



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL STATUS EPİLEPTİKUS MODELİNDE
MANNİTOLÜN BEYİN ELEKTRİKSEL AKTİVİTESİNE OLAN
ETKİSİ VE BU ETKİDE KAN BEYİN BARIYERİNDEKİ
GEÇİRGENLİK ARTIŞININ ROLÜ**

Dr. Deniz SERİN

UZMANLIK TEZİ

TOKAT

2023

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL STATUS EPİLEPTİKUS MODELİNDE MANNİTOLÜN
BEYİN ELEKTRİKSEL AKTİVİTESİNE OLAN ETKİSİ VE BU
ETKİDE KAN BEYİN BARIYERİNDEKİ GEÇİRGENLİK
ARTIŞININ ROLÜ**

Dr. Deniz SERİN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Semiha Gülsüm KURT

TOKAT
2023

‘En değerli varlığım olan anneme, babama ve kardeşlerime...’

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her zaman hoşgörü ile sorunlarımızı çözen, destek ve yardımlarıyla hep yanımda olan, uzmanlık eğitimim sürecinde kendilerinden çok şeyler öğrendiğim ve meslek hayatım boyunca bana her zaman örnek teşkil edecek olan başta tez danışmanım olan Sayın Prof. Dr. Semiha Gülsüm KURT'a, Sayın Prof. Dr. Dürdane AKSOY'a, Sayın Prof. Dr. Betül ÇEVİK'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Orhan SÜMBÜL'e,

Uzmanlık tezimin hayata geçirilmesinde katkısı, emeği ve özverisi ile bana çok büyük desteği olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Zeynep KASAP ACUNGİL'e,

Tezime sağladıkları katkılardan dolayı Sayın Doç. Dr. Muzaffer KATAR ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Osman DEMİR'e,

Kısa süre de olsa beraber çalışma imkânı bulduğum ve kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yusuf KOÇAK'a,

Hem iyi günlerde hem de kötü günlerde beraber dostluk içinde çalıştığım değerli meslektaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan hep mutluluk duyduğum sekreterlerimiz ve hemşirelerimize,

Ve hayatım boyunca her türlü desteği sağlayan aileme ÇOK TEŞEKKÜR EDERİM.

ÖZET

Mannitol infüzyonu, beyin vasküler endotel hücrelerinde dehidratasyona ve buna bağlı sıkı bağlantı noktalarında genişlemeye neden olur. Bu durum bariyerin geçirgenliğinde artış sağlar. Ek olarak hücre dışı hiperosmolaritenin antinöbet etkisi bilinmektedir, ancak bu etki için uygun terapötik doz belirsizdir. Bu çalışma penisilinle oluşturulan status epileptikus modelinde, mannitolün beyin elektriksel aktivitesine etkisini ve bu etkide kan beyin bariyerinin valproik asit ile fenitoin geçirgenliğine etkisini araştırmaktadır.

Üretan anestezisi altındaki ratların somatomotor korteksine penisilin G enjeksiyonu yapıldı ve epileptik odak oluşturuldu. Ratlar; kontrol (2ml SF, 1.grup), mannitol (1,5 gr/kg, 2.grup), fenitoin (50 mg/kg, 3.grup), mannitol+fenitoin (1,5 gr/kg+25 mg/kg, 4.grup), valproik asit (400 mg/kg, 5.grup), mannitol+valproik asit (1,5 gr/kg+200 mg/kg, 6.grup) olmak üzere intravenöz infüzyon gruplarına ayrıldı. İnfüzyonlar penisilin G enjeksiyonundan 30 dk sonra yapıldı ve epileptiform aktivite üzerindeki etkileri elektrokortigografi (ECoG) kayıtlarıyla değerlendirildi. Mannitolün KBB'ye etkisi, kan ve BOS numunelerindeki fenitoin ile VPA düzeyi ile değerlendirildi.

İstatistiksel analizler normal dağılım gösterip göstermediğine uygun olarak One-Way ANOVA, Independent-Samples T-test ve Mann-Whitney U test ile değerlendirildi.

Penisilinle indüklenen status epileptikus modelindeki ECoG kayıtları değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Numunelerin sonuçlarında ise; 3. ve 4. gruplar arasında BOS/serum oranı, serum ve BOS değerinde anlamlı fark görülmedi. 5. ve 6. gruplarda ise BOS/serum oranında ve BOS değerinde anlamlı fark yokken, 5. gruptaki serum değeri 6. gruba kıyasla anlamlı derecede yüksekti.

Bu çalışma fenitoin, VPA, mannitol, mannitol+VPA ve mannitol+fenitoinin penisilinle indüklenen status epileptikus modelinde epileptiform aktiviteye etki etmediğini göstermektedir. Ayrıca fenitoinle mannitol arasında farmakokinetik etkileşim olabileceğini ve mannitolün VPA'nın KBB geçirgenliğini arttırabileceğini düşündürmektedir. Penisilinle indüklenen status epileptikus modelinin nöbet önleyici ilaç etkinliği araştırmaları açısından uygunluğu, mannitolün antinöbet aktivitesinin belirlenmesi ve mannitolün KBB üzerindeki etkisinin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: penisilin, status epileptikus, mannitol, valproik asit, fenitoin

SUMMARY

Mannitol infusion causes dehydration of brain vascular endothelial cells and enlargement of tight junctions. This provides an increase in the permeability of the barrier. In addition, the antiseizure effect of extracellular hyperosmolarity is known, but the appropriate therapeutic dose for this effect is uncertain. This study investigates the effect of mannitol on brain electrical activity and the effect of blood-brain barrier on valproic acid and phenytoin permeability in penicillin-induced status epilepticus model.

Penicillin G was injected into the somatomotor cortex of the rats under urethane anesthesia and an epileptic focus was created. Rats; were divided into intravenous infusion groups as control(2ml SF, 1st group), mannitol(1.5g/kg, 2nd group), phenytoin(50mg/kg, 3rd group), mannitol+phenytoin(1.5g/kg+25mg/kg, 4th group), VPA(400mg/kg, 5th group), mannitol+VPA(1.5gr/kg+200mg/kg, 6th group). Infusions were administered 30 minutes after penicillin G injection and their effects on epileptiform activity were evaluated by electrocortigography (ECoG) recordings. The effect of mannitol on BBB was evaluated by phenytoin and VPA levels in blood and CSF samples.

Statistical analyses were evaluated by One-Way ANOVA, Independent-Samples T-test and Mann-Whitney U test according to whether they showed normal distribution.

When the ECoG recordings in the penicillin-induced status epilepticus model were evaluated, no significant difference was found between the groups. In the results of the samples; There was no significant difference in CSF/serum ratio, serum and CSF values between the 3rd and 4th groups. While there was no significant difference in CSF/serum ratio and CSF value in the 5th and 6th groups, the serum value in the 5th group was significantly higher than in the 6th group.

This study shows that phenytoin, VPA, mannitol, mannitol+VPA and mannitol+phenytoin do not affect epileptiform activity in the penicillin-induced status epilepticus model. It also suggests that there may be a pharmacokinetic interaction between phenytoin and mannitol, and that mannitol may increase the BBB permeability of VPA. More studies are needed to determine the suitability of the penicillin-induced status epilepticus model for antiseizure drug efficacy studies, to determine the antiseizure activity of mannitol and to determine its effect of mannitol on BBB.

Keywords: penicillin, status epilepticus, mannitol, valproic acid, phenytoin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Status Epileptikus	5
2.1.1. Tanım	5
2.1.2. Epidemiyoloji	6
2.1.3. Status Epileptikus Sınıflaması	6
2.1.3.1. Eksen 1: Semiyoloji	6
2.1.3.2. Eksen 2: Etyoloji	7
2.1.3.3. Eksen 3: EEG Korelasyonu	8
2.1.3.4. Eksen 4: Yaş	9
2.1.4. Patofizyoloji	9
2.1.4.1. Status Epileptikusta Rol Alan Önemli Reseptörler	10
2.1.4.1.1. GABA _A Reseptörü	10
2.1.4.1.2. Transmembran Cl ⁻ Gradyanı ve Cl ⁻ Kanalları	11
2.1.4.1.3. Glutamat Reseptörleri	11
2.1.4.2. İzole Nöbetlerden SE'ye Dönüşümde Yer Alan Mekanizmalar	13
2.1.4.3. SE'nin Hücresel Hasardaki Olası Mekanizmaları ve Sistemik Etkileri	15
2.1.5. Tedavi	18
2.2. Merkezi Sinir Sistemi Bariyeri	20
2.2.1. Kan Beyin Bariyerinin Yapısal Özellikleri	21
2.2.1.1. Endotel Hücreleri	22
2.2.1.2. Perisitler	23
2.2.1.3. Astrositler	25
2.2.1.4. Bazal Membran	27

2.2.1.5. Nöronlar	29
2.2.1.6. Mikroglialar	30
2.2.1.7. Perivasküler Makrofajlar	30
2.2.1.8. Periferik Bağışıklık Hücreleri	31
2.2.1.9. Sıkı Bağlantılar	31
2.2.2. Kan Beyin Bariyerinde Taşınım	36
2.2.2.1. Parasellüler Yolak ile Taşınım	36
2.2.2.2. Transsellüler Yolak ile Taşınım	38
2.2.2.2.1. Çözünür Taşıyıcılar (SLC'ler)	38
2.2.2.2.2. ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları	39
2.2.2.2.3. Veziküler Taşıyıcılar	40
2.2.2.2.4. Hücresel Transport	42
2.3. İlaç Transportu Modülasyon Yöntemleri	44
2.3.1. Transkraniyal Dağıtım Yöntemi	45
2.3.1.1. İntraserebroventriküler Enjeksiyon Yöntemi	46
2.3.1.2. İntraparankimal Enjeksiyon Yönetimi	46
2.3.2. KBB'nin Geçici Bozulması	47
2.3.2.1. KBB'nin Ozmotik Bozulması	47
2.3.2.2. KBB'nin Farmakolojik Bozulması	49
2.3.2.2.1. Bradikinin Analogları	50
2.3.2.2.2. Alkilgliseroller	51
2.3.2.2.3. Lizofosfatidik Asit	51
2.3.2.2.4. Kadherin Bağlayıcı Peptitler	53
2.3.3. Transsellüler Dağıtım Yolları	53
2.3.3.1. Taşıma Proteinleri Aracılı Taşıma Sistemleri	54
2.3.3.1.1. KBB'de Çözünür Taşıyıcı ile Taşıma Sistemleri	54
2.3.3.1.1.1. Amino Asit Taşıyıcıları	55
2.3.3.1.1.2. Glikoz Taşıyıcıları	57
2.3.3.1.1.3. Monokarboksilat Taşıyıcıları	58
2.3.3.1.1.4. Nükleozit Taşıyıcıları	59
2.3.3.1.1.5. Organik Anyon Taşıyıcıları	60
2.3.3.1.2. KBB'de Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset Taşıma Sistemleri	61
2.3.3.2. Veziküler Taşıma Sistemleri	63

2.3.3.2.1. Transferrin Reseptörü Aracılı Veziküler Transport Sistemi	64
2.3.3.2.2. İnsülin Reseptörü Aracılı Veziküler Transport Sistemi	65
2.3.3.2.3. LRP1 Aracılı Veziküler Transport Sistemi	66
2.3.3.2.4. Difteri Toksin Reseptörü Aracılı Veziküler Transport Sistemi	67
2.3.4. Transnazal Yolak	68
3. MATERYAL VE METOD	70
3.1. Deney Hayvanları	70
3.2. Deney Grupları	70
3.3. Deney Prosedürünün Uygulanışı	71
3.4. Elektrokortikografik Kayıtların Değerlendirilmesi	76
3.5. İstatistiksel Analiz	77
4. BULGULAR	79
5- TARTIŞMA	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
7. KAYNAKLAR	89

KISALTMALAR

%(ID/G)	: Gram Doku Başına Verilen Doz Yüzdesi
ABC	: ATP Bağlayıcı Kaset
AMPA	: a-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolepropionik Asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCRP	: Meme Kanseri Direnç Proteini
Bm	: Bazal Membran
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CED	: Konveksiyonla Güçlendirilmiş Difüzyon
Cl ⁻	: Klor
Cldn	: Klaudin
CNT	: Konsantratif Tek Yönlü Na ⁺ / Nükleozid Kotransporterler
CRM197	: Çapraz-Reaksiyona Giren Materyal 197
ECL	: Hücre Dışı Döngü
ECoG	: Elektrokortikografi
EEG	: Elektroensefalografi
ENT	: Dengeleyici Çift Yönlü Taşıyıcılar
FIRES	: Febril Enfeksiyonla İlişkili Epilepsi Sendromu
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
GLAST	: L -Glutamat / L -Aspartat Taşıyıcısı
HRP	: Horseradish Peroksidaz
GLT	: Glutamat Taşıyıcısı
HCO ₃ ⁻	: Bikarbonat
ICV	: İntraserebroventriküler
İK	: İntrakortikal
İN	: İntranazal
IV, i.v.	: İntravenöz
JAM	: Bağlantı Adezyon Molekülleri
JTKS	: Jeneralize Tonik Klonik Status Epileptikus
K ⁺	: Potasyum
KAR	: Kâinat Reseptörü
KBB	: Kan Beyin Bariyeri

KCC2	: $K^{+} - Cl^{-}$ Yardımcı Taşıyıcısı 2
KSE	: Konvulsif Status Epileptikus
LAM	: Lökosit Adezyon Molekülleri
LAT	: L-Amino Asit Taşıyıcı Sistemi
LogP	: Partisyon Katsayısı
LRP1	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü ile İlişkili Protein 1
MCT	: Monokarboksilat Taşıyıcıları
MDR1	: Çoklu İlaça Direnç 1
mGluR	: Metabotropik Glutamat Reseptörü
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
MMP	: Matris Metalloproteinaz
mPTP	: Mitokondrial Geçirgenlik Geçiş Gözenekleri
MRP	: Çoklu İlaça Direnç İlişkili Proteinler
MSS	: Merkezi Sinir SİSTEMİ
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfataz
NKCC1	: $Na^{+} - K^{+} - Cl^{-}$ Yardımcı Taşıyıcısı 1
NKSE	: Non-konvulsif Status Epileptikus
NMDA	: N -Metil- D – Aspartat
NORSE	: Yeni Başlayan Refrakter Status Epileptikus
NOS	: Nitrik Oksit Sentetaz
NVÜ	: Nörovasküler Ünite
OAT	: Organik Anyon Taşıyıcıları
OATP, SLCO	: Organik Anyon Taşıyan Polipeptit
OKT	: Organik Katyon Taşıyıcıları
PEPT	: Peptit Taşıyıcısı
PGP	: Penisilin G Potasyum
PME	: Progresif Miyoklonik Epilepsi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RSE	: Refrakter Status Epileptikus
SE	: Status Epileptikus
SF	: Serum Fizyolojik
SLC	: Çözünür taşıyıcılar
TJ	: Sıkı Bağlantı
VPA	: Valproik Asit

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
Tablo-1 : Eksen 1: SE'nin Semiyolojik Sınıflaması	7
Tablo-2 : Eksen 2: SE'nin Etyolojik Sınıflaması	8
Tablo-3 : Deney Grupları ve Örnek Sayıları	71
Tablo-4 : Gruplardan Alınan Kayıtların Diken Frekansları	81
Tablo-5 : Fenitoin ve Fenitoin+Mannitol Gruplarının Laboratuvar Sonuçları	82
Tablo-6 : Valproik asit ve Valproik asit+Mannitol Gruplarının Laboratuvar Sonuçları	82

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Status epileptikus (SE) 100,000’de 10-41 insidansı oranları ile nörolojik acillerin sık görülenlerindendir. Maalesef nöbet önleyici ilaçlar olguların % 31-50’inde SE’u sonlandırmakta başarısız kalmaktadır. Dirençli vakalardaki tedaviler solunum depresyonu, arteriyel hipotansiyon ve immünosupresyon gibi ciddi yan etkilere neden olabilen sürekli intravenöz anesteziklerin de kullanılmasını gerektirebilmektedir. Bu nedenle, jeneralize konvülsiv SE’de anestezi dikkatle uygulanmalıdır. Ancak, nöbet önleyici anestezi altında bile, SE olgularının önemli bir bölümünde devam edebilir. Nöbet önleyici tedavilerin etkisiz kaldığı durumlarda alternatif tedavi seçenekleri gündeme gelmiştir (1).

Penisilin kaynaklı epilepsi modelinin avantajı, penisilini uygulamanın birkaç yolunun olmasıdır. İndüklemek istenen modele bağlı olarak, penisilin uygulaması intraperitoneal, intramusküler, intravenöz veya intrakortikal olabilmektedir(2). Penisilin G, beyin omurilik sıvısındaki (BOS) konsantrasyonuna bakılmaksızın en yüksek epileptojenik potansiyele sahip penisilin grubu antibiyotiktir. GABA'nın GABA_A reseptörlerine bağlanmasının inhibisyonu yoluyla inhibitör sinaptik transmisyonu müdahale, penisilin kaynaklı merkezi sinir sistemi uyarımının patogenezi açıklayan yaygın olarak kabul edilen bir mekanizmadır(3). GABA aracılı inhibisyonun bir azalma, uyarıcı kortikal afferentlerin merkezi sinir sistemi uyarımı üretmesine veya epileptiform deşarjları tetiklemesine neden olur. Ek olarak epileptik aktiviteye neden olan hücreler Cl⁻ gradyenti, transmembran GABA_A reseptör kompleksi içerisindeki çeşitli ligant bağlanma yerlerine değişken ligand bağlanmasıyla da yakından modüle edilir. Dikkate değer olan, GABA_A aracılı etkileri olan benzodiazepinler ve barbitüratlar, penisilin kaynaklı konvülsiyonları tedavi etmede fenitoin'den daha etkilidir(4). Ayrıca penisilin kaynaklı epilepsi modelinin yosunlu liflerin filizlenmesini indüklediği, dentat girusun granüler hücre tabakasındaki nöronlarda kayba neden olduğu ve kullanılan penisilin dozu ile bağlantılı olmakla beraber hipokampal nöronlarda kayba neden olduğu bildirilmiştir(2). Tüm bu özellikler, penisilin'in iyi bir nöbet indüksiyon modeli olabileceğini göstermektedir. Ratların ilaç infüzyonu, ECoG kaydı ve BOS alımı sırasında hareketsiz kalması gerekliliği ile yukarıda belirtilen nöbet indüksiyon özellikleri nedeniyle, ratlara üretilen anestezisi altında PGP ile indüklenen deneysel status epileptikus modeli

planlanmıştır.

Mannitol nörolojide kafa içi basıncını düşürmek için kullanılan bir ajandır. Bu endikasyonda intravenöz (IV) olarak verilir. IV verilen mannitol plazmada yeni bir çözünen oluşturur ve bu da plazmanın tonisitesini arttırır. Mannitol, bozulmamış kan-beyin bariyerini geçemediğinden, mannitol ile artan vasküler tonisite, suyu beyin parankiminden intravasküler boşluğa çeker. Bu durum, beyindeki hücrelerin hafifçe dehidrate kalmasına neden olur. Su daha sonra mannitol ile birlikte böbreklere gider ve burada idrarla atılır (5).

Mannitol çözeltisinin infüzyonu, kan-beyin bariyerinin ozmotik açılmasına neden olur. Bunun temel mekanizması ise beyin vasküler endotel hücrelerinin sıvı kaybına bağlı büzülmesi ve buna bağlı sıkı bağlantı noktalarının genişlemesidir. Kan-beyin bariyerinin ozmotik açılması, bariyerin geçirgenliğinde (küçük moleküller için 10 kat) belirgin artış sağlar. Bunun sonucu ise sıkı bağlantılar boyunca pasif difüzyon ile artan toplu sıvı akışıdır. Geçirgenliğin bu etkisi ise kısa süreli ve geri dönüşümlüdür. Geçirgenlik, büyük ölçüde 10 dakika içinde tersine çevrilir (6).

Nöbet önleyici ilaçların beyne nüfuz etmesi KBB hasarından etkilenebilir. Marchi ve ark. tarafından yapılan çalışmada intrakarotid verilen mannitolün diazepam ve fenitoine karşı geçirgenliği artırdığı, ilaçların artmış lipofilitesinin beyne ilaç penetrasyonu için önemli olduğunu ancak KBB bozulduğunda ilaçların proteine bağlanma seviyesinin, toplam ilaç birikiminin ana denetleyicisi olduğunu, beyin su içeriğinin ilaç geçirgenliğini kontrol eden önemli bir faktör olmadığını göstermiştir. Ayrıca bozulmamış serebrovasküler bölgelere kıyasla toplam ilaç miktarı artsa da daha düşük serbest ilaç seviyeleri ile karakterize olduğu gösterilmiştir. İlaça dirençli epilepsi modellerinde bu mekanizmalar ile ilaçların beyin dağılımına katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (7). Status epileptikusda kullanılan fenitonin lipofilite değeri (logP) 2.47 dir(8). Valproik asitin ise LogP değeri 2.75'dir(9). Mannitolün LogP değeri 3.1'dir (10). Proteine bağlanma oranları ise fenitoin için%90, valproik asit için %85-94'tür(11).

Hücre dışı hiperosmolaritenin antikonvülsan etkisi on yıllardır bilinmektedir, ancak bu etki için henüz uygun bir terapötik uygulama bulunamamıştır. Hücre şişmesi ile hücre dışı hacim azalması, bitişik nöronlar arasındaki fiziksel yakınlığın artması ve buna bağlı artan nöronlar arasındaki elektriksel etkileşim ile daha küçük hacimlerde meydana gelen hücre dışı iyonik

değişiklikler sinaptik olmayan uyarıların artacağı, bunun da nöbetlere neden olacağı düşünülmektedir. Çünkü nöronlar arasındaki sinaptik olmayan bağlantının artması, epileptik senkronizasyonun önemli bir bileşenidir. Nöronal etkileşimi azaltmak için hipertonik solüsyonlarla yapılan tedavinin, tekrarlayan nöbetleri olan hayvan modellerinde epileptiform aktiviteyi bu şekilde inhibe ettiği düşünülmektedir(12).

Baran ve arkadaşlarının yaptığı epilepsinin kainik asit modelinde mannitol tedavisinin beyin ödemi azaltarak nöbetlerin yayılmasını ve beyin hasarını önleyebileceği sonucuna varılmıştır(13). Serafini ve arkadaşlarının çalışmasında yetişkin sıçan neokortikal dilimlerinde, hücre dışı ozmolaritesinde mannitol ile indüklenen 30 mOsm/L'lik bir artışın fenitoininkine benzer bir nöbet önleyici etki elde edilebileceğini gösterilmiştir. Yine bu çalışmada mannitol ve fenitoinin nöbet önleyici mekanizmalarını karakterize etmek ve karşılaştırmak için çoklu elektrot dizileri kullanılmıştır. Fenitoin ritmik tekrarlayan, iktal benzeri aktivitenin voltajını, süresini ve uzaysal yayılmasını azalttığı gösterilmiştir. Buna karşılık, mannitol ritmik tekrarlayan, iktal benzeri aktivitenin voltajını, süresini ve uzamsal yayılmasını önemli ölçüde etkilemeden, direkt epileptiform deşarj oranını azaltarak nöbetleri engellemiştir(12). Haglund ve ark.'ları hücre dışı boşlukta oluşan elektriksel alan etkileşimleri gibi sinaptik olmayan mekanizmaların da nöronal hipersenkroniye ve epileptojenisiteye katkıda bulunabileceğini öne sürmüşlerdir. Hücre dışı boşluğu modüle eden mannitol gibi ilaçların ise klinik olarak yararlı nöbet önleyici özelliklere sahip olabilirken, nöronal uyarılabilirliğinin baskılanması ile ilişkili yan etkilerden kaçınılabileceğini iddia etmişlerdir (14).

van Vliet ve ark. ise yaptıkları çalışmada kronik epileptik ratlarda mannitol tarafından KBB'nin yapay olarak açılmasının, ratların çoğunda nöbet sayısında kalıcı bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular, epileptogenez ve kronik epileptik faz sırasında KBB sızıntısının meydana geldiğini göstermekte ve bunun epilepsinin ilerlemesine katkıda bulunabileceğini düşündürdüğünü belirtmişlerdir(15).

Mannitolün epileptik aktiviteyi azalttığına dair yayınlar olmakla birlikte bunun tersine iddia eden de yayın da vardır. Antiepileptik etkisi olsa bile bunun hangi mekanizmayla olduğu açık değildir. Biz bu çalışmada deneysel status epileptikus modeli oluşturulan ratlarda mannitolün epileptik aktivite üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Bu etkide KBB geçirgenliğindeki artışın etki olduğunu düşünüyoruz. Bunu anlamak amacıyla ratlara status epileptikus

tedavisinde etkinlikleri ispatlanmış olan fenitoin ve valproik asit vermeyi planlıyoruz. Bu çalışmada fenitoin ve valproik asitin etkin dozda verildiği gruplarla, düşük doz fenitoin ve valproik asitin mannitolle beraber verildiği grupların verileri karşılaştırılacaktır. Ratların BOS ve serum örneklerinden fenitoin, valproik asit seviyeleri çalışılacaktır.

Bizim hipotezimiz mannitolle beraber düşük doz fenitoin ve valproik asit alan gruplarda BOS ilaç/serum ilaç seviyesi oranlarının, yüksek doz alanlardan daha fazla olacaktır. Bunun nedeninin mannitolün KBB geçirgenliği artırmasına bağlı olduğunu düşünüyoruz. Ek olarak mannitolün status epileptikus altındaki ratlardaki nöbet önleyici aktivitesi de çalışmada incelenecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Status epileptikus

2.1.1. Tanım

Nöbet, beyinde anormal aşırı veya senkron nöronal aktiviteye bağlı olarak gelişen geçici belirti ve/veya semptomlar olarak tanımlanır. Status epileptikus (SE) genel olarak bir nöbetin yeterli bir süre devam ettiğinde veya yeterince sık tekrarlandığında kullanılan, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan 'kalıcı' bir epileptik durumdur.(16,17). Bu durum bir dizi şiddetli nöbetten farklıdır. İnhibe edici mekanizmalar, ciddi nöbetleri bile hızla sonlandırırken, SE sırasında başarısız olur. Bu nedenle SE, bitkinlik ve beyin hasarı ortaya çıkmadan önce nadiren kendiliğinden sona erer(17).

Status epileptikusun tanımı uzun bir süre '30 dakikadan uzun süren bir nöbet' olarak tanımlanmaktaydı. Fakat bu tanım klinik faydadan yoksundu. Nörokritik Bakım Derneği tarafından 2012 yılındaki yenilenen klavuzda tanım, '5 dakika veya daha fazla sürekli klinik ve/veya elektrografik nöbet aktivitesi veya nöbetler arasında iyileşme olmaksızın tekrarlayan nöbet aktivitesi' olarak revize edildi(18). Ek olarak, status epileptikusun patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması, status epileptikusun yeniden tanımlanmasına yol açtı. Bu yeni tanımda, status epilepticus'un iki farklı patofizyolojik süreç tarafından tanımlanabileceğini kabul etmektedir. Yeni tanımda 'SE, nöbet sonlandırmasından sorumlu mekanizmaların başarısızlığından veya anormal derecede uzamış nöbetlere yol açan mekanizmaların başlatılmasından kaynaklanan ve tedaviye başlanması gereken durum olan 't1 zaman noktası' ile nöbetlerin türüne bağlı olarak değişmekle beraber nöronal ölüm, nöronal yaralanma ve nöronal ağların değişmesi dahil olmak üzere uzun vadeli sonuçların başladığı süre olan 't2 zaman noktası' belirlendi(16).

Yeni tanım, aynı zamanda status epileptikusun "operasyonel" bir tanımını olan, hastalar yerleşik status epileptikusta olmasa bile, status epileptikusa sahip olarak kabul edilip tedavi edilmesi gereken zamanı belirledi(19). Bu tanımla oluşan erken terapötik müdahale, SE'nin neden olduğu nöronal hasar ve zamana bağlı olarak gelişen farmakodirenç riskini azaltmaktadır(17).

t1 ve t2 zamanı farklı nöbet tiplerinde farklılık göstermektedir. t1 zamanı jeneralize tonik-klonik SE durumunda 5 dakikayken, t2 zamanı 30 dakikadır. Bilinç bozukluğu olan fokal SE'de ise t1 zamanı 10 dakika, t2 zamanı 60 dakikadan fazladır. Absans SE'de ise, t1 zamanı 10-15 dakikadır, t2 zamanı bilinmemektedir(18).

2.1.2. Epidemiyoloji

Status epileptikus epidemiyolojisi farklı çalışmalarda değişmekle beraber yılda 100.000 kişide 18.3 ile 41 hasta olarak saptanmıştır. SE ile ilişkili ölüm oranı ise %20'ye kadar çıkmaktadır. Bu oran çocuklar için %3 iken yetişkinler için de %26 olarak rapor edilmiştir. SE'deki kişilerin %50'den azında bir nöbet veya epilepsi öyküsü mevcuttur (20–22).

Status epileptikusun insidansına cinsiyet, etyoloji ve nöbet tipi açısından bakıldığında ise; erkeklerde kadınlardan daha fazla olduğu, akut semptomatik nöbetlerin daha sık görüldüğü, fokal ve sekonder jeneralize status epileptikusun diğer herhangi bir nöbet tipinden daha sık görüldüğü tespit edilmiştir(20,21).

2.1.3. Status Epileptikus Sınıflaması

ILAE'nin 2015 yılında yayınladığı status epileptikus sınıflamasında, status epileptikus semiyoloji, etyoloji, elektroensefalografi (EEG) korelasyonu ve yaş olmak üzere 4 ayrı eksenle incelenmiştir.

2.1.3.1. Eksen 1: Semiyoloji

Bu eksen, SE'nin klinik sunumunu ifade etmektedir ve bu yüzden sınıflandırmanın temel yapısını oluşturur. Sınıflandırmada belirgin motor semptomların varlığı veya yokluğu ile bilinç derecesini içeren 2 ana alt kategoriden oluşur(23). Semiyolojinin alt kategorileri Tablo-1'de belirtilmiştir.

Tablo-1: Eksen 1: SE'nin semiyolojik sınıflaması:

(A) Belirgin motor semptomları olan <u>A.1 Konvülsif SE (tonik-klonik SE)</u> A.1.a. Jeneralize konvülsif A.1.b. Fokal başlayıp bilateral jeneralize A.1.c. Fokal veya jeneralize olup olmadığı bilinmeyen <u>A.2 Miyoklonik SE (belirgin epileptik miyoklonik jerkler)</u> A.2.a. koma ile A.2.b. koma olmadan <u>A.3 Fokal motor SE</u> A.3.a. Tekrarlayan fokal motor nöbetler (Jacksonian) A.3.b. Epilepsi parsialis kontunia (EPC) A.3.c. Adversif status A.3.d. Oküloklonik status A.3.e. İktal parezi (yani fokal inhibitör SE) <u>A.4 Tonik SE</u> <u>A.5 Hiperkinetik SE</u> (B) Belirgin motor semptomlar olmadan (yani konvülsif olmayan SE, NCSE) <u>B.1 NKSE ile koma ("süptil" SE dahil)</u> <u>B.2 NKSE komasız</u> B.2.a. Jeneralize B.2.aa Tipik absans B.2.ab Atipik absans B.2.ac Miyoklonik absans B.2.b. Fokal B.2.ba Bilinç bozukluğu olmadan (otonom, duyuşsal, görsel, koku alma, tat alma, duyuşsal/psişik/deneysel veya işitsel semptomlarla birlikte sürekli aura) B.2.bb Afazi durumu B.2.bc Bilinç bozukluğu olan B.2.c Fokal veya jeneralize olup olmadığı bilinmeyen B.2.ca Otonomik SE

2.1.3.2. Eksen 2: Etiyoloji

Yapısal, metabolik, enflamatuvar, enfeksiyöz, toksik veya genetik bir bozukluğun neden olduğu SE için nörolojik terminolojiyle uyumlu olarak Tablo-2'de de gösterildiği gibi "*bilinen*" veya "*semptomatik*" terimi kullanılır. Zamansal ilişkisine bağlı olarak da akut, uzak ve ilerleyici alt bölümler uygulanabilir.

SE'nin altta yatan etiyolojisi için "idiyopatik" veya "genetik" terimleri uygun değildir. İdiyopatik veya genetik epilepsi sendromlarında, SE'nin nedeni hastalıkla aynı değildir. Bu hastalarda metabolik bozukluklar, toksik

nedenler veya uyku yoksunluğu gibi intrensek faktörler SE'yi tetikleyebilir. Bu nedenle burada “idiyopatik” veya “genetik” terimleri kullanılmamalıdır. Bu durumlarda "Bilinmeyen" veya "kriptojenik" terimi kullanılmalıdır.

Bu hastaların "Muhtemelen" semptomatik veya genetik olduğu varsayımı da uygun değildir.

Tablo-2: Eksen 2: SE'nin etyolojik sınıflaması:
I. Bilinen (semptomatik) • Akut (örneğin, inme, zehirlenme, sıtma, ensefalit, vb.) • Uzak (örneğin, travma sonrası, postensefalitik, inme sonrası vb.) • Progresif (örneğin, beyin tümörü, Lafora hastalığı ve diğer PME'ler, demanslar vb.) • Tanımlanmış elektroklinik sendromlarda SE (örneğin, Ohtahara sendromu, Dravet sendromu, Lennox-Gastaut sendromu vb.) II. Bilinmeyen (kriptojenik)

SE'li hastaların en az yarısında bilinen epilepsi hastalığı veya spesifik epilepsi sendromu yoktur. Genel olarak altta yatan akut veya uzak bir nedene bağlı merkezi sinir sistemi etkilenimi veya sistemik hastalığın klinik prezentasyonu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Epileptik ensefalopatilerin, epileptiform EEG patternine dönüşmeyen fokal veya jeneralize periodik dalgaları olan komadaki hastaların, epilepsi ile psikoz gibi davranış bozukluğunun birlikte görüldüğü durumların ve epileptiform EEG paternleri olan akut konfüzyonel durumdaki hastaların etyolojik sınıflamadaki yerleri şu anda belirsiz olup, bu hastalar ‘Sınır Sendromlar’ olarak adlandırılmaktadır(23).

2.1.3.3. Eksen 3: EEG Korelasyonu

Herhangi bir SE tipinin, iktal EEG paternleri hastalık açısından spesifik değildir. Epileptiform deşarjlar ayırt edici özellik olarak kabul edilebilir olsa da SE süresi arttıkça EEG paterninde değişiklik ve ritmik nonepileptiform paternler hakim olmaktadır. EEG, SE'nin konvülsif formlarında hareket ve kas artefaktı nedeniyle sınırlı klinik değere sahip olmasına rağmen, klinik belirtilerin genellikle belirsiz ve spesifik olmadığı NKSE tanısında vazgeçilmezdir.

Şu anda SE için kanıta dayalı EEG kriterleri bulunmamaktadır. SE'deki EEG paternlerini tanımlamak için, lokalizasyonu [jeneralize (bilateral senkron

paternler dahil), lateralize, bilateral bağımsız, çok odaklı], pattern adını (periyodik deşarjlar, ritmik delta aktivitesi veya diken-dalga/keskin-dalga plus alt tipler), dalga morfolojisini [keskinlik, faz sayısı (örneğin, trifazik morfoloji), mutlak ve bağıl genlik, polarite], zamanla ilgili özelliklerini [yaygınlık, sıklık, süre, günlük patern süresi ile indeksi, başlangıç şekli (ani ve kademeli) ve dinamikleri (gelişen, dalgalanan veya statik)], modülasyonu (uyarana bağılı ve spontan) ve ilaç müdahalesinin EEG üzerindeki etkisini içeren tanımlama yapılmasını önermektedir(23).

2.1.3.4. Eksen 4: Yaş

Farklı yaş gruplarında ortaya çıkan SE türü, elektroklinik sendromun ayrılmaz bir parçası olabilmektedir. Bazı elektroklinik sendromlar uyku yoksunluğu, zehirlenme veya uygun olmayan ilaçlar gibi tetikleyici ve/veya hızlandırıcı nedenler mevcut olduğunda ortaya çıkabilmektedir. Bu yüzden yaşa bağılı gruplandırma önem arz etmektedir.

Gruplandırma; yenidoğan (0 ila 30 gün), bebeklik (1 aydan 2 yıla kadar), çocukluk (> 2 ila 12 yaş), ergenlik ve yetişkinlik (> 12 ila 59 yaş), yaşlılık ($\geq$ 60 yaş) olarak yapılmaktadır(23).

2.1.4. Patofizyoloji

Status epileptikusun hücresel ve moleküler patofizyolojisi, klinik senaryoları anlamak ve ileriye dönük mantıksal tedaviler tasarlamak için kavramsal bir çerçeve sağlar.

Status epileptikus, postiktal durumu sağlayacak kritik geçiş, tekrarlayan yaklaşma ve iktal geri çekilme olarak kabul edilebilir. Biyolojik açıdan bu durum nöbeti, post-iktal duruma "iten" süreçlerin başarısızlığı olarak görülebilir. Status epileptikusun hayvan modelleri, bize tek nöbetten status epileptikusa doğru ilerleme hakkında bilgiler vermektedir. Nöbet aktivitesinin 30 dakikadan daha uzun "sürdürüldüğü" stimülasyon protokollerinde, nöbetlerin artık kendi kendine devam ettiği, yani stimülasyon durdurulduğunda bile status epileptikusun kendi kendini idame ettirebildiğini göstermiştir. Aslında, stimülasyon ne kadar uzun olursa, kendi kendine devam eden status epileptikus şansı o kadar artmaktadır. Bu, nöbetin sonlandırılması için gerekli olan süreçlerin tükendiğini ve/veya nöbet aktivitesini yönlendiren süreçlerin

güçlendiğini gösterir(16).

İnsanlarda nöbetlerin kendi kendine devam ettiğine dair bir kanıt yoktur; ancak, yarım saatten fazla süren nöbetlerin kontrol edilmesinin zorlaştığına dair gözlemler bu yorumu desteklemektedir. Tekli nöbetlerden kendi kendini idame ettiren status epileptikusa dönüşümde yer alan mekanizmaları anlamak, inatçı status epileptikusu ve sonuçlarını, beyin hasarını ve epileptogenezi önlememize yardımcı olabilir(19).

2.1.4.1. Status Epileptikusta Rol Alan Önemli Reseptörler

2.1.4.1.1. GABA_A Reseptörü

GABA_A reseptörü, beş alt birimin farklı kombinasyonları tarafından oluşturulan ve ligandla aktive olan iyonotropik bir reseptördür. Bu reseptör büyük ölçüde nöronların postsinaptik zarı üzerinde eksprese edilir. Reseptör, amino asit bileşimlerine göre 7 ayrı alt birime (α , β , γ , δ , ϵ , π , θ) ayrılır. Ayrıca bu alt birimlerin bazıları, farklı izoformlarda sınıflandırılabilirler (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3}). Alt birim sınıflarının ve izoformlarının kombinasyonu, kanalın lokalizasyonu, ligand bağlanması ve iletkenliği dahil olmak üzere reseptörün biyofiziksel özelliklerini belirler.

GABA_A reseptörünün kemirgen ve insan beynindeki en yaygın düzenlemesi, iki α_1 alt birimi, iki β_2 alt birimi ve bir γ_2 alt birimidir. Kemirgen beyin dokusunda yapılan çalışmalar, bu bileşimin fazik inhibisyon ile ilişkili olduğu ve çoğu GABA_A sinapsta yer aldığını göstermiştir(24).

γ alt birimi, sinapslarda GABA_A reseptörünün kümelenmesi için çok önemli olduğu düşünülmektedir. Bu görüşle uyumlu olarak, in vitro çalışmalar, kemirgenlerde γ -alt biriminin bir δ -alt birimi ile değiştirildiğinde, GABA_A reseptörlerinin ekstrasinaptik bölgelerde kümelenmesini göstermiştir.

GABA_A reseptörleri, α - ve β -alt birimleri arasında bağlanan ve bir nörotransmitter olan GABA tarafından aktive edilir. Bu bağlanma, Cl^- ve çok daha az oranda bikarbonat (HCO_3^-) geçirgenliği için pentamerik kanalda konformasyonel bir değişikliğe neden olur(24). Bu nedenle GABA_A reseptörü aktivasyonu tipik olarak negatif yükün net içe doğru hareketine ve membran hiperpolarizasyonuna neden olur. Bu süreç, GABA_A reseptörlerinin 'klasik' inhibitör etkisinin temelini oluşturur(24).

2.1.4.1.2. Transmembran Cl^- Gradyanı ve Cl^- Kanalları

GABA_A reseptörü, öncelikle bir Cl^- kanalıdır. Bu nedenle, benzodiazepin bağlanması yoluyla iletkenliğini modüle etmenin etkileri, transmembran Cl^- konsantrasyon gradyanının durumu tarafından yönetilir.

