

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ARKUAT ÇEKİRDEKTE BULUNAN AgRP
NÖRONLARININ, KAINİK ASİT İLE
İNDÜKLENMİŞ EPİLEPSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Muhsine Sinem ETHEMOĞLU SARI

İSTANBUL, 2021

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ARKUAT ÇEKİRDEKTE BULUNAN AgRP
NÖRONLARININ, KAINİK ASİT İLE
İNDÜKLENMİŞ EPİLEPSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Muhsine Sinem ETHEMOĞLU SARI

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. BAYRAM YILMAZ

İSTANBUL, 2021

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Fizyoloji Doktora Programı
Tez Başlığı : Arkuat Çekirdekte Bulunan AgRP Nöronlarının, Kainik Asit İle İndüklenmiş Epilepsi Üzerine Etkileri
Tez Sahibi : Muhsine Sinem Ethemoğlu Sarı
Sınav Tarihi : 29.06.2021

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)
Jüri Başkanı/Tez danışmanı	Prof. Dr. Bayram YILMAZ-Yeditepe Üniversitesi
Üye:	Prof.Dr. Erdal AĞAR- On Dokuz Mayıs Üniversitesi
Üye:	Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM- İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Üye:	Doç.Dr. Mehtap KAÇAR- Yeditepe Üniversitesi
Üye:	Doç.Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL- Yeditepe Üniversitesi

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 01/07/2021 tarih ve 2021/07-132 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

29.06.2021

Muhsine Sinem Ethemoğlu Sarı

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	ii
BEYAN	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ	ixx
TEŞEKKÜR	x
ABSTRACT	xi
ÖZET	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Hipokampus	4
2.2.Hipotalamus	7
2.2.1.Arkuat Çekirdek	9
2.3.Nöbet ve Epilepsi	14
2.3.1.Nöbet:	14
2.3.2. Epilepsi:	14
2.3.3.Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırılması	16
2.3.4.Epilepsi Etiyolojisi	20
2.3.5.Epilepsi Epidemiyolojisi	20
2.3.6.Epilepsi Patofizyolojisi	20
2.3.7. Epilepsi Tanı ve Tedavisi	21
2.3.8. Deneysel Epilepsi Modelleri	24
2.4.Optogenetik ve Kemogenetik Yaklaşımlar ile Sinirbilim Çalışmaları	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1.Deney Grupları	29

3.2.Transgenik Deney Hayvanları ve Genotiplemesi	32
3.3.Beyin içi Enjeksiyonlar	33
3.4.Epilepsi Modelinin Oluşturulması ve Değerlendirilmesi	33
3.5.AgRP Nöronlarının Aksonal Uzantılarının Görüntülenmesi	34
3.6.AgRP Nöronlarının Dinlenim Zar Potansiyellerinin Ölçülmesi	35
3.7.Hipokampal GABA Nöronlarının Dinlenim Zar Potansiyellerinin Ölçülmesi	35
3.8.AgRP Nöronlarının Kemogenetik Aktivasyonu ile Davranış Deneyleri	35
3.9.AgRP Nöronlarının Optogenetik Aktivasyonu ile EEG Kaydı Alınması	36
3.10.c-FOS Boyaması Yapılması	37
3.11.İstatiksel Analiz	37
4.BULGULAR	39
4.1.Genotipleme Sonuçları	39
4.2.Epilepsi Skorlaması	39
4.3.Aksonal Uzantıların Gösterilmesi	40
4.4.Yeme Davranışı ve Ağırlık Takibi	41
4.5.Dinlenim Zar Potansiyeli Ölçümü	44
4.6.Optogenetik Aktivasyon ile EEG Kaydı ve Analizi	47
4.7.Kemogenetik Aktivasyon ile Yapılan Davranış Deneyleri	48
4.8.c-FOS Görüntüleme Sonuçları	52
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	54
6.KAYNAKÇA	60

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması	18
Tablo 2.2: Beyin dalgalarının frekans ve beyin durumları	24
Tablo 2.3: 2013-2018 yılları arasında yapılmış epilepsi-optogenetik çalışmalar.	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Kemirgenlerde dorsal hipokampal formasyon.	4
Şekil 2.2: 5. Katman kortikal piramidal nöron (A) ve CA1 bölgesinde yer alan piramidal nöron (B).....	6
Şekil 2.3: Periferik metabolik sinyallerin ve MSS'nin birlikte çalışması ile enerji homeostazı ve besin alımı.....	8
Şekil 2.4: Beslenme düzenlenmesinde rol oynayan hipotalamik yolların şematik çizimi	9
Şekil 2.5: Arkuat Çekirdek Melanokortin Yolağı	13
Şekil 2.6: Beyin dalgalarının EEG'de görünümü.	23
Şekil 2.7: Optogenetik tekniğinin uygulanabileceği farklı fonksiyonel seviyeler.....	25
Şekil 2.8: Optogenetik uygulamasının özeti.....	26
Şekil 3.1: Çalışmanın 1. aşamasının grafiksel özeti	29
Şekil 3.2: Çalışmanın 2.aşamasının grafiksel özeti.	30
Şekil 3.3: Çalışmanın 3.aşamasının grafiksel özeti	31
Şekil 3.4: Epileptik Nöbetler.	34
Şekil 3.5: Kemogenetik aktivasyon sonrası yeme davranışı.	36
Şekil 3.6: 3 kutuplu elektrot ve optogenetik ferülünün takılması.....	37
Şekil 4.1: Genotipleme sonuçlarına göre AgRP pozitif örnekler.	39
Şekil 4.2: AgRP hayvanlarının ARC bölgesine yapılan GFP enjeksiyonu.....	40
Şekil 4.3 ARC'den diğer bölgelere yapılan aksonal uzantılar.....	40
Şekil 4.4: ARC'den hipokampusa yapılan aksonal uzantılar	41
Şekil 4.5: Çifte transgenik hayvanlarda, kırmızı ve yeşil renk ile işaretlenen nöronlar. 41	
Şekil 4.6: AgRP-GFP hayvanlarında epilepsi ve kontrol grubunun ağırlık ve tüketilen yem grafikleri.....	42
Şekil 4.7: AgRP-Kemogenetik hayvanlarında epilepsi ve kontrol grubunun ağırlık ve tüketilen yem grafikleri.	43
Şekil 4.8: AgRP hayvanlarının mesafe ve hız grafikleri..	43
Şekil 4.9: 24 saatlik aktivite sonuçlarının ısı haritası (heatmap) görüntüleri.	44
Şekil 4.10: AgRP-Optogenetik hayvanlarında epilepsi ve kontrol grubunun ağırlık ve tüketilen yem grafikleri.....	44

Şekil 4.11 AgRP-GFP deneyinde epilepsi ve kontrol grubunun dinlenim zar potansiyelleri grafiği ve trasesi	45
Şekil 4.12 AgRPxVgat çifte transgenik hayvanların ARC çekirdeğinin kemogenetik uyarımı sonucunda, hipokampal GABA nöronlarının dinlenim zar potansiyeli kaydı ...	46
Şekil 4.13: AgRPxVgat çifte transgenik hayvanların ARC çekirdeğinin optogenetik uyarımı sonucunda, hipokampal GABA nöronlarının dinlenim zar potansiyeli kaydı ...	46
Şekil 4.14: AgRP-Optogenetik deney gruplarında epilepsi ve kontrol gruplarının frekans, amplitud grafikleri ve trasesi.....	47
Şekil 4.15: Açık alan testinde deney gruplarının bölgelerde geçirilen zamanın yüzdesi.	48
Şekil 4.16: Açık alan testinde deney gruplarının içme sularında CNO ve SF bulunurken testte gösterdikleri aktivite sonuçlarının grafiği.	49
Şekil 4.17: Açık alan testinde deney gruplarının içme sularında CNO ve SF bulunurken testte gösterdikleri mobilite sonuçlarının grafiği.	49
Şekil 4.18: Obje Yerleşim testinin tanıtma ve test sonuçlarının grafiği	50
Şekil 4.19: Obje Yerleşim Testi'nde deney hayvanlarının takip ettiği yol.	50
Şekil 4.20: Yeni obje tanıma testinde gruplar arası ayrım göstergesi grafiği.....	51
Şekil 4.21: Yeni obje tanıma testinde deney hayvanlarının takip ettiği yol.	51
Şekil 4.22: AgRP-Kemogenetik grubundan temsili bir görüntü.	52
Şekil 4.23: AgRP-optogenetik grubundan temsili bir görüntü.	53
Şekil 5.1 Optogenetik yönteminde kullanılan rodopsin iyon kanalları ve uyarılabilecekleri ışık renkleri.	55

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

5-HT₂CR: Serotonin 2C Reseptörü

AgRP: Agouti-ilişkili peptit

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

AR: Archearhodopsin

ARC: Arkuat Çekirdek

CART: Kokain Amfetamin Düzenleyici Transkript

ChR2: Channel Rhodopsin 2

CNO: clozapine-N-oksit

EEG: Elektroensefelografi

GABA: Gamma aminobutyric acid

GFP: Green Fluorescent Protein

ILAE: International League Against Epilepsy

KA: Kainik Asit

MC-R: Melanokortin reseptörü

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NORT: Novel Object Recognition Test (Yeni Obje Tanıma Testi)

NpHR: Halorhodopsin

NPY: Nöropeptit Y

OLT: Object Location Test (Obje Yerleşim Testi)

POMC: Proopiomelanocortin

SF: Serum Fizyolojik

TIDA: Tuberoinfundibular Dopamin

α -MSH: α -Melanosit Uyarıcı Hormon

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca yanında yer aldığım, fizyoloji alanındaki tecrübe ve görüşlerini benimle paylaşıp bu alana can-ı gönülden bağlanmamı sağlayan, mesleki prensipleri ile genç akademisyenlere örnek teşkil edip, ufukumuzu açan Yeditepe Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı, danışmanım ve kıymetli hocam **Prof. Dr. Bayram Yılmaz'a** teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Tez çalışmamın gerek geliştirilmesinde gerek uygulanmasında olsun bu çalışmada her daim değerli görüşlerini benimle paylaşan değerli hocam **Doç. Dr. Burcu Gemici Başol'a** minnetlerimi sunmaktan gurur duyarım.

Doktora eğitimim boyunca gerek eğitim gerek öğretim konusunda desteğini esirgemeyen **Doç. Dr. Mehtap Kaçar'a** teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasında aynı çalışma ortamını paylaştığım ve tez çalışmam boyunca yardım eden doktora öğrencisi **Yavuz Yavuz** ve yüksek lisans öğrencisi **Zehra Yağmur Erol'a** teşekkür ediyorum.

Aynı bölümde çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum, çalışmam boyunca desteklerini hissettiğim **Fizyoloji Anabilim Dalı** ailesine gönülden teşekkür ediyorum.

Doktora hayatım boyunca ne zaman pes edecek olsam, ne zaman dursam veya ne zaman düşsem her daim elimden tutan, sen yaparsın diyen, birlikte güldüğüm ve desteklerini hem akademik anlamda hem manevi olarak hissettiğim kıymetli arkadaşlarım **Ecem Yıldırım, Tuğçe Önel** ve **Meltem Yalçın'a** sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

25 yıllık eğitim öğretim hayatımda hem maddi hem manevi desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, bu alanda verdiğim her kararda arkamda duran ve sonsuz sevgisini her daim hissettiren sevgili babam **Nizamettin Ethemoglu** ve sevgili annem **Gönül Ethemoglu** ile kardeşlerim **Ayşenur Ethemoglu** ve **Ahmet Eren Ethemoglu'na** sonsuz minnet ve saygılarımı sunuyorum.

Akademik hayatım ile ilgili aldığım her kararda arkamda duran ve verdiği destek ile bu tez çalışmasını mümkün kılan, kıymetli eşim ve en iyi arkadaşım **Ahmet Metin Sarı'ya** yaptığı tüm fedakârlıklar için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

ABSTRACT

Ethemoğlu Sarı M.S. (2021). The Effects of AgRP Neurons in the Arcuate Nucleus on Kainic Acid-Induced Epilepsy. Yeditepe University, Institute of Health Science, Department of Physiology, PhD thesis, İstanbul.

The modulatory effect of Agouti-related peptide (AgRP) neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus with gamma aminobutyric acid (GABA) is important for energy metabolism. It is known that energy metabolism is impaired in epilepsy. Due to the anticonvulsant effects of GABA and neuropeptide Y associated with AgRP neurons, it was hypothesized that these neurons may play a role in epilepsy. We presumed that acute and chronic stimulation of AgRP neurons may affect kainic acid (KA)-induced experimental epilepsy model. Thirty female and male transgenic AgRP-cre mice were used. Epileptic activity was induced with 100 nl of KA (15mM, in saline). Optogenetic and chemogenetic methods were used to investigate the effects of acute and chronic stimulation of AgRP neurons on epileptic activity. As a result, the control and epilepsy groups were compared according to electroencephalography (EEG), cell attach recording, feeding behaviour, open field, object location and novel object recognition tests. All experiments were approved by the local animal research ethics committee. One-Way-ANOVA and Student-t-test were applied for statistical analysis. Seizures were scored according to the racine scale. Three and above were considered as seizures and compared with the control group ($p < 0.05$). Although the epilepsy and control groups continued in the same pattern in EEG, the epilepsy group followed a higher numeric trend in amplitude. During the open field test, it was observed that the epilepsy group, whose AgRP neurons were chronically stimulated, spent less time in the inner zone compared to the control group ($p < 0.05$). Even though the acute and chronic stimulation of AgRP neurons did not make a significant difference in the epilepsy group, it was observed that the results followed a similar trend to the control group. Our findings suggest that AgRP neurons may have a modulatory effect in epilepsy.

Key words: Epilepsy, AgRP neurons, Optogenetic, Chemogenetic, Behaviour Tests

ÖZET

Ethemoğlu Sarı M.S. (2021). Arkuat Çekirdekte Bulunan AgRP Nöronlarının, Kainik Asit ile İndüklenmiş Epilepsi Üzerine Etkileri. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Agouti ile ilişkili peptit (AgRP) nöronlarının hipotalamusun kavisli çekirdeğindeki gama aminobütirik asit (GABA) ile modülatör etkisi, enerji metabolizması için önemlidir. Epilepside enerji metabolizmasının bozulduğu bilinmektedir. AgRP nöronları ile ilişkili GABA ve nöropeptid Y'nin antikonvülsan etkileri nedeniyle, bu nöronların epilepside rol oynayabileceği varsayılmıştır. AgRP nöronlarının akut ve kronik uyarılmasının, davranışsal ve elektrofizyolojik olarak kainik asit (KA) kaynaklı deneysel epilepsi modelini etkileyebileceğini varsaydık. Otuz dişi ve erkek transgenik AgRP-cre faresi kullanıldı. Epileptik aktivite, 100 nl KA (serum fizyolojik içinde 15mM) ile indüklendi. AgRP nöronlarının akut ve kronik uyarılmasının epileptik aktivite üzerindeki etkilerini gözlemlemek için optogenetik ve kemogenetik yöntemler kullanıldı. Sonuç olarak, kontrol ve epilepsi grupları elektroensefalografi (EEG), dinlenim zar potansiyeli kaydı, beslenme davranışı, açık alan, obje yerleşim ve yeni nesne tanıma testlerine göre karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz için One-Way-ANOVA ve Student-t-test uygulandı. Nöbetler racine cetveline göre skorlandı. Üç ve üzeri nöbet olarak kabul edildi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı ($p<0.05$). EEG'de epilepsi ve kontrol grupları aynı düzende devam etse de, epilepsi grubu amplitüdde daha yüksek bir sayısal eğilim izledi. Açık alan testi sırasında AgRP nöronları kronik olarak uyarılmış epilepsi grubunun kontrol grubuna göre iç bölgede daha az zaman geçirdiği görüldü ($p<0.05$). AgRP nöronlarının akut ve kronik uyarımı epilepsi grubunda anlamlı bir fark yaratmasa da sonuçların kontrol grubuna benzer bir seyir izlediği görüldü. Bulgularımız, AgRP nöronlarının epilepside modülatör bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, AgRP nöronları, Optogenetik, Kemogenetik, Davranış Deneyi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, dünya genelinde yaklaşık 65 milyon insanı etkileyen nörolojik bir hastalıktır ¹. Çok sayıda insanın yaşam kalitesini düşüren bu hastalığın hala bilinmeyen yönleri bulunmaktadır. Epilepsi mekanizmasında cevaplanamamış sorulardan bazıları; ani nöbetlerin başlamasının altında yatan sebepler, bu nöbetlerin nasıl yayıldığı ve nöbetlerin bitmesini sağlayan mekanizmanın bilinmeyenleridir. Epilepsi mekanizmasında yer alan bu boşluklar hastalığa yaklaşım ve yeni tedavi yöntemleri için zorluk oluşturmaktadır².

Hastalığa tedavi yaklaşımında en etkili yol epilepsi cerrahisidir ³. Ancak bu cerrahi yaklaşım, beyin dokusunun çıkarılmasının geri döndürülemez sonuçları nedeniyle çok az hasta için uygundur³. Özellikle refraktör epilepsi fokal olduğu için en iyi umut, rezektif cerrahidir. Bununla birlikte, bu tür cerrahinin olumsuz etkileri sebebiyle bu yaklaşım hastaların %5'inden daha azı için uygundur. Tüm bunların aksine son yıllarda deney hayvanlarında çalışılmakta olan gen terapisi, beyin işlevini korurken epileptik odaktaki nöronal uyarılabilirliği düzenleyebilir ⁴.

Kemogenetik yöntem, deney hayvanlarında nöronal aktivitenin manipülasyonunu sağlar. Nöronlarda, G proteinine bağlı reseptörler, ligandlarına bağlı olarak nöronal ateşlemeyi aktive edebilir, inhibe edebilir veya modüle edebilir. Bu özellik ile kemogenetik, çeşitli hücre işlevlerini modüle etmek için kullanılabilir⁵. Bu amaçla clozapine-N-oxide (CNO) ligandına bağlı olarak hM3Dq nöronal aktivasyonu sağlamak için kullanılan muskarinik bir reseptördür. Beslenme, enerji tüketimi, sinaptogenez, hafıza ve sosyal davranış deneylerinde kullanıldığı çok sayıda araştırma bulunmaktadır⁶. İnsan muskarinik M4 reseptöründen üretilen hM4D, CNO ile uyarıldığında hücreyi hiperpolarizasyona götürerek, nöronu inhibe eder ve presinaptik terminale daha az nörotransmitter salınmasına sebep olur ⁷.

Son yıllarda yapılmış çalışmalar, kullanılan kemogenetik ajanların hem epileptik nöbetleri baskılamada hem de epilepsi mekanizmasının açıklanmasına katkıda bulunmuştur. 2014 yılında Kätzel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁷ akut ve kronik nöbet modellerinde kemogenetik teknoloji kullanılmış ve ligand olan CNO verildiğinde nöbetlerin baskılandığı ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra hipokampal dentat granül hücrelerinin epilepsideki rolü de yine kemogenetik susturma yöntemi ile gösterilmiştir ⁸.

Optogenetik, canlı doku ve hayvanların spesifik hücrelerinde iyi tanımlanmış olayları uyarmak veya inhibe etmek amacıyla kullanılan genetik ve optik yöntemler kombinasyonudur⁹. Optogenetik, ışık ile aktive olan iyon kanalları ve hedef hücre popülasyonlarında bulunan spesifik iyon kanalları kullanılarak, hedef hücrelerin milisaniyeler içinde uyarılabilmesi veya inhibe edilmesine olanak sağladığı için, epilepside olası bir alternatif tedavi olabilir¹⁰.

Gama aminobütirik asit (GABA) internöronları, heterojen bir hücre topluluğudur. Bu heterojen topluluk hücre membranları, uyarılabilme özellikleri, morfolojileri ve eksprese ettikleri biyolojik belirteçlere göre farklılık gösterir¹¹. Nöbet geçirme sürecinin altında yatan sebepler hala tam olarak kanıtlanamamış olsa da, bu süreçte özellikle hipokampusta yer alan GABA internöronlarının önemli bir rolü ortaya konmuştur¹². Hipokampusta yer alan GABA internöronları, toplam hipokampal nöron popülasyonunun yaklaşık olarak %10-15'ini oluşturur. CA1/CA3 bölgesinde bulunan GABA internöronlarının deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda özellikle nöronal devre kontrolünde önemli bir yere sahip olduğu bildirilmiştir¹³.

Hipotalamus beyinde temel yaşam fonksiyonlarıyla ilgili önemli kararların oluşturulması için gerekli olan bir dizi duyuşal girdiyi işlemek ve bütünleştirmekle görevlidir. Bu girdileri her bir parametre için ideal seviyeleri ile kıyaslar ve gerekli cevabı hazırlamaya yardımcı olur. Hipotalamus, vücudu homeostazda tutmaya yardımcı olan ve özelleşmiş nöronların gruplandığı birçok çekirdekten meydana gelmiştir¹⁴. Bu çekirdeklerden biri olan arkuat çekirdek (ARC), vücudun enerji sensörleri gibi hareket eden özelleşmiş nöronlara sahiptir. Hipotalamusun daha çok ventral kısmında uzanır ve 3. ventrikülü saran bir şekilde yerleşmiştir¹⁵. ARC'de özellikle öne çıkan iki tip nöron grubu bulunur ve bunlar birbirine zıt olarak çalışır. Agouti ilişkili peptit (AgRP) ve nöro-peptid Y (NPY) sentezleyen nöron grubu besin alımını uyarır, enerji tüketimini azaltır. Öte yandan proopiomelanokortin (POMC) ve kokain-amfetamin düzenleyici transkript (CART) sentezleyen nöronlar ise besin alımını azaltırken, enerji harcanmasını artırır¹⁶. AgRP ve NPY peptitleri birlikte ifade edilir. Bu peptitler özellikle leptin sinyal eksikliğinin neden olduğu obezitenin önemli bir bölümüne aracılık ederler. NPY'nin nöbetleri baskılayabildiği *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir¹⁷. Epilepsi hastalarında beslenme şeklinin düzenlenmesi çok yaygın bir tedavi yöntemidir¹⁸.

Bu tez projesinde, ARC’de bulunan AgRP nöronlarının deneysel temporal lob epilepsi patolojisindeki olası rolünün açıklanması amaçlanmıştır. Bu sebeple AgRP nöronlarının akut ve kronik olarak uyarılması bu nöral ağdaki yerini açıklayabilmek için ilk basamak olmuştur. Optogenetik ve kemogenetik yöntemler, nöronal ağları araştırmak için kullanılan yeni ve güçlü tekniklerdir. Bu teknikleri epilepsi mekanizmasını araştırmak için kullanmak gelecek çalışmalara ışık tutacaktır.

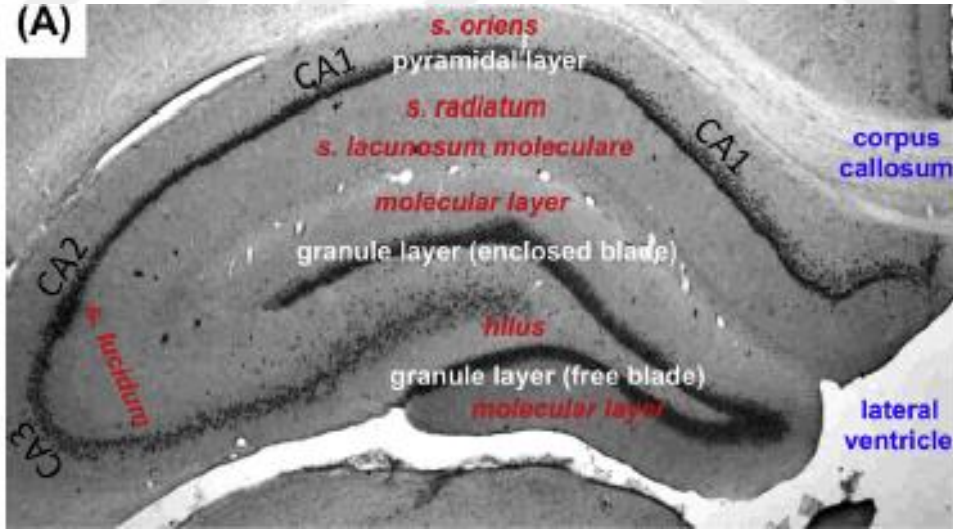


2.GENEL BİLGİLER

2.1.Hipokampus

Hipokampal oluşum; insanların temporal lobunda, kemirgenlerin ise ön beyinlerinin kaudal kısmında yer alan filogenetik olarak ilkel bir kortikal yapıdır. Hipokampus Yunanca'da şeklinden dolayı “denizati” anlamına gelmektedir¹⁹. Hipokampal oluşum üç ana yapıdan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla hipokampus, dentat girus ve subikulumdur. Bu yapıları ise eksitator glutamaterjik esas (principal) nöronlar ve inhibitör GABA ara nöronlar oluşturur. Hipokampus, lateral ventrikülün temporal boynuzunun medialinde yer alan bir kabarıklık olarak tanımlanır. Bu kabarıklığın sebebi ventrikül duvarının invaginasyonudur. Bu invaginasyon hipokampal fisür olarak adlandırılan katlanma ile oluşur²⁰.

Hipokampal formasyonun başlıca soma katmanları, piramidal hücre gövdelerinden veya dentat girustaki granül hücre gövdelerinden oluşur. Anatomistler hipokampal nöropil bölgelerini, temel hücre süreçlerindeki mikroskopik farklılıklara ve her bir katmanda bulunan afferentler ve efferentlere dayanarak farklı seviyelere ayırmışlardır²¹.



