gerekmektedir. İncelemeler sonucunda kesin karar verilemiyorsa yanlış tanı konmamalı ya hasta takibine devam edilmeli yada üst bir merkeze yönlendirilmelidir. İlk nöbetle başvuran hastada rutin EEG en önemli tetkiktir (Akdağ ve ark., 2016). ILAE tanı kriterlerinde ise aşığıdaki 3 durumun epilepsi tanımı için kullanılabileceği belirtilmektedir.

1. >24 saat arayla meydana gelen en az iki provoke edilmemiş (veya refleks) nöbet
2. Bir provoke edilmemiş (veya refleks) nöbet ve önümüzdeki 10 yıl içinde meydana gelen, iki provoke edilmemiş nöbetten sonra genel nüks riskine (en az %60) benzer başka nöbet olasılığı
3. Bir epilepsi sendromunun teşhisi (Fisher ve ark., 2014).

2.1.5. Sınıflandırma

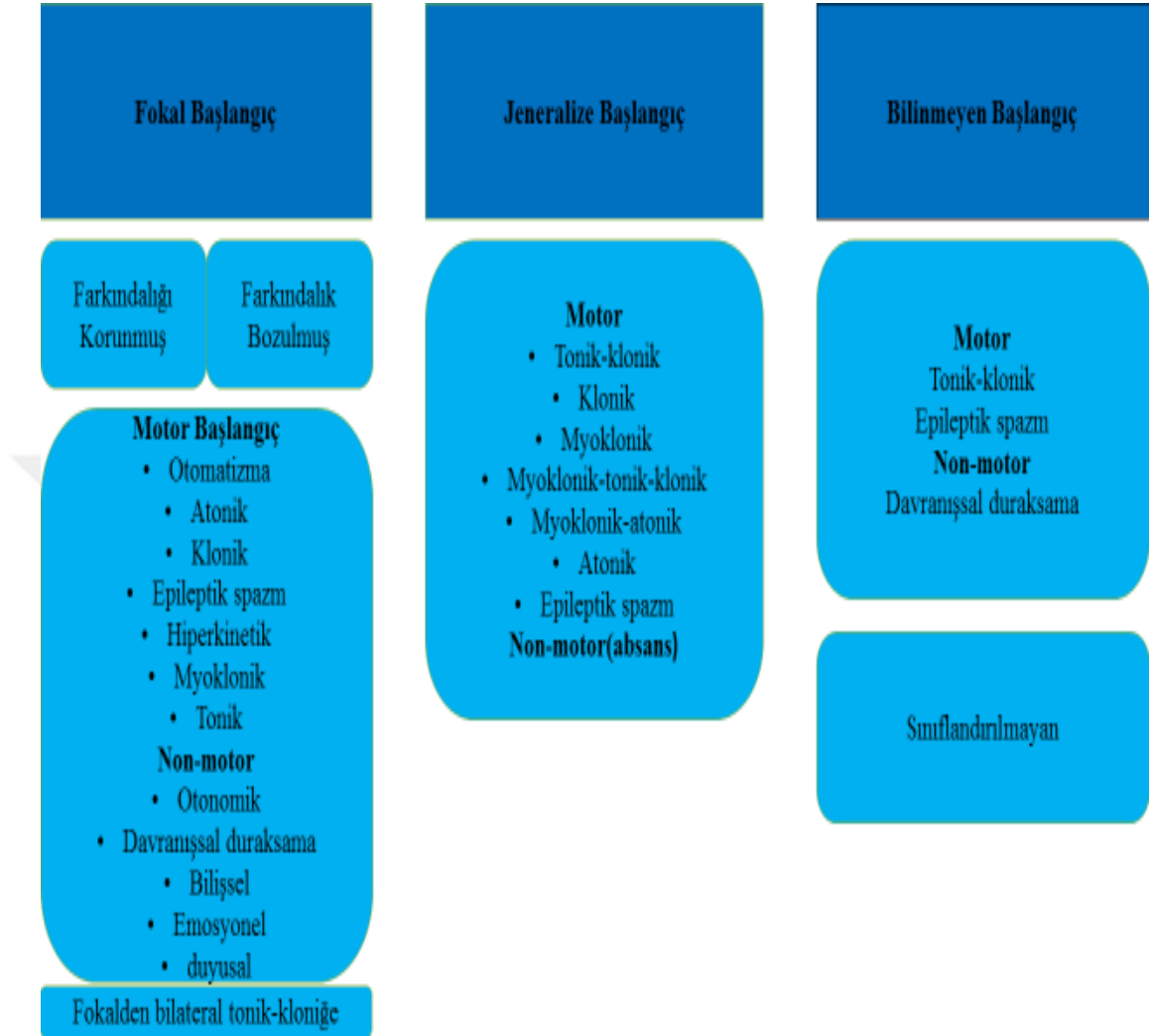
Nöbetlerin sınıflandırılması düşüncesi ilk defa 1960 senesinde toplanan milletlerarası epilepsi uzmanlarının epileptik nöbetlerin sınıflandırılması üzerine çeşitli çalışmalar yapması ile başlamıştır. Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği (ILAE) tarafından Sınıflama ve Terminoloji Komisyonu adında bir komisyon kurulmuştur. Bu komite ilk olarak 1970 yılında epileptik nöbetler ve epilepsi sınıflandırmalarını düzenlemiş ve yıllarca süren çalışmaların sonucunda 1981 senesinde “1981 Epileptik Nöbetlerin Klinik ve Elektroensefalografik Sınıflaması” ve 1989 senesinde “1989 Epilepsiler ve Epilepsi Sendromları Sınıflaması” çalışmaları sayesinde dünya çapında kabul görmüş bilimsel bir dil oluşturulmuştur. Son senelerde tıbbi imkanlarında artmasıyla; video EEG, genetik çalışmalar, laboratuvar çalışmaları ve benzeri imkanlar sayesinde ILAE tarafından mevcut sınıflamalar sırasıyla 2001, 2006, 2010 ve 2017 senelerinde yeniden güncellenmiştir. Yeni 2017 sınıflandırması diğer sınıflandırmalar ile karşılaştırıldığında birkaç önemli eklemeler ve alternatif terimlerin kullanıldığı söylenebilir (Akdağ ve ark., 2016; Fisher ve ark., 2017; Walter ve ark., 2018).

ILAE 2017 Nöbet Sıralaması Basit Sürüm



Şekil 2.4. ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması basit sürüm

ILAE 2017 Nöbet Sıralaması Genişletilmiş Sürüm



Şekil 2.5. ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması genişletilmiş sürüm

2.1.6.Epilepsi ve Nöbet Oluşum Mekanizmaları

Epilepsinin hastalık olarak ilk defa resmi tanımı Hipokrat tarafından “Bence bu hastalık diğerlerinden daha ilahi değil; diğer hastalıklarla aynı yapıya ve bireysel hastalıkları ortaya çıkaran nedene sahiptir” sözleri ile ilahi bir durum olmayıp hastalık olarak kabul edilmiştir. Hipokrat’tan sonraki yakın dönemlerde doktorlar daha çok nozoloji alanında bilimsel olarak incelenmesi, semptomlarının belirlenmesi ve hastalığın sınıflandırılması ile ilgili konularda katkıları olmuştur. Ancak daha ileri dönemlerde epileptik nöbetlerin mekanizmalarıyla ilgili çalışmalar yapılmıştır (Magiarkinis ve ark., 2010). Epileptik nöbetlerin etiyolojisi yapısal bozukluk, metabolik bozukluk, enfeksiyöz, genetik

mutasyonlar, bağıklık ve bilinmeyen nedenler yer alır. Bu nedenlere bağılı nöbetlerin kaynaklandığı düşünölmektedir. Epilepsilerin geneline neden olan bir patoloji (tümörler, kistler, gliaskleroz, vaskuler anomali vb.) gösterilebilmektedir. Tüm epilepsi nöbetlerinin patofizyolojisi aynı olmayacağı gibi bazı nöbetlerin patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir (Sonat, 2009). Epileptik nöbetlerin aktivitesi, sinaptik ve voltaj kapılı inhibitör iletkenlikleri bloke ederek veya sinaptik ve voltaj kapılı uyarıcı iletkenlikleri aktive ederek akut olarak indüklenebilir. Epileptojenik bölgelerde nöronlar uyarılması, deşarjların oluşması ve yayılması kolaylaşmaktadır. Kısaca özetlemek gerekirse 3 mekanizma önemlidir.

- A) Bozulmuş gliaların (özellikle astrositlerin) fonksiyonu
- B) Glutamat gibi eksitator aminoasitlerde artma
- C) Başta γ -aminobutirik asit (GABA) olmak üzere inhibitör aminoasitlerde azalma

Bu mekanizmaların bir sonucu olarak, nöronlar membran potansiyeli bozulur, ayrıca bu nöronlar normalden daha kolay depolarize olup başka bir deyişle, nöronal deşarj ve uyarılma eşikleri azalır. İnhibitör bir nörotransmitter olan GABA'nın azalması da, epileptik nöronlar üzerindeki sinaptik inhibisyonun kalkmasına ve daha kolay eksite olmalarına yol açmaktadır (Sonat, 2009; Zenbilci, 1995). Son yıllardaki araştırmalar sonucunda epilepsi ile ilişkili olan 977 gen bulunmuştur. Epilepsiye yada epileptik semptomlara neden olan 84 gen bulunmuştur. Bu epilepsi genlerinden bazılarının fonksiyonel katagorileri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017).

Tablo 2.1. Epilepsi genlerinin fonksiyonel kategorileri.

Kodlanmış protein işlevi	Gen ve fenotip (OMIM fenotipi)
İyon kanalı	
Sodyum kanalı	SCN1A (DS/GEFS+/FFS), SCN1 B (GEFS +), SCN2A (EIEE/BFIS), SCN8A (EIEE/BFIS), SCN9A (GEFS+/DS/FFS)
Potasyum kanalı	KCNA2 (EIEE), KCNB1 (EIEE), KCNC1 (PME), KCNMA1 (GEPD), KCNQ2 (EIEE/BFNS), KCNQ3 (BFNS), KCNT1 (NFLE/EIEE)
Kalsiyum kanalı	CACNA1A (EIEE), CACNA1H (CAE/IGE), CACNB4 (IGE/JME)
GABA-A reseptörü	GABRA1 (EIEE/CAE/JME), GABRB1 (EIEE), GABRB3 (CAE/EIEE), GABRD (GEFS+/IGE/JME), GABRG2 (GEFS+/FFS/CAE)
Asetilkolin reseptörü	CHRNA2 (NFLE), CHRNA4 (NFLE), CHRN2 (NFLE)
Sinyal iletimi/molekül	EFHC1 (JAE/JME), FGF12 (EIEE)

SCN1A , sodyum kanalı, nöronal tip I, SCN1B , sodyum kanalı, voltaj kapılı, SCN8A , sodyum kanalı, voltaj kapılı, tip VIII, SCN9A , sodyum kanalı, voltaj kapılı, tip IX, KCNA2, potasyum kanalı, voltaj kapılı, çalkalayıcı ile ilgili alt aile, üye 2, KCNB1 , potasyum kanalı, voltaj kapılı, shab ile ilgili alt aile, üye 1, KCNMA1 , potasyum kanalı, kalsiyumla aktive edilmiş, büyük iletkenlik, M alt ailesi, alfa üyesi 1, KCNQ2 , potasyum kanalı, voltaj kapılı, KQT benzeri alt aile, üye 2, KCNQ3 , potasyum kanalı, voltaj kapılı, KQT benzeri alt aile, üye 3, KCNT1 , potasyum kanalı, T alt ailesi, üye 1, CACNA1A , kalsiyum kanalı, voltaja bağlı, P/Q tipi, alfa-1A alt birimi, CACNA1H , kalsiyum kanalı, voltaja bağlı, T tipi, alfa-1H alt birimi, CACNB4 , kalsiyum kanalı, voltaja bağlı, beta-4 alt birimi, GABRA1 , gama-aminobütirik asit reseptörü, alfa-1, GABRB1 , gama-aminobütirik asit reseptörü, beta-1, GABRB3 , gama-aminobütirik asit reseptörü, beta-3, GABRD , gama-aminobütirik asit reseptörü, delta, GABRG2 , gama-aminobütirik asit reseptörü, gama-2, CHRNA2 , kolinerjik reseptör, nöronal nikotinik, alfa polipeptit 2, CHRNA4 , kolinerjik reseptör, nöronal nikotinik, alfa polipeptit 4, CHRN2 , kolinerjik reseptör, nöronal nikotinik, beta polipeptit 2, EFHC1,

EF-el alanı (C-terminali) içeren protein 1, FGF12 , fibroblast büyüme faktörü 12 (Wang ve ark., 2017).

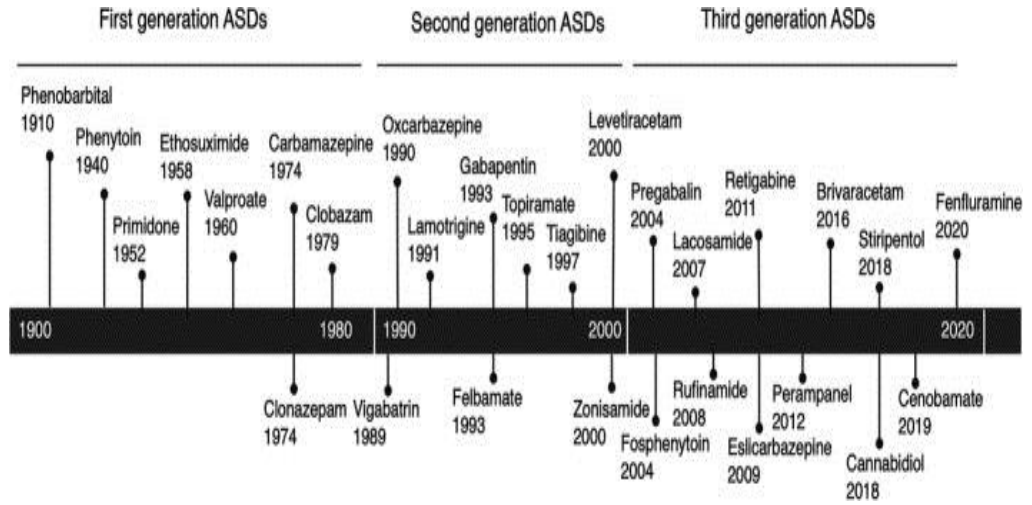
Yapılan çalışmaların sonucunda; epilepsi sendromlarının çeşitliliği, epilepsinin patofizyolojisinin karmaşık olduğu ve epilepsi genlerinin net olarak karakterize edilmediği sonucuna ulaşılmaktadır. Nöbetlerin hangi sebeplerden dolayı ortaya çıktığı, bu nöbetlerle birlikte beynin nasıl etkilendiği ve epilepsinin engellenmesinde yada tedavisinin en doğru şekilde nasıl yapılacağı gibi şuan cevaplanmamış pek çok sorunun olduğu görülmektedir. Görüntüleme teknikleri, farmakogenomik, moleküler genetik, fizyolojik alanlardaki yeni keşif ve gelişmeler sonucunda epilepsinin tedavisinde yeni gelişmelerin olması ve hastaların yaşam standartlarının yükselmesine katkı sağlanması beklenmektedir (Bambal ve ark., 2011).

2.2. EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE ANTİEPİLEPTİK İLAÇLAR

Epilepsinin güncel tedavisi, antiepileptik ilaçlarla semptomların baskılanmasına dayanmaktadır. Antiepileptik ilaçların seçimi nöbetlerin tiplerine ve epilepsi sendromuna bağlıdır (Hakami, 2021; Pitkanen, 2010). İyi seçilmiş bir antiepileptik ilaç, hastaların %60-70'inde yeterli nöbet kontrolü sağlar. İlk epileptik nöbetten sonra tedaviye ne zaman başlanması gerektiği konusunda genel bir anlaşma yoktur. Hastalarda yapılan kontrollü çalışmalar sonunda erken tedavinin, ilk ataktan en az 2 yıl boyunca nöksleri azalttığı gösterilmiştir. İlaç yan etkilerinin daha az olması için öncelikle monoterapi tercih edilir fakat hastaların %30 luk bir kısmında nöbetler tam olarak kontrol edilemediğinden aynı anda birden fazla ilaç kullanılır. İki veya daha fazla ilaç kullanılmasına rağmen nöbetlerin kontrolü sağlanamayan hastalar ilaca dirençli kabul edilir (Hakami, 2021).

2.2.1. Antiepileptik İlaçların Sınıflandırılması

Antiepileptik ilaçlar birinci nesil (eski), ikinci ve üçüncü nesil (daha yeni) ajanlar olarak sınıflandırılır (Hakami, 2021).



Şekil 2.6. Nöbet önleyici ilaçların sınıflandırılması ve kullanıma sunulma yılı (Hakami, 2021).

Antiepileptik ilaçlar yan etkileri, farmakokinetikleri, etki mekanizmaları gibi özellikleri ile birbirinden ayrılmaktadır (Hakami, 2021).

2.2.2. Antiepileptik İlaçların Farmakokinetiği

Farmakokinetik, ilaçların vücutta emilimi, dağılımı, dönüşümü ve atılması gibi süreçlerini inceleyen bir farmakoloji alt dalıdır. Antiepileptik ilaçların kendi arasındaki veya antiepileptik ilaçların diğer ilaçlar arasındaki etkileşimleri ve toksisite riskinden korunmak için ilaçların farmakokinetik özellikleri iyi bilinmelidir (Zaccara ve Perucca, 2014). Genelde tüm antiepileptik ilaçlar oral yoldan alındığı zaman iyi emilir, biyoyararlanım yüzdeleri yüksektir ve kolayca kan-beyin bariyerini geçer. Çoğu AEİ'nin, etki mekanizması orta ila uzun sürelidir (yarılanma ömürleri >12 saattir) ve bir gün içerisinde iki ya da üç kez uygulanabilir (Hakami, 2021). Antiepileptik ilaçların klinik olarak ilgili farmakokinetik profilleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Nöbet Önleyici İlaçların Farmakokinetik Profilleri (Hakami,2021)

Nöbet Önleyici İlaç	Biyoyararlanım %	Tepe Konsantrasyonu (Saat)	Plazma Protein Bağlanması (%)	Eliminasyon Yarı Ömrü (Saat)	Eleme Yolu	Terapötik Serum Konsantrasyonu (Mcg/Ml)
Brivarasetam	~ 95	1	≤ 20	7-10	++	0,2-2
Karbamazepin	75-85	4-5	70-80	10-17	++++	4-11
Esraridiol	10-20	2,5-5	>94	56-61	++++	KD
Senobamat	88	1-4	60	50-60	+++	KD
Klobazam	90-100	1-3	80-90	36-42	++++	0,03-3
Klonazepam	>80	1-4	80-90	24-48	+++	10-70 ^{bir}
Eslikarbazepin	>90	1-4	<40	13-20	++++	5-35
Etosuximide	95-100	3-7	0	30-60	++	40-100
Felbamat	>90	3-5	22-36	16-22	++	30-60
Gabapentin	50	2-3	0	5-9	-	3-21
Lakozamid	100	1-2	<30	12-14	+	3-10
Lamotrijin	~ 90	1-3	55	8-35	+++	3-13
Levetirasetam	~ 95	1-2	<10	6-8	-	5-41
Okskarbazepin	100	4-5	75	10-17	++++	3-36
Perampanel	100	0,5-3	95-96	70-110	+++	0,1-1
Fenobarbital	>90	0,5-4	55	90	++	12-30
Fenitoin	85-90	5-7	90	24	+++ ^b	10-20
Pregabalin	~90	1-2	0	4,5-7	-	2-6
Primidon	>90	2-6	10	8-15	++	8-12
Rufinamid	>90	4-6	35	6-10	++	4,5-31
Stiripentol	Değişken	2-3	99	4,5-13	+	4-22
Tiagabin	~90	0,5-2	96	2-9	+++	0,02-0,2
Topiramet	~80	2-4	15	20-30	+	2-10
Valproat	>90	2-4	90	15	++++	50-100
Vigabatrin	100	1	0	5-8	-	20-160 ^{bir}
Zonisamid	>90	2-6	40-60	50-68	++	10-38

NE, yerleşik değil

++++Yoğun hepatik metabolizma ve aktif metabolit(ler)

+++Yoğun hepatik metabolizma, ancak aktif metabolit(ler) yok

++Hepatik metabolizma (aktif metabolitler olsun veya olmasın) ve renal atılım.