Cl^- denge potansiyeli, Na^+/K^+ ATPaz, geçirimsiz anyonlar, Cl^- iletkenlikleri ve Cl^- katyon eş taşıyıcıları dahil olmak üzere birden çok hücresel faktörler tarafından belirlenir. Bununla birlikte, Cl^- katyon eş taşıyıcıları gibi yalnızca Cl^- iyonuna spesifik aktif veya sekonder aktif taşıma mekanizmaları, Cl^- iyonu için bir gradyent oluşturabilir. Bu durum, Cl^- denge potansiyelini dinlenme membran potansiyelinden uzaklaştırabilirler, böylece GABA_A reseptörü aracılı sinyalizasyonun özellikleri kontrol edebilir.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ yardımcı taşıyıcısı (NKCC1) tipik olarak dinlenme membran potansiyeline göre Cl^- akışını hücre içine taşır ve bu durum pozitif bir Cl^- denge potansiyeli ile sonuçlanır. $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ yardımcı taşıyıcı 2 (KCC2) ise Cl^- 'yi hücre dışına çıkarır, daha negatif bir Cl^- denge potansiyeline neden olur(24). Nöbetler hem KCC2 hem de NKCC1'in ekspresyonunu ve aktivitesini değiştirebilir. Bu değişim dakikalardan saatlere kadar gelişebilir. Kemirgen beyin dokusunu kullanan çoklu in vitro çalışmalar, devam eden nöbet aktivitesinin, nöronların Cl^- ekstrüzyon kapasitesini azaltan KCC2'nin fonksiyonunda ve yüzey ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu azalmaya, NKCC1'in nispi ekspresyonunda ve aktivitesinde bir artış eşlik eder. En az on dakikalık nöbet aktivitesi Cl^- -katyon eş taşıyıcılarının nispi ekspresyon seviyelerinde bir tersine dönmeye neden oluyor gibi görünmektedir. Bu değişiklikler temel Cl^- seviyelerini artırır, ancak aynı zamanda nöronları Cl^- birikimine daha duyarlı hale getirir.

Birlikte ele alındığında, bu tür değişikliklerin GABA_A reseptörü aracılı inhibisyonu zayıflatacağı ve böylece reseptörün benzodiazepinler tarafından allosterik modülasyonu yoluyla inhibisyonu artırma potansiyelini azaltacağı tahmin edilmektedir(24).

2.1.4.1.3. Glutamat Reseptörleri

Glutamat, yetişkin memeli beyninin baskın uyarıcı nörotransmitteridir

ve çok sayıda işlemin normal yürütülmesi için kritik öneme sahiptir. Presinaptik nöronlarda depolarizasyon, presinaptik glutamatın sinaptik boşluğa salınması sağlar.

Glutamat birkaç iyonotropik ve metabotropik reseptör alt sınıfları aracılığıyla uyarıcı etkilere neden olur. Bunlar postsinaptik iyonotropik glutamat reseptörlerinden a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit (AMPA) reseptörleri hızlı uyarıcı nörotransmisyon için kritikken, N - metil- D - aspartat (NMDA) reseptörleri, bilgi işleme için gerekli olan yavaş postsinaptik uyarıcı potansiyellerin çoğuna aracılık eder. Glutamat ayrıca ek bir iyonotropik glutamat reseptörü olan kainat reseptörü (KAR) ile etkileşime girer. KAR, uyarıcı nörotransmisyonun hem pre- hem de postsinaptik modülasyonunu içerebilen ve nöronal sinyalizasyonda daha az anlaşılan bir role sahiptir(25).

Glutamatın iyonotropik reseptörlere ek olarak, pre- ve postsinaptik metabotropik reseptörleri (mGluR'ler) de mevcuttur. Bu reseptörler epilepsiyle ilişkilendirilmiştir. mGluR'ler üç ana fonksiyonel alt gruba ayrılırlar. Grup I, presinaptik mGluR1 ve postsinaptik mGluR5'i içerir. Presinaptik mGluR1, glutamatın veziküler salınımını artırabilirken, postsinaptik mGluR5, iyonotropik reseptörlerin (NMDA/AMPA) postsinaptik etkilerini modüle eder. Grup II, ağırlıklı olarak presinaptik terminalde bulunan ve presinaptik glutamat salınımını inhibe eden mGluR2/3'ü içerir. Pilocarpinin neden olduğu SE modelinde presinaptik mGluR2/3 ekspresyonunun derin bir aşağı regülasyon saptanmıştır. Bu durum SE'de görülen artmış uyarılabilirliği desteklemektedir. Ek olarak, mGluR3 astrositlerde eksprese edilir ve glutamat taşıyıcı L -glutamat / L -aspartat taşıyıcı (GLAST) ve glutamat taşıyıcı (GLT)-1'in ekspresyonunu düzenler. Bu taşıyıcılar sinaptik yarıktaki glutamat seviyelerini, glutamatın geri alımını modüle ederek düzenlerler(25).

Glutamat, iyonotropik glutamat reseptörleri aracılığıyla doğrudan hücre içine Ca^{+2} akışını sağlar. Bu durum voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının aktivasyonuna yol açan depolarizasyona ve hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımına yol açar.

İn vivo çalışmalar, epileptogenez ve nöbete bağlı hasarda mGluR'lerin rolünü olduğunu göstermektedir. Fosfatidil inositol bağlantılı mGluR'lerin aktivasyonu nöronal uyarılabilirliği artırır ve hücre içi depolardan Ca^{+2}

salınımı sağlar. Aynı zamanda iyonotropik glutamat reseptörlerinin güçlendirilmesi, NMDA'ya bağımlı uzun süreli potansiyeli kolaylaştırır. Grup I mGluR'lerin aktivasyonu limbik sistem nöbetlerini indükler ve öncelikle hipokampal nöronal dejenerasyona neden olur. Hasar, grup I mGluR antagonistleri ve hücre içi Ca^{+2} mobilizasyonunun blokerleri tarafından zayıflatılır, ancak iyonotropik glutamat reseptörlerinin antagonistleri tarafından zayıflatılmaz. Buna karşılık, grup II/III mGluR'lerin agonistleri nöbetlere karşı koruma sağlarlar. Ayrıca, mGluR2/3'ün aktivasyonu, cAMP oluşumunun inhibisyonunu, voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının inhibisyonunu ve glutamat salınımının inhibisyonunu ile nöroprotektif etkide rol oynar(26).

2.1.4.2. İzole Nöbetlerden SE'ye Dönüşümde Yer Alan Mekanizmalar

Hayvan modellerinde tek nöbetten kendi kendini idame ettiren SE'ye geçiş sırasında hipokampal GABA_A reseptörlerinde endositoz gerçekleştiğini gösteren kanıtlar mevcuttur. Sinaptik yarığa salınan GABA paketine verilen postsinaptik tepkiyi yansıtan minyatür inhibitör postsinaptik akımların, status epileptikusta %27'lik bir düşüş gösterdiği saptanmıştır. Sinaptik yarıқта fonksiyonel GABA_A reseptörlerinin azalması, GABA inhibisyonundaki başarısızlığı ve SE sırasında zamana bağlı olarak benzodiazepinlere karşı gelişen ilerleyici farmakodirenci kısmen açıklayabilmektedir. İlginç bir şekilde, ekstrasinaptik GABA_A reseptörleri SE'de endositoza uğramaz, bu durum ekstrasinaptik reseptörlerin nörosteroidlerle uyarılmasının SE tedavisinde faydalı olabileceği ihtimalini artırır(17).

Aynı zamanda, AMPA ve NMDA reseptör alt birimleri sinaptik zara taşınırlar. Bu değişiklik prokonvülsandır ve kontrolsüz nöbetlerin uyarılabilirliği daha da artırır. (17).

Status epileptikus sırasında GABA_A reseptörü aracılı inhibisyon işlevindeki değişiklikler, özellikle NMDA reseptörü yoluyla olan glutamaterjik sinyalizasyona bağlıdır. Status epileptikusun bir kemirgen modelinde, uzun süreli nöbet aktivitesinin, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artışı başlatan NMDA reseptörlerinde yaygın ve kalıcı bir aktivasyonuna neden olduğu göstermiştir. Hücre içindeki kalsiyum artışından sonra, tamamlayıcı yollar ile hem fazik hem de tonik GABA_A reseptörlerinin ekspresyonunu azaltan protein kinaz C, kalsinörin ve hücre dışı sinyalle

düzenlenen kinazlar gibi ikinci haberci yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Ek olarak, sıçan nöronal kültürlerinden elde edilen kanıtlar, NMDA reseptörü aracılı Ca^{+2} akışının KCC2 fonksiyonunu azaltabileceğini ve böylece $GABA_A$ reseptörünün inhibe etme kapasitesini daha da azaltabileceğini göstermiştir(24). Hücre içerisindeki kalsiyum artışı NMDA reseptörlerinin yanı sıra diğer ana glutamaterjik reseptör olan AMPA reseptörlerinin de ekspresyonunu artıran mekanizmaların aktivasyonunda yer aldığı gösterilmiştir(24). Bu durumdaki net sonuç ise $GABA_A$ reseptörü aracılı inhibisyonda azalma ile birlikte glutamaterjik uyarımdaki bir artış nedeniyle nöbet aktivitesinde şiddetlenmedir. Bununla birlikte, bu aşırı uyarılabilirlik durumunun sürdürülmesi büyük ölçüde NMDA reseptörlerine bağlıdır(27).

Bu süreç, üç spesifik tedavi yaklaşımına işaret edebilmektedir. Birincisi, erken NMDA reseptörünün inhibisyonu, benzodiazepinlerin gücünü artırabilir; bu durum status epilepticus'un hayvan modellerinde gözlemlenmiştir(16). NMDA antagonistleri, seyrinde nispeten geç uygulandıklarında bile SE'yi bloke edebilirler. Terapötik olarak ilgili konsantrasyonlarda NMDA bloke etme kabiliyetine sahip iki ajan olan, ketamin ve felbamatin, gerçekten de deneysel SE'nin geç tedavisinde çok etkili olduğu gösterilmiştir(27). İkincisi, kalsinörin antagonistlerinin aynı etkiye sahip olacağı tahmin edilmektedir. Son olarak, ekstrasinaptik $GABA_A$ reseptörü reseptörlerini hedef alan terapötik stratejilerdir. Anestezikler ve özellikle nörosteroidler, bu ekstrasinaptik $GABA_A$ reseptörlerini hedefler ve benzodiazepine dirençli status epileptikusta etkili oldukları gösterilmiştir.

$GABA_{A\alpha}$ ilaçlara karşı direnç, yalnızca reseptörlerdeki değişikliklerin değil, aynı zamanda KCC2'nin fosforilasyon durumunun da sonucu olabilir. Bu da KCC2'nin endositozuna, yüksek hücre içi klorür seviyelerine ve bunun sonucunda $GABA$ 'nın azalan inhibitör etkinliğine neden olur(16). Bu durum SE tedavisinde KCC2'yi de hedef haline getirebilmektedir.

SE'deki akut reseptör değişiklikleri sürecinde ek olarak eksitatör hücrelerde presinaptik adenosin A1 ve $GABA_B$ reseptör ekspresyonu azalır. Bu durum sinaptik aralığa glutamat salınımının baskılanmasını azaltır. Buna bağlı olarak nöbetlerin devamlılığı desteklenmiş olur(28,29).

İlaça karşı duyarlılığı etkileyebilecek olan sadece reseptörlerdeki değişiklikler değil, aynı zamanda belirli nöbet önleyici ilaçlara karşı direnci

artırabilen ve status epileptikusa yanıt olarak artan ilaç taşıyıcı dışı atım proteinleridir. Bazı çalışmalarda P-glikoproteinin fokal status epileptikus modelinde ilaç direncini açıklayan mekanizmalarda yer almadığını göstere de, diğer ilaç taşıyıcılarının veya diğer SE modellerinde ilaç taşıyıcılarının rolü olup olmadığı belirsizdir(16).

2.1.4.3. SE'nin Hücresel Hasardaki Olası Mekanizmaları ve Sistemik Etkileri

SE'nin en belirgin etkisi ise nöronal ölümdür. Kalsiyum birikimiye bu duruma yol açan temel faktördür. İyonotropik glutamat reseptörleri (özellikle NMDA reseptörleri) bu süreçte anahtar rol oynar(30).

Status epileptikus gelişimi sırasında nöronal ölümün bir sonucu olarak, ATP hücre dışı sıvıya salınır ve P₂X reseptörlerini aktive edebilir, bu da kalsiyumun nöronlarda ve gliada birikmesine neden olur. Bunun sonucunda da artmış nöroenflamasyon ve nöronal ölüme neden olur(31). Spesifik nöron grupları SE'ye daha duyarlı olup nöronal ölüm genellikle hipokampüste, özellikle de hilus, CA3 ve CA1 bölgelerinde belirgindir. İn vivo ve in vitro çalışmalar ile NMDA reseptörlerinin veya reseptörler yolu ile kalsiyum girişinin inhibisyonunun nöroprotektif olduğu gösterilmiştir.

Kalsiyum girişinden sonraki aktive olan mekanizmalar belirsiz olsa da, kalsiyum girişi, nöronal ölüme neden olan birkaç enzimi aktive edebilir. Kaspaz 3'ün aktivasyonu yoluyla apoptozun, status epileptikusu takiben nöronal ölüme yol açan ana yol olduğu öne sürülse de, daha yeni kanıtlar bu yolun hiçbir rol oynamadığını veya yalnızca küçük bir rol oynadığını öne sürmektedir. İlgili diğer enzimler arasında kalsiyuma bağımlı kalpainler, non-lizozomal sistein proteazlar yer alır. Bununla birlikte, kalpain ailesinin üyeleri farklı hedeflere sahiptir. Örneğin; kalpain 1 aktivasyonunun ağırlıklı olarak nöroprotektif etkilere sahip olurken, kalpain 2 aktivasyonu ise nörotoksik olan karmaşık bir protein yıkımı dizisi ile sonuçlanır. (16). Kalpainler, farklı nöronal alt tiplerde farklı derecelerde aktive olabilir ve bu da status epileptikusta nöronal ölüm bazı nöronlardaki duyarlılığı açıklayabilir.

Hücre içi kalsiyum birikiminin ve NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun bir başka önemli sonucu, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimidir. NOS, üç farklı izoform olarak bulunur: her ikisi de hücresel

kalsiyum girişi yoluyla aktive olan nöronal NOS ve endotelial NOS ve sürekli aktif olan ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonları tarafından düzenlenmeyen indüklenebilir NOS(32). İndüklenebilir NOS esas olarak enflamatuar hücrelerde bulunur ve bunun inhibisyonu, inflamasyonu azaltıp, status epileptikus takiben nöroprotektif etki sağlar. Aşırı üretildiğinde ise reaktif oksijen türleriyle (ROS) birleşerek yüksek konsantrasyonlarda nörotoksik olan peroksinitrit üretirler. Artmış ROS üretimi, ryanodin reseptörlerinin aktivasyonuna ve sarkoplazmik retikulumda kalsiyum-ATPaz'ın inhibisyonuna neden olur(33). Bu da iç kalsiyum depolarının salınmasına ve mitokondrial geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (mPTP) açılmasına katkıda bulunur. ROS oluşumu ayrıca direkt olarak lipid peroksidasyonu, enzimlerin inhibisyonu, mPTP açılması ve DNA hasarı yoluyla hücre ölümüne katkıda bulunur. Uzun süreli nöbet aktivitesi sırasında ROS üretimi mitokondriye atfedilse de, nöbet kaynaklı ROS, muhtemelen NADPH oksidazın NMDA reseptörüne bağlı aktivasyonu yoluyla üretilir(34,35). Bu durum daha sonra ATP tükenmesine, adenin oluşumuna ve aynı zamanda ROS üreten ksantin oksidaz için substratlar olan hipoksantin ve ksantinde artışa neden olur. NADPH oksidaz aktivitesi, nöbet aktivitesi sırasında artar ve NADPH oksidazın inhibisyonu, status epileptikus'un in vivo modellerinde nöroprotektif olduğu gösterilmiştir(36).

Kalsiyum girişinin nöronal işlev bozukluğuna ve ölüme giden ana yollardan biri de mitokondriyal işlev bozukluğu olabilmektedir. Mitokondri, ağırlıklı olarak mitokondriyal kalsiyum uniporter aracılığıyla kalsiyumu alan, sitozolik kalsiyumun ana tamponlarından biridir. Mitokondri tarafından kalsiyum alımı, mitokondriyal solunum zincirini aktive eder ve kalsiyuma bağımlı NADH dehidrojenazların aktivasyonuna neden olur. Bu yolla mitokondriyal ATP ve serbest radikal üretimini artırabilir. Bununla birlikte, aşırı mitokondriyal kalsiyum birikiminin iki ana zararlı etkisi vardır. İlk olarak, kalsiyum birikimi mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olabilir. ATP üretimi için mitokondriyal membran potansiyeli gerekli olduğundan, bu durum ATP üretiminin azalmasına ve sonuç olarak hücresel enerji yetmezliğine neden olabilir(37). Enerji yetmezliği, hücrenin iyonik gradyanları koruma yeteneğinde bir azalmaya neden olur ve bu nedenle hücresel depolarizasyon, aşırı uyarılabilirlik ve sonunda da hücre ölümüyle sonuçlanır.

İkincisi, aşırı kalsiyum ve reaktif oksijen türleri üretimi, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenəğinin (mPTP) açılmasına neden olur. mPTP, sitokrom c gibi proapoptotik proteinlere geçirgendir. mPTP açılması ayrıca mitokondriyal membran potansiyelinin daha fazla depolarizasyonuna yol açar ve sonuç olarak ATP üretiminde bir azalma, düzensiz iyonik homeostaz ve mitokondriyal matris şişmesine neden olur(38). Bu durumda mitokondri fonksiyon göremez ve buna bağılı olarak da hücre ölür.

Genel olarak, mitokondriyal ATP üretiminde başarısızlık ve aşırı ROS üretimi, SE kaynaklı akut patolojiye yol açan ana yol olması muhtemeldir. Status epileptikus takip eden gün ve haftalarda çok sayıda değışiklik meydana gelir. Bunların çoğı, gen ifadesindeki değışikliklere bağılı transkripsiyon faktörlerindeki, mikroRNA ifadesindeki ve DNA metilasyonundaki değışikliklerdir. Nöbet patofizyolojisindeki akut mekanizmaların nöbetin erken dönemlerinde hedeflenmesi, nöbetlerin sonraki sonuçları önleyebilir. Bu da kronik epilepsi ve bilişsel problemler dahil olmak üzere status epileptikusun uzun vadeli sonuçlarına katkıda bulunabilir.

Uzun süreli konvülsif nöbetlerin sistemik etkilerinde ise; vücut homeostazını yeniden sağlamaya yönelik kalp atış hızında, kan basıncında, solunum hızında, kan şekerinde ve elektrolitlerde adaptif değışiklikler görülür. Ayrıca konvülsiyonların neden olduğı tekrarlayan kas kasılmaları aşırı metabolik talep yaratır. Konvülsiyonlar devam ettikçe vücut anaerobik metabolizmaya geçer ve laktik asit artar. Hayvan çalışmaları, 20 ila 40 dakikalık sürekli nöbet aktivitesinden sonra telafi edici mekanizmalarda bir başarısızlık olduğunu göstermektedir. Yeterli ventilasyonun başarısızlığı, pulmoner ödem ile birlikte solunumsal asidoza ve hipoksiye, laktik asit ise metabolik asidoza neden olur. Devam eden konvülsiyonlarda hipertermi ve rabdomiyoliz meydana gelir. Uzun süreli SE, hipoksi, hipertermi, asidoz ve hipoglisemi mekanizmaları yoluyla nöronal hasara yol açar. Bu durum özellikle hipokampusun dentat çekirdeğinde ve piramidal tabakasında nöron kaybıyla sonuçlanan hipokampal skleroz neden olabilmektedir. Hipokampal skleroz ise gelecekte nöbetlerin ve epilepsinin odak noktası olabilir ve bir kısır döngüye neden olabilmektedir(39). Genel olarak 5-30 dakikalık jeneralize konvülsif status epileptikustan sonra, homeostatik telafi mekanizmaları metabolik ihtiyaçlara cevap veremez ve bu da çoklu organ yetmezliğine yol

açar(40).

2.1.5. Tedavi

Her ne kadar NKSE'de net özellikler tanımlanmamış olsa da birçok deneysel kanıt, uzun süreli nöbetlerden sonra geri dönüşümsüz beyin hasarının ortaya çıktığını göstermektedir. Nöbet aktivitesini bastırmak için agresif erken müdahale, bakımın birinci önceliğidir. Tedaviyi geciktirmek, SE'de daha fazla dirençliliğe yol açmaktadır.

Modern tedavi protokolleri aşamalı bir yaklaşımı benimsemektedir. Erken SE durumunda ilk tercih benzodiazepinlerdir. Tercihen intravenöz (IV) yol ile uygulanmalıdır. İntramüsküler, nazal veya bukkal uygulama, intravenöz yol mevcut değilse kabul edilebilir. IV erişim elde etmeye çalışırken benzodiazepin tedavisini geciktirmemek gerekir(41). Nöbetler benzodiazepinlerle olan tedaviye dirençli ise, "yerleşik SE" olarak adlandırılır. Bu durumda benzodiazepin olmayan, IV nöbet önleyici ilaçlar ile tedavi edilmelidir. Genellikle fenitoin veya valproat kullanılır ama seçenek olarak fenobarbital, levetirasetam veya lakozamid kullanılabilir. Biri benzodiazepin olmak üzere iki uygun parenteral nöbet önleyici ilacın tam dozuna rağmen nöbetler devam ederse, hastanın refrakter status epileptikusta olduğu kabul edilir. Bu noktada ilaçların anesteziik dozları ile takibi önerilir. Anesteziik dozda ilaçlara rağmen nöbet başlangıcından 24 saat sonra devam eden SE, süper dirençli SE olarak kabul edilir(42).

Benzodiazepinler, nöbetleri hızla kontrol ettikleri için konvülsif status epileptikus için birinci basamak tedavidir. Status epileptikus için en sık kullanılan üç benzodiazepin; diazepam, lorazepam ve midazolamdır. IV lorazepam genellikle en çok tercih edilen ajandır(43). Midazolam, ek olarak İM, nazal veya bukkal yollardan verilebilmektedir. Diazepam ise rektal uygulama için uygundur(43). Benzodiazepin tedavisinin ardından konvülsiyonlar durmuş olsa bile, nüksü önlemek için benzodiazepin olmayan bir nöbet önleyici ilaç tedaviye eklenmelidir(44). Bu durum özellikle kısa etki sürelerine sahip olan diazepam veya midazolam kullanılmışsa önemlidir. Lorazepam ise uzun etki süresi nedeniyle bu konuda istisna olabilir. Lorazepam ile kontrol altına alınan nöbetlerde, nöbet önleyici ilaca gerek yoktur(43).

KSE'li hastaların yaklaşık %40'ında nöbetler, birinci basamak tedavi olan benzodiazepin kullanılmasına rağmen devam eder ve yerleşik SE'ye ilerler. Yerleşik SE için ikinci basamak tedavi, bir yükleme dozunda antiepileptik ilaçlardan oluşur. Sıklıkla kullanılan antiepileptik ilaçlar arasında fenitoin veya fosfenitoin, valproat, lakozamid, fenobarbital ve levetirasetamdır. Bu ilaçlardan herhangi birinin göreceli üstünlüğüne dair net bir kanıt yoktur(45).

VPA, 144 dalton gibi düşük bir moleküler ağırlığa sahip bir nöbet önleyici ilaçtır. Karaciğerde metabolize edilir ve idrarla atılır. Terapötik seviyelerde (50 ila 100 g/ml), VPA neredeyse tamamen (%90 ila 95) plazma proteinlerine bağlanır ve sonuç olarak sınırlı bir serbest ilaç fraksiyonu olur(46). Vpa'nın KBB'de taşınımında P-gp gibi dışa akış taşıyıcıları, organik anyon taşıma polipeptitleri (Oatps) ve proton-bağlı monokarboksilat taşıyıcıları (MCT'ler) gibi peptid taşıyıcıları tarafından taşındığı gösterilmiş olsa da KBB'den taşınım mekanizmaları net değildir(47). VPA'nın tek geçişteki beyin alım indeksinin (BUI) % 40 olduğu gösterilmiştir. Bu durum fenitoin için % 28 ve fenobarbital için %24 olduğu gösterilmiştir(47).

Valproik asit, sodyum kanalı inaktivasyonunu uzatan, kalsiyum aracılı geçici akımları zayıflatan ve GABA'yı arttıran bir organik asit bileşiğidir. VPA'nın erişkinlerde yükleme dozu 20-40 mg/kg ve maksimum doz 3000 mg olarak belirlenmiştir. İnfüzyon hızı ise dakikada 6 mg/kg'dır(42).

Fenitoin ise voltaj kapılı sodyum kanallarının blokajı ile etki gösterir. Genel olarak 252.3 dalton molekül ağırlığına sahiptir. %90 plazma proteinlerine bağlanır. Karaciğerde metabolize edilip, üriner yolla atılır. Kan beyin bariyerinde taşınımı MCT ve ABC gibi taşıyıcı proteinlerle olduğu düşünülse de, fenitoinin taşınım mekanizması net değildir(48). Status epileptikus durumunda 20 mg/kg, maksimum 2gr olacak şekilde yüklenir. İnfüzyon hızı ise dakikada 1 mg/kg'dır(49).

Benzodiazepinlere kıyasla daha yavaş olsa da, SE süresi uzadıkça birçok nöbet önleyici ilaç gibi hem valproik asitte, hemde fenitoinde zaman bağlı farmakodirenç gelişmektedir(50,51).

Birinci ve ikinci basamak tedavilere rağmen nöbetler devam ettiğinde veya tekrarladığında SE dirençli kabul edilir ve 'Refrakter status epileptikus' olarak adlandırılır. Bu durum SE'li hastaların %23 ila %43'ünde görüldüğü

bildirilmektedir. Dirençli SE'nin hastane içi mortalitesinin %17 ile %39 arasında değiştiği bildirilmiştir(45). Süper refrakter status epileptikus ise anestezi tedavisinin başlamasından 24 saat veya daha fazla devam eden veya tekrarlayan SE olarak tanımlanır(43). Bu durumda 3. Basamak tedavilere geçilir. Burada midazolam, propofol, barbitürat (sodyum tiyopental ve pentobarbital), lidokain ve ketamin gibi infüzyon tedavileri kullanılır(42). Bu hastalara eş zamanlı nöbet önleyici ilaç olarak topiramat, clobazam, brivarasetam, parampanel, kullanılabilir. Ek olarak bu hastalara terapötik hipotermi, vagus sinir uyarımı, rezektif cerrahi ve ketojenik diyet uygulanabilir(42).

Nispeten nadir olmakla birlikte, anti-NMDA reseptör ensefaliti gibi enflamatuvar veya otoimmün etiyolojilerin neden olabildiği, genelde öncesinde nöbet öyküsü ve yapısal bir bozukluğu olmayan ve ilk kapsamlı değerlendirmede etiyolojisi belirlenmemiş olan hastalara yeni başlayan refrakter status epileptikus (NORSE) denir. NORSE'nin bir alt kategorisi olarak kabul edilen febril enfeksiyonla ilişkili epilepsi sendromu (FIRES), RSE'nin başlangıcından iki hafta ila 24 saat önce başlayan bir prodromal ateşli enfeksiyon ile karakterize edilir. Bu hastalarda olası bir immün etyoloji saptanırsa, bu durumda glukokortikoidler, immün globulinler ve plazmaferez gibi immünomodülatör tedaviler verilebilir(52).

2.2. Merkezi Sinir Sistemi Bariyeri

Kan-beyin arayüzünde biyolojik bir bariyerin varlığı ilk olarak Paul Ehrlich'in periferik yoldan infüze edilen bir boyanın beyin dokusunu boyamadığını fark etmesiyle tespit edilmiştir. Goldmann tarafından ise aynı boyanın beyin omurilik sıvısına uygulanması sonrası periferik vasküler yapıların boyanmadığının, sadece beyin dokusunun boyandığının gözlenmesiyle de desteklenmiştir(53).

Merkezi sinir sisteminin (MSS) bariyerleri, beyne iyonlar ile biyomoleküllerin akışının sıkı şekilde kontrol edildiği, temel besin maddeleri ile oksijenin sağlandığı ve beyinden toksinlerin temizlendiği izole bir ortam sağlar. Böylece bariyerler hem nöronal ağ için en uygun olan iyi düzenlenmiş bir ortam yaratıp korurken, hem de çevrede bulunabilecek herhangi bir hasar riskinden de izole etmiş olur. MSS patolojisi durumunda ise, kan-MSS

bariyerlerinin bariyer özellikleri değişir, ödem oluşumuna ve enflamatuar hücrelerin MSS'ye alınmasına yol açarlar.

Üç adet kan-merkezi sinir sistemi bariyeri vardır. Bunlar serebral vasküler ağacın tüm seviyelerinde lokalize olan endotelyal 'kan-beyin bariyeri' (KBB), beyin ventriküler sistemi içindeki koroid pleksuslarda bulunan 'kan-beyin omurilik sıvısı bariyeri' ve duramater üzerinde bulunan 'araknoid bariyer'dir. Bu bariyerler beyin interstisyel sıvısını ve beyin omurilik sıvısını (BOS) periferik dolaşımdan ayırır(54).

MSS'nin korumasına katkıda bulunan ve beyin homeostazını koruyan ana engel KBB'dir. Merkezi sinir sisteminde kan-beyin bariyerinde olduğu gibi kan-beyin omurilik sıvısı (BOS) bariyeri de değişken kan ortamı ile merkezi sinir sistemini izole etmiştir. KBB'nin MSS mikrodamarları içindeki endotel hücreleri seviyesinde olduğu düşünülürken, kan-BOS bariyeri koroid pleksus epitel hücreleri tarafından oluşturulur. Koroid pleksus epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonlarının yanı sıra BOS üretim ve salgılama fonksiyonu da vardır. Koroid pleksus epitel hücrelerinin bariyer ve salgılama fonksiyonları, iyonların ve besinlerin BOS'a taşınmasına ve BOS'tan toksik ajanların atılmasına izin veren çok sayıda taşıma sistemleri ile korunur(55).

Dura mater'nin altında üçüncü bariyer olarak kabul edilen avasküler araknoid epitel bulunur. Dura mater MSS'yi kaplar ve merkezi sinir sisteminin hücre dışı sıvıları ile vücudun geri kalanı arasındaki sızdırmazlığı tamamlar(56). Kan ve beyin arasındaki alışverişe katkısı, avasküler yapısı ve diğer bariyerlere kıyasla küçük yüzey alanı nedeniyle önemsizdir(57).

MSS'nin çoğu bölgesi, KBB özelliklerini içeren kılcal damarlar tarafından vaskülarize olmasına rağmen, üçüncü ve dördüncü ventriküllere bitişik olan spesifik çekirdekler, subfornikal organ, area postrema, epifiz bezi ve medyan eminence çok fazla sayıda çözünen maddelere karşı yüksek geçirgenliğe sahip olan sürekli pencereci damarlar içerirler(58). Bu yüksek geçirgenlik, kanda çözünen madde konsantrasyonlarını algılayan veya kana moleküller salgılayan çekirdeklerin işlevleri için önemlidir.

2.2.1. Kan Beyin Bariyerinin Yapısal Özellikleri

Kan-beyin bariyeri, merkezi sinir sisteminin mikrovasküler dolaşım

özelliklerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir(59). Kan ve beyin parankimi arasındaki hemostazda rol oynayan kan beyin bariyeri, merkezi sinir sistemindeki en büyük bariyer olup, MSS homeostazını koruyan ana bariyerdir(60). KBB'nin arayüzü ortalama bir yetişkinde yaklaşık 12-18 m² olması ve gram doku başına ortalama 150-200 cm²'lik mikrovasküler yüzey alanı içermesi nedeniyle önemli bir yapısal bariyerdir(61,62). Bariyer, MSS ile kan dolaşımı arasında maddelerin geçişine seçici olarak izin veren veya kısıtlayan özelliklere sahip çok hücreli yapılardan oluşur. Bu kısıtlayıcı bariyer özellikleri, MSS homeostazının sıkı bir şekilde düzenlenmesinin yanı sıra MSS'nin toksinlerden, patojenlerden, inflamasyondan, yaralanmadan ve hastalıklardan korumasını sağlar(63).

Kan beyin bariyerinde, beyin hücreleri ve kan damarları arasındaki ilişkiyi tanımlamak için nispeten yeni bir kavram olan nörovasküler ünite (NVÜ) kavramı kullanılır. NVÜ, serebral kan akışının ve kan-beyin bariyeri fonksiyonunun düzenlenmesinde yer alan hücreler ve hücre dışı bileşenleri içerir(64). Nörovasküler ünitenin fonksiyonunun düzenlenmesi esas olarak mikrovasküler endotel hücreleri, astrositik son ayaklar ve bazal membrana gömülü perisitler tarafından sağlarken, kapiller bazal membran, mikrogial, nöronal hücreler ve bunlar arasındaki bağlantılar nörovasküler ünite (NVÜ) olarak adlandırılan yapıyı tamamlar(65,66).

2.2.1.1. Endotel Hücreleri:

Endotel hücreleri, kan damarlarının duvarlarını oluşturan modifiye skuamöz epitel hücreleridir. Bu hücreler mezoderm kökenlidir(67). Büyük arterlerin ve damarların çapı düzinelerce endotel hücrelerden oluşabiliyorken, en küçük kılcal damarın lümenini oluşturmak için tek bir endotel hücrenin kendi üzerine katlanması yeterlidir(68).

Kan beyin bariyerinin seçici geçirgen özelliğini sürdürmek için nörovasküler ünite içindeki endotel hücreleri, diğer hücrelerden farklı olarak; hücreler arasındaki metabolitlerin giriş ve çıkışını kontrol eden KBB'ye özgü taşıyıcı ve reseptör proteinler, bitişik hücreler arasındaki hareketi sınırlamak için yüksek elektriksel direnç sahip sıkı kavşaklar (TJ'ler), periferik endotel hücrelerine kıyasla düşük transsitotik vezikül seviyeleri ve moleküllerin hızlı

geçişine izin veren küçük gözenekler olan fenestraların yokluğu gibi özellikler ile diğer dokulardaki endotel hücrelerinden ayrılırlar(69,70).

MSS endotel hücrelerinde iki ana taşıyıcı grup vardır. İlki, lümen yüzeyine polarize olan ve lipofilik molekülleri kana doğru taşıyan dışa akış taşıyıcılarıdır(71–73). İkincisi ise belirli besin maddelerinin KBB üzerinden MSS'ye taşınmasını ve belirli atık ürünlerinin ise MSS'den kana taşınmasını kolaylaştıran spesifik besin taşıyıcılarıdır (74).

MSS endotelyal hücreleri diğer endotelyal hücrelere kıyasla daha yüksek miktarlarda mitokondri içerirler(75). Bu durum taşıma işlevlerindeki kritik iyon gradyanlarını korumak için gereken ATP'yi üretmek için olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, MSS'nin endotel hücreleri, moleküllerin fiziksel özelliklerini, reaktivitelerini, çözünürlüklerini ve taşınma özelliklerini değiştirerek moleküllerin geçişini düzenleyen bir metabolizmaya da sahip olduğu düşünülmektedir. Endotelyal hücreler, fiziksel bariyer özelliklerinin [sıkı bağlantı bölgeleri (TJ'ler), düşük transsitoz], moleküler bariyer özelliklerinin [efflux taşıyıcıları, spesifik metabolizma, düşük lökosit adezyon molekülleri (LAM'ler)] ve besinleri sağlamak için spesifik olan taşıyıcıların kombinasyonu ile MSS homeostazını sıkı bir şekilde düzenler.

2.2.1.2. Perisitler

Perisitler, mikrovasküler endotelyal tüpün ablumenal yüzeyinde bulunan ve bazal membrana gömülü olan hücrelerdir(76). İlk olarak 1870'lerde Eberth ve Rouget tarafından, kılcal damarların dışındaki bazal membranda gömülü halde bulunan yumru morfolojisine sahip uzamsal hücreler olarak karakterize edilmiştir(77)

Bu hücreler temel olarak yerel düzenleyici hücrelerdir. İnflamasyona, fizyolojik ve patolojik koşullarda vasküler stabiliteye ve anjiyogeneze katkıda bulunarak, hemostazın sürdürülmesinde görev alırlar. Beyinde perisitler, nörovasküler ünite hücreleri ile aktif iletişim halindedir ve stres uyaranlarına yanıt olarak düzenleyici ayarlamalar yaparlar(78). Bu hücreler nöronal aktivitedeki lokalize değişikliklere yanıt olarak beyindeki kan akımını değiştirmek için aktif olarak gevşeyebilir veya kasılabilirler (79,80). Kasılma yeteneklerine yol açan temel faktörler, alfa-düz kas aktini (α -SMA),

tropomiyosin ve miyozin dahil olmak üzere kasılma proteinleridir (81,82).

Serebral mikrovasküler yapının doğru gelişimi, nöronal fonksiyon için esastır ve perisitler, serebral mikrodolaşımın hem doğru gelişmesinde hem de sürdürülmesinde kritik bir rol oynarlar.

Bu hücreler endotel hücrelerinin çoğalmasını, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını düzenler. Yetişkin beyinde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve nörojenik lokus çentik homolog proteini (NOTCH) 3, TGF β ve anjiyopoyetin 1 (ANGPT1) salgılayarak anjiyogenezi teşvik ederler ve hücrel stabilizasyonu sağlarlar(83–88).

Perisitler ayrıca temas veya yakınlık gerektiren bir mekanizma yoluyla endotel hücrelerinin mitotik oranlarını, farklılaşmasını ve hücrelerin büyümelerinin baskılanması ile endotel hücre döngüsünü kontrol etmektedir. Ortak hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, perisitlerin tüm endotel hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir(86). Bu sonuçlar, perisitlerin endotel hücrelerinin büyümesini modüle edebildiğini göstermektedir.

Fizyolojik durumda, perisitler KBB'nin bütünlüğüne de katkıda bulunurlar. Bu hücreler sıkı bağlantı noktalarının bütünlüğünü düzenler ve endotel hücrelerinin hizalamasını korurlar. Perisit kaybı, endotel hücreleri arasında sıkı bağlantıların oluşumunun başarısızlığına neden olarak KBB geçirgenliğinde anormal bir artışa yol açar(89). Ayrıca veziküllerin endotel geçişinin düzenlenmesinde ve toksik maddelerin beyinden temizlenmesinde de katkı sağlarlar. Perisit eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalarda perisit kaybının, sekonder nörodejeneratif değişikliklere yol açan serum proteinlerin, vaskülotoksik moleküllerin ve nörotoksik maddelerin birikmesiyle bağlantılı olarak KBB'nin bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir(83,90) .

Perisitler, inflamasyonu ve bağışıklık hücrelerinin beyin parankimine geçişlerini de düzenlerler. Bunu TNF- α , CCL2, IFN- γ , IL-1 β ve IL-6 gibi proenflamatuar sitokinleri salgılayarak, lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu artırarak sağlarlar. Perisitler matriks metalloproteinaz ekspresyonu, reaktif oksijen radikalleri üretimi ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) sekresyonu ile KBB'nin bazal membranının bozulmasını ve sıkı bağlantı noktalarının yıkılmasını teşvik eder(91). Salgılanan bu immünmodülatör faktörler astrositler, mikrogliya ve endotel hücrelerinde proinflamatuvar durumu indüklerler ve nöronal ölüme neden olan apoptotik süreçlere neden olurlar(92–

94).

Perisitler, aynı zamanda anti-enflamatuar moleküller salgılayarak mikrogliaların anti-enflamatuar özellikler kazanmasına ve immün hücre infiltrasyonunda artışa neden olan moleküllerin ekspresyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar özellikler gösteren immün regülasyona da neden olurlar(95–97).

Beyindeki perisit hücreleri vücuttaki diğer perisit hücrelerinden farklı olarak hem nöral krest hem de mezoderm kökenlidir. Bildircin-civciv kimerizasyon tekniğini ile yapılan çalışmalarda ön beyin perisitlerinin nöral krest; beyin sapı, omurilik ve orta beyin perisitlerinin ise mezoderm kökenli olduğunu gösterilmiştir(98,99). Perisitlerin kök hücre benzeri özellikleri mevcut olup, NVÜ bileşenini oluşturan hücreleri yenileyebilmektedirler(100). İn vitro ve in vivo çalışmalar perisitlerin, uygun uyaranların olduğu ve iskemi/hipoksi gibi çevresel değişiklikler altında multipotansiyel kök hücre aktivitesi kazanarak NVÜ'nun ana bileşen hücrelerini oluşturduğunu göstermiştir(100–104).

2.2.1.3. Astrositler

Astrositler beyinde en çok bulunan hücre tipidir ve KBB'nin düzenlemesinin ötesinde sinaps oluşumunda, nörotransmitterlerin ve iyonların geri dönüşümünde, hücre dışı potasyum seviyelerinin düzenlenmesinde, nöronların beslenmesinde ve MSS içindeki inflamatuvar yanıtların kontrolünde rol oynayan ektodermal kökenli hücrelerdir(105). KBB işlevi üzerindeki etkileri, nörovasküler sistemin yaklaşık %99'unu kaplayan perivasküler uç ayaklardaki süreçler tarafından gerçekleştirilir(105)(105,106). Astrosit uç ayakları, astrositik terminallerde zenginleştirilmiş transmembran proteini olan disroglikan-distrofin kompleksi ile hücre dışı matris bileşeni olan agrini bağlar. Bu durum uç ayak hücre iskeletini bazal membranın abluminal tarafına bağlar(107,108). Astrosit uç ayaklarının polarizasyonunda ise iyon taşınma süreçlerinde rol oynayan intramembranöz parçacıkların ortogonal dizileri rol oynamaktadır. Agrin, MSS'deki su homeostazını düzenlemek için önemli olan aquaporin-4'ün birikimine ve bunların ortogonal parçacık dizileri organizasyonuna aracılık eder (109–111).

