

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI



FARKLI DENEYSEL EPİLEPSİ MODELLERİNDE TRP İYON
KANALLARININ VE NÖROTROFİK FAKTÖRLERİN
ROLÜ: MOLEKÜLER VE ELEKTROFİZYOLOJİK
YAKLAŞIMLAR İLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

AYŞEGÜL YILDIZ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. AYDIN HİM

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi HAYRİYE SOYTÜRK

BOLU, TEMMUZ - 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ayşegül YILDIZ tarafından hazırlanan “Farklı Deneysel Epilepsi Modellerinde TRP İyon Kanallarının ve Nörotrofik Faktörlerin Rolü: Moleküler ve Elektrofizyolojik Yaklaşımlar ile İncelenmesi” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 7/07/2023

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Aydın HİM
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Şerif DEMİR
Düzce Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNEŞER
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 31/07/2023 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %18 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 2021/20 sayısı ile etik izin alınmıştır.

AYŞEGÜL YILDIZ

ÖZET

**FARKLI DENEYSEL EPİLEPSİ MODELLERİNDE TRP İYON
KANALLARININ VE NÖROTROFİK FAKTÖRLERİN ROLÜ:
MOLEKÜLER VE ELEKTROFİZYOLOJİK YAKLAŞIMLAR İLE
İNCELENMESİ
DOKTORA TEZİ
AYŞEGÜL YILDIZ
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AYDIN HİM)
(İKİNCİ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ HAYRİYE SOYTÜRK)
BOLU, TEMMUZ - 2023
XVI+113**

Amaç: En yaygın nörolojik hastalıklardan biri olan epilepsi dünya çapında birçok bireyde görülmektedir. Bu çalışmada, farklı deneysel epilepsi modelleri kullanılarak TRP iyon kanalları ve bazı nörotrofik faktörlerin gen ifadeleri incelenerek epilepsideki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Etik kurul onayı alınan çalışmamızda ergin *Wistar albino* ve *WAG/Rij* erkek sıçanlar kullanılarak toplamda 32 hayvan (n=8) çalışmaya dahil edildi. Gruplar Kontrol, Akut PTZ, Kronik PTZ (tutuşma) ve Absans Epilepsi modeli şeklinde oluşturuldu. Akut model için tek doz pentilentetrazol (PTZ) (50 mg/kg), kronik PTZ modeli için hayvanların tutuşma davranışları gözlenene kadar haftada üç kez PTZ (35 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. Absans epilepsi modeli ise kendiliğinden epileptiform aktivite oluşturmaktadır. Hayvanlardan 60 dakikalık elektrokortikogram kaydı alındıktan hemen sonra korteks ve hipokampus dokuları izole edildi. Hedef genlerin ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile çalışıldı. Elde edilen veriler SPSS 20.0 yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizi post-hoc LSD testiyle karşılaştırıldı. $p < 0,05$ 'ten küçük olan değerler anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Korteks dokularında TRPM3, TRPM8, TRPV1, NGF genlerinin ekspresyonları kontrol grubuyla kıyaslandığında absans epilepsili grupta anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,05$). Hipokampus dokularında TRPM2, TRPM8 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuyla kıyaslandığında Akut PTZ ve Kronik PTZ gruplarında anlamlı şekilde azalmıştır ($p < 0,05$). Hipokampus dokularında TRPM3 ve TRPV1 genleri kontrol grubuna kıyasla absans epilepsili grupta anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,05$) ayrıca bu dokuda NGF geni de kontrole kıyasla Akut PTZ ve Kronik PTZ gruplarında anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,05$).

Sonuç: Farklı epilepsi modellerinde, TRP iyon kanalları ve büyüme faktörü gen ekspresyon seviyeleri farklı şekilde etkilenmektedir. TRPM3, TRPM8, TRPV1 ve NGF genlerinin artan ekspresyonları, absans epilepsisinin patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabilir ve nöral ağlarda değişikliklere neden olabilir. Hipokampus dokusundaki düşük TRPM2 ve TRPM8 ekspresyonunun Akut PTZ ve Kronik PTZ epilepsi modelleriyle ilişkili olduğu görülmektedir. Bu çalışma, literatüre yeni bir bakış açısı getirmekte ve epilepsi üzerine yapılan araştırmalara katkı sağlamaktadır.

ANAHTAR KELİMELE: Epilepsi, TRP kanalları, BDNF, PTZ, Genetik hayvan modeli

ABSTRACT

THE ROLE OF TRP ION CHANNELS AND NEUROTROPHIC FACTORS IN DIFFERENT EXPERIMENTAL EPILEPSY MODELS: INVESTIGATION WITH MOLECULAR AND ELECTROPHYSIOLOGICAL APPROACHES

PHD THESIS

AYŞEGÜL YILDIZ

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. AYDIN HİM)

(CO-SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. HAYRİYE SOYTÜRK)

BOLU, JULY 2023

XVI+113

Aim: Epilepsy, one of the most common neurological disorders, affects millions of people worldwide. The purpose of this study was to investigate the role of TRP ion channels and some neurotrophic factors in epilepsy by analysing their gene expression in different experimental epilepsy models.

Methods: A total of 32 adult Wistar albino and WAG/Rij male rats (n=8) were used in our study, which was approved by the ethics committee. Control, Acute PTZ, Chronic PTZ (Kindling), and Absence Epilepsy groups have been created. A single dose of pentylenetetrazol (PTZ) (50 mg/kg) was given to the animals in the acute model, whereas PTZ (35 mg/kg) was injected intraperitoneally three times a week until the animals' kindling behavior was observed in the chronic PTZ model. The absence epilepsy model causes epileptiform activity on its own. After 60 minutes of electrocorticogram recording from the animals, the cortex and hippocampal tissues were isolated. The real-time polymerase chain reaction method was used to examine the expression levels of the target genes. Using SPSS 20.0 software, the data collected were compared using a one-way analysis of variance post-hoc LSD test. Significant values were those smaller than $p<0.05$.

Results: The expressions of TRPM3, TRPM8, TRPV1, and NGF genes in cortex tissues increased significantly in the absence epilepsy group compared to the control group ($p<0.05$). In hippocampus, expressions of TRPM2, and TRPM8 genes decreased significantly in the acute PTZ and chronic PTZ groups compared to the control group ($p<0.05$), TRPM3 and TRPV1 genes were significantly increased in the absence epilepsy group compared to the control group ($p<0.05$), and NGF gene expression increased significantly in acute PTZ and chronic PTZ groups compared to the control ($p<0.05$).

Conclusion: TRP ion channels and growth factor gene expression levels can be affected differently in different epilepsy models. Increased expression of TRPM3, TRPM8, TRPV1, and NGF genes may play an important role in the pathophysiology of absence epilepsy and cause changes in neural networks. This study brings a new perspective to the literature and contributes to research on epilepsy.

KEYWORDS: Epilepsy, TRP channels, BDNF, PTZ, Genetic animal model

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	xi
FOTOĞRAF LİSTESİ	xii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
TEŞEKKÜR	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1 Epilepsi ve Epileptik Nöbet.....	13
2.2 Günümüzde Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırılması	15
2.2.1 Fokal Başlangıçlı Nöbetler	20
2.2.2 Jeneralize Başlangıçlı Nöbetler	21
2.2.3 Bilinmeyen Nöbetler	21
2.2.4 Sınıflandırılmayan Nöbetler	21
2.3 Epilepsi Patofizyolojisi (Epileptogenez)	21
2.4 EEG ve ECoG	23
2.5 Deneysel Epilepsi Modelleri	28
2.5.1 Kimyasallarla Oluşturulan Deneysel Epilepsi Modelleri	28
2.5.2 Elektriksel Uyarıyla Oluşturulan Epilepsi Modelleri	29
2.5.3 Beyin Hasarıyla Oluşturulan Modeller	29
2.5.4 Genetik Epilepsi Modelleri.....	29
2.6 TRP Kanalları	31
2.6.1 TRP Kanal Biyolojisi ve Patolojisi.....	33
2.6.2 TRPM Kanalları	33
2.6.3 TRPV1 Kanalı	35
2.7 TRP Kanalları ve Epilepsi	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1 Gereçler	42
3.1.1 Cihazlar.....	42
3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Uygulanış Şekilleri.....	43
3.1.3 Deney Hayvanları	43
3.1.4 Sarf Malzemeler, Kimyasal Maddeler ve Kullanılan Ticari Kitler ..	45

3.2 Yöntem	45
3.2.1 Cerrahi İşlem	45
3.2.2 Akut PTZ Modelinin Oluşturulması.....	46
3.2.3 Kronik PTZ (Tutuşma) Modelinin Oluşturulması.....	46
3.2.4 Elektrokortikogram (ECoG) Kayıtları.....	47
3.2.5 Elektrofizyolojik Kayıtların Değerlendirilmesi.....	49
3.2.6 Beyin Dokularının Alınması ve Saklanması	49
3.2.7 Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi	50
3.3 İstatistiksel Analiz.....	54
4. BULGULAR	56
4.1 Elektroforez Jel Görüntüsü.....	56
4.2 ECoG Bulguları.....	56
4.2.1 Kontrol Grubunun ECoG Verileri	57
4.2.2 Akut PTZ Grubunun ECoG Verileri	57
4.2.3 Kronik PTZ (Tutuşma) Grubunun ECoG Verileri	57
4.2.4 Absans Epilepsili WAG/Rij Sıçan Grubunun ECoG Verileri	58
4.3 Moleküler Bulgular	59
4.3.1 Total RNA İzolasyonu.....	59
4.3.2 cDNA Sentezi	61
4.3.3 qRT-PCR ile mRNA Ekspresyonları ve Erime Eğrisi Analizleri	63
5. TARTIŞMA	76
5.1 TRPM2 Hakkında Veriler	76
5.2 TRPM3 Hakkında Veriler	79
5.3 TRPM8 Hakkında Veriler	80
5.4 TRPV1 Hakkında Veriler	83
5.5 BDNF Hakkında Veriler.....	86
5.6 NGF Hakkında Veriler	89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
7. KAYNAKLAR.....	96

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. ILAE'ye göre Epilepsi Sınıflandırılması.	16
Şekil 2.2. Nöbet tiplerinin ILAE'ye göre sınıflandırılması.	17
Şekil 2.3. EEG, A ve B.	27
Şekil 2.4. Patojenik EEG Dalgaları.....	28
Şekil 2.5. TRP kanallarının yapıları arasındaki benzerlikler ve farklılıklar	32
Şekil 2.6. Epilepside yer alan TRP ailesine ait kanalların yapıları.....	37
Şekil 3.1. Güç analizi.....	44
Şekil 3.2. Etki faktörü analizi	44
Şekil 3.3. Kronik PTZ (Tutuşma) epilepsi modelinin zaman gösterge çizelgesi.....	47
Şekil 3.4. Kontrol grubundan alınan ECoG kaydı	48
Şekil 3.5. Akut PTZ grubundan alınan ECoG kaydı	48
Şekil 3.6. Kronik PTZ (tutuşma) grubundan alınan ECoG kaydı.....	48
Şekil 3.7. Absans Epilepsili WAG/Rij sıçan grubundan alınan ECoG kaydı....	49
Şekil 4.1. Korteks ve hipokampus örneklerindeki TRPM2 ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.)	66
Şekil 4.2. Korteks dokusundaki TRPM2 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=85^\circ C$).	66
Şekil 4.3. Hipokampus dokusundaki TRPM2 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=85^\circ C$).	67
Şekil 4.4. Korteks ve hipokampus örneklerindeki TRPM3 ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.)	67
Şekil 4.5. Korteks dokusundaki TRPM3 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=80,50^\circ C$).	68
Şekil 4.6. Hipokampus dokusundaki TRPM3 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=80,50^\circ C$).	68
Şekil 4.7. Korteks ve hipokampus örneklerindeki TRPM8 ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.)	69
Şekil 4.8. Korteks dokusundaki TRPM8 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=86^\circ C$).	69
Şekil 4.9. Hipokampus dokusundaki TRPM8 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=86^\circ C$).	70
Şekil 4.10. Korteks ve hipokampus örneklerindeki TRPV1 ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.)	70
Şekil 4.11. Korteks dokusundaki TRPV1 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=84,50^\circ C$).	71
Şekil 4.12. Hipokampus dokusundaki TRPV1 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=84,50^\circ C$).	71
Şekil 4.13. Korteks ve hipokampus örneklerindeki BDNF ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.)	72
Şekil 4.14. Korteks dokusundaki BDNF gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=86,50^\circ C$).	72
Şekil 4.15. Hipokampus dokusundaki BDNF gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=86,50^\circ C$).	73
Şekil 4.16. Korteks ve hipokampus örneklerindeki NGF ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.)	74

Şekil 4.17. Korteks dokusundaki NGF gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=84,50^{\circ}\text{C}$).	74
Şekil 4.18. Hipokampus dokusundaki NGF gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=84,50^{\circ}\text{C}$).	75



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar	42
Tablo 3.2. Deneyde kullanılan primerler.....	51
Tablo 4.1. Akut PTZ grubunun ECoG verileri.....	57
Tablo 4.2. Kronik PTZ (Tutuşma) grubunun ECoG verileri.....	58
Tablo 4.3. Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubunun ECoG verileri.....	58
Tablo 4.4. Korteks dokusundaki RNA konsantrasyonları.....	60
Tablo 4.5. Hipokampus dokusundaki RNA konsantrasyonları.....	61
Tablo 4.6. Korteks dokusundaki cDNA konsantrasyonu	62
Tablo 4.7. Hipokampus dokusundaki cDNA konsantrasyonu	63
Tablo 4.8. <i>TRPM2</i> , <i>TRPM3</i> , <i>TRPM8</i> , <i>TRPV1</i> , <i>BDNF</i> , <i>NGF</i> gen ürünleri için T _m (°C) değerleri.....	64
Tablo 4.9. <i>TRPM2</i> , <i>TRPM3</i> , <i>TRPM8</i> , <i>TRPV1</i> , <i>BDNF</i> , <i>NGF</i> genlerinin deney gruplarına ait korteks ve hipokampus dokularındaki relatif ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) düzeyleri ve ortalama $\pm$ S.H.'ları.....	65

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 3.1. Cerrahi işlemde bir görüntü.....	46
Fotoğraf 3.2. Hayvanların kafatasına yerleştirilen kalıcı elektrot.....	46
Fotoğraf 3.3. Hayvanlardan alınan beyin dokuları	50
Fotoğraf 4.1. Beyin dokularından elde edilen cDNA'ların jel görüntüsündeki elektroforez işlemi band görüntüleri	56



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
5HT	: 5-hidroksiindolasetik asit
AMPA	: α-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolepropiyonik Asit
ARD	: Ankirin Tekrar Domaini
ATP	: Adenozin Trifosfat
BDNF	: Beyin kaynaklı Nörotrofik Faktör
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
CA1/3	: Cornu Ammonis 1/3
CACNA1H	: Kalsiyum Voltaj Kapılı Kanal Alt Birimi Alfa1 H
CCI	: Kronik Daralma Hasarı
cDNA	: Komplementer DNA
COOH	: Karboksil Grubu
CZP	: Kapsazepin
DDD	: Diken Dalga Deşarjı
ddH₂O	: Double Distile Su
DEHAM	: Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
dk	: Dakika
ECoG	: Elektrokortikogram
EEG	: Elektroensefalografi
EFHC1	: EF-el motifi içeren proteini kodlayan gen
FLA2	: Fosfolipaz A2
g	: Gram
GABA	: Gama Aminobutirik Asit
GABA_A	: Gama Aminobutirik Asit A Reseptörü
GABA_B	: Gama Aminobutirik Asit B Reseptörü
GAERS	: Genetik Absans Epilepsili Sıçan
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
Hz	: Hertz
i.p.	: İntraperitoneal
İJE	: İdiyopatik Jeneralize Epilepsi

ILAE	: Uluslararası Epilepsiye Karşı Lig
K⁺	: Potasyum İyonu
Kv7	: Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
L	: Litre
mg	: Miligram
Mg⁺²	: Magnezyum İyonu
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mTOR	: Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
mV	: Milivolt
Na⁺	: Sodyum İyonu
ng	: Nanogram
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NH	: Nörodejeneratif Hastalıklar
NH₂	: Amino Grubu
NMDA	: N-metil-D-aspartat
PCK	: Protein Kinaz C
PCR	: Polimeraz Chain Reaksiyonu
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
pH	: Hidrojen Potansiyeli
PIP₂	: Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfat
PISE	: Pilocarpin ile İndüklenen Status Epileptikus
PK	: Protein Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PMCA	: Plazma Membranı Ca ⁺² ATPaz
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
PTZ	: Pentilentetrazol
qRT-PCR	: Kantitatif Eş Zamanlı-PCR
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
S.H.	: Standart Hata

SPECT	: Tek Foton Emisyonlu Bigisayarlı Tomografi
Tm	: Erime sıcaklığı
TM	: Trans Membran
TrkB	: Tropomiyozin reseptör kinaz B
TRP	: Transient Reseptör Potansiyeli
TRPM2	:Transient Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı Alt Ailesi M Üyesi 2
TRPM3	: Transient Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı Alt Ailesi M Üyesi 3
TRPM8	: Transient Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı Alt Ailesi M Üyesi 8
TRPV1	: Transient Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı Alt Ailesi V Üyesi 1
VDAC1	: Voltaj Bağımlı Anyon Kanalı 1
WAG/Rij	: Wistar Albino Glaxo/Rijswijk Suşu

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımda her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, çok kıymetli rahmetli Annem Nuriye YILDIZ'a, kıymetli Babam Recep YILDIZ'a, kıymetli kardeşlerim Nilgün YILDIZ'a ve Gamzegül YILDIZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kendisiyle doktora sürecinde iyi ki tanıştım dediğim, fikirlerimi eyleme geçiren, her zaman beni destekleyen, dinleyen, tez çalışmamızı engin bilgi ve tecrübesiyle en güzel şekilde çalışıp bitirdiğimiz, zor günlerimde en büyük destekçim olan sevgili hocam ayrıca ikinci tez danışmanım olan kıymetli Dr. Öğr. Üyesi Hayriye SOYTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayatım başladığından beri kendisini tanıdığım, akademik bilgisine her zaman güvendiğim, tez konumu destekleyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Aydın HİM'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım laboratuvarlarını bana açan, bu süreçte beni destekleyen kıymetli Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ hocama ve kıymetli Doç. Dr. Gökhan ARSLAN hocama, doktora sürecinde yardımları ve engin bilgilerini esirgemeyen kıymetli rahmetli Prof. Dr. Tufan MERT hocama, moleküler çalışmalarımda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Cansu ÖNAL hocama, deney aşamasında ve doktora boyunca yardımlarını esirgemeyen çok değerli Asistan Yusuf Talha İÇOĞLU'na, Asistan Onur DEMİR'e, Dr. Didem AYHAN'a, Dr. Emre Soner TİRYAKİ'ye, Asistan Elif TÜRKDÖNMEZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmayı destekleyen BAİBÜ BAP Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma BAİBÜ BAP kapsamında 2022.08.02.1553 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Bu tez kıymetli anneme ithaf edilmiştir...

1. GİRİŞ

Halk arasında “sara hastalığı” olarak bilinen epilepsi en yaygın nörolojik ve kronik beyin hastalığıdır. Epilepsi, dünya çapında yaklaşık 70 milyon insanı etkilemektedir (1). Epilepsiye neden olan faktörler arasında akut beyin yaralanmaları (örneğin nörotravma, inme, beyin tümörleri veya status epileptikus), gen mutasyonları, Merkezi Sinir Sistemi (MSS) enfeksiyonları, metabolik bozukluklar ve otoimmün durumlar yer alır (2). Epilepsi genellikle bilişsel bozukluklar, anksiyete ve depresyon gibi nörolojik komorbiditeler ve hastaların yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen psikiyatrik bozukluklarla da ilişkilidir (3). Bununla birlikte, birçok hasta için epilepsinin nedenleri hala bilinmemektedir.

Kötü yaşam kalitesi ve morbidite riskini artıran önemli bir faktörü temsil eden tekrarlayan ve provoke edilmemiş nöbetlerin varlığı, epileptik koşulların ortak bir özelliğidir. Epilepsinin oluşumu, MSS’deki nöronal ağların anormal hipersenkronize elektriksel aktivitesine yol açan inhibitör ve uyarıcı nöronların dengesizliğine bağlanmıştır (4). Bununla birlikte, epileptogenezden sorumlu hücrel ve moleküler mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Tüm epilepsi nöbetlerinde aynı mekanizmadan söz edilmemekle birlikte hepsinde artmış nöronal uyarılabilirlik ve aşırı nöronal aktivite gibi ortak özellikler mevcuttur. Epileptojenik odak adını verdiğimiz beyin bölgelerindeki hücreler tam açıklanamayan nedenlerle artmış uyarılma ve anormal ateşlenme özelliği gösterirler ve etraflarındaki normal hücreleri de bu duruma ortak ederler (5).

Gama aminobutirik asit (GABA), MSS’deki majör inhibitör nörotransmitterdir ve GABA reseptör sistemi bu etkisini GABA_A ve GABA_B reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir (6). GABAerjik sistemin işlevsel bozukluğu veya eksikliği epilepsi, ağrı ve anksiyete ile ilişkilendirilmiştir (7). Bu nedenle, nöronal voltaj kapılı sodyum kanalları, aksonlar boyunca aksiyon potansiyellerinin yayılmasına aracılık eder ve bu nedenle, antinöbet ilaçlarının önemli hedefleri olduğu düşünülmektedir (8).

Beyindeki senkronize elektrik boşalımının ardından epileptik nöbetler meydana gelmektedir. GABA’nın aracılık ettiği inhibitör sinaptik iletimdeki işlev bozukluğu, artmış glutamaterjik uyarıcı sinaptik mekanizmalar, kalsiyum

akışındaki artışlar ve spontan nöronal ateşlemenin yoğunlaşması nöbetlerden sorumlu başlıca mekanizmalardır (9).

GABA'nın GABA_A reseptörüne bağlanması, kanalın açılmasına yol açarak klor iyonunun hücre içine girmesine izin vermektedir ve membranın uyarılabilirliğinin azalmasına neden olmaktadır. Bu da nöronal elektriksel aktivitenin hızlı bir şekilde inhibisyonunu sağlamaktadır (6). GABA'nın GABA_B reseptörüne bağlanması ise potasyum akımını arttırmakta, kalsiyum iyon girişini azaltmakta ve diğer nörotransmitterlerin presinaptik salınımını inhibe etmektedir (10). GABA_A iletimindeki azalmanın *in vitro* ortamda memeli neokorteksinde epileptiform aktiviteye neden olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Ayrıca, epilepsi gelişimi esnasında GABA_A reseptörlerinin aşırı eksprese olduğu bulunmuştur. GABA_B reseptörlerinin ise epilepsi ve nöbetlerdeki rolü net değildir (11). Glutamat en önemli eksitator nörotransmitter olarak N-metil-D-aspartat (NMDA) ve non-NMDA reseptörleri üzerinden etkisini gösterir. NMDA reseptörleri sodyum ve kalsiyumun nöron içine girişini sağlayarak yavaş etkili ve uzun süreli eksitator postsinaptik potansiyellere neden olur. Bu da epileptik burst sinyallerinin oluşmasını sağlamaktadır. Non-NMDA reseptörlerinin en önemli alt tipi olan α -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolepropionik Asit (AMPA) özellikle piramidal nöronlarda eksitator sinaptik aktivite yapar (12).

Bazı epileptik sendromlarda genetik faktörlerin rolü olduğu gösterilmiştir. Örneğin, gen mutasyonları anormal iyonik kanal fonksiyonlarına yol açabilmekte ve anormal ağ bağlantılarını etkileyebilmektedir (13). Tek gen epilepsilerinin çoğu, nöronal iyon kanallarını kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. İyon kanallarındaki mutasyonlar eksitator ve inhibitör nörotransmisyonun etkinliğinin değişmesine yol açmakta; sonuç olarak da eksitator nörotransmisyonun artmasına ya da inhibitör fonksiyonun kaybına neden olmaktadır. İyon kanallarının dışında GABAerjik sisteme ait genetik bozukluklar da tespit edilmiştir.

Hasar görmüş beyinde; nörogenez, yosunlu lif oluşumu ve hipokampal hücre ölümünün anormal nöronal devre reorganizasyonuna katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (14). Bu yeniden yapılanmanın ortaya çıkması, belirli nörotransmitter reseptörlerinin ve iyon kanallarının değişen seviyeleriyle (uzun süreli güçlenmeye bağlı sinaptik plastisite gibi) ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nöronların

fonksiyonel özellikleri değıştikçe, kontrolsüz aşırı uyarılma durumu meydana gelebilir ve buna GABA aracılı inhibisyonda azalma eşlik eder (15). İyonların membranlardaki hareketi tüm yaşam formları için oldukça hayatidir. Membranda iyon kanallarından iyon akımının fizyolojik koşullarda gerçekleşmesi membran potansiyelinin ve hücrenin elektriksel uyarılabilirliği için en önemli faktördür. Beyni ve iskelet kasını etkileyen bazı iyon kanal hastalıkları arasında; epilepsi, ailesel hemiplejik migren, epizodik ataksi, spinoserebellar ataksi, hiperepleksi, eritemalji, periyodik paralizi, miyotoni, konjenital miyastenik sendrom, malignant hipertermi ve santral kor hastalığı yer almaktadır (16).

Bireysel nöron ve ağ uyarılabilirlikleri, farklı voltaj kapılı ve ligand kapılı iyon kanalları tarafından kontrol edilen hücre içi ve hücre dışı sıvı arasındaki iyon konsantrasyon gradyanlarıyla sağlanır (17). Aşırı uyarılma, kusurlu inhibisyon, enerji yetersizliği, mekanik travma veya kan-beyin bariyeri kusurlarından kaynaklanan iyon konsantrasyonu homeostazının bozulması ve nöronal uyarılabilirliğin bozulmasına yol açacaktır (18).

Beyindeki dejenerasyon, esas olarak beyindeki nöronları ve glia'yı etkileyen farklı koşullara sahip nörodejeneratif hastalıkları (NH) kapsar. Ancak, NH'lerin risk faktörleri ve patofizyolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu iyonik mekanizmaların düzenleyici süreçleri, patolojik koşullarda bulunmayabilir veya aşırı olabilir, bu da NH'ye sahip bireylerin beyinlerinin farklı bölgelerinde hücre ölümü sebebiyle nöron kaybına yol açabilir. NH'lerde homeostazın bozulması hücre ölümüne yol açabildiği ve Transient Reseptör Potansiyeli (TRP) kanallarının potansiyel katkısının olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

TRP kanallarının hücreyi kalsiyum (Ca^{+2}) yoluyla geri yükleme veya uyarma yeteneği 'Plazma Membranı Ca^{+2} ATPaz (PMCA)' aktivitesi düzeyine bağlı olarak düzenlenmesi hala araştırılmaktadır. PMCA eş zamanlı olarak intraselüler Ca^{+2} ve hidrojen potansiyeli (pH) regülasyonunu etkilediğinden, TRP kanalları ve PMCA böylece çeşitli hücre tiplerinde veya TRP kanallarının ve PMCA'nın ifade edildiği beynin spesifik bölgelerinde iyonik homeostazın modüle edilmesinde önemli rolleri mevcuttur. Bu nedenle, patolojik koşullar altında TRP kanallarının ve/veya PMCA'nın disfonksiyonu, beyindeki anormal Ca^{+2} ve pH seviyelerine bağlı olarak nöronal homeostazı bozarak çeşitli NH'lere neden

olmaktadır. NH'lerin tedavisi için yeni hedefler sağlayabilen, TRP kanallarının ve hücre içi Ca^{+2} ve pH'ın kontrolündeki işlevi ele alınmaktadır (19).

Epileptik nöbetler, MSS de anormal fokal veya jeneralize olan senkronize elektriksel deşarjlarla indüklenir. Fizyolojik şartlarda nöronlar arasındaki iletişimde denge, eksitator ve inhibitör devreler ağıyla düzenlenmektedir. Hem eksitator mekanizmaların artışı hem de inhibitör mekanizmaların bozulması bu dengeyi epileptik deşarjlarla sonuçlanabilecek şekilde bozabilir. Nöronların uyarılabilirliği ve iletişimlerinin altında aksonal iletiye aksiyon potansiyelleriyle aracılık edilmesi ve hücreden hücreye sinyal iletiminin sinapslarla gerçekleşmesi gibi iki temel mekanizma yer almaktadır. İyon kanalları her iki işlemde temel oluşturduğu için, mutasyonla indüklenen herhangi bir işlev bozukluğu doğrudan beynin uyarılabilirliğini etkileyebilir ve epileptik nöbetleri tetikleyebilir (20, 21).

Hücre içerisinde voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları veya ligand kapılarının (nörotransmitter gibi kimyasal bir habercinin) aktivasyonuna bağlı hücre içerisinde Ca^{+2} iyon artışının epilepsi oluşumunda önemli rolü olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, günümüzde epilepsi tedavisinde kullanılan birçok ilaç bu kanalları bloke ederek tedavi sağlamaktadır. Fakat mevcut ilaçların çoğu tam tedavi sağlayamamaktadır. Bunun başlıca nedenleri, epilepsinin etiyolojisinin tam açığa çıkartılamamış olması ve mevcut ilaçların hiç birisinin TRP kanallarını bloke edememesidir (22).

TRP kanalları, hücresel işlevler ve sinyal yolları üzerinde belirgin etkileri olan duyuşal sinyallerin önemli araçlarıdır. TRP kanallarını kodlayan genlerdeki mutasyonlar, insanlarda kardiyovasküler, renal, iskelet ve sinir sistemlerini etkileyen çeşitli kalıtsal hastalıkların nedeni olmaktadır (23).

Hücre içi Ca^{+2} , beyin sinyallemede karmaşık bir role sahiptir ve nöronal bütünlüğü korumak için beyin fizyolojisini düzenlemektedir (24). Ca^{+2} 'un hücre zarı boyunca akışı, esas olarak glutamat reseptör kanalları, voltaj kapılı kalsiyum kanalları, sodyum-kalsiyum değıştirici ve TRP kanallarının aracılık ettiği temel beyin fonksiyonları için önemlidir (19, 25, 26). Bu nedenle, Ca^{+2} sinyali, çeşitli fizyolojik rollerde çeşitli nöronal işlevleri etkiler ve Ca^{+2} patolojik koşullara yol açabilecek kontrolsüz yanıtlardan kaçınmak için kararlı bir şekilde düzenlenmelidir

(26). Bununla birlikte, Ca^{+2} 'de sürekli artan akış, endoplazmik retikulum stresine, mitokondriyal disfonksiyona ve çeşitli proteazların aktiflenmesine neden olarak nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır (25). Nitekim, reaktif oksijen türlerinin ve anormal pH homeostazının neden olduğu bozulmuş hücre fonksiyonu, nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinin de temelini oluşturmaktadır (27, 28). Özellikle Ca^{+2} 'un akımı ve pH seviyeleri, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, Huntington Hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz ve yaşa bağlı bozukluklarda görülmektedir (29, 30).

TRP kanalları hem asidik hem alkali şartlarda; sıcaklık, gerilme/basınç, kimyasallar, oksidasyon/indirgeme, ozmolarite ve pH dahil hücresel ortamdaki değişikliklere yanıt veren 'hücresel sensörler'dir (31, 32). TRP kanallarının *in vivo* olarak nasıl modüle edildiği hala bilinmemektedir.

TRP kanallarının aktivasyonu, katyonların membrandan geçmesine ve hücreleri depolarize etmesine izin vererek çok çeşitli hücresel tepkilere yol açmaktadır. Çok çeşitli uyarılarla uyarılan ve muhtemelen vücuttaki tüm hücrelerde ifade edilen (33), TRP kanallarının çeşitli fizyolojik roller oynadığı düşünülmektedir. Bu alandaki kapsamlı araştırmalar, TRP kanallarının periferik ve merkezi sinir sistemini (34), solunum sistemini (35) etkileyen bir dizi hastalıkta rol oynadığını göstermiştir. Genito-üriner (36), gastrointestinal (37), kardiyovasküler (38) ve bağışıklık sistemleri (39) ile obezite ve diyabet dahil metabolik bozukluklarda da (40) rol oynamaktadır.

TRP kanalları aynı zamanda G Proteinine Bağlı Reseptörlerin aktivasyonu ile indüklenen hücre içi Ca^{+2} artışı ile uyarılır ve downregulasyon sinyaline aracılık eder. Ayrıca TRP kanallarının aktivitesi, Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfat (PIP_2), Diaçilgliserol, Adenozin Trifosfat (ATP) ve kalmodulin dahil olmak üzere çeşitli hücre içi moleküller tarafından modüle edilmektedir (41).