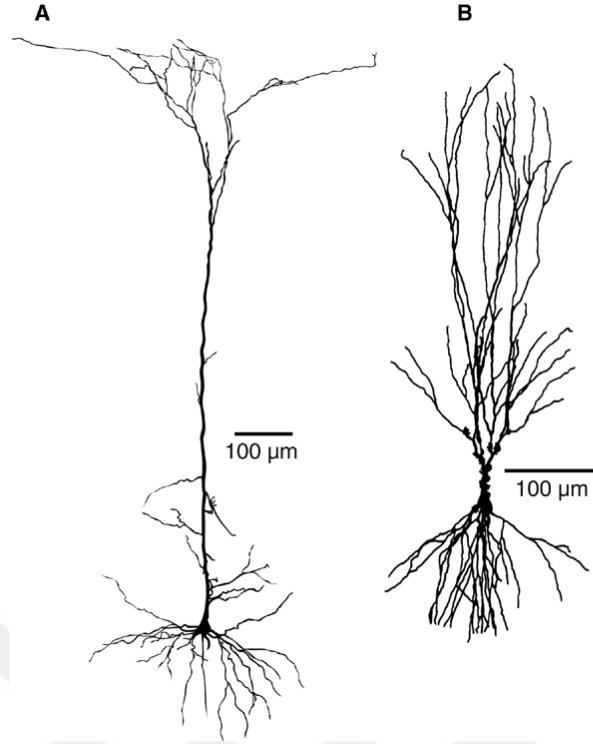
Şekil 2.1: Kemirgenlerde dorsal hipokampal formasyon.

Hipokampus ve dentat girusu enine bir kesitte görüntülerken, düzenli sıralanmış ana hücre gövdeleri ile bir “C” (hipokampus) veya “V” (dentat girus) oluşturur. Hipokampusta bulunan “C” şekilli piramidal hücre gövdeleri oluşumu, morfolojik ve ara

bağlantı farklılıklarına dayalı olarak üç alt alana ayrılmıştır²². Bu alanlar ise hipokampusun latince ismi olan “Cornus Ammonus (Amon’un boynuzu) üzerine CA1, CA2 ve CA3 olarak adlandırılmıştır. CA3 bölgesi dentat girusa bitişikken, CA1 bölgesi subikuluma komşudur. CA2 bölgesi bu iki bölge ile morfolojik, fenotipik ve bağlantısal olarak benzer özellikler gösterse de fonksiyonel olarak farklı özelliklere sahip bir hücre bölgesi oluşturur²³. Dentat girusdaki granül hücreler, morfoloji açısından “V” şekilli oluşum boyunca benzer şekilde ilerlerler. “V” şekilli oluşuma yol açan dentat girusun iki kolu, genellikle kapalı veya suprapiramidal kanadı ve serbest veya infrapiramidal kanadı olarak adlandırılır. Bu iki kanadın CA3 bölgesine yaptıkları projeksiyonlarda ve afferent bağlantılarında farklılıklar bulunmaktadır. Bu iki kanat arasında kalan bölge ise dentat girusun hilusu veya polimorfik bölge olarak adlandırılır²⁴.

Hipokampal oluşumun esas hücrelerinin tamamının (piramidal ve granül hücreler) glutamaterjik olduğuna inanılmaktadır. Piramidal hücreler, belirgin bir şekilde piramit şekline sahiptir. CA3 ve CA2'deki piramidal hücreler, CA1'dekilerden daha büyük hücre gövdelerine sahiptir. Her hücrenin tepesinden ve tabanından ayrı çok dallı dendritik uzantılar çıkar²⁵.

Piramidal nöronlar, diğer birçok nöron tipi gibi, sinaptik girdileri, aksiyon potansiyeli çıktısına dönüştürür. Bu nöron grubu, sayılarının çokluğu ve aksonlarını genellikle uzun mesafelere göndermeleri nedeniyle önemlidir. Bundan dolayı “projeksiyon nöronları” olarak da adlandırılırlar. Örnek olarak; motor korteksin 5. tabakasındaki piramidal nöronlar, kasları çalıştırmak için aksonlarını omurilikten aşağı gönderir. Hipokampal piramidal nöronlar, kortikal piramidal nöronlardan daha küçük yapıdadırlar ve bu nöron grubu farklı olarak bir topluluk gibi davranarak, aynı anda aksiyon potansiyeli oluştururlar²⁶ (Şekil 2).



Şekil 2.2: Beşinci katman kortikal piramidal nöron (A) ve CA1 bölgesinde yer alan piramidal nöron (B)²⁶.

Tüm hipokampal piramidal nöronlar aynı yönelimde olup, apikal dendiritik bağlantıları “C”şekli boyunca merkeze doğru uzanır. Bu nöronlar striatum oriensin içine girerek, distal hipokampal veya subkortikal hedeflere giderler²⁴.

Dentat girusun üç katmanı vardır. Bunlar dıştan içe sırasıyla moleküler katman, granül hücre katmanı ve polimorfik katmandır. Dentat girusun ana hücre tipi granül hücrelerdir. Granül hücreler birbirlerine sıkıca kenetlenmiştir. Çoğu durumda hücreler arasında glial kılıf bulunmaz. Dentat girusun granül nöronları, oval şekilli hücre gövdelerine sahiptir. Bu hücreler aynı yöne doğru yerleşmişlerdir ²⁷. Dentat girusun granül nöronları eksitator iken, piramidal sepet (basket) hücreleri ise inhibitördür. Bunlar dentat girusta çalışan en yoğun inhibitör internöronlardır²⁸.

Dentat girusun hilus bölgesinde yer alan büyük somalara sahip glutamaterjik nöron topluluğu mossy hücreleridir. Bu nöronlar mossy liflerden girdi alıp dentat girusun granül hücrelerine projeksiyon yaparlar. Dallara ayrılmış mossy lifler, deneysel temporal lob epilepsisindeki ayırt edici histopatolojik bulgulardan biridir. Bu fiberler, nöbet

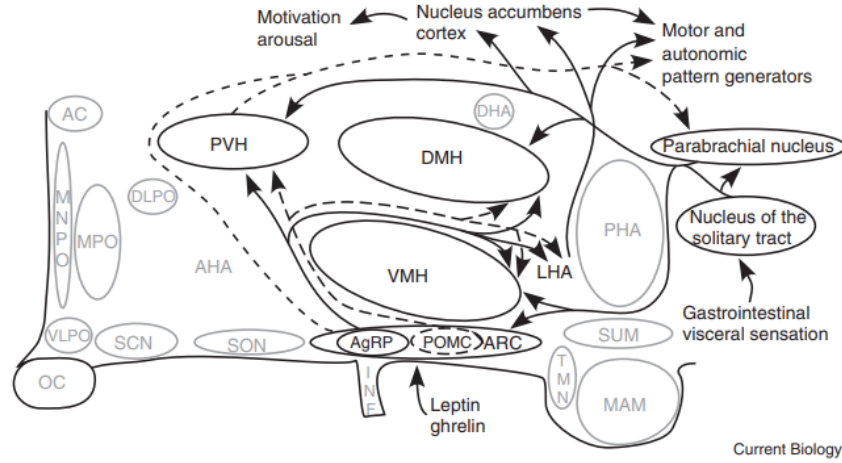
sürecinde kısa dönem depresyon sergileyen dentat granül hücreleri üzerinde, tekrarlayan eksitator sinapsları oluşturlar²⁹.

GABAerjik internöronlar, heterojen bir hücre topluluğudur. Bu heterojen topluluk, nöron membranları, ateşleme özellikleri, morfolojileri ve eksprese ettikleri biyolojik işaretleyicilere göre farklılık gösterirler¹¹. Dentat girus ve hipokampusun tüm katmanlarına dağılmış çeşitli tipte inhibitör aranöron hücre gövdeleri vardır. Bu aranöronlar parvalbumin, kalbindin ve kalretinin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinler ile kategorize edilmiştir¹³. İnternöronlar, hipokampal oluşumun %10-15'ini oluşturuyor olsa da esas hücrelerle yaptıkları çok sayıda sinaptik bağlantı ve geniş akson terminalleri ile hipokampal fonksiyon üzerinde önemli bir etkiye sahiptirler. Bu etkiyi esas nöronları hedef alarak, aktivitelerini inhibe ederken bazı internöronlarda, diğer internöronları hedef alarak esas hücrelerin disinhibisyonunu sağlar³⁰. Tekrarlayan nöbetlerde GABAerjik aranöron mekanizmasının bozulduğu, bu nedenle aranöronlarda kayıplar yaşandığı böylece kronik epileptogenez durumunun daha da arttığı öne sürülmektedir³¹.

2.2.Hipotalamus

Hipotalamus, beynin en eski ve en küçük bölümlerinden biridir. Hipotalamus temel yaşam fonksiyonlarını kontrol eden nöronal devrelere sahiptir. Bu nöronal devreler, beslenmeden sindirime kadar enerji metabolizması, metabolik kontrol ve enerji harcaması; sıvı ve elektrolit dengesi, sıvı Emilimi ve atılımına kadar; ısı üretimi ve korunması ile termoregülasyon; uyanma-uyku döngüleri ve ortamdaki stres faktörlerine acil müdahaleler ve üreme hormonu kontrolünden çiftleşme, hamilelik, doğum ve emzirmeye kadar üreme gibi birden fazla karmaşık yaşamsal faaliyeti kapsar³².

Hipotalamus, anatomik yerleşimi açısından en kolay ventral yüzeyinden tanımlanabilir. Önde optik kiazma, lateralde optik yollar ve arkada mamiller cisim ile sınırlandırılmıştır³³ Willis çemberinin kan damarlarıyla çevrilidir. Hipotalamusun, orta hattında üçüncü ventrikül iki taraf arasında bir sınır oluşturacak şekilde bulunur. Bu orta hat boyunca hipotalamus, beynin her iki tarafında simetrik olarak yerleşir. Çoğu fonksiyon için hipotalamusun sadece bir tarafının aktivitesi gereklidir¹⁴. Yetişkin bir memeli hipotalamusu anatomik olarak dört rostrokaudal seviyeye ve üç mediolateral bölgeye ayrılabilir³⁴ Rostralden kaudale kadar dört bölge preoptik, anterior, tuberal ve mamiller hipotalamus olarak adlandırılır. Bunların her biri lateral, medial ve



Şekil 2.4: Beslenmenin düzenlenmesinde rol oynayan hipotalamik mekanizmaların şematik gösterimi¹⁴.

2.2.1. Arkuat çekirdek

Hipotalamusta birden fazla çekirdek, enerji dengesinin düzenlenmesinde rol oynar. Üçüncü ventrikülün tabanına bitişik bulunan ARC, periferik metabolik sinyallerin enerji durumu üzerine bütünlük için bir anahtar bölgedir³⁷. Üçüncü ventrikülün tabanında ve medyan eminensin (işlevsel bir kan-beyin bariyeri olmayan bir çevresel organ) bitişğinde yer alan ARC nöronları, hem dolaşımdaki sinyalleri hem de diğer beyin bölgelerinde bulunan nöronlardan gelen girdileri algılayabilir ve bunlara yanıt verebilir.³⁸

ARC, çeşitli homeostatik devrelerde merkezi bir rol oynar ve gıda alımının, enerji harcamasının ve vücut ağırlığının merkezi düzenlenmesi için özellikle önemli bir bölgedir³⁹.

Merkezi melanokortin sistemi, enerji homeostazının düzenlenmesinde yer alan en iyi karakterize edilmiş nöronal yollardan biridir. Aynı zamanda sistem, obezite ve diyabet tedavisine yönelik ilaçların geliştirilebilmesi için de açık bir hedeftir. Bu nöronal yolak; hormon, besin ve nöral girdilerden gelen sinyalleri algılayıp düzenlemesi bakımından benzersizdir. Melanokortin sisteminin özellikle arkuat çekirdeğe gelen leptin ve insülinin uzun vadeli adipositik sinyallerinin ve beyin sapına gelen akut açlık-tokluk sinyallerinin bütünleştirilmesinde büyük bir rol aldığı düşünülmektedir⁴⁰. Sistem, melanokortin reseptörlerinin hem agonistleri hem de antagonistlerini eksprese etmesi bakımından da benzersizdir.

Hipotalamik melanokortin sistemi, POMC ve AgRP nöronlarından oluşur ve bu nöronlar melanokortin reseptörleri (MC-R) eksprese eden diğer nöron gruplarına, kendi peptit ürünleri sayesinde projeksiyon yaparak enerji metabolizmasını düzenleyebilir⁴¹. POMC'den üretilen α -melanosit uyarıcı hormon (MSH), G-proteinine bağlı MC4-R için bir agonisttir. Bu etkileşim, gıda alımını azaltır ve enerji harcamasını artırır. Tersine AgRP, güçlü bir melanokortin reseptör antagonistidir ve pozitif enerji dengesini destekleyen bir ters agonist gibi davranır. Her iki nöron grubu da leptin ve insülin için birer hedeftir ve enerji dengesini düzenlemek için beslenme ve nöronal sinyalleri birleştirebilir⁴².

Merkezi melanokortin sistemi, yalnızca periferik enerji harcaması, glukoz homeostazı ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi için metabolik sinyal üretmekle kalmaz, aynı zamanda merkezi melanokortin nöronlarının aktivitesini akut olarak düzenleyen periferik organlardan da hümorale metabolik sinyaller alır. Bu geri bildirim mekanizması, anoreksijenik metabolik hormonlara karşı verilen cevaplarda anahtar role sahiptir. Öte yandan verilen cevaplardaki eksiklik, sistemde patolojik bir bulguya neden olabilir⁴³.

Leptin, vücuttaki yağ kütlesi ile orantılı miktarda beyaz yağ dokusu tarafından üretilen ve salınan anoreksijenik bir hormondur. Leptin, POMC ve AgRP nöronlarını farklı seviyelerde düzenler⁴⁴. İnsülin ve leptin reseptörleri POMC ve AgRP nöronlarında eksprese edilir ancak POMC nöronlarının ATP-duyarlı potasyum kanalları yoluyla insüline yanıtı obez farelerde değil, sadece zayıf farelerde meydana gelir. Leptin beyaz yağ dokusundan salınır ve hem pre- hem de postsinaptik mekanizmalar yoluyla POMC nöronlarını aktive ederken, AgRP nöronlarının ateşleme hızını azaltır⁴⁴.

Öte yandan ghrelin ise oreksijenik bir hormondur⁴⁵. Plazma ghrelin seviyeleri açlıkla artar ve yemekten sonra hızla düşer. Sistemik veya merkezi olarak verildiğinde ghrelin, beslenmeyi uyarır ve ARC'deki AgRP nöronlarını aktive eder. Bu nedenle, ağırlık kaybı sırasında, artan plazma ghrelin seviyeleri, azaltılmış insülin ve leptin sinyalizasyonu ile kombinasyon halinde, kaybedilen kiloların geri kazanılmasına katkıda bulunur³⁸.

ARC'de çeşitli fonksiyonları bulunan birden fazla nöron grubu bulunmaktadır. Bunlardan ilki; Dorsomedial ARC'de bulunan tuberoinfundibular dopamin (TIDA)

nöronları, prolaktin hormonu üreten hipofiz laktotrop hücreleri üzerinde güçlü bir baskılayıcı etki sağlar⁴⁶. Prolaktin, laktasyonda önemli rol oynar⁴⁷. Geç gebelik ve emzirme döneminde dolaşımdaki prolaktin artışı, annede emzirme ve anne bakımı dâhil olmak üzere birçok önemli fizyolojik işlevi başlatır. Hipofiz portal kan dolaşımına geçiş için bu nöronlar tarafından medyan eminens'ten salınan dopamin, dopamin D2 tipi reseptörleri aracılığıyla laktotropları tonik olarak inhibe eder. TIDA nöronlarının uyarılma frekansları da dâhil olmak üzere, diğer nöron gruplarından farklı bir elektrofizyolojik karakteristiğe sahip olduğu gösterilmiştir⁴⁸.

Pubertal başlangıç ve üremede kilit rol oynayan Kisspeptin nöronlarının bir kısmı antroventral periventriküler çekirdekte yer alırken, diğer nöron popülasyonu ARC'de bulunmaktadır. ARC kisspeptin nöronlarının gonadol steroidlerin negatif geri besleme etkilerini ilettiği, bu nedenle de gonadotropinin tonik etkisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir⁴⁹. Kemirgenlerde yapılan çalışmalar, ARC'nin gonadotropin salınımı yaptıran hormonunun dalgalı (pulsatil) üretimin ana bölgesi olduğu ve bu sebeple de üreme fonksiyonları için gerekli olduğunu göstermiştir⁵⁰.

Son olarak, ön hipofiz bezinden büyüme hormonu salgılanmasını somatostatin ve NPY ile birlikte kontrol eden büyüme hormonu salgılayıcı hormon nöronları da, ARC'de bulunan bir nöron grubudur⁵¹.

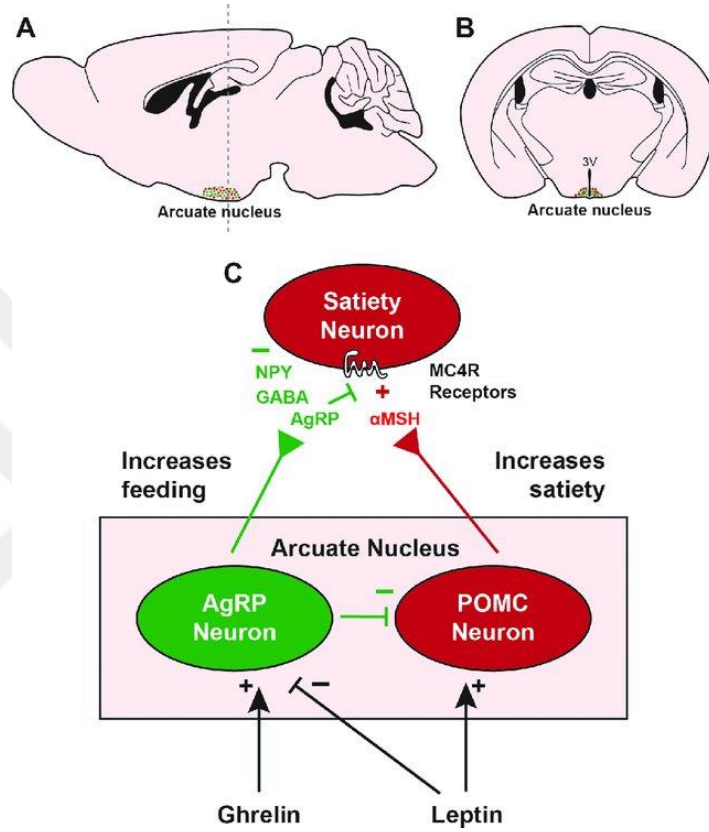
ARC'de bulunan melanokortin sisteminin iki ana nöron grubu olan POMC ve AgRP ise alt başlıklarda incelenecektir.

POMC Nöronları: ARC içinde, POMC nöronları, hipofiz sapının hemen üzerindeki üçüncü ventrikülün tabanında medyan eminens/tübero-infundibular zona bitişik olarak bulunur. Bu nöronların çoğu, CART peptidini birlikte eksprese eder ve beyinde geniş çapta projeksiyon yapabilirler⁴¹. POMC nöronlarının doğrudan aktivasyonunun, gıda alımının baskılanmasına yol açtığı optogenetik ve kemogenetik yöntemlerle gösterilmiştir. POMC nöronlarının, anoreksik MC4R'lere agonist olan alfa-melanosit uyarıcı hormon (α -MSH) salgılayarak iştahı bastırdığına inanılmaktadır. MC4R eksikliğinin farelerde hiperfaji ve obezite ile sonuçlandığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu nedenle, POMC nöronlarını ve MC4R eksprese eden nöronları içeren merkezi melanokortin yolağı, beyinde önemli bir anoreksijenik devreyi temsil eder⁵². Merkezi melanokortin yolunu aktive eden anahtar anoreksijenik sinyallerden biri de

serotoninidir. Serotoninin anoreksijenik etkisine büyük ölçüde POMC nöronları tarafından ifade edilen serotonin 2C (5-HT₂CR) reseptörleri aracılık eder⁵³. ARC içinde iki farklı POMC nöron popülasyonu mevcuttur; 5-HT₂CR eksprese eden POMC nöronları gıda alımını baskılar ve LepR eksprese eden POMC nöronları enerji tüketimini artırır. 5-HT₂CR olan POMC nöronları, paraventriküler çekirdekte bulunan Sim1 nöronlarının MC4R'leri aracılığıyla gıda alımını baskılar. Öte yandan POMC nöronları, omurilikte bulunan intermediolateral kolondaki sempatik nöronları tarafından ifade edilen MC4R'ler ile enerji harcamasını artırırlar⁵⁴.

AgRP Nöronları: AgRP orijinal olarak mediobasal hipotalamustaki nöronlar tarafından üretilen ve MC4R'nin ve beyinde eksprese edilen melanokortin reseptör ailesinin başka bir üyesi olan MC3R'nin antagonisti olarak işlev gören bir peptittir⁵⁵. Hipotalamusta AgRP eksprese eden nöronlar, NPY'yi birlikte eksprese eder ve beslenmeyi düzenlemek için periferden gelen oreksijenik ve anoreksijenik sinyallere yanıt verirler⁵⁶. AgRP'nin sistemik olarak verilmesi artan beslenmeye neden olur. Gıda yoksunluğu, AgRP/NPY nöronlarında NPY ve AgRP mRNA ekspresyonunun artmasına neden olurken, yeniden beslenme bu peptitlerin seviyelerini eski haline getirir⁴¹. AgRP/NPY nöronları ayrıca GABA salgılar. GABA inhibitör bir nörotransmitterdir ve oreksijenik etkisini POMC/CART nöronlarının GABAerjik aracılı inhibisyonu yoluyla gösterebilir⁵⁷. GABA nörotransmisyonunun AgRP/NPY nöronlarının oreksijenik etkilerinin çoğuna aracılık ettiğine inanılmaktadır. Örneğin, özellikle AgRP nöronlarında bulunan veziküler GABA taşıyıcısı genlerinin silinmesi, oreksijenik etkilerde GABAerjik nörotransmisyonun önemini doğrular nitelikte, deney hayvanlarında zayıf vücut fenotipine yol açar⁵⁴. Akut beslenmeye NPY ve GABA aracılık ederken, nöropeptid AgRP'nin ve onun melanokortin reseptörleri ile etkileşiminin, beslenme davranışının uzun vadeli düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir⁵⁸. AgRP nöronlarının silinmesi sonucunda, standart diyet uygulandığında obez ve hiperinsülinemik hale gelen fareler, yüksek yağlı diyet ile beslendiklerinde vücut ağırlıklarında azalma ve glikoz toleransında paradoksal bir gelişme olduğu gösterilmiştir. AgRP nöronlarının ablasyonunun, karaciğer, kas ve pankreas arasındaki, lipid ve karbonhidrat metabolizması dengesinde değişikliğe yol açtığı belirtilmiştir⁵⁹. AgRP/NPY nöronları AgRP, NPY ve GABA aracılığı ile hem oreksijenik etkisini hem de enerji metabolizmasını bir orkestra şefi gibi yönetmektedir. Literatürdeki çalışmalar AgRP/NPY nöronlarının termogeneizde de önemli bir yeri

olduğunu, enerji harcamasını arttırmada rol aldığını göstermektedir⁶⁰. AgRP nöronlarının aktivasyonu ve ablasyonunun, kaygı benzeri davranışlarda görünüşte benzer bir azalmaya neden olduğu, buna ek olarak, gıda uyarılarının yokluğunda hipotalamik AgRP nöronlarının aktivasyonunun, yiyecek arama ve diğer stereotipik davranışları tetiklediği de gösterilmiştir⁶¹.



Şekil 2.5: Arkuat Çekirdek Melanokortin Yolağı⁶².

2.3.Nöbet ve Epilepsi

2.3.1.Nöbet:

Uluslararası Epilepsi ile Savaş Birliği'nin (International League Against Epilepsy, ILAE) 2017 yılında yayınladığı rapora göre; nöbet, beyinde anormal, aşırı veya senkronize nöronal aktiviteye bağlı olarak geçici belirti ve/veya semptomların ortaya çıkmasıdır⁶³. Epileptik nöbet, anormal nöronal aktivitenin neden olduğu nesnel belirtiler veya öznel semptomlar ile kendini gösteren geçici bir davranış değişikliğidir. Paroksizmal bir atak olan nöbet sırasında ortaya çıkabilen semptomlar ise duyu ve motor fonksiyonlarında ani değişiklikler ve bilinç kayıpları oluşturabilmektedir. Nöbet sadece epilepsiye bağlı olarak meydana gelmez. Epileptik nöbetlerin temel özelliği tekrarlanabilir olmasıdır. Epileptik nöbet, anormal nöronal ateşlemenin neden olduğu bir nöbeti, psikojenik nöbet gibi epileptik olmayan bir olaydan ayırt etmek için kullanılır. Birçok hastada epilepsinin nedeni bilinmemekle birlikte, nöbetler, beyin işlevini bozan hemen hemen her türlü olayın sonucu olabilir. Sebebi, felç veya travmatik beyin hasarı olabilirken, bulaşıcı hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve genetik mutasyonlarda bu sebeplerden olabilir⁶⁴. Epileptik nöbetlerin ne zaman başlayıp ne zaman biteceği tahmin edilemediği için hastanın yaşam kalitesini önemli derecede düşürmektedir.