+Değişken (veya orta) hepatik metabolizma (aktif metabolitlerle veya bunlar olmadan)

-Böbrek atılımı (değişmemiş). Hepatik metabolizma yok

^{bir} ng/mL^b doygun

Antiepileptiklerin çoğu karaciğer enzimleri tarafından metabolize olur. Fenitoin, karbamazepin, eslikarbazepin, primidon, fenobarbital, ve okskarbazepin; hepatik sitokrom P450 enzimlerinin indükleyicileridir. Valproat ve klobazam ise karaciğer enzim inhibitörleridir (Hakami, 2021).

2.2.3. Antiepileptik İlaçların Etki Mekanizmaları

Antiepileptik ilaçlar iyon kanalı aktivitesini değiştirerek, GABA aracılı inhibisyonu arttırarak, yada glutamat aracılı uyarımı azaltma gibi çeşitli etki mekanizmalarıyla anormal nöronal ateşlemeyi bastırır. Bazı antiepileptiklerin bir tane etki mekanizması varken, bazılarının birden fazla etki mekanizması vardır ve bazılarında ise tam olarak etki mekanizması henüz bilinmemektedir (Farrokh ve ark., 2018). Antiepileptik ilaçların etki mekanizması tablo 2.3 de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Antiepileptik ilaçların etki mekanizması

Antiepileptik ilaç ajanı	Tahmin edilen etki mekanizması
brivaracetam	SV2A modülasyonu
karbamazepin	Na ⁺ kanal blokajı
klobazam	GABA güçlendirme
klonazepam	GABA güçlendirme
diazepam	GABA güçlendirme
Fosfenitoin/fenitoin	Na ⁺ kanal blokajı
lakoamid	Voltaj kapılı Na ⁺ kanallarının geliştirilmiş yavaş inaktivasyonu
lamotrijin	Na ⁺ kanal blokajı
Levetirasetam	SV2A modülasyonu
lorazepam	GABA güçlendirme
midazolam	GABA güçlendirme
okskarbazepin	Na ⁺ kanal blokajı
pentobarbital	GABA güçlendirme
Perampanel	AMPA glutamat reseptör antagonisti
fenobarbital	GABA güçlendirme
topiramet	Na ⁺ kanal blokajı, GABA güçlendirmesi, AMPA/Kainat glutamat antagonisti
Valproik asit	GABA güçlendirme, glutamat (NMDA) inhibisyonu, sodyum kanalı ve T tipi kalsiyum kanalı blokajı
Zonisamid	Na ⁺ ve Ca ²⁺ kanal blokajı

AMPA , alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit, GABA gamma-aminobütirik asit, NMDA , N -metil- d -aspartat, SV2A sinaptik vezikül glikoprotein 2A

Birden fazla antiepileptik ilaç kullanırken, farklı etki mekanizmalara sahip ilaçları seçmek daha doğru olur (Farrokh ve ark., 2018).

2.2.4. Valproik asit

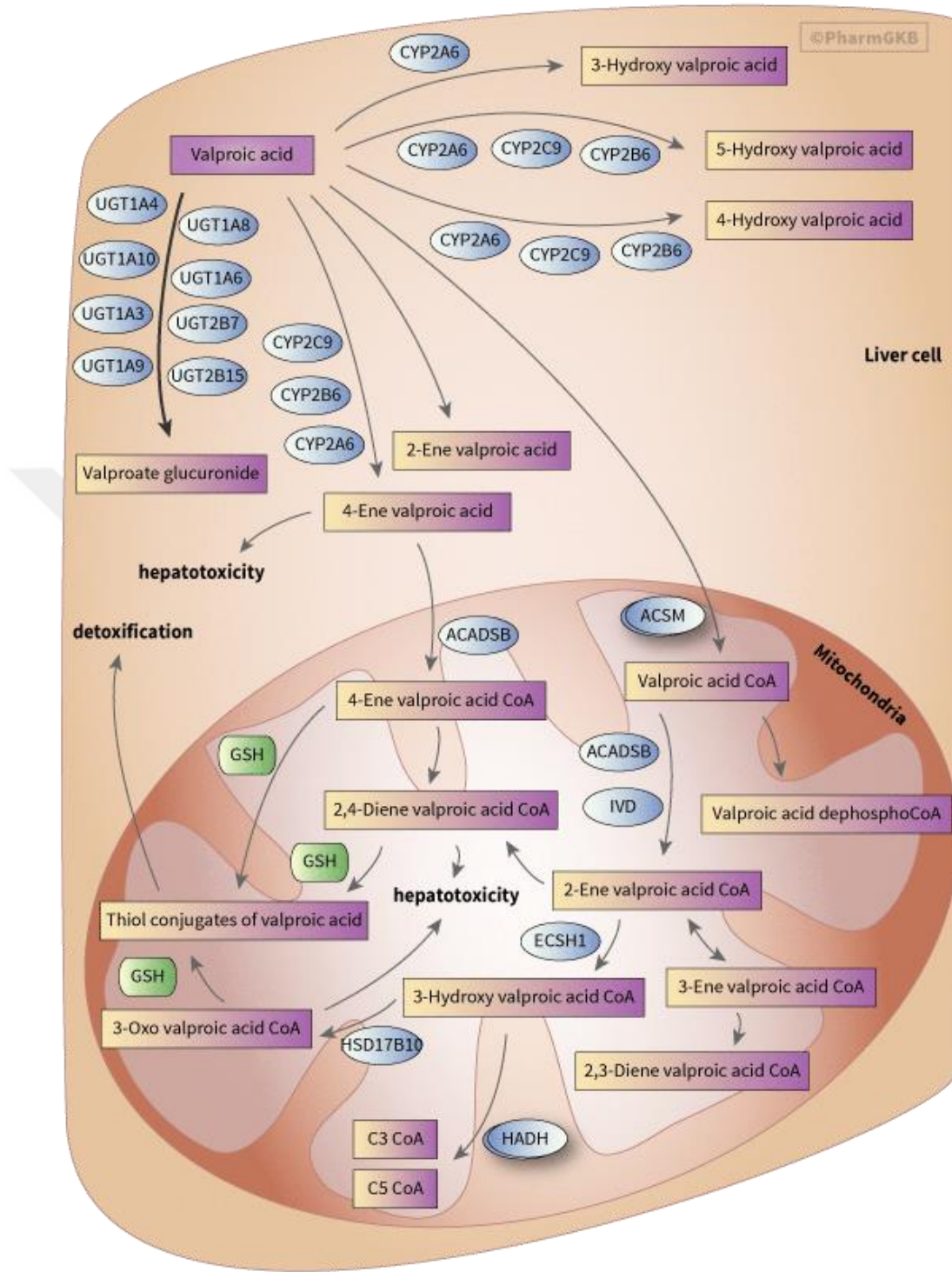
Valproik asit, doğal olarak oluşan valerik asitten türetilen kısa zincirli dallı bir yağ asididir. Valproik asit epilepsi tedavisinde kullanılan en yaygın ilaçlardan biridir. İlk olarak epilepsi ve nöbetlerin tedavisinde kullanıldığı bilinsede bipolar bozukluk, migren,

anksiyete ve psikiyatrik bozukluklarda da kullanıldığı bilinmelidir. Ayrıca valproik asidin kanser tedavisinde kullanımı içinde klinik deneylerin devam ettiği bilinmektedir (Bialer ve Yagen 2007; Ghodke-Puranik ve ark., 2013).

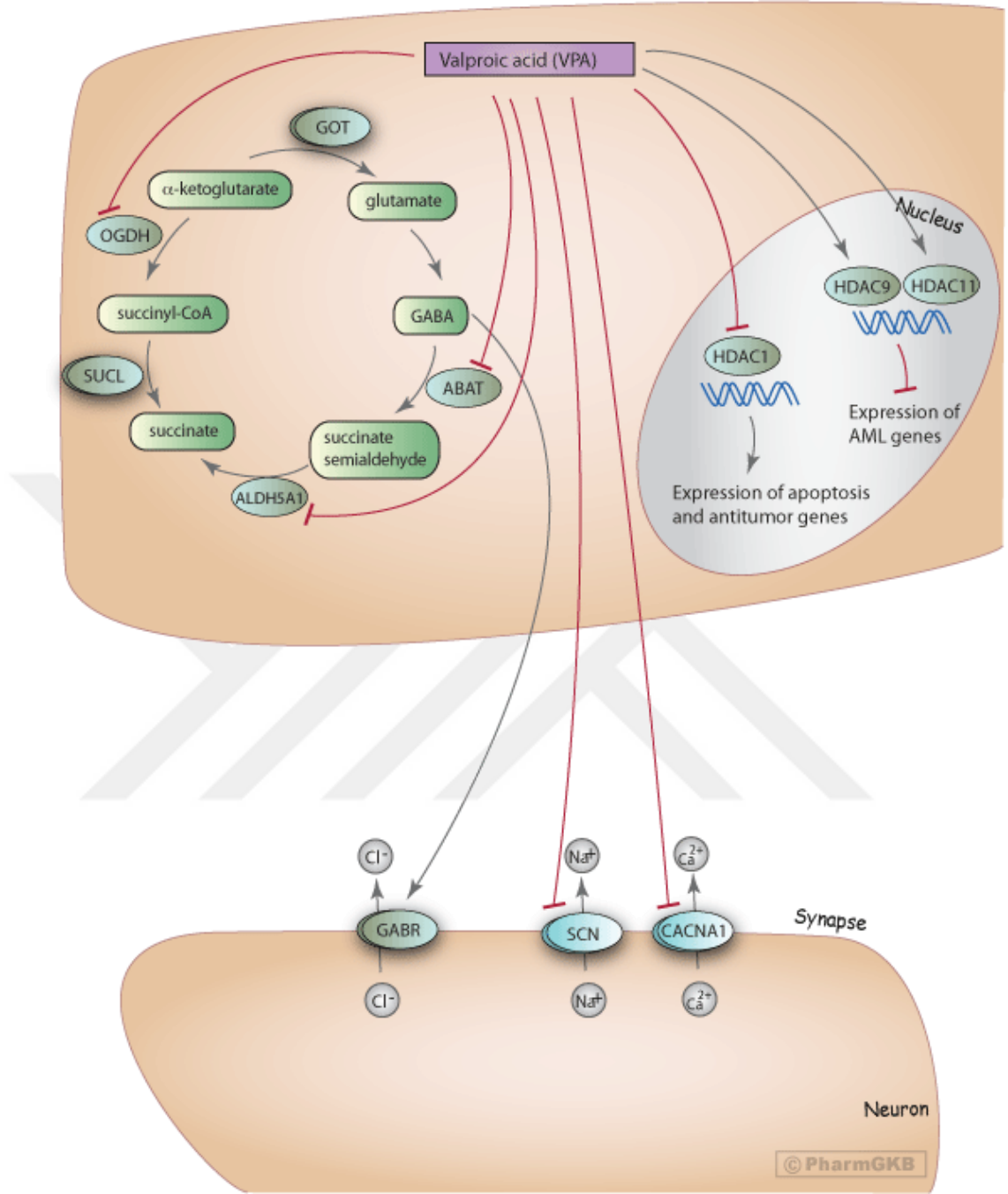
Valproik asidin etki mekanizmasının çok yönlü olmasından ve kabul edilebilecek güvenlik profili sebeplerinden dolayı yetişkin ve pediatrik hastalarda kullanımı diğer anti epileptik ilaçlara göre daha fazladır (Ghodke-Puranik ve ark., 2013).

İlacın yan etkileri genellikle gastrointestinal (bulantı, kusma, dispepsi), olup ayrıca hepatik yetmezlik, pankreatit, kilo kaybı, alerji gibi yan etkileri olduğu bilinmektedir. Tüm bunlara rağmen valproik asidin diğer antiepileptik ilaçlarla kıyaslandığında minimal nörolojik yan etkileri (sedasyon, ataksi, kognitif fonksiyon bozukluğu) vardır. Epilepsi hastalarında da bu minimal nörolojik yan etki önemlidir (Davis ve ark, 1994).

Valproik asidin farmakokinetiğinde yer alan genler (Şekil 7) ve farmakodinamiğinde yer alan genler (Şekil 2.8) aşağıda gösterilmiştir (Ghodke-Puranik ve ark., 2013).



Şekil 2.7. Valproik asit farmakokinetiğinde yer alan aday genlerin grafik gösterimi.

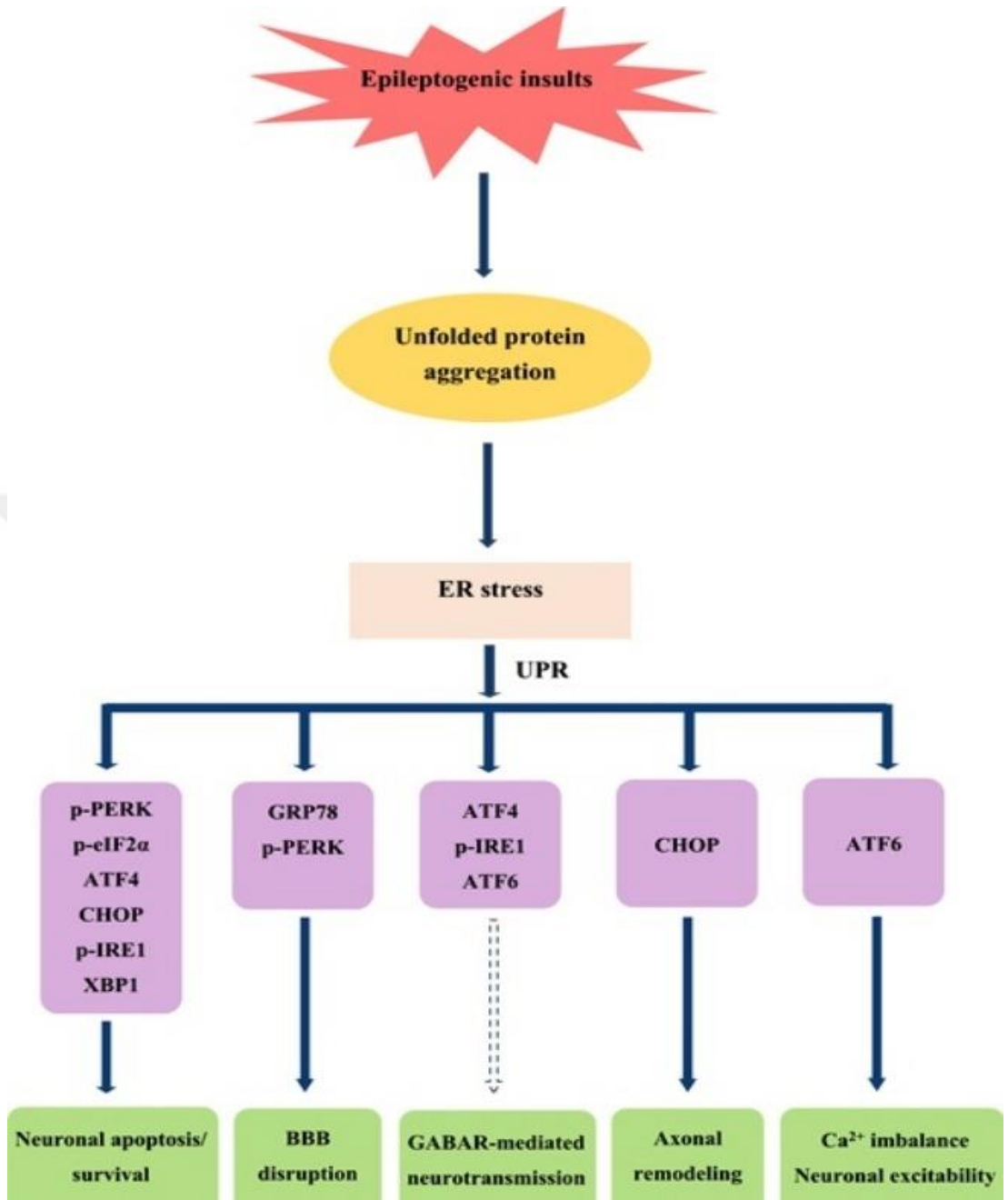


Şekil 2.8. (VPA) farmakodinamiğinde yer alan aday genlerin grafik gösterimi.

Antiepileptik ilaçlar esas olarak farklı sitokrom P450 izoformları tarafından metabolize edilir. (VPA) nde sitokrom P450 inhibitörü olduğu bilinmesine rağmen valproik asidin in vitro sitokrom P450 izoformlarının aktivite üzerindeki inhibe edici etkileri hakkında sadece sınırlı çalışmalar yayınlanmıştır.

2.3. EPİLEPSİ ve ENDOPLAZMIK RETİKULUM STRESİ

Endoplazmik retikulum, membranöz bir hücre içi organelidir. Endoplazmik retikulum stresi, endoplazmik retikulum lümeninde yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesi durumu olarak kabul edilir. Aşırı yada uzun süren ER stresi, ER stresini durdurmak ve ER homeostazını tekrar eski haline getirmek için katlanmamış protein tepkisinin (UPR) aktivasyonuna neden olur (Fu ve ark., 2020). Epilepsi, ilerleyici nörodejenerasyona neden olan en yaygın kronik nörolojik hastalıklardan biridir. Endoplazmik retikulum streside son zamanlarda epilepsiye bağlı nöronal hasara katkıda bulunan önemli bir etiyolojik faktör olarak kabul edilmiştir. Tüm bunlarla birlikte, epilepsinin endoplazmik retikulum stresine spesifik katkısı büyük ölçüde bilinmemektedir (Zhu ve ark., 2017). Son zamanlarda artan kanıtlar, epilepsi ile ilişkili çeşitli patolojik süreçlere katılabilecek epileptogenez sırasında düzensiz ER stresini göstermiştir (Şekil 2.9).

