



NÖROTROFİK p75 RESEPTÖRÜNÜN PENTİLENTETRAZOL (PTZ) İLE OLUŞTURULMUŞ EPİLEPSİDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ

ESRA KABAK

TRABZON MAYIS - 2026

YÜKSEK LİSANS TEZİ



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**NÖROTROFİK p75 RESEPTÖRÜNÜN
PENTİLENTETRAZOL (PTZ) İLE
OLUŞTURULMUŞ EPİLEPSİDEKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

Esra KABAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Selcen ABİDİN

TRABZON - 2026

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.

10.05.2026
ESRA KABAK

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, değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Selcen ABİDİN'e ve yüksek lisans tez çalışmalarında sağladıkları katkılardan dolayı Sayın Prof. Dr. Ayşe Yeşim GÖÇMEN'e şükranlarımı arz ederim.

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

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 Dilanur KÖSE'ye,

Bu süreç boyunca sevgisiyle bana güç veren, umudumu kaybettiğim anlarda yeniden inanmamı sağlayan, sabrı, anlayışı ve desteğiyle her koşulda yanımda olan yol arkadaşım İbrahim Yıldırım'a teşekkür ederim. Bu yolculuğu benimle birlikte yürüdüğü ve her adımda bana hissettirdiği güven için minnettarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteklerini hiçbir koşulda eksik etmeden her zaman yanımda olan, emeklerini eksik etmeyen, her kararında koşulsuz varlıklarını hissettiğim canım annem Şehri KABAK'A , kıymetli babam Dursun KABAK'a , canım kardeşlerim Şenol , Sercan ve Büşra KABAK'a ve sevgili aile büyüklerime, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Onların sevgisi ve anlayışı olmadan bu yolculuğu yapmak mümkün olmazdı; attığım her adımda yanımda oldukları için onlara yürekten teşekkür ederim.

Esra KABAK

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin TYL-2024-15922 nolu projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epilepside Nöronal Mekanizmalar ve Nöronal Uyarılabilirlik	4
2.2. Epileptogenez	6
2.3. Nörotrofinler ve Epilepsi	9
2.3.1. Nörotrofin Ailesi	9
2.3.2. BDNF'nin Genel Özellikleri	10
2.3.3. proBDNF ve MBDNF	12
2.3.4. TrkB Sinyal Yolu ve Uyarılabilirlik	14
2.3.5. p75NTR Yapısı ve Sinyal Yolakları	17
2.4. P75NTR'nin Farmakolojik Modülasyonu	20
2.4.1. LM11A-31'in Yapısı ve Etki Mekanizması	20
2.4.2. Nörodejeneratif Modellerde Kullanımı ve Epilepsideki Potansiyeli	21
2.5. PTZ ile Oluşturulan Deneysel Epilepsi Modeli	22
2.5.1. PTZ'nin Farmakolojik Özellikleri ve Yapısı	23
2.5.2. PTZ Kindling Modeli ve Deneysel Kullanımı	24

2.5.3. PTZ'nin Epileptojenik Mekanizmaları	25
2.6. Antiepileptik İlaçlar	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	29
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	30
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Deney Hayvanları	30
3.2.2. Deney Grupları ve DeneySEL Tasarım	30
3.2.3. Taze Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	32
3.2.4. PTZ Kindling Protokolü	32
3.2.5. Elektrokortikografi (ECoG) Kayıtları	34
3.2.6. Biyokimyasal Analizler	36
3.2.7. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Deney Hayvanları Üzerine Genel Etkiler	39
4.2. LM11A-31'in PTZ Kaynaklı Nöbetler Üzerindeki Etkileri	39
4.3. LM11A-31'in Kortikal ECoG Gücü ve RMS Genliği Üzerindeki Etkileri	41
4.4. LM11A-31'in Korteks ve Hipokampüsteki Sinaptik Protein Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	43
4.5. LM11A-31'in Kortikal ve Hipokampal Dokulardaki Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerindeki Etkileri	45
4.6. Bulguların Genel Değerlendirmesi	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
6. KAYNAKLAR	53

EKLER	64
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	65
ÖZGEÇMİŞ	67



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemeler ile bunların üretici firma ve modelleri	29
Tablo 2.	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	29
Tablo 3.	Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ile üretici firmaları	30



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Nöronal uyarılabilirliği belirleyen faktörler	8
Şekil 2.	Nörotrofinler ve reseptörleri	10
Şekil 3.	BDNF'nin protein yapısı	12
Şekil 4.	ProBDNF'nin mBDNF'ye dönüşümü ve görevli organeller	13
Şekil 5 .	p75 reseptörünün hücre içi sinyal yolları	20
Şekil 6.	LM11A-31 molekülünün yapısı	21
Şekil 7.	PTZ molekülünün yapısı	23
Şekil 8.	PTZ'nin moleküler etki mekanizması	27
Şekil 9.	Kayıt alınan hayvan grupları	33
Şekil 10.	Stereotaksik cihaza yerleştirilmiş hayvan	34
Şekil 11.	Lowry yöntemi ile protein tayini için kullanılan BSA standart eğrisi	36
Şekil 12.	PSD-95 (DLG-4) ELISA standart eğrisi	37
Şekil 13.	Sinaptofizin (SYP) ELISA standart eğrisi	37
Şekil 14.	LM11A-31'in PTZ kaynaklı nöbetler üzerindeki etkisi	40
Şekil 15.	Racine skor kümülatif nöbet yükü	40
Şekil 16.	ECoG kayıt örnekleri	41
Şekil 17.	DeneySEL gruplar genelinde ortalama ECoG gücü	42
Şekil 18.	DeneySEL gruplar genelinde ECoG sinyallerinin RMS genliği	42
Şekil 19.	Korteksteki PSD-95 seviyeleri	44
Şekil 20.	Hipokampustaki PSD-95 seviyeleri	44
Şekil 21.	Korteksteki SYP Seviyeleri	45
Şekil 22.	Hipokampustaki SYP seviyeleri	45
Şekil 23.	Korteksteki toplam antioksidan durumu seviyeleri	47
Şekil 24.	Hipokampüsteki toplam antioksidan durumu seviyeleri	47

Şekil 25.	Korteksteki toplam oksidan durumu seviyeleri	48
Şekil 26.	Hipokampustaki toplam oksidan durumu seviyeleri	48
Şekil 27.	Korteksteki Tiyobarbitürik asit reaktif madde seviyeleri	49
Şekil 28.	Hipokampustaki Tiyobarbitürik asit reaktif madde seviyeleri	49



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

4-AP	4- aminopiridin
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	İlaca dirençli epilepsi
EEG	Elektroensefalografi
ERC	Entorhinal korteks
ERK	Ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinazlar
GABA	Gama aminobütirik asit
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IP₃	İnozitol trifosfat
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KCC2	Potasyum-klorür kotasıyıcısı 2
LEC	Lateral entorhinal korteks
LLR	Lösince zengin bölge
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

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
p75NTR	p75 nörotrofin reseptörü
PTZ	Pentientetrazol

Simgeler

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

Formüller

CaCl₂	Kalsiyum klorür
C₁₂H₂₅N₃O₃	LM11A-31 molekülünün formülü
MgCl₂	Magnezyum klorür
KCl	Potasyum klorür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NaH₂PO₄	Sodyum dihidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür

ÖZET

Nörotrofik p75 Reseptörünün Pentilentetrazol (PTZ) ile Oluşturulmuş Epilepsideki Rolünün İncelenmesi

Epilepsi tekrarlayan nöbetlerle karakterize olan ve dünyada %1 nüfusu etkileyen nörolojik bir bozukluktur. Epilepsiye sebep olan ve altında yatan mekanizmalar daha tam olarak çözülmüş değildir. Ayrıca epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkileri ve ilaçlara dirençli epilepsi türlerinden dolayı yeni ilaç arayışları da devam etmektedir. Pentilentetrazol (PTZ) tutuşma (kindling) modeli epilepsi çalışmalarında yaygınlıkla kullanılan modellerden bir tanesidir ve insanlardaki kronik epilepsi bozukluğunu modellemektedir.

Nörotrofik faktörler, merkezi sinir sisteminde, uzun süreli yapısal gelişim ve adaptif cevaplardan sorumlu nöromodülatör peptitlerdir. P75 reseptörü, nörotrofik faktörlere afinitesi olan fakat özellikle proBDNF'nin bağlandığı bir reseptördür. P75 ve yolaklarının epilepsi ile ilişkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmamızda p75 reseptörünün, PTZ ile oluşturulmuş epileptik nöbetlere ve sonrasında gelişen biyokimyasal değişiklere etkisi, bir p75 reseptör antagonisti olan LM11A-31 kimyasalı kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla farelere gün aşırı 35 mg/kg PTZ intraperitoneal (i.p.) enjekte edilerek kronik epilepsi oluşturmaları sağlandı. Bu süreç her enjeksiyondan sonra davranış skorlaması ile takip edildi. P75 reseptörünün etkilerinin tanımlanabilmesi için farelere PTZ enjeksiyonuna başlamadan 7 gün önce ve PTZ uygulaması boyunca gün aşırı 50 mg/kg LM11A-31 i.p. olarak verildi. Farelerde kronik epilepsi oluştuktan sonra (yaklaşık 10-11 PTZ enjeksiyonu, 21 gün) farelere son LM11A-31 ve PTZ dozu uygulanıp, farelerden elektrokortikografi (ECoG) kayıtları alındı. Dekapitasyondan sonra beyinlerinde biyokimyasal parametreler (PSD-95, Synaptophysin, TNF-alfa, IL-6) analiz edildi. ECoG kayıtlarında güç spektrum analizleri, epileptik olayların frekansları, süreleri, genlikleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Elektrofizyoloji, Kronik PTZ modeli, LM11A-31, p75 reseptörü, Uyarılabilirlik

ABSTRACT

Investigation of the Role of Neurotrophic p75 Receptor in Pentylenetetrazole (PTZ) Induced Epilepsy

Epilepsy is a neurological disorder characterized by recurrent seizures and affects 1% of the population in the world. The mechanisms that cause and underlie epilepsy have not yet been fully resolved. In addition, the search for new drugs continues due to the side effects of drugs used in the treatment of epilepsy and drug-resistant types of epilepsy. For this reason, it is necessary to use animal models in epilepsy studies. PTZ kindling model is one of these models and it models chronic epilepsy disorder in humans.

Neurotrophic factors are neuromodulatory peptides responsible for long-term structural development and adaptive responses in the central nervous system. The p75 receptor is a receptor that has affinity for neurotrophic factors, but to which proBDNF specifically binds. The relationship between p75 receptors and epilepsy is not fully understood. In this study, the effects of blocking the p75 receptor with the chemical LM11A-31 on epileptic events in PTZ kindled animals. For this purpose, 35 mg/kg PTZ will be injected intraperitoneally (i.p.) into mice every other day to create chronic epilepsy. This process will be monitored by behavioral scoring after each injection. To reveal the effects of P75 receptor blockade, 50 mg/kg LM11A-31 will be administered (i.p.) every other day starting 7 days before the first PTZ injection and continue throughout PTZ administration. After the mice are fully kindled (approximately 21 days, 10-11 PTZ injections), electrocorticograms (ECoG) of the mice will be recorded after the last dose of LM11A-31 and PTZ is administered to the mice. After decapitation, biochemical parameters (PSD-95, Synaptophysin, TNF-alpha, IL-6) will be analyzed in the mice brains. Power spectrum analysis in ECoG recordings, frequencies, durations and amplitudes of epileptic events will be compared between groups.

Keywords: Electrophysiology, Chronic PTZ model, LM11A-31, p75 receptor, Excitability

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi; bilinç, davranış ve motor fonksiyonları etkileyebilen, dünya genelinde yaygın olarak görülen önemli bir nörolojik hastalıktır. Sağlıklı bireylerde beyindeki elektriksel aktivite belirli bir denge ve düzen içerisinde sürdürülürken, epilepsi durumunda bu fizyolojik düzen bozulmakta ve anormal, ani ve kontrolsüz elektriksel deşarjlar ortaya çıkmaktadır. Bu anormal deşarjlar sonucunda farklı klinik özellikler gösteren epileptik nöbetler meydana gelmektedir. Epilepsi, bu nöbetlerin tekrarlayıcı nitelik kazanması ve bireyin günlük yaşamını olumsuz etkilemesiyle tanımlanan kronik bir hastalıktır. Oluşan nöbetler, hastaların sosyal yaşamını, işlevselliğini ve yaşam kalitesini ciddi ölçüde sınırlandırabilmektedir. Epileptik nöbetlerin süresi, şiddeti ve klinik bulguları bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bazı nöbetler kısa süreli bilinç kaybı ya da hafif kas kasılmaları şeklinde seyrederken, bazıları daha şiddetli, uzun süreli ve yaygın konvülsif ataklara yol açabilmektedir.

Sinir sisteminde hücresel düzeyde meydana gelen aşırı depolarizasyon ve buna bağlı olarak nöronal uyarılabilirliğin artması, epileptik nöbetlerin temel mekanizmaları arasında yer almaktadır. Epilepsi tedavisinde antiepileptik ilaçlar yaygın olarak kullanılmakta ve nöbet kontrolünü sağlamak amacıyla sürekli olarak yeni farmakolojik ajanlar geliştirilmektedir. Ancak tüm bu gelişmelere rağmen, epilepsi hastalarının belirli bir kısmı mevcut ilaç tedavilerine yeterli yanıt vermemekte ve tedaviye dirençli epilepsi tablosu ortaya çıkmaktadır. Bu durum, tedavi seçeneklerini sınırlandırmakta ve yeni yaklaşımların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Daha etkili, yan etkileri daha az ve nöbet kontrolü açısından daha yüksek potansiyele sahip tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik bilimsel çalışmalar günümüzde de yoğun şekilde sürdürülmektedir (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. İnhibisyon/eksitasyon dengesindeki değişimler, hücre dışı koşulların dinlenme potansiyellerini etkilemesi, nöral uyarılabilirliği değiştirir. Sinir devrelerindeki senkronize haldeki boşalmalar ve epilepsi benzeri aktiviteler, uyarılabilirliğin artması sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Merkezi sinir sisteminde yüksek düzeyde eksprese edilen nörotrofik faktörlerden biri olan Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF), nöronların farklılaşması, aksonal uzama ve

dallanma, sinaptik olgunlaşma ile sinaptik plastisite gibi temel hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli görevler üstlenmektedir. Nöronal hücrelerde BDNF, başlangıçta öncül molekülü olan proBDNF peptidi şeklinde sentezlenmekte; daha sonra hücre dışı ortama salınarak proteolitik mekanizmalar aracılığıyla biyolojik olarak aktif formu olan olgun BDNF (mBDNF)'e dönüştürülmektedir (2). BDNF'nin biyolojik etkileri, molekülün olgunluk durumuna bağlı olarak farklı reseptörler aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Hücre dışı alanda bulunan olgun BDNF, TrkB reseptörünü aktive ederek nöronal sağkalım, büyüme ve sinaptik güçlenme ile ilişkili sinyal yollarını başlatmaktadır. Buna karşılık, BDNF'nin öncül formu olan proBDNF, p75 nörotrofin reseptörü üzerinden etki göstererek çoğunlukla apoptoz, sinaptik zayıflama ve hücresel stres yanıtlarıyla ilişkilendirilen mekanizmaları düzenlemektedir (3).

Nöbet gelişimine katkı sağlayan çok sayıda moleküler mekanizma arasında, proBDNF/p75 nörotrofin reseptörü (p75NTR) aracılı sinyal yolları; nöronal hiperuyarılabilirlik ve sinir ağı dengesinin bozulmasıyla olan ilişkisi nedeniyle dikkat çekmektedir (4). p75NTR, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesine dahil olan ve NGF, BDNF, NT-3 ile NT-4 gibi nörotrofinler için düşük afiniteli olmakla birlikte, pronörotrofinler için yüksek afinite gösteren ve fizyolojik olarak önemli etkiler gösteren bir reseptördür (5). p75 nörotrofin reseptörü, erken nöronal gelişim sürecinde yüksek ekspresyon düzeylerine sahipken, fizyolojik koşullardaki yetişkin beyinde düşük düzeylerde saptanmaktadır; buna karşın patolojik durumlar arasında yer alan yaralanma, inflamasyon, nörodejenerasyon ve epileptik aktiviteye yanıt olarak yeniden eksprese edilmektedir (6).

Önemli olarak, BDNF'nin öncü formu olan proBDNF, özellikle ortak reseptör sortilinin eşliğinde p75NTR'ye yüksek afiniteli bağlanma gösterir; bu etkileşim sinaptik zayıflama, artmış nöronal eksitabilite ve bazı koşullarda apoptozla ilişkili sinyal yollarının aktive edilmesine neden olur (7). Deneysel epilepsi modellerinde, nöbetler veya status epileptikus sonrasında hem proBDNF hem de p75NTR'nin nöronal ve glial hücrelerde hızla artan bir ekspresyon sergilediği gösterilmiştir; bu bulgu, proneurotrofin-p75NTR aracılı sinyalleşmenin nöronal hasarın ikincil bir sonucu olmaktan öte, epileptogenez sürecinde aktif bir rol üstlendiğine işaret etmektedir (8). Bu doğrultudaki artan kanıtlar, p75NTR'nin nöbetlere yatkınlığı ve epileptik sürecin ilerlemesini etkileme potansiyeli nedeniyle umut vadeden bir tedavi hedefi olabileceğine işaret etmektedir.

Bu çerçevede, p75NTR aracılı sinyal yollarının farmakolojik olarak düzenlenmesi, epilepsi patogeneğinde yer alan uyumsuz nörotrofin aracılı yollara müdahale etmeye yönelik yenilikçi bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. LM11A-31, p75NTR'ye özgül bağlanma gösteren, sinyal iletimini pro-apoptotik ve eksitatör kaskatlardan uzaklaştırarak nöroprotektif ve sinaptik stabiliteyi destekleyen yollara yönlendiren, küçük molekül ve peptit dışı bir ligandır (9). Doğrudan nörotrofin uygulamalarına kıyasla LM11A-31, kan-beyin bariyerini aşabilme ve oral biyoyararlanım gibi avantajlı farmakolojik özellikler sergilemekte olup, bu durum bileşiği translasyonel kullanım açısından umut verici kılmaktadır. Literatürde yer alan çalışmalar, Alzheimer hastalığı, travmatik beyin hasarı ve Huntington hastalığı modellerinde LM11A-31'in nörodejeneratif süreçleri, sinaptik bozuklukları ve nöroinflamatuvar yanıtları azalttığını bildirmektedir (10, 11). Bununla birlikte, LM11A-31'in epilepsi bağlamındaki olası etkileri—özellikle nöbetlerin zaman içindeki ilerleyişi ve toplam nöbet yükünün düzenlenmesi üzerindeki rolü—henüz yeterince aydınlatılamamıştır.

Pentilentetrazol (PTZ) kindling modeli, epileptogenez sürecinin ve nöbetlerin kademeli olarak şiddetlenmesinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan, iyi tanımlanmış bir deneysel yaklaşımdır. Subkonvülsif dozlarda tekrarlanan PTZ uygulamaları, nöbet şiddetinde aşamalı bir artışa yol açmakta; ağ düzeyinde hipereksitabilite, plastisiteye bağlı nöbet progresyonu ve artmış nöbet duyarlılığı gibi insan epilepsisinin temel özelliklerini yansıtmaktadır (12). Önemli olarak, PTZ kindling modeli, nöroinflamatuvar süreçlerin aktive olması, nörotrofin aracılı sinyal yollarında değişimler ve sinaptik uyarıcı-engelleyici dengenin bozulması ile karakterizedir; bu patofizyolojik olayların tümü p75NTR aktivasyonu ile yakından ilişkilendirilmektedir.