Genel olarak iyon kanallarından herhangi birinde meydana gelen eksiklik kanalopati olarak tanımlanmıştır. Çoğu iyon kanalı gibi TRP kanalopatisi de keşfedilmiştir ve etkileri, zardaki iyon kanallarının sayısındaki değişikliklerle tetiklenebilir, bu da kanalların duyarlılaşmasına veya duyarsızlaşmasına neden olabilir. Sonuç olarak, fizyolojik veya zararlı uyarılara tepki olarak yanıtta

değişiklik göstermektedir (30). TRP kanalları beynin birçok farklı bölgesinde bulunmaktadır. TRP kanalları ile hastalıklar arasındaki doğrudan bağlantı, TRP genlerindeki mutasyonların 'TRP Kanalopatileri' olarak adlandırılan kalıtsal hastalıklarla nedensel olarak ilişkili olduğunu gösteren insan genetik çalışmaları tarafından ortaya çıkarılmıştır (42).

TRP kanallarından TRPV1, zararlı ısı, keskin kimyasallar (kapsaisin ve jöle balığı zehiri) ve protonlar dahil olmak üzere çok sayıda ağırlı uyaranla aktive edilmektedir. Ek olarak, TRPV1 voltaj, lipidler ve fosforilasyon ile aktive edilebilir (43). TRPV1 eksikliği olan fareler, bradikinin ve/veya Sinir Büyüme Faktörü (NGF) gibi enflamatuvar araçlara yanıt olarak azalmış termal hiperaljezi göstermektedir (44).

TRPV1, Protein Kinazlarla (PK) fosforilasyon ve fosfatazlarla defosforilasyon, kanal aktivitesinin belirlenmesine önemli katkı sağlamaktadır (45). TRPV1'in Protein Kinaz C (PKC) tarafından fosforilasyonunun, TRPV1'in enflamasyon sırasında termal hiperaljeziye neden olmak için duyarlı hale geldiği önemli bir biyokimyasal mekanizmayı temsil ettiği düşünülmektedir (46). TRP kanallarının 'sinyal pleksleri' ve 'kanalozomlar' oluşturmak için artan sayıda hücre içi proteinlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir (47). Bu tür etkileşimlerin artık TRP kanalı trafiği, konumlandırma ve aktivitesi için önemli olduğuna inanılmaktadır (48). Son araştırmalar, TRP kanalları ve düzenleyici proteinleri arasındaki etkileşimin manipülasyonunun terapötik amaçlar için kullanılabileceğini göstermektedir.

TRPM alt ailesi, sekiz seçici olmayan katyon kanalından oluşan TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6/7 ve TRPM8 olarak kabul edilmiştir. Bu kanallar ilk olarak yüksek oranda metastatik melanom olarak bilinen kanser hücre dizilerinde TRP kanallarının ekspresyonunu azaltan protein olarak tanımlanmıştır (49). Bu kanallardan birkaçı sinir sisteminde çok önemli bir rol oynasa da (örneğin nöroinflamasyon) TRPM3 ve TRPM8, özellikle deri, sinüsler, akciğerler ve gastrointestinal sistemde duyu sinirleri arasında en belirgin kanallardır (50).

Nosiseptif duyu nöronlarında bir dizi TRP kanalı (TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM3, TRPM8, TRPC1, TRPC3 ve TRPC6 dahil) eksprese edilmektedir. Genetiği değiştirilmiş hayvanlar ve farmakolojik ajanlarla yapılan kapsamlı araştırmalar, bu TRP kanallarının ağrının üretimi ve iletilmesinde rol oynadığını ve bu nedenle yeni analjezik ajanların geliştirilmesi için umut verici hedefleri temsil ettiğini doğrulamıştır (32, 51).

TRPM alt ailesi iyon kanallarının ekspresyonundaki ve işlevindeki değişiklikler, insanlarda kardiyovasküler ve nörodejeneratif değişiklikler, organ disfonksiyonu, kanser ve diğer kanalopatiler dahil olmak üzere birçok hastalığı oluşturabilir. TRP iyon kanalları, vasküler ve immün hücrelerin düzenlenmesi, nöroendokrin hücrelerde ekzositoz, hipokampal nöronların farklılaşması dahil olmak üzere heterojen fizyolojik ve patolojik süreçlere katılmaktadır (52).

TRPM2, bir hücrel redoks (oksidatif stres) sensörü olarak işlev görür ve bipolar bozukluk, diyabet ve ayrıca kardiyovasküler ve nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde rol oynamaktadır. TRPM2'deki mutasyonun, Amyotrofik Lateral Skleroz/Parkinsonizm-demans kompleksiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür (42). Nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların gelişiminde anahtar rol oynadıklarına inanılan beyinde bir dizi TRP kanalı ifade edilmektedir (53). Bunlardan TRPM2, beyindeki mikroglia ve nöronlarda ifade edilir ve bir redoks sensörü olarak işlev görebilmektedir. TRPM2'nin oksidatif stres ile aktivasyonu hücre ölümüne yol açabilmektedir. TRPM2 eksikliği olan fareler, felç fokal iskemi modelinde nöronal ölüme karşı direnç göstermiştir (54).

TRPM8, soğuğa duyarlı nosiseptif A delta ve C liflerinde ifade edilmektedir (55). Topikal mentol, karpal tünel sendromu ve boyun ağrısı olan hastalarda analjezik olarak klinikte denenmiştir. Doğal olarak oluşan TRPM8 antagonistleri arasında bitki kannabinoidleri kannabidiol, kannabinol ve kannabiogerol bulunmaktadır (56). TRPM8-nakavt farelerle yapılan çalışmalar, soğuğa karşı azalmış duyarlılığın yanı sıra, sinir yaralanması veya iltihaplanmadan sonra soğuğa karşı zayıflamış aşırı duyarlılık göstermektedir (57). Sentetik TRPM8 antagonistleri, sıçanlarda kronik daralma hasarı (CCI) olarak adlandırılan siyatik sinir etrafındaki dört gevşek ligatür tarafından indüklenen bir nöropatik ağrı modelinde analjezik olmaktadır. Böylece soğuğa aşırı duyarlılık ile karakterize

edilen hastalıkların tedavisi için bir yöntem sağlayabileceğine dair ek kanıtlar sağlamaktadır (58).

TRPM8-nakavt farelerde yapılan çalışmalarda elde edilen veriler, nöropatik ağrının kemirgen modellerinde soğuk allodini (zararsız soğuktan kaynaklanan ağrı) için TRPM8'in gerekli olduğunu göstermektedir. Soğuğa aşırı duyarlı nöropatide TRPM8'in değerlendirilmesi hem vahşi hem de TRPM8-nakavt fareler için siyatik sinir üzerinde 'CCI' modelinde gerçekleştirilmiştir (59). TRPM8-double nakavt farelerinde CCI'yi takiben soğuğa duyarlılıkta önemli bir artış göstermezken, vahşi tip farelerde soğuğa karşı daha fazla duyarlı hale gelmiştir. CCI'dan sonra soğuk veya mentol kaynaklı nosifensif davranış (zararlı bir uyarana karşı canlının gelecekte bundan kaçınmasına neden olan davranışsal ve fizyolojik bir tepki) üzerinde benzer etkiler bildirilmiştir (60). Ayrıca, TRPM8 antagonistlerinin yakın zamanda visseral ağrı modellerinde yerleşik ağrıyı başarılı bir şekilde tersine çevirdiği bulunmuştur (61). Ağrıyı hafifletmek için topikal soğuk uygulama yaygın bir yöntemdir. TRPM8'in soğuk ve mentol kaynaklı analjezideki rolü, TRPM8-nakavt fareleri ile yapılan deneylerle doğrulanmıştır (62). TRPM8 kanalları, duyuşal nöronlarda eksprese edilmektedir. Örneğin inflamasyon olduğunda hem beyaz kan hücrelerinden hem de sinir terminallerinden hücre dışı sinyal moleküllerinden oluşan bir "kokteyl" üretilir ve duyuşal nöronların hem ağrılı hem de ağrısız uyaranlara duyarlılığı artar. Bradikinin, hücre dışı ATP ve farklı prostaglandinler dahil olmak üzere bu enflamatuvar araçların çoğu, Fosfolipaz C veya adenilat siklaza bağlı G-protein-bağlı reseptörleri aktive etmektedir. Ek olarak, reseptör tirozin kinazlar üzerinde etkili olan NGF gibi büyüme faktörleri üretilir ve sinir terminallerinin akut sensitizasyonuna katkıda bulunabilir (63). Öte yandan, hücre yüzeyi reseptörlerinin aktivasyonunun TRPM8 üzerindeki etkileri yeni yeni ortaya çıkmaya başlamıştır.

TRPV1, genellikle hücre yüzeyi reseptörleri tarafından ısıya karşı daha duyarlı hale getirilirken, TRPM8 ise akut enflamatuvar ajanlar tarafından inhibe edilme eğilimindedir (64). PKC aktivasyonunun TRPM8 inhibisyonuna neden olduğu mekanizma henüz net değildir. Forbol ester işlemi, TRPM8 proteininin fosforilasyonunun azalmasına yol açmıştır. Fosfolipaz A2 (FLA2)'nin TRPM8 üzerindeki genel uyarıcı etkisi göz önüne alındığında, lizofosfolipidlerin pozitif

etkisinin araşidonik asidin inhibe edici etkisine baskın olması muhtemeldir. FLA2 ürünleri, TRPM8 aktivitesi mentol ve icilin duyarlılığını modüle ederken, FLA2'nin TRPM8'in soğuk veya kimyasal agonistleri tarafından aktivasyonu için mutlak bir gereklilik olmadığını göstermektedir (65).

Epilepsinin başlangıcına çok sayıda faktör katkıda bulunmasına rağmen, iyon kanalları, membran uyarılabilirliği ve diğer birçok nöronal özelliğin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu kanalların düzensizliği, genelleştirilmiş kortikal spike ve dalga nöbetleri gibi epilepsinin merkezi bir özelliğine yol açabilir. Son çalışmalar, TRP kanallarının epilepsi patolojisinde rol oynayabileceğini göstermektedir (66). Düşük Ca^{+2} ve düşük magnezyum (Mg^{+2}) konsantrasyonları, piramidal nöronlarda daha büyük depolarizasyonu indükleyerek, olgunlaşmamış ve displastik kortekslerde epileptiform aktiviteye daha fazla duyarlılık oluşturabilir.

Beyin kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF), tüm MSS aracılığıyla yaygın bir şekilde tanımlanmaktadır. Özellikle hipokampusta, çoğunlukla dentat granül hücrelerinin yosunlu lif aksonlarına karşılık gelen bölgelerde yüksek düzeyde BDNF ekspresyonu gözlenmektedir (67). Buna ek olarak, BDNF sadece nöronlar tarafından değil, aynı zamanda astrositlerde ve mikrogliya hücrelerinde de bulunmaktadır (68) ve her ikisi de epilepsi gibi fizyolojik ve patolojik durumlarda nöronal uyarılabilirlikte önemli bir rol oynamaktadır. BDNF, MSS'deki nöronal popülasyonların veya bununla doğrudan ilişkili hücrelerin gelişimi ve sürdürülmesinde önemli bir faktördür (69). BDNF tarafından indüklenen sinaptik güçlenmenin temel mekanizmasının, presinaptik (örneğin, glutamat salınımının artmasıyla) veya postsinaptik (örneğin, nörotransmitter reseptörlerinin fosforilasyonu) olup olmadığı hala belirsizdir. Bununla birlikte, en azından hipokampusta, hem presinaptik hem de postsinaptik Tropomiyozin reseptör kinaz B (TrkB) reseptörlerinin önemli olduğu bilinmektedir. Genel olarak, BDNF'nin inhibe edici (GABAerjik) akımı azalttığı ve uyarıcı (glutamaterjik) sinapsları güçlendirdiği gözlenmektedir (67). Yapılan bir çalışmada, epilepsili yetişkin hastalarda serumdaki BDNF seviyelerinin azaldığı belirtilmektedir (70). Temporal lob epilepsili hastaların hipokampal dokusunda, BDNF, mRNA ve protein ekspresyonuyla birlikte değerlendirilmiştir. Bu hastalar arasında özellikle hipokampal sklerozu olanlarda, BDNF düzeylerinin daha yüksek olduğu

gözlenmiştir. İlginç bir şekilde, ilaca dirençli hastalarda dentat girus ve *Cornu Ammonis* 3 (CA3) bölgelerinde BDNF/TrkB ekspresyonunda belirgin bir artış tespit edilirken, Valproik asit tedavisi BDNF/TrkB protein ekspresyonunda önemli bir şekilde düşüşe neden olmuştur (71). BDNF/TrkB sinyali, epileptik hayvanlardan elde edilen hipokampal dilim preparatlarında dentat girusun yosunlu liflerinin oluşumunu destekler ve hipokampal tutuşmanın ilerlemesini doza bağlı, uzun süreli, nöronal toksisiteye ikincil olmayan ve hipokampusa özgü bir şekilde düzenlenmektedir (72).

NGF ve BDNF proteinlerinin ekspresyonu, elektriksel uyarılma ve epileptik aktivitelerde yüksek düzeyde düzenlendiği gösterilmiştir. Özellikle BDNF'nin aktiviteye bağlı sinaptik yeniden yapılanmada hızlı bir şekilde salındığı bulunmuştur (73). Nörotrofin seviyesinin hücre devamlılığı ve apoptoz arasındaki ince çizgiyi belirlemede etkili olduğu düşünülmektedir. BDNF'nin neden olduğu bu olaylar uyarılabilirliği değiştirebilir (74), ancak epileptogenez ve kronik epilepsi ile kesin bir ilişki henüz kurulamamıştır. BDNF, yeni nöron üretimini artıran ve mevcut nöronları güçlendiren güçlü bir proteindir. Daha spesifik olarak, BDNF salınımı, yeni hücrelerin gelişmesini sağlayan gen dizilerini ve beyin yollarını etkinleştirmektedir.

Deneyssel epilepsi çalışmaları, ilaç keşfi, mekanizma açıklaması ve tanımlama gibi önemli olaylar ve süreçler arasındaki karşılıklı ilişkiyi açıklamak amacıyla gerçekleştirilir. Epilepsi ve nöbet için oluşturulan hayvan modelleri, epilepsiyi anlamamızı büyük ölçüde artırmaktadır. Epileptogenezin temel mekanizmalarının anlaşılması, yeni antiepileptik ilaçların keşfi ve bu ilaçların klinik etkilerinin belirlenmesi, insan sağlığı açısından güvenliklerinin onaylanması ve ilaca dirençli nöbetler için özel modellerin tasarlanması açısından büyük önem taşır.

Pentilentetrazol (PTZ), GABA'nın inhibe edici etkisini bloke eden bir GABA reseptör antagonistidir ve nöronal aktiviteyi artırmak için kullanılmaktadır (75). PTZ, GABA_A reseptörlerini, kalsiyum, sodyum ve potasyum kanallarını bloke eder ve nöronal sistemde hipereksitabilitiyi indüklemektedir (76). GABA_A reseptörleri, allosterik olarak bağlanan bazı bölgelere sahiptir. PTZ, GABA_A reseptörünün pikrotoksin bölgesine bağlanarak klorür kanalı aktivitesini inhibe

etmektedir (77). Farklı ilaçlar, GABA aracılı klor akışını etkileyebilen bu bağlanma bölgeleri aracılığıyla etki gösterebilir. PTZ, merkezi sinir sistemi üzerinde konvülsan etkisi olan bir maddedir. Aktivitesini, pikrotoksinin GABA_A reseptörüne bağlandığı ve muhtemelen aktivitesini GABA_A reseptör alt birimi ikinci transmembran alanındaki pikrotoksin etkileşimiyle ilişkili bölgeye bağlanarak göstermektedir (77). GABA taşıyıcılarının miktarı, nöbet oluşumu ve epileptogenez için bir belirleyici faktör olabilmektedir (78). Sistemik olarak verildiğinde, PTZ jeneralize nöbetlere neden olur, başlangıçta miyoklonik kasılmaları tetikler ve ardından jeneralize tonik-klonik nöbetlere yol açmaktadır (79, 80).

Antiepileptik ilaçların geliştirilmesi ve epilepsinin mekanizmasının araştırılması için yapılan çalışmalarda en sık kullanılan kimyasal madde PTZ'dir. Sağlıklı insan beyinde elektrokortikografi (ECoG) kayıtlarının veya biyokimyasal analizlerin etik dışı olması nedeniyle epilepsinin temel elektrofizyolojik mekanizmasının araştırılması deneysel hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Epilepsinin moleküler mekanizmasını aydınlatmak için ideal bir epilepsi modeli, kendiliğinden tekrarlayan ve insandaki epilepsiye benzer nöbetler oluşturmalıdır. Bu amaçla, sıçanlarda PTZ kimyasal maddesi kullanılarak oluşturulan tutuşma modeli, en sık kullanılan hayvan modellerinden biridir (75).

Yapılan çalışmalarda, iyon kanallarının nakavt hayvan modellerinin kullanılmasına rağmen, genetik absans epilepsili *Wistar Albino Glaxo/Rijswijk* suşu (WAG/Rij) sıçanlarında TRPM ve TRPV iyon kanalları daha önce araştırılmamıştır. Bu tez çalışması kapsamında, ilk defa WAG/Rij sıçanlarında bu iyon kanalları incelenmiştir. Ayrıca, literatür taraması sonucunda WAG/Rij ve kronik PTZ (tutuşma) epilepsi modelinin karşılaştırılmadığı, TRPM8, TRPM2, TRPM3, TRPV1 gibi iyon kanallarının ifadesi ile BDNF ve NGF gibi nörotrofik faktörlerin değişikliklerinin daha önce çalışılmadığı tespit edilmiştir. Sunulan çalışma, farklı epilepsi modellerinin karşılaştırılması yoluyla belirtilen iyon kanallarının ve nörotrofik faktörlerin ifadesindeki değişiklikleri ortaya çıkarmayı amaçlamaktadır.

Sunulan çalışma, TRP iyon kanallarının ve nörotrofik faktörlerin hipokampusta ve kortekste epileptiform aktivite sürecindeki ekspresyon düzeylerinin farklı epilepsi modellerinde belirlenmesini amaçlamaktadır. ECoG

kaydı ile nöbetin gerçekten meydana gelip gelmediğini elektrofizyolojik olarak gözlemlemek ve deneysel epilepsi modelinin oluşumunu doğrulamak, bu çalışmanın en önemli unsurlarından biridir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Epilepsi ve Epileptik Nöbet

Epilepsi sara nöbetleri oluşturmaya kalıcı bir yatkınlık ile karakterize edilen ciddi bir beyin hastalığıdır (81). En yaygın MSS hastalıklarından biri olan epilepsi, her yaştan insanı etkileyebilen, dünya çapında yaklaşık 70 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir (82). Epilepsi uzun süreli spontan epileptik nöbet geçirme eğilimi ile ayırt edilir ve çok çeşitli nörolojik, bilişsel ve psikososyal etkileri vardır (83). Aktif epilepsisi olan kişilerin %75'inden fazlası tedavi edilmemektedir, bu da çoğunlukla düşük ve orta gelirli ülkelerde yoğunlaşan önemli bir tedavi açığına neden olmaktadır (84). Epilepsi, özellikle morbidite, sakatlık ve mortaliteyi önemli ölçüde azaltabilen uygun maliyetli tedavilerle mümkünken dünya çapında bir sağlık önceliği olmalıdır.

Epilepsi prevalansı, sosyo-ekonomik durum gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde farklılık göstermektedir. Yetersiz sağlık eğitimi, coğrafi, çevresel, etnik ve kültürel faktörlere ve genetik yatkınlığa ek olarak çeşitli ülkelerde epilepsi prevalansındaki farklılık göstermektedir (85).

Yüksek gelirli ülkelerde epilepsi insidansı, bölgeler arasında benzerlik gösterir ve yaklaşık olarak her yıl 100.000 kişi başına 50 (40-70 aralığında) insidans olduğu bilinmektedir (86, 87). Yenidoğanlarda ve 50 yaşın üzerindeki kişilerde epilepsi insidansı bimodal bir dağılım gösterir. Elli yaşın üzerindeki kişilerde insidans yaşla birlikte artar ve 70 yaş üstü kişilerde en yüksek insidans görülür. Bilinmeyen nedenlerle, düşük gelirli ülkelerde epilepsi görülme sıklığı, yüksek gelirli ülkelere göre daha yüksek düzeydedir (88, 89).

Hastanın ilk epileptik nöbet ile başvurduğu andan itibaren, klinisyen epilepsinin etiyolojisini belirlemeyi amaçlamalıdır. Terapötik etkilere odaklanan çeşitli etiyolojik gruplamalar tanımlanmıştır. Genellikle ilk değerlendirmenin bir parçası olarak, mümkün olduğunda Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) gibi beyin görüntüleme yöntemleri kullanılır. Bu, klinisyenin hastanın epilepsisinin yapısal bir etiyolojiye sahip olup olmadığına karar vermesine yardımcı olur. Beş farklı etiyolojik grup daha bulunmaktadır: genetik, bulaşıcı, metabolik, immünolojik ve bilinmeyen. Bir hastanın epilepsisi birden fazla etiyolojik

kategoriye ait olabilir; etiyolojiler hiyerarşik değildir ve hastanın etiyolojik gruplarına öncelik verilmesi duruma göre değişebilir (3).

Epilepsi genellikle tek başına ortaya çıkmaz, nadiren görülür. Genellikle komorbiditelerin varlığı yaygındır. Epilepsi hastalarının çoğunluğunun bir veya daha fazla ek tıbbi sorunu bulunmaktadır. Epilepsi uzun bir süredir psikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir, örneğin depresyon, anksiyete bozukluğu, psikoz ve otizm spektrum bozukluğu gibi durumlar. Ancak son zamanlarda, epilepsi ile somatik bozukluklar da ilişkilendirilmiştir. Bu somatik bozukluklar arasında tip 1 diyabet, artrit, sindirim sistemi ülserleri ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi rahatsızlıklar yer almaktadır (90).

Epilepsi, tek bir tezahürü ve nedeni olan bir durumdan ziyade, birçok risk faktörü ve genetik yatkınlık içeren semptom kompleksi bir hastalıktır. Genomik teknolojilerdeki ilerlemeler sayesinde epilepsilerin karmaşık genetik yapısı çözülmeye başlamıştır. Komorbiditeler, etiyolojik ve prognostik belirteçler olarak giderek daha fazla tanınmaktadır. Epilepsi için derin beyin stimülasyonu, lazer interstisyel termal terapi ve vagus sinir stimülasyonu gibi alternatif tedaviler bulunmaktadır, ancak bu tedavilerin antiepileptik faydaları sınırlıdır (91). Bu terapötik tedavilerdeki zorluklar, epilepsinin patofizyolojisinin tam olarak anlaşılmasından kaynaklanabilir. Konvansiyonel teori, epilepsinin nöronal uyarılabilirlikteki bir dengesizlikten kaynaklandığı düşünülmektedir, bu nedenle araştırmalar eksitator glutamaterjik nörotransmisyon ve inhibitör GABA nörotransmisyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. Sonuç olarak, mevcut antiepileptik ilaçların belirlenmiş hedefleri üç kategoriye ayrılabilir (92):

- 1) Sinaptik uyarımın inhibisyonu,
- 2) Sinaptik inhibisyonun artırılması ve
- 3) Sodyum, kalsiyum ve potasyum kanalları gibi voltaj kapılı iyon kanallarının aracılık ettiği nöronların içsel ateşlemesinin modülasyonu.

Nöbet önleyici ilaçlar, nöbet geçiren bireylerin çoğunda nöbetleri bastırabilir, ancak uzun vadeli prognozu değiştirme yeteneğine sahip değildir.

Epilepsi, özellikle nöbetlerin devam ettiği bireylerde yaşam kalitesi, morbidite ve erken ölüm riski üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (93).

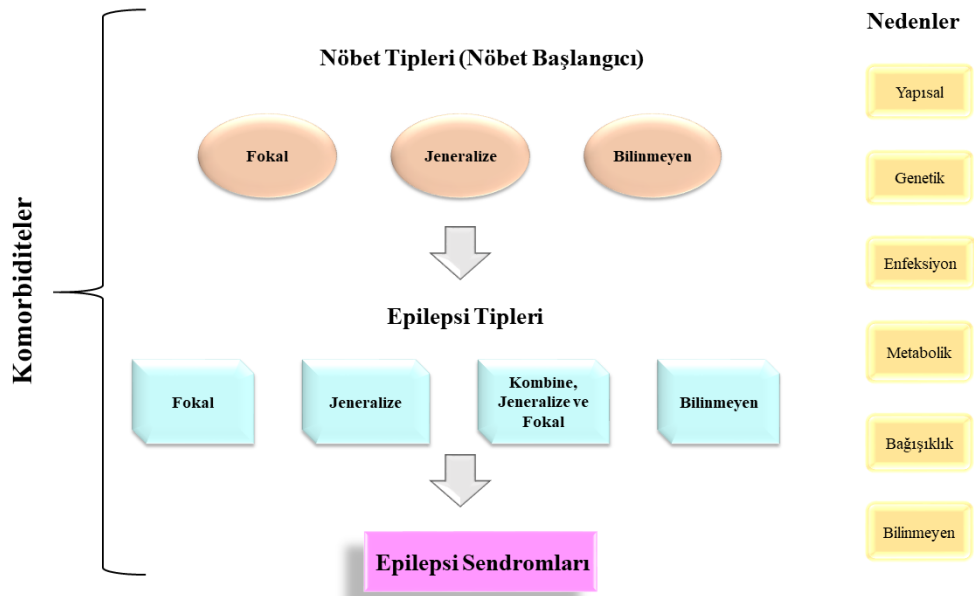
Epilepsinin tanımlayıcı özelliği, tekrarlayan, provoke edilmemiş nöbetlere yatkınlıktır (94). Epileptik nöbet "beyinde anormal derecede senkronize nöronal aktivitenin neden olduğu belirti ve/veya semptomların geçici olarak ortaya çıkması" olarak tanımlanır (81). Bu durum, uzun süreli bir yatkınlık ile karakterizedir ve hafif absanslardan jeneralize tonik-klonik nöbetlere kadar çeşitli epileptik nöbetlere yol açabilir. Nöbetler, beyin uyarma ve inhibisyon dengesindeki bir bozulma nedeniyle ortaya çıkar, bu da esas uyarıcı nörotransmitter glutamat ve esas baskılayıcı nörotransmitter GABA tarafından yönetilen beyin aktivitesindeki ani bir artışa ve hipersenkronize elektriksel aktiviteye yol açar. Epileptik nöbetler, nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçlarla birlikte görülebilir (95). Epileptik nöbetler arasında, vücudun sarsılmasıyla birlikte bilinç kaybı, oryantasyon bozukluğu ve tepki vermede güçlükler gibi belirtiler olabilir. Görsel veya diğer duyuşsal semptomlar da görülebilir ve bu semptomlar tek bir uzvun izole duruşu veya beynin hangi bölümlerinin etkilendiğine bağlı olarak anlık farkındalık kaybı şeklinde ortaya çıkabilir. Epilepsi, epileptik nöbetlerin tekrarlamasıyla karakterize edilen bir beyin bozukluğudur. İlk nöbet geçiren birçok hastada başka bir nöbet olmayabilir, ancak provoke edilmemiş bir nöbetin ardından nöbetlerin tekrarlama olasılığı yüksektir ve en az 24 saat arayla iki veya daha fazla provoke edilmemiş nöbeti olanlara epilepsi teşhisi konur (96). Tek bir nöbet geçiren ancak gelecekte en az %60 nöbet geçirme riskine (tıbbi öykü veya EEG'ye göre) sahip olan kişilerin de epilepsi olduğu kabul edilmektedir (83). Epilepsinin etiyolojisi genellikle bilinmez ve kriptojenik (veya idiyopatik) olarak adlandırılır. Beyinde malformasyon veya tümör gibi patolojik bir durum bulunduğunda, epilepsi semptomatiktir veya edinseldir (97). Epileptik nöbetler, beyinde hangi bölgelerin etkilendiğine bağlı olarak (diğer semptomlarla birlikte) vücudun sarsılması, kafa karışıklığı, yanıt vermede zorluk ve farkındalık kaybı gibi belirtilerle ortaya çıkabilir. Ayrıca görsel veya diğer duyuşsal semptomlar da tek bir uzvun izole duruşu veya kısa süreli farkındalık kaybı şeklinde görülebilir (81).

2.2 Günümüzde Epileptik Nöbetlerin Sınıflandırılması

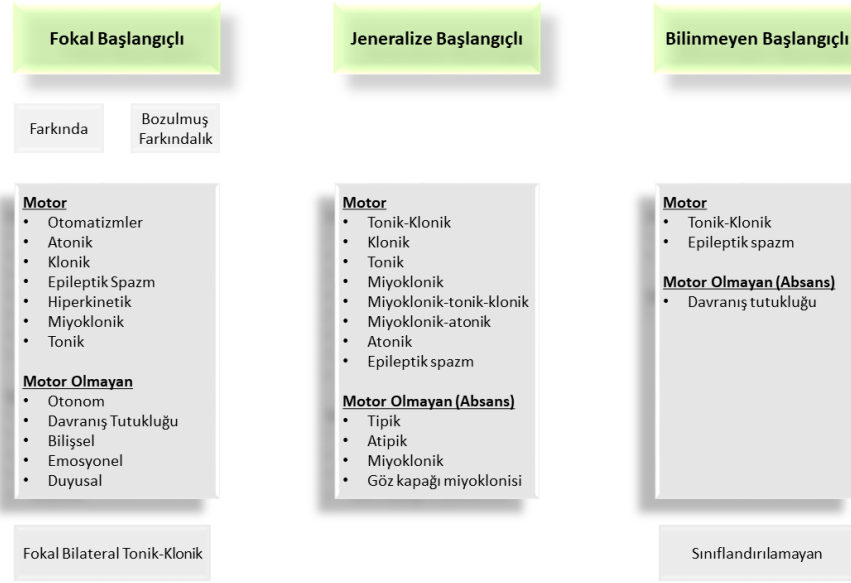
2017 yılında, Uluslararası Epilepsiye Karşı Lig (ILAE; the International League Against Epilepsy), epilepsinin ve nöbetlerin terminolojisini ve

sınıflandırmasını güncellemiştir. Bu yeni şemanın amacı ‘EpilepsyDiagnosis.org’ aracılığıyla, dünyanın herhangi bir yerindeki epilepsi hastalarına bakan klinisyenlere nöbet tip(ler)ini, epilepsi tipini teşhis etmede, epilepsi sendromlarını teşhis etmede ve epilepsinin etiolojisini tanımlamada yardımcı olmaktır (98). ILAE’nin 2017 yılında yayınladığı sınıflandırma sistemine göre, nöbetler öncelikle nasıl başladığına göre gruplandırılmıştır.

Genel olarak insanlar epilepsi hastası olarak kategorize edilirken, teşhis mümkün olduğunca spesifik ve kesin olmalıdır. Sınıflandırma üç düzeyde yapılır: nöbet tipi, epilepsi tipi ve sendrom (Şekil 2.1). Her aşamada nedenler ve komorbiditeler tanımlanmalıdır, çünkü bunlar önemli terapötik etkilere sahip olabilir. Nedenler altı kategoriye ayrılır: yapısal, genetik, bulaşıcı, metabolik, bağışıklık ve bilinmeyen (3). Nöbetler, başlangıçlarına göre fokal, jeneralize veya bilinmeyen olarak sınıflandırılır. Farkındalık düzeyi, farkındalığı korunan ve farkındalığı bozulmuş olanlarda fokal nöbetleri alt bölümlere ayırır. Fokal nöbetler ayrıca en erken ve en belirgin motor veya motor olmayan belirtilere göre sınıflandırılır (Şekil 2.2) (99).



Şekil 2.1. ILAE’ye göre Epilepsi Sınıflandırılması (99).



Şekil 2.2. Nöbet tiplerinin ILAE'ye göre sınıflandırılması (99).

Yeni Epilepsi Sınıflandırması, epilepsiyi çeşitli klinik ortamlarda sınıflandırmak için tasarlanmış çok seviyeli bir sınıflandırmadır (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Bu sınıflandırma, dünya çapında erişilebilen çeşitli kaynakların tanınmasını içerir. Yani, teşhis koyan klinisyenin kullanabileceği kaynaklara bağlı olarak birden fazla sınıflandırma seviyesi mümkün olabilir.