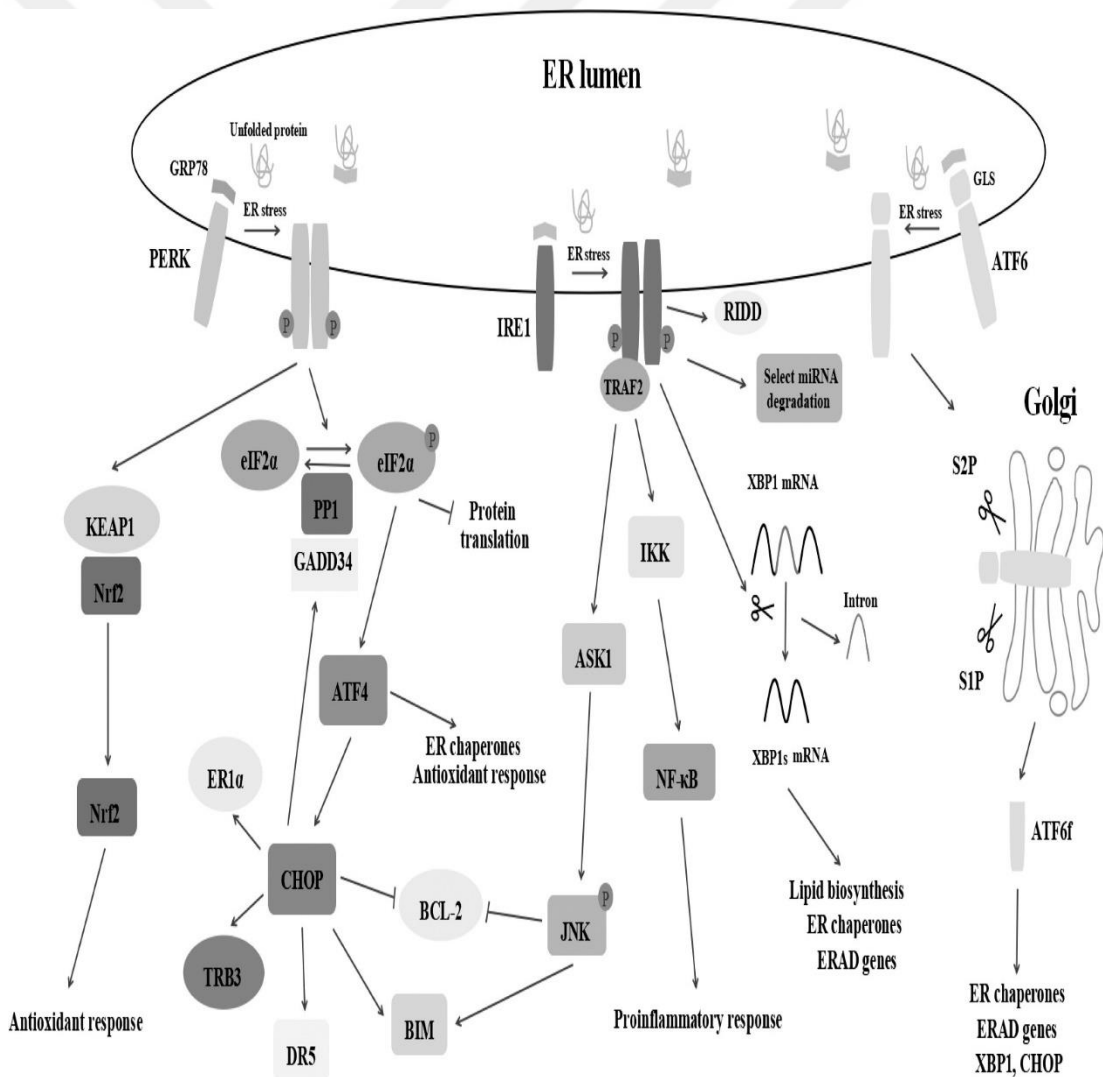


Şekil 2.9. Epileptogenez ER stres süreci

Endoplazmik retikulum stresi, uygun olan endoplazmik retikulum işlevinin ve yapısının bozulmasıyla ortaya çıkan bir durumdur. Yapılan çalışmalarda epilepsi ile ilişkili olan nörofizyopatolojik mekanizmalarda ER stresinin ve apoptozun önemli rolü olduğu bilinmektedir. LGI1 gibi proteinlerde bir hata oluşması sonucunda katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler birikebilir. ER stresi belirteçlerinden C/EBP homolog proteini (CHOP) ve 78-kDa glikozla düzenlenmiş protein (GRP78) miktarlarındaki artış

sonucunda apoptoza neden olmaktadır. Tedavi için kullanılan antiepileptiklerden olan valproik asit'din hepatik hücrelerde CYP450 proteinlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Beyinde bol miktarda bulunan BDNF ise koruyucu ve onarıcı bir işlev görmektedir. Bizde bu çalışmada valproik asidin ve bir diğer ER stres inhibitörü olan 4-fenilbütirik asidin (4-PBA) CHOP, GRP78, LGI1, BDNF, ve CYP450 proteinlerinin epilepside ER stresi ile olan ilişkilerini değerlendirdik.

UPR, üç temel ER transmembran proteini tarafından harekete geçirilir. Bunlar protein kinaz R benzeri ER kinaz (PERK), inositol gerektiren enzim 1 (IRE1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) dır UPR sinyalleme dalları, Şekil 10'da gösterilmiştir (Fu ve ark., 2020; Hashimoto ve Saido, 2018).



Şekil 2.10. UPR sinyalleme dalları

ER stresi ile katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, GRP78'i PERK, IRE1 ve ATF6'nın lümen alanlarından ayırarak üç proteinin aktivasyonunu tetikler (Fu ve ark., 2020; Malhi ve Kaufman, 2011).

2.3.1. PERK Yolu

PERK, C-terminal sitoplazmik serin/treonin kinaz alanı ve N-terminal ER lümen bölgesinden meydana gelen tip I ER transmembran proteindir (Fu ve ark; 2020; Harding ve Zhang, 1999; Harding ve ark., 2000). GRP78'in PERK'ten ayrışması, PERK'in C-terminal sitoplazmik kinaz alanında otofosforilasyonu tetikler (Fu ve ark; 2020; Naidoo ve ark., 2005). Bu tetiklenme sonucunda fosforile olmuş PERK (p-PERK), ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2'nin (eIF2a) alfa alt biriminin fosforilasyonunu teşvik eder (Fu ve ark; 2020; Harding ve Zhang, 1999). Fosforile eIF2a (p-eIF2a), global protein sentezini inhibe ederek endoplazmik retikulumda protein katlanması ihtiyacını azaltır (Fu ve ark., 2020; Huang ve ark., 2015). Bir diğer taraftan, transkripsiyon faktörü 4'ü (ATF4) aktive etmek gibi, bazı kötü çevrilmiş mRNA'lar, eIF2a fosforilasyonu üzerine gelişmiş translasyona uğrar (Fu ve ark; 2020; Spriggs ve ark., 2010). Şiddetli veya uzun süreli endoplazmik retikulum stresi koşulları altında ATF4, C/EBP homolog proteini (CHOP) gibi proapoptotik araçların ekspresyonunu düzenler (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016). Büyümeyi durduran ve DNA hasarına neden olan gen (GADD153) olarak da bilinen CHOP, ER stresinin bir sonucu olan hücre apoptozuna aracılık eden önemli bir faktördür (Oyadomari, 2004).

Önceki araştırmalar, insan epilepsisinde ve deneysel epilepsi modellerinde PERK sinyalinin düzensizliğini göstermiştir. Yüksek GRP78 ve CHOP seviyeleri ve nöronal apoptoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca çalışmalarda CHOP seviyesinin yüksel olduğu beyin bölgelerindeki Status epileptikusun neden olduğu strese karşı daha savunmasız olduğunu göstermiştir (Fu ve ark., 2020).

Bizde bu çalışmada valproik asidin ve bir diğer ER stres inhibitörü olan 4-PBA CHOP, GRP78, LGI1, BDNF ve CYP450 proteinlerinin epilepside ER stresi ile olan ilişkilerini değerlendirdik.

2.3.2. IRE1 Yolu

IRE1 ayrıca tip I ER transmembran proteini olarakta bilinmektedir (Fu ve ark., 2020; Huang ve ark., 2019). GRP78'in IRE1a'nın lümen alanından ayrışması ile dimerizasyon/oligomerizasyon ve otofosforilasyon yoluyla IRE1a aktivasyonunu indükler ve IRE1a fosforilasyonu, C-terminal RNaz alanının allosterik aktivasyonu ile sonuçlanır (Korennykh ve Walter, 2012). Fosforile IRE1 α (p-IRE1 α), ER stresinin yoğunluğuna bağlı olarak hem hayatta kalma yanlısı hem de proapoptotik sinyal yollarıyla ilişkilidir (Oakes ve Papa, 2015). Hafif endoplazmik retikulum stresi altında, p-IRE1 α , X-box bağlayıcı protein 1'i (XBP1) kodlayan mRNA'dan 26 nt'lik bir intronu ayırır ve transkripsiyonel olarak aktif XBP1s proteinine dönüşen translasyonel bir çerçeve kayması meydana gelir (Calton ve ark., 2002; Walter, 2011). XBP1 daha sonra çekirdeğe yer değiştirir ve ER homeostazını eski haline getirmek için lipid biyosentezi, ER biyosentezi ve ER ile ilişkili bozunma (ERAD) ile ilgili birçok UPR geninin transkripsiyonunu aktive eder (Fu ve ark., 2020; Rodrigo ve ark., 2019; Sriburi ve ark., 2004). ER stresi geri döndürülemez olduğunda, p-IRE1 α 'nın RNaz alanı, çeşitli ER-lokalize mRNA'ların bozulmasını katalize eder. Bu işlem, yukarı regüle edilmiş IRE1'e bağlı bozulma (RIDD) olarak bilinir. RIDD, ER'deki protein katlanma yükünü azaltarak ER stresini azaltır (Hollien ve Weissman, 2006). Bununla birlikte, şiddetli endoplazmik retikulum stresi altında, IRE1 α aracılı sinyalleme, proapoptotik bir programa doğru kayar. P-IRE1 α , apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1'i (ASK1) ve bunun aşağı akış hedefi c-Jun N-terminal kinazı (JNK) aktive etmek için tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) ile etkileşime girer (Fu ve ark; 2020; Urano ve ark., 2000). p-IRE1 α ayrıca TRAF2 ile etkileşime girebilir ve ardından I κ Ba kinazı (IKK) aktive ederek NF- κ B aktivasyonunu tetikleyerek proinflamatuvar yanıtlara yol açar (Tam ve ark., 2012).

2.3.3. ATF6 Yolu

ATF6, lösün fermuar transkripsiyon faktörü ailesine ait bir ER lokalize tip II transmembran proteinidir (Hillary ve FitzGerald, 2018). ATF6, bir luminal C-terminal alanı, bir transmembran alanı ve bir sitoplazmik N-terminal alanı içerir (Chen ve ark., 2002). Memeliler, ATF6 proteininin iki izoformunu, ATF6 α ve ATF6 β ifade eder (Hillary ve FitzGerald, 2018). ATF6 α ve ATF6 β karşılaştırıldığında ATF6 α

transkripsiyonel açıdan daha aktif ve fonksiyonel rolleri daha iyi belgelenmiştir (Thuerauf ve ark; 2007). Uygun Fizyolojik koşullarda, ATF6α'nın lümen alanı ER şaperonu GRP78 ile etkileşime girer. ER stresi üzerine GRP78'in ATF6α'dan ayrışması, ATF6α'nın (GLS1 ve GLS2) iki Golgi yerelleştirme dizisini (GLS) ortaya çıkarır (Shen ve ark., 2002). ATF6α daha sonra Golgi aparatına yer değiştirir ve bölge 1 proteaz (S1P) ve bölge 2 proteaz (S2P) tarafından bölünür (Ye ve ark., 2000). Bu bölünmenin sonrasında ATF6f oluşur (Gerakis ve Hetz., 2018). ATF6f çekirdeğe girer, ER stres yanıt elemanına (ERSE) bağlanır ve ayrıca moleküler ER şaperonlarının, ERAD genlerinin ve XBP1 ve CHOP gibi UPR araçlarının ifadesini destekler (Vekich ve ark., 2012; Yoshida ve ark., 2000). Bu nedenle ATF6 yolu, ER boyutunu artırabilir ve yanlış katlanmış proteinlerin bozulmasını teşvik edebilir (Fu ve ark., 2020).

2.3.4. Sitokrom P450

Bu benzersiz enzim sistemi, 1958 yılında Klingenberg ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş ve özel spektroskopik özelliklerinden dolayı P450 adı verilmiştir. O zamandan beri, sitokrom P450'lerin başlangıçta düşünülen daha karmaşık olduğu ortaya çıktı. Günümüzde de sitokrom P450'ye olan ilgi hala yüksektir ve artmaktadır. CYP1, CYP2 ve CYP3, birincil olarak eksojen substratların oksidatif metabolizmasında ve dolayısıyla beyin farmakoterapisindeki birçok ajanın etkinliğinde yer alır (Kuban ve Daniel, 2021; Stahl 2013).

Son araştırmalar, ilgili karaciğer enzimlerine kıyasla beyindeki sitokrom P450 enzimlerinin (CYP'ler) farklı düzenlemesini göstermiştir. Bu muhtemelen iki organın anatomik temeli ve fizyolojik işlevinden kaynaklanmaktadır. Beyin, beyin diğer bölümlerinden çok çeşitli nöral girdiler alan farklı hücre türlerini içeren çeşitli işlevsel yapılardan oluşan heterojen bir organdır. Her beyin yapısı benzersiz bir şekilde innerve edilir ve her hücre tipi, nöronlar ve yapılar arasındaki bağlantılara aracılık eden kendi presinaptik ve postsinaptik reseptörlerine sahiptir. Bu nedenle, belirli genlerin fizyolojik düzenlenmesi beyin bölgeleri arasında farklılık gösterir. Düzenleme şeklindeki bu farklılıklar, beyinde karaciğerden çok daha düşük seviyelerde ifade edilen sitokrom 450 enzimlerini kodlayan genlerle de ilişkilidir. Ksenobiyotik metabolizması, CYP450 enzim ekspresyonunun ve konsantrasyonlarının en yüksek olduğu karaciğerde gerçekleşir. Beyindeki toplam CYP içeriği, karaciğerdekinden önemli ölçüde daha

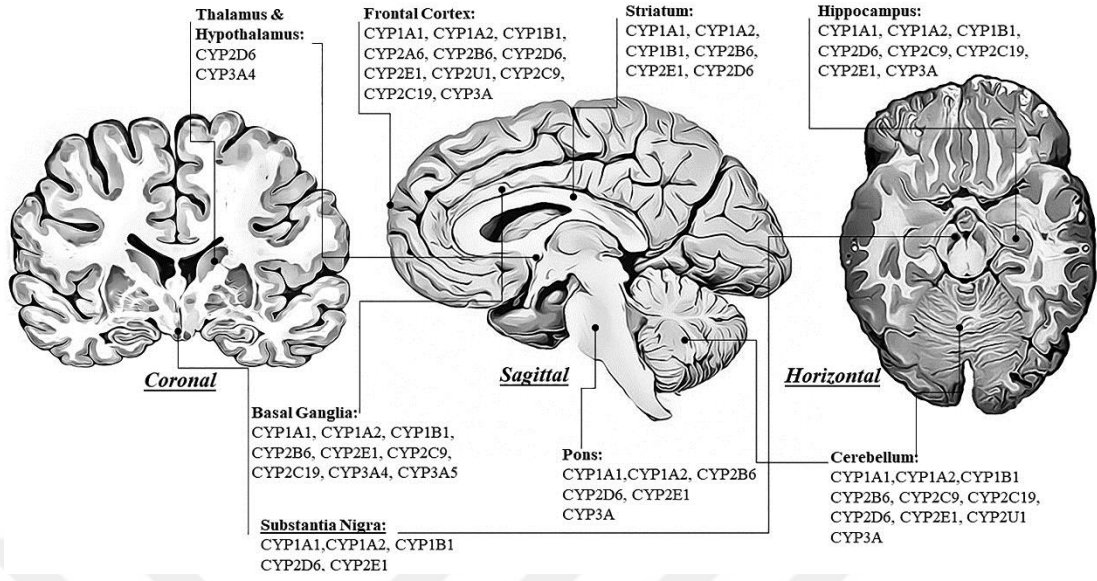
düşüktür. Karaciğer CYP oranının % 0,5-2 olduğu tahmin edilmektedir (Hedlund ve ark., 2001; Kuban ve Daniel, 2021).

2.3.4.1. Sitokrom P450'lerin Genel Özellikleri

Sitokrom P450 enzimleri olarak bilinen hemeproteinleri içeren benzersiz savunma sistemleri 1960'lardan beri bilinmektedir. Sitokromlar P450, tüm yaşam alemlerinde yaygın olan bir enzim üst ailesidir: hayvanlar, böcekler, bitkiler, mantarlar, protozoalar, bakteriler, arkealar ve virüsler. Şu anda, farklı önemli fizyolojik rollere sahip 52.675'ten fazla CYP dizisi belgelenmiştir. İnsanlar yaşamları boyunca çeşitli kimyasallara, ilaçlara, gıda katkı maddelerine ve kirleticilere maruz kalmaktadır. Bu maruziyet sonucunda hücre stabilitesi bozabilir ve zararlı etkilerle metabolizmayı bozabilir (Omura ve Sato, 1962; Raw ve ark., 1960). Bu enzimlerin adları, spektral absorpsiyon dalga boyları ile ilişkilidir. Enzimin indirgenmiş formunun spektrumu, enzim karbon monoksit ile doyurulduğunda 450 nm'de bir Sorette zirvesi gösterir ve bu, sistein tiyolatın proksimal koordinasyonunun tutulmasını yansıtır (Omura ve Sato, 1962; Omura ve Sato, 1964).

Farklı dokularda çeşitli CYP enzimleri bulunur. Sitokrom enzimlerinin çoğu, endoplazmik retikulum, mitokondri, Golgi, dış nükleer zar, peroksizomlar ve hücre zarları gibi zarlara bağlanır (Khandwala ve Kasper 1973; Sagara ve ark., 1978; Williams ve ark., 2000). Çözünür formları da vardır, ancak bunlar maya ve prokaryotlarda daha yaygındır. CYP1A1 çoğu dokuda bulunsada beyindeki eksprese olma miktarı daha yüksektir (Meyer ve ark., 2002).

Toplam CYP protein içeriği beyinde karaciğere göre önemli ölçüde düşük olmasına rağmen, bazı hücre tiplerinde karaciğerdekine benzer seviyelere ulaşmıştır (Miksys ve Tyndale, 2013). Çeşitli CYP enzimlerinin ekspresyon ve aktivite seviyeleri beyin yapıları arasında farklılık gösterir (Şekil 11).



Şekil 2.11. Beynin çeşitli bölümlerindeki sitokrom P450 ekspresyonları (Kuban ve Daniel, 2021)

Nöronlarda, sitokrom P450'nin başka işlevleri vardır: hipotalamus, hipokampus ve striatum gibi alanlarda nöron oluşumu ve büyümesi için gerekli olan sinyal moleküllerini (steroidler ve yağ asitleri) sağlar (Kuban ve Daniel, 2021). CYP enzimleri, beyin bireysel bölgelerinde ve spesifik nöronlarda ve glial hücrelerde diferansiyel olarak eksprese edilir. CYP enzimlerinin ekspresyonu en çok beyin sapında, serebellumda, hipokampusta ve striatum bölgelerinde gerçekleşir (Dutheil ve ark. 2008).

İnsanlarda, çeşitli sitokrom P450 enzimlerini kodlayan 57 gen tanımlanmıştır. Bu genler, amino asit dizisi benzerliğine dayalı olarak 18 aile ve 57 alt aile olarak sınıflandırılır. CYP 1, 2 ve 3 ailesinin üyeleri öncelikle beyindeki ksenobiyotik metabolizması ve fizyolojik süreçlerde yer alır.

2.3.4.2. Sitokrom 1 Ailesi

CYP1 ailesi, insanlarda üç fonksiyonel gen içeren CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1 olmak üzere iki alt aileden oluşur. CYP1A1 ve CYP1B1, türler arasında yüksek oranda korunmuştur (Martignoni ve ark. 2006). Özellikle, CYP1A1 aromatik hidrokarbonların metabolizmasında yer alırken, CYP1A2 aromatik aminleri ve heterosiklik türevleri dönüştürür. CYP1A1 in insan beyindeki varlığı bilinmektedir. (Chinta ve ark., 2005; McFadyen ve ark., 1998). CYP1A1 ve CYP1A2 faz I ilaç metabolizması sırasında

önemli enzimlerdendir. Antidepresan, antipsikotikler, kafein, analjezikler, antipiretikler, ve antiinflamatuvar ilaçlar gibi klinik ilaçların yaklaşık %9'unun biyotransformasyonuna katkıda bulundu bilinmektedir (Lu ve ark., 2020). CYP1A, 5-hidroksilasyon ile melatoninin sentezini ve metabolizmasını katalize eder (Hardeland, 2010; Torjman ve ark., 2017). CYP1B1 esas olarak putamenlerde (dorsal striatumun bir parçası) ve temporal ve frontal loblarda bulunur (McFadyen ve ark., 1998 ; Rieder ve ark., 1998).

2.3.4.3. CYP2 Ailesi

CYP2, CYP'lerin en büyük ailesi olup insan karaciğer CYP izoformlarının yaklaşık olarak %30'unu temsil etmektedir (Daly, 2016; Zhao ve ark., 2021). İnsan vücudunda on bir alt aile bu aileyi temsil eder (Cheng ve ark., 2003). CYP2 genleri, farklı kromozomlar üzerinde bulunur ve birkaç gen kümesinde düzenlenir (Dhers ve ark., 2017).

