



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**NÖROTROFİN RESEPTÖRLERİNDEN TRKB
VE P75'İN BEYİN KESİTLERİNDE
OLUŞTURULMUŞ EPİLEPSİ BENZERİ
OLAYLARA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dilanur KÖSE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. İsmail ABİDİN

TRABZON - 2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

17/06/2025
Dilanur KÖSE

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım derslerde derin bilgisi ile beni aydınlatan, her zaman yol gösteren, tez çalışmamın planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda yardımını esirgemeyen, çalışmamda hayvanların teminini sağlamamda yardımcı olan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail ABİDİN'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince gerek derslerde, yaptığımız çalışmalarda gerekse sosyal hayatımda yardımlarından fazlaca faydalandığım sayın Prof. Dr. Selcen ABİDİN ve Doç. Dr. Harun BAŞOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım derslerle bilgi birikimime büyük katkıları olan Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Figen CELEP EYÜBOĞLU, Doç. Dr. Tuba DİNÇER ve Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a,

Tez çalışmamın deney ve analiz aşamalarında yardımlarını ve deneyimlerini esirgemeyen kıymetli Arş. Gör. Dr. Hilal ÖZTÜRK'e,

Lisans hayatımdan tanıdığım, yüksek lisans dönemimin de büyük çoğunluğunu beraber geçirdiğimiz, deneylerimde mental olarak desteklerini esirgemeyen değerli bölüm arkadaşım Esra KABAK'a,

2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında yüksek lisans eğitimimi boyunca maddi destek aldığım TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na,

Hayatım boyunca bana destek olarak ayakta durmamı sağlayan, emeklerini eksik etmeyen, koşulsuz destek ve inançlarının bitmeyeceğini bildiğim, eğitime başladığım ilk günden beri hem manevi ve hem de maddi her koşulda yanımda olan canım annem, canım babam, canım kardeşlerim ve sevgili aile büyüklerime,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

Dilanur KÖSE

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin TYL-2023-10952 No'lu projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xi

ÖZET

xiv

ABSTRACT

xv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

4

2.1. Uyarılabilirlik ve Epilepsinin Nöronal Mekanizması

5

2.2. Antiepileptik İlaçlar

8

2.2.1. ANA-12

9

2.2.2. LM11A-31

9

2.3. Entorhinal Korteks ve Hipokampal Oluşum

10

2.3.1. Entorhinal Korteks ve Hipokampusun Anatomik Yapıları

11

2.3.2. Epileptik Olaylarda Entorhinal Korteks ve Hipokampusun Rolü

13

2.3.2.1. Rhinal Bölgelerin Rolü

13

2.3.2.2. Hipokampusun Rolü

14

2.3.2.3. Entorhinal Korteksin Rolü

14

2.4. Nörotrofinler

15

2.4.1. Beyin Türevli Nörotrofik Faktör ve Genel Özellikleri

16

2.4.1.1. Beyin Türevli Nörotrofik Faktörün Sentezi ve Salınımı

18

2.4.1.2. proBDNF ve olgun BDNF

19

2.4.2. Beyin Türevli Nörotrofik Faktör İzofomlarının Hücre İçi Sinyal Yolakları

20

2.4.2.1. Tropomiyozin Reseptör Kinaz B, Hücre İçi Yolakları ve Uyarılabilirlikle İlişkisi

22

2.4.2.2. p75 Nörotrofin Reseptörü, Hücre İçi Yolakları ve Uyarılabilirlikle İlişkisi

26

3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Gereç	32
3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	32
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	34
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları	34
3.2.2. Kullanılan Stok Solüsyonlar ve İlaç Moleküllerinin Hazırlanması	34
3.2.3. Taze Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	35
3.2.3.1. İlaçlı Solüsyonların Hazırlanması	36
3.2.4. Taze Beyin Kesitlerinin Alınması	36
3.2.5. Kesitlerden Hücre Dışı Alan Potansiyellerinin Kayıt Edilmesi	37
3.2.5.1. Bazal Kayıtların Alınması	38
3.2.5.2. Epilepsi Oluşturulmuş Kesitlerde Kayıtların Alınması	44
3.2.6. Elektrofizyolojik Kayıtların Analiz Edilmesi	49
3.2.7. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50
4.1. ANA-12'nin Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular	50
4.1.1. ANA-12'nin Hipokampustaki Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular	51
4.1.2. ANA-12'nin Entorhinal Korteksteki Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular	54
4.2. LM11A-31'in Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular	56
4.2.1. LM11A-31'in Hipokampustaki Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular	57
4.2.2. LM11A-31'in Entorhinal Korteksteki Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular	59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
6. KAYNAKLAR	67
EKLER	82
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	83
ÖZGEÇMİŞ	84

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemeler ile bunların üretici firmaları	32
Tablo 2.	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	33
Tablo 3.	Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ile üretici firmaları	34



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Nöronal uyarılabilirliği belirleyen iki faktör	7
Şekil 2.	ANA-12 molekülünün yapısı	9
Şekil 3.	LM11A-31 molekülünün yapısı	10
Şekil 4.	Entorhinal korteks ve hipokampus yapıları ve bunların birbirleriyle yaptıkları sinaptik bağlantılar	11
Şekil 5.	Nörotrofinler ve reseptörleri	16
Şekil 6.	Fare ve sıçan BDNF genlerinin yapıları ve alternatif transkriptleri	17
Şekil 7.	BDNF'nin protein yapısı	18
Şekil 8.	ProBDNF'nin mBDNF'ye dönüşümü ve görevli organeller	19
Şekil 9.	BDNF izoformlarının reseptörlerine bağlanmasıyla aktifleşen sinyal yolları	21
Şekil 10.	mBDNF/TrkB kompleksinin sinyal yolları	24
Şekil 11.	p75 reseptörünün hücre içi sinyal yolları	28
Şekil 12.	Fare beyninden horizontal düzlemde kesitlerin alınması ve oksijenlenmesi	36
Şekil 13.	Laboratuvarında kullanılan deney düzeneği	37
Şekil 14.	Kesite yerleştirilen elektrotların konumu	38
Şekil 15.	Kayıt haznesine giren ve hazneden çıkan yBOS'nın gösterilmesi	38
Şekil 16.	ANA-12'nin hipokampustaki epilepsi benzeri olaylara etkisini gösteren kayıtlar	51
Şekil 17.	ANA-12'nin hipokampustaki epilepsi benzeri olayların toplam gücüne ve güç spektrumuna etkisi	52
Şekil 18.	ANA-12'nin hipokampustaki epilepsi benzeri olayların frekansına, süresine ve genliğine etkisini gösteren çizgi grafikleri	53
Şekil 19.	ANA-12'nin entorhinal kortekste epilepsi benzeri olaylara etkisini gösteren kayıtlar	54
Şekil 20.	ANA-12'nin entorhinal kortekste epilepsi benzeri olayların toplam gücüne ve güç spektrumuna etkisi	55
Şekil 21.	ANA-12'nin entorhinal kortekste epilepsi benzeri olayların frekansına, süresine ve genliğine etkisini gösteren çizgi grafikleri	56
Şekil 22.	LM11A-31'in hipokampustaki epilepsi benzeri olaylara etkisini gösteren kayıtlar	57
Şekil 23.	LM11A-31'in hipokampustaki epilepsi benzeri olayların toplam gücüne ve güç spektrumuna etkisi	58

Şekil 24.	LM11A-31'in hipokampustaki epilepsi benzeri olayların frekansına, süresine ve genliğine etkisini gösteren çizgi grafikleri	58
Şekil 25.	LM11A-31'in entorhinal korteksteği epilepsi benzeri olaylara etkisini gösteren kayıtlar	59
Şekil 26.	LM11A-31'in entorhinal korteksteği epilepsi benzeri olayların toplam gücüne ve güç spektrumuna etkisi	60
Şekil 27.	LM11A-31'in entorhinal korteksteği epilepsi benzeri olayların frekansına, genliğine ve süresine etkisini gösteren çizgi grafikleri	60



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

4-AP	4- aminopiridin
7,8-DHF	7,8-dihidroksiflavon
Akt	Protein kinaz B
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izokszolpropiyonik asit
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
CC	Sistein kümesi
CCRD	Sisteince zengin bölge
CREB	Siklik AMP yanıt elementi bağlayıcı protein
DAG	Diaçilgliserol
DG	Dentat girus
DRE	İlaça dirençli epilepsi
EC	Entorhinal korteks
EEG	Elektroensefalografi
ERC	Entorhinal korteks
ERK	Ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinazlar
GABA	Gama aminobütirik asit
GIRK	G-protein kenetli içe doğrultucu potasyum kanalları
Grb2	Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
GTPaz	Guanozin trifosfataz
HS	Hipokampus sklerozu
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IP₃	İnozitol trifosfat
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KCC2	Potasyum-klorür kotaşıyıcısı 2
LEC	Lateral entorhinal korteks
LLR	Lösince zengin bölge
LNGFR	Düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü
LTD	Uzun süreli depresyon
LTP	Uzun süreli potansiyasyon
MAPK	Mitojenle aktive olan kinaz
MBDNF	Olgun beyin türevli nörotrofik faktör
MEC	Medial entorhinal korteks
MEK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MMP	Matriks metalloproteinaz

MSS	Merkezi sinir sistemi
MTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NGF	Sinir büyüme faktörü
NgR1	Nogo-66 reseptörü
NMDA	N-metil D-aspartat
NRAGE	Nörotrofin reseptörüyle etkileşimli MAGE homolog
NRIF	Nörotrofin reseptörüyle etkileşimli faktör
NT	Nörotrofin
NT-3	Nörotrofin 3
NT-4/5	Nörotrofin 4/5
NT-6	Nörotrofin 6
NT-7	Nörotrofin 7
p75NTR	p75 nörotrofin reseptörü
P85	PI-3 kinazın katalitik olmayan altbirimi)
PDS	Paroksizmal depolarizasyon şifftleri
PI3K	Fosfatidil inozitol-3-kinaz
PIP2	Fosfatidilinozitol 4,5- bifosfat
PKC	Protein kinaz C
PLC-γ	Fosfolipaz C-γ
PPC	Proprotein konvertaz
PRC	Perirhinal korteks
ProBDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör öncülü
RAC1	RAC ailesi küçük guanozintrifosfataz 1
RhoA	Ras homolog gen ailesi üyesi A
RhoA-GDI	Rho guanin nükleotidi ayrıştırma inhibitörü
RIP2	Serin/ treonin – protein kinaz 2
ROCK	Rho ilişkili protein kinaz
S1P	Sfingozin-1-fosfat
Shc	SH2- içeren dizi
TARP	AMPA reseptör düzenleyici protein
TLE	Temporal lob epilepsisi
TRAF6	Tümör nekroz faktörü reseptörüyle ilişkili faktör 6
Trk	Tropomiyozin reseptör kinaz
TrkA	Tropomiyozin reseptör kinaz A
TrkB	Tropomiyozin reseptör kinaz B

TrkC	Tropomiyozin reseptör kinaz C
Tyr-515	Anti trkb antikoru
YBOS	Yapay beyin omurilik sıvısı

Simgeler

α	Alfa
γ	Gama
κ	Kappa
μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde

Formüller

$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	ANA-12 molekülünün formülü
CaCl_2	Kalsiyum klorür
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$	LM11A-31 molekülünün formülü
MgCl_2	Magnezyum klorür
KCl	Potasyum klorür
NaHCO_3	Sodyum bikarbonat
NaH_2PO_4	Sodyum dihidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür

ÖZET

Nörotrofin Reseptörlerinden TrkB ve p75'in, Beyin Kesitlerinde Oluşturulmuş Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisinin İncelenmesi

Nörotrofik faktörler; beyin gelişimi, fonksiyonlarının düzenlenmesi, sinir hücrelerinin dallanmalarının kontrol edilmesi gibi süreçlerde rol oynayan haberci/modülatör proteinlerdir ve beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) bu nörotrofik faktörlerden biridir. Merkezi sinir sistemi (MSS)'nde, tropomiyozin reseptör kinaz B (TrkB) ve p75 nörotrofin reseptörü (p75NTR), BDNF'nin reseptörlerindendir. TrkB reseptörü, BDNF'nin olgun formuna afinite gösterirken; p75NTR, BDNF'nin hem olgun hem de pro formuna affinite gösterir. Bu reseptörler genel olarak sinir hücrelerinin gelişimi, sağ kalımı, farklılaşması ve plastisite gibi olaylarda görev almaktadır. Fakat p75NTR'nin farklı ligandlarının olması onu hücre ölümünde de görevli hale getirmiştir. Nöronal uyarılabilirlik bir nöronun ateşleme eşiğine ulaşma eğilimini ifade etmektedir. Epilepside uyarılabilirlik artar, bu da nöronların normalden daha kolay ve kontrolsüz bir şekilde elektriksel aktivite üretmesine neden olur. Bu çalışmada TrkB yolağını antagonize eden ANA-12 ve p75 yolağını durduran LM11A-31 moleküllerinin akut etkilerinin, epilepsi ile ilişkili sinirsel aktiviteler üzerindeki etkilerinin incelenmesi, amaçlanmıştır.

İn vitro epilepsi modelinde, C57BL/6 tipi yabani fareler kullanılarak, hipokampus ve entorhinal korteks bölgelerini içeren horizontal taze beyin kesitleri elde edildi. Hipokampus (CA1) ve entorhinal korteks bölgelerinden eş zamanlı kayıtlar alındı. 4-AP (100 μ M) uygulamasıyla kesitlerde epilepsi benzeri olaylar oluşturuldu. ANA-12 (10 μ M) ve LM11A-31 (100 nM) moleküllerinin normal sinirsel aktivite ve epilepsi benzeri olayları nasıl etkilediği, ayrı ayrı, elektrofizyolojik veriler yardımıyla değerlendirildi. Elde edilen verilerden güç spektrum analizleri, epileptik aktivitelerin frekansları, süreleri ve genlikleri hesaplandı. Maddelerin kesitlere uygulanmadan önceki ve sonraki değerleri karşılaştırıldı. 0,1-50 Hz bant aralığında, moleküller hipokampus ve entorhinal kortekste epilepsi benzeri olayların güçlerini (mV^2/Hz) değiştirmedi. Epilepsi benzeri olayların frekansları ve süreleri, ANA-12 uygulaması sonrası her iki beyin bölgesinde de azaldı. LM11A-31 uygulamasının epilepsi benzeri olayların frekansları, süreleri ve genliklerine etkisi görülmedi.

Anahtar Kelimeler: BDNF, Epilepsi, p75 reseptörü, Taze beyin kesiti, TrkB reseptörü, Uyarılabilirlik

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Neurotrophin Receptors TrkB and p75 on Epilepsy-Like Events Induced in Brain Slices

Neurotrophic factors are messenger/modulator proteins that play a role in processes such as brain development, regulation of functions, control of nerve cell branching and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is one of these neurotrophic factors. In the central nervous system (CNS), tropomyosin receptor kinase B (TrkB) and p75 neurotrophin receptor (p75NTR) are receptors of BDNF. While the TrkB receptor shows affinity for the mature form of BDNF, p75NTR shows affinity for both the mature and pro forms of BDNF. These receptors generally play a role in events such as nerve cell development, survival, differentiation and plasticity of nerve cells. However, the fact that p75NTR has different ligands has made it also responsible for cell death. Neuronal excitability refers to the tendency of a neuron to reach its firing threshold. Excitability increases in epilepsy, causing neurons to produce electrical activity more easily and uncontrollably than normal. The aim of this study was to investigate the acute effects of ANA-12, which antagonizes the TrkB pathway, and LM11A-31, which stops the p75 pathway, on neural activities associated with epilepsy.

In the in vitro epilepsy model, horizontal fresh brain slices containing the hippocampus and entorhinal cortex regions were obtained using C57BL/6 wild type mice. Simultaneous recordings were made from the hippocampus (CA1) and entorhinal cortex regions. Epilepsy-like events were induced in the slices with application of 4-AP (100 μ M). How ANA-12 (10 μ M) and LM11A-31 (100 nM) molecules affected normal neural activity and epilepsy-like events was evaluated separately with the help of electrophysiological data. Power spectrum analyses, frequencies, durations and amplitudes of epileptic activities were calculated from the obtained data. The values of the substances before and after application to the sections were compared. In the 0.1-50 Hz bandwidth, the molecules didn't change strengths (mV^2/Hz) of epileptic-like events in the hippocampus and entorhinal cortex. The frequencies and durations of epileptic-like events decreased in both brain regions after ANA-12 application. LM11A-31 application didn't affect frequencies, durations and amplitudes of epileptic-like events.

Keywords: BDNF, Epilepsy, Fresh brain section, p75 receptor, TrkB receptor, Excitability

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi, bilinç ve motor kontrol üzerinde etkili, dünya çapında sık görülen nörolojik bozukluklardan önemli bir tanesidir. Beyinde normal şartlarda elektriksel aktiviteler belirli bir düzende gerçekleşirler. Fakat epilepsi varlığında bu düzen bozulur ve ani, kontrolsüz elektriksel patlamalar meydana gelmektedir. Bu patlamalar sonucunda kişide çeşitli nöbet türlerinin meydana gelmesi epilepsinin belirtilerindendir. Epilepsi bu nöbetlerin tekrarlanması ve nöbetlerin kişinin hayatını etkilemesiyle de tanımlanmaktadır. Meydana gelen nöbetler hastanın hayatını önemli ölçüde kısıtlar. Epileptik nöbetlerin şiddeti, süresi ve belirtileri kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Örneğin bazı epileptik nöbetler sadece kısa süreli bilinç kaybı veya kaslarda titreme şeklinde olabilirken bazıları daha ağır ve daha geniş yayımlı nöbetlere yol açmaktadır.

Sinir sisteminde hücre düzeyinde meydana gelen depolarizasyonla beraber uyarılabilirliğin artması bu nöbetlerle bağlantılıdır. İlaç tedavileri, epilepsi nöbetlerinin kontrol altına alınmasında yaygındır ve birçok yeni ilaç türü üretilmeye devam etmektedir. Buna rağmen epileptik hastaların bir kısmı bu yeni ilaçlara dirençlidir ve bu yüzden tedavileri kısıtlanır. Daha az yan etki ve daha iyi tedavi potansiyeli olan ilaçların geliştirilmesi için de çalışmalar devam etmektedir (1).

Bir sinir hücresinin veya sinir devresinin bir uyarıya verdiği yanıtın şiddeti uyarılabilirlik olarak bilinir. Nöronal uyarılabilirlik, nöronun cevap olarak oluşturduğu aksiyon potansiyeli yeteneğidir. Nöral uyarılabilirlik ise bir sinir devresini oluşturan sistemin oluşturduğu toplam cevabın şiddetidir. İnhibisyonun azalması veya artması, eksitasyonun artması veya azalması, hücre dışı koşulların dinlenme potansiyellerinin değişmesi nöral uyarılabilirliği değiştirir. Sinir devrelerindeki senkronize haldeki boşalmalar ve epilepsi benzeri aktiviteler, uyarılabilirliğin artması sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Hipokampus ve entorhinal korteks (EC), insan beyinde hafıza ve yön bulma gibi olaylarda önemli rol üstlenen yapılardır. Bu yapılar epilepsiye yol açan patolojik süreçler açısından da kilit rol üstlenirler. Entorhinal korteks, neokorteks ve hipokampus arasında kapı görevi görür ve burada oluşan anormal elektriksel aktiviteler hipokampusu da etkileyerek nöbetlerin yayılmasına neden olmaktadır. Klinik çalışmalar, entorhinal korteks-hipokampus etkileşiminin yalnızca epileptik nöbetlerin kaynağının olmadığını, bu nöbetlerin öğrenme ve hafıza süreçlerini de bozabileceğini göstermektedir.

Merkezi sinir sistemi (MSS)'nde yaygın olarak ifade edilen nörotrofik faktör olan Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF), nöronlarda başkalaşma, aksonal dallanma, sinaptik olgunlaşma ve plastisite gibi olayları kontrol etmekle görevlidir. Nöronlarda BDNF, proBDNF peptidi şeklinde sentezlenir, hücre dışına salınır ve olgun BDNF (mBDNF)'e dönüştürülür (2). Olgun BDNF ekstrasellüler ortamda Tropomiyozin İlişkili Kinaz B (TrkB) reseptörüne bağlanır ve etkilerini oluştururken BDNF öncülü proBDNF, p75NTR (p75 nörotrofin reseptörü) 'e bağlı olarak etkilerini oluşturur (3).

BDNF'nin uyarılabilirliğe etkisinin TrkB ve p75NTR ile ilişkilendirilmesi çeşitli araştırmalara konu olmuştur. TrkB ve p75NTR genellikle uzun süreli hücresel olayları düzenler. Hem TrkB ve p75NTR hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu kontrol ederek nöronlarda etkiye sebep olurlar (4). Bu etkilere bağlı olarak TrkB ve p75NTR, sinir devrelerinde akut uyarılabilirliği değiştirme potansiyeline sahiptirler. Bu reseptörlerin antagonistlerinin kullanılarak uyarılabilirliğe nasıl etki ettiğinin anlaşılması epilepsi hastalığı için yeni ilaç keşiflerinin ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

TrkB reseptörü, BDNF'nin fizyolojik reseptörü olarak hizmet eder ve önemli hücre içi biyokimyasal yolları başlatır. Akut TrkB aktivasyonu, N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptörü aracılı akımları (5) ve presinaptik glutamat salınımını artırır (6). Bununla beraber BDNF/TrkB yolağı ile epilepsi arasında bir ilişki olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur. Genel olarak, TrkB yolağının fonksiyonunun bozulmasının epilepsiyi baskıladığına ilişkin literatürde çok sayıda veri bulunmaktadır. Bununla beraber, yapılan çalışmalarda çeşitli deneysel modeller kullanılmış ve kesin sonuca varılamamıştır. KTÜ Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarında, bir TrkB reseptörü agonisti olan 7,8-dihidroksiflavon (7,8-DHF)'un taze beyin kesitlerinde epileptik olayları arttırdığı kanıtlanmıştır (7). Benzer bir deneysel yöntemi kullanarak TrkB yolağının antagonisti tarafından durdurulmasının etkisi tam olarak bilinmemektedir.

ProBDNF ile etkileşen p75NTR aktivasyonu, Trk reseptörlerinin etkilerini arttırmaktadır (8). Önceki çalışmalarda araştırmacılar, $p75^{NTR}$ aktivasyonunun uyarılabilirlik ve epilepsi ile ilişkisini incelemiştir. Taze beyin kesitlerinin kullanıldığı bir çalışmada, tabaka beş entorhinal korteks nöronlarının aksiyon potansiyeli ateşleme frekansı ve süresi proBDNF ile artmıştır ancak p75NTR eksprese etmeyen transjenik farelerde bu artış görülmemiştir (9). Literatürdeki mevcut verilerle, p75NTR ile epilepsi ve uyarılabilirlik arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamaktadır.

TrkB ve p75NTR yolaklarının epilepsi nöbetlerini hem başlatma hem de durdurma yetenekleri olduğu farklı çalışmalar sonucunda gösterilmiştir fakat bu çalışmaların çoğu kronik etkilerle ilgilidir. Yapılan çalışmayla bu yolakların akut olarak engellenmesinin beyin kesitlerinde meydana gelen epilepsi benzeri olayları nasıl etkilediği incelenmiştir. Bu yolakların incelenmesi için biri TrkB reseptörünün antagonisti, diğeri de p75NTR antagonisti olan iki molekül kullanılmıştır. Bu moleküller sırasıyla ANA-12 ve LM11A-31'dir. Çalışmada bu moleküllerin antiepileptik potansiyelleri gösterilmiş ve epilepsi benzeri olaylara nasıl etkileri olduğu aynı modelde incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında; in vitro epilepsi modelinde C57BL/6 tipi yabani fareler kullanılmıştır ve hem hipokampusun CA1 bölgesinden hem de medial entorhinal korteks bölgesinden alınan ekstrasellüler kayıtlarla birlikte TrkB yolağı antagonisti ANA-12 (10 μ M)'nin ve p75 yolağı antagonisti LM11A-31 (100 nM)'in akut uygulamasının hem bazal uyarılabilirliği hem de epilepsi ile ilişkili aktiviteleri dakikalar içinde nasıl etkilediklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Epilepsi, beyindeki anormal elektriksel aktivitenin neden olduğu yaygın bir nörolojik bozukluktur. Epilepsi kronik bir bozukluktur ve tekrarlayan nöbetlerle karakterizedir. Nöbet ise bir kortikal nöron popülasyonunun anormal, aşırı hipersenkron aktivitelerinin klinik belirtisidir.

Epilepsi günlük faaliyetleri, sosyal ilişkileri ve hatta çalışma şansını sınırladığından yaşam kalitesini de önemli ölçüde azaltır (10, 11). Dünyada epilepsi görülmesi sıklığı %0,5 ve %1 arasında değişim göstermektedir. Yani her 1000 kişiden 5 veya 10'u epilepsi hastasıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünyada yaklaşık 50 milyon kişi epilepsi hastasıdır fakat her yıl bu sayı artış göstermektedir. Ülkelerin gelişmişlik oranları da epilepsi hastalığının insidansını etkileyen faktörlerdendir. Gelişmiş ülkelerde yıllık insidans 100 bin kişide yaklaşık 30-50 vaka iken, gelişmekte olan ülkelere bu oran 100 binde 100'e çıkmaktadır. Türkiye'de epilepsi görülme sıklığı ise %0,6-%1,1 arasında değişmektedir. Yani her 1000 kişiden 6 ila 10 tanesi epilepsi hastasıdır.

Epilepsi çocukluk ve yaşlılık dönemlerinde daha sık görülmektedir. Çocukluk dönemlerindeki epilepsinin oluşmasını genetik faktörler ve doğumsal problemler etkilemektedir. Yaşlılıkta dönemde ise meydana gelen beyin hasarları, damar hastalıkları ve inme gibi problemler epilepsiyi tetiklemektedir.

Epilepsi hastaları, nöbetler kontrol altına alınmadığında ciddi fiziksel ve psikolojik zorluklarla karşılaşır. Bu zorlukların arasında farkındalık kaybı, hareket anormallikleri, duylarda (görme, işitme ve tat alma) kayıplar, ruh hali veya bilişsel kapasitelerde bozulmalar ve hatta ölüm tehlikesi yer almaktadır. Tek başına bir nöbet geçirdikten sonra epilepsinin tekrarlama olasılığı genel olarak %27-71 arasında değişmektedir. Doğru tedavi ve yönetimle epilepsi hastaları normal hayatlarına devam ettirebilmektedirler. Çoğu zaman tedavi antiepileptik ilaçlarla yapılır fakat bazı durumlarda cerrahi müdahaleler de kullanılmaktadır. İlaç tedavileri kimi zaman etki göstermezken kimi zaman da bireysel olarak farklı etki göstermektedir. Epilepsi oluşumunun kompleks sebepleri ve kişilerin epigenetik yapıları ilaç tedavilerinde kısıtlayıcı etki gösterir. Bu yüzden devamlı olarak epilepsi üzerine yeni çalışmalar ve yeni ilaç keşifleri yapılmaktadır.

2.1. Uyarılabilirlik ve Epilepsinin Nöronal Mekanizması

Memeli hücreleri temel olarak uyarılabilir ve uyarılabilir olmayan hücreler olarak iki grupta incelenebilir. Uyarılabilir hücreler, aldıkları uyarılarla membran potansiyellerinde değişim gösteren ve aksiyon potansiyeli üretip aldıkları uyarıyı iletebilen (nöronlar) veya bir uyarıya cevap veren (kas hücreleri, salgı yapan hücreler) hücrelerdir (12).

Uyarılabilirlik bir nöron için eksitatör nöronlar, inhibitör nöronlar ve nöronal olmayan destekleyici görevleri olan glia ve astrositlerden oluşan bir sinir devresi/ sinir ağı dokusunda ifade edilir.