Nöbet Tipi:

Nöbet tipi, epilepsi sınıflandırma şemasının başlangıç noktasıdır ve klinisyenlerin epileptik nöbetlerle ilgili kesin bir tanı koyduklarını varsaymaktadır. Bu sınıflandırma şeması, epileptik ve epileptik olmayan olayları ayırt etmek için bir tanı yöntemi sağlamak amacıyla tasarlanmamıştır. Nöbetler, epilepsi tanısının bir göstergesi olarak kabul edilir. Ancak epileptik olmayan olaylar, epilepsiyle ilişkili olmayan nöbetler veya benzer semptomlarla ortaya çıkan durumları ifade eder. Epileptik olmayan olaylar çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilir, örneğin geçici serebral iskemiler, epilepsi benzeri senkoplar, psikojenik nöbetler, migren auraları veya bazı ilaçların yan etkileri. Bu durumda, epilepsi tanısının zaten konulduğunu varsaydığımız için epileptik ve epileptik olmayan olayları ayırt etmek için ek bir tanı yöntemi gerekmebilir. Tanı epilepsi olarak belirlenmişse, olaylar epileptik nöbetler olarak kabul edilir. Nöbetler, fokal başlangıçlı, jeneralize başlangıçlı ve bilinmeyen başlangıçlı olmak üzere üç tip olarak sınıflandırılmıştır (3).

Bazı ortamlarda EEG, video veya görüntüleme incelemelerinin mevcut olmaması nedeniyle, nöbet tipine göre sınıflandırma mümkün olan en yüksek tanı derecesi olabilir. Diğer durumlarda, örneğin bir hastanın yalnızca bir nöbet geçirmesi gibi durumlarda, daha üst düzey bir tanıya ulaşmak için yeterli bilgi olmayabilir.

Epilepsi Tipi:

Epilepsinin sınıflandırması için en etkili elemanlardan birisi de epilepsi tipidir ve 2014 tanımına göre hastanın epilepsi tanısı aldığını varsayar (83). Epilepsi tipi iyi bilinen jeneralize epilepsi ve fokal epilepsilere ek olarak "Kombine Jeneralize ve Fokal Epilepsi" olarak adlandırılan yeni bir kategori eklenmiştir. Ayrıca 'Bilinmeyen' adında bir kategori de vardır. Birçok epilepsi, birden fazla nöbet tipiyle karakterizedir.

Jeneralize epilepsi teşhisi için, hasta tipik olarak EEG'de genelleştirilmiş sivri dalga (spike-wave-diken dalga) aktivitesi gösterecektir. Jeneralize epilepsisi olan bireyler, absans, miyoklonik, atonik, tonik ve tonik-klonik nöbetleri içeren bir dizi nöbet tipine sahip olabilir. Jeneralize epilepsi tanısı, karakteristik interiktal EEG deşarjlarının bulgusuyla desteklenen klinik kanıtlara dayalı olarak belirlenir. EEG'si normal olan jeneralize tonik-klonik nöbetleri olan bir hasta dikkatle tedavi edilmelidir. Bu durumda, jeneralize epilepsi tanısı koymak için miyoklonik jerkler veya ilgili aile öyküsü gibi destekleyici kanıtların bulunması gerekir (3).

Fokal epilepsiler tek odaklı ve çok odaklı epilepsilerin yanı sıra bir hemisferi içeren nöbetleri içerir. Fokal farkında (aware) nöbetler, fokal bozulmuş farkındalık nöbetleri, fokal motor nöbetler, fokal motor olmayan nöbetler ve fokal olarak başlayıp bilateral olarak devam eden tonik-klonik nöbetler dahil olmak üzere bir dizi nöbet tipi görülebilir. İnteriktal EEG tipik olarak fokal epileptiform deşarjlar gösterse de tanı EEG bulgularıyla desteklenen klinik verilerine dayanarak belirlenir (3).

Hem jeneralize hem de fokal nöbetleri olan hastalar olduğu için yeni Kombine Jeneralize ve Fokal Epilepsi grubu mevcuttur. Tanı klinik kanıtlara ve EEG verilerine dayanmaktadır. İktal kayıtlar gerekli olmasa da faydalıdır. İnteriktal

EEG hem jeneralize diken dalgası hem de fokal epileptiform deşarjlar gösterebilir ancak tanı için epileptiform aktivite gerekli değildir. Dravet sendromu ve Lennox-Gastaut sendromu her iki kategoriyi de içeren iki yaygın nöbet örneğidir.

Epilepsi tipi klinisyenin bir “Epilepsi Sendromu” teşhisi koyamadığı durumlarda ulaşılabilecek son tanı seviyesi olabilir. Örnekler şunları içerir: etiyojisi bilinmeyen fokal epilepsisi olan lezyonsuz temporal lob epilepsisi olan bir çocuk veya yetişkinin yaygın durumu; EEG'de jeneralize tonik-klonik nöbetler ve jeneralize spike-wave aktivitesi ile başvuran, bilinen bir epilepsi sendromu olarak sınıflandırılmayan ancak kesin bir jeneralize epilepsi tanısı olan 5 yaşında bir çocuk veya EEG kayıtlarında ve normal MRI'da hem fokal deşarjlar hem de jeneralize spike dalga ile hem fokal bozulmuş farkındalık nöbetleri hem de absans nöbetleri olan 20 yaşında bir kadının daha az yaygın senaryosu, bu nedenle kombine jeneralize ve fokal epilepsi tanısı alacaktır (3).

“Bilinmeyen” terimi, hastanın epilepsisi olduğunun anlaşıldığı ancak yeterli bilgi olmadığı için klinisyenin epilepsi tipinin fokal mı yoksa jeneralize mi olduğunu belirleyemediği durumları ifade etmek için kullanılır. Bunun nedeni birçok faktör olabilir. EEG'ye erişim olmaması veya EEG incelemelerinin bilgi vermemesi olabilir. Nöbet tipi/tipleri bilinmiyorsa, ikisi her zaman uyumlu olmasa da epilepsi tipi de benzer nedenlerle bilinmiyor olabilir. Örneğin hasta, odak özellikleri ve normal EEG kayıtları olmayan birkaç simetrik tonik-klonik nöbet geçirmiş olabilir. Sonuç olarak, nöbetlerin başlangıcı belirsizdir ve kişinin bilinmeyen bir epilepsi tipi vardır.

Epilepsi Sendromu:

Üçüncü seviye bir epilepsi sendromu teşhisidir. Bir epilepsi sendromu, nöbet tiplerini, EEG'yi ve birlikte ortaya çıkma eğiliminde olan görüntüleme özelliklerini içeren bir dizi özellik anlamına gelir. Genellikle başlangıç yaşı ve remisyon (uygulanabildiğinde), nöbet tetikleyicileri, günlük varyasyon ve bazen prognoz gibi yaşa bağlı özelliklere sahiptir (100, 101). EEG ve görüntüleme çalışmaları ile ilgili spesifik bulgularla birlikte entelektüel ve psikiyatrik işlev bozukluğu gibi kendine özgü komorbiditeleri de olabilir (102).

İdiyopatik Jeneralize Epilepsiler (İJE'ler), jeneralize epilepsilerin iyi bilinen ve yaygın alt grubudur. İJE'ler dört iyi bilinen epilepsi sendromundan oluşur: Tek Başına (Alone) Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetler, Çocukluk Absans Epilepsisi, Juvenil Absans Epilepsisi, Juvenil Miyoklonik Epilepsisi ve Jeneralize Absans Epilepsisi (önceden Uyanışta Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetler olarak bilinirdi, ancak nöbetlerin günün herhangi bir saatinde meydana gelebileceğini kabul edilerek modifiye edilmiştir) (3).

Genellikle bebeklik döneminde başlayan, kendi kendini sınırlayan çeşitli fokal epilepsiler vardır. En yaygın olanı, eskiden “centrotemporal dikenli (spike) iyi huylu epilepsi” olarak adlandırılan, merkez-temporal dikenli, kendi kendini sınırlayan epilepsidir. Panayiotopoulos tarafından tanımlanan erken başlangıçlı formu ve Gastaut tarafından tanımlanan geç başlangıçlı formu olan, kendi kendini sınırlayan çocukluk çağı oksipital epilepsiler olarak bu geniş kategoriye dahil olmuştur (103). Bazıları ergenlik ve hatta yetişkinlik döneminde başlayan, kendi kendini sınırlayan diğer frontal (104), temporal (105) ve parietal lob (106) epilepsileri tanımlanmıştır.

Anahtar noktaları: ILAE, nöbet tiplerinin sınıflandırılmasıyla çalışmak üzere tasarlanmış Epilepsilerin Sınıflandırılması için gözden geçirilmiş bir çerçeve sunar. Tanı seviyeleri: nöbet tipi, epilepsi tipi (fokal, jeneralize, kombine jeneralize ve fokal, bilinmiyor) ve epilepsi sendromu. Hastanın ilk geldiği andan itibaren ve tanı yolundaki her adımda etiyolojik bir tanı düşünülmelidir. Bir hastanın epilepsisi birden fazla etiyolojik kategoride sınıflandırılabilir.

2.2.1 Fokal Başlangıçlı Nöbetler

Fokal başlangıçlı nöbetler, tek bir hemisferde, sınırlı veya daha geniş bir bölgeden kaynaklanırlar. Fokal nöbetler, hastanın farkındalık düzeyine ve nöbetin ilk belirgin klinik belirtisinin özeliğine göre sınıflandırılır. Fokal nöbetlerin sınıflandırılması için öncelikle farkındalık seviyesinin belirlenmesi gereklidir. Farkındalık, bir şeyin olup bittiğine veya var olduğuna dair bilgi ve anlayış olarak tanımlanır. Bir kişi fokal nöbet geçirdiğinde, kişinin nöbet sırasında kim olduğunu ve çevresinde neler olup bittiğini bilip bilmediğine göre farkındalığı belirlenir. Farkındalık meydana gelen nöbetin farkına varmak anlamına gelmez (107).

2.2.2 Jeneralize Başlangıçlı Nöbetler

Fokal nöbetlere benzer şekilde jeneralize nöbetler, motor veya motor olmayan belirtilere göre sınıflandırılır. Motor jeneralize nöbetler daha spesifik olarak tonik-klonik, klonik, tonik, miyoklonik, miyoklonik-tonik-klonik, miyoklonik-atonik, atonik veya epileptik spazmları içerir (99, 108). Jeneralize tonik-klonik nöbetler genellikle 1-3 dakika sürer ve ani farkındalık veya bilinç kaybı ile birlikte. Jeneralize klonik nöbet, iki taraflı ve sürekli ritmik kasılma ile karakterizedir. Jeneralize tonik nöbetleri olan bir hastada tüm uzuvlarda sertleşme görülür (109).

2.2.3 Bilinmeyen Nöbetler

Bilinmeyen başlangıçlı nöbetler motor (tonik-klonik, epileptik spazmlar gibi) veya davranış tutukluğu gibi motor olmayan belirtilere göre sınıflandırılır.

2.2.4 Sınıflandırılmayan Nöbetler

Bilgi yetersizse veya nöbet kategorize edilemiyorsa nöbet sınıflandırılmamış olarak kabul edilir.

2.3 Epilepsi Patofizyolojisi (Epileptogenez)

Epilepsi ve beyin hasarı arasındaki ilişki bilinen en eski klinik-nöropatolojik bağıntılardan biridir. Deneysel modeller ve klinik çalışmalar, uzun süreli nöbet veya status epileptikusun beyinde nöronal ölüme neden olabileceğini uzun süredir doğrulamıştır. Ammon boynuzunda hipokampustaki hücre kaybı, diğer limbik bölgelere, serebellum ve serebral kortekse verilen hasar da yaygın olmasına rağmen, en sık gözlenen lezyon olmaya devam etmektedir (110).

Epileptogenez, epileptik olmayan bir beyin yapısının, spontan ve tekrarlayan nöbetlere eğilimli bir beyne dönüşüm sürecini ifade eder (111). Bu süreç, bir nöronal ağ içindeki uyarıcı ve inhibe edici aktiviteler arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Bu nedenle, sürecin aşırı, hipersenkronize ve salınımlı bir şekilde işlemesi muhtemel hale gelir. Bu durum, devam ettirildiğinde normal nöronal işleyişi bozar ve diğer nöronal ağları etkileme potansiyeline sahiptir (99). Genelleştirilmiş epilepsiler için, epileptojenik ağlar, bilateral olarak talamokortikal yapıları içeren geniş bir alana yayılmıştır (112). Fokal epilepsi ağları, tipik olarak limbik veya neokortikal olmak üzere bir yarımküredeki nöral devreleri içerir. Epileptojenik ağlarla sonuçlanan uyarma ve inhibisyon arasındaki dengesizlik, her zaman basitçe uyarmada bir artış veya inhibisyon kaybı anlamına gelmez; olgunlaşmamış beyinde nöbet veya limbik epilepsi olmaması gibi bazı durumlarda,

inhibisyonda anormal bir artış da epileptojenik olabilir. (113, 114, 115). Genelleştirilmiş epilepsilerin büyük çoğunluğunun kalıtsal bir kökene sahip olduğu varsayılmaktadır (116). Buna karşılık, yapısal serebral anormalliklerin, özellikle ilaca dirençli epilepside, fokal epilepsilerin en belirgin özelliği olduğu varsayılmıştır (117, 118). Bununla birlikte, lezyonel olmayan fokal epilepside giderek artan sayıda kalıtsal ve *de novo* genetik mutasyon keşfedilmiştir (119, 120, 121). Yapısal anormalliklerin nöbet aktivitesine neden olduğu patofizyolojik mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Nöbetler esas olarak kortikal nöronlardaki anormal aktivitede neden olur, ancak beyaz cevherdeki glial hücreler ve aksonlar da ikincil olarak dahil olabilir (122).

Diğer epilepsi türlerinde olduğu gibi uyarıcı ve inhibe edici sinaptik süreçlerdeki değişiklikler potansiyel olarak kortikal düzeyde diken dalga deşarjların (DDD) oluşumuna katkıda bulunabilir. Klorür homeostaz disfonksiyonu, temporal lobda ritmik paroksizmal aktiviteye ve tümör kaynaklı neokortikal epilepsilere katkıda bulunan depolarizan GABA_Aerjik olaylarla ilişkilendirilmiştir (123, 124). Sonuç olarak, DDD'ler sırasında kortikal internöronların tekrarlayan aktivasyonu, iktojenik piramidal hücreleri baskılayarak, paroksizmal depolarizasyonun ilk fazı sırasında dar bir zaman aralığı içinde deşarjlarını sınırlandırır (125). İktojenik nöronlar arasındaki yakın ateşleme, DDD frekanslarında faz kilitleme ve senkronize aktiviteyi artırabilir (126). Bununla birlikte, piramidal nöronların uzak dendritlerinde GABA_B alt birimleri ekspresyonunun azalması, presinaptik GABA_B reseptörlerinin fonksiyonunun azalması ve/veya somatosensoriyel kortekste inhibitör sinaptik yanıtın hızlı (muhtemelen GABA_A) bileşeninin azalması, spontan sinaptik yetersizliği açıklayabilir ve iktojenik hücrelerde hiperpolarizasyonlar ve katılan neokortikal hipereksitabiliteye katkıda bulunur (127, 128). Sonuç olarak, kortikal GABA_Aerjik sistemlerin absans epilepside çok yönlü pro-iktojenik etkileri olabilir, normal işleyiş yoluyla nöronal senkronizasyonu teşvik ederken aynı zamanda neokorteksin patolojik anormallikler yoluyla paroksizmal deşarjlar üretme eğilimini artırır.

En iyi bilinen epileptojenik lezyon, cerrahi olarak çıkarılan beyin dokusunda sıklıkla saptanan mezial temporal sklerozdur (129, 130, 131). Patolojik bulgular, belirli alt alanlarda uyarıcı ve engelleyici nöron kaybını, aksonal filizlenmeyi ve

sinaptik yeniden şekillenmeyi ve glial fonksiyon ve yapıdaki değişiklikleri içerir (132, 133, 134). İlk beyin hasarının hipokampal hücre kaybıyla sonuçlandığı, ardından kollateral aksonal filizlenme ve sinaptik devrenin yeniden düzenlenmesiyle sonuçlandığı ve nihayetinde spontan nöbetler ortaya çıkana kadar limbik devrelerde inhibisyon ve eksitasyon arasındaki dengeyi etkilediği düşünülmektedir. Pek çok farklı nörobiyolojik süreç, antiepileptojenik veya hastalık modifiye edici tedaviler için potansiyel hedefler olarak gösterilmiştir. Bu süreçler şunları içermektedir (135, 136):

- Nörodejeneratif proteinlerin birikimini (insan *tau* ve β -amiloid gibi),
- Nörojenez,
- Proinflamatuvar süreçleri (İnterlökin-1 β , dönüştürücü büyüme faktörü β ve aktivin reseptör benzeri kinaz gibi),
- Nöronal voltajdaki değişiklikleri ve ligand kapılı iyon kanalları,
- Nörotransmitter salımı veya alımı özellikleri ve hücre içi sinyalleşme basamakları (BDNF ve tropomiyozin reseptör kinaz, rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi [mTOR]) yolağının mekanik hedefi, adenoazin/adenoazin kinaz ve mikrogliya aktivasyonu gibi).

Bu süreçlerin birçoğunun epigenomik (bir hücrenin genetik materyali üzerindeki tüm epigenetik modifikasyonlar setinin incelenmesi) değişiklikler tarafından yönlendirildiği düşünülmektedir (137, 138). Bu süreçlerden hangisinin epileptogenez için temel olduğu henüz belirlenmemiştir ve klinik olarak doğrulanmış bir antiepileptojenik tedavi yoktur.

2.4 EEG ve ECoG

Epilepsi altın standardı olmayan zor bir tanıdır. Tanı koymanın anahtarı, güvenilir görgü tanığı ifadeleriyle birleştirilmiş ayrıntılı bir öyküdür. Bir nöbetin oluşup oluşmadığına ilişkin karar, epilepsiye özgü tek bir özellik olmadığından, bir dizi semptom ve belirtilerin kombinasyonuna dayanır. Epilepsi ile ilgili yanlış teşhisler yaygın ve muhtemelen tehlikeli olduğundan, epileptik olmayan paroksizmal oluşumlar her zaman kontrol edilmelidir (139). Senkopun en sık görülen görünümü geçici bilinç kaybıdır ve en yaygın epilepsi taklitleri psikojenik veya fonksiyonel nedenlerdir (140). Olası nöbetleri olan tüm kişilerde, özellikle de

anlık bilinç kaybı görülüyorsa, bir elektrokardiyogram düşünülmelidir. Olaylarla ilgili evde çekilen videolar tanı açısından çok yardımcı olabilir ancak epileptik ile epileptik olmayan olayları ayırt etmek için uzman gerektirir. Anormal bir EEG mutlaka epilepsiyi göstermese de interiktal epileptiform deşarjlar klinik bir tanıyı doğrulamaya yardımcı olabilir. Anormal bir EEG, epilepsinin türünü (fokal veya jeneralize) belirlemede, bir epilepsi sendromunu teşhis etmede ve tekrarlama riskini belirlemede yararlı olmaktadır (141).

Epilepsili bir hastayı değerlendirmek için en önemli araç EEG'dir. EEG ve uyarılmış potansiyeller, MSS tarafından üretilen elektriksel aktivitenin ölçümleridir. Anormal olduğunda, nöbetleri fokal veya jeneralize olarak sınıflandırmanın yanı sıra hastanın yaşadığı epileptik sendromu karakterize etmeye yardımcı olabilmektedir. Bu yaklaşım, çoğu vakada nöbet kontrolü ile ilgili prognostik bir görüşe izin verir ve ayrıca daha iyi tedavi seçeneklerine yol açabilir. Nörogörüntüleme normal olduğunda ve cerrahi düşünüldüğünde, video-EEG izleme, nöbet tipini doğrulamak ve beyindeki epileptojenik bölgeyi hesaplamak için yararlı bir tekniktir (142).

Acil durumlarda bilgisayarlı tomografi taramaları faydalıdır, ancak hastaların sadece %30'unda fokal lezyonlar bulunur (143). Fokal epilepsilerin araştırılmasında MRI kullanılması, klinik ve EEG bulgularında başlangıç bölgesine dayalı özel protokoller gerektirir. MRI kullanmanın birincil nedeni epilepsinin nedenini belirlemek, ikinci neden ise mümkünse ameliyat öncesi değerlendirmeye izin vermektir. İşlem sonrası rekonstrüksiyonların yanı sıra dikkate alınması gereken MRI epilepsi protokolleri vardır. MRI yaygın fokal epilepsilerin tanı ve tedavisine olağanüstü bir katkı sağlar: mezial temporal lob epilepsisi, gangliogliomlar, oligodendrogliomlar ve disembriyoplastik nöroepitelyal tümörler gibi düşük dereceli tümörler, fokal kortikal displaziler gibi kortikal gelişim malformasyonları, tüberoskleroz, inflamasyonlar, Rasmussen ensefaliti ve diğer lezyonlar gibi (144). Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT) gibi fonksiyonel görüntüleme yöntemleri, dirençli fokal epilepsilerde iktal odağın belirlenmesine ve doğrulanmasına yardımcı olarak cerrahi müdahaleyi kolaylaştırmaktadır (145). Genetik testler, bazı epilepsi türlerinin nedenlerini belirleme olasılığını artırmıştır. Bu karmaşık bir iştir ve klinik

uygulamasında uzmanlık gerektirir. Genetik test yöntemleri, kromozomal mikrodizi analizi, karyotipleme, tek gen testi, gen paneli testi, tüm ekzom dizileme ve tüm genom dizilemedir (146). Elektrik stimölasyonu, inatçı epilepsiyi tedavi etmek için kullanılabilecek başka bir palyatif tedavidir. Vagus sinir stimölasyonunun bu demografi için faydalı olduğuna dair kanıtlar vardır (147). Dirençli epilepsili bireylerde, çeşitli teknolojileri kullanan son araştırmalar, anterior talamik çekirdeğin intraserebral stimölasyonunun ve NeuroPace Duyarlı Nörostimölatörün de nöbet sıklığını azaltabileceğini ve yaşam kalitesini artırabileceğini düşündürmektedir (148, 149).

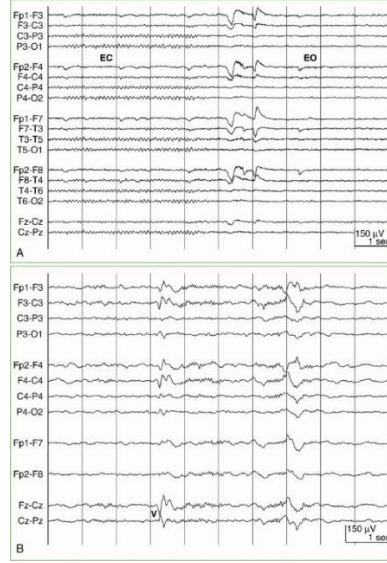
EEG'nin Fizyolojik Prensipleri: EEG sinyalleri serebral korteks tarafından üretilir. Kendiliğinden EEG aktivitesi, binlerce hatta milyonlarca kortikal nöronda meydana gelen uyarıcı ve engelleyici sinaptik potansiyellerin toplamı tarafından üretilen hücre dışı akımlarının akışını yansıtır. Bireysel aksiyon potansiyelleri doğrudan EEG aktivitesine katkıda bulunmaz. Geleneksel bir EEG kaydı, alttaki kortekste devam eden sinaptik aktivitenin neden olduğu kafa derisi yüzeyinde değışen voltaj alanlarının uzaysal dağılımını zaman içinde gösteren hızlandırılmış bir grafiktir (150).

EEG, kortikal nöronların aniden içsel aktivitelerini yansıtmanın yanı sıra, talamus ve beyin sapı retiküler formasyon dahil olmak üzere subkortikal yapılardan gelen önemli afferent girdilere de bağlıdır. Örneğin talamik afferentler, alfa ritmi ve uyku içcikleri gibi normal kalıpları karakterize eden ritmik salınımları üretmek için kortikal nöronları sürüklemekten muhtemelen sorumludur. Bir EEG anormalliği, doğrudan kortikal sinir ağlarının bozulmasından veya dolaylı olarak kortikal nöronlar üzerindeki subkortikal girdilerin modifikasyonundan kaynaklanabilir (150).

Kafa derisinden kaydedilen bir EEG, beynin elektriksel aktivitesinin yalnızca sınırlı, düşük çözünürlüklü bir görüntüsünü temsil eder. Bu kısmen, beyin omurilik sıvısı (BOS), kafatası ve doku katmanlarından kaynaklanan belirgin voltaj zayıflaması ve "bulanıklaşma" nedeniyle olmaktadır. Kafa derisi EEG'sinde bir deşarjın ortaya çıkması için, korteksin nispeten geniş alanlarının benzer bir senkronize aktiviteye dahil olması gerekir. Örneğin, serebral kortekse nüfuz eden mikroelektrot dizilerinden elde edilen kayıtlar, tek bir kortikal kolon kadar küçük

alanlarda meydana gelen nöbet benzeri deşarjlarla birlikte, kafa derisinden ve hatta kortikal yüzeyden gelen kayıtlarla görülmeyen karmaşık bir nöbet başlatma ve yayılma yapısı ortaya koymaktadır (151).

Çoğu normal insanda ve 3 yaş ve üzerindeki çocuklarda EEG aktivitesinin uyanıklık modeli, çoğunlukla 8-12 Hz'de meydana gelen sinüzoidal salınımlardan oluşur, en belirgin olanı oksipital alan olan alfa ritmidir (Şekil 2.3.A). Göz açma, zihinsel aktivite ve uyuşukluk alfa ritmini azaltır (bloke eder). Beta aktivitesi 12 Hz'den büyük, genellikle frontal bölgelerde bulunur ve barbitürat veya benzodiazepin ilaçları alan kişilerde daha belirgin olabilir. Sekiz Hz'den daha yavaş aktivite, delta aktivitesi (1-3 Hz) ve teta aktivitesi (4-7 Hz) olarak ayrılabilir. Yetişkinler normal olarak temporal bölgeler üzerinde sınırlı derecede teta aktivitesi gösterebilir. Altmış yaşından sonra karışık teta frekanslarının yüzdesi artar (150). Delta aktivitesi normalde yetişkinlerde uyanıkken bulunmaz, ancak uykuya daldıklarında ortaya çıkar (Şekil 2.6.B). Yavaş aktivitenin (teta ve delta) miktarı ve genliği, uykunun derinliği ile yüksek oranda yakından ilişkilidir. Yenidoğanların ve küçük çocukların EEG'lerinde yavaş frekanslar bol miktarda bulunur ancak bunlar olgunlaşmayla birlikte giderek kaybolur. Teta frekans aralığında bir posterior baskın ritim yaklaşık 3 aylıktan itibaren belirgindir ve bu durum frekansta kademeli olarak artarak 3 yılda en az 8 Hz'e ulaşır.



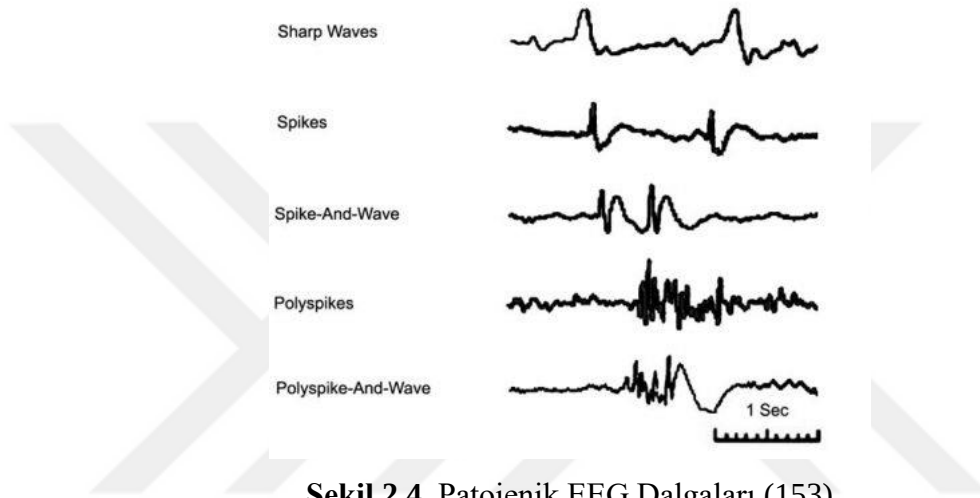
Şekil 2.3. EEG, A ve B. İki Hastadan Alınan Normal Elektroensefalografik Kayıt Örnekleri. A. Uyanma aktivitesi, gözler açıldığında azalan (EO) ve gözler kapatıldığında devam eden (EC) 9 Hz'lik bir alfa ritmi ile karakterize edilir. B. Aşama 2 uykusu, üst üste binen tepe (V) dalgaları ve uyku içciklerinin eşlik ettiği 2 ila 5 Hz arka plan aktivitesi ile karakterize edilir (150).

Nöbetlerin başlangıcı tahmin edilemez olduğundan ve çoğu hastada görülmeleri nispeten seyrek olduğundan, EEG kayıtları genellikle hastanın nöbet geçirmediği zamanlarda alınır (interiktal kayıtlar). Epilepsili hastaların çoğunda ataklar arasında bile EEG'deki elektriksel anormallikler meydana geldiğinden interiktal kayıtlar değerlendirilir (150).

Epileptiform deşarjlar, epilepsili hastalarda ve bazen nöbet geçirmeyip epilepsiye genetik yatkınlığı olan kişilerde interiktal olarak oluşan diken veya keskin dalgalardır. Epileptiform deşarjlar nöbet tipine bağlı olarak fokal veya jeneralize olabilir (150).

Epilepsi ile ilişkili farklı EEG dalgaları: Epilepsili hastalarda epileptik nöbet sırasında kaydedilen EEG paterni ile sağlıklı bir kişiden kaydedilen EEG paterni farklıdır (152). Tipik bir EEG genlik değerleri 20-100 μ V arasında kabul edilir. Daha büyük değerler epilepsiye veya beyinde meydana gelebilecek patogenezi göstermektedir. Diken aktivitelerin oluşturduğu deşarjların lokal (fokal) veya jeneralize olmasına ve morfolojik özelliklerine göre farklı epilepsi tiplerinin tanısı ve sınıflandırması mümkün olmaktadır (Şekil 2.4).

- 1) **Diken (spike) aktivitesi:** 20-70 milisaniye süreli (14-50 Hz frekanslı) aktivitedir. Genellikle arkasından yavaş dalga aktivitesi görülür.
- 2) **Keskin dalga (sharp) aktivitesi:** 70-200 milisaniye süreli (5-14 Hz frekanslı) aktivitedir. Genellikle arkasından yavaş dalga aktivitesi görülür.
- 3) **Çoklu diken (polyspike) aktivitesi:** İki veya daha fazla diken aktivitesinden oluşur ve takiben yavaş dalga aktivitesi görülür.



Şekil 2.4. Patolojik EEG Dalgaları (153)

2.5 Deneysel Epilepsi Modelleri

Epilepsinin patofizyolojisini anlamak ve epilepsi tedavisinde yeni tedavi metotları geliştirebilmek için çeşitli deneysel epilepsi modeli geliştirilmiştir. Sağlıklı bireylerin beyinde hücre içi kayıtlar almak, mikro kimyasal analizler ve anatomik tespit işlemlerini yapmak etik açıdan uygun değildir. İnsan ile diğer deney hayvanları gibi memeliler arasında yapısal ve işlevsel farklılıklar olmasına rağmen ortak temel mekanizmaların varlığı bu modellerden yararlanılmasının temel nedenidir (79).

2.5.1 Kimyasallarla Oluşturulan Deneysel Epilepsi Modelleri

Kainik asit ve pilokarpin gibi kimyasalların intrahippokampal enjeksiyonu ile insandaki temporal lop epilepsisine benzer model oluşmaktadır (154, 155). PTZ, striknin, N-metil-D-aspartat, tetanos toksini ve penisilin gibi kimyasalların sistemik ya da hipokampal enjeksiyonu ile insanda akut ve tekrarlayan nöbetlere benzer akut deneysel modeller oluşturulmaktadır (156).

2.5.2 Elektriksel Uyarıyla Oluşturulan Epilepsi Modelleri

Elektroşokla oluşturulan nöbetler korneal ve auriküler stimülasyonla oluşturulur ve jeneralize tonik klonik epilepsiye neden olur. İnsandaki tonik klonik nöbetlerle benzerlik göstermektedir (157). Sonraki deşarj (Afterdischarge) ile oluşturulan nöbetler ise fokal elektriksel uyarılarla oluşturulur. Kompleks parsiyel epilepsiye ve miyoklonik nöbetlere neden olur. İnsanda fokal başlayarak yayılan ve jeneralize epilepsiye dönüşen nöbetlere benzemektedir (158). Tutuşma modeli ise tekrarlayan afterdischarge uyarılarıyla oluşur. Sekonder jeneralize nöbetlere dönüşen parsiyel nöbetlere neden olur. İnsanda kontrol edilemeyen nöbetlere benzerlik göstermektedir. İlaçlara dirençli epilepsilere tedavi metotları geliştirmek amacıyla kullanılır (159).