CYP2A alt ailesinin sitokrom P450 monooksijenazları, karaciğerde ksenobiyotik işlemede ve karaciğer dışı dokularda metabolik aktivasyonda önemli bir rol oynar (Su ve Ding, 2004).

CYP2B alt ailesinin beyinde yaygın olarak eksprese edildiği bilinmektedir (Bhagwat ve ark., 2000; Gervot ve ark., 1999; Rosenbrock ve ark., 2001; Miksys ve ark., 2003).

CYP2C enzimleri birlikte (2C8, 2C9, 2C18, 2C19) yaygın olarak uygulanan tüm ilaçların, araşidonik asidin ve bazı steroidlerin yarısından fazlasını metabolize eder. CYP2C9 ve CYP2C19, incelenen beş kişinin beyinlerinin mikrozomal fraksiyonlarında, özellikle frontal korteks, hipokampus, bazal ganglionlar (singulat korteks, Globus pallidus ve substantia nigra), amigdala (hafıza süreçleri, duygusal reaksiyonlar, kaygı) ile ilgili tespit edildi (Kuban ve Daniel, 2021). CYP2 ailesinden CYP2D6 ve CYP2C9, önemli ilaç metabolize edici faktörlerden olduğu bilinmektedir (Zhao ve ark., 2021).

Valproik asidin farmakokinetiğinde CYP2C9, CYP2A6 ve CYP2B6'nın rol oynadığı bilinmektedir (Ghodke-Puranik ve ark., 2013).

2.3.4.4. CYP3 Ailesi

CYP3 ailesinin klinikteki ilaçların %50'sinin metabolize edilmesinde rol oynadığı ve CYP3A alt ailesininde klinik ilaçların %30'unun metabolize edilmesinde rol oynadığı

bilinmektedir (Evans ve Relling, 1999; Wojnowski, 2004; Zhao ve ark., 2021). Beyindeki CYP3A enzim aktivitesinin incelenmesi, beyindeki nispeten düşük CYP konsantrasyonu ve tanımlanmış lokalizasyonunun karmaşıklığı nedeniyle zordur (Pai ve ark., 2002). Bununla birlikte, CYP3A, mRNA, protein ve birkaç fonksiyonel seviyede tanımlanmıştır. Beyin enzimleri CYP3A'nın çeşitli endojen ve ekzojen bileşikleri metabolize etme yeteneği, bunların merkezi sinir sistemindeki ilaçların kaderini ve etkisini etkileyebileceğini düşündürmektedir (Britto ve Wedlund 1992; Pai ve ark., 2002).

Günümüzde CYP3 ailesinin beyindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. CYP enziminin beyindeki konsantrasyonu, karaciğerdeki konsantrasyonun onda biri ve onbeşte biri kadardır. (Pai ve ark., 2002; Kuban ve Daniel, 2021).

2.3.5. Epilepsi ve LGI1

Epilepsi, anormal sinaptik iletimin neden olduğu en yaygın olan beyin bozukluklarından biridir. Mevcut antiepileptik ilaçların temel hedefleri olan sinaptik iyon kanallarında epilepsi ile ilişkili bir dizi mutasyon tanımlanmıştır. Epilepsinin tedavisi için yeni potansiyel hedeflerden biri, iyonik olmayan kanal tipi epilepsi ile ilişkili proteinlerin bir sınıfıdır (Yagamata ve Fukai, 2020). En iyi karakterize edilmiş iyonik olmayan kanal epilepsi ile ilişkili proteinlerden biri, nöronlar tarafından salgılanan bir protein olan lōsin açısından zengin tekrar glioma ile inaktive edilmiş protein 1'dir (Fukata ve ark., 2017). LGI1'in en az 43 mutasyonu (29 yanlış anlamlı mutasyon ve 14 silme/bozulma mutasyonu) bulunduğu bilinmektedir (Yagamata ve Fukai, 2020). LGI1'in nöbetler ve bilişsel işlev bozukluğu ile ilgiside bilinmektedir (Irani ve ark., 2010., Lai ve ark., 2010). Genetik, biyokimyasal ve klinik çalışmalar, epilepsi ve LGI1 arasında güçlü bir ilişki olduğuna dair kanıtlar topladı. Tüm bunlara rağmen LGI1'in fizyolojik işlevleri ile ilgili belirsizlik hala devam etmektedir. LGI1 ve ADAM22 reseptörünün son yapısal çalışmaları, LGI1-ADAM22'nin daha yüksek dereceli bağlanmasının aracılık ettiği transsinaptik bağlantıyı gösterir ve mutasyonlar ile bunların patogenezi arasındaki ilişkiyi aydınlatır (Yagamata ve Fukai, 2020).

Yapısal, klinik ve biyokimyasal araştırmalarla elde edilen veriler LGI1-ADAM22 etkileşiminin bozulmasının epilepsiye neden olduğu fikrini güçlendirmektedir. Bizde bu çalışmada epilepsili farelerde, tedavide kullanılan valproik asit ve ER stres inhibitörü

Fenilbütirik asit (PBA) kullanımının LGI1-ADAM22 ekspresyonlarına etkisini değerlendirdik.

2.3.6. Epilepsi ve BDNF

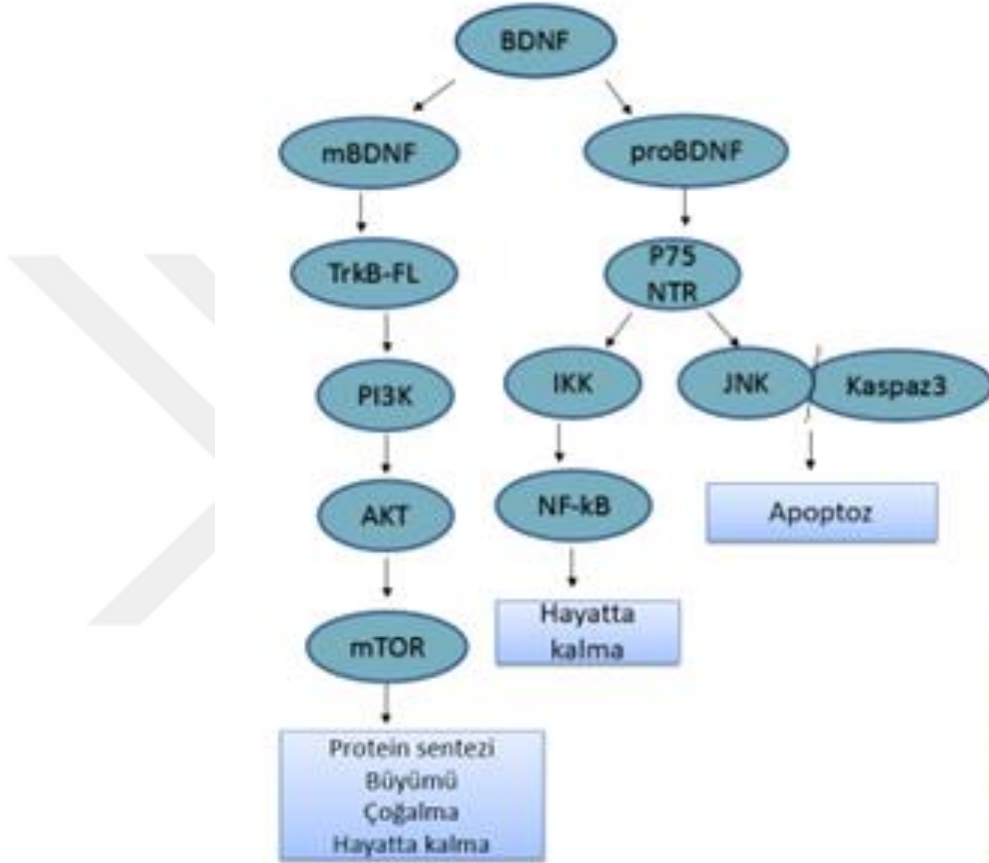
Nörotrofinler, merkezi ve periferik sinir sistemlerinde nöronal hayatta kalma, gelişme ve işlevde önemli roller oynayan, işlevsel ve yapısal olarak ilişkili proteinlerin bir ailesidir. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) de nörotrofin ailesine aittir (Sahay ve ark., 2020). Nörotrofinler erişkin beyninde nöronların hayatta kalmasını ve işlevlerini sürdürmesini sağlamaya çalışır (Lipsky ve Marini, 2007). Nörotrofinler içerisinde en bolca bulunanı, çeşitli organlarda ve beyinde nöronlar, glial hücreler ve bilhassa astroitler tarafınca eksprese olan beyin kaynaklı nörotrofik faktördür (BDNF) (Bazzari ve Bazzari, 2022). BDNF'nin ekspresyon düzeyi, insan serebral korteksinde ve murin modellerinde görüldüğü gibi, çevresel faktörler, birincil duyuşal kortekslerde ve hipokampusta BDNF seviyelerini artırmaktadır. Duyuşal yoksunluk durumunda ekspresyon düzeylerinde tam tersi durumlar gözlenmektedir (Lipovich ve ark., 2012; Nanda ve Mack, 2000; Valles ve ark., 2011).

Epilepsiler, BDNF/TrkB sinyalinin önemli bir rol oynadığı kabul edilen pek çok hastalıktan sadece biridir. Uzun zamandır devam eden nöbetlerin sonucunda BDNF ekspresyonunun seviyesini arttığı keşfi, bu konuya olan ilginde artmasını sağlamıştır (Isackson ve ark., 1991). Farelerde uygulanan kindling modeliyle epilepsi geliştirilmesi sonucunda BDNF heterozigot farelerde bozulduğunun fark edilmesiyle endojen BDNF/TrkB sinyalinin epileptogenezi teşvik etmiş olduğu hipotezini ortaya çıkarmıştır (Kokaia ve ark., 1995). Bunu, bir takım detaylı araştırmanın yayınlandığı detaylı bir literatür izlemiştir (Binder ve ark., 2001; Hu ve Russek, 2008; McNamara ve Scharfman, 2012).

2.3.6.1. BDNF İletimi

İnsanda proBDNF proteini, beyin bölgesine özgü işlevlere sahip BDNF geni tarafından kodlanır (Pruunsild ve ark., 2007). Daha sonra proBDNF sortilin ve p75 nörotrofin reseptörüne (p75 NTR) bağlanır. Sinaptik depresyona ve nöral apoptoza neden olan JNK/kaspaz3 yollarını aktive eder yada transkripsiyon faktörü NF-kB aktive ederek hayatta kalma yolunu seçer. proBDNF hücre içi bölünerek proteolitik olarak olgun bir

forma (mBDNF) işlenir. TrkB'nin mBDNF ile birleşmesi, hücrenin hayatta kalması ve sinaptik plastisiteyi korumak için ERK1/2 ve PI3K/Akt sinyal yollarının aktivasyonu ve memeli rapamisin hedefi (mTOR) ile sonuçlanır (Şekil 2.12) (Numakawa ve Odaka, 2021).



Şekil 2.12. BDNF sinyal yolları (Bazzari ve Bazzari, 2022; Fu ve ark., 2020; Numakawa ve Odaka, 2021)

2.3.7. 4-Fenilbütirik Asit (4-PBA)

Fenilbütirik asit (PBA) ilk olarak uzun zaman önce benzenbütirolakton ve alüminyum klorürün reaksiyonuyla sentezlendi. Amonyak temizleme özelliğiyle tanınan PBA, üre döngüsü bozukluklarının tedavisi için FDA onaylıdır. Son çalışmalar, PBA'nın geniş kapsamlı biyolojik etkilerini göstermiştir. PBA yanlış katlanmış olan proteinlerin birleşmesini sağlamak için endoplazmik retikulum (ER) şaperonu görevi görür. (He ve Moreau, 2019). Bizde bu çalışmada valproik asit (VPA) ve 4-fenilbutirik asidin (4-PBA) akut başlangıçlı pentilentetrazol kaynaklı (PTZ) nöbetlerde anormal beyin

elektriksel aktivitesi, endoplazmik retikulum stresi ve apoptoz üzerine etkilerini araştırıyoruz.

2.4. DENEYSEL EPİLEPSİ MODELLERİ

Hastalığa uygun model oluşturduktan sonra teşhis için gerekli adımları uygulayarak klinik vakalarda oluşabilecek hastalıkları hızlı bir şekilde teşhis edebiliyoruz. Hayvanlarda kullanılan başarılı tedaviler, insanlarda potansiyel hastalıkları önlemeye yönelik etkili müdahaleler için zaman kazandırabilir. Deney hayvanları kullanılarak oluşturulan modellerden elde edilen simülasyonlar, epilepsinin fizyopatolojik mekanizmalarını anlamak için uzun yıllardır kullanılmaktadır (Campos ve ark., 2017).

Araştırmacılar, deney hayvanlarında epilepsi modelleri oluşturuyor ve tedavi seçeneklerini keşfetmek için hastalık simülasyonları yürütüyor. Ana hedef, ilaç keşfi için etkinlik analizlerinin yayınlanmasıdır. Bu amaçla, hastalığın farklı formlarını görüntülemek için deneysel epilepsi modelleri oluşturulmuştur. Epileptik nöbetler hem hayvanlarda hem de insanlarda spontan olarak görülebilir. Hayvan nöbetleri nadirdir ve deneyseldir. Kurslarda kullanım için belirli gereksinimlerin karşılanması gerekir. Bu nedenle deneysel çalışmalarda kullanılabilecek ve araştırmacıların bulgularını destekleyen uygun hayvan modelleri geliştirilmiştir (Özkan, 2020).

Epilepsinin daha iyi anlaşılması için hayvan modellerinin de daha iyi anlaşılması gerekiyor. Epilepsinin morfolojisini anlamak için, aktif bileşenlerin ve yöntemlerin sonucunu belirlemek için birçok hayvan modeli kullanılmıştır.

Tablo 2.4. Deneysel Epilepsi Hayvan Modelleri Ve Modelin Oluşturulmasında Kullanılan Yöntem Veya Etken Maddeler (Özkan, 2020)

Epilepsi Modeli	Etken Veya Epilepsi Oluşturma Yöntemi
Basit Parsiyel Epilepsinin Akut Modelleri	Penisilin (Postnova ve ark., 2010), bikukulin (Inostroza ve ark., 2012), pikrotoksin (Usunoff ve ark., 1969), striknin (Fisher, 1989), kolinerjik (Ferguson ve ark., 1971), antikolinerjik maddeler (Daniels ve Spehlmann, 1973), (Campos ve ark., 2018)
	Akut elektriksel uyarı (Kandratavicius ve ark., 2014)
	GABA kesilmesi (Brailowsky ve ark., 1987)
	Neokorteks ve hipokampus dilimleri (McCormick ve ark., 1985)
Basit Parsiyel Epilepsinin Kronik Modelleri	Beyin kabuğuna metal uygulanması; alüminyum, kobalt, nikel (Kopeloff, 1960), krom, kalay, tungsten, bizmut, kadmiyum, titanyum, demir, civa, vanadyum, berilyum, kurşun, çinko (Chusid ve Kopeloff, 1962)
	Soğutma (Hanna ve Stalmaster, 1973)
	Işın verme (Remler ve ark., 1986)
Kompleks Parsiyel Epilepsi Modelleri	Kainik asit (Faingold ve Browning, 1987)
	Tetanoz toksini (Carrea ve Lanari, 1962)
	Prepriform korteks (Pireddave Gale, 1982)
	Kindling (tutuşma) modeli (Deflorida ve Delgado, 1958)
Petit Mal Epilepsi Modelleri	Çift taraflı odak (Fisher ve Prince, 1977), Luitelaar ve ark., 2014)
	Sistemik penisilin (Bloomerve ark., 1967)
	Gama-Hidroksi Bütirat (Snead, 1988)
	Opioid peptid (Snead ve Bearden, 2006)
	Genetik (Coenen, 1987)
Grand Mal (Jeneralize Tonik Klonik) Epilepsi Modelleri	Büyük nöbet (Gloor ve Fariello, 1988)
	Fotosensitizasyon (Meldrum, 1984) odyojenik fare (Seyfried ve Glaser, 1985)
	Etanol (Bağırıcı ve Bostancı, 2001)
	Maksimal elektroşok (MES) (Luszczki ve ark., 2006)
	Pentilentetrazol, penisilin (Bo ve ark., 1984)
Status Epileptikus Modelleri	Lityum pilokarpin (Buterbaugh ve ark., 1986).
	Kobalt homosistin (Walton ve Treiman, 1988)
	Elektrik situmilasyonu (Vicedomini ve Nadler, 1987), Kandratavicius ve ark., 2014)

2.4.1. Kindling (tutuşma) Modeli

Kindling, beynin fokal elektriksel stimölasyonu ile oluşturulan epilepsi hayvan modellemesidir. Ateşleme modellemesi, insanlarda epileptik indüksiyona nasıl katkıda bulunabileceğini ortaya çıkardı ve var olan mekanizmaların altında yatan elektriksel uyarımı inceledi. Esasen ateşleme, beynin farklı bölümlerinde elektriksel impulsları artıran tekrarlayan aktivite nedeniyle oluşur (Alonso-DeFlorida ve Delgado, 1958)

İlk ateşleme çalışmaları farelerde yapılmış olsa da, sonraki ateşleme çalışmaları bu olguyu fareler, sıçanlar, kediler, köpekler ve birçok primat dahil olmak üzere birçok memeli türünde kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Kindling, hem epileptojenik hem de kronik epilepsi için önemli bir model olmaya devam ediyor (McIntyre ve ark; 2002)

2.4.1.1. PTZ Kindling Modeli

Pentilentetrazol (PTZ) kullanan bir kimyasal ateşleme yöntemi olup Mason ve Cooper tarafından 1972'de tarif edilmiştir (Mason ve Cooper 1972). PTZ, bir gama-aminobütirik asit (GABA)-A reseptörü antagonistidir (Shimada ve Yamagata, 2018).

Antiepileptik ilaçların test edilmesi ve hastalığın olası etiyolojisini daha iyi olarak tanımlamak için bir epilepsi kindling modeli geliştirilmektedir. Kindling, sonuçta davranışsal ve elektriksel nöbetlerin gelişmesine yol açan nöral yolların tekrarlayan elektriksel veya kimyasal uyarımı olarak tanımlanabilir. Çoğunlukla kullanılan yakma modellerinden birisinde PTZ kindling modelidir (Mortazavi ve ark., 2005).

PTZ ateşleme modelinin, nöbetlerin ortaya çıkmasına yardımcı olduğu ve nöbetleri azaltmak için kullanılan ilaçların etkinliğini test etmede etkili olduğu gösterilmiş olsa da, nöbetlerden sonra bilişsel ve duygusal sorunların tedavisinde etkili olduğu tam olarak araştırılmamıştır (Mortazavi ve ark., 2005). PTZ, epilepsi tedavisi için etkili antiepileptik ilaçlar geliştirmek için araştırmalarda en yaygın olarak kullanılan kimyasaldır (Marangoz, 1997).

PTZ ateşleme modeli insan epilepsisinde görölenlere benzeyen davranışsal, duygusal ve nöropatolojik eksiklikler için potansiyel terapötikler için bir ekran görevi gördüğü yararlı bir model olarak bilinmektedir (Mortazavi ve ark., 2005).

2.5. EPİLEPSİ VE DAVRANIŞ TESTLERİ

Nörobilim çalışmalarında epilepsi, depresyon ve anksiyete gibi hastalıkların davranış üzerinde etkisinin ölçülebilmesi için açık alan, yüzmeye zorlama gibi pek çok yöntem geliştirilmiştir.