Nöbetler Elektroensefelografi (EEG) yöntemi ile gösterilebilir. Nöbet riskinin yüksek olduğu EEG korelasyonları, iktal (nöbet sırasında), postiktal (nöbet sonrası) veya interiktal (nöbetler arasında) olarak kategorize edilir. Bu ayrımlar genellikle belirsizdir, çünkü birçok nöbet için interiktal-iktal sınırlar kesin olarak ayrılamaz⁶⁵. İktal dönem genellikle kısa sürer ve müdahale edilmeden biter. Eğer bu iktal dönem sona ermezse, hasta status epileptikus yaşamaya başlar bu da hasta için hayati tehlike arz eder⁶⁶.

2.3.2. Epilepsi:

Epilepsi, aşırı nöronal uyarılabilirlikten kaynaklanan, tekrarlı ve beklenmedik nöbetlerle karakterize nörolojik bir hastalıktır⁶⁷. Epilepsi, 100.000 olan bir nüfusta yılda yaklaşık 50 yeni vaka insidansı ile en yaygın nörolojik durumlardan biridir. Dünya genelinde nüfusun yaklaşık %1'i epilepsiden muzdariptir⁶⁸.

Epilepsi için ilaç tedavisi çoğu durumda başarılı olsa da, bazı epilepsi türleri kolay kontrol edilememektedir. En sık görülen epilepsi formlarından biri olan temporal lob

epilepsisi olan hastaların yaklaşık %30-40'ı ilaca dirençlidir. Bu da, alternatif tedavi stratejileri geliştirme talebini ortaya koymaktadır⁶⁹.

Epilepsi, ILAE tarafından bir “bozukluk” değil “hastalık” olarak yeniden tanımlanmıştır. “Hastalık” terimi, epilepsinin önemini ve etkisini hastalara, klinisyenlere ve topluma daha iyi vurgular. Bazıları “hastalığın” daha fazla damgalanma taşıdığından endişe duysa da, kanser, diyabet ve kalp hastalığı gibi önemli hastalıkların da tümü bozukluk değil, hastalıktır⁷⁰.

Epilepsi, bir kişinin epileptik nöbet geçirmesi ve beyninin "patolojik ve tekrarlayan nöbet geçirme eğilimi göstermesi" durumunda ortaya çıkar. Her nöbet epilepsi değildir fakat epilepsi nöbet hastalığı olarak tanımlanabilir. Epilepsi, EEG’de görülen epileptiform aktivite ve beyin görüntüleme yöntemlerinde görülebilen epileptojenik anormallik ile gösterilebilir⁷¹.

Epilepsi hastalığının tanısını koyabilmek için 2014 yılında ILAE’nin yayımladığı rapora göre, aşağıda bulunan üç durumdan biri varlığında epilepsi hastalığından bahsedilir:

- 1) Hastanın yirmi dört saat ara ile en az iki tane spontan nöbet veya refleks nöbet geçirmesi.
- 2) En az bir spontan veya refleks nöbet geçirmesi ve 10 yıl içerisinde nöbet tekrarlama riskinin en az iki spontan nöbet varlığındaki riske benzer olması (en az %60).
- 3) Hastanın epilepsi sendromlarından herhangi birine sahip olması.⁷⁰

Epilepsi mekanizmasının tam olarak anlaşılamaması sebebiyle, mevcut tedavi seçenekleri yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte hastaların yaklaşık üçte biri mevcut tedavi seçenekleri ile nöbetlerini kontrol altına alamamaktadırlar. Ayrıca bu tedavilerin yan etkilerinden olumsuz etkilenmektedirler. Epilepsi cerrahisi, bu hastaları nöbetsiz kılmak için en yüksek şansa sahiptir, ancak sadece az sayıda hasta ameliyat için uygundur. Ameliyat olamayan ve ilaçlara yanıt vermeyen hastalar için nöro-stimülasyon cihazları, diyet terapileri veya yeni ilaçların klinik denemeleri alternatif seçeneklerdir⁶⁴.

Epilepsi mekanizmasında cevaplanamamış sorulardan bazıları; ani nöbetlerin başlamasının altında yatan sebepler, bu nöbetlerin nasıl yayıldığı ve nöbetlerin bitmesini

sağlayan mekanizmanın bilinmeyenleridir. Epilepsi mekanizmasıyla ilgili bu bilgi eksiklikleri, hastalığa yaklaşım ve yeni tedavi yöntemleri için zorluk oluşturmaktadır.

2.3.3.Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması

ILAE'nin 2017 yılında yayınladığı makalede 1981 yılında yayınlanan sınıflandırmanın klinik tanının iyileştirilmesi için değiştirilmesi gerektiğini belirtmiştir.

1981 yılında yapılan sınıflandırma aşağıdaki gibidir⁷².

1.Parsiyel (fokal) Nöbetler

A. Basit Parsiyel Nöbetler (Bilinç durumu bozulmaksızın)

- Motor semptomlu
- Somatosensoryel
- Otonomik semptomlu
- Psşik semptomlu

B. Kompleks Parsiyel Nöbetler (Bilinç bozukluğu ile seyreden)

- Basit parsiyel başlangıcı izleyen bilinç bozukluğu
- Bilinç durumunun başlangıçtan itibaren bozulması

C. Sekonder Jeneralize Nöbete Dönüşen Parsiyel Nöbetler

- Basit parsiyel nöbetin jeneralize nöbete dönüşmesi
- Kompleks parsiyel nöbetin jeneralize nöbete dönüşmesi
- Basit parsiyel nöbetin kompleks parsiyel dönüşmesi ve ardından jeneralize nöbet olması

2. Jeneralize Nöbetler

- Absans nöbetler
- Miyoklonik nöbetler
- Klonik nöbetler
- Tonik nöbetler
- Tonik klonik nöbetler
- Atonik nöbetler

3. Sınıflandırılmayan Nöbetler

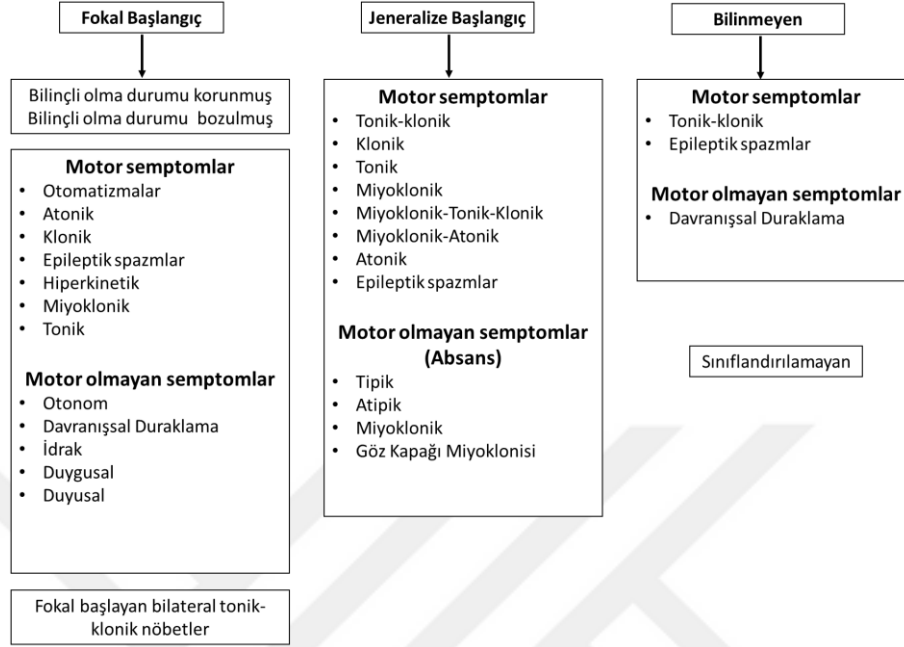
- Yeterli bilgi olmayışı nedeni ile yukarıdaki kategorilere dâhil edilmeyen nöbetlerdir.

Yukarıda bulunan sınıflandırmanın güncellenmenin sebepleri ise şöyle sıralanmıştır.

1. Bazı nöbet türleri, örneğin tonik nöbetler veya epileptik spazmlar, fokal veya genel başlangıçlı olabilir.
2. Başlangıcı hakkında bilgi eksikliği, nöbeti sınıflandırılmaz hale getirir ve 1981 sistemiyle tartışılmasını zorlaştırır.
3. Geçmişe dönük nöbet tanımları genellikle bir bilinç düzeyi belirtmez ve birçok nöbetin merkezinde yer alan bilinç değişikliği karmaşık bir kavramdır.
4. "Psişik", "kısmi", "basit kısmi", "karmaşık kısmi" ve "bilişsel olmayan" gibi mevcut kullanımdaki bazı terimler toplum tarafından yüksek düzeyde kabul görmez veya toplum tarafından anlaşılmaz.
5. Bazı önemli nöbet türleri dâhil edilmemiştir.

Epileptik nöbetlerin klinik ve elektroensefalografik sınıflandırılması Tablo 1’de gösterildiği gibidir. Bireysel bir nöbetin sınıflandırılması herhangi bir düzeyde olabilir: başka bir ek bilgi olmaksızın "fokal başlangıçlı" veya "jeneralize başlangıçlı" nöbet veya "fokal duyusal nöbet", "fokal motor nöbet", "fokal tonik nöbet" veya "fokal otomatizm nöbeti" denilebilir. Ek sınıflandırıcılar teşvik edilir ve bunların kullanımı nöbeti sınıflandıran kişinin deneyimine ve amaçlarına bağlı olabilir. Fokal başlangıçlı ve jeneralize başlangıçlı terimleri gruplama amaçlıdır⁷¹.

Tablo 2.1:Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması ⁷¹.



2017 raporuna göre nöbetler isimlendirilirken artık kısmi (parsiyel) terimi yerine fokal (odak) terimi kullanılacaktır. ILAE kısmi teriminin anatomik yerden ziyade nöbeti tanımlamasından dolayı bu terimin kullanılmayacağını belirtmiştir. Fokal terimi ise nöbet başlangıç yeri açısından daha açıklayıcıdır.

Fokal Nöbetler: 2010 yılında ILAE, fokal nöbetleri “bir yarım küreyle sınırlı ağlardan kaynaklanan” olarak tanımladı. Belirsiz bir şekilde sınırlandırılmış olabilirler veya daha geniş bir alana dağılmış olabilirler. Odak nöbetleri subkortikal yapılardan kaynaklanabilir⁷³.

Fokal başlangıçlı nöbetlerin değerlendirilmesi üç aşamada gerçekleştirilir. İlk aşama bilincin değerlendirildiği aşamadır. Bu sebeple bu aşamada nöbetler bilinçli olma durumu ve bilinçli olmama durumu olarak ikiye ayrılır. İkinci aşamada nöbet, gösterilen semptomlara göre değişiklik gösterir. Tablo 1’de de belirtildiği gibi motor semptomlar ve motor olmayan semptomlar olarak ikiye ayrılır. Bununla birlikte yapılan sınıflandırma hiyerarşik bir sınıflandırma değildir, bazı durumlarda da hastanın bilinç durumu

belirtilmeden direk motor semptomlu veya motor semptomu olmayan fokal epilepsi olarak da adlandırılabilir.

Epileptik odaklarının anatomik yerleşimine göre fokal epilepsi sınıflandırması ise şu şekildedir⁷⁴;

- Frontal Lob Epilepsi
- Temporal Lob Epilepsi
- Pariyetal Lob Epilepsi
- Oksipital Lob Epilepsi

Jeneralize Nöbetler: Jeneralize nöbetler, beynin nöronal ağlarında bilateral olarak başlar. Bu iki taraflı dağılım simetrik olmak zorunda değildir. Fokal başlangıçlı nöbetler, daha sonra jeneralize nöbetlere dönüşebilir. Bu türde olan nöbetler korteks veya subkortikal yapılarda ortaya çıkabilir. Jeneralize nöbetlerde ani bilinç kaybı görülür. Status Epilepticus durumu da beş dakikadan uzun süren bir jeneralize konvülsiyon durumu olabilmektedir. Jeneralize nöbetler de motor ve motor olmayan semptomlara bakılarak sınıflandırılabilir. Motor olmayan semptomlarda belirtilen absans jeneralize epilepsinin tipik bir EEG görüntüsü bulunmaktadır. Bu görüntüde dalga deşarjları, yüksek genlikli, 3Hz ve iyi biçimlenmiştir. Hastanın konuşmasının aniden kesilmesi ve hareketlerinde bir boşluk ile karakterizedir. Genellikle bir dakikadan az sürer ve hasta nöbet bittiğinde kaldığı yerden devam eder⁶⁸.

Bilinmeyen (Sınıflandırılmayan) Nöbetler: Eksik bilgi veya nöbetin olağandışı doğası nedeniyle bir nöbeti sınıflandırmak hiç mümkün olmayabilir, bu durumda buna sınıflandırılmamış nöbet denir. Sınıflandırılmamış nöbetler genelde klinisyenin olayın bir nöbet olduğundan emin olduğu ancak olayı daha fazla sınıflandıramadığı istisnai durumlar için kullanılır. Epileptik spazmların kökeni ise belirsizdir. Epileptik spazmlar, ekstremitelerin ani uzaması veya fleksiyonu ile kendini gösterir, birkaç saniye tutulur ve daha sonra kümeler halinde tekrarlanır⁶³.

2.3.4.Epilepsi etiyolojisi

Epilepsi, nöronlardan nörotransmitter salgılanması, iyon dengesini ve enerji metabolizmasını bozan bir durumdur. Farklı çeşitlerde 100'den fazla epileptik sendrom tanımlandığı için, hastalığın tanısını koymak açısından, sendromların sınıflandırılması önemlidir. Bu noktada da epilepsi etiyolojisini bilmek klinik açıdan değer taşır.

Nöbetler uyaranlı veya uyaransız olabilir. Akut semptomatik nöbetler olarak da bilinen uyaranlı nöbetler; elektrolit bozuklukları, toksinler, kafa travması, enfeksiyon süreçleri, vasküler anomaliler, tümörler veya diğer kitle lezyonları ve diğer birçok nedenden kaynaklanabilir⁷⁵ Aynı zamanda epilepsi, genetik sebeplerle veya monogenik mutasyonlar ile de oluşabilir. Tanım olarak, uyaransız nöbetler, herhangi bir neden olmaksızın veya inme, beyin kanaması gibi akut bir yaralanma veya bir zarar görmeden yedi günden fazla süre sonra ortaya çıkabilir. Tekrarlayan uyaransız nöbetler de epilepsiyi tanımlar⁷⁶.

2.3.5.Epilepsi epidemiyolojisi

Kuzey Amerika'da yaşa göre düzenlenmiş epilepsi insidansı senede 100.000 kişiden 16'sı ile 100.000 kişiden 51'i arasında değişmektedir. Yaşa göre düzenlenmiş yaygınlık, rapor eden ülkeye bağlı olarak 1000'de 2,2 ile 1000'de 41 arasında değişmektedir. Fokal epilepsi, tüm epilepsi insidansının üçte ikisini oluşturabilir. Düşük sosyoekonomik popülasyonlarda insidans artar⁷⁷. Yeni başlayan nöbetlerin yaklaşık %25 ila %30'unun uyaranlı veya başka bir nedene sekonder olduğu düşünülmektedir. Epilepsi insidansı genç ve ileri yaş gruplarında en yüksektir ve 50 yaşından sonra giderek artmaktadır. Yaşlılarda nöbet ve epilepsinin en sık nedeni serebrovasküler hastalıktır⁷⁸.

2.3.6.Epilepsi patofizyolojisi

Epilepsinin birçok farklı alt tipi olduğundan, patofizyolojisi de farklılıklar gösterir. Fakat tüm alt tipler ve epileptik nöbetlerin ortak bir noktası bulunmaktadır. Bu ortak nokta, epileptik nöbete yol açan, sinaptik düzeyde uyarıcı nörotransmitter glutamat ile inhibitör GABA arasındaki bozulmuş dengedir⁷⁹. Her bir epileptik alt başlığın patolojisi bu dengeden daha karmaşık sebeplerden kaynaklanmaktadır.

Merkezi Sinir Sistemi'nde (MSS) bulunan en önemli eksitator nörotransmitter, glutamattır⁸⁰. Glutamat reseptörleri özellikle eksitator hücrelerde post sinaptik olarak yer alırlar. Epilepside önemli bir role sahip olduğu düşünülen glutamat reseptörleri

iyonotropik olarak üçe ayrılır. Bu reseptörlerin ilki bazı N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörleridir. NMDA reseptör kanalı, nöronal dinlenme zar potansiyelinde Mg^{+2} tarafından bloke edilir ve membran depolarize olduğunda Mg^{+2} uzaklaştırılır⁸¹. Diğer reseptörler α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) reseptörleridir. Sinapslardaki AMPA reseptör çalışması sürekli ve hızlı olarak kabul edilir. Sinaptik güçlenme (potentiation) ve sinaptik depresyon, sinaptik AMPA reseptörlerinin sayısındaki değişikliklerle düzenlenir. Son olarak kainate reseptörleri bulunmaktadır. Bu üç reseptör çeşidinin de agonist ve antagonistleri birbirlerinden farklıdır. Ama üçü de sodyum ve potasyuma geçirgendirler. Bu sebeple membran depolarizasyonu ve aksiyon potansiyelinde kilit rol oynarlar⁸². Öte yandan epilepside meydana gelen eksitatoksisitede de bu reseptörler görev alırlar. Ayrıca hem NMDA hem de AMPA reseptörlerinin düzensiz aktivitesi ve genetik mutasyonu nöbet bozukluklarının bir nedeni olabilir⁸³.

MSS'nin başlıca inhibitör nörotransmitteri ise GABA'dır. GABA'nın $GABA_A$ ve $GABA_B$ olmak üzere iki adet alt tip reseptörü bulunmaktadır. $GABA_A$ reseptörleri postsinaptik nöronlarda görev alırken, $GABA_B$ reseptörleri pre-sinaptik nöronlarda bulunur ve sinaptik salınımı modüle eder. $GABA_A$ reseptörlerinin aksiyon potansiyelini etkilemesi klor (Cl^-) iyonu ile olur. Bu reseptör alt tipi Cl^- iyonlarına geçirgendir ve bunların hücre içine girişi ile birlikte zar hiperpolarize olur. Böylece hücrede aksiyon potansiyeli bloklanır. Bu sebeple, $GABA_A$ reseptör agonistleri olan barbitüratlar ve benzodiazepinlerin nöbetleri baskıladıkları bilinmektedir. $GABA_B$ reseptörleri ise ikincil mesajcı sistem üzerinden presinaptik bölgeden nörotransmitter salınımını azaltılmasına sebep olurlar. Aynı zamanda bu ikincil mesajcı sistem potasyum üzerinden de hücreyi hiperpolarizasyona götürür. GABA reseptörlerinin antagonistleri özellikle deneysel epilepsi modeli oluşturmak için kullanılmaktadır⁸⁴.

Tüm bu bilgilerin ışığında GABA ve glutamat reseptörlerinin epileptik nöbetlere sebep olma veya terapatik ilaçlar oluşturmada önemli bir yere sahip olduğu söylenebilir.

2.3.7. Epilepsi tanı ve tedavisi

Epileptik nöbeti düşündüren bir veya daha fazla paroksizmal olaydan sonra, hastalar kapsamlı bir klinik muayene ve tıbbi öykü, fizik muayene, EEG ve beyin görüntülemenin değerlendirilmesini içeren çok aşamalı bir tanı sürecinden geçmelidir.

Epilepsi tanısında ilk adım, olayın epileptik nöbet mi yoksa nöbet taklidi mi olduğunu belirlemektir. Tanıdaki ikinci adım, epileptik nöbetin provoke edilmemiş, refleks veya akut semptomatik olup olmadığını belirler. Üçüncü adım, ilk uyaranlı veya refleks nöbeti ile başvuran hastaların epilepsisi olup olmadığını belirlemektir. Son adım ise, nöbetleri; nöbet tipi, epilepsi tipi veya mümkünse epilepsi sendromu olarak sınıflandırmaktır. EEG ve nöro-görüntüleme bu tanıyı koyabilmek için anahtar tekniklerdir⁶⁴.

EEG, insan beyninin nöronal aktivitesini ölçen en eski teknolojilerden biridir. EEG beyin yüzeyinde kortikal nöronların elektriksel aktivitesini ölçen, bunu kaydeden ve sayısal değerlere yansıtan bir metottur. Klinik tanıda, özellikle epilepsi ve uyku bozukluklarının belirlenmesinde ve duysal iletim yollarındaki bozuklukların değerlendirilmesinde önemli uygulama alanı vardır. Elde edilen kayıtlardaki beyin dalgaları, epilepsinin hangi tipte olduğunu ve epileptik odağın nerede meydana geldiğini gösterebilir⁸⁵.

Beyin dalgaları; eksitator ve inhibitör potansiyellerin eşitlenmesi ile postsinaptik nöronlarda eş zamanlı olarak ortaya çıkan sinaptik aktivitedir. Her bir beyin dalgası farklı frekans ve genlik değerleri ile karakterizedir. Beyin dalgalarının farklı anlarda farklı baskınlıkla ortaya çıkmasından beyin korteks aktivitesi sorumludur. Bu bulgular o kişinin psikoloji ve sağlık durumunu yansıtabilmektedir⁸⁶. Farklı frekans ve amplitüd değerlerine göre beyin dalgaları 5 alt başlıkta toplanır⁸⁷

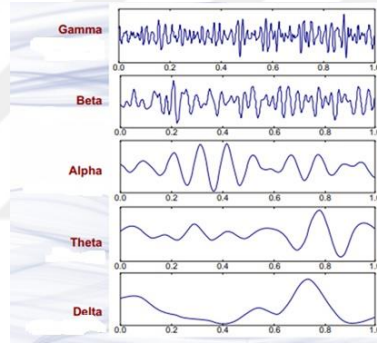
Gama Dalgaları: Bir gama dalgası en hızlı beyin aktivitesi olarak kabul edilir. Bilişsel işlev, öğrenme, hafıza ve bilgi işlemeden sorumludur. Bu dalganın öne çıkması kaygıya, yüksek uyarılmaya ve strese yol açar; bastırılması Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu, depresyon ve öğrenme güçlüğüne yol açabilir. Optimum koşullarda gama dalgaları dikkat, odaklanma, duyuların bağlanması (koku, görme ve işitme), bilinç, zihinsel işleme ve algılamaya yardımcı olur.

Alfa Dalgaları: Alfa dalgaları beta ve teta arasında bir frekans aralığına sahiptir. Gerekliğinde sakinleşmeye yardımcı olurlar ve derin rahatlama duygularını teşvik ederler. Alfa dalgaları, hayal kurmada, odaklanamama ve çok rahat olmada belirgin bir şekilde bulunur. Bastırılırlarsa kaygı, yüksek stres ve uykusuzluğa neden olabilir. Optimal olduklarında, rahat bir duruma yol açar.

Beta Dalgaları: Beta dalgaları, genellikle uyanık halde gözlenen yüksek frekanslı, düşük genlikli beyin dalgalarıdır. Bilinçli düşünce ve mantıksal düşünceye katılırlar ve uyarıcı bir etkiye sahip olma eğilimindedirler. Doğru miktarda beta dalgasına sahip olmak odaklanmamızı sağlar.

Teta Dalgaları: Bu belirli frekans aralığı, hayal kurma ve uyku ile ilgilidir. Teta dalgaları belirgin olduğunda, depresyon, hiperaktivite, dürtüsellik ve dikkatsizlik görülür; bastırılırsa kaygı, duygusal farkındalıkta azalma ve stres görülebilir. Optimal bir durumda, teta yaratıcılığa, duygusal bağlantıya, sezgiye ve rahatlama yardımcı olur.

Delta Dalgaları: Delta dalgaları, insanlarda kaydedilen en yavaş beyin dalgalarıdır. En sık bebeklerde ve küçük çocuklarda bulunurlar ve en derin gevşeme ve onarıcı, iyileştirici uyku seviyeleri ile ilişkilidirler. Delta, beyin yaralanmalarında, öğrenme problemlerinde, düşünememe gibi durumlarda belirgin olarak görülür⁸⁸.



Şekil 2.6: Beyin dalgalarının EEG’de görünümü⁸⁸.

Tablo 2.2: Beyin dalgalarının frekans ve farklı beyin aktivite durumları.

Frekans Bandı	Frekans	Beyin Durumu
Gama γ	>35 Hz	Konsantrasyon
Beta β	12-35 Hz	Anksiyete, aktivite, dışarıya dikkat
Alpha α	8-12 Hz	Rahatlama
Theta θ	4-8 Hz	Derin rahatlama durumu
Delta δ	0.5-4 Hz	Uyku

2.3.8. Deneysel epilepsi modelleri

İnsanlarda epilepsi ve nöbetlerin bazı özelliklerini kopyalayan *in vitro* ve *in vivo* birçok model vardır. Bu modellerin olması epilepsi mekanizmasını daha iyi anlayabilmek ve hastalığın temelinde yatan mekanizmaların açığa çıkabilmesi için oldukça önemlidir. Epilepsi deneysel anlamda en çok çalışılan nörolojik hastalıklardan biridir. Bu sebeple oluşturulan deneysel epilepsi modelleri de bir hayli fazladır. Bu çeşitlilikte klinik tanı açısından epilepsinin birçok alt başlığa sahip olması da yatmaktadır.