2.5.3 Beyin Hasarıyla Oluşturulan Modeller

Hipertermik Nöbet Oluşturma Modeli, Hipoksi Modeli ve Posttravmatik Epilepsi Modeli şeklinde sınıflandırılmıştır. Epileptogenez mekanizmasını çözümlemek amacıyla kullanılan modellerdir.

2.5.4 Genetik Epilepsi Modelleri

Audiojenik Modeller ve Genetik Absans Epilepsili Sıçan (GAERS), WAG/Rij gibi absans epilepsi modeller kullanılmaktadır. Audiojenik modeller genetik olarak yatkın hayvanlara akustik stimülasyon uygulamasıyla oluşturulur. Vahşi koşu ve tonik klonik nöbetlere neden olur. İnsanda herhangi bir duyuşsal uyarana bağılı olarak gelişen epilepsiler ve temporal lob epilepsileriyle benzerlik gösterir (160). GAERS, WAG/Rij, absans epilepsi modellerinde ise epileptik deşarjlar doğal ve kendiliğinden oluşur. İnsanda jeneralize idiyopatik epilepsiyle ve absans epilepsiyle benzerlik göstermektedir (161).

Absans epilepsisi, beyin gelişimi boyunca ortaya çıkan, ancak hastalarda iyi araştırılmamış prototipik bir epileptik hastalıktır. Genetik hayvan modellerinden olan WAG/Rij suşu, özellikle de absans nöbetlerin ayırt edici özelliğı olan EEG’de diken-dalga deşarjları kaydedilen sıçanlar, bu tür epilepsinin patogenezinin doğru bir şekilde incelenmesine izin vererek insanda büyük oranda geçerlilik sağlar. Son araştırmalar, diken ve dalgalı deşarjların birincil somatosensoriyel kortekste başladığını ve çeşitli yaklaşımlar kullanarak hızla motor kortekslere ve talamik çekirdeklere yayıldığını göstermiştir (162). Özellikle, *in vivo* elektrofizyolojik

hücre içi kayıtlar, bu korteksin derin katmanlarının piramidal nöronlarının, nöbetlerin yokluğunda iktojenik nöronlar olarak katılımlarına işaret ederek hızlı aktivasyon, hipereksitabilite ve hipersenkronizasyon özellikler gösterdiğini ortaya çıkardı.

WAG/Rij farelerinde yapılan kantitatif genetik çalışmalar, DDD'lerin varlığından tek bir genin sorumlu olabileceğini, ancak diğer birçok genin nöbet miktarını belirlediğini göstermiştir (163). DDD özelliklerinin erkeklerde ve kadınlarda aynı olması, genetik geçişin otozomal olduğunu gösterir. WAG/Rij farelerinde yapılan bağlantı çalışmaları modeldeki DDD genlerinin *chr 5* ve *chr 9* kromozomlarda bulunduğunu ortaya çıkardığı gösterilmiştir (164). Kuzey Çin'den alınan Han etnik kökenine sahip 118 çocukluk çağı absans epilepsi hastasında gerçekleştirilen genetik araştırmaya dayanarak, çocukluk absans epilepsisinin patogenezinde yer alan önemli bir duyarlılık geni olan Kalsiyum Voltaj Kapılı Kanal Alt Birimi Alfa1 H (*CACNA1H*) bulunmuştur (165, 166). Bununla birlikte, bağlantı analizleri bir Avrupa Kafkas örneğinde *CACNA1H* bölgesinde bir lokus için kanıt sağlamamıştır (167). *CACNA1H*'nin sıçan analogundaki GAERS'de bir mutasyonun, yakın zamanda GAERS'de mevcut olduğu ancak WAG/Rij sıçanlarında olmadığı açıklanmıştır (168).

WAG/Rij sıçanlarında talamik 5HIAA seviyesi, Wistar sıçanlarına kıyasla daha düşük olduğu için, 5HT'nin (5-hidroksiindolasetik asit) talamik doku konsantrasyonu, DDD indeksi (nöbetlerin meydana geldiği sürenin bir ölçüsü) ile pozitif olarak bağlantılı olduğu bildirilmiştir (169). Frontal korteks, pons-medulla ve hipotalamusta triptofanın doku içeriği (5HT'nin öncüsü) ile DDD indeksi arasında negatif korelasyonlar bulunduğu bildirilmiştir (170). Birçok çalışma, dopaminerjik sisteminin özelliklerinin WAG/Rij sıçanları ve epileptik olmayan kontroller arasında farklılık gösterdiğini göstermektedir (171). Kendi içinde melezlenmiş August Copenhagen Irish sıçan türünün kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, WAG/Rij sıçanları, Dopamin-2 benzeri dopamin reseptörlerinin daha büyük bir kortikal yoğunluğunu ve nükleus akumbens merkezinde daha düşük bir Dopamin-1 benzeri dopamin reseptörünün yoğunluğunu gösterdi (172). Sonuç olarak, en azından kortikal dopamin reseptörleri seviyesinde, WAG/Rij sıçanlarındaki beyin katekolaminerjik sistemi, potansiyel olarak absans epilepsiyile ilişkili değişiklikler gösterir. WAG/Rij sıçanlarının frontal korteksinde,

dopamin metabolizması ile DDD skoru arasında oldukça anlamlı bir pozitif bağlantı oluğu gösterilmiştir (173).

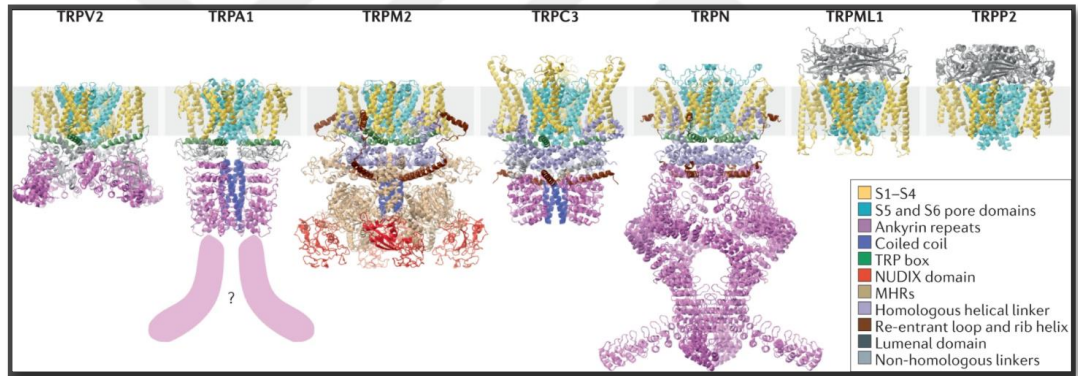
2.6 TRP Kanalları

TRP geni ilk defa fotoreseptör çalışmaları esnasında, *Drosophila melanogaster* türü sirke sineğinin göz hücrelerinde, hatalı ışık algılama özelliğine sahip bir *Drosophila* mutanlığı olarak keşfedildi (174). Bunun sonunda, *trp* olarak bilinen bir iyon kanalını kodlayan genin işlevsel bir kopyasının eksikliğinden kaynaklandığı gösterildi (175).

TRP kanalları hem MSS'nin hem de periferik sinir sisteminin (PSS) fizyolojisinde ve patofizyolojisinde çok önemli roller oynayan transmembran protein kompleksleridir. TRP kanalları, birçok kimyasal, mekanik ve termal uyarının yanı sıra pH, ozmolarite ve çeşitli endojen veya ekzojen ligandlar, ikinci haberciler ve sinyal molekülleri tarafından aktive edilen seçici olmayan katyon kanalları olarak görev alır. Patofizyolojik olarak, bu kanalların üreme sistemi, böbrek, pankreas, akciğer, kemik ve bağırsakta ve ayrıca hem MSS hem de PSS'deki nöropatik ağrıda önemli olduğu gösterilmiştir. TRP kanallarının fizyolojik işlevlerine ek olarak, Alzheimer, Huntington, Amyotrofik lateral skleroz ve epilepsi dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarda çeşitli patofizyolojik rollere katkıda bulunduğu ve bu hastalıkların kanallarla ilişkisi olduğu bilinmektedir (176).

TRP'ler çeşitli dokularda ve hücre tiplerinde bulunan çok yönlü sinyal molekülleri (41, 177). TRP'lerin çoğu, hem fiziksel (sıcaklık, voltaj, basınç ve gerilim) hem de kimyasal uyarılar tarafından aktive edilen, tesadüf dedektörleri (Nöronların sinirsel girdileri zamanlama açısından uygun bir şekilde birleştirilmesi ve belirli bir uyarının birden fazla sinir hücresinde eş zamanlı olarak gerçekleşmesi durumunu ifade eder.) olarak da bilinen polimodal kanallardır. Bunun dışında TRP kanallarıyla ilgili yapılabilecek birkaç genelleme vardır (177). TRP kanalları, iki değişkenli ve hücre içi amino grubu ($-NH_2$) ve bir karboksil grubu ($-COOH$) terminal sitozolik alanı ve sodyum (Na^+), potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{+2}) ve Mg^{+2} dahil olmak üzere çeşitli iyonların taşınmasına izin veren S5 ve S6 tarafından oluşturulan kanal gözeneklidir (178). Bazı TRP'ler plazma membranında seçici olmayan katyon kanalları olarak işlev görürken, diğerleri hücre içi organellerde Ca^{+2} salınımını kontrol eder (179).

Memeli TRP kanal süper ailesinin 28 üyesi vardır (insanlarda 27) (41). Sıcaklık algılama, nosisepsiyon, görme, tat, epitelyal iyon taşınması ve mineral homeostazı gibi birçok farklı fizyolojik süreçte önemli roller oynarlar (180). Mayalarda, omurgasızlarda ve omurgalılarda bulunur. Memeliler de bu üst aile, dizi homolojisine dayalı olarak altı alt aileye ayrılır: **kanonik** TRPC'ler, (TRPC1-7), **vanilloid** TRPV'ler (TRPV1-6), **melastatin** TRPM (TRPM1-8), **ankirin** TRPA (TRPA1), **mukolipinler** TRPML'ler (TRPML1-3) ve **polisistinler** TRPP'ler (TRPP2, TRPP3) (41, 181). Bu alt ailelerin üyeleri, işlevden çok dizi homolojisine dayalı olarak oluşturuldukları için sıklıkla çok az ortak noktaya sahiptir. Örneğin TRPM2 makrofajlarda bir redoks sensörüdür (182); TRPM7 bağırsak epitel hücrelerinde büyük bir Mg^{+2} alım yolu sağlar (183) ve TRPM8 duyu nöronlarında soğuğu ve mentolü tespit eder (184, 185) ancak prostattaki androjenlere yanıt olarak epitelyal büyümeyi düzenler. Yapısal benzerliklerine rağmen, bu proteinler alt tip seçici bileşiklerin/ilaçların geliştirilmesine izin verecek kadar farklıdır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. TRP kanallarının yapıları arasındaki benzerlikler ve farklılıklar. Ortak yapısal özellikleri, her TRP kanal alt ailesi için temsili yapıları gösterecek şekilde renklendirilmiştir (179).

TRP kanalları tetrameriktir ve her bir alt birim, hücre içi N- ve C-terminalleri ve altı transmembran bölüm içerir, beşinci ve altıncı bölümler ve aralarındaki yeniden giriş halkası iyon ileten gözenek oluşturur (186). Çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik uyaranlar tarafından aktive edilen yüksek Ca^{+2} geçirgenliğine sahip seçici olmayan katyon kanallarıdır. Ca^{+2} geçirgenlikleri, çok modlu aktivasyonları ve yaygın ifadeleri nedeniyle bu kanallar, çeşitli fizyolojik süreçlerde Ca^{+2} sinyalinin modüle edilmesinde önemli bir rol oynar. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, artan kanıtlar, TRP kanallarının çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (187).

TRP kanallarının dış gözenek/por alanı tamamen açıktır ve muhtemelen birkaç kimyasal bileşiğe erişimi artıran geniş huni benzeri bir şekle sahiptir. Ancak gözenek yapısı her durumda farklıdır (açık, kapalı, inaktif durumlar gibi). Aslında TRPV1 için yapısal olarak farklı agonistler proteinin farklı alanları ile etkileşime girer, örneğin S5 ve S6'ya yakın olan gözenek döngüsünün en üst bölgeleri toksinler için bir bağlanma yeri oluşturur (188). İlginç bir şekilde diğer TRP alt tipleri, seçicilik filtresinde ve gözenek sarmalında, dış gözenek alanının farklı bir yapısını öneren farklı diziler taşır. Bu farklılık, çeşitli kanal modülatörlerinin afinite ve seçiciliğinin yanı sıra katyon seçiciliğini de açıklayabilir (189). Öte yandan TRP kanal modülatörlerinin yapısal bir bileşeni ve boyutu, bu moleküllerin her bir kanalla nasıl etkileşime girdiğinde önemli bir rol oynayabilir ve çeşitli protein bölgelerinde farklı bağlanma bölgeleri sunar (190).

Çoğu TRP'nin sınırlı ekspresyon paternleri/kalıpları vardır, ancak çeşitli doku dağılımları, insan hücrelerinin, dokularının ve organlarının çoğunu etkilediğini gösterir. TRP'lerin çeşitli fizyolojik aktiviteleri ve düzenleyici mekanizmaları, hastalığa nasıl dahil olduklarını etkiler. Bunlar hem kalıtsal hem de edinilmiş kanalopatileri ve ayrıca bir veya daha fazla TRP kanalının bloke edilmesinin semptomları hafifletebileceği veya terapötik faydalar sağlayabileceği çeşitli diğer hastalıkları içerir (177).

2.6.1 TRP Kanal Biyolojisi ve Patolojisi

Tüm TRP kanalları evrimsel olarak iyi korunmuş olsa da dış uyaranlara karşı duyarlılıkları türler arasında önemli ölçüde değişir. TRPV1, memelilerde kapsaisin tarafından aktive edilir (başlangıçta 'kapsaisin reseptörü' olarak klonlanmıştır) (191), ancak kuşlarda etkinleştirilmez (192). TRPV1'in türe bağlı farklı ısı aktivasyon eşikleri vardır; bu, belirli hayvanlarda (insanlar dahil) zararlı bir ısı sensörü olduğunu (193), ancak diğerlerinde (örneğin, çöl ıssısına evrimsel olarak adapte olmuş develer) olmadığını gösterir (194). Benzer şekilde, TRPA1'in soğuğa duyarlılığı, kemirgenler ve primatlar arasında değişiklik gösterir (195).

2.6.2 TRPM Kanalları

TRPM kanalları TRP üst ailesinin en büyük ve en çeşitli alt ailesini oluşturur ve TRPM1-TRPM8 olmak üzere sekiz üyeden oluşur. Bunların tümü ya doğrudan Ca^{+2} 'a geçirgen kanallar (TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM6/7, TRPM8) yoluyla

ya da diğer kanallar üzerindeki etkileri yoluyla dolaylı olarak sitozole Ca^{+2} girişine katkıda bulunur (196). Diğer TRP kanallarında olduğu gibi, altı transmembran alanı ve beşinci ve altıncı transmembran alanları arasında bir gözenek alanı vardır. Ca^{+2}/Mg^{+2} homeostazının önemi nedeniyle, bu kanallar nörodejeneratif hastalıklar, inflamasyon, kardiyovasküler hastalık ve tip II diyabet tedavisi için potansiyel hedefler olarak araştırmacıların ilgisini çekmiştir (196).

TRPM2 Kanalı: TRPM2, beyinde, özellikle hipokampus ve serebral korteksteki mikrogliya ve nöronlarda bulunan seçici olmayan Ca^{+2} 'a geçirgen bir kanaldır. TRPM2, konumu ve geçirgenlik nitelikleri nedeniyle Alzheimer hastalığı, bipolar bozukluk ve juvenil miyoklonik epilepsi dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarda rol oynar (197, 198). TRPM2, son araştırmalarda epilepsi ile ilişkilendirilmiştir. TRPM2'nin epilepsi kaynaklı bilişsel bozulmanın patofizyolojisinde çok önemli rol oynadığı gösterilmiştir. TRPM2, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumundaki artış, Poli Adenozin Difosfat Polimeraz yolağının aktivasyonu ve Ca^{+2} sitozolik konsantrasyonundaki artış dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle epileptik beyinlerde tetiklenebilmektedir (199). TRPM2'nin aktivasyonu daha sonra Ca^{+2} ve diğer katyonların daha yüksek akışına yol açarak epileptik beynin uyarılabilirliğini ve dolayısıyla nöbetleri artıracaktır. Ayrıca Ca^{+2} akışı, hücre ölümüne yol açabilen mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olabilir (200). TRPM2 kanalı, birkaç seçici olmayan inhibitör (ekonazol, klotrimazol, flufenamik asit) tarafından inhibe edilebilir, fakat bunlar aynı zamanda diğer TRP üyelerini ve katyon kanallarını da inhibe etmektedir (197). Seçici TRPM2 blokerlerinin olası bir antiepileptik etkisine dair bir kanıt olmamasına rağmen, JNJ-28583113 gibi birkaç yeni seçici inhibitör yakın zamanda tanımlanmıştır (201).

TRPM3 Kanalı: TRPM3, farklı transkripsiyon bölgeleri nedeniyle varyantlar sunan, ısıyla aktive olan seçici olmayan bir katyon kanalıdır (202). Bu kanal PIP_2 varlığında aktive edilir. TRPM3, insan vücudunda, özellikle de beyinde geniş ölçüde eksprese edilir. Hipokampus, locus coeruleus, serebellum, hipotalamus nöronları ve oligodendrositlerde bulunur (203). TRPM3'ün Purkinje hücrelerinde glutamaterjik iletimi güçlendirdiği gösterilmiştir (204). Bu TRPM3 gen mutasyonları ile gelişimsel ve epileptik ensefalopati, nöbetler ve entelektüel yetersizlik ile belirgin bozukluklar arasındaki yakın zamanda keşfedilen bir bağlantıyı açıklayabilir (205). Ayrıca epileptik ensefalopati ile bağlantılı bu

TRPM3 mutasyonları karakterize edilmiş ve farklı mekanizmalar yoluyla kanal aktivitesini arttırmıştır (202, 206). Her iki araştırmada da TRPM3, bir antiepileptik ilaç olan TRPM3 antagonisti primidon tarafından baskılanmıştır. TRPM3 inhibisyonunun ayrıca primidonun antiepileptik aktivitesine aracılık edip etmediği net değildir.

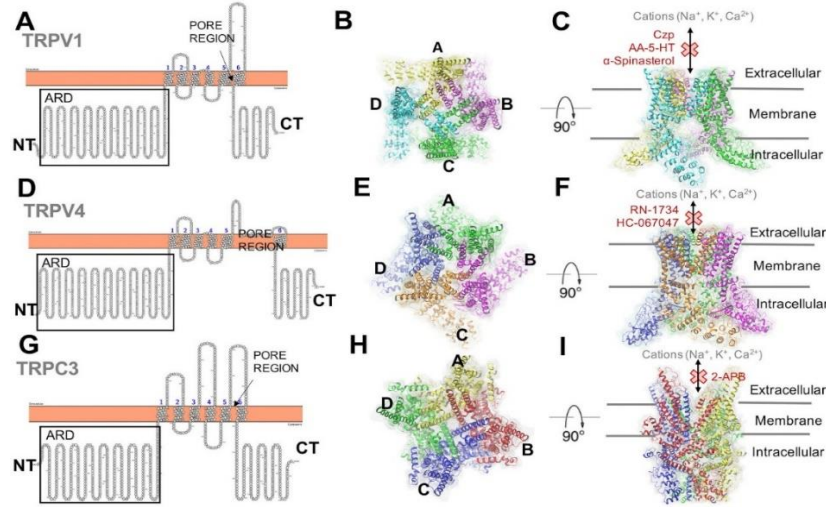
TRPM8 Kanalı: Moleküllere de geçirgen olan TRPM8, orta seviyede Ca^{+2} geçirgenliğine sahip seçici olmayan bir kanaldır (207). Önceden tanımlanmış birçok TRP kanalının aksine, bu kanal bir soğukta ve mentol sensörü olarak işlev görür (208). TRPM8, vücut termoregülasyonunun yanı sıra beyin fonksiyonunda da yer alır; hipotalamus, hipokampus ve amigdalada ifade edilir. TRPM8 kanal aktivasyonu vücut iç sıcaklığını yükseltirken, kanalı bloke etmek bu sıcaklığı düşürür. Bu durum TRPM8'e özgü bir antagonist olan M8-B'nin ateşli ve pentilentetrazolün neden olduğu nöbetlerde antikonvülsan etkilere sahip olduğunun nedenini açıklamaktadır (9). Böylece TRPM8'in epilepside işlev gördüğü olası mekanizma, kanal etkinleştirildiğinde vücut iç sıcaklığını artıran sıcaklık kontrolünün sağlanmasıyla ilgilidir. Bu sıcaklık artışı daha sonra TRPV4 gibi diğer TRP kanallarını etkinleştirebilir ve ardından nöbetlerin başlamasını kolaylaştırabilir (209).

2.6.3 TRPV1 Kanalı

TRPV1, ağrı duyusunda yer alan periferik duyu nöronları ve memeli vücudundaki diğer çok sayıda nöronal ve nöronal olmayan hücreler tarafından ifade edilen iyonlara ve küçük moleküllere karşı geçirgen olan seçici olmayan kanallardır (210, 211). Zarar veren ısı ($>42^{\circ}C$), asidik çözeltiler (pH 6,5), oksidatif stres (nitrik oksit, hidrojen peroksit), endojen lipid türevli bileşikler, kapsaisin gibi diyet bileşenleri ayrıca resiniferatoksin ve vanillotoksinler gibi zehirler tarafından aktive edilebilir (212, 213). Şaşırtıcı bir şekilde, TRPV1 kanalları, 10 mM'dan fazla (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) hücre dışı iki değerli katyonların konsantrasyonları ile etkinleştirilir. Bu nedenle, her ikisi de doğrudan Ca^{+2} ve Mg^{+2} tarafından aktive edildiğinden, G-protein-bağlı bir reseptör olan Ca^{+2} -algılayıcı reseptör ile fonksiyonel homolojiyi/benzerliği paylaşır (214). TRPV1 böylece hipertonic nosisepsiyonun bir alt kümesini iletebilirken, TRPV4 hipotonik nosisepsiyonu iletebilir (215).

Pek çok TRP kanalında olduğu gibi, tamamen yeni bir mekanizma olarak, epileptik patogeneze hakkında yeni bir bilgi verir ve yeni bir farmasötik hedef tanımlar (216). Ayrıca, vanilloid TRP kanalı TRPV1 epilepsi etiyolojisinde önemli olduğu görünmektedir. TRPV1 yakın zamanda bir antiepileptojenik hedef olarak keşfedilmiştir. TRPV1 ekspresyonu, epileptogeneze neden olan NGF tarafından upregüle edilmektedir. Ayrıca, endojen endokannabinoid olan anandamid TRPV1'i uyarır ve epilepside anandamid seviyeleri yükselir. TRPV1 aktivasyonu, kalıcı epilepsili hastalarda apoptotik nöronal ölüme neden olmaktadır (217). TRPV1 aktivasyonu, genel olarak, tercihen internöronlar üzerindeki sinapsları etkiler ve öğrenme ve epileptik aktivite sırasında fizyolojik ve patolojik devre davranışındaki uzun vadeli değişiklikleri etkileyebilmektedir (218).

Her TRPV1 alt birimi, hücre içi N- ve C- terminallerine sahip altı transmembran (TM) alanı/domaini ve ayrıca TM5 ve TM6 arasında bir gözenek alanı içerir. Bu kanal dört TRPV1 alt biriminden oluşur ve 50-100 pS'lik tek kanal iletkenliğine sahip tek değerli ve çift değerli katyonlara geçirgendir (219) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Epilepside yer alan TRP ailesine ait kanalların yapıları. **A.** N-terminalinde uzun bir Ankirin Tekrar Domainine (ARD) sahip olan TRPV1 alt biriminin hücre içi topolojik diyagramı; altı transmembran alanı ve sitozolik taraftaki C-terminali. Gözenek bölgesi, 5. ve 6. transmembran alanları arasında yer alır. **B.** Dört TRPV1 alt biriminden oluşan şerit gösteriminde TRPV1 kanal yapısının üstten görünümü. **C.** TRPV1 kanalının yandan görünümü. Diğerleri arasında kapsazepin (CZP), N-arakidonoil-serotonin ve α-Spinasterol tarafından bloke edilen kanalın (katyonlar) geçirgenliğinin temsili. **D.** TRPV1 yapısına benzer şekilde TRPV4 alt biriminin topolojik diyagramı, yine ARD ile birlikte. **E.** Dört TRPV4 alt biriminden oluşan TRPV4 kanal yapısının üstten görünümü. **F.** TRPV4 kanalının yandan görünümü. Diğerlerinin yanı sıra RN-1734 ve HC-067047 tarafından bloke edilen kanalın (katyonlar) geçirgenliğinin temsili. **G.** Transmembran alanı 5 ve 6 arasındaki gözenek bölgesi ile uzun bir ARD'ye ve diğer TRP kanallarına benzer bir yapıya sahip olan TRPC alt ailesi yapısını temsil eden TRPC3 alt biriminin topolojik diyagramı. **H.** Şeritlerdeki TRPC3 kanalının üstten görünümü, dört TRPC3 alt biriminden oluşur. **I.** TRPC3 kanalının yandan görünümü. 2-APB tarafından bloke edilen kanalın (katyonlar) geçirgenliğinin temsili (220).

TRPV1 kanalları, MSS'de, özellikle sinapslarda (çoğunlukla postsinaptik bölgede, aynı zamanda presinaptik nöronlarda), astrositlerin uç ayaklarında ve perisitlerde yaygın olarak eksprese edilir (221). Hipokampus, korteks, serebellum, bulbus olfactorius, mezensefalon ve arka beyinde eksprese edilirler. Ayrıca hipokampus ve kortekste nöronların hücre gövdeleri ve dendritlerinde yüksek ekspresyona sahiptirler (222). Bu lokalizasyon, bir dizi faaliyetine tekabül eder ve epilepsideki potansiyel rolü hakkında bilgi verir. Epileptik hayvan modellerinin dorsal kök gangliyonunda TRPV1 protein seviyeleri, kontrol seviyelerinden oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (178). TRPV1 kanalları, voltaj kapılı kalsiyum

kanallarına ve NMDA reseptörlerine bağı olarak, epileptik nöronlardaki Ca^{+2} akışında rol oynar, nöbetleri ve nöron ölümünü teşvik eder (220).

TRPV1'in termoregülasyondaki rolü iyi bilinmektedir (223). Kapsaisin ile TRPV1 aktivasyonu, sıcak ortamda (30–32,5°C) kemirgenlerde ısı kaybı davranışına neden olur ve fareler vazodilatasyon nedeniyle 'kırmızı kulak' sergiler ve kafesin soğuk yüzeyini arar (224). Buna karşılık, TRPV1 eksikliği olan (Trpv1-/- veya kapsaisin duyarsızlaştırılmış) fareler, ısı kaybı mekanizmalarında (vücut yalama gibi) eksiklikler gösterir ve 35°C'ye maruz kaldıklarında hipertermi geliştirir (225). İnsanlarda kapsaisin, bir ısı kaybı mekanizması olarak tat alma terlemesine (tatsal terleme: Yemek yedikten hemen sonra alın, yüz, kafa derisi ve boyunda terleme.) neden olabilir, ancak TRPV1 antagonistleri vücut sıcaklığını artırabilir veya azaltabilir, hatta onu değiştirmeden bırakabilir (termötral antagonistler) (226). Bu termoregülatuar yan etkiler, farmakoterapi için kullanılabilir: Doz sınırlayıcı olarak hipertermiye neden olan TRPV1 antagonistleri, hedefe yönelik yan etki olarak tıbbi soğutmadan sonra normal vücut sıcaklığının geri kazanılmasına da yardımcı olabilir. Böylece hipotermiye neden olan TRPV1 agonistleri, inme sonrası beyni koruyabilir (227).

TRPV1, TRP kanal ifadesi ve işlevindeki çeşitliliğin başlıca örneğidir. TRPV1, birincil duyu nöronlarında bol miktarda eksprese edilir ve ağırlı duyuların önemli bir entegratörü (aferent fonksiyon) ve ayrıca nörojenik inflamasyonun (efferent fonksiyonu) önemli bir başlatıcısı olarak işlev görür (224). Ayrıca TRPV1 eksprese eden duysal nöronlar, sıcaklık hissi (228, 229) ve kaşıntı ile ilişkilendirilmiştir (230). İç organlarda, nöronal TRPV1 öksürük, kusma, kalp hızı, miksiyon ve bağırsak peristalsisi gibi refleks yollarını aktive eder (224). TRPV1, düşük seviyelerde de olsa, çok sayıda beyin çekirdeğinde ve nöronal olmayan hücrelerde ifade edilir (231, 232).

TRPV1 kanalının mevcut moleküler mimarisi, kanal geçişi ve daha spesifik olarak protein-ligand etkileşimi yoluyla farmakolojinin hesaplamalı araştırmalarını yürütülmesine ve ayrıca reseptör bağlanma afinitesi yoluyla olası küçük moleküllerin TRPV1 modülatörleri olarak aranmasına/keşfedilmesine olanak tanımaktadır (233, 234). Bu bağlamda, lipid molekülleri yoluyla kanal düzenlemesinde yer alan, vanilloid bağlanma bölgesinden (inhibitör bölge) farklı

olan ve modölatör moleküllerin fizikokimyasal özelliklerine (örneğin moleküler ağırlık, hidrofobiklik, yük) dayalı kanal inhibisyonu hakkında yeni hipotezler ortaya çıkaran birkaç bağlanma bölgesi rapor edilmiştir (235, 236). Bu bulgular, TRPV1'in farklı molekül türleri tarafından inhibisyonunda moleküler belirleyiciler hakkında bilgi sağlar.

2.7 TRP Kanalları ve Epilepsi

Epilepsinin etiyolojisinin tam olarak anlaşılması için pek çok çalışma yapılmasına rağmen, spesifik moleküler ve hücresel yollar belirsizliğini korumaktadır. Modern/mevcut epilepsi ilaçlarının moleküler hedefleri büyük ölçüde Ca^{+2} , glutamat ve GABA kanalları gibi iyon kanallarıdır (237). Epilepsi patofizyolojisinde yer alan moleküler hedef olarak seçici olmayan Ca^{+2} geçirgen kanallar olan TRP kanallarının epilepside nöbet aktivitesinde rolü olduğu yakın zamanda keşfedilmiştir (30). Yakın tarihli bir bulgu, TRPV1 kanalının epilepsi gelişiminde rolü olabileceğini ortaya koymuştur (213).

Epileptik aktivitenin başlaması ve yayılması, çeşitli kanıtlara dayalı olarak hücre içi ve hücre dışı Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişikliklerle ilişkilendirilebilir. Bu nedenle Ca^{+2} epilepsinin gelişmesinde ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynar (238).

TRP kanallarının çoğu, beyinde yaygın olarak ifade edilen, seçici olmayan, dışa doğru doğrultucu/rektifiye edici Ca^{+2} geçirgen katyon kanallarıdır. Nöronlardaki katyon akışı nedeniyle epilepsiye olası katılımlarının bir nedenidir (220).

TRP kanallarından TRPC1, TRPC3-7, TRPM2, TRPM7, TRPV1, TRPV4 ve TRPA1'in tümü epilepsi ile ilişkilendirilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi TRPC kanalları, beyin gelişimi boyunca nöronal gelişme ve hayatta kalmanın yanı sıra birkaç epileptojenik süreçte de önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Örneğin, TRPC1 ekspresyonu epilepsi hastalarının kortikal lezyonlarında artar ve astrosit kaynaklı epilepsi aracılığıyla modüle edilir (239). Araştırmacılar, pilokarpin (muskarinik agonist) ile indüklenen status epileptikus (PISE) modelini kullanarak, TRPC3'ün genetik olarak ortadan kaldırılmasının pilokarpine nöbet duyarlılığını azalttığını, buna karşın TRPC3 ekspresyonunun artmasının hipereksitabiliteyi

indüklediğini ve kortekste epileptiform aktiviteye duyarlılığı arttırdığını keşfettiler (240, 241). TRPC6 ekspresyonu, kronik epileptik sıçanlarda downregüle edilirken, siTRPC6 genetik delesyonu, dentat girusta nöbet duyarlılığını ve nöbet kaynaklı nöronal hasarı arttırırken, hipokampusun *Cornu Ammonis* 1 (CA1) ve *Cornu Ammonis* 3 (CA3) nöronlarında artmamaktadır (242). Ayrıca, diğer TRPC ailesi üyelerinde, TRPC1/4'ün genetik ablasyonu, nöbet kaynaklı nöronal hücre ölümünü azaltır. TRPC5-nakavt farelerde ayrıca hipokampusun CA1 ve CA3 bölümlerinde çok daha az nöbet ve daha az nöbet kaynaklı nöronal hücre ölümü görüldüğü bildirilmiştir. Buna karşılık, TRPC7 kanalı, CA3'te spontan epileptiform patlamaya dahil olur ve bunun azalması, TRPC7-nakavt farelerinde PISE'deki bir azalma ile ilişkilidir (243).