2.5.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi ilk olarak 1934 yılında Hall tarafından kemirgenlerde duygusal davranışları ölçmek amaçlı geliştirilmiş ve fareler, domuzlar, kuzular, tavşanlar, sıçanlar, buzağılar, primatlar, arılar ve ıstakozlar da dahil olmak üzere çok sayıda hayvan türünde kullanılmaktadır (Pruet ve Belzung, 2003). Açık alan testi başlangıçta davranış psikologları tarafından geliştirilmiştir, ancak uygulamaları nörobilim ve psikofarmakoloji dahil olmak üzere diğer birçok alana yayılmıştır (Choleris ve ark., 2001; Menard ve Treit 1999;) Açık alan testi, günümüzde hayvan psikolojisini tanımlayan en popüler yöntemlerden biridir (Choleris ve ark., 2001). Bu tür ortamları doğası gereği tehlikeli olarak algılayabilirler.

Test yapısı, 50×50 cm taban alanı ve 30 cm yüksekliğinde kenarları olan üstü açık bir yapıdan oluşmaktadır. Tabanın 16 eşit kareye bölündüğü düzenekte fare köşeden bırakılarak serbestçe dolaşmasına izin verildi.

Doğal olarak aydınlık, açık bir ortamdan uzaklaşan fareler için merkezi bekleme süresi, motor aktiviteyi test etmek için kullanılan 5 dakikalık zamanda hayvanın geçtiği kare sayısı, araştırma aktivitesi için de arka ayakları üzerinde şahlanarak etrafı inceleme (rearing) sayısı değerlendirildi. Korku seviyesini ölçmek için ise 5 dakikalık zaman periyodu içerisinde test alanına yaptığı defekasyon (dışkı) sayısı belirlendi (Mortazavi ve ark., 2005). Sonraki deneylerde önceki farelerden kaynaklanan olası koku işaretleme etkilerini ortadan kaldırmak için test alanı %70 alkolle temizlendi (Phillips, 1982).

2.5.2. Yüzmeye Zorlama Testi

Yüzmeye zorlama davranış testi, ani ve kaçınılmaz stresle başa çıkma stratejilerini ölçer ve stres tepkisinin nöral koluna dair benzersiz bir içgörü sağlar (Commons ve ark., 2017). Bu test ilk kez 1977'de Porsolt tarafından uygulanmıştır (Commons ve ark., 2017; Porsolt ve ark., 1977). Bu yöntemde, kaçıışı olmayan bir durumda yüzmeye zorlanan fareler, başlangıçtaki şiddetli bir aktiviteden sonra sonunda tamamen hareket etmeyi

bırakır ve sadece başlarını su yüzeyinde tutmak için gerekli hareketleri yaptığı gözleme dayalıdır. Bu karakteristik ve kolayca tanımlanabilen hareketsiz davranış, farelerin kaçmanın imkansız olduğunu öğrendiğini ve deneysel koşullara boyun eğdiğini ima eden umutsuz bir durumu gösterdiği düşünülmektedir (Commons ve ark., 2017; Molendijk ve Kloet, 2015; Porsolt ve ark., 1977).

Deney düzeneğinde 30 cm uzunluğunda dört şeffaf cam silindir kullanılmıştır. Cam silindirin içi 20 cm uzunluğa kadar $22\pm1^{\circ}\text{C}$ 'deki su ile dolduruldu. Fareler daha sonra yüzmeleri için cam silindire bırakıldı. Fare davranışı 7 dakika boyunca gözlemlendi, ancak kamera tarafından yalnızca son 5 dakika kaydedildi. Farelerin suya ilk girdiklerinde aşırı mücadele etmeleri, ilk 2 dakikanın değerlendirme dışı bırakılması neden oldu. Farelerin mücadele (tırmanma ve hızlı yüzme hareketi), aktif yüzme ve hareketsiz (su üzerinde kalabilmek için harcadığı minimum çaba) açısından değerlendirildi. Test bittikten sonra fareler kağıt havlu ile silinerek kafeslerine yerleştirildi (Cryan ve ark., 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler Aletler

- Buzdolabı +4 (Vestel +^o4C)
- Derin Dondurucu (Vestel -20^oC)
- Derin Dondurucu (New Brunswick -80^oC)
- Otomatik Mikropipetler (Thermo Scientific)
- Otomatik Makropipet (Thermo Scientific)
- Santrifüj (Thermo Scientific)
- Kamera (Xiaomi Mi Home Security Camera)
- Mikroskop
- Protein Elektroforezi (BIO-RAD)
- SONICS Vibra cell
- Etüv (Panasonic)
- Glomax multi detection system(Promega)
- Açık alan davranış testi ünitesi
- Deney hayvanları kafes sistemi

3.1.2. Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

- Pentilentetrazol (Sigma Aldrich)
- Sodyum valporat (Depakin 400mg/4ml)
- Sodium 4- phenylbutyrate (BIOSYNTH Carbosynth)
- Ketamin (Alfamine)
- Ksilazin (Rompun)
- Serum fizyolojik sıvısı (Biofleks)
- 1 ml enjektör (Beybi)
- Pipet uçları (Isolab)
- Eppendof tüp (Isolab)
- 96 kuyucuklu plate (Cellstar)

3.2. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 08.09.2021 tarih ve 21/175 karar nolu onayı ile Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden temin edilen 56 adet 8 haftalık BALB/c türü dişi fare kullanıldı. Deney süresi boyunca fareler oda sıcaklığında (22-24°C) 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde barındırıldı ve yemek ve su kısıtlaması yapılmadı. Tüm deneyler aynı saatlerde yapıldı, böylece fareler sirkadiyen ritimdeki değişikliklerden etkilenmedi.

3.3. ÇALIŞMA TASARIMI

Hayvanlar her grupta 8 fare olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. G1 (Kontrol), G2 (4-PBA+PTZ), G3 (PTZ+VPA), G4 (VPA+PTZ), G5 (PTZ), G6 (4-PBA), G7(VPA). Epilepsi oluşturmak için PTZ ile indüklenen kindling modeli uygulandı (Göl ve ark., 2019; Hansen ve ark., 2004; Mortazavi ve ark., 2005; Tadayuki ve ark., 2018). Kindling gelişinceye kadar günaşırı 5. Gruptaki farelere serum fizyolojik (SF) solüsyonunda çözünen 30 mg/kg PTZ enjekte edildi, kontrol grubu (1.grup) farelere de aynı hacimde serum fizyolojik intraperitoneal (İP) olarak verildi. 7. Gruba da VPA

(200mg/kg) İP uygulandı. 4.gruptaki farelere VPA (200mg/kg) 30 dakika sonra serum fizyolojik (SF) solüsyonunda çözünen 30 mg/kg PTZ İP verilecek ve 3. gruptaki farelere önce PTZ (30mg/kg) 30 dakika sonra VPA (200mg/kg) İP verildi. 6. gruptaki farelere 4-PBA (100mg/kg) dozda ip olarak enjekte edildi. 2. Gruba ise 4-PBA (100mg/kg) dozda ip olarak uygulanacak ve 20 dk sonra da PTZ (30mg/kg) enjeksiyonu yapıldı. Farelere tüm enjeksiyonlar aynı saatte (10:00-12:00) olmak üzere toplam 14 enjeksiyon yapıldı. Son enjeksiyondan 10 gün sonra artmış konvülsan duyarlılığın devamını kontrol etmek için son bir kez daha enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyonların süre ve doz ayarlaması literatürde belirtildiği gibi gerçekleştirildi (Abdel-Salam ve ark., 2020; Göl ve ark., 2019; Rzayev ve ark., 2022; Yu ve ark., 2019).

Tablo 3.1. Deney Grupları

G1 (KONTROL)	
G2 (4PBA+PTZ) 4-PBA 20 dk sonra PTZ	
G3 (PTZ+VPA) PTZ 30 dk sonra VPA	
G4 (VPA+PTZ) VPA 30 dk sonra PTZ	
G5 (PTZ)	
G6 (4-PBA)	
G7 (VPA)	

3.3.1. Çözeltilerin Hazırlanması ve Enjeksiyonu

3.3.1.1. PTZ

PTZ dozunu 30 mg/kg'a ayarlamak için, hayvanlar enjeksiyondan önce tartıldı ve ortalama vücut ağırlıkları 30 g idi. Hayvana enjekte edilen 0,1 ml'lik çözeltinin içeriği:

$$\begin{array}{rcl} 30 \text{ mg} & \times & 1000 \text{ g} \\ 0,9 \text{ mg} & \times & 30 \end{array}$$

Şeklinde hesaplanarak 0.9 mg PTZ, 0.1 ml salin içinde çözüldü ve enjekte edildi.

3.3.1.2. 4-PBA

100 mg/kg 4-PBA dozunu ayarlamak için, hayvanlar enjeksiyondan önce tartıldı ve ortalama ağırlıkları 30 g idi. Hayvana enjekte edilecek olan 0.45 ml lik solüsyonun içeriği ise;

$$\begin{array}{rcl} 100 \text{ mg} & \times & 1000 \text{ g} \\ 3 \text{ mg} & \times & 30 \text{ g} \end{array}$$

Şeklinde hesaplanarak 3 mg 4-PBA, 0.45 ml fizyolojik salin içinde eritildi ve enjekte edildi.

3.3.1.3. VPA

VPA dozunu 200 mg/kg'a ayarlamak için, hayvanlar enjeksiyondan önce tartıldı ve ortalama vücut ağırlıkları 30 g idi. Hayvana enjekte edilen 0,1 ml'lik çözeltinin içeriği:

$$\begin{array}{rcl} 200 \text{ mg} & \times & 1000 \text{ g} \\ 6 \text{ mg} & \times & 30 \text{ g} \end{array} \quad \begin{array}{rcl} 6.66 \text{ ml} & \times & 400 \text{ mg} \\ 0,1 \text{ ml} & \times & 6 \text{ mg} \end{array} \quad 6.66 - 4 = 2,66 \text{ ml}$$

şeklinde hesaplanarak ve 400mg/4ml olan ilaca 2,66ml daha serum fizyolojik eklenerek istenilen doz ayarlanmıştır. Tek bir enjeksiyon ise 0.1ml olarak enjekte edilmiştir.

Her PTZ enjeksiyonundan sonra, hayvanlar 30 dakika gözlemlendi ve Racine ölçeğine göre değerlendirildi.

Evre 0: yanıt yok

Evre 1: kulaklar ve yüzde seyirmeler

Evre 2: vücuda yayılan konvulzif dalga

Evre 3: myoklonik jerkler ya da arka ayaklar üzerinde şaha kalkma

Evre 4: Hayvanın olduğu yere düşmesi ile birlikte klonik nöbetler

Evre 5: Tekrarlayan şiddetli tonik-klonik ya da ölümcül nöbetler

3.4. DAVRANIŞ TESTLERİ

Son enjeksiyondan iki gün sonra hayvanlara açık alan ve yüzmeye zorlama testleri uygulandı.

3.4.1. Açık Alan Testi

Test yapısı, 50×50 cm taban alanı ve 30 cm yüksekliğinde kenarları olan üstü açık bir yapıdan oluşmaktadır. Tabanın 16 eşit kareye bölündüğü düzenekte fare köşeden bırakılarak serbestçe dolaşmasına izin verildi.

Doğal olarak aydınlık, açık bir ortamdan uzaklaşan fareler için merkezi bekleme süresi, motor aktiviteyi test etmek için kullanılan 5 dakikalık zamanda hayvanın geçtiğı kare sayısı, araştırma aktivitesi için de arka ayakları üzerinde şahlanarak etrafı inceleme (rearing) sayısı değerlendirildi. Korku seviyesini ölçmek için ise 5 dakikalık zaman periyodu içerisinde test alanına yaptığı defekasyon (dışkı) sayısı belirlendi. Sonraki deneylerde önceki farelerden kaynaklanan olası koku işaretleme etkilerini ortadan kaldırmak için test alanı %70 alkolle temizlendi (Phillips, 1982).



Şekil 3.1. Açık Alan Testi

3.4.2. Yüzmeye Zorlama Testi

Deney düzeneğinde 30 cm uzunluğunda dört şeffaf cam silindir kullanılmıştır. Cam silindirin içi 20 cm uzunluğa kadar $22\pm1^{\circ}\text{C}$ 'deki su ile dolduruldu. Fareler daha sonra yüzmeleri için cam silindire bırakıldı. Fare davranışı 7 dakika boyunca gözlemlendi, ancak kamera tarafından yalnızca son 5 dakika kaydedildi. Farelerin suya ilk girdiklerinde aşırı mücadele etmeleri, ilk 2 dakikanın değerlendirme dışı bırakılması neden oldu. Farelerin mücadele (tırmanma ve hızlı yüzme hareketi), aktif yüzme ve hareketsiz (su üzerinde kalabilmek için harcadığı minimum çaba) açısından değerlendirildi. Test bittikten sonra fareler kağıt havlu ile silinerek kafeslerine yerleştirildi (Cryan ve ark., 2002).



Şekil 3.2. Yüzmeye Zorlama Testi

Davranış testinden beş gün sonra, hayvanlara 10 mg/kg ksilazin ve 60 mg/kg ketamin ile anestezi uygulanarak sakrifikasyon gerçekleştirildi. Western blot ve immünohistokimyasal analiz için beyin dokusu toplandı.

3.5. PROTEİN ANALİZLERİ

3.5.1. Western Blot

Sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokuları p-mTOR, LGI1 ve CHOP proteinlerinin analizi için ripa buffer içine alınarak lizat haline getirildi ve hücrelerin

parçalanması için sonics vibra cell cihazı (pulse 10/10, time20sn, ampl %65) kullanıldı. Daha sonra 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi, süpernatant yeni bir Eppendorf'a aktarıldı ve Bradford yöntemi kullanılarak protein konsantrasyonu belirlendi. Stok proteinler kullanılana kadar -20°C'de saklandı.

Protein konsantrasyonu değerlerini belirlemek için, önce 2 mg/ml'lik bir stok albümin konsantrasyonu seyreltilerek bir standart hazırlandı. Damıtılmış su 'boş değer' olarak kullanıldı. Standartlar, numuneler ve boşluklar ölçüldü ve her biri 5 ul'de 96 oyuklu plakalara yüklendi. Daha sonra üzerlerine 200 µl reaktif (Thermo) eklendi ve 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. Son olarak, 595 nm dalga boyunda protein ölçümleri yapıldı. Standart eğri %99 ise ölçümler doğru kabul edildi. Hesaplamalar her numunenin konsantrasyonuna göre yapıldı ve eşit protein değerleri için jeller yüklendi. Hazırlanan markörler ve numuneler jel üzerine yüklendi ve yaklaşık 120 dakika 110 voltta çalıştırıldı. Proteinler daha sonra PVDF zarlarına aktarıldı. Oda sıcaklığında %5 yağsız kuru süt ile bloke edin. Yıkama, TBS-T içinde yapıldı ve antikorlar, üreticinin talimatlarına göre antikor seyreltme tamponunda (1X TBS-T + %5 BSA) seyreltme yoluyla hazırlandı. Membranlar, primer antikor ile gece boyunca +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, zarlar üç kez 15 dakika süreyle tamponla (1X TBS-T + %0.02 Tween 20) yıkandı ve ikincil antikorla işlendi. Daha sonra yıkandı ve 3 dakika HRP substratı (ECL) uygulandı. Son olarak bir görüntüleme cihazı ile gözlemlendi (Karabulut ve ark., 2021).

3.5.2. İmmünohistokimya

İmmünohistokimyasal değerlendirme için parafin bloklardan 5 µm'lik seri kesitler alındı ve polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan preparatlar, standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilen ile deparafinize edildi ve dereceli bir alkol serisinden geçirilerek seyreltildi. CYP2C19, KASPAZ 3, CYP3A4, CYP450, CYP1A1-2, BDNF, NFKB, GRP78 Birincil antikor optimizasyonu sağlandıktan sonra, üreticinin talimatlarına göre standart protokoller kullanılarak immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan örneklerin Leica mikroskobu kullanılarak 4x ve 10x büyütmede fotoğrafları çekildi. Antikor ekspresyon yoğunluğu, Image J programı ile ölçüldü (Karabulut ve ark., 2021).

Tablo 3.3. İmmünohistokimyasal Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	18	Sekonder Antikor	10 dakika
2	Ksilen I	20 dakika	19	PBS	3x5 dakika
3	Ksilen II	20 dakika	20	Strepta Avidin	10 dakika
4	Ksilen III	20 dakika	21	PBS	3x5 dakika
5	Absolu Alkol I	20 dakika	22	DAB	1-5 dakika
6	Absolu Alkol II	20 dakika	23	Distile Su	2x3 dakika
7	%96 Alkol	20 dakika	24	Gill Hematoksilen	45 saniye
8	%70 Alkol	20 dakika	25	Akarsu	5 dakika
9	%50 Alkol	20 dakika	26	%50 Alkol	10 dakika
10	Distile Su	2x5 dakika	27	%70 Alkol	10 dakika
11	Hidrojen Peroksit	12 dakika	28	%96 Alkol	10 dakika
12	Distile Su	2x5 dakika	29	Absolu Alkol I	10 dakika
13	Sitrat Buffer	2x15 dakika	30	Absolu Alkol II	10 dakika
14	PBS	2x5 dakika	31	Ksilen I	20 dakika
15	Serum Blok	10 dakika	32	Ksilen II	20 dakika
16	Primer Antikor (6-18°C)	1 gece	33	Kapatma	
17	PBS	3x5 dakika			

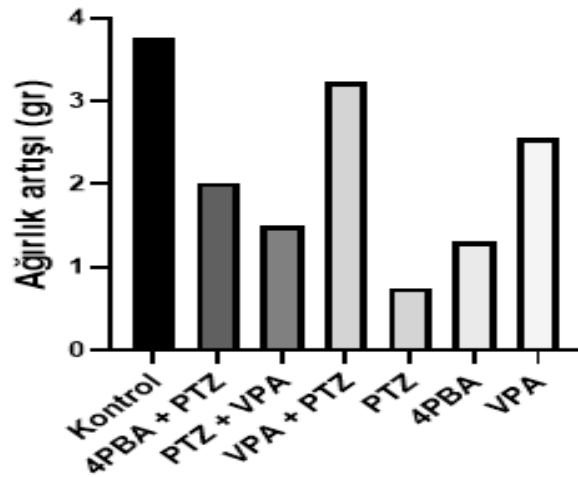
3.6. VERİ ANALİZİ VE İSTATİSTİKLER

İstatistiksel değerlendirmesi yapılan; proteinlerin ekspresyon yoğunlukları, farelerin ağırlık değişimleri, merkezde bulunma süresi, şahlanma sayısı, defekasyon sayısı, geçtiği kare sayısı, aktif yüzme, hareketsiz kalma ve mücadele parametreleri için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. İstatistiksel hesaplamalar ve grafikler GraphPad Prism 9 programı kullanılarak oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarında Ağırlık Değişimi

Deneysel çalışma sırasında fareler, deney başlamadan önce, sekizinci enjeksiyondan önce ve deney süresi sonunda üç kez tartıldı. Şekil 4.1'de bir ağırlık artışı grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Gruplar arası ağırlık artış farkı

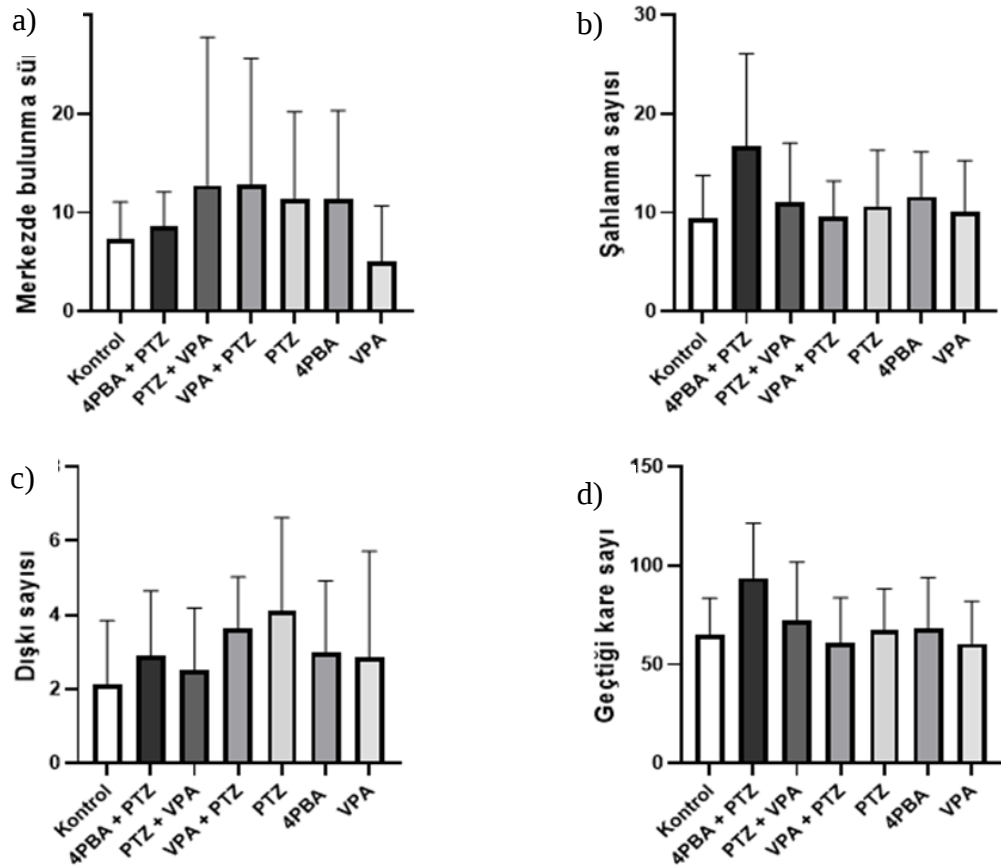
4.2. Deney Hayvanlarında Nöbet Takibi

Deneysel süreçte tüm PTZ enjeksiyonlarından sonra farelere 30 dk boyunca nöbet takibi yapılmış ve Racine Skalası (Evre 0: yanıt yok, Evre 1: kulaklar ve yüzde seyirmeler, Evre 2: vücuda yayılan konvulzif dalga, Evre 3: myoklonik jerkler ya da arka ayaklar üzerinde şaha kalkma, Evre 4: Hayvanın olduğu yere düşmesi ile birlikte klonik nöbetler, Evre 5: Tekrarlayan şiddetli tonik-klonik ya da ölümcül nöbetler)'na göre

değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda sadece PTZ grubunda Evre 1 ve Evre 2 nöbetler gözlemlendi. Diğer gruplarda bu evre 0 olarak değerlendirildi.