Glial içe düzeltici potasyum kanalı olan Kir4.1'in yüksek yoğunluğuyla birlikte, uç ayaklarda koordineli bir su ve K⁺ değişimi sağlanır. Bu durum

nöronal aktivitedeki değişikliklere yanıt olarak uzaysal K^+ tamponlaması için önemlidir(112–114).

Astrositler ve endotel hücrelerini fiziksel olarak bazal membran ayırmaktadır. Astrositler perisitlerin aksine endotelyal hücreler ile doğrudan temas kurmadığından, endotelyal bariyerin özelliklerindeki değişikliklere yalnızca çözünebilir faktörler ile aracılık ederler. Bununla birlikte, astrosit uç ayakları endotel hücrelerine yakındır ve in vivo çalışmalar bazal membranın, astrositler tarafından salınan faktörlerin iletilmesinde aracı görevi görebildiğini göstermiştir.

Endotel hücrelerinin astrositlerle birlikte kültürlendiği in vitro çalışmalarda, astrositlerin endotel hücrelerinde sıkı bağlantıları, taşıyıcıları ve metabolik enzimleri artırdığı ve bu sayede KBB fenotipinin geliştiğini göstermiştir(115–117). Fakat astrositlerin tek başlarına endotel hücrelerinde bariyer özelliklerini indükleyip indüklemedikleri veya fonksiyonel bariyeri indükleyen ek hücrelerin olup olmadığı hala açık değildir. Bununla birlikte, gelişim sırasında astrositler farklılaşmadan önce kan beyin bariyeri oluştuğundan astrositlerin bariyer oluşumuna katkısı olası değildir(118). Aksine, astrositler bariyer bakımı için önemlidir.

Astrositler, KBB olgunlaştığı embriyonik gelişimin geç aşamalarından başlayarak, anjiyopoietin-1, apolipoprotein E, insülin benzeri büyüme faktörü, retinoik asit, anjiyotensin II ve Hedgehog (Hh) sinyal yolağı ile sıkı bağlantı proteinlerinin artışı ve serebrovasküler bütünlüğün korunmasını sağlar(119,120). Astrositler tarafından salgılanan lamininler de KBB bütünlüğünü korumaktadır. Astrositik laminin kaybı, astrositlerde aquaporin-4 (AQP4) ve sıkı bağlantı proteini ekspresyonunu azaltır. Ek olarak astrositik lamininin integrin $\alpha 2$ reseptörü, fonksiyonel bloke edici antikör ve RNAi kullanarak inaktive edildiği zaman, kan beyin bariyerinde perisit farklılaşmasının inhibe olduğu ve bunun da sızdıran bir bariyerle sonuçlandığını göstermiştir(121). KBB gelişimi sırasında glial hücrelerle beyin endotel hücre iletişimini araştırmada ise nöronal Reelin'in endotel hücrelerinde Dab1'i aktive ettiğini ve bunun da endotel hücrelerinin laminin a4'ü hücre dışı matrise bırakmasına neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışma Dab1 ile aktive olan endotel hücrelerinin, bariyeri kapatmak için glial hücrelerle laminin a4 yoluyla iletişim kurduğu sonucuna varmıştır (122). Dab1 nakavt farelerde ise beyin kılcal damarlarda bariyer sızıntısı ve astrosit uç

ayaklarda azalma olduğu görülmüştür.

Astrositler, enflamatuar koşullar altında da KBB'nin endotel hücreleri için destekleyici bir rol üstlenmektedir. Hedgehog yolu, endotel hücrelerinde kemokinlerin ve lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak anti-enflamatuar etki gösterir (120). Ayrıca, sfingosin-1 fosfat reseptör uyarımı ile salınan astrositik retinoik asit ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, lökosit göçünü azaltarak KBB endotel hücrelerinde antienflamatuar etkinlik sağlamaktadır(123–125).

Pial mikrovasküler sistemi ise astrosit uç ayakları ile yakın bir ilişkiden yoksundur, ancak yine de bazı KBB özelliklerini sergilemektedir (122)(126). Bu durum, KBB endotel hücrelerinin selfintrinsik bariyer özelliklerini vurgulamaktadır. Öte yandan, endotel hücrelerinin KBB fenotip özelliklerini arttırmada glia limitans tarafından üretilen çözünür faktörlerin rolü önemlidir.

2.2.1.4. Bazal Membran

Nörovasküler ünitenin aselüler üyesi olan bazal membran, karmaşık bir ekstrasellüler matriksten oluşan KBB'nin oldukça dinamik bir bileşenidir. Ekstrasellüler matriks molekülleri endotel hücreleri, astrositler ve perisitler tarafından üretilir. Bazal membran, yapısal olarak nörovasküler ünite hücreleri için destek sağlayan hücre dışı matristir ve bu hücreler arasındaki arası iletişim ve sinyal yolları için düzenleyici bir merkezdir. Bazal membranın ana bileşenleri, fibronektin, agrin, osteonektin ve glikozaminoglikanlarla desteklenen kollajen tip IV, laminin, nidogen ve perlecan'dır(126). Hepsi, nörovasküler ünite hücreleri tarafından eksprese edilen ilgili transmembran reseptörleri olan distroglikan veya integrinler için ligand görevi görür(127). Bu reseptörler ekstrasellüler matriksi hücre iskeletine bağlar ve hücre-matriks etkileşimlerini sağlarlar. Ekstrasellüler matriks içindeki ligandlar, hücre göçünü, proliferasyonu ve hücre sağkalımını düzenleyen sinyal kaskadlarını tetiklemek için bu reseptörlerine bağlanır ve bu da bariyer fonksiyonunu düzenler.

İntegrinler, α ve β alt birimlerden oluşan ligand bağlayıcı membran proteinleridir. α_v alt birimi, anjiyogenezisteki rolü nedeniyle alandaki en iyi çalışılmış integrin alt birimlerinden biridir. Bu alt birimin nöronlardan ve gliadan silinmesi farelerde serebral kanamalara neden olmaktadır(128). Ayrıca, çalışmalar α_v integrinlerin, TGF- β aktivasyonu yoluyla beyin

vaskülarizasyonunu düzenlediğini de göstermiştir. Ayrıca, bariyer özelliklerini modüle eden Wnt sinyalizasyonunu da düzenlediği ile ilgili kanıtlar mevcuttur. (129). Endotel hücrelerinde integrin $\beta 1$ 'in silinmesi ise VE-kadherin sinyalizasyonunu bozar, bu da sızdıran bir bariyerle sonuçlanan sıkı bağlantıların organizasyonunun bozulmasına neden olmaktadır(130).

Bazal membran kemokinleri, endotelin luminal yüzü üzerinde oligomerize olur ve yüksek lokal konsantrasyonlarda birikirler. Bu kemokinler, hücreleri aktive etmek ve yönlendirmek için konumlandırılmışlardır(131).

Bazal membran, endotel hücrelerinde bileşke proteinlerinin yeniden dağılımına ve taşıyıcıların ekspresyonuna aracılık eder, böylece maddelerin değişim yönü kontrol edilir. Örneğin, $\beta 1$ integrinin endotelial olarak silinmesi, endotelial hücreler ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşim ortadan kaldırır ve interendotelial bileşenler olan VE-cadherin, CD31 ve CD99'un önemli ölçüde yanlış konumlandırılmasına neden olur (130,132,133). Bazal membran astrosit ayak uçlarında ortogonal parçacık dizileri oluşturmak, su ve K^+ homeostazını sağlamak için gerekli ekstrasellüler matriks bileşeni olan agrinin de astrositlerle etkileşmesini sağlar (107,110).

Perisitler, bazal membrana tamamen gömülüdür ve bu perisitlerin matriks bileşenlerine sürekli olarak maruz kalmalarını sağlar. Bu da perisitlerin daha fazla farklılaşma yeteneklerinin baskılanmasından sorumlu olmaktadır (78). Ayrıca bazal membranda astrosit türevi laminin kaybı, perisitlerin KBB'nin destekleyici bir dinlenme durumundan, destabilize edici bir fenotipe dönüşmesinde tetikleyici rol oynamaktadır(121).

Postkapiller venül seviyesinde ise göç eden immün hücrelerin kaderinde önemli bir role sahiptir. Serebrovasküler ağacın bu alanlarında, iki ayrı bazal membranla sınırlanan bir perivasküler boşluk mevcuttur. Vasküler BM, endotelial hücreleri ve perisitler tarafından salgılanan hücre dışı bir matristir, parankimal BM ise esas olarak vasküler sisteme uzanan astrositik uzantılar tarafından salgılanır. Vasküler ve parankimal BM'ler farklı bileşimlere sahiptir, örneğin vasküler BM laminin $\alpha 4$ ve $\alpha 5$ içerirken, parankimal BM laminin $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ içerir(134). Lamininlerin izoformların dengesi damar oluşumunda, bariyer oluşumunda ve beyne lökosit infiltrasyonunun düzenlenmesinde önemlidir(135–137). T hücreleri ekstraselüler edildikten sonra perivasküler boşlukta sıkışır ve T hücrelerinin nöral dokuya ilerlemesine izin vermek için lokal antijen sunan

makrofajlar tarafından reaktivasyonu gerekir. Burada önemli bir rol, ekstrasellüler matriks substratlarını sindirebilen ve bazal membran bütünlüğünü azaltan matris metalloproteinazlar (MMP'ler) tarafından oynanmaktadır(138). İskemik inme, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi koşullarda MMP-2 ve MMP9 gibi spesifik matriks metalloproteinazların artmış olarak saptanır. Bu gibi hastalık koşullarında bazı MMP'lerin artışı ve buna bağlı bazal membranın parçalanması ile hastalığa neden olabileceği düşünülmektedir(139).

2.2.1.5. Nöronlar

KBB'nin ana görevi, nöronlar için ideal bir çalışma ortamı sağlamaktır. Bu nedenle, bariyer işlevi ve işlev bozukluğunun nöronal ağ üzerinde önemli bir etkisi olduğundan, nöronlar NVÜ'nün ayrılmaz bir parçası olarak düşünülmelidir. Nöronal-vasküler çapraz iletişiminin insan beyinde hemen hemen her nöronun kendi kılcal damarına sahip olduğu düşüncesi nedeniyle önemlidir. Bununla birlikte, bu yalnızca sayısal bir tahmindir, çünkü bir kılcal damar birbirine yakın birkaç nöronu etkileyebilir. Bir kılcal damarda kan akışı tıkanığında, aynı anda birkaç nöron hasar görür.

Nöronların enerji talepleri değiştiğinde, serebral vasküler yapılara sinyal verebilmesi gerekir. Nörovasküler eşleşme olarak bilinen bir süreç olan KBB boyunca substrat dağıtımının ayarlanmasıyla birlikte serebral kan akışını düzenlemek için pozitif ve negatif geri bildirim mekanizmaları mevcuttur(59). Nörovasküler eşleşme için bir diğer mekanizma ise serotonerjik, noradrenerjik, kolinerjik ve GABAerjik nöronlar tarafından astrositik süreçlerin veya endotelial tüpün doğrudan innervasyonudur(140). Örneğin, KBB'nin endotelial hücreleri ile yakın temas halinde olduğu gösterilen adrenerjik nöronların elektrikle uyarılmasından sonra, KBB boyunca artan, çözünen taşıma hızı gözlenmiştir(141). Nöronlar ayrıca astrositler veya perisitler aracılığıyla da serebrovasküler sisteme dolaylı olarak sinyal verebilir. Örneğin, in vitro nöronal aktivasyonu, astrositleri histamin ve ATP salgılaması için uyarır. Bu da, artan GLUT-1 aktivitesine ve sonunda endotel boyunca daha fazla glikoz iletimine yol açar (142). Nörotransmitter olan glutamat nöronal aktivite üzerinde etki göstermesi, perisitlerin gevşemesine neden olur ve bu da beyinde kan akışını mevcut ihtiyaçlara göre düzenler(79). Nöronların özellikle KBB bütünlüğü üzerindeki doğrudan etkileri açıklayan nörovasküler bağlantı mekanizmaları

henüz netleştirilememiştir.

2.2.1.6. Mikroglialar

Mikroglialar, MSS'deki doğal immün sistemin ilk savunma hattını oluşturan hücrelerindendir. Kökenleri ve işlevleri ile beyindeki diğer fagositlerden ayrı bir miyeloid hücre popülasyonunu temsil eder. Meninkslerde, koroid pleksusta ve perivasküler boşlukta bulunan makrofajlarının aksine, mikroglialar yolk kesesinden köken alan ve embriyogenez sırasında beyin vaskülarizasyonu gerçekleşmeden önce MSS'ye göç eden parankimal immün hücreleridir(143)(144). Embriyonik gelişimde beyin vaskülarizasyonu başladığında, mikroglialar endotel hücrelerinin füzyonunu teşvik eder ve karmaşık vasküler ağlar oluşturmaya yardımcı olurlar(145).

Mikroglialar, potansiyel olarak bozulmuş bir iyonik denge, hasarlı hücreler veya enfeksiyöz ajanlar gibi herhangi bir patolojik değişiklikler açısından çevredeki nöral dokuyu sürekli olarak örneklerler. Mikroglia reaksiyonunun nörodejeneratif mi yoksa nöroprotektif etkilere mi aracılık ettiği belirsizdir. KBB söz konusu olduğunda, mikroglia, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve interleukin-1 α /1 β , IL-6 ve tümör nekroz faktör- α gibi sitokinlerin salınmasıyla endotel hücrelerini aktive eder(146). Ayrıca enflamatuvar koşullar altında periferik bağışıklık hücrelerinin toplanması sağlayan kemokin olan CCL2'nin salgılanması sağlar(147).

Epileptogenezde görülen aşırı artan ve/veya ektopik birleşen yenidoğan nöronlar, tekrarlayan uyarıcı ağlar oluşmasına yol açar. Mikroglialar, epileptojenik süreçleri önlemek için SE'den sonra oluşan ektopik yenidoğan nöronal hücreleri fagosit eder. Bu sayede nöronal homeostazın sağlanmasına katkı sağlar(148).

2.2.1.7. Perivasküler Makrofajlar

Perivasküler makrofajlar, postkapiller venüllerin ablumenal tarafında bulunan monosit kökenli hücreler olup, içi sıvı dolu perivasküler boşluk olan Virchow–Robin aralığında yaygın olarak bulunurlar(149). İmmün hücre infiltrasyonu esas olarak postkapiller venüller seviyesinde gözlemlendiğinden, perivasküler makrofajlar immün sistemin MSS'ye açılan kapısında bulunur. Bu durum nöroinflamatuvar hastalıklarda da önemli olan bağışıklık hücresinin beyin

parankimine girişini düzenlemelerine yardımcı olur.

Perivasküler makrofajlar, sağlıklı koşullar altında düşük seviyelerde majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerini eksprese eden kan kaynaklı fagositlerdir. Enflamasyon, bu hücrelerin perivasküler boşlukta birikmesine yol açar ve MHC sınıf II ekspresyonunu ile yardımcı uyarıcı moleküllerin artışına neden olur(150). Böylece makrofajlar antijen sunan hücreler olarak işlev görürler ve perivasküler boşluğa ulaşan lenfositleri yeniden aktive edebilirler (151). Bu yolla, perivasküler makrofajlar lenfositlerin KBB'yi aşip nöral dokuya ilerlemesine izin verilip verilmeyeceğine karar verir.

2.2.1.8. Periferik Bağışıklık Hücreleri

Kanda dolaşan bağışıklık hücreleri, sürekli KBB ile ilişkili olmadıkları için NVÜ'nün tüm üyeleri arasında istisnai bir konuma sahiptir. Sağlıklı bir durumda KBB endoteli lökositlerle adeziv etkileşimleri desteklemez ve ekstrasvazasyon meydana gelmez. Enflamasyon sırasında endotel hücreleri, kan akışındaki inflamatuvar faktörler tarafından "dıştan" veya NVÜ'nün bileşenleri inflamatuvar mediatörler saldıgında "içten" aktive olur. Bu durum bağlantı bütünlüğünün kısmi kaybına ve vasküler geçirgenlikte bir artışın yanı sıra, endotelyal aktivasyon çevreden bağışıklık hücrelerini almak için hücre adezyon moleküllerinin yukarı regülasyonuna ve hücrel infiltrasyonu destekleyen sitokinler ile kemokinlerin salınımına yol açar(150,152). Bu durumda diapedez, yalnızca iltihaplanma sırasında sıkı bağlantıları muhtemel zayıflamış olan bitişik endotel hücreleri arasında paraselüler olarak değil, aynı zamanda endotel hücre gövdesi boyunca transselüler olarak da meydana gelir(153).

2.2.1.9. Sıkı Bağlantılar

Bariyer özelliklerinden sorumlu ana yapılar, sıkı bağlantılardır. Bariyerin oluşturulmasından sorumlu hücreler, kan-beyin bariyeri için kılcal damar endotel hücreleriyken, kan-beyin omurilik sıvısı bariyeri için epitel (glial) hücrelerdir(154,155). KBB hücreler arası bağlantıların oluşumunda ve korunmasında rol oynayan çeşitli proteinler tanımlanmıştır.

KBB'nin TJ'leri, beyin kılcal damarlarının endotel hücreleri arasında bulunur. TJ'lerde iki ana protein sınıfı vardır: i) okludin, claudinler ve birleşme adezyon molekülleri (JAM'ler) olmak üzere transmembran proteinler; ii) zonula

occludens ailesi, AF6/afadin, multi-PDZ alan protein 1 (MUPP1), membranla ilişkili guanilat kinaz (MAGI)-1, -2 ve -3, PAR-3 ve -6 ve heterotrimerik G-proteinleri(156) gibi periferel proteinleridir. Aderan kavşaklarda da kaderinler ve β -katenin tespit edilmiştir(157)

MSS endotel hücreleri, moleküllere ve iyonlara karşı yüksek dirençli bir parselüler bariyer oluşturan, luminal ve abluminal kompartmanları birbirine bağlayan sıkı bağlantılar (Tj) tarafından bir arada tutulurlar. Bu bağlantıların gücü, bulundukları dokuya bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. Hücre kültüründe yapılan çalışmalar, 4 nm'ye kadar yüksüz moleküllere karşı boyut seçici bir geçirgenliğe sahip olduğu, büyük moleküllere ise düşük geçirgenliğe sahip olduklarını göstermektedir(158). Bu, TJ'lerin 4 nm'lik bir gözenek oluşturduğunu ve daha büyük moleküllerin ise bu bağlantılardaki devamsızlıklardan geçtiğini göstermektedir.

Claudinler, parselüler bariyer oluşumu için gerekli olan önemli bir ana bağlantı elemanıdır(159). Claudinlerle yapılan çalışmalar, claudinlerin hücresel bağlantı içindeki gözenegin boyutunu ve yük seçiciliğini tanımladığını, böylece belirli bir hücre içindeki claudinlerin bileşiminin parselüler bariyerin geçirgenliğini belirleyebileceğini göstermiştir(160).

Claudinler, memelilerde 27 farklı üyeden oluşan bir sınıftır. Farklı claudin ailesi üyeleri, farklı dokularda farklı epitel bariyerleri tarafından eksprese edilir(161). Bazı claudin üyeleri farklı dokuların epitelyal bariyerleri için spesifiktir. Örneğin; cldn 1 epidermal bariyer, cldn 16 böbrek epiteli, cldn11 MSS miyelini, cldn 12 karaciğer, cldn 9 pankreas, cldn 19 periferik sinirin miyelini için spesifiktir(162–164)

Yapısal olarak, claudinler, kısa bir amino (N)-terminal sekansı ve uzun bir karboksil (C)-terminal sekansından oluşan iki hücre dışı döngü (ECL'ler) ve iki sitoplazmik alana sahip tetraspan proteinleridir. Claudinlerin ECL'leri, aynı zar üzerindeki komşu claudinlerle (cis-etkileşim) ve/veya bitişik hücredekilerdeki claudinlerle (trans-etkileşim) yoluyla, homo- veya heterodimerizasyon veya oligomerizasyon sağlar(165–168). Bu durum TJ omurgasının oluşumunu sağlar. ECL'ler ayrıca claudinlerin yük ve boyut seçiciliğini belirlemekten de sorumludur. Claudinlerin C-terminali ise, claudin ailesinin üyeleri arasında büyük bir çeşitlilik sergiler ve claudin-12 hariç çoğu claudin bir PDZ bağlama motifi ile biter(169). TJ'deki PDZ'ye bağlı etkileşimler, TJ

proteinlerinin organizasyonunda ve modülasyonunda önemli bir rol oynar. Çoğu claudinin C-terminal kuyruğundaki PDZ alanı, sitoplazmik proteinleri (özellikle zonula okludens proteinlerini) toplar. Ek olarak, bir claudin molekülünün C-terminali üzerindeki PDZ alanları, okludin ve JAM'ler dahil diğer transmembran TJ proteinleri ile etkileşimlerini artırır. Claudinlerin C-terminal alanı birden fazla serin, treonin ve tirozin kalıntısı içerir, bu da C-terminalinin çoklu fosforilasyon bölgelerine sahip olmasını sağlar. Claudin fosforilasyonunun düzenleyici rolü beyin mikrovasküler endotelinde henüz doğrudan incelenmemiş olsa da, diğer epitelyal ve endotelyal dokulardaki çalışmalar protein-protein etkileşimlerinin modülasyonunda, protein dönüşüm mekanizmalarında rol aldığını düşündürmektedir(170).

Günümüzde Cldn'lerin dokuya özgü parasellüler kanallar oluşturma yeteneklerine veya iyon ve küçük molekül geçirgenliğine göre sınıflandırılması yönünde fikir birliği vardır. Spesifik olarak, Cldn2, Cldn10b, Cldn15, Cldn21 katyon seçici gözenekler oluştururken, Cldn10a ve Cldn17 anyonların nüfuz etmesine izin verdiği bilinmektedir. Buna karşılık, Cldn1, Cldn5, Cldn11 ve Cldn14 gibi Cldn'ler için de bariyer fonksiyonu gösterilmiştir. Cldn3, Cldn8 ve Cldn19 parasellüler boşlukların sıkılaştırılmasında rol aldığı gösterilmiştir, ancak bu claudinler, Cldn16 ile heterotopik ilişkili olduğunda ise iki değerli katyonlara karşı seçici bir geçirgenlik sağlamaktadır(171).

Claudin-5, KBB'de baskın TJ proteini olarak kabul edilmektedir(172). Ayrıca claudin-5'in MSS endotel hücreleri tarafından yüksek oranda eksprese edildiği KBB devamlılığı için önemli olduğu gösterilmiştir. Claudin-5'ten yoksun farelerde KBB morfolojik olarak normal TJ'lerle sonuçlanır, ancak bu durum muhtemel bariyer fonksiyonundaki bozukluğa bağlı olarak erken neonatal ölüme yol açar. KBB normalde 400 Da'dan düşük moleküllere karşı geçirgenken, claudin-5 nakavt farelerin beyin mikro damar sisteminin 800 Da'dan daha düşük moleküllere karşı oldukça geçirgen olduğu tespit edilmiştir(173). Buna karşılık, beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde claudin-5'in aşırı ekspresyonu, yüksek parasellüler sıklığa neden olur, bu da claudin-5'in ekspresyon seviyelerinin doğrudan TJ fonksiyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir(173). Ayrıca nöroinflamasyon sırasında beyinde claudin-5 pozitif lökositlerin tespit edilmesi inflamasyon sırasındaki normal beyin fonksiyonlarının korunmasında claudin-5'in de etkili olduğunu

göstermektedir(174). Ek olarak Claudin-11 miyelin kılıf zarı boyunca magnezyum iyonunun geçirgenliğini düzenlemektedir. Bu durum nörotransmitter salınımı için önemlidir. Diğer Cldn üyeleri için, fizyolojik özellikler tam olarak belirlenmemiştir

Oklüdin, epitel hücreleri ve MSS endotel hücreleri tarafından eksprese edilen bir tetraspanindir. Okludin, TJ'lerin oluşumu için gerekli değildir(175), fakat oklüdinin homotipik etkileşimlerini bozan in vitro kültür deneyleri, bariyer özellikleri oluşturmaktan ziyade epitelyal farklılaşma ve TJ düzeneğinin ve enflamasyon gibi vasküler dinamiklerdeki akut değişikliklerde, endotel zar boyunca artan transepitelyal elektrik direnci ve azalan paraselüler geçirgenlik gibi TJ yanıtlarına aracılık ederek(176), Tj fonksiyonlarının bir düzenleyicisi olarak bariyer direncinde önemli olduğunu göstermiştir(177–179). Okludin, nöral olmayan dokulardaki endotel hücrelere kıyasla MSS endotel hücrelerinde oldukça zengindir, bu da bariyerin önemli bir bileşeni olduğunu gösterir(58).

Okludin, kısa bir N-terminal alanı, uzun bir C-terminal alanı ve hücre içi kısa bir dönüş dahil olmak üzere üç sitoplazmik alan, bir tetraspanning marvel alanı ve iki ECL alanı içerir. Oklüdinlerin karboksi-terminal kısmı, çeşitli kinazlar, fosfatazlar ve connexin-26 gibi düzenleyici proteinlerle etkileşime girer (180–183). Ayrıca karboksi-terminal kısım, aynı zamanda aktini hücre iskeletine bağlayan ve onu da hücre zarına lokalize eden zonula oklüdenslere (ZO-1, ZO-2 ve ZO-3) bağlanır(183). Okludin'in N-terminal alanı, transepitelyal direnç ve paraselüler geçirgenlikten bağımsız olarak nötrofillerin transepitelyal göçünü düzenler(81)

Okludinin lateral homodimerizasyonu veya oligomerizasyonuna tetraspanning marvel alanı, sitoplazmik C-terminali ve ECL2 aracılık eder. Oklüdinin oligomerizasyonu redoksa duyarlı olup, TJ düzeneğinin redoks bağımlılığına katkıda bulunur. Normal koşullarda bu redoks duyarlı etkileşim oklüdinin oligomerizasyonunu destekler ve TJ bariyer fonksiyonuna katkıda bulunurken, hipoksi-reoksijenasyon veya inflamasyon ile ilişkili oksidatif stres durumunda ise oklüdin oligomerik yapılarının bozulmasına ve buna bağlı TJ bozulması ile paraselüler geçirgenlikte artışla karakterize olan KBB işlev bozukluğuna yol açtığını göstermiştir(184,185).

Ek olarak okludin eksikliği olan farelerde MSS kalsifikasyonu saptanmıştır. Bu da okludinin KBB boyunca kalsiyum akışını düzenlediğini

düşündürmektedir(175).

Bağlantı adezyon molekülleri (JAM'ler), epitel ve endotel hücrelerdeki sıkı bağlantılarda, homotipik etkileşimler oluşturan immünoglobulin süper ailesi üyeleridir. JAM, N terminalli bir ekstrasellüler domain ve kısa bir sitoplazmik C terminalinden oluşurlar. Sitoplazmik C terminalindeki bir PDZ motifi, ZO-1 ve cingulin gibi yapı iskeleti proteinleri ile etkileşime girer. Ayrıca JAM'ler hem JAM ailesi üyeleriyle ve hemde karşıt endotel hücrelerinin üzerindeki adezyon molekülleriyle de etkileşime girerler. JAM proteinleri, hücre polaritesini korumak ve ZO-1 ile okludin'i hücreye temas ettiği noktalarda desteklemek için önemlidir(186). JAM'lerin, hücre-hücre temasının erken evrelerinde TJ oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. JAM, okludin ve claudinlerin olmadığı hücre yapışmasının erken aşamalarında, E-cadherin ve ZO-1 ile nokta benzeri hücre çıkıntılarında kolokelize olur ve TJ oluşumuna katılır (187).

Sekans homolojisine dayalı olarak JAM ailesi, JAM-A (JAM-1), JAM-B (JAM-2) ve JAM-C (JAM-3) olmak üzere üç üye içeren iki alt aileden oluşur. Üyelerin daha düşük bir polipeptit dizisi benzerliğine sahip olduğu başka bir alt aile ise CAR, JAM-D (JAM-4) ve JAM-like (JAM-L) içerir. JAM'ler, topolojik olarak claudinlerden ve okludinden farklıdır, çünkü her JAM molekülü yalnızca bir hücre dışı alana, tek bir transmembran bölgeye ve farklı izoformlar arasında uzunluğu değişen bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir(188).

JAM, epitelde sıkı bağlantı düzeneğinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu etkiler, okludin ile doğrudan veya dolaylı etkileşimler yoluyla ortaya çıkabilmektedir. Ca^{+2} tükenmesi-yenilenmesi deneyleri sırasında JAM'a karşı antikorlar epitelyal hücrelere eklendiğinde, birleşme bütünlüğünün geri kazanılmasının baskılandığı ve JAM ile okludin'in yeniden dağılımının bozulduğu gösterilmiştir(189).

JAM-1'in olgun KBB'deki kesin rolü tam olarak anlaşılamamış olsa da, lökositlerin transendotel göçünde de rol oynadığı öne sürülmektedir (190) İnsan çalışmalarından JAM-C'nin mutasyonunun intraserebral kanamalar, subependimal kalsifikasyon ve konjenital katarakt ile sonuçlandığı bildirilmiştir(191). JAM4 ise farelerin kan beyin bariyerinde tanımlanmıştır(192).

TJ'lerin genellikle hücreleri çevreleyerek bitişik hücreler arasındaki boşluğu kapatarak bariyer olarak çalıştığı düşünülmektedir (iki hücreli TJ'ler).

Bununla birlikte, üç hücrenin birleştirilmesiyle oluşan ve trisellüler TJ'ler (tTJ'ler) olarak adlandırılan özel yapılar tanımlamıştır. Bu bağlantılar üç hücreli temaslardaki dar hücre dışı alanda bariyer fonksiyonu sağlayarak hücreler arası boşluğun sızdırmazlığı sağlar. Bu üç hücreli bağlantı kompleksleri triselülün ve lipoliz ile uyarılan reseptörden (LSR) ile oluşur(193).

Transmembran adhezyon kompleksleri, ZO-1, ZO-2, Cingulin, Jacop, MAGI'ler ve MPP'ler gibi bir dizi sitoplazmik adaptör aracılığıyla hücrenin yapı iskeletine bağlanırlar. Ek olarak, TJ'ler, endotel hücreleri birbirine bağlayan ve vasküler endotelyal (VE)-kadherin ve trombosit endotelyal hücre adezyon molekülü (PECAM)1'den oluşan ve hücre iskeletine kateninlerle bağlanan bazal adhezyon bağlantıları ile etkileşime girerler. İlginç bir şekilde, cldn5, cldn12, ZO-1 ve ZO2 dahil olmak üzere tanımlanan TJ proteinlerinin çoğu, tüm dokularda endotelyal hücreler tarafından eksprese ediliyor gibi görünmektedir. MSS'nin endotel hücreleri ile periferik endotel hücrelerini karşılaştıran transkripsiyonel bir analizde, jacop ve MPP7'nin yanı sıra üç hücreli TJ molekülleri olan marveld2 (trisellülün) ve LSR'nin periferik kıyasla KBB'de zenginleştiğini göstermektedir. Bu durum, moleküllerin bariyer oluşumunda kritik olabileceğini düşündürmektedir(58).

2.2.2. Kan Beyin Bariyerinde Taşınım

MSS epitelyal hücreleri, farklı lümenal ve ablumenal bölmelere sahip oldukça polarize hücrelerdir. Parasellüler bağlantıların düşük geçirgenliği, hücrelerin, kan ve beyin arasındaki iyonlar ve moleküllerin hareketini kontrol etmesine izin verir. İyon ve moleküllerin MSS'ye taşınımı parasellüler ve transsellüler yollar ile sağlanır. Bu benzersiz yapı monoklonal antikorlar (mAbs), rekombinant proteinler, antisens veya gen terapötikleri dahil büyük moleküllü nöroterapötiklerin tamamının ve kuraldan ziyade istisna olan küçük molekül ağırlıklı nöroterapötiklerinde % 98'inin KBB'yi geçememesine neden olur(194).

2.2.2.1. Parasellüler Yolak İle Taşınım

Parasellüler yolak ile taşınım, serebral kan damarları boyunca konumlanan bitişik endotelyal hücreler arasındaki bağlantılarla molekül transferi

sağlar. Sıkı bağlantı yoluyla olan parasellüler taşınma, hücre zarı boyunca olan transsellüler taşımadan önemli farkları vardır. İlk olarak, bu taşınma sadece pasiftir, hücreler arası taşıma ile üretilen elektroozmotik gradyanlar tarafından düzenlenir. İkincisi hem mukozal hem de serozal yönlerde aynı seçiciliği ve iletkenliği gösterir. Üçüncüsü ise akut fizyolojik düzenleme potansiyeli hücre içi taşınım için yüksek düzeydeyken, parasellüler taşınımın potansiyeli hakkında tartışmalar devam etmektedir(195).

Parasellüler yolakta yük transferini sınırlayan sıkı bağlantı proteinlerinin varlığı nedeniyle küçük çözünen maddeler, iyonlar ve lipitte çözünen moleküller dışındaki tüm moleküllere geçirimsizdir. Bununla birlikte moleküler ağırlıkları 400 Da'dan az olan birçok lipitte çözünür molekül, endotelin lipit zarlarından difüzyon yoluyla KBB'yi geçebilmektedir(75)(186). Bir çözünen maddenin MSS'ye girme hızı ile lipit çözünürlüğü arasında genel bir korelasyon vardır ve genellikle pH 7.4'te logD oktanol/tampon bölünme katsayısı olarak belirlenir(196). Yaygın olarak nötr olan bir maddenin parçalara ayrılmasına atıfta bulunan logP'nin aksine, logD, çözeltide bulunan nötr ve iyonize türleri içerir(197). Sıvı bir fazdan hücre zarının lipit membranına geçişini kısıtlayan diğer faktörlerse polar yüzey alanının (PSA) 80 Å²'den büyük olması ve 6'dan fazla hidrojen bağı oluşturma eğilimidir(196).

Plazma proteinlerine yüksek bağlanma ve düşük ayrılma afinitesi de moleküllerin MSS'ye penetrasyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır. KBB penetrasyonu göz önüne alındığında pozitif yük taşıyan bazlar, asitlere göre avantaja sahiptir. Bu moleküllerin hücre içerisine girişlerini kolaylaştıran faktörler, moleküllerin katyonik doğası ve hücre zarının dış yüzeyinin negatif yüklü glikokaliks ve fosfolipid gruplarının bulunmasıdır. Kan gazları olan oksijen ve karbondioksitin KBB boyunca hareketi dağınıktır. Genel olarak çözülmüş gazlar konsantrasyon gradyanlarında düşük oldukları tarafa doğru hareket ederler. Beyne oksijen sağlanması ve karbondioksitin uzaklaştırılması serebral kan akışı fizyolojik sınırlar içinde kaldığı sürece yeterlidir. Negatif yüklü bikarbonat iyonu ise KBB boyunca çok düşük bir pasif geçirgenliğe sahiptir(69).

Bununla birlikte, bu moleküler ve fiziko-kimyasal faktörler her zaman MSS penetrasyonu ve aktivitesi için mutlak bir gösterge değildir. Klinik kullanımda KBB penetrasyonu için bu genel kurallara uymayan birçok örnek

vardır(198).

2.2.2.2. Transsellüler Yolak ile Taşıma

Transsellüler yol, proteinlerin, peptitlerin, amino asitlerin, iyonların ve karbonhidratların beyne taşınması için baskın yoldur. Ek olarak, transferrin reseptörü gibi beyin endotel hücrelerinin apikal yüzeyinde eksprese edilen çeşitli reseptörlerin moleküler bileşiminden yararlanılarak KBB boyunca çeşitli terapötik ilaçlar iletilebilmiştir. Transsellüler taşınımında çözünür taşıyıcılar(SLC'ler), ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları ve veziküler taşıyıcılar görev almaktadır.

2.2.2.2.1. Çözünür Taşıyıcılar (SLC'ler)

Paraselüler difüzyon bariyeri, beyni glikoz ve amino asitler gibi birçok temel polar besin maddesinden izole eder. Bu nedenle KBB'yi oluşturan endotel hücreleri, MSS'ye bu çeşitli çözünür madde ve besinleri taşımak için spesifik çözünür taşıyıcılar olan SLC'leri eksprese eder. Çoğu polar molekül, hücre zarlarından geçemez ve bu nedenle hücreler, hemostazı sağlamak için hücre zarında çok sayıda SLC eksprese eder(197).

Bazı taşıma proteinleri ekspresyonlarında polarizedir ve yalnızca luminal veya abluminal membrana yerleştirilirler, genel olarak taşıma proteinleri ise endotel hücrelerinin her iki membranına yerleştirilir. Bu taşıyıcıların endotel hücresindeki oryantasyonu, çevredeki substratların nakil yönünün kandan beyne veya beyinden kana olmasını sağlar. Lateral hücre zarlarındaki sıkı bağlantıların başka bir işlevi de zarda bir 'çit' görevi görmektir. Bu taşıma proteinlerinin ve lipid yığınlarının serbest hareketini önler ve böylece bariyerin polaritesini korur(69).

Genel olarak besin taşıyıcıları, belirli besinlerin düşük konsantrasyon gradyanına hareketini kolaylaştırır. MSS'nin epitelyal hücrelerinde, endotelin oluşturduğu fiziksel bariyeri aşmak için çeşitli besin taşıyıcıları eksprese edilir. Bunların çoğu, SLC2a1 (glikoz), SLC16a1 (laktat, piruvat), SLC7a1 (katyonik amino asitler) ve SLC7a5 (nötr amino asitler, L -DOPA) dahil olmak üzere kolaylaştırılmış taşıyıcıların çözünür taşıyıcı sınıfına aittir(59). GLUT1 olarak da adlandırılan SLC2a1, MSS'ye glikoz sağlamaadaki rolü nedeniyle sık

incelenmiştir. GLUT1 kandan beyne konsantrasyon gradyanında glikozun taşınmasını kolaylaştırır. Bu taşıyıcının ekspresyonu, nöral olmayan dokulardaki endotel hücrelerine kıyasla MSS endotel hücrelerinde oldukça fazladır(199). Ek olarak, MSS endotelyal hücrelerinde, transferrin reseptörü (transferrin/demir), Ager (amiloid) ve LDL reseptör ilişkili protein (LRP)1/LRP8 dahil olmak üzere çeşitli reseptör aracılı taşıma sistemleri mevcuttur. Bu taşıma sistemlerinin çoğu, MSS'ye ilaç dağıtımına yardımcı olmak için truva atı olarak hedeflenmektedir.

Bu taşıyıcıların çoğu kandan beyne besin sağlasa da (SLC2a1, SLC16a1, SLC7a5, Tfr), Ager gibi birkaçı da beyinden atık ürünlerin uzaklaştırılması için önemlidir. KBB taşıyıcılarının, substratları ve taşıma yönlerinin tam karakterizasyonu, MSS'nin besin gereksinimlerini belirlemek ve bariyerin kan ile MSS arasındaki etkileşime nasıl aracılık ettiğini belirlemek için önemlidir(58).

2.2.2.2.2. ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları (ABC Taşıyıcıları)

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılar; metabolik ürünler, lipidler, steroller ve ilaçlar dahil olmak üzere hücre dışı ve hücre içi zarlar boyunca çeşitli substratların yerini değiştiren zar proteinleridirler(200).

Lipid çözünürlüğü ile karşılaştırıldığında bazı moleküllerin beyin penetransı, logD'lerinden beklenenden çok daha düşük bir MSS giriş oranına sahiptir. Bunun nedeni bu madde ve metabolitlerin çoğunun, ABC taşıyıcı (ATP bağlayıcı kaset) ailesinin üyeleri tarafından aktif olarak dışarı atılmasıdır(201). Bir ilacın beyne nüfuz etmesini sağlamak için lipid çözünürlüğünü artırma stratejisi, molekülün ABC akış taşıyıcıları için bir substrat olma olasılığını da artırabilmektedir(201–203).

İnsanlarda, ABC taşıyıcı süper ailesi, nükleotit bağlayıcı kıvrımlar ve transmembran protein alanlarındaki sekans homolojisine bağlı olarak A'dan G'ye kadar değişen yedi alt aileye bölünmüş 48 gen içerirler(200). Bu taşıyıcıların çoğu lümen yüzeyinde lokalizedir ve ABC taşıyıcılarının KBB'deki en önemli rolü, çok çeşitli substratları kana taşıyan efflux pompası olarak görev yapmalarıdır. Geniş substrat çeşitliliği bu taşıyıcıların beyinde potansiyel olarak nörotoksik endojen veya ksenobiyotik molekülleri uzaklaştırarak, hayati bir nöroprotektif ve detoksifiye edici işlev yerine getirirler(58,204). Ek olarak,

birçok ilaç bu ABC efflux taşıyıcıları için substratlardır ve beyin penetrasyonları bu taşıma aktivitesi ile önemli ölçüde azalır.