TRPM ailesi epilepsi patofizyolojisinde de rol oynamaktadır. TRPM2 kanalları, juvenil miyoklonik epilepsiye karşı artan bir hassasiyetle bağlantılı olan ve hipokampus nöronlarında kontrol edilen EF-el alanı içeren *protein-1* geniyle birlikte eksprese edilir (244). Ayrıca, TRPM7'nin nöbetler sırasında aktif olduğu gösterilmiştir. Dahası, TRPM7'nin genetik olarak silinmesi, oksijen-glukoz yoksunluğunun neden olduğu bir katyon akımının aktivasyonunu inhibe eder ve ROS-aracılı oksijen-glukoz yoksunluğunun aktivasyonunu önler (245).

TRPV1 kanalının duyu nöronlarında nörojenik ağrı ve inflamasyon oluşumunda önemli olduğu düşünülse de (246), serebral korteks, hipokampus, serebellum, talamus, hipotalamus, striatum, orta beyin ve amigdalada da bulunmaktadır (247). TRPV1 ekspresyonunun, sıçanların hipokampusunda ve temporal lob epilepsisi olan farelerin dentat girusunda ve ayrıca temporal lob epilepsisi olan kişilerin korteksinde de daha yüksek olduğu gösterilmiştir (248, 249). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, TRPV1 kanal aktivasyonunun epilepsi gelişiminde rol oynayabileceği belirtilmiştir. Bilim insanları, TRPV1 kanalının inhibe edilmesinin kapsazepin, 5'-iyodoresiniferatoksin ve resolvinleri kullanarak hipokampus ve dorsal kök gangliyon nöronlarında epilepsi kaynaklı Ca^{+2} girişine ve nöbetlere karşı koruyucu etkilere neden olduğunu gösterdiler (250).

Öjenol tarafından TRPV3 aktivasyonun epileptiform alan potansiyellerini baskıladığı ve hipokampusun CA1 nöronlarında ve neokorteksin üçüncü tabakasında üretilen alan postsinaptik potansiyellerinin genliğini azalttığı

belirtilmiştir (251). PISE epilepsi modelini kullanan başka bir çalışma, TRPV4'ün spesifik agonisti (GSK1016790A) ile aktive edilmesinin proinflatuar sitokinleri (Tümör Nekroz Faktörü Alfa, İnterlökin-1 ve İnterlökin-6) arttırdığını, ancak seçici bir TRPV4 antagonisti olan HC-067047 ile inhibe edildiğini ve post status epileptikus sonrası hücre sağkalımını önemli ölçüde arttırdığı keşfedilmiştir (252).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Cihazlar

Tez çalışmaları boyunca kullanılan cihazlar Tablo 3.1.'de sıralanmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Cihazın Markası	Kullanım Amacı
Derin dondurucu (-20°C)	Panasonic	Hayvanlardan alınan örneklerin ve solüsyonların saklanması için kullanılmıştır.
Derin Dondurucu (-80°C)	Panasonic/MDF-4334-PE	Doku örneklerinin saklanması için kullanılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj	Hettich/Mikro 220 R	Tüm moleküler çalışmalarda ve mRNA izolasyonunda kullanılmıştır.
Mikrosantrifüj	Biosan-Microspin 12	Polimeraz Chain Reaksiyon (PCR) tüplerinde solüsyonların homojenizasyonunda kullanılmıştır.
NanoDrop	Thermo Scientific/2000	mRNA ve cDNA örneklerinin konsantrasyonunu ve saflığını ölçmek için kullanılmıştır.
Thermal Cycler	BioRad C1000 Touch	Komplementer DNA (cDNA) sentezi için kullanılmıştır.
Real Time PCR	Alt Modül: BioRad C1000 Touch; Üst Modül: BioRad CFX96	Hedef genlerin regülasyon seviyelerinin bakılmasında kullanılmıştır.
PCR Plate Sealer	BioRad PX1	Platelerin üzerini kapatmak için kullanılmıştır.
Otomatik Pipetler	Eppendorf	Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4°C)	Panasonic Medicoool 311D (H) 340 L	Solüsyonların ve örneklerin saklanması için kullanılmıştır.
Vorteks	Benchmark	Tüplerdeki solüsyonun homojenizasyonunda kullanılmıştır.

3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Uygulanış Şekilleri

Pentilenetetrazol: Deneysel epilepsi modeli oluşturmak için GABA_A reseptörü antagonisti kullanılmıştır.

Moleküler formülü: C₆H₁₀N₄

Moleküler ağırlığı: 138,17 g/mol

Uygulanma şekli: GABA_A reseptör antagonisti olan PTZ (P6500, Sigma, St. Louis, MO, ABD) epilepsi modeli oluşturmak için %0,9 NaCl çözeltisi içinde eritildi. Akut PTZ modeli için intraperitoneal (i.p.) 50 mg/kg'lık doz, kronik PTZ (tutuşma) modeli için i.p. olarak 35 mg/kg'lık doz olarak hazırlandı.

Ketamin: Hayvanlarda genellikle anestezi başlatmak ve sürdürmek için kullanılan propofol gibi bir ilaçtır.

Moleküler formülü: C₁₃H₁₆ClNO

Moleküler ağırlığı: 237,72 g/mol

Uygulanma şekli: Hayvanlara 90 mg/kg'lık doz i.p. olarak uygulandı.

Ksilazin: Hayvanlarda sedasyon, anestezi, kas gevşemesi ve analjezi için kullanılan farmasötik bir ilaçtır.

Moleküler formülü: C₁₂H₁₆N₂S

Moleküler ağırlığı: 220,34 g/mol

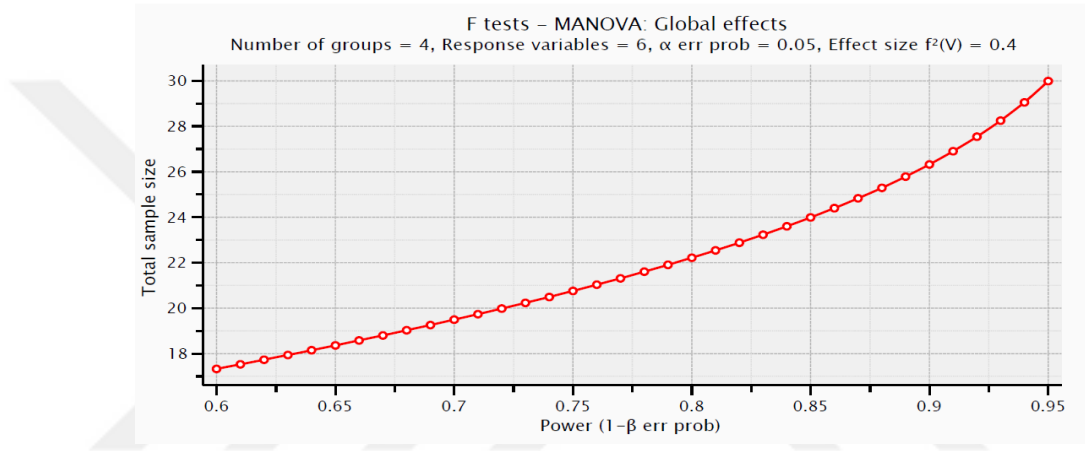
Uygulanma şekli: Hayvanlara 10 mg/kg'lık doz i.p. olarak uygulandı.

3.1.3 Deney Hayvanları

Deneysel çalışmalara Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 09.06.2021 tarihli ve 2021/20 sayılı kararı ile onaylandıktan sonra başlandı. Çalışmada kullanılacak *Wistar albino* deney hayvanları BAİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DEHAM), genetik olarak absans epilepsili WAG/Rij sıçanlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi DEHAM'dan temin edildi ve 280-400 g ağırlığında toplamda 32 adet hayvan kullanıldı. Hayvanlar erkek *Wistar albino* türü ve WAG/Rij suşuna ait

Wistar cinsi 6 aylıkken çalışmaya başlandı (WAG/Rij’de nöbet 6 aylıkken görülmektedir). Deneylere başlayana kadar ve çalışma süresince sıçanlar DEHAM’da, kontrollü sıcaklıklarda ($24^{\circ}\text{C}\pm 2$) kafeslere yerleştirildi, 12 saatlik aydınlık-karanlık, nispi nemi %60 olan ortamda tutuldular ve *ad libitum* beslendiler. Çalışmada kullanılacak hayvan sayısı güç analizine göre, her grupta 8 adet hayvan olarak hesaplandı.

Literatürde ECoG parametreleri dikkate alındığında %95 güven ($1-\alpha$), %95 test gücü ($1-\beta$), $f=0.40$ etki büyüklüğü ile her bir grupta 8 hayvan olmak üzere toplamda 32 hayvan çalışmaya dahil edilmiştir (Şekil 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.1. Güç analizi

F tests – MANOVA: Global effects		
Options:	Pillai V, O'Brien-Shieh Algorithm	
Analysis:	A priori: Compute required sample size	
Input:	Effect size $f^2(V)$	= 0.40
	α err prob	= 0.05
	Power ($1-\beta$ err prob)	= 0.95
	Number of groups	= 4
	Response variables	= 6
Output:	Noncentrality parameter λ	= 38.4000000
	Critical F	= 1.7430449
	Numerator df	= 18.0000000
	Denominator df	= 75.0000000
	Total sample size	= 32
	Actual power	= 0.9667228
	Pillai V	= 0.8571429

Şekil 3.2. Etki faktörü analizi

Hayvanlar rastgele seçilerek gruplarda 8 hayvan olacak şekilde 4 ana grup oluşturuldu. Gruplar Kontrol, Akut PTZ, Kronik PTZ (tutuşma) ve Absans Epilepsili Genetik Model (WAG/Rij) şeklindedir. Kontrol grubuna hiçbir şekilde ilaç enjeksiyonu yapılmadı. Akut PTZ grubuna 50 mg/kg PTZ tek doz enjekte edildi. Kronik PTZ grubuna sıçanlar tutuşma davranışı gösterene kadar 35 mg/kg doz PTZ enjekte edildi. Absans Epilepsili Genetik Model için doğuştan

epileptiform aktiviteye sahip WAG/Rij sıçanlar kullanıldı ve ilaç enjeksiyonu yapılmadı.

3.1.4 Sarf Malzemeler, Kimyasal Maddeler ve Kullanılan Ticari Kitler

- Pentilenetetrazol
- Ketamin, anestezik ajanı
- Ksilazin, anestezik ajanı
- cDNA sentez kiti (Biorad)
- iTAq Universal SYBR Green Supermix (200 x 20 µl rxns, 2 ml)
- TRPM2 primeri
- TRPM3 primeri
- TRPM8 primeri
- TRPV1 primeri
- BDNF primeri
- NGF primeri
- Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) kontrol primeri
- İzopropanol
- Crio tüpler
- Etanol

3.2 Yöntem

3.2.1 Cerrahi İşlem

Operasyondan 1 gün önce aç bırakılan sıçanlara ketamin (90 mg/kg, i.p.) ve ksilazin (10 mg/kg, i.p.) ile anestezi uygulandı. Anestezinin derinliği kornea ve pençe refleksleri ile kontrol edildi. Daha sonra hayvanların kafa derileri tıraş edilerek kafa derisi rostrokaudal doğrultuda 2-5 cm uzunluğunda kesilerek açıldı. Stereotaksi aletine kafaları, kulak delikleri ve ön dişleri sabitleme çubukları aracılığı ile sabitlenerek yerleştirildi (Fotoğraf 3.1). Cilt insize edilip, deri altı dokular çıkarıldı. Bregma belirlendikten sonra duraya zarar vermeden üç adet delik açıldı ve belirlenen koordinatlara üç adet vida yerleştirildi (Fotoğraf 3.2). Birincisi frontal kortekse (bregmanın 4 mm anterior ve 3 mm bregma sağ lateraline), ikincisi oksipital kortekse (bregmanın 4 mm posterior ve 3 mm sağ lateraline) ve üçüncüsü referans elektrot (bregmanın 4 mm posterior ve 3 mm sol lateraline). Son olarak vidaların etrafına elektrot telleri sarılarak dental akrilik ile sabitlendi (253).

Ameliyattan sonra analjezi için buprenorfin hidroklorür (0,1 mg/kg) intramüsküler olarak enjekte edildi (253). Sıçanlar tek tek kafeslere yerleştirilip 7 günlük bir iyileşme dönemine tabi tutuldu. Yedi günlük iyileşme sürecinden sonra hayvanlar tek tek cam kafeslere (40x40x40 cm) yerleştirildi.



Fotoğraf 3.1. Cerrahi işlemden bir görüntü



Fotoğraf 3.2. Hayvanların kafatasına yerleştirilen kalıcı elektrot

3.2.2 Akut PTZ Modelinin Oluşturulması

Hayvanlara elektrot takıldıktan sonra akut deneysel epilepsi modeli oluşturmak için tek doz PTZ (50 mg/kg/i.p.) uygulandı (254). ECoG kaydı 60 dakika (dk) kadar alındı. Hayvanlar 60. dk'da sakrifiye edilip beyin dokuları alındı.

3.2.3 Kronik PTZ (Tutuşma) Modelinin Oluşturulması

Kronik deneysel epilepsi modeli oluşturmak için hayvanların tutuşma davranışları gözlenene kadar haftada üç kez (Pazartesi, Çarşamba ve Cuma) PTZ (35 mg/kg/i.p.) enjekte edildi. Sıçanlar 40×40×40 cam kafeslerde 30 dakika değerlendirildi.

Nöbetlerin şiddeti şöyle skorlandı (255):

Evre 0: Yanıt yok

Evre 1: Kulak ve yüz seğirmesi

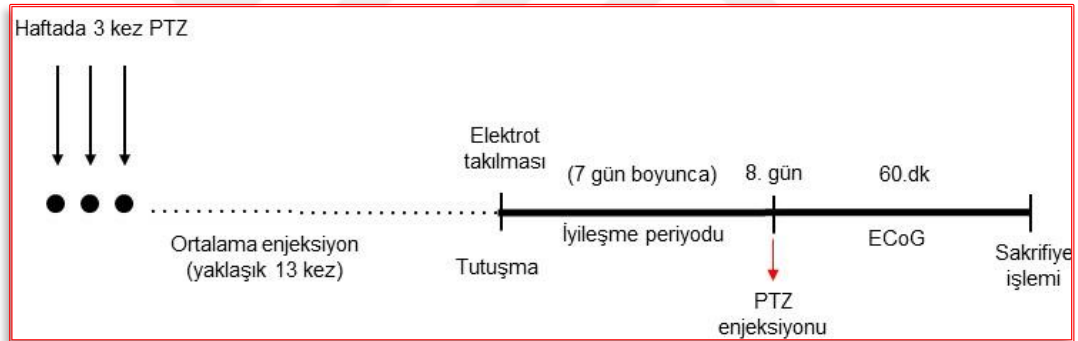
Evre 2: Miyoklonik vücut dik pozisyon olmadan sarsılır

Evre 3: Miyoklonik sarsıntılar, klonik ön ayak konvülsiyonları ile dik pozisyon

Evre 4: Tonik-klonik nöbetler

Evre 5: Genel tonik-klonik nöbetler, postüral kontrol kaybı

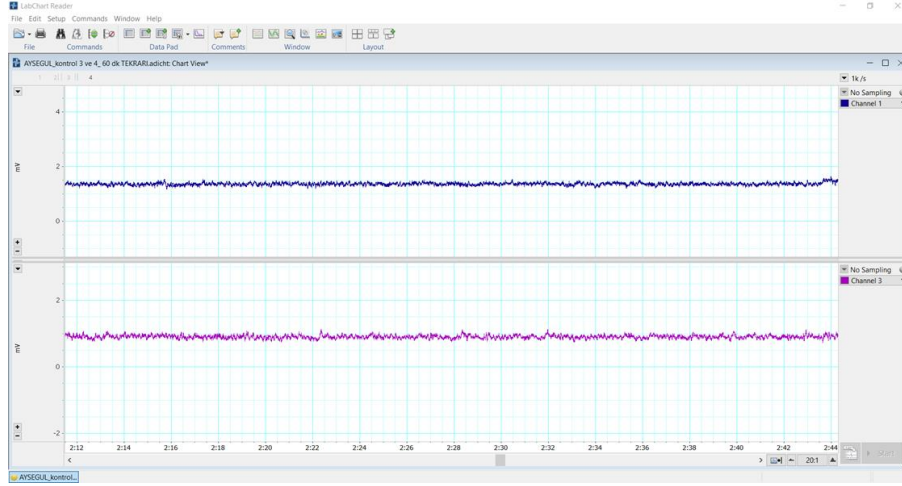
Hayvanlar ardışık üç PTZ enjeksiyonundan sonra evre 4 veya evre 5 nöbet geçirdiğinde tutuşmuş olarak kabul edildi (256, 257, 258, 259). Hayvanlar tutuşturulduktan sonra elektrot takıldı ve 1 hafta boyunca iyileşmeye bırakıldı. Sonraki 8. gün nöbeti indüklemek için PTZ enjekte edildikten sonra ECoG kaydı alındı (Şekil 3.3). Kayıt 60 dk alındı. Hayvanlar 60. dk'da sakrifiye edilip beyin dokuları alındı.



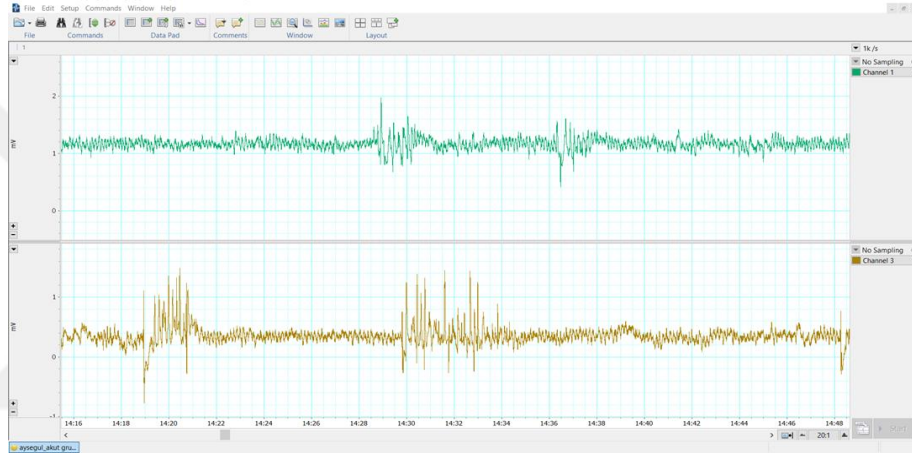
Şekil 3.3. Kronik PTZ (Tutuşma) epilepsi modelinin zaman gösterge çizelgesi

3.2.4 Elektrokortikogram (ECoG) Kayıtları

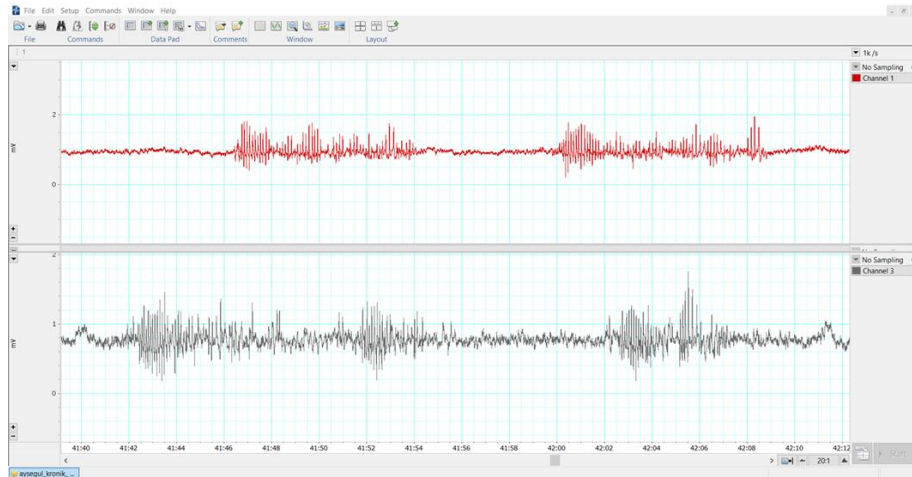
Cerrahi operasyonla kalıcı elektrotların yerleştirilmesinden ve 1 haftalık iyileşme sürecinden sonra elektrotlar yardımıyla korteks yüzeyinden gelen ECoG kayıtları, elektrotlara bağlı özel kablolarla veri toplama sistemine (PowerLab 8/30, ADInstruments, Avustralya) bağlandı. ECoG aktiviteleri LABCHART 8 yazılımı aracılığıyla kaydedildi. Bu yazılımla 60. dk'ya kadar ECoG kayıtları alındı. Hayvanlar uyanıkken ECoG kaydı alındı böylece anestezi etkisi ortadan kaldırılmış oldu. Bu kayıtların analizleri elektrotlar yardımıyla online olarak kaydedildi ve ECoG kayıtları deney bittikten sonra yine POWER LABCHART 8 yazılımıyla offline olarak yapıldı (Şekil 3.4 - Şekil 3.7).



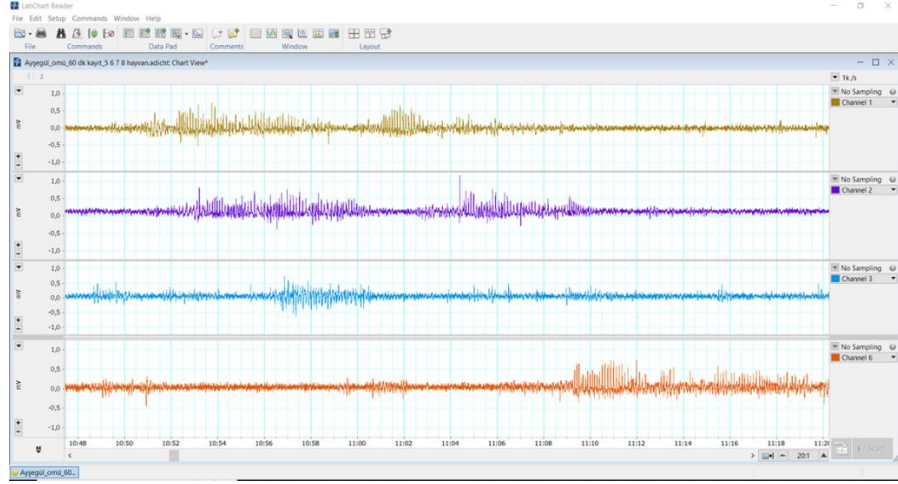
Şekil 3.4. Kontrol grubundan alınan ECoG kaydı



Şekil 3.5. Akut PTZ grubundan alınan ECoG kaydı



Şekil 3.6. Kronik PTZ (tutuşma) grubundan alınan ECoG kaydı



Şekil 3.7. Absans Epilepsili WAG/Rij sıçan grubundan alınan ECoG kaydı

3.2.5 Elektrofizyolojik Kayıtların Değerlendirilmesi

Akut PTZ grubundaki hayvanlar için öncelikle 10 dk boyunca bazal aktiviteleri alındı ve ardından intraperitoneal PTZ enjeksiyonu yapıldı. PTZ enjeksiyonundan yaklaşık 1-5 dk sonra epileptik spike aktiviteleri görülmeye başlandı.

Deneyler sonucunda elde edilen epileptiform aktivite, ECoG kayıtları kullanılarak offline olarak analiz edildi. ECoG kayıtlarında tüm hayvanların toplam DDD nöbet sayısı, toplam DDD spike sayısı, toplam DDD spike süresi, latansı, DDD süre ortalaması, DDD amplitüd ortalaması, nöbet başına spike ortalaması ve nöbet başına süre ortalaması analiz edildi (260). Analiz, POWER LABCHART 8 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Deneyde kullanılan tüm hayvanlardan elde edilen kayıtlar için bu hesaplama ayrı ayrı yapıldı. Elde edilen parametreler IBM SPSS Statistics 20.0 (Inc. Chicago, USA) yazılımı ile istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi. Analiz sonuçları, deneyde elde edilen verilerin istatistiksel olarak nasıl değerlendirildiğini göstermektedir.

3.2.6 Beyin Dokularının Alınması ve Saklanması

Tüm gruplardaki her hayvandan elektrofizyolojik kayıtlar alındıktan sonra, etik yönergeleri doğrultusunda sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Hayvanların beyinleri çıkarıldı ve bu aşamalar Fotoğraf 3.3'te gösterildi. Elde edilen her hayvanın korteks ve hipokampus dokuları kullanıldı. Hipokampus ve korteks dokuları deoksiribonükleaz ve ribonükleaz free tüplere ayrı ayrı konuldu ve hemen kuru buz içine alındı. Sonrasında, dokular -80°C 'de saklandı, çalışılıncaya

kadar muhafaza edildi. Bu düşük sıcaklıkta saklama, analizlerin doğru ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamak amacıyla yapılmıştır.



Fotoğraf 3.3. Hayvanlardan alınan beyin dokuları

Moleküler çalışma için, tüm gruplara ait korteks ve hipokampus dokuları kullanıldı (n=6). Elde edilen dokular aşağıdaki deneyler için kullanıldı:

- Total RNA izolasyonu
- Total RNA bütünlüğünün ve konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanması
- Ters transkripsiyon yöntemiyle cDNA sentezi
- Gerçek zamanlı PCR ile TRPM2, TRPM3, TRPM8, TRPV1, BDNF, NGF genlerinin ekspresyonlarının analizi
- mRNA ekspresyonlarındaki değişimin $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplanması
- Çoğaltılan gen ürünlerinin Erime Eğrisi Analizi ile spesifik erime sıcaklığı (T_m) değerlerinin saptanması

3.2.7 Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, dört farklı grup üzerinde çalışıldı. İlk grup, hiçbir şekilde epilepsi geçirmemiş ve epilepsiye yatkınlığı olmayan *Wistar albino* sıçanları içeren kontrol grubuydu. İkinci ve üçüncü grup, PTZ ile indüklenmiş epilepsiye yatkınlığı olmayan *Wistar albino* sıçanları içeriyordu. Dördüncü grup ise absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarını içeriyordu.

Bu çalışma ile gruptaki TRP kanalları, BDNF, NGF genlerinin ekspresyonun değişimi, kontrol grubuyla karşılaştırılarak gen ekspresyonu

seviyeleri belirlendi. . Gen ekspresyonu seviyeleri, epileptik nöbetler sonrasında incelenmiştir. Belirtilen genlerin baz dizilimi bilgileri Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Deneyde kullanılan primerler (F: Forward R: Reverse)

Genler	Baz Dizilimi (5’-3’)
TRPM2	F: CACACTACCTTCCCTGCATC R: CTGATCAAGAGGAGGGCTTT
TRPM3	F: CGGCTCCTTCTCTTGGAGAT R: AGGCCTCAAGGTAATTCTGG
TRPM8	F: ATCTCCTCTGCGTTGTCGTT R: GCCCAGTGATGTGGACAGTA
TRPV1	F: GGCATTGACAACTGCTTCA R: GCGAGTTCAAAGACCCAGAG
BDNF	F: GTACTCTGGAGAGCGTGAATGG R: ACTACTGGAGCATCACCTGGA
NGF	F: TCATCCACCCACCCAGTCTTCC R: TAATGTTACCTCGCCCAGCAC

Gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin tespit edilmesi amacıyla, dokulardan total RNA izole edildi, cDNA sentezi yapıldı ve kantitatif eş zamanlı-PCR (qRT-PCR) yöntemleri kullanıldı.

- **Total RNA İzolasyonu:** Doku örnekleri sıvı azotta ezilerek homojen hale getirildi. Homojen hale gelen dokudan en az 10 mg olacak şekilde tartıldı ve üzerine 500 µL PureZOL (BioRad, Cat. No: 7326890) solüsyonu eklendikten sonra homojenize edildi. Homojenatlı tüpler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 100 µL kloroform eklenip 15 saniye hızlıca çalkalandı. Üç dakika oda sıcaklığında bekletilen ependorflar, 12.000 rpm’de +4°C’de 15 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında oluşan şeffaf renkli üstteki faz yeni ependorfa alınıp, üzerine 500 µL izopropanol eklendi ve karıştırıldı. 12.000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Bu aşamada, ependorfun alt kısmında beyaz pellet şeklinde nükleik asitler (DNA ve RNA) elde edildi.

Nükleik asit içeren süpernatant temiz bir ependorfa aktarıldı ve üzerine izopropanol (500 µL) ilave edilerek karıştırıldı. +4°C'de 15.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve RNA çöktürüldü. Soğuk %75'lik etanol ile 2 kez yıkama yapıldı. +4°C'de 7500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte bulunan etanol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Ependorfun ağzı kapatılmadan etanolün uçması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Total RNA'lar 50 µL double distile su (ddH₂O) ile seyreltilip cDNA sentezinin yapılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı.

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi için NanoDrop ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbanları ölçüldü. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı 1,8-2,0 arasında olan RNA'lar seçildi.

- **Komplementer DNA (cDNA) sentezi:** cDNA sentezi, RNA molekülünden ters transkriptaz enzimi ile DNA kopyasının sentezlenmesidir. Belli bir sıcaklıkta ikincil yapıdaki RNA'nın açılması sağlanır. mRNA'nın çeşitli bölgelerine primerler bağlanır. Uygun sıcaklık ve sentez için gerekli nükleotidlerin bulunması durumunda primerlerin üzerinden mRNA'nın dizilimine uygun cDNA sentezlenir. Yüksek ısıda ters transkriptaz enzimi inaktive edilerek reaksiyon durdurulur.

cDNA sentezi için iScript cDNA sentez kiti (BioRad, Katalog No. 1708890) kullanıldı. 5 µL cDNA mix, x µL RNA ve 15-x µL nükleaz içermeyen su karışımı toplam 20 µL nükleaz içermeyen su PCR tüpünde buz üzerinde karıştırıldı (x değeri ölçülen RNA miktarıdır. Her örnek için ayrı ayrı ölçüm yapılmıştır.).

Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi ve 25°C'de 5 dakika, 46°C'de 20 dakika, 90°C'de 1 dakika süreleriyle cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu süreçte aktif olan revers transkriptaz enzimi total RNA'lardan cDNA sentezlenmesini

sağlar. Oluşan cDNA örnekleri -80°C’de saklandı. Deneyde kullanılan primerler Tablo 3.2.’de verilmiştir.

- qRT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizi: PCR uygun koşullarda nükleik asitlerin *in vitro* olarak çoğaltılması işlemidir. PCR’da peş peşe tekrarlanan döngüler sayesinde DNA miktarı üstel olarak artar. PCR’a başladığımız hedef dizinin miktarı ile herhangi bir döngüde elde edilen PCR ürününün miktarı arasında kantitatif bir ilişki vardır. Gerçek zamanlı PCR, başlangıçtaki hedef dizi miktarına göre oluşan son ürünün floresan boyalarla özgün ve hassas bir şekilde kantitatif olarak tespit edildiği yöntemdir (261).

cDNA’lar sekans spesifik primerlerin varlığında gerçek zamanlı PCR ile amplifiye edildi. Deney için SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad, Katalog No. 1725271) kullanıldı. TRPM2, TRPM3, TRPM8, TRPV1, BDNF, NGF genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki tabloda gösterilen primerler kullanıldı (Tablo 3.2.).

Çalışmada kullanılan primer dizileri web tabanlı Primer-BLAST programı ile belirlenmiştir ve web tabanlı *in silico* PCR programı ile primerlerin uygunluğu doğrulandı (262, 263).

PCR reaksiyonu için cDNA’lar 1:5 oranında, primerler ise 25 µM konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz içermeyen suyla seyreltildi. Total hacmi 10 µL olacak şekilde, her bir qRT-PCR reaksiyonuna 2 µL cDNA, 2 µL primer karışımı (forward+reverse), 5 µL 2X SYBER Green ve 1 µL ddH₂O eklenerek kabarcık olmamasına dikkat edilerek karıştırıldı. Reaksiyon için şu program kullanıldı: 95°C 5 dk, [95°C 15 sn, 60°C 30 sn, 72°C 30 sn]x40, 72°C 5 dk.