4.3. Açık Alan Testi Verileri ve Gruplar Arası Karşılaştırmaları

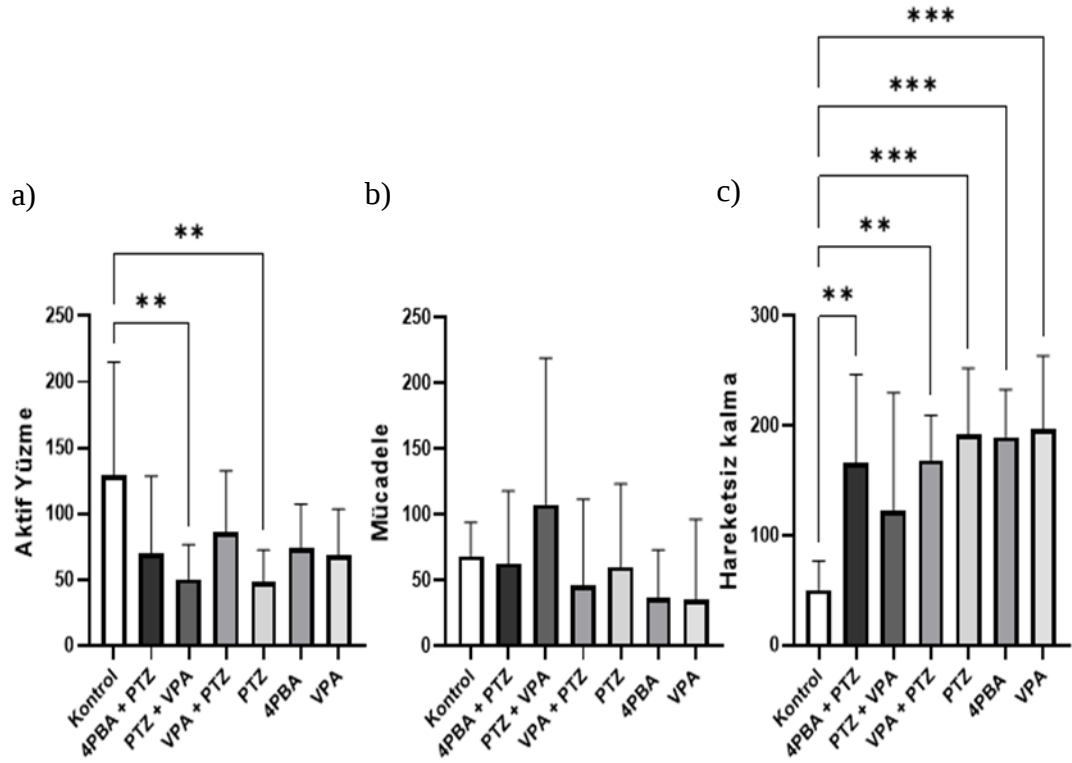
Sonuçta beş dakikalık zaman diliminde kontrol grubuna göre; merkezde bulunma süreleri incelendiğinde PTZ+VPA ve VPA+PTZ grubunda nispeten daha yüksek olduğu, şahlanma sayılarında 4-PBA+PTZ grubunda daha yüksek olduğu, dışkı sayısının PTZ grubunda daha yüksek olduğu ve geçtiği kare sayısının 4-PBA+PTZ grubunda nispeten daha yüksek olduğu gözlemlendi fakat bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Açık alan testi. a) Farelerin merkezde bulunma süresi, b) Farelerin şahlanma sayısı, c) Farelerin dışkı sayısı, d) Farelerin geçtiği kare sayısı

4.4. Yüzmeye Zorlama Testi Verileri ve Gruplar Arası Karşılaştırmaları

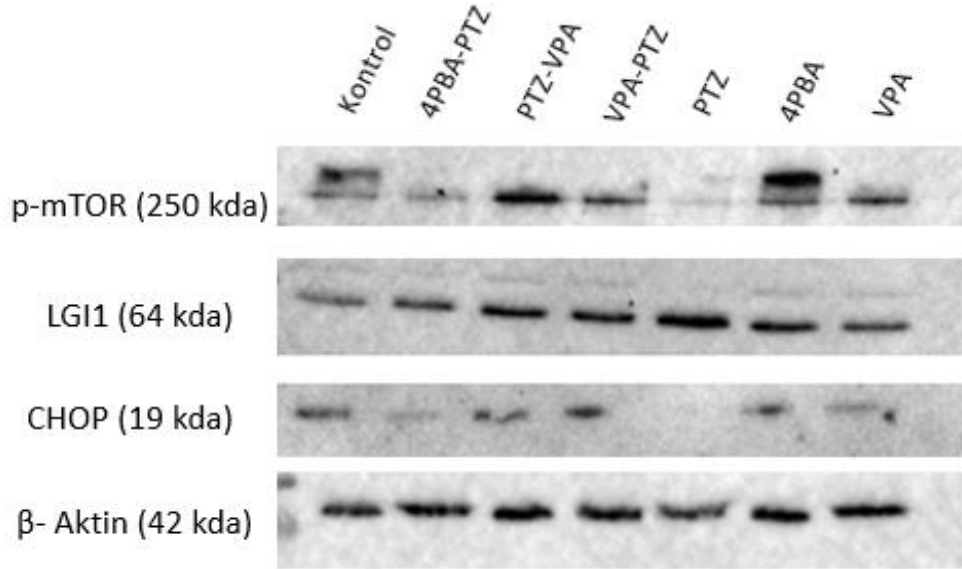
Yüzmeye zorlama testinde farelerin aktif yüzme, hareketsiz kalma ve mücadele davranışları değerlendirildi. Aktif yüzme davranışında kontrol grubu PTZ ve PTZ+VPA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Mücadele davranışında PTZ+VPA grubunun diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Hareketsiz kalma davranışında ise kontrol grubu 4PBA-PTZ, VPA-PTZ, PTZ, 4PBA, VPA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük olduğu görüldü. PTZ+VPA grubunda ise kontrol grubuna göre yüksel olsada istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Yüzmeye zorlama testi a) Aktif yüzme b) Mücadele c) Hareketsiz kalma

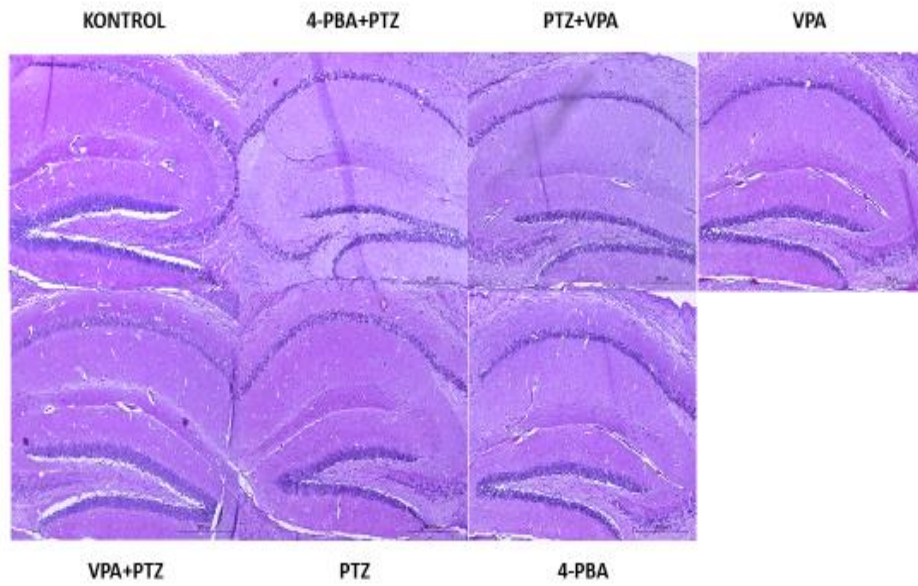
*: p<0.05, **:p<0.005, ***: p<0.0005

4.5. Western Blot Protein Analiz Verileri ve İstatistikleri

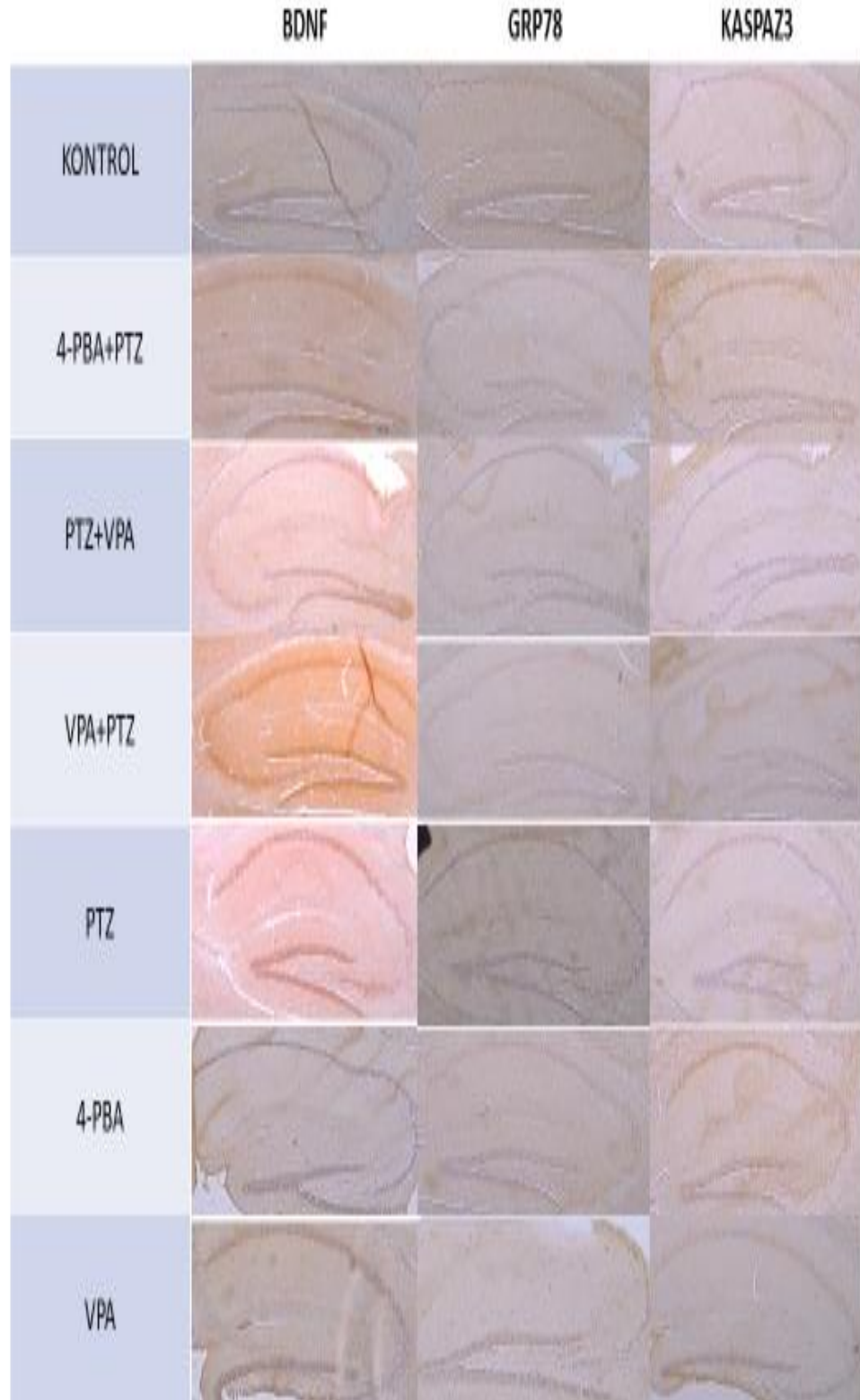


Şekil 4.4. Western blot protein analizi. CHOP, pmTOR ve LGI1 proteinlerinin analizi için Western blot tekniği kullanılmıştır.

4.6. İmmünohistokimyasal Boyama ve Protein Analiz Verileri



Şekil 4.5. Hematoksilen Eozin boyaması

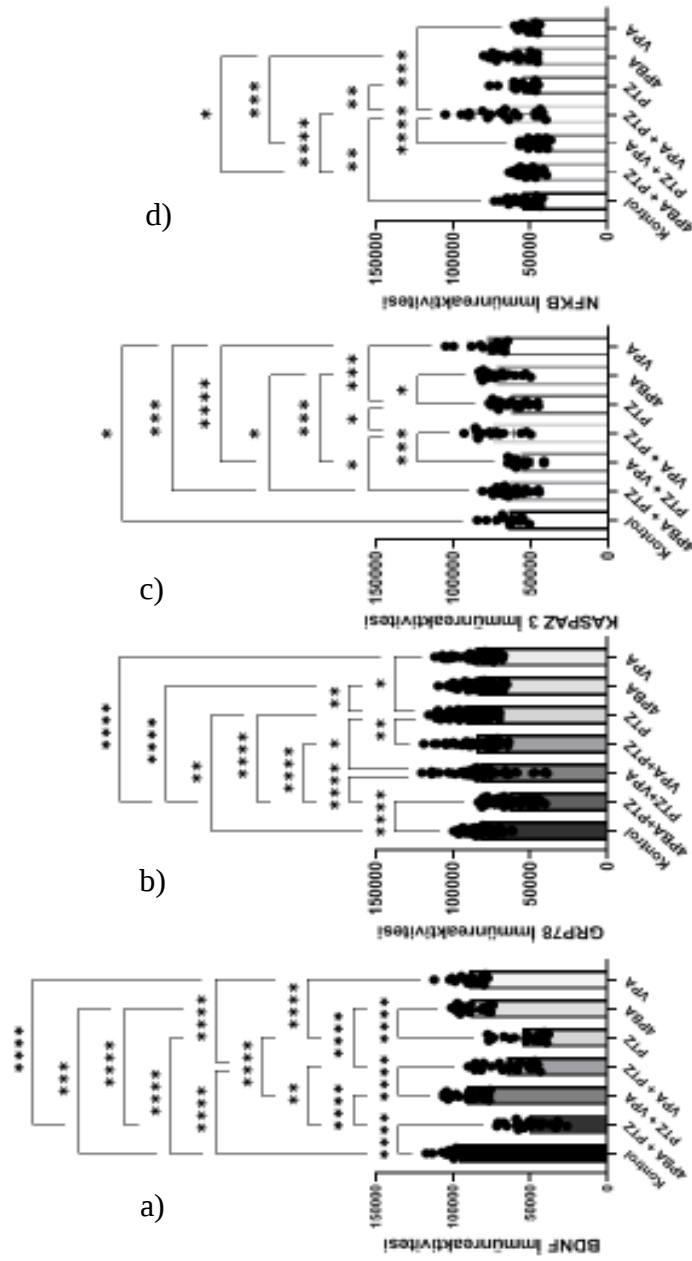


Şekil 4.6. BDNF, GRP78, KASPAZ3 proteinlerinin immünohistokimyasal boyaması

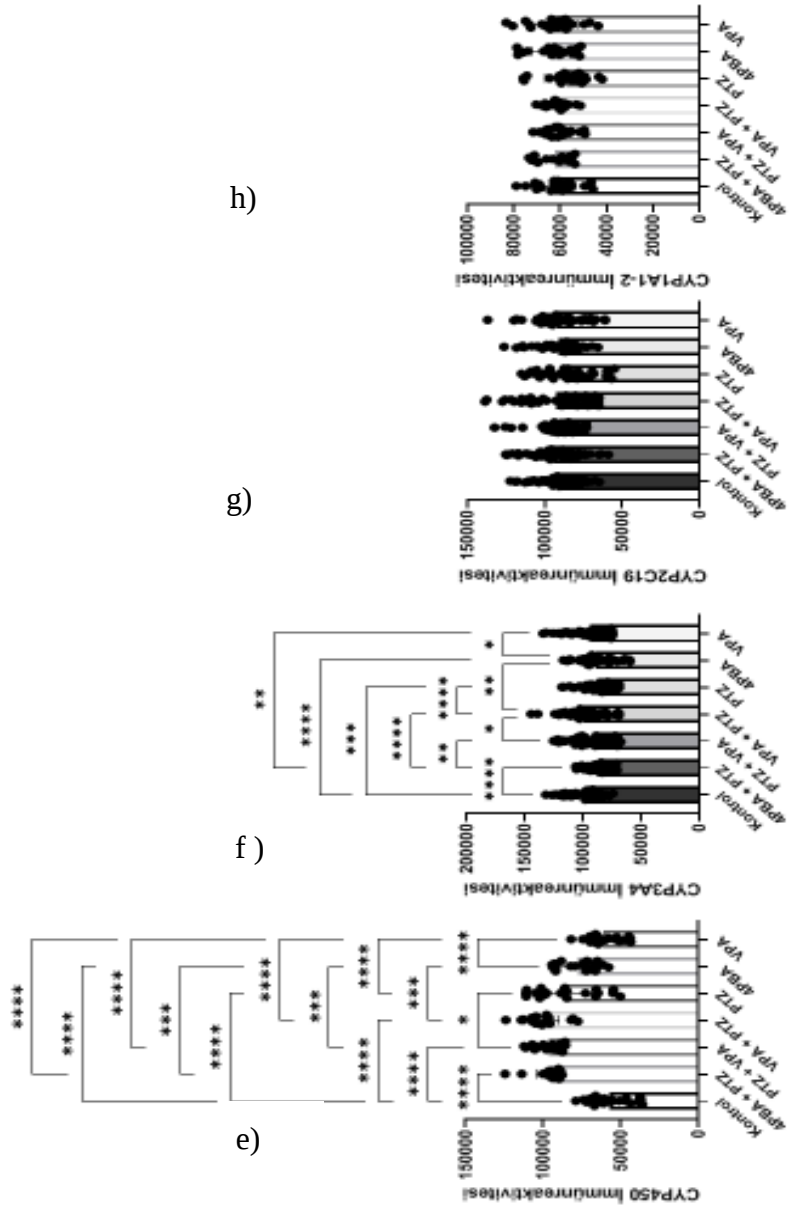


Şekil 4.7. CYP3A4, CYP2C19, NFKB proteinlerinin immünohistokimyasal boyaması

Sakrifiye edilmiş hayvanlardan alınan beyin dokusundaki immünohistokimyasal boyama teknikleri sonucunda, gruplar arasında BDNF proteini için immünoreaktivitede istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdi (Şekil 4.8). ER stres göstergelerinden olan GRP78 protein immünoreaktivitede de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdi (Şekil 4.8). ER stres göstergelerinden apoptoz üzerinde etkisi bulunan KASPAZ3 protein immünoreaktivitede de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdi (Şekil 4.8). İmmünitede, hücrenin sağkalımında etkili NFkB protein immünoreaktivitede de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdi (Şekil 4.8). CYP450 proteini için immünoreaktivitede istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdi (Şekil 4.9). CYP3A4 proteini için immünoreaktivitede istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülürken CYP2C19 ve CYP1A1-2 için istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. İmmünohistokimya BDNF, GRP78, KASPAZ3, NFKB, protein analizi a) BDNF b) GRP78 c) KASPAZ3 d) NFKP immünreaktivite grafikleri grafikleri *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$, ****: $p < 0.0001$.