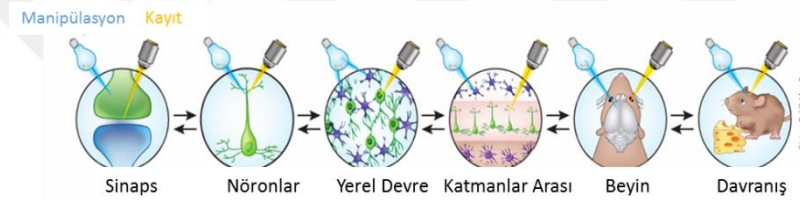
Çalışılacak deneysel epilepsi modelinin bazı özelliklere sahip olması beklenir. Öncelikle model, epilepsi ile karakterize olan ani ve tekrarlayan nöbetlere sahip olmalıdır. Bu nöbetlerin özellikleri klinik nöbetlerle örtüşmelidir. Bu nöbetler frekans ve genlik ile ölçülebilir olmalıdır⁸⁶.

Deneysel epilepsi modellerinden kimyasal bir ajanla oluşturulan, elektriksel uyararla oluşturulan ve genetik tabanlı epilepsi modelleri en çok kullanılanlardır. Kimyasal ajanlar ile oluşturulan epilepsi modellerinden pilokarpin ve kainik asit (KA) fokal epilepsi (temporal lob epilepsi) oluştururken, pentylenetetrazol jeneralize nöbetler oluşturmaktadır. Yine pikrotoksin ve penisilin fokal neokortikal nöbetler oluştururken, tetradoksin infantil spazmlar oluşturur. Elektroşok ile oluşturulan nöbetler genelde jeneralize epilepsi sınıfına girmektedir. Öte yandan genetik manipülasyonlar ile hem monogenik hem de birden fazla gene bağlı epilepsi modeli oluşturulabilir⁸⁹.

2.4. Optogenetik ve kemogenetik yaklaşımlar ile sinirbilim çalışmaları

Optogenetik, canlı doku ve hayvanların spesifik (işaretlenmiş) hücrelerinde iyi tanımlanmış olayları uyarmak veya inhibe etmek amacıyla kullanılan genetik ve optik yöntemler kombinasyonudur⁹. Optogenetik, ışığa duyarlı iyon kanalları ve hedef hücre popülasyonlarında bulunan spesifik iyon kanalları kullanılarak, hedef hücrelerin milisaniyeler içinde uyarılabilmesi veya inhibe edilmesine olanak sağladığı için, nöral ağların araştırmasında önemli bir teknolojidir¹⁰.

Optogenetik, beyin fonksiyonunun tüm seviyelerinde uygulanabilir. Nöral aktiviteyi hem kaydetmek hem de manipüle etmek için optogenetik problemler kullanılabilir. Optogenetik tekniği, sinir sisteminin farklı fonksiyon seviyelerinde uygulanabilir ve bu seviyeler arasında nedensel bağlantılar kurmanın da güçlü bir yolunu sağlar⁹⁰ (Şekil 7).

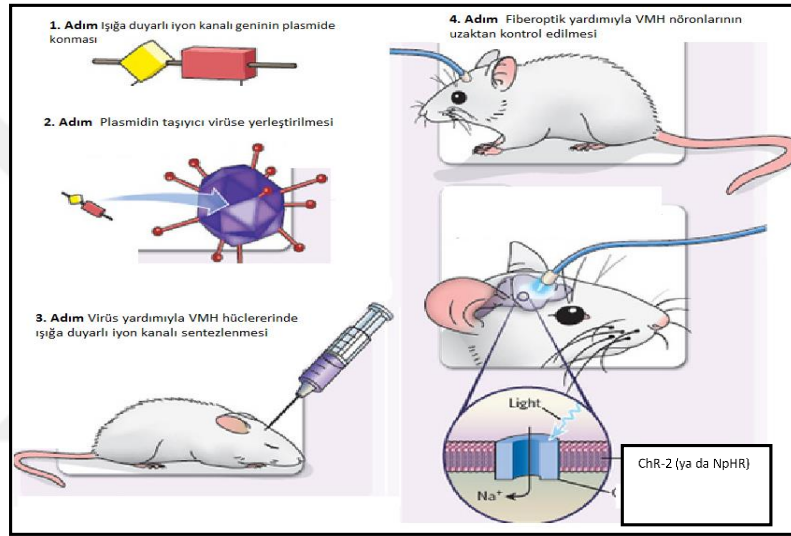


Şekil 2.7: Optogenetik tekniğinin uygulanabileceği farklı fonksiyonel seviyeler⁹⁰.

Optogenetik ve kemogenetik teknikler, son yıllarda nöronal ağların ortaya çıkarılmasında kullanılan önemli yöntemlerdir⁴. Optogenetik, ışığa duyarlı proteinlerin genetik olarak hücre içine eklenmesiyle elde edilen ve sinirsel aktiviteyi ışıkla kontrol etmek veya izlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ışığa duyarlı bir rhodopsin iyon kanalının hücrede kodlanması ve bu kanalın cevap vereceği uygun dalga boyunda ışık ile uyarılması ilkesine dayanmaktadır. Bu rhodopsin kanallarına örnek olarak *Channel Rhodopsin* (ChR2) ve *Archaeorhodopsin* (AR) veya *Halorhodopsin* (NpHR) verilebilir. ChR2'ler, ışığa duyarlı katyon kanallarıdır, nöronları mavi ışığa (460 nm) karşılık olarak hızla açar ve depolarize ederler. Aksine AR, sarı-yeşil ışığa (550 nm) yanıt veren bir proton pompasıdır ve nöral aktiviteyi inhibe eder^{91,92}. Transgenik fare hatları ile birleştirilen optogenetik araçların yakın zamandaki gelişimi, nöral devre araştırmalarında kolaylık sağlar. Böylece optogenetik yöntemler fizyolojik ve patolojik durumlarda nöronların birbirleri ile ilişkilerini göstermekte kolaylık sağlar⁹³. Tüm bu

gelişmeler göz önüne alınarak, epilepsi mekanizmasının araştırılmasında önemli ve güçlü bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Literatürde epilepsi çalışmalarında GABAerjik internöronların optogenetik modifikasyonu üzerinde çok durulduğu görülmektedir. Çünkü epilepside nöronal ağın çok önemli bir parçası olan bu internöronların, nöbet başlamasında anahtar bir role sahip olduğu düşünülmektedir⁹⁴. Aşağıdaki tabloda bu çalışmalardan bazı örnekler verilmiştir⁹⁵.



Şekil 2.8: Optogenetik uygulamasının grafik özeti.

Tablo 2.3: 2013-2018 yılları arasında yayınlanmış epilepsi-optogenetik çalışmalarından bazıları⁹⁵.

Kullanılan Deneysel Epilepsi Modeli	Model	Kullanılan Optogenetik Araç	Sonuç
Absans epilepsi	Genetik, spontan kasılmalar.	hSyn promotörü altında ChR2'yi viral olarak eksprese eden serebellar çekirdek nöronlarının optogenetik aktivasyonu.	Serebellar çekirdeklerin kapalı döngü sisteminde isteğe bağlı optogenetik aktivasyonu, talamokortikal absans nöbetlerin karakteristiği olan genelleştirilmiş diken ve dalga deşarjlarını durdurdu.
Kortikal nöbetler	Somatosensoriyel kortekse uygulanan 4-aminopiridin; akut nöbetler	ChR2, tek taraflı olarak somatosensoriyel kortekse hedeflenen VGAT promotörü, ışık altında GABA _A reseptörüne bağlı bir şekilde iktal benzeri olayları başlattı	GABA _A reseptörüne bağlı bir şekilde iktal benzeri olayları başlattı
Temporal epilepsi lob	İntrahipokampal bikikulin enjeksiyonu	hSyn promotörü altında NpHR taşıyan virüsün ventro-posterior hipokampusa tek taraflı olarak iletilmesi; hipokampusun CA1/CA2 bölgesine hedeflenen ışık uyarımı	Hipokampal hücrelerin optogenetik inhibisyonu, GABA _A reseptör antagonisti varlığında epileptiform aktiviteyi azaltır.
Temporal epilepsi lob	İntrahipokampal kainate enjeksiyonu	Dentat gyrusun mossy (yosunsu) hücrelerine Arch verildi.	Kapalı döngü isteğe bağlı optogenetik yosunlu hücrelerin uyarılması, varsayılan nöbet odağının aynı tarafında veya karşı tarafında, davranışsal nöbet sıklığını azalttı.
Temporal epilepsi lob	Hipokampus CA3 bölgesine 4-aminopyridine verilerek akut nöbetler oluşturuldu.	Thy1 promotörü altında ChR2 eksprese eden ve spesifik olarak inhibitör nöronları hedeflemek için kullanılan transgenik fareler ile VGAT promotörü altında ChR2 eksprese eden transgenik fareler kullandı.	Hipokampal nöronların düşük frekanslı optogenetik uyarımı, nöbet aktivitesini azalttı.
Temporal epilepsi lob	Optogenetik olarak uyarılmış hipokampal nöbetler	Transgenik sıçanlarda Thy promotörü altında eksprese edilen ChR2; hipokampus, talamus, amigdala ve sensorimotor kortekse iletilen ışık uyarımı	Opsin eksprese eden hipokampusa tekrarlayan pulsativ fotostimülasyon, hipokampusun uzunlamasına ekseni boyunca sürdürülen ve yayılan deşarjlardan sonra nöbetlere neden oldu.

Kemogenetik teknoloji, kontrol edilebilir bir gen terapisi tasarlamak için alternatif bir yaklaşım sağlar. Kemogenetik teknolojiler spesifik hücre popülasyonlarının seçici olarak farmakolojik kontrolü ve manipülasyonuna imkan sağlar^{96,97}. Bu sistemin sağladığı avantaj, ligand verilene kadar gen terapisinin etkisiz kalmasıdır. Kemogenetik yaklaşımda, mutasyona uğratılmış muskarinik asetilkolin reseptörlerinden türetilmiş olan hM3Dq uyarıcı reseptörü ve hM4D (Gi) inhibitör reseptörü kullanılır. Mutasyona uğratılarak üretilen bu reseptörler ligant olarak CNO'ya duyarlıdır. Ligant bağlanması ile aktive olan bu reseptörler ie alım sağlayan potasyum kanallarını açan bir G-protein kaskadını tetikler. Böylece nörotransmitter salgılanması inhibe olur ve nöronal ağın inhibisyonu ile sonuçlanır⁹⁸. Özellikle kronik olarak yapılacak deneylerde kemogenetik teknoloji kullanılarak nöronal aktivasyon ve inhibisyon sağlanması araştırmacılara avantaj sağlamaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Grupları

Deneyler üç aşamada gerçekleştirilmiştir.

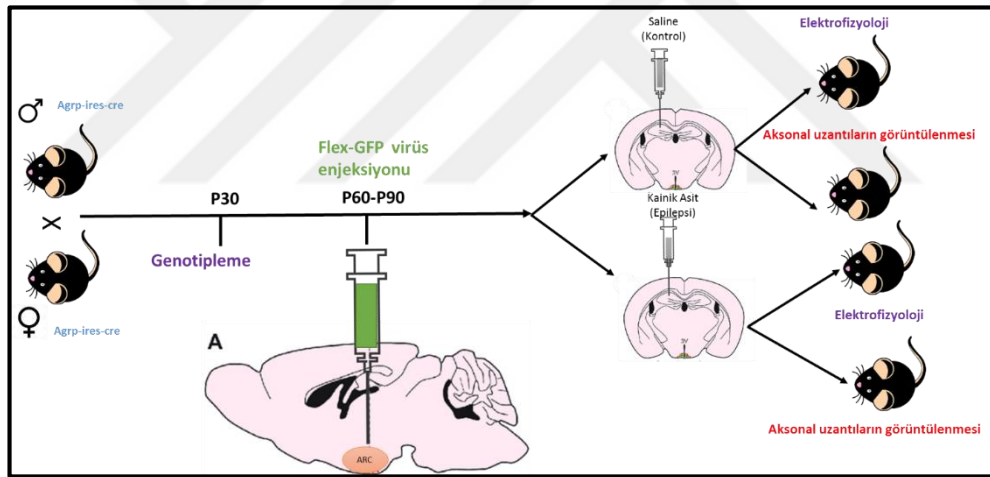
1) Epilepsi esnasında AgRP nöronlarının hipokampuse aksonal uzantılarının görüntülenmesi ve AgRP nöronlarının membran potansiyellerinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Deney hayvanları Epilepsi ve Kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Epilepsi-görüntüleme, n=5

Kontrol-görüntüleme, n=5

Epilepsi-Elektrofizyoloji, n=5;126 hücre

Kontrol-Elektrofizyoloji n=5;106 hücre



Şekil 3.1 Çalışmanın birinci aşamasının grafik özeti.

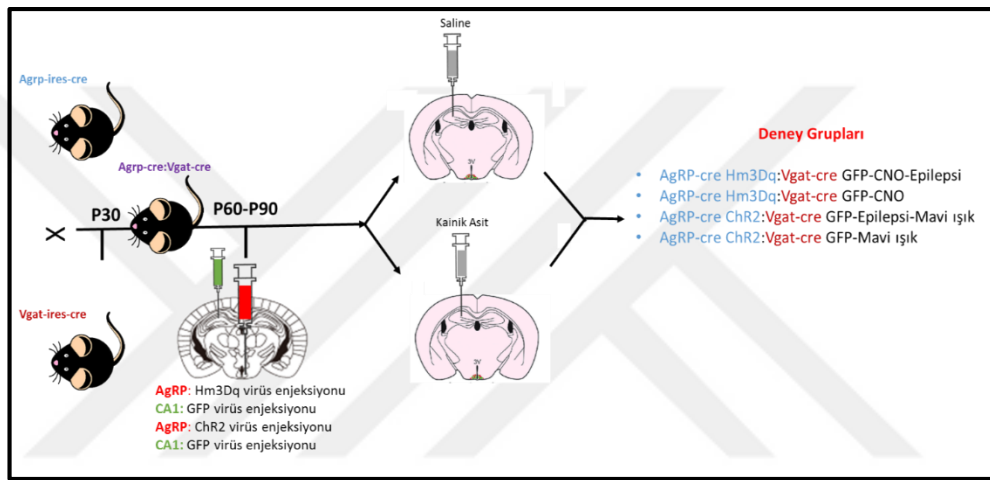
2) Epilepsi esnasında AgRP nöronlarının optogenetik ve kemogenetik aktivasyonunun hipokampal nöronlar üzerindeki membran potansiyelinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Fareler, epilepsi ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı.

Epilepsi-Optogenetik (n=5)

Kontrol-Optogenetik (n=4)

Epilepsi-Kemogenetik (n=2)

Kontrol-Kemogenetik (n=2)



Şekil 3.2: Çalışmanın ikinci aşamasının grafik özeti.

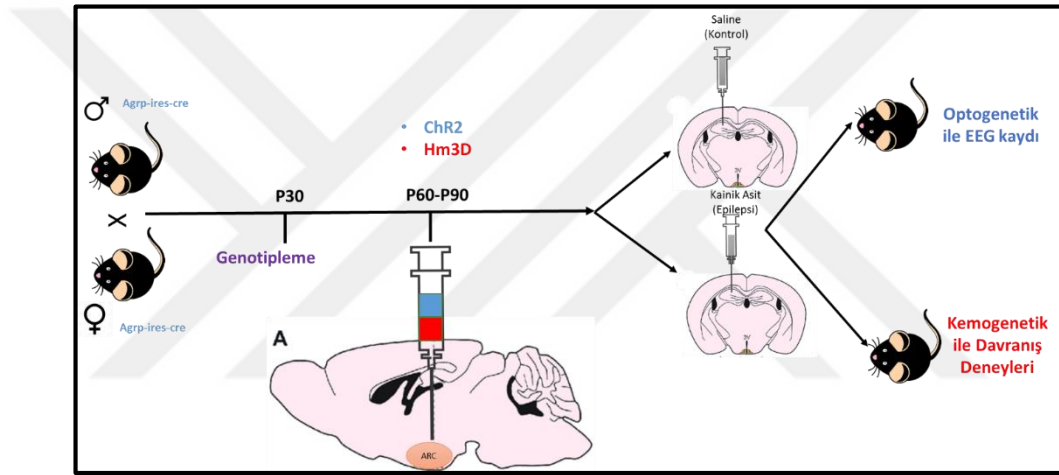
3) Epilepsi esnasında AgRP nöronlarının optogenetik ve kemogenetik aktivasyonu ile farelerde meydana gelen davranışsal ve elektroensefelografik değişimlerin incelenmesi hedeflenmiştir. Deney hayvanları epilepsi ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı.

Epilepsi-Optogenetik (n=4)

Kontrol-Optogenetik (n=4)

Epilepsi-Kemogenetik (n=5)

Kontrol-Kemogenetik (n=4)



Şekil 3.3: Çalışmanın üçüncü aşamasının grafik özeti.

3.2. Transgenik Deney Hayvanları ve Genotiplemesi

Deneyler için 50 adet, 8-12 haftalık ARC- AgRP nöronlarının gen bölgelerine kre-rekombinaz enzimi eklenmiş transgenik fareler (AgRP-cre; Jackson:012899) kullanıldı. İkinci aşamada yapılan deneyler için, AgRP-cre transgenik fareler ile Vgat-cre (Vgat-cre, Jackson:016962) olarak adlandırılan GABA nöronlarına kre rekombinaz eklenmiş transgenik hayvanlar çiftleştirilerek çift transgenik hayvanlar üretildi. Bu transgenik fareler Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (YÜDETAM) temin edildi. Tüm hayvanlar 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, sıcaklık ($22\pm1^{\circ}\text{C}$), yem ve suya *ad libitum* erişebileceği koşullarda bakıldı. Tüm deney protokolleri Yeditepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylandı.

Yeni doğan yavruların laktasyon dönemi beklendi ve 35. günde hayvanlar cinsiyetlerine göre ayrıldı. Aynı gün (35) yavruların kulaklarına küpe takılarak, kulak dokusu alındı. Kulak dokuları $+4^{\circ}\text{C}$ 'de DNase'den arındırılmış deney tüplerine alındı. Her bir örneğe 100 ul 25 mM NaOH/0.2 mM EDTA solüsyonundan eklendi. Bu örnekler 98°C 'de 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 15°C 'ye alınan dokular 100 ul 40 mM Tris HCl solüsyonu ile 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj (Mikrosantrifüj, Sigma 1-14) edildi. Hazırlanan solüsyonlardan genotipleme için alikotlar oluşturuldu. AgRP primerleri (AGG AAC TGC TTC CTT CAC GA) ve Vgat primerleri (ACA CCG GCC TTA TTC CAA G) 20 mM olacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan primerler ve PCR Master Mix (BioLabs Taq 2x Master Mix, M0270S), dokudan elde edilen DNA örneği karıştırıldı ve üzerine 12,5 ul'ye tamamlanacak şekilde su eklendi. Hazırlanan karışım PCR cihazına (Labnet, Multigene Optimax) koyularak, reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon sonunda, hazırlanan %2'lik agaroz jelinde, elektroforez yöntemi (SCIEPLAS, VWR 300V) ile DNA örnekleri yürütüldü. Görüntülenen sonuçlar ile hayvanlar AgRP pozitif ve AgRP negatif olarak tayin edildi. Çift transgenik hayvanlar ise AgRPxVgat pozitif, AgRP pozitif ve Vgat pozitif olarak tayin edildi.

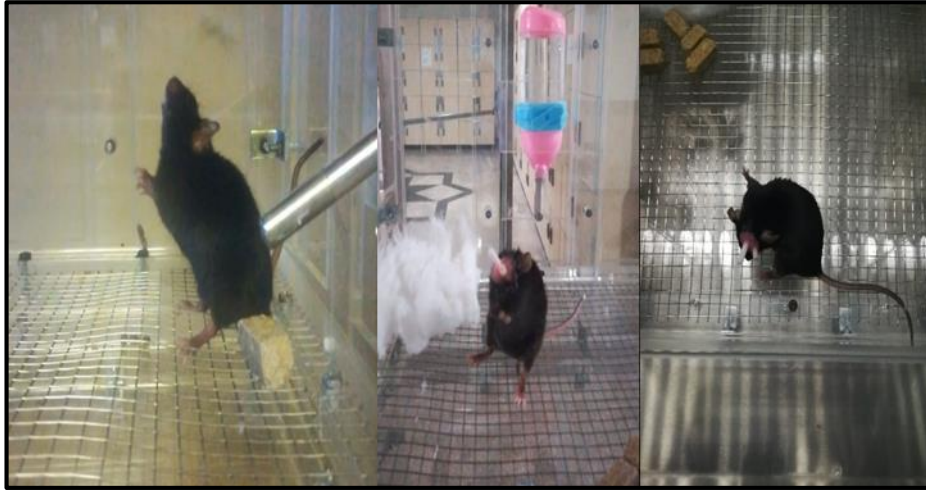
3.3.Beyin içi Enjeksiyonlar

AgRP transgenik hayvanlara 8-10 hafta arasında ($20g\pm2$) ilk aşamadaki hayvanlara aksonal uzantıların gösterilmesi ve AgRP nöronlarının dinlenme zar potansiyellerinin ölçülmesi için green fluorescent proteininin (GFP) beyin içi enjeksiyon ile verildi. Deney hayvanlarının hepsine fare beyin atlasından⁹⁹ alınan koordinatlar ile ARC çekirdeklerine (AP: -1.46mm, ML: -0.36mm/+0.38 mm, DV: 5.75 mm) GFP enjeksiyonu yapıldı. Belirlenen koordinatlara 80 -100 nl GFP mikromanipulatör ile bilateral olarak uygulandı. Enjeksiyon bitiminde sütur atılan deney hayvanı post operatif bakıma alındı. İkinci aşamada ise çifte transgenik hayvanların ARC çekirdeklerine GFP verilirken, hipokampus bölgesine (AP: -1,25 mm, ML: $\pm 0,2$ DV: -0.16mm) GABA nöronlarını işaretleyebilmek için td-tomato adı verilen kırmızı floresan proteini verildi. Çifte transgenik hayvanlarda optogenetik aktivasyonlar için ise ARC'de bulunan AgRP nöronlarını işaretleyebilmek için optogenetik aktivasyon yapılacak hayvanlara ChR2 verilirken, hipokampal GABA nöronlarını işaretlemek için td-tomato verildi. Kemogenetik aktivasyonlar için ise AgRP nöronlarına Hm3Di verilirken, hipokampal GABA nöronlarına GFP enjeksiyonu yapıldı. Bu çalışmanın üçüncü aşaması için ise AgRP pozitif transgenik hayvanların bir kısmının ARC bölgesine optogenetik deneyleri için ChR2 verilirken, diğerlerine kemogenetik deneyleri için Hm3Di enjeksiyonu yapıldı. Beyin içi enjeksiyonlar sonrası 14-18 gün arasında beklendi.

3.4.Epilepsi Modelinin Oluşturulması ve Değerlendirilmesi

Kre-rekombinaz bağlı bölgelerin olduğu adeno ilgili virüslerin verildiği transgenik fareler 14-18 gün sonrasında rastgele olacak şekilde kontrol grubu ve epilepsi grubu şeklinde gruplara ayrıldı. Hipokampus bölgesine enjektör (Hamilton, 7071 Neuron) yardımıyla epilepsi grubuna 15 mM olacak şekilde 100 nl KA, (Kainic Acid monohydrate, K0250; Sigma Aldrich) kontrol grubuna ise kainik asitin çözöldüğü serum fizyolojik (SF) 100 nl olacak şekilde verildi. Enjeksiyonlar sonrası tekli metabolik kafeslere alınan hayvanlar her bir kafeste bir kamera olacak şekilde kayıt altına alındı. Böylece bu kayıtlardan elde edilen görüntüler ile nöbetler skorlandı. Ayrıca deney hayvanlarının yem ve ağırlık ölçümleri deneyler sonlandırılınca kadar takip edildi. KA verilen hayvanların nöbetleri Racine cetveline¹⁰⁰ göre, deney gruplarını bilmeyen birinin değerlendirmesi ile kör çalışma şeklinde gerçekleştirildi. Racine cetveline göre epileptik nöbetler şu şekilde değerlendirildi;

- 1) Davranışsal duraklama
- 2) Kafa hareketi ile bıyık oynatma
- 3) Tek pençe klonik hareket
- 4) Çift Pençe klonik hareket
- 5) Arka iki pençe üzerine ayağa kalkma ve düşme
- 6) Bulunduğu ortamlarda kenarlara saklanma, saldırgan koşma ve çarpma hareketleridir.



Şekil 3.4: Epileptik nöbetler.

3.5. AgRP Nöronlarının Aksonal Uzantılarının Görüntülenmesi

Çalışmanın birinci aşamasında kontrol ve epilepsi gruplarına ayrılan farelere, görüntüleme için anestezi altında %4 paraformaldehit çözeltisi kullanılarak, kardiyak perfüzyon uygulandı. Beyin dokuları diseksiyonla çıkartıldı. Vibrotom cihazı kullanılarak 70 µm kalınlığında beyin kesitleri elde edildi ve pozitif yüklü lamlara alındı. Su bazlı kapatma solüsyonu kullanılarak lamel ile kapatıldı. Beyin kesitlerinde, enfeksiyon bölgesi olan hipotalamustan başlanarak hipokampusun CA1 bölgesine kadar olan alan konfokal mikroskop ile tarandı. GFP sinyali veren ve hipokampusa kadar uzanan AgRP aksonlarının görüntülenmesi amaçlandı.