Başlangıç denatürasyonu 95°C’de 10 dakika ve bunu takiben toplam 40 döngü; 95°C’de 15 saniye denatürasyon, 60°C’de 60 saniye bağlanma ve zincir uzaması gerçekleşecek şekilde PCR programı oluşturuldu. Erime eğrisi analizi için 40. döngünün sonuna 95°C’de 1 dakika, 55°C’de 30 saniye ve 95°C’de 30 saniye olacak şekilde bir segment daha eklendi. PCR ürünlerinin varlığı ve saflık kontrolleri erime eğrisi analizleriyle yapıldı.

Gen ürünlerinin ekspresyon düzeylerinin hesaplanması için “Komperatif $\Delta\Delta CT$ ” yöntemi kullanılmıştır (264). Referans gen olarak GAPDH kullanılırken kıyaslama için de kontrol grubu kullanılmıştır. CT değeri, PCR ürünlerinin miktarındaki belirgin artışın olduğu ilk döngüyü ifade etmektedir. Komperatif $\Delta\Delta CT$ şu şekilde hesaplanır:

$$\text{Kontrol } \Delta CT = \text{Kontrol } CT_{(\text{Gen})} - \text{Kontrol } CT_{(\text{Gapdh})}$$

$$\text{Örnek } \Delta CT = \text{Örnek } CT_{(\text{Gen})} - \text{Örnek } CT_{(\text{Gapdh})}$$

$$\Delta\Delta CT = [(\text{Örnek } \Delta CT)_{\text{Ort.}} - (\text{Kontrol } \Delta CT)_{\text{Ort.}}]$$

$$\text{Hedef genin mRNA miktarı} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Kontrol için elde edilen $\Delta\Delta CT$ değerleri yaklaşık olarak “0” olduğu için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri de yaklaşık olarak “1” dir. Elde ettiğimiz sonuç, ilgilendiğimiz hedef genin örnek grubundaki ekspresyonunun kontrole göre relatif miktarıdır. Bir orantı ifadesi olduğundan birim içermez. Kontrole göre örnekteki hedef genin ekspresyonunun kaç kat arttığını veya azaldığını göstermektedir.

-Erime Eğrisi Analizi: Erime noktası, bir DNA zincirinin %50’sinin açılması için gerekli sıcaklıktır. Bir DNA fragmentinin erime noktası, fragmentin uzunluğuna ve guanin-sitozin (GC) içeriğine bağlı olarak değişir. Erime eğrisi analizleri, floresan boya ve DNA arasındaki spesifik bağlanmaları non-spesifik bağlanmalardan ayırt eder ve PCR ürünü hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar (265).

3.3 İstatistiksel Analiz

Elde edilen moleküler verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics 20.0 (Inc. Chicago, USA) yazılımı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu, One-Sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak belirlendi. Veriler normal dağılım gösterdiği için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Varyans analizi sonucunda gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu görüldü. Gruplar normal dağılım gösterdiğinden farkın nereden kaynaklandığını saptamak için Post-Hoc LSD testi kullanıldı. Grafik ve metin içerisinde kullanılan

deney gruplarına ait değerler ortalama $\pm$ standart hata (S.H.) olarak ifade edildi. Test sonuçlarına göre p değeri 0,05'in altında olan farklılıklar anlamlı kabul edildi.

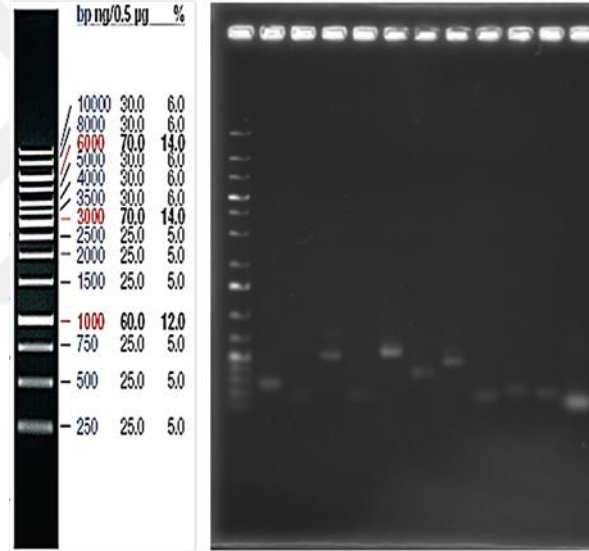


4. BULGULAR

Sunulan çalışmada farklı deneysel epilepsi modelleri karşılaştırılarak *TRPM2*, *TRPM3*, *TRPM8*, *TRPV1*, *BDNF*, *NGF* gen ekspresyonu ve elektrofizyolojik kayıtları değerlendirilmiştir.

4.1 Elektroforez Jel Görüntüsü

İzole edilen cDNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. -80°C'de bekletilen cDNA'lar çözünmeleri için buz üzerine alındı ve %1'lik agaroz jelde örneklerden 5 µL uygulandı (Fotoğraf 4.1). Elektroforez sonrasında jel, Etidyum bromid ile boyanarak her bir kuyucukta cDNA bantlarının varlığı incelendi. Bu sonuçlara göre, sürüntü (degradasyon) gözlenen örneklerden cDNA izolasyonu yeniden yapıldı.



Fotoğraf 4.1. Beyin dokularından elde edilen cDNA'ların jel görüntüsündeki elektroforez işlemi band görüntüleri **M.** Marker **1.** TRPM2 **2.** TRPM3 **3.** TRPM8 **4.** TRPV1 **5.** GAPDH **6.** BCL-2 **7.** BAX **8.** NGF **9.** SİTOKROM-C **10.** BDNF **11.** β-AKTİN (Soldan sağa doğru)

4.2 ECoG Bulguları

Sıçanlardan alınan ECoG kayıtları toplamda 60 dk sürdü. Kontrol grubuna herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmadı. Akut PTZ grubundaki sıçanlardan öncelikle 10 dk'lık bazal aktivite kaydı alındı. Ardından, sıçanlara i.p. yoluyla 50 mg/kg PTZ dozu enjekte edildi ve 60 dk'lık ECoG kaydı alındı. Kronik PTZ (tutuşma) grubundaki sıçanlara ise haftada 3 gün olmak üzere i.p. yoluyla 35 mg/kg PTZ dozu enjekte edildi. Sıçanlar PTZ dozu ile tutuşturulduktan sonra 60 dk'lık

ECoG kaydı alındı. Genetik modelde ise sıçanlar doğuştan absans epilepsili olduklarından dolayı herhangi bir ilaç enjekte edilmedi.

Her gruptaki hayvanların ECoG kayıtları analiz edildi. Bu analizde toplam DDD nöbet sayısı, toplam DDD spike sayısı, toplam DDD spike süresi, DDD süre ortalaması, DDD amplitüd ortalaması, nöbet başına spike ortalaması ve nöbet başına süre ortalaması gibi parametreler hesaplandı. Sadece akut grup için ekstra bir latans ortalaması da hesaplandı. Bunun nedeni, nöbet sonradan indüklendiği için oluşan ilk diken dalganın süresini hesaplamaktır. Elde edilen verilerin aşağıda değerlendirildi.

4.2.1 Kontrol Grubunun ECoG Verileri

Kontrol grubundaki hayvanlara nöbet indükleyici ilaç enjekte edilmediği için belirtilen parametreler sıfır olarak hesaplandı.

4.2.2 Akut PTZ Grubunun ECoG Verileri

Akut PTZ grubundaki hayvanlara nöbet indükleyici ilaç olarak PTZ enjekte edildiği için belirtilen parametreler Tablo 4.1.'de gösterildi.

Tablo 4.1. Akut PTZ grubunun ECoG verileri

	Toplam DDD nöbet sayısı	Toplam DDD spike sayısı	Toplam DDD spike süresi	DDD süre ortalaması (sn)	DDD amplitüd ortalaması (mV)	Latans (sn)	Nöbet başına spike ortalaması	Nöbet başına süre (sn) ortalaması
1. hayvan	314	3622	807	2,71	0,48	196	11,54	0,22
2. hayvan	501	12295	1214	2,97	0,40	136	24,54	0,10
3. hayvan	301	8603	1114	3,76	0,21	146	28,58	0,13
4. hayvan	155	4061	537	3,84	0,26	185	26,20	0,13
5. hayvan	176	4622	561	3,24	0,27	177	26,26	0,12
6. hayvan	461	9398	1220	2,69	0,33	198	20,39	0,13
7. hayvan	434	733	1003	2,39	0,52	167	1,69	1,37
8. hayvan	320	5705	1227	4,04	0,24	152	17,83	0,22
Ortalama	332,75	6129,88	960,37	3,21	0,34	169,63	19,63	0,30
Standart sapma	126,88	3721,67	290,56	0,61	0,11	23,29	9,12	0,43

4.2.3 Kronik PTZ (Tutuşma) Grubunun ECoG Verileri

Kronik PTZ grubundaki sıçanlara nöbet indükleyici ilaç olarak PTZ enjekte edilmiş olup, kronik epilepsi modeli oluşturan tutuşmuş hayvanlar için belirtilen parametreler Tablo 4.2.'de gösterildi.

Tablo 4.2. Kronik PTZ (Tutuşma) grubunun ECoG verileri

	Toplam DDD nöbet sayısı	Toplam DDD spike sayısı	Toplam DDD spike süresi	DDD süre ortalaması (sn)	DDD amplitüd ortalaması (mV)	Nöbet başına spike ortalaması	Nöbet başına süre (sn) ortalaması
1. hayvan	413	3440	1094	2,74	0,65	8,33	0,32
2. hayvan	254	2342	757	3,08	0,39	9,22	0,32
3. hayvan	398	7335	1204	3,36	0,22	18,43	0,16
4. hayvan	247	6580	718	3,00	0,20	26,64	0,11
5. hayvan	211	5005	787	4,30	0,76	23,72	0,16
6. hayvan	194	10111	852	4,53	0,32	52,12	0,08
7. hayvan	149	5341	769	5,34	0,68	35,85	0,14
8. hayvan	149	3679	734	4,93	0,60	24,69	0,20
Ortalama	252	5479,13	865	3,91	0,48	24,87	0,19
Standart sapma	102,49	2495,55	182	0,99	0,22	14,28	0,09

4.2.4 Absans Epilepsili WAG/Rij Sıçan Grubunun ECoG Verileri

Absans epilepsili WAG/Rij sıçanlardan elde edilen parametreler Tablo 4.3.'te gösterildi.

Tablo 4.3. Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubunun ECoG verileri

	Toplam DDD nöbet sayısı	Toplam DDD spike sayısı	Toplam DDD spike süresi	DDD süre ortalaması (sn)	DDD amplitüd ortalaması (mV)	Nöbet başına spike ortalaması	Nöbet başına süre (sn) ortalaması
1. hayvan	43	2217	409	8,19	0,61	51,56	0,18
2. hayvan	74	6496	661	7,77	0,29	87,78	0,10
3. hayvan	68	5081	594	7,53	0,44	74,72	0,12
4. hayvan	56	2904	401	5,72	0,48	51,86	0,14
5. hayvan	22	1488	205	8,90	0,52	67,64	0,14
6. hayvan	48	2370	341	7,10	0,33	49,38	0,14
7. hayvan	40	1345	167	4,29	0,39	33,63	0,12
8. hayvan	53	2841	398	7,23	0,46	53,60	0,14
Ortalama	50,50	3092,75	396,93	7,09	0,44	58,77	0,14
Standart sapma	16,39	1794,97	169,70	1,46	0,10	17,00	0,02

4.3 Moleküler Bulgular

Tüm sıçanlardan 60 dk'lık ECoG kaydı alındıktan hemen sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Daha sonra hayvanların korteks ve hipokampus dokuları ayrıştırıldı. Bu dokular ayrı ayrı değerlendirilerek gen ekspresyon seviyeleri hesaplandı. Bu aşama sırasıyla Total RNA izolasyonu, cDNA sentezi, gerçek zamanlı PCR ile gen ekspresyon sonuçları değerlendirilmiş olup istatistiksel analizi gerçekleştirildi.

4.3.1 Total RNA İzolasyonu

Hayvanlardan alınan korteks ve hipokampus doku örnekleri alındıktan sonra havanda sıvı azotla birlikte ezilerek homojen bir yapı haline getirilmiştir. Çeşitli aşamalarla Total RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra RNA'nın saflık ve konsantrasyonu NanoDrop cihazıyla ölçüldü. Elde edilen veriler Tablo 4.4. ve Tablo 4.5'te gösterildi.

Tablo 4.4. Korteks dokusundaki RNA konsantrasyonları

Gruplar (Korteks dokusu)	260/280 (Saflık)	RNA Konsantrasyonu (ng/μL)
Kontrol	2,02	1636,1
	2,04	1455,4
	2,06	2571,1
Kronik PTZ (Tutuşma)	2,08	4387,4
	1,98	1425,4
	2,06	2415,7
	2,03	2221,2
	2,05	2396,5
	2,96	2043,5
	2,05	2357,6
Akut PTZ	2,12	4641,6
	2,07	2446,4
	2,04	1606,2
	2,00	2500,0
	2,07	2181,6
	2,08	2671,2
Absans Epilepsi (WAG/Rij Sıçan)	2,07	1524,9
	2,06	2457,6
	2,01	1372,8
	2,01	1718,7

Tablo 4.5. Hipokampus dokusundaki RNA konsantrasyonları

Gruplar (Hipokampus dokusu)	260/280 (Saflık)	RNA Konsantrasyonu (ng/ μ L)
Kontrol	1,85	326,6
	1,80	80,9
	1,88	300,6
Kronik PTZ (Tutuşma)	1,93	458,0
	1,80	561,5
	1,93	691,2
	1,92	96,3
	1,92	939,0
	1,93	263,4
	1,86	684,1
Akut PTZ	1,84	733,9
	1,81	446,1
	1,87	502,0
	1,91	471,4
	1,91	510,4
	1,94	377,0
Absans Epilepsi (WAG/Rij Sıçan)	1,96	431,4
	1,89	859,8
	1,92	871,1
	1,91	356,2

4.3.2 cDNA Sentezi

Her bir örnek için 1 μ g RNA, 2 μ L oligo dT ve ddH₂O son hacmi 8 μ L olacak şekilde karıştırılıp, 70°C’de 5 dakika inkübe edildi. 10 μ L 2X reaksiyon buffer ve 2 μ L reverse transkriptaz enzimi eklendikten sonra, örnekler 42°C’de 1 saat ve 80°C’de 5 dakikada inkübe edildi. cDNA örnekleri -20°C’de saklandı. cDNA’nın saflık ve konsantrasyonu NanoDrop cihazıyla ölçüldü. Elde edilen veriler Tablo 4.6. ve Tablo 4.7.’de belirtildi.

Tablo 4.6. Korteks dokusundaki cDNA konsantrasyonu

Gruplar (Korteks dokusu)	260/280 (Saflık)	cDNA Konsantrasyonu (ng/μL)
Kontrol	1,84	1007,0
	1,84	1131,1
	1,84	1194,8
Kronik PTZ (Tutuşma)	1,82	1171,0
	1,83	1242,9
	1,83	1134,4
	1,84	1296,4
	1,83	1160,2
	1,86	1134,6
	1,85	1142,1
	1,82	1265,1
Akut PTZ	1,85	1141,0
	1,83	1312,6
	1,82	1121,2
	1,84	1193,9
	1,85	1119,3
Absans Epilepsi (WAG/Rij Sıçan)	1,84	1221,0
	1,85	2227,0
	1,84	1203,3
	1,82	1224,4

Tablo 4.7. Hipokampus dokusundaki cDNA konsantrasyonu

Gruplar (Hipokampus dokusu)	260/280 (Saflık)	cDNA Konsantrasyonu (ng/ μ L)
Kontrol	1,86	1195,7
	1,80	1318,3
	1,81	1068,1
Kronik PTZ (Tutuşma)	1,83	1143,8
	1,82	1172,4
	1,84	1207,9
	1,80	1294,3
	1,82	1207,8
	1,84	1103,5
	1,83	1167,2
Akut PTZ	1,83	1211,4
	1,81	1280,7
	1,82	1361,9
	1,82	1214,2
	1,83	1200,7
	1,80	1290,0
	1,82	1196,5
Absans Epilepsi (WAG/Rij Sıçan)	1,83	1137,9
	1,83	1136,1
	1,85	1171,9

4.3.3 qRT-PCR ile mRNA Ekspresyonları ve Erime Eğrisi Analizleri

Erime eğrisi analizi, hedeflenen genin veya hedef bölgenin özgünlüğünü ve belirli bir hedefin varlığını doğrulamak için kullanılan bir tekniktir.

Analiz sırasında, PCR ürünü (yani hedeflenen genin çoğaltılmış kopyası) ısıtırken, çift sarmallı DNA yapısı denatüre olur ve tek sarmallı DNA'ya dönüşür.

Bu denatürasyon sırasında, DNA'daki baz çiftleri ayrılır ve bu süreç belirli bir sıcaklıkta gerçekleşir. Erime eğrisi analizi, denatürasyon sürecinin hızını ve sıcaklıkta gerçekleştiği noktayı izler. Bu denatürasyon sıcaklığı, hedeflenen genin baz dizilimine bağlıdır. Pozitif bir erime eğrisi, hedeflenen genin varlığını gösterirken, negatif bir erime eğrisi hedeflenen genin veya hedef bölgenin yokluğunu veya özgünlüğünü ifade edebilir. Bu nedenle, RT-PCR testinde erime eğrisi analizi, hedeflenen genin veya hedef bölgenin varlığını veya yokluğunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (313).

TRPM2, *TRPM3*, *TRPM8*, *TRPV1*, *BDNF*, *NGF* gen ürünleri için T_m değerleri Tablo 4.8.'de verilmiştir. *TRPM2*, *TRPM3*, *TRPM8*, *TRPV1*, *BDNF*, *NGF* genlerinin deney gruplarına ait korteks ve hipokampus örneklerindeki relatif ekspresyon düzeyleri Tablo 4.9.'da verildi.

Tablo 4.8. *TRPM2*, *TRPM3*, *TRPM8*, *TRPV1*, *BDNF*, *NGF* gen ürünleri için T_m (°C) değerleri.

Gen Ürünü	T_m (°C)
TRPM2	85
TRPM3	80,50
TRPM8	86
TRPV1	84,50
BDNF	86,50
NGF	84,50

Tablo 4.9. TRPM2, TRPM3, TRPM8, TRPV1, BDNF, NGF genlerinin deney gruplarına ait korteks ve hipokampus dokularındaki relatif ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) düzeyleri ve ortalama $\pm$ S.H.'ları (n=6).

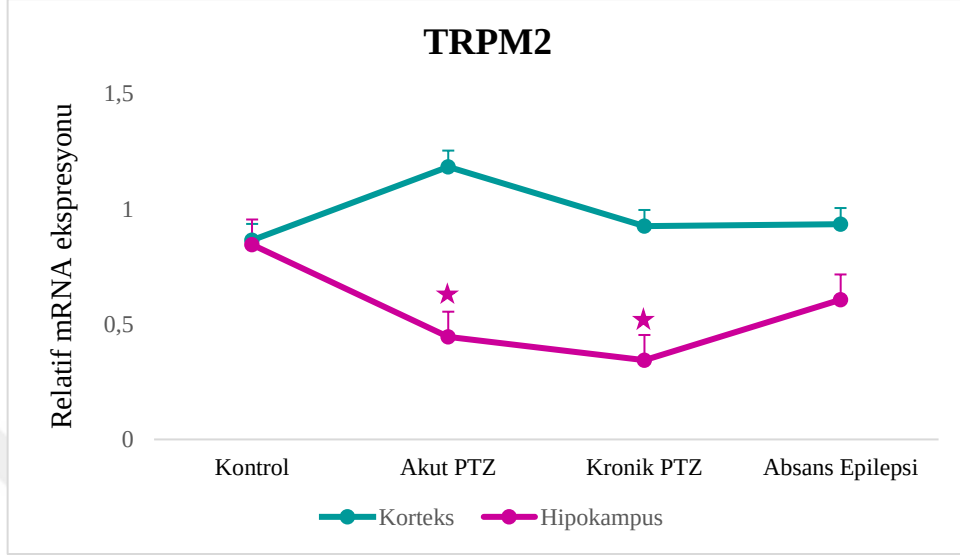
	Genler	Kontrol	Akut PTZ	Kronik PTZ (Tutuşma)	Absans Epilepsi (WAG/Rij Sıçan)
KORTEKS	TRPM2	0,86 $\pm$ 0,19	1,18 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,15
	TRPM3	0,77 $\pm$ 0,17	1,06 $\pm$ 0,14	1,04 $\pm$ 0,07	1,54 $\pm$ 0,27
	TRPM8	1,07 $\pm$ 0,18	0,97 $\pm$ 0,26	0,64 $\pm$ 0,19	1,99 $\pm$ 0,22
	TRPV1	0,97 $\pm$ 0,29	1,01 $\pm$ 0,12	0,78 $\pm$ 0,14	2,12 $\pm$ 0,39
	BDNF	0,82 $\pm$ 0,16	1,74 $\pm$ 0,76	2,33 $\pm$ 0,88	0,58 $\pm$ 0,13
	NGF	0,76 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,05	1,13 $\pm$ 0,13
HİPOKAMPUS	TRPM2	0,85 $\pm$ 0,07	0,45 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,14
	TRPM3	1,12 $\pm$ 0,16	0,96 $\pm$ 0,29	0,88 $\pm$ 0,23	1,77 $\pm$ 0,47
	TRPM8	1,99 $\pm$ 1,14	0,68 $\pm$ 0,17	0,52 $\pm$ 0,20	1,15 $\pm$ 0,29
	TRPV1	1,42 $\pm$ 0,39	1,24 $\pm$ 0,47	1,27 $\pm$ 0,22	2,90 $\pm$ 0,73
	BDNF	1,12 $\pm$ 0,15	5,27 $\pm$ 2,18	6,85 $\pm$ 2,99	3,03 $\pm$ 0,88
	NGF	1,17 $\pm$ 0,17	4,18 $\pm$ 0,81	4,03 $\pm$ 1,21	2,30 $\pm$ 0,58

TRPM2 Ekspresyonu ve Erime Eğrisi Analizi

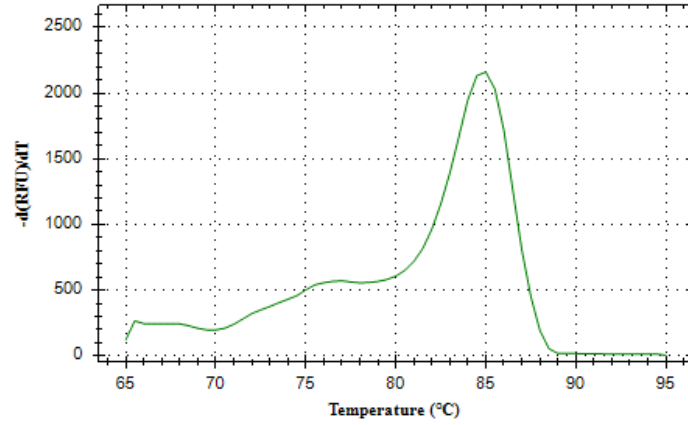
Korteks dokusunda incelenen TRPM2 kanalının relatif mRNA ekspresyonunda; diğer gruplar kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.1). Korteks dokusuna ait TRPM2 kanalının relatif mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, Akut PTZ, Kronik PTZ (Tutuşma) ve Absans Epilepsili gruplarda sırasıyla 0,86 $\pm$ 0,19, 1,18 $\pm$ 0,06, 0,93 $\pm$ 0,08, 0,93 $\pm$ 0,15 olarak tespit edildi.

Hipokampus dokusunda incelenen TRPM2 kanalının relatif mRNA ekspresyonu; kontrol grubuyla kıyaslandığında akut PTZ ve kronik PTZ gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0,05$) (Şekil 4.1.). Hipokampus dokusuna ait TRPM2 kanalının relatif mRNA ekspresyon düzeyleri

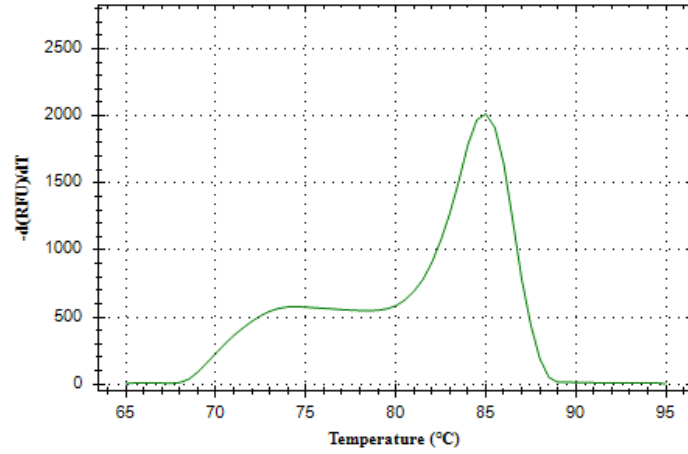
akut PTZ ve kronik PTZ gruplarında sırasıyla $0,45 \pm 0,07$ ve $0,34 \pm 0,11$ iken kontrol grubunda $0,85 \pm 0,07$ olarak bulundu. TRPM2 gen ürününe ait erime eğrisi analizi Şekil 4.2. ve 4.3.'te verildi.



Şekil 4.1. Korteks ve hipokampus örneklerindeki TRPM2 ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.). *p<0,05



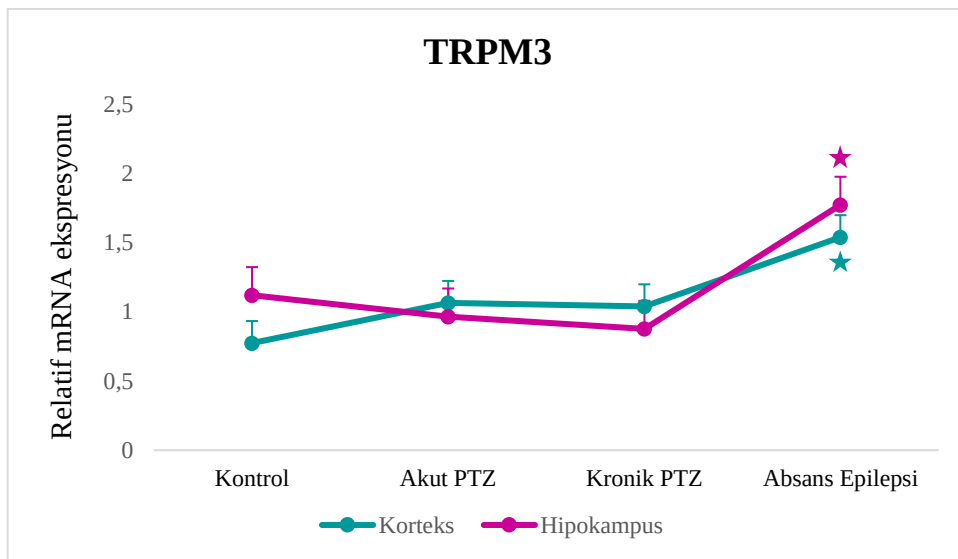
Şekil 4.2. Korteks dokusundaki TRPM2 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği (Tm=85°C).



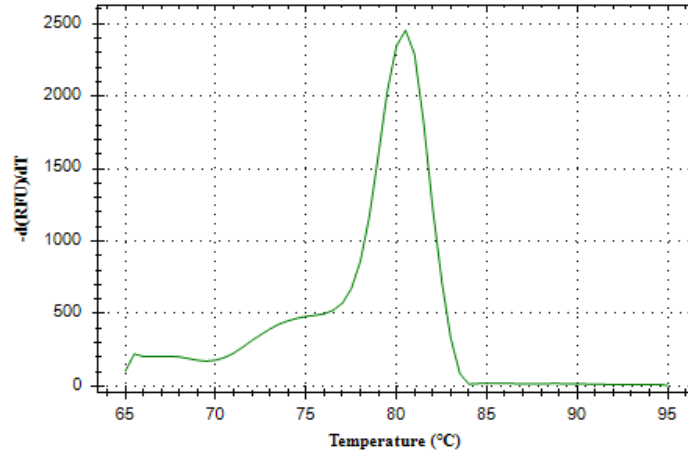
Şekil 4.3. Hipokampus dokusundaki TRPM2 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği (T_m=85°C).

TRPM3 Ekspresyonu ve Erime Eğrisi Analizi

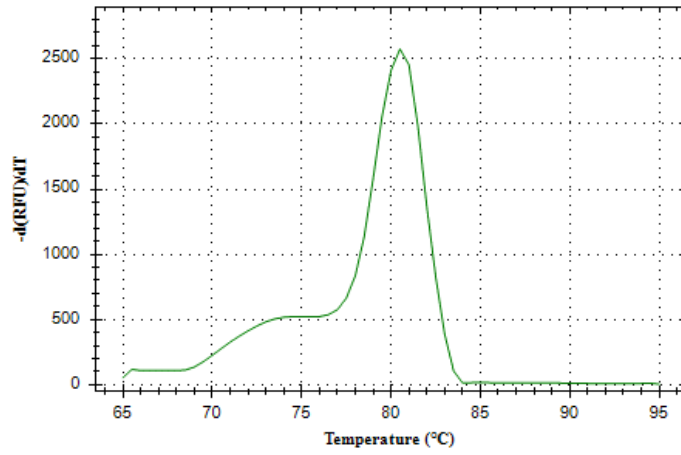
Hem korteks dokusunda hem de hipokampus dokusunda incelenen TRPM3 kanalının relatif mRNA ekspresyonu; kontrol grubuyla kıyaslandığında absans epilepsi grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p < 0,05$) (Şekil 4.4.). Korteks dokusuna ait TRPM3 kanalının relatif mRNA ekspresyon düzeyleri absans epilepsi grubunda $1,54 \pm 0,27$ iken kontrol grubunda $0,77 \pm 0,17$ olarak bulundu. Hipokampus dokusuna ait TRPM3 kanalının relatif mRNA ekspresyon düzeyleri absans epilepsi grubunda $1,77 \pm 0,47$ iken kontrol grubunda $1,12 \pm 0,16$ olarak tespit edildi. TRPM3 gen ürününe ait erime eğrisi analizi Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da verildi.



Şekil 4.4. Korteks ve hipokampus örneklerindeki TRPM3 ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.). * $p < 0,05$



Şekil 4.5. Korteks dokusundaki TRPM3 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği (Tm=80,50°C).



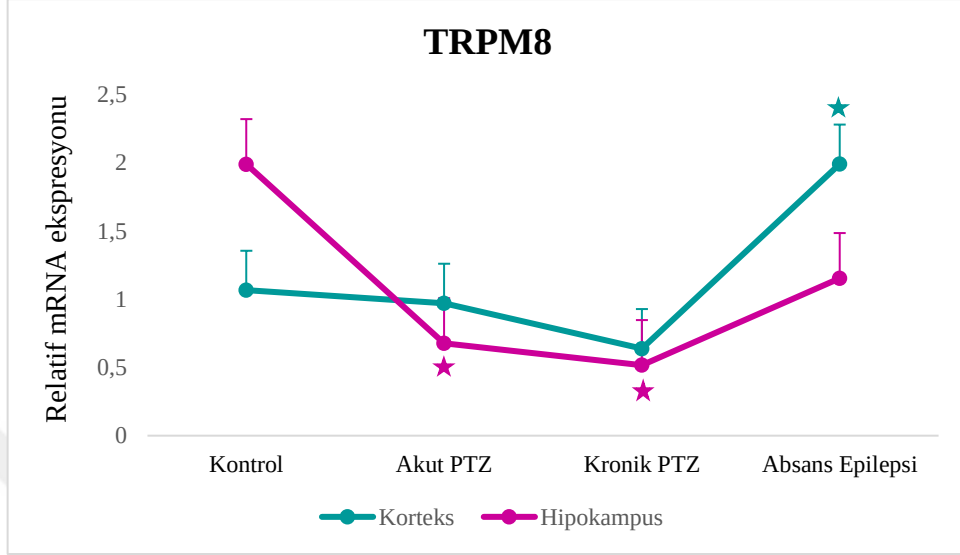
Şekil 4.6. Hipokampus dokusundaki TRPM3 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği (Tm=80,50°C).