KBB'de, dışa akış için en büyük öneme sahip ABC taşıyıcıları; P-glikoproteinler (Pgp, Çoklu İlaça Direnç 1, MDR1, ABCB1), Çoklu İlaça Direnç ilişkili Proteinler (MRP'ler, ABCC1, 2,4, 5) ve Meme Kanseri Direnç Proteinleridir (BCRP, ABCG2)(201,205,206)

ABC taşıyıcılarından olan ABCA1 ve ABCG1 beyin ve KBB'de eksprese edilir ve kolesterol taşınması ile HDL biyosentezi bozukluklarında yer alır. ABCA4 proteini ise çubuk fotoreseptör hücrelerinin dış segmentlerinde A vitamini türevlerini taşır ve bu nedenle görme döngüsünde önemli bir görev alır. ABCA2 de MSS'de eksprese edilir ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(200).

P-glikoprotein olarak da adlandırılan MDR1, geniş çapta incelenen bir ABC taşıyıcısıdır. MDR1 nakavt farelerde beyne giren endojen moleküllerin yanı sıra, çeşitli küçük lipofilik ilaçlarında beyne girişinde bir artış gözlenmiştir(207). MDR1'in artışı ise ilaca dirençli epilepsi ve tümörlerle de ilişkilendirilmiştir(208,209). Pgp ve BCRP, KBB'nin luminal membranında eksprese edilirler ve işlevlerini bir miktar işbirliği ile substratları olan maddeleri endotelden kana taşıyarak sağlarlar(210). MRP izoformlarının bazıları luminal veya abluminal membranda veya bazen her ikisinde de eksprese edilmektedirler. MRP'ler çeşitli dokularda da ifade edilirler ve bunların çoğu çoklu endojen moleküllerin ve ksenobiyotiklerin taşınmasından sorumludur. MRPlar sadece efflux pompası olarak görev yapmaz aynı zamanda hücre içi detoksifikasyon, inflamasyon ve madde taşınması gibi fizyolojik fonksiyonlarda da yer alırlar(211).

Dışa akışı önleyebilecek ve böylece MSS'ye giren ilaç miktarını artırabilecek terapötikleri geliştirmek için, bu akış taşıyıcılarının substratlarını tahmin eden yapısal modellemeler gereklidir. Ek olarak, bu akış taşıyıcılarının inhibitörlerinin geliştirilmesi de küçük moleküllu bileşiklerin MSS'de birikmesine yardımcı olur.

2.2.2.2.3. Veziküler Taşıyıcılar

Endositotik mekanizmalar, KBB boyunca makromoleküllerin

transsitozunu sağlar, bu da proteinler ve peptitler gibi büyük moleküler ağırlıklı maddelerin MSS'ye bozulmadan girebileceği ana yolu sağlar. Polarize hücrelerde, makromoleküllerin apikalden bazolateral plazma zarlarına taşınması tek yönlü transsitoz olarak ifade edilir. Bu yoldaki adımlar endositoz, hücre içi veziküler taşıma ve ekzositozdur(212).

Kanla taşınan büyük moleküllerin çoğunun beyne girmesi kan-beyin bariyeri ve sıkı bağlantıların varlığıyla fiziksel olarak engellense de, çeşitli büyük molekülleri ve kompleksleri KBB boyunca taşımak için spesifik ve spesifik olmayan transsitotik mekanizmalar geliştirilmiştir(69). Spesifik olmayan endositoz, sıvı fazlı endositozdur (pinositoz olarak adlandırılır) ve plazma zarının etrafındaki ekstrasellüler sıvıda bulunan moleküllerin endositozundan sorumludur. Bu durumda plazma zarı tomurcuklanarak ekstrasellüler sıvıdaki molekülleri çevreler ve lümeni aracılığıyla içselleştirir. Çözünen moleküllerin elektrostatik etkileşimler gibi spesifik olmayan etkileşimlerinde ise yine spesifik olmayan mekanizma olan adsorptif endositoz ile içselleştirilir. Adsorptif aracılı endositik yolda endositoza uğrayacak molekül üzerinde onu katyonik hale getirecek pozitif bir yük gereklidir. Bu durum molekül ile hücre yüzeyi bağlanma bölgelerinin etkileşimini sağlar, böylece endositoz ve ardından da transsitoz indüklenmiş olur. Genel olarak katyonik lipidler, polimerler, nanopartiküller ve albumin gibi pozitif yüklü moleküller bu yol ile endositoza uğrar. Spesifik endositik yol ise çözünen moleküllerin hücre zarı üzerindeki reseptörüne bağlandığı reseptör-ligand eşleştirme süreci ile gerçekleşir. Ligand reseptör ile eşleştikten sonra çözünen madde, yapısal (sınıf I) veya ligandla uyarılan (sınıf II) endositoz süreçleri yoluyla sitoplazmaya alınır(213).

En az altı farklı endositik vezikül tipi tanımlanmıştır, ancak beyin endotelinde yalnızca üç ana tip kesin olarak bulunmaktadır. Bunlar, reseptör aracılı endositozun (RMT) çoğundan sorumlu olan klatrin ile kaplı çukurlar, hücre dışı proteinlerin hem seçici olmayan adsorptif aracılı endositozuna hem de bazı membran reseptörlerinin kaçakçılığına aracılık eden daha küçük, daha esnek ve daha az sayıda olan caveola aracılı transport ve hücre dışı bileşenlerin spesifik olmayan bir taşınımından sorumlu olan özellikle de enflamatuar faktörler tarafından düzenlenen büyük, düzensiz şekilli makropinositotik veziküllerdir(214).

Polimerler, katyonik lipidler, albumin ve nanoparçacıklar gibi pozitif

yüklü moleküller adsorptif endositoz yoluyla hücre içerisine alınırlar(212). Makropinositotik veziküller ise hücre dışı sıvının, proteinlerin ve makromoleküllerin nonspesifik toplu yutulması ile transitozu sağlar(215).

KBB'de, reseptör aracılı transsitozu başlatma kabiliyetine sahip 20'ye yakın reseptör tanımlanmıştır. Bunlar; transferrin reseptörü, heparin bağlayıcı EGF, çöpçü (scavenger) reseptörler AI, BI, EGF reseptörü, tümör nekroz faktör, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörleri, apolipoprotein E reseptörü 2, leptin reseptörü, melanotransferrin reseptörü ve LDL reseptörleridir(213). RMT'de, reseptörler ve ligandları bir arada kümelenir, ardından hem ligand hem de reseptörler endotel hücresi içerisine klatrin aracılı transport ile alınır ve hücrenin karşı kutbunda ekzositoz edilmek üzere sitoplazma boyunca yönlendirilir. Ligand ve reseptörün ayrışması, muhtemelen hücresel geçiş sırasında veya ekzositotik olay sırasında meydana gelir.

Mevcut yollarda bir protein veya peptidin transsitosunu bozulmadan elde etmek için, endozom içeriğinin lizozomal bölmeden kaçınılması gerekir. Bunun için lizozomal bölmeden uzağa yönlendirerek bir hücre içi transport sistemi gerekir. Lizozomdan uzaklaşmak, birçok periferik endotel hücrelerinde meydana gelmezken, çok sayıda makromolekülün bozulmamış transsitosunun bir zorunluluk haline geldiği KBB'nin spesifik bir özelliğidir(216). Buna karşılık, birçok hücre ve dokuda endozom içerikleri, enzimatik bozunmanın gerçekleştiği asidik lizozoma yönlendirilir(217).

KBB'nin elektron mikroskobik çalışmaları, periferik endotelial hücrelerle karşılaştırıldığında, MSS'nin endotel hücrelerinde endositoz miktarının daha düşük olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, KBB'de veziküler taşımayı içeren transsitoz, peptitler ve proteinler gibi birçok makromolekülün KBB'ye taşınmasında önemli bir faktördür. Çeşitli dokulardaki kılcal damar endotelinin protein veya peptiti transsitoz etme yeteneği karşılaştırıldığında, bir mikrovasküler yapının protein geçirgenliği ile endositotik profillerin sayısı arasında zayıf bir korelasyon olduğu gösterilmiştir(218).

2.2.2.2.4. Hücresel Transport

Kemik iliğinden türetilmiş olan ve monosit soyundan gelen hücreler, embriyonik gelişim sırasında beyne girer ve immünolojik olarak yetkin yerleşik

mikroglia haline dönüşür(219). Sağlıklı MSS parankiminde nötrofil ve lenfosit neredeyse yoktur, bu durum sıkı bir şekilde düzenlenmiş immün hücre-KBB etkileşiminin bir sonucudur ve MSS’de son derece düşük bir bağışıklık gözetimine neden olan, immün ayrıcalıklı bir bölge olmasını sağlar. Mononükleer lökositler, monositler ve makrofajlar patolojik koşullarda MSS’ye alınabilir ve yerleşik mikroglialar için tamamlayıcı roller oynayabilirler ve bazı durumlarda da mikroglial bir fenotipe dönüşebilirler(57,220). Dolaşımdaki nötrofiller ve mononükleer hücreler, KBB’nin inflamasyon bölgelerine yönelir, bariyeri geçer ve özellikle venüller olmak üzere küçük damarların etrafındaki perivasküler boşlukta birikirler. Perivasküler boşluk, koordineli bağışıklık tepkisi için spesifik bir yer özelliği sağlar(54). Bir lökositin kandan dokuya girişi, yuvarlanan yapışma, sıkı yapışma ve ekstrasvazasyonu içeren çok aşamalı bir işlemdir. Yuvarlanan yapışma için selektinler (E-selektin, P-selektin) ve sıkı yapışma için immünoglobulin ailesi üyeleri dahil olmak üzere bir dizi farklı lökosit yapışma molekülü gerektirir. Bu yapışma moleküllerinin ekspresyonu, MSS’deki endotelial hücrelerde periferik endotelial hücrelere kıyasla çok daha düşüktür, ancak felç ve MS gibi nöroinflamatuvar hastalıklar sırasında yükselir(55,221)(222).

Perivasküler makrofajlar ve mikroglialar, inflamasyon ve diğer patolojik durumlarda aktif hale gelebilir. Normal KBB’de, mononükleer hücreler, sıkı bağlantı komplekslerinin yeniden düzenlenmesini ve açılmasını içeren paraselüler bir yol aracılığıyla değil, doğrudan endotel hücrelerinin sitoplazmasından geçen bir diapedez süreci ile nüfuz ettiği görünmektedir(223). Bu mekanizma, mononükleer hücrelerin KBB’yi TJ bozulması olmadan geçmesini sağlar. Diapedez sırasında lökositler, abluminal membranda bir açıklık oluşturmadan önce lümenal membranı kapatarak endotel hücresine girer, böylece hücre boyunca sıvı dolu bir kanal asla oluşturulmaz (153)(224). KBB’yi içeren inflamatuvar patolojik durumlarda, sitokinlerin ve diğer ajanların etkilerinin bir sonucu olarak endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar açılabilir ve mononükleer hücreler daha sonra hem transselüler hem de paraselüler yollardan girebilir (225).

İlginç bir şekilde, farklı hastalıklarda MSS’ye sızan farklı tipte inflamatuvar hücre alt kümeleri gözlenir. Örneğin, MS’de aktif lezyon bölgelerinde T hücrelerinin, B hücrelerinin, nötrofillerin ve makrofajların

infiltrasyonu vardır, oysa inmede nötrofil ve makrofaj infiltratları vardır, ancak lenfositler büyük ölçüde bulunmaz. Önemli bir soru, her hücrenin KBB'yi geçmek için farklı bir mekanizması olup olmadığı ve bu ayrımcılığın aktive edilmiş KBB mi yoksa aktive edilmiş bağışıklık hücresi düzeyinde mi yapıldığıdır(58).

2.3. İlaç Transportu Modülasyon Yöntemleri

Merkezi sinir sistemi bozukluklarını tedavi etmeye yönelik olan ilaçların onay oranı, diğer terapötik sınıflarından önemli ölçüde düşüktür. Agresif çabalara rağmen, MSS'yi hedef alan birçok yeni bileşik, beyne güvenli ve etkili bir dozda geçememektedir. Diğer terapötik sınıflara kıyasla MSS ilaç onayındaki tutarsızlığın birçok olası nedeni olsa da MSS için ilaç geliştirmenin zorlu bir yönü, bileşiğin terapötik yanıt için yeterli miktarda kan-beyin bariyerini geçmesi gerekliliğidir. KBB'nin normalde kısıtlayıcı doğası, suda çözünür ilaçların ve büyük terapötik makromoleküllerin beyne verilmesi için iyi bilinen ve zorlu bir engel teşkil eder(71,226). Genel olarak, 400Da moleküler ağırlığından daha büyük moleküllerin KBB'yi geçemeyecek kadar büyük olduğu kabul edilir(186). Genellikle küçük molekülü ilaçların KBB'yi geçtiği varsayılsa da, aslında, tüm küçük molekülü ilaçların sadece ~% 2'si beyne nüfuz eder ve bu moleküllerin büyük çoğunluğu şizofreni, depresyon gibi affektif bozuklukların tedavisinde kullanılan ilaçlardır(194,227). Nörodejeneratif hastalıklar, psikiyatrik bozukluklar, felç, travmatik beyin hasarı ve beyin tümörleri de dahil olmak üzere yaygınlığı artan birçok MSS ile ilgili bozukluklarda mevcut küçük molekül tedavisinin büyük ölçüde etkisiz kaldığı görülmektedir. Nöbet önleyici ilaçlarla yapılan çalışmalarda ise tek geçişte beyin alım indeksinin (BUI) valproik asit için % 40, fenitoin için % 28 ve fenobarbital için %24 olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, beyin ilaç konsantrasyonlarının kararlı durum ölçümleri, fenitoin> fenobarbital> valproik asit şeklinde dizilim göstermektedir(47). Bu nedenle MSS hastalıkları için etkili tedavi arayışları, yalnızca ilaç hedefine değil, aynı zamanda ilacın beyindeki etki bölgesine etkin bir şekilde verilmesine de odaklanmaktadır.

İlaçları MSS'ye ulaştırmak için kullanılan üç genel yol vardır. Bir yaklaşım, KBB ve/veya kan-BOS bariyerindeki ilaç geçirgenliği ile ilgili

zorlukların, intraserebroventriküler ve intracerebral yöntemlerle geçildiği transkraniyal dağıtım yöntemi ve intranazal enjeksiyon yöntemidir. Bu yöntemlerde ilaç doğrudan beyne uygulandığından, KBB'nin sınırlayıcı özellikleri tamamen üstesinden gelmektedir. Diğer yaklaşımlarda ise terapötik ajanların gelişmiş bir paraselüler difüzyon yoluyla beyne girmesine izin vermek için beyin kılcal endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinin geçici olarak bozulmasına neden olan osmotik ve farmakolojik yöntemleri içeren geçici KBB modülasyonu ile KBB geçirgenliğini artırmak için ilaç molekülünün veya ilaç taşıyıcısının kimyasal modifikasyonlarını içeren yollardır.

2.3.1. Transkraniyal Dağıtım Yöntemi

MSS ilaç formülasyonları ve dağıtım platformlarındaki son gelişmelere rağmen, birçok potansiyel etkili ilaç molekülü, KBB'nin kısıtlayıcı doğası nedeniyle hala ilgili terapötik konsantrasyonlarda beyne nüfuz edemez. Bu nedenle, beyne ilaç dağıtımını arttırmaya yönelik bir strateji, ilaçların beyine transkraniyal dağıtım yöntemi yoluyla doğrudan uygulanmasıdır. Bu yöntem KBB'nin penetrasyon sorununu tamamen ortadan kaldırmaktır.

Transkraniyal uygulama yaklaşımı invazivdir, kafatasına küçük bir deliğin delindiği bir kraniotomi gerektirir. İntraserebroventriküler (ICV) enjeksiyon, intraserebral (IC) uygulama, konveksiyonla güçlendirilmiş difüzyon (CED) olmak üzere üç temel uygulama yöntemini kapsar(228). Bu teknikleri kullanmanın önemli bir avantajı, gözlenen sistemik yan etkiler olmaksızın beyin parankiminde ve BOS'ta çok daha yüksek bir ilaç konsantrasyonu elde etme yeteneğidir. Ayrıca, bu doğrudan uygulama yöntemleri, çeşitli formülasyonlarda hem küçük hem de büyük terapötik ilaç moleküllerinin beyne ve hedef bölgelerine nüfuz etmesini sağlar(229). Bununla birlikte, bu invaziv tekniğin önemli bir dezavantajı, ilacın enjeksiyon bölgesinden sınırlı difüzyon yeteneğidir. İlacın enjeksiyon bölgesinden uzağa düşük difüzyon hızı, geniş doku bölgesinde terapötik ilaç seviyelerini elde etmek ve sürdürmek için yüksek konsantrasyonda ilaç gerektirir(230). Bu aynı zamanda doz sınırlayıcı toksisiteye de yol açabilir.

2.3.1.1. İntraserebroventriküler Enjeksiyon Yöntemi

KBB'yi atlamak için bir yaklaşım, terapötik ajanları doğrudan beyin ventriküllerine enjekte etmektir. Bunun mantığı, BOS içeriğiyle birlikte beyin ventriküllerinin beyin interstisyel sıvısı ile etkileşime girebilmesi ve böylece ilaçların beyin parankimi içine difüzyonuna izin vermesidir. Bu uygulamada beyindeki ilaç konsantrasyonunu yöneten ana faktör, ilacın uygulama bölgesinden beyne nüfuz etmesini sağlayan difüzyon fenomenine dayanır(231). Difüzyon, beyin dokusundaki hücrelerin enjeksiyon bölgesine olan uzaklığı arttıkça logaritmik olarak azalmaktadır(232). İntraserebroventriküler enjeksiyonu (ICV) takiben ilaçların beyin parankimine ne ölçüde yayılabileceği bir endişe kaynağıdır. Terapötik ajanların ICV uygulamasına klinik cevabın başarısızlığının temel nedeni, ilaç moleküllerinin beyin parankimi içine düşük difüzyon yetenekleridir(233). Bu, özellikle büyük hidrofilik ilaç moleküllerinde görülen bir durumdur. Nitekim, insan beynindeki BOS devir hızı, endimal yüzeyden parankimal yüzeye olan ilaç difüzyon hızından çok daha hızlıdır. Sonuç olarak, ilacın beyindeki hedef bölgelere göre genel dolaşıma dağılması daha olasıdır(234). Bu sınırlamalar nedeniyle, ICV enjeksiyonunun farmakolojik etkisi, yalnızca ilacın hedef reseptörü beyin endimal yüzeyinin yakınında lokalize ise önemlidir. İlaçların ICV dağıtımını kullanan uygulamalar, meninkslerde ve BOS'taki ilaçların daha kolay dağılabileceği beyin subaraknoid bölgesinde lokalize primer veya metastatik beyin tümörlerinin tedavisi için en uygundur(235). ICV ilaç dağıtım yöntemiyle ilgili ek bir husus, özellikle uzun süreli ilaç tedavisi için olası subependimal astroglotik reaksiyonların gelişmesidir(236).

2.3.1.2. İntraparankimal Enjeksiyon Yönetimi

Bu yöntem, ICV ilaç dağıtımının sınırlı difüzyon yeteneklerinin üstesinden gelmek için ilacın doğrudan beyin parankimine verilmesi ile ilgili bir girişimdir. Bu yöntemde bileşikler; intratekal kateterler yoluyla bolus/infüzyon şeklinde, kontrollü salınım matrislerle, mikrokapsüllenmiş kimyasallarla veya rekombinant hücreler yoluyla enjekte edilebilir(231). İntraserebral enjeksiyon, kateter yerleştirme bölgesinde potansiyel kanama ve enfeksiyon riskini içeren bir cerrahi prosedürü gerektirmektedir.

Bolus enjeksiyonu ile ilgili en büyük sorun, sınırlı difüzyon katsayısı nedeniyle bileşiklerin yavaş hareket etmesidir. Bunun nedeni, hücrelerin hem gri hem de beyaz cevher mikroçevresindeki sıkı dizilişi ve beyindeki konsantrasyona bağlı difüzyon fenomeninden kaynaklanmaktadır(237). Bu yüzden parankimde uygun bir ilaç konsantrasyonu sağlamak için büyük miktarda ilaç dozu gereklidir(238).

Alternatif olarak, ilaçları daha geniş bir doku bölgesine yönlendirmek için konveksiyonla güçlendirilmiş difüzyon (CED) fenomenini kullanan sürekli infüzyon yöntemi de kullanılabilir. Bolus enjeksiyona kıyasla CED'in ilacı büyük dozlarda verme, ilaç konsantrasyonunu ve zaman içindeki dağılımını koruma özelliğinin daha iyi olduğu gösterilmiştir.(237). CED, ilacın doğrudan intraserebral enjeksiyonunu ve ilaç infüzyonu sırasında KBB'yi aşmak için pozitif hidrostatik basıncın kullanılmasını içeren invaziv bir ilaç verme mekanizmasıdır. Pozitif basınç gradyanının kullanılması, uygulanan ilacın hedef dokuya daha fazla nüfuz etmesini sağlar. İlaç, sürekli bir pozitif basınç gradyanı oluşturmak için bir infüzyon pompası implante edilmiş kateter kullanılarak uygulanır. CED'in beyinle ilgili kullanımları çoğunlukla beyin tümörlerinin deneysel tedavisi ile sınırlıdır. CED yaklaşımı, klinik öncesi beyin tümörü deneylerinde olumlu etkiler göstermiş olsa da klinik etkinliği en iyi ihtimalle mütevazıdır. Beyne infüzyonun hidrostatik basıncına bağlı olarak astrogliosis gelişimine ek olarak, daha önce tartışılan tüm doğrudan uygulama yöntemleri gibi CED iletiminin kullanımı maliyetlidir ve kateter ve/veya implant yerleştirme için cerrahi müdahale gerektirir(239).

2.3.2. KBB'nin Geçici Bozulması

KBB, beyinin endotel hücreleri, perisitler, astrositik uç ayaklar ve nöronal hücrelerden oluşan, moleküller ve çözünen maddelerin kandan beyne difüzyonunu sınırlayan koruyucu bir bariyerdir. KBB'nin osmotik veya farmakolojik yöntemlerle kontrollü ve geçici bir şekilde bozulmasına neden olan sıkı bağlantıların bütünlüğünü değiştirmek, beyne ilaç dağıtımını artırabilmektedir.

2.3.2.1. KBB'nin Osmotik Bozulması

KBB'nin osmotik bozulması kavramı ilk olarak 1972'de Rapoport ve ark.

tarafından hipertonic arabinozun intraarteriyel infüzyonunu takiben albümine geniş ölçüde bağlanan Evans mavisinin, MSS'de varlığının saptanmasıyla keşfedildi. Bu gözlem, hipertonic bir çözeltinin, endotel hücrelerinin büzülmesini indüklediğini ve beyin kılcal endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları bozduğunu buna bağlı olarak da KBB'nin geçirgenliğini arttırdığını ileri sürmüştür(240). KBB'yi geçici olarak bozmak için laktamit, salin, üre, radyografik kontrast madde ve mannitol gibi diğer hipertonic solüsyonlar da kullanılabilir(241).

Ozmotik bozulma tekniği, KBB'nin geçici bozulması için kullanılan en yerleşik yöntemdir. Bu teknik, özellikle prelinik kemirgen modellerinde KBB penetrasyonunun sınırlı olması nedeniyle kötü prognoza ve sınırlı kemoterapötik cevaba sahip beyin tümörlerinin tedavisinde ilaçları beyne iletmek için kullanılmıştır(242). KBB bozulması için kullanılan en yaygın ozmotik ajan, karotid artere infüze edilen mannitoldür. Ozmotik ajanlar tarafından oluşturulan KBB bozulmasının büyüklüğü, kontrastlı CT veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ajanlarının yanı sıra Evans mavisi ve horseradish peroksidad (HRP) dahil floresan etiketli çeşitli geçirgenlik belirteçleri kullanılarak belirlenmiştir(243).

Ozmotik ajanın verilmesini takiben KBB'nin bozulması, beyne hem küçük hem de büyük moleküllerin artan birikimi ile sonuçlanır. Kontrastlı MRI kullanılarak sıçanlarda yapılan çalışmalar, KBB bozulmasının zaman sürecinin hızlı olduğunu, mannitol enjeksiyonunu takiben dakikalar içinde meydana geldiğini ve maksimum maruziyetin 60 dakikada gerçekleştiğini göstermektedir(244). KBB açılış süresi kullanılan hayvan modeline göre değişkenlik göstermektedir. Bununla birlikte, hayvan çalışmalarında ozmotik bozulmayı takiben KBB özelliklerinin restorasyonu için maksimum süre yaklaşık 6 saattir(240). KBB'nin açılması, ilacı beyne iletmek için süre açısından yeterli olsa da KBB bozulmasından kaynaklanan toksisite potansiyeli, KBB'nin geçirgenliğinin artması ile artabilir.

KBB'nin ozmotik bozulması, beyin tümörlerinin tedavisinde beyne kemoterapötik ajanların verilmesini arttırmak için insanlarda da incelenmiştir. karotid arter yoluyla mannitol infüzyonu uygulanan, primer MSS lenfoması ve malign gliomaları olan beyin tümürlü hastaların klinik çalışmalarında, kemoterapötik ilaçların MSS'ye iletiminin arttığı ve buna bağlı olarak da hayatta

kalma oranını arttırdığı gösterilmiştir(245,246). Bununla birlikte, bu tekniğin ana dezavantajı, makrofajların yanı sıra diğer küçük ve büyük moleküllerin MSS'ye girmesine ve kafa içi basınçta geçici bir artışa neden olmasına izin veren bozulma ile ilişkili uzun iyileşme süresidir. Ozmotik bozulma ile ilişkili kafa içi basıncındaki artış, beyin tümörü tedavileri için önemli bir kontrendikasyondur. Bu prosedürün başarısını engelleyen diğer doğal faktörler, her hastanın hemodinamik değişkenliğini, kullanılan anestezi ajanının yanı sıra hipertonic solüsyonların infüzyon hızını içerir. Özellikle beyin tümörlerinin tedavisinde ilave bir kafa karıştırıcı faktör, ozmotik bozulmaya ve/veya radyasyon tedavisine tekrar tekrar maruz kalındığında görülen değişken KBB bozulmasıdır(240,245).

Bir ozmotik ajan olan mannitol, uzun süredir intravasküler infüzyon yoluyla KBB açılması gibi çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Sıçanlarda intraarteriyel mannitol infüzyonundan 5 dakika sonra KBB bariyerinin açıldığının ve bu açıklığın yaklaşık 20-30 dakika sürdüğü gösterilmiştir.

İntravenöz uygulama ise MSS boyunca eşit dağılımla sonuçlanacağından, yaygın MSS hastalıklarının tedavisi için potansiyel faydalar sunmaktadır. Bununla birlikte, bu tedavinin etkinliği ve IV iletilen maddelerin MSS'ye girişini artırmak ile KBB'yi bozmak için gerekli en uygun koşullar belirsizdir(246–248).

2.3.2.2. KBB'nin Farmakolojik Bozulması

Beyin endotel hücrelerinin hem luminal hem de abluminal membranlarının geçirgenliği, lökotrien, histamin, arşidonik asit ve bradikinin gibi endojen ligandlar tarafından modüle eden çok sayıda reseptöre sahiptir. Bu endojen vazoaktif bileşiklerin çoğu, reseptör sinyal iletim seviyesinde taşıfılaksi gelişmesinin yanı sıra proteazlar tarafından parçalanmaları nedeniyle kısa bir yanıt ve yarı ömrüne sahiptirler. Ayrıca, bu endojen ligandların çoğu, farklı organ ve doku bölgelerindeki reseptörlerinin aktivasyonu nedeniyle de hedef dışı istenmeyen etkiler oluşturabilmektedirler. Bu sınırlamalara rağmen, beyin mikrovasküler sistemi içindeki reseptörlerin farmakolojik hedeflenmesi yoluyla KBB geçirgenliğinin modülasyonu, beyne ilaç iletimini arttırmak için geçerli bir yaklaşımı temsil etmektedir.

2.3.2.2.1. Bradikinin Analogları

Endotel hücreleri üzerindeki bradikinin reseptörlerinin farmakolojik aktivasyonunun, KBB'nin geçici bozulmasını sağlamak için geçerli bir farmakolojik hedef olduğu gösterilmiştir. Bu, daha seçici bir bradikinin B2 reseptör agonisti olan Cereport'un (Labradimil veya RMP-7) tasarımı ve sentezi yoluyla yapılmıştır. Cereport'un yarı ömrü, 5 konumunda bir fenilalanin yerine (2-tienil)-alanin'in yer değiştirmesi ve ayrıca 7 konumundaki fenilalanin yerine metiltirozin değişikliği nedeniyle bradikinininden iki ila üç kat daha fazladır ve proteolitik yıkıma daha az duyarlıdır(249). Sıçan beyni mikrovasküler endotel hücreleri, kobay ileumu ve sıçan uterusu ile yapılan in vitro çalışmalar, Cereport'un B2 reseptörleri için seçici olduğunu ve bir B2 reseptör agonisti olarak hareket ettiğini göstermektedir. Cereport, B2 reseptörü için bradikinininden daha düşük bir afiniteye sahipken, artan yarı ömür nedeniyle hücre bazlı ve in vivo sistemlerde bradikinininden daha büyük bir potens gösteririr(250).

Bradikinin, endotel hücreleri üzerindeki B2 reseptörlerine bağlanır ve tümör vaskülatuvar sisteminde daha yaygın bir enzim olan nitrik oksit sentazı aktive eden sitozolik Ca^{+2} 'da geçici bir artış sağlar. Buradaki nihai sonuç, vazodilatasyon ve artmış vasküler geçirgenlik üreten bir sinyal molekülü olan nitrik oksitte bir artıştır(251).

Cereport, beynin vasküler sistemini etkilemeden endotel hücreleri arasında oluşan sıkı bağlantılara müdahale ederek KBB geçirgenliğini artırır. Cereport ile artan KBB geçirgenliği, bileşiğin infüzyonunu takiben dakikalar içinde hızla meydana gelir. Sıçan ve köpeklerde yapılan in vivo çalışma, KBB geçirgenliğinin Cereport uygulamasından sadece 5 dakika sonra meydana geldiğini göstermiştir(249,252). Ayrıca, KBB özelliklerini infüzyonun sona ermesini takiben 2-5 dakika içinde normal durumuna geri döndüğünü, bu bozulmanın sadece kısa bir süre sürdüğünü göstermiştir. Cereport'un bir başka önemli farmakodinamik özelliği ise bileşiğin sürekli veya çoklu tatbikatını takiben genellikle dakikalar içinde gelişen taşiflaksidir. Bradikinin veya Cereport'un sürekli infüzyonu, bariyer özelliklerinin 10–20 dakika içinde kendiliğinden restorasyonunu indükler ve bariyer 30–60 dakika içinde başlangıç permeabilitesine geri döner. Çalışmalar, 15 dakikalık bir aralıklara ayrılmış iki ardışık Cereport uygulamasının tam bir taşiflaksiye neden olduğunu, 60

dakikalık bir aralığın ise bileşiğin tek infüzyonuna kıyasla daha küçük bir bozulma büyüklüğüne neden olduğunu göstermiştir(253).

2.3.2.2.2. Alkilgliseroller

KBB'nin geçici olarak bozulması, çeşitli alkilgliserollerin farmakolojik uygulaması yoluyla da gösterilmiştir. Alkilgliseroller tarafından indüklenen KBB bozulması, tedaviyi takiben 120 dakika içinde başlangıç permeabilitesinin geri kazanılması nedeniyle geri dönüşümlüdür(254). Alkilgliserollerin etkinliğini değerlendiren kemirgen glioblastomalı beyin tümörü çalışmalarında, bu tedavi altında kemoterapötiklerin beyne nüfuzu az olsa da beyne ilaç dağılımında doza bağlı artışlarla sonuçlanmıştır. En yüksek alkilgliserol dozları kullanılarak tümör bölgesine metotreksat dağıtımındaki artışın büyüklüğü, ozmotik bozulma ile gözlemlenenle kıyaslanabilir geçirgenlikte ve bradikinin analogu Cereport ile gözlemlenenden önemli ölçüde daha büyüktü(255). In vitro ve in vivo deneyler, intrakarotid alkilgliserollerden sonra toksik yan etkilerin ve nöropatolojik değişikliklerin olmadığını göstermiştir(255).

Alkilgliserollerle tedavi, hidrofilik çözünen maddelerin ve makromoleküllerin beyin birikiminin artmasıyla sonuçlanır, buna da sıkı bağlantıların modülasyonunun ve hücre dışı difüzyon yollarının dahil olması ile sağlanır. Kesin moleküler mekanizma bilinmemekle birlikte, beyin damar sistemi içindeki bir reseptörün farmakolojik olarak hedeflenmesini destekleyen birkaç bulgu vardır. İlk olarak, alkilgliserollerle gözlenen KBB geçirgenliği üzerindeki etkiler konsantrasyona bağlıdır. İkincisi, KBB bozulmasının hem büyüklüğü hem de süresi alkilgliserolün farmakolojik yapısına bağlılık göstermektedir. Erdlenburch ve ark. KBB bozulmasının, en iyi yanıtı verenin alkil grubunun zincir uzunluğunun bir fonksiyonu olarak arttığını tespit etmişlerdir. Alkilgliserolün KBB bozulması üzerindeki konsantrasyon ve yapı bağımlılığı, beyin mikrodamar hücreleri içindeki reseptör bölgelerinin aktivasyonunun, alkilgliserol moleküllerinin KBB geçirgenliği üzerindeki etkilerine aracılık ettiğini göstermektedir(256)

2.3.2.2.3. Lizofosfatidik Asit

KBB'nin vasküler geçirgenliği üzerinde etkisi olduğu gösterilen başka bir bileşik, lizofosfatidik asittir (LPA). LPA, nöronlar, Schwann hücreleri,

adipositler ve fibroblastlar dahil olmak üzere çoğu hücre tipinde bulunan bir fosfolipittir. Aktive trombositler tarafından salgılanır ve serum, tükürük, foliküler sıvı, malign efüzyonlar dahil olmak üzere çok sayıda vücut sıvısında bulunur. LPA, plazma zarının yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak yanıtlarını G-protein-bağlı reseptör (GPCR) sinyal yollarıyla başlatarak memeli hücrelerinde çeşitli tepkiler üretir. Şu anda en az altı farklı LPA reseptörü türü (LPAR1–LPAR6) vardır. LPAR2 ve LPAR3 de mevcut olmasına rağmen, beyinde LPAR1 en yüksek düzeyde eksprese edilendir(257). LPA'nın önemli bir hücre hedefi, mitogeneze, hücre göçünde ve geçirgenlikte LPA'nın neden olduğu değişikliklerin meydana geldiği vasküler endoteldir. LPA'nın beyin vasküler endotel hücre geçirgenliği üzerine yapılan çalışmaları, primer beyin endotel hücreleri kültürlerinde ve in situ kraniyal pencere preparatlarında gözlenen hücre ötesi elektrik direncindeki (TEER) ve vasküler belirteçlerin akışındaki artışla geçirgenliğin arttırıldığı desteklemektedir(258). İntravenöz LPA enjeksiyonları, KBB bütünlüğünde doza bağlı bozulmaya neden olmaktadır. KBB geçirgenliğinin LPA ile modülasyonu, başlangıçta hızlı ve kısa süreliyen (3 dakika içinde), KBB bütünlüğünün tam restorasyonu 20 dakika içinde gözlenmiştir(242). Ayrıca, daha lipofilik görüntüleme ajanlarının aksine hem küçük hem de büyük hidrofilik geçirgenlik belirteçlerinin beyinde birikimi, beyin endotel hücreleri arasında değişen sıkı bağlantı yoluyla artan bir paraselüler difüzyon yolu olduğunu düşündürmüştür(242). KBB geçirgenliğinin farmakolojik modülasyonu için LPA reseptörlerini hedeflemenin birkaç avantajı vardır. Biri, LPA'ya maruz kalmanın ardından gözlemlenen KBB bozulmasının hızlı başlangıcı ve KBB bütünlüğünün restorasyonu için nispeten kısa zaman sürecidir. İkinci bir avantaj ise bu yaklaşımla etki sağlanabilecek çok çeşitli lipofilik ve hidrofilik moleküllerdir(242).

Ek olarak, KBB'nin tek tip olmayan bozulmasına sahip görünen Cereport'un aksine, LPA, incelenen beynin tüm alanlarında benzer büyüklükte KBB açıklığına neden olduğu tespit edilmiştir. Beyin mikrovasküler sisteminde ifade edilen çok sayıda LPA reseptörü olsa da seçilen LPA reseptörlerini daha seçici farmakolojik ajanlarla hedeflemenin, KBB modülasyonunun kapsamını daha da iyileştirme olasılığı vardır. Bu nedenle, beyin mikro damar sistemi üzerindeki fosfolipid reseptörleri yoluyla KBB geçirgenliğinin modülasyonu potansiyeli önemli bir yol sunmaktadır.

2.3.2.2.4. Kadherin Bağlayıcı Peptitler

KBB geçirgenliğini modüle etmek için deneysel olarak kullanılacak yeni farmakolojik ajanlar kaderin bağlayıcı peptitlerdir. Beyin mikrovasküler endotel hücrelerindeki yapışık bağlantılar kaderin proteinleri tarafından desteklenir. Bu proteinlerin bitişik beyin mikrovasküler endotel hücrelerine bağlanması, hücre bağlantısı içinde çapı 11Å veya yaklaşık 500 Da'dan büyük olan çözünenlerin hücre dışı geçişini sınırlayan bir homolitik dimer oluşturur(259). Kadherin proteini, ekstrasellüler alanda beş ardışık tekrarlanan üniteye (EC-1-EC-5) sahiptir ve bu proteinin His-Ala-Val'in (HAV) bölgeleri endotel bağlantılarındaki dimer oluşumunda rol oynar. HAV bölgesi sekansına dayalı sentetik peptitlerinin E-cadherin molekülleri arasındaki etkileşimleri inhibe ettiği ve konsantrasyona bağlı bir şekilde sıgır beyni mikrovasküler endotel hücrelerinin toplanmasını önlediğini de gösterilmiştir. Farelerde IV HAV peptit enjeksiyonları, çok çeşitli geçirgenlik işaretçilerine karşı artan KBB geçirgenliğine neden olduğu, bu geçirgenliğin HAV peptidinin uygulanmasından 3-6 dakika içinde belirgin olduğu ve bu geçirgenlik artışının doza bağımlı olduğu gösterilmiştir. Farelere kontrast maddesinin enjeksiyonundan 1 saat önce HAV peptidi verildiğinde ise KBB geçirgenlik artışının tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir, bu da KBB bütünlüğünün 1 saat içinde tamamen normale döndüğünü göstermiştir(259).

Diğer farmakolojik KBB'yi bozan ajanlar gibi, HAV peptidinin etkileri en çok küçük hidrofilik geçirgenlik belirteçleri için belirgindir. Bununla birlikte büyük makromoleküllerin de beyin dağılımında artış gözlenmiştir. Bu yaklaşımın avantajları, kaderin bağlayıcı peptidin modülasyonu yoluyla açılma büyüklüğü ve süresi açısından KBB bozulmasının daha da iyileştirilme yeteneğidir. Bunun bir örneği, büyük ve küçük molekül ayrımı ve uzun süreli KBB açılması (4 saate kadar) gösteren siklize kaderin bağlayıcı peptitlerle yapılan çalışmalardır(260). Ayrıca, diğer farmakolojik ajanlardan farklı olarak, kaderin bağlayıcı peptitler tarafından üretilen KBB bozulmaları tüm beyin boyunca aynıydı.

2.3.3. Transsellüler dağıtım yolları

Genel olarak, taşıma proteinleri aracılı taşıma sistemleri ve veziküler

taşıma sistemleri olmak üzere iki ana gruba ayrılabilirler.

2.3.3.1. Taşıma Proteinleri Aracılı Taşıma Sistemleri

Bu gruptaki taşıma sistemleri içe alım taşıyıcıları ve dışa atım(efflux) pompaları olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. Alım taşıyıcılar, maddelerin ve ilaçların hücre dışından hücrelere alınımından sorumludur ve çoğunlukla çözünür taşıyıcılar (SLC'ler) ailesine aittirler. Bu SLC taşıyıcı üst ailesi içindeki önemli taşıyıcı aileler, organik anyon taşıyan polipeptit ailesi (OATP'ler; SLCO veya SLC21A gen ailesi), organik anyon ve katyon taşıyıcı ailesi (OAT'ler ve OKT'ler; SLC22A gen ailesi) ve peptit taşıyıcı ailesidir (PEPT, SLC15A gen ailesi).

Dışa atım(efflux) pompaları ise esas olarak ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailesinin üyeleridir. Bu taşıyıcılar, genel olarak hücre içinden hücre dışı ortama substrat taşınımına aracılık ederler. Temel olarak konsantrasyon gradyanlarına karşı substrat translokasyonuna aracılık ettikleri için ATP hidrolizinden oluşan enerjiyi kullanırlar. Önemli dışa atım(efflux) pompaları, ABCB alt ailesinin bir üyesi olan P-glikoprotein (P-gp), ABCC alt ailesine ait MRP (çoklu ilaca dirençli protein) ailesinin üyeleri ve ABCG alt ailesine ait BCRP'dir (261).