3.6. AgRP Nöronlarının Dinlenim Zar Potansiyellerinin Ölçülmesi

Elektrofizyoloji için ayrılan deney hayvanı grupları, kesme solüsyonu (cutting solution) ile kardiyak perfüzyona maruz bırakıldı. Beyin dokuları diseksiyonla çıkartıldı. Vibrotom kullanılarak 250 µm kalınlığında kesitler elde edildi. Bu kesitler yapay serebrospinal sıvı solüsyonu içinde %95 O₂ %5 CO₂ ile gazlandı. Gazlama devam ederken solüsyon 32 °C’de inkübe edildi. ARC bölgesine enjekte edilmiş GFP sayesinde görüntülenecek AgRP nöronlarından aksiyon potansiyeli kaydı alındı. Epileptik nöbeti olan ve olmayan farelerde, AgRP nöronları arasında olası bir potansiyel farklılık bu yöntem ile gösterilmeye çalışıldı. Yapay serebrospinal sıvı ile doldurulan mikropipet ile görüntülebilen nörona ~20 MΩ dirençli bir yama oluşturuldu. Epilepsi grubu ve kontrol grubu hayvanları AgRP nöronlarının, gösterdikleri aksiyon potansiyel değişiklikleri kaydedildi. Elde edilen bulgular, Clampfit-10 yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

3.7. Hipokampal GABA Nöronlarının Dinlenim Zar Potansiyellerinin Ölçülmesi

Çifte transgenik hayvanlardan ChR2 ile AgRP nöronları işaretlenen epilepsi ve kontrol gruplarından banyoya alınan *ex vivo* beyin kesitleri 10 Hz ile 10 saniye boyunca 485 nm ışık ile uyarıldı. Yukarıda belirtilen yöntem ile hipokampal GABA nöronlarından dinlenim membran potansiyeli kaydı alındı.

Ayrıca, çifte transgenik hayvanlardan ARC bölgesine Hm3Di enjeksiyonu yapılan epilepsi ve kontrol grubu hayvanlara kemogenetik uyarım CNO ile 1 hafta boyunca içme sularına 5 mg/ml (1mg/kg) olacak şekilde verildi. Çifte transgenik olan hayvanların arkuat bölgesi optogenetik veya kemogenetik ile uyarılıp, hipokampus bölgesinden kayıtlar alındı.

3.8. AgRP Nöronlarının Kemogenetik Aktivasyonu ile Davranış Deneyleri

Epilepsi indüklemesinden sonra post operatif üçüncü günde içme sularına 5 mg/ml (1mg/kg) olacak şekilde suda çözülerek CNO verildi. Deney hayvanlarının beslenme takibi CNO verilmesinden sonra 10 gün boyunca yapıldı. Yedikleri yem ve içtikleri su, günlük olarak not edildi. Bununla birlikte post operatif 7. günde farelerin hipokampal bölge ile ilişkilendirilen davranış deneylerinden Açık Alan Testi (Open Field Test), Novel-Object-Recognition Test (NORT) ve Object Location Test (OLT) yapıldı¹⁰¹. Ortama alışması için hayvanlar öncelikle 2 dakika boyunca açık alana bırakıldı. Otuz

dakika sonra sırasıyla aynı hayvanlar açık alana 10 dakika boyunca bırakılmış ve kamera sistemi ile takip edildi. NORT için 45x45 cm kare bir kutuda öncelikle alışması için dolaşmalarına izin verilen hayvanlar, ertesi gün önce iki noktada bulunan cisimleri tanımaları için alana bırakıldı. Daha sonra OLT testi için bir cismin yeri değiştirilerek, deney hayvanının geçirdiği süreler, hızı, aktivitesi ve mobilitesi hesaplandı. Öte yandan NORT deneyi için alıştığı cisimlere maruz bırakılan deney hayvanı daha sonra farklı bir cisim koyularak test edildi. Tüm bu çalışmalar NOLDUS (Ethovision 15) izleme takip programı ile gerçekleştirildi.

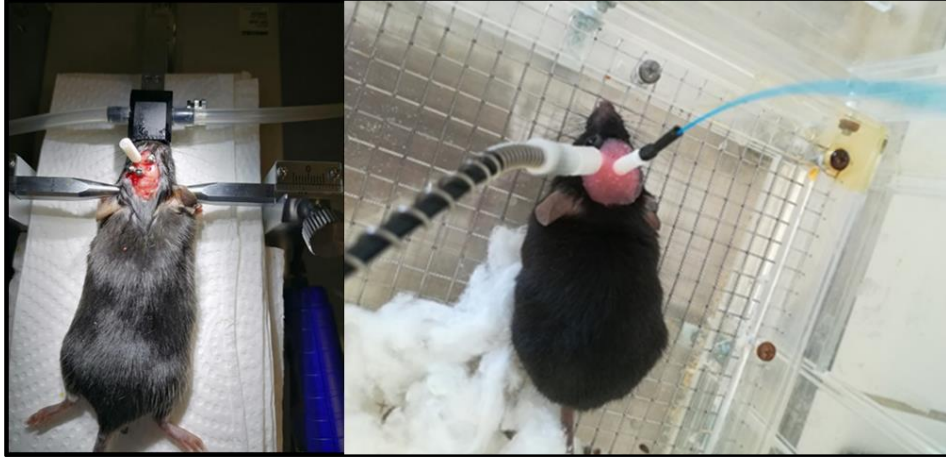


Şekil 3.5: Kemogenetik aktivasyon sonrası yeme davranışı.

3.9. AgRP Nöronlarının Optogenetik Aktivasyonu ile EEG Kaydı Alınması

KA ve SF enjeksiyonu yapılmadan önce EEG kaydı alınabilmesi için üç kutuplu elektrot (MS333/2A, Tripolar Electrodes, Plastics One) hayvanın kafatasına çelik vidalar (0-80X1/8, Plastics One) yardımı ile takıldı. Bununla birlikte optogenetik uyarım için ferül (CF270-10, Ceramic Ferrule, 2.5 mm, 10.5 mm) ARC'ye yerleştirildi. Kafa, dişçi çimentosu ile kapatılarak deney hayvanı post-operatif bakıma alındı. Post operatif bakım sonrası 1., 3. ve 5. günler EEG kaydı alındı (BIOPAC INS.MP36). Kafatasında bulunan üç kutuplu elektroda 80 cm uzunluğunda (335-340/3, Plastics One.) olan kablo yardımı ile kayıt alındı. Önce baseline kaydı alınan EEG sırasında, hayvanlara 30. ve 40. dakikalar arasında yerleştirilen çekirdek çapı 200µm olan fiber optik kablo sayesinde 480 nm

boyunda mavi ışık ile ARC bölgesinde bulunan AgRP nöronları uyarıldı. Bu uyarım ve sonrasında da EEG kaydı devam etti. Acknowledge-Biopac programı kullanılarak bulguların frekans ve genlik analizi yapıldı.



Şekil 3.6: Üç kutuplu elektrot ve optogenetik ferülünün takılması.

3.10.c-FOS Boyaması Yapılması

Kronik CNO uygulaması ile aktive olan nöronlarını görüntülemek amacı ile alınan beyin kesitlerine c-FOS boyaması yapıldı. Öncelikle PBS ile yıkanan kesitler daha sonra bloklamak için %4'lük keçi serumu (Sigma, 69023), %0.3'lük Triton-X (Sigma, T9284-12) ve 1X PBS (Invitrogen, 00-3002) içeren solüsyon ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Birinci antikor olan c-FOS antikor (Abcam, ab190289) 1:3000 olacak şekilde bloklama solüsyonu içinde seyretildi. Örnekler bu solüsyon içerisinde 4°C'de bir gece boyunca çalkalanmaya bırakıldı. Bu işlem sonrası PBS ile yıkanan örnekler Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11008) (1:1000) antikor, 1XPBS, %0,1'lik Triton-X-100'den oluşan sekonder antikor karışımı ile ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında çalkalanmaya bırakıldı. Tekrar yıkama işlemlerinden geçen kesitler lamlara alınarak kurutuldu ve mounting medium (sigma, F4680-2ml) ile lamel ile kapatıldı.

3.11.İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler için Graphpad Prism 9 analiz programı kullanıldı. Tüm grupların frekans ve genlikleri (amplitude) tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA)

testinde LSD testi seçilerek yapıldı. Aynı zamanda diğ er sonuçların analizinde Student-t-testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatıksel anlamlı olarak değ erlendirildi.

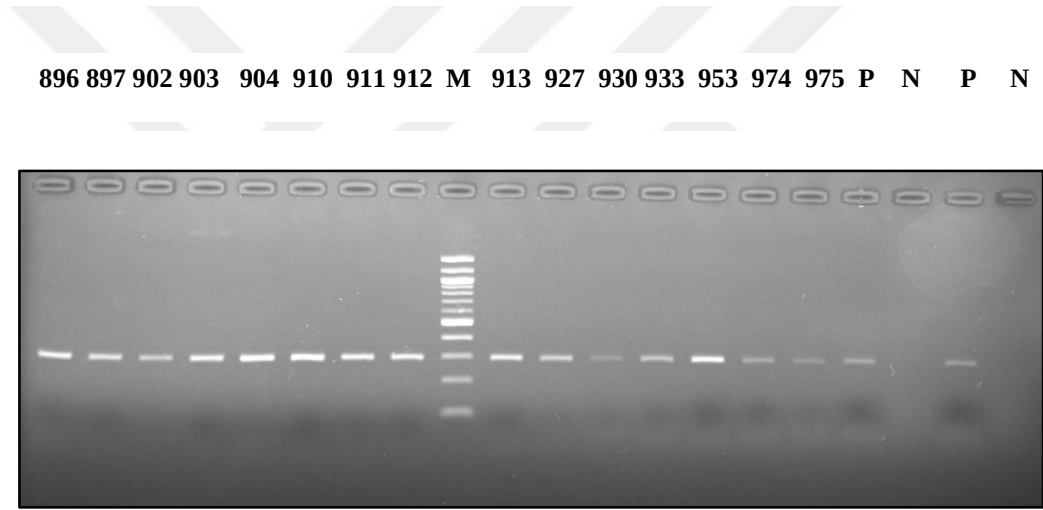


4.BULGULAR

Bu tez çalışmasında ARC'de bulunan AgRP nöronlarının optogenetik ve kemogenetik aktivasyonunun epilepsideki rolünün araştırılması hedeflendi.

4.1. Genotiplleme Sonuçları

Genotiplleme sonuçlarına göre fareler transgenik olan ve olmayan hayvanlar olarak ikiye ayrıldı. AgRP hayvanları ile yapılan genotiplleme sonuçlarında mutant gen 500bp'de aranmıştır. AgRP-Vgat çifte transgenik hayvanlar için hem AgRP hem Vgat primeri bakılmıştır. Sonuç gösteren bantlarda hem 500 bp'de hem de 200 bp'de bant aranmıştır. Genotipllemenin çalıştığı koyulan negatif ve pozitif kontrol örnekleri ile desteklenmiştir.



Şekil 4.1: Genotiplleme sonuçlarına göre AgRP pozitif örnekler.

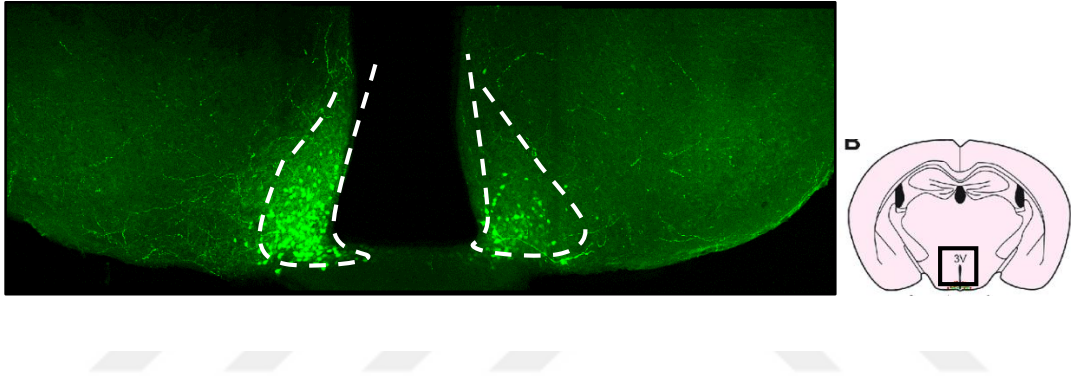
4.2. Epilepsi Skorlaması

Epilepsi indüklemesi yapılan epilepsi grubu ve kontrol grubu, beyin içi enjeksiyonları sonucu tekli kafeslere nöbet takibi için alınmıştır. Elde edilen kamera kayıtları ile nöbet skorlaması yapılan epilepsi ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,01$). Deney gruplarına 3 ve üzeri nöbet skorlaması gösteren deney hayvanları dâhil edilmiştir.

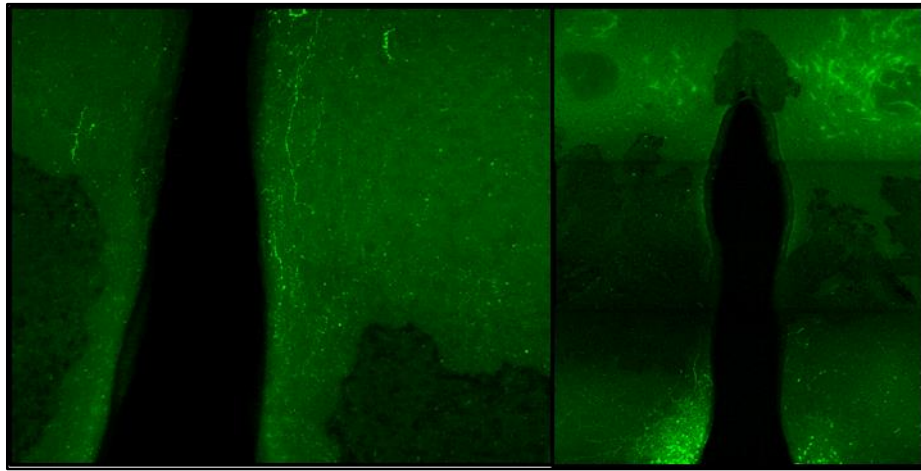
Nöbet benzeri hareketler gösteren kontrol grubu hayvanları deney dışı bırakılmıştır. Racine cetveline göre skorlanan epileptik hayvanların ortalama skoru dört olmuştur.

4.3.Aksonal Uzantıların Gösterilmesi

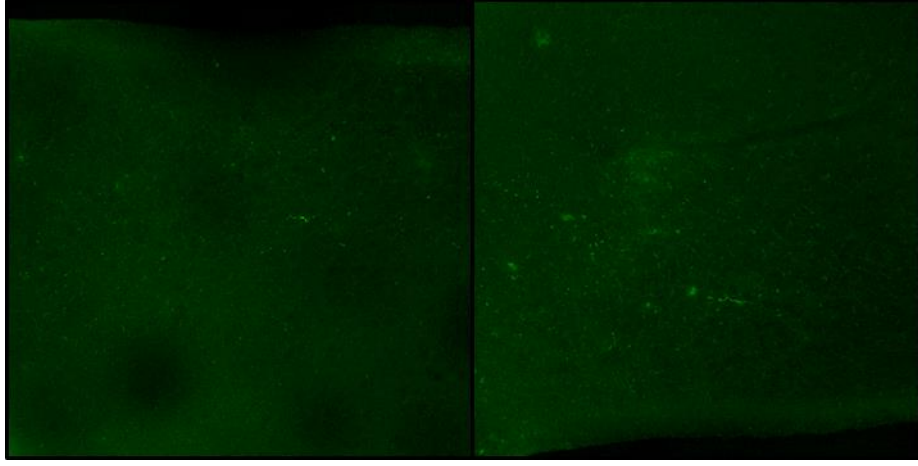
Her bir deney hayvanına yapılan enjeksiyon, deney sonunda alınan kesitler ile doğrulanmıştır. Enjeksiyonu doğru yerde olmayan hayvanlar deney dışı bırakılmıştır. Hem AgRP hayvanlarda hem de çift transgenik hayvanlarda enjeksiyon bölgesinden başlayarak hipokampusa kadar olan kesitler takip edilmiştir. Fakat ne AgRP farelerde ne de çift transgenik hayvanlarda hipokampusa kadar uzanan bir aksonal uzantı gözlemlenmemiştir.



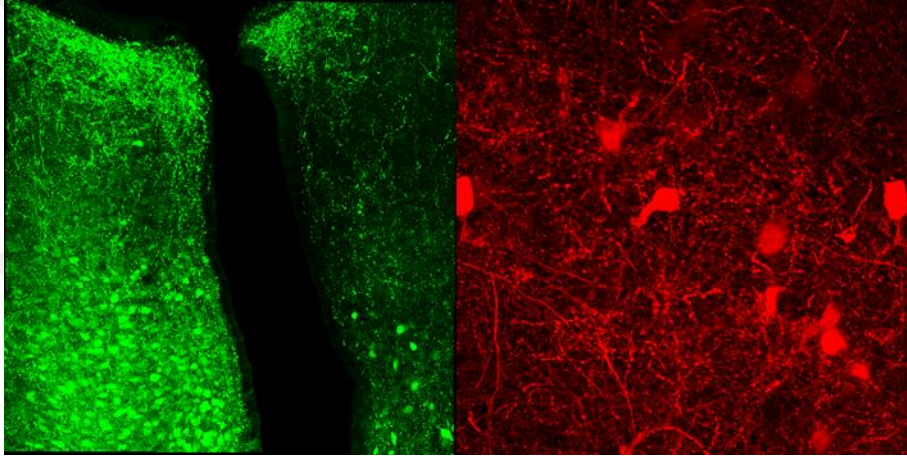
Şekil 4.2: AgRP farelerde ARC bölgesine yapılan GFP enjeksiyonu.



Şekil 4.3: ARC'den diğer bölgelere yapılan aksonal uzantılar.



Şekil 4.4: ARC'den hipokampusa yapılan aksonal uzantılar.

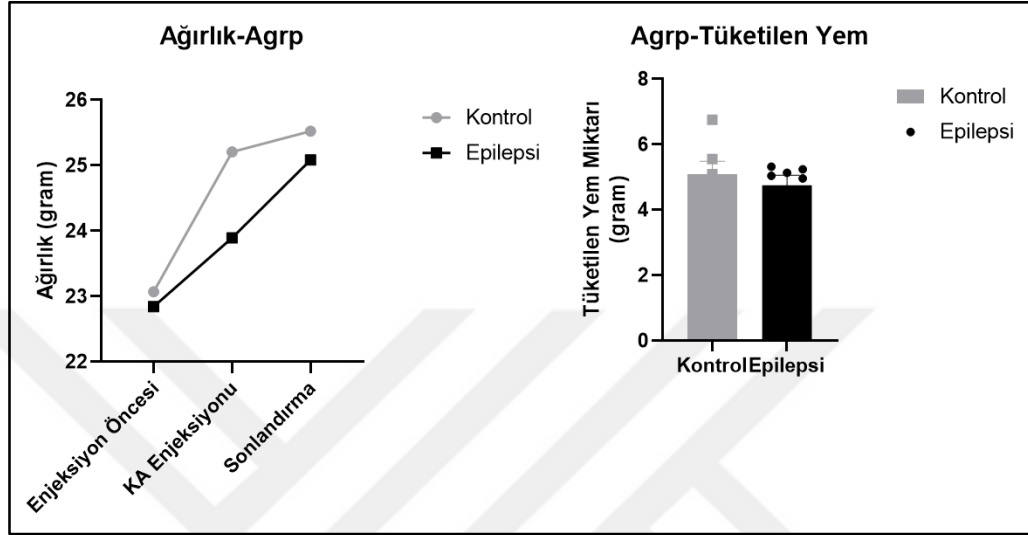


Şekil 4.5: Çifte transgenik hayvanlarda, kırmızı ve yeşil renk ile işaretlenen nöronlar.

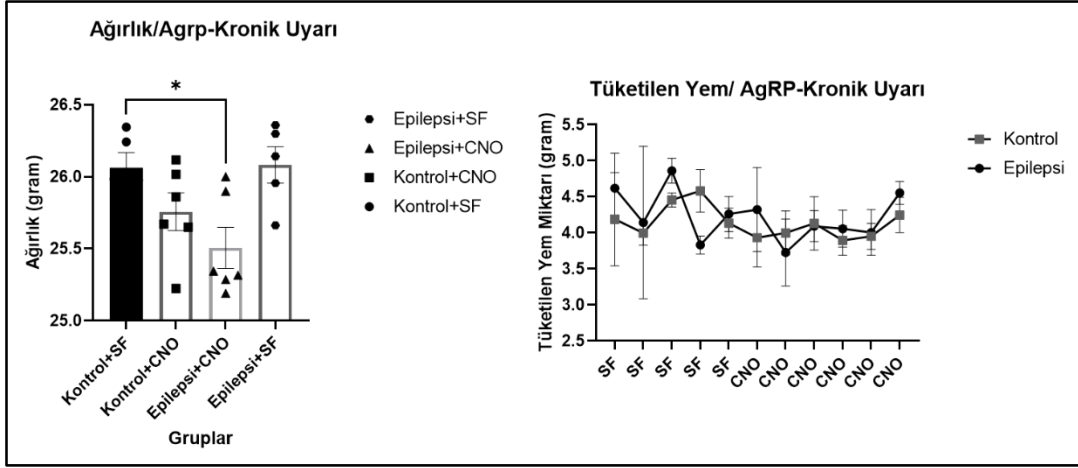
4.4. Yeme Davranışı ve Ağırlık Takibi

Deney sonuna kadar tekli kafeslerde takip edilen hayvanlara her gün aynı saat aralığında 7 ± 2 gram yem verildi. Ertesi gün bu yemler toz ve pellet olarak tartıldı ve tüketilen yem hesaplandı. Deney süresince AgRP-GFP hayvanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamaktadır. AgRP kemogenetik aktivasyon grubunda 11 günlük kayıt alındı. Bu kayda göre 6 gün CNO, 6 gün SF verildi. AgRP kemogenetik gruplar arasında epilepsili hayvanlara CNO verilen günler ile epilepsili gruba SF verilen günler arasında tüketilen yem ve ağırlık bakımından istatistiksel bir fark gözlemlendi ($p < 0,05$).

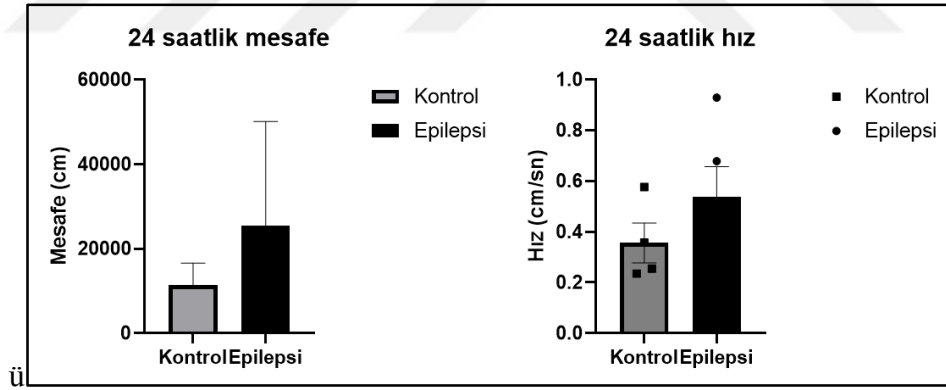
AgRP-optogenetik aktivasyon grubunda tüketilen yem grafiği optogenetik uyarım öncesi ve sonrasına göre hazırlanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.