TRPM8 Ekspresyonu ve Erime Eğrisi Analizi

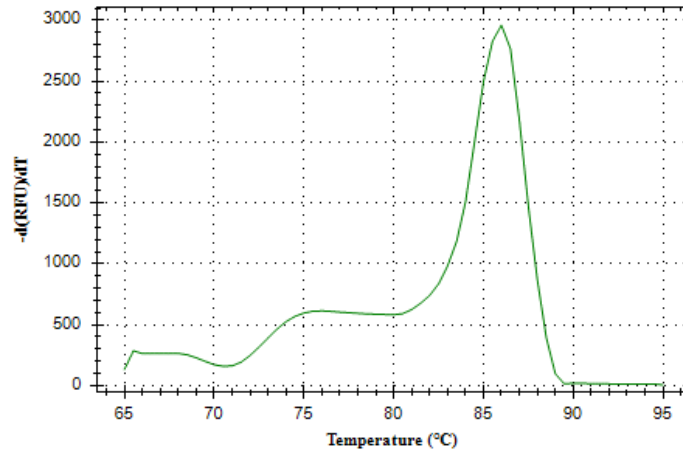
Korteks dokusunda incelenen TRPM8 kanalının relatif mRNA ekspresyonu; absans epilepsi grubunda kontrol grubuna göre istatistik açıdan anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$) (Şekil 4.7.). Korteks dokusuna ait TRPM8 kanalının relatif mRNA ekspresyon düzeyleri absans epilepsi grubunda $1,99\pm0,22$ iken kontrol grubunda $1,07\pm0,18$ olarak tespit edildi.

Hipokampus dokusunda incelenen TRPM8 kanalının relatif mRNA ekspresyonu; akut PTZ ve kronik PTZ grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.7.). Hipokampus dokusuna ait TRPM8 kanalının relatif mRNA ekspresyon düzeyleri akut PTZ ve

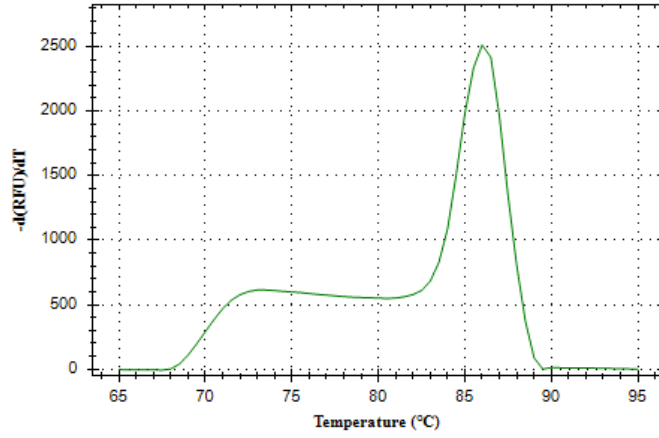
kronik PTZ gruplarında sırasıyla $0,68 \pm 0,17$ ve $0,52 \pm 0,20$ iken kontrol grubunda $1,99 \pm 1,14$ olarak tespit edildi. TRPM8 gen ürününe ait erime eğrisi analizi Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'da verildi.



Şekil 4.7. Korteks ve hipokampus örneklerindeki TRPM8 ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.). * $p < 0,05$



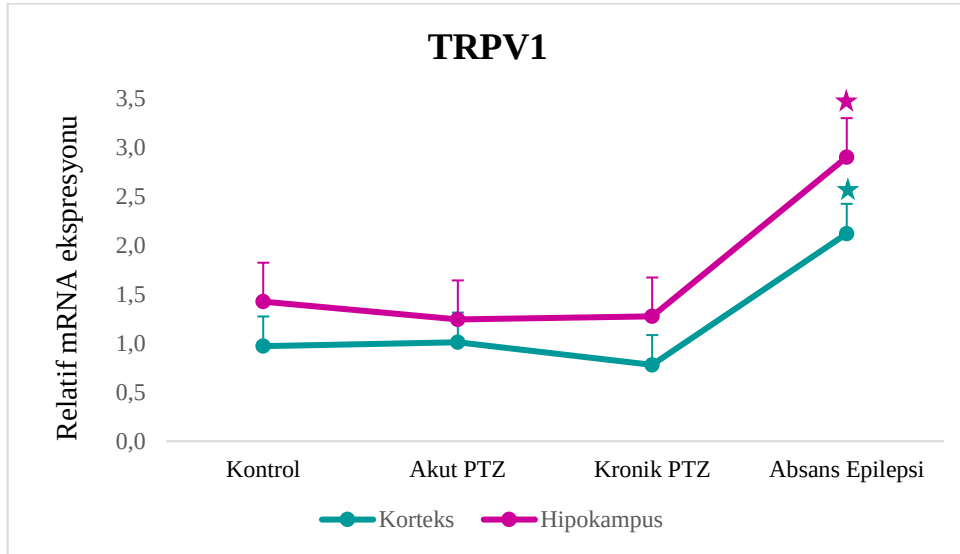
Şekil 4.8. Korteks dokusundaki TRPM8 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m = 86^\circ\text{C}$).



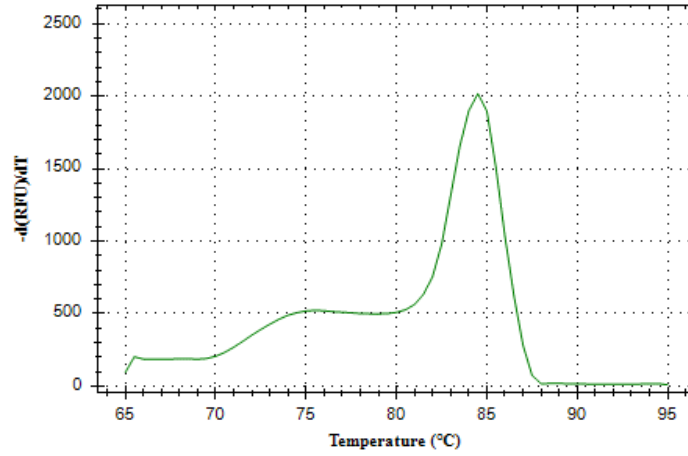
Şekil 4.9. Hipokampus dokusundaki TRPM8 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği (T_m=86°C).

TRPV1 Ekspresyonu ve Erime Eğrisi Analizi

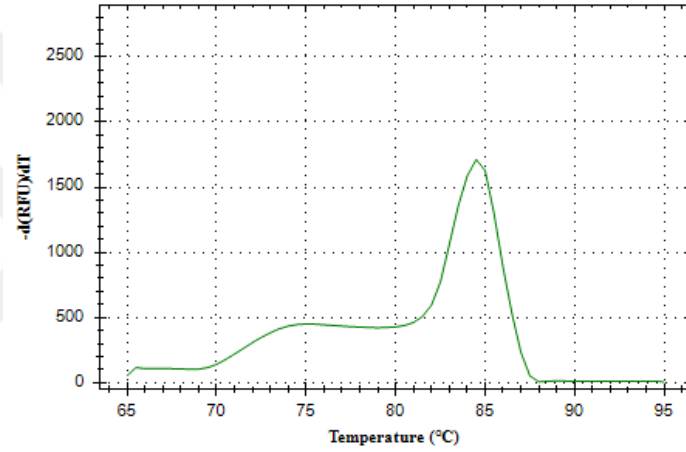
Hem kortekste hem de hipokampusta TRPV1 kanalının relatif mRNA ekspresyonu; absans epilepsi grubunda kontrol grubuna göre istatistik açıdan anlamlı düzeyde yüksekti ($p < 0,05$) (Şekil 4.10.). Korteks dokusuna ait TRPV1 kanalının relatif mRNA ekspresyon düzeyleri absans epilepsi grubunda $2,12 \pm 0,39$ iken kontrol grubunda $0,97 \pm 0,29$ olarak bulundu. Hipokampus dokusuna ait TRPV1 kanalının relatif mRNA ekspresyon düzeyleri absans epilepsi grubunda $2,90 \pm 0,73$ iken kontrol grubunda $1,42 \pm 0,39$ olarak tespit edildi. TRPV1 gen ürününe ait erime eğrisi analizi Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'de verildi.



Şekil 4.10. Korteks ve hipokampus örneklerindeki TRPV1 ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama±S.H.). * $p < 0,05$



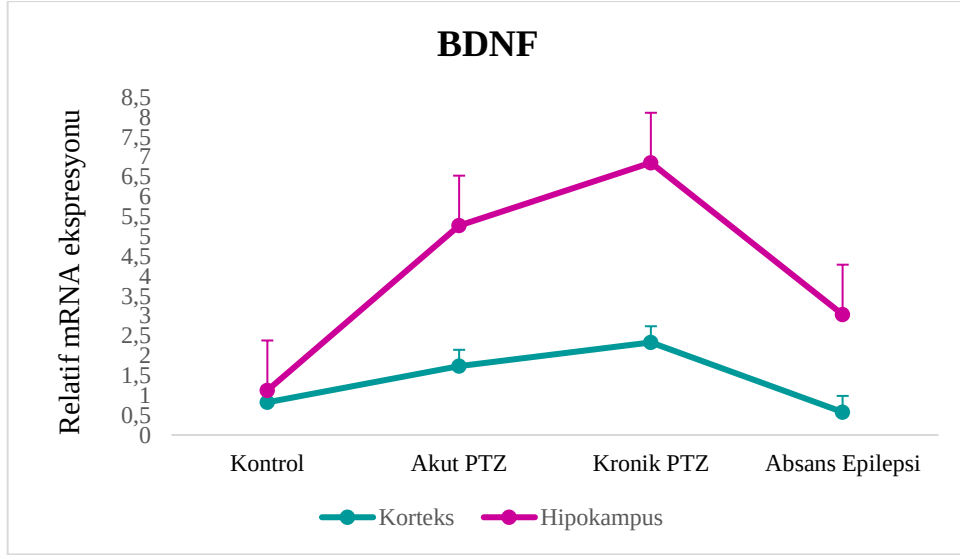
Şekil 4.11. Korteks dokusundaki TRPV1 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=84,50^{\circ}\text{C}$).



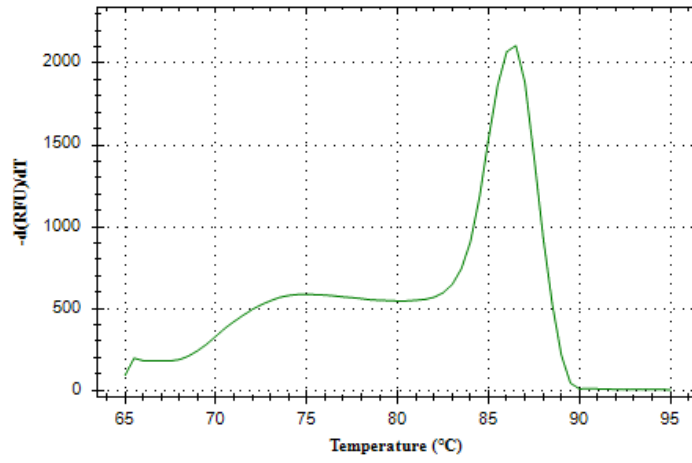
Şekil 4.12. Hipokampus dokusundaki TRPV1 gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=84,50^{\circ}\text{C}$).

BDNF Ekspresyonu ve Erime Eğrisi Analizi

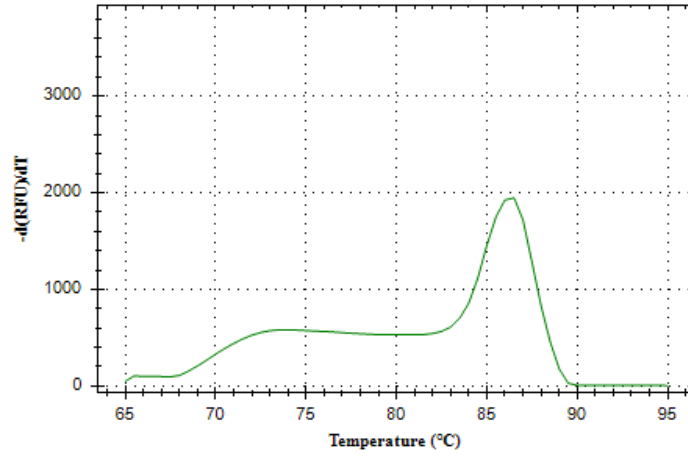
Hem korteks dokusunda hem de hipokampus dokusunda incelenen BDNF relatif mRNA ekspresyonu; diğer gruplar kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.13.). Korteks dokusuna ait BDNF relatif mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, akut PTZ, kronik PTZ ve absans epilepsi gruplarında sırasıyla $0,82\pm0,16$, $1,74\pm0,76$, $2,33\pm0,88$ ve $0,58\pm0,13$ olarak tespit edildi. Hipokampus dokusuna ait BDNF relatif mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, akut PTZ, kronik PTZ ve absans epilepsi gruplarında sırasıyla $1,12\pm0,15$, $5,27\pm2,18$, $6,85\pm2,99$ ve $3,03\pm0,88$ olarak elde edildi. BDNF gen ürününe ait erime eğrisi analizi Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.'te verildi.



Şekil 4.13. Korteks ve hipokampus örneklerindeki BDNF ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.).



Şekil 4.14. Korteks dokusundaki BDNF gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=86,50^\circ\text{C}$).

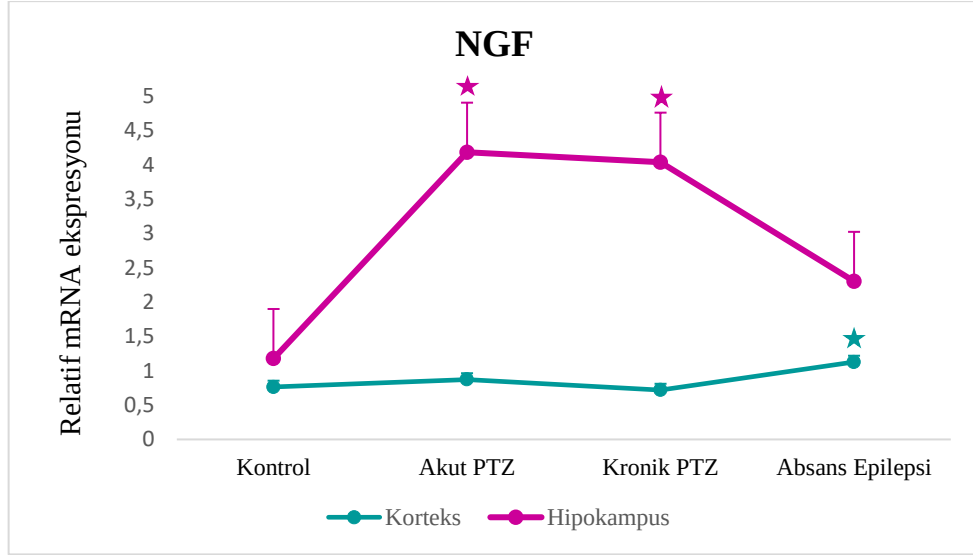


Şekil 4.15. Hipokampus dokusundaki BDNF gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=86,50^{\circ}\text{C}$).

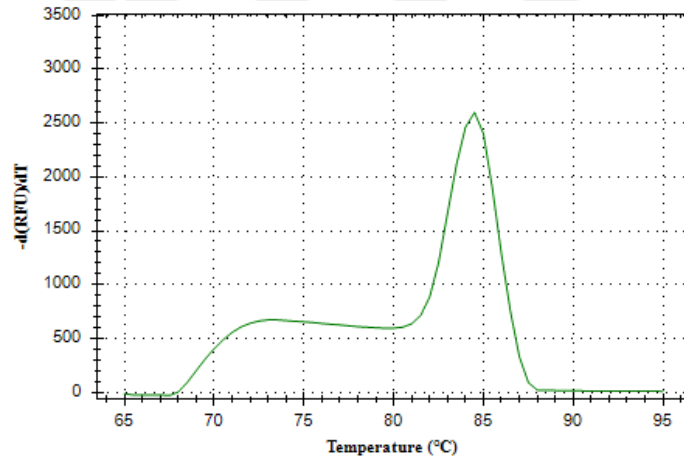
NGF Ekspresyonu ve Erime Eğrisi Analizi

Korteks dokusunda incelenen NGF relatif mRNA ekspresyonu; absans epilepsi grubunda kontrol grubuna göre istatistik açıdan anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$) (Şekil 4.16.). Korteks dokusuna ait NGF relatif mRNA ekspresyon düzeyleri absans epilepsi grubunda $1,13\pm0,13$ iken kontrol grubunda $0,76\pm0,12$ olarak tespit edildi.

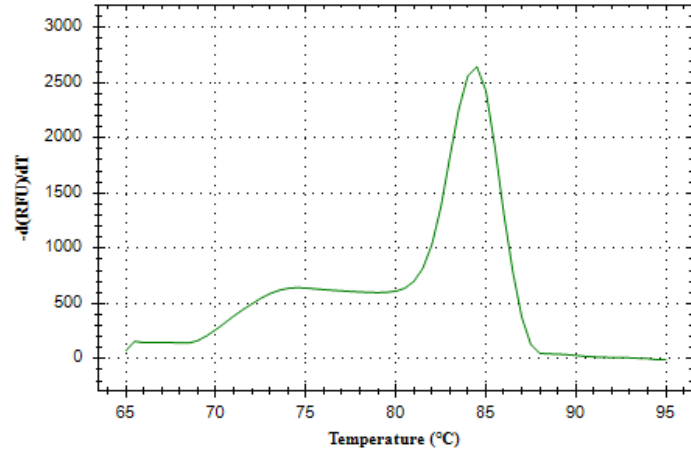
Hipokampus dokusunda incelenen NGF relatif mRNA ekspresyonunun; akut PTZ ve kronik PTZ grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.16). Hipokampus dokusuna ait NGF relatif mRNA ekspresyon düzeyleri akut PTZ ve kronik PTZ gruplarında sırasıyla $4,18\pm0,81$ ve $4,03\pm1,21$ iken kontrol grubunda $1,17\pm0,17$ idi. NGF gen ürününe ait erime eğrisi analizi Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.'de görülmektedir.



Şekil 4.16. Korteks ve hipokampus örneklerindeki NGF ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama $\pm$ S.H.). * $p < 0,05$



Şekil 4.17. Korteks dokusundaki NGF gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m = 84,50^\circ\text{C}$).



Şekil 4.18. Hipokampus dokusundaki NGF gen ürünü için erime eğrisi analizi grafiği ($T_m=84,50^{\circ}\text{C}$).

5. TARTIŞMA

Epilepsi epileptik nöbetlerle karakterize bir hastalıktır. Bir epileptik nöbet ise hücre içi ve hücre dışı iyon konsantrasyonlarında belirgin değişikliklerin eşlik ettiği ciddi şekilde bozulmuş nöral aktivitenin bir örneğidir. Bu çarpıcı olaylar, genellikle, altta yatan beyin ağlarında artan uyarılma ve senkronizasyon nedeniyle beyin fonksiyonunun ciddi şekilde bozulmasını içerir. Voltaj ve ligand kapılı kanallar yoluyla iyon akışlarının sebep olduğu membran voltajındaki değişiklikler, nöral aktivitenin temelini oluşturmaktadır. Epilepsinin deneysel hayvan modelleri arasında kimyasal modeller, fiziksel modeller ve genetik modeller bulunmaktadır. Yaygın konvülsanlar arasında pentilentetrazol, kainik asit, pilokarpin vb. bulunur. En tipik konvülsanlardan biri PTZ'dir ve hem akut hem de kronik (tutuşma) epilepsinin modellerini oluşturmak için kullanıldı.

MSS hastalıklarından Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, inme, bipolar bozukluk, depresyon ve epilepsi gibi hastalıklar görülme sıklığının artması nedeniyle hem tıbbi hem de toplumsal sorunlar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu nöronal hastalıkların tümü, Ca^{+2} homeostazının bozulması ve yanlış katlanmış protein gibi bazı benzer etiyolojilere sahiptir. TRP kanalları dahil olmak üzere çeşitli iyon kanallarının etkisi, bu yanlış katlanmış proteinler tarafından bozulur ve hücre içi Ca^{+2} homeostazını daha da değiştirir. TRP kanal aileleri, çeşitli fizyokimyasal uyaranlar tarafından tetiklenen hücresel sensörler olarak çalışan seçici olmayan Ca^{+2} 'a geçirgen kanalların yanı sıra hücre içi Ca^{+2} homeostazını sürdürmekten sorumlu olan eksojen ve endojen ligandları içerir. TRP kanalları, nöronal hücrelerde geniş ölçüde eksprese edilir ve aktivitelerindeki bozulmalar çeşitli nörolojik bozuklukları meydana getirmektedir (30).

5.1 TRPM2 Hakkında Veriler

Katano ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaya göre TRPM2 kanallarının, hipokampus nöronlarında EF-el motifi içeren proteini kodlayan geni (*EFHC1*) içeren bir EF-el alanıyla birlikte ifade edildiği keşfedilmiştir. Juvenil miyoklonik epilepsi ve juvenil absans epilepsi riskinin artmasıyla bağlantılı olan *EFHC1*, EF-el alanı yoluyla hücre içi Ca^{+2} 'da bir artışı algılayabilir ve TRPM2 kanal aktivitesini kontrol etmek için potansiyel bir Ca^{+2} sensörü olarak çalışabilir. TRPM2 kanalı ile fiziksel olarak etkileşime girdiğini ve dolayısıyla hidrojen

peroksitin neden olduğu hücre ölümünde TRPM2 kanal aktivitesini güçlendirdiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, *EFHC1*'deki değışiklikler, epilepside TRPM2 ile güçlendirilmiş nöronal apoptotik aktivitenin güçlenmesinden sorumlu olabileceğini göstermiştir (244). *EFHC1*'in TRPM2 kanal aktivasyonunun Ca^{+2} duyarlılığının düzenlenmesinde rol oynadığını bildirmişlerdir. Katano ve ekibi bu çalışmada ise *in situ* hibridizasyon analizi, TRPM2 ve *EFHC1*'in hipokampus ve ventriküllerdeki aynı hücrelerde birlikte eksprese edildiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, hidrojen peroksit ile aktive olan TRPM2 aracılı Ca^{+2} akışının ve hücre ölümünün *EFHC1* mutasyonları tarafından baskılanmasının juvenil miyoklonik epilepsi fenotipinin ekspresyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Aslında, ROS'un yapısal olarak sıçan hipokampusunda üretildiği bildirilmektedir.

Zheng ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise; TRPM2 kanalının epilepsideki rolünü araştırmak için akut epilepsi modeli, akut tutuşma modeli, maksimal elektroşok modeli ve kronik tutuşma modeli gibi farklı hayvan epilepsi modelleri kullanılmıştır. TRPM2-nakavt'ın epilepside koruyucu bir rol oynayabileceği dört epilepsi modelinden de benzer sonucu aldıkları ve epilepsi üzerinde koruyucu etkisinin downregüle olduğu bildirilmiştir. TRPM2'nin nakavt edilmesi, akut epilepsi modelinde hipokampal nöronların patolojik hasarını hafiflettiği bildirilmiştir. Ayrıca TRPM2-nakavt farelerde, epilepsi sırasında zamanla uzamsal bellek eksikliklerini iyileştirmesine rağmen kaygıyı iyileştirmediği bildirilmiştir. TRPM2-nakavt, epilepsi kaynaklı hipokampal patolojik hasarları iyileştirebilir ve astrosit aktivasyonunu zayıflatabilir. Bu bulgular epilepsi tedavisi ve erken müdahale için yeni bir yaklaşım sağlayabilmektedir (199).

Sunulan çalışmada akut, kronik ve genetik absans epilepsi modelleri kullanılarak epilepsiye bağı TRPM2 gen ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. TRPM2 gen ekspresyon seviyelerinde kortekste anlamlı farklılık olmazken hipokampusta akut PTZ ve kronik PTZ (tutuşma) gruplarında anlamlı bir şekilde azalma bulunmuştur. Epilepsi nöbetleri sırasında hipokampusun aşırı derecede aktive olduğu bilinmektedir (266), bu aktivasyonun TRPM2 kanallarının da etkisi olabilir. Endojen bir koruyucu mekanizma ile TRPM2 kanallarının sayısının azalması nöbetleri azaltabilir. Diğer olası mekanizma ise nöbet sırasında üretimi artabilecek eksitator ya da inhibitör nörotransmitter maddelerin etkisi ile TRPM2

kanallarının gen ekspresyon seviyeleri azalmış olabilir. Bu çalışmaya ek olarak GABA ve glutamat gen ekspresyon seviyelerine ya da ELISA ile hipokampustaki seviyelerinin belirlenmesi mekanizma hakkında bize bilgi verebilir.

Ayrıca dışardan indüklenen epilepsili hayvanlardaki mekanizma ile absans epilepsili WAG/Rij sıçanlardaki mekanizma farklılıklar gösterebilir. Bu çalışmada WAG/Rij grubunda her iki dokuda da anlamlılık olmadığından farklı bir mekanizmadan söz edilebilir. Akut ve kronik PTZ gruplarında hipokampus dokularında anlamlı derecede azalma durumu ise benzer mekanizmaların faaliyette olduğunu ifade edebilir.

Ying ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise TRPM2-nakavt farelerin epilepsiye daha duyarlı oldukları görülmüş ve neden epilepsiye daha duyarlı olduklarının mekanizması araştırılmıştır. TRPM2-nakavt farelerin Kv7 (voltaj kapılı potasyum kanalları) işlevinde bir eksiklik olabileceğini bildirmişlerdir (267). TRPM2-nakavt farelerin PTZ tutuşma epilepsi modelinde epilepsiye daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, PTZ akut epilepsi modelinde, TRPM2-nakavt farelerinin ölüm oranı, siyah fare suşu olan C57BL/6'da kontrol grubundan önemli ölçüde düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışma ekibi TRPM2-nakavt farelerdeki hipokampal CA1 piramidal nöronlarda, Kv7 kanalının inhibe edilmesinin nöronların ateşleme sıklığını artırdığını bildirmiştir (267). Önceki çalışmalarında TRPM2-nakavtın pilokarpin epilepsi modelinde epilepsinin neden olduğu sinir hasarını ve nöroinflamasyonu etkili bir şekilde hafifletebileceğini gösterdiler (268). TRPM2-nakavt farelerinin daha yüksek nöronal uyarılabilirliğe sahip olabileceği ve bu nedenle epilepsiye daha duyarlı olabilecekleri bildirilmiştir. Ayrıca Kv7 agonistinin TRPM2-nakavt fare nöronlarının uyarılabilirliğini etkili bir şekilde azaltabileceğini ve TRPM2-nakavt farelerde epileptik nöbetleri hafifletebileceğini doğruladılar. Elde edilen verilere göre, nöronların uyarılabilirliğini azaltmak, genetik seviyede veya iyon kanalları üzerinde yapılan düzenlemelerle, epilepsinin genetik yatkınlığını azaltmak için yeni bir tedavi yaklaşımının mümkün olduğu keşfedilmiştir (267).

Sunulan çalışmanın verilerine göre, TRPM2'nin akut PTZ ve tutuşma gruplarında hipokampus dokusunda varlığının, epileptogenezden korunma belirtisi olabileceği, absans epilepside ise böyle bir etkininin görülmediği söylenebilir.

5.2 TRPM3 Hakkında Veriler

Epilepsinin ayırt edici özelliği bir grup nöronun aşırı uyarılabilirliği ile ilgili tekrarlayan nöbetlerdir. TRPM3 iyon kanalı hücreyi depolarize eden Na^+ girişi ve sitoplazmik Ca^{+2} 'yı artıran Ca^{+2} 'a geçirgen seçici olmayan bir katyon kanalıdır. Hem depolarizasyon hem de artan sitoplazmik Ca^{+2} , uyarılabilirliğin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, mutasyona uğramış TRPM3'ün epilepsiyi indükleyebileceğine dair ilk varsayım, mutasyona uğramış TRPM3 kanallarının artan bazal aktiviteye sahip olmasıdır (180).

Yapılan bir çalışmada ise zihinsel engelliliğe ve epilepsiyeye neden olan TRPM3 mutasyonlarının hücre içi kalsiyum seviyeleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Mutantlardan herhangi birini ifade eden hücrelerin, oda sıcaklığında yabani tip TRPM3 ile transfekte edilmiş hücrelerden daha yüksek bazal kalsiyum seviyelerine sahip olduğunu ayrıca V990M mutantını ifade eden hücrelerin, P1090Q mutantını ifade edenlerden daha yüksek bazal Ca^{+2} seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur. Mutantların daha yüksek bazal aktiviteleri muhtemelen bu kanalları eksprese eden nöronlarda depolarizasyona ve yüksek Ca^{+2} seviyelerine neden olur, bu da artan uyarılabilirlik ve nöbetleri indüklemek için bir mekanizma oluşturmaktadır (206). Mutant ve yabani tip kanalların farmakolojik aktivatörlere ve inhibitörlere duyarlılıkları test edilmiştir. V990M en yüksek bazal aktiviteyi, agonistlere karşı en yüksek duyarlılığı göstermiştir ve antagonistler tarafından inhibisyona karşı en az duyarlı olarak belirlenmiştir. P1090Q mutantı yabani tip TRPM3, en düşük bazal aktiviteyi, agonistlere karşı en düşük duyarlılığı ve antagonist inhibisyonuna karşı en yüksek duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir (180).

Sunulan çalışmada ise TRPM3 gen ekspresyonu sadece absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda korteks ve hipokampusta anlamlı düzeyde artmıştır. Hücre içine giren katyon iyonlarının genetik absans epilepsi modelinde TRPM3 ekspresyonunu artırdığı düşünülebilir. Absans epilepsi mekanizmasında TRPM3 kanallarının rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular, TRPM3 kanalının nöbetlerin patogenezinde ve sinyal yollarında nasıl etkili olduğunu daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir. Bu hipotezi test etmek için TRPM3 kanal kapatıcılarının ve açıcılarının etkinliği belirlenerek, TRPM3 kanallarının WAG/Rij sıçanlarındaki spontan nöbetler üzerindeki etkileri araştırılabilir. Bu tür deneyler,

TRPM3 kanallarının nöbetlerin mekanizmasında rol oynayıp oynamadığını belirlemek için önemli bir araştırma yöntemidir. Sonuçlar, TRPM3 kanal aktivitesinin nöbetlerin oluşumunda veya nöbet süresindeki değişiklikleri ve bu da kanalların potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini gösterebilir. Ancak, belirtmek gerekir ki bu hipotezin doğruluğunu değerlendirmek için bu bulguların doğrulanması ve mekanizmanın daha iyi anlaşılması için ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

5.3 TRPM8 Hakkında Veriler

Zandi ve arkadaşlarının yapmış oldukları hayvan çalışmasında, TRPM8 reseptör antagonistinin (M8-B) ateşle gelen nöbetler (febrile), PTZ ve elektroşok kaynaklı nöbetlerle ilgili hayvan modelleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (9). Bu çalışmanın sonucunda M8-B'nin sıçan yavrularının vücut ısını düşürdüğünü göstererek TRPM8 kanalının vücuttaki termoregülasyonda aktif bir rolü olduğunu doğrulamışlardır. TRPM8 antagonistinin ateşli ve PTZ'nin neden olduğu nöbetler üzerinde önemli koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak, elektroşokun neden olduğu nöbetler üzerinde benzer koruyucu etkilere sahip olmadığı bildirilmiştir (9). Bu sonuçlar, TRPM8 antagonistinin farklı nöbet türleri üzerinde farklı etkilere sahip olabileceğini ve potansiyel olarak spesifik nöbet mekanizmalarını hedefleyebileceğini düşündürmektedir.

TRPM8-nakavt ve yabani tip farelerde penisilin ve PTZ indüklü akut epilepsi modellerinde ECoG kaydı alınan bir çalışmada epileptik nöbetler değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, epilepsi indükleyici enjeksiyondan sonra TRPM8 agonist uygulaması ile epileptiform deşajların baskılandığı gösterilmiştir. Ek olarak, epilepsi indükleyici enjeksiyondan önce TRPM8 agonist uygulaması ile epileptiform deşarj gelişimi ve epileptik nöbetler baskılanmıştır. Buna karşılık, TRPM8-nakavt farelerde, epileptiform deşajlar ve epileptik nöbetler TRPM8 agonisti tarafından baskılanmadığı ve vahşi tip farelerine kıyasla epileptik indükleyici tarafından daha fazla kötüleştiği görülmüştür. TRPM8 agonistinin fokal epilepsili hastalar için yeni ilaç tedavilerinin geliştirilmesi için temel olabileceği ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (269).