Şekil 4.9. İmmünohistokimya CYP450, CYP3A4, CYP2C19, CYP1A1-2, protein analizi e) CYP450 f) CYP3A4 g) CYP2C19 h) CYP1A1-2 immünreaktivite grafikleri
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$, ****: $p < 0.0001$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, farelerde PTZ kullanarak bir epilepsi kindling modeli oluşturduk (Göl ve ark., 2019). Beyin dokusunda, sitokrom P450 ve ailesi üyelerinden CYP450, CYP2C19, CYP3A4 ile CYP1A1-2, ER stres belirteçleri GRP78, CHOP, KASPAZ3 ve NFKB, temporal lob epilepsi ile ilişkili proteinler LGI1, BDNF'nin ve mTOR proteininin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Bu çalışmada nöbet izlemi sırasında sadece PTZ grubunda evre 1 ve 2 nöbetler gözlemlendi. Kontrol, 4-PBA+PTZ, PTZ+VPA, VPA+PTZ, 4-PBA, VPA gruplarında ise nöbet takibi Evre 0 olarak derecelendi. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, benzer çalışmalarla tutarlı olarak, antiepileptik ilaç valproik asitin nöbetleri baskıladığı görülmektedir. Yokoi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma da 4-PBA'nın mutasyona uğramış LGI1 proteininin katlanmasını ve işlevini geri kazandırdığını ve nöbet duyarlılığını azalttığını göstermiştir (Yokoi ve ark., 2015). Benzer şekilde, bu çalışmada 4-PBA'nın nöbet aktivitesini baskıladığı görülmektedir. Ek olarak, başka bir çalışma, 4-PBA'nın Lafora hastalığında nörodejenerasyonu iyileştirdiğini gösterdi (Berthier ve ark., 2016).

Açık alan davranış testleriyle farelerin beş dakika boyunca test alanında geçtiği kare sayıları, 16 karelik alanın ortadaki 4 karesinde yani farelerin merkezde buluma süresi, çevreyi keşfetmek için arka ayakları üzerinde kaç sefer yükseldikleri şaşlanma sayısı ve korku seviyesini değerlendiren dışkı sayısı ölçüldü (Göl ve ark., 2019). Lokomotor aktivite performansını değerlendirmek için ölçülen geçilen kare sayısına göre 4-PBA+PTZ grubunun kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu diğer grupların kontrol grubu ile kıyaslandığında belirgin fark olmadığı gözlemlendi. Ancak 4-PBA+PTZ grubundaki yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bulgular, farelerde ve sıçanlarda lokomotor aktivitede hiçbir değişiklik bulamayan önceki çalışmalarla

tutarlıdır (Brandt ve ark., 2010; Groticke ve ark., 2007; Lopes ve ark., 2016). Kemirgenler doğal olarak açık ve parlak ışıklı ortamları sevmezler. Dolayısıyla merkezde daha az vakit geçirmeleri beklenir. Merkezde bulunma süreleri incelendiğinde VPA grubu hariç diğer bütün gruplar kontrol grubuna göre daha yüksek olsada bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildir. Merak duygusu olarak düşünülen şahlanma sayısı incelendiğinde 4-PBA+PTZ grubu kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olsada istatistiksel olarak anlamlı değildir. Korku duygusu olarak düşünülen dışkı sayıları incelendiğinde özellikle PTZ grubu olmak üzere bütün gruplar kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. Fakat bu sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu çalışmada, açık alan testinde incelenen parametrelerde gruplar arası farklar istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.

Yüzmeye zorlama davranış testi, ani ve kaçınılmaz stresle başa çıkma stratejilerini ölçer ve stres tepkisinin nöral koluna dair benzersiz bir içgörü sağlar, ayrıca hareketsiz kalma süresinin artması ve aktif yüzme davranışında azalma depresyon benzeri davranış olarak nitelendirilmektedir (Aygün, 2020; Commons ve ark., 2017). Aktif yüzme davranışında kontrol grubu PTZ ve PTZ+VPA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Mücadele davranışında PTZ+VPA grubunun kontrol ve diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülsede istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hareketsiz kalma davranışında ise kontrol grubu 4PBA-PTZ, VPA-PTZ, PTZ, 4PBA, VPA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük olduğu görüldü. PTZ+VPA grubunda ise kontrol grubuna göre yüksel olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Davranış testi sonuçlarına göre PTZ uygulanan deney gruplarında kontrol grubuna göre depresyon benzeri davranışların arttığı gözlenmiştir. Test sonuçlarında kontrol grubu farelere göre ilaç uygulanan grupların özellikle PTZ ve önce PTZ uygulanan grupların stresle baş etme gücü daha düşük olup, umutsuzluğu kabullenme içerisinde oldukları istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bu sonuçların ilaçların yarı ömrü ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Gidal ve ark., 2021). Bu kanuda daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

Potansiyel ilaç etkileşimleri ve antiepileptik ilaçların bireysel farmakokinetiği, özellikle pediatrik hastalarda serum konsantrasyonlarında büyük dalgalanmalara ve farklı klinik

yanıtlara yol açabilir (Iapadre ve ark., 2018). Ayrıca, farklı polimorfizmler özellikle valproik asit farmakokinetiğinde yer alan (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, UGT1A8 ve UGT2B7) antiepileptiklerin farmakokinetiğini, kararlı durum konsantrasyonlarını ve ilaç direncini etkileyerek AEİ'lerde potansiyel değişikliklere yol açabilir (Ben ve ark., 2017). Bu çalışmada ksenobiyotikleri yok eden ve sitotoksiteyi azaltmada rol oynayan beyin CYP450 proteini, CYP3A4, CYP2C19 ve CYP1A1-2'nin immünreaktivitesi değerlendirilmiştir. CYP450 immünoreaktivitesi beyinde incelendiğinde kontrol grubu VPA grubu haricinde diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha düşüktür. CYP3A4 immünoreaktivitesi beyinde incelendiğinde kontrol grubu 4-PBA ve 4-PBA+PTZ gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha yüksektir. CYP2C19 ve CYP1A1-2 immünoreaktivitesi beyinde incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç çıkmamıştır. Valproik asidin CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19 un zayıf inhibitörü olduğu ve bu zayıf inhibasyona bağlı CYP izoformları inhibe ederek klinik olarak anlamlı etkileşimler oluşturması beklenmeyen çalışmalar mevcuttur (Wen ve ark., 2001).

LGI1 mutantlarının yapısını ve işlevini eski haline getirmek için kimyasal düzeltici 4-PBA'yı test eden bir çalışma, 4-PBA işleminin LGI1 mutant salgısını ve bunların ADAM22'ye bağlanmasını büyük ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir büyük ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir (Yokoi ve ark., 2015). Bu çalışmanın sonuçlarına göre en çok ekspresyon PTZ grubunda olup daha sonra PTZ+VPA, VPA+PTZ ve 4-PBA gruplarında görülerek önceki çalışmalarla tam olarak örtüşmemektedir.

Endoplazmik retikulum stres belirteçleri olan GRP78 ve CHOP'un ekspresyon seviyeleri, Western blot ve immünohistokimya teknikleri kullanılarak değerlendirildi. ER stresinin yokluğunda, GRP78, ER transmembran proteinlerinin lümen alanına bağlanır ve bunların aktivasyonunu inhibe eder. Endoplazmik retikulum stres altında lümen bölgesinden ayrılarak PERK, IRE1 ve ATF6'nın aktivasyonunu tetikler. CHOP ise ER stresini gösterir (Chen ve ark., 2013; Chen ve ark., 2014; Fu ve ark., 2019; Liu ve ark., 2011; Rzayev ve ark., 2022). Bu çalışmanın sonuçlarına göre beyinde GRP78 immünoreaktivitesi dikkat çekici sonuçlar göstermiştir. 4-PBA+PTZ grubu bütün

gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha düşüktür. PTZ grubunda kontrol, VPA ve 4-PBA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. GRP78 immünoaktivitesine göre 4-PBA+PTZ ve VPA gruplarında ER stresinin baskılandığını gözlemledik. CHOP ekspresyon düzeyi PTZ ve 4-PBA+PTZ grubunda en düşük, VPA+PTZ ve PTZ+VPA gruplarında yüksekti. Bu çalışmanın sonuçlarında CHOP ekspresyon düzeyi PTZ de düşük olması beklenen bir sonuç olmayıp önceki çalışmalarla tam olarak örtüşmemektedir.

BDNF sinyallemede rol oynayan BDNF, KASPAZ3, NFKB ve mTOR'un beyin seviyeleri, Western blot ve immünohistokimyasal tekniklerle değerlendirildi. BDNF, memeli beyinde, özellikle hipokampusta ve serebral kortekste sentezlenen bir nörotrofin protein ailesidir. BDNF, TrkB'ye bağlanır ve nöronal hayatta kalmayı, sinaptik plastisiteyi ve uzun vadeli güçlendirmeyi desteklemek için mTOR sinyalini takip eder. Öte yandan proBDNF'ye bağlanır ve apoptozu ve uzun süreli baskılamayı indükler. BDNF, hafıza ve öğrenme gibi nöral gelişimin birçok aşamasında yer alır. Mevcut kanıtlar, BDNF'nin epilepsi, nörodejeneratif hastalıklar, anksiyete ve depresyon gibi psikolojik ve nörolojik bozukluklarda da rol oynadığını göstermektedir (Nowroozi ve ark., 2021). BDNF immünoaktivitesi beyinde, kontrol grubunda 4-PBA+PTZ, VPA+PTZ, PTZ ve 4-PBA gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde daha yüksektir. 4-PBA+PTZ, VPA+PTZ ve PTZ grupları diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha düşüktür. Epilepsi ve BDNF'yi birbirine bağlayan önceki çalışmalar karışık sonuçlara varmıştır. Temporal lob epilepsinin ilk astrositlerinde BDNF'nin aşırı ekspresyonunun artmış uyarılabilirliğe ve nöronal hücre ölümüne neden olduğunu gösteren çalışmaların aksine bir çalışma, epileptik farelerin hipokampusuna BDNF salgılayan hücrelerin eklenmesinin nöbet sıklığını %80 oranında azalttığını buldu (Falcicchia ve ark., 2018; Fernández-García ve ark., 2020; Simonato ve ark. 2006). Bu çalışmanın sonuçlarına göre beyindeki BDNF seviyeleri kontrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksekti. 4-PBA+PTZ, VPA+PTZ ve PTZ grupları, diğer gruplara göre daha düşük BDNF immünoaktivitesi gösterdi. KASPAZ3 immünoaktivitesinde PTZ+VPA grubu kontrol grubuna benzer ve VPA+PTZ grubuna göre ise istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşüktür. NFKB immünoaktivitesinde ise VPA+PTZ grubu diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksektir. mTOR aktivitesi, western blot teknolojisi kullanılarak değerlendirildi. Ekspresyon

seviyesi en yüksek 4-PBA daha sonra PTZ+VPA grubunda olup en düşükte PTZ grubunda görülmüştür. Kemirgenlerde mTOR'un aşırı aktivasyonunun modellenmesiyle epileptojenik etkilerin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Zhang ve ark., 2016; Nguyen ve ark., 2019). Bununla birlikte, son on yılda, mTOR inhibitörleri tutarsız epilepsi önleyici etkinlik göstermiştir (Buckmaster ve ark., 2009; Gericke ve ark., 2020). mTOR hücre sağkalımına yardımcı olmasından ötürü PTZ grubunda endüşük olması 4-PBA, PTZ+VPA, VPA ve VPA+PTZ gruplarında yüksek olması beklediğimiz bir durumdur.

Sonuç olarak bu çalışmada yüzmeye zorlama davranış testi sonucunda tüm gruplar kontrol grubuna göre depresyon, korku benzeri davranışlar gözlemledik. Protein analiz sonuçlarına göre ise ilaç metabolizmasında etkili olan CYP450 proteinlerinden CYP450, CYP2C19, CYP3A4 ve CYP1A1-2 ekspresyonu incelendiğinde karaciğerde yapılan bazı çalışmalara göre beyinde istatistiksel olarak anlamlı bir inhibasyon olmamış olup VPA'nın bu CYP proteinlerin zayıf inhibitörü olduğu ve bu yüzden anlamlı etkileşimler oluşturması beklenmeyen çalışmaları desteklemektedir. 4-PBA+PTZ grubunun GRP78 protein immünoreaktivitesinde en az aktif gruplardan biri olması 4-PBA ile ER stresin inhibe edilebildiğini göstermiştir. PTZ grubunda nöronları koruyucu işlevi olan BDNF ve hücre sağkalımı için etkili olan mTOR ekspresyonunun minimal olması epilepside nöronal sağkalımın olumsuz etkilendiğini göstermektedir. NFkB immünoreaktivitesinde VPA+PTZ grubunun PTZ+VPA ve PTZ grubuna göre yüksek olması ve VPA'nın PTZ öncesi verilmesinin hücre sağkalımına yardımcı olan NFkB'yi artırdığının görülmesi üzerine VPA'nın epilepsi öncesi mi sonrası mı verilmesi üzerine daha kapsamlı çalışmalar yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Salam, Omar ME, Sleem, Amany A, Sayed, Marawan Abd El Baset Mohamed, Youness, Eman R, Shaffie, Nermeen PY. Capsaicin exerts anti-convulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures. *Neurochemical Research*, 2020; 45(5), 1045-1061.
- Akdağ G, Algın D, Erdiñç O *Epilepsi / Epilepsy*. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2016; 38(1)
- Alison M Pack *Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies ew Continuum (Minneap Minn)*. 2019 Apr;25(2):306-321.
- Aygun H. Trazodone increases seizures in a genetic WAG/Rij rat model of absence epilepsy while decreasing them in penicillin-evoked focal seizure model, *Epilepsy & Behavior, Part A*, 2020; 103.
- Bambal G, Çakıl D, Ekici F. *Epilepsi Oluşum Mekanizmaları*. *Konuralp Medical Journal*. 2011; 3(3): 42-45
- Bazzari AH, Bazzari FH. BDNF Therapeutic Mechanisms in Neuropsychiatric Disorders. *Int. J. Mol. Sci*. 2022; 23, 8417.
- Ben ML, Hakim A, Ghozzi H, Atheymen R, Sahnoun Z, Zeghal K. Influence of ageandco-medication on the steady-state pharmaco kinetics of valproicacid in Tunisian patients with epilepsy. *Rev Neurol (Paris)*. 2017;173:159-63
- Berthier A, Payá M, García-Cabrero AM, Ballester MI, Heredia M, Serratosa JM, Sánchez MP, Sanz P. Pharmacological interventions to ameliorate

- neuropathological symptoms in a mouse model of lafora disease *Mol. Neurobiol.* 2016; 53. 1296-1309
- Binder DK, Croll SD, Gall CM, H.E. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* 2001; 24, 47-53
- Brandt C, Nozadze M, Heuchert N, Rattka M, Loscher W. Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy *J Neurosci*, 2010; 30. 8602-8612
- Britto MR, Wedlund PJ. Cytochrome P-450 in the brain. Potential evolutionary and therapeutic relevance of localization of drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab Dispos.* 1992; 20(3):446–450.
- Buckmaster PS, Ingram EA, Wen X. Inhibition of the mammalian target of rapamycin signaling pathway suppresses dentate granule cell axon sprouting in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2009; 29:8259–8269.
- C R Rieder, D B Ramsden, A C Williams Cytochrome P450 1B1 mRNA in the human central nervous system *Mol Pathol.* 1998 Jun;51(3):138-42.
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 Mrna *Nature.* 2002; 415. 92-96
- Chen J, Guo H, Zheng G, Shi ZN. Region-specific vulnerability to endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death in rat brain after status epilepticus *J. Biosci.* 2013; 38. 877-886
- Chen J, Zheng G, Guo H, Shi ZN. Role of endoplasmic reticulum stress via the PERK signaling pathway in brain injury from status epilepticus *J. Mol. Neurosci*, 2014; 53. 677-683
- Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi *J. Biol. Chem.* 2002; 277. 13045-13052

- Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem.* 2003; 278(39):38084–38093.
- Chinta SJ, Kommaddi RP, Turman CM, Strobel HW, Ravindranath V. Constitutive expression and localization of cytochrome P-450 1A1 in rat and human brain: presence of a splice variant form in human brain1. *J Neurochem.* 2005; 93(3):724–736.
- Choleris E, Thomas A W, Kavaliers M, Prato F S A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field *Neurosci Biobehav Rev.* 2001 May;25(3):235-60.
- Christian M Kaculini , Amelia J Tate-Looney , Ali Seyfi The History of Epilepsy: From Ancient Mystery to Modern Misconception *Cureus.* 2021 Mar 17;13(3):e13953.
- Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. *ACS Chem Neurosci.* 2017; 8(5): 955-960.
- CR Mason , RM Cooper A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol *Epilepsia.* 1972 Sep;13(5):663-74.
- Daly A. CYP2 family [Video file]. In: The Biomedical & Life Sciences Collection, Henry Stewart Talks. 2016; [accessed 2022 Dec 03]. Available from: <https://hstalks.com/bs/685/>.
- Dan C McIntyre , Michael O Poulter, Krista Gilby Kindling: some old and some new *Epilepsy Res.* 2002 Jun;50(1-2):79-92.
- Dhers L, Ducassou L, Boucher JL, Mansuy D. Cytochrome P450 2U1, a very peculiar member of the human P450s family. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74(10):1859–1869.
- Donna J Thuerauf , Marie Marcinko, Peter J Belmont, Christopher C Glembotski Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on

- endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability *J Biol Chem.* 2007 Aug 3;282(31):22865-78.
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* 1999; 286(5439):487–491.
- Falcicchia C, Paolone G, Emerich DF, Lovisari F, Bell WJ, Fradet T, Wahlberg LU, Simonato M. Seizure-suppressant and neuroprotective effects of encapsulated BDNF-producing cells in a rat model of temporal lobe epilepsy *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2018; 9. 211-224
- Fernández-García S, Sancho-Balsells, A, Longueville S. Astrocytic BDNF and TrkB regulate severity and neuronal activity in mouse models of temporal lobe epilepsy. *Cell Death Dis* 2020; 11, 411.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 2017b; 58: 522-530.
- Fisher RS, Emde Boas W, Blume W et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by ILAE and IBE. *Epilepsia*, 2005; 46(4): 470-472.
- Forsgren L, Sundelin H, Sveinsson O LakartidingenEpilepsy: incidens, prevalens and causes.2018 May15 21;115:E6FD.
- Friedman J Wilma Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis *Neuroscientist.* 2010 Jun;16(3):244-52.
- Fukata Y, Yokoi N, Miyazaki Y , Fukata M The LGI1-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders *Neurosci Res.* 2017 Mar;116:39-45.
- Gerakis Y, Hetz C. Emerging roles of ER stress in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease *FEBS J.* 2018; 285. 995-1011
- Gericke B, Brandt C, Theilmann W, Welzel L, Schidlitzki A, Twele F, Kaczmarek E, Anjum M, Hillmann P, Loscher W. Selective inhibition of mTORC1/2 or