2.3.3.1.1. KBB'de Çözünür Taşıyıcı ile Taşıma Sistemleri

Çok çeşitli endojen çözünenler, taşıyıcı aracılı taşıma yoluyla beyne girer. Beyin kapiller endotel hücreleri, luminal ve/veya abluminal taraflarda eksprese edilen birkaç çözünen taşıyıcıya (SLC'ler) veya taşıma proteinlerine sahiptir. Bu taşıyıcıların işlevi, glikoz, amino asitler, nükleositler, monokarboksilatlar, küçük peptitler ve organik anyonlar/katyonlar dahil olmak üzere temel polar metabolitleri beynin içine ve dışına taşımaktır. SLC süper ailesi altındaki bu taşıyıcıların gen sembollerinin önüne SLC eklenir.

Kan-BOS bariyeri ve KBB'deki taşıyıcı konumuna bağlı olarak, çözünen maddeler kandan endotel/epitele ve/veya endotel/epitelden beyne/BOS'a yer değiştirebilir. Mekanik olarak, SLC'ler kolaylaştırılmış difüzyon tabanlı taşıyıcılardır; bu nedenle, çözünenler, çözünen maddenin konsantrasyon gradyanı veya bir elektrolitle birlikte taşınmasını sağlayan taşıyıcı tarafından

yönlendirilirler ve plazma zarı boyunca çift yönlü olarak hareket ederler. İlaçların nakil aracılı yollarla beyne iletilmesi için iki ana yaklaşım vardır: (i) yalancı substrat olarak taşımayı optimize etmek için ilacın kimyasal modifikasyonu veya (ii) ilacın bir endojen taşıma substratına konjugasyonudur(262). İlaç moleküllerinin (pödosubstrat veya ön ilaç) taşıyıcı aracılı sistemle taşınmasını etkileyebilecek birkaç faktör vardır. Bunlar SLC yollarından yararlanan endojen substratlarla olan doğrudan rekabet ve SLC'lerin beyin kılcal yoğunluğunun ve taşınma kinetiğinin SLC alt sınıfları bazında ve canlı türleri arasında farklılık göstermesidir. Bu nedenle, ilaç tasarımı ve deneysel stratejilerde bu olası engellere veya tutarsızlıklara dikkat etmelidir.

2.3.3.1.1.1. Amino Asit Taşıyıcıları

Beyin kılcal endotel hücrelerinde değişik amino asit taşıyıcı sistemler eksprese edilir. En çok çalışılan amino asit taşıyıcıları, Na^+ 'dan bağımsız sistemler olan L (LAT1—SLC7A5 ve LAT2—SLC7A8), y^+ (SLC7A7) ve x_c^- (x_cCT —SLC7A11)dir. L sistemi, L-lösin, L-fenilalanin, L-triptofan, L-tirozin, L-izolösin, L-metionin ve L-valin gibi büyük nötr amino asitleri aktif olarak taşır(263). y^+ sistemi, L-arginin, L-lizin ve L-ornitin dahil katyonik amino asitleri taşır. x_c^- sisteminin substratları ise L-glutamat ve L-aspartat gibi anyonik amino asitlerdir.

In vitro çalışmalar, A/N (SNAT1—SLC38A1, SNAT2—SLC38A2, SNAT3—SLC38A3, SNAT4—SLC38A4, ve SNAT5—SLC38A5), $\text{B}^{0,+}$ (SLC7A9), ASC (SLC7A10), β (β -alanin ve taurin gibi β -amino asitleri taşır) ve X^- (SLC1A1) sistemleri adı verilen diğer Na^+ bağımlı amino asit taşıyıcılarının varlığını ileri sürmektedir(264). A, ASC, X^- ve $\text{B}^{0,+}$ sistemleri kılcal vasküler sistemin abluminal membranında yer almaktadır. Bu taşıyıcılar dışarı akış için, amino asit substratlarını beynin hücre dışı sıvısından serebrovasküler endotel hücresine aktif olarak taşır. A ve ASC sistemlerinin substratları, küçük nötr amino asitleri (örneğin, L-alanin, L-serin ve L-sistein), $\text{B}^{0,+}$ sistemi nötr ve bazik amino asitleri (örneğin, L-arginin ve L-lizin) ve X^- anyonik amino asitleri (örneğin, L-glutamat ve L-aspartat) içermektedir(264). β -Amino asitler (örneğin, β -alanin ve taurin) ise düşük kapasiteli, Na^+ ve Cl bağımlı bir taşıyıcı olan Sistem β tarafından beyin kılcal vasküler endoteline taşınır(265).

Geniş substrat yelpazesiyle L-amino asit taşıyıcı sistemi (özellikle

LAT1), KBB'de terapötik/tanısal ajanları iletmek için sık kullanılan SLC yoludur. Büyük nötr amino asit taşıyıcı (LAT) sistemi, periferik dokulardaki lösin (L)-tercih eden sisteme(L sistemi) benzer bir şekilde büyük ve nötr amino asitlerin KBB boyunca taşınmasına aracılık eder. Bununla birlikte, KBB'deki L sistemi, periferik dokulardaki L sistemleri ile karşılaştırıldığında, amino asitler için çok daha yüksek bir afiniteye sahiptirler(266).

Endojen substratlarını taklit eden ve L sistemi tarafından taşınan ilaç molekülleri, L-DOPA, baklofen, gabapentin, alfa-metildopa, melfalan gibi ajanları içerir(267). L-amino asit taşıyıcı sistemi ayrıca pozitron emisyon tomografisi (PET) görüntülemeye kullanılan 6-[18F]floro-L-3,4-dihidroksi-fenilalanin (18F-FDOPA) [85], L-[11C]-metil-metionin (11C-MET), O-(2-[18F]floroetil)-L-tirozin (18F-FET) ve L-3-[18F]-floro- α -metil tirozin ([18F]-FAMT) gibi ajanları beyne iletmek için kullanılmıştır(267).

Düşük dereceli glial tümörlerinin tanısal görüntülemesinde, SLC tabanlı PET görüntüleme probu olan 11C-MET, Gadolinyum kullanılarak çekilen T1ağırlıklı MRG'den daha üstün olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni, gadolinyum bazlı MRI kontrast ajanlarının düşük dereceli gliomlarda (paraselüler olarak) sağlam KBB'yi geçmemesidir; bununla birlikte, 11C-MET, beyin tümörü mikrovasküler sisteminde artmış taşıyıcı protein ekspresyonu/aktivitesi nedeniyle aktif taşımaya maruz kalmaktadır. Bu durum düşük dereceli glial tümörlerin erken teşhisinde önem arz etmektedir(268).

Genel olarak, L aracılı taşıyıcı sistemle taşınmaya maruz kaldığı gösterilen terapötik/tanısal ajanlar, endojen substratların yapısal homologlarıdır. Amino asit substratına konjuge edilmiş bir ilacın taşıyıcı sistem aracılı taşımaya maruz kaldığının gösterildiği çok az rapor vardır. Birkaç rapor, ilaç-amino asit konjugatlarının LAT1'i bağlama ve inhibe etme yeteneğini göstermiştir. Örneğin, L-sistin ile konjuge edilen 6-merkaptopurin sıçan beyinde [14C] L-lösin alımını inhibe etmiştir. Son zamanlarda ketoprofenin hem L-tirozin hem de L-lisin ön ilaçlarının LAT1 in situ sıçan beyin perfüzyonu yoluyla sıçan beynine hem hızlı hem de verimli bir şekilde alındığı kanıtlanmıştır. Ayrıca valproik asitin, L-fenilalanin analogları ile yapılan çalışmalarında, molekülün LAT1'e aracılığıyla KBB'yi aştığını, aktif ilacı beyin parankiminde serbest bırakabildiklerini, LAT1 ile bağlanmalarının geri dönüşümlü olduğunu göstermiştir. Bu durum zayıf beyin penetrasyon özelliklerine sahip küçük moleküler ağırlıklı ilaçların LAT1 aracılı

MSS'ye dağıtımı için ön ilaç tasarımı kullanılabılır olabileceğini göstermiştir(269). Fakat bu yaklaşımın zayıf KBB geçirgenliğine sahip ilaçlardaki etkinliğini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.3.3.1.1.2. Glikoz Taşıyıcıları

Glikoz taşıyıcıları, plazma zarı boyunca glikoz ve diğer heksozları (mannoz ve galaktoz) taşır. Bu taşıyıcılar Na^+ bağımlı SGLT ve Na^+ bağımsız GLUT aileleri olarak sınıflandırılır. KBB'de ilk tanımlanan ve muhtemelen en önemli glikoz taşıyıcısı, KBB'nin luminal ve abluminal taraflarında ifade edilen GLUT1'dir (SLC2A1)(270). GLUT-1 kolaylaştırıcı bir taşıyıcıdır, yani glikozu, difüzyon ile meydana gelecek taşınımından daha yüksek bir miktarda konsantrasyon gradyanından aşağıya taşır. GLUT-1, bu ailenin serebral endotel hücrelerindeki ana üyesidir. GLUT1 ayrıca kemirgen koroid pleksusunda da tespit edilmiştir(271).

GLUT1, beyindeki yüksek glikoz talebini verimli bir şekilde yönetir. GLUT1'in kapiller yoğunluğu ve taşıma kapasitesi, KBB'deki SLC'ler arasında en yüksek olanıdır(272).

Yüksek taşıma kapasitesi nedeniyle, GLUT1 taşıyıcısı, KBB genelinde taşıyıcı aracılı taşıma için hedeflenmiştir. Bununla birlikte, birçok SLC gibi, GLUT1 taşıyıcısı, bağlanma ve taşıma için çok katı bir stereokimyasal ve moleküler boyut gereksinimlerine sahiptir. Çalışmaların çoğu, terapötik ajanları gerçek GLUT1 substratlarını konjuge etme ile “ön ilaç” yaklaşımını benimsemiştir. Glikoza bağlı opioid peptit analogları (nöromodülatörler), fare modelinde modifiye edilmemiş peptitlere kıyasla daha fazla bir KBB penetrasyonu gösterdi. Başlangıçta, artan geçirgenlik GLUT1 aracılı taşımaya bağlandı(239). Bununla birlikte, daha sonraki çalışmalar GLUT1 aracılı taşımanın aksine glikopeptidlerin metabolik stabilitesi ve artan biyoyararlanımının KBB geçirgenliğinin nedeni olduğunu gösterdi(273).

SLC5 taşıyıcıları sodyum-glukoz ko-taşıyıcılarıdır. Fare serebral endotel hücrelerinde SLC5a1, a5 ve a6 tanımlanmıştır ve fare koroid pleksusunda SLC5a6 ve a10 tanımlanmıştır. Hem yetişkinlerde hem de yenidoğanlarda beyne glikoz taşınması için gerekli olduğu bilinmektedir. Fakat glukoz taşınımının çoğuna GLUT-1 (SLC2a1) aracılık eder. Bu taşıyıcının kritik önemi, GLUT-1 eksikliği olan kişilerde ortaya çıkan ciddi klinik etkilerle gösterilmiştir(274).

Kan-beyin ve kan-BOS bariyerlerinde tanımlanan diğer tüm glikoz taşıyıcılarının fonksiyonel önemi belirsizdir, çünkü glikoz taşınımını incelemek için mevcut yöntemler olası rolleri arasında ayrım yapmamaktadır. Bu, aynı substrat için birçok taşıyıcının geliştiği genel bir sorunu yansıtmaktadır. En azından bu belirgin fazlalığın GLUT-1 fonksiyonunun olası kaybı sırasında fonksiyonunu telafi etmek için yetersiz olduğu açıktır(275). Ayrıca çeşitli antiinflamatuvar ajanların da glukozillenmiş ön ilaçları, beyne daha iyi iletim için incelenmiştir. Pek çok çalışma, glukozile edilmiş ön ilaçların beyne daha fazla geçiş gösterdiğini gösterebilse de bileşiklerin gerçekten de GLUT1 taşıyıcısı tarafından taşınıp taşınmadığına dair bazı sorular vardır(276). GLUT1 taşıyıcısı taşıma kapasitesi açısından büyük bir potansiyele sahip olsa da taşıyıcıya glikozdan daha yüksek afiniteye sahip ilaç adaylarını tasarlamak ve belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.3.3.1.1.3. Monokarboksilat Taşıyıcıları

Monokarboksilat taşıyıcı (MCT) ailesi on dört alt tip içerir. Bunlar, karbonhidrat, yağ ve amino asit metabolizmasında önemli roller oynayan proton bağlı piruvat, laktat ve keton gövdeleri (asetoasetat ve β -hidroksibutirat) gibi monokarboksilatların veya monokarboksilik asitlerin transmembran taşınmasında yer alır(277).

Bu ailenin beyindeki en önemli taşıyıcıları MCT1 (SLC16A1), MCT2 (SLC16A7), MCT4 (SLC16A3) ve MCT8 (SLC16A2)'dir, MCT6 (SLC16A5), MCT7 (SLC16A6), MCT9 (SLC16A9) ve MCT14 (SLC16A14) dahil olmak üzere diğer MCT'ler de beyinde bulunmuştur(278).

MCT'ler arasında, MCT1 (SLC16A1) beyin kapiller endotel hücrelerinde eksprese edilir ve laktik asidin hücre içi – ekstrasellüler substrat konsantrasyonlarına ile hücre zarı boyunca pH gradyanına dayalı olarak çift yönlü (içeri veya dışarı akış) taşınmasını sağlar. MCT1 taşıyıcısının, salisilik asit, nikotinik asit ve benzoik asit gibi eksojen substratları, küçük alkil veya aril gruplarına bağlı monokarboksilik asit ile KBB boyunca taşıdığı bilinmektedir. Bugüne kadar, MCT1 aracılı taşıma, 5-florourasil (5-FU), gempitabin ve gabapentin gibi ilaçların mono-karboksilik asitlerine bir ester veya amid bağları bağlayarak oral biyoyararlanımını iyileştirmek amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir(279). Ayrıca probenesid ve 6-merkaptopürin gibi bileşiklerin

MCT1 tarafından beyinden sistemik dolaşıma geri akışı, bu ilaçların beyne dağılımını sınırlandırılmaktadır(279).

MCT2, nöronlarda bulunan ana MCT'dir. MCT2, yüksek oranda oksidatif olan ve esas olarak laktat ithal etmesi muhtemel hücreler olan dendritlerde, dendritik dikenlerde ve nöronların aksonlarında bulunur(280). MCT2 aynı zamanda periferik dokularda eksprese edilirler, bu da periferik maruziyetten kaçınarak beyin içi hedefli ilaç iletimi için kullanılmasını zorlaştırır(277).

MCT3 (SLC16A8), retina epitel hücrelerine ek, ağırlıklı olarak koroid pleksus epitel hücrelerinde eksprese edilir ve laktik asidin retina dışına taşınmasını kolaylaştırmada önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, MCT3'ün genetik olarak silindiği farelerin retinal fonksiyonuna ilişkin elektrofizyolojik çalışmalar davranışta mütevazı değişiklikler ortaya çıkarsa da, retinal histolojide önemli bir anormallik saptanmamıştır(277).

MCT4 özellikle beyaz iskelet kası lifleri, astrositler, beyaz kan hücreleri ve kondrositler gibi glikolize dayanan dokularda ifade edilir(277).

MCT'lerin, tahmin edilmesi ve kontrol edilmesi zor olabilen çift yönlü taşıma sistemine sahip olması nedeniyle ilaç alımını artırmak için hedef olarak kullanılması zordur. Ayrıca, MCT'ler arasında örtüşen substrat özgüllükleri olması, MCT'lerin, GLUT'lar gibi taşıma mekanizmaları ile etkileşime girmesi spesifik hedef olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır.

2.3.3.1.1.4. Nükleozit Taşıyıcıları

Pürin (adenosin, guanozin ve inozin) ve pirimidin (üridin, sitidin ve timidin) nükleozidleri, sırasıyla DNA, RNA ve ATP'nin yapı taşları olan nükleotidlerin öncüleridir. Nükleozidler, DNA ve RNA sentezinde olduğu kadar beyindeki sinyalizasyon ve nöromodülasyonda da önemli işlevlere sahiptir. Bu moleküllerin hidrofilik özelliklerinden kaynaklı, KBB'yi geçmesi için özel taşıyıcılara gerek duyarlar. İnsanlarda nükleozit taşıyıcıları, dengeleyici çift yönlü taşıyıcılar (ENT, alt tip: ENT1—SLC29A1, ENT2—SLC29A2, ENT3—SLC29A3 ve ENT4—SLC29A4) ve konsantratif tek yönlü Na^+ / nükleozid kotransporterler (CNT, alt tip: CNT1—SLC28A1, CNT2—SLC28A2 ve CNT3—SLC28A3) olmak üzere iki aile mevcuttur(281). ENT ve CNT'ler, sırasıyla KBB'nin lümenal (kandan endotelyuma) ve abluminal (endotelden

beyine) tarafında eksprese edilir. ENT1, ENT2 ve ENT3 hem pürin hem de pirimidin nükleozidlerini taşıırken ENT4 spesifik olarak adenosin taşıır(282). CNT ailesi arasında, CNT3 hem pürin hem de pirimidin nükleositlerini taşıır; CNT2 guanozin, adenosin ve üridini taşıır; CNT1 ise, adenosin ve pirimidin nükleositlerini taşıır(282). NT'ler, nükleosit substratlarının yapısal homologları (psödosubstrat) olan terapötik ajanlar için hedef olarak belirlenmiştir. Örneğin antikanser ilaçları gempitabin (2',2'-diflorodeoksisitidin), zalsitabin ve sitarabin ile antiviral ajan zidovudinin ENT1 ve CNT1 yoluyla beyne girdiği gösterilmiştir(281).

2.3.3.1.1.5. Organik Anyon Taşıyıcıları

Organik anyon taşıyan polipeptitler (OATP'ler), endojen substratların Na⁺'dan bağımsız olarak çift yönlü taşınmasına aracılık ederler. Birkaç çalışma, OATP'ler tarafından substratlar için hücre içi bikarbonat, glutatyon veya glutatyon konjugatlarının olası değişimini göstermiştir. İnsanlarda ve kemirgenlerde SLC taşıyıcı ailesinin SLCO aile grubuna aittir. SLCO, 6 alt aileden ve 14 üyeden oluşur. OATP'ler altı ailede (OATP1–OATP6) gruplandırılmıştır, bunlardan OATP1 (alt aile: OATP1A, OATP1B, OATP1C ve OATP1D) en çok çalışılmıştır. OATP1A ailesinin üyeleri arasında OATP1A2 (SLCO1A2), OATP1B1 (SLCO1B1), OATP1B3 (SLCO1B3) ve OATP1C1 (SLCO1C1) bulunur.

OATP/Oatp aracılı taşıma ağırlıklı olarak kolaylaştırıcı diffüzyon veya sekonder aktif taşımadır. Çözünen maddelerin OATP/Oatp aracılığıyla taşınması, plazma zarı boyunca elektrokimyasal gradyan veya konsantrasyon gradyanına karşı ATP'ye bağımlı pompalar tarafından üretilen iyon gradyanları tarafından belirlenir(283).

İnsanlarda, OATP1A2, beyin kapiller endotel hücrelerinin luminal tarafında eksprese edilir. OATP1A2'nin insan beyni endotel hücrelerinde, ilaç ve nöroaktif peptitlerin iletimi yanı sıra organik metabolitlerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır(284). Daha yakın zamanlarda, insan korteksi, serebellum ve hipokampustan alınan parafine gömülmüş kesitler kullanılarak yapılan çalışmalarda, nöronlarda OATP1A2'nin lokalizasyonu keşfedilmiştir (285). OATP1A2 taşıyıcısı, safra tuzları, tiroid hormonları, steroid konjugatları, lineer/siklik peptitler ve birkaç ksenobiyotik dahil olmak üzere çok

çeşitli substratları da tanır. OATP1C1, koroid pleksus epitel hücrelerinin bazolateral tarafında eksprese edilir. Buna karşılık, OATP1C1 taşıyıcısı daha kısıtlayıcıdır ve tiroksine yüksek afinite gösterir(286).

OATP1A2'nin faydalı terapötik ajanların taşınmasındaki rolü araştırılmıştır. Mevcut kanıtlar, OATP1A2 taşıyıcısının alt tabaka stereokimyasal gereksinimleri açısından nispeten toleranslı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bir psödosubstrat yaklaşımı, potansiyel MSS ilaçlarının OATP1A2 yoluyla transmembran iletimi için umut verici bir strateji olabilmektedir.

2.3.3.1.2. KBB'de Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset Taşıma Sistemleri

ATP bağlayıcı kaset (ABC) akış taşıyıcıları, yetişkin beyninde hem kan-beyin, hem de kan-BOS bariyerlerinde bulunan, aktif olarak çok sayıda toksik ama aynı zamanda potansiyel terapötik bileşikler beyinden kana geçişini sağlayan önemli bir taşıyıcıdır(287).

Kan-beyin bariyeri arayüzünde, en iyi incelenen akış taşıyıcıları ABCB1 (P-glikoprotein veya MDR1) ve ABCG2'dir (meme kanseri direnç proteini, BCRP). ABCC2 (çoklu ilaca dirençli protein 2, MRP2) ve ABCC4 (MRP4) de kan-beyin bariyeri arayüzünde gösterilmiştir(288). Kan beyin bariyerinin serebral kapiller endotel hücrelerinde Pgp, BCRP, MRP2, MRP4 ve MRP5 taşıyıcıları baskındır ve bu taşıyıcılar bileşikler kana verdikleri için lümen zarında lokalizedir. Kan-BOS arayüzünde, ABCC1 (çoklu ilaca dirençli protein 1, MRP1) baskın dışa akış taşıyıcısı gibi görünmektedir, ancak ABCC4 (MRP4) ve ABCG2 (BCRP) de mevcuttur(288,289). Burada MRP1 ve MRP4, bileşikler pleksus stromasına gönderdiklerinden dolayı bazolateral membranlarda lokalizedir (289). P-gp'nin koroid pleksustaki subselüler yerleşimi net değildir.

Bu taşıyıcılar ATP'ye bağlanır ve taşıyıcı moleküllerle (glutatyon, glukuronik asit veya sülfat eklenmiş) konjuge edilmiş bileşikler hücre zarından geçirmek için hidrolizden elde edilen enerjiyi kullanırlar. KBB içinde P-gpler; antikanser ajanlar(örn., doksorubisin, vinblastin, paklitaksel ve metotreksat), doğal ürünler(örn., curcuminoidler), lineer/siklik peptitler (örn. pepstatin A, valinomisin) ve son zamanlarda beta amiloid gibi büyük makromoleküller dahil olmak üzere yapısal olarak ilgisiz çok çeşitli substratlarla etkileşime giren iyi karakterize edilen ilaç efflux taşıyıcısıdır.

Kan-BOS ve KBB bariyeri içinde çoklu MRP ilaç dışa atım taşıyıcılarının mevcudiyeti ve çeşitli MRP taşıyıcılarının substratlarındaki geniş örtüşme, ilaçların KBB geçirgenliğinde MRP'lerin rolünü belirlemeyi zorlaştırmıştır. MRP ilaç dışa atım taşıyıcıları, anti kanser ajanları (örneğin, doksorubisin, vinblastin, vinkristin ve metotreksat) ve ilaçların konjuge metabolitleri dahil olmak üzere çeşitli organik anyonlarla etkileşime girmektedirler(290).

BCRP, KBB'de tanımlanan en son ABC taşıyıcısıdır. Tek bir nükleotid bağlama alanı ve sadece altı transmembran bölgesi ile BCRP, bir dışa atım pompası olarak işlev görmek için homodimer oluşumu gerektiren bir yarı taşıyıcı olarak adlandırılır(291). BCRP'nin substratları, P-gp ve MRP1 ile önemli ölçüde örtüşmektedir. Sonuç olarak, birçok ilacın hem P-gp, hem MRP1 hem de BCRP aktivitesinin bir kombinasyonu ile beyne girmesi engellenir. Önemli ilaç dışa atım taşıyıcı yükümlülükleri olan ilaçlar için, ilacın dışa akış taşıyıcı ile etkileşimlerini en aza indirerek beyne ilaç iletiminde iyileştirmeler sağlanabilir. Dışa akış taşıyıcısına yönelik afiniteyi azaltmak için ilaç molekülü kimyasal olarak modifiye edilebilir veya ilaç dışa akım taşıyıcı aktivitesinin farmakolojik inhibisyonu yapılabilir. Birincisine bir örnek, George ve arkadaşlarının çalışmalarıdır. Burada taksanın KBB geçirgenliğini artırmak için bir karboksilik asit grubu ile taksanı C10 pozisyonunda kimyasal modifikasyona (TX-67) uğratarak dışa atımını azaltmıştır. TX-67'nin kimyasal modifikasyonları, beyin endotel hücrelerinde P-gp akışının azalmasına ve ana ilacın (paklitaksel) atılımında azalmaya neden olmuştur(292). C7 pozisyonuna eklenmiş karboksilik asit veya amid grupları ile de paklitaksel analoglarında benzer sonuçlar gözlenmiştir(293). Fakat ilacın akış taşıyıcı etkileşimlerini sınırlayan yapısal değişikliklerin ilaca verilen biyolojik tepkileri değiştirebileceğine dikkat edilmelidir. Ek olarak, yapıdaki bu tür değişiklikler, diğer taşıyıcı etkileşimlerine de neden olabilmektedir. Daha önce tartışılan paklitaksel örneğinde, KBB geçirgenliğindeki artışlar, karboksilik asit taşıyıcıları yoluyla artan akışın ve P-gp tarafından azaltılmış akışının net bir sonucu olarak görülebilir(293). Kimyasal modifikasyona uygun olmayan ajanlar, lipozomal veya polimerik ilaç taşıyıcılarına formülasyon yoluyla veya ilaç akış taşıyıcı aktivitesini inhibe eden ajanların birlikte uygulanması yoluyla ilaç dışa akış taşıyıcılarından kaçabilir. İlaçların lipozomlara veya polimerik misellere dahil edilmesi, ilacı ilaç akış

taşıyıcılarıyla etkileşime girmekten korur(294). Bu yaklaşım, beyne çok çeşitli terapötik ajanların verilmesini artırmak için kullanılmıştır.

Akış taşıyıcı sistemler içerisinde P-gp ilaç akış taşıyıcı sistem inhibitörlerinin uygulanması kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. İlaç akışının farmakolojik inhibisyonu, ilaçların bağırsak emilimini ve doku dağılımını arttırmak için kullanılmış olsa da KBB'de dışa akış taşıyıcı aktivitesinin tam inhibisyonu zordur.

Tirozin kinaz inhibitörlerinin çoğu hem P-gp hem de BCRP substratlarıdır. Hem P-gp hem de BCRP nakavt farelerde yapılan çalışmalar, vahşi tip kontrollere kıyasla bu ajanların beyin dağılımında önemli artışlar gösterirken, akış taşıyıcılarının farmakolojik inhibisyonunun etkileri, incelenen kinaz inhibitörüne bağlıdır. Bu tür bulgular, KBB'de ilaç akış taşıyıcılarının farmakolojik modülasyonunun etkinliğinin, büyük ölçüde ilacın fizikokimyasal özelliklerine bağlı olacağını göstermektedir.

2.3.3.2. Veziküler Taşıma Sistemleri

Genel olarak sıvı fazlı endositoz ve absorptif endositoz olmak üzere iki adet veziküler taşıma sistemi mevcuttur. Her iki süreç de enerji gerektirir ve metabolik inhibitörler tarafından inhibe edilebilir. Genel olarak beyin kapiller endotel hücrelerinde veziküler transport diğer kapiller yataklara göre daha azdır. Bununla birlikte, normal beyin fonksiyonu için önemli olan birkaç büyük makromolekül, reseptör aracılı endositoz yoluyla kandan beyne taşınır. Bu nedenle, beyin kılcal endotel hücrelerinde bu spesifik reseptör aracılı taşıma süreçlerini kullanmak için terapötik ajanların ve biyomakromoleküllerin tasarımı, KBB boyunca hücre içi geçirgenliği arttırmak için başka bir yaklaşımı temsil eder. Beyin endotel hücreleri boyunca reseptör aracılı taşınmaya maruz kalan spesifik ligandlara konjuge ilaçların verilmesine yönelik yöntem, “Truva Atı” yaklaşımı olarak adlandırılmıştır. Difteri toksin reseptörü aracılı veziküler transport, insülin reseptörü aracılı veziküler transport, LRP1 aracılı veziküler transport, transferrin reseptörü aracılı veziküler transport sık kullanılan veziküler transport sistemleridir.

KBB'de reseptör aracılı veziküler transsitoz kullanımı, beyne makromolekül ilaç dağıtımı ve beyinde ilaç birikimini artırmak için büyük bir potansiyel göstermektedir. Bununla birlikte, bu yöntemle ilgili en sınırlayıcı

dezavantaj, düşük verimliliğidir. Örneğin, transferrin-konjuge misellerin enjekte edilen dozun beyindeki yüzdesinin %0.03 ID/g olarak rapor edilmiş(295). İnsülin reseptör antikorunun ağır zinciri ile eritropoetinin kaynaştırıldığı bir çalışmada ise eritropoetinin enjekte edilen dozun beyindeki yüzdesinin %0.02 ID/g olduğu tespit edilmiştir(296). LRP1 reseptörü daha iyi dağıtım verimliliği göstermiş olsa da, beyne geçen miktar sadece %0.25 ID/g olduğu tespit edilmiştir(297). Bu durumlar, verilen ilacın çok küçük bir kısmının beyindeki hedefine ulaştığını göstermektedir.

İlaçların beyne iletilmesi için çeşitli reseptör aracılı veziküler taşıma yollarının değerlendirilmesindeki sınırlamalardan biri de hem verilen ilacın hem de KBB geçirgenliğini incelemek için kullanılan klinik öncesi modelin standardizasyonun eksikliğidir. Ek olarak pek çok ligand hedefli nanoparçacık formülasyonlarının, hedeflenen ligandın etkinliğe katkısının kanıtlanmamış olması nedeniyle, faz III klinik deneylerine ilerlememiştir.

2.3.3.2.1. Transferrin Reseptörü Aracılı Veziküler Transport Sistemi

Transferrin, demirin vücutta taşınması için çok önemli olan, moleküler ağırlığı 80 kDa olan monomerik bir glikoproteindir. Demir, transferrin ile kompleks halinde hücreye, transferrinin plazma zarı üzerindeki reseptörüne bağlanmasıyla başlatılan bir endositik süreç yoluyla girer. Beyin kapiller endotel hücreleri, diğer hücre tiplerine kıyasla yüzeylerinde yüksek yoğunlukta transferrin reseptörlerine sahiptir. Transferrinin beyin kılcal endotel hücreleri üzerindeki reseptörüne bağlanması, transferrin-demir kompleksinin internalizasyonunu tetikler. Beyin endotel hücresinin içinde, demir endozomdaki transferrinden çıkarılır ve beyinin ekstrasellüler sıvısına salınır, transferrin ve reseptörü lümene yani plazma zarına geri döndürülür(298).

KBB'de transferrin reseptörlerinin miktarı ve reseptöre bağlanmayı takiben ortaya çıkan veziküler taşıma, beyne hedeflenen ilaç iletimi için bu taşıma sisteminin potansiyel kullanımına ilgi uyandırmıştır. Bununla birlikte, bu taşıma yolunun kullanılmasındaki en büyük sınırlama, transferrinin kendisinin hücresel işleme tabi tutulması ve nihayetinde beyin kılcal endotel hücresinin lümen yüzeyine geri döndürülmesidir. Bu nedenle, transferrin molekülünün bir ilaç taşıyıcısı olarak kullanılması ile KBB'de geçirgenlik kabiliyetini artırılması olası değildir. Bu sorunu aşmak için araştırmacılar, transfer reseptörüne karşı bir

ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaya uygun görünen bir murin monoklonal antikoru OX26'yı tanımladılar(229). OX26'yı bir ilaç taşıyıcısı olarak ideal kılan üç önemli özelliği vardır. İlk olarak, transferrin reseptörüne yönelik diğer antikorların aksine, bu antikor reseptöre bağlanır ve endositozu tetikler. İkincisi, internalize edilen antikoru hücresel işlemesi sonrası, internalize edilmiş OX26'nın önemli bir bölümünün beyin tarafındaki abluminal plazma membranında ekzositoz ile tekrardan salınımına geçmesidir. Üçüncü önemli özellik ise OX26 antikoru, transferrin reseptörü üzerindeki transferrin ligand bağlama bölgesinden farklı olan bir endotelial epitopuna bağlanmasıdır; bu nedenle OX26 monoklonal antikor, beyin endotelial hücreleri üzerindeki reseptörüne transferrin bağlanmasına müdahale etmemektedir. OX26 antikoru, epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vazodilatör peptidi (VIP), antisens oligonükleotitler, peptid nükleik asitler (PNA'lar), metotreksat, sinir büyüme faktörü ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör dahil olmak üzere çeşitli moleküllerle konjuge edilebildiğinden, etkili bir beyin iletim vektörü olduğu kanıtlanmıştır(299). Ayrıca OX26'nın koroid pleksuslar yoluyla da kan-BOS bariyerlerinden demir taşınmasına aracılık ettiğini gösteren kanıtlar vardır(300).

2.3.3.2.2. İnsülin Reseptörü Aracılı Veziküler Transport Sistemi

İnsülin, glikoz regülasyonunda önemli işlevleri olan bir pankreatik peptid hormonudur. MSS'de insülin reseptörlerinin varlığı, insülinin nöronal hücrelerdeki nörotropik ve nöromodülatör etkileriyle birleştiğinde, beyinde de önemli işlevleri olabileceğini düşündürmektedir(301,302). Birkaç nöronun insülin mRNA'sını eksprese ettiği bilirse de beyindeki insülin düzeylerinin kandaki peptid konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olduğu bulgusu, beyindeki insülinin MSS kaynaklı olmadığını düşündürür.

Beyin mikrodamar endotel hücrelerinin lümenal plazma membranında yüksek afiniteli insülin reseptörlerinin varlığını ve bunların insülinin veziküler taşınmasına katılımlarını gösteren çalışmalar, bu peptidin KBB'ye reseptör aracılı bir taşıma işlemi yoluyla nüfuz ettiğini göstermektedir. Birkaç çalışma, terapötik ajanların ve makromoleküllerin beyne iletilmesi için bir taşıma vektörü olarak insülinin potansiyel kullanımını desteklemektedir.

Kabanov ve ark. antipsikotik ajan olan haloperidolün farelerde beyne

verilmesi için insülinin polimer misellerine konjugasyonu incelediği bir çalışmada, akciğer ve karaciğer gibi periferik organlarda bu misellerin birikiminin azaldığı görülürken, MSS'deki etkilerinin artırdığı görülmüştür(303). Bu çalışmalar, beyin mikrovasküler endotel hücreleri kültürlerinde insülin ile konjuge misellerin taşınmasının, insülin konjuge misellerin reseptör aracılı veziküler taşınma sürecinden geçtiğini ve serbest insülin tarafından inhibe edilebilen doyurulabilir bir süreç olduğunu göstermektedir(304).

İnsülin ayrıca proteinler için bir KBB taşıma vektörü olarak kullanılmıştır. Fukuta ve ark. tarafından IV olarak verilen ve peroksidaz enzimi olan HRP'nin insülinle konjuge edilmiş ve insüline konjuge edilmemiş HRP'nin beyindeki aktivitesini incelediğinde, insülin konjuge HRP'nin, insüline konjuge edilmemiş HRP ile tedavi edilen farelere kıyasla beyinde önemli ölçüde daha yüksek peroksidaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir(305).

Bu çalışmalar, insülin reseptörünün beyne bir taşıma sistemi olarak uygulanabilirliğini göstermektedir. Olumlu prelinik verilere rağmen, ilaçların beyne verilmesi için bu "Truva Atı" teknolojisini kullanarak klinik etkinliği gösteren kanıt eksikliği mevcuttur.

2.3.3.2.3. LRP1 Aracılı Veziküler Transport Sistemi

Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 1 (LRP1/CD91/ α 2-makroglobulin reseptörü), LDL reseptör ailesinin bir üyesidir ve beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin hem luminal hem de abluminal plazma membranında yüksek oranda eksprese edilir. Ligandlarına bağlandıktan sonra, reseptörler ligandı reseptör aracılı bir transsitoz süreci yoluyla KBB boyunca taşır. LRP1 reseptörünün iki formu vardır: biri zara bağlı form ve diğeri çözünür form. KBB'de görevli ilaç hedefi olarak kullanılan esas form olarak LRP1'in membrana bağlı formudur.

LRP, apoE, doku plazminojen aktivatörü (tPA), proteinaz inhibitörleri (plazminojen aktivatör inhibitörü-1), APP, kan pıhtılaşma faktörleri (örneğin, faktör VIII, protein S), büyüme faktörleri, bakteriyel ve viral proteinler, laktoferrin ve A β vahşi tip ve mutant peptitler gibi yapısal ve fonksiyonel olarak ilişkisiz birçok ligandı bağlayabilmektedir(306). LRP1'in bu ligandların hücresel internalizasyonuna ve bunların KBB boyunca taşınmasına aracılık ettiği

bildirilmiştir.

Çeşitli nörolojik enflamatuvar bozuklukların tedavisinde kullanılan ve KBB'yi gerçekten geçip geçemeyeceği belirsiz olan intravenöz immünoglobulinin (IVIg), LRP1 aracılığıyla KBB'yi aştığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (307).

Anjiopeps, LRP1 aracılığıyla taşınma yolunu kullanan, beyin kılcal damarlarında yüksek transsitoz kapasitesi ve önemli parankimal beyin birikimi gösteren bir peptittir. Glioma hücrelerindeki KBB'de LRP-1'in aşırı ekspresyonunun rapor edilmesi, LRP-1 aracılı taşınmanın glioma tedavisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir(308). Bu nedenle KBB'yi aşan potansiyel vektör olarak geçen anjiyopeps peptitleri geliştirilmiştir. Anjiyopeps, beyin tümörünü tedavi etmek için vektör olarak tümör hücrelerine doksorubisin, etoposid, temozolomid, paklitaksel gibi kemoterapötikleri veya siRNA veya DNA yüklü nanopartikülleri vermek amacıyla başarılı şekilde kullanılmıştır(309–312). Peptidin yüksek transsitozunun yanı sıra özellikle dikkat çekici olan şey, peptite birden fazla ilaç molekülü ekleme yeteneğidir. Anjiyopeps, peptit omurgasına üç adede kadar küçük molekül bağlama yeteneği ile, transsitoz yolunun nispeten daha düşük verimliliğine karşı avantaj sağlamaktadır.

Anjiopeps'in yanı sıra, apoE de KBB boyunca LRP1 aracılı transsitoz için kullanılan başka bir ligandır. ApoE'yi doğrudan hedefleme vektörü olarak kullanmak yerine, polisorbata 80 (Tween-80) sıklıkla kullanılır. Polisorbata 80 kaplı nanopartiküllerin, normal şartlarda KBB'nin geçirimsiz olan kontrast maddeleri beyne iletebildiği göstermiştir. Bununla birlikte, aynı nanopartiküller apoE geninden yoksun farelerde KBB'yi geçmez, bu durum polisorbata 80 kaplı nanopartiküllerin hücre yüzeyinde apoE aracılığıyla absorbe edebileceğini ve reseptör aracılı transsitoz yoluyla KBB'yi geçebileceğini gösterir(313).

2.3.3.2.4. Difteri Toksin Reseptörü Aracılı Veziküler Transport Sistemi

KBB boyunca taşınmak için geliştirilen bir başka yeni ligand, difteri toksininin toksik olmayan bir mutanti olan çapraz-reaksiyona giren materyal 197'dir (CRM197)(314). Difteri toksini gibi, KBB'de eksprese edilen difteri reseptörlerine bağlanır. CRM197 taşıyıcılı poli-bütilsiyanoakrilat nanoparçacıkları, tek tabakalı insan beyni mikrovasküler endotel hücrelerini in

vitro olarak geçebildiği gösterilmiştir. Ek olarak, nanopartiküllerinin üzerindeki CRM197 miktarındaki artış ile de insan beyni mikrovasküler endotel hücreler tarafından geçirgenliğinin arttığı gösterilmiştir(315). Başka bir çalışma, CRM197'nin hücre zarında caveolin-1 proteininin miktarının arttırdığını, buna bağlı pinositotik veziküllerin arttığını ve beyin mikrodamarında da sıkı bağlantı ile ilişkili proteinlerin yeniden düzenlendiğini buna bağlı olarak da KBB geçirgenliğinin arttığını ileri sürmüştür(314).

2.3.4. Transnazal Yolak

KBB'yi atlamaya alternatif bir yaklaşım, ilacın intranazal (IN) verilmesidir. Nazal pasajlardaki koku alma bölgesi yüksek geçirgenliğe sahip bir epitele, yüksek kan akışına, gözenekli endotelial membran yapısına, geniş yüzey alanına ve ilk geçiş metabolizmasına uğramaması nedeniyle beyne hızlı ilaç iletimi sağlar(316).