Mentol aracılığıyla TRPM8'in aktivasyonu yoluyla hücre içi Ca^{+2} seviyesini artırarak duyu nöronlarından glutamat salınımını kolaylaştırarak, periferik nosisepsiyonun modülasyonuna yol açmaktadır (314). Zhang ve arkadaşları

yaptıkları çalışmada ne kültürlenmiş hipokampal nöronlarda ne de sıçanların (erkek Sprague-Dawley) hipokampus dokusunda TRPM8 mRNA'larının saptanmadığını bildirmişlerdir (270). Yapılan bu çalışmada mentolün kültürlenmiş hipokampal nöronların spontan aktivitesini önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir. Kültürdeki hipokampal nöronların sinaptik akımlar ve sıfır Mg^{+2} ile indüklenen epileptiform aktivite gibi fizyolojik fonksiyonları sergileyen geniş sinaptik ağlar oluşturma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (315). Mevcut bulgular mentolün, sıçan hipokampusunun CA1 piramidal nöronlarındaki yüksek afiniteli, yavaş yavaş duyarsızlaştıran GABA_A reseptörlerinin aracılık ettiği tonik inhibisyonu seçici olarak arttırdığını ayrıca hipokampusun *in vitro* nöronal uyarılabilirliğinin ve *in vivo* nöronal hiper uyarılabilirliğinin inhibisyonuna yol açtığını göstermektedir (270).

Sunulan çalışmada hipokampus dokusunda kontrol grubuna göre akut ve kronik PTZ gruplarında TRPM8 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı, korteks dokusunda ise absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Genetik olarak absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarında TRPM8 kanallarının epilepsi gelişiminde rol oynadığı düşünülebilir. Ancak dışardan indüklenen veya sonradan herhangi bir sebeple oluşan epilepside TRPM8 kanallarının bir rolü olmayabileceği de düşünülebilir.

TRPM8 reseptörlerinin dorsal kök ganglion nöronlarının hücre gövdelerinde de bulunduğu daha önce bahsedilmiştir. Szulczyk'nin kortikal nöronlarda yapmış olduğu çalışmasında TRPM8 aktivatörü olan mentolün epileptiform oluşumlar üzerindeki etkisinin TRPM8 kanallarından bağımsız olduğu görülmüştür (271). TRPM8 kanalları kalsiyum iyonlarına geçirgen olduğundan, mentol ile aktivasyonları nöronal plazma zarını depolarize etmektedir (272). Szulczyk'nin çalışmasında ise mentolün membran depolarizasyonunu indüklemediğini, işleyen TRPM8 reseptörlerinin/kanallarının büyük olasılıkla postsinaptik nöronlarda mevcut olmadığı düşünülmektedir. Araştırmacılar, mentolün omurilikte uyarıcı sinaptik iletimi artırdığını keşfetmişleridir. Bu etkinin mekanizması, glutamat salınımını artıran presinaptik akson terminallerinde kalsiyuma geçirgen TRPM8 kanallarının uyarılması yoluyla olduğu düşünülmektedir (273). Szulczyk'nin bulgularında ise interiktal epileptiform

olaylar güçlü bir şekilde inhibe edildiğinden mentol büyük olasılıkla glutamat salınımını azaltmaktadır. Bu nedenle, işlevsel TRPM8 kanallarının prefrontal kortekste presinaptik terminallerde ifade edildiği varsayılırsa, mentolün presinaptik aksonlardaki TRPM8 kanallarını etkileyerek epileptiform olayları inhibe etmesi olası görünmüyor. Spesifik TRPM8 reseptörü/kanalı inhibitörünün varlığında mentolün, prefrontal korteks piramidal nöronlarda iktal epileptiform oluşumları güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, mentolün bu çalışmada gözlemlenen epileptiform epizodlar üzerindeki etkisinin TRPM8 reseptörlerinden/kanallarından bağımsız olduğu görülmektedir (271). Mentolün antiepileptik etkileri *in vitro* deneylerle (patch-clamp) gösterilmiştir. Çalışma kapsamında mentolün yaygın olarak kullanılan antiepileptik ilaçlar ve ilaç adaylarına benzer şekilde *in vitro* kortikal nöronlarda sodyum akımlarını, aksiyon potansiyellerini ve epileptik olayları inhibe ettiği gösterilmiştir (271).

Sunulan çalışmaya göre TRPM8 kanalının ekspresyonuun hipokampus dokusunda akut PTZ ve kronik PTZ modellerinde kontrole göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur. Kortekste ise sadece absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda TRPM8 ekspresyonun kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur. Bu durumda, TRPM8 kanallarının farklı beyin bölgelerinde farklı düzeylerde düzenlendiği ve farklı epilepsi modellerinde farklı ekspresyon değişiklikleri gösterebileceği düşünülebilir. Bu nedenle olası nöroprotektif etki veya nörodejenerasyon üzerindeki etkilerinin net bir şekilde belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Nöroprotektif etkinin mekanizması kompleks olabilir ve farklı epilepsi modelleri veya beyin bölgeleri arasında değişebilir. Akut ve kronik epilepsi modellerinde hipokampus dokusunda TRPM8 ekspresyonunun azalmasıyla birlikte nöroprotektif etkinin olabileceği düşünülmektedir. Nöroprotektif etki, hücrel stresin azaltılması, nöronal ölümün engellenmesi veya nöronal sağlığın korunması gibi mekanizmaları içerebilir. Hipokampus, epileptik aktivitenin sıklıkla odaklandığı bir beyin bölgesidir ve epilepsi nöbetlerinin nöronal hasara yol açabileceği bilinmektedir (316). Bu nedenle, sunulan çalışmada da hipokampus dokusunda TRPM8 ekspresyonunun azalması, nöroprotektif etkinin sağlandığı nöral ağların stabilizasyonu veya hücrel stresin azaltılması yoluyla nöronal sağlığın korunmasıyla ilişkili olabilir. Ayrıca kortekste ise genetik farklılıkların TRPM8 ekspresyonunu etkileyebileceği düşünülebilir. Genetik faktörler, belirli

epilepsi modellerinde veya belirli beyin bölgelerinde TRPM8 ekspresyonunda değişikliklere neden olabilir.

5.4 TRPV1 Hakkında Veriler

Son zamanlarda hipokampusta fonksiyonel TRPV1 kanalları keşfedilmiştir (317). Ca^{+2} 'nin epilepsinin etiyolojisinde rol oynadığı iyi bilinmektedir (318), dolayısıyla bu da TRPV1 kanallarını özgün potansiyel antiepileptik hedef haline getirmektedir. TRPV1 ekspresyonunun, hipokampusun dentat girusu gibi epileptik beyin lokasyonlarında ve ayrıca mezial temporal lob epilepsisi olan bireylerin temporal korteksinde upregüle olduğu gösterilmiştir (248, 274). TRPV1 kanal agonisti olan kapsaisin, sıçanların hipokampal dilimlerinde epileptik aktiviteyi artırırken, TRPV1 kanal antagonistinin epileptik aktiviteyi inhibe ettiği bildirilmiştir (275). Ayrıca, TRPV1 inhibisyonu, farelerde 4-aminopiridin tarafından oluşturulan nöbet aktivitesini ve *in vitro* epileptiform aktiviteyi azaltmaktadır (276). Bir başka çalışmada ise, TRPV1 aktivasyonunun sıçanlarda tutuşmayı hızlandırdığı, inhibisyonunun nöbet başlangıcını geciktirdiği gösterilmiştir (277).

Sunulan çalışmada ise hem korteks hem de hipokampus dokusundaki TRPV1 ekspresyonunun sadece absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda kontrole göre anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur. Absans epilepsi modelinde artan TRPV1 ekspresyonu, sinaptik yollar aracılığıyla farklı etkileşimlerle ilişkili olabilir. Öte yandan, akut PTZ ve kronik PTZ epilepsi modellerinde ise TRPV1 ekspresyonunun istatistik açıssından anlamsız olması, kanalın düşük düzeylerde ifade edildiğini gösterebilir. Bu farklılık, epileptogenez sürecindeki mekanizmaların ve sinaptik yolların genetik epilepsi modelinden farklı olduğunu düşündürülebilir.

TRPV1 antagonistlerinin epilepsideki terapötik etkisinde yer alan moleküler mekanizma açısından, TRPV1 aktivitesinin insanlarda ve deney hayvanlarında bu hastalığın oluşumunda önemli bir rol oynadığı bilinen bir nörotransmitter olan glutamatı arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, TRPV1 kanallarının aktivasyonu, sinaptik etkinlikte yer alan nörotransmitterler olan GABA ve katekolaminlerin salınımını azaltmaktadır (278, 279). Dolayısıyla epilepsi, TRPV1 antagonistleri için yeni bir terapötik alan olarak tanımlanmıştır (217, 280).

Bu preklinik ve klinik bulguları doğrulamak için TRPV1 kanalının kapsazepin (kapsaisinin sentetik bir antagonisti) ve 5'-iyodoresiniferatoksin tarafından inhibisyonun da epileptik atakları inhibe ettiği bulunmuştur (237). Ayrıca temporal lob epilepsisinin akut bir sıçan modelinde, kapsaisinin kannabinoid agonistiyle birlikte uygulanması epileptik nöbetleri azaltmıştır (281). Ayrıca, TRPV1 antagonistleri AMG-9810 ve spinasterol (*Spinacia oleracea*'nın aktif bileşeni), farklı epilepsi fare modellerinde pentilentetrazol ve 6 Hz stimülasyon ile maksimum elektroşok dahil olmak üzere çeşitli epilepsi modellerinde güçlü antiepileptik etki göstermiştir (277).

Piperine'nin (*Piper nigrum*'un temel bileşeni) antiepileptik etkisi, tipik bir sıçan epilepsi indükleyicisi olan kapsazepin tarafından inhibe edilmiştir. Ayrıca, TRPV1'in aktivasyonunun, epileptik hayvanlarda bazal sinaptik iletimi arttırdığı, inhibisyonunun ise sinaptik iletimi azalttığı bildirilmiştir (282).

Beyin hasarına dahil olan mekanizmalar eksitotoksiste, apoptoz ve glial hücrelerin aşırı aktivasyonunu içermektedir (283). MSS'de TRPV1'in sinaptik iletimde, nörojenizde ve nöroinflamasyonda oldukça önemli rolleri vardır. Son çalışmalar TRPV1'in MSS glia hücrelerinde, özellikle mikroglia ve astrositlerde fonksiyonel olarak eksprese edildiğini göstermektedir (284).

Anandamid, kanabinoid reseptörünü aktive etmeye ek olarak, TRPV1 kanalında endojen bir agonist olarak varsayılmıştır, ancak afinitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (285). Anandamid, TRPV1'i aktive ederek *in vitro* preparasyonlarda spontan uyarıcı postsinaptik akımları arttırmaktadır. Ayrıca bir TRPV1 agonisti olan kapsaisin, temporal lob epilepsisi olan farelerde spontan uyarıcı postsinaptik akımların sıklığını artırarak, dentat girus granül hücrelerinde glutamat salınımının artmasına neden olmuştur. Sonuç olarak, TRPV1-nakavt fareler, erken yaşam hipertermi stres faktörlerinin neden olduğu PTZ kaynaklı nöbetlere karşı daha az duyarlı olmuştur (274). Ek olarak pilokarpin kaynaklı status epileptikus modelinde, TRPV1 ekspresyonunun artması, hipokampal CA1 ve CA3'te bazal sinaptik iletimi değiştirebilir ve böylece alan uyarıcı postsinaptik potansiyelleri indükleyebilirken bazı çalışmalar ise kapsaisinin *in vivo* olarak güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermektedir (282).

In vitro ve *in vivo* TRPV1 blokerleri, 4-aminopyridine ile indüklenen epileptiform aktivitede antikonvülsan etkiler sergilemiştir (276). Sıçanlarda ayrıca PTZ kaynaklı nöbetleri ve amigdala kaynaklı tutuşmayı da azaltmıştır. Son olarak, TRPV1 inhibisyonu, genetik olarak epileptik sıçanda akustik (sesle ilgili) olarak indüklenen nöbetleri azaltmıştır (277, 280). Ca^{+2} akışının azalması, TRPV1 blokerlerinin nöbetleri azalttığı varsayılan bir yöntemdir. PTZ ve TRPV1 agonistleri, sıçanların hipokampusunda ve dorsal kök gangliyonlarında Ca^{+2} akışını arttırmıştır (286, 287).

İnsanlarda ve deney hayvanlarında glutamat salınımının ve glutamat kaynaklı sinyalleşmenin TRPV1 kanal aktivitesi ile arttığı bildirilmiştir. Böylece glutamaterjik sinapslarda TRPV1 kanallarının aktivasyonu ile postsinaptik stimülasyon süresi artmaktadır (279, 288). Genel olarak, Na^{+} ve Ca^{+2} katyon akışlarının nöronların depolarize olmasına ve aksiyon potansiyellerini ateşlemesine neden olduğu ve bunun da Na^{+} ve Ca^{+2} katyonlarının akışını artırabileceği anlaşılmaktadır. Glutamat salınımı ve TRPV1 kanal aktivasyonu arasındaki bağlantıya ek olarak, TRPV1 kanal aktivasyonu, aktiviteye bağlı sinaptik etkinliği ve epilepsiyi modüle ettiği bilinen nörotransmitterler olan GABA ve katekolaminlerin salınımını azaltmıştır (279, 289).

Araştırmalar doğrultusunda, TRPV1 kanalının epileptik aktivitenin düzenlenmesinde potansiyel bir hedef olduğunu ve TRPV1 antagonistlerinin antiepileptik etki sağlayabileceğini desteklemektedir. Sunulan çalışmada da farklı epilepsi modelleri kullanılmış olup TRPV1 ekspresyonu değerlendirilmiştir. WAG/Rij grubundaki anlamlı düzeydeki artışın daha çok TRPV1 kanalının sinaptik iletişimi düzenlemede önemli bir rol oynayabileceği ve epilepsi üzerinde etkili olabileceği düşünülebilir. TRPV1 kanalının sinaptik iletişimi düzenlemesi, kanalın aktivasyonu ile gerçekleşir (319). TRPV1 kanalı, nöronların membranında bulunur ve ağrı, sıcaklık ve diğer dış uyaranların algılanmasında önemli bir rol oynar (319). Bu kanalın aktivasyonu, sinaptik geçişin gücünü değiştirerek sinapslardaki iletişimi etkileyebilir. TRPV1 kanalının WAG/Rij sıçan grubunda epileptiform aktivitenin tetiklenmesine katkıda bulunuyor olabilir. Ayrıca, kanalın aktivasyonu sinir hücrelerindeki intrasellüler katyon iyonları (özellikle kalsiyum gibi) seviyelerini etkileyebilir ve bu da sinaptik iletişimde değişikliklere neden olabilir (320).

Nazıroğlu ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, TRPV1 agonisti kapsaisinin neden olduğu sitozolik kalsiyum artışının, sıçanların dorsal kök gangliyonunda ve hipokampusunda apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (250). Bu bulgular, TRPV1 kanalları yoluyla kalsiyum birikiminin epileptik nöbetlerin düzenlenmesinde fizyolojik olarak önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, TRPV1 kanal blokerleri epilepsiye, kapsaisin kaynaklı TRPV1 yoluyla Ca^{+2} girişine ve nöron ölümüne karşı koruma sağlamıştır. Sonuç olarak, TRPV1 kanal blokajı ile kalsiyum birikiminin azaltılmasının, hipokampus ve dorsal kök gangliyon nöronlarında epilepsi kaynaklı Ca^{+2} girişine karşı nöronal koruyucu bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (213, 250).

Bir başka TRPV1 antagonisti olan N-arakidonoil-serotonin, farelerde pentilentetrazolün neden olduğu nöbetlerin başlangıcını etkili bir şekilde geciktirmiştir ve süresini kısaltmıştır (290). Ayrıca, TRPV1 reseptörü için seçici bir antagonizma ile bitki türevli bir bileşik olan α -Spinasterolün, çeşitli epilepsi hayvan modellerinde de önemli bir antikonvülsan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (280). Sunulan çalışmada, akut PTZ ve kronik PTZ grubunda TRPV1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlılık olmaması, bu genin sentezlenemediğini gösterebilir. Yapılan çalışmalarda, TRPV1 antagonistinin kullanılması, bu kanalın aktivasyonunu engelleyerek nöbet süresini kısalttığı belirtilmiş ve sunulan çalışmada benzer etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Sunulan çalışmanın, sadece absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubunda TRPV1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmesi, TRPV1 kanalının absans epilepsinin patogenezi ve mekanizmalarında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürülebilir.

5.5 BDNF Hakkında Veriler

BDNF yeni nöronların ve sinapsların gelişimi ve farklılaşmasının yanı sıra merkezi ve periferik sinir sisteminde mevcut nöronların hayatta kalmasında önemli bir rol oynamaktadır (291, 292). Bulgular BDNF ve reseptörü olan TrkB'nin epilepsi patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir. BDNF seviyeleri ve aktivitesi, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara göre epileptogenez sırasında yükselmektedir (293). Ayrıca, yetişkin sıçanların hipokampusundaki TrkB

seviyelerinin azalması, nöbet oluşumunu azaltır, bu da TrkB'nin epilepside terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir (159, 294).

BDNF'nin, yetişkinlerde en sık görülen epilepsi türlerinden biri olan temporal lob epilepsisinde tanımlanan, yosunlu lif filizlenmesi olarak bilinen anormal sinaptik plastisitenin ortaya çıkmasında rol oynadığı bilinmektedir. Hem BDNF proteini hem de mRNA düzeyinin, epileptik bireylerin temporal lob ve hipokampusundaki nöbetleri takiben arttığı gösterilmiştir (295). Hayvanlar ve *in vitro* modeller üzerinde yapılan deneyler, BDNF'nin granül nöronların hipertrofisine neden olduğunu ve yosunlu lif dallanmasını arttırdığını ortaya koymuştur. Ayrıca, BDNF'nin intrahipokampal infüzyonu, hafif nöbetlere ve yosunlu lif filizlenmesinin gelişmesine neden olmuştur. Bu veriler, altta yatan moleküler yollar bilinmemesine rağmen, temporal lob epilepsideki anormal sinaps gelişiminde BDNF'nin rolünü doğrulamaktadır (296).

Skupien-Jaroszek ve arkadaşlarının yapmış oldukları hayvan çalışmasında, kainat ile indüklenen epilepsi modeli kullanılarak BDNF'yi yeniden konumlandırma ile morfolojik ve klinik epileptik özellikler arasındaki ilişki incelenmiştir. Nükleer periferde *Bdnf* aleli olan çekirdek yüzdesinin, yosunlu lif filizlenmesinin yoğunluğu ile negatif ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu gözlem, BDNF'nin epilepsideki filizlenme olaylarında yer aldığı fikriyle uyumlu olduğunu göstermektedir (296).

BDNF'nin hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerde, nöronlar üzerinde proeksitator ve plastik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (67). Birçok çalışma, nörotrofik faktörlerin, özellikle BDNF ve NGF'nin epilepsi ile yakından bağlantılı olduğu gösterilmiştir (297). Endojen nörotrofik faktörler (NGF ve BDNF gibi) çeşitli nöronal fonksiyonları ve plastisiteyi düzenler ve nöbetlerden sonra ekspresyonları artar (298). Artan NGF ve BDNF seviyeleri, epilepsi ile sonuçlanan anormal deşarja neden olabilir (299). Deneysel epilepsi modellerinde, spesifik BDNF delesyonu veya antagonist BDNF ajanlarının uygulanması epileptogenezini inhibe etmiştir (300). Bununla birlikte, nörotrofik ajanların epilepsideki etkilerinin tartışmalı olduğunu belirtmek gerekir.

Hong ve arkadaşlarının yapmış oldukları klinik bir çalışmada, uzun süre kliniği takip edilen epilepsi hastalarından alınan serumdaki BDNF seviyeleri değerlendirilmiştir (301). Çalışmada, kontrollerde ve epilepsili kişilerde serum BDNF seviyeleri ile ilişkili yaşın değil cinsiyetin önemli bir faktör olduğu ve epilepsili kişilerdeki serum BDNF seviyelerinin kontrollerden farklı olmadığı bulunmuştur. Ayrıca nöbet sıklığı ve epilepsi süresi, diğer faktörlerden bağımsız olarak serum BDNF seviyeleri ile negatif korelasyon olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla BDNF'nin serumdaki konsantrasyonu, epilepsili kişilerde hastalığın ciddiyeti ile ilişkilidir ve ciddiyet için yararlı bir belirteç olabileceği sonucuna varmışlardır (301).

Chen ve arkadaşlarının yaptığı klinik çalışmada, temporal lob epilepsili hastaların serumlarındaki BDNF seviyeleri incelenmiştir (302). Epilepsili hastalar, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde daha düşük serum BDNF seviyelerine sahip oldukları görülmüştür. Bu anlamlılık, özellikle daha sık nöbetleri olan bilateral temporal lob epilepsili alt grupta daha belirgindir. Ayrıca BDNF düzeyleri sol temporal lob, sol talamus ve sağ hipokampus bölgelerinde epilepsi süresi ve fraksiyonel anizotropi ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, serum BDNF seviyelerinin kronik epilepsili hastalarda daha uzun epilepsi süresi, bozulmuş beyaz cevher bütünlüğü ve zayıf bilişsel işlev ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (302).

Sunulan çalışmada ise BDNF gen ekspresyonu açısından hem korteks hem de hipokampus dokusunda tüm gruplar kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu çalışmaya göre BDNF gen ekspresyonu, epilepsinin patogenezinde bu spesifik gruplar arasında farklılık göstermemektedir. BDNF'nin epileptogenezdeki rolü, farklı beyin bölgelerinde veya hücre tiplerinde değişiklik gösterebilir. Diğer çalışmaların sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, BDNF'nin epileptogenezdeki rolü hakkında daha net bir anlayışa ulaşılması için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir. Farklı çalışmaların farklı sonuçlar elde etmesi, epilepsi mekanizmasının karmaşıklığını ve BDNF'nin çok yönlü etkilerini göstermektedir.

5.6 NGF Hakkında Veriler

Deneyssel epilepsi modellerini kullanan birçok araştırma, BDNF veya NGF'nin pro-epileptojenik fonksiyonlarını doğrulamıştır. Status epileptikus başlangıcından sonra hipokampusta NGF seviyelerinin yükselmesi için gereken sürenin 3-4 saat olduğu, ancak BDNF'nin hilus lezyonu nedeniyle oluşan limbik nöbetlerden sonra 1 saat içinde arttığı ve 24 saat içinde ise bazal seviyelere geri döndüğü görülmüştür (303, 304, 305). Adams ve arkadaşları intraventriküler NGF infüzyonunun epileptogenezi hızlandırdığını bildirmişlerdir (306). Başka bir çalışma, artan pro-NGF düzeylerinin (NGF'nin öncüsü) farelerde spontan epileptik benzeri konvülsiyonlara ve nörodejenerasyona neden olduğunu bulunmuştur (307). Aygun ve arkadaşlarının araştırmasında ise, Wistar grubuyla karşılaştırıldığında WAG/Rij grubunda BDNF ve NGF immünoreaktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (308). Aygun ve arkadaşları çalışmalarında, doku örneklerinde belirli proteinleri veya antijenleri lokalize etmek veya ifade düzeylerini belirlemek için kullanılan immunohistokimya yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntem proteinlerin spesifik hücre tipleri veya bölgelerle ilişkisini anlamak için sıklıkla kullanılır. Aygun ve arkadaşları, nörotrofik faktörleri tespit ederken aldıkları kesite bağlı olarak var olan ya da depolanan proteinlerin miktarının az olduğunu tespit etmişlerdir. Gen ekspresyonu ise bir hücrenin belirli genlerin mRNA'larının sentezlenmesi ve protein üretimi yoluyla nasıl çalıştığını ifade eden başka bir moleküler analiz yöntemidir. Bizim çalışmamızda hayvanlara hiçbir şekilde tedavi uygulanmamış olup, sıçanlarda var olan NGF ve BDNF gen ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Akut ve kronik epilepsi modelleri dışarıdan indüklendiği için nöbet esnasında bu nörotrofik faktörlerin arttığı istatistiksel analizlerle doğrulanmıştır.

Sunulan çalışmada, kortekste NGF ekspresyonunun absans epilepsi grubunda ve hipokampusta ise hem akut PTZ hem de kronik PTZ grubunda kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur. Epilepsi, nöronlarda aşırı uyarılma, nöronal hasar ve stresin artmasıyla ilişkili olabilmektedir. Bu patolojik süreçler NGF üretimini artırabilir ve nöronların hasar gördüğü veya stres altında olduğu durumlarda koruyucu bir etkiye sahip olabilir böylece nöronların hayatta kalmasını destekleyebilir (321). Ayrıca, NGF'nin nörotransmitterlerin sentezini ve salınımını etkileyebileceği bilinmektedir. Nöbet

anında artan NGF ekspresyonu, nörotransmitterlerin düzenlenmesinde rol oynayarak epileptik beyindeki nörotransmitter dengesizliklerini de etkileyebilir. Bu bulgular doğrultusunda, NGF'nin epileptogenezin mekanizmasında bir hedef olarak potansiyel bir öneme sahip olabileceğini göstermektedir. Epileptogenez sırasında NGF'nin anlamlılığı yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (306).

Alvim ve arkadaşları yaptığı klinik araştırmada, epilepsi tanılı hastalardan alınan kan örneklerini değerlendirmişlerdir (309). Hastaların plazma düzeylerinin çeşitli sitokinlerle ve nörotrofik faktörlerle ilişkili olduğu ve epilepsi nöbet sıklığını klinikte epilepsi belirtici olarak değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Hastalarda BDNF, NGF ve Nörotrofin-3 plazma seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (309). Başka bir çalışmada, yeni başlayan nöbetleri olan hastalarla kontrol grubu arasında NGF'nin plazma ve BOS seviyeleri açısından benzerlik olduğu bulunmuştur (310).

Güncel bir çalışmada, dirençli epilepsili çocuklarla yapılan çalışmada, serumdaki nörotrofik faktörlerden BDNF ve NGF değerlendirilmiştir. Nöronal uyarılabilirlik üzerinde inhibitör etkileri olan ilaçlarla tedavi edilen refraktör epilepsili çocukların nörotrofik düzeyindeki iyileşmeyi karşılaştırmak için iki nörotrofik indeks, BDNF ve NGF değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre BDNF ve NGF'nin tedavi öncesine göre tedaviden sonra anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (311). Bu sonuçlar, nörotrofik faktörlerin epilepsi tedavisinde potansiyel bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ancak daha fazla çalışma ve klinik araştırma yapılması gerekmektedir.

Kayama ve ekibinin yapmış oldukları bir çalışmada, NGF-TrkA yolu, fosfatidilinositol 3-kinaz ve p38 MAP Kinazın aktiviteleri yoluyla TRPM8 mRNA'yı stabilize ederek TRPM8 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (312). Ayrıca, mRNA stabilizasyonundan bağımsız transkripsiyon sonrası süreçler yoluyla, c-Jun N-terminal kinaz ve Src tirozin kinaz, sırasıyla TRPM8 ekspresyonunun pozitif ve negatif düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. PTEN aktivitesinin, protein TRPM8 ekspresyonunu arttırdığı bulunmuş olup NGF'nin neden olduğu TRPM8 fonksiyonel artışı, kalsiyum görüntüleme ile doğrulanmıştır. NGF, bir hücre fraksiyonlama analizi ve hızlandırılmış floresan mikroskopik inceleme yöntemleriyle, TRPM8'in plazma zarına taşınmasını teşvik etmiştir. Bu

Çalışmanın bulgularına dayanarak, NGF aracılı TRPM8 yukarı regölasyonunda yer alan sinyal yollarına ve bunun normal duruma dönüşüne ilişkin yeni bilgiler sağlamaktadır (312).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada, *Wistar albino* ve WAG/Rij sıçanlarda, farklı deneysel epilepsi modelleri karşılaştırılarak, TRP iyon kanallarına ve nörotrofik faktörlere ait gen ekspresyonlarının düzeylerine yönelik araştırma yapılmıştır. Bu doğrultuda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Akut PTZ grubunda hayvanlara tek doz PTZ (50 mg/kg) intraperitoneal olarak enjekte edildikten sonra 1-5 dk içinde epileptik dikenler ve diken-dalga kompleksleri görüldü. Epileptiform aktivite 60 dk'lık kayıt boyunca devam etti. Akut PTZ grubunun ECoG verileri ortalama $\pm$ S.H. olarak şu şekilde tespit edildi: Toplam DDD nöbet sayısı: 332,75 $\pm$ 126,88; Toplam DDD spike sayısı: 6129,88 $\pm$ 3721,67; Toplam DDD spike süresi: 960,37 $\pm$ 290,56; DDD süre ortalaması (sn): 3,21 $\pm$ 0,61; DDD amplitüd ortalaması (mV): 0,34 $\pm$ 0,11; Latans (sn): 169,63 $\pm$ 23,29; Nöbet başına spike ortalaması: 19,63 $\pm$ 9,12; Nöbet başına süre (sn) ortalaması: 0,30 $\pm$ 0,43.
2. Kronik PTZ (tutuşma) modelinde, hayvanların tutuşma davranışları gözlenene kadar haftada üç kez PTZ (35 mg/kg) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Epileptiform aktivite 60 dk'lık kayıt boyunca devam etti. Kronik PTZ grubunun ECoG verileri ortalama $\pm$ S.H. olarak şu şekilde tespit edildi: Toplam DDD nöbet sayısı: 252 $\pm$ 102,49; Toplam DDD spike sayısı: 5479,13 $\pm$ 2495,55; Toplam DDD spike süresi: 865 $\pm$ 182; DDD süre ortalaması (sn): 3,91 $\pm$ 0,99; DDD amplitüd ortalaması (mV): 0,48 $\pm$ 0,22; Nöbet başına spike ortalaması: 24,87 $\pm$ 14,28; Nöbet başına süre (sn) ortalaması: 0,19 $\pm$ 0,09.
3. Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubunda görülen epileptiform aktivite kendiliğinden oluşmaktadır. Hayvanların epileptiform aktivite kayıtları 60 dakika boyunca alındı. Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubunun ECoG verileri ortalama $\pm$ S.H. olarak şu şekilde tespit edildi: Toplam DDD nöbet sayısı: 50,50 $\pm$ 16,39; Toplam DDD spike sayısı: 3092,75 $\pm$ 1794,97; Toplam DDD spike süresi: 396,93 $\pm$ 169,70; DDD süre ortalaması (sn): 7,09 $\pm$ 1,46; DDD amplitüd ortalaması (mV): 0,44 $\pm$ 0,10; Nöbet başına spike ortalaması: 58,77 $\pm$ 17,00; Nöbet başına süre (sn) ortalaması: 0,14 $\pm$ 0,02.

4. Çalışmamızda incelenen genlerin amplifikasyon ürünleri, erime eğrisi analizi yoluyla incelenmiş ve genlerin ekspresyon düzeylerinin başarılı bir şekilde gen ifadesini yansıttığı gösterilmiştir.
5. Akut PTZ grubu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hipokampus dokusunda TRPM2 gen ekspresyon seviyesinin 0,44 kat azaldığı, TRPM8 gen ekspresyon seviyesinin 0,67 kat azaldığı, NGF gen ekspresyon seviyesinin 4,18 kat arttığı bulunmuştur. Korteks dokusunda ise Akut PTZ grubu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.
6. Kronik PTZ (tutuşma) grubu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hipokampus dokusunda TRPM2 gen ekspresyon seviyesinin 0,34 kat azaldığı, TRPM8 gen ekspresyon seviyesinin 0,51 kat azaldığı, NGF gen ekspresyon seviyesinin 4,03 kat arttığı bulunmuştur. Korteks dokusunda ise Kronik PTZ grubu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.
7. Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hipokampus dokusunda TRPM3 gen ekspresyon seviyesinin 1,77 kat arttığı, TRPV1 gen ekspresyon seviyesinin 2,90 kat arttığı bulunmuştur. Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, korteks dokusunda TRPM3 gen ekspresyon seviyesinin 1,53 kat arttığı, TRPM8 gen ekspresyon seviyesinin 1,98 kat arttığı, TRPV1 gen ekspresyon seviyesinin 2,12 kat arttığı, NGF gen ekspresyon seviyesinin 1,12 kat arttığı bulunmuştur.
8. Korteks dokularından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde TRPM2 ve BDNF gen ekspresyonunda Akut PTZ, Kronik PTZ (tutuşma) ve Absans epilepsili WAG/Rij sıçan gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p>0,05$). Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubu Kontrol grubuyla kıyaslandığında ise TRPM3, TRPM8, TRPV1, NGF gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p<0,05$).
9. Hipokampus dokularından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde BDNF gen ekspresyonunda deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p>0,05$). Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubu Kontrol grubuyla kıyaslandığında ise TRPM3 ve TRPV1 gen ekspresyon seviyeleri

anlamli olarak artti ($p<0,05$). TRPM2, TRPM8 gen ekspresyon seviyesi ise Kontrol grubuna kiyasla Akut PTZ ve Kronik PTZ