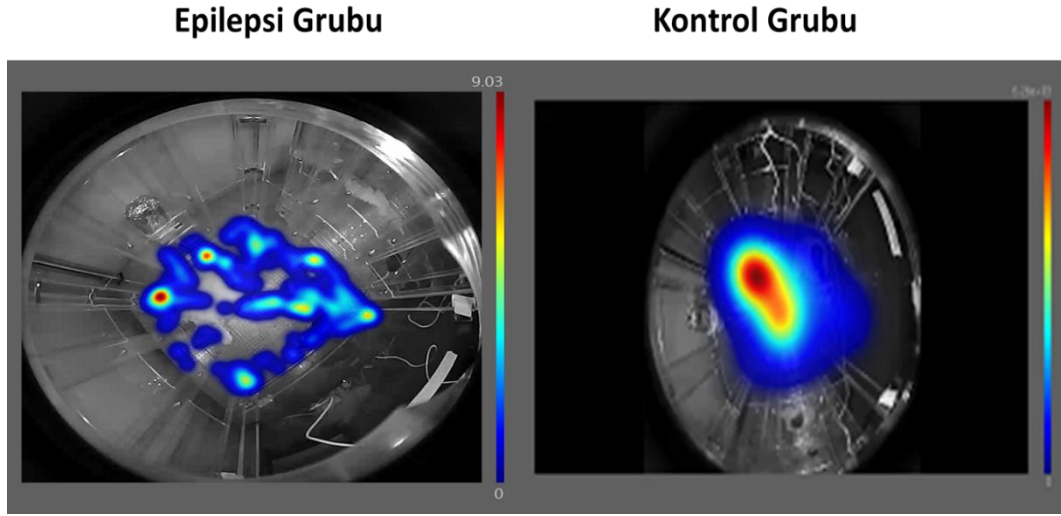
Şekil 4.6. AgRP-GFP hayvanlarında epilepsi ve kontrol grubunun ağırlık ve tüketilen yem grafikleri. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



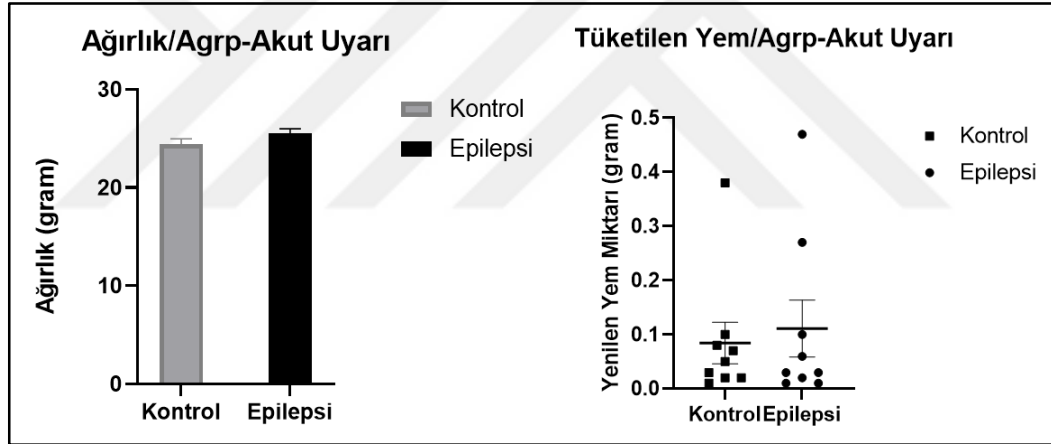
Şekil 4.7: AgRP-kemogenetik hayvanlarında epilepsi ve kontrol grubunun ağırlık ve tüketilen yem grafikleri. Epilepsi hayvanlarına CNO verilen günler ile kontrol hayvanlarına SF verilen günler arasında istatistiksel bir fark görüldü (*, $p < 0,05$). Kontrol grubuna SF verildiği günler ile epilepsi grubuna CNO verildiği günler arasında ağırlık bakımından istatistiksel bir anlamlılık bulunmuştur (*, $p < 0,05$).



Şekil 4.8: AgRP hayvanlarının 24 saatlik kamera kayıtları sonucunda elde edilen mesafe ve hız grafikleri. Gruplar arası anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 4.9: 24 saatlik aktivite sonuçlarının ısı haritası (heatmap) görüntüleri.

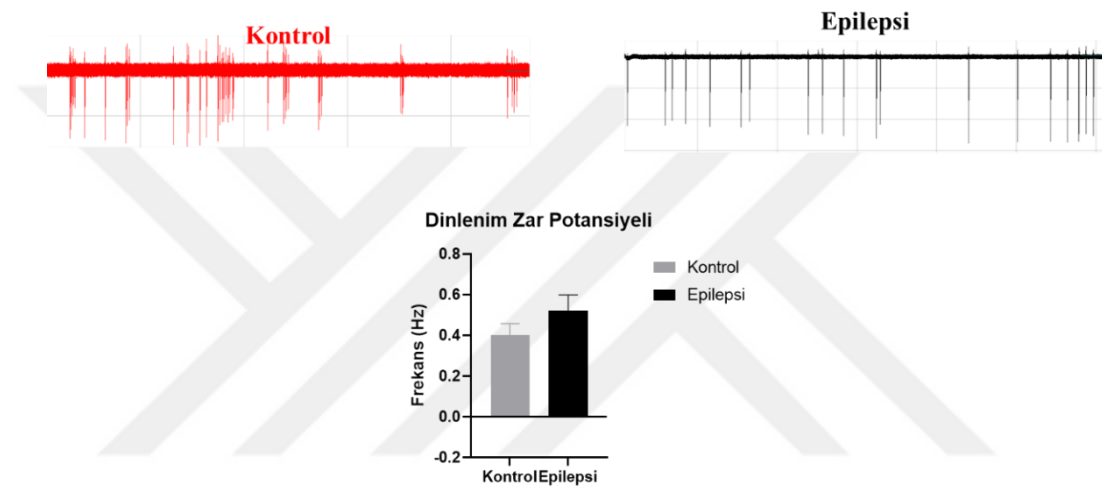


Şekil 4.10: AgRP-Optogenetik hayvanlarında epilepsi ve kontrol grubunun ağırlık ve tüketilen yem grafikleri. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

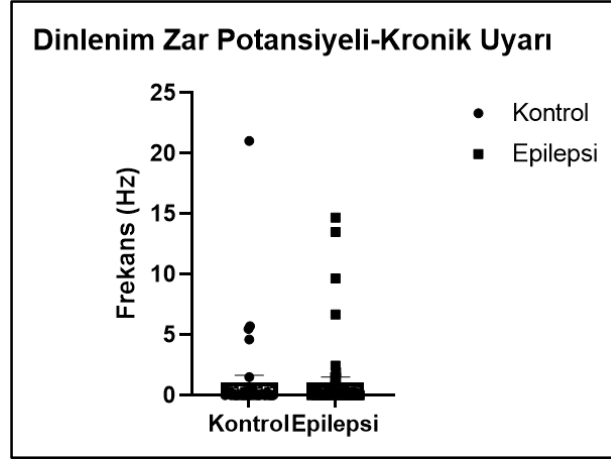
4.5.Dinlenme Zar Potansiyeli Ölçümü

Çalışmanın ilk aşamasında epilepsi ve kontrol grupları arasında ARC'de bulunan AgRP nöronlarının dinlenme zar potansiyelleri ölçüldü. Alınan hücre yaması (patch clamp-cell attach) kayıtlarına göre epilepsi grubunda AgRP nöronlarının eşik değeri kontrol grubuna göre daha yüksekti. Fakat gruplar arası anlamlı bir fark bulunmadı. Çifte transgenik farelerde kemogenetik uyarımı yapılan Hm3Di grubunda 7 gün boyunca CNO

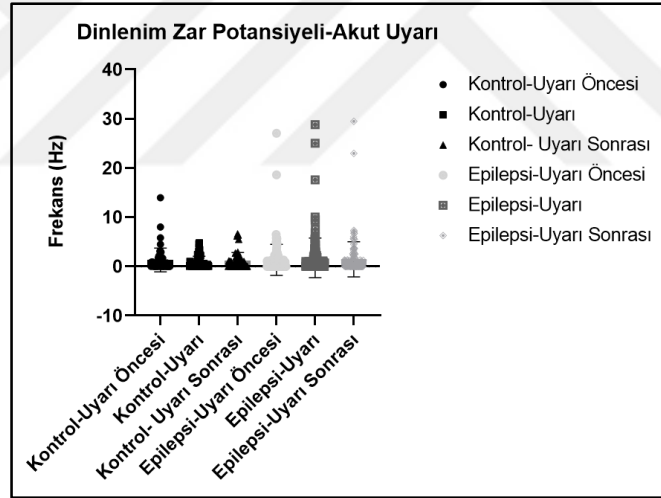
ile uyarım yapılan AgRP nöronlarının, hipokampal GABA nöronlarını üzerine etkileri incelendi. Epilepsi ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Son olarak çifte transgenik hayvanlarda *ex vivo* kesitte, ARC'ye optogenetik uyarım yapılan deney gruplarında hipokampal GABA nöronlarının dinlenme zar potansiyellerine göre fark gözlenmedi. Uyarı sırasında epilepsi grubunun hipokampal GABA nöronlarının zar eşik değerinin, kontrol grubuna kıyasla daha büyük olduğu bulundu. Fakat gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.11: AgRP-GFP deneyinde epilepsi ve kontrol grubunun dinlenme zar potansiyelleri grafiği ve traseleri. Gruplar arasında anlamlı bir değişiklik bulunmadı (Epilepsi n=5,126 hücre; Kontrol n=4,106 hücre).



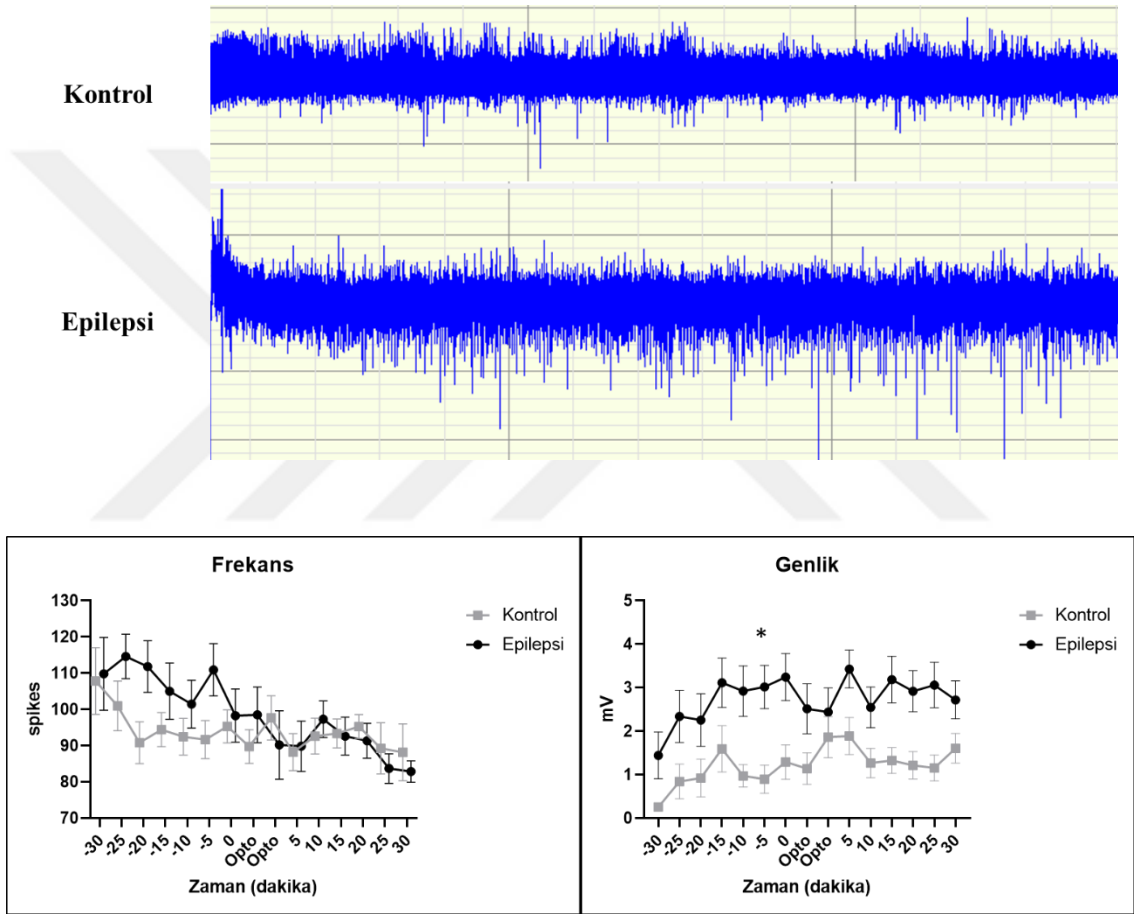
Şekil 4.12: AgRPxVgat çifte transgenik hayvanların ARC çekirdeğinin kemogenetik uyarımı sonucunda, hipokampal GABA nöronlarından alınan dinlenim zar potansiyeli kaydı. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (epilepsi n=2,52 hücre; kontrol n=2, 38 hücre).



Şekil 4.13: AgRPxVgat çifte transgenik hayvanların ARC çekirdeğinin optogenetik uyarımı sonucunda, hipokampal GABA nöronlarından alınan dinlenim zar potansiyeli kaydı. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (epilepsi, n= 5, 134 hücre; kontrol, n=4, 50 hücre).

4.6. Optogenetik Aktivasyon ile EEG Kaydı ve Analizi

ARC'ye ferül yerleştirilmiş AgRP transgenik hayvanlarından uyarı öncesi, uyarı sırasında ve uyarı sonrasında EEG kayıtları alındı. Post-operatif bakım sonrası, 1., 3. ve 5. günlerde alınan EEG kayıtlarından frekans ve amplitude analizleri yapıldı. Gruplar arası frekans analizinde bir fark görülmezken, genlik grafiğinde -5. dakikada epilepsi ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

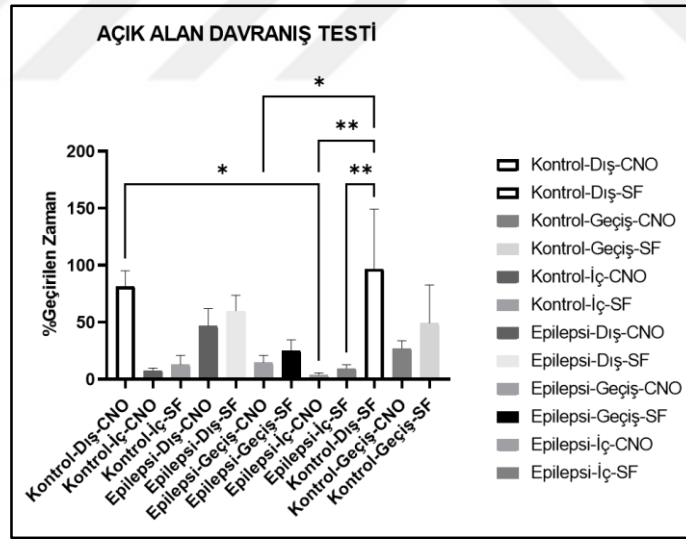


Şekil 4.14: AgRP-Optogenetik deney gruplarında epilepsi ve kontrol gruplarının frekans grafiği, genlik grafiği ve trase görüntüleri. Frekans sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi. Amplitude sonuçlarına göre -5. dakikada epilepsi ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulundu (*, $p<0,05$) (Epilepsi $n=4$, Kontrol $n=4$).

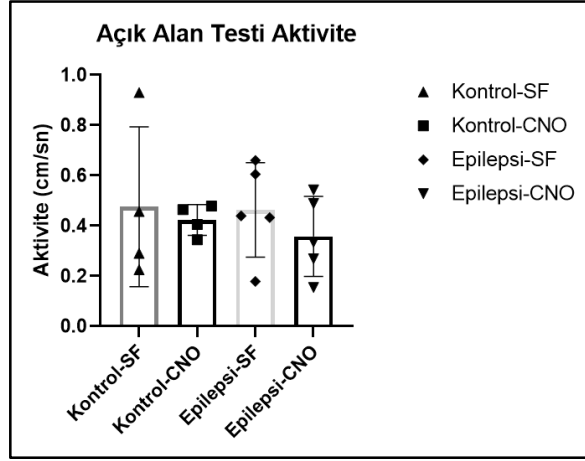
4.7.Kemogenetik Aktivasyon ile Yapılan Davranış Deneyleri

Epilepsi ve kontrol gruplarına rastgele hayvanlar seçilerek, içme sularına bir hafta CNO bir hafta SF koyularak davranış testleri yapıldı. Açık alan testi için üç bölgeye ayrıldı. CNO alan epilepsi grubu, bölgenin iç kısmında daha az zaman geçirdi. Bu sonuç kontrol grubunun CNO alan grubu ve SF alan grubunun dış kısmında geçirdiği süre ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,001$; $p<0,005$). Epilepsi ve kontrol grubu SF aldığı anda ise kontrol grubu dış bölgede, epilepsi grubunun iç bölgede geçirdiği zamandan anlamlı olarak fazla idi ($p<0,001$). Yine SF alan kontrol grubu dış bölgede, CNO alan epilepsi grubunun geçiş bölgesinde anlamlı olarak daha fazla zaman geçirdi ($p<0,005$).

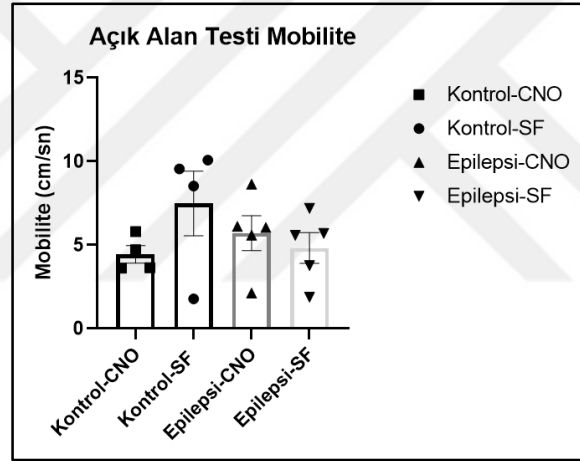
Açık alan testinde aktivite parametresinde anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol grubu CNO alırken daha az mobiliteye sahipken, SF aldıklarında daha fazla mobilitelik gösterdikleri belirlendi. Epilepsi grubunda ise bu durumun tam tersi oldu. Epilepsi grubunun mobilitesinde CNO alırken artış eğilimi görüldü. Fakat gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Obje yerleşim testi ve yeni obje tanıma testlerinde de gruplar arası anlamlı değişiklik bulunmadı.



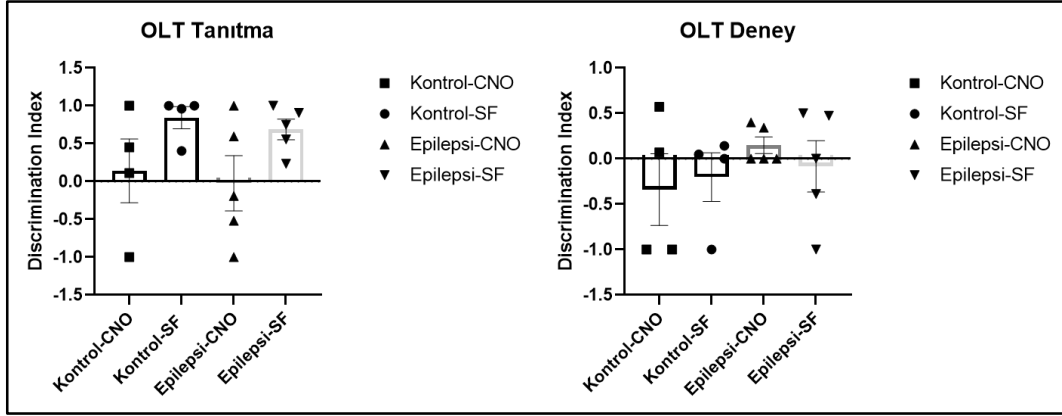
Şekil 4.15: Açık alan testinde deney gruplarının bölgelerde geçirilen zamanın yüzdesi (**, $p<0,001$; *, $p<0,005$; Epilepsi $n=5$, Kontrol $n=4$).



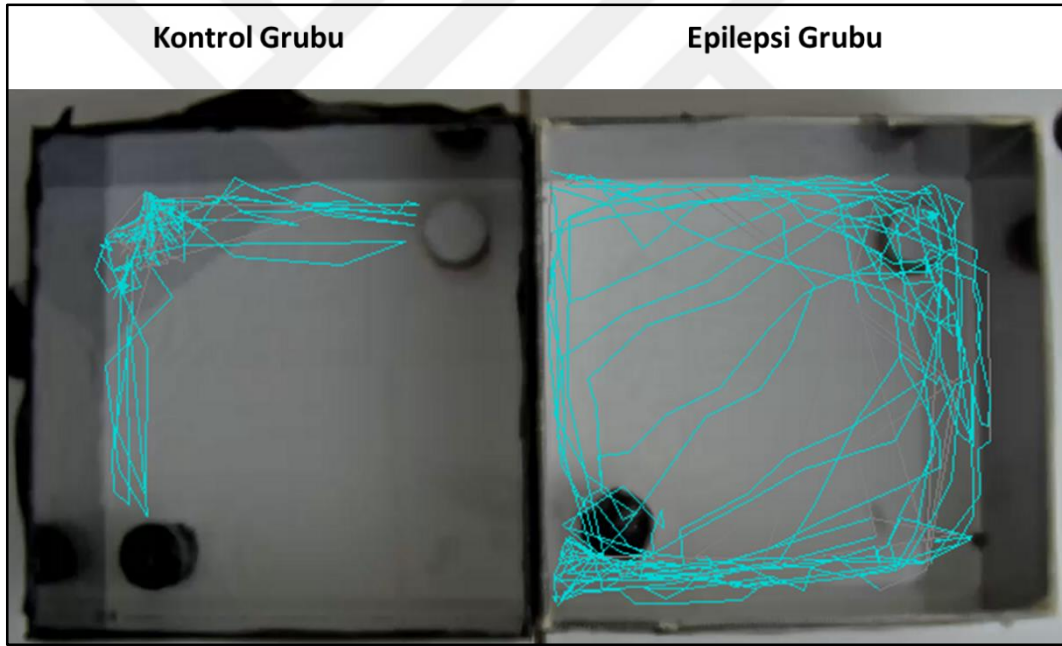
Şekil 4.16: Açık alan testinde deney gruplarının içme sularında CNO ve SF bulunurken testte gösterdikleri aktivite sonuçlarının grafiği (Epilepsi n=5, Kontrol n=4).



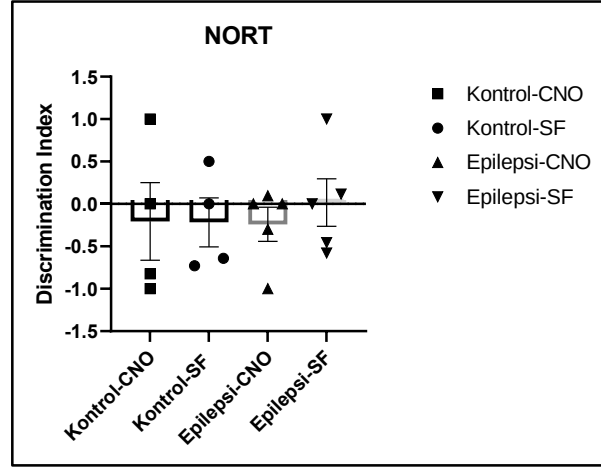
Şekil 4.17: Açık alan testinde deney gruplarının içme sularında CNO ve SF bulunurken testte gösterdikleri mobilite sonuçlarının grafiği (Epilepsi n=5, Kontrol n=4).



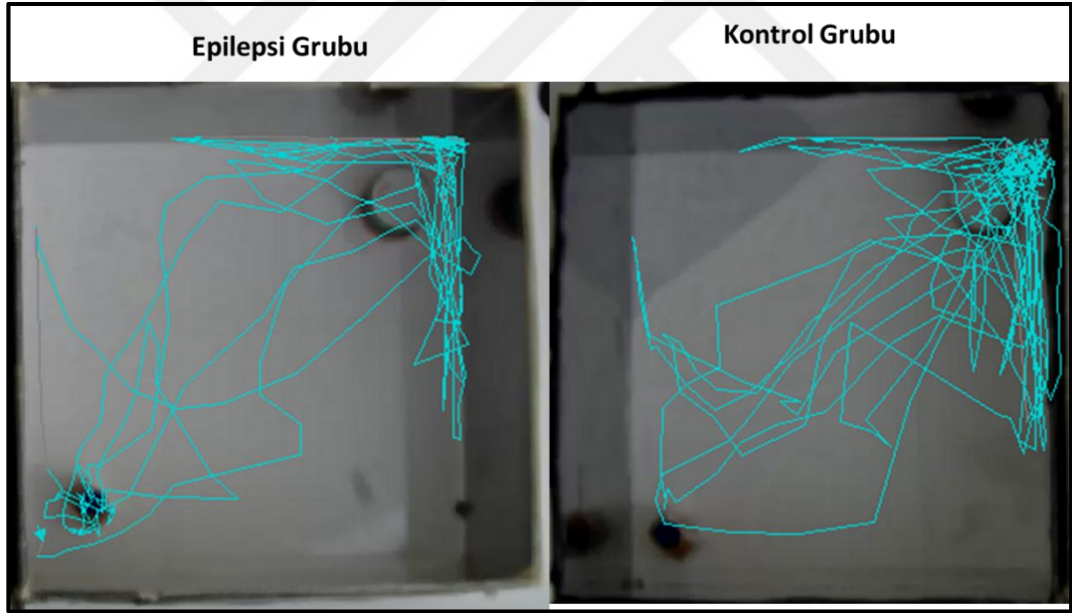
Şekil 4.18: Obje yerleşim testinin tanıtma ve test sonuçlarının grafiği. Gruplar arası anlam değışiklik gözlenmedi (Epilepsi n=5, Kontrol n=4).



Şekil 4.19: Obje Yerleşim Testi'nde deney hayvanlarının takip ettiği yol (Epilepsi n=5, Kontrol n=4).