Olfaktor bulbus, beynin koku ile ilgili duyuşal bilgileri almak ve sıralamakla görevli kısmıdır. Burun boşluğundaki koku alma epitelindeki koku alma reseptör nöronlarından, etmoid kemikteki olfaktör bulbus aksonal çıkıntıları duyuşal girdiyi alır. Olfaktor bulbusa iletilen duyuşal bilgiler, olfaktör bulbus içindeki internöronlar aracılığıyla diğer beyin merkezlerine iletilir. IN yol, beyne ve BOS'a ilaç verilmesi için burun boşluğundaki epitel hücrelerindeki nöronal projeksiyonları kullanır. Bu nedenle, diğer doğrudan beyin uygulama yollarına göre, daha az invaziv olması, siliyer epitelin MSS'ye ilaç girişi için geniş bir yüzey alanı sağlaması, molekülün mukoza ile temas etmesiyle beraber KBB'yi atlayıp, çok hızlı şekilde beyin omurilik sıvısına taşınması bakımından avantajlıdır (317,318).

İlaç koku alma epiteline ulaştığında, IN iletimi, ilacın beyne nüfuz etmesi için iki farklı yol kullanır. İntranöronal yol, ilacın olfaktör reseptör nöronlarına ve olfaktör bulbusa retrograd aksonal taşınmasını içerir. Bu yol, ilacın fiziksel-kimyasal özelliklerine bağlı olarak koku soğancığına ulaşması saatler, günler süren daha yavaş yoldur. Ekstranöronal yol için moleküller, nöronu çevreleyen perinöral boşluktan olfaktör bulbusa doğru yayılır. İlaç, olfaktör bulbusa yayıldığında, difüzyon süreci ile yakın beyin bölgelerine girer(319).

Transnazal yol, sistemik uyulamaya kıyasla düşük doz uygulanması, kendi kendine uygulanabilmesi ve steril tekniklere gerek duyulmaması nedeniyle

avantaj sağlamaktadır. Fakat bu tekniğin bazı sınırlamaları vardır. Bunlar; yolun sık kullanımında görülen burun mukozasının hasarı, mukosilyer klirens sistemi nedeniyle ilaçların burun boşluğundan hızlı bir şekilde temizlenmesi, burun tıkanıklığına bağlı interferans bunlardan bir kaçıdır(320). Ayrıca nazal mukoza hem solunum mukozasıyla ilişkili hem de yüksek oranda vaskülarizedir. Mukoza vaskülarizasyonunu yakındaki karotid arterlerden sağlar. Bu nedenle ilaçlar, burun boşluğunun arkasındaki koku alma epiteline ulaşmadan önce, nazal mukozadan ve/veya solunum mukozasından sistemik dolaşıma absorpsiyon potansiyeli vardır.

Nazal kavitenin anatomik özelliklerinden dolayı olfaktör epitele ilacın verilmesi zor ve değişken olabilir. Bu nedenlerle, beyne IN verilmesi için en uygun terapötik ajanlar, nazal kavitede nazal ve solunum epiteli içinde minimum sistemik absorpsiyona sahip olacak büyük makromoleküllerdir. Geçirgenlik arttırıcılar olsun ya da olmasın peptit ve protein terapötiklerinin IN yolla beyne verilmesinin kullanıldığı hayvan modellerinde olumlu sonuçlar saptanmıştır.

Bununla birlikte, buradaki ana engel, ilacın beynin küçük, lokalize bölgelerine sınırlı penetrasyonu olması nedeniyle, beyne ilaç verilmesi için bu yolun etkinliğinin klinik olarak gösterilmesi zordur. Yine de olanzapin, sumatriptan ve buspiron gibi ajanların mukoadezif mikroemülsiyon formülasyonları intranazal olarak verildiğinde iyi etkinlik göstermiştir(321–323). Her ne kadar başarılı sonuçlar elde edilebilse de transnazal ilaç transport yaklaşımının fizibilitesi, devam eden klinik çalışmaların sonuçlarına bağlı olacaktır.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışması, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı araştırma laboratuvarında etik kurul izni (Etik No: 2021/98) alındıktan sonra yapılmıştır. Başlangıçta çalışmanın örneklem büyüklüğü her grupta ortalama 7 adet rat olacak şekilde toplam 42 rat olarak planlanmıştır. Ancak deney sürecinde ratlarda kayıp olması nedeniyle etik kurula tekrar başvurularak rat sayısı artırılmış ve toplam 45 adet ile tamamlanmıştır. Mevcut çalışmada her grupta strese maruz kalmamış, standartlara uygun kafeslerde bakılan erişkin erkek Wistar Albino sıçan (yaklaşık 390-460 g ağırlığında) kullanılmıştır. Sıçanlar deney süresince 23 ± 1 °C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık-12 saat karanlık siklusunun sağlandığı ışık döngüsünde, sesten yalıtılmış ve havalandırma sisteminin mevcut olduğu, %55±4 oranda nemli ortamda bir ortamda barındırılmışlardır. Deney hayvanları her grupta toplam 7-9 rat olacak şekilde 6 gruba ayrılmış olup yem ve su ihtiyaçları ad libitum şekilde sağlanmıştır. Deney uygulaması 08.00-17.00 saatleri arasında gerçekleştirilmiş olup, deney ortamının ışık, nem ve ses düzeyi sürekli kontrol altında tutulmuştur.

3.2. Deney Grupları

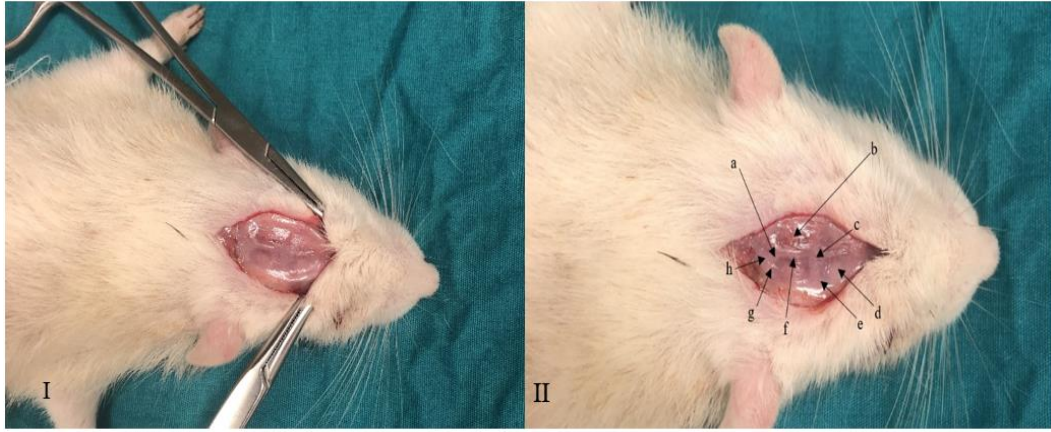
Penisilin G ile indüklenen deneysel status epileptikus modelinde mannitolün beyin elektriksel aktivitesine olan etkisi ve bu etkide kan beyin bariyerindeki geçirgenlik artışının rolünü araştırmak için sıçanlar her grupta en az 7 rat olacak şekilde rastgele 6 gruba ayrılmıştır (Tablo 3). Deney esnasında 400 mg/kg valproik asit grubunda (5. Grup) 2 rat kayıt başlangıcında eksitus olmuştur. Bu nedenle 400 mg/kg valproik asit grubu 8 rat ile tamamlanmıştır. 50 mg/kg fenitoin grubunda (3. Grup) ise 2 rat, fenitoin infüzyonu sonrası eksitus olması nedeniyle 9 rat ile tamamlanmıştır. Diğer gruplarda ise 7'şer rat bulunmaktadır. Valproik asit (400mg/kg) grubunda 3 rattan hem bos hem kan örneği alınmamıştır. 1 rattan ise sadece kan örneği alınabilmiştir. 400 mg/kg valproik asit grubunun diğer üyelerinden hem bos hem de kan örneği alınmıştır. 50 mg/kg fenitoin grubunda ise 4 rattan hem bos hem de kan örneği

alınmamıştır, bu grupta 5 rattan bos ve kan örneği alınmıştır. Mannitol(1.5 gr/kg)+fenitoin(25 mg/kg) grubunda (4. Grup) ise 6 rattan hem bos hem de kan örneği alınmış olup; 1 rattan sadece kan örneği alınmış olup, bos örneği alınmamıştır. Mannitol (1.5 mg/kg)+valproik asit (200 mg/kg) grubunda (6. Grup) ise 1 rattan bos örneği alınmamış olup sadece kan örneği alınmıştır. Grubun diğer üyelerinden hem kan hem de bos örneği alınmıştır.

Tablo-3: Deney Grupları ve Örnek Sayıları					
Gruplar		Toplam rat sayısı (n)	ECoG kaydı alınan rat sayısı (n)	Toplam kan örneği sayısı (n)	Toplam bos örneği sayısı (n)
1. Grup	Kontrol grubu (2 ml SF, i.v.)	7	7	-	-
2. Grup	Mannitol (1,5 gr/kg, i.v.)	7	7	-	-
3. Grup	Fenitoin (50 mg/kg i.v.)	9	7	7	5
4. Grup	Mannitol (1,5 gr/kg i.v.) ve fenitoin (25 mg/kg i.v.)	7	7	7	6
5. Grup	Valproik asit (400 mg/kg i.v.)	8	6	5	4
6. Grup	Mannitol (1,5 gr/kg i.v.) ve valproik asit (200 mg/kg, i.v.)	7	7	7	6
Toplam:		45	43	26	21

3.3. Deney Prosedürünün Uygulanışı

TGOÜ deney hayvanları laboratuvarından temin edilen ratlarda anestezi, deneyden hemen önce hazırlanan ve intraperitoneal (İP) yolla verilen 1.25 g/kg dozda üretan (%25'lik solusyon) ile sağlanmıştır. Kafa üzerindeki tüyler traş edildikten sonra, kafa derileri orta hattın rostrokaudal yönde 2-4 cm uzunluğunda kesilip açılmıştır. Kafa kemiği üzerinde bulunan tendon ve faysalar uzaklaştırıldıktan sonra varsa küçük kanama odakları elektrokoter ile koterize edilmiştir.



Resim-1: I: Ratın, kafa kemikleri üzerindeki tendon ve fasyalar uzaklaştırıldıktan sonraki görüntüsü
II: kranium kemikleri anatomisi (a:lambda noktası, b:paryetal kemik, c:bregma noktası, d:frontal kemik, e:koronal sütür, f:sagittal sütür, g:lambdoid sütür, h:interparyetal kemik)

Ortaya çıkan kafatası kemiği bir tur motoru ile inceltilerek bregma hattının solunda kalan kısım kaldırılmıştır. Kafatası kemiği tamamen uzaklaştırıldıktan sonra dura mater kaldırılıp açığa çıkan korteks 37⁰C'lik serum fizyolojik emdirilmiş bir parça teril gazlı bez ile kapatılmıştır. Operasyon sonrası sıçanlar stereotaksik cihaza yerleştirilerek sabitlenmiştir. Beyin ile diğer dokuların sıvı kaybını ve kayıt sırasında oluşacak artefaktları önlemek amacıyla sıvı vazelin havuzu oluşturulmuştur.



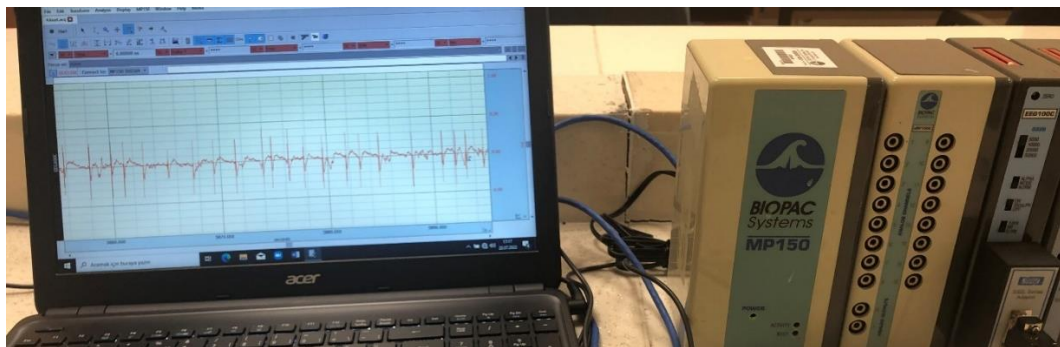
Resim-2: A-B: Paryetal kemiğin çıkartılması, C: Ratın stereotaksik cihaza yerleştirilmesi

Elektrofizyolojik kayıt için 2 adet Ag/AgCl top elektrot ve topraklama amacıyla 1 adet Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Top elektrotlardan pozitif olanı bregma 1 mm anterior- sagital sütür 2 mm laterale, negatif olanı ise bregma 5 mm posterior, sagital sütür 2 mm laterale gelecek Şekilde yerleştirilmiştir. Bir adet referans elektrot ise kayıt jeli sürülerek tutturulmuştur.



Resim-3: A-B-C: Elektrotların yerleştirilmesi

Elektrotlardan alınan electrocortikografi (ECoG) aktivitesi veri kayıt sistemine online olarak kaydedilmiştir. Elektrofizyolojik kayıtlar TGO fizyoloji laboratuvarında mevcut olan Biopac System MP150 cihazı ile yapılmıştır.



Resim-4: Biopac System MP150 cihazı ve electrocortikografi (ECoG) aktivitesi kaydı

Öncelikle deneyde kullanılan tüm ratların bazal ECoG kayıtları alındı. Daha sonra deneysel status epileptikus modeli için kontrol grubu dahil, ürethan anestezisi altındaki tüm ratlara intrahemisferik olarak Penisilin G Potasyum (PGP) enjeksiyonu yapıldı. PGP epileptiform aktivite oluşturulmak için 500 ünite (İÜ) doz ve 200 IU/μl şeklinde, toplam 2.5 μl hacim içerisinde sol sommatomotor kortekse Bregma'dan 3 mm lateral, 2 mm posterior ve 2 mm ventral koordinatlarında Hamilton mikroenjektörü kullanılarak intrakortikal (İk) verildi. Çözücü olarak distile su kullanıldı. PGP İk uygulanması sonrası ECoG'de bilateral diken ve diken-dalga kompleksleri ile karakterize epileptiform aktivite oluştuğu görüldü. Oluşan dikenlerin amplitüdü ve frekansı 20-30 dk içinde kararlı bir düzeye ulaşması beklendi.



Resim-5: A-B-C: Penisilin G Potasyum (PGP) enjeksiyonu

İ.v. infüzyon için kuyruk venine 24G intraket yerleştirildi ve İlk PGP uygulanmasından 30 dk sonra 10 dk süreli İV uygulamalara başlandı. Hayvanlar basit rastgele örnekleme yöntemi ile 6 gruba ayrıldı. 1. grup olan kontrol grubuna herhangi bir ilaç verilmedi. İV 2 ml SF verildi. 2. gruba 1,5 gr/kg dozunda mannitol i.v. infüzyon şeklinde verildi. 3. gruba ise 50 mg/kg dozunda fenitoin i.v. infüzyon verildi. 4. gruba 1,5 gr/kg dozunda mannitol ve 25 mg/kg dozunda fenitoin i.v. infüzyon şeklinde verildi. 5. gruba 400 mg/kg dozunda valproik asit i.v. infüzyon şeklinde verildi. 6. gruba 1,5 gr/kg dozunda mannitol ve 200 mg/kg dozunda valproik asit i.v. infüzyon şeklinde verildi.



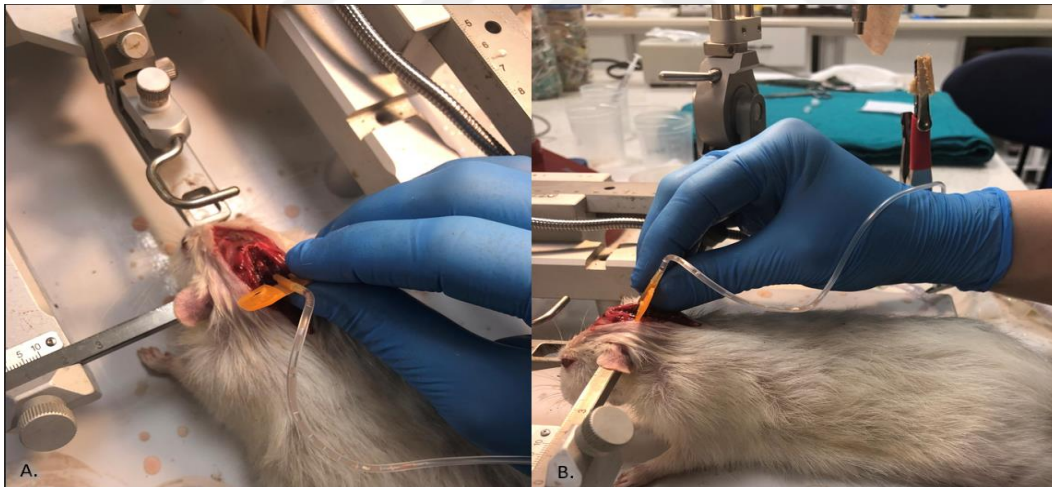
Resim-6: A: Kuyruk venine yerleştirilmiş 24G intraket, B: Deney gruplarına infüzyon uygulanması

Elektrotlar ile alınan aktivite EEG150B (Biopac) arabiriminde yükseltilerek Bipoac MP150 veri kayıt sistemine aktarıldı ve korteksten elde edilen analog sinyaller sayısal hale dönüştürüldükten sonra bir USB kablosu yardımıyla bilgisayara nakledildi. Beyin aktivitesi “Data Acquisition Systems” (Biopac) yazılımı ile görüntülenecek şekilde ve deney sonrası analiz için bilgisayara kaydedildi. Kayıt tamamlandıktan sonra anestezi altındaki nöbet önleyici ilaç verilen ratlardaki sisterna magnadan BOS alımı için yeniden pozisyon verildi. Ratların baş ve boynunu net bir şekilde ortaya çıkarmak için burun aşağı bakacak şekilde stereotaktik çerçeveye sabitlendi. İlk vertebra ile foramen magnum arasındaki mesafeyi açmak için burnun yaklaşık 45°–90° açıyla aşağı doğrultuldu. Operasyon planlanan bölge traş edildi ve cilt dezenfekte edildi. Bir neşter kullanılarak orta hat üzerinden keskin bir cilt insizyonu yapıldı. Boyun kasları bistüri ve penset yardımı ile ekarte edilerek atlas kemiğinin procesusu spinosusu ile occipital protuberance arasındaki atlantookspital membran açığa çıkarıldı. Kanayan damarlar ve kaslar gereklilik durumuna bağlı olarak koterize edildi.



Resim-7: A: Baş ve boyuna pozisyon verilmesi, B: Atlantookspital fasyanın açığa çıkarılması

26 g iğne ucu ve 60 derecelik giriş açısı ile occipital protuberancenin hemen altından, atlantookspital membran delinerek sisterna magnaya girildi ve BOS örneği alındı.



Resim-8: A-B: Sisterna magnadan BOS alımı

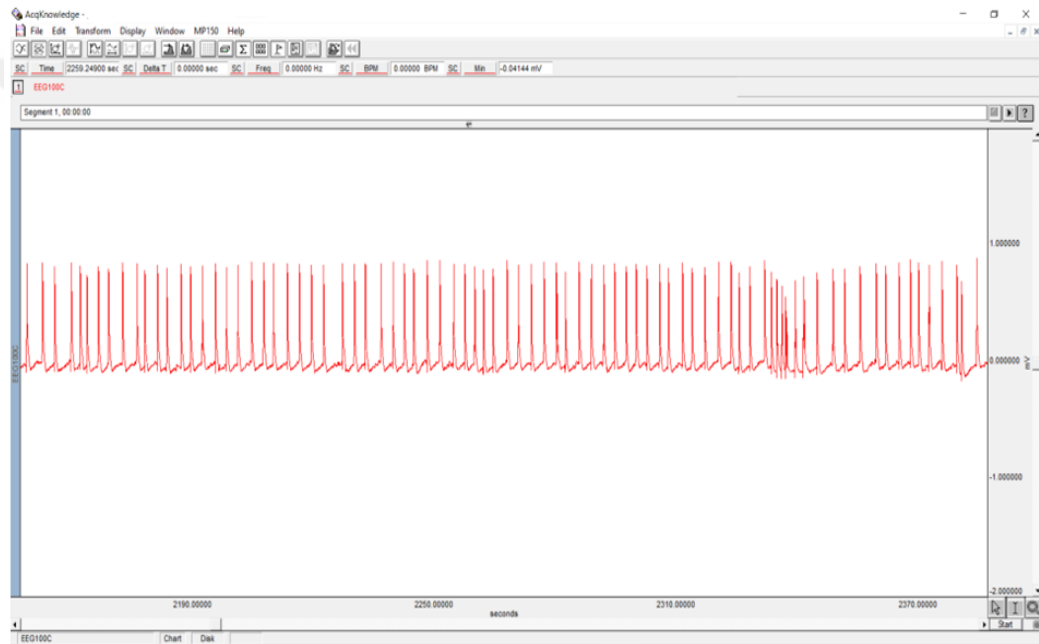
BOS alımı tamamlandıktan sonra intrakardiyak girişim ile ratlardan serum örnekleri alındı. Örnekler uygun koşullarda biyokimya laboratuvarına gönderilerek BOS ve serumdan valproik asit, fenitoin düzeyleri çalışıldı.

3.4. Elektrokortikografik Kayıtların Değerlendirilmesi

PGP İk uygulanması sonrası ECoG'de oluşan diken ve diken-dalga komplekslerin frekanslarının enjeksiyon sonrası 20 ve 30. dk'lar arası 10 dk'lık dönemden elde edilecek dalga frekansı ortalaması 1. dk değeri olarak kaydedildi.

Daha sonra ise devamındaki her 10 dk'lık aralardan sonraki 1 dk'lık dönemlerdeki dalga frekansı değerleri kayıt boyunca kaydedildi.

Elektrotlar ile alınan aktivite EEG150B (Biopac) arabiriminde yükseltilerek Bipoac MP150 veri kayıt sistemine aktarılıp, korteksten elde edilen analog sinyaller sayısal hale dönüştürüldükten sonra bir USB kablosu yardımıyla bilgisayara nakledildi. Beyin aktivitesi "Data Acquisition Systems" (Biopac) yazılımı ile deney sonrası analiz için bilgisayara kaydedildi. Devamında 10'ar dk'lık aralarla, 1 dk'lık dilimlerin diken frekansı ortalamaları alındı. İstatistikler, alınan 1 dk'lık dilimlerin değerleri kullanılarak yapıldı ve grafiklerdeki zaman göstergeleri de buna göre ayarlandı.



Resim-9: ECoG kaydında kullanılan program ve kayıt anının bir görüntüsü (3. Grup/4. Rat)

3.5. İstatistiksel Analiz

Alınan ECoG kayıtları AcqKnowledge® (v:3.8.1) yazılımının özellikleriyle birer dakikalık dilimlere ayrıldı. Analiz için kullanılacak 1 dakika içerisindeki dikenlerin sayısı hesaplandı. Bu işlem tüm rat kayıtları için tekrarlandı. Tüm ECoG kayıtları rakamsal verilere dönüştürüldü. İstatistiksel analizler SPSS v12.0 yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Çalışmadaki tüm verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk ve çarpıklık (skewness) ile basıklık (kurtosis) değerlerinden hesaplanan Z-skoru testi(324) ile değerlendirildi. Normal dağılan ECoG verilerinin analizi için One-Way

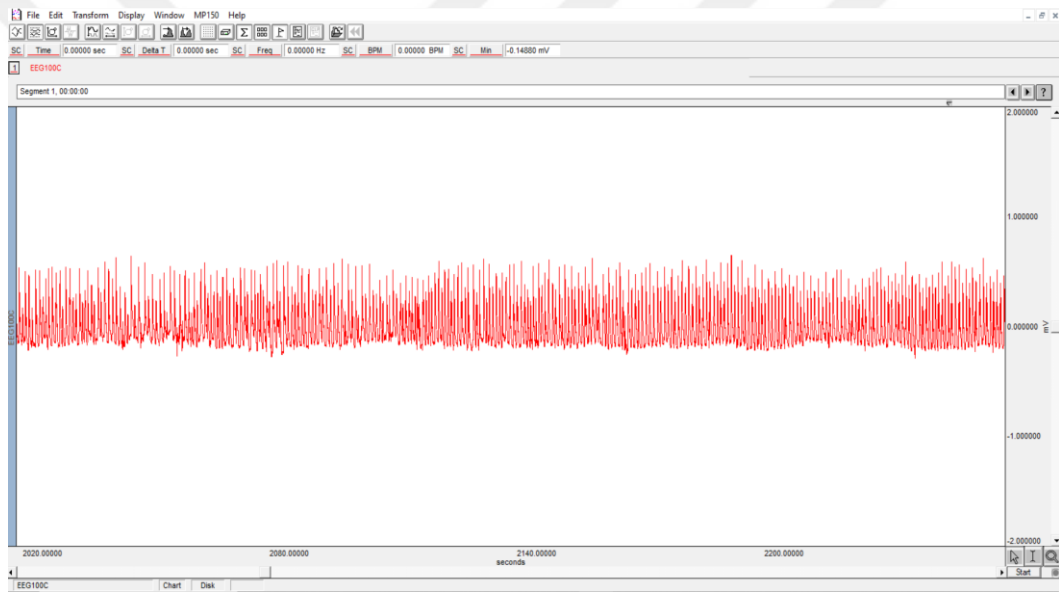
ANNOVA kullanıldı. Verilerin homojenitesine değerlendirmek için Levene testi (homojen varyans testi) kullanıldı. Sonuçlarına göre de gerekli verilerde Welch testi uygulandı. İlaçların serum, BOS sonuçlarını ve VPA içeren grupların BOS/serum oranlarının sonuçlarını analiz etmek için ise Independent-Samples T-test kullanıldı. Fenitoin+mannitol grubundaki BOS/serum oranları normal dağılıma uymadıkları için fenitoin - fenitoin+mannitol gruplarındaki BOS/kan oranlarının analizleri Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Analiz sonuçları ortalama $\pm$ SHO (standart hata ortalaması) ile gösterildi. Tüm analizlerdeki edilen sonuçların p değerleri $<0,05$ ise farklılık istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmada intrakraniyel PGP enjeksiyonu ile oluşturulan DSE modelindeki ratlarda uygulanan mannitol, fenitoin, fenitoin+mannitol, valproik asit ve valproik asit+mannitol infüzyonları ile kontrol grubunun DSE süresince diken frekansları incelendi.

İntrakraniyel PGP enjeksiyonu bütün gruplarda epileptiform aktiviteye neden oldu. İntrakraniyel PGP enjeksiyonu sonrası yaklaşık 3-5 dk içinde diken-dalga kompleksleri ve diken aktivite ile karakterize epileptiform aktivite oluştu. Epileptiform aktiviteler yaklaşık 20-30 dk içinde kararlı duruma ulaştı (Resim 10) ve yaklaşık 3-4 saat kadar devam etti.



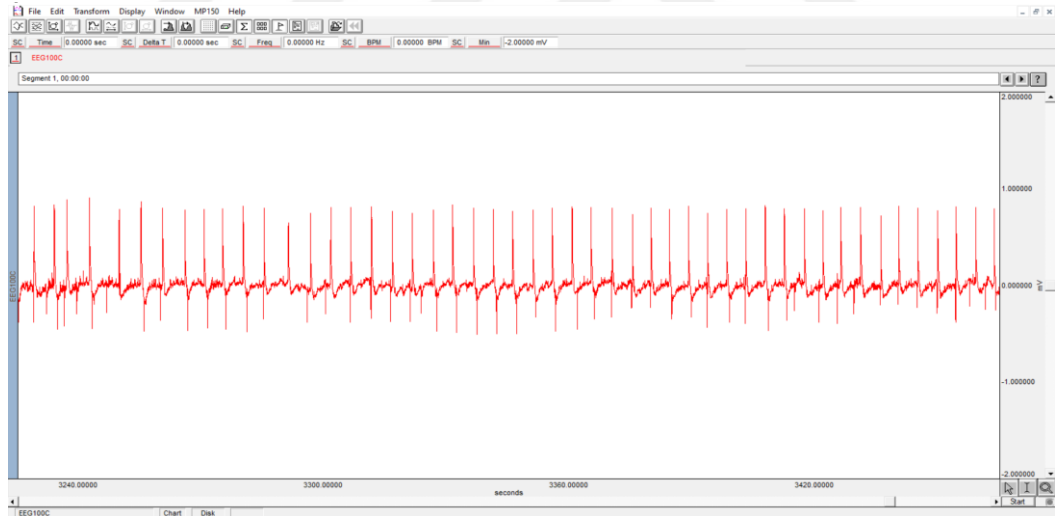
Resim-10: İntrakraniyel PGP sonrası oluşan epileptiform aktivitenin IV infüzyon tedavisi öncesi kararlı durum hali (6.grup/2.rat)

İntrakraniyel PGP enjeksiyonu sonrası oluşan epileptik aktivitenin kararlı duruma gelmesi 20-30 dakikada gerçekleştiğinden diken frekansı incelenirken, intrakraniyel PGP enjeksiyonunun 20. ve 30. dakika arasındaki 10 dakikalık dönemden sağlanan verilerin ortalama değeri 1. dakika değeri olarak kaydedildi, devamında ise 10'ar dakikalık aralıklarla alınan 1'er dakikalık dilimlerin diken frekans ortalamaları hesaplandı. Analizler, alınan 1 dakikalık dilimlerin değerleri kullanılarak yapıldı.

Deney sürecinde 3. gruptaki (fenitoin 50 mg/kg) 2 rat infüzyon sırasında, 5. grupta (400 mg/kg VPA) ise 2 rat bazal kayıt sırasında, yine 400 mg/kg VPA kullanılan 5. grupta 1 ratın toplam kaydın 2. saatinde exitus olduğu görüldü. 6

grupta (mannitol 1.5 gr/kg+ VPA 200 mg/kg) ise 1 rat yine toplam kaydın 2. saatinde, 4. grupta (mannitol 1.5 gr/kg+ fenitoin 25 mg/kg) ise 1 ratın kaydın 90. dakikasında eksitus olduğu görüldü.

Kayıt tamamlandıktan sonra ratlardan BOS ve kan numuneleri alındı. Çalışma sırasında fenitoin 50 mg/kg kullanılan 3. gruptaki 2 rat ve 400 mg/kg VPA kullanılan 5. gruptaki 2 ratın tedavi öncesi ve 400 mg/kg VPA kullanılan 5. gruptaki 1 ratın ilaç infüzyonu sonrası kısa zamanda eksitus olması nedeniyle bu ratlardan BOS ve kan numunesi alınmadı. Ek olarak 3. gruptaki (fenitoin 50 mg/kg grubu) 2 rattan, 4. gruptaki (mannitol 1.5 gr/kg+ fenitoin 25 mg/kg grubu) 1 rattan, 5. gruptaki (400 mg/kg VPA grubu) 1 rattan ve 6. gruptaki (mannitol 1.5 gr/kg+ VPA 200 mg/kg grubu) 1 rattan BOS numunesi alınamadı. 3. gruptaki (fenitoin 50 mg/kg grubu) 1 rattan serum numunesi numune yetersizliği nedeniyle çalışılmadı. Numuneler TOGÜ biyokimya laboratuvarında çalışıldı. Elde edilen sayısal değerler analiz edildi. Analiz sonuçları ortalama $\pm$ SHO (standart hata ortalaması) ile gösterildi.



Resim-11: İntrakraniyel PGP sonrası oluşan epileptik aktivitenin, IV infüzyon tedavisi sonrası örnek gösterimi (5.grup/8.rat)

Epileptik aktivitenin analizi sonrası elde edilen ortalama $\pm$ SHO değerleri tablo-4'te verilmiştir.

Tablo-4: Gruplardan alınan kayıtların diken frekansları (her 10 dk'daki 1 dk'lık ortalama değerler) (ortalama frekans±SHO)					
Ortalama±SEM					
Gruplar	1.dk	2.dk	3.dk	4.dk	5.dk
I. grup	42,37 (±10,42)	39,57 (±8,7)	39,00 (±14,56)	38,57 (±13,22)	36,57 (±13,55)
II. grup	43,54 (±15,45)	38,85 (±15,37)	37,14 (±13,68)	37,85 (±12,29)	37,71 (±14,36)
III. grup	31,05 (±10,95)	36,57 (±14,80)	31,57 (±14,21)	30,28 (±6,42)	32,85 (±6,86)
IV. grup	27,50 (±14,58)	24,71 (±20,20)	25,14 (±14,55)	23,14 (±16,57)	26,42 (±15,12)
V. grup	26,61 (±7,90)	20,83 (±9,28)	19,60 (±14,01)	28,40 (±11,69)	25,40 (±11,32)
VI. grup	38,20 (±16,51)	40,71 (±23,01)	35,00 (±11,91)	30,85 (±8,66)	31,57 (±6,97)
Ortalama±SEM					
Gruplar	6.dk	7.dk	8.dk	9.dk	10.dk
I. grup	36,28 (±15,41)	33,14 (±14,01)	27,85 (±15,14)	26,00 (±11,86)	25,28 (±12,49)
II. grup	41,28 (±16,00)	34,71 (±14,53)	32,57 (±14,52)	32,28 (±14,60)	30,85 (±12,17)
III. grup	33,14 (±6,56)	32,71 (±7,11)	32,00 (±9,79)	32,00 (±8,73)	33,85 (±10,54)
IV. grup	22,83 (±15,96)	24,66 (±17,15)	21,33 (±18,26)	21,50 (±15,17)	18,16 (±15,70)
V. grup	24,60 (±8,53)	28,40 (±9,12)	27,60 (±9,18)	30,40 (±9,93)	31,20 (±8,34)
VI. grup	30,71 (±10,07)	32,00 (±12,01)	32,57 (±10,08)	29,14 (±10,60)	31,14 (±10,33)
I. grup: Kontrol grubu (2ml sf i.v. infüzyonu) II. grup: Mannitol 1,5 gr/kg i.v. infüzyon grubu III. grup: Fenitoin 50 mg/kg i.v. infüzyon grubu IV. grup: Mannitol 1,5 gr/kg i.v. infüzyon ve fenitoin 25 mg/kg i.v. infüzyon grubu V. grup: Valproik asit 400 mg/kg i.v. infüzyon grubu VI. grup: Mannitol 1,5 gr/kg i.v. infüzyon ve valproik asit 200 mg/kg i.v. infüzyon grubu NOT: İntrakraniyel PGP enjeksiyonunun 20. ve 30. dakika arasındaki 10 dakikalık dönemden sağlanan verilerin ortalama değeri 1. dakika değeri olarak kaydedildi, devamında ise 10'ar dakikalık aralıklarla alınan 1'er dakikalık dilimlerin diken frekans ortalamaları hesaplandı, analizler, 1 dakikalık dilimlerin değerleri ile yapıldı					

Epileptiform aktivitenin analizi sonrası elde edilen p değerleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü. Tüm zaman dilimlerindeki p değerleri 0.05'ten büyük saptandı.

Kan ve BOS numuneleri incelendiğinde ise 3. grup (fenitoin 50 mg/kg) için BOS fenitoin düzeyi ortalaması 3,12 (±2,09) µg/ml olarak ölçüldü. 3. grubun (fenitoin 50 mg/kg) serum fenitoin düzeyi ortalaması ise 5,93 (±3,86) µg/ml olarak ölçüldü. Mannitol (1.5gr/kg)+fenitoin (25 mg/kg) kullanılan 4. grup için BOS fenitoin düzeyi ortalaması 1,30 (±1,45) µg/ml ölçüldü. 4. grup için serum fenitoin düzeyi ortalaması 5,60 (±3,42) µg/ml olarak ölçüldü (tablo 5). 50 mg/kg kullanılan fenitoin grubu (3.grup) ve 25 mg/kg fenitoin+1.5 gr/kg kullanılan mannitol (4. grup) grubu arasında BOS/serum oranı açısından yapılan analizde p değeri>0.05 olarak saptandı. Anlamlı fark görülmedi. Numune materyali üzerinden gruplar arasındaki fark analiz edildiğinde ise fenitoin 50 mg/kg kullanılan 3. grup ile mannitol (1.5gr/kg)+ fenitoin (25 mg/kg) kullanılan 4. grup arasında hem kan hem de BOS fenitoin düzeyi açısından anlamlı fark görülmedi. Analiz sonuçlarının p değeri >0.05 olarak saptandı.

Tablo-5: Fenitoin ve Fenitoin+Mannitol Gruplarının Laboratuvar Sonuçları						
Gruplar	Serum fenitoin düzeyi (ort±sho)	Serum numune sayısı (n)	BOS fenitoin düzeyi (ort±sho)	BOS numune sayısı (n)	BOS/Serum oranı (ort±sho)	BOS/Serum oranı örnek sayısı (n)
3. grup: Fenitoin (50 mg/kg)	5,93 (±3,86) µg/ml	6	3,12 (±2,09) µg/ml	5	0,35 (±0,19)	4
4. grup: Mannitol (1,5 gr/kg) + fenitoin (25 mg/kg)	5,60 (±3,42) µg/ml	7	1,30 (±1,45) µg/ml	6	0,31 (±0,29)	6

Valproik asit sonuçları değerlendirildiğinde ise; 400 mg/kg VPA kullanılan 5. grupta serum valproik asit düzeyi ortalaması 360,80 (±164,78) µg/ml olarak ölçüldü. 400 mg/kg VPA kullanılan 5. grubun BOS valproik asit düzeyi ortalaması ise 234,37 (±139,30) µg/ml olarak ölçüldü. Mannitol (1,5 gr/kg) + valproik asit (200 mg/kg) kullanılan 6. grup için serum valproik asit düzeyi ortalaması 146,47 (±129,13) µg/ml olarak saptandı. Bu grubun BOS valproik asit düzeyi ortalaması ise 91,45 (±61,52) µg/ml olarak ölçüldü (tablo-6). 400mg/kg VPA kullanılan 5. grup ile mannitol (1,5 gr/kg) + VPA (200 mg/kg) kullanılan 6. grup arasında VPA'nın BOS/serum oranı açısından yapılan analizde p değeri >0.05 olarak saptandı. Anlamlı fark görülmedi. Yine bu gruplar arasında VPA BOS değeri açısından yapılan analizde ise p değeri >0.05 olarak saptandı. Anlamlı fark görülmedi. Bu grupların serum VPA değeri açısından yapılan analizinde p değeri < 0.05 olarak saptandı. 5. grubun 6. gruba kıyasla daha yüksek kan valproik asit düzeyine sahip olduğu görüldü.

Tablo-6: Valproik asit ve Valproik asit+Mannitol Gruplarının Laboratuvar Sonuçları						
Gruplar	Serum VPA düzeyi (ort±sho)	Serum numune sayısı (n)	BOS VPA düzeyi (ort±sho)	BOS numune sayısı (n)	BOS/Serum oranı (ort±sho)	BOS/Serum oranı örnek sayısı (n)
5. grup: Valproik asit (400 mg/kg)	360,80 (±164,78) µg/ml	5	234,37 (±139,30) µg/ml	4	0,63 (±0,20)	4
6. grup: Mannitol (1,5 gr/kg) + Valproik asit (200 mg/kg)	146,47 (±129,13) µg/ml	7	91,45 (±61,52) µg/ml	6	0,61 (±0,12)	6

5- TARTIŞMA

Bu çalışma penisilin ile indüklenen deneysel status epileptikus modelinde oluşturulan status epileptikusta, penisilin enjeksiyonundan 30 dk sonra IV olarak verilen mannitolün, valproik asitin, fenitoinin, fenitoinle beraber verilen mannitolün ve valproik asitle beraber verilen mannitolün nöbeti sonlandırmada, nöbetlerin diken frekansını anlamlı olarak azaltmada etkisiz olduğunu düşündürmektedir. Literatürde bu konu ile ilgili çeşitli sonuçlar olmakla birlikte, çalışmamızın sonuçlarına benzer sonuçlar da mevcuttur.

Nöbet aktivitesinin 30 dakikadan daha uzun "sürdürüldüğü" stimülasyon protokollerinde, nöbetler kendi kendine devam ettiği, yani stimülasyon durdurulduğunda bile status epileptikusun kendi kendini idame ettiği bilinmektedir. Bu, nöbetin sonlandırılması için gerekli olan süreçlerin tükendiğini ve/veya nöbet aktivitesini yönlendiren süreçlerin güçlendiğini gösterir(16). İnsanlarda nöbetlerin kendi kendine devam ettiğine dair bir kanıt yoktur; ancak, yarım saatten fazla süren nöbetlerin kontrol edilmesinin zorlaştığına dair gözlemler bu yorumu desteklemektedir (19).

Potansiyel nöbet önleyici tedavilerin SE üzerindeki etkilerini karşılaştırırken dikkate alınması gereken önemli bir faktör, SE ne kadar uzun süre devam ederse kontrol edilmesinin o kadar zor olmasıdır. Status epileptikus patofizyolojisinde, tekli nöbetlerden kendi kendine devam eden SE'ye geçişte, GABA_A reseptörlerinin sinaptik zardan fonksiyonel olarak inaktif oldukları sitoplazmaya hareket ettikleri ve buna bağlı da GABA_A reseptör sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum ise benzodiazepinlere karşı zamana bağlı farmakodirenç gelişimini ve nöbetlerin kendi kendine devam etme kısmen eğilimini açıklayabilmektedir(19). Benzodiazepinlere kıyasla daha yavaş olsa da, hem valproik asit, hem de fenitoin gibi birçok nöbet önleyici ilaçta SE süresi uzadıkça farmakodirenç gelişmektedir(50,51).