- PI3K/mTORC1/2 signaling does not prevent or modify epilepsy in the intrahippocampal kainate mouse model. *Neuropharmacology* 2020; 162:107817.
- Gidal BE, Ferry J, Reyderman L, Piña-Garza JE. Use of extended-release and immediate-release anti-seizure medications with a long half-life to improve adherence in epilepsy: a guide for clinicians. *Epilepsy & Behavior*. 2021;120, 107993.
- Göl M, Erdoğan F, Kanan D, Kanbur M, Gölgeli A, Öztürk A Pentilentetrazol ile İndüklenen Kindlingin Matür ve İmmatür Sıçan Davranışları, Emosyonel Öğrenme, Beyin ve Serum Nitrik Oksit Seviyesine Etkisi *Epilepsi* 2019;25(2):51-5
- Graeme J Sills , Michael A Rogawski Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs *Neuropharmacology*. 2020 May 15;168:107966
- Groticke I, Hoffmann K, Loscher W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol*, 2007; 207. 329-349
- H Rosenbrock , C E Hagemeyer, M Ditter, R Knoth, B Volk Identification, induction and localization of cytochrome P450s of the 3A-subfamily in mouse brain *Neurotox Res*. 2001 Aug;3(4):339-49.
- Hansen SL, Sperling BB, Sánchez C Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2004 28; 1; 105-113
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, D. PERK is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein Response *Mol. Cel*. 2000; 5. 897-904
- Harding HP, Zhang Y, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase *Nature*, 1999; 397. 271-274
- Harmeet Malhi , Randal J Kaufman Endoplasmic reticulum stress in liver disease *J Hepatol*. 2011 Apr;54(4):795-809.
- Hashimoto S, Saido TC. Critical review: involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer's disease *Open Biol*. 2018; 8.Article 180024

- Hedlund E, Gustafsson J, Warner M. Cytochrome P450 in the brain: a review. *Curr Drug Metab.* 2001; 2(3):245–263.
- Hillary RF, FitzGerald U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis *J. Biomed. Sci.* 2018; 25. 48
- Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein Response *Science*, 2006; 313. 104-107
- Hu Y, RussekSJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation *J. Neurochem.* 2008; 105, 1-17
- Huang HC, Tang D, Lu SY, Jiang ZF. Endoplasmic reticulum stress as a novel neuronal mediator in Alzheimer's disease *Neurol. Res.* 2015; 37. 366-374
- Huang SJ, Xing YY, Emerging Y. roles for the ER stress sensor IRE1 α in metabolic regulation and disease *J. Biol. Chem.* 2019; 294. 18726-18741
- Iapadre G, Balagura G, Zagaroli L, Striano P, Verrotti A. Pharmacokinetic and drug interaction of antiepileptic drugs in children and adolescents. *Paediatr Drugs.* 2018; 20(5):429-453.
- Ingrid E Scheffer, Samuel Berkovic, Giuseppe Kapovilla, Mary B. Connolly, Jacqueline Fransızca, Laura Guilhoto, Edouard Hirsch, Satish Jain, Gary W Mathern, Solomon L Moshe, Douglas R Nordli, Emilio Perucca, Torbjörn Tomson, Samuel Wiebe, Yue Hua Zhang, Sameer M Zuberi ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology *Epilepsia.* 2017 Apr;58(4):512-521.
- Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, Peles E, Buckley C, Lang B, Vincent A (2010) Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 2010 133(9):2734–2748.

Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF Neuron, 1991; 6:937-948

Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C Cell death induced by endoplasmic reticulum stress FEBS J. 2016; 283. 2640-2652

Jessica J Falco-Walter , Ingrid E Scheffer , Robert S Fisher The new definition and classification of seizures and epilepsy Epilepsy Res. 2018 Jan;139:73-79.

Jie Fu , Tao Tao , Zuoxiao Li , Yangmei Chen , Jinglun Li , Lilei Peng The roles of ER stress in epilepsy: Molecular mechanisms and therapeutic implications Biomed Pharmacother. 2020 Nov;131:110658.

Jie Wang , Zhi-Jian Lin , Liu Liu , Hai-Qing Xu , Yi-Wu Shi , Yong-Hong Yi , Na He , Wei-Ping Liao Epilepsy-associated genes Seizure. 2017 Jan;44:11-20.

JOHN A. DAVIES Mechanisms of action of antiepileptic drugs Seizure 1995; 4:267-272

Kokaia M, Ernfors P, Kokaia Z, Elmer E, Jaenisch R, Lindvall O. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice Exp. Neurol. 1995; 133, 215-224

Korennykh A, Walter P. Structural basis of the unfolded protein Response Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2012; 28. 251-277

Kuban W, Daniel W.A, Cytochrome P450 expression and regulation in the brain, Drug Metabolism 2021, 53:1, 129

L Gervot , B Rochat, J C Gautier, F Bohnenstengel, H Kroemer, V de Berardinis, H Martin, P Beaune, I de Waziers Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities Pharmacogenetics. 1999 Jun;9(3):295-306.

Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. Lancet Neurol 2010 9(8):776–785.

Lin TW, Harward SC, Huang YZ, McNamara JO. Targeting BDNF/TrkB pathways for preventing or suppressing epilepsy. Neuropharmacology. 2020; 1;167:107734.

- Lipovich L, Dachet F, Cai J, Bagla S, Balan K, Jia H, Loeb JA. Activity-dependent human brain coding/noncoding gene regulatory networks. *Genetics* 2012; 192, 1133–1148.
- Lipsky RH, Marini AM. Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1122, 130–143.
- Liu G, Guo H, Guo C, Zhao S, Gong D, Zhao Y. Involvement of IRE1 α signaling in the hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy *Brain Res. Bull.* 2011; 84. 94-102
- Lopes MW, Lopes SC, Santos DB, Costa AP, Gonçalves FM, Mello N, Prediger RD, Farina M, Walz R, Leal RB. Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy, *Epilepsy & Behavior*, 2016; 55, 92-100,
- Lu J, Shang X, Zhong W, Xu Y, Shi R, Wang X. New insights of CYP1A in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases. *Acta Pharm Sin B.* 2020; 10(1):91–104.
- Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A, Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity, *Epilepsy & Behavior*, 2010; 17, 1,103-108
- Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2(6):875–894.
- McFadyen MCE, Melvin WT, Murray GI. Regional Distribution of Individual Forms of Cytochrome P450 mRNA in Normal Adult Human Brain. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55(6):825–830.
- McNamara JO, Scharfman HE. Temporal lobe epilepsy and the BDNF receptor, TrkB J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, A.V. Delgado-Escueta (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, Bethesda MD. 2012;
- Meir Bialer 1, Boris Yagen Valproic Acid: second generation Neurotherapeutics. 2007 Jan;4(1):130-7.
- Menard J, Treit D Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety *Neurosci Biobehav Rev*, 23 (1999), pp. 591-613

- Mingzhe Zhao , Jingsong Ma , Mo Li , Yingtian Zhang , Bixuan Jiang , Xianglong Zhao , Cong Huai , Lu Shen , Na Zhang , Lin He , Shengying Qin Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans Int J Mol Sci. 2021 Nov 26;22(23):12808.
- Molendijk Marc L, E Ronald de Kloet Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression Psychoneuroendocrinology. 2015 Dec;62:389-91.
- Mortazavi F, Ericson M, Story D, Hulce VD, Dunbar GL. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats. Epilepsy Behav. 2005; 7(4): 629-638.
- Naidoo N, Giang W, Galante RJ, Pack AI. Sleep deprivation induces the unfolded protein response in mouse cerebral cortex J. Neurochem. 2005; 92. 1150-1157
- Nanda SA, Mack KJ. Seizures and sensory stimulation result in different patterns of brain derived neurotrophic factor protein expression in the barrel cortex and hippocampus. Mol. Brain Res. 2000; 78, 1–14.
- Nowroozi A, Salehi MA, Mohammadi S. Brain-derived neurotrophic factor in patients with epilepsy: A systematic review and meta-analysis. Epilepsy Research, 2021; 178, 106794.
- Numakawa T, Odaka H. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease: Beneficial Effects of Flavonoids for Neuroprotection. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(11):5719.
- Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology Annu. Rev. Pathol. 2015; 10. 173-194
- Oyadomari S, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress Cell Death Differ. 2004; 11. 381-389

- Pai HV, Upadhyaya SC, Chinta SJ, Hegde SN, Ravindranath V. Differential metabolism of alprazolam by liver and brain cytochrome (P4503A) to pharmacologically active metabolite. *Pharmacogenomics J*. 2002; 2(4):243–258.
- Phillips KM. Effects of time and administration of ethanol on open field behavior in hamsters. *Physiol Behav* 1982; 29(5):785–7.
- Pitkanen A. Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. *Epilepsia*. 2010; 51 (Ek 3):2-17.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977; 266(5604): 730-732.
- Prut Laetitia, Belzung Catherine The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 28;463(1-3):3-33.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 2007; 90, 397–406.
- R Davis , D H Peters, D McTavish Valproic acid. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy *Drugs*. 1994 Feb;47(2):332-72.
- Riffault B, Kourdougli N, Dumon C, Ferrand N, Buhler E, Schaller F. Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor (proBDNF)-Mediated p75NTR Activation Promotes Depolarizing Actions of GABA and Increases Susceptibility to Epileptic Seizures. *Cereb Cortex*. 2018; 1;28(2):510–27.
- Robert S Fisher , Carlos Acevedo, Alexis Arzimanoglou, Alicia Bogacz, J Helen Cross, Christian E Elger, Jerome Engel Jr, Lars Forsgren, Jacqueline A French, Mike Glynn, Dale C Hesdorffer, B I Lee, Gary W Mathern, Solomon L Moshé, Emilio Perucca, Ingrid E Scheffer, Torbjörn Tomson, Masako Watanabe, Samuel Wiebe ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy *Epilepsia*. 2014 Apr;55(4):475-82. doi:
- Rodrigo S, Panadero MI, Fauste E, Rodríguez L, Roglans N, Álvarez-Millán JJ, Otero P, Laguna JC, Bocos C. Effects of maternal fructose intake on perinatal ER-

- Stress: a defective XBP1s nuclear translocation affects the ER-stress resolution
Nutrients, 2019; 11. 1935
- Rüdiger Hardeland Melatonin metabolism in the central nervous system Curr
Neuropharmacol. 2010 Sep;8(3):168-81.
- Rzayev Emil, Ramazan Amanvermez, Seda Gün, Emre S Tiryaki, Gökhan Arslan 4-
Phenylbutyric Acid Plus Valproic Acid Exhibits the Therapeutic and
Neuroprotective Effects in Acute Seizures Induced by Pentylentetrazole
Neurochem Res. 2022 Oct;47(10):3104-3113.
- S V Bhagwat , M R Boyd, V Ravindranath Multiple forms of cytochrome P450 and
associated monooxygenase activities in human brain mitochondria Biochem
Pharmacol. 2000 Mar 1;59(5):573-82.
- Sahay A, Kale A, Joshi S. Role of neurotrophins in pregnancy and offspring brain
development. Neuropeptides 2020; 83, 102075.
- Salia Farrokh , Pouya Tahsili-Fahadan , Eva K Ritzl , John J Lewin , Marek A Mirski
Antiepileptic drugs in critically ill patients Crit Care. 2018 Jun 7;22(1):153.
- Sharon Miksys , Caryn Lerman, Peter G Shields, Deborah C Mash, Rachel F Tyndale
Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human
brain Neuropharmacology. 2003 Jul;45(1):122-32.
- Sharon Miksys , Rachel F Tyndale Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the
brain J Psychiatry Neurosci. 2013 May;38(3):152-63.
- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by
dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals
Dev. Cell, 2002; 3. 99-111
- Simonato M, Tongiorgi E Kokaia M. Angels and demons: neurotrophic factors and
epilepsy. Trends Pharmacol. Sci. 2006; 27, 631–638.
- Sonat F. Hayvanlarda Epilepsi. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2009;
28(1): 47-52.
- Spriggs KA, Bushel M, Willis AE. Translational regulation of gene expression
during conditions of cell stress Mol. Cell, 2010; 40. 228-237

- Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum J. Cell Biol. 2004; 167. 35-41
- Stahl SM. Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications. 4th ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press 2013;
- Sylvie Tordjman, Sylvie Chokron, Richard Delorme, Annaëlle Charrier, Eric Bellissant, Nemat Jaafari, Claire Fougerou Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits Curr Neuropharmacol. 2017 Apr;15(3):434-443.
- Tadayuki Shimada, Kanato Yamagata Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model J Vis Exp. 2018; (136): 56573. Published online 2018 Jun 12.
- Tahir Hakami Neuropharmacology of Antiseizure Drugs Neuropsychopharmacol Rep. 2021 Sep;41(3):336-351.)
- Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A, Niwa M. ER stress activates NF- κ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK PLoS One, 2012; 7.45078
- Tatar M, Tatar T. Endoplazmik Retikulum Stresi ve İlişkili Hastalıklar. Osmangazi Tıp Dergisi. 2019; 41(3): 294-303.
- Ting Su , Xinxin Ding Regulation of the cytochrome P450 2A genes Toxicol Appl Pharmacol. 2004 Sep 15;199(3):285-94.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 Science, 2000; 287. 664-666
- Valles A, Boender AJ Gijsbers S, Haast RA, Marten GJ, de Weerd P. Genomewide analysis of rat barrel cortex reveals time-and layer-specific mRNA expression changes related to experience-dependent plasticity. J. Neurosci. 2011; 31, 6140–6158.
- Vekich JA, Belmont PJ, Thuerauf DJ, Glembotski CC. Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects

- cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012; 53. 259-267
- VonDran MW, LaFrancois J, Padow VA, Friedman WJ, Scharfman HE, Milner TA, Hempstead BL. p75^{NTR}, but not proNGF, is upregulated following status epilepticus in mice. *ASN neuro*, 2014; 6(5), 1759091414552185.
- W Löscher Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action *Prog Neurobiol.* 1999 May;58(1):31-59.
- Wen X, J S Wang, K T Kivistö, P J Neuvonen, J T Backman In vitro evaluation of valproic acid as an inhibitor of human cytochrome P450 isoforms: preferential inhibition of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) *Br J Clin Pharmacol.* 2001 Nov;52(5):547-53.
- Wojnowski L. Genetics of the variable expression of CYP3A in humans. *Ther Drug Monit.* 2004; 26(2):192–199.
- Xinjian Zhu , Jingde Dong , Bing Han , Rongrong Huang , Aifeng Zhang , Zhengrong Xia , Huanhuan Chang , Jie Chao , Honghong Yao Neuronal Nitric Oxide Synthase Contributes to PTZ Kindling Epilepsy-Induced Hippocampal Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Damage *Front Cell Neurosci.* 2017 Nov 28;11:377.
- Yamagata A, Fukai S Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of LGI1-ADAM22 *Cell Mol Life Sci.* 2020 Jan;77(2):267-274.
- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs *Mol. Cell*, 2000; 6. 1355-1364
- Yogita Ghodke-Puranik , Caroline F Thorn, Jatinder K Lamba, J Steven Leeder, Wen Song, Angela K Birnbaum, Russ B Altman, Teri E Klein Valproik asit yolu: farmakokinetik ve farmakodinamik Farmakogenet Genomik .2013 Nis;23(4):236-41.
- Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Ohkawa T, Takahashi N, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Imoto K, Meijer D, Watanabe M, Fukata M.

Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nat Med* 2015;21, 19–26

Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein Response *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20. 6755-6767

Yu C, Jiang F, Zhang M, Luo D, Shao S, Zhao J, Guan, Q. HC diet inhibited testosterone synthesis by activating endoplasmic reticulum stress in testicular Leydig cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2019; 23(5), 3140-3150.

Zenbilci N. Sinir Sisitemi Hastalıkları, 3.Baskı, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayın İstanbul, 1995; 625-661.

EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 18.10.2021-136051



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Deneyisel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
Müdürlüğü



Sayı : E-40175052-622.01-136051
Konu : Talep Hk.

18.10.2021

GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 18.10.2021 tarihli ve 135872 sayılı yazınız

Enstitütünüz tezli yüksek lisans öğrencisi Ufuk YÜKSEL'in (4060130032) "Pentilentetrazol ile İndüklenen Kindling Modelinde Valproik Asitin Sitokrom P 450 Enzim Sistemi ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezi çalışmasını Merkez Müdürlüğümüzde yapması uygun görülmüş çalışma izni verilmiştir.
Gereğini bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr. Vehbi GÜNEŞ
Merkez Müdürü V.

Belge Doğrulama Kodu :BS985RFLUJ Pin Kodu :70752

Adres:Talas Yolu Melikgazi KAYSERİ
Telefon:+90 352 437 49 01/24404 Faks:+90 352 437 52 73
e-Posta:dekam@erciyes.edu.tr Web:http://www.erciyes.edu.tr
Kep Adresi:erciyesuni@hs01.kep.tr

Belge Takip Adresi : http://ebys.erciyes.edu.tr/enVision-Sorgula/validate_doc.aspx?eD=BSV85RF6N6&eS=136051

Bilgi için: Mustafa ERMIŞ
Unvanı: Veteriner Hekim
Tel No: 24404



Sayı: 68742022- 903.99.-267
Konu: Değerlendirme Onay

25/10/2021

Sayın; Prof.Dr.Fusun Ferda ERDOĞAN;

“Pentilentetrazol ile İndüklenen Kindling Modelinde Valproik Asitin Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı projenizin Merkezimiz Kök Hücre Birimi’nde gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Not: Bu projeden çıkan bütün yayınlarınızda projenin Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinde yapıldığına dair ibarenin kullanılması zorunludur.

Kullanım şekli: “Erciyes University Genome and Stem Cell Center (GENKOK)



Tarih: 08.09.2021

Toplantı Sayısı: 08

Karar No:21/175

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 08.09.2021 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Nurcan DURSUN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Gülşay SEZER	Dr.Öğr.Üyesi	Tıp Fakültesi
Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN	Dr.Öğr.Üyesi	Eczacılık Fakültesi
İzzet Burçin SATICIOĞLU	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜ
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneyisel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla ilişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji A.D'dan Prof.Dr.Fusun Feriye ERDOĞAN tarafından sunulan "Pentilentetrazol ile İndüklenen Kindling Modelinde Valproik Asitin Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 08.09.2021

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

İmza :

PENTİLENTETRAZOL İLE İNDÜKLENEN KİNDLİNG MODELİNDE VALPROİK ASİTİN SİTOKROM P450 ENZİM SİSTEMİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% **10**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **9**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **3**
YAYINLAR

% **4**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 1
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Mehmet Fatih Göl. "Effects of pentylenetetrazol-induced kindling on mature and immature rat behavior, emotional learning and levels of nitric oxide in brain and serum", Journal of the Turkish Epilepsi Society, 2018 Yayın	% 1
5	abis-files.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	www.seizure-journal.com İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Ufuk YÜKSEL

İletişim Bilgileri

Eğitim Bilgileri

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
2,79	Dumlupınar Üniversitesi Hemşirelik bölümü	2015

İş Deneyimleri

Yıl	Kurum	Görev
2015-2017	Talas 1 NOLU ASM	Hemşire
2017-Halen	Erciyes Üniversitesi Hastanesi	Hemşire