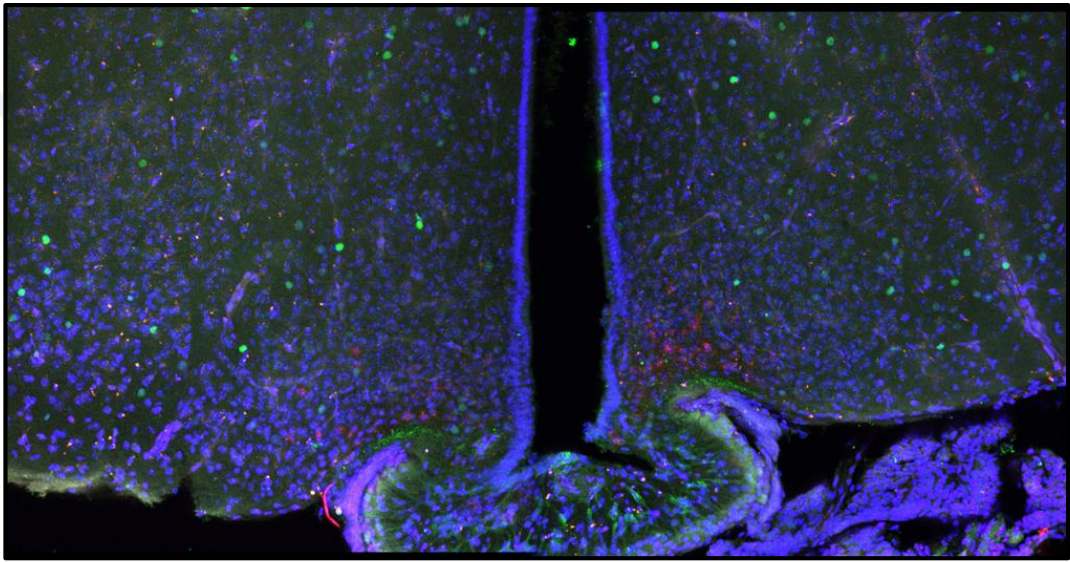
Şekil 4.20: Yeni obje tanıma testinde gruplar arası ayırım göstergesi grafiği. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Epilepsi n=5, Kontrol n=4).



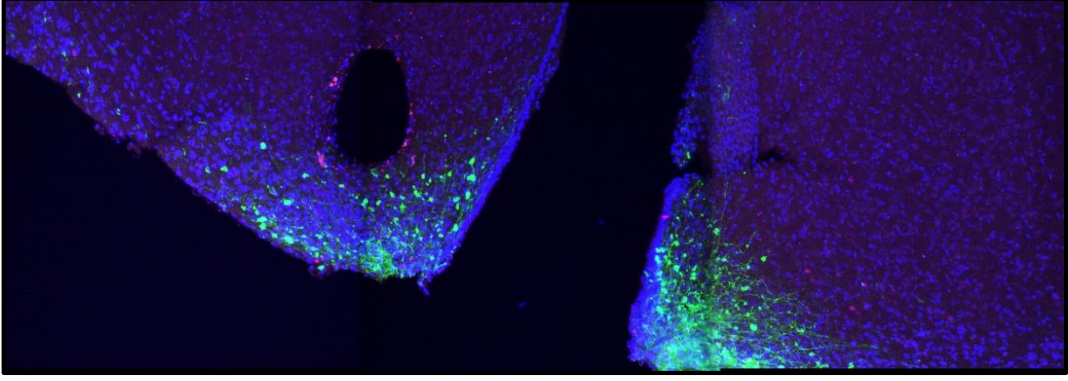
Şekil 4.21: Yeni obje tanıma testinde deney hayvanlarının takip ettiği yol (Epilepsi n=5, Kontrol n=4).

4.8.c-FOS Görüntüleme Sonuçları

Bu boyama özellikle Hm3Di aktivasyonunda c-fos varlığı ve optogenetik deneylerinde kullanılan ferülün yerleşiminin doğruluğunu teyit etmek için yapıldı. Deney grupları arasında bir fark görülmedi. Kre-rekombinaz bağlı proteinlerle işaretlenen nöronların c-fos boyaması ile bütünleşmesi, bu nöronların aktivasyonunu göstermektedir. Öte yandan ferülün bulunduğu yer ARC'de olmayan veya enjeksiyon görülmeyen deney hayvanları deney dışı bırakılmıştır.



Şekil 4.22: AgRP-Kemogenetik grubundan temsili bir görüntü. Kırmızı renk Hm3Di enjeksiyonunu gösterirken, yeşil renk c-fos boyaması için bir göstergedir. Mavi renk çekirdek boyası DAPI'dir (Epilepsi n=5, Kontrol n=4).



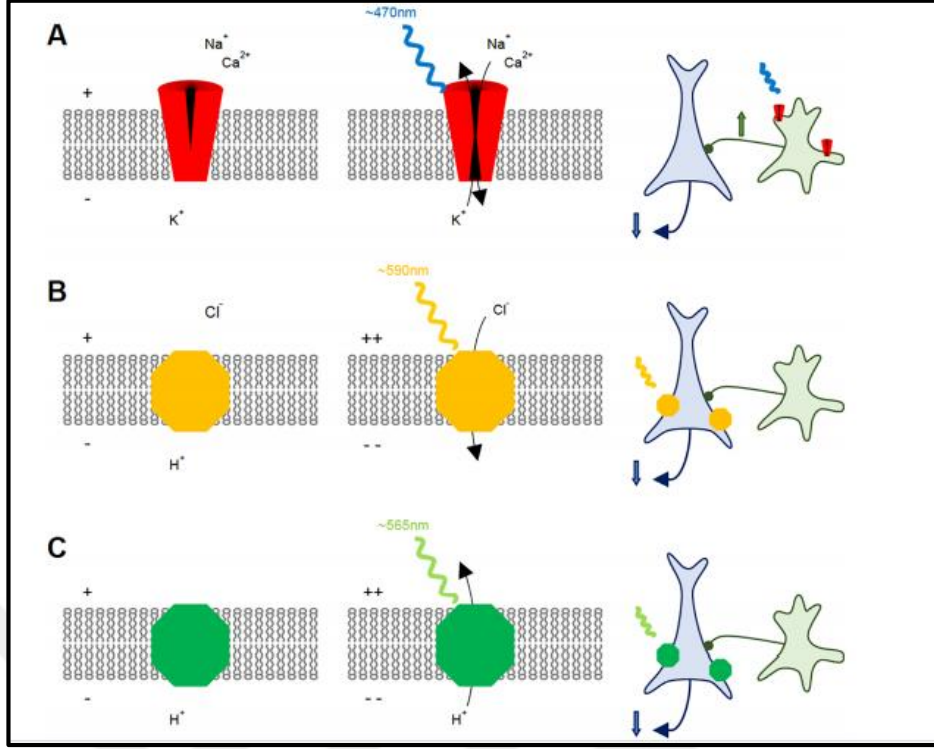
Şekil 4.23: AgRP-optogenetik grubundan temsili bir görüntü. Yeşil renk ChR2 enjeksiyonu, kırmızı renk c-fos boyaması ve mavi renk ise DAPI boyamasıdır. Sol tarafta görülen delik, bize ferülün doğru yere yerleştiğini göstermektedir (Epilepsi n=4, Kontrol n=4).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasının amacı, enerji metabolizmasında önemli bir yere sahip olan hipotalamik ARC bölgesinin modülatör nöron grubu AgRP nöronlarının akut ve kronik aktivasyonunun deneysel temporal lob epilepsi modelinde meydana getirdiği değişimleri elektrofizyolojik ve davranışsal olarak incelemektir. AgRP nöronlarının seçilmesinin iki nedeni vardır. İlk olarak AgRP nöron grubunun enerji metabolizmasını GABA ile düzenlediği gösterilmiştir ve bu nöron grubu ARC çekirdeğinde bulunan özel bir nöron topluluğudur. Ayrıca yine bu nöron grubundan GABA'nın serbest bırakılması, ghrelin ile uyarılan gıda alımında önemli bir yere sahiptir⁵⁷.

NPY, enerji dengesinin düzenlenmesi, hafıza, öğrenme ve epilepsi dahil olmak üzere beyindeki birçok süreçte görev almaktadır. Hipokampus ve neokortekste NPY, neredeyse tamamı GABA eksprese eden nöronlar tarafından yapılır. NPY içeren birçok internöron aynı zamanda somatostatini de birlikte ifade eder¹⁰². Dong ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmaya göre adeno ilişkili virüs ile verilen NPY, KA ile indüklenmiş epileptik sıçan beyinde nöbetleri, N-methyl-D-aspartate reseptör ekspresyonunu azaltarak blokladığı gösterilmiştir¹⁰³. GABA ve NPY'nin epilepsi üzerine etkileri, AgRP nöronlarını araştırmak için önemli gerekçelerden biri oldu. Öte yandan AgRP nöronlarını uyardığı bilinen ghrelin hormonu da gösterdiği nöro-koruyucu ve anti-inflamatuvar etki ile nöronları epilepsi kaynaklı hasarlardan korur. Yine ghrelinin hipokampal sinaptik plastisiteyi, epilepsi durumunda koruduğu ve arttırdığı gösterilmiştir¹⁰⁴. GABA, NPY ve ghrelinin antikonvülzan etkileri sebebiyle, AgRP nöronlarının epilepside olası bir rol oynayabileceği hipotez edildi. AgRP nöronlarının aktivasyonunun hem akut hem de kronik olarak uyarılmasını amaçladık. Bu sebeple 2010 yılında Nature dergisi tarafından yılın metodu seçilen ve epilepsi mekanizmalarını araştırmakta yaygın olarak kullanılan optogenetik metodunu kullanmayı tercih ettik¹⁰⁵. Optogenetik uyarılabilir dokularda, ışığa duyarlı mikrobiyal iyon kanallarının eksprese ettirilmesi ve bir ışık uyarımı sayesinde hücrelerin aktivasyonu ve inhibisyonunu sağlayabilir.

Optogenetiğin, MSS'de kullanılması oldukça yaygındır, özellikle sinirbilimciler tarafından nöral ağların ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılır.



Şekil 5.1: Optogenetik yönteminde kullanılan rodopsin iyon kanalları ve uyarılabilecekleri ışık renkleri. (A) ChR2 gibi uyarıcı opsinler, ışığa tepki olarak bir katyon iletkenliği açar, nöronları depolarize eder ve aksiyon potansiyeli oluşumunu kolaylaştırır. (B) İnhibitör opsinler, Cl⁻'yi nöronlara (NpHR) veya (C) protonları hücre dışına pompalayarak (ARC) taşıyıcı görevi görür¹⁰⁷.

Optogenetik yöntemi nöronal aktivasyon ve inhibisyonu sağlayabildiği için birçok nöral yolağın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bunlardan en önemlisi ve en çok çalışını melanokortin yolağıdır⁴¹. AgRP nöronlarının ise bu yolda bir direktör olduğu yine optogenetik yöntemler ile çalışılmış ve ortaya konulmuştur¹⁰⁸. AgRP nöronlarının aktivasyonunun, yeme davranışı, enerji metabolizması ve termogenez de etkili olduğu, bu etkiyi ise melanokortin yolağı üzerinden gerçekleştirdiği bilinmektedir^{109, 110}.

ARC'deki nöronlar optogenetik yöntem ile akut olarak uyarıldı. Seramik ferüle bağlanan fiber optik kablo ile hedeflenen bölgeye mavi dalga ışık verildi. Transgenik farelere ChR2 adlı mavi ışığa duyarlı katyon kanalı, kre enzimine bağlı olacak şekilde hayvana verildi. Böylece işaretlenen nöronlar, fiber optik kablo sayesinde mavi ışığa

maruz kaldılar ve aktivasyon sağlandı. Bu deneysel yaklaşım ile AgRP nöronları akut olarak uyarıldı.

Epilepsinin altında yatan sebepler ortaya çıktıkça yeni terapiler ve yaklaşımlarda tedavi için ümit verici olabilir. İşte bu sebeple optogenetik yöntemi epilepsi fizyopatolojisinin araştırılmasında güçlü bir teknik olarak görülmektedir. Optogenetik teknik, nöbet kontrolü için önemli yapıların tanımlanması, epilepsi ile ilgili hipotezlerin test edilmesi ve nöbetlerde spesifik nöronal popülasyonlarının rollerinin araştırılması için benzersiz bir tekniktir.

Yapılan literatür çalışması sonucunda bu konuya değinen ilk çalışmalardan birinin Wykes ve arkadaşları tarafından Kasım 2012’de yayınlandığını gördük. Söz konusu çalışmada, sıçanlarda motor kortekste tetanus toksin ile epileptik odak oluşturuldu. Araştırmacılar kortekste bulunan beşinci tabaka piramidal nöronlara, inhibisyon için kullanılan NpHr’yi beyin içi enjeksiyon ile verip, opto-uyarım verdiklerinde, neokortikal nöbetleri durdurabildiklerini göstermişlerdir¹¹¹.

Krook-Magnuson ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada ise gerçek zamanlı kapalı devre yanıt sistemi oluşturulmuştur. Bu çalışma, epilepsi çalışmaları açısından büyük önem arz etmektedir. Çünkü Matlab programı ile yazılan komutlarla kapalı bir devre sistemi kurulmuştur. Gelen nöbet milisaniye önceden hücre aktivitesi ile belirlenip o bölgeye verilen rodopsinler yardımı ile optogenetik müdahalede bulunulmuştur. Söz konusu çalışmada iki strateji izlenmiştir. İlk olarak temporal lobe epilepsi nöbetleri esas hücreler üzerinden halorodopsinler sayesinde amber veya kırmızı renkte ışık uyarımı ile engellenmiştir. Diğer stratejiye göre ise inhibitör parvalbumin salan GABAerjik internöronların optogenetik uyarımları ile nöbetler engellenmiştir. Çalışmacılar nöbetleri ve nöbetlerin yol açtığı davranışsal nöbetleri susturmayı başarmışlardır¹¹². Bu eş zamanlı nöbet susturma stratejisi, epilepsi çalışmalarını bir üst noktaya taşımış ve dentat kapısı hipotezini desteklemiştir. Böylece araştırmacılar nöbet sırasında granül hücreleri de inhibe ederek, dentat geçidin yeniden onarımını sağlamış oldular. Böylece nöbet odağı ile aynı hemisferde olan granül hücreler inhibe edildiğinde fokal nöbetlerin sustuğu görüldü.

Ayrıca, optogenetik yeni bir deneysel epilepsi modeli oluşturmak için de kullanılmıştır. Hipokampusta esas hücrelerin yüksek frekansta uyarılması, optogenetik tekniği ile uyarılmış hipokampal nöbetler oluşturmuştur¹¹³.

Literatürde bugüne kadar ARC bölgesinin epilepsi ile ilişkisi hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada optogenetik tekniği, AgRP farelerde epilepsi ve kontrol grupları arasında EEG parametresi açısından farklılıkların incelenmesi için kullanıldı. Bu projenin bulgularına göre iki grup arasında anlamlı bir fark görülmedi. Fakat frekansı yüksekte başlayan epilepsi grubu, optogenetik uyarı ile birlikte kontrol grubuna daha yakın bir frekans profili gösterdi. Buradan yola çıkarak AgRP nöronlarının uyarımı ile birlikte enerji metabolizmasındaki değişim kaynaklı iki hipotez öne sürebiliriz. Öncelikle bu nöron grubunun GABA salınımı önemli bir çıkış noktası olabilir. Diğer bir açıklamaya göre ise, açlık sinyallerinin enerji metabolizmasını etkilediği ve böylece beynin nöbet oluşturmak yerine kendi homeostazını korumaya yönelik çalıştığı düşünülmektedir. Bir diğer önermemiz, bu AgRP aktivasyonunun hipokampal GABA nöronlarını etkileyebileceğiydi. Bu sebeple çifte transgenik hayvanlarından alınan beyin kesitlerinde Chr2 bulunan ARC çekirdeğine mavi ışık uyarımı yaparak, kırmızı renk işaretlenmiş GABA nöronlarından membran potansiyeli kaydı alındı. Bu kayıta optogenetik uyarım sırasında; epileptik hayvanların hipokampal GABA nöronlarının uyarılabilirlikleri azalırken, kontrol grubunun uyarılabilirliğinin arttığı, yani eşik değerin düştüğü görüldü. Uyarı sonrasında da bu eğilim devam etmiştir. AgRP nöronlarının hipokampal GABA nöronlarına direk bir projeksiyonu olmadığını ilk aşamada yaptığımız çalışmada görmüştük. Bu sebeple akut bir uyarıda epileptik hipokampal GABA nöronlarının eşik değerinin yüksek olması beklenebilir. Bu durumun tamamen epilepsi patofizyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Kemogenetik yöntem ile nöronlara farmakolojik bir duyarlılık kazandırılır. G protein bağlı reseptörlerden ve sentetik ligand kapılı iyon kanallarından üretilen ve tasarlanmış ilaçlar ile aktive edilebilen tasarlanmış reseptörler (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs-DREADDs) en yaygın kullanılan kemogenetik ajanlardır. Bu tasarlanmış reseptörler dışarıdan verilen agonistler ile aktive edilirken, nöronları inhibe edebilir veya uyarabilirler¹¹⁴. Kemogenetik yöntem ile hem *in vitro*¹¹⁵ hem de *in vivo* epilepsi modellerinde¹¹⁶ nöbetlerin baskılanabildiği gösterilmiştir. İnsan muskarinik M4 reseptöründen üretilen hM4D, CNO ile uyarıldığında hücreyi

hiperpolarizasyona götürerek, nöronu inhibe eder ve presinaptik terminale daha az nörotransmitter salınmasına sebep olur¹¹⁷. Bu yöntem ile hem KA ile indüklenmiş hem de pilokarpin ile indüklenmiş epilepsi modellerinde hM4D enjeksiyonu yapılmış deney hayvanlarında, kronik olarak verilen CNO ile nöbetlerin baskılandığı gözlenmiştir¹¹⁸. Deneysel epilepsi modellerinde, parvalbumin inhibitör internöronları hedeflenerek, CNO ile birlikte nöronu polarize eden hM3D iyon kanalları kullanılmış ve nöbetlerin baskılandığı gösterilmiştir¹¹⁹.

Özellikle kronik davranış deneylerinde, belli bir hücre grubunu susturmak veya aktive etmek için kemogenetik metot kullanılabilir. Kronik olarak verilecek CNO, bu iyon kanalları üzerine etki eder ve davranıştaki etkileri gözlenebilir. Öte yandan optogenetik yöntem genellikle akut deneyler için kullanılır. Akut deneylerde hem bağlanan fiber kablo hem de verilen ışık dalga boyu önemlidir. Optogenetik yöntem ile hareketli hayvandan EEG ve elektromyografi gibi kayıtlar alınabilirken, davranış deneyleri de yapılabilir. Yine kemogenetik olarak uyarılmış belirli bir nöron grubuna sahip deney hayvanına da tüm bu testler uygulanabilir. Bu iki yöntem de bize nöronların manipülasyonunu yaparak, ölçülmesi amaçlanan parametreleri sağlayabilir.

Bu çalışmaya ilişkin önemli bir kısıtlılık ise cerrahi işlem ve KA nöbet uyarımının deney hayvanı yaşam oranını düşürmüştür. Bu sebeple gruplarda bulunan deney hayvanı sayısı hedeflenenden az olmuştur. Ayrıca, çifte transgenik hayvanların üreme verimliliğinin düşük olmasından dolayı, alınan yavru sayısı ise yeterli olmadığı için gruplarda hayvan sayıları azalmıştır.

Davranış deneyleri için kronik uyarım, sonuç almak için daha belirleyici olacağı düşüncesiyle kemogenetik uyarım yapıldı. ARC'ye akut uyarım yapılarak ölçülen hipokampal GABA nöronlarının dinlenme zar potansiyelleri bu sefer kemogenetik uyarım ile ölçüldü. Epilepsi ve kontrol grubu arasında bir fark görülmedi. Fakat çifte transgenik hayvanların üretiminde karşılaşılan zorluklar ve deney dışı kalan hayvanlar yüzünden, deney grubunun hayvan sayısı iki olarak kaldı. Gruplar arasında tüketilen yem miktarı açısından bir fark olmasa da ağırlık açısından epilepsi grubunun CNO aldığı dönemde görülen azalmanın, epilepsi ve AgRP enerji metabolizması ilişkili olduğu düşünülmektedir. Açık alan test aktivite ve mobilite sonuçları da 24 saatlik aktivite testlerini destekler niteliktedir. Epileptik fareler, kontrol grubuna göre anlamlı olmasa da

bir yükseliş göstermektedir. Yeni obje tanıma ve objenin yerini tanıma testlerinde kontrol grubu ve epilepsi grubunda bir farklılık gözlenmemiştir. Normalde yapılan çalışmalar, KA performansı bozduğunu göstermiştir¹²⁰. Fakat burada KA vermiş olduğu hipokampal zarara rağmen, deney hayvanları araştırmış ve devamlı olarak alan içinde gezmiştir. Daha önce, 2019 yılında yayınlanan bir çalışmaya göre, AgRP nöronlarının kemogenetik aktivasyonu, mekânsal öğrenme ve çalışma belleğini içeren davranış görevlerinde farelerin performansını modüle etmiştir¹²¹. Bu gruplar arası cevapların çok yakın olmasının da AgRP nöronlarının kemogenetik aktivasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

AgRP nöronlarının akut ve kronik uyarımının incelendiği bu tez çalışmasında, sonuç olarak bu nöron grubunun aktivasyonunun epileptik hayvanlarda, kontrol grubuna benzer sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Yapılan önceki çalışmalar göz önüne alındığında bu nöron grubunun epilepsi üzerine enerji metabolizması veya GABA nöronları üzerinden etki edip etmediğinin araştırılması, bu çalışmayı bir sonraki basamağa taşıyacaktır. Bu tez projesinin bir diğer önemli özelliği ise Ülkemizde yapılan ilk epilepsi-optogenetik çalışması olmasıdır.

Daha ileri deneylerde, kapalı devre sistemin kullanılması yararlı olacaktır. Bu yöntem ile EEG kaydı alınırken, gelen nöbet öncesi AgRP nöronlarının aktivasyonunun nöbetlere etkilerinin araştırılması amaçlanabilir.

6.KAYNAKÇA

1. England MJ, Liverman CT, Schultz AM, Strawbridge LM. Epilepsy across the spectrum: Promoting health and understanding. A summary of the Institute of Medicine report. *Epilepsy Behav.* 2012;25(2):266-276. doi:10.1016/j.yebeh.2012.06.016
2. Krook-Magnuson E. The gate and the source? The dentate gyrus takes central stage in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2017;17(1):48-49. doi:10.5698/1535-7511-17.1.48
3. Jetté N, Sander JW, Keezer MR. Surgical treatment for epilepsy: the potential gap between evidence and practice. *Lancet Neurol.* 2016;15(9):982-994. doi:10.1016/S1474-4422(16)30127-2
4. Walker MC, Kullmann DM. Optogenetic and chemogenetic therapies for epilepsy. *Neuropharmacology.* 2020;168(August):107751. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107751
5. Ngo HB, Melo MR, Layfield S, et al. A Chemogenetic Tool that Enables Functional Neural Circuit Analysis. *Cell Rep.* 2020;32(11). doi:10.1016/j.celrep.2020.108139
6. Roth BL. Use of DREADDs. *Neuron.* 2017;89(4):683-694. doi:10.1016/j.neuron.2016.01.040.DREADDs
7. Kätzel D, Nicholson E, Schorge S, Walker MC, Kullmann DM. Chemical-genetic attenuation of focal neocortical seizures. *Nat Commun.* Published online 2014. doi:10.1038/ncomms4847
8. Zhou QG, Nemes AD, Lee D, et al. Chemogenetic silencing of hippocampal neurons suppresses epileptic neural circuits. *J Clin Invest.* Published online 2019. doi:10.1172/JCI95731
9. Camporeze B, Manica BA, Bonafé GA, et al. Optogenetics the new molecular approach to control functions of neural cells in epilepsy, depression and tumor. 2018;8(10):1900-1918.
10. Chia-Chu Chiang, Thomas P. Ladas, Luis E. Gonzalez-Reyes and DMD. Seizure

- suppression by high frequency optogenetic stimulation using in vitro and in vivo animal models of epilepsy. *Bone*. 2008;23(1):1-7. doi:10.1016/j.brs.2014.07.034.Seizure
11. Losi G, Mariotti L, Carmignoto G. GABAergic interneuron to astrocyte signalling: A neglected form of cell communication in the brain. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2014;369(1654). doi:10.1098/rstb.2013.0609
 12. Choy MK, Duffy BA, Lee JH. Optogenetic study of networks in epilepsy. *J Neurosci Res*. 2017;95(12):2325-2335. doi:10.1002/jnr.23767
 13. Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC MC. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons | Physiological Reviews. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00007.2017>
 14. Saper CB, Lowell BB. The hypothalamus. *Curr Biol*. 2014;24(23):R1111-R1116. doi:10.1016/j.cub.2014.10.023
 15. Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: Perception and integration. *Nat Rev Genet*. 2002;3(8):589-600. doi:10.1038/nrg862
 16. Lau J, Herzog H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Front Neurosci*. 2014;8(SEP). doi:10.3389/fnins.2014.00313
 17. Luo N, Marcelin G, Liu M, Schwartz G, Chua S. Neuropeptide Y and Agouti-Related Peptide Mediate Complementary Functions of Hyperphagia and Reduced Energy Expenditure in Leptin Receptor Deficiency. Published online 2011. doi:10.1210/en.2010-1135
 18. Livingston S, Pauli LL. Ketogenic Diet and Epilepsy. *Dev Med Child Neurol*. 1975;17(6):818-819. doi:10.1111/j.1469-8749.1975.tb04712.x
 19. Yassa MA. Hippocampus. In: *Brittanica*. ; 2021:4-7.
 20. Ben Greenstein. Hipokampus. In: *Nörobilim Renkli Atlası: Nöroanatomi ve Nörofizyoloji*. ; 2004.
 21. Johnston D AD, Shepherd GM ed. Hippocampus. In: *Brain. 5th Ed. Oxford:*

Oxford University Press; 455e498.