Bu çerçevede, bu tez çalışmasının amacı; p75NTR aktivasyonunun LM11A-31 aracılığıyla farmakolojik olarak modüle edilmesinin, PTZ ile indüklenen fare epilepsi modelinde nöbet gelişimi ve kümülatif nöbet şiddeti üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Bu bağlamda, LM11A-31 tedavisinin, proneurotrofin-p75NTR aracılı aşırı uyarılabilirlik mekanizmalarına müdahale ederek nöbet şiddetinin zaman içindeki progresyonunu anlamlı düzeyde baskılayacağı hipotez edilmiştir. Davranışsal nöbet skorlaması ile kümülatif nöbet yükü analizlerinin birlikte kullanılması yoluyla, bu çalışmanın epilepside hastalık seyrini değiştirmeye yönelik bir yaklaşım olarak p75NTR modülasyonunun potansiyeline ilişkin yeni ve özgün veriler sunması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Epilepsi terimine milattan önceki kayıtlarda dahi rastlanılır ve kökeni “epilambanein” kelimesinden gelmektedir. Epilepsi kelimesi Yunancada “yakalamak” veya “ele geçirmek” anlamına gelmektedir. Hastalığın tasvirine yaklaşık olarak MÖ 2000’li yıllara ait metinlerde rastlanmaktadır. Akad yazıtlarında epilepsi hastası bir birey; boynu sola doğru dönmüş, elleri ve ayakları kasılmış, gözleri açık, ağzından köpük gelen ve bilinç kaybı yaşayan bir kişi olarak betimlenmiştir (13). Epilepsi, merkezi sinir sisteminde ortaya çıkan nörolojik bir bozukluk olup küresel ölçekte 70 milyondan fazla bireyi etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (14). Epilepsinin yıllık insidansının 100.000 kişi başına yaklaşık 50,4 ile 81,7 arasında değiştiği bilinmektedir (15). Epilepsinin insidansı erkeklerde kadınlara kıyasla daha yüksektir ve hastalık özellikle yaşamın erken dönemlerinde daha sık görülmektedir. İleri yaşlarda görülme sıklığında bir azalma gözlenmekle birlikte, yaşlanma süreciyle birlikte insidansta yeniden bir artış meydana gelebilmektedir. Yeni tanı konulan epilepsi olgularının yaklaşık %60’ında hastalık parsiyel nöbetlerle ortaya çıkmakta, vakaların yaklaşık üçte ikisinde ise kesin olarak belirlenmiş bir etiyolojik neden saptanamamaktadır (16). Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, epilepsinin direkt ve indirekt olarak sağlık harcamalarında önemli bir yeri olduğu, hastaların yaşam kalitesine ve toplum içerisinde iş bulma zorluğu, etiketlenme gibi faktörler nedeniyle hastaların üretkenliklerine etkide bulunduğu gözlenmiştir (17). Epilepsi hastalığının klinik olarak tanısının konulabilmesi için belirli ölçütlerin olması gerekir. Bu ölçütler arasında 24 saatten uzun ara ile meydana gelen en az iki provoke edilmemiş nöbetin varlığı veya tek bir provoke edilmemiş nöbet sonrasında gelecek 10 yıl içinde nöbetin tekrarlama riskinin %60 ve üzerinde olması yer almaktadır (18).

2.1. Epilepside Nöronal Mekanizmalar ve Nöronal Uyarılabilirlik

Nöronal uyarılabilirlik, hem tek tek nöronların intrinsik membran özellikleri hem de bu nöronların yer aldığı sinir ağlarının yapısal ve fonksiyonel özellikleri çerçevesinde açıklanır. Sinir ağları içerisinde eksitator ve inhibitör nöronların yanı sıra nöronal olmayan destekleyici görevleri olan mikrogiallar, oligodendrositler ve astrositler nöronal aktivitenin düzenlenmesinde önemli rol oynar (19). Uyarılabilir hücreler, yeterli büyüklükte bir uyarı aldıklarında hücrenin membran potansiyelinde değişiklikler meydana gelir ve bu değişiklikler sonucunda aksiyon potansiyeli oluşturarak alınan uyarı iletilir.

Bu özellik merkezi sinir sisteminde bilgi iletiminin temelini oluşturmakta olup, nöronal uyarılabilirliğin artması veya azalması epileptik aktivitenin ortaya çıkmasında belirleyici bir faktör olarak kabul edilmektedir (20).

Normal koşullarda dinlenme durumunda olan nöronlar dışarıdan herhangi bir uyarı almazlar ve dinlenme zar potansiyelinde bulunur. Başta sodyum, potasyum ve klorür iyonları olmak üzere iyonların hücre içi ve dışı dağılımlarının sabit tutulmasını sağlayan iyon kanalları ve taşıyıcılar sayesinde dinlenme zar potansiyeli korunur. Nöron diğer nöronlardan gelen kimyasal bir uyarı (nörotransmitter aracılı) veya elektriksel bir uyarı alırsa, zar potansiyelinde geçici değişiklikler meydana gelir.

Bu değişiklik eşik değerinin aşarsa aksiyon potansiyeli oluşur. Bir nöronun belirli bir uyarıya karşı aksiyon potansiyeli oluşturma kolaylığı ve yanıt sıklığı nöronal uyarılabilirlik olarak tanımlanmaktadır. Nöronun uyarılabilirliği artarsa normal bir nöron ile karşılaştırıldığında aynı büyüklükte gelen uyarıya daha fazla sayıda aksiyon potansiyeli oluşturarak karşılık verir. Bir sinir ağı içerisinde birbirileri ile bağlantılı olan nöronların verdiği toplam cevap nöronal uyarılabilirlik ile orantılı olarak şiddetlenir. Uyarılabilirliğin artması için hücre dışında meydana gelen değişikliklerin dinlenme potansiyelini depolarize duruma getirmesi, inhibitör sinaptik etkinliğin azalması veya uyarıcı sinaptik iletimin artması gibi çeşitli durumların ortaya çıkması gerekmektedir (19).

Epilepsi, merkezi sinir sistemindeki nöronların normal fizyolojik kontrol mekanizmaları dışında, aşırı ve senkronize biçimde ateşlemesi sonucu ortaya çıkan kronik bir nörolojik hastalıktır. Epilepsinin ortaya çıkışında çok sayıda moleküler ve hücrel mekanizma yer alır. Hastalık, meydana gelen nöbetlerle açıklanır ve bu nöbetlerle karakterize olmuştur.

Epilepsinin oluşma sürecinde tek bir neden bulunmamakta olup, hastalık çok sayıda faktörün bir araya gelmesiyle gelişebilmektedir. Bu faktörler arasında genetik yatkınlık, doğumsal beyin gelişim bozuklukları, kafa travmaları, serebrovasküler olaylar (inme), enfeksiyonlar ve merkezi sinir sistemini etkileyen diğer yapısal hasarlar yer almaktadır. Tüm bu etkenlere rağmen epilepsi gelişim süreci ve altta yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (21).

2.2. Epileptogenez

Epileptogenez, normal bir beynin zaman içerisinde epileptik nöbet üretme kapasitesine sahip bir duruma dönüşmesini ifade eden dinamik ve çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç içerisinde eksitator (uyarıcı) ve inhibitör (baskılayıcı) nörotransmitterler arasında var olan denge ortadan kalkar ve epileptogenez sonucunda beyin dokusu, spontan ve tekrarlayıcı epileptik nöbetlerin ortaya çıkmasına yatkın hale gelir.

Epileptogenez sürecinde rol oynayan en önemli uyarıcı nörotransmitter glutamat, bir diğer en önemli baskılayıcı nörotransmitter GABA (γ -aminobütirik asit)'dir. GABA'nın post sinaptik nöron üzerindeki etkisi, hücre içi ve dışındaki iyonların dağılımına bağlıdır. Çoğu durumda GABA inhibitör etki göstererek nöronal aktiviteyi baskılar. Ancak bazı gelişimsel dönemlerde veya patolojik koşullarda GABA, hücre membranında depolarizasyona yol açarak uyarıcı etki de oluşturabilir. Bu durumda uyarıcı ve baskılayıcı iletim arasındaki denge bozulur ve nöronal uyarılabilirlik artarak epileptik aktivitenin ortaya çıkması kolaylaşır.

Perisinaptik bölgelerden gerçekleşen salınımlar, nöronlarda eksitasyon ve inhibisyonun dengelenmesini sağlayarak uyarılabilirliği düzenler. Epileptik salınımların hücresel temeli başlıca eksitasyon-inhibisyon dengesizliği ve nöronların intrinsik uyarılabilirliğindeki artışla ilişkilidir (22).

Sinir hücrelerinde sodyum (Na^+), potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{+2}) ve klorür (Cl^-) iyonlarının hücre içerisindeki dengesi çeşitli iyon kanalları ve taşıyıcı proteinler aracılığıyla sağlanır. Bu taşıyıcılardan biri olan Potasyum-klorür kotransportörü 2 (KCC2), özellikle erişkin nöronlarda sıklıkla eksprese edilmektedir. KCC2, hücre içi klorür iyonu konsantrasyonunu düşük düzeyde tutarak GABA aracılı inhibitör iletimin etkinliğini belirleyen temel düzenleyicilerden biridir. KCC2 işlevinin bozulması durumunda bu denge kaybolur, GABA'nın inhibitör etkisi zayıflar ve nöronal uyarılabilirlik artarak epileptik nöbetlerin ortaya çıkması kolaylaşır (19).

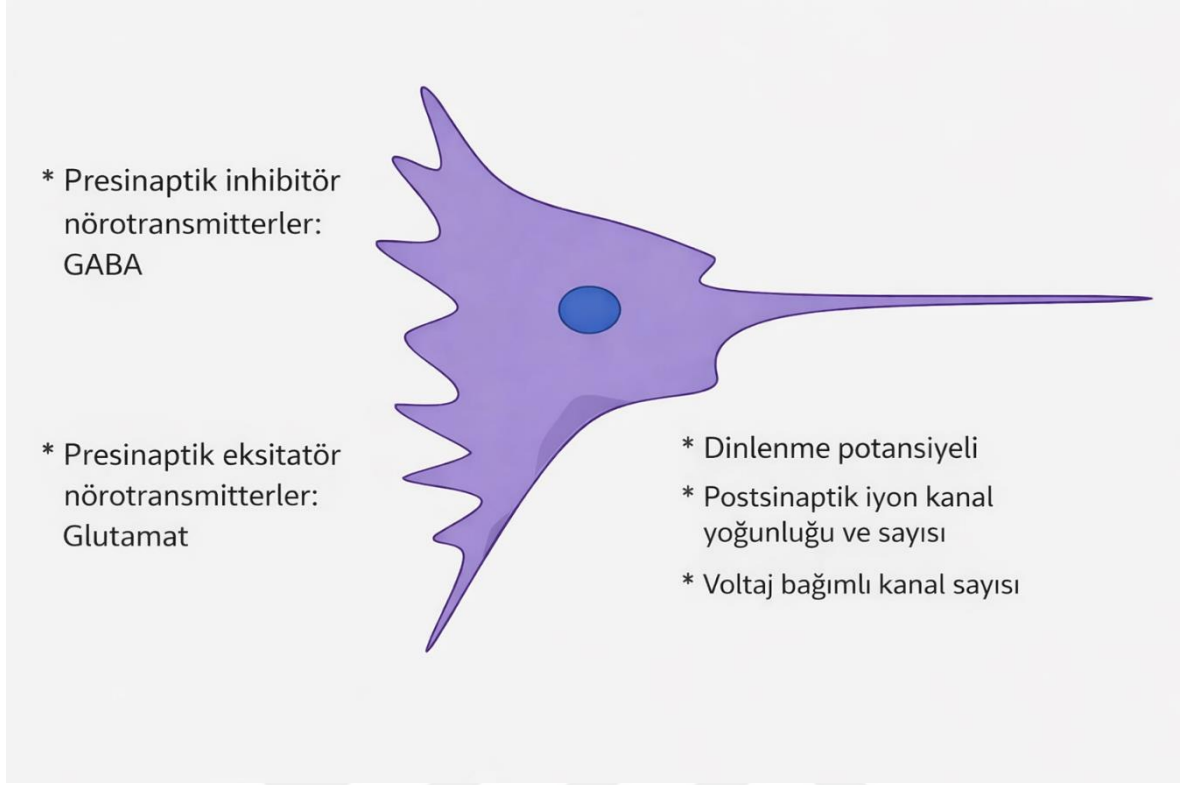
Beyinde iyonik dengenin korunması, iyon kanalları ve taşıyıcı proteinler aracılığıyla sağlanmaktadır. Beyinde bulunan bu kanallarda veya taşıyıcı sistemlerde meydana gelen mutasyonlar ya da nöronların aşırı uyarılması neticesinde iyonik dengenin bozulmasına yol açarak epileptik nöbet gelişimini kolaylaştırabilir.

Bu süreçte, GABA'nın reseptörüne bağlanmasıyla Cl^- ve bikarbonat (HCO_3^-) iyonlarının hücre giriş-çıkışı düzenlenir; böylece inhibitör ya da uyarıcı yanıt oluşur. Hücre içi Cl^- konsantrasyonunun düşük tutulması ve GABAerjik inhibisyonun sağlanması için nöronlara özgü potasyum-klor kotransportörü KCC2 gereklidir. KCC2 ekspresyonunun azalması veya fonksiyonunun bozulması durumunda sinaptik inhibisyon zayıflar ve GABAerjik sinyalizasyon depolarizan hale gelebilir (23).

Epileptik salınımların ikinci önemli nedeni de postsinaptik nöronların intrinsik uyarılabilirliğinin artmasıdır. Genel hatlarıyla nöronal uyarılabilirlik aslında presinaptik nöronların nörotransmitterleri tarafından meydana gelen postsinaptik potansiyellerin büyüklüğü ve bu potansiyellerin aksiyon potansiyeline dönüştürülme olasılığı ile ilişkilidir. Postsinaptik nöronun sinaptik girdilere aşırı yanıt vermesi, uyarılabilirliğin denetimsiz biçimde yükselmesine yol açarak epileptogenez sürecine katkıda bulunmaktadır. Hücre membran potansiyelinin depolarizasyon tarafına doğru kayması, iyon kanallarının tipi, yoğunluğu ve kinetik özellikleri gibi pek çok etken oluşan aksiyon potansiyelinin frekansını belirler (24).

Özellikle glutamat reseptörleri gibi sinaptik iletimde önemli rolleri olan bazı proteinlerde meydana gelen yapısal veya işlevsel değişikliklerin epilepsi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izokszolpropiyonik asit (AMPA) olarak bilinen glutamat reseptöründe meydana gelen mutasyonlar veya işlev bozuklukları nöronal uyarılabilirliği artırarak epilepsiye yatkınlık oluşturabilir. Aynı zamanda bu proteinler sinaptik plastisitede rol oynamaktadır (25, 26).

Epilepsi beyin dokusunda oluşan bir yaralanmanın ardından gelişen aşırı nöronal uyarılabilirlik sonucu da ortaya çıkabilir. Bu durum fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K)/insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)/rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) yolağında ortaya çıkan mutasyonlar ya da bozulmalar neticesinde de ortaya çıkabilmektedir (27, 28). MTOR sinyal yolunun aktifleşmesi IGF gibi büyüme faktörleri tarafından gerçekleştirilir. MTOR sinyal yolunun fizyolojik düzeyde aktivasyonu sinaptik plastisite için gereklidir, ancak MTOR sinyal yolunun aşırı ve kontrolsüz uyarılması, anormal sinaptik bağlantıların oluşmasına, nöronal ağ organizasyonunun bozulmasına ve sonuç olarak epileptik sürecin başlamasına neden olabilir (29).



Şekil 1. Nöronal uyarılabilirliği belirleyen faktörler

Özetle, epileptik nöbetler, merkezi sinir sisteminde (MSS) uyarıcı nörotransmitterler (glutamat, aspartat) ile inhibitör nörotransmitterler [γ -aminobütirik asit (GABA) ve glisin] arasındaki fizyolojik dengenin bozulması sonucu ortaya çıkabilmektedir. Bu durum çoğunlukla GABAerjik nörotransmisyonun zayıflamasına bağlı olarak nöronal inhibisyonun azalması ya da glutamaterjik sistemin aşırı aktivasyonu ile karakterize edilen artmış uyarıcı sinaptik iletimden kaynaklanmaktadır (Şekil 1). Buna ek olarak, iyon kanallarının fonksiyonunu etkileyen genetik polimorfizmler, gen ekspresyonundaki değişiklikler, iyon kanalı kaybı veya yapısal mutasyonlar; hücresel enerji metabolizmasındaki bozukluklar, oksidatif stres artışı ve nöroinflamatuvar süreçlerin aktivasyonu gibi faktörler, nöronal aşırı uyarılabilirliği artırarak epileptogenez sürecine katkıda bulunmakta ve ilerleyen aşamalarda nöronal hasar ile hücre ölümüne yol açabilmektedir (30).

2.3. Nörotrofinler ve Epilepsi

2.3.1. Nörotrofin Ailesi

Nörotrofinler, merkezi ve periferik sinir sisteminde yer alan nöronların gelişimsel süreçlerini, işlevlerini ve canlılıklarını düzenleyen temel büyüme faktörleri grubunu oluşturur. Bu moleküller, beynin normal gelişiminde, sinaptik plastisite mekanizmalarında ve nöronal homeostazın korunmasında önemli roller üstlenmektedir. Nöronların yaşamlarını sürdürebilmeleri, nörotransmitter salınım kapasitesini koruyabilmeleri ve nörogenez süreçlerinin desteklenmesi nörotrofinlerin başlıca işlevleri arasında sayılmaktadır (31). Nörotrofinler, hücre yaşamsallığını artırmalarının yanı sıra, hücre ölümüne karşı koruyucu ve baskılayıcı bir etki de göstermektedir. Bu kritik rollerinin ortaya konulmasının ardından “nörotrofin” terimi literatüre ilk kez 1980’li yıllarda Barde ve arkadaşları tarafından kazandırılmış (32), daha sonra Purves ve çalışma arkadaşlarının katkılarıyla kavram genişletilmiştir (33).

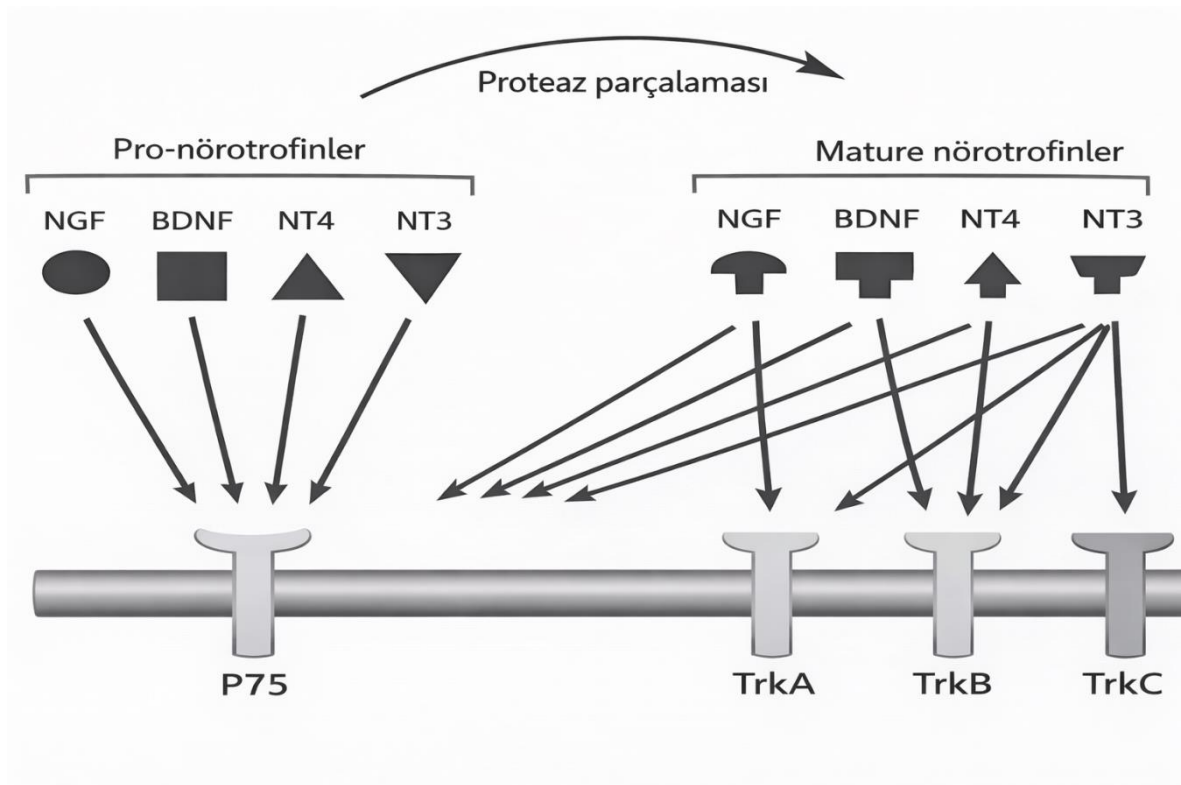
Nörotrofinler başlangıçta beyinde tanımlanmış olsa da bu moleküllerin reseptörlerinin çeşitli kök hücre tiplerinde de eksprese edildiği ve bu hücrelerde kritik sinyal iletim yollarını düzenlediği öne sürülmektedir (34). Nörotrofinlerin tümü, biyolojik etkilerini p75 nörotrofin reseptörü (p75NTR) ile tropomiyozin reseptör kinaz ailesine ait Trk reseptörlerine (TrkA, TrkB ve TrkC) bağlanarak göstermektedir. Olgun hâle gelmiş nörotrofinler TrkB reseptörüne daha yüksek bağlanma eğilimi gösterirken, işlenmemiş formlar p75NTR’a daha güçlü affinite ile etkileşmektedir (Şekil 2).

Bu büyüme faktörleri başlangıçta prenörotrofin olarak sentezlenir; ardından sinyal peptidinin uzaklaştırılmasıyla pronörotrofin formuna dönüştürülür. Pronörotrofinlerin olgun, aktif nörotrofinlere işlenmesi ise prohormon konvertaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Yapısal ve biyolojik açıdan birbirleriyle yüksek düzeyde benzerlik taşıyan bu moleküller, nörotrofin sınıfının karakteristik özelliklerini paylaşmaktadır.