Nöronlar, normal şartlarda dinlenim potansiyeli adı verilen bir zar potansiyeli varlığında bulunmaktadır. Hücre zarındaki iyon kanallarının düzenlenmesi sayesinde bu potansiyel korunur. Dışarıdan gelen bir uyarı veya başka bir nörondan gelen kimyasal nöronun zar potansiyelinde değişime sebep olur. Bu değişiklik, eşik değerinin aşılmasına sebep olursa nöronun aksiyon potansiyeli oluşturmaya sağlar. Bu olay nöronal uyarılabilirlik olarak bilinir. Nöronal uyarılabilirlik, hücre düzeyindeki uyarılabilirliktir ve en temel tanımı ile bir nöronun cevap olarak oluşturduğu aksiyon potansiyeli sayısıdır. Uyarılabilirlik düzeyi artmış yani hiper uyarılabilir haldeki bir nöron, normal bir nörona kıyasla, aynı uyarıya daha fazla sayıda aksiyon potansiyeli ateşleyerek cevap verir.

Nöral uyarılabilirlik ise, birbirleri ile bağlantı durumunda olan ve bir sinir devresi veya sinir ağını oluşturan sistemin oluşturduğu cevabın şiddetlenmesi ile karakterizedir. Genel olarak inhibisyonun azalması, eksitasyonun artması, hücre dışı koşulların dinlenim potansiyellerini depolarize olacak şekilde değiştirmeleri nöral uyarılabilirliği artırır (13).

Epilepsi, MSS'deki nöronların anormal şekilde ateşlenmesiyle karakterize edilen kronik bir nörolojik bozukluktur. Birçok moleküler ve hücrel mekanizma bu hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır.

Epileptik nöbetlerle karakterize edilen epilepsi, kortekste veya korteksin gri maddesinde başlar. Epileptik nöbetler, kortikal nöron ağındaki uyarı ve inhibisyon arasındaki ani dengesizlikten kaynaklanır. Nöronlar yüksek, koordineli ve sürekli nöronal uyarılabilirlik aktivitesi gösterdiğinde nöbetler başlar. Bu şekilde nöbetlerin tetiklenmesi 'epileptogenez' olarak adlandırılır.

Epileptogenez sürecinde uyarıcı (eksitator) ve baskılayıcı (inhibitör) nörotransmitterler arasındaki denge bozulur. En önemli eksitator nörotransmitter glutamat, en önemli inhibitör nörotransmitter ise γ -aminobütirik asit (GABA)'dır. Postsinaptik nöron türüne göre GABAerjik ya da glutamaterjik nöronla sinaps yapar. Bu sayede inhibisyon ya da eksitasyon sağlanır.

Nöronlarda hücre içindeki sodyum (Na^+), potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{+2}) ve klor (Cl^-) dengesini çeşitli iyon kanalları sağlar. Potasyum-klorür kotasıyıcısı 2 (KCC2) bunlardan bir tanesidir. KCC2 yetişkin nöronlarda yaygın olarak ifade edilmektedir. GABA reseptörünün işlevi KCC2 tarafından da yönetilir. Olgun beyinde KCC2, GABA'nın inhibitör verimliliğini belirlemek için hücre içi ve dışı klor (Cl^-) dengesini korumak için görevlidir (14). Bu dengelerin bozulması sonucunda da epileptik nöbetler ortaya çıkar. İyon dengesini sağlayan, protein yapıdaki transmembran kanalları ve taşıyıcılar beyinde yaygın olarak dağılmıştır. Bu kanal ve taşıyıcılardaki genetik mutasyonlar da nöronların aşırı uyarılması sonucunda beraberinde epileptik nöbetleri ortaya çıkartır.

Sinaptik plastisitede görevli bazı proteinlerdeki mutasyonlar da epilepsi ile ilişkilendirilmiştir. α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izokszolpropiyonik asit (AMPA) reseptörü glutamatın reseptörlerinden bir tanesidir. Transmembran AMPA reseptör düzenleyici proteinler olarak bilinen TARP'lar, AMPA reseptörleriyle ilişki kurarlar ve bu reseptörlerin aktivitelerini düzenlerler. Stargazin proteini bu proteinlerden bir tanesidir ve hem presinaptik hem de postsinaptikte AMPA reseptörlerine bağlandığı bulunmuştur. Stargazin proteinini kodlayan genlerde oluşan bir mutasyon epilepsi oluşumuna sebep olmaktadır (15, 16).

Epilepsi beyin hasarı sonrasında oluşmuş aşırı aktivite sonucunda da meydana gelebilir. Bu meydana gelme fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K)/insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)/rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) yolağındaki bir dizi mutasyon veya bozulma sonucunda meydana gelebilmektedir (17, 18). MTOR sinyal yolağı IGF gibi büyüme faktörleri tarafından aktifleştirilen önemli bir hücresel yoldur. Bu yolun aktifleşmesi plastisite için gereklidir, bu nedenle de mTOR'un aşırı aktivasyonu gereksiz nöronal bağlantıya ve epilepsiye yol açar (19, 20).

Epilepsinin birbirinden oldukça farklı nedenleri vardır. Ancak etiyojinin yaklaşık %50'si belirsizliğini korumaktadır. Sebepleri arasında yapısal farklılıklar, genetik, bulaşıcı

hastalıklar, metabolik faaliyetlerin sonuçları, bağışıklık sistemi ile ilgili rahatsızlıklar gösterilebilir ve çeşitli bilinmeyen sebeplerle beraber altı kategoriye ayrılır. Örneğin, oksijen eksikliğinden kaynaklanan doğum öncesi yaralanma, epilepsinin nedeni olan beyin hasarına yol açabilmektedir. Ayrıca ciddi kafa travması veya felç de epilepsinin nedeni olabilmektedir. Bazı genetik sendromlar veya beyindeki gelişimsel malformasyonlarla ilgili genetik koşullar hastalık riskini arttırmaktadır. Bununla birlikte, çoğunlukla neden bilinmemektedir ve hastada epilepsinin kökenine ilişkin net göstergeler bulunmamaktadır (21). Nöbetin fenotipine göre de sınıflandırma yapılmaktadır: fokal epilepsiler, yaygın epilepsiler ve bu iki türün kombinasyonu olan epilepsiler şeklinde sınıflandırmalar klinikte kullanılmaktadır.



Şekil 1. Nöronal uyarılabilirliği belirleyen iki faktör

Birbirinden farklı sebepleri olsa da epileptik nöbetler ile sonuçlanan olayların hücresel mekanizmaları benzerdir (Şekil 1). Nöronal uyarılabilirlik presinaptik salınımlar sonrası oluşan eksitasyon ve inhibisyonlarla dengelenir. İki temel hücresel neden ise epileptik boşalmalara yol açar.

İlk hücresel neden sinaptik geçişlerdeki eksitasyon/inhibisyon dengesinin bozulmasıdır. Bir nörondan salınan eksitator (uyarıcı) ve inhibitör (engelleyici) nörotransmitterler belirli bir uyarılabilirlik düzeyini devam ettirirler. Eksitasyon/inhibisyon dengesi, deneysel olarak ölçümlenebilir (22). Epileptik durumlarda bu denge eksitasyon yönünde bozulur. Şekil 1’de nöron gövdesine dökülen eksitator nörotransmitter glutamat ve inhibitör nörotransmitter γ -aminobütirik asit (GABA) gösterilmiştir. GABA, beyindeki

birincil inhibitör nörotransmitterdir ve GABA'nın reseptörüne bağlanması sonucu Cl^- ve bikarbonat (HCO_3^-) giriş-çıkışı düzenlenerek sırasıyla GABAerjik inhibisyon ve uyarılmaya yol açar. Nöronlara spesifik olan KCC2, düşük hücre içi Cl^- konsantrasyonunu korumak ve GABA aracılı inhibisyonu sağlamak için gereklidir. Mutasyon veya ekspresyonundaki değişiklikler sonucu bozulmuş olan KCC2 işlevi, GABAerjik uyarılmaya yol açar bu da sinaptik inhibisyonun bozulmasına sebep olur (23).

İkinci hücrel neden ise postsinaptik nöronun uyarılabilirliğinin artmasıdır. Genel olarak uyarılara verilen nöronal yanıt veya presinaptik nöronlardan gelen nörotransmitterlerin oluşturdukları postsinaptik potansiyellerin şiddeti nöronal uyarılabilirlik olarak tanımlanır. Postsinaptik nörona gelen uyarılara verilen aşırı tepki sonucu uyarılabilirliğin kontrolsüzce artması epilepsinin oluşmasına etki etmektedir. Dinlenme potansiyelindeki depolarizasyon yönündeki kaymalar, iyon kanallarının türü ve sayısı, voltaj kapılı kanalların sayısı gibi hemen bütün faktörler postsinaptik nöronun uyarıya vereceği aksiyon potansiyeli frekansını etkileyecektir (24, 25).

2.2. Antiepileptik İlaçlar

Epilepsinin en yaygın ve öncelikli tedavisi ilaç kullanımıdır. Epilepsi tedavisinde kullanılan bu ilaçlar anti-epileptik ilaçlar olarak adlandırılırlar. Bu ilaçlar şekil 1'de özetlenen ve yukarıda bahsedilen mekanizmaların bir ya da birkaçını hedefleyerek epileptik nöbetleri baskırlar veya şiddetini azaltırlar. Antiepileptik ilaçlar, inhibisyonu eksitasyon karşısında daha baskın hale getirerek epileptik nöbeti durdurmayı veya yayılmasını engellemeyi hedefler. Antiepileptik ilaçları mekanizmalarına göre dört sınıfta inceleyebiliriz (26, 27):

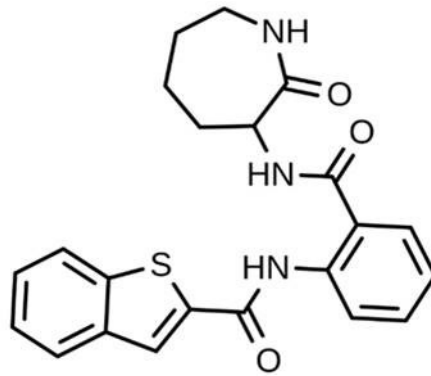
1. Voltaj kapılı sodyum kanallarının modülasyonu ile aksiyon potansiyellerinin azaltılması (örneğin; fenitoin, karbamazepin, lamotrijin, topiramet, zonisamid, lakozamid), voltaj kapılı kalsiyum kanallarının (örneğin; etosüksimit) ve voltaj kapılı potasyum kanallarının (örneğin; retigabin, ezogabin) modülasyonu;
2. GABA aracılı inhibitör nörotransmisyonun artırılması (örneğin; benzodiazepinler, barbitüratlar, tiagabin, vigabatrin);
3. Glutamat aracılı uyarıcı nörotransmisyonun zayıflaması (örneğin: perampanel, lamotrijin, felbamat);

4. Presinaptik bir etki yoluyla nörotransmitter salınımının modülasyonu (örneğin; levetirasetam, brivaracetam, gabapentin, pregabalin).

Epileptik nöbetlerin semptomatik tedavisi için 20'den fazla antiepileptik ilaç bulunmasına rağmen epilepsili hastaların yaklaşık üçte biri farmakoterapiye dirençli nöbetlere sahiptir. Bu tür ilaca dirençli epilepsi (DRE) hastalarında erken ölüm, yaralanma psikososyal işlev bozukluğu ve yaşam kalitesinin düşmesi riskleri artmıştır. Bu nedenle daha etkili tedavilerin geliştirilmesi acil bir klinik ihtiyaçtır. Bu alanda yeni biyolojik hedeflerin ve antiepileptik ilaç adaylarının etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar devam etmektedir (27).

2.2.1. ANA-12

ANA-12, kimyasal olarak N-[2-[(2-oxoazepan-3-il)karbamoyl]fenil]-1-benzotiyofen-2-karboksamid olarak adlandırılan, moleküler formülü $C_{22}H_{21}N_3O_3S$ olan, 407,49 g/mol ağırlığına sahip seçici bir TrkB antagonisti olarak tanımlanan ve molekül yapısı şekil 2'de gösterildiği şekilde olan moleküldür. ANA-12, TrkB reseptörüne iki farklı bağlanma bölgesi üzerinden non-kompetif olarak bağlanmaktadır. İlki yaklaşık 10nM bölüşüm katsayısına sahip yüksek affiniteli bölge, ikincisi yaklaşık 12 μ M bölüşüm katsayısına sahip düşük afiniteli bir bölgedir. Bu bağlanma, BDNF'nin TrkB üzerindeki aktivasyonunu engelleyerek spesifik bir inhibisyon sağlar.

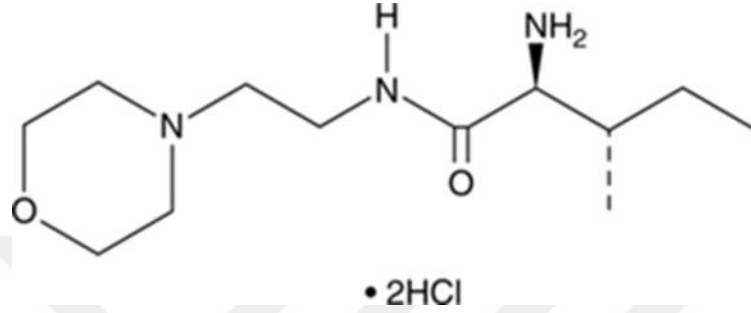


Şekil 2. ANA-12 molekülünün yapısı

2.2.2. LM11A-31

LM11A-31, kimyasal olarak (2S,3S)-2-amino-3metil-N-(2-morfolin-4-iletıl)pentanamid dihidroklorür olarak adlandırılan, moleküler formülü $C_{12}H_{25}N_3O_3$ olan,

316,3 g/mol ağırlığında non-peptid yapıda p75 reseptör antagonisti olarak tanımlanan ve molekül yapısı şekil 3'te gösterildiği şekilde olan moleküldür. LM11A-31, p75NTR'ye bağlanır ve pronörotrofinlerin p75NTR'ye bağlanarak neden olduğu hücre ölümünü engelleyerek nöronal hayatta kalmayı destekler. LM11A-31 oral yolla alındığında da kan-beyin bariyerini geçebilmektedir.



Şekil 3. LM11A-31 molekülünün yapısı

2.3. Entorhinal Korteks ve Hipokampal Oluşum

İnsan beyinde öğrenme, hafıza ve yön bulma gibi birçok temel bilişsel görevi yöneten iki önemli yapı entorhinal korteks (EC) ve hipokampal oluşumdur. Entorhinal korteksin ve hipokampusun arasındaki çift yönlü iletişimin hafıza sistemleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu yapılar hafıza sistemleri üzerinde etki gösterirken hem bilgiyi organize ederler hem de yönlendirirler (28, 29).

Entorhinal korteks, medial temporal lobda yer alır ve hipokampusa perforan yol ile doğrudan bilgi aktaran bir alan olarak bilinir. Yapı olarak neokorteks ve hipokampus arasında bir köprü görevi görmektedir. Lateral (LEC) ve medial (MEC) olmak üzere iki ana bölümden oluşur. Bu bölümlerde kendi arasında I, II, III, IV, V ve VI olmak üzere 6 farklı katmana ayrılır. LEC nesnel hafıza gibi bilgileri işlerken MEC mekansal yön bulma işlevlerinde önemli göreve sahiptir.

Hipokampus denizati şeklinde kıvrımlı bir yapıdadır. Entorhinal korteks üzerinden gelen bilgileri işler. Dentat girus (DG), CA1, CA2 ve CA3 yapılarından oluşur. Dentat girus entorhinal korteksten girdi alır ve bu girdiyi hipokampusun alt alanlarına iletir. Benzer anıların birbirinden ayrıştırılmasında görevlidir. CA1, CA2 ve CA3 alanları hipokampusta trisinaptik devrenin oluşumunu sağlayan yapılardır. CA1, hipokampal devredeki ilk bölgedir ve hem subikuluma hem de entorhinal korteksin V. katmanına

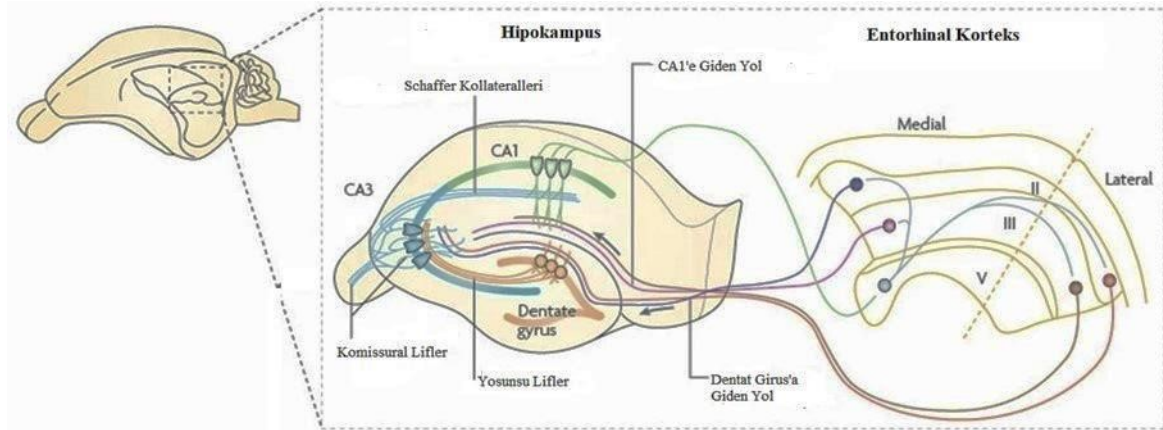
projeksiyon yapar (30). CA2, CA1 ve CA3 arasındaki küçük bir bölgedir ve entorhinal korteksin II. katmanından perforan yol ile girdi alır. CA3 bölgesi ise dentat girustaki granül hücrelerinden ve perforan yol ile entorhinal korteksten girdi alır.

Tüm bu bölgeler alınan bilgileri işleyerek uzun süreli hafızanın oluşturulması, yeni bilgiler öğrenilmesi ve yeniden hatırlanılmasında önemli bir role sahiptir.

2.3.1. Entorhinal Korteks ve Hipokampusun Anatomik Yapıları

Epilepsi oluşumunun ve epileptik aktivitenin yayılmasının anlaşılabilmesi için sinir ağı ve sinir devrelerinin yapılarının ve davranışlarının öncelikle anlaşılması gereklidir. Memelilerin limbik ve neokortikal beyin bölgelerinin birbirine bağlanma özellikleri (connectivity) ve epileptik aktivite ile ilişkili hipersenkron ve hipereksitabilitenin açıklanabilmesi için önemlidir.

Memelilerde duyu bilgilerinin işlendiği kortikal bölgeler ve limbik sistem arasındaki bağlantılar pek çok fizyolojik olayda önemli roller oynar. Fare ve sıçanlarda en önemli duyu kokudur ve kokunun işlendiği yolak aynı zamanda epileptik olayların da başladığı ve yayıldığı yolaklar olarak tanımlıdır. Bu yolak sırasıyla olfaktör korteks, piriform korteks, lateral ve medial entorhinal korteks ve hipokampustur (Şekil 4).



Şekil 4. Hipokampus ve entorhinal korteks yapıları ile bunların birbirleriyle yaptığı sinaptik bağlantılar (Guilherme'den, 31)

Şekil 4'te entorhinal korteks tabakaları ve hipokampusun CA1, CA3 ve DG bölgelerinin bağlantıları görülmektedir (31). Hipokampus içerdiği yapılarla trisinaptik devrenin oluşmasında etkilidir. Kortekse gelen ana bilgi, entorhinal korteksin II.

katmanındaki nöronlardan DG'ya perforan yol aksonları tarafından iletilir. Perforan yol aksonları, granül hücrelerinin dendritleriyle uyarıcı bir sinaptik bağlantı kurar. LEC ve MEC'den gelen aksonlar ise sırasıyla dentritlerin dış ve orta bölgelerinin üçte biri kadarını uyarırlar. Granül hücreleri, yosunsu liflerden oluşan aksonları aracılığıyla CA3 piramidal nöronlarının proksimal apikal dendritlerine projeksiyon yaparlar. Bunun sonucunda oluşan ileti schaffer kollateralleri aracılığıyla CA1 piramidal hücrelerine, komissural lifler aracılığıyla da CA3 ve CA1 piramidal hücrelerine iletilir. Sıralı trisinaptik devreye ek olarak CA3 bölgesinde hücreleri birbirine kalabalık bir hücresel ağ da vardır. CA3 piramidal hücreleri entorhinal korteksin II. katmanından gelen bir uyarıyla da doğrudan uyarılabilirler. CA1 piramidal nöronlarının dendritleri ise entorhinal korteksin III. katmanından doğrudan uyarı alabilmektedir. Hipokampustaki üç ana alt alan, hücre gövdelerinin birbirine geçen C şeklindeki düzenlendiği bir organizasyon yapısındadır. Ayrıca hipokampus kendi içinde çok fazla inhibitör nöron çeşitliliğine de sahiptir.

Kemirgen memelilerde entorhinal korteks temporal lobun kaudal ucunda bulunur. Genellikle medial (MEC) ve lateral (LEC) bölgelere ayrılır. Entorhinal korteks, altı katmanlı neokorteks ile iki katmanlı allokorteks arasında yapısal olarak ara bir konumdadır. Hipokampal oluşum içindeki duysal bilgi akışının temel yolları şekil 4'te gösterilmiştir. Duysal girdi (piriform korteks aracılığıyla entorhinal kortekse giren koku alma girdisinin istisnası hariç) ilk önce birincil duysal korteks ve bu modaliteye ayrılmış diğer kortikal alanlar (tek modlu duysal korteksler olarak adlandırılır) tarafından işlenir ve ardından çoklu duysal modaliteler boyunca bilgiyi bütünleştiren kortekslere (peririnal, parahipokampal korteks) aktarılır. Bu sisteme gelen duysal girdi, esas olarak entorhinal korteksin yüzeysel katmanlarındaki (II. ve III. katmanlar) nöronlara, doğrudan veya parahipokampal bölgenin bitişik korteksleri aracılığıyla birleşir (32, 33). EC'nin yüzeysel katmanlarındaki başlıca nöronlar, hedefine ulaşmak için EC'nin derin katmanlarından ve subikulumdan geçmesi gerektiği için bu yola delip geçen anlamında perforan yol olarak bilinen bir lif yoluyla hipokampuse ana kortikal girdiyi sağlar. Bilgi, hipokampal oluşumun dört alt alanına (dentat girus, CA1 ve CA3 alanları, subikulum) ulaşır (34). II. ve III. katmanlarda ortaya çıkan perforan yol, farklı ve seçici bir dağılım gösterir; böylece II. katman nöronlarından kaynaklanan lifler neredeyse yalnızca dentat girus ve CA3'ü hedeflerken, III. katman nöronları seçici olarak CA1 ve subikulumu projeksiyon yapar (35). Dentat girustan aksonlar hipokampusun CA3 bölgesine gider. Bilgiler daha sonra

CA3'ten hipokampusun CA1 bölgesine yansır ve bu bölge aynı zamanda EC'nın daha derin III. katmanından da projeksiyonlar alır. CA1'den bilgi, III, V ve VI. katmanlarına geçer ve subikulum aracılığıyla entorhinal kortekse geri döner. II. katman ve III. katman bileşeni arasındaki farklılaşmanın yanı sıra, perforan yol, lateral (LEC) ve medial (MEC) entorhinal kortekste, yaygın olarak sırasıyla lateral ve medial perforan yol olarak bilinen projeksiyonları içerir. Her projeksiyona ait lifler, hipokampus alt alanlarının her birinde çarpıcı şekilde farklı terminal dağılımları gösterir. LEC ve MEC farklı ve büyük ölçüde tamamlayıcı kortikal girdi kümeleri aldığından, perforan yolun her iki bileşeni de büyük olasılıkla hipokampusa işlevsel olarak farklı bilgiler iletir (36). Bu entorhinal – hipokampus ilişkilerinin yanı sıra, EC'in ayrıca başka yerlerde daha ayrıntılı olarak analiz edilen çok çeşitli kortikal ve subkortikal alanlarla önemli bağlantıları vardır (32). Kısaca kortikal girdiler iki grup oluşturur: yüzeysel katmanlar I ve II'de sonlananlar ve tercihend erin katmanlara (V – VI) dağılanlar. Yüzeysel katmanlara gelen girdiler esas olarak koku alma yapılarından (koku alma ampulü, ön koku alma çekirdeği ve piriform korteks) ve perirhinal korteksten gelir. Buna karşılık, derin katmanlara gelen girdiler esas olarak medial prefrontal korteksten (prelimbik, infralimbik ve ön singulat korteksler) ve retrosplenial korteksin hem granüler hem de disgranüler kısımlarından gelir. Subkortikal afferenter medial septal bölge, amigdala ve talamusun reuniens ve centralis medialis çekirdekleri dahil olmak üzere çeşitli alanlardan gelir.

2.3.2. Epileptik Olaylarda Entorhinal Korteks ve Hipokampusun Rolü

Epilepsi, genel ve kısmi (fokal) epilepsi olarak kategorize edilebilir. Genel epilepsi tüm beyni etkileyen yaygın bir nöbet türüdür, kısmi epilepsi ise beynin belirli bir bölgesiyle sınırlıdır. Temporal lob epilepsisi (TLE), esas olarak hipokampusta bir nöbetten kaynaklanan kısmi bir epilepsi türüdür. Sinaptik bağlantılarla birbirine bağlı hipokampus ve entorhinal korteks oluşumu, bu tür bir epilepsinin başlamasında ve yayılmasında önemli roller oynar.

2.3.2.1. Rhinal Bölgelerin Rolü

Entorhinal kortekse en önemli duyuşsal girdi, koku bilgisinin geldiği rhinal alanlardan gelir. Koku alma – limbik kortekslerin tutulumu genellikle ilaçlara dirençli nöbetlerle karakterize şiddetli epilepsi formlarıyla ilişkilidir. Bu tür epilepsiler genellikle ilaca dirençli epilepsi türleridir (37). Entorhinal kortekse koku girdisinin kaynağı olan

rhinal ve piriform korteksler, diğer limbik ve kortikal alanlarla geniş ölçüde bağlantılı olan oldukça epileptojenik bölgelerdir. Bu bölgelerin işlevsel yapısı, genellikle hafıza işlemeyle ilişkilendirilen nöronal osilasyonlar şeklindeki ağ aktivitesini içerir. Sonuç olarak, bu bölgelerin benzersiz anatomik organizasyonu ve bağlantıları nöbetlerle sonuçlanan patolojik hipersenkronizasyona da yol açmaktadır. Amigdala, hipokampus ve rhinal korteks ile olan bağlantılar da dahil olmak üzere piriform korteksin uzun menzilli projeksiyonları, bu yapıyı bir kokunun ‘bir duyguyu tetikleme’ otobiyografik bir hafızayı harekete geçirme veya limbik sistem boyunca nöbet aktivitesini tetikleme yeteneğinde önemli bir merkez olarak konumlandırır. Rhinal korteks, hipokampus için ana kortikal iletişim alanları olarak işlev gören entorhinal (ERC) ve perirhinal (PRC) kortekslere ayrılmıştır. Normal koşullar altında, bu mimari bildirimsel belleğin işlenmesinde önemli bir rol oynar. Patolojik koşullar altında rhinal – hipokampal döngü aşırı yayılmaya ve döngü kazanımı amplifikasyonuna eğilim gösterir; bu da temporal lob epilepsisinin bir özelliğidir (38).

2.3.2.2. Hipokampusun Rolü

Hipokampus, hafıza oluşumu, mekansal navigasyon ve duygusal düzenlemede rol oynayan limbik sistemdeki birincil yapıdır. Özellikle yeni anıların kodlanması için kritik öneme sahiptir ve işlevinin bozukluğu bilişsel bozukluklara yol açmaktadır. TLE’de hipokampus genellikle nöron kaybı, gliosis ve devrelerinin yeniden düzenlenmesi gibi yapısal anormallikler gösterir ve bu da hipereksitabiliteye ve nöbetlerin oluşumuna sebep olur (39).

TLE’deki hipokampus oluşumunun özellikle nöbetlerin başladığı beyin tarafında CA1 ve CA3 bölgelerindeki piramidal hücrelerin kaybıyla karakterize edilen hipokampus sklerozu (HS) olarak bilinen benzersiz bir özelliği vardır. Bu yapısal değişikliği kalan nöronların uyarıabilirliğini artırarak nöbetlere karşı duyarlılığı artırır ve uyarıcı ve engelleyici nörotransmisyon arasındaki dengeyi bozar (40).