22. Anand K, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*. 2012;15(4):239-246. doi:10.4103/0972-2327.104323
23. Benoy A, Dasgupta A, Sajikumar S. Hippocampal area CA2: an emerging modulatory gateway in the hippocampal circuit. *Exp Brain Res*. 2018;236(4):919-931. doi:10.1007/s00221-018-5187-5
24. Spencer RL, Bland ST. Hippocampus and hippocampal neurons. *Stress Physiol Biochem Pathol Handb Stress Ser Vol 3*. Published online 2019:57-68. doi:10.1016/B978-0-12-813146-6.00005-9
25. Spruston N. Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(3):206-221. doi:10.1038/nrn2286
26. Bekkers JM. Pyramidal neurons. *Curr Biol*. 2011;21(24):R975. doi:10.1016/j.cub.2011.10.037
27. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007;163:3-22. doi:10.1016/S0079-6123(07)63001-5
28. Ribak CE, Seress L. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol*. 1983;12(4):577-597. doi:10.1007/BF01181525
29. Hendricks WD, Westbrook GL, Schnell E. Early detonation by sprouted mossy fibers enables aberrant dentate network activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;166(22):10994-10999. doi:10.1073/pnas.1821227116
30. Freundl TF. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus*. 1996;470.
31. F. Edward Dudek L-RS. Loss of GABAergic Interneurons in Seizure-induced Epileptogenesis. *Epilepsy Curr*. 2003;3(5):159–161.

32. Zhou X, Zhong S, Peng H, et al. Cellular and molecular properties of neural progenitors in the developing mammalian hypothalamus. *Nat Commun.* 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-17890-2
33. Ben-Shlomo A, Melmed S. Hypothalamic Regulation of Anterior Pituitary Function. *Pituitary*. Published online January 1, 2011;21-45. doi:10.1016/B978-0-12-380926-1.10002-1
34. Burbidge S, Stewart I, Placzek M. Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. 2016;6(April):623-643. doi:10.1002/cphy.c150023
35. Xie Y, Dorsky RI. Development of the hypothalamus: Conservation, modification and innovation. *Dev.* 2017;144(9):1588-1599. doi:10.1242/dev.139055
36. Roh E, Song DK, Kim MS. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp Mol Med.* 2016;48(3). doi:10.1038/emm.2016.4
37. Morselli LL, Claflin KE, Cui H, Grobe JL. Control of Energy Expenditure by AgRP Neurons of the Arcuate Nucleus: Neurocircuitry, Signaling Pathways, and Angiotensin. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20(3). doi:10.1007/s11906-018-0824-8
38. Morton GJ, Schwartz MW. *Metabolic Roles of the Orexigenic and Anorexigenic Neuropeptides*. 2nd ed. Elsevier Inc.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00047-5
39. de Oliveira RF, ChangetheRest change the, WHITE O, et al. Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice. *Nature*. 2018;388:539-547.
40. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):571-578. doi:10.1038/nn1455
41. Baldini B and Phelan KD. The melanocortin pathway and energy homeostasis: From discovery to obesity therapy. *Mol Metab.* 2021;48(March):101206. doi:10.1016/j.molmet.2021.101206

42. Dutia R, Kim AJ, Modes M, et al. Effects of AgRP Inhibition on Energy Balance and Metabolism in Rodent Models. *PLoS One*. 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0065317
43. Koch M, Horvath TL. Molecular and cellular regulation of hypothalamic melanocortin neurons controlling food intake and energy metabolism. *Mol Psychiatry*. 2014;19(7):752-761. doi:10.1038/mp.2014.30
44. Kim JD, Leyva S, Diano S. Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front Physiol*. 2014;5(Nov):1-7. doi:10.3389/fphys.2014.00480
45. Diéguez C, Boit D, Novelle G. New Insights in Ghrelin Orexigenic Effect. 2010;38:196-205.
46. Grattan DR. The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol*. 2015;226(2):T101-T122. doi:10.1530/JOE-15-0213
47. Augustine RA, Ladyman SR, Bouwer GT, et al. Prolactin regulation of oxytocin neurone activity in pregnancy and lactation. *J Physiol*. 2017;595(11):3591-3605. doi:10.1113/JP273712
48. Stagkourakis S, Dunevall J, Taleat Z, Ewing AG, Broberger C. Dopamine release dynamics in the tuberoinfundibular dopamine system. *J Neurosci*. 2019;39(21):4009-4022. doi:10.1523/JNEUROSCI.2339-18.2019
49. K.E. Beale, J.S. Kinsey-Jones, J.V. Gardiner, E.K. Harrison, E.L. Thompson, M.H. Hu, M.L. Sleeth, A.H. Sam, H.C. Greenwood, A.K. McGavigan, W.S. Dhillo, J.M. Mora, X.F. Li, S. Franks, S.R. Bloom, K.T. O'Byrne and KGM. The Physiological Role of Arcuate Kisspeptin Neurons in the Control of Reproductive Function in Female Rats. *Endocrinology*. 2014;155(3):1091-1098.
50. Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, et al. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One*. 2009;4(12). doi:10.1371/journal.pone.0008334

51. Mano-Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, et al. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in the arcuate nucleus (Arc) of the hypothalamus are decreased in transgenic rats whose expression of ghrelin receptor is attenuated: Evidence that ghrelin receptor is involved in the up-regulation of GHRH e. *Endocrinology*. 2006;147(9):4093-4103. doi:10.1210/en.2005-1619
52. Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*. 2005;123(3):493-505. doi:10.1016/j.cell.2005.08.035
53. Xu Y, Jones JE, Kohno D, et al. 5-HT₂CRs Expressed by Pro-Opiomelanocortin Neurons Regulate Energy Homeostasis. *Neuron*. 2008;60(4):582-589. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.033
54. Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep*. 2015;48(4):229-233. doi:10.5483/BMBRep.2015.48.4.272
55. Ellacott KLJ, Cone RD. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:395-408. doi:10.1210/rp.59.1.395
56. Van Den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci*. 2004;7(5):493-494. doi:10.1038/nn1226
57. Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat Neurosci*. 2008;11(9):998-1000. doi:10.1038/nn.2167
58. Sternson SM, Atasoy D. Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite. *Neuroendocrinology*. 2014;100:95-102. doi:10.1159/000369072
59. Joly-Amado A, Cansell C, Denis RGP, et al. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Published online 2014. doi:10.1016/j.beem.2014.03.003.

60. Zagmutt S, Mera P, Soler-Vázquez MC, Herrero L, Serra D. Targeting AgRP neurons to maintain energy balance: Lessons from animal models. *Biochem Pharmacol*. Published online 2018. doi:10.1016/j.bcp.2018.07.008
61. Dietrich MO, Zimmer MR, Bober J, Horvath TL. Hypothalamic AgRP Neurons Drive Stereotypic Behaviors beyond Feeding. *Cell*. 2015;160(6):1222-1232.
62. Vicent MA, Mook CL, Carter ME. POMC neurons in heat: A link between warm temperatures and appetite suppression. *PLoS Biol*. 2018;16(5):1-8. doi:10.1371/journal.pbio.2006188
63. Fisher RS, Cross JH, French JA, et al. Operational Classification of Seizure Types by the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 2017;58(4):522-530.
64. Devinsky O, Vezzani A, O'Brien TJ, et al. Epilepsy. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4(May). doi:10.1038/nrdp.2018.24
65. Fisher RS, Scharfman HE, DeCurtis M. How Can We Identify Ictal and Interictal Abnormal Activity? *Adv Exp Med Biol*. 2014;813(3):3-23.
66. Okan M. Status Epileptikus. *Pract Emerg Med Pocket B*. 2016;(2):116-119.
67. Ethemoglu MS, Seker FB, Akkaya H, et al. Anticonvulsant activity of resveratrol-loaded liposomes in vivo. *Neuroscience*. 2017;357. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.05.026
68. Weinstein S. Seizures and epilepsy: An overview. *Epilepsy Intersect Neurosci Biol Math Eng Phys*. Published online 2016:65-77. doi:10.1201/b10866-10
69. Berglind F, Ledri M, Sørensen AT, et al. Optogenetic inhibition of chemically induced hypersynchronized bursting in mice. *Neurobiol Dis*. 2014;65:133-141. doi:10.1016/j.nbd.2014.01.015
70. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-482. doi:10.1111/epi.12550
71. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res*. 2018;139(November 2017):73-79.

doi:10.1016/j.eplepsyres.2017.11.015

72. Penry K. Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*. 1981;22(4):489-501. doi:10.1111/j.1528-1157.1981.tb06159.x
73. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-685. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x
74. Amengual-Gual M, Sánchez Fernández I, Loddenkemper T. Patterns of epileptic seizure occurrence. *Brain Res*. 2019;1703(February):3-12. doi:10.1016/j.brainres.2018.02.032
75. Lowenstein DH AB. Status epilepticus at an urban public hospital in the 1980s. *Neurology*. 1993;43(3):483-488.
76. Huff JS MN. Etiology. In: *Seizure*. 2021 Jul 2. StatPearls Publishing; 2021:3-5.
77. Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy-A review. *Epilepsy Res*. 2009;85(1):31-45. doi:10.1016/j.eplepsyres.2009.03.003
78. Sen A, Jette N, Husain M, Sander JW. Epilepsy in older people. *Lancet*. 2020;395(10225):735-748. doi:10.1016/S0140-6736(19)33064-8
79. Flynn S, Babi MA. Anticonvulsants. In: *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)*. ; 2017:176-192.
80. Ethemoglu MS, Kutlu S, Seker FB, Erdogan CS, Bingol CA, Yilmaz B. Effects of agomelatine on electrocorticogram activity on penicillin-induced seizure model of rats. *Neurosci Lett*. 2019;690. doi:10.1016/j.neulet.2018.09.014
81. Paoletti P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci*. 2011;33(8):1351-1365. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x
82. Barker-Haliski M, Steve White H. Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(8):1-15.

doi:10.1101/cshperspect.a022863

83. Hanada T. Ionotropic glutamate receptors in epilepsy: A review focusing on ampa and nmda receptors. *Biomolecules*. 2020;10(3). doi:10.3390/biom10030464
84. Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy. In: *Epilepsia*. Vol 42. ; 2001:8-12. doi:10.1046/j.1528-1157.2001.042Suppl.3008.x
85. Michel CM, Brunet D. EEG source imaging: A practical review of the analysis steps. *Front Neurol*. 2019;10(APR). doi:10.3389/fneur.2019.00325
86. Muhsine Sinem Ethemoglu. Agomelatinin penisilinle indüklenmiş deneysel epilepsi modelinde elektrokortikogram, kan basıncı ve serebral kan akımı üzerine etkisi. Published online 2016.
87. Müller-Putz GR. Electroencephalography. *Handb Clin Neurol*. 2020;168(2007):249-262. doi:10.1016/B978-0-444-63934-9.00018-4
88. Abhang PA, Gawali BW, Mehrotra SC. *Technological Basics of EEG Recording and Operation of Apparatus.*; 2016. doi:10.1016/b978-0-12-804490-2.00002-6
89. Raol YH, Brooks-Kayal AR. *Experimental Models of Seizures and Epilepsies*. Vol 105. 1st ed. Elsevier Inc.; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-394596-9.00003-2
90. Häusser M. Optogenetics: The age of light. *Nat Methods*. 2014;11(10):1012-1014. doi:10.1038/nmeth.3111
91. Duebel J, Marazova K, Sahel JA. Optogenetics. *Curr Opin Ophthalmol*. 2015;26(3):226-232. doi:10.1097/ICU.0000000000000140
92. Huang F, Tang B, Jiang H. Optogenetic investigation of neuropsychiatric diseases. *Int J Neurosci*. 2013;123(1):7-16. doi:10.3109/00207454.2012.728651
93. Lee C, Lavoie A, Liu J, Chen SX, Liu BH. Light Up the Brain: The Application of Optogenetics in Cell-Type Specific Dissection of Mouse Brain Circuits. *Front Neural Circuits*. 2020;14(April):1-14. doi:10.3389/fncir.2020.00018
94. Ladas TP, Chiang CC, Gonzalez-Reyes LE, Nowak T, Durand DM. Seizure

- reduction through interneuron-mediated entrainment using low frequency optical stimulation. *Exp Neurol*. 2015;269:120-132. doi:10.1016/j.expneurol.2015.04.001
95. Christenson Wick Z, Krook-Magnuson E. Specificity, versatility, and continual development: The power of optogenetics for epilepsy research. *Front Cell Neurosci*. 2018;12(June):1-25. doi:10.3389/fncel.2018.00151
 96. Aklan I, Sayar Atasoy N, Yavuz Y, et al. NTS Catecholamine Neurons Mediate Hypoglycemic Hunger via Medial Hypothalamic Feeding Pathways. *Cell Metab*. 2020;31(2):313-326.e5. doi:10.1016/j.cmet.2019.11.016
 97. Dilsiz P, Aklan I, Sayar Atasoy N, et al. MCH Neuron Activity Is Sufficient for Reward and Reinforces Feeding. *Neuroendocrinology*. 2020;110(3-4):258-270. doi:10.1159/000501234
 98. Zhu H, Roth BL. DREADD: A chemogenetic GPCR signaling platform. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18(1):1-6. doi:10.1093/ijnp/pyu007
 99. Franklin, K. B. J., & Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Editio.; 1997.
 100. Racine RJ. Modification of Seizure Activity by Electrical Stimulation: II.Motor Seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32:281-294.
 101. Denninger JK, Smith BM, Kirby ED. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *J Vis Exp*. 2018;2018(141):1-10. doi:10.3791/58593
 102. Colmers WF, El Bahh B. Neuropeptide Y and Epilepsy. *Epilepsy Curr*. 2003;3(2):53-58. doi:10.1046/j.1535-7597.2003.03208.x
 103. Dong C, Zhao W, Li W, Lv P, Dong X. Anti-epileptic effects of neuropeptide Y gene transfection into the rat brain. *Neural Regen Res*. 2013;8(14):1307-1315. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.14.007
 104. Ge T, Yang W, Fan J, Li B. Preclinical evidence of ghrelin as a therapeutic target in epilepsy. *Oncotarget*. 2017;8(35):59929-59939. doi:10.18632/oncotarget.18349

105. Method of the Year 2010. *Nat Methods*. 2011;8(1):1. doi:10.1038/nmeth.f.321
106. Ferenczi EA, Tan X, Huang CLH. Principles of Optogenetic Methods and Their Application to Cardiac Experimental Systems. *Front Physiol*. 2019;10(September). doi:10.3389/fphys.2019.01096
107. Walker MC, Kullmann DM. Optogenetic and chemogenetic therapies for epilepsy. *Neuropharmacology*. 2020;168(September 2019):107751. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107751
108. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AgRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci*. Published online 2011. doi:10.1038/nn.2739
109. Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Bober J, Zimmer MR, Dietrich MO. Regulation of substrate utilization and adiposity by AgRP neurons. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-018-08239-x
110. Atasoy D, Nicholas Betley J, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012;488(7410):172-177. doi:10.1038/nature11270
111. Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L, et al. Optogenetic and Potassium Channel Gene Therapy in a Rodent Model of Focal Neocortical Epilepsy. doi:10.1126/scitranslmed.3004190
112. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun*. 2013;4:1376-1378. doi:10.1038/ncomms2376
113. Cela E, McFarlan AR, Chung AJ, et al. An Optogenetic Kindling Model of Neocortical Epilepsy. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-019-41533-2
114. Lieb A, Weston M, Kullmann DM. Designer receptor technology for the treatment of epilepsy. *EBioMedicine*. Published online 2019. doi:10.1016/j.ebiom.2019.04.059
115. Avaliani N, Andersson M, Runegaard AH, Woldbye D, Kokaia M. DREADDs

- suppress seizure-like activity in a mouse model of pharmacoresistant epileptic brain tissue. *Gene Ther.* Published online 2016. doi:10.1038/gt.2016.56
116. Wicker E, Forcelli PA. Chemogenetic silencing of the midline and intralaminar thalamus blocks amygdala-kindled seizures. *Exp Neurol.* Published online 2016. doi:10.1016/j.expneurol.2016.07.003
 117. Kätzel D, Nicholson E, Schorge S, Walker MC, Kullmann DM. Chemical-genetic attenuation of focal neocortical seizures. *Nat Commun.* 2014;5. doi:10.1038/ncomms4847
 118. Robrecht Raedt, Chris Van Den Haute, Sofie Daelemans, Ine Dauwe, Veerle Baekelandt, Lars E. Larsen, Wouter Van Lysebettens, Kristl Vonck PB. Chemogenetic Silencing of Excitatory Hippocampal Neurons Prevents Spontaneous Seizures in a Mouse Model for Temporal Lobe Epilepsy. In: *Annual Meeting Abstracts : View | American Epilepsy Society.* ; 2018:1-2. Accessed November 2, 2020. https://www.aesnet.org/meetings_events/annual_meeting_abstracts/view/195615
 119. Călin A, Stancu M, Zagrean AM, Jefferys JGR, Ilie AS, Akerman CJ. Chemogenetic recruitment of specific interneurons suppresses seizure activity. *Front Cell Neurosci.* Published online 2018. doi:10.3389/fncel.2018.00293
 120. Heinrichs SC, Seyfried TN. Behavioral seizure correlates in animal models of epilepsy: A road map for assay selection, data interpretation, and the search for causal mechanisms. *Epilepsy Behav.* 2006;8(1):5-38. doi:10.1016/j.yebeh.2005.08.009
 121. Zimmer MR, Schmitz AE, Dietrich MO. Activation of AgRP neurons modulates memory-related cognitive processes in mice Graphical abstract HHS Public Access. *Pharmacol Res.* 2019;141:303-309. doi:10.1016/j.phrs.2018.12.024



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)

ETİK KURUL KARARI

Protokol No	Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No	Proje Yürütücüsü
2019-817	24.12.2019	2019/12	2019/12-6	Prof. Dr. Bayram Yılmaz
'Arkuat Çekirdekte Bulunan AgRP Nöronlarının, Kainik Asit ile İndüklenmiş Epilepsi Üzerine Etkileri' isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür.				
Hayvan Türü / Irkı		Toplam Hayvan Sayısı		Hayvanın Cinsiyeti
Fare		65		Erkek veya Dişi

Görevi	Adı Soyadı	Katılım Durumu
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	Katılmadı
Başkan Vekili	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Üye	Veteriner Hekim Engin SÜMER	
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Üye	Prof. Dr. Rukset ATTAR	
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE	
Üye	Doç. Dr. Ediz DENİZ	
Üye	Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR	
Üye	Hakan GÖKSEL	Katılmadı
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER	Katılmadı

Kişisel Bilgiler

Adı	Muhsine Sinem	Soyadı	Ethemoğlu Sarı
------------	---------------	---------------	----------------

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Fizyoloji	Yeditepe Üniversitesi	2021
Yüksek Lisans	Fizyoloji	Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Yeditepe Üniversitesi	2013
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	2011
Lise	Sayısal	Çamlıca Kız Lisesi (Süper Lise)	2005

Bildiği Yabancı Dilleri	Yabancı Dil Sınav Notu (#)
İngilizce	85 (YÖKDİL)

Başarılmış birden fazla sınav varsa(YDS,YÖKDİL; TOEFL; EELTS vs), tüm sonuçlar yazılmalıdır

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Teknik Uzman	Yeditepe Üniversitesi	2013-

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
SPSS	Çok iyi
Graphpad Prism	Çok iyi
Noldus Ethovision	Çok iyi
LabChart	Çok iyi
NIS	Çok iyi
ZEN	Çok iyi
BioRAD	Çok iyi
BioPac	Çok iyi
PhysioEX	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

- Kilic E, Reitmeir R, Kilic Ü, Caglayan AB, Beker MC, Kelestemur T, Ethemoglu MS, Ozturk G, Hermann DM. “HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, PeriLesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia”. Front Cell Neurosci. 2014 Dec 11; 8:422.
- Eren Z, Günel MY, Bakir EA, Coban J, Çağlayan B, Ekimci N, Ethemoglu S, Albayrak O, Akdeniz T, Demirel GY, Kiliç E, Kantarci G. “Effects of paricalcitol and aliskiren combination therapy on experimental diabetic nephropathy model in rats”. Kidney Blood Press Res. 2014;39(6):581-90.

• Seker FB, Kilic U, Caglayan B, <u>Ethemoglu MS</u>, Caglayan AB, Ekimci N, Demirci S, Dogan A, Oztezcan S, Sahin F, Yilmaz B, Kilic E. “HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin improves abnormal brain electrical activity via mechanisms involving eNOS”. Neuroscience. 2015 Jan 22; 284:349-59.
• <u>Ethemoglu MS</u>, Seker FB, Akkaya H, Kilic E, Aslan I, Erdogan CS, Yilmaz B. “Anticonvulsant Activity of Resveratrol-loaded Liposomes in vivo”. Neuroscience. 2017 Aug 15; 357:12-19
• <u>Ethemoglu MS</u>, Kutlu S, Seker FB, Erdogan CS, Bingol CA, Yilmaz B. “Effects of agomelatine on electrocorticogram activity on penicillin-induced seizure model of rats”. Neurosci Lett. 2019 Jan 18; 690:120-125.
• Varicioglu GS, <u>Ethemoglu S</u>, Olcay AB, Yilmaz B, Ozilgen M. “Thermodynamic assessment of the use of alternative metabolic energy resources on work performance efficiency of spontaneous rat myometrium contractions”. Int J Exergy. 2019 Vol.30 No.1

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

• Post-Acute Delivery of HMG-Coenzyme a Reductase Inhibitor Rosuvastatin Induces Stroke Recovery by Promoting Perilesional Tissue Remodelling and Brain. Ulkan Kilic, A. Burak Caglayan, <u>Sinem Ethemoglu</u>, M. Caglar Beker, Nur Ekimci, Bayram Yilmaz, Ertugrul Kilic. (EMBO Young Scientist Forum, İstanbul, 2012, Poster).
• Post-acute delivery of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin promotes perilesional tissue remodelling and behavioural outcome after middle cerebral artery occlusion. Ertugrul Kilic, Ülkan Kilic, Raluca Reitmeier, Ahmet Burak Caglayan, <u>Muhsine Sinem Ethemoglu</u>, Dirk M. Hermann. (EMBO, Amsterdam, 2014, Poster).

Effects of resveratrol and resveratrol delivered in liposome carrier system on penicillin-induced brain epileptic activity in male rats. <u>M.S. Ethemoğlu</u>, İ. Arslan, F.B. Şeker, N. Ekimci, G. Duman, B. Yılmaz, E. Kılıç. (FEPS, Budapest, 2014, Poster).
Renoprotective Effects of Paricalcitol on Contrast-Induced Nephropathy in Rats. Zehra Eren, Yalçın Günel, Elif Arı Bakır, Jale Çoban, Burak Çağlayan, Çağlar Beken, <u>Sinem Ethemoğlu</u>, Tuba Akdeniz, Gülderen Yanıkkaya, Ertuğrul Kılıç, Gülçin Kantarcı. (World Congress of Nephrology, 2013)

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

The Roles of Neurohormone Kisspeptin in Neuronal Survival after Hyperhomocystenemia Induced Cellular Injury. H. Akkaya, E. Kılıç, S. Eyuboğlu, <u>S. Ethemoğlu</u>, B. Yılmaz (38th National Physiology Congress, Trabzon, 25-29 September 2012, Poster)
Acute Delivered Apelin-13 Effects on Penicillin Induced Brain Epileptic Activity. Gönül Gürol, F. Burcu Şeker, Ali Aslan, <u>M. Sinem Ethemoğlu</u>, Sibel Sarı, Bayram Yılmaz. (39th National Physiology Congress, Ankara, 10-14 September 2013, Poster).
Resveratrol ve Lipozom İçine Yüklendiği Resveratrolün Sıçanda Penisilinle İndüklenmiş Beyin Epileptik Aktivitesine Etkisi. <u>M.S. Ethemoğlu</u>, İ. Arslan, F.B. Şeker, N. Ekimci, G. Duman, B. Yılmaz, E. Kılıç (11th National Neuroscience Congress, İzmir, 28th April-1st May 2013, Oral Presentation).
Sıçanlarda kainik asitle oluşturulmuş epileptik nöbetlerde midkin ekspresyon. <u>Ethemoğlu MS</u>, Kaçar M, Şeker FB, Yazıhan N, Eyuboğlu S, Tuna BG, Yılmaz B. (13th National Neuroscience Congress, Konya, 30th April- 3rd May 2015, Poster).
Agomelatin'in Penisilinle İndüklenmiş Deneysel Epilepsi Modelinde Elektrokortikogram ve Kan Basıncı Üzerine Etkisi. <u>Ethemoğlu MS</u>, Şeker FB, Kutlu S, Yılmaz B. (42nd National Physiology Congress, Düzce, 5-8 September 2016. Oral Presentation).
Sıçan Karaciğer Dokularında mTOR Sinyal Yolu ile Oksidan ve Antioksidan Durumun Yaşa Bağlı Değişikliklerinin Araştırılması. Meltem Yalçın, Nuray Yazıhan, <u>Muhsine Sinem Ethemoğlu</u>, Cihan Süleyman Erdoğan, Mehtap Kaçar. (44th National Physiology Congress, Antalya, 1-4 November, 2018, Poster).

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifika ları/Ödü lleri)

EMBO Installation Grant (MSc Scholarship) (2011-2013)
Lisans Eğ itimini Onur Derecesi ile Bitirmek (2011)
Scholarship for Bachelor Degree (from ÖSYM) (2006-2011)
Erasmus De ğ işim Programı Bursu
Erasmus Staj Programı Bursu
International Student Grant from Cologne University
Devlet Parasız Yatılı Okul Bursu