Nörotrofin ailesi; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3), NT-4/5 ve daha az bilinen NT-6 ile NT-7 gibi çeşitli üyelerden oluşmaktadır (35). Olgun nörotrofinlerin p75NTR reseptörüne bağlanmaları mümkün olmakla birlikte, bu etkileşim işlenmemiş nörotrofin formlarının gösterdiği bağlanma gücüne kıyasla belirgin derecede daha zayıftır. NT-3, Trk reseptör ailesinin tüm üyeleriyle etkileşim kurabilen bir nörotrofik faktör olarak öne çıkarken; NGF yalnızca TrkA

reseptörüne özgü bağlanma göstermektedir. Buna ek olarak, NT-4/5 ve BDNF'nin bağlanma seçiciliği TrkB reseptörü ile sınırlıdır (36).

Nörotrofinlerin kan beyin bariyerini sınırlı düzeyde geçebilmesi maalesef tedavi esnasında hedef olarak kullanılmalarını zorlaştırmaktadır (37). Yine de sinir sisteminde elzem olarak rol oynamaları sebebiyle nörotrofinler nörodejeneratif hastalıkların tedavi seyrinde hedef olarak değerlendirilmekte ve denemeler yapılmaktadır (38).



Şekil 2. Nörotrofinler ve reseptörleri (Rosalind'den, 34)

2.3.2. BDNF'nin Genel Özellikleri

Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF), nörotrofin ailesinin bir üyesi olarak merkezi ve çevresel sinir sisteminde nöronal sağkalım, farklılaşma ve büyüme süreçlerini destekleyen; bunun yanı sıra sinaptik dallanma oluşumunda görev alan önemli bir nörotrofik faktördür (39). Ayrıca, nörotransmitterler ve nöropeptitler aracılığıyla işleyen çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesinde de etkin rol oynadığı bilinmektedir.

Öğrenmeye bağlı nöronal plastisite süreçlerinde görev alan BDNF; aksonal dallanma, sinaps oluşumu, sinaptik iletim, uzun süreli potansiyasyon (LTP) ve NMDA

reseptörlerinin fonksiyonel modülasyonu gibi temel nörofizyolojik mekanizmalarla yakından ilişkilidir.

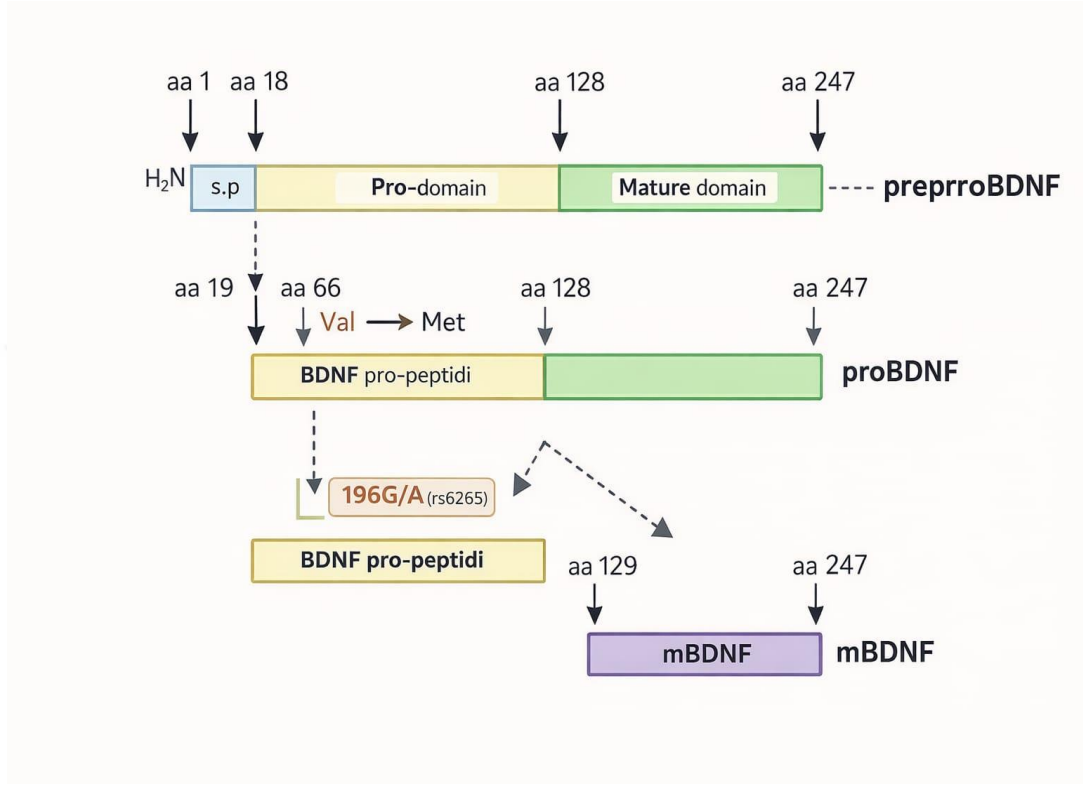
Bu özellikleri doğrultusunda BDNF, öğrenme, bellek ve genel bilişsel işlevlerle güçlü bir bağlantı göstermektedir. Dolayısıyla, BDNF sentezinde ya da düzeylerinde meydana gelen bozulmaların çeşitli nörolojik ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (40).

BDNF, yalnızca beynin belirli bölgeleriyle sınırlı olmayıp vücudun çeşitli doku ve organlarında da saptanmaktadır. Beyinde ise başlıca hipokampus ve kortekste yoğun olarak sentezlendiği striatumda ise ağırlıklı olarak afferent kaynaklı BDNF bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca BDNF'ye ait mRNA ve farklı transkriptlerin amigdala ile koku sistemine ait projeksiyon alanlarında (41), korteksin iç ve dış tabakalarındaki piramidal hücre katmanlarında (42), hipokampusta (43) ve serebellum ve talamusta varlığı gösterilmiştir (44). Buna karşılık, olfaktorius bulbus, spinalis, medulla ve adrenerjik beyin sapı çekirdeklerinde BDNF mRNA ekspresyonunun baskın olarak tespit edildiği bildirilmektedir (45, 41, 43).

Nörotrofin ailesi içerisinde en kapsamlı biçimde incelenen moleküllerden biri olan BDNF'nin biyosentezi, olgunlaşması ve hücre dışına salınımı, birden fazla öncü izoformun yer aldığı çok aşamalı bir süreç olarak gerçekleşmektedir (2). BDNF, ekzon IX'dan köken alan pre-proBDNF formu halinde sentezlenir. Amin ve karboksil uçlara sahip olan bu öncül yapı; bir sinyal (öncül) peptidi, bir pro bölge ve bir olgun bölge olmak üzere üç ayrı domain içermekte olup, toplamda 247 amino asitten oluşmaktadır (46).

Pre-proBDNF, endoplazmik retikulumda öncü (sinyal) dizisinin uzaklaştırılmasıyla işlenerek yaklaşık 32 kDa ağırlığında ve 228 amino asitten oluşan proBDNF formuna dönüştürülür. Oluşan proBDNF molekülü, yapısal olarak iki ayrı bölge içermektedir. N-terminalde yer alan pro-alan yaklaşık 129 amino asitten oluşurken, C-terminalde bulunan olgun alan 118 amino asit uzunluğundadır (46). ProBDNF, bu formdayken p75NTR–sortilin reseptör kompleksine bağlanarak apoptoz, uzun süreli sinaptik depresyon (LTD), ve aksonal büyüme gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayabilmektedir (47, 48). Bununla birlikte, proBDNF'nin biyolojik olarak farklı işlevler üstlenen olgun BDNF formuna dönüşebilmesi için ek işlenme basamaklarından geçmesi gerekmektedir.

Bu dönüşüm, hücre içi ya da hücre dışı ortamda görev yapan çeşitli proteazların aracılığıyla gerçekleşir ve sonuçta yaklaşık 14 kDa ağırlığında, 118 amino asitten oluşan olgun BDNF (mBDNF) meydana gelir (Şekil 3).



Şekil 3. BDNF'nin protein yapısı (Luca'dan,88)

2.3.3. proBDNF ve mBDNF

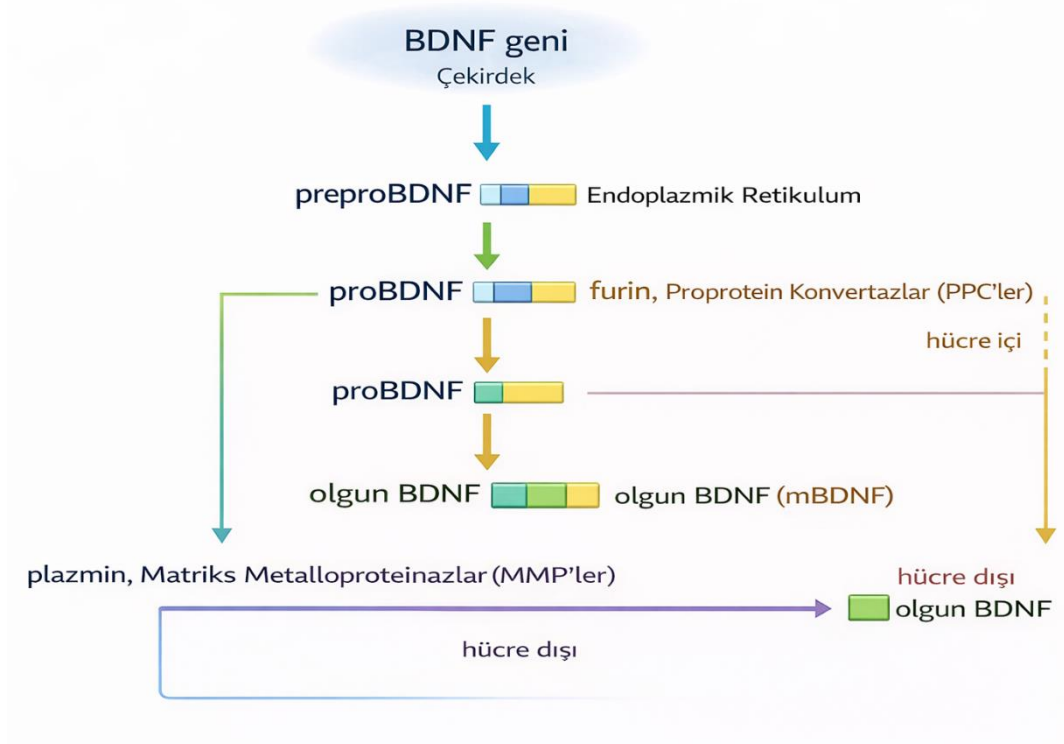
BDNF, hücre içinde başlangıçta öncül formu olan proBDNF şeklinde sentezlenmekte, ardından proteolitik işlem basamakları sonucunda olgun BDNF (mBDNF) formuna dönüştürülmektedir. Bu iki BDNF formu, farklı reseptörlere bağlanmaları nedeniyle biyolojik etkiler açısından birbirine zıt sonuçlar ortaya koymaktadır. ProBDNF'nin p75NTR reseptörüne bağlanması apoptoz ve sinaptik zayıflama ile ilişkilendirilirken, mBDNF'nin TrkB reseptörü üzerinden etki göstermesi nöronal sağkalımı ve sinaptik güçlenmeyi desteklemektedir (49).

BDNF geninin ekspresyonu ile sentezlenen preproBDNF, ardışık işleme basamakları sonucunda proBDNF formuna dönüştürülmektedir.

ProBDNF'nin olgun BDNF (mBDNF) haline gelmesi, hücre içi ve hücre dışı proteolitik mekanizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Hücre içinde bu süreç, proBDNF'nin Golgi aygıtına taşınmasını takiben furin ve proprotein konvertazlar (PPC) aracılığıyla gerçekleşirken, hücre dışı ortamda plazmin ve matriks metalloproteinazlar (MMP) bu dönüşümde görev almaktadır.

Söz konusu işlenme basamakları sinaptik aktiviteyle yakından ilişkilidir; yüksek frekanslı sinaptik uyarımlar mBDNF salınımını artırırken, düşük frekanslı uyarımlar proBDNF salınımının baskın hale gelmesine neden olmaktadır (3).

ProBDNF ve olgun BDNF (mBDNF) arasındaki dengenin korunması, öğrenme süreçleri, bellek oluşumu, sinaptik plastisite ve genel nörolojik sağlık açısından kritik öneme sahiptir. Bu dengenin bozulması, çeşitli patolojik durumların ve nörolojik hastalıkların gelişimiyle ilişkilendirilmektedir. İnsan ve hayvan modellerinde yürütülen çalışmalar, proBDNF'nin işlenmesindeki aksaklıkların; şizofreni, otizm ve epileptik nöbetler de dâhil olmak üzere farklı nörogelişimsel ve nörodejeneratif bozuklukların ortaya çıkışında rol oynayabileceğini göstermektedir (50).



Şekil 4. ProBDNF'nin mBDNF'ye dönüşümü ve görevli organeller (Li'den, 3)

BDNF'nin sentezi ve salınımı, hücre tipine bağlı olarak yapısal özellikler ve hücresel aktivite düzeyleri tarafından düzenlenmektedir. BDNF'nin öncül (proBDNF) ve olgun (mBDNF) formları arasındaki denge, beyin gelişiminin farklı evrelerinde ve farklı beyin bölgelerinde değişkenlik göstermektedir. Nöronal hücrelerde istirahat halinde BDNF reseptörlerinin önemli bir kısmı, hücre içi veziküllerin zarında lokalize durumdadır. Hücre zarının depolarize olması ve nöronal aktivitenin artmasıyla birlikte hem proBDNF hem de mBDNF'nin hücre dışına salındığı bildirilmektedir.

BDNF, biyolojik etkilerini p75NTR ve TrkB reseptörleri aracılığıyla göstermektedir; olgun BDNF p75NTR'ye düşük afiniteyle bağlanırken TrkB reseptörüne yüksek afinite göstermektedir. Buna karşılık, proBDNF'nin TrkB reseptörü ile etkileşimi ihmal edilebilir düzeydeyken, p75NTR'ye yüksek afiniteyle bağlanmaktadır (Şekil 4). Presinaptik bölgede, mBDNF'nin TrkB'ye ve proBDNF'nin p75NTR'ye bağlanmasının ardından oluşan ligand–reseptör kompleksleri, aksonlarda yer alan çeşitli düzenleyici proteinlerin aracılığıyla retrograd taşıyım yoluyla hücre gövdesine doğru iletilmektedir (51).

2.3.4. TrkB Sinyal Yolu ve Uyarılabilirlik

Trk reseptörleri, hücre zarında lokalize olan ve nörotrofinleri tanıma özelliğine sahip reseptör tirozin kinaz ailesinin temel üyelerini oluşturmaktadır. Bu reseptör ailesi TrkA, TrkB ve TrkC olmak üzere üç farklı alt tipten meydana gelmektedir. Nörotrofinlerle kurdukları etkileşimler aracılığıyla Trk reseptörleri, nöronal hücrelerin sağkalımı, büyümesi ve fonksiyonel bütünlüğünün sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır.

Trk reseptör ailesinin varlığı ilk kez 1980'li yılların sonlarında tanımlanmış, 1991 yılında ise TrkB'nin beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ile etkileşime girerek nörotrofik reseptör işlevi gördüğü ortaya konmuştur (46).

TrkB reseptörü, yapısal açıdan hücre zarını geçen bir glikoprotein olup üç ana bölümden meydana gelmektedir. Bu bölümler; hücre dışında yer alan ligand bağlama bölgesi, membranı kat eden transmembran segment ve hücre içi tirozin kinaz domeni şeklinde tanımlanmaktadır. Ligand etkileşiminden sorumlu olan ekstrasellüler kısım, iki sistein açısından zengin küme (CC1–2), üç lösin açısından zengin tekrar bölgesi (LRR1–3) ile iki adet immünoglobulin benzeri C-tipi domain içermektedir (47).

Olgun BDNF'nin TrkB reseptörüne yüksek afiniteyle bağlanması, reseptörlerin birbirine yaklaşarak dimerizasyonuna ve böylece tirozin kinaz aktivitesinin başlatılmasına

neden olur. Bu sürecin ardından, TrkB'nin tirozin içeren bölgelerinde otofosforilasyon gerçekleşir ve bu fosforillenmiş alanlar p85 (PI3K'nin katalitik olmayan alt birimi) ile Shc (SH2-domeni içeren adaptör protein) gibi sinyal proteinleri için bağlanma noktaları haline gelir. Bu proteinlerin reseptöre bağlanıp aktive olmasıyla birlikte fosfolipaz C- γ (PLC- γ), fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K) ve RAS aracılı MAPK yolları uyarılarak hücrenin yaşamsal süreçleri düzenlenir (51). Bu sinyal iletim yolları, hücre içi işlevlerin düzenlenmesinin yanı sıra transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu uyararak hücre içi Ca^{2+} düzeylerinin artmasına ve BDNF geninin ekspresyonunun yükselmesine de katkı sağlamaktadır (52).

TrkB reseptörünün merkezi sinir sisteminde özellikle hipokampus, korteks ve serebellum gibi bölgelerde yoğun olarak eksprese edildiği bilinmektedir. Bu yaygın dağılım, TrkB'nin öğrenme ve bellek süreçlerinin yanı sıra duygu durumunun düzenlenmesinde de kritik bir işleve sahip olduğunu göstermektedir (48). Gerçekleştirilen araştırmalar, TrkB reseptörünün işlevindeki bozulmaların; depresyon, şizofreni, Alzheimer hastalığı ve epilepsi başta olmak üzere çeşitli nörodejeneratif ve nörolojik hastalıklarla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (49).

Nöronal uyarılabilirliğin düzenlenmesinde TrkB reseptörü hem hücre içi süreçler hem de sinaptik mekanizmalar üzerinden etkili olan temel bir molekül olarak öne çıkmaktadır. Özellikle epileptik aktivitenin ortaya çıkabilmesi için TrkB aracılı sinyal iletiminin önemli rol oynadığı gösterilmiş olup, bu sinyal yolunun uyarılabilirlik üzerindeki etkilerinin fizyolojik ya da patolojik koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği bilinmektedir. TrkB'nin uyarılabilirliği modüle etme kapasitesi, reseptörün aktive ettiği hücre içi sinyal yollarıyla doğrudan ilişkilidir. Bu yollar aracılığıyla TrkB; iyon kanallarının fonksiyonel düzenlenmesini, GABA_A reseptörünün inhibisyonunun zayıflatılmasını ve klorür dengesinin bozulmasına neden olarak nöronların çevresel uyaranlara verdikleri yanıtları şekillendirmektedir. Ayrıca TrkB aktivasyonunu takiben nöronlarda hücre içi Ca^{2+} düzeylerinde meydana gelen artış, bu reseptörün nörotransmitter salınımını etkilediğini ve dolayısıyla nöronal uyarılabilirlik üzerinde belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir (39).

Nöronların olgunlaşmasıyla birlikte klorür iyonlarının hücre içinde dengede tutulmasını sağlayan temel mekanizmalardan biri, potasyum-klor kotransportörü KCC2'nin aktivitesidir.

Nöronlara özgü olan bu taşıyıcı, klorür iyonlarının sitoplazmadan hücre dışına taşınmasına aracılık ederek inhibitör sinyal iletiminin doğru şekilde işlemesine katkıda bulunur. BDNF'nin TrkB reseptörü üzerinden oluşturduğu sinyalizasyonun artmasıyla, hipokampus kaynaklı nöronlarda KCC2 gen ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir (53).

KCC2 düzeylerindeki bu azalma, nöron içinde klorür iyonlarının birikmesine yol açmaktadır. Hücre içi klorür dengesinin bu şekilde değişmesi, GABAerjik iletimin inhibitör etkisini zayıflatarak nöronal membranın depolarize olmasına neden olmaktadır (54). Çeşitli deneysel çalışmalar, BDNF eksikliğinin nöronlarda aksiyon potansiyeli oluşumunun artmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Dentat girusta (DG) bulunan GABAerjik nöronlar ile p75NTR ekspresyonu olmayan nöronlar üzerinde gerçekleştirilen incelemelerde ise, olgun BDNF'nin nöronal uyarılabilirliği azalttığı ve aksiyon potansiyeli ateşlenmesini baskılayıcı bir etki gösterdiği ortaya konmuştur (42).

Nöronlarda uyarılabilirlik düzeyinin artması, pozitif geri besleme mekanizmaları aracılığıyla BDNF salınımını artırmaktadır. Artan BDNF düzeyi TrkB reseptörleriyle yeniden etkileşime girerek sinaptik güçlenme ve uzun süreli potansiyasyon (LTP) süreçlerini destekler. Bu döngü, öğrenme ve hafıza mekanizmalarının yanı sıra epilepsi başta olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıkların patofizyolojik temellerinde kritik bir rol oynamaktadır (55).

BDNF ve reseptörü TrkB epilepsi oluşum mekanizmasında hayati bir öneme sahiptir. Epilepsi, nöronal ağlarda ortaya çıkan anormal ve senkronize elektriksel deşarjlarla seyreden kronik bir nörolojik hastalıktır. Bu hastalığın gelişiminde rol oynayan moleküler düzeydeki mekanizmaların aydınlatılması, daha etkin ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının oluşturulması açısından kritik öneme sahiptir. Nörotrofinler ve bunlara ait reseptörlerin epilepsi patogeneğinde rol oynayabileceği görüşü, epileptik nöbetlerin dentat girusta (DG) NGF mRNA düzeylerinde belirgin bir artışa yol açtığının saptanmasıyla gündeme gelmiştir (54).

BDNF/TrkB etkileşimini takiben PLC- γ sinyal yolunun aktive olması, IP₃ ve DAG oluşumunda artışa yol açarak hücre içi Ca²⁺ salınımını artırır. Bu moleküler olaylar nöronal uyarılabilirliği yükselterek epileptogenez için elverişli bir ortam oluşturur. Epileptik aktivite sürecinde BDNF/TrkB yolunun belirgin şekilde aktive olduğu ve bu etkinin hipokampusun DG granül hücreleri ile CA1 piramidal nöronlarında yoğunlaştığı gösterilmiştir.

BDNF/TrkB aracılı sinyalizasyonun sinaptik güçlenmeyi desteklemesi ve GABAerjik inhibisyonu azaltması, nöronal depolarizasyonu artırarak epileptogenez için uygun bir zemin oluşturmaktadır. BDNF/TrkB sinyal yolunun aktive olması, KCC2 ekspresyonunu baskılayarak GABAerjik inhibitör etkinliği azaltır. KCC2 fonksiyonunun kaybı hücre içi klorür dengesini bozarak GABA'nın inhibitör etkisinin azalmasına neden olur. Bu durum nöronal uyarılabilirliği artırarak epileptogenez açısından kritik bir rol oynar.

2.3.5. p75NTR Yapısı ve Sinyal Yolakları

p75 nörotrofin reseptörünün keşfedilmesi 1973 yılına dayanır ve reseptör düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü (LNGFR) olarak tanımlanmıştır. Pro-BDNF, NT-3 ve NT-4 gibi nörotrofik ligandlar için etkinlik gösteren bir bağlanma bölgesi sunduğu bilinmektedir. Ayrıca p75NTR, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin bir üyesi olup, nöroplastisite, sinaptik işlevlerin düzenlenmesi, öğrenme ve bellek süreçleri ile nöronal yaşam ve hücre ölümü arasındaki dengenin sağlanmasında önemli bir etkiye sahiptir. p75NTR aracılı etkiler, ligand tipi ve hücresel çevreye bağlı olarak farklı yönlerde şekillenebilmektedir.

p75NTR, hücre dışı ligand bağlanmasından sorumlu glikozillenmiş bir ekstrasellüler domain, transmembran domain ve katalitik aktivitesi bulunmayan hücre içi domain olmak üzere üç bölümden oluşur. Hücre dışı domain, dört farklı sistein zengini tekrar bölgesi (CCRD1–4) içermektedir (56). p75NTR, Trk reseptörlerinin aksine intrinsik tirozin kinaz aktivitesinden yoksundur ve etkilerini çeşitli adaptör (aracı) proteinler üzerinden ortaya koymaktadır. Bu etkinin yönü ve sonucu, bağlanan ligand ve birlikte ifade edilen koreseptörlere bağlı olarak farklılaşmaktadır (57).

p75NTR, gelişimsel süreçlerin belirli aşamalarında duyuşal ve sempatik nöronlar, omurilik ve beyin sapı motor nöronları ile serebral korteks, serebellum ve bazal ön beyindeki nöronlar tarafından eksprese edilmektedir. p75NTR, ligand bağlanmasını takiben α - ve γ -sekretazlar tarafından gerçekleştirilen ardışık membran içi proteolitik kesimlere uğrayabilmektedir. Bu süreç sonunda hücre içi domainin serbestleştiğı ve hücre içi sinyal iletiminde rol oynadığı gösterilmiştir

p75NTR ile sortilinin birlikte oluşturduğu reseptör kompleksi, merkezi nöronlarda apoptozun düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. Pronörotrofinlerin p75NTR'ye bağlanarak sinyal iletebilmesi büyük ölçüde sortilin koreseptörünün eşlik etmesine bağlıdır.

Bu bağlamda sortilin, proBDNF- p75NTR etkileşimini güçlendirerek hücre içi sinyalizasyonun yönünü ve etkinliğini belirlemektedir (58).

ProBDNF'nin sortilin aracılığıyla p75NTR'ye bağlanması, p75NTR/sortilin reseptör kompleksinin oluşmasına ve kendine özgü hücre içi sinyal yollarının aktive edilmesine yol açmaktadır. Bu etkileşim sonucunda p75NTR'nin ölüm domaini, nörotrofin reseptörüyle etkileşimli faktör (NRIF) ve nörotrofin reseptörüyle etkileşimli MAGE homolog (NRAGE) gibi aracı proteinler üzerinden JNK sinyal yolunu harekete geçirir. Aktive olan JNK, c-Jun'un fosforilasyonunu tetikleyerek proapoptotik genlerin ekspresyonunu başlatır. Bu bağlamda, yapısal olarak ön ve olgun bölgeden oluşan proBDNF ise bu süreçte önce sortilinle, ardından p75NTR ile etkileşime girerek sinyal iletimini başlatmaktadır (59). Bu mekanizma özellikle nörogelişimsel süreçlerde ve patolojik koşullarda hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir.

p75NTR, yalnızca sortilin ile değil, aynı zamanda Nogo-66 reseptörü (NgR1) ile de etkileşime girebilmektedir. Bu etkileşim sonucunda apoptoz indüklenirken, miyelin ilişkili inhibitör sinyaller aracılığıyla nöronal büyüme baskılanmaktadır. Aktive olan p75NTR, Rho guanin nükleotidi ayrıştırma inhibitörü (Rho-GDI) ile etkileşime girerek Rho ilişkili protein kinaz (ROCK) aktivitesine aracılık eden RhoA'nın serbest kalmasını ve aktifleşmesini sağlar. Bu sürecin sonucunda nörit geri çekilmesi ve hücre morfolojide belirgin değişiklikler meydana gelir. RhoA/ROCK sinyal yolağı, aksonal yönlendirme, yapısal yeniden düzenlenme ve hasar sonrası rejenerasyonun baskılanması gibi süreçlerde kritik bir öneme sahiptir (60).

p75NTR, hücre bağlama bağlı olarak hem hücre ölümünü hem de hücre sağkalımını düzenleyebilen bir reseptördür. Sortilin eşliğinde aktive olan proBDNF/p75NTR sinyalizasyonu çoğunlukla JNK ve RhoA/ROCK yolları üzerinden proapoptotik etki gösterirken; p75NTR'ye bağlanan proBDNF, hücre iskeleti dinamiklerini düzenleyen RhoA GTPaz sinyal yolunu aktive edebilmektedir. Bazı durumlarda ise RIP2 ve TRAF6 gibi adaptor proteinler aracılığıyla NF- κ B sinyal yolunun aktivasyonu gerçekleşmektedir (61). NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonu, antiapoptotik genlerin ve nöronal sağkalımı destekleyen genlerin ekspresyonunu başlatabilmektedir (62).

Bu nedenle p75NTR'nin etkisi, bağlanan ligand formuna (proBDNF/mBDNF), koreseptör varlığına ve hücre mikroyevreye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

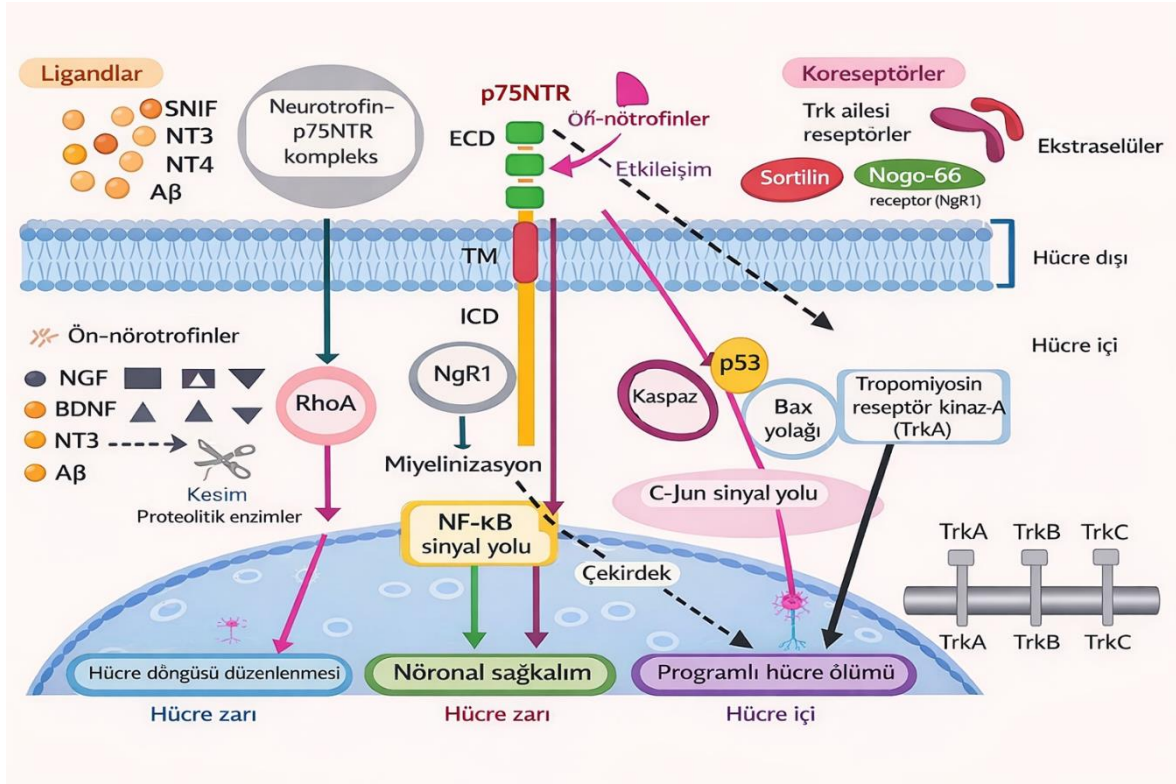
Epileptik süreçler sırasında p75NTR'nin ifade düzeylerinin arttığı ve bu artışın nöbetlerin hem sıklığı hem de şiddetiyle bağlantılı olduğu bildirilmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalar, epileptik nöbetler sonrasında proBDNF/p75NTR ekspresyonunun glial hücreler ve nöronlar kapsamında artış gösterdiğini göstermiştir (63).

ProBDNF/p75NTR sinyal iletimi; GABAerjik iletimin baskılanması (64), nöronal apoptozun artması ve nöroinflamatuvar süreçlerin desteklenmesi yoluyla epileptogenez mekanizmalarını başlatmaktadır (65). Özellikle Rho-ROCK sinyalizasyonu aracılığıyla GABAA reseptörlerinin düzenlenmesi ve lizozomal degradasyonunun artması, GABA iletiminin zayıflamasına ve bunun sonucunda epileptik nöbetlerin gelişmesine katkıda bulunur (64).

BDNF'nin plazminojen aracılığıyla mBDNF'ye dönüştürülmesinin uzun süreli epilepsi sırasında sekteye uğraması, proBDNF düzeylerinin yükselmesine ve buna bağlı olarak epileptik nöbetlerin daha şiddetli seyretmesine yol açmaktadır (65). Bu durum, ProBDNF/p75NTR sinyalizasyonunun uzun süreli epilepsi sonrası hipokampusta ortaya çıkan nöronal apoptozu büyük ölçüde yönlendirdiği anlaşılmaktadır (63). Epilepsinin uzun süreli seyrinin ardından proBDNF'nin yosunsu lifler ve mikrogliada, p75NTR'nin ise aksonlar, akson terminalleri, nöronlar ve astrositlerde geçici olarak lokalize olması dikkat çekmektedir (66).

ProBDNF'nin p75NTR'ye bağlanmasıyla aktive olan RhoA-JNK sinyal yollarının kaspaz aracılı apoptotik süreçleri tetikleyebildiği gösterilmiştir (67). Bu mekanizmalar, sinaptik bütünlüğün bozulmasına ve epileptik nöbetlerin ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır (Şekil 5).

TrkB aracılı sinyal iletiminin eksitasyon-inhibisyon dengesini eksitasyon yönüne kaydırabildiği gösterilmişken, proBDNF/p75NTR ekseninin özellikle inhibitör iletimin baskılanması ve nöronal apoptoz üzerinden epileptogenez sürecine katkıda bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu bağlamda, p75NTR aracılı sinyal yollarının farmakolojik olarak modüle edilmesi, epilepsi patogenezinde yer alan nörotrofin dengesizliğine müdahale etmeye yönelik potansiyel bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 5. p75 reseptörünün hücre içi sinyal yolları (Turkistani'den, 4)

2.4. P75NTR'nin Farmakolojik Modülasyonu

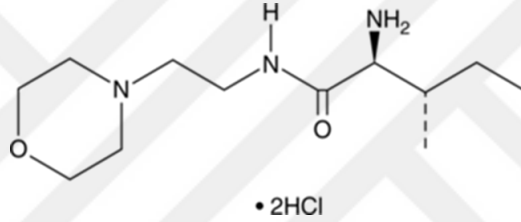
2.4.1. LM11A-31'in Yapısı ve Etki Mekanizması

p75 nörotrofin reseptörünün epileptogenez sürecindeki rolünün ortaya konulması, bu reseptörün farmakolojik olarak hedeflenebileceği düşüncesini gündeme getirmiştir. p75NTR aracılı sinyal iletiminin özellikle proBDNF/sortilin eksenini üzerinden JNK ve RhoA/ROCK yollarını aktive ederek nöronal apoptozu ve inhibitör iletimde bozulmayı tetikleyebildiği gösterilmiştir (59, 64, 67). Bu nedenle p75NTR'nin seçici modülasyonu, nörotrofin dengesizliği ile ilişkili patolojik süreçlerin kontrol altına alınması açısından potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

Bu bağlamda geliştirilen küçük molekül yapıları bir p75NTR ligandı olan LM11A-31, non-peptid yapıda bir reseptör modülatördür. Kimyasal olarak (2S,3S)-2-amino-3-metil-N-(2-morfolin-4-iletıl) pentanamid dihidroklorür şeklinde tanımlanmakta olup $C_{12}H_{25}N_3O_3$ moleküler formülüne ve 316,3 g/mol molekül ağırlığına sahiptir (Şekil 6). LM11A-31, oral uygulama sonrası kan-beyin bariyerini geçebilme özelliğine sahip olması nedeniyle merkezi sinir sistemi hastalıklarında farmakolojik kullanım açısından avantaj sağlamaktadır.

LM11A-31, p75NTR'ye yüksek afinite ile bağlanarak pronörotrofinlerin bu reseptör üzerinden tetiklediği hücre ölüm sinyallerini baskılar ve böylece nöronal hayatta kalımı destekleyici etki gösterir (9, 10). Ayrıca RhoA/ROCK sinyalizasyonunun düzenlenmesi yoluyla hücre iskeleti bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunduğu bildirilmektedir. Bu özellikleri, reseptörün tamamen antagonize edilmesinden ziyade sinyalizasyonun patolojik yönünün dengelenmesi şeklinde tanımlanmaktadır.

p75NTR'nin bağlama bağımlı olarak NF-κB aracılı sağkalım sinyallerini de aktive edebildiği göz önüne alındığında (61, 68), LM11A-31'in etkisi reseptörün fizyolojik işlevlerini tamamen ortadan kaldırmadan patolojik aktivasyonu sınırlayan bir modülasyon olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 6. LM11A-31 molekülünün yapısı

2.4.2. Nörodejeneratif Modellerde Kullanımı ve Epilepsideki Potansiyeli

Alzheimer ve Parkinson hastalıkları ile travmatik beyin hasarı gibi nörolojik durumlarda proBDNF düzeylerinin arttığı ve bu artışın p75NTR ekspresyonundaki yükselme ile paralel seyrettiği bildirilmiştir (69). Bu durum proBDNF/p75NTR etkileşiminin güçlenmesiyle ilişkilendirilmektedir. Bu sinyalizasyon eksenini, nöronal apoptoz ve sinaptik bütünlüğün bozulması ile sonuçlanmaktadır. Deneysel modellerde LM11A-31 uygulamasının nöronal kaybı azalttığı, sinaptik protein düzeylerini koruduğu ve bilişsel performansı iyileştirdiği gösterilmiştir (10).

Benzer şekilde depresyon modellerinde proBDNF/p75NTR etkileşiminin artmasının sinaptik plastisite kaybı ile ilişkili olduğu, LM11A-31 uygulamasının ise bu etkileri kısmen tersine çevirebildiği bildirilmiştir (69).

Epileptik süreçlerde p75NTR ekspresyonunun arttığı ve proBDNF/p75NTR sinyalizasyonunun nöbet şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (63). ProBDNF/p75NTR

ekseninin GABAerjik iletimi baskılayarak nöronal uyarılabilirliği artırdığı ve RhoA/ROCK ile JNK yolları üzerinden nöronal hasara katkıda bulunduğu bildirilmektedir (64, 67). Ayrıca uzun süreli epilepsi sırasında proBDNF düzeylerinin artışı ve mBDNF'ye dönüşümün azalması, p75NTR aracılı sinyalizasyonun baskın hale gelmesine yol açabilmektedir (65). In vivo çalışmalarda p75NTR aktivasyonunun, epileptik nöbetlere karşı artmış bir duyarlılık ile sonuçlandığı gösterilmiştir (63).

Bu veriler ışığında, p75NTR'nin farmakolojik modülasyonunun epileptogenez sürecinde nöronal hasarı ve inhibitör iletimdeki bozulmayı azaltabileceği öngörülmektedir. LM11A-31'in p75NTR aracılı proapoptotik ve proeksitatör sinyalleri dengeleme potansiyeli, epilepsi modellerinde terapötik bir aday olarak değerlendirilmesine zemin hazırlamaktadır.

2.5. PTZ ile Oluşturulan Deneysel Epilepsi Modeli

Pentilentetrazol (PTZ), merkezi sinir sistemi üzerinde güçlü konvülzan etkilere sahip sentetik bir kimyasal bileşik olup, deneysel epilepsi ve nörolojik hastalık modellerinde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (70). Literatürde kardiyazol, metrazol, pentetrazol, corazol ve deumakard gibi farklı isimlerle de anılan PTZ, özellikle nöbet indüksiyonundaki güvenilirliği nedeniyle tercih edilmektedir (71). PTZ, düşük dozlardan yüksek dozlara kadar geniş bir etki spektrumu sergileyerek, deneysel çalışmalarda anksiyete benzeri davranışlardan jeneralize tonik-klonik nöbetlere kadar farklı nörolojik yanıtların oluşturulmasına olanak tanımaktadır (72). Bu özellik, PTZ'yi hem akut nöbet modellerinde hem de kindling temelli kronik epilepsi çalışmalarında kullanılabilir kılmaktadır (73).

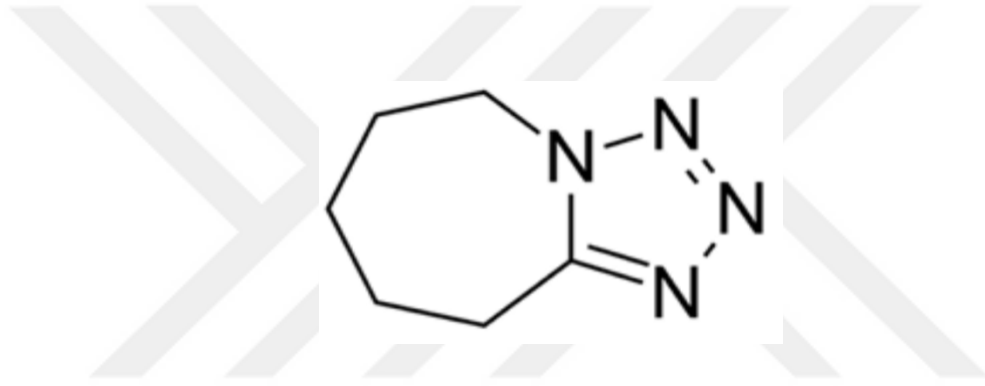
Deneysel epilepsi araştırmalarında PTZ'nin tercih edilmesinin başlıca nedenleri arasında uygulama kolaylığı, yüksek tekrarlanabilirlik, cerrahi girişim gerektirmemesi ve farklı laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilir sonuçlar sunması yer almaktadır (74). Bu yönleriyle PTZ, yeni antiepileptik ve nöroprotektif ajanların taranmasında standartlaştırılmış bir farmakolojik araç olarak kabul edilmektedir (67).

Ayrıca PTZ modeli, epilepsinin altında yatan nörobiyolojik süreçlerin araştırılmasında; nöronal uyarılabilirlik, sinaptik plastisite, nöroinflamasyon ve hücrel stres yanıtları gibi mekanizmaların incelenmesine olanak sağlamaktadır (75). Bu nedenle PTZ, epilepsi patofizyolojisinin deneysel düzeyde anlaşılmasına katkı sağlayan temel kimyasal konvülzanlardan biri olarak değerlendirilmektedir (73).

2.5.1. PTZ'nin Farmakolojik Özellikleri ve Yapısı

Pentilenetetrazol (PTZ; Şekil 7), kardiyazol, metrazol, pentetrazol, pentametilenetetrazol, corazol ve deumakard gibi farklı adlarla da bilinen, tetrazol halkası içeren, heterosiklik bir bileşiktir. Moleküler formülü $C_6H_{10}N_4$ olan PTZ'nin moleküler ağırlığı 138,17 g/mol'dür ve IUPAC adı 6,7,8,9-tetrahidro-5H-tetrazolo[1,5-a]azepin olarak tanımlanmaktadır.

Fiziksel özellikleri açısından PTZ, genellikle beyaz ya da renksiz kristal yapıdaki bir toz halinde bulunur. Düşük lipofilik özellik gösteren ve hidrofilik yapısı baskın olan PTZ, belirgin asidik veya bazik özellikler göstermeyen nötr karakterli bir bileşik olarak sınıflandırılmaktadır.



Şekil 7. PTZ molekülünün yapısı

PTZ, davranışsal, nörofizyolojik ve nörokimyasal değişiklikleri indükleyebilme kapasitesi nedeniyle deneysel epilepsi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, potansiyel antiepileptik ve/veya nöroprotektif etkilere sahip yeni bileşiklerin taranmasında yaygın olarak kullanılan bir ajandır. Düşük doz aralığında (10–40 mg/kg) uygulandığında anksiyojenik özellik göstererek deney hayvanlarında anksiyete benzeri davranışları tetikleyebilmektedir. Buna karşılık, 60 mg/kg ve üzerindeki dozlarda PTZ uygulaması miyoklonik ve jeneralize tonik-klonik nöbetlere yol açabilmekte ve kimyasal kindling modeli yani nöbet şiddetinde kademeli artış ile sonuçlanmakta ve buna eşlik eden nöronal hücre ölümü gözlenmektedir. Daha yüksek dozlarda (≥ 80 mg/kg) ise PTZ'nin mortal etkiye sahip olduğu bildirilmiş olup, bu dozlar esas olarak nöroprotektif potansiyele sahip bileşiklerin değerlendirilmesine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir (76).

2.5.2. PTZ Kindling Modeli ve Deneysel Kullanımı

Epileptik nöbetler, merkezi sinir sisteminde (MSS) uyarıcı nörotransmitterler (glutamat, aspartat) ile inhibitör nörotransmitterler [γ -aminobütirik asit (GABA) ve glisin] arasındaki fizyolojik dengenin bozulması sonucu ortaya çıkabilmektedir. Bu durum çoğunlukla GABAerjik nörotransmisyonun zayıflamasına bağlı olarak nöronal inhibisyonun azalması ya da glutamaterjik sistemin aşırı aktivasyonu ile karakterize edilen artmış uyarıcı sinaptik iletimden kaynaklanmaktadır (77).

İnhibitör sinaptik etkinliğin kimyasal yollarla baskılanması, deneysel epilepsi modellerinde nöbet oluşumunu tetiklemek amacıyla yaygın olarak kullanılan temel yaklaşımlardan biridir. Bu kapsamda geliştirilen modeller arasında, pentylenetetrazol (PTZ) ile oluşturulan epileptik nöbet modeli, yeni ve potansiyel antiepileptik ajanların etkinliğinin değerlendirilmesinde yüksek duyarlılığa sahip, güvenilir bir model olarak öne çıkmaktadır (78).

PTZ modelinin önemli avantajları arasında uygulama kolaylığı, yüksek tekrarlanabilirlik ve cerrahi girişim gerektirmemesi yer almaktadır. Nöbetlerin intraperitoneal veya subkutan uygulama yoluyla kısa sürede ve güvenilir biçimde indüklenebilmesi, deneysel sürecin kontrol edilebilirliğini artırmaktadır. Bunun yanı sıra, iyi tanımlanmış PTZ kindling modeli, bilimsel literatürde geniş kabul görmüş olup farklı araştırmalar arasında sonuçların karşılaştırılmasını mümkün kılmaktadır. Hayvan modellerinde PTZ uygulaması, epileptik nöbetlerin ve epilepsinin altında yatan nörobiyolojik mekanizmaların ayrıntılı olarak incelenmesine olanak sağlamakta ve bu sayede daha etkili ve güvenli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. PTZ, bu nedenlerle sıklıkla kimyasal olarak indüklenen akut ve kronik epileptik nöbet modellerinde kullanılmaktadır (79). Bununla birlikte, PTZ modelinin insan epilepsilerinin karmaşık ve kronik doğasını tam olarak yansıtamayabileceği ve PTZ'nin uyarıcı özellikleri nedeniyle tekrarlayan uygulamalarda sistemik etkiler oluşturabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

2.5.3. PTZ'nin Epileptojenik Mekanizmaları

PTZ'nin etki mekanizması uzun süre tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, epileptojenik etkilerinin temel olarak GABAA reseptörü aracılı inhibitör aktiviteyi non-kompetitif şekilde baskılamasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. İlk dönem çalışmalarda, benzodiazepinlerin PTZ ile indüklenen nöbetleri baskılayabilmesi bu iki ajan arasında fonksiyonel bir karşılık bulunduğunu düşündürmüştür (79). Ancak daha sonraki araştırmalar, PTZ'nin GABAA reseptörüne ait klorür kanalının picrotoxin-duyarlı bağlanma bölgesi ile etkileşime girdiğini ortaya koymuştur. Picrotoxin, GABAA reseptörüne ait klorür kanalını bloke eden güçlü bir konvülzan ajandır (80).

GABAA reseptörü, merkezi bir iyon kanalı (iyonofor) çevresinde düzenlenmiş toplam 19 farklı alt birimden ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π ve $\rho 1-3$) oluşan heteropentamerik bir protein kompleksidir. Reseptörün aktivasyonu, iki GABA molekülünün α ve β alt birimleri arasındaki bağlanma bölgelerine tutunmasıyla gerçekleşir ve bu durum klorür iyonlarının (Cl^-) hücre içine selektif geçişini sağlar. Sonuç olarak hücre membranı hiperpolarize olur ve nöronal uyarılabilirlik baskılanır (81). PTZ'nin bu inhibitör mekanizmayı baskılaması, santral inhibitör tonusun azalmasına ve nöronal hiperuyarılabilirliğin ortaya çıkmasına yol açmaktadır.

PTZ, GABAA reseptör aracılı inhibitör transmisyonun baskılanmasına ek olarak, beynin antioksidan savunma sistemlerini bozmakta, oksidatif stresi yükseltmekte ve nöroinflamasyonu tetiklemektedir. Bu etkilerin birleşimi, özellikle şiddetli veya tekrarlayan nöbetler sonrasında hipokampus ve serebral kortekste belirgin olmak üzere nörotoksik süreçlere ve yapısal değişikliklere yol açmaktadır (82).

PTZ'nin konvülzan ve nörotoksik etkilerinin temelinde, GABAA reseptör aktivitesinin baskılanması sonucu santral inhibitör tonusun azalması ve nöronal hiperuyarılabilirliğin ortaya çıkması yer almaktadır. Bu süreç başlangıçta AMPA ve kâinat reseptörleri aracılığıyla başlamakta, devamında glutamatın aşırı NMDA reseptör aktivasyonu ile sürdürülmektedir. Katyon kanalları olan NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, hücre içine Na^+ ve Ca^{2+} girişini artırarak membran depolarizasyonuna neden olur (83). Artan iyon girişi, voltaj bağımlı sodyum (Nav) ve kalsiyum ($Cav1$ ve $Cav2$) kanallarının aktivasyonunu tetikleyerek bu iyonların hücre içine daha fazla akmasına yol açar. Nav kanallarının aşırı aktivasyonu anormal aksiyon potansiyellerinin yayılmasını

kolaylaştırırken, Cav1/2 kanalları nörotransmitter salınımını, özellikle glutamat salınımını artırır (84).

Hücre içine giren Ca^{2+} , hipokampal nöronlarda endoplazmik retikulumda bulunan ryanodin reseptörleri aracılığıyla kalsiyumla indüklenen kalsiyum salınımını (CICR) başlatır (85). Sitoplazmik Ca^{2+} düzeylerindeki artış ($[Ca^{2+}]_c$), epileptik nöbetlerin başlatılması ve sürdürülmesinde kritik rol oynar. Yüksek Ca^{2+} düzeyleri ayrıca endonükleazlar, proteazlar, kinazlar, fosfatazlar ve fosfolipazlar gibi çeşitli enzimlerin aktivasyonuna neden olarak hücrel homeostaz için gerekli biyomoleküllerin yıkımını tetikler (86). Bunun yanı sıra apoptotik yolları aktive eder, serbest radikal üretimini artırır, oksidatif strese ve mikrogial aktivasyona yol açar (87). Bu süreçler sonucunda hipokampusta nitrik oksit (NO), siklooksijenaz-2 (COX-2)/prostaglandin E2 (PGE2) ve interlökin-1 β (IL-1 β) gibi proinflamatuvar medyatörlerin ekspresyonu ve salınımı artar (88). Ayrıca COX-2/PGE2 yolunun, G proteinine bağlı EP1 reseptörlerinin aktivasyonu üzerinden hücre içi Ca^{2+} artışına yol açarak epileptik nöbetlerin modülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Bu mekanizma, PTZ ile indüklenen nöbet modeli kullanılarak halen araştırılmaktadır.

Artmış hücre içi Ca^{2+} düzeyleri, glutamat ve aspartat gibi uyarıcı nörotransmitterlerin salınımını artırarak nöronal uyarılabilirliği besleyen pozitif bir geri besleme döngüsünün oluşmasına katkıda bulunmaktadır (89). Buna ek olarak, inflamatuvar hücrelerden salınan IL-1 β , astroglial glutamat taşıyıcılarının ekspresyonunu azaltarak sinaptik aralıktaki glutamatın uzaklaştırılmasını engeller. Tüm bu değişiklikler, PTZ kaynaklı nöbetler sırasında beyinde eksitotoksisite, oksidatif stres ve inflamasyonun birbirini beslediği patolojik bir döngü oluşturarak ciddi nörotoksisiteye ve potansiyel olarak ölümcül sonuçlara yol açabilmektedir (78).

PTZ ile indüklenen epileptik nöbetler sırasında artmış hücre içi Ca^{2+} düzeyleri, oksidatif stres ve nöroinflamatuvar yanıtların aktivasyonu yalnızca eksitotoksik hasara yol açmakla kalmayıp aynı zamanda nörotrofin dengesinde de belirgin değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle tekrarlayan nöbetler sonrasında proBDNF düzeylerinde artış ve buna eşlik eden p75NTR ekspresyonunda yükselme bildirilmektedir. ProBDNF/p75NTR sinyalizasyonunun aktive olması, JNK ve RhoA/ROCK yolları üzerinden nöronal apoptozu artırmakta, GABAerjik inhibitör iletimi zayıflatmakta ve böylece epileptogenez sürecini besleyen patolojik bir mikroçevre oluşturmaktadır (Şekil 8). Bu bulgular, epileptik süreçte p75NTR aracılı sinyal yollarının farmakolojik olarak modüle edilmesinin

nöroprotektif bir strateji olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, p75NTR'nin küçük molekül modülatörlerinden biri olan LM11A-31'in, proBDNF/p75NTR eksenini düzenleyerek epileptik süreç üzerindeki potansiyel etkilerinin araştırılması önem kazanmaktadır.

Şekil 8. PTZ'nin moleküler etki mekanizması (Monteiro'dan, 98)

Epilepsi hastalığının tedavileri arasında toplumlarda sıklıkla kullanılan yöntem farmakolojik tedavidir. Kullanılan bu ilaçlar anti-epileptik ilaçlar olarak adlandırılırlar ve çalışma şekilleri olarak epileptogenez sürecinde bir veya daha fazla mekanizma üzerinden etki sağlayarak nöbetleri baskırlar ya da şiddetini azaltırlar. İlaçların amacı inhibisyonu eksitasyon karşısında daha baskın duruma getirerek oluşacak olan nöbeti durdurma ya da yavaşlatmaktır. Antiepileptik ilaçları etkiledikleri mekanizmalara göre gruplandırma yaptığımızda dört adet başlık altında ele alabiliriz (42, 90).

- 2- GABA aracılı inhibitör sinyallerinin güçlendirilmesi (örneğin; benzodiazepinler, barbitüratlar, tiagabin, vigabatrin);
- 3- Glutamat aracılı eksitator uyarılmanın baskılanması (örneğin: perampanel, lamotrijin, felbamat)
- 4- Voltaj bağımlı iyon kanallarının düzenlenmesiyle aksiyon potansiyeli oluşumunun baskılanması; Voltaj kapılı sodyum kanalları (örneğin; fenitoin, karbamazepin, lamotrijin, topiramat, zonisamid, lakozamid), voltaj kapılı kalsiyum kanalları (örneğin; etosüksimit) ve voltaj kapılı potasyum kanalları (örneğin; retigabin, ezogabin).

Epileptik nöbetlerin kontrolü amacıyla yirmiden fazla antiepileptik ilacın klinik kullanıma sunulmuş olmasına rağmen, epilepsi hastalarının yaklaşık üçte biri uygulanan ilaç tedavilerine yeterli yanıt vermemekte ve dirençli nöbetlerle seyretmektedir. İlaça dirençli epilepsi (DRE) olarak tanımlanan bu durum, hastalarda erken ölüm olasılığını, yaralanma riskini, psikososyal işlevsizlik düzeyini ve genel yaşam kalitesindeki düşüşü anlamlı biçimde artırmaktadır. Bu nedenle, daha etkili ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi güncel klinik uygulamalar açısından kritik bir ihtiyaçtır. Bu doğrultuda, yeni moleküler hedeflerin belirlenmesine ve potansiyel antiepileptik bileşiklerin terapötik etkilerinin incelenmesine yönelik araştırmalar devam etmektedir (90).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemeler Tablo 1’de verilmiştir.

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

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Üretici Firma/Model
Pipet çekici	Sutter P-1000
4 kanallı diferansiyel amplifikatör	A – M systems 1700
Analog – Dijital çevireç	Molecular Devices 1440A
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
Analog – Dijital çevireç	Sinyallerin dijital hale çevrilmesi ve verilen kenetleme komutlarının amplifikatöre iletilmesi
Stereotaksik çerçeve (WPI)	Kayıt sırasında hayvanın sabitlenmesi ve elektrot pozisyonlarının tespiti
2 adet masaüstü bilgisayar	Veri kazanımı ve analizlerin yapılması
Hassas terazi	Kimyasalların hassas ağırlık ölçümlerinin yapılması
Otomatik pipet seti	Çözeltilerin hazırlanması
Dişçi Toru	ECoG cerrahi işlemleri için

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
D-Glukoz	Sigma - Aldrich
LM11A – 31	Cayman
Pentilentetrazol (PTZ)	Sigma-Aldrich
DLG-4 (PSD-95)	Ato Chembio
Synaptofisin (SYP)	Ato Chembio

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Hayvanları

KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na yapılan 2024/ 19 protokol numaralı karar (Bkz. Ek 1 Etik Kurul Onayı) ile etik kurul onayı alındıktan sonra 12 – 16 haftalık erkek, 40 adet C57BL/6 ırkına ait yabani tip fareler üretildikleri ve barındırıldıkları KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

3.2.2. Deney Grupları ve Deneysel Tasarım

Bu çalışmada kullanılan 12–16 haftalık erkek C57BL/6 yabani tip fareler, rastgele örnekleme yöntemi kullanılarak dört deney grubuna ayrıldı. Her grupta eşit sayıda hayvan bulunmasına özen gösterildi ($n = 10/\text{grup}$). Bütün gruplardaki hayvanlara aşağıda anlatıldığı gibi gün aşırı enjeksiyon yapıldı. Sırasıyla enjeksiyonu yapılan bütün gruplardaki hayvanlar davranış skorlaması yapılmak üzere kafeslere konuldu ve 30 dk'lık video kaydı için kamera karşısına yerleştirildi. Video kaydı tamamlandıktan sonra hayvanlar kendi kafeslerine alınarak sonraki enjeksiyona kadar beklendi. Deney süreci boyunca enjeksiyon uygulamaları ve davranış skorlaması sırasında standart prosedürlere bağlı kalındı.

Hayvanlar aşağıdaki dört gruba ayrıldı:

1. Saline Kontrol Grubu (K)

Bu gruptaki hayvanlara deney süresi boyunca gün aşırı olarak intraperitoneal (i.p.) yoldan 0,2 ml %0,9 NaCl (saline) uygulandı. PTZ veya LM11A-31 uygulanmadı. Bu grup, enjeksiyon stresinin ve prosedürel uygulamaların bazal etkilerini değerlendirmek amacıyla oluşturuldu.

2. LM11A-31 Kontrol Grubu (L)

Bu gruptaki hayvanlara gün aşırı olarak 50 mg/kg dozunda LM11A-31 intraperitoneal yoldan uygulandı. PTZ enjeksiyonu yapılmadı. Bu grup, LM11A-31'in tek başına davranışsal nöbet aktivitesi ve elektrofizyolojik parametreler üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla oluşturuldu.

3. PTZ Grubu (P)

Bu gruptaki hayvanlara gün aşırı olarak 35 mg/kg dozunda pentilentetrazol (PTZ) intraperitoneal yoldan uygulandı. Toplam 8 enjeksiyon içeren kindling protokolü uygulandı. PTZ enjeksiyonlarını takiben hayvanlar 30 dakika süreyle video kaydı ile gözlemlendi ve davranışsal nöbet skorlaması yapıldı. Bu grup, PTZ ile indüklenen epileptik nöbet gelişimini ve kindling sürecini değerlendirmek amacıyla oluşturuldu.

4. LM11A-31 + PTZ Grubu (P+L)

Bu gruptaki hayvanlara PTZ uygulamalarına başlanmadan 1 hafta önce gün aşırı olarak 50 mg/kg dozunda LM11A-31 ön tedavisi uygulandı. Daha sonra her PTZ (35 mg/kg) enjeksiyonundan 15 dakika önce LM11A-31 uygulandı. PTZ enjeksiyonu gün aşırı toplam 8 enjeksiyon olacak şekilde sürdürüldü. Her PTZ enjeksiyonunu takiben hayvanlar 30 dakika boyunca video kaydı ile izlendi ve davranış skorlaması yapıldı. Bu grup, p75NTR modülasyonunun PTZ ile indüklenen epileptik nöbet gelişimi ve nöbet progresyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla oluşturuldu.

Deneysel Sürecin Genel Akışı

Tüm gruplarda enjeksiyon öncesinde hayvanların vücut ağırlıkları ölçüldü ve doz hesaplamaları bireysel olarak yapıldı. Kindling sürecinin tamamlanmasının ardından elektrokortikografi (ECoG) kayıtları alındı ve takiben doku örnekleri biyokimyasal analizler için toplandı.

3.2.3. Taze Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan tüm farmakolojik ajanlar enjeksiyon gününde taze olarak hazırlandı ve intraperitoneal (i.p.) yoldan uygulandı.

Pentilentetrazol (PTZ): Pentilentetrazol (PTZ) normal serum fizyolojikte (%0,9 NaCl çözeltisi) çözülerek 35 mg/kg dozunda farelere intraperitoneal (i.p.) olarak gün aşırı verileceğinden gün aşırı taze olarak hazırlandı (91).

LM11A-31: İlaç normal serum fizyolojik çözeltisinde taze hazırlanarak farelere 50 mg/kg i.p. olarak verileceğinden enjeksiyon gününde taze olarak hazırlandı (10, 92).

Üretan: Elektrokortikografi (ECoG) kayıtları öncesinde hayvanlar Üretan ile anestezi yapıldı. Üretan, steril serum fizyolojik (%0,9 NaCl) içerisinde çözülerek taze hazırlandı. Ve 1,75 g/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Çözelti konsantrasyonu, her hayvana vücut ağırlığına göre uygun hacimde enjeksiyon yapılacak şekilde ayarlandı. Enjeksiyon hacmi her hayvanın kilogram başına hesaplanan doza göre belirlendi. Anestezi derinliği pedal refleks (parmak sıkıştırma) ile kontrol edildi.

3.2.4. PTZ Kindling Protokolü

PTZ ile oluşturulan kimyasal kindling modeli, epileptogenez sürecini ve nöbet ilerleyişini değerlendirmek amacıyla uygulandı. Bu modelde subkonvülsif dozlarda PTZ'nin tekrarlayan dozlarında nöbet şiddetlerinde kademeli bir artış olması hedeflendi. PTZ hayvanlara gün aşırı olacak şekilde toplam 8 enjeksiyon i.p. olarak verildi. Uygulanan doz (35 mg/kg) tek başına tüm hayvanlarda tonik-klonik nöbet oluşturmayacak, ancak tekrarlayan uygulamalarla nöbet şiddetinin progresif olarak artmasını sağlayacak subconvulsif dozdur. P+L grubunda, PTZ uygulamalarına başlamadan 1 hafta önce gün aşırı olarak 50 mg/kg dozunda LM11A-31 ön tedavi olarak uygulandı. PTZ uygulamalarına başladıktan sonra da her PTZ enjeksiyonundan önce LM11A-31 uygulaması devam ettirildi.

Davranışsal Gözlem ve Video Kaydı

Her PTZ enjeksiyonunun ardından her hayvan tek bir kafese alınmış ve tek seferde 6 hayvan video kamera ile 30 dakika boyunca kayıt altına alındı (Şekil 9). Tüm gözlemler sabit ortam koşullarında yapıldı.

Hayvanların davranışları daha sonra kaydedilen video görüntülerinden analiz edildi. Gözlemler sırasında kimliklendirme amacıyla hayvanların grup numaraları kafeslerin üzerine görünür şekilde yazıldı.



Şekil 9. Kayıt alınan hayvan grupları

Racine Nöbet Skorlama

4 gruba ayırdığımız hayvanların davranış skorlarını analiz etmek amacıyla racine skorlama ölçeği kullanılmıştır (93).

- 0: Normal davranış,
- 1: hareketsizleşme, yüzüstü yatma,
- 2: baş sallama, yüz, ön ayak ve arka bacak miyoklonusu (seğirmesi),
- 3: sürekli tüm vücut seğirmesi, miyoklonik sıçramalar, sert bir şekilde dik tutulan kuyruk,
- 4: şaha kalkma, tonik nöbet, bir yana düşme,
- 5: tonik-klonik nöbet, sırtüstü düşme, çılgınca koşma ve zıplama,
- 6: ölüm

Bu ölçek kullanılarak her fare için davranış skorlaması ayrı ayrı yapıldı. Her fare için toplam 30 dk'lık kayıt alınmış ve skorlama yapılırken 30 dk üç eşit zaman dilimine bölündü. 10 ar dakikalık zaman diliminde izlenen hayvanların davranışları yukarıda bulunan ölçeğe göre not edildi. Elde edilen bu veriler 4 gruptaki tüm fareler için tek tek izlenip not edildi. Elde edilen nöbet skorları zamana bağlı olarak analiz edilerek, her hayvan için

kümülatif nöbet yükü de hesaplandı. Tekrarlayan PTZ enjeksiyonları sonucunda nöbet şiddetinde progresif artış gözlenmesi kimyasal kindling olarak değerlendirildi.

3.2.5. Elektrokortikografi (ECoG) Kayıtları

Tüm gruplardaki hayvanlar 8 enjeksiyon sonrasında gruplar halinde bölünerek, ECoG kaydı için hazırlandı. Bir grup için 2 güne bölünen kayıt alma işlemi her hayvan için ayrı ayrı olarak ve titizlikle yapıldı. Kafeslerinden çıkarılan hayvan deney için hazırlandı. Gerekli solüsyonlar taze bir şekilde günlük olarak hazırlandı.

İlk olarak taze üretilen hazırlandı. Ardından laboratuvarında bulunan hassas terazi ile hayvanın kilosu ölçüldü ve not edildi. Hazırlanan üretilen 1.75 gr/kg'lık doz olacak şekilde fareye intraperitoneal olarak enjekte edildi ve karanlık bir kutu içerisinde hava alacak şekilde uyutuldu. Anestezi altındaki hayvanın uyku durumu parmak sıkıştırma yöntemi ile kontrol edildi. Farelerin kafa derisi orta hattın bistiği ile açıldıktan sonra bregma tespit edildi. Dişçi toru kullanılarak sağ hemisferde bregmanın 1 mm önüne ve sagittal çizginin 1.5 mm yanına bir delik, diğeri bregmanın 3 mm arkasına ve sagittal çizginin 1.5 mm yanına bir delik daha açıldı. Açılan bu iki adet deliğe elektrotlar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Farenin kuyruğuna toprak elektrodu da bağlanarak kayıt alma işlemine başlandı (94) (Şekil 10).



Şekil 10. Stereotaksik cihaza yerleştirilmiş hayvan

Bilgisayardan AxoScope 10.7 programı açıldı ve kayıt protokol seçildi. Her kayıt süresi 15 dk olarak belirlendi. Her bir hayvan için 2 adet bazal kayıt alındı ve bilgisayarda ayrı ayrı olarak dosyalandı.

Spontan kortikal sinyaller, AC amplifikatör (A-M Systems Model 1700) kullanılarak 0,1–50 Hz bant geçiren filtre aralığında filtrelenmiş ve $10.000\times$ oranında amplifiye edildi. Elde edilen sinyaller, Digidata 1440A veri toplama sistemi (Axon Instruments/Molecular Devices, Union City, CA, USA) aracılığıyla 1000 Hz örnekleme hızında dijitalize edilmiştir. Elektrofizyolojik verilerin kaydı, depolanması ve analizi pCLAMP yazılım paketi kullanılarak gerçekleştirildi.

Kayıtlar akut PTZ uygulaması olmaksızın gerçekleştirildi; yani ECoG kayıtları sırasında veya hemen öncesinde PTZ uygulanmadı. Bu nedenle elde edilen veriler akut nöbet aktivitesini değil, tekrarlayan PTZ kindling sonrası oluşan interiktal ağ aktivitesini yansıtmaktadır.

Kayıt alma işlemi bittikten sonra hayvan titizlikle stereotaksik aletten alındı ve beyinleri hızlıca çıkartıldı, hipokampus ve korteks ayrılarak biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmak üzere üzerinde hipokampus ve korteks için ayrı ayrı hazırlanan ependorfların içine koyuldu. Ardından testlerin yapılacağı zamana kadar saklanmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dolaba kaldırıldı.

Bir günlük çalışmada bir gruptan toplam 5 adet hayvanın ECoG kaydı çekildi ve ardından beyinlerinin hipokampus ve korteks bölgeleri çıkartılarak işlemler tamamlandı. Ertesi günde kalan aynı grubun 5 hayvanı için aynı prosedür uygulandı ve onlarında kayıt alma ve beyin çıkarma işlemlerinin tamamlanmasının ardından bu grubun deneysel olarak işlemleri tamamlanmış oldu. Bu şekilde 4 grubun ECoG kayıtları alındı. Elde edilen kayıt verileri bilgisayarda ayrı ayrı olarak dosyalandı.

Güç Spektrumu ve RMS Analizi

Bu çalışmada ECoG kayıtlarından toplam ortalama güç (total mean power) hesaplandı. Ayrıca her grup için kök ortalama kare (root mean square, RMS) değerleri analiz edildi. RMS değeri, EEG/ECoG sinyalinin genel gücünü ve amplitüd değişkenliğini yansıtan nicel bir parametre olarak hesaplandı. RMS değerleri, pCLAMP yazılım paketi içinde yer alan Clampfit analiz modülü kullanılarak hesaplandı. Bu yöntem ile sinyal amplitüdü ve nöronal aktivitenin genel değişkenliğini nicel olarak değerlendirildi. Toplam güç analizi ve

RMS hesaplamaları, tüm hayvanlar için aynı analiz parametreleri kullanılarak gerçekleştirildi ve gruplar arası karşılaştırmalar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.6. Biyokimyasal Analizler

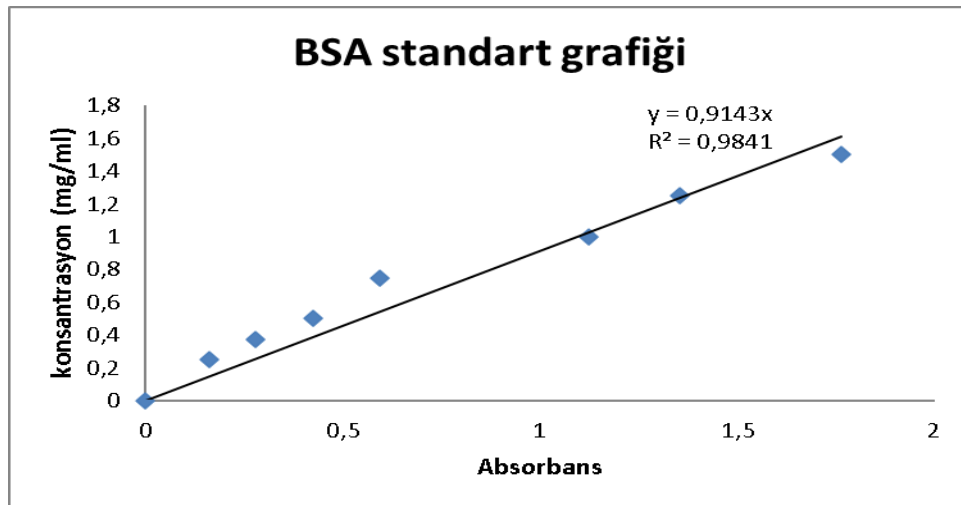
Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Korteks ve hipokampus dokuları, soğuk lizis tamponu (pH 7,4) içerisinde homojenize edildi. Kullanılan lizis tamponunun içeriği: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,7 mM Na₂HPO₄, %1 Triton X-100, Proteaz inhibitörleri (5 µg/mL aprotinin ve 5 µg/mL leupeptin).

Homojenizasyon işlemi ultrasonik hücre parçalayıcı (Sonics Vibracell, Newtown, CT, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen homojenatlar 4 °C’de 20.000 × g’de 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar analizlerde kullanılmak üzere toplandı.

Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

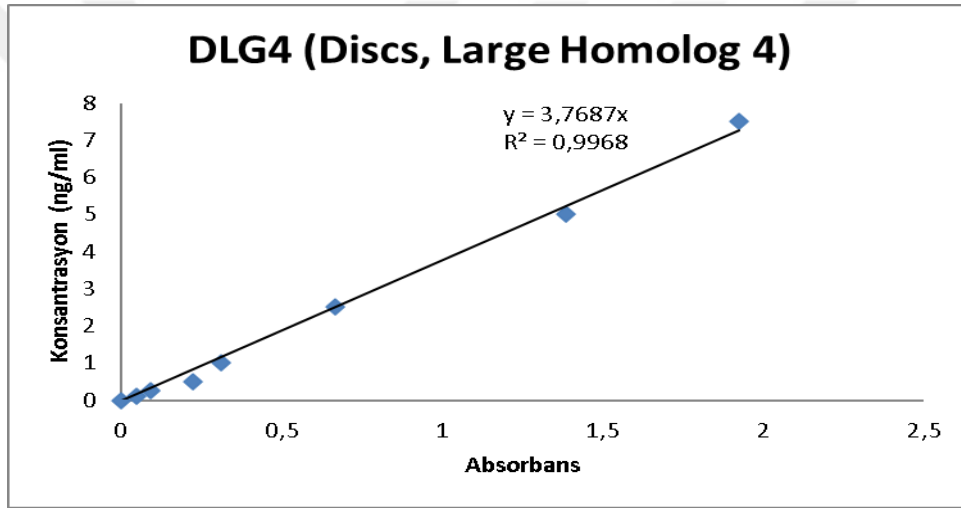
Doku homojenatlarının toplam protein konsantrasyonu Lowry yöntemi kullanılarak belirlendi (95). Bu yöntemde proteinlerin alkali bakır reaktifi ile reaksiyona girmesi ve ardından Folin–Ciocalteu reaktifi ile renk oluşumu esas alınmaktadır. Absorbans ölçümleri 750 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu kullanılarak gerçekleştirildi. Protein konsantrasyonları sığır serum albümini (BSA) standart eğrisi (Şekil 11) kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar mg protein/mL olarak ifade edildi.



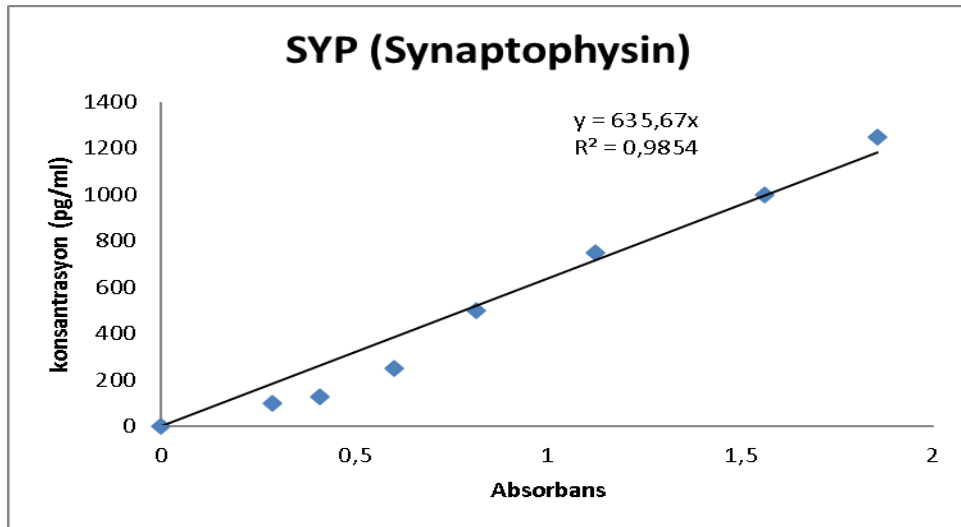
Şekil 11. Lowry yöntemi ile protein tayini için kullanılan BSA standart eğrisi

ELISA Analizleri

Sinaptik Protein düzeyleri, ticari ELISA kitleri kullanılarak belirlendi. Ölçülen parametreler: Postsinaptik density proteini-95 (PSD-95/DLG4) ve Sinaptofizin (Synaptophysin/SYP). Analizler üretici firma talimatlarına uygun şekilde (Ato Chembio) gerçekleştirildi. Absorbans ölçümleri 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) kullanılarak yapıldı. Konsantrasyon hesaplamaları, kit tarafından sağlanan standart protein çözeltileri kullanılarak oluşturulan standart eğriler üzerinden yapılmıştır (Şekil 12 ve Şekil 13). Sonuçlar ng/mL doku olarak ifade edildi.



Şekil 12. PSD-95 (DLG-4) ELISA standart eğrisi



Şekil 13. Sinaptofizin (SYP) ELISA standart eğrisi

Oksidatif Stres Parametreleri

Oksidatif stres değerlendirmesi kapsamında toplam antioksidan kapasite (TAS), toplam oksidan düzeyi (TOS) ve lipid peroksidasyonu belirteci olarak tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS)  l  ld . TAS ve TOS düzeyleri ticari kolorimetrik analiz kitleri (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak belirlendi. TAS sonuçları  mol Trolox eşdeğeri/mg protein TOS sonuçları nmol H₂O₂ eşdeğeri/mg protein birimlerinde ifade edildi. Lipid peroksidasyonu değerlendirmesi amacıyla malondialdehit (MDA) oluşumunu yansıtan TBARS düzeyleri ölçüldü.

TBARS absorbans ölçümleri 532 nm dalga boyunda gerçekleştirildi ve sonuçlar nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi. Tüm biyokimyasal analizler doğruluk ve güvenilirliği artırmak amacıyla çift örnek (duplicate) halinde çalışıldı.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism (sürüm 8.0.2) kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro–Wilk testi ile değerlendirildi. Zamana bağlı Racine nöbet skorlarındaki değişiklikler, uygun olduğunda Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi ile birlikte Geisser-Greenhouse düzeltmesi ile iki yönlü tekrarlanan  l  mler ANOVA kullanılarak analiz edildi. Kümülatif nöbet yükü, her hayvan için Racine skor-zaman eğrisi altındaki alan (AUC) hesaplanarak ölçüldü ve Mann-Whitney U testi kullanılarak P ve P+L grupları arasında kar ıla tırıldı. ECoG g   ve RMS genlik verileri ile sinaptik protein seviyeleri ve oksidatif stres indeksleri (TAS, TOS ve TBARS) dahil olmak üzere biyokimyasal parametreler, Tukey'nin post hoc testi ile birlikte tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edildi. Veriler, uygun şekilde ortalama ± SEM veya medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) olarak sunulmuştur. p değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

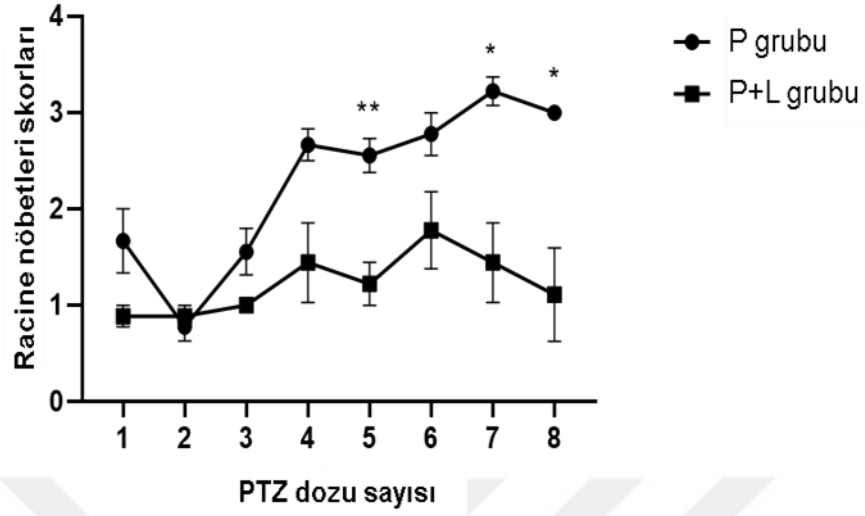
4.1. Deney Hayvanları Üzerine Genel Etkiler

Deneysel sürecin başlangıcında her deney grubunda 10 hayvan bulunmaktaydı. PTZ uygulanan gruplarda (P ve P+L), kindling protokolü sırasında her grupta bir hayvan nöbet sonrası gelişen komplikasyonlar sebebiyle kaybedildi. Bu nedenle davranışsal analizler, elektrofizyolojik kayıtlar ve biyokimyasal analizler P ve P+L gruplarında n=9 hayvan üzerinden gerçekleşti. Kontrol (K) ve LM11A-31 (L) gruplarında ise deney süresi boyunca herhangi bir hayvan kaybı gözlenmedi ve analizler n=10 hayvan üzerinden yapılmıştır. Tüm analizler aynı hayvanlardan elde edilen veriler kullanılarak gerçekleştirildi.

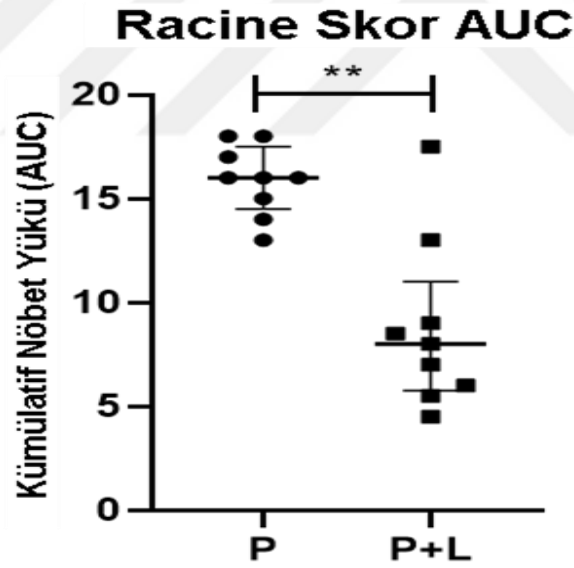
4.2. LM11A-31'in PTZ Kaynaklı Nöbetler Üzerindeki Etkileri

LM11A-31'in PTZ kaynaklı nöbetler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla nöbet şiddeti, her intraperitoneal PTZ enjeksiyonundan (35 mg/kg, iki günde bir) sonra Racine ölçeği kullanılarak değerlendirildi. Farelere sadece PTZ (P) veya her PTZ enjeksiyonundan önce LM11A-31 (P+L) uygulandı. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir (P ve P+L grupları için n = 9, K ve L grupları için n=10). İki yönlü tekrarlanan ölçümler ANOVA'sı, zaman, tedavi ve zaman $\times$ tedavi etkileşiminin anlamlı etkilerini ortaya koymuştur. Post hoc Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi, 5, 7 ve 8. enjeksiyonlarda gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir (*p<0.05, **p<0.01, P grubuna kıyasla). Kümülatif nöbet yükü, Racine skoru-zaman eğrisi altındaki alan (AUC) hesaplanarak değerlendirilmiştir (Şekil 15). Veriler medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) olarak sunulmuştur (grup başına n = 9). Bu sonuç LM11A-31 tedavisinin PTZ ile indüklenen nöbet progresyonunu anlamlı şekilde azalttığını göstermiştir (Mann-Whitney U testi, p<0.01).

LM11A-31'in PTZ kaynaklı Racine skorları üzerindeki etkisi



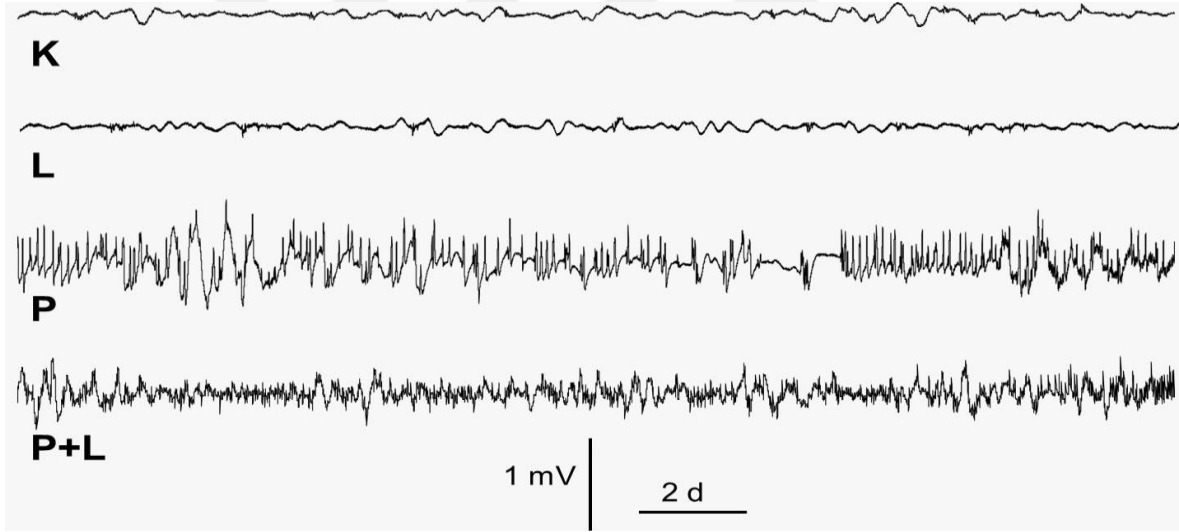
Şekil 14. LM11A-31'in PTZ kaynaklı nöbetler üzerindeki etkisi (*p<0.05, **p<0.01)



Şekil 15. Racine skor kümülatif nöbet yükü (**p<0.01)

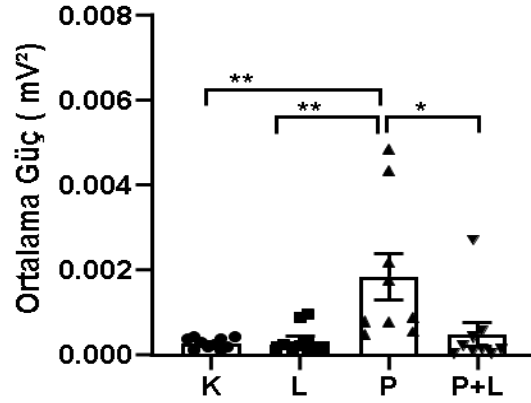
4.3. LM11A-31'in Kortikal ECoG Gücü ve RMS Genliği Üzerindeki Etkileri

LM11A-31'in kortikal ECoG gücü ve RMS genliği üzerindeki etkilerini incelemek için ortalama ECoG gücü (mV^2) ve RMS genliği, kontrol (K, $n = 10$), LM11A-31 ile tedavi edilen (L, $n = 10$), PTZ ile tedavi edilen (P, $n = 9$) ve PTZ + LM11A-31 ile tedavi edilen (P+L, $n = 9$) farelerde ölçülmüştür. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur, bireysel noktalar tek hayvanları temsil etmektedir. Tek yönlü ANOVA, hem ECoG gücü ($F(3,34) = 6.037$, $p = 0.0021$) hem de RMS genliği ($F(3,34) = 7.802$, $p = 0.0004$) için tedavinin anlamlı bir etkisini ortaya koymuştur. Tukey'nin post hoc analizi, P grubunda K ve L gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek ECoG güç ve RMS değerleri gösterirken, LM11A-31 tedavisinin P+L grubunda bu artışları anlamlı derecede azalttığı görülmüştür (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). LM11A-31 tek başına (L grubu) ECoG gücü veya RMS genliği üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.



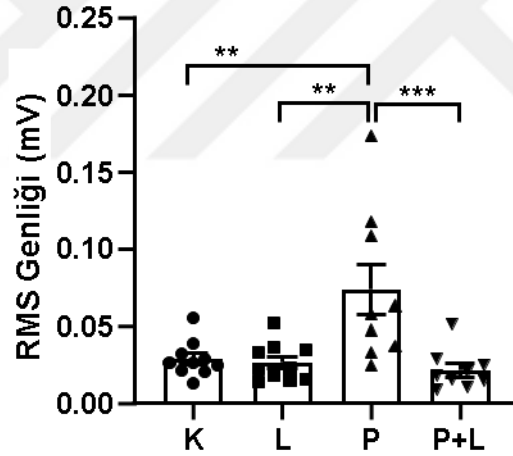
Şekil 16. ECoG kayıt örnekleri

Deneyisel gruplar genelinde ortalama ECoG gücü



Şekil 17. Deneyisel gruplar genelinde ortalama ECoG gücü (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Deneyisel gruplar genelinde ECoG sinyallerinin RMS genliği



Şekil 18. Deneyisel gruplar genelinde ECoG sinyallerinin RMS genliği (**p<0.01, ***p<0.001)

4.4. LM11A-31'in Korteks ve Hipokampüsteki Sinaptik Protein Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

LM11A-31'in korteks ve hipokampüsteki sinaptik protein düzeyleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla postsinaptik yoğunluk proteini PSD-95 ve presinaptik belirteç sinaptofizin (SYP) düzeyleri, deney grupları arasında ölçülmüştür. Analizler serebral korteks ve hipokampus dokularında ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Kortekste PSD-95 düzeyleri deney grupları arasında anlamlı farklılık göstermiştir (Şekil 19). PTZ uygulanan grupta (P), PSD-95 seviyeleri kontrol grubuna kıyasla azalma eğilimi gösterirken, LM11A-31 ön tedavisi uygulanan P+L grubunda PSD-95 düzeylerinin P grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

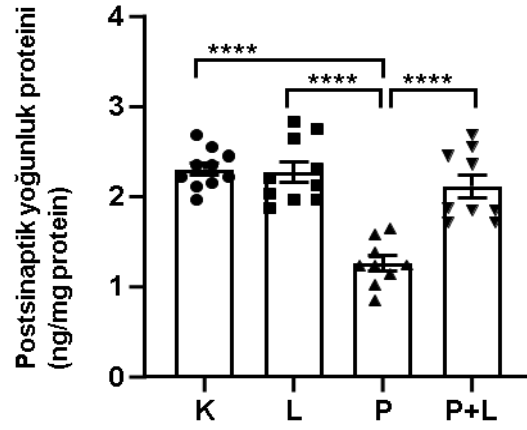
Hipokampüste ölçülen PSD-95 düzeyleri de benzer şekilde deney grupları arasında farklılık göstermiştir (Şekil 20). PTZ uygulaması hipokampal PSD-95 düzeylerinde azalma eğilimine neden olurken, LM11A-31 uygulamasının bu değişimi kısmen düzelttiği gözlenmiştir.

Presinaptik belirteç olan sinaptofizin (SYP) düzeyleri incelendiğinde, kortikal dokuda gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 21). PTZ uygulanan grupta SYP düzeyleri kontrol grubuna kıyasla azalırken, LM11A-31 uygulanan P+L grubunda SYP seviyelerinin P grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Hipokampüste ölçülen SYP düzeyleri de deney grupları arasında benzer bir dağılım göstermiştir (Şekil 22). PTZ uygulaması hipokampal SYP düzeylerinde azalma eğilimine neden olurken, LM11A-31 tedavisinin bu azalmayı kısmen azalttığı gözlenmiştir.

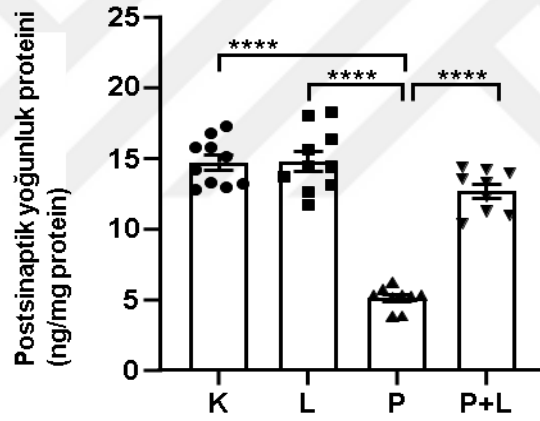
Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur ve bireysel veri noktaları tek hayvanları temsil etmektedir (Kontrol [K] ve LM11A-31 [L] grupları için $n = 10$; PTZ [P] ve PTZ + LM11A-31 [P+L] grupları için $n = 9$). Grup farklılıkları tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ ve $****p < 0.0001$ olarak değerlendirilmiştir.

Korteksteki PSD-95 Seviyeleri

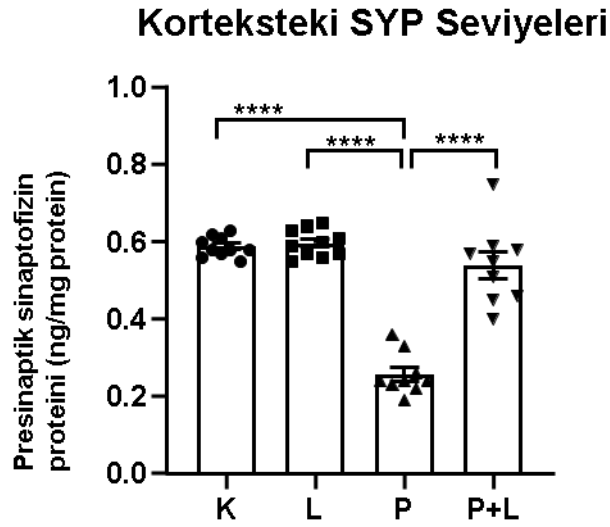


Şekil 19. Korteksteki PSD-95 seviyeleri (****p<0.0001)

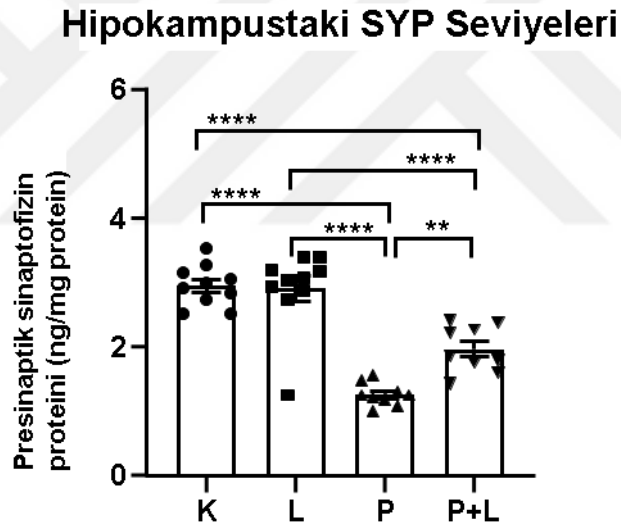
Hipokampustaki PSD-95 Seviyeleri



Şekil 20. Hipokampustaki PSD-95 seviyeleri (****p<0.0001)



Şekil 21. Korteksteki SYP Seviyeleri (****p<0.0001)



Şekil 22. Hipokampustaki SYP seviyeleri (**p<0.01, ****p<0.0001)

4.5. LM11A-31'in Kortikal ve Hipokampal Dokulardaki Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerindeki Etkileri

LM11A-31'in kortikal ve hipokampal dokulardaki oksidatif stres belirteçleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla toplam antioksidan kapasite (TAS), toplam oksidan düzeyi (TOS) ve lipid peroksidasyonu göstergesi olan TBARS düzeyleri ölçülmüştür.

Kortekste ölçülen TAS düzeyleri, deney grupları arasında farklılık göstermiştir (Şekil 23). PTZ uygulanan grupta TAS seviyelerinde azalma eğilimi gözlenirken, LM11A-31 uygulanan P+L grubunda TAS düzeylerinin P grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

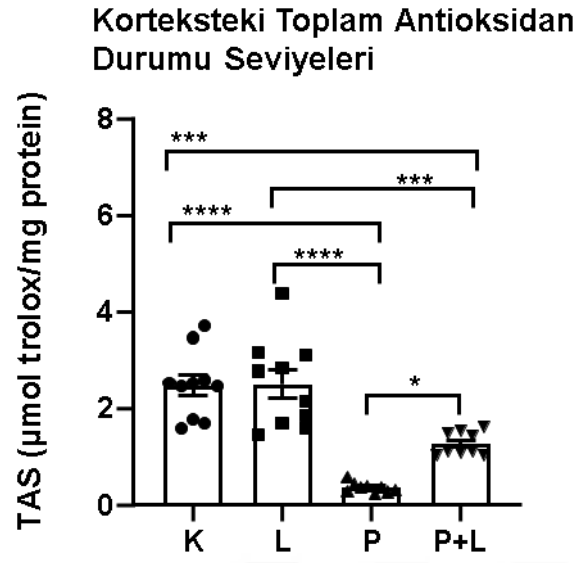
Hipokampal dokuda ölçülen TAS seviyeleri de benzer bir dağılım göstermiştir (Şekil 24). PTZ uygulaması antioksidan kapasitede azalma eğilimi oluştururken, LM11A-31 tedavisinin bu değişimi kısmen düzelttiği gözlenmiştir.

Kortekste TOS düzeyleri incelendiğinde, PTZ uygulanan grupta oksidan seviyelerinde artış gözlenmiştir (Şekil 25). LM11A-31 uygulanan P+L grubunda ise TOS düzeylerinin P grubuna kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir.

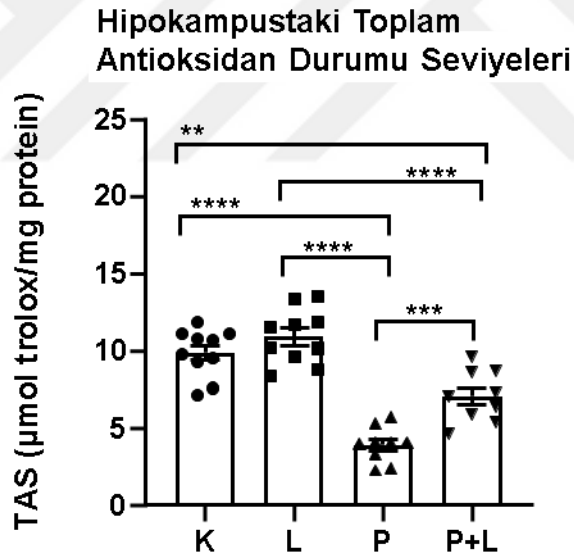
Hipokampüste ölçülen TOS düzeyleri de benzer şekilde deney grupları arasında farklılık göstermiştir (Şekil 26). PTZ uygulaması oksidan düzeylerinde artışa neden olurken, LM11A-31 tedavisinin bu artışı kısmen azalttığı gözlenmiştir.

Lipid peroksidasyonu göstergesi olan TBARS düzeyleri hem korteks hem de hipokampus dokularında deney grupları arasında farklılık göstermiştir. Kortekste PTZ uygulaması TBARS düzeylerinde artışa neden olurken, LM11A-31 uygulanan P+L grubunda bu artışın daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 27). Benzer şekilde hipokampüste de PTZ uygulaması TBARS seviyelerinde artış oluşturmuş, LM11A-31 tedavisi bu artışı kısmen azaltmıştır (Şekil 28).

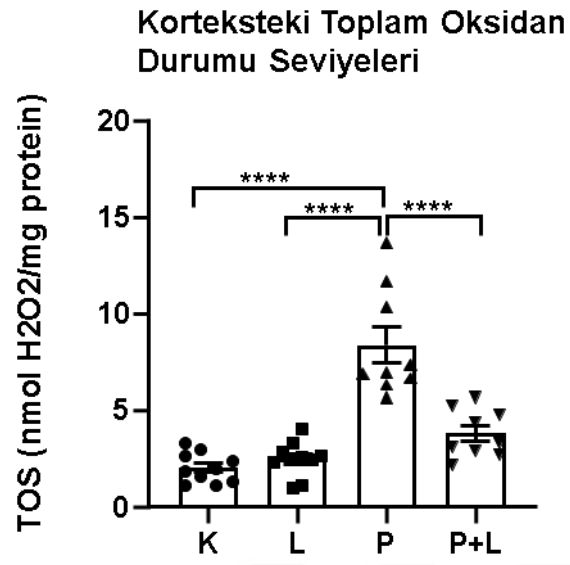
Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur ve bireysel veri noktaları tek hayvanları temsil etmektedir (Kontrol [K], ve LM11A-31 [L] grupları için $n = 10$; PTZ [P] ve LM11A-31 + PTZ [P+L] grupları için $n = 9$). İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$ olarak kabul edilmiştir.



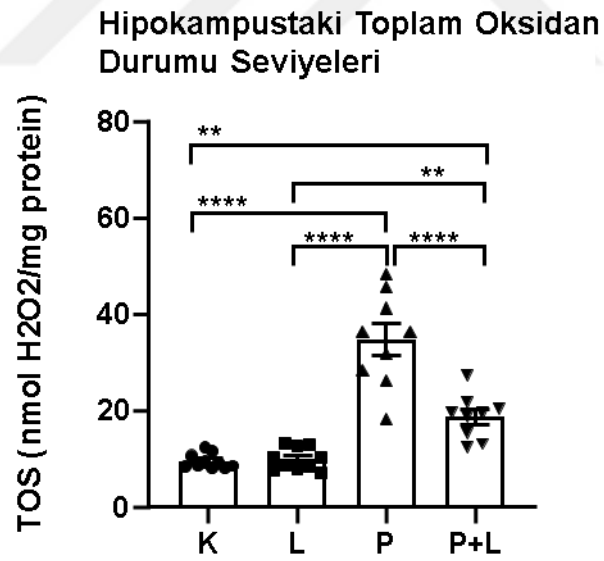
Şekil 23. Korteksteki toplam antioksidan durumu seviyeleri (* $p<0.05$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$)



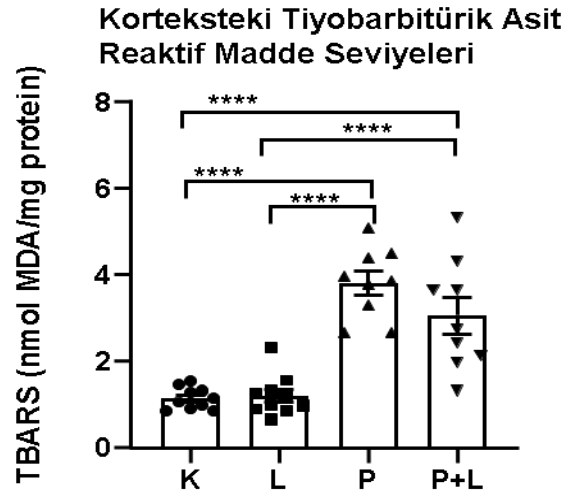
Şekil 24. Hipokampüsteki toplam antioksidan durumu seviyeleri (* $p<0.05$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$)



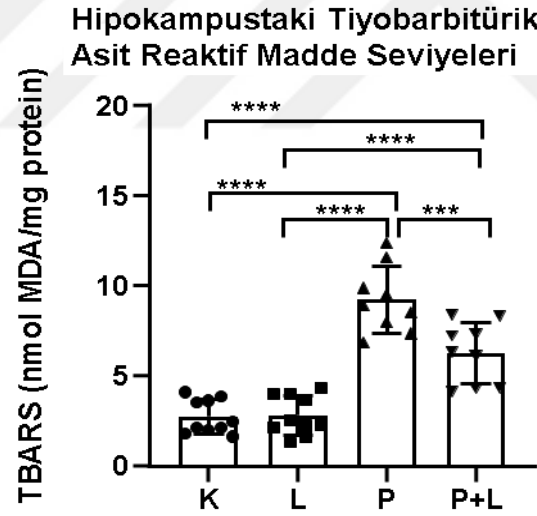
Şekil 25. Korteksteki toplam oksidan durumu seviyeleri (****p<0.0001)



Şekil 26. Hipokampustaki toplam oksidan durumu seviyeleri (**p<0.01, ****p<0.0001)



Şekil 27. Korteksteki Tiyoarbitürük asit reaktif madde seviyeleri (****p<0.0001)



Şekil 28. Hipokampustaki Tiyoarbitürük asit reaktif madde seviyeleri (***p<0.001, ****p<0.0001)

4.6. Bulguların Genel Değerlendirmesi

Elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, PTZ ile oluşturulan kindling modelinde hem davranışsal nöbet şiddetinin hem de kortikal elektrofizyolojik aktivitenin arttığı görülmüştür. LM11A-31 uygulaması bu nöbet progresyonunu azaltmış ve artmış kortikal ECoG gücü ile RMS genliğini anlamlı şekilde düşürmüştür. Ayrıca PTZ uygulamasının sinaptik protein düzeyleri ve oksidatif stres belirteçleri üzerinde oluşturduğu değişimlerin LM11A-31 tedavisi ile kısmen düzeldiği gözlenmiştir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Epilepsi, küresel ölçekte 50 milyondan fazla kişiyi etkileyen ve toplum genelinde yıllık insidansı %2–5 olarak bildirilen, en sık rastlanan kronik nörolojik bozukluklar arasında yer almaktadır. (96). Epilepsi tedavisinde farmakoterapötik alanda önemli gelişmeler sağlanmıştır. Ancak hastaların yaklaşık %30–40’ında ilaç direnci gelişmesi, mevcut antiepileptik ilaçların sınırlı etkililiğini ortaya koymaktadır (97). Uygulanan tedavi yöntemleri, nöronal hiperuyarılabilirliğin uzun vadeli seyrini durdurmakta yetersiz kalabilmekte; buna ek olarak bilişsel, davranışsal ve sistemik yan etkilerle ilişkilendirilmektedir (98). Bu bağlamda, epileptogenez sürecine katkı sağlayan moleküler mekanizmaların ortaya konması ve bu mekanizmaları daha düşük yan etki profiliyle hedefleyebilen yeni ajanların geliştirilmesi, güncelliğini koruyan önemli bir klinik gereksinimdir. Bu tez kapsamında, nörotrofik p75 reseptörünün Pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen epilepsi modelindeki rolü araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, LM11A-31’in PTZ ile indüklenen epilepsi modelinde nöbet davranışları, kortikal elektrofizyolojik aktivite ve bu değişikliklerle ilişkili sinaptik, inflamatuvar ve oksidatif mekanizmalar üzerindeki etkileri kapsamlı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, PTZ uygulamasının progresif bir epileptik süreç oluşturduğunu; LM11A-31 tedavisinin ise bu sürecin farklı biyolojik düzeylerinde düzenleyici etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmanın ilk aşamasında nöbet davranışları incelenmiş ve tekrarlanan PTZ uygulamalarıyla nöbet şiddetinin zaman içerisinde progresif olarak arttığı gözlenmiştir. PTZ grubundaki hayvanların 8. enjeksiyona kadar 4 düzeyine ulaşan Racine skorları sergilemesi, kullanılan modelin başarılı bir kindling süreci oluşturduğunu göstermektedir. Buna karşılık, PTZ uygulamasına eşzamanlı olarak LM11A-31 verilen grupta nöbet şiddetinin belirgin biçimde baskılandığı ve hiçbir hayvanın deney süresince 4’lük Racine skoruna ulaşmadığı saptanmıştır. Bu bulgular, LM11A-31’in PTZ’ye bağlı nöbet davranışları üzerinde belirgin bir koruyucu etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Davranış skorlarına ilişkin istatistiksel analizler, zaman faktörünün nöbet şiddeti üzerinde anlamlı bir ana etkiye sahip olduğunu ve PTZ uygulamalarının ilerleyici bir kindling sürecine yol açtığını doğrulamaktadır. Bununla birlikte, tedavi faktörünün de anlamlı bir ana etki göstermesi, LM11A-31 uygulamasının genel olarak nöbet şiddetini azalttığını ortaya koymuştur. Özellikle zaman ve tedavi arasındaki anlamlı etkileşim,

LM11A-31'in nöbet progresyonunun seyrini zaman içerisinde değiştirdiğini göstermektedir. Post hoc analizlerde ilacın erken dönemde sınırlı etki gösterdiği, ancak kindling sürecinin ilerleyen evrelerinde nöbet şiddetini anlamlı düzeyde azalttığı görölmüştür. Bu durum, LM11A-31'in nöbetlerin başlatılmasından ziyade, epileptik sürecin ilerlemesiyle ilişkili mekanizmalar üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Kümülatif nöbet yükünün anlamlı şekilde azalması da bu yorumu destekler niteliktedir.

Davranışsal düzeyde ortaya konan bu değişikliklerin, kortikal elektriksel aktivitedeki yansımalarını değerlendirmek amacıyla ECoG analizleri yapılmıştır. PTZ uygulaması sonrasında kortikal ECoG gücü ve RMS genliğinde gözlenen belirgin artış, kortikal nöronal ağlarda aşırı uyarılabilirliğin ve senkronize epileptiform aktivitenin arttığını göstermektedir. Bu elektrofizyolojik değişiklikler, davranışsal olarak saptanan yüksek Racine skorlarıyla uyumlu bir tablo çizmektedir.

LM11A-31'in PTZ ile birlikte uygulanması ise hem ECoG gücünü hem de RMS genliğini anlamlı şekilde azaltmıştır. Kortikal elektriksel aktivitedeki bu baskılanma, ilacın epileptik deşarjların genliğini ve yaygınlığını sınırladığını düşündürmektedir. Davranışsal bulgularla birlikte ele alındığında, LM11A-31'in nöbet şiddetini azaltıcı etkisinin yalnızca gözlenebilir davranışlarla sınırlı kalmadığı, aynı zamanda kortikal ağ aktivitesi düzeyinde de karşılık bulduğu görölmektedir. Bu durum, ilacın epileptik süreçte nöronal ağların aşırı senkronizasyonunu ve uyarılabilirliğini modüle edebileceğine işaret etmektedir.

Elektrofizyolojik ve davranışsal değişikliklerin altında yatan olası yapısal mekanizmaları değerlendirmek amacıyla sinaptik protein düzeyleri incelenmiştir. PTZ uygulamasının hem korteks hem de hipokampusta PSD-95 ve sinaptofizin ekspresyonunda belirgin bir azalmaya yol açtığı saptanmıştır. PSD-95 düzeylerindeki düşüş, postsinaptik yoğunluk yapısında ve sinaptik stabilitede bozulmaya işaret ederken; sinaptofizin seviyelerindeki azalma, presinaptik iletim kapasitesinin zayıfladığını düşündürmektedir. Bu bulgular, epileptik aktivitenin sinaptik bütönlük üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu göstermektedir.

LM11A-31 tedavisi ile birlikte hem kortikal hem de hipokampal dokularda PSD-95 ve sinaptofizin seviyelerinin anlamlı şekilde artması, ilacın sinaptik yapıyı koruyucu veya destekleyici bir etkiye sahip olabileceğini ortaya koymaktadır. Sinaptik protein ekspresyonundaki bu iyileşme, davranışsal olarak gözlenen nöbet şiddetindeki azalma ve

ECoG analizlerinde saptanan kortikal hiperaktivitenin baskılanması ile birlikte değerlendirildiğinde, LM11A-31'in epileptik süreçte hem fonksiyonel hem de yapısal düzeyde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Nöroenflamatuvar değişikliklere paralel olarak oksidatif stres parametrelerinde de PTZ'ye bağlı belirgin bozulmalar saptanmıştır. PTZ uygulamasıyla birlikte toplam antioksidan kapasitenin azalması ve toplam oksidan durum ile lipid peroksidasyonunun artması, epileptik aktivitenin oksidatif dengeyi ciddi biçimde bozduğunu göstermektedir. LM11A-31 tedavisi ile TAS seviyelerinde kısmi bir iyileşme sağlanırken, TOS ve TBARS düzeylerinde anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu parametrelerin kontrol düzeylerine tamamen ulaşmaması, PTZ'nin oluşturduğu oksidatif hasarın tam olarak geri döndürülemediğini düşündürmektedir.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, LM11A-31'in PTZ ile indüklenen epilepsi modelinde nöbetlerin davranışsal şiddetini azalttığı, kortikal elektriksel aktiviteyi baskıladığı ve sinaptik, inflamatuvar ve oksidatif stresle ilişkili patolojik değişiklikleri çok düzeyli olarak modüle ettiği söylenebilir. Bu sonuçlar, LM11A-31'in epileptik süreçlerde nöbet progresyonunu ve buna eşlik eden nöronal hasarı sınırlayabilecek potansiyel bir terapötik ajan olabileceğine işaret etmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Sirven JI (2015). Epilepsy: A spectrum disorder. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(9): a022848.
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* 14: 1155333.
4. Turkistani A., Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Albuhadily AK, Elhussieny O, Al-Farga A, Aqlan F, Saad HM, Batiha GE (2024). The functional and molecular roles of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in epilepsy. *Journal of Central Nervous System Disease* 16: 11795735241247810.
5. Dechant G, Barde YA (2002). The neurotrophin receptor p75NTR: Novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Neuroscience* 5(11): 1131–1136.
6. Meeker R, Williams K (2014). Dynamic nature of the p75 neurotrophin receptor in response to injury and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 9(5): 615–628.
7. Riffault B, Medina I, Dumon C, Thalman C, Ferrand N, Friedel P, Gaiarsa J-L, Porcher C (2014). Pro-brain-derived neurotrophic factor inhibits GABAergic neurotransmission by activating endocytosis and repression of GABAA receptors. *The Journal of Neuroscience* 34(40): 13516–13534.
8. 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* 6(5): 1759091414552185.
9. Longo FM, Massa SM (2013). Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: A strategy for the treatment of neurological disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 12(7): 507–525.

10. Knowles JK, Simmons DA, Nguyen TV, Vander Griend L, Xie Y, Zhang H, Yang T, Pollak J, Chang T, Arancio O, Buckwalter MS, Wyss-Coray T, Massa SM, Longo FM (2013). A small molecule p75NTR ligand prevents cognitive deficits and neurite degeneration in an Alzheimer's mouse model. *Neurobiology of Aging* 34(8): 2052–2063.
11. Simmons D, Knowles JK, Belichenko NP, Banerjee G, Finkle C, Massa SM, Longo FM (2014). A small molecule p75NTR ligand, LM11A-31, reverses cholinergic neurite dystrophy in Alzheimer's disease mouse models with mid- to late-stage disease progression. *PloS one* 9(8): e102136.
12. Löscher W (2002). Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 50(1): 105–123.
13. Yaşar F, Demirel Gökcalp Z (2023). İkonografik çözümleme bağlamında Floransa Biblioteca Medicea Lorenziana Plut. 6.23 ve Paris Bibliothèque National de France Grec 74 el yazmalarındaki epilepsi hastalarının iyileştirilmesi mucizesi sahneleri. *Art-Sanat* 20: 735–761.
14. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet* 393(10172): 689–701.
15. GBD 2016 Epilepsy Collaborators (2019). Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology* 18(4): 357–375.
16. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT (1993). Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota. *Epilepsia* 34(3): 453–468.
17. Chen Z, Brodie MJ, Ding D, Kwan P (2023). Editorial: Epidemiology of epilepsy and seizures. *Frontiers in Epidemiology* 3: 1273163.
18. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer D C, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55(4): 475–482.

19. Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, 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.
20. Hochman DW (2009). Non-synaptic mechanisms: Changes in the extracellular space as a modulator of excitability and epileptogenicity. *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research* 946–953.
21. Van Bueren N E R, van der Ven SHG, Hochman S, Sella F, Cohen Kadosh R (2023). Human neuronal excitation/inhibition balance explains and predicts neurostimulation induced learning benefits. *PLoS Biology* 21(8): e3002193.
22. 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* 45(1): 1–22.
23. Scharfman HE (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 7(4): 348–354.
24. Fritschy J. M. (2008). Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 1: 5.
25. 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.
26. Guerrini R, Dobyns WB (2014). Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *The Lancet Neurology* 13(7): 710–726.
27. Mirzaa GM, Poduri A (2014). Megalencephaly and hemimegalencephaly: breakthroughs in molecular etiology. *American Journal of Medical Genetics Part C* 166(2): 156–172.
28. 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. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33(21): 9056–9067.

29. Lasarge CL, Danzer SC (2014). Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7: 18.
30. Lason W, Chlebicka M, Rejdak K (2013). Mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacological Reports* 65(4): 787–801.
31. Purves D, Snider WD, Voyvodic JT (1988). Trophic regulation of nerve cell morphology. *Nature* 336(6195): 123–128.
32. Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal* 1(5): 549–553.
33. Segal RA (2003). Selectivity in neurotrophin signaling. *Annual Review of Neuroscience* 26: 299–330.
34. Reichardt LF (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361(1473): 1545–1564.
35. Nordvall G, Forsell P, Sandin J (2022). Neurotrophin-targeted therapeutics. *Drug Discovery Today* 27(10): 103318.
36. Gottmann K, Mittmann T, Lessmann V (2009). BDNF signaling in synaptic plasticity. *Experimental Brain Research* 199(3–4): 203–234.
37. Kazim SF, Iqbal K (2016). Neurotrophic factor mimetics in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration* 11(1): 50.
38. Honea RA, Cruchaga C, Perea RD, Saykin A., Burns JM, Weinberger DR, Goate A M, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) (2013). Characterizing the role of brain derived neurotrophic factor genetic variation in Alzheimer's disease neurodegeneration. *PloS One* 8(9): e76001.
39. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2008). BDNF and memory. *Neuroscientist* 14(2): 147–156.
40. 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. *The European Journal of Neuroscience* 7(9): 1831–1839.

41. Nawa H, Carnahan J, Gall C (1995). BDNF protein after seizure. *European Journal of Neuroscience* 7(7): 1527–1535.
42. 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.
43. 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.
44. Rosenthal A, Goeddel DV, 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.
45. Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release. *Journal of Neuroscience* 29(41): 12764–12767.
46. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(22): 5455–5463.
47. 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.
48. Binder DK, Scharfman HE (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22(3): 123–131.
49. Numakawa T, Yamagishi S, Adachi N, Matsumoto T, Yokomaku D, Yamada M, Hatanaka H (2002). Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of Ca(2+) oscillations in developing cortical neurons. *The Journal of biological chemistry* 277(8): 6520–6529.
50. Deinhardt K, Chao MV (2014). Effects of mature and proBDNF signaling on neuronal structure. *Neuropharmacology* 76: 603–609.

51. Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe ., 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.
52. Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, Saarma M (2002). BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *The Journal of cell biology* 159(5): 747–752.
53. Lu B, Pang PT, Woo NH (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience* 6(8): 603–614.
54. Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, 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.
55. 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 2'a trial. *Nature medicine* 30(6): 1761–1770.
56. 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.
57. Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL (2010). Proneurotrophin actions. *Developmental Neurobiology* 70(5): 350–359.
58. 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 & disease* 2(9): e198.
59. Underwood CK, Coulson EJ (2008). The p75 neurotrophin receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40(9): 1664–1668.

60. Blondy S, Christou N, David V, Verdier M, Jauberteau MO, Mathonnet M, Perraud A (2019). Neurotrophins and their involvement in digestive cancers. *Cell death & disease* 10(2): 123.
61. Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(16): 5854–5863.
62. 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* 6(5): 1759091414552185.
63. Porcher C, Medina I, Gaiarsa JL (2018). Mechanism of BDNF Modulation in GABAergic Synaptic Transmission in Healthy and Disease Brains. *Frontiers in cellular neuroscience* 12: 273.
64. 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(39): 9870–9879.
65. 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 & therapeutics* 25(3): 303–313.
66. 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): 578.
67. Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(16): 5854–5863.

68. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(22): 5455–5463.
69. Löscher W (2011). Critical review of epilepsy models. *Epilepsy Research* 94(1–2): 1–6.
70. Fisher RS (1989). Animal models of seizures. *Brain Research Reviews* 14(3): 245–278.
71. Singh T, Goel RK, Jain S (2012). PTZ-induced seizure models: A systematic review. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18(8): 676–685.
72. Dhir A (2012). Pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures and kindling models for evaluation of antiepileptic drugs. *Pharmacological Reports* 64(6): 1283–1298.
73. White HS (2003). Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions. *Epilepsia* 44 Suppl 7: 2–8.
74. Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ (2015). Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5(10): a022822.
75. Akdogan I, Yonguc NG (2011). Experimental epilepsy models. In: *Underlying Mechanisms of Epilepsy*. InTech.
76. Lasoń W, Chlebicka M, Rejdak K (2013). Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacological reports : PR*, 65(4), 787–801.
77. Löscher W (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20(5): 359–368.
78. Möhler H, Okada T, Heitz P, Ulrich J (1978). Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by 3H-diazepam binding. *Life sciences* 22(11): 985–995.

79. Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH (2001). Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 298(3): 986–995.
80. Arslan A (2021). Extrasynaptic δ -subunit containing GABAA receptors. *Journal of Integrative Neuroscience* 20(1): 173–184.
81. Alachkar A, Ojha SK, Sadeq A, Adem A, Frank A, Stark H, Sadek B (2020). Experimental Models for the Discovery of Novel Anticonvulsant Drugs: Focus on Pentylentetrazole-Induced Seizures and Associated Memory Deficits. *Current pharmaceutical design* 26(15): 1693–1711.
82. Van Den Pol AN, Obrietan K, Belousov A (1996). Glutamate hyperexcitability and seizure-like activity throughout the brain and spinal cord upon relief from chronic glutamate receptor blockade in culture. *Neuroscience* 74(3): 653–674.
83. Few AP, Nanou E, Watari H, Sullivan JM, Scheuer T, Catterall WA (2012). Asynchronous Ca^{2+} current conducted by voltage-gated Ca^{2+} (CaV)-2.1 and $\text{CaV}2.2$ channels and its implications for asynchronous neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(7): E452–E460.
84. Murphy SN, Miller RJ (1988). A glutamate receptor regulates Ca^{2+} mobilization in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(22): 8737–8741.
85. Rasola A, Bernardi P (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell calcium* 50(3): 222–233.
86. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylentetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience letters*, 357(2), 83–86.
87. Han T, Qin Y, Mou C, Wang M, Jiang M, Liu B (2016). Seizure induced synaptic plasticity alteration in hippocampus is mediated by IL-1 β receptor through PI3K/Akt pathway. *American journal of translational research* 8(10): 4499–4509.

88. Rawat C, Kukal S, Dahiya UR, Kukreti R (2019). Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: future therapeutic strategies for epilepsy management. *Journal of neuroinflammation* 16(1): 197.
89. Buzsáki G, Moser EI (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature neuroscience* 16(2): 130–138.
90. Shimada T, Yamagata K (2018). Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *Journal of visualized experiments : JoVE* (136): 56573.
91. Mirzahosseini G, Ismael S, Salman M, Kumar S, Ishrat T (2024). Genetic and Pharmacological Modulation of P75 Neurotrophin Receptor Attenuate Brain Damage After Ischemic Stroke in Mice. *Molecular neurobiology* 61(1): 276–293.
92. Ribeiro LR, Dos Santos AMF, da Cruz Guedes ., Bezerra TLDS, de Souza TL, Filho JMB, de Almeida RN, Salvadori MGDSS (2024). Effects of acute administration of 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol in mouse models of seizures. *Epilepsy research* 205: 107421.
93. Öztürk H, Başoğlu H, Abidin S, Abidin İ. Exploring the Potentials of Flavonoids on Brain Function: Effects of Three Phenolic Compounds on Brain Electrical Activity. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2023; 20(3):525–32
94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193(1): 265–275.
95. Beghi E (2020). The epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology* 54(2): 185–191.
96. Shankar R, Marston XL, Danielson V, Do Rego B, Lasagne R Williams O Groves L (2024). Real-world evidence of epidemiology, patient characteristics, and mortality in people with drug-resistant epilepsy in the United Kingdom, 2011–2021. *Journal of Neurology* 271(5): 2473–2483.
97. Perucca P, Gilliam FG (2012). Adverse effects of antiepileptic drugs. *The Lancet Neurology* 11(9): 792–802.
98. Monteiro AB, Alves AF, Portela ACR, Pires HFO, Melo MP, Barbosa NMMV, Felipe CFB (2024). Pentylentetrazole: A review. *Neurochemistry International*, 180: 105841.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Esra KABAK

Uyruğu:

Doğum Tarihi:

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	2026
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2022
Lise	Ömer Derindere Fen Lisesi	2018

YABANCI DİL

İngilizce B2

TEKNİK BECERİLER

- Elektrofizyolojik analizlerin yapılması
- In vivo elektrofizyoloji
- Beyin kesitleri ile çalışma
- PCR deney tasarımı ve deney uygulamaları

YAYIN

Kaya Hİ, Boğuşlu C, Kabak E, Akkol C, Saka ET, Uzuner SÇ (2022). The effect of silicon phthalocyanine on cell death and mitochondrial membrane potential in pancreatic cancer cells. Turkish Journal of Analytical Chemistry 4(2): 111-115.

Kabak E, Aydın-Abidin S, Göçmen AY, Öztürk H, Köse D, Başoğlu H, Abidin İ (2026). Chronic p75 neurotrophin receptor modulation with LM11A-31 attenuates seizure progression and network hyperexcitability in pentylenetetrazol kindling. Neuropharmacology 294: 110991.

POSTER

Esra Kabak, Hilal Öztürk, Dilanur Köse, Harun Başoğlu, İsmail Abidin, Selcen Aydın Abidin. Konneksinlerin PiriformKorteksteki Epileptik Olaylara Etkilerinin İncelenmesi 6th International 35th National Biophysics Congress, İzmir, 4-7 September 2024.

SERTİFİKA

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (KTÜ), 2023

HOBİLER

- Gezmek
- Aile ve arkadaşlarla vakit geçirmek
- Kitap okumak
- Film ve dizi izlemek