2.3.2.3. Entorhinal Korteksin Rolü

Neokorteks ile hipokampus arasındaki birincil arayüz görevi gören entorhinal korteks (EC), TLE’nin patofizyolojisinde de merkezi bir rol oynar. EC, duyu ve mekansal bilgilerin işlenmesinde rol oynar ve hafızanın pekiştirilmesi ve geri çağırılması için önemli bir yapıdır (33). TLE’li hastalarda entorhinal korteks nöronal kayıp, sinaptik

bağlantıdaki değişiklikler ve hipokampus ile giriş – çıkış ilişkisindeki değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli patolojik değişiklikler gösterir.

EC, hipokampus ile neokorteks arasındaki iletişimi kolaylaştırmada kritik öneme sahiptir. TLE'nin ilerlemesi sırasında, EC sıklıkla epileptik aktiviteye dahil olur ve hipokampusla olan bağlantılarının işlev bozukluğu, nöbetlerin temporal lob boyunca ve hatta diğer beyin bölgelerine yayılmasına neden olur (41). Dahası, EC'nin TLE'de gözlenen mekansal ve hafıza eksikliklerinin gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Çünkü hipokampus tabanlı devrelerdeki katılımı bilişsel işlev için önemlidir (41).

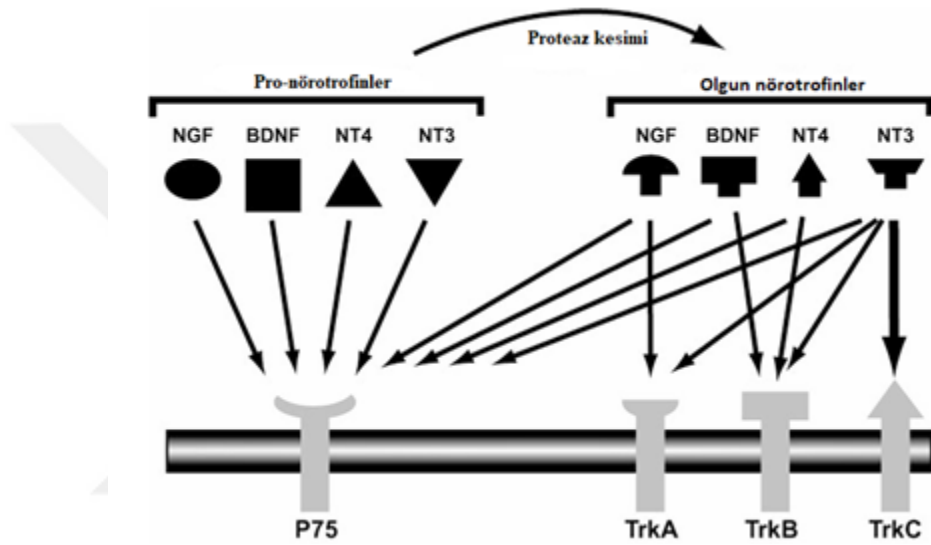
TLE'nin hayvan modellerinde, entorhinal korteksin nöbetlerin başlamasına ve yayılmasına önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin, normal entorhinal – hipokampal sinyalleme bozulması, hipokampus nöronlarının anormal uyarılmasına yol açabilir ve bu da epileptik deşarjları tetikleyebilmektedir (42).

2.4. Nörotrofinler

Nörotrofinler merkezi ve periferik sinir sistemindeki nöronların fonksiyonlarının ve gelişimlerini kontrol edilmesinde görev alan temel büyüme faktörü sınıfıdır. Nörotrofinler, normal beyin gelişiminde, plastisitede ve homeostazide önemli görevlere sahiptirler. Nöronların sağ kalımlarını sürdürebilmeleri, nörotransmitterleri salgılayabilmeleri, nörogenezin uyarılmasına katkı sağlamaları nörotrofinlerin özellikleri arasında yer almaktadır (43). Nörotrofinler hücre sağ kalımına katkıda bulundukları gibi hücre ölümüne de inhibe edici etki gösterirler. Nöronların bu yaşamsal keşifleri sonrasında nörotrofin terimi ilk olarak 1988 yılında Purves ve arkadaşları tarafından kullanılmaya başlanmıştır (44). Her ne kadar nörotrofinler ilk olarak beyinde keşfedilmiş olsa da reseptörlerinin önemli sinyal yollarına aracılık eden çeşitli kök hücre tiplerinde eksprese edildiği de ileri sürülmektedir (45).

Sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3), NT-4/5, NT-6 ve NT-7 nörotrofin sınıfına ait üyelerdir. Bu faktörler yapısal ve biyolojik olarak yüksek derecede benzerlik gösterirler. Nörotrofinler prenörotrofin olarak sentezlenirler ve yapılarındaki sinyal peptidinin kesilmesiyle pronörotrofinlere dönüştürülürler. Prohormon konvertazlar ise bu pronörotrofinleri olgun nörotrofinlere dönüştürmekte görevlidir.

Nörotrofinlerin tamamı etkilerini Trk (tropomiyozin reseptör kinaz) reseptörleri (TrkA, B ve C) ve p75NTR (p75 nörotrofin reseptörü)'ye bağlanarak gösterirler. Sentezlendikten sonra işlenen nörotrofinler TrkB'ye daha yüksek affiniteyle, işlenmemiş nörotrofinler ise p75NTR'a yüksek affiniteyle bağlanırlar (46) (Şekil 5). İşlenen nörotrofinler p75NTR'ye de bağlanabilirler fakat affiniteleri işlenmemiş formların affinitelerinde göre daha düşüktür. NT-3 bütün Trk reseptörlerine bağlanabilirken, NGF TrkA reseptörüne, NT-4/5 ve BDNF yalnızca TrkB reseptörüne bağlanabilmektedir (47).



Şekil 5. Nörotrofinler ve reseptörleri (Rosalind'den, 46)

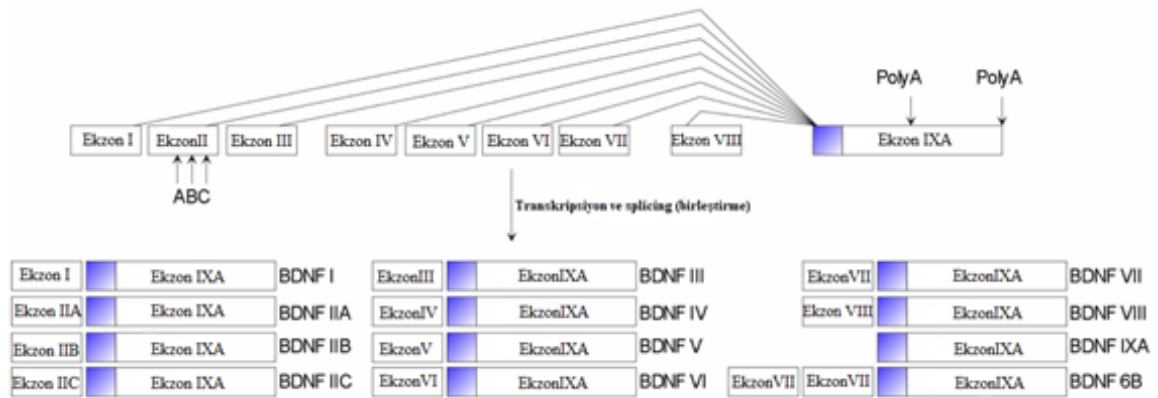
Sinir sistemindeki önemli görevleri sebebiyle NT'ler nörodejeneratif hastalıkların tedavilerinde terapötik hedef olarak denenmektedir (48). Fakat NT'lerin kan beyin bariyerini geçememesi onların tedavide terapötik hedef olarak kullanılabilme derecelerini kısıtlamaktadır (49).

2.4.1. BDNF ve Genel Özellikleri

Nörotrofin ailesinin üyelerinden biri olan Beyin Kaynaklı Nörotrofin Faktör (BDNF), merkezi ve çevresel sinir sisteminde nöronlarının yaşamasını, başkalaşmasını, büyümesini sağlayan ve sinaptik dallanmaların da oluşması için gerekli bir nörotrofindir (50). BDNF kişilerde özellikle öğrenme, hafıza ve beyin fonksiyonlarıyla ilişkilidir. Aksonal dallanmada, sinaptik iletimde, uzun süreli potansiyasyon (LTP)'da, sinaps oluşumunda, NMDA reseptörlerinin modülasyonunda, öğrenmeye bağlı nöronal plastisitede görev almaktadır. BDNF'nin MSS'de esas görevi nöronların gelişmesine

yardımcı olmasıyken nörotransmitterlerin ve nöropeptitlerin görev aldığı önemli sinyal yollarını düzenlemede de önemli görevlere sahiptir. Bu sebeple de BDNF sentezindeki bozuklukların farklı nörodejeneratif ve nörolojik hastalıklara yol açtığına dair görüşler vardır (51). Depresyon, epilepsi, alzheimer, huntington ve parkinson gibi birçok nörolojik hastalık BDNF etkisindeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. BDNF'nin nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmasına ilişkin çok sayıda çalışma da mevcuttur.

13.5 kDa'lık dimerik bir protein olan BDNF'nin amino asit dizisi yapısal olarak NGF, NT-3 ve NT-4/5 ile %50'den fazla benzerliğe sahiptir (52, 53). İnsan *BDNF* geni, fare ve sıçan *BDNF* geni ile homologtur (54, 55). BDNF geni ilk olarak 1991'de kromozom 11 bant p13'te tanımlanmıştır (56) fakat daha sonra yeni çalışmalar sonucunda bu konum 11p13-14 olarak değiştirilmiştir. *BDNF* geni farklı promotörler içeren sekiz kısa kodlanmayan ekzondan (ekzon I-VIII) oluşurken, sadece bir tane protein kodlayan ekzondan (ekzon IX) oluşmaktadır. Promotörlerin farklı alternatif splicing (birleştirme) mekanizmaları farklı *BDNF* mRNA'larının oluşmasına sebep olur (Şekil 6). *BDNF* gen ekspresyonu 9 fonksiyonel promotörle kontrol edilmektedir. Bu 9 promotör, çeşitli uyarılara cevap veren 34 farklı mRNA transkripti üretebilmektedir. *BDNF* transkriptlerinden II, III, IV, V ve VII eksonlarını bulunduranlar yalnızca beyinde eksprese olurken, geri kalanlar hem beyin hem de nöron dışı dokularda eksprese olabilmektedir (57, 58). *BDNF* 9 farklı promotörle beraber karmaşık bir gen yapısına sahip olmasına rağmen, kodlama dizisi sadece ekzon IX'da bulunmaktadır ve BDNF öncülü olan proBDNF'yi kodlayan diziyi içermektedir (59).



Şekil 6. Fare ve sıçan BDNF genlerinin yapıları ve alternatif transkriptleri (Carla'dan, 60)

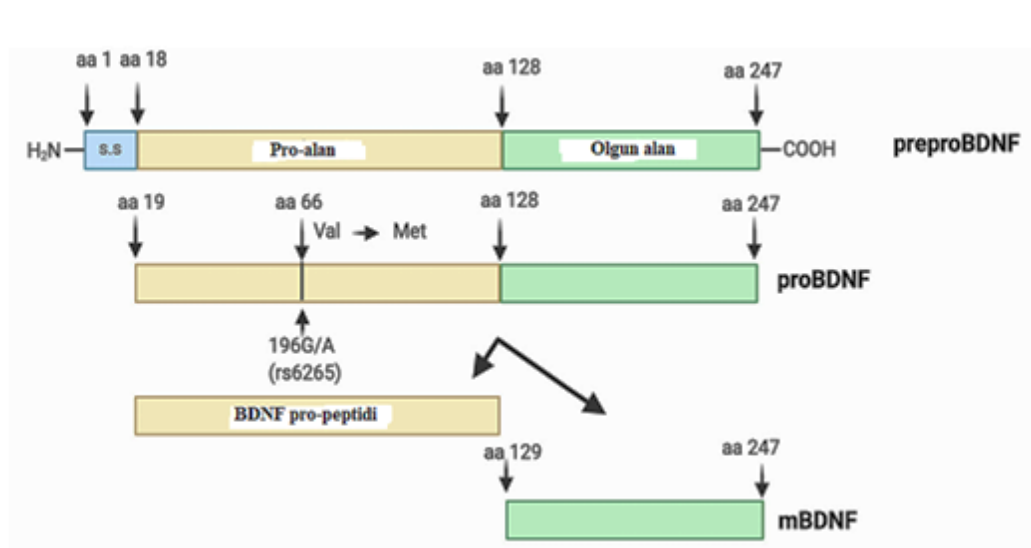
BDNF'nin mRNA ekspresyonu nöronal aktifiyle pozitif ilişki gösterir. Bu mRNA eksprese düzeyleri depresyon, stres (60) ve egzersiz (61) gibi fizyolojik, patolojik ve çevresel durumlarda değişebilmektedir.

BDNF, beyinde en çok hipokampus, korteks ve striatum bölgelerinde sentezleniyor olsa da vücudun farklı organ ve yapılarında da bulunmaktadır. BDNF'nin hem mRNA'sı hem de transkriptleri amigdalada, koku sisteminin projeksiyon bölgelerinde (62), hipokampusta (63), korteks iç ve dış tabakalarının piramidal tabakalarında (64), serebellumda ve talamusta (65) tespit edilmişken; yalnızca mRNAsı olfaktorius bulbusta, spinaliste, medullada ve adrenerjik beyin sapı çekirdeklerinde tespit edilmiştir (54, 62, 63).

BDNF bu bölgelere ek olarak ayrıca retina, timüs, dalak, ince bağırsak, fibroblastlar, kalp, akciğer, karaciğer, monosit, lenfosit, trombosit, mide, prostat gibi çeşitli organ ve yapılarda da sentezlenmektedir (66).

2.4.1.1. BDNF'nin Sentezi ve Salınımı

Nörotrofin ailesinin en çok araştırılan üyelerinden olan BDNF'nin sentezi, olgunlaşması ve salınımı birkaç öncü izoformu içeren birden fazla aşamalı bir süreçtir (2). BDNF şekil 6'da gösterildiği gibi ekzon IX'dan pre-proBNF olarak sentezlenir. Bir ucunda amin diğer ucunda karboksil grubu bulunan ve bir öncül grup, bir pro alan ve bir olgun olmak üzere toplam üç farklı alandan oluşan pre-proBDNF yapısı toplam 247 amino asitten oluşmaktadır (67) (Şekil 7).



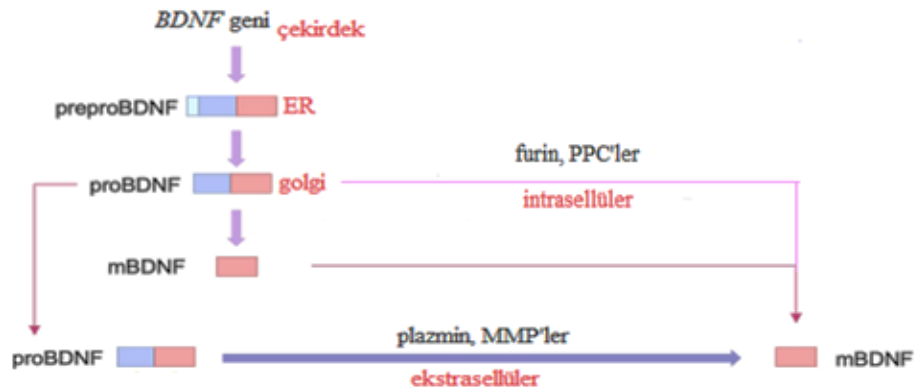
Şekil 7. BDNF'nin protein yapısı (Luca'dan, 67)

Pre-proBDNF yapısı endoplazmik retikulumda öncül dizisinden kesilerek 32 kDa'lık ve 228 amino asitlik proBDNF yapısı oluşturulur. ProBDNF yapısı pro ve olgun olmak üzere iki farklı alandan oluşur. N- terminal pro-alan bölgesinde 129 amino asit, C-terminal olgun-alan bölgesinde 118 amino asit bulundurur (67) (Şekil 7). Bu halinde proBDNF, p75NTR-sortilin reseptörlerine bağlanıp apoptoz, LTP, sinaptik depresyon, aksonal büyüme gibi çeşitli olaylarda işlev görebilir. Oluşan proBDNF'nin olgun BDNF'ye dönüşmesi için yine farklı işlemlerden geçmesi gerekir. ProBDNF yapısı hücre içinde veya dışında farklı proteinler yardımıyla 14 kDa'lık ve 118 amino asitlik olgun BDNF (mBDNF)'ye çevrilmektedir (Şekil 8).

2.4.1.2. proBDNF mBDNF

BDNF, hücrede öncül formu olan proBDNF olarak sentezlenir ve daha sonra proteolitik yolla mBDNF'ye dönüştürülür. Bu iki farklı BDNF formu farklı reseptörlere bağlanarak zıt etkiler gösterirler. ProBDNF, p75NTR'ye bağlanarak apoptoz ve sinaptik zayıflamayı teşvik ederken mBDNF, TrkB'ye bağlanarak nöronal hayatta kalma ve sinaptik güçlenmeyi teşvik eder (68).

BDNF geninden sentezlenen preproBDNF, proBDNF'ye dönüştürülür. ProBDNF'nin mBDNF'ye dönüşümü hem hücre içi hem de hücre dışı proteazlar tarafından gerçekleştirilir. Hücre içi dönüşümde proBDNF yapısı golgi organeline taşınır, burada furin ve proprotein konvertazlar (PPC) tarafından mBDNF'ye çevrilir (3) (Şekil 8). Hücre dışı dönüşümde ise plazmin ve matriks metalloproteinazlar (MMP) görevlidir. Bu dönüşüm sinaptik aktiviteye bağlı olarak düzenlenir; yüksek frekanslı uyarılar mBDNF salınımını artırırlar, düşük frekanslı uyarılar ise proBDNF salınımını artırırlar (3) (Şekil 8).



Şekil 8. ProBDNF'nin mBDNF'ye dönüşümü ve görevli organeller (Li'den, 3)

ProBDNF/p75NTR etkileşimi sonucu uzun süreli depresyon (LTD) oluşurken, mBDNF/TrkB etkileşimi sonucunda uzun süreli potansiyasyon (LTP) oluşur (68). Bu zıt etkiler, sinaptik bağlantıların güçlenmesi ya da zayıflaması gibi süreçlerde rol oynar.

Bu iki form arasındaki denge öğrenme, hafıza, sinaptik plastisite ve genel sağlık için önemlidir. Dengenin bozulması çeşitli patolojik rahatsızlıklara ve nörolojik hastalıklara sebep olur. Hem insan hem de hayvan modellerinde yapılan çalışmalar sonucunda, proBDNF işlemindeki bozulmaların şizofreni, otizm ve nöbetler dahil olmak üzere nörogelişimsel ve nörodejeneratif bozuklukların ortaya çıkmasından sorumlu olabileceğini göstermektedir (69). Epilepsi, depresyon, Alzheimer ve bipolar bozuklukta ise mBDNF seviyelerinin azaldığı, proBDNF seviyelerinin ise arttığı gözlenmiştir.

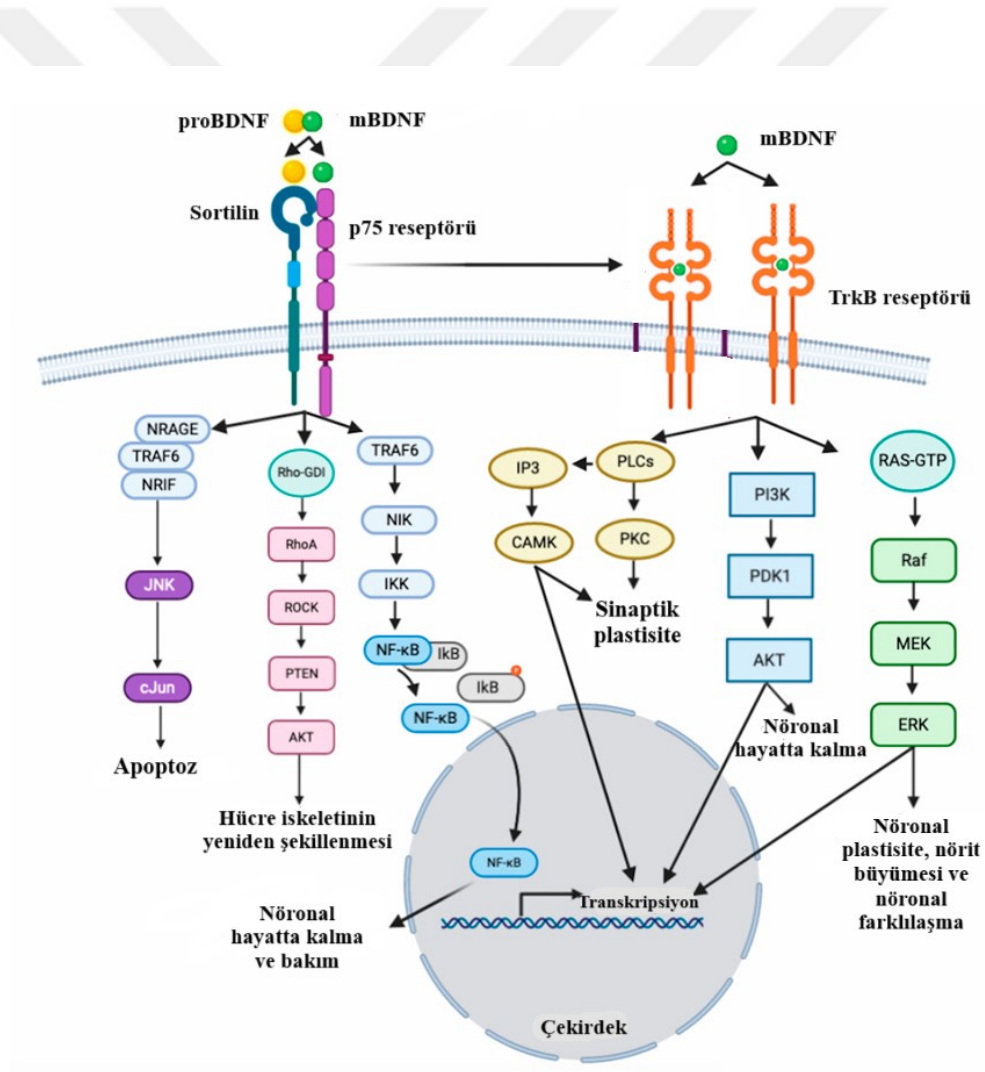
2.4.2. BDNF İzoformlarının Hücre İçi Sinyal Yolakları

Hücrenin tipine göre BDNF, yapıya ve aktiviteye bağlı olarak salgılanmaktadır. BDNF'nin hem pro formunun hem de olgun formunun dengesi beyin gelişiminin farklı aşamalarında ve farklı bölgelerinde değişiklik göstermektedir. Nöronal hücrelerde dinlenme durumunda BDNF'nin reseptörleri hücre içi veziküllerin zarında bulunmaktadır. Hücre zarının depolarize duruma geçmesinin ardından hem proBDNF hem de mBDNF salgılanabilmektedir. BDNF proteini, fonksiyonlarını p75NTR ve TrkB reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir. Olgun BDNF, p75NTR'ye düşük ilgiyle bağlanırken TrkB reseptörüne yüksek ilgiyle bağlanabilmektedir. ProBDNF ise TrkB reseptörüne bağlanmazken, p75NTR'ye yüksek ilgiyle bağlanmaktadır (Şekil 5). Presinaptik bölgede mBDNF ve proBDNF sırasıyla TrkB ve p75 reseptörlerine bağlandıktan sonra oluşan mBDNF-TrkB ve proBDNF-p75NTR kompleksleri aksonlardaki çeşitli düzenleyici proteinlerin aracılığıyla hücre gövdesine doğru geri taşınmaktadır.

Olgun BDNF'nin yüksek afiniteyle TrkB reseptörüne bağlanması reseptörün dimerizasyonuna sebep olur ve kinaz aktivasyonuna öncülük eder. Kinaz aktivasyonu başladıktan sonra tirozin rezidülerinde otofosforilasyon meydana gelerek p85 (PI-3 kinazın katalitik olmayan altbirimi) ve Shc (SH2- içeren dizi) gibi hedef proteinlere özgü bağlanma bölgeleri oluşturulur. Bu hedef proteinler aktive olduktan sonra fosfolipaz C- γ (PLC- γ), fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K) ve RAS/mitojenle aktive olan kinaz (MAPK) gibi farklı sinyal yolları aktive edilerek hücrenin yaşamsal fonksiyonları düzenlenir (67) (Şekil 9).

Bu sinyal kaskadları ayrıca transkripsiyon faktörleri fosforilasyonu, Ca^{+2} artışı ve *BDNF* geninin ekspresyonunun artışında da rol oynamaktadır (70).

ProBDNF ise p75 reseptörüyle etkileşime girdikten sonra yapısındaki ön alan sayesinde sortilin reseptörüyle etkileşime girer (Şekil 9). Oluşan proBDNF/p75NTR/sortilin kompleksi, nükleer faktör kappa B (NF- κ B), Ras homolog gen ailesi üyesi A (RhoA) ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) sinyal kaskadlarını aktifleştirir (67). Şekil 9'da gösterildiği gibi aktifleşen farklı sinyal yolları sonucunda hücrenin proapoptotik cevabı yani ölümü veya hayatta kalması belirlenir (71). p75NTR'nin apoptozu düzenlemek haricinde diğer bir görevi ise Trk reseptörleriyle beraber nörotrofinlerin spesifik bağlanmasına yardımcı olmaktır.



Şekil 9. BDNF izoformlarının reseptörlerine bağlanmasıyla aktifleşen sinyal yolları (Luca'dan, 67)

BDNF'nin çok fazla sayıda beyin fizyolojik süreçlerinde rol oynaması izoformlarının farklı tipte reseptörlerle etkileşime girerek; plastisite, beyin gelişimi ve hasar sonrası rejenerasyon gibi süreçlerle ilgili farklı sinyal yollarını aktifleştirmesine bağlıdır. BDNF'nin sentezindeki veya sinyalleşme basamaklarındaki herhangi bir bozukluk farklı patolojik süreçlerin de tetiklenmesine sebep olmaktadır.

2.4.2.1. TrkB Reseptörü, Hücre İçi Yolakları ve Uyarılabilirlikle İlişkisi

Trk ailesi, hücre yüzeyinde bulunan ve nörotrofinleri tanıyan önemli bir reseptör tirozin kinaz ailesidir. Trk ailesi Trk-A, Trk-B ve Trk-C'den oluşur. Bu reseptörler nörotrofinlerle etkileşime girerek sinir hücrelerinin hayatta kalmasını, büyümesini ve işlevselliğini düzenlerler. Trk reseptör ailesi ilk olarak 1980'li yılların sonunda keşfedilmiştir. 1991 yılında ise TrkB'nin BDNF ile etkileşime girerek nörotrofik bir reseptör olarak görev yaptığı bulunmuştur (72).

Yapısal olarak TrkB reseptörü transmembran bir glikoproteindir ve üç temel bölgeden oluşur. Bu bölgeler, hücre dışındaki ekstrasellüler ligand bağlayıcı bölge, transmembran bölge ve hücre içi tirozin kinaz domaini olarak bilinmektedir. Ekstrasellüler bölge ligand bağlanmasından sorumlu bölgedir: iki sistein kümesi (CC1-2), üç lösince zengin bölge (LLR1-3) ve iki immünoglobulin benzeri C tipi domain, içerir (73). Transmembran bölge reseptörün hücre zarında sabitlenmesini sağlarken, hücre içi bölge tirozin kinaz aktivitesine sahiptir.

Ligand bağlandığında TrkB homodimerleşir ve hücre içi bölgede ototirozin fosforilasyonu meydana gelir. Bu fosforilasyon sonucunda özellikle Ras/MAPK, PI3K/Akt ve PLC- γ gibi sinyal yolları tetiklenir. Böylece hücre farklılaşması, büyümesi, hayatta kalması ve sinaptik işlevler düzenlenir (74).

TrkB reseptörü MSS'de, hipokampus, korteks ve serebellum gibi bölgelerde yüksek düzeyde ifade edilir. Bu durum reseptörün öğrenme, hafıza ve duygu-durum düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (75). TrkB'nin sinaptik düzeydeki aktiviteleri, LTP gibi nöral plastisite süreçlerinde de belirleyicidir.

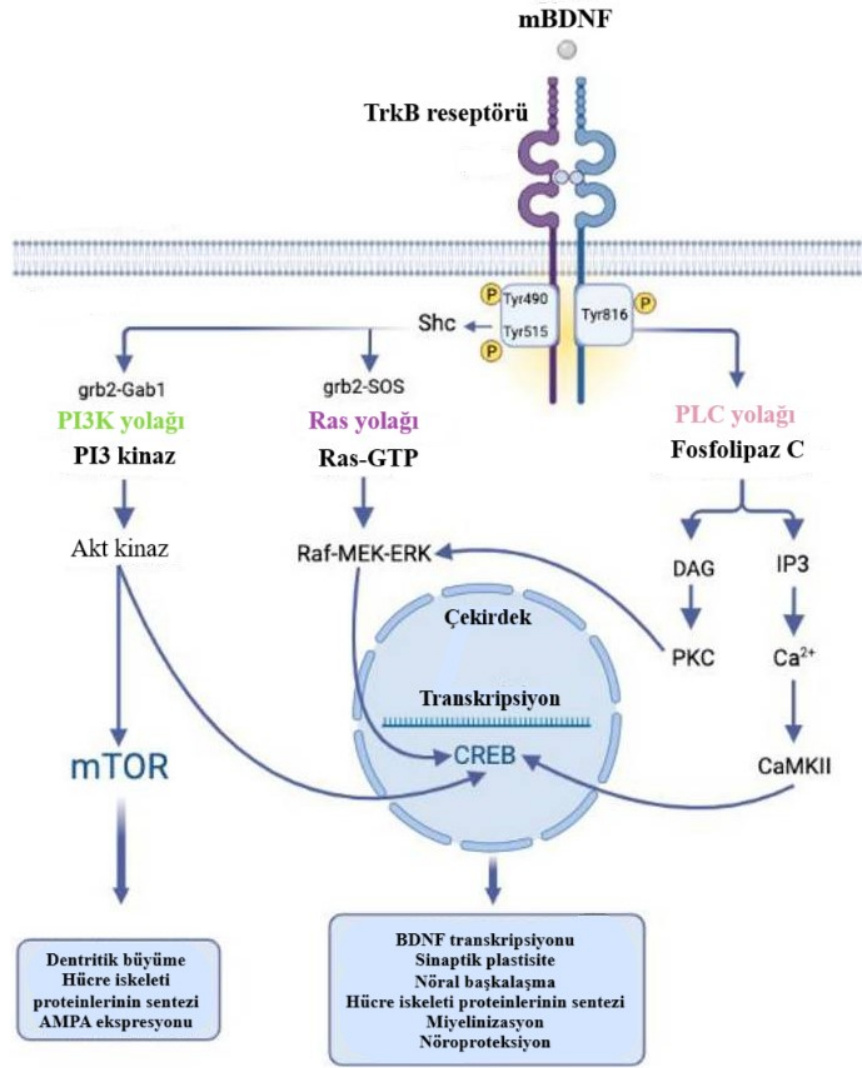
Yapılan çalışmalarla TrkB'nin işlev bozukluklarının depresyon, şizofreni, Alzheimer, epilepsi gibi birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkili olduğu görülmüştür (76). Bu sebeple TrkB hem temel sinirbilim çalışmaları hem de terapötik hedef olarak ilaç geliştirme çalışmalarında ön planda yer almaktadır.

TrkB reseptörü BDNF molekülünün olgun alt birimi olan mBDNF yapısıyla etkileşime girmektedir. TrkB/mBDNF kompleksi Rho gen ailesinin bir üyesi olan PI3K, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve PLC- γ gibi proteinleri aktifleştirir. Aktifleşen proteinler apoptoz, nöronların hayatta kalma süreçleri, dentritik büyüme, omurga olgunlaşması, sinaps gelişimi, öğrenme ve hafıza gibi birçok olayı düzenlemektedir (74).

TrkB aktivasyonu Ras aracılığıyla MAPK sinyal yolağını aktifleştirir. Ras, GTPaz aktivitesiyle aktifleşir. Aktif Ras, Raf kinazı fosforile eder. Bunun sonucunda sırasıyla MEK ve ERK kinazlar aktifleşir. ERK çekirdeğe geçerek siklik AMP yanıt elementi bağlayıcı protein (CREB)'i aktive eder ve gen ekspresyonunu düzenler. Bu sinyal yolağı; nöronal farklılaşma (77), hücre iskeletini oluşturan proteinlerin sentezi (78) ve hipokampal nöronlarda dentritik büyüme ve dallanma (79) için önemli bir sinyal yoludur.

TrkB'nin aktifleşmesiyle beraber tetiklenen diğer bir yol PI3K/Akt sinyal yolağıdır. TrkB üzerindeki Tyr-515 yapısı, adaptör protein Shc tarafından tanınır ve Grb2/PI3K kompleksinin oluşmasına neden olur (80). PI3K, fosfoinozidler fosforile ederek PIP3 yapısını oluşturur ve bu da Akt'nin membrana transloke olmasına sebep olur. Akt daha sonra mTOR kompleksi gibi çeşitli alt hedefleri fosforile ederek hücreyi apoptoza karşı korur, metabolizmayı düzenler ve hücre büyümesini sağlar (81). PI3K/ Akt/ mTOR sinyal yolağı protein sentezi ve hücre iskeleti gelişimi yoluyla dentritik büyümeyi ve dallanmayı tetiklemektedir (82). Bu yolağın aktifleşmesi kortikal nöronlarda apoptozun da önlenmesini sağlar (74).

TrkB'nin aktifleşmesi sonrasında PLC- γ 'nın aktifleşmesi, fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat (PIP2)'in, inozitol trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserol (DAG) olarak hidrolize olmasına sebep olur. IP₃, endoplazmik retikulumdan Ca⁺² salınımını tetikler. DAG ise protein kinaz C (PKC)'nin aktivasyonunu sağlar. Bu sinyaller hem uyarılabilirlik hem de sinaptik plastisite için önemli bir rol oynarken (83) aynı zamanda gen ekspresyonu üzerinden de uzun vadeli etkilere sebep olur (70) (Şekil 10).



Şekil 10. mBDNF/TrkB kompleksinin sinyal yolları (Guiseppe'den, 80)

TrkB reseptörü nöronal uyarılabilirliği hem hücresel hem de sinaptik düzeyde çok yönlü olarak etkileyen bir moleküldür. TrkB reseptörü epileptik aktivite gelişiminde gereklidir ve TrkB sinyal yolunun uyarılabilirlik üzerindeki etkisini çeşitli durumlara göre değişiklik gösteren karmaşık bir yapıya sahiptir.

TrkB reseptörünün uyarılabilirlik düzeyini etkileyebilme potansiyeli doğrudan TrkB'nin hücre içi sinyal yolları ile ilişkilidir. TrkB, iyon kanallarının düzenlenmesi, GABAerjik iletimin baskılanması ve klorür homeostazının bozulması gibi mekanizmalarla nöronların çevresel uyaranlara verdiği yanıtları kontrol etmektedir. TrkB aktivasyonu sonrası nöronlarda hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artıyor olması, TrkB'nin

nörotransmitter salınımını ve uyarılabilirliğe etki ettiğini göstermektedir. Hipokampal kültür hücrelerinde akut olarak uygulanan BDNF'nin glutamat salınımını arttırdığı ve bu olayın TrkB aracılığıyla gerçekleştiği bilinmektedir (50).

BDNF/TrkB sinyalizasyonu sonucunda oluşan farklı bir etki de GABA salınımının azalması glutamat salınımının artmasıdır. Bu durum GABA'nın inhibitör etkisini azaltarak eşiği düşürür ve uyarılabilirliğin artmasına katkı sağlar (84).

Olgun nöronlarda hücre içi klorür iyon dengesini sağlayan potasyum-klor kotasıyıcısı (KCC2), hücre içindeki klorür iyonlarının hücre dışına çıkmasını sağlayan nöronlara özgü bir tür taşıyıcıdır. BDNF/TrkB aktivasyonu sonucunda, hipokampal nöronlarda KCC2 ekspresyonu da artmaktadır (85). Bu ekspresyonun artması nöron içi klorür birikimine sebep olur. Bu durum GABAerjik nöronların inhibitör etkisini de azaltır ve depolarizasyon meydana gelir (86).

Yapılan farklı çalışmalarla BDNF yoksunluğunun aksiyon potansiyeli oluşturmada artışa yol açtığı bulunmuştur. DG'taki GABAerjik ve p75NTR'den yoksun nöronlarda yapılan çalışmalarda olgun BDNF'nin uyarılabilirliği azalttığı ve aksiyon potansiyeli ateşlemesini bastırdığını ortaya koymuştur (87).

Nöronal uyarılabilirliğin hücrede artması pozitif geribildirim sayesinde BDNF salınımını da teşvik etmektedir. Bu teşvik sonucunda BDNF/TrkB etkileşimi tekrardan gerçekleşerek sinaptik güçlenme ve LTP süreçleri desteklenir. Bu durum da özellikle öğrenme, hafıza oluşumu ve nörolojik bozuklukların patofizyolojisinde önemli bir yer tutar (88). Bu geri bildirim mekanizması TrkB'nin sadece anlık uyarılabilirlik değil, uzun vadeli plastisite süreçlerinde de aktif bir rol üstlendiğini gösterir.

TrkB Reseptörü ve Epilepsi

Epilepsi nöronların anormal derecedeki elektriksel aktivitesiyle karakterize edilen kronik bir nörolojik bozukluk olarak bilinir. Bu bozukluğun patolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması, etkili tedavi süreçlerinin geliştirilmesi için büyük bir önem taşır. Bu nedenle, BDNF ve reseptörü TrkB epileptogenez sürecinde de önemli rol oynamaktadır.

Nörotrofinlerin ve reseptörlerinin epilepsiye dahil olabileceği hipotezi, meydana gelen epilepsi nöbetlerinin DG'daki NGF mRNA'larında büyük çaplı artışa neden olduğunun keşfedilmesiyle ortaya çıktı (89). BDNF'nin transjenik yol kullanılarak aşırı

eksprese edilmesi kendiliğinden meydana gelen nöbetlerin ve azalmış eşik değerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (90). Epileptik nöbetler sırasında, BDNF/TrkB aktivasyonunun arttığı da bilinmektedir. Bu artış özellikle hipokampusta DG granül hücreleri ve CA1 piramidal hücrelerinde belirgin olarak gözlenmektedir. BDNF/TrkB sinyalizasyonu LTP süreçleri desteklerken GABAerjik iletimi de zayıflatabilmektedir. Bu durum nöronal yapılarda depolarizasyona yol açarak epileptogenez oluşumunu ortaya çıkarır.

BDNF/TrkB sinyalizasyonu sonrasında PLC- γ sinyal yolağının aktifleşmesiyle IP_3 ve DAG üretiminin artmasıyla birlikte Ca^{+2} salınımı da artar. Bu süreç de nöronal uyarılabilirliği artırır ve epilepsi oluşumuna zemin hazırlar.

BDNF/TrkB sinyalizasyonu, K-Cl kotasıyıcısı KCC2'nin ekspresyonunu azaltarak GABAerjik nöronların etkisini zayıflatır. KCC2'nin baskılanması hücre içi klorür birikimine ve GABA'nın inhibitör etkisinin kaybına yol açar. Bu durum da nöronal uyarılabilirliği artırır ve epileptogenezi destekler.

2.4.2.2. p75 Reseptörü, Hücre İçi Yolakları ve Uyarılabilirlikle İlişkisi

p75 reseptörü ilk olarak 1973 yılında düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü (LNGFR) olarak keşfedilmiştir. Pro-BDNF, NT – 3, NT – 4 gibi çeşitli büyüme sinyalleri için fonksiyonel bir reseptör olduğu bilinmektedir. Ayrıca p75NTR, tümör nekroz faktörü reseptör ailesinin bir üyesidir. p75NTR; nöroplastisite, sinaptik modülasyon, öğrenme, bellek ve nöronal hayatta kalma/ ölüm süreçlerinde kritik bir rol oynar. Bu reseptörün etkisi, kendisine bağlanan nörotrofik faktöre ve çevresel sinyallere bağlı olarak farklılık gösterebilir.

p75NTR yapısal olarak glikozillenmiş ekstrasellüler ligand bağlama olarak hücre dışı, transmembran domaini ve hücre içi katalitik aktivitesi olmayan domain olarak 3 farklı domain içermektedir. Hücre dışı domain 4 farklı sisteince zengin bölgeden (CCRD1-4) oluşur (91). Transmembran bölgedeki α - ve γ -sekretazlar membrane içi proteolizden sorumludur. Nörotrofinler sistein açısından zengin bölge 2 ve 4'e bağlanırlar. Bağlanma sonrası meydana gelen konformasyonel değişiklik sonucunda da sinyal yolları aktive olur.

Duyusal ve sempatik nöronlar, omurilik ve beyin sapı motor nöronları ve serebral korteks, serebellum, bazal ön beyindeki nöronlar gelişimlerinin bir aşamasında p75NTR ifade ederler (92). p75NTR entorhinal korteks ve hipokampus CA1 yapılarında da güçlü bir şekilde sentezlenmektedir (93).

p75NTR gelişmekte olan sinir sisteminde nöronal gelişimin başlamasından itibaren yaygın olarak ifade edilmektedir. p75NTR'nin farklı nörodejeneratif hastalıkların varlığında farklı şekillerde ifade edildiği görölmektedir (94). Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ve travmatik beyin hasarları durumlarında proBDNF düzeylerinde artış gözlenmiştir. Aynı zamanda p75NTR ekspresyonunun da artmasıyla beraber proBDNF/p75NTR etkileşimi nöronların ölümlü ve sinaptik bağlantıların zayıflaması ile sonuçlanmaktadır. Depresyon gibi psikiyatrik hastalıklarda da proBDNF/p75NTR etkileşiminin aşırı derecede olması, sinaptik plastisitenin azalması ve nöronal işlev bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir (95). Bu da p75NTR'nin sinirbilim çalışmalarında terapötik ilaç hedefli tedavilerde kullanılabileceğini göstermektedir.

Trk reseptörlerinden farklı olarak p75NTR'nin tirozin kinaz aktivitesi yoktur. Bu nedenle etkisini aracı proteinlerle beraber gösterir. Bu etki ligandına ve kendisine eşlik eden koreseptörlerin varlığına bağlı olarak farklı sonuçlara yol açmaktadır (96).

Pronörotrofinlerin p75NTR'ye bağlanması ve sinyal iletimi çoğunlukla sortilin koreseptörü ile birlikte çalışmayı gerektirir. Sortilin, proBDNF'nin p75NTR'ye bağlanmasını kolaylaştırır ve sinyalin şiddetini, yönünü belirler. Merkezi nöronlardaki apoptozun sağlanması için p75NTR/sortilin reseptör kompleksinin oluşması gerekir (97).

Sortilinin p75NTR için bir yardımcı reseptör olarak görev aldığı bilinmektedir. pro-BDNF, sortilin reseptörlerinin varlığında p75NTR'ye karşı daha spesifik bir bağlanma gösterir (98). Ön ve olgun alandan oluşan pro-BDNF yapısı, ilk olarak sortilinle daha sonra da p75NTR ile etkileşime girer. ProBDNF'nin p75NTR/sortilin kompleksine bağlanması kendine özgü farklı sinyal yollarının aktifleşmesine sebep olur.

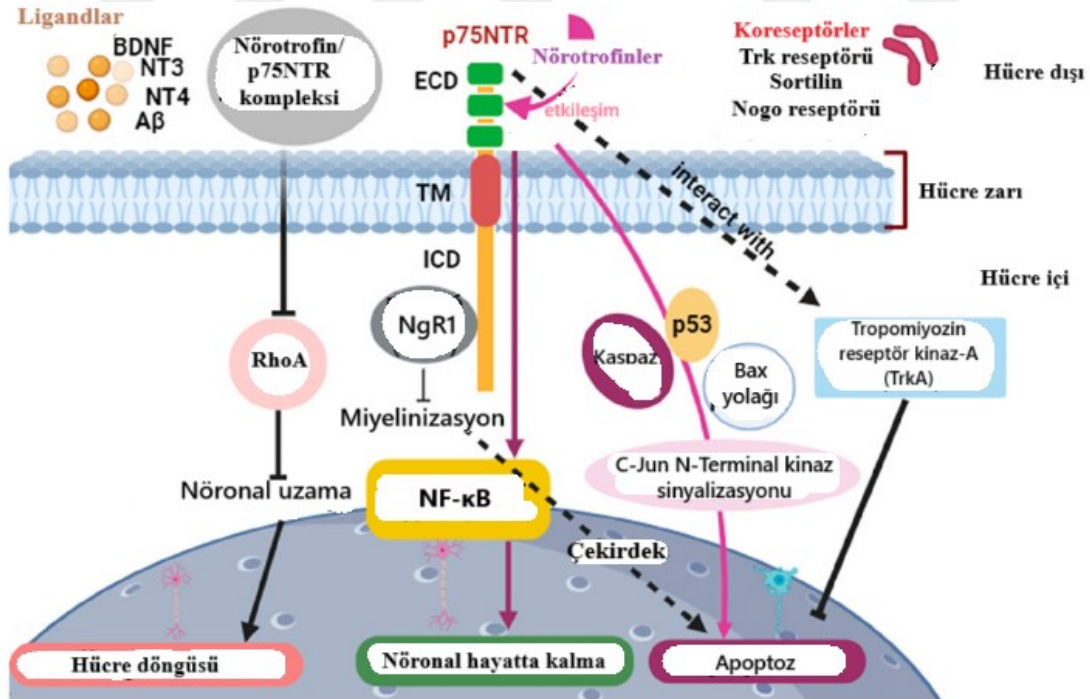
ProBDNF, sortilin yardımıyla p75NTR'ye bağlandığında, reseptörün ölüm domaini nörotrofin reseptörüyle etkileşimli faktör (NRIF) ve nörotrofin reseptörüyle etkileşimli MAGE homolog (NRAGE) gibi aracı proteinler üzerinden JNK sinyal yolunu aktiveştirir; aktiveşen JNK, c-Jun'u fosforile eder ve proapoptik genlerin aktivasyonunu başlatır (99). Bu sinyal yolu gelişimsel dönemde fazla nöronların eliminasyonunda, erişkin dönemde ise beyindeki nörodejeneratif süreçlerde kritik bir rol oynar.

p75NTR hem hücre sağkalımına hem de hücre ölümüne aracılık eder. Spesifik nörotrofinin bağlanarak sortilin yardımıyla p75NTR'yi aktiveştirdiği durumlarda serin/treonin-protein kinaz 2 (RIP2) ve tümör nekroz faktörü reseptörüyle ilişkili faktör 6

(TRAF6) gibi aracı proteinler sayesinde NF- κ B sinyal yolunu aktifleştirir (100). Bu aktifleşme sonucunda I κ B kinaz (IKK), κ B (1Kb) proteinin inhibitörünü fosforile eder ve bunun sonucunda I κ B NF- κ B'den ayrılır ve NF- κ B aktivasyonu ortaya çıkar (67). NF- κ B transkripsiyon faktörü çekirdeğe geçerek antiapoptotik, nöronal hayatta kalmayı ve bakımı destekleyen genlerin ekspresyonunu tetikler (Şekil 11).

ProBDNF'nin p75NTR'ye bağlanması hücre iskeletinin yeniden düzenlemelerini etkileyen bir yol olan RhoA GTPaz sinyal yolağını da aktifleştirir (101). Aktifleşen p75NTR Rho guanin nükleotidi ayrıştırma inhibitörü (Rho-GDI) ile etkileşime girerek Rho ilişkili protein kinaz (ROCK) aktivitesine aracı olan RhoA'yı serbest bırakarak aktif hale getirir. Bu durum nörit geri çekilmesine ve hücre morfolojisinin değişmesine sebep olur. Bu sinyal yolağı aksonal yönlendirme, yeniden yapılanma ve hasar sonrası rejenerasyonun baskılanması gibi durumlarda önem taşır.

p75NTR, sadece sortilinle değil nogo-66 reseptörü (NgR1) ile de etkileşime girebilir. Bu etkileşim sonucunda apoptoz indüklenir ve nöronal miyelin kılıf oluşumu aktive edilir (94).



Şekil 11. p75 reseptörünün hücre içi sinyal yolakları (Areej'den, 94)

p75NTR, Trk reseptörleriyle de etkileşim halindedir. p75NTR ve TrkA arasındaki etkileşim sonucunda p75NTR aktivasyonundan kaynaklanan apoptozun etkisinin azaldığı görülmüştür (102). TrkA'ya fazla affinite gösteren ligant mevcut olduğunda p75NTR Trk'nın bağlanma yeteneğini artırır, aktif olan TrkA, p75NTR'nin sinyallemesini azaltır. TrkA'ya fazla affinite göstermeyen ligand, p75NTR'ye bağlandığında aktifleşen p75NTR, TrkA'nın serin bölgelerini fosforile eden sinyal yolağını aktive eder. Bunun sonucunda TrkA'nın çalışması engellenir ve hayatta kalmayı sağlayan sinyallerin azalmasına neden olur.

p75NTR'nin nöronal uyarılabilirliği ne şekilde etkilendiği tam olarak bilinmese de yapılan farklı çalışmalar, p75NTR'nin nöronal uyarılabilirliği modüle etmede önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur.

ProBDNF/p75NTR aktifleşmesiyle sfingomiyelin ve sfingozin-1-fosfat (S1P) barındıran bir sinyal yolağı kullanılarak duyuşal nöronların uyarılabilirliği artabilmektedir, bu modülasyon sonucunda iyon kanalı aktivitesi etkilenecek uyarılara yanıt olarak artan aksiyon potansiyeli ateşlenmektedir (103).

Nöronal gelişim sırasında artan proBDNF düzeyleri sonucunda proBDNF/p75NTR sinyalizasyonunun artması, olgun nöronal hücrelerde KCC2'ye bağılı depolarize edici bir GABA tepkisini açığa çıkarmıştır ve in vivo olarak p75NTR'ın aktive edilmesi sonucunda artan nöbet duyarlılığı gözlenmiştir (104). Bu çalışma, gelişim sırasında artan proBDNF düzeylerinin GABA'nın etkisini bozarak sonraki aşamalarda patolojik bozukluklara sebep olabileceğinin kanıtı olmuştur.

Bazı durumlarda ise p75NTR'nin aktivasyonu nöronal uyarılabilirliği azaltıcı etkiler de göstermektedir. p75NTR'nin aktivasyonu, G-protein kenetli içe doğru tucu potasyum kanallarını (GIRK) aktive ederek hücre dışına potasyum gönderimini artırır. Hücre dışına doğru olan bu potasyum çıkışı nöronun hiperpolarizasyonuna ve dolayısıyla da nöronal uyarılabilirliğin azalmasına yol açar. Bu mekanizma RAC1 (RAC ailesi küçük guanozintrifosfataz 1)'e ve PIP2'ye dayalı sinyalizasyon yolağı üzerinden gerçekleşir (105).

p75NTR'nin yetişkin nöronlarda genetik olarak silinmesi artan uyarılabilirlikle sonuçlanmaktadır. Bu proBDNF/p75NTR sinyalizasyonunun yetişkin nöronlarda aktiviteyi inhibe ettiğini gösterir. Farklı bir çalışmada proBDNF'nin reseptörüne bağlanması sonucu

kortikal nöronlarda kolinerjik Ca^{+2} tepkilerinin azaldığı bulunmuş ve buna bağlı olarak da V. katman piramidal nöronlarda uyarılabilirliğin azaldığı gösterilmiştir (9).

p75NTR ve Epilepsi

Epilepsi esnasında p75NTR'nin ekspresyonu artar ve bu durum epileptik nöbetlerin sıklığı ve şiddetiyle ilişkilendirilmektedir. Son çalışmalarla birlikte epileptik nöbetler sonucunda hem glial hücrelerde hem de nöronlarda proBDNF/p75NTR ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (94). Özellikle p75NTR'nin proBDNF ile etkileşimi nöroinflamasyon ve nöronal hasarı tetikleyebilmektedir. Bu süreç epileptik olay oluşumunda ve nöbet sürdürülebilirliğinde etkilidir.

ProBDNF/p75NTR sinyalizasyonu, GABA oluşumunu baskılayarak (106), nöronal apoptozu arttırarak ve nöroinflamasyonu destekleyerek epileptogenez sürecini tetikler (98). Özellikle Rho-ROCK sinyal yolu üzerinden $GABA_A$ reseptörlerinin etkileşmesi ve lizozomal yıkımıyla GABA iletiminin bozulması epileptik nöbetlerin meydana gelmesine sebep olur (94).

Uzun süreli epilepsi sırasında plazminojen varlığında BDNF'nin mBDNF'ye ayrılması bozulur. Bu da proBDNF düzeylerinin artmasına ve buna bağlı olarak da epileptik nöbetlerin şiddetlenmesine sebep olmaktadır (107, 108). Uzun süreli epilepsi sonrasında ise hipokampustaki nöronal apoptoz esas olarak proBDNF/p75NTR sinyalizasyonu tarafından aracılık edilir (109). Uzun süreli epilepsi sonrası proBDNF yosunu liflerde ve mikroglia da lokalize olurken; p75NTR aksonlarda ve akson uçlarında, nöron ve astrositlerde geçici olarak lokalize olur.

Kaspazlar nöronal apoptozda önemli bir rol oynarlar. p75NTR'nin aktivasyonu, kaspazın aktivasyonunu etkiler böylece nöronal hasar ve hücre ölümü artar. Bu durum epileptogenez sürecinde önemli bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır. Kaspaz 3'ün inhibisyonu ise epileptik nöronal kaybı azaltmada etkilidir (110).

p75NTR, NF- κ B'yi aktive ederek inflamasyon süreçlerini hızlandırır. Nöbet sırasında glialardan ve nöronlardan salgılanan sitokinler NF- κ B'nin yüksek derecede eksprese edilmesine neden olur (111). Yüksek derecede ifade sonucunda kan-beyin bariyeri bozulur ve GABA inhibisyonu azalır. Bu da epileptik nöbetlerin tetiklenmesine sebep olur.

ProBDNF ile indüklenen p75NTR aktivasyonu, RhoA sinyallemesini ve apoptozla ilişkili olan proteinlerin aktivitesini arttırır (112). Rho kinaz olarak bilinen ROCK molekül ağırlığı 160 kDa olan bir protein kinazdır. Nöronal olmayan dokularda ifade edilen ve nöronal dokularda ifade edilen olmak üzere iki türü mevcuttur. Rho-ROCK sinyal yolu beyin hasarı sırasında aksonal büyümeyi engellemektedir (113). Rho-ROCK sinaptik plastisite açısından karmaşık olan nöronlarda ve astrositlerde yüksek oranda ifade edilir (114). Farklı çalışmalar, p75NTR'nin sinyal yollarının Rho-ROCK sinyal yolağının ifadesini aktifleştirdiğini ve nöronal hasarın da bununla ilgili olduğunu ortaya koymuştur (115, 116). ProBDNF aracılığıyla p75NTR'nin RhoA/ROCK yolunu aktifleştirmesi, nöronal apoptoz ve sinaptik hasarı arttırır bu da epileptik nöbetlerin ortaya çıkmasına sebep olur. Özellikle Rho-ROCK inhibitörlerinin kullanımı, epilepsi modellerinde nöronal hasarı azaltmada umut verici sonuçları ortaya koymuştur.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemeler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemeler ile bunların üretici firma ve modelleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Üretici Firma/Model
Vibrasyonlu mikrotom	Leica VT-1000S
Pipet çekici	Sutter P-1000
Titreşimsiz masa	TMC 6300
Motorize mikro pozisyonlayıcı (manipülatör) ve kontrol ünitesi	Luigs and Neumann
Manuel mikro pozisyonlayıcı	Scientifica LBM7
4 kanallı diferansiyel amplifikatör	A – M systems 1700
Analog – Dijital çevireç	Molecular Devices 1440A
Sabit platformlu yama – kenetleme mikroskobu ve aksesuarları	Nikon FN1
Kızıl ötesi kamera	Till Photonics
Hareketli tabla ve platform	Burleigh
Dijital osiloskop	AA Tech
2 adet masaüstü bilgisayar	Hp
Buzdolabı	Beko
Hassas terazi	Heraus
Buz makinesi	Hoshizaki
Manyetik karıştırıcı	İsolab
Distile su cihazı	Purelab
Otomatik pipet seti	Axygen
pH - metre	Hannah
Çeşitli cam malzemeler	Isolab

Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Kullanılan Cihaz	Kullanım Amacı
Vibrasyonlu mikrotom	Taze beyin kesitlerinin elde edilmesi
Pipet çekici	Beyin kesitlerinden alan potansiyeli kayıtlarında kayıt elektrotu olarak kullanılması
Titreşimsiz masa	Ex vivo kayıt sisteminin mekanik titreşimlerden izolasyonu
Motorize mikro pozisyonlayıcı (manipülâtör) ve kontrol ünitesi	Elektrotun hücrenin zarına yaklaştırılması ve yumuşak temas sağlanması
Manuel mikro pozisyonlayıcı	Elektrotun kesitle hassas teması
4 kanallı diferansiyel amplifikatör	Kesitlerden elde edilen alan potansiyellerinin filtrelenmesi ve amplifikasyonu
Analog – Dijital çevireç	Sinyallerin dijital hale çevrilmesi ve verilen kenetleme komutlarının amplifikatöre iletilmesi
Sabit platformlu yama – kenetleme mikroskobu ve aksesuarları	Kesitlerin anatomik olarak tanımlanması, yüksek magnifikasyonda nöronların görsel olarak tanımlanması ve pipetin istenen nörona görsel olarak yaklaştırılması
Kızıl ötesi kamera	Kesitlerin derin odak yüzeylerinden daha net görüntü elde edilmesi
Hareketli tabla ve platform	Mikroskobun hareket ettirilmesi ve manipülâtörlerin sabitlenmesi
Dijital osiloskop	Sinyallerin doğrulanması ve kontrolü
2 adet masaüstü bilgisayar	Veri kazanımı ve analizlerin yapılması
Hassas terazi	Kimyasalların hassas ağırlık ölçümlerinin yapılması
Otomatik pipet seti	Çözeltilerin hazırlanması
pH - metre	Çözeltilerin pH ölçümleri ve ayarlanması
Su banyosu	Kesitlerin dinlendirilmesi sırasında haznenin sıcaklık kontrolünün sağlanması

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar üretici firmaları ile birlikte Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ile üretici firmaları

Kullanılan Kimyasal	Üretici Firma
Sodyum klorür	Sigma - Aldrich
Potasyum klorür	Sigma - Aldrich
Monosodyum fosfat	Sigma - Aldrich
Sodyum bikarbonat	AFG Bioscience LLC
Kalsiyum klorür	LOBA Chemie
Magnezyum klorür	Merck
D-Glukoz	Sigma - Aldrich
4 - Aminopiridin	Sigma - Aldrich
ANA - 12	BLDPharm
LM11A - 31	Cayman

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları

KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na yapılan 2023/20 protokol numaralı karar (Bkz. Ek 1 Etik Kurul Onayı) ile etik kurul onayı alındıktan sonra 6 - 8 haftalık erkek, 16 adet C57BL/6 ırkına ait yabani tip fareler üretildikleri ve barındırıldıkları KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

3.2.2. Kullanılan Stok Solüsyonlar ve İlaç Moleküllerinin Hazırlanması

Solüsyon A [120 mM sodyum klorür (NaCl), 2.5 mM potasyum klorür (KCl), 1 mM sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)]: 70.128 g NaCl, 1.8637 g KCl ve 1.2 g NaH_2PO_4 tartıldı ve bir miktar saf su eklenerek kapağı kapatıldı. Manyetik karıştırıcıya bırakılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Tamamen çözünen çözelti saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Deney günü taze kullanım için buzdolabının 4 °C'lik bölümüne kaldırıldı.

Solüsyon B [25 mM sodyum bikarbonat (NaHCO_3)]: 20.003 g NaHCO_3 tartıldı ve bir miktar saf su eklenerek kapağı kapatıldı. Manyetik karıştırıcıya bırakılarak tamamen

çözünmesi sağlandı. Tamamen çözünen çözelti saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Deney günü taze kullanım için buzdolabının 4 °C'lik bölümüne kaldırıldı.

Ca⁺² [2 mM kalsiyum klorür (CaCl₂)] Solüsyonu; 5.881 g tartıldı ve bir miktar saf su eklendi. Tamamen çözünmesi sağlandı. Tamamen çözünen çözelti saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Deney günü taze kullanım için buzdolabının 4 °C'lik bölümüne kaldırıldı.

Mg⁺² [1 mM magnezyum klorür (MgCl₂)] Solüsyonu; 1.9 g tartıldı ve bir miktar saf su eklendi. Tamamen çözünmesi sağlandı. Tamamen çözünen çözelti saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Deney günü taze kullanım için buzdolabının 4 °C'lik bölümüne kaldırıldı.

10 µM Olacak Şekilde ANA-12 Molekülünün Hazırlanması; 20 günlük çalışma için toplam 5 L yBOS harcanacağı planlararak hesaplama yapıldı. 20.3745 g ANA-12 molekülü alınarak, suda çözünmediği için, 4 mL DMSO'da çözdürüldü. 4 mL örnek alınıp 20 ependorfa eşit şekilde bölündü. Ependorflara molekül ismi ve tarih yazıldı. Her bir ependorf deney gününde 250 mL yBOS'na eklenecek şekilde buzdolabının -20 °C bölümüne kaldırıldı.

100 nM Olacak Şekilde LM11A-31 Molekülünün Hazırlanması; 20 günlük çalışma için toplam 5 L yBOS harcanacağı planlanarak hesaplama yapıldı. Hesaplama sonucu çok düşük bir kütle çıktığı için eldeki bütün molekül, suda çözünmediği için, 1 mL DMSO içerisinde çözdürüldü. Çözdürülen 1 mL örnek içerisinde 6.4 µL alınıp farklı bir ependorfa aktarıldı. Örnek 4 mL DMSO içerisine eklendi. 4 mL örnek alınıp 20 ependorfa eşit şekilde bölündü. Ependorflara molekül ismi ve tarih yazıldı. Her bir ependorf deney gününde 250 mL yBOS'na eklenecek şekilde buzdolabının -20 °C bölümüne kaldırıldı.

3.2.3. Taze Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

yBOS'nın hazırlanışı; Her deney gününde taze kullanılan yBOS 1000 mL olacak şekilde hazırlandı. 100 mL solüsyon A, 100 mL solüsyon B, 25 mL Ca⁺² solüsyonu ve 25 mL Mg⁺² solüsyonu balon jojede karıştırıldı ve saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon oksijenlenmeye bırakıldı. Deneyde kullanılmadan önce yaklaşık 40 dk boyunca oksijen tüpüne bağlanarak oksijene doyurulması sağlandı.

Kesme solüsyonunun hazırlanışı; Taze beyin kesitlerinin alınmasında diseksiyon sırasında metabolizmayı yavaşlatmak amacıyla soğuk ve Ca⁺² içermeyen ve kesme solüsyonu adı verilen bir yBOS hazırlandı. 50 mL solüsyon A, 50 mL solüsyon B, 12.5 mL Mg⁺² solüsyonu balon jojede karıştırıldı ve saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Deneyde

kullanılmadan önce buzun içine yerleştirilerek sıcaklığının 1-2 °C olması sağlandı. Aynı zamanda oksijen tüpüne bağlanarak oksijene doyurulması sağlandı.

3.2.3.1. İlaçlı Solüsyonların Hazırlanması

İlaçlı solüsyonlar çalışma yapılacak günlerde, taze beyin kesitleri yBOS içerisinde dinlendirilirken, taze olarak hazırlanan ve devamlı olarak oksijenlenen yBOS kullanılarak hazırlandı.

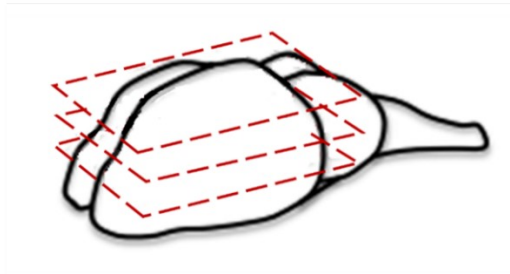
ANA-12 (10 μ M)'li solüsyonun hazırlanışı; Daha önce hazırlanmış ve -20 °C'de saklanan ANA-12 stok molekülüne ait ependorf alındı, 250 mL yBOS içerisine, balon joje dairesel olarak çalkalanarak, eklendi. Süperfüzyon çemberine ait şişelere dolduruldu ve oksijenlenmeye bırakıldı.

LM11A-31 (100 nM)'li solüsyonun hazırlanışı; Daha önce hazırlanmış ve -20 °C'de saklanan ANA-12 stok molekülüne ait ependorf alındı, 250 mL yBOS içerisine, balon joje dairesel olarak çalkalanarak, eklendi. Süperfüzyon çemberine ait şişelere dolduruldu ve oksijenlenmeye bırakıldı.

3.2.4. Taze Beyin Kesitlerinin Alınması

KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen yabani tip hayvan dekapite edildi. Kafatası içerisindeki beyin zarar verilmeden çıkartıldı. Kesilen beyin 4 dk olacak şekilde kesme solüsyonunda bekletildi. Kesme solüsyonu içerisinde 4 dk bekleyen beyinden şekil 12a'da gösterildiği gibi horizontal olacak şekilde 370 μ m kalınlığında kesitler elde edildi. Kesitler vibrasyonlu mikrotom (Leica VT-1000S) kullanılarak alındı.

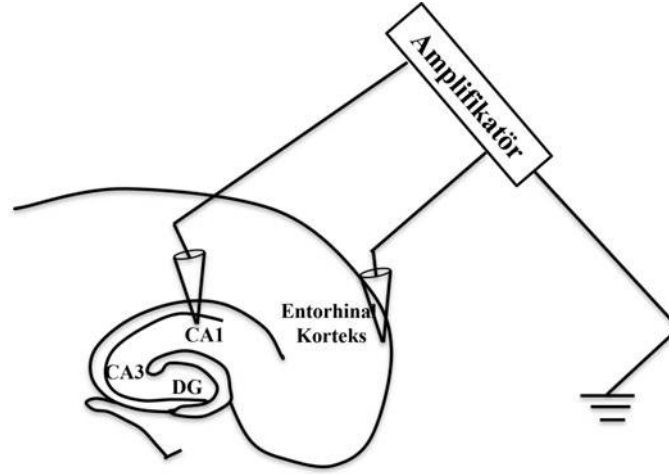
a)



b)



Şekil 12. Fare beyninden horizontal düzlemde kesitlerin alınması ve oksijenlenmesi

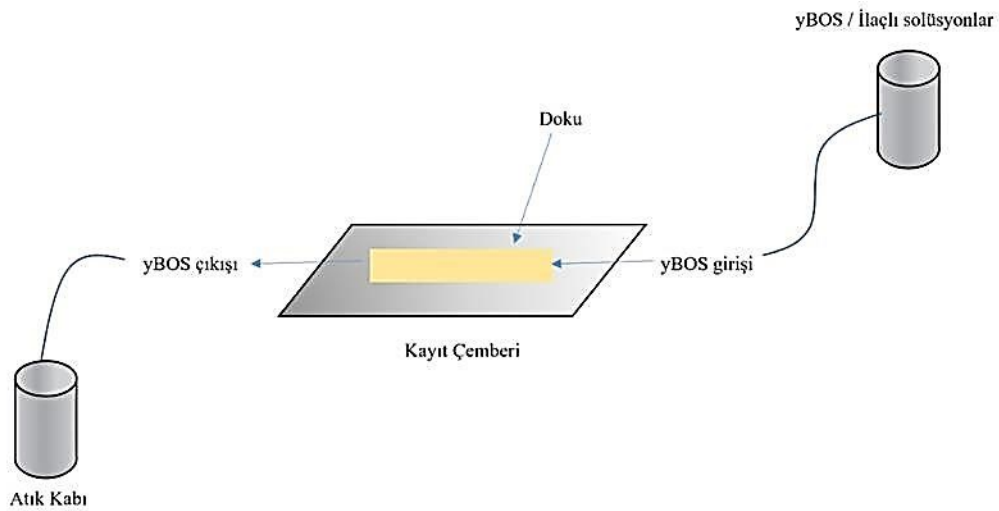


Şekil 14. Kesite yerleştirilen elektrotların konumu

Elektrotlar sırasıyla amplifikatör, A/D çevireç ve bilgisayara sinyal taşımaktadır. Elektrotlardan alınan sinyalin büyüklüğü diferansiyel amplifikatörde artırılır. Artan sinyal A/D çevireç sayesinde analog halden dijital hale dönüştürülür. Dijital haldeki sinyal bilgisayarda görüntülenir ve kaydedilir.

3.2.5.1. Bazal Kayıtların Alınması

Kesitler alındıktan ve gerekli solüsyonlar hazırlandıktan sonra kayıt işlemine geçildi. Şekil 15'teki düzenek kullanarak kayıt haznesinin içerisinden sıcaklığı 29–30 °C olan ve devamlı olarak oksijenlenen yBOS'un geçişi sağlandı.



Şekil 15. Kayıt haznesine giren ve hazneden çıkan yBOS'nın gösterilmesi

ANA-12’li Bazal Kayıtların Alınması

1. Sıcak su banyosunda 1 saat yBOS içerisinde dinlendirilmiş ve oksijenlenmiş kesitlerden bir tanesi pipetle alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
2. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
3. Bilgisayardan AxoScope 10.7 programı açıldı ve çift kanalla kayıt edebilmeyi mümkün kılan protokol seçildi.
4. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
5. Kayıt haznesi içerisindeki yBOS’nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
6. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 20 dk, herhangi bir manipüleye maruz bırakılmadan, yBOS içerisinde bekletildi.
7. 20 dk sonunda 15 dk’lık bazal kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
8. 15 dk kayıt sonunda içerisine ANA-12 molekülü eklenmiş olan yBOS’nın kayıt haznesi akışı sağlandı.
9. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
10. 20 dk sonunda 15 dk’lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
11. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
12. İkinci kesit su banyosu içerisinden pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
13. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
14. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
15. Kayıt haznesi içerisindeki yBOS’nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.

16. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 20 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, yBOS içerisinde bekletildi.
17. 20 dk sonunda 15 dk'lık bazal kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
18. 15 dk kayıt sonunda içerisine ANA-12 molekülü eklenmiş olan yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
19. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
20. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
21. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
22. Üçüncü kesit su banyosu içerisinden pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
23. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
24. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
25. Kayıt haznesi içerisindeki yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
26. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 20 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, yBOS içerisinde bekletildi.
27. 20 dk sonunda 15 dk'lık bazal kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
28. 15 dk kayıt sonunda içerisine ANA-12 molekülü eklenmiş olan yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
29. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
30. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.

31. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
32. Dördüncü kesit su banyosu içerisinde pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
33. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
34. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
35. Kayıt haznesi içerisindeki yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
36. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 20 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, yBOS içerisinde bekletildi.
37. 20 dk sonunda 15 dk'lık bazal kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
38. 15 dk kayıt sonunda içerisine ANA-12 molekülü eklenmiş olan yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
39. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
40. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.

Bir günlük çalışmayla dört kesitten; biri hipokampusun CA1 bölgesi, diğeri medial entorhinal korteks olacak şekilde ikiye, toplam sekiz kayıt elde edildi. Bu protokol farklı günlerde birkaç kez uygulanarak hipokampus CA1 ve entorhinal korteks bölgelerinin her ikisi için de n sayısının 8 olması sağlandı.

LM11A-31'li Bazal Kayıtların Alınması

1. Sıcak su banyosunda 1 saat yBOS içerisinde dinlendirilmiş ve oksijenlenmiş kesitlerden bir tanesi pipetle alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
2. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
3. Bilgisayardan AxoScope 10.7 programı açıldı ve çift kanalla kayıt edebilmeyi mümkün kılan protokol seçildi.

4. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
5. Kayıt haznesi içerisindeki yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
6. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 20 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, yBOS içerisinde bekletildi.
7. 20 dk sonunda 15 dk'lık bazal kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
8. 15 dk kayıt sonunda içerisine LM11A-31 molekülü eklenmiş olan yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
9. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
10. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
11. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
12. İkinci kesit su banyosu içerisinde pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
13. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
14. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
15. Kayıt haznesi içerisindeki yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
16. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 20 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, yBOS içerisinde bekletildi.
17. 20 dk sonunda 15 dk'lık bazal kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
18. 15 dk kayıt sonunda içerisine LM11A-31 molekülü eklenmiş olan yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
19. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.

20. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
21. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
22. Üçüncü kesit su banyosu içerisinde pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
23. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
24. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
25. Kayıt haznesi içerisindeki yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
26. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 20 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, yBOS içerisinde bekletildi.
27. 20 dk sonunda 15 dk'lık bazal kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
28. 15 dk kayıt sonunda içerisine LM11A-31 molekülü eklenmiş olan yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
29. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
30. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
31. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
32. Dördüncü kesit su banyosu içerisinde pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
33. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
34. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.

35. Kayıt haznesi içerisindeki yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
36. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 20 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, yBOS içerisinde bekletildi.
37. 20 dk sonunda 15 dk'lık bazal kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
38. 15 dk kayıt sonunda içerisine LM11A-31 molekülü eklenmiş olan yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
39. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
40. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.

Bir günlük çalışmayla dört kesitten; biri hipokampusun CA1 bölgesi, diğeri medial entorhinal korteks olacak şekilde ikişer, toplam sekiz kayıt elde edildi. Bu protokol farklı günlerde birkaç kez uygulanarak hipokampus CA1 ve entorhinal korteks bölgelerinin her ikisi için de n sayısının 9 olması sağlandı.

3.2.5.2. Epilepsi Oluşturulmuş Kesitlerde Kayıtların Alınması

Kesitlerde epilepsi oluşturulabilmesi için 4-AP (100 µM) kullanıldı. 1000 mL yBOS hazırlanırken bir ependorf 4-AP çözdürüldü ve içerisine eklendi. 250 mL ilaçlı solüsyon da hazırlanan bu 4-AP'li yBOS kullanılarak hazırlandı.

Kesitler alındıktan ve gerekli solüsyonlar hazırlandıktan sonra kayıt işlemine geçildi. Kayıt haznesinin içerisinden sıcaklığı 29–30 °C olan ve devamlı olarak oksijenlenen 4-AP (100 µM)'li yBOS'nın geçişi sağlandı.

Epilepsi Oluşturulmuş Kesitlerde ANA-12'li Kayıtların Alınması

1. Sıcak su banyosunda 1 saat yBOS içerisinde dinlendirilmiş ve oksijenlenmiş kesitlerden bir tanesi pipetle alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
2. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
3. Bilgisayardan AxoScope 10.7 programı açıldı ve çift kanalla kayıt edebilmeyi mümkün kılan protokol seçildi.

4. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
5. Kayıt haznesi içerisindeki 4-AP'li yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
6. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 50 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, 4-AP'li yBOS içerisinde bekletildi.
7. 50 dk sonunda 15 dk'lık kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
8. 15 dk kayıt sonunda içerisine ANA-12 molekülü eklenmiş olan 4-AP'li yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
9. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
10. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
11. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
12. İkinci kesit su banyosu içerisinde pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
13. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
14. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
15. Kayıt haznesi içerisindeki 4-AP'li yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
16. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 50 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, 4-AP'li yBOS içerisinde bekletildi.
17. 50 dk sonunda 15 dk'lık kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
18. 15 dk kayıt sonunda içerisine ANA-12 molekülü eklenmiş olan 4-AP'li yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
19. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.

20. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
21. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
22. Üçüncü kesit su banyosu içerisinde pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
23. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
24. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
25. Kayıt haznesi içerisindeki 4-AP'li yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
26. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 50 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, 4-AP'li yBOS içerisinde bekletildi.
27. 50 dk sonunda 15 dk'lık kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
28. 15 dk kayıt sonunda içerisine ANA-12 molekülü eklenmiş olan 4-AP'li yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
29. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
30. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.

Bir günlük çalışmayla üç kesitten; biri hipokampusun CA1 bölgesi, diğeri medial entorhinal korteks olacak şekilde ikişer, toplam altı kayıt elde edildi. Bu protokol farklı günlerde birkaç kez uygulanarak hipokampus CA1 bölgesi için n sayısının 11; entorhinal korteks bölgesi için n sayısının 15 olması sağlandı.

Epilepsi Oluşturulmuş Kesitlerde LM11A-31'li Kayıtların Alınması

1. Sıcak su banyosunda 1 saat yBOS içerisinde dinlendirilmiş ve oksijenlenmiş kesitlerden bir tanesi pipetle alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
2. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.

3. Bilgisayardan AxoScope 10.7 programı açıldı ve çift kanalla kayıt edebilmeyi mümkün kılan protokol seçildi.
4. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
5. Kayıt haznesi içerisindeki 4-AP'li yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
6. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 50 dk, herhangi bir manipüleye maruz bırakılmadan, 4-AP'li yBOS içerisinde bekletildi.
7. 50 dk sonunda 15 dk'lık kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
8. 15 dk kayıt sonunda içerisine LM11A-31 molekülü eklenmiş olan 4-AP'li yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
9. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
10. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
11. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
12. İkinci kesit su banyosu içerisinde pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
13. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
14. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
15. Kayıt haznesi içerisindeki 4-AP'li yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
16. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 50 dk, herhangi bir manipüleye maruz bırakılmadan, 4-AP'li yBOS içerisinde bekletildi.
17. 50 dk sonunda 15 dk'lık kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.

18. 15 dk kayıt sonunda içerisine LM11A-31 molekölü eklenmiş olan 4-AP'li yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
19. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
20. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
21. Kayıt haznesi içerisindeki ilaçlı solüsyon yıkandı ve kayıt haznesine tekrardan yBOS dolduruldu.
22. Üçüncü kesit su banyosu içerisinde pipet yardımıyla alınarak kayıt haznesi içerisine yerleştirildi.
23. Yerleştirilen kesit mikroskopta görüntülendi ve konumu ayarlandı.
24. Konumu tam olarak ayarlanan kesitin hipokampusunun CA1 bölgesine bir elektrot, medial entorhinal korteks bölgesine diğer elektrot yerleştirildi. Elektrotların konumları tekrar tekrar kontrol edildi.
25. Kayıt haznesi içerisindeki 4-AP'li yBOS'nın sıcaklığı ölçüldü, 29–30 °C olması sağlandı.
26. Elektrotları yerleştirilen kesit yaklaşık 50 dk, herhangi bir manipüleyle maruz bırakılmadan, 4-AP'li yBOS içerisinde bekletildi.
27. 50 dk sonunda 15 dk'lık kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.
28. 15 dk kayıt sonunda içerisine LM11A-31 molekölü eklenmiş olan 4-AP'li yBOS'nın kayıt haznesine akışı sağlandı.
29. Akan solüsyonun 20 dk boyunca kesite perfüze olması beklendi.
30. 20 dk sonunda 15 dk'lık ilaçlı kayıt alınarak bilgisayarda uygun klasöre kaydedildi.

Bir günlük çalışmayla üç kesitten; biri hipokampusun CA1 bölgesi, diğeri medial entorhinal korteks olacak şekilde ikişer, toplam altı kayıt elde edildi. Bu protokol farklı günlerde birkaç kez uygulanarak hipokampus CA1 ve entorhinal korteks bölgelerinin her ikisi için de n sayısının 11 olması sağlandı.

3.2.6. Elektrofizyolojik Kayıtların Analiz Edilmesi

Elde edilen bazal kayıtlar, ANA-12 (10 μ M) molekülüne ait kayıtlar ve LM11A-31 (100 nM) molekülüne ait kayıtlar kaydedildiği klasörlerden Clampfit 10.7 uygulaması kullanılarak açıldı. Biyolojik sinyallerin daha görünür olması ve epileptik deşarjların fark edilebilir hale gelmesi için düşük geçiren filtreden geçirildi. Düşük geçiren filtrede 280 Hz ve altı filtre edildi. Ayrıca şehir cereyanı denilen 50 Hz'lik gürültü ve harmonikleri de filtre edilerek kayıt dosyaları filtreli şekilde uygun klasörlere tekrardan kaydedildi.

Gürültüden arındırılmış kayıt dosyaları, güç analizleri için Clampfit 10.7 uygulaması kullanılarak açıldı. Güç spektrumu sekmesinden Hamming formülü kullanılarak analiz edildi. 50 Hz frekansa kadar elde edilen değerler Microsoft Excel 2016 programı kullanılarak not edildi. Elde edilen değerler toplandı ve son değer yeni bir Microsoft Excel sayfasına not edildi. Her bazal, ANA-12 (10 μ M) molekülüne ait kayıtlar ve LM11A-31 (100 nM) molekülüne ait kayıtlar için ilaç uygulamadan öncesi ve ilaç uygulaması sonrası olmak üzere bu işlem uygulandı.

Gürültüden arındırılmış kayıt dosyalarında elde edilen epilepsi benzeri olaylar frekans, süre ve genliklerinin karşılaştırılabilmesi için tek tek incelendi. Her bazal, ANA-12 (10 μ M) molekülüne ait kayıtlar ve LM11A-31 (100 nM) molekülüne ait kayıtlar için ilaç uygulamadan öncesi ve ilaç uygulaması sonrasında elde edilen olayların süreleri ve genlikleri Microsoft Excel 2016 uygulaması kullanılarak tek tek not edildi. Ortalamaları alınarak ilaç uygulaması öncesi ve ilaç uygulanması sonrası elde edilen veriler karşılaştırıldı.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Deney verilerinin analizi GraphPad Prism 8.0.2. programı kullanılarak yapıldı. İlk olarak bazal, ANA-12 (10 μ M) molekülüne ait kayıtlar ve LM11A-31 (100 nM) molekülüne ait kayıtlar için hem ilaç uygulamadan öncesi hem de ilaç uygulaması sonrasında elde edilen toplam güç, frekans, genlik ve süre verilerinin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testiyle kontrol edildi. Normal dağılıma uyan ($p>0,05$) verilerde Bağımlı Örneklem T Testi kullanıldı, p değeri 0,05'ten küçük çıkan değerler anlamlı kabul edildi. Normal dağılıma uymayan verilerde ($p<0,05$) Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi (Bağımlı örneklem T-testi) kullanıldı, p değeri 0,05'ten küçük çıkan değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Analizleri GraphPad Prism 8.0.2. programı kullanılarak yapılan, normal dağılıma uyup uymadığı kontrol edilen toplam güç, frekans, genlik ve süre verilerinin yine aynı uygulama üzerinden çizgi grafikleri oluşturuldu.

Taze beyin kesitlerinden elde edilen güç spektrumu, beyinde lokal olarak izlenen elektriksel aktivitenin frekans dağılımını ve yoğunluğunu gösteren bir bulgudur. Elektrofizyolojik kayıtlara ait, 4-AP (100 μ M) uygulaması ve sonrasında sırasıyla ANA-12 (10 μ M) ve LM11A-31 (100 nM) uygulamaları sonrasında ait güç spektral yoğunluk dağılımını gösteren görseller oluşturuldu. İlaçların, epilepsi oluşturulmuş kesitlerdeki etkisi güç spektrumlarından yola çıkarak incelendi.

Alınan bazal kayıtlarda hem hipokampusta hem de entorhinal kortekste epilepsi benzeri olaylara rastlanmadı. Böylece ANA-12 (10 μ M) ve LM11A-31 (100 nM)'in epileptik bir etkisinin olmadığı bulundu.

4.1.1., 4.1.2., 4.2.1. ve 4.2.2. numaralı bölümlerde kullanılan görsellerde belirtilen 'önce' ifadesi taze beyin kesitine 4-AP (100 μ M) uygulandıktan sonra elde edilen kayıttan ortaya çıkan verileri ifade ederken; 'sonra' ifadesi 4-AP (100 μ M) uygulanmış taze beyin kesitine ilgili ilaç eklendikten sonra elde edilen kayıttan ortaya çıkan verileri ifade etmektedir.

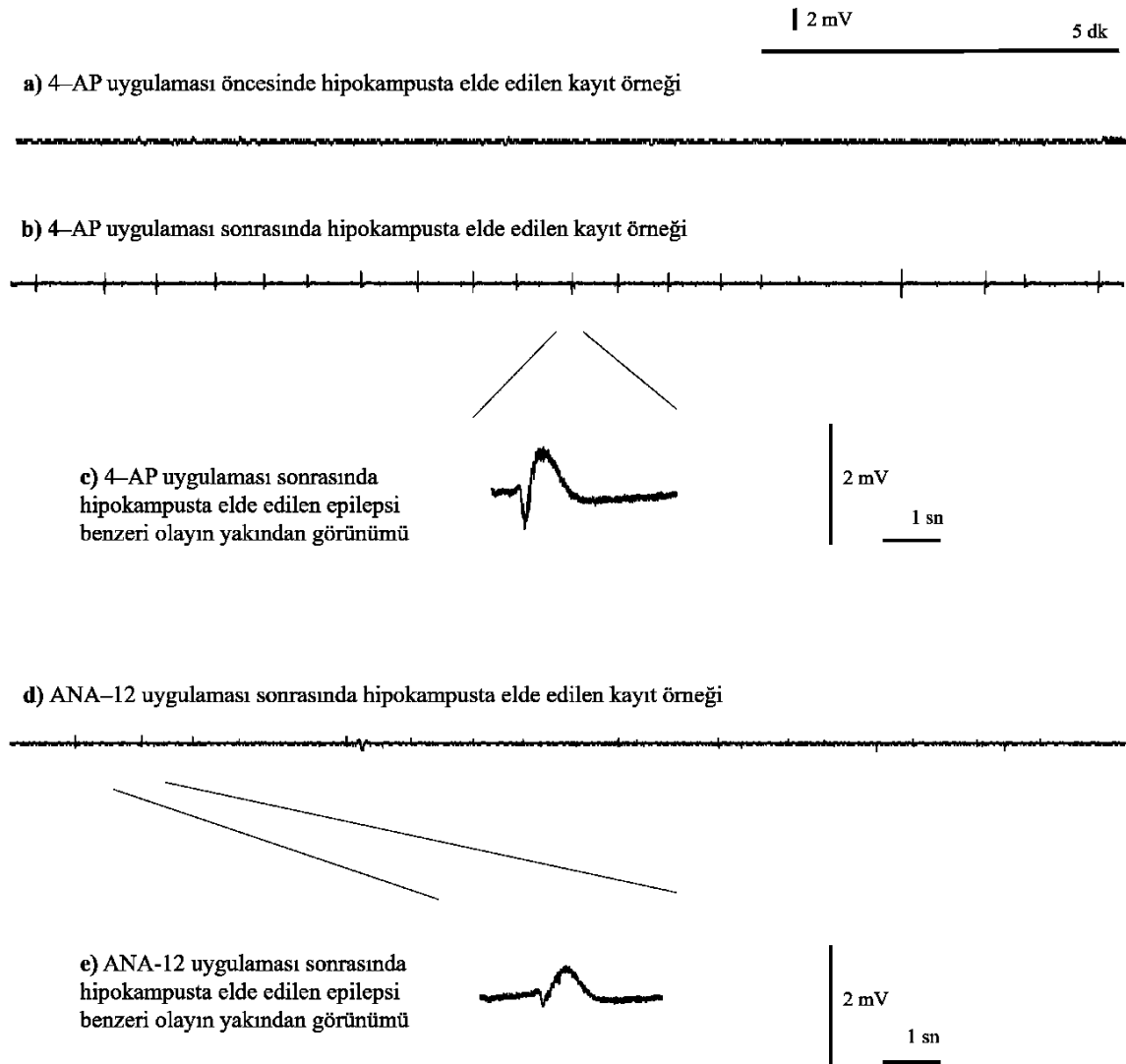
Genel olarak bakıldığında; dinlendirilmiş taze beyin kesitlerinde ilk 15 dk'lık kayıta epilepsi benzeri olaylar gözlenmemiştir. 4-AP (100 μ M) uygulaması sonrası hem hipokampusta hem de entorhinal kortekste epilepsi benzeri olaylar oluşurken; hipokampusta ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların genliğinin entorhinal kortekstekilerden daha düşük olduğu gözlenmiştir.

4.1. ANA-12'nin Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular

Bağımlı örneklem T-testi kullanılarak yapılan analizler sonucunda: ANA-12 (10 μ M) molekülünün epilepsi benzeri olayların toplam gücü ve genliği üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmazken; epilepsi benzeri olayların frekansına ve süresine anlamlı bir etkisi olduğu bulundu. Ayrıca ANA-12 (10 μ M) molekülünün eklenmesinin hem hipokampustan hem de entorhinal korteksten elde edilen sinyallere ait güç spektral yoğunluk dağılımına da etkisinin olmadığı görüldü.

Taze beyin kesitine 4-AP (100 μ M) uygulandıktan sonraki ve ilaç (ANA-12/LM11A-31) uygulandıktan sonraki elektrofizyolojik kayıtlara ait örnekler ve kayıtlarda olduğu gözlenen epilepsi benzeri olayların yakından görünümü sırasıyla hipokampus ve entorhinal kortekse ait olmak üzere şekil 16 ve şekil 19’da gösterilmiştir.

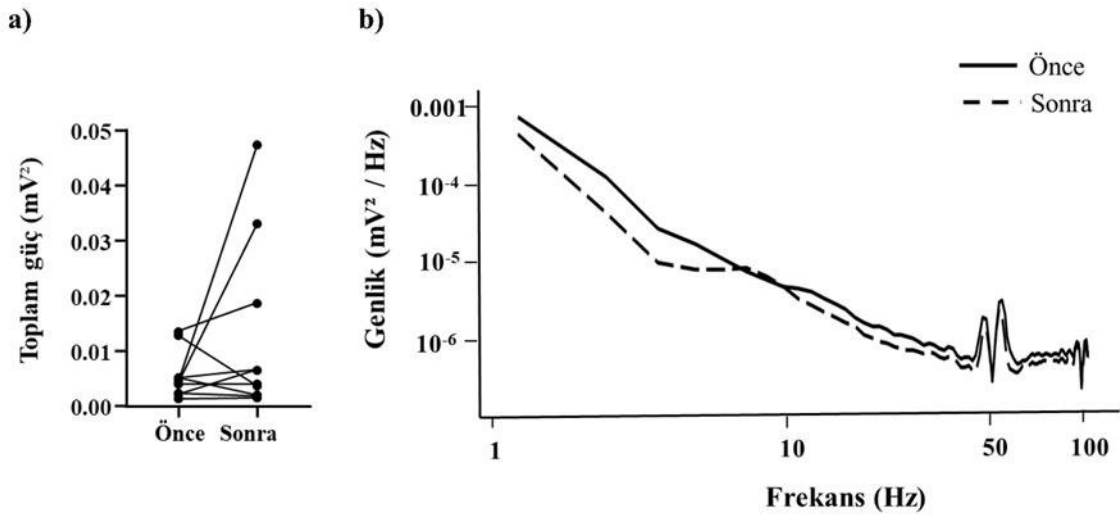
4.1.1. ANA-12’nin Hipokampustaki Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular



Şekil 16. ANA-12’nin hipokampustaki epilepsi benzeri olaylara etkisini gösteren kayıtlar

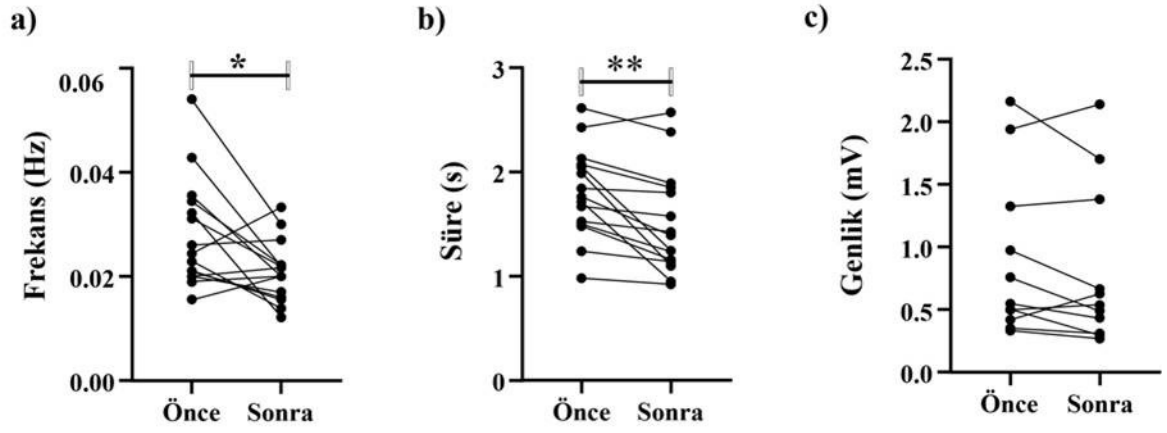
4-AP (100 μ M) uygulanmış taze beyin kesitlerine ANA-12 (10 μ M) molekülünün uygulanması sonrası hipokampustan elde edilen kayıtlarda yapılan analizler sonucunda; hipokampustaki epilepsi benzeri olayların toplam gücü ile 4-AP (100 μ M)’li kayıtlarda

ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların toplam gücü karşılaştırıldığında anlamlılık ortaya çıkmadı ($p > 0.05$; $n=15$; şekil 17a). Güç spektrumuna bakıldığında ise ANA-12 (10 μM) uygulamasının hipokampustan elde edilen sinyallerin güç spektral yoğunluk dağılımına etkisi olmadığı gözlemlendi (Şekil 17b).



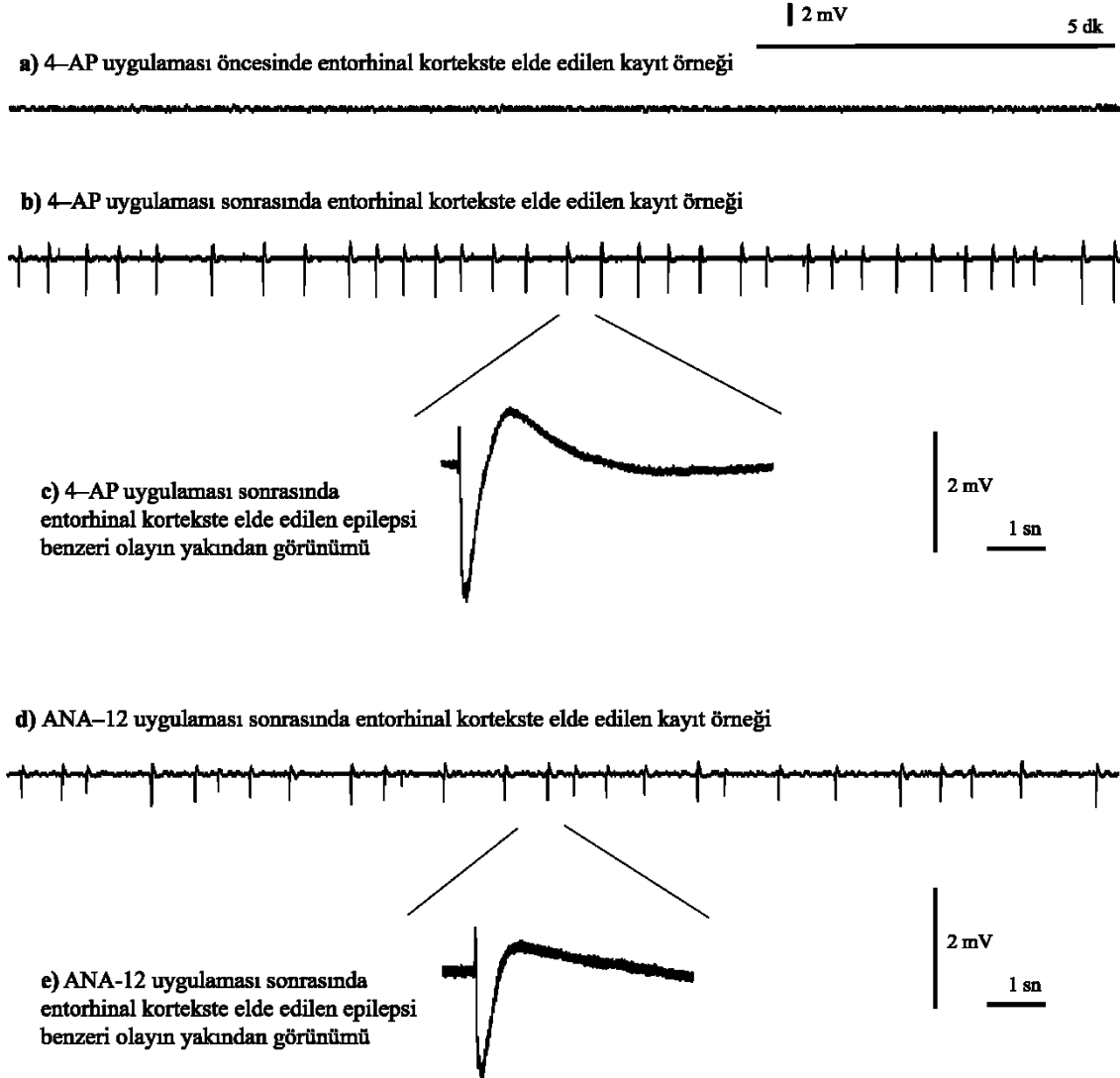
Şekil 17. ANA-12 'nin hipokampustaki epilepsi benzeri olayların toplam gücüne ve güç spektrumuna etkisi

4-AP ile indüklenen, hipokampusta ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların ortalama frekansları 0.02801 ± 0.002695 iken, ANA-12 (10 μM) uygulaması sonrası ortalama frekansların 0.02085 ± 0.001503 olduğu görülmüştür. Böylece ANA-12 (10 μM) uygulaması öncesi ve sonrası hipokampusta ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların frekansı karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalma olduğu bulunmuştur ($p = 0.0141$; $n=15$; şekil 18a). 4-AP ile indüklenen, hipokampusta ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların ortalama süreleri 1.800 ± 0.1117 iken, ANA-12 (10 μM) uygulaması sonrası ortalama sürelerin 1.510 ± 0.1292 olduğu görülmüştür. Böylece ANA-12 (10 μM) uygulaması öncesi ve sonrası hipokampusta ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların süreleri karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalma olduğu bulunmuştur ($p = 0.0023$; $n=15$; 18b). ANA-12 (10 μM) uygulaması sonrası hipokampusta ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların genliği, 4-AP (100 μM)'li kayıtlarda ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların genliğiyle karşılaştırıldığında anlamlılık ortaya çıkmadı ($p > 0.05$; $n=15$; şekil 18c).



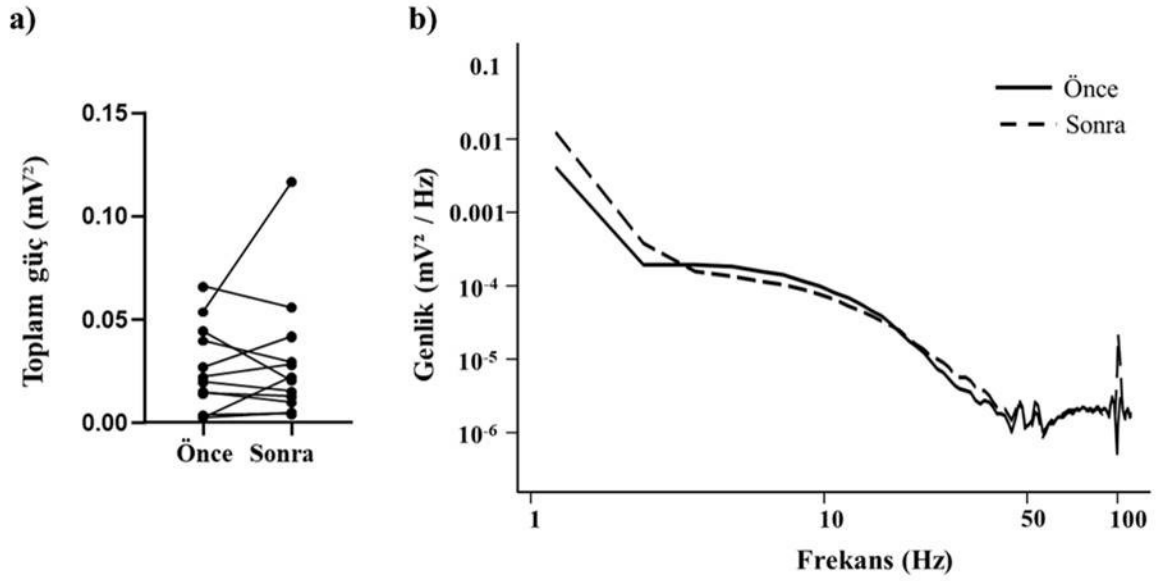
Şekil 18. ANA-12 'nin hipokampustaki epilepsi benzeri olayların frekansına, süresine ve genliğine etkisini gösteren çizgi grafikleri (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, $n=15$)

4.1.2. ANA-12'nin Entorhinal Korteksteki Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular



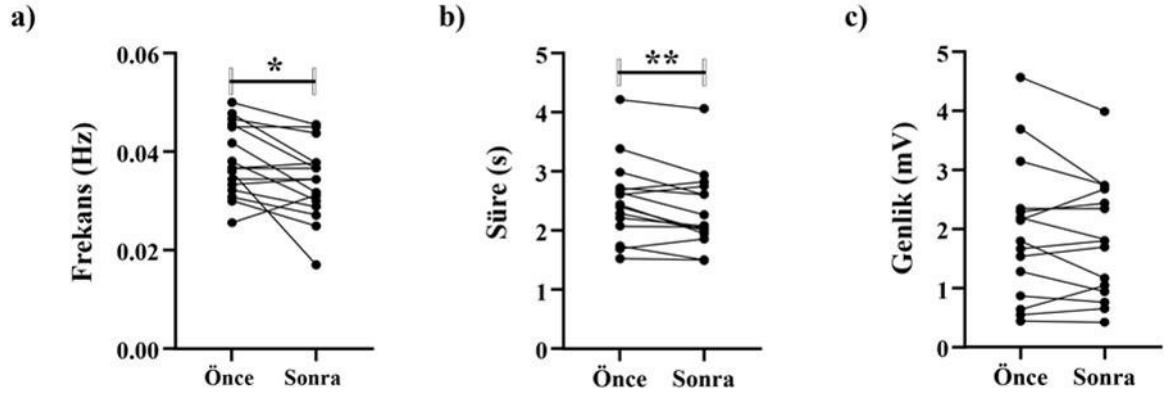
Şekil 19. ANA-12'nin entorhinal korteksteki epilepsi benzeri olaylara etkisini gösteren kayıtlar

4-AP (100 μ M) uygulanmış taze beyin kesitlerine ANA-12 (10 μ M) molekülünün uygulanması sonrası entorhinal korteksten elde edilen kayıtlarda yapılan analizler sonucunda; entorhinal korteksteki epilepsi benzeri olayların toplam gücü ile 4-AP (100 μ M)'li kayıtlarda ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların toplam gücü karşılaştırıldığında anlamlılık ortaya çıkmadı ($p > 0.05$; $n=15$; şekil 20a). Güç spektrumuna bakıldığında ise ANA-12 (10 μ M) uygulamasının entorhinal korteksten elde edilen sinyallerin güç spektral yoğunluk dağılımına etkisi olmadığı gözlemlendi (Şekil 20b).



Şekil 20. ANA-12 'nin entorhinal korteksteki epilepsi benzeri olayların toplam gücüne ve güç spektrumuna etkisi

4-AP ile indüklenen, entorhinal kortekste ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların ortalama frekansları 0.03815 ± 0.001804 iken, ANA-12 ($10 \mu\text{M}$) uygulaması sonrası ortalama frekansların 0.03392 ± 0.001900 olduğu görülmüştür. Böylece ANA-12 ($10 \mu\text{M}$) uygulaması öncesi ve sonrası entorhinal kortekste ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların frekansı karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalma olduğu bulunmuştur ($p = 0.0123$; $n=15$; şekil 21a). 4-AP ile indüklenen, entorhinal kortekste ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların ortalama süreleri 2.508 ± 0.1771 iken, ANA-12 ($10 \mu\text{M}$) uygulaması sonrası ortalama sürelerin 2.334 ± 0.1695 olduğu görülmüştür. Böylece ANA-12 ($10 \mu\text{M}$) uygulaması öncesi ve sonrası entorhinal kortekste ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların süreleri karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalma olduğu bulunmuştur ($p = 0.0088$; $n=15$; şekil 21b). ANA-12 ($10 \mu\text{M}$) uygulaması sonrası entorhinal kortekste ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların genliği, 4-AP ($100 \mu\text{M}$)'li kayıtlarda ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların genliğiyle karşılaştırıldığında anlamlılık ortaya çıkmadı ($p > 0.05$; $n=15$; şekil 21c).



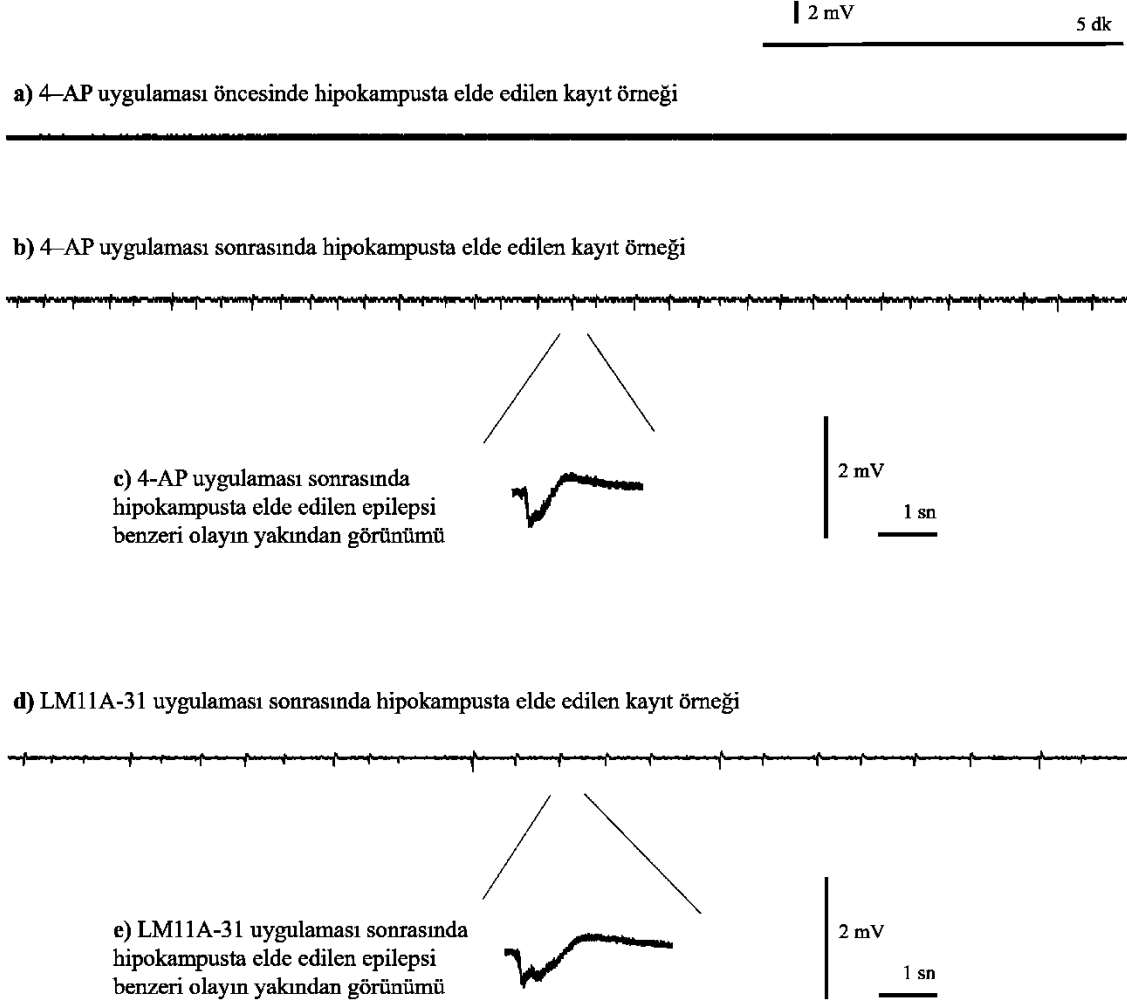
Şekil 21. ANA-12 'nin entorhinal korteksteki epilepsi benzeri olayların frekansına, süresine ve genliğine etkisini gösteren çizgi grafikleri (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, $n=15$)

4.2. LM11A-31'in Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular

Bağımlı örneklem T-testi kullanılarak yapılan analizler sonucunda: LM11A-31 (100 nM) molekülünün epilepsi benzeri olayların toplam gücü, frekansı, süresi ve genliği üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bulundu. Ayrıca LM11A-31 (100 nM) molekülünün eklenmesinin hem hipokampustan hem de entorhinal korteksten elde edilen sinyallere ait güç spektral yoğunluk dağılımına da etkisinin olmadığı görüldü.

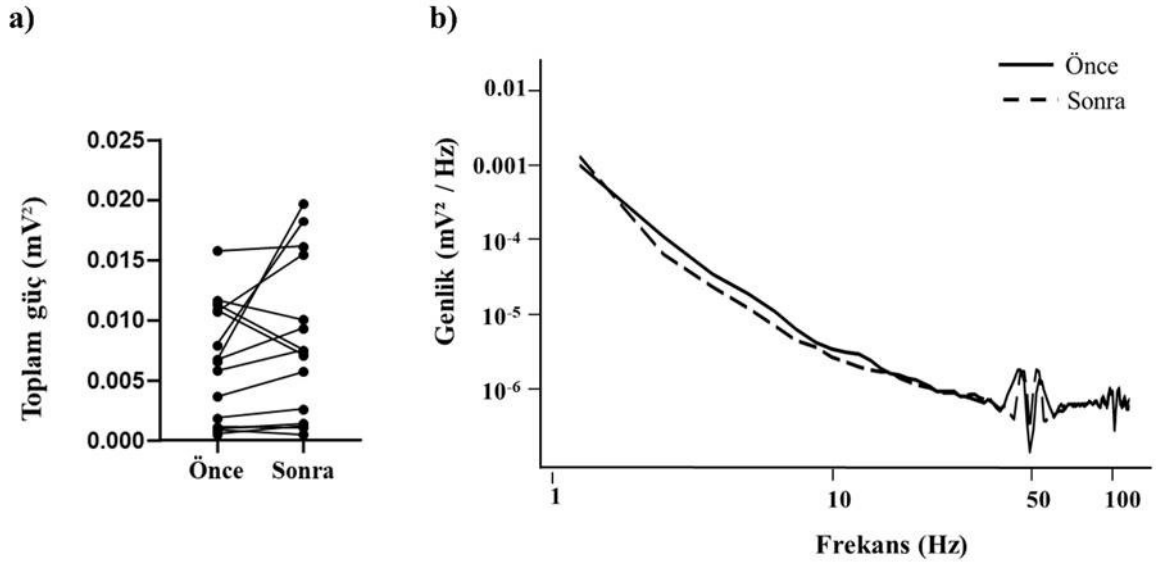
Taze beyin kesitine 4-AP (100 μ M) uygulandıktan sonraki ve ilaç (ANA-12/LM11A-31) uygulandıktan sonraki sonraki elektrofizyolojik kayıtlara ait örnekler ve kayıtlarda olduğu gözlenen epilepsi benzeri olayların yakından görünümü sırasıyla hipokampus ve entorhinal kortekse ait olmak üzere şekil 22 ve şekil 25'te gösterilmiştir.

4.2.1. LM11A-31'in Hipokampustaki Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular



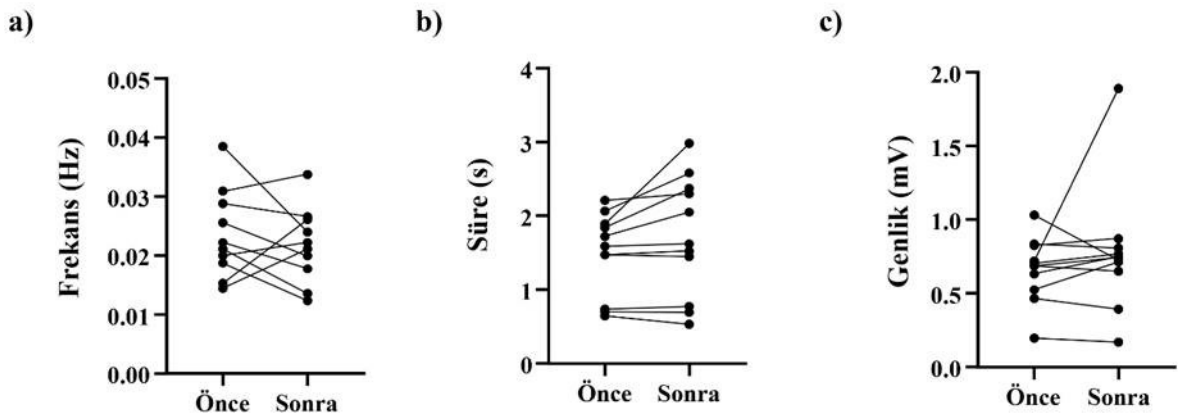
Şekil 22. LM11A-31'in hipokampustaki epilepsi benzeri olaylara etkisini gösteren kayıtlar

4-AP (100 μ M) uygulanmış taze beyin kesitlerine LM11A-31 (100 nM) molekülünün uygulanması sonrası hipokampustan elde edilen kayıtlarda yapılan analizler sonucunda; hipokampustaki epilepsi benzeri olayların toplam gücü ile 4-AP (100 μ M)'li kayıtlarda ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların toplam gücü karşılaştırıldığında anlamlılık ortaya çıkmadı ($p > 0.05$; $n=11$; şekil 23a). Güç spektrumuna bakıldığında ise LM11A-31 (100 nM) uygulamasının hipokampustan elde edilen sinyallerin güç spektral yoğunluk dağılımına etkisi olmadığı gözlemlendi (Şekil 23b).



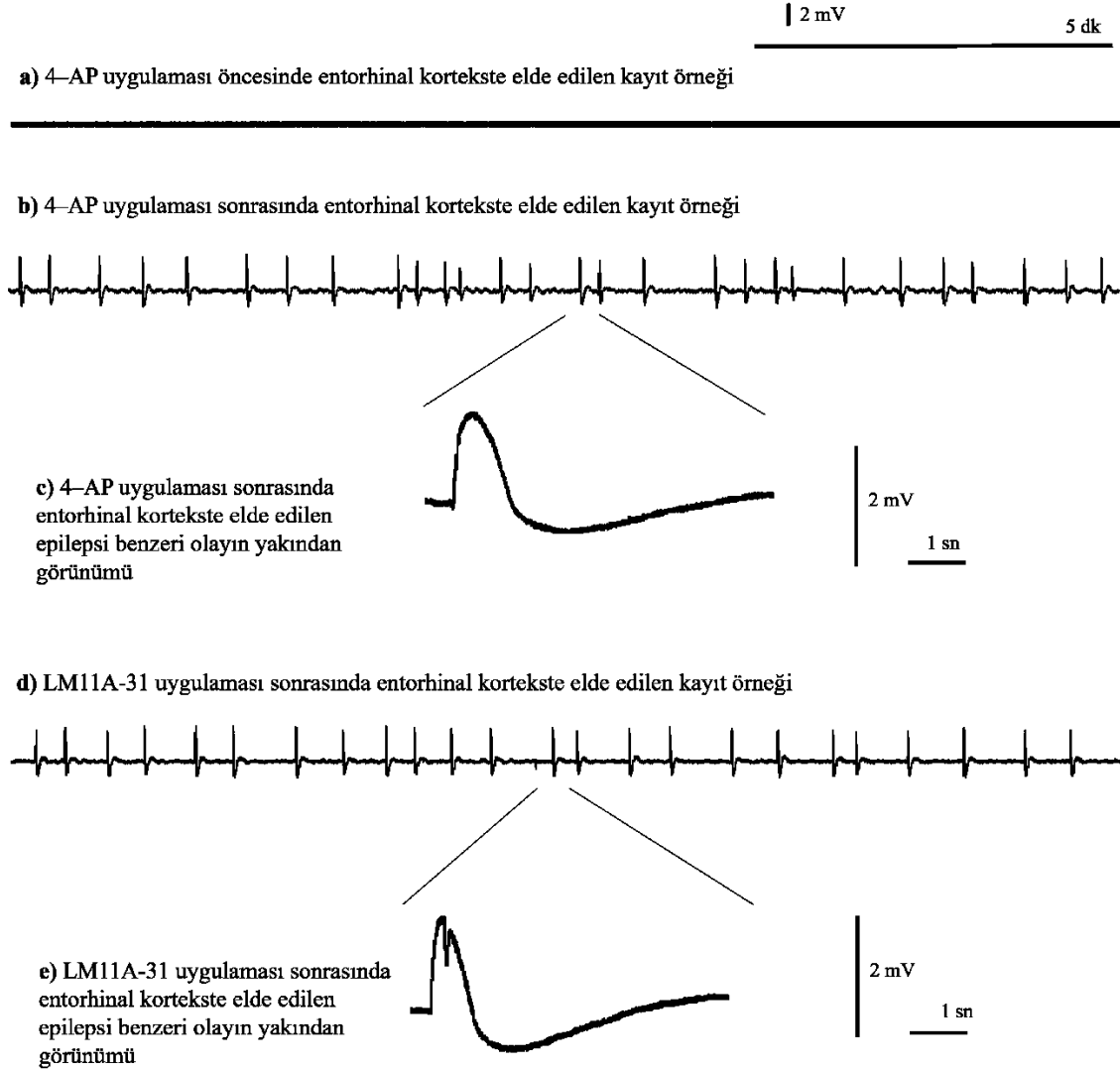
Şekil 23. LM11A-31'in hipokampustaki epilepsi benzeri olayların toplam gücüne ve güç spektrumuna etkisi

4-AP (100 μ M) uygulanmış taze beyin kesitlerine LM11A-31 (100 nM) molekülünün uygulanması sonrası hipokampustan elde edilen kayıtlarda yapılan analizler sonucunda; hipokampustaki epilepsi benzeri olayların frekansı, süresi ve genliği ile 4-AP (100 μ M)'li kayıtlarda ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların frekansı, süresi ve genliği karşılaştırıldığında anlamlılık ortaya çıkmadı ($p > 0.05$; $n=11$; şekil 24a, 24b ve 24c).



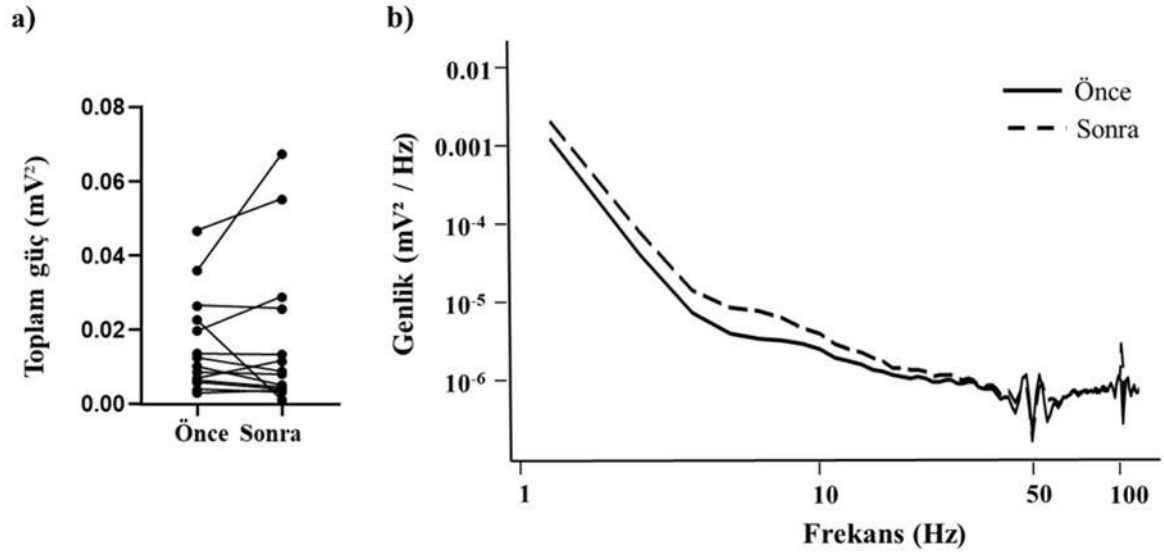
Şekil 24. LM11A-31'in hipokampustaki epilepsi benzeri olayların frekansına, süresine ve genliğine etkisini gösteren çizgi grafikleri ($n=11$)

4.2.2. LM11A-31'in Entorhinal Korteksteki Uyarılabilirlik ve Epilepsi Benzeri Olaylara Etkisine Ait Bulgular



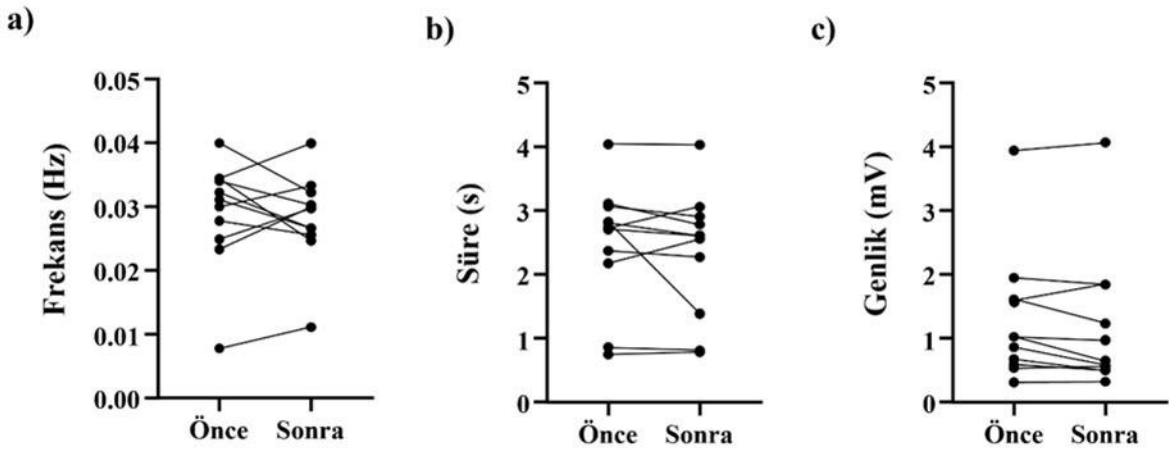
Şekil 25. LM11A-31'in entorhinal korteksteki epilepsi benzeri olaylara etkisini gösteren kayıtlar

4-AP (100 μ M) uygulanmış taze beyin kesitlerine LM11A-31 (100 nM) molekülünün uygulanması sonrası entorhinal korteksten elde edilen kayıtlarda yapılan analizler sonucunda; entorhinal korteksteki epilepsi benzeri olayların toplam gücü ile 4-AP (100 μ M)'li kayıtlarda ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların toplam gücü karşılaştırıldığında anlamlılık ortaya çıkmadı ($p > 0.05$; $n=11$; şekil 26a). Güç spektrumuna bakıldığında ise LM11A-31 (100 nM) uygulamasının entorhinal korteksten elde edilen sinyallerin güç spektral yoğunluk dağılımına etkisi olmadığı gözlemlendi (Şekil 26b).



Şekil 26. LM11A-31'in entorhinal korteksteği epilepsi benzeri olayların toplam gücüne ve güç spektrumuna etkisi

4-AP (100 μ M) uygulanmış taze beyin kesitlerine LM11A-31 (100 nM) molekülünün uygulanması sonrası entorhinal korteksten elde edilen kayıtlarda yapılan analizler sonucunda; entorhinal korteksteği epilepsi benzeri olayların frekansı, süresi ve genliği ile 4-AP (100 μ M)'li kayıtlarda ortaya çıkan epilepsi benzeri olayların frekansı, süresi ve genliği karşılaştırıldığında anlamlılık ortaya çıkmadı ($p > 0.05$; $n=11$; şekil 27a, 27b ve 27c).



Şekil 27. LM11A-31'in entorhinal korteksteği epilepsi benzeri olayların frekansına, süresine ve genliğine etkisini gösteren çizgi grafikleri ($n=11$)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Epilepsi dünya çapında on milyonlarca sayıda insanı etkileyen ciddi bir hastalık yükü oluşturmaktadır. Her ne kadar nöbet oluşumları ilaçlarla kontrol altına alınsa da insan hayatını büyük ölçüde olumsuz etkilemesi ve ilaç tedavilerinin herkeste aynı yanıtı vermemesi epilepsi hastalığını kesin tedavisi zor hastalıklar kategorisine koymaktadır. Oluşumundaki sosyal, genetik, metabolik ve yapısal unsurlar hastalığı daha da karmaşık bir hale getirmektedir. Bu sebeplerden dolayı da epilepsi araştırmaları her daim güncelliğini korumaktadır.

MSS’de gelişim, olgunlaşma ve adaptif süreçleri yöneten nöropeptit yapılı düzenleyiciler nörotrofik faktörler olarak bilinir. BDNF, bu faktörlerden biridir ve sinir devrelerinin yeni uyarım koşullarına göre şekillenmesinde önemlidir. BDNF, sinirsel aktivite ile salınıp sinirsel yapının belirlenmesinde rol oynayan fizyolojik süreçlerde yer almaktadır (50, 117). Daha sonraki çalışmalarda BDNF’nin akut sinirsel cevapların şekillenmesinde de rol oynayan bir modülatör olabileceği ileri sürülmüştür fakat hücre düzeyinde nöronlar ve kanallar üzerinde tanımlanan etkilerin nöronal devre düzeyinde de tanımlanması önem art etmektedir. Tez çalışmamızda da BDNF ile ilişkili iki reseptör olan TrkB ve p75’in akut olarak sinir devrelerindeki uyarılabilirliği ve yapay olarak tetiklenen epilepsi benzeri olayları nasıl etkilediği ortaya araştırılmıştır. Elde edilen bulgular şu şekilde özetlenebilir:

- TrkB reseptörünün inhibe edilmesi, hipokampus CA1 ve EC bölgelerindeki genel sinirsel osilasyonların toplam gücünü etkilememiştir.
- TrkB reseptörünün inhibe edilmesi hem hipokampus CA1 hem de EC’de epilepsi benzeri olayların sayısını azaltmış, olayların sürelerini ise kısaltmıştır.
- p75NTR, hipokampus CA1 ve EC bölgelerindeki genel sinirsel osilasyonların toplam gücünü etkilememiştir.
- P75NTR’nin inhibe edilmesi hem hipokampus CA1 hem de EC’de epilepsi benzeri olayların sayısına, sürelerine ve genliklerine etki etmemiştir.

Çalışmada 6-8 haftalık farelerin kullanılmasının sebebi farelerde erişkinliğin başına denk gelen dönem olmasından kaynaklanmaktadır. Bu yaş aralığında hipokampus ve entorhinal korteks yapıları fonksiyonel olgunluğa ulaşmaktadır. Sinaptogenez ve miyelinizasyon büyük ölçüde tamamlandığı için de nöronal uyarılabilirlik süreci rahatlıkla ölçülebilir.

TrkB reseptörünün BDNF ile etkileşimi sonucunda aktive ettiği sinyal yollarıyla beraber sinaptik iletim ve nöronal uyarılabilirlik üzerinde belirleyici bir rolü bulunmaktadır. TrkB'nin uyarılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada TrkB reseptörleri genetik olarak silinen fareler kullanılmış ve çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır (118). Kronik epilepsinin oluşturulduğu model kullanılmış ve farelerde TrkB reseptörlerinin olmaması nedeniyle BDNF/TrkB yolağının çalışmadığı bu sebeple de farelerin epilepsiye daha dayanıklı hale geldiği belirtilmiştir. Fakat akut olarak koreal şekilde uygulanan 6 Hz elektrik modelinde, TrkB reseptörleri olmayan fareler normal farelerle aynı süre ve aynı akımda epileptik nöbetler geçirmiştir. Bu çalışma, kronik ve akut modelleri incelemek için önem arz etse de kullanılan genetik modelde çok sayıda ek değişiklik yapıldığından BDNF/TrkB yolağının rolünün tam olarak anlaşılması zordur. Genetik ve nadir görülen epilepsi türündeki bir modelde, TrkB sinyal yolağının genetik manipülasyon teknikleri kullanılarak aktive edildiğinde epilepsi nöbetlerinin arttığı davranış deneyleriyle beraber gösterilmiştir (119). Çalışmada farelere ANA-12 verildiğinde nöbet sıklığının azaldığı gözlenmiştir. Peptit olarak BDNF uygulanması veya TrkB agonisti 7,8-DHF uygulanması, GABA salınımını azaltarak inhibitör akımları zayıflatır ve nöronların daha kolay uyarılabilmesine neden olur böylece BDNF/TrkB yolağı aktivasyonu nedeniyle sinir devreleri eksitasyon yönünde hareket eder (84). TrkB'nin postsinaptikte aktivasyonu ise nörotransmitter salınımını tetikleyerek presinaptikteki Ca^{+2} girişini baskılamakta olduğu ve bunun da uyarılabilirliği azalttığı görülmüştür (120). Bunun sonucunda TrkB'nin hücre tipine bağımlı çift yönlü etki gösterebildiği bulunmuştur. Yapılan daha fizyolojik farklı bir çalışmada, BDNF heterozigot farelerin EC'lerinde BDNF konsantrasyonunun azaldığı ve EC piramidal nöronlarında aksiyon potansiyeli frekanslarının azaldığı görülmüştür. Aynı çalışmada BDNF eksikliğinin eksitasyon/inhibisyon dengesini bozduğu ve GABA salınımlarını azalttığı gösterilmiştir, çalışmada yine 7,8-DHF kullanılarak TrkB'nin akut olarak aktive edilmesiyle epileptiform aktivitenin şiddeti artmış ve iktal boşalımların süresi uzamıştır (7). Hücre düzeyindeki bu etkiler, BDNF/TrkB yolağının epilepsi ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Penisilin kullanılarak indüklenmiş fokal epilepsi modelinde elektrofizyolojik olarak (121) ve kainik asit ile indüklenen sistemik epilepsi modelinden (122) elde edilen davranış verileri, heterozigot farelerin bazı deneysel epileptik modellerde daha dirençli olduğunu doğrulamıştır. Bu çalışmalardan farklı olarak buradaki tez çalışması, doğrudan ex vivo preperattaki etkiyi değerlendiren bir çalışmadır ve tüm bu

Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, mevcut çalışmada ANA-12 uygulaması ile devam eden epileptik aktivitenin frekanslarının ve sürelerinin azalmasıyla uyumlu olduğu bulunmuştur.

p75NTR'nin sinirsel uyarılabilirlikteki etkisi plastisite ve epileptogenez gibi süreçlerin şekillenmesinde kritik bir rol üstlenir. LTD'nin p75 reseptörünün ani bloke edilmesi sebebiyle azaldığını gösteren bir çalışmada buradaki mevcut tez çalışmasıyla benzer olarak fare beyin kesitleri kullanılmıştır (123). Farklı bir çalışmada entorhinal kortekste p75NTR'nin piramidal nöronların uyarılabilirliğini baskıladığı ve ateşleme davranışını azalttığı bulunmuş, bunun sonucunda da p75NTR'nin eksikliğinde hafıza performansında iyileşme ve epileptik nöbetlere yatkınlığın arttığı görülmüştür (9). Başka bir çalışmada p75NTR'si olmayan farelerde hızlı glutamat salınımı ve uyarılabilirlik artışıyla alakalı olan LTP'nin arttığı gözlenmiştir (124). Elektroensefalografi (EEG) ve beyin kesitlerinin kullanıldığı bir çalışmada, proBDNF/p75NTR sinyalinin gelişim döneminde GABA'nın dengesini bozarak kalıcı şekilde depolarize edici yanıtlara yol açtığını ve bunun da epilepsiye yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir (104). Davranış deneyleri ölçümlerinin yapıldığı farklı bir çalışmada, hipokampusta proBDNF'nin artışının sağlandığı uygulamada, piramidal nöronların ateşleme oranını arttığı bunun da öğrenmeyi kolaylaştırdığı ve strateji kullanımını değiştirdiği ortaya konulmuştur (125). Farklı bir çalışmada ise mBDNF'nin GABAerjik internöronların uyarılabilirliğini azaltırken, proBDNF'nin aynı hücrelerde anlamlı bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (87). Yapılan alışmalar birlikte değerlendirildiğinde ise p75NTR aktivasyonunun etkisinin farklı hücre tiplerinde ve farklı beyin bölgelerinde değiştiği anlaşılmaktadır. Akut olarak p75 reseptörünün modülasyonunun etkileri hakkında ise daha az araştırma yapılmıştır. Yapılan tez çalışmasıyla p75NTR'nin akut olarak inhibisyonunun etkisi incelenmiş olup, p75NTR inhibisyonunun uyarılabilirliği veya epilepsi benzeri aktiviteleri azaltabileceği hipotezi kurulmuştur. Fakat LM11A-31'in akut olarak uygulanmasının uyarılabilirliği azaltıcı veya arttırıcı bir etkisi görülmemiş ve epilepsi benzeri olaylarda frekansı, süreyi ve genliği etkilememiştir. Akut olarak p75NTR'nin modülasyonunun etkisinin gösterildiği çok fazla sayıda çalışmanın olmaması, çalışmalar sonucunda farklı sonuçlar elde edilmesi ve iki farklı bölgenin beraber araştırılmamış olması, yapılan bu tez çalışmasının özgünlüğünü arttırmaktadır.

Hipokampus ve entorhinal korteks beyinde bellek ve öğrenme işlevlerinde kritik rol oynayan iki yapıdır. Bu yapıların birbirleriyle bağlantıları plastisite ve bilgi akışı gibi

nörofizyolojik süreçlerde önemli bir yer tutar. Bu iki yapı arasında bağlantı iki farklı yol ile sağlanır. İlk yol, $EC \rightarrow DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1 \rightarrow$ Subikulum yoludur ve dışarıdan alınan bilgilerin hipokampusta işlenmesini sağlar. İkinci yol, Hipokampus $\rightarrow$ Subikulum $\rightarrow$ EC yoludur. Bu yol ise işlenmiş bilgilerin EC'ye ve oradan da neokortekste gönderilmesini sağlayan yoldur. EC'den gelen yoğun girdiler, hipokampusun uyarılabilirliği belirleyici şekilde bir rol oynamaktadır. Aşırı uyarılma durumunda EC-hipokampus bağlantısı epileptik başlatan ve yayılmasını sağlayan temel yoldur. Aynı zamanda bu yol, öğrenme sırasında senkronize şekilde ortaya çıkan osilasyonların meydana gelmesine de sebep olur. Tez çalışmasında hipokampus ve entorhinal korteks arasındaki bağlantıyı koruyabilmek amacıyla horizontal kesitler kullanılmıştır. Bu yöntem in vitro deneysel epilepsi modelinde yaygın olarak kullanılmaktadır (126).

Hipokampustaki nöronal uyarılabilirliğin öğrenme ve hafıza süreçlerinde önemli bir rolü vardır. Bu uyarılabilirlik farklı moleküler mekanizmalar ve hücresel süreçlerle düzenlenir. Yayılan depolarizasyon sonrasında uyarılabilirliğin arttığı ve CA1 piramidal nöronlarda artan aktivitenin voltaj kapılı Na^+ kanalları tarafından yönetildiği bulunmuştur (127). Farklı bir çalışmada kainik asit ile indüklenmiş TLE modelinde T-tipi Ca^{+2} kanalının, hipokampal nöbetlerin süresini ve sıklığını düzenleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (128). Başka bir çalışmada Nav1.6 geninde görülen bir mutasyonun CA1 bölgesindeki Na^+ akımını arttırarak spontan ateşleme ve erken yeniden depolarizasyon gibi dalga formlarına neden olduğu bulunmuştur (129). Tüm bu çalışmalar sonucunda hipokampal uyarılabilirliğin hem voltaj kapılı Na^+ / Ca^{+2} hem de yayılan depolarizasyon gibi dinamik devre olayları aracılığıyla düzenlendiği bulunmuştur. Dolayısıyla hipokampustaki uyarılabilirlik tek bir bağımlıya değil çok katmanlı hücresel mekanizmalar ve çevresel faktörlerle şekillenmektedir. Bu da epileptik aktivitenin gelişiminin karmaşık bir yapıda olduğunun bir göstergesidir.

Hipokampusa giden ana giriş noktası olan EC, bilişsel ve patolojik işlevlerde önemli rol oynar. Katman II ve III'te bulunan nöronların inhibitör ve eksitator dengeleri uyarılabilirlik açısından EC'yi önemli ölçüde düzenlenmektedir. BDNF heterozigot farelerde, eksitasyon/inhibisyon dengesinin bozulması nedeniyle, medial EC'lerinde bulunan piramidal hücrelerinde uyarılabilirliğin azaldığı gösterilmiştir (130). Başka bir çalışmada EC'ye medial septumdan gelen GABAerjik projeksiyonların inhibisyonu düzenlediği gösterilmiş ve bu projeksiyonların inhibe edici internöronlar üzerinde etkili

olduğu gösterilmiş, bu da septum-entorhinal devrenin EC'nin aktivitesinde önemli rol oynadığını işaret etmektedir (131). TLE modelinde, GABAerjik sinapsların kaybı dolayısıyla azalmış inhibisyon sonucunda EC katman II hücrelerinin aşırı uyarılabilir hale geldiği keşfedilmiştir (132).

Nörofarmakoloji alanında sıkça kullanılan 4-AP molekülü, voltaj bağımlı K^+ kanallarının geri dönüşümlü olarak inhibe edilmesini sağlar. Nöronların ve nöron olmayan bütün hücrelerin dinlenim potansiyelini depolarize düzeylere taşır ve aksiyon potansiyeli ateşleme olasılığını artırır. Bu özelliği sayesinde sinaptik iletim güçlenir, oluşan aksiyon potansiyelinin süresi uzar ve nöronal uyarılabilirlik artar. Tez çalışmasında kullanılan taze beyin kesitlerinde epilepsi benzeri olayların tetiklenmesinde başka yöntemler de kullanılmaktadır. Bunlar arasında 0 Mg^{+2} (solüsyonlarda Mg'nin hiç kullanılmadığı yöntem) modeli gösterilebilir (133). Bu modelde yapay beyin sıvısı içine Mg konulmaz ve böylece NMDA reseptörünün Mg blokajı ortadan kaldırılır. Bu da 4-AP'ye benzer şekilde epileptik boşalmaları meydana getirir. Bikukulin eklenmesi GABA_A reseptörlerini bloke ederken, kainik asit modeli de AMPA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile yapay epileptik aktiviteler oluşturabilir. Fakat 4-AP modelinin fizyolojik olarak daha uygun olduğu iddia edilmiştir (134). Bu yüzden tez çalışmasında $100\text{ }\mu\text{M}$ konsantrasyonda 4-AP kullanılmıştır (135).

Kesit çalışmalarında 4-AP kullanıldığında iktal ve interiktal olarak adlandırılan iki farklı olayın oluştuğu görülmüştür (126). 'İktal' olayların süreleri daha uzun ve genlikleri yüksek, 'interiktal'lerin ise süreleri kısadır. İktal olaylar klinikte epilepsi nöbetleriyle de ilişkilendirilir. Tez çalışmasında kullanılan ve antiepileptik özelliklerini araştırdığımız moleküllerin etkilerinin, 'iktal' olayları baskılayacak kadar güçlü olmadığı düşünülmesi sebebiyle daha az nöronun senkronizasyonu sonucu meydana gelen 'interiktal' benzeri boşalmalar üzerindeki etkilerinin öncelikli olarak araştırılması amaçlanmıştır. Tez çalışmasında gözlenen epilepsi benzeri olaylar daha çok interiktale benzeyen olaylar olmuştur. Kullanılan kesitlerde beyin bütünlüğü frontal-okspital yönde korunmuştur. Böylece uzun mesafeli GABAerjik nöronların bütünlüğü bozulmamış ve güçlü senkronizasyon ile ilişkilendirilen iktal olayların ortaya çıkması büyük ölçüde engellenmiştir (38). Yine de kısıtlı sayıdaki bazı kesitlerde iktal benzeri olaylar görülmüş fakat bu kesitler analize dahil edilmemiştir.

TrkB ve p75NTR yolaklarının uyarılabilirlik ile alakasını gösteren ve farklı moleküllerin kullanıldığı farklı çalışmalar mevcuttur. Çalışmalardan bazıları bu moleküllerin akut etkileri, bazıları ise kronik etkileriyle alakalıdır. Bu tez çalışmasında ANA-12 için 10 μ M dozu, LM11A-31 için 100 nM dozu kullanılarak akut etkinin gösterildiği deneyler yapılmıştır. Bu dozlar önceki çalışmalarda taze beyin kesitlerinde etkisi gösterilmiş dozlar olarak bilinmektedir. Buna rağmen moleküllerin daha yüksek dozlarının kullanıldığı deneylerin yapılmamış olması çalışmamızın kısıtlayıcı yönü olmaktadır. Fakat yine de akut olarak TrkB ve p75 reseptörlerine etki edilmesinin, ortaya çıkan epileptik olaylar ve uyarılabilirlik üzerindeki etkileri ilk defa bu çalışma ile ifade edilmiştir. Uyarılabilirliğin modüle edilmesi ve epilepsi nöbetleriyle alakalı olarak her iki reseptörün etkinliğinin aynı modelde değerlendirildiği bir çalışma bulunmaması da bu tez çalışmasının bu konudaki özgünlüğünü arttırmaktadır.

Yapılan tez çalışması, daha sonra yapılacak çalışmalara da kaynaklık edebilecek bulgular ortaya çıkarmıştır.

- Farklı dozlarda kullanılan ANA-12 ve LM11A-31'in ayrı ayrı ve sinerjik etkilerinin,
- ANA-12 ve LM11A-31'in epileptik aktivite başlamadan önce uygulanmasının etkilerinin,
- Özellikle de ANA-12'nin mevcut antiepileptik ilaçlarla beraber kullanıldığında meydana çıkartacağı etkilerinin,
- LM11A-31 molekülünün kronik olarak hayvanlara uygulanmasının, araştırılması literatüre yeni bilgiler katacaktır.

4-AP uygulaması sonucunda başlayan epileptik aktivitenin etkisinin azalması için güçlü bir etkileşim beklenir. Bu tez çalışmasının ana bulgusu, TrkB'nin bu tür bir potansiyele sahip olduğu fakat p75NTR'nin etkisinin olmadığıdır. TrkB reseptörü aktivasyonu durdurmak veya baskılamak için antiepileptik bir potansiyele sahiptir. Yeni antiepileptik ilaçlar ve hedefleri halen araştırılmaktadır. Bu durumda TrkB'yi yeni bir ilaç hedefi olarak veya mevcut antiepileptik ilaçlarla birlikte etkileşime girme potansiyeli için değerlendirmek mümkündür.

6. KAYNAKLAR

1. Sirven JI (2015). Epilepsy: A spectrum disorder. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine [Online]. Available from: <https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/9/a022848.long>. [Accessed 17 November 2024].
2. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J (2018). BDNF: A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* 38(3): 579–593.
3. Li Q, Hu YZ, Gao S, Wang PF, Hu ZL, Dai RP (2023). ProBDNF and its receptors in immune-mediated inflammatory diseases: novel insights into the regulation of metabolism and mitochondria. *Frontiers in Immunology* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1155333/full>. [Accessed 25 November 2024].
4. Sandhya VK, Raju R, Verma R, Advani J, Sharma R, Radhakrishnan A, Nanjappa V, Narayana J, Somani BL, Mukherjee KK, et al. (2013). A network map of BDNF/TRKB and BDNF/p75NTR signaling system. *Journal of Cell Communication and Signaling* 7(4): 301–307.
5. Crozier RA, Black IB, Plummer MR (1999). Blockade of NR2B-containing NMDA receptors prevents BDNF enhancement of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. *Learning and Memory* 6(3): 257–266.
6. Kang HJ, Schuman EM (1995). Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Journal of Physiology - Paris* 89(1): 11–22.
7. Aydin-Abidin S, Abidin İ (2019). 7,8-Dihydroxyflavone potentiates ongoing epileptiform activity in mice brain slices. *Neuroscience Letters* 703: 25–31.
8. Chan FKM, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288(5475): 2351–2354.
9. Gibon J, Buckley SM, Unsain N, Kaartinen V, Séguéla P, Barker PA (2015). ProBDNF and p75NTR control excitability and persistent firing of cortical pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience* 35(26): 9741–9753.

10. Stafstrom CE, Carmant L (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. Cold Spring Harb Perspect Medicine [Online]. Available from: <https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/6/a022426.long>. [Accessed 17 November 2024].
11. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M, et al. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55(4): 475–482.
12. Sperelakis N (2012). Electrogenesis of membrane excitability. In: Sperelakis N (Ed.), *Cell Physiology Source Book*. Academic Press, Cambridge, Pages: 345-367.
13. Hochman DW (2009). Non-synaptic mechanisms: Changes in the extracellular space as a modulator of excitability and epileptogenicity. In: Schwartzkroin PA (Ed), *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*. Academic Press, Cambridge, Pages 946–953.
14. Kahle KT, Staley KJ, Nahed B V., Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008). Roles of the cation - chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology* 4(9): 490–503.
15. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikkath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel γ subunit. *Nature Genetics* 19(4): 340–347.
16. Yokoi N, Fukata M, Fukata Y (2012). Synaptic plasticity regulated by protein-protein interactions and posttranslational modifications. *International Review of Cell and Molecular Biology* 297: 1-43
17. Guerrini R, Dobyns WB (2014). Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *The Lancet Neurology* 13(7): 710–726.
18. Mirzaa GM, Poduri A (2014). Megalencephaly and hemimegalencephaly: breakthroughs in molecular etiology. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics* 166(2): 156–172.
19. Berdichevsky Y, Dryer AM, Saponjian Y, Mahoney MM, Pimentel CA, Lucini CA, Usenovic M, Staley KJ (2013). PI3K-Akt signaling activates mTOR-mediated epileptogenesis in organotypic hippocampal culture model of post- traumatic epilepsy. *Journal of Neuroscience* 33(21): 9056–9067.

20. Lasarge CL, Danzer SC (2014). Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2014.00018/full>. [Accessed 19 November 2024].
21. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet* 393(10172): 689–701.
22. Van Bueren NER, Van Der Ven SHG, Hochman S, Sella F, Kadosh RC (2023). Human neuronal excitation/inhibition balance explains and predicts neurostimulation induced learning benefits. *PLoS Biology* [Online]. Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3002193>. [Accessed 30 April 2025].
23. McMoneagle E, Zhou J, Zhang S, Huang W, Josiah SS, Ding K, Wang Y, Zhang J (2024). Neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 as a promising drug target for epilepsy treatment. *Acta Pharmacologica Sinica* [Online]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41401-023-01149-9>. [Accessed 28 December 2024].
24. Scharfman HE (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 7(4): 348–354.
25. Fritschy JM (2008). Epilepsy, E/I balance and GABAA receptor plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/neuro.02.005.2008/full>. [Accessed 7 April 2025].
26. Sirven JI, Noe K, Hoerth M, Drazkowski J (2012). Antiepileptic drugs 2012: recent advances and trends. *Mayo Clinic Proceedings* 87(9): 879–889.
27. Sills GJ, Rogawski MA (2020). Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology* 168: 107966.
28. Buzsáki G, Moser EI (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience* 16(2): 130–138.
29. Van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* 10(4): 272–282.

30. Zammit AR, Ezzati A, Zimmerman ME, Lipton RB, Lipton ML, Katz MJ (2017). Roles of hippocampal subfields in verbal and visual episodic memory. *Behavioural Brain Research* 317: 157–162.
31. Neves G, Cooke SF, Bliss TVP (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience* 9(1): 65–75.
32. Agster KL, Burwell RD (2009). Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* 19(12): 1159–1186.
33. Burwell RD (2000). The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 911: 25–42.
34. Witter MP (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* 3: 33–44.
35. Witter MP, Naber PA, Van Haeften T, Machielsen WCM, Rombouts SARB, Barkhof F, Scheltens P, Lopes Da Silva FH (2000). Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus* 10(4): 398–410.
36. Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17(9): 697–708.
37. Vaughan DN, Jackson GD (2014). The piriform cortex and human focal epilepsy. *Frontiers in Neurology* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2014.00259/full>. [Accessed 7 April 2025].
38. Vismer MS, Forcelli PA, Skopin MD, Gale K, Koubeissi MZ (2015). The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. *Frontiers in Neural Circuits* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neural-circuits/articles/10.3389/fncir.2015.00027/full>. [Accessed 7 April 2025].
39. Wieser HG (2004). Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45(6): 695–714.
40. Spencer SS (2003). Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia* 43(3): 219–227.

41. Bernhardt BC, Kim H, Bernasconi N (2013). Patterns of subregional mesiotemporal disease progression in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 81(21): 1840–1847.
42. Yu Y, Han F, Wang Q (2023). A hippocampal-entorhinal cortex neuronal network for dynamical mechanisms of epileptic seizure. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 31: 1986–1996.
43. Chaldakov GN, Tonchev AB, Aloe L (2009, March). NGF and BDNF: from nerves to adipose tissue, from neurokinins to metabokines. *Rivista di Psichiatria* 44(2): 79-87.
44. Purves D, Snider WD, Voyvodic JT (1988). Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 336(6195): 123–128.
45. Pramanik S, Sulistio YA, Heese K (2017). Neurotrophin signaling and stem cells-implications for neurodegenerative diseases and stem cell therapy. *Molecular Neurobiology* 54(9): 7401–7459.
46. Segal RA (2003). Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual Review of Neuroscience* 26: 299–330.
47. Reichardt LF (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361(1473): 1545–1564.
48. Nordvall G, Forsell P, Sandin J (2022). Neurotrophin-targeted therapeutics: a gateway to cognition and more?. *Drug Discovery Today* 27(10): 103318.
49. Kazim SF, Iqbal K (2016). Neurotrophic factor small-molecule mimetics mediated neuroregeneration and synaptic repair: emerging therapeutic modality for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 11(1): 50.
50. Gottmann K, Mittmann T, Lessmann V (2009). BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Experimental Brain Research* 199(3-4): 203–234.
51. Honea RA, Cruchaga C, Perea RD, Saykin AJ, Burns JM, Weinberger DR, Goate AM (2013). Characterizing the role of brain derived neurotrophic factor genetic variation in alzheimer's disease neurodegeneration. *PLoS ONE* [Online]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076001>. [Accessed 19 November 2024].

52. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2008). Reviews: BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* 14(2): 147–156.
53. Wetmore C, Cao Y, Pettersson RF, Olson L (1991). Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and interneuronal transfer as visualized with anti-peptide antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(21): 9843–9847.
54. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *The EMBO Journal* 9(8): 2459–2464.
55. Rosenthal A, Goeddel D V., Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR, Nikolics K, Winslow JW (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 4(5): 767–773.
56. Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD (1991). Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* 10(3): 558–568.
57. Begni V, Riva MA, Cattaneo A (2017). Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 131(2): 123–138.
58. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007). Mouse and rat *bdnf* gene structure and expression revisited. *Neuroscience Research* 85(3): 525–535.
59. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010). A simple role for BDNF in learning and memory?. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/neuro.02.001.2010/full>. [Accessed 19 November 2024].
60. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995). Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 15: 1768–1777.
61. Zoladz JA, Pilc A (2010). The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. *Journal of Physiology and Pharmacology* 61(5): 533–541.

62. Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, Rosenthal A, Winslow JW (1990). Widespread Expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 250(4978): 290–294.
63. Dugich-Djordjevic MM, Peterson C, Isono F, Ohsawa F, Widmer HR, Denton TL, Bennett GL, Hefti F (1995). Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *European Journal of Neuroscience* 7(9): 1831–1839.
64. Huntley GW, Benson DL, Jones EG, Isackson PJ (1992). Developmental expression of brain derived neurotrophic factor mRNA by neurons of fetal and adult monkey prefrontal cortex. *Developmental Brain Research* 70(1): 53–63.
65. Nawa H, Carnahan J, Gall C (1995). BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *European Journal of Neuroscience* 7(7): 1527–1535.
66. Rost B, Hanf G, Ohnemus U, Otto-Knapp R, Groneberg DA, Kunkel G, Noga O (2005). Monocytes of allergics and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3. *Regulatory Peptides* 124(1-3): 19–25.
67. Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F (2020). Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *Molecular Sciences* 21(20): 1–29.
68. Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: Implications in CNS function. *Journal of Neuroscience* 29(41): 12764–12767.
69. Binder DK, Scharfman HE (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22(3): 123–131.
70. Numakawa T, Yamagishi S, Adachi N, Matsumoto T, Yokomaku D, Yamada M, Hatanaka H (2002). Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of Ca²⁺ oscillations in developing cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry* 277(8): 6520–6529.
71. Deinhardt K, Chao M V. (2014). Shaping neurons: long and short range effects of mature and proBDNF signalling upon neuronal structure. *Neuropharmacology* 76: 603–609.

72. Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66(2): 395–403.
73. Barbacid M (1995). Structural and functional properties of the trk family of neurotrophin receptors. *Annals New York Academy of Sciences* 766: 442–458.
74. Kaplan DR, Miller FD (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 10(3): 381–391.
75. Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P (2013). BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 14(6): 401–416.
76. Autry AE, Monteggia LM (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Reviews* 64(2): 238–258.
77. Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kühn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp H-P, Bonhoeffer T, Klein R (1999). Essential role for trkB receptors in hippocampus-mediated learning below a certain threshold before behavioral defects become apparent. *Neuron* 24(2): 401–414.
78. Gonzalez A, Moya-Alvarado G, Gonzalez-Billaut C, Bronfman FC (2016). Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton* 73(10): 612–628.
79. Kwon M, Fernández JR, Zegarek GF, Lo SB, Firestein BL (2011). BDNF-promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin. *Journal of Neuroscience* 31(26): 9735–9745.
80. Schirò G, Iacono S, Ragonese P, Aridon P, Salemi G, Balistreri CR (2022). A brief overview on bdnf-trk pathway in the nervous system: a potential biomarker or possible target in treatment of multiple sclerosis?. *Frontiers in Neurology* [Online]. Available from:
<https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2022.917527/full>. [Accessed 6 June 2025].
81. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 297–305.

82. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *Journal of Neuroscience* 25(49): 11288–11299.
83. Zachos NC, Lee LJ, Kovbasnjuk O, Li X, Donowitz M (2013). PLC- γ directly binds activated c-Src, which is necessary for carbachol-mediated inhibition of NHE3 activity in Caco-2/BBe cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 305(3) 266-275.
84. Marongiu D, Imbroschi B, Mittmann T (2013). Modulatory effects of the novel trkB receptor agonist 7,8-dihydroxyflavone on synaptic transmission and intrinsic neuronal excitability in mouse visual cortex in vitro. *European Journal of Pharmacology* 709(1-3): 64–71.
85. Ludwig A, Uvarov P, Soni S, Thomas-Crusells J, Airaksinen MS, Rivera C (2011). Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *Journal of Neuroscience* 31(2): 644–649.
86. Pradhan J, Noakes PG, Bellingham MC (2019). The Role of altered BDNF/TrkB signaling in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2019.00368/full>. [Accessed 5 May 2025].
87. Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A, Jensen K (2009). Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 29(40): 12412–12418.
88. Lu B, Pang PT, Woo NH (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience* 6(8): 603–614.
89. Gall CM, Isackson PJ (1989). Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science* 245(4919): 758–761.
90. Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons M V., Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE (1999). Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93(4): 1491–1506.

91. Almeida RD, Duarte CB (2014). p75NTR processing and signaling: functional role. In: Kostrzewa RM (Ed.), *Handbook of Neurotoxicity*. Springer Science+Business Media, Berlin. Pages: 1899–1923.
92. Danelon V, Garret-Thomson SC, Almo SC, Lee FS, Hempstead BL (2023). Immune activation of the p75 neurotrophin receptor: implications in neuroinflammation. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2023.1305574/full>. [Accessed 6 May 2025].
93. Shanks HRC, Chen K, Reiman EM, Blennow K, Cummings JL, Massa SM, Longo FM, Börjesson-Hanson A, Windisch M, Schmitz TW (2024). p75 neurotrophin receptor modulation in mild to moderate Alzheimer disease: a randomized, placebo-controlled phase 2a trial. *Nature Medicine* 30(6): 1761–1770.
94. Turkistani A, Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Albuhadily AK, Elhussieny O, AL-Farga A, Aqlan F, Saad HM, Batiha GES (2024). The functional and molecular roles of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in epilepsy. *Journal of Central Nervous System Disease* [Online]. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/11795735241247810>. [Accessed 26 April 2025].
95. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nature Neuroscience* 8(8): 1069–1077.
96. Underwood CK, Coulson EJ (2008). The p75 neurotrophin receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40(9): 1664–1668.
97. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *Journal of Neuroscience* 25(22): 5455–5463.
98. Riolo G, Ricci C, De Angelis N, Marzocchi C, Guerrera G, Borsellino G, Giannini F, Battistini S (2022). BDNF and pro-bdnf in amyotrophic lateral sclerosis: a new perspective for biomarkers of neurodegeneration. *Brain Sciences* 12(5): 617.

99. Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL (2010). Understanding proneurotrophin actions: recent advances and challenges. *Developmental Neurobiology* 70(5): 350–359.
100. Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao M V. (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *Journal of Neuroscience* 21(16): 5854–5863.
101. Fujita Y, Takashima R, Endo S, Takai T, Yamashita T (2011). The p75 receptor mediates axon growth inhibition through an association with PIR-B. *Cell Death and Disease* [Online]. Available from: <https://www.nature.com/articles/cddis201185>. [Accessed 4 May 2025].
102. Blondy S, Christou N, David V, Verdier M, Jauberteau MO, Mathonnet M, Perraud A (2019). Neurotrophins and their involvement in digestive cancers. *Cell Death and Disease* [Online]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1385-8#Sec8>. [Accessed 26 April 2025].
103. Zhang YH, Chi XX, Nicol GD (2008). Brain-derived neurotrophic factor enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of the p75 neurotrophin receptor and the sphingomyelin pathway. *Journal of Physiology* 586(13): 3113–3127.
104. Riffault B, Kourdougli N, Dumon C, Ferrand N, Buhler E, Schaller F, Chambon C, Rivera C, Gaiarsa JL, Porcher C (2018). Pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF)-mediated p75 NTR activation promotes depolarizing actions of GABA and increases susceptibility to epileptic seizures. *Cerebral Cortex* 28(2): 510–527.
105. Coulson EJ, May LM, Osborne SL, Reid K, Underwood CK, Meunier FA, Bartlett PF, Sah P (2008). p75 Neurotrophin receptor mediates neuronal cell death by activating GIRK channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Journal of Neuroscience* 28(1): 315–324.
106. VonDran MW, LaFrancois J, Padow VA, Friedman WJ, Scharfman HE, Milner TA, Hempstead BL (2014). P75NTR, but not proNGF, is upregulated following status epilepticus in mice. *ASN Neuro* [Online]. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1759091414552185> [Accessed 28 April 2025].

107. Angelucci F, Čechová K, Průša R, Hort J (2019). Amyloid beta soluble forms and plasminogen activation system in Alzheimer's disease: consequences on extracellular maturation of brain-derived neurotrophic factor and therapeutic implications. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 25(3): 303–313.
108. Porcher C, Medina I, Gaiarsa JL (2018). Mechanism of BDNF modulation in GABAergic synaptic transmission in healthy and disease brains. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2018.00273/full>. [Accessed 28 April 2025].
109. Volosin M, Trotter C, Cragolini A, Kenchappa RS, Light M, Hempstead BL, Carter BD, Friedman WJ (2008). Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *Journal of Neuroscience* 28(39): 9870–9879.
110. Narkilahti S, Nissinen J, Pitkänen A (2003). Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: Effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacology* 44(8): 1068–1088.
111. Huang X yi, Hu Q peng, Shi H yun, Zheng Y yu, Hu R rong, Guo Q (2021). Everolimus inhibits PI3K/Akt/mTOR and NF-κB/IL-6 signaling and protects seizure-induced brain injury in rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 114: 101960.
112. Yang B, Wang L, Nie Y, Wei W, Xiong W (2021). proBDNF expression induces apoptosis and inhibits synaptic regeneration by regulating the RhoA-JNK pathway in an in vitro post-stroke depression model. *Translational Psychiatry* 11: 1–10.
113. Bai X, Zhou Y, Oyang N, Liu L, Tian J, Huang X, Lv T (2019). A de novo mutation in the MTUS1 gene decreases the risk of noncompaction of ventricular myocardium via the Rac1/Cdc42 pathway. *Frontiers in Pediatrics* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pediatrics/articles/10.3389/fped.2019.00247/full>. [Accessed 28 April 2025].
114. Fujita Y, Yamashita T (2014). Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. *Frontiers in Neuroscience* [Online]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2014.00338/full>. [Accessed 28 April 2025].

115. Naska S, Lin DC, Miller FD, Kaplan DR (2010). P75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Molecular and Cellular Neuroscience* 45(2): 108–120.
116. Forgione N, Fehlings MG (2014). Rho-ROCK inhibition in the treatment of spinal cord injury. *World Neurosurgery* [Online]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878875013000168>. [Accessed 28 April 2025].
117. Edelmann E, Leßmann V, Brigadski T (2014). Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76: 610–627.
118. He XP, Kotloski R, Nef S, Luikart BW, Parada LF, McNamara JO (2004). Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron* 43(1): 31–42.
119. Zhu Z-A, Li Y-Y, Xu J, Xue H, Feng X, Zhu Y-C, Xiong Z-Q (2023). CDKL5 deficiency in adult glutamatergic neurons alters synaptic activity and causes spontaneous seizures via TrkB signaling. *Cell Reports* 42(10): 113202.
120. Wu Y, Liu Q, Guo B, Ye F, Ge J, Xue L (2020). BDNF activates postsynaptic TrkB receptors to induce endocannabinoid release and inhibit presynaptic calcium influx at a calyx-type synapse. *Journal of Neuroscience* 40(42): 8070–8087.
121. Abidin I, Yildirim M, Aydin-Abidin S, Kalay E, Cansu A, Akca M, Mittmann T (2011). Penicillin induced epileptiform activity and EEG spectrum analysis of BDNF heterozygous mice: an in vivo electrophysiological study. *Brain Research Bulletin* 86(3-4): 159–164.
122. Aydin-abidin S, Keser H, Sahin E, Alver A (2023). Investigation of the effects of endogenous bdnf on kainic acid induced seizures. *Farabi Medical Journal* 2(1): 8–15.
123. Ma X, Vuyyuru H, Munsch T, Endres T, Lessmann V, Meis S (2022). ProBDNF dependence of ltd and fear extinction learning in the amygdala of adult mice. *Cerebral Cortex* 32(7): 1350–1364.
124. Barrett GL, Reid CA, Tsafoulis C, Zhu W, Williams DA, Paolini AG, Trieu J, Murphy M (2010). Enhanced spatial memory and hippocampal long-term potentiation in p75 neurotrophin receptor knockout mice. *Hippocampus* 20(1): 145–152.

125. An L, Li X, Tang C, Xu N, Sun W (2018). Hippocampal proBDNF facilitates place learning strategy associated with neural activity in rats. *Brain Structure and Function* 223(9): 4099–4113.
126. Avoli M, D’Antuono M, Louvel J, Köhling R, Biagini G, Pumain R, D’Arcangelo G, Tancredi V (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Progress in Neurobiology* 68(3): 167–207.
127. Lin CH, Hsu SP, Cheng TC, Huang CW, Chiang YC, Hsiao IH, Lee MH, Shen ML, Wu DC, Zhou N (2017). Effects of anti-epileptic drugs on spreading depolarization-induced epileptiform activity in mouse hippocampal slices. *Scientific Reports* [Online]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-12346-y>. [Accessed 9 June 2025].
128. Kim CH (2015). Cav3.1 T-type calcium channel modulates the epileptogenicity of hippocampal seizures in the kainic acid-induced temporal lobe epilepsy model. *Brain Research* 1622: 204–216.
129. Lopez-Santiago LF, Yuan Y, Wagnon JL, Hull JM, Frasier CR, O’Malley HA, Meisler MH, Isom LL (2017). Neuronal hyperexcitability in a mouse model of SCN8A epileptic encephalopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(9): 2383–2388.
130. Abidin İ, Aydin-Abidin S, Mittmann T (2019). Neuronal excitability and spontaneous synaptic transmission in the entorhinal cortex of BDNF heterozygous mice. *Neuroscience Letters* 690: 69–75.
131. Gonzalez-Sulser A, Parthier D, Candela A, McClure C, Pastoll H, Garden D, Sürmeli G, Nolan MF (2014). GABAergic projections from the medial septum selectively inhibit interneurons in the medial entorhinal cortex. *Journal of Neuroscience* 34(50): 16739–16743.
132. Kumar SS, Buckmaster PS (2006). Hyperexcitability, interneurons, and loss of GABAergic synapses in entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* 26(17): 4613–4623.

133. Basoglu H, Degirmencioglu İ, Ozturk H, Yorulmaz N, Aydin-Abidin S, Abidin I (2023). Title: A boron-chelating piperazine-tethered schiff base can modulate excitability in brain slices in a specific frequency range. *Chemistry Select* [Online]. Available from: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/slct.202303410>. [Accessed 12 June 2025].
134. Campos G, Fortuna A, Falcão A, Alves G (2018). In vitro and in vivo experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy Research* 146: 63–86.
135. Gonzalez-Sulser A, Wang J, Motamedi GK, Avoli M, Vicini S, Dzakpasu R (2011). The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array. *Neuropharmacology* 60(7-8): 1142–1153.



EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Dilanur KÖSE

Uyruğu: TC

Doğum Tarihi: 1

E-Posta:

**Yazışma Adresi
(Ev):**

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı	2025
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2021
Lise	Akyazı Eyyup Genç Fen Lisesi	2017

YABANCI DİL

İngilizce B2

Almanca A2

TEKNİK BECERİLER

- Hücre kültürü oluşturma
- Ex vivo elektrofizyoloji
- Taze beyin kesitlerinin hazırlanması ve kullanımı

- Temel elektrofizyolojik analizler
- PCR deney tasarımı ve uygulanması

YAYIN

Hilal Öztürk, **Dilanur Köse**, Aslı Beyza Bayrakdar, Hümeysra Ayşe Şimşek, Semanur Yıldırım, Selcen Aydın-Abidin, İsmail Abidin (2025). (–)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) decreases neuronal network excitability and interictal like activity in mouse brain slices. Neuroscience Letters 859-861: 138274

POSTER

Dilanur Kose, Ismail ABIDIN (2023). Investigation of the Effects of Pannexin-1 on Epilepsy-Like Events in Acute Brain Slices. 5th International 34th National Biophysics Congress, İzmir, 6-9 September 2023.

SERTİFİKA

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (KTÜ), 2022

Bilgisayar Operatörlüğü (İşletmenliği) Sertifikası (MEB), 2025

BURSLAR

2210/A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, TÜBİTAK BİDEB, 2022

HOBİLER

- Kitap okumak
- Maç izlemek
- Doğa yürüyüşü yapmak
- Müzik dinlemek
- Spor yapmak
- Gezmek ve yeni yerler keşfetmek