Penisilin kaynaklı epilepsi modelinin avantajı, penisilini uygulamanın birkaç yolunun olmasıdır. İndüklemek istenen modele bağlı olarak, penisilin uygulaması intraperitoneal, intramusküler, intravenöz veya intrakortikal olabilmektedir(2). Penisilin G, beyin omurilik sıvısındaki (BOS) konsantrasyonuna

bakılmaksızın en yüksek epileptojenik potansiyele sahip penisilin grubu antibiyotiktir. GABA'nın GABA_A reseptörlerine bağlanmasının inhibisyonu yoluyla inhibitör sinaptik transmisyonu müdahale, penisilin kaynaklı merkezi sinir sistemi uyarımının patogeneziyi açıklayan yaygın olarak kabul edilen bir mekanizmadır(3). GABA aracılı inhibisyonundaki bir azalma, uyarıcı kortikal afferentlerin merkezi sinir sistemi uyarımı üretmesine veya epileptiform deşarjları tetiklemesine neden olur. Ek olarak epileptik aktiviteye neden olan hücrel Cl⁻ gradyenti, transmembran GABA_A reseptör kompleksi içerisindeki çeşitli ligant bağlanma yerlerine değişken ligand bağlanmasıyla da yakından modüle edilir. Dikkate değer olan, GABA_A aracılı etkileri olan benzodiazepinler ve barbitüratlar, penisilin kaynaklı konvülsiyonları tedavi etmede fenitoinden daha etkilidir(4). Ayrıca penisilin kaynaklı epilepsi modelinin yosunlu liflerin filizlenmesini indüklediği, dentat girusun granüler hücre tabakasındaki nöronlarda kayba neden olduğu ve kullanılan penisilin dozu ile bağlantılı olmakla beraber hipokampal nöronlarda kayba neden olduğu bildirilmiştir(2). Tüm bu özellikler, penisilin iyi bir nöbet indüksiyon modeli olabileceğini göstermektedir.

Penisilin kaynaklı epilepsi modelini kullanan çalışmalarda ilaç etkinliği açısından farklı sonuçlar mevcuttur. Golden ve ark. tarafından yapılan penisilin ile indüklenen status epileptikus çalışmasında 40 mg/kg dozda fenitoin kullanılmıştır. Tedavi, diken dalgaların ortaya çıkmasından 30 dk sonra verilmiş ve 90. dakikada kontrol grubu ile kıyasla fenitoin grubunda spike aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendiği gösterilmiştir (325). Edmonds ve ark. tarafından yapılan bir diğer penisilin ile indüklenen epilepsi modelinde ise kontrol hayvanlarında başlangıçta nöbet sıklığında artış olsa da 2. Saatin sonundaki deşarj aktivitesi sıklığı başlangıç aktivitesindeki değerin %60'ı kadar azalmıştır. Bu durum düşük doz (30 mg/kg p.o.) fenitoin grubunda kontrol grubuyla benzerken; yüksek doz (60 mg/kg p.o.) fenitoin grubunda ise daha düşük deşarj aktivite sıklığı saptanmış, fakat kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamış (326). Stark ve ark. tarafından kediler üzerinde yapılan çalışmasında ise IV fenitoinin 15 mg/kg dozunun kısa süreli bir nöbet önleyici etki gösterdiğini 7.5 mg/kg ve 30 mg/kg dozlarının ise anlamlı etki göstermediğini saptamıştır (327). Louis ve ark. tarafından fenitoinin etkinliğinin araştırıldığı penisilin kullanılan deneysel epilepsi modelinde, nöbetlerin penisilin dozuyla ilişkili olarak fenitoina cevap verdiği gösterilmiştir. Çalışma tasarımı incelendiğinde ise fenitoinin verilmeye başlandığı

zamanın, ‘nöbet aktivitesi başladıktan sonra’ olarak belirtilmiştir (328). Kasap Acungil ve ark. tarafından yapılan, i.p 300 mg/kg valproik asitin kullanıldığı penisilin kaynaklı deneysel epilepsi modeli çalışmada ise grupların hiçbirinde nöbet aktivitesinin durmadığı ama epileptiform aktivite sıklığının valproik asit kullanılan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir. Çalışma tasarımı incelendiğinde ise infüzyonların İ.C. penisilin uygulamasından yaklaşık 20 dakika sonra verildiği görülmüştür (329).

Bu çalışmada ise infüzyonlar İ.C. penisilin uygulamasından yaklaşık 30. dakika sonra verilmiştir. Fenitoin+mannitol grubunda epileptik aktivite sıklığında kontrol grubu ile kıyaslanınca anlamlı olmayan zamana bağlı azalma görülmüştür. Bu durum fenitoin grubunda tespit edilememiştir ve gruplar arasında anlamlı fark yoktur. Valproik asit grubunda ise başlangıç döneminde kısa süreli olan ve kontrol grubu ile anlamlı fark göstermeyen bir azalma tespit edilmiştir. Valproik asit+mannitol grubunda ise nöbet sıklığında kontrol grubuyla kıyaslanınca anlamlı fark göstermeyen dalgalanma izlenmiştir.

Diğer farmakolojik deneysel status epileptikus modelleri değerlendirildiğinde ise sonuçlarımız ile uyumlu bulgular mevcuttur. Örneğin; potansiyel nöbet önleyici ilaçların kainik asit kaynaklı SE üzerindeki etkisi incelendiğinde; fenitoin (50 - 210 mg/kg) ve karbamazepinin (80 mg/kg) kainik asit kaynaklı SE'ye karşı etkisiz olduğu görülmüştür. Valproatın (100 - 250 mg/kg) ise bu modelde hem antikonvülsan hem de prokonvülsan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Diazepam (3 ila 5 mg/kg) ve fenobarbital (50 mg/kg) ise bu modelde etkili antikonvülzanlar olduğunu göstermiştir (330).

SE'nin Li-pilokarpin ve pilokarpin modelinde ise; pilokarpin enjeksiyonu öncesi verilen diazepam, fenobarbital ve valproat ile SE gelişmesi engellenirken, karbamazepin ve fenitoin bu konuda etkisizdir. Ayrıca SE bir kez yerleştikten sonra diazepam, sodyum valproat, karbamazepin, fenobarbital ve fenitoinin uygulandığında, ilaçların SE'yi sonlandırmakta etkisiz olduğu gösterilmiştir(330,331).

Kobalt/Homosistein Tiyolaktone modelinde ise; klinik SE tedavisinde etkili olan tüm antikonvülzanların bu modelde etkili olduğu belirtilmektedir (330). Walton ve Treiman tarafından geliştiren bu model incelendiğinde ise; Nöbetler, homosistein tiyolaktone enjeksiyonundan yaklaşık 10 ila 15 dakika sonra ortaya çıkar. İkincil JTKS ise enjeksiyondan 30 dakika sonra başladığı görülmüştür(332).

Çalışma tasarımı incelendiğinde ise nöbetlerin genel olarak ataklar şeklinde olduğu ve ilaç uygulamalarına 2. sekonder JTKSE atağı ile başladığı görülmüştür. Walton ve Treiman tarafından yapılan çalışma incelendiğinde ise 1. ve 2. sekonder JTKSE arasındaki ortalama sürenin 8.5 ± 4.4 dk olduğu saptanmıştır(333). Bu modelin sınırlamaları ise modeldeki SE sırasında görülen yüksek mortalite, kobalt lezyonu ile homosistein tiyolakton enjeksiyonu için gerekli olan uzun hazırlık aşamaları ve ağırlıklı olarak tedavideki kısmi yanıtlılıktır. Aynı zamanda nöbet önleyici ilaçların erken dönemde başlanması ve nöbet önleyici ilaçların bu modelde etkin olması, nöbet süresi arttıkça nöbet önleyici ilaçlara karşı farmakokinetik direnç geliştiğini düşündürmektedir.

Numunelerin sonuçlarının değerlendirilmesinde ise; çalışmamızda 50 mg/kg i.v. fenitoin (3.grup) ile 1,5 gr/kg mannitol + 25 mg/kg fenitoin (4.grup) infüzyonu verilen grup arasındaki BOS/serum oranı, serum değeri ve BOS değeri açısından yapılan istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Fenitoin dozunun 4. grupta düşük kullanılmasına rağmen, hem kan hemde BOS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmaması, mannitolün, fenitoinin farmakokinetik özelliklerini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Valproik asit sonuçları değerlendirildiğinde ise; 400 mg/kg IV valproik asit verilen 5. grup ile 1,5 gr/kg IV mannitol+200 mg/kg IV valproik asit verilen 6. grup arasındaki BOS/serum oranı, BOS değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yokken; valproik asit serum değerinin 5. grupta yüksek olması, mannitolün valproik asitin kan beyin bariyerinden geçirgenliğini artırabileceğini düşündürmektedir.

Litaratür KBB'nin osmotik bozulmasının ilaç geçirgenliği üzerinden incelendiğinde ise Marchi ve ark. tarafından yapılan çalışmada intrakarotid olarak verilen mannitolün diazepam ve fenitoine karşı geçirgenliği artırdığı, ilaçların artmış lipofilitesinin beyne ilaç penetrasyonu için önemli olduğunu ancak KBB bozulduğunda proteine ilaç bağlanma seviyesinin, toplam ilaç birikiminin ana denetleyicisi olduğunu, beynin su içeriğinin ilaç geçirgenliğini kontrol eden önemli bir faktör olmadığını göstermiştir. Ayrıca bozulmamış serebrovasküler bölgelere kıyasla toplam ilaç miktarı artsa da daha düşük serbest ilaç seviyeleri ile karakterize olduğu gösterilmiştir. İlaça dirençli epilepsi modellerinde bu mekanizmalar ile ilaçların beyin dağılımına katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (7).

Kaube ve ark. tarafından yapılan ve kan-beyin bariyerinin bozulmasından sonra sumatriptanın incelendiği bir çalışmada tek başına sumatriptan verilen gruba

kıyasla mannitol+sumatriptan verilen gruptaki trigeminal uyarılmış potansiyellerin tepeden tepeye amplitüdlerinde anlamlı azalma saptanmıştır. Çalışmada kan beyin bariyerinin Evans mavisi ile geçirgenliğinde artış sağladığı gösterilmiştir. Ek olarak çalışmada intravenöz yol ile 35 ml/kg mannitol (%12.5) kullanıldığı belirtilmiştir(334).

Burger ve ark. ise sistemik mannitol uygulaması sonrası rekombinant viral vektör derivesi olan rAAV2 uygulamasının, MSS'ye rAAV2'nin geçişini belirgin arttırdığını göstermiştir (335). McCarty ve ark. ise MSS'ye rAAV2 geçişindeki artışın IV mannitol verilmesinden 8dk sonra en belirgin olduğunu göstermiştir (336).

Geçirgenliği artıran optimal IV mannitol dozu ise hala belirsizdir. K. B. Chen ve ark. tarafından yapılan çalışmada IV 0.5mg/kg dozun KBB de bir geçirgenliğe neden olmadığını göstermiştir (247).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma penisilin ile indüklenen deneysel status epileptikus modelinde oluşturulan status epileptikusta penisilin enjeksiyonundan 30 dk sonra IV olarak verilen mannitolün, valproik asitin, fenitoinin, fenitoinle beraber verilen mannitolün ve valproik asitle beraber verilen mannitolün SE'yi sonlandırmada, nöbetlerin diken frekansını anlamlı olarak azaltmada etkisiz olduğunu düşündürmektedir. Bunun temel sebebi SE'de ilaçlara karşı zamana bağlı farmakodirenç neden olabilmektedir.

Fenitoin ve fenitoin+mannitol verilen gruplar arasındaki BOS/serum oranı, serum değeri ve BOS değeri açısından yapılan istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Fenitoin dozunun 4. grupta düşük kullanılmasına rağmen, hem kan hemde BOS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmaması, mannitolün, fenitoinin farmakokinetik özelliklerini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Valproik asit grupları sonuçlarında ise 400 mg/kg IV valproik asit verilen 5. grup ile 1,5 gr/kg IV mannitol ve 200 mg/kg IV valproik asit verilen 6. grup arasındaki BOS/serum oranı, BOS değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yokken; valproik asit serum değerinin 5. grupta yüksek olması, mannitolün valproik asitin kan beyin bariyerinden geçirgenliğini artırdığını düşündürmektedir.

Fakat çalışmamızda bazı önemli kısıtlayıcı noktalar mevcuttur. Bunlar; bazı BOS numunelerinin kan ile kontamine olması, cerrahi prosedürün olası etkisi ve bazı ratlardan BOS alınamaması bu çalışmanın önemli kısıtlayıcı özellikleridir ve bu yüzden sonuçların doğruluğu için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Arman F. Konvülzif Status Epileptikus. In: Bora İ, Yeni SN GC, editor. Epilepsi. 2nd ed. 2018. p. 503–35.
2. Rubio C, Rubio-Osornio M, Retana-Marquez S, Lopez M, Custodio V, Paz C. In Vivo Experimental Models of Epilepsy. Cent Nerv Syst Agents Med Chem [Internet]. 2010 Dec 1;10(4):298–309. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5249&volume=10&issue=4&spage=298>
3. Wanleenuwat P, Suntharampillai N, Iwanowski P. Antibiotic-induced epileptic seizures: mechanisms of action and clinical considerations. Seizure [Internet]. 2020;81(May):167–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.08.012>
4. Chow KM, Hui AC, Szeto CC. Neurotoxicity induced by beta-lactam antibiotics: From bench to bedside. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2023 Feb 3];24(10):649–53. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-005-0021-y>
5. Tenny S, Patel R, Thorell W. Mannitol. StatPearls [Internet]. 2022 Nov 14 [cited 2023 Feb 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470392/>
6. Rapoport SI. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. Cell Mol Neurobiol [Internet]. 2000 [cited 2023 Feb 5];20(2):217–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10696511/>
7. Marchi N, Betto G, Fazio V, Fan Q, Ghosh C, Machado A, et al. Blood-brain barrier damage and brain penetration of antiepileptic drugs: Role of serum proteins and brain edema. Epilepsia [Internet]. 2009 Apr;50(4):664–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2008.01989.x>
8. Phenytoin | C₁₅H₁₂N₂O₂ - PubChem [Internet]. [cited 2023 Feb 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1775#section=LogP&fullscreen=true>
9. NCBI. VALPROIC ACID | C₈H₁₆O₂ - PubChem [Internet]. 2021 [cited

2023 Feb 5]. p. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3121#sec>.

Available from:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3121#section=LogP&fullscreen=true>

10. National Center for Biotechnology Information. Mannitol | C₆H₁₄O₆ - PubChem [Internet]. PubChem Compound Summary for CID 6251. [cited 2023 Feb 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mannitol>
11. Patsalos PN, Zugman M, Lake C, James A, Ratnaraj N, Sander JW. Serum protein binding of 25 antiepileptic drugs in a routine clinical setting: A comparison of free non-protein-bound concentrations. *Epilepsia* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2023 Feb 5];58(7):1234–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epi.13802>
12. Serafini R. A comparison of anticonvulsant efficacy and action mechanism of Mannitol vs Phenytoin in adult rat neocortical slices. *IBRO Reports*. 2017 Dec 1;3:55–64.
13. Baran H, Lassmann H, Sperk G, Seitelberger F, Hornykiewicz O. Effect of mannitol treatment on brain neurotransmitter markers in kainic acid-induced epilepsy. *Neuroscience* [Internet]. 1987 Jun;21(3):679–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452287900297>
14. Haglund MM, Hochman DW. Furosemide and Mannitol Suppression of Epileptic Activity in the Human Brain. *J Neurophysiol* [Internet]. 2005 Aug;94(2):907–18. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00944.2004>
15. van Vliet EA, da Costa Araujo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* [Internet]. 2007 Feb 1;130(2):521–34. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awl318>
16. Walker MC. Pathophysiology of status epilepticus. *Neurosci Lett*. 2018 Feb;667:84–91.
17. Chen JWY, Naylor DE, Wasterlain CG. Advances in the pathophysiology of status epilepticus. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 2007 Apr;115(s186):7–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600->

0404.2007.00803.x

18. Wylie T, Sandhu DS, Murr N. Status Epilepticus. 2022 May 15 [cited 2023 Jan 16]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430686/>
19. Chen JW, Wasterlain CG. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurol* [Internet]. 2006 Mar;5(3):246–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147444220670374X>
20. Leitingner M, Trinkä E, Zimmermann G, Granbichler CA, Kobulashvili T, Siebert U. Epidemiology of status epilepticus in adults: Apples, pears, and oranges-A critical review-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). *Epilepsy Behav* [Internet]. 2020 [cited 2023 Jan 29];103:106720. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106720>
21. Knake S, Rosenow F, Vescovi M, Oertel WH, Mueller HH, Wirbatz A, et al. Incidence of status epilepticus in adults in Germany: A prospective, population-based study. *Epilepsia*. 2001;42(6):714–8.
22. Trinkä E, Höfler J, Zerbs A. Causes of status epilepticus. *Epilepsia* [Internet]. 2012 Sep [cited 2023 Jan 29];53(SUPPL. 4):127–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1528-1167.2012.03622.x>
23. Trinkä E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, et al. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015 Oct;56(10):1515–23.
24. Burman RJ, Rosch RE, Wilmschurst JM, Sen A, Ramantani G, Akerman CJ, et al. Why won't it stop? The dynamics of benzodiazepine resistance in status epilepticus. [cited 2023 Jan 14]; Available from: https://github.com/richardjburman/bzp_review.
25. Barker-Haliski M, White HS. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. [cited 2023 Jan 16]; Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
26. Aronica EM, Gorter JA, Paupard M-C, Grooms SY, Bennett MVL, Zukin RS. Status Epilepticus-Induced Alterations in Metabotropic Glutamate Receptor Expression in Young and Adult Rats. 1997;

27. Wasterlain CG, Mazarati AM, Naylor D, Niquet J, Liu H, Suchomelova L, et al. Short-Term Plasticity of Hippocampal Neuropeptides and Neuronal Circuitry in Experimental Status Epilepticus. *Epilepsia* [Internet]. 2002 Jul 24;43:20–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1528-1157.43.s.5.1.x>
28. Hamil NE, Cock HR, Walker MC. Acute down-regulation of adenosine A1 receptor activity in status epilepticus. *Epilepsia* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2023 Jan 29];53(1):177–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1528-1167.2011.03340.x>
29. Chandler KE, Princivalle AP, Fabian-Fine R, Bowery NG, Kullmann DM, Walker MC. Plasticity of GABAB Receptor-Mediated Heterosynaptic Interactions at Mossy Fibers After Status Epilepticus. *J Neurosci* [Internet]. 2003 Dec 10 [cited 2023 Jan 29];23(36):11382–91. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/23/36/11382>
30. Griffiths T, Evans MC, Meldrum BS. Intracellular calcium accumulation in rat hippocampus during seizures induced by bicuculline or L-allylglycine. *Neuroscience* [Internet]. 1983 Oct;10(2):385–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452283901410>
31. Henshall DC, Diaz-Hernandez M, Miras-Portugal MT, Engel T. P2X receptors as targets for the treatment of status epilepticus. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00237/abstract>
32. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* [Internet]. 2012 Apr 1;33(7):829–37. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehr304>
33. Mikami Y, Kanemaru K, Okubo Y, Nakaune T, Suzuki J, Shibata K, et al. Nitric Oxide-induced Activation of the Type 1 Ryanodine Receptor Is Critical for Epileptic Seizure-induced Neuronal Cell Death. *EBioMedicine* [Internet]. 2016 Sep;11:253–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396416303693>
34. Kovac S, Domijan A-M, Walker MC, Abramov AY. Seizure activity results in calcium- and mitochondria-independent ROS production via NADPH and xanthine oxidase activation. *Cell Death Dis* [Internet]. 2014

- Oct 2;5(10):e1442–e1442. Available from:
<https://www.nature.com/articles/cddis2014390>
35. Patel M, Li Q-Y, Chang L-Y, Crapo J, Liang L-P. Activation of NADPH oxidase and extracellular superoxide production in seizure-induced hippocampal damage. *J Neurochem* [Internet]. 2005 Jan;92(1):123–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2004.02838.x>
 36. Williams S, Hamil N, Abramov AY, Walker MC, Kovac S. Status epilepticus results in persistent overproduction of reactive oxygen species, inhibition of which is neuroprotective. *Neuroscience* [Internet]. 2015 Sep;303:160–5. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215006120>
 37. Kovac S, Domijan A-M, Walker MC, Abramov AY. Prolonged seizure activity impairs mitochondrial bioenergetics and induces cell death. *J Cell Sci* [Internet]. 2012 Jan 1; Available from:
<https://journals.biologists.com/jcs/article/doi/10.1242/jcs.099176/258108/Prolonged-seizure-activity-impairs-mitochondrial>
 38. Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev* [Internet]. 2015 Oct;95(4):1111–55. Available from:
<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00001.2015>
 39. Johnson EL, Kaplan PW. Status Epilepticus: Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Semin Neurol* [Internet]. 2020 Dec 11;40(06):647–51. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0040-1718722>
 40. Hirsch LJ, Gaspard N. Status Epilepticus. *Contin Lifelong Learn Neurol* [Internet]. 2013 Jun;19:767–94. Available from:
<http://journals.lww.com/00132979-201306000-00020>
 41. Silbergleit R, Durkalski V, Lowenstein D, Conwit R, Pancioli A, Palesch Y, et al. Intramuscular versus Intravenous Therapy for Prehospital Status Epilepticus. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Feb 16 [cited 2023 Jan 19];366(7):591–600. Available from:
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/Nejmoa1107494>

42. Grover EH, Nazzal Y, Hirsch LJ. Treatment of Convulsive Status Epilepticus. *Curr Treat Options Neurol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 Jan 19];18(3):1–20. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11940-016-0394-5>
43. Brophy GM, Bell R, Claassen J, Alldredge B, Bleck TP, Glauser T, et al. Guidelines for the Evaluation and Management of Status Epilepticus. *Neurocritical Care* 2012 171 [Internet]. 2012 Apr 24 [cited 2023 Jan 19];17(1):3–23. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12028-012-9695-z>
44. Al-Mufti F, Claassen J. Neurocritical care: Status epilepticus review. *Crit Care Clin* [Internet]. 2014;30(4):751–64. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2014.06.006>
45. Kim D, Kim JM, Cho YW, Yang KI, Kim DW, Lee ST, et al. Antiepileptic drug therapy for status epilepticus. *J Clin Neurol*. 2021;17(1):11–9.
46. Meek MF, Broekroelofs J, Yska JP, Egbers PHM, Boerma EC, van der Voort PHJ. Valproic acid intoxication: Sense and non-sense of haemodialysis. *Neth J Med*. 2004;62(9):333–6.
47. Cornford EM, Diep CP, Pardridge WM. Blood–Brain Barrier Transport of Valproic Acid. *J Neurochem*. 1985;44(5):1541–50.
48. Jomura R, Akanuma S-I, Bauer B, Yoshida Y, Kubo Y, Hosoya K-I. Participation of Monocarboxylate Transporter 8, But Not P-Glycoprotein, in Carrier-Mediated Cerebral Elimination of Phenytoin across the Blood-Brain Barrier. [cited 2023 Jan 20]; Available from:
<https://doi.org/10.1007/s11095-021-03003-1>
49. Jodoin K. The Renal Drug Handbook: The Ultimate Prescribing Guide for Renal Practitioners, 4th edition. Vol. 23, *European Journal of Hospital Pharmacy*. 2016. 248.1-248.
50. Mazarati AM, Baldwin RA, Sankar R, Wasterlain CG. Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. *Brain Res*. 1998 Dec 14;814(1–2):179–85.
51. Wasterlain CG, Chen JWY. Mechanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drugs. *Epilepsia* [Internet]. 2008 Dec [cited 2023 Jan 30];49(SUPPL. 9):63–73. Available

from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1528-1167.2008.01928.x>

52. Wickström R, Taraschenko O, Dilella R, Payne ET, Specchio N, Nabbout R, et al. International consensus recommendations for management of new onset refractory status epilepticus (NORSE) including febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): Summary and clinical tools. *Epilepsia* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2023 Jan 19];63(11):2827–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epi.17391>
53. Saunders NR, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Møllgård K, et al. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: A walk through 100 years of history. *Front Neurosci*. 2014;8(DEC):1–26.
54. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: Evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol*. 2005;25(1):5–23.
55. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Semin Immunopathol*. 2009;31(4):497–511.
56. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2006 Jan;7(1):41–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371949>
57. Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S. Principles of neural science [Internet]. 2000 [cited 2022 Nov 30]. Available from: https://www.academia.edu/download/30536508/neuroscience_syllabus.pdf
58. Daneman R, Prat A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Dec 18];7(1). Available from: </pmc/articles/PMC4292164/>
59. Zlokovic B V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*. 2008;57(2):178–201.
60. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 2020;17(1):1–24. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
61. Gross PM, Sposito NM, Pettersen SE, Fenstermacher JD. Differences in Function and Structure of the Capillary Endothelium in Gray Matter, White

- Matter and a Circumventricular Organ of Rat Brain. *J Vasc Res* [Internet]. 1986;23(6):261–70. Available from:
<https://www.karger.com/Article/FullText/158652>
62. Crone C. The Permeability of Capillaries in Various Organs as Determined by Use of the ‘Indicator Diffusion’ Method. *Acta Physiol Scand*. 1963;58(4):292–305.
 63. Larsen J, Martin D, Byrne M. Recent advances in delivery through the blood-brain barrier. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2014 Sep 22 [cited 2022 Nov 27];14(9):1148–60. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24678707/>
 64. Bell AH, Miller SL, Castillo-Melendez M, Malhotra A. The Neurovascular Unit: Effects of Brain Insults During the Perinatal Period. *Front Neurosci* [Internet]. 2020 Jan 22;13. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.01452/full>
 65. Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol* [Internet]. 1999 Jan;5(6):556–69. Available from:
<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13550289909021285>
 66. Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer’s disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2011 Nov 3;12(12):723–38. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048062>
 67. Aquino JB, Sierra R, Montaldo LA. Diverse cellular origins of adult blood vascular endothelial cells. *Dev Biol*. 2021 Sep 1;477:117–32.
 68. Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circ Res* [Internet]. 2007 Feb 2 [cited 2022 Nov 29];100(2):174–90. Available from:
<https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.RES.0000255690.03436.a>
e
 69. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010 Jan [cited 2022 Nov 29];37(1):13–25. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19664713/>
 70. Pavek P, Stejskalova L, Krausova L, Bitman M, Vrzal R, Dvorak Z. Rifampicin does not significantly affect the expression of small heterodimer partner in primary human hepatocytes. *Front Pharmacol*.

2012;3 JAN(January):1–5.

71. Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* [Internet]. 2005 Jan;2(1):86–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717060>
72. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(2):159–64.
73. Cordoncardo C, O'brien JP, Casals D, Rittman-Grauert L, Biedler JL, Melamed MR, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites (monoclonal antibodies/immunohistochemistry/cancer chemotherapy). *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 1989 [cited 2022 Nov 29];86:695–8. Available from: <https://www.pnas.org>
74. Mittapalli RK, Manda VK, Adkins CE, Geldenhuys WJ, Lockman PR. Exploiting nutrient transporters at the blood-brain barrier to improve brain distribution of small molecules. *Ther Deliv*. 2010 Dec;1(6):775–84.
75. Liebner S EB. Development of the Blood–Brain Barrier. In: *The Blood-Brain Barrier and Its Microenvironment* [Internet]. CRC Press; 2005 [cited 2022 Nov 29]. p. 1–26. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b14290-5/development-blood-brain-barrier-stefan-liebner-britta-engelhardt>
76. Sims DE. The pericyte--a review. *Tissue Cell* [Internet]. 1986 [cited 2022 Dec 3];18(2):153–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3085281/>
77. Bhattacharya A, Kaushik DK, Lozinski BM, Yong VW. Beyond barrier functions: Roles of pericytes in homeostasis and regulation of neuroinflammation. *J Neurosci Res* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jan 30];98(12):2390–405. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jnr.24715>
78. Dore-Duffy P. Pericytes: Pluripotent Cells of the Blood Brain Barrier. *Curr Pharm Des*. 2008 Jun 24;14(16):1581–93.
79. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA,

- et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. 2014;508(1):55–60.
80. Kisler K, Nelson AR, Rege S V, Ramanathan A, Wang Y, Ahuja A, et al. Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat Neurosci* [Internet]. 2017 Mar 30;20(3):406–16. Available from: <http://www.nature.com/articles/nn.4489>
 81. Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull* [Internet]. 2000 Apr;51(5):363–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923099002609>
 82. Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M, Schallek J, Kılıç K, Can A, et al. Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife* [Internet]. 2018 Mar 21;7. Available from: <https://elifesciences.org/articles/34861>
 83. Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, et al. Pericytes Control Key Neurovascular Functions and Neuronal Phenotype in the Adult Brain and during Brain Aging. *Neuron*. 2010 Nov 4;68(3):409–27.
 84. Gu X, Liu XY, Fagan A, Gonzalez-Toledo ME, Zhao LR. Ultrastructural changes in cerebral capillary pericytes in aged Notch3 mutant transgenic mice. *Ultrastruct Pathol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Dec 11];36(1):48–55. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/01913123.2011.620220?casa_token=c3y4a0fiUt8AAAAA:6M2xt8SZiGYnt5NXQxtw3lJBLCI-j4R4z7nj9B6BkY2SEZ3M2R5oLfOS6tuq_D4dqlXyednKIIF_4A
 85. Blocki A, Beyer S, Jung F, Raghunath M. The controversial origin of pericytes during angiogenesis - Implications for cell-based therapeutic angiogenesis and cell-based therapies. *Clin Hemorheol Microcirc* [Internet]. 2018 [cited 2022 Dec 11];69(1–2):215–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29758937/>
 86. Durham JT, Surks HK, Dulmovits BM, Herman IM. Pericyte contractility controls endothelial cell cycle progression and sprouting: Insights into angiogenic switch mechanics. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2022 Dec 11];307(9):C878–92. Available from:

<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00185.2014>

87. Fukushi JI, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of Galectin-3 and $\alpha 3 \beta 1$ integrin. *Mol Biol Cell*. 2004 Aug;15(8):3580–90.
88. Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA. Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res*. 1999 Feb 19;84(3):298–305.
89. Sengillo JD, Winkler EA, Corey J, Walker T, Sullivan JS, Johnson M, et al. Deficiency in Mural Vascular Cells Coincides with Blood–Brain Barrier Disruption in Alzheimer's Disease. *Wiley Online Libr [Internet]*. 2012 May [cited 2022 Dec 11];23(3):303–10. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bpa.12004?casa_token=JuSgqg159dcAAAAA:DZKYtRYBj6ps9epgXtpcmvCkc4NrRGXQeTd7V3Lb1QqwjnKKKPga7aQls3j7QpX_vMUebH23Gm70-ac
90. Ma Q, Zhao Z, Sagare AP, Wu Y, Wang M, Owens NC, et al. Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid- $\beta 42$ by LRP1-dependent apolipoprotein e isoform-specific mechanism. *Mol Neurodegener*. 2018 Oct 19;13(1).
91. Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2017 Mar 1;38(3):291–304.
92. Kovac A, Erickson MA, Banks WA. Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: Cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation*. 2011 Oct 13;8.
93. Duan L, Zhang X Di, Miao WY, Sun YJ, Xiong G, Wu Q, et al. PDGFR β Cells Rapidly Relay Inflammatory Signal from the Circulatory System to Neurons via Chemokine CCL2. *Neuron*. 2018 Oct 10;100(1):183-200.e8.
94. Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, Machida T, Bölükbaşı Hatip FF, Hatip-Al-Khatib I, et al. TNF- α -sensitive brain pericytes activate microglia by releasing IL-6 through cooperation between I κ B-NF κ B and JAK-STAT3 pathways. *Brain Res*. 2018 Aug 1;1692:34–44.
95. Cardona A, Pioro E, Sasse M, Kostenko... V. Fraktalkin reseptörü ile

- mikroglial nörotoksisitenin kontrolü. Doğa . [Internet]. 2006 [cited 2022 Dec 12]; Available from: <https://www.nature.com/articles/nn1715>
96. Fu D, Yu JY, Yang S, Wu M, Hammad SM, Connell AR, et al. Survival or death: a dual role for autophagy in stress-induced pericyte loss in diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2016 Oct 1;59(10):2251–61.
 97. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* [Internet]. 2010 Nov 13 [cited 2022 Dec 12];468(7323):562–6. Available from: https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/nature09513&casa_token=LP4TTbOpMPoAAAAA:WzTsDSVoOkBHe3q_AoXG3W1slLPk4VlAdgsTRSowS6az17WIwfnMiwXSxa6sHmq0w4H94xAZosQPqN2INQ
 98. Reyahi A, Nik undefined, Ghiyasi M, Gritli-Linde A, Pontén... F. Foxf2, beyin perisit farklılaşması ve kan-beyin bariyerinin gelişimi ve bakımı için gereklidir. *Gelişimsel hücre* [Internet]. 2015 [cited 2022 Dec 12]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S153458071500324X>
 99. Korn J, Christ B, Kurz H. Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells. *J Comp Neurol* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2022 Dec 12];442(1):78–88. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cne.1423?casa_token=jnYDrFPDI5UAAAAA:DZYSh8gIV6PIMzSkIu_yFGjYZSj7av2kPjuQlZA3PlX6w1UjVDPQOVsqC2Mjd1hOcfcOALKMCbAopnoQ
 100. Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X, Van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2006 May 18 [cited 2022 Dec 14];26(5):613–24. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1038/sj.jcbfm.9600272>
 101. Pombero A, Garcia-Lopez R, Martinez S. Brain mesenchymal stem cells: physiology and pathological implications. *Dev Growth Differ* [Internet]. 2016 Jun;58(5):469–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dgd.12296>
 102. Özen I, Deierborg T, Miharada K, Padel T, Englund E, Genové G, et al. Brain pericytes acquire a microglial phenotype after stroke. *Acta*

- Neuropathol. 2014;128(3):381–96.
103. Sakuma R, Kawahara M, Nakano-Doi A, Takahashi A, Tanaka Y, Narita A, et al. Brain pericytes serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2016 Mar 7;13(1).
 104. Nakagomi T, Kubo S, Nakano-Doi A, Sakuma R, Lu S, Narita A, et al. Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. *Stem Cells* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Dec 14];33(6):1962–74. Available from: <https://academic.oup.com/stemcls/article-abstract/33/6/1962/6407282>
 105. Gee JR, Keller JN. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Jun 1;37(6):1145–50.
 106. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2022 Dec 15];58(9):1094–103. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.20990>
 107. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol* [Internet]. 2011 [cited 2022 Dec 15];287:1–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21414585/>
 108. Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS, Campbell KP, et al. Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2022 Dec 15];33(12):2179–86. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1460-9568.2011.07688.x>
 109. Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS, Campbell KP, et al. MOLECULAR AND DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. [cited 2022 Dec 15]; Available from: <http://www.graphpad.com>
 110. Warth A, Kröger S, Wolburg H. Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2022

- Dec 15];107(4):311–8. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14735305/>
111. Noell S, Mack AF, Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Aquaporin-4-Based Orthogonal Arrays of Particles. *Int Rev Cell Mol Biol* [Internet]. 2011 [cited 2022 Dec 15];287:1–41. Available from:
<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>
 112. Barres BA, Koroshetz WJ, Chun LLY, Corey DR. Ion channel expression by white matter glia: The type-1 astrocyte. *Neuron* [Internet]. 1990 Oct 1 [cited 2022 Dec 15];5(4):527–44. Available from:
<http://www.cell.com/article/089662739090091S/fulltext>
 113. Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, et al. An inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2001;281(3 50-3).
 114. Butt AM, Kalsi A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2006 [cited 2022 Dec 15];10(1):33–44. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16563220/>
 115. Abbott NJ. Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability*. *J Anat* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2022 Dec 15];200(6):629–38. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x>
 116. Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S-I, Harada S-I, Yamashita J, Yamamoto H. Induction of Various Blood-Brain Barrier Properties in Non-Neural Endothelial Cells by Close Apposition to Co-Cultured Astrocytes. *Glia* [Internet]. 1997 [cited 2022 Dec 15];19:13–26. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/>
 117. Colgan OC, Collins NT, Ferguson G, Murphy RP, Birney YA, Cahill PA, et al. Influence of basolateral condition on the regulation of brain microvascular endothelial tight junction properties and barrier function. *Brain Res*. 2008 Feb 8;1193:84–92.
 118. Yang Y, Higashimori H, Morel L. Developmental maturation of astrocytes and pathogenesis of neurodevelopmental disorders. *J Neurodev Disord* [Internet]. 2013 Dec [cited 2022 Dec 15];5(1). Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23988237/>

119. Michinaga S, Koyama Y. Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Dec 15];20(3). Available from: [/pmc/articles/PMC6387062/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23988237/)
120. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Dec 23 [cited 2022 Dec 15];334(6063):1727–31. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1206936>
121. Yao Y, Chen ZL, Norris EH, Strickland S. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nat Commun* 2014 51 [Internet]. 2014 Mar 3 [cited 2022 Dec 15];5(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms4413>
122. Segarra M, Aburto MR, Cop F, Llaó-Cid C, Härtl R, Damm M, et al. Endothelial Dab1 signaling orchestrates neuro-glia-vessel communication in the central nervous system. *Science* (80-) [Internet]. 2018 Aug 24 [cited 2022 Dec 15];361(6404). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao2861>
123. Spampinato SF, Obermeier B, Cotleur A, Love A, Takeshita Y, Sano Y, et al. Sphingosine 1 Phosphate at the Blood Brain Barrier: Can the Modulation of S1P Receptor 1 Influence the Response of Endothelial Cells and Astrocytes to Inflammatory Stimuli? *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul 21 [cited 2022 Dec 15];10(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26197437/>
124. Mizee MR, Nijland PG, van der Pol SMA, Drexhage JAR, van het Hof B, Mebius R, et al. Astrocyte-derived retinoic acid: a novel regulator of blood-brain barrier function in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2022 Dec 15];128(5):691–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25149081/>
125. Prager B, Spampinato SF, Ransohoff RM. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier. *Trends Mol Med* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Dec 15];21(6):354–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25939882/>

126. Allt G, Lawrenson JG. Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies? *Brain Res Rev* [Internet]. 1997 Jun [cited 2022 Dec 16];24(1):67–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9233542/>
127. Baeten KM, Akassoglou K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood–brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2022 Dec 17];71(11):1018–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dneu.20954>
128. McCarty JH, Lacy-Hulbert A, Charest A, Bronson RT, Crowley D, Housman D, et al. Selective ablation of α v integrins in the central nervous system leads to cerebral hemorrhage, seizures, axonal degeneration and premature death. *Development* [Internet]. 2005 Jan [cited 2022 Dec 17];132(1):165–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15576410/>
129. Astudillo P, Larrain J. Wnt signaling and cell-matrix adhesion. *Curr Mol Med* [Internet]. 2014 Feb 13 [cited 2022 Dec 17];14(2):209–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24467207/>
130. Yamamoto H, Ehling M, Kato K, Kanai K, Van Lessen M, Frye M, et al. Integrin β 1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. *Nat Commun* 2015 61 [Internet]. 2015 Mar 10 [cited 2022 Dec 17];6(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms7429>
131. Proudfoot AEI. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem Soc Trans*. 2006 Jun;34(3):422–6.
132. Iivanainen E, Kähäri VM, Heino J, Elenius K. Endothelial cell–Matrix interactions. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2022 Dec 17];60(1):13–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jemt.10238>
133. Zovein AC, Luque A, Turlo KA, Hofmann JJ, Yee KM, Becker MS, et al. β 1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2022 Dec 17];18(1):39. Available from: [/pmc/articles/PMC3178410/](https://pmc/articles/PMC3178410/)
134. Thomsen MS, Routhe LJ, Moos T. The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Dec 17];37(10):3300. Available from:

/pmc/articles/PMC5624399/

135. Wu C, Ivars F, Anderson P, Hallmann R, Vestweber D, Nilsson P, et al. Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nat Med* [Internet]. 2009 May [cited 2022 Dec 17];15(5):519–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19396173/>
136. Menezes MJ, McClenahan FK, Leiton C V., Aranmolate A, Shan X, Colognato H. The Extracellular Matrix Protein Laminin $\alpha 2$ Regulates the Maturation and Function of the Blood–Brain Barrier. *J Neurosci* [Internet]. 2014 Nov 11 [cited 2022 Dec 17];34(46):15260. Available from: </pmc/articles/PMC6608454/>
137. Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial Cell Laminin Isoforms, Laminins 8 and 10, Play Decisive Roles in T Cell Recruitment across the Blood–Brain Barrier in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Cell Biol* [Internet]. 2001 May 5 [cited 2022 Dec 17];153(5):933. Available from: </pmc/articles/PMC2174323/>
138. Dore-Duffy P, Cleary K. Morphology and Properties of Pericytes. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2011 [cited 2022 Dec 17];686:49–68. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-938-3_2
139. Rempe RG, Hartz AMS, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood–brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Dec 17];36(9):1481. Available from: </pmc/articles/PMC5012524/>
140. Banks WA. The blood brain barrier. *Neuroimmune Pharmacology*. 2008. 21–38 p.
141. Cohen Z, Molinatti G, Hamel E. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 1997 [cited 2022 Dec 30];17(8):894–904. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9290587/>
142. Leybaert L. Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2005 Jan [cited 2022 Dec 30];25(1):2–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15678108/>

143. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* [Internet]. 2010 Nov 5 [cited 2022 Dec 17];330(6005):841–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20966214/>
144. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res* [Internet]. 1999 Nov 18 [cited 2022 Dec 17];117(2):145–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10567732/>
145. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* [Internet]. 2010 Aug 5 [cited 2022 Dec 17];116(5):829–40. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/116/5/829/107751/Tissue-macrophages-act-as-cellular-chaperones-for>
146. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2022 Dec 17];40(2):140–55. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.10161>
147. Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2014 Jul 28 [cited 2022 Dec 17];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25065370/>
148. Luo C, Koyama R, Ikegaya Y. Microglia engulf viable newborn cells in the epileptic dentate gyrus. *Glia*. 2016;64(9):1508–17.
149. Polfliet MMJ, Zwijnenburg PJG, van Furth AM, van der Poll T, Döpp EA, Renardel de Lavalette C, et al. Meningeal and Perivascular Macrophages of the Central Nervous System Play a Protective Role During Bacterial Meningitis. *J Immunol* [Internet]. 2001 Oct 15 [cited 2022 Dec 17];167(8):4644–50. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/167/8/4644/84106/Meningeal-and-Perivascular-Macrophages-of-the>
150. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* [Internet].

- 2012 Sep 20;12(9):623–35. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nri3265>
151. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* [Internet]. 2009 Nov 5 [cited 2022 Dec 17];462(7269):94–8. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19829296/>
 152. Hudson LC, Bragg DC, Tompkins MB, Meeker RB. Astrocytes and microglia differentially regulate trafficking of lymphocyte subsets across brain endothelial cells. *Brain Res* [Internet]. 2005 Oct 5 [cited 2022 Dec 17];1058(1–2):148–60. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16137663/>
 153. Sage PT, Carman C V. Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Front Biosci*. 2009;14:5066.
 154. Rascher G, Hirnforschung HW-J fur, 1997 undefined. The tight junctions of the leptomeningeal blood-cerebrospinal fluid barrier during development. *europemc.org* [Internet]. [cited 2022 Dec 18]; Available from: <https://europemc.org/article/med/9476217>
 155. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*. 2002 Jun 1;38(6):323–37.
 156. Jia W, Lu R, Martin TA, Jiang WG. The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (Review). *Mol Med Rep* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2022 Dec 18];9(3):779–85. Available from:
<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2013.1875/abstract>
 157. Roux KJ, Amici SA, Notterpek L. The temporospatial expression of peripheral myelin protein 22 at the developing blood-nerve and blood-brain barriers. *J Comp Neurol*. 2004 Jun;474(4):578–88.
 158. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:403–29.
 159. Tsukita S, Tanaka H, Tamura A. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Dec 18];44(2):141–52. Available from:
<http://www.cell.com/article/S0968000418301932/fulltext>

160. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Dec 18];283(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12055082/>
161. Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol - Ren Physiol* [Internet]. 2003 [cited 2022 Dec 18];285(6 54-6):1078–84. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00116.2003>
162. Liu F, Koval M, Ranganathan S, Fanayan S, Hancock WS, Lundberg EK, et al. Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *J Proteome Res*. 2016;15(2):339–59.
163. Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S. Claudin-11/OSP-based Tight Junctions of Myelin Sheaths in Brain and Sertoli Cells in Testis. *J Cell Biol* [Internet]. 1999 May 3 [cited 2022 Dec 18];145(3):579–88. Available from: <http://www.jcb.org>
164. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, et al. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* [Internet]. 2005 May 9 [cited 2022 Dec 18];169(3):527–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15883201/>
165. Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M. Regulation of Heterotypic Claudin Compatibility. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Oct [cited 2022 Dec 18];282(41):30005–13. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)71759-X/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)71759-X/abstract)
166. Ward C, Claudins MK-, 2011 undefined. Biochemical analysis of claudin-binding compatibility. Springer [Internet]. 2011 [cited 2022 Dec 18];762:13–26. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-185-7_2
167. Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Mueller SL, Zuleger N, Krause E, et al. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. Springer [Internet]. 2006 Feb [cited 2022 Dec 18];63(4):505–14. Available from:

https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-005-5472-x&casa_token=Wowmy1fzOVkAAAAA:kuNtEkeiUzDADwUHQP9vRed-mSF-5CyBxiH8SHNGJdPU5UQp73U_56WNYakjuTeh1OA-KnN3fKPXuJOa_Q

168. Mitic L, Unger V, Science JA-P, 2003 undefined. Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4. Wiley Online Libr [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2022 Dec 18];12(2):218–27. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1110/ps.0233903>
169. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2008 Mar 1;1778(3):631–45.
170. Viña JR, Amasheh S, Reinach PS, Davis TP, Lochhead JJ, Yang J, et al. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Front Physiol* | www.frontiersin.org [Internet]. 2020 [cited 2023 Jan 30];1. Available from: www.frontiersin.org
171. Berselli A, Benfenati F, Maragliano L, Alberini G. Multiscale modelling of claudin-based assemblies: A magnifying glass for novel structures of biological interfaces. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022 Jan 1;20:5984–6010.
172. Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 2019 Jan 29 [cited 2023 Jan 30];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30691500/>
173. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* [Internet]. 2003 May 12 [cited 2022 Dec 18];161(3):653–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12743111/>
174. Paul D, Baena V, Ge S, Jiang X, Jellison ER, Kiprono T, et al. Appearance of claudin-5+ leukocytes in the central nervous system during neuroinflammation: A novel role for endothelial-derived extracellular vesicles. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2016 Nov 16 [cited 2023 Jan 30];13(1):1–17. Available from:

<https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-016-0755-8>

175. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 2000;11(12):4131–42.
176. Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K. Parasellüler geçirgenlik ve transepitelyal elektriksel direncin fonksiyonel ayrışması ve apikal-bazolateral membran içi difüzyon bariyerinin ... *Hücre Derg* . [Internet]. 1996 [cited 2022 Dec 18]; Available from: <https://rupress.org/jcb/article-abstract/134/4/1031/15344>
177. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2005 [cited 2022 Dec 18];1669(1):34–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15842997/>
178. Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, Anderson JM. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci* [Internet]. 2010 Aug 15 [cited 2022 Dec 18];123(Pt 16):2844–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20663912/>
179. Buschmann MM, Shen L, Rajapakse H, Raleigh DR, Wang Y, Wang Y, et al. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2022 Dec 18];24(19):3056–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23924897/>
180. Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, et al. PKC eta regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Jan 6 [cited 2022 Dec 18];106(1):61–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19114660/>
181. Smales C, Ellis M, Baumber R, Hussain N, Desmond H, Staddon JM. Occludin phosphorylation: Identification of an occludin kinase in brain and cell extracts as CK2. *FEBS Lett* [Internet]. 2003 Jun 19 [cited 2022 Dec 18];545(2–3):161–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12804768/>
182. McKenzie JAG, Riento K, Ridley AJ. Casein kinase I epsilon associates

- with and phosphorylates the tight junction protein occludin. *FEBS Lett* [Internet]. 2006 Apr 17 [cited 2022 Dec 18];580(9):2388–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16616143/>
183. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*. 2008 Nov 1;32(2):200–19.
 184. Lacaz-Vieira F, Jaeger MMM, Farshori P, Kachar B. Small Synthetic Peptides Homologous to Segments of the First External Loop of Occludin Impair Tight Junction Resealing. *J Membr Biol* 1999 1683 [Internet]. 1999 [cited 2022 Dec 18];168(3):289–97. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002329900518>
 185. Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, Demarco KM, Nametz N, et al. Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2010 [cited 2022 Dec 18];30(9):1625–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20234382/>
 186. Greene C, Campbell M, Janigro D. Fundamentals of Brain-Barrier Anatomy and Global Functions [Internet]. *Nervous System Drug Delivery: Principles and Practice*. Elsevier Inc.; 2019. 3–20 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813997-4.00001-3>
 187. Bauer HC, Traweger A, Bauer H. Proteins of the Tight Junction in the Blood-Brain Barrier [Internet]. *Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease*. Elsevier Inc.; 2004. 1–10 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-639011-7.50005-X>
 188. Mok KW, Mruk DD, Cheng CY. Regulation of Blood-Testis Barrier (BTB) Dynamics during Spermatogenesis via the “Yin” and “Yang” Effects of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) and mTORC2. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press; 2013. p. 291–358.
 189. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* [Internet]. 2000 [cited 2022 Dec 21];113(13):2363–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10852816/>
 190. Martìn-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the

- immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* [Internet]. 1998 Jul 13 [cited 2022 Dec 21];142(1):117–27. Available from: <https://rupress.org/jcb/article-abstract/142/1/117/1037>
191. Mochida GH, Ganesh VS, Felie JM, Gleason D, Hill RS, Clapham KR, et al. A homozygous mutation in the tight-junction protein JAM3 causes hemorrhagic destruction of the brain, subependymal calcification, and congenital cataracts. *Am J Hum Genet*. 2010 Dec 10;87(6):882–9.
 192. Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The Mouse Blood-Brain Barrier Transcriptome: A New Resource for Understanding the Development and Function of Brain Endothelial Cells. *PLoS One* [Internet]. 2010 [cited 2022 Dec 21];5(10). Available from: [/pmc/articles/PMC2966423/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2966423/)
 193. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, et al. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci*. 2011;124(4):548–55.
 194. Pardridge WM. The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *Neurotherapeutics*. 2005;2(1):3–14.
 195. Van Itallie CM, Anderson JM. The Molecular Physiology of Tight Junction Pores. *Physiology* [Internet]. 2004 Dec;19(6):331–8. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00027.2004>
 196. Clark DE. In silico prediction of blood–brain barrier permeation. *Drug Discov Today*. 2003 Oct 15;8(20):927–33.
 197. Krämer SD. Absorption prediction from physicochemical parameters. *Pharm Sci Technolo Today* [Internet]. 1999 Sep;2(9):373–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1461534799001881>
 198. Bodor N, Buchwald P. Brain-Targeted Drug Delivery: Experiences to Date. *Am J Drug Deliv*. 2003;1(1):13–26.
 199. Cornford EM, Hyman S, Swartz BE. The human brain GLUT1 glucose transporter: ultrastructural localization to the blood-brain barrier endothelia. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 1994 [cited 2022 Dec 30];14(1):106–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8263045/>
 200. Dean M, Moitra K, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Hum Mutat*. 2022;43(9):1162–82.

201. Begley DJ. ABC Transporters and the Blood-Brain Barrier. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2022 Dec 26];10(12):1295–312. Available from:
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=10&issue=12&spage=1295>
202. Begley DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther*. 2004 Oct 1;104(1):29–45.
203. Förster F, Volz A, Fricker G. Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2008 May [cited 2022 Dec 26];69(1):396–403. Available from:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641107003475?casa_token=8AIqBW_pca0AAAAA:6lfcvVd0GjaAhdw1y_wZFWnqdTqc3cPqsVJVNkyK1atYiFyp1BFvNq0aJLhZjTSON_crToYiUHY
204. Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: Expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev*. 2006;58(2):140–61.
205. Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai K, et al. Quantitative atlas of membrane transporter proteins: Development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res*. 2008;25(6):1469–83.
206. Dauchy S, Dutheil F, ... RW-J of, 2008 undefined. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood–brain barrier. *Wiley Online Libr* [Internet]. 2008 [cited 2022 Dec 26];107(6):1518–28. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.2008.05720.x>
207. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CAAM, Van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* [Internet]. 1996 Jun 1 [cited 2022 Dec 27];97(11):2517–24. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8647944/>
208. Abbott NJ, Khan EU, Rollinson CMS, Reichel A, Janigro D, Dombrowski SM, et al. Drug resistance in epilepsy: the role of the blood-brain barrier.

- Novartis Found Symp [Internet]. 2002;243:38–47; discussion 47-53, 180–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990780>
209. Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport* [Internet]. 2001 Nov 16 [cited 2022 Dec 27];12(16):3557–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11733711/>
 210. Kodaira H, Kusuhara H, Fujita T, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y. Quantitative evaluation of the impact of active efflux by P-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier on the predictability of the unbound concentrations of drugs in the brain using cerebrospinal fluid concentration as a. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2022 Dec 29];339(3):935–44. Available from: <https://jpet.aspetjournals.org/content/339/3/935>
 211. Wang JQ, Yang Y, Cai CY, Teng QX, Cui Q, Lin J, et al. Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2021;54(December 2020):100743. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100743>
 212. Pulgar VM. Transcytosis to cross the blood brain barrier, new advancements and challenges. *Front Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2022 Dec 29];13(JAN). Available from: www.frontiersin.org
 213. Barar J, Rafi MA, Pourseif MM, Omid Y. Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *BioImpacts* [Internet]. 2016 Dec 5 [cited 2023 Jan 30];6(4):225–48. Available from: <https://bi.tbzmed.ac.ir/FullHtml/16362>
 214. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(8):603–12.
 215. Razani B, Lisanti MP. Caveolins and Caveolae: Molecular and Functional Relationships. *Exp Cell Res* [Internet]. 2001 Nov;271(1):36–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482701953728>
 216. Nag, Sukriti - Begley D. Blood-brain barrier, exchange of metabolites and gases. Kalimo H, ed *Pathol Genet ISN Neuropathol Press* 2005 pp 22e29 [Internet]. 2005 [cited 2022 Dec 30];22–9. Available from:

[https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/en/publications/blood-brain-barrier-exchange-of-metabolites-and-gases\(b7dfc370-5db4-4468-a2f0-3baa72008f10\).html](https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/en/publications/blood-brain-barrier-exchange-of-metabolites-and-gases(b7dfc370-5db4-4468-a2f0-3baa72008f10).html)

217. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. Vol. 77, *Physiological Reviews*. American Physiological Society; 1997. p. 759–803.
218. Claudio L, Kress Y, Norton WT, Brosnan CF. Increased vesicular transport and decreased mitochondrial content in blood-brain barrier endothelial cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* [Internet]. 1989 Dec [cited 2022 Dec 30];135(6):1157–68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1880501/>
219. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* [Internet]. 2007;147(4):867–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.055>
220. Davoust N, Vauillat C, Androdias G, Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol*. 2008;29(5):227–34.
221. Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* [Internet]. 2006 Sep [cited 2022 Dec 30];66(3):232–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16935624/>
222. Scholz M, Cinatl J, Schädel-Höpfner M, Windolf J. Neutrophils and the blood–brain barrier dysfunction after trauma. *Med Res Rev* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2022 Dec 30];27(3):401–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/med.20064>
223. Engelhardt B, Wolburg H. Mini review: Transendothelial migration of leukocytes: Through the front door or around the side of the house? Vol. 34, *European Journal of Immunology*. 2004. p. 2955–63.
224. Carman C V., Springer TA. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Oct;20(5):533–40.
225. Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2022 Dec 30];112(1):1–25. Available from: </clinsci/article/112/1/1/68254/Peri-vascular-production-and-action-of-pro>
226. Mohammed S. A, Mansoor C, M.Zeeshan. Q, Alan M. P. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system

- drug discovery. *NeuroRx* [Internet]. 2005;2(4):554–71. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L41393265%0Ahttp://dx.doi.org/10.1602/neurorx.2.4.554>
227. Khawli LA, Prabhu S. Drug Delivery across the Blood–Brain Barrier. *Mol Pharm* [Internet]. 2013 May 6 [cited 2022 Dec 31];10(5):1471–2. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/mp400170b>
 228. Pardridge WM. Blood–brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 2007 Jan 1;12(1–2):54–61.
 229. De Vries NA, Beijnen JH, Boogerd W, Van Tellingen O. Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*. 2006;6(8):1199–209.
 230. Huynh GH, Deen DF, Szoka FC. Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors. *J Control Release*. 2006 Jan 10;110(2):236–59.
 231. Lo E. Drug delivery to damaged brain. *Brain Res Rev* [Internet]. 2001 Dec;38(1–2):140–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017301000832>
 232. Fung LK, Shin M, Tyler B, Brem H, Saltzman WM. Chemotherapeutic drugs released from polymers: Distribution of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in the rat brain. *Pharm Res* [Internet]. 1996 [cited 2023 Jan 1];13(5):671–82. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1016083113123>
 233. Lalan M, Lalani R, Patel V, Misra A. Brain Targeted Drug Delivery Systems. In-Vitro In-Vivo Tools Drug Deliv Res Optim Clin Outcomes. 2018;6(11):237–82.
 234. Aird RB. A study of intrathecal, cerebrospinal fluid-to-brain exchange. *Exp Neurol*. 1984;86(2):342–58.
 235. Groothuis DR, Benalcazar H, Allen C V., Wise RM, Dills C, Dobrescu C, et al. Comparison of cytosine arabinoside delivery to rat brain by intravenous, intrathecal, intraventricular and intraparenchymal routes of administration. *Brain Res*. 2000;856(1–2):281–90.
 236. Yamada K, Kinoshita A, Kohmura E, Sakaguchi T, Taguchi J, Kataoka K, et al. Basic fibroblast growth factor prevents thalamic degeneration after cortical infarction. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991;11(3):472–8.
 237. Nicholson C, Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion

- analysis. *Trends Neurosci.* 1998;21(5):207–15.
238. Kawakami K, Kawakami M, Kioi M, Husain SR, Puri RK. Distribution kinetics of targeted cytotoxin in glioma by bolus or convection-enhanced delivery in a murine model. *J Neurosurg* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2023 Jan 1];101(6):1004–11. Available from: <https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg/101/6/article-p1004.xml>
 239. Stockwell J, Abdi N, Lu X, Maheshwari O, Taghibiglou C. Novel central nervous system drug delivery systems. *Chem Biol Drug Des.* 2014;83(5):507–20.
 240. Bellavance MA, Blanchette M, Fortin D. Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy [Internet]. Vol. 10, *AAPS Journal*. Springer; 2008 [cited 2023 Jan 2]. p. 166–77. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-008-9018-7>
 241. Kemper EM, Boogerd W, Thuis I, Beijnen JH, van Tellingen O. Modulation of the blood-brain barrier in oncology: Therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2004 [cited 2023 Jan 2];30(5):415–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15245774/>
 242. On NH, Savant S, Toews M, Miller DW. Rapid and reversible enhancement of blood-brain barrier permeability using lysophosphatidic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2013 Dec 18 [cited 2023 Jan 2];33(12):1944–54. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1038/jcbfm.2013.154>
 243. Farrell CL, Shivers RR. Capillary junctions of the rat are not affected by osmotic opening of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol* [Internet]. 1984 Sep [cited 2023 Jan 2];63(3):179–89. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00685243>
 244. Nagy Z, Pappius HM, Mathieson G, Hüttner I. Opening of Tight Junctions in Cerebral Endothelium. *J Comp Neur.* 1979;185:569–78.
 245. Kroll RA, Pagel MA, Muldoon LL, Roman-Goldstein S, Fiamengo SA, Neuwelt EA. Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery* [Internet]. 1998 Oct [cited 2023 Jan 2];43(4):879–85.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9766316/>

246. McCarty DM, DiRosario J, Gulaid K, Muenzer J, Fu H. Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice. *Gene Ther* [Internet]. 2009 Nov 9;16(11):1340–52. Available from: <https://www.nature.com/articles/gt200985>
247. Chen KB, Wei VC, Yen LF, Poon KS, Liu YC, Cheng KS, et al. Intravenous mannitol does not increase blood-brain barrier permeability to inert dyes in the adult rat forebrain. *Neuroreport*. 2013;24(6):303–7.
248. Fu H, Muenzer J, Samulski RJ, Breese G, Sifford J, Zeng X, et al. Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: Global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Mol Ther* [Internet]. 2003;8(6):911–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.08.021>
249. Emerich DF, Dean RL, Osborn C, Bartus RT. The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: From concept to clinical evaluation. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(2):105–23.
250. Straub, J. A.; Akiyama A. P. In Vitro Plasma Metabolism of RMP 7. *P Pharm Res*. 1994;2:1673–1676.
251. Hersh DS, Wadajkar AS, Roberts N, Perez JG, Connolly NP, Frenkel V, et al. Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2016 [cited 2023 Jan 6];22(9):1177. Available from: [/pmc/articles/PMC4900538/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2690538/)
252. Sikpa D, Whittingstall L, Savard M, Lebel R, Côté J, McManus S, et al. Pharmacological modulation of blood–brain barrier permeability by kinin analogs in normal and pathologic conditions. *Pharmaceuticals*. 2020;13(10):1–20.
253. Borlongan C V., Emerich DF. Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Res Bull*. 2003 May 15;60(3):297–306.
254. Erdlenbruch B, Kugler W, Schinkhof C, Neurath H, Eibl H, Lakomek M, et al. Blood-brain barrier opening with alkylglycerols: Biodistribution of 1-O-

- pentylglycerol after intravenous and intracarotid administration in rats. 2008 [cited 2023 Jan 6]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=idrt20>
255. Erdlenbruch B, Schinkhof C, Kugler W, Heinemann DEH, Herms J, Eibl H, et al. Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2023 Jan 6];139(4):685–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.bjp.0705302>
 256. Erdlenbruch B, Jendrossek V, Eibl H, Lakomek M. Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats. *Exp brain Res* [Internet]. 2000 [cited 2023 Jan 6];135(3):417–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11146820/>
 257. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee C-W, Mutoh T, et al. LPA Receptors: Subtypes and Biological Actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jan 7];50:157–86. Available from: www.annualreviews.org
 258. Masago K, Kihara Y, Yanagida K, Hamano F, Nakagawa S, Niwa M, et al. Lysophosphatidic acid receptor, LPA6, regulates endothelial blood-brain barrier function: Implication for hepatic encephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;501(4):1048–54.
 259. On NH, Kiptoo P, Siahaan TJ, Miller DW. Modulation of blood-brain barrier permeability in mice using synthetic E-cadherin peptide. *Mol Pharm*. 2014;11(3):974–81.
 260. Laksitorini MD, Kiptoo PK, On NH, Thliveris JA, Miller DW, Siahaan TJ. Modulation of Intercellular Junctions by Cyclic-ADT Peptides as a Method to Reversibly Increase Blood-Brain Barrier Permeability. *J Pharm Sci* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jan 8];104(3):1065–75. Available from: <https://kuscholarworks.ku.edu/handle/1808/23773>
 261. Glaeser H, Fromm MF, König J. Transporters and Drugs – An Overview. In 2008. p. 341–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527621460.ch15>
 262. Gynther M, Ropponen J, Laine K, Leppänen J, Haapakoski P, Peura L, et

- al. Glucose promoiety enables glucose transporter mediated brain uptake of ketoprofen and indomethacin prodrugs in rats. *J Med Chem* [Internet]. 2009 May 28 [cited 2023 Jan 12];52(10):3348–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19402664/>
263. Meier C. Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *EMBO J*. 2002 Feb 15;21(4):580–9.
 264. Smith QR. Transport of Glutamate and Other Amino Acids at the Blood-Brain Barrier. *J Nutr* [Internet]. 2000 Apr 1 [cited 2023 Jan 8];130(4):1016S-1022S. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/130/4/1016S/4686663>
 265. Tamai I, Senmaru M, Terasaki T, Tsuji A. Na(+)- and Cl(-)-dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1995 Nov 27 [cited 2023 Jan 8];50(11):1783–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8615856/>
 266. Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(21):12079–84.
 267. Puris E, Gynther M, Auriola S, Huttunen KM. L-Type amino acid transporter 1 as a target for drug delivery. *Pharm Res* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2023 Jan 8];37(5). Available from: [/pmc/articles/PMC7203094/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3203094/)
 268. Laukamp KR, Lindemann F, Weckesser M, Hesselmann V, Ligges S, Wölfer J, et al. Multimodal Imaging of Patients With Gliomas Confirms 11C-MET PET as a Complementary Marker to MRI for Noninvasive Tumor Grading and Intraindividual Follow-Up After Therapy. *Mol Imaging* [Internet]. 2017 [cited 2023 Jan 8];16. Available from: [/pmc/articles/PMC5470145/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2870145/)
 269. Peura L, Malmioja K, Laine K, Leppänen J, Gynther M, Isotalo A, et al. Large amino acid transporter 1 (LAT1) prodrugs of valproic acid: New prodrug design ideas for central nervous system delivery. *Mol Pharm*. 2011;8(5):1857–66.
 270. Cornford EM, Hyman S. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx* [Internet]. 2005 [cited 2023 Jan 8];2(1):27–43. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1602/neurorx.2.1.27>

271. Parnham MJ, Schmidtko A, Lyck R, Enzmann G. Progress in Inflammation Research Series Editors: The Blood Brain Barrier and Inflammation [Internet]. 2017. 7–8 p. Available from:
https://books.google.hu/books?id=Q_iODgAAQBAJ&pg=PA122&lpg=PA122&dq=PEST+domain+MCT8&source=bl&ots=9OWjrsERnb&sig=ACfU3U09PQo94TJ5EQDiUWC3zlGKcwtgMA&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwiEsufSzd7mAhVJtIsKHSH6BckQ6AEwA3oECAgQAQ#v=onepage&q=PEST domain MCT8&f=false
272. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab [Internet]. 2012 Nov [cited 2023 Jan 8];32(11):1959–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22929442/>
273. Dhanasekaran M, Polt R. New Prospects for Glycopeptide Based Analgesia: Glycoside-Induced Penetration of the Blood-Brain Barrier. Curr Drug Deliv. 2005;2(1):59–73.
274. Patching SG. Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. Mol Neurobiol 2016 542 [Internet]. 2016 Jan 22 [cited 2023 Jan 9];54(2):1046–77. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-015-9672-6>
275. Dong Wang, MD, Juan M Pascual, MD, PhD, and Darryl De Vivo M. Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Summary Genetic counseling GeneReview Scope. 2019;1–21.
276. Chen Q, Gong T, Liu J, Wang X, Fu H, Zhang Z. Synthesis, in vitro and in vivo characterization of glycosyl derivatives of ibuprofen as novel prodrugs for brain drug delivery. J Drug Target [Internet]. 2009 May [cited 2023 Jan 9];17(4):318–28. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19558357/>
277. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family—Structure and functional characterization. IUBMB Life [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2023 Jan 9];64(1):1–9. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.573>
278. Halestrap AP. The SLC16 gene family – Structure, role and regulation in health and disease. Mol Aspects Med. 2013 Apr 1;34(2–3):337–49.
279. Huttunen J, Adla SK, Markowicz-Piasecka M, Huttunen KM. Increased/Targeted Brain (Pro)Drug Delivery via Utilization of Solute

- Carriers (SLCs). *Pharmaceutics*. 2022;14(6):1–42.
280. Bergersen LH. Lactate transport and signaling in the brain: Potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(2):176–85.
281. Choi JS, Berdis AJ. Nucleoside transporters: Biological insights and therapeutic applications. *Future Med Chem*. 2012;4(11):1461–78.
282. E. Parkinson F, L. Damaraju V, Graham K, Y.M. Yao S, A. Baldwin S, E. Cass C, et al. Molecular Biology of Nucleoside Transporters and their Distributions and Functions in the Brain. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(8):948–72.
283. Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC Transporters as Therapeutic Targets: Emerging Opportunities. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2023 Jan 10];14(8):543. Available from: [/pmc/articles/PMC4698371/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25647629/)
284. Stieger B, Gao B. Drug transporters in the central nervous system. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2015 Feb 20 [cited 2023 Jan 10];54(3):225–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25647629/>
285. Gao B, Vavricka SR, Meier PJ, Stieger B. Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. *Pflugers Arch Eur J Physiol* [Internet]. 2015 Jul 13 [cited 2023 Jan 10];467(7):1481–93. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-014-1596-x>
286. Westholm DE, Stenehjem DD, Rumbley JN, Drewes LR, Anderson GW. Competitive inhibition of organic anion transporting polypeptide 1c1-mediated thyroxine transport by the fenamate class of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Endocrinology* [Internet]. 2009 Feb [cited 2023 Jan 10];150(2):1025–32. Available from: <https://experts.umn.edu/en/publications/competitive-inhibition-of-organic-anion-transporting-polypeptide->
287. M.S. Hartz A, Bauer B. ABC transporters in the CNS - an inventory. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2011 Mar 28 [cited 2023 Jan 10];12(4):656–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21118088/>
288. Strazielle N, Ghersi-Egea J-F. Efflux transporters in blood-brain interfaces

- of the developing brain. *Front Neurosci* [Internet]. 2015 Feb 5;9. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnins.2015.00021/abstract>
289. Ek CJ, Wong A, Liddelow SA, Johansson PA, Dziegielewska KM, Saunders NR. Efflux mechanisms at the developing brain barriers: ABC-transporters in the fetal and postnatal rat. *Toxicol Lett* [Internet]. 2010 Aug;197(1):51–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427410014864>
 290. Deeley RG, Westlake C, Cole SPC. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* [Internet]. 2006 [cited 2023 Jan 10];86(3):849–99. Available from:
<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00035.2005>
 291. Natarajan K, Xie Y, Baer M, pharmacology DR-B, 2012 undefined. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. Elsevier [Internet]. [cited 2023 Jan 10]; Available from:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295212000275?casa_token=E-gpN6SttUQAAAAA:0o-wMC6NWk0OTTreGnG-01ngulHN_V4RhRBEzDEmwEliv1vK-X4uL7ldMJJaOB1O6X2bjNRCWLYo
 292. Rice A, Liu Y, Michaelis M Lou, Himes RH, Georg GI, Audus KL. Chemical modification of paclitaxel (taxol) reduces P-glycoprotein interactions and increases permeation across the blood-brain barrier in vitro and in situ. *J Med Chem* [Internet]. 2005 Feb 10 [cited 2023 Jan 10];48(3):832–8. Available from:
<https://experts.umn.edu/en/publications/chemical-modification-of-paclitaxel-taxol-reduces-p-glycoprotein->
 293. Ndungu JM, Lu YJ, Zhu S, Yang C, Wang X, Chen G, et al. Targeted delivery of paclitaxel to tumor cells: Synthesis and in vitro evaluation. *J Med Chem* [Internet]. 2010 Apr 22 [cited 2023 Jan 10];53(8):3127–32. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm901763f>
 294. Xu W, Ling P, Zhang T. Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. *J Drug Deliv* [Internet]. 2013 Jun 27 [cited 2023 Jan 10];2013:1–15. Available

from: /pmc/articles/PMC3712247/

295. Zhang P, Hu L, Yin Q, Zhang Z, Feng L, Li Y. Transferrin-conjugated polyphosphoester hybrid micelle loading paclitaxel for brain-targeting delivery: synthesis, preparation and in vivo evaluation. *J Control Release* [Internet]. 2012 May 10 [cited 2023 Jan 12];159(3):429–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22306333/>
296. Boado RJ, Hui EKW, Zhiqiang Lu J, Pardridge WM. Drug targeting of erythropoietin across the primate blood-brain barrier with an IgG molecular trojan horse. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2010 Jun [cited 2023 Jan 12];333(3):961–9. Available from: https://www.researchgate.net/publication/42108875_Drug_Targeting_of_Erythropoietin_Across_the_Primate_Blood-Brain_Barrier_with_an_IgG_Molecular_Trojan_Horse
297. Ke W, Shao K, Huang R, Han L, Liu Y, Li J, et al. Gene delivery targeted to the brain using an Angiopep-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *Biomaterials* [Internet]. 2009 Dec [cited 2023 Jan 12];30(36):6976–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19765819/>
298. Nielsen SSE, Holst MR, Langthaler K, Bruun EH, Brodin B, Nielsen MS. Apicobasal transferrin receptor localization and trafficking in brain capillary endothelial cells. *Fluids Barriers CNS* 2023 201 [Internet]. 2023 Jan 9 [cited 2023 Jan 11];20(1):1–15. Available from: <https://fluidsbarrierscns.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12987-022-00404-1>
299. Johnsen KB, Burkhart A, Thomsen LB, Andresen TL, Moos T. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2019;181(May):101665. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101665>
300. Moos T, Morgan EH. Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood–brain barrier in the rat. *J Neurochem* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2023 Jan 11];79(1):119–29. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1471-4159.2001.00541.x>
301. Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, Hefti F. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro

- by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J Neurosci*. 1990;10(2):558–70.
302. Palovcik RA, Phillips MI, Kappy MS, Raizada MK. Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res*. 1984 Aug 20;309(1):187–91.
 303. Kabanov A V., Chekhonin VP, Alakhov VY, Batrakova E V., Lebedev AS, Melik-Nubarov NS, et al. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. *FEBS Lett* [Internet]. 1989 Dec 4 [cited 2023 Jan 11];258(2):343–5. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/0014-5793\(89\)90298-8](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/0014-5793(89)90298-8)
 304. Batrakova E V., Li S, Miller DW, Kabanov A V. Pluronic P85 increases permeability of a broad spectrum of drugs in polarized BBMEC and Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* [Internet]. 1999 [cited 2023 Jan 11];16(9):1366–72. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1018990706838>
 305. Fukuta M, Okada H, Iinuma S, Yanai S, Toguchi H. Insulin Fragments as a Carrier for Peptide Delivery Across the Blood–Brain Barrier. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci* [Internet]. 1994 [cited 2023 Jan 31];11(12):1681–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1018942728317>
 306. Zhao Y, Li D, Zhao J, Song J, Zhao Y. The role of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) in regulating blood-brain barrier integrity. *Rev Neurosci*. 2016;27(6):623–34.
 307. Proulx DP, Rouleau P, Paré I, Vallières-Noël MM, Bazin R. Interaction between intravenous immunoglobulin (IVIg) and the low-density lipoprotein receptor-related protein 1: A role for transcytosis across the blood brain barrier? *J Neuroimmunol* [Internet]. 2012;251(1–2):39–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.06.009>
 308. Xin H, Jiang X, Gu J, Sha X, Chen L, Law K, et al. Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma. *Biomaterials* [Internet]. 2011 Jun [cited 2023 Jan 12];32(18):4293–305. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21427009/>

309. Ché C, Yang G, Thiot C, Lacoste MC, Currie JC, Demeule M, et al. New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration. *J Med Chem* [Internet]. 2010 Apr 8 [cited 2023 Jan 12];53(7):2814–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20210346/>
310. Zheng M, Yan C, Yang Q, Zhu F, Du Q, Xia X, et al. Brain-targeted polymersome codelivery of siRNA and temozolomide for effective glioblastoma chemo-RNAi synergistic therapy. *ChemPhysMater*. 2022 Jul 1;1(3):203–10.
311. Xin H, Sha X, Jiang X, Zhang W, Chen L, Fang X. Anti-glioblastoma efficacy and safety of paclitaxel-loading Angiopep-conjugated dual targeting PEG-PCL nanoparticles. *Biomaterials* [Internet]. 2012 Nov [cited 2023 Jan 12];33(32):8167–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22889488/>
312. Huang S, Li J, Han L, Liu S, Ma H, Huang R, et al. Dual targeting effect of Angiopep-2-modified, DNA-loaded nanoparticles for glioma. *Biomaterials* [Internet]. 2011 Oct [cited 2023 Jan 12];32(28):6832–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21700333/>
313. Koffie RM, Farrar CT, Saidi LJ, William CM, Hyman BT, Spires-Jones TL. Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Nov 15 [cited 2023 Jan 12];108(46):18837–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22065785/>
314. Wang P, Liu Y, Shang X, Xue Y. CRM197-induced blood-brain barrier permeability increase is mediated by upregulation of caveolin-1 protein. *J Mol Neurosci* [Internet]. 2011 Mar 16 [cited 2023 Jan 12];43(3):485–92. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12031-010-9471-5>
315. Kuo Y-C, Chung C-Y. Transcytosis of CRM197-grafted polybutylcyanoacrylate nanoparticles for delivering zidovudine across human brain-microvascular endothelial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2012 Mar [cited 2023 Jan 12];91:242–9. Available

from:

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511006527?cas](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511006527?casa_token=IVvI-gOYZvcAAAAA:FfyPbMRFLbi_u_PHcNdeKNt2hkJFnGCy5l0XQkQs-UGZHAcdnLeMDTeCoapkPFe7FUi38NcGFw)
[a_token=IVvI-](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511006527?casa_token=IVvI-gOYZvcAAAAA:FfyPbMRFLbi_u_PHcNdeKNt2hkJFnGCy5l0XQkQs-UGZHAcdnLeMDTeCoapkPFe7FUi38NcGFw)

[gOYZvcAAAAA:FfyPbMRFLbi_u_PHcNdeKNt2hkJFnGCy5l0XQkQs-](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511006527?casa_token=IVvI-gOYZvcAAAAA:FfyPbMRFLbi_u_PHcNdeKNt2hkJFnGCy5l0XQkQs-UGZHAcdnLeMDTeCoapkPFe7FUi38NcGFw)
[UGZHAcdnLeMDTeCoapkPFe7FUi38NcGFw](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511006527?casa_token=IVvI-gOYZvcAAAAA:FfyPbMRFLbi_u_PHcNdeKNt2hkJFnGCy5l0XQkQs-UGZHAcdnLeMDTeCoapkPFe7FUi38NcGFw)

316. Alam MI, Beg S, Samad A, Baboota S, Kohli K, Ali J, et al. Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2010;40(5):385–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.003>
317. Mittal D, Ali A, Md S, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective. <https://doi.org/10.3109/107175442013838713> [Internet]. 2014 Mar [cited 2023 Jan 1];21(2):75–86. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10717544.2013.838713>
318. Westin U, Piras E, Jansson B, Bergström U, Dahlin M, Brittebo E, et al. Transfer of morphine along the olfactory pathway to the central nervous system after nasal administration to rodents. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2005 [cited 2023 Jan 2];24(5):565–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15784346/>
319. Scott JW, Wellis DP, Riggott MJ, Buonviso N. Functional organization of the main olfactory bulb. *Microsc Res Tech* [Internet]. 1993 [cited 2023 Jan 1];24(2):142–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8457726/>
320. Ali J, Ali M, Baboota S, Sahani JK, Ramassamy C, Dao L, et al. Potential of nanoparticulate drug delivery systems by intranasal administration. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2010 May;16(14):1644–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210751>
321. Patil K, Yeole P, Gaikwad R, Khan S. Brain targeting studies on buspirone hydrochloride after intranasal administration of mucoadhesive formulation in rats. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2009 Apr 27 [cited 2023 Jan 2];61(5):669–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19406007/>
322. Kumar M, Misra A, Mishra AK, Mishra PP, Pathak K. Mucoadhesive nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of olanzapine for brain targeting. *J Drug Target* [Internet]. 2008 [cited 2023 Jan 2];16(10):806–14.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18988064/>

323. Vyas TK, Babbar AK, Sharma RK, Singh S, Misra A. Preliminary brain-targeting studies on intranasal mucoadhesive microemulsions of sumatriptan. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2006 Jan 20 [cited 2023 Jan 2];7(1):E49. Available from: [/pmc/articles/PMC2750715/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18988064/)
324. Mayers A. Introduction to Statistics and SPSS in Psychology [Internet]. Introduction to Statistics and SPSS in Psychology. Pearson; 2013. 52–54 p. Available from: <https://books.google.com.tr/books?id=SDHtMgEACAAJ>
325. Golden GT, Fariello RG. Penicillin spikes in rats: Limitations of a simple model for the study of anticonvulsants. *Neuropharmacology*. 1984 Sep 1;23(9):1001–7.
326. Edmonds HL, Stark LG, Hollinger MA. The effects of diphenylhydantoin, phenobarbital, and diazepam on the penicillin-induced epileptogenic focus in the rat. *Exp Neurol* [Internet]. 1974 Nov;45(2):377–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014488674901265>
327. Stark LG, Edmonds HL, Keesling P. Penicillin-induced epileptogenic foci: I: Time course and the anticonvulsant effects of diphenylhydantoin and diazepam. *Neuropharmacology*. 1974;13(4):261–7.
328. Louis S. Intravenous Diphenylhydantoin in Experimental Seizures. *Arch Neurol*. 1968;18(5):472.
329. Kasap Acungil Z, Nacar T. Effect of Resveratrol on a Penicillin-Induced Epilepsy Model in Rats. *Arch Epilepsy*. 2022;28(2):78–84.
330. Steven L. Peterson TEA. Experimental Models of Status Epilepticus. In: *Neuropharmacology Methods in Epilepsy Research*. 1997. p. 108–38.
331. Morrisett RA, Jope RS, Snead OC. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Exp Neurol*. 1987;97(1):193–200.
332. Reddy DS, Kuruba R. Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. *Int J Mol Sci* 2013, Vol 14, Pages 18284-18318 [Internet]. 2013 Sep 5 [cited 2023 Feb 4];14(9):18284–318. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/14/9/18284/htm>
333. Walton NY, Treiman DM. Experimental secondarily generalized convulsive status epilepticus induced by d,l-homocysteine thiolactone.

- Epilepsy Res. 1988;2(2):79–86.
334. Kaube H, Hoskin KL, Goadsby PJ. Inhibition by sumatriptan of central trigeminal neurones only after blood-brain barrier disruption. *Br J Pharmacol.* 1993;109(3):788–92.
335. Burger C, Nguyen FN, Deng J, Mandel RJ. Systemic mannitol-induced hyperosmolality amplifies rAAV2-mediated striatal transduction to a greater extent than local co-infusion. *Mol Ther [Internet]*. 2005 Feb [cited 2023 Feb 6];11(2):327–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15668145/>
336. McCarty DM, DiRosario J, Gulaid K, Muenzer J, Fu H. Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice. *Gene Ther.* 2009;16(11):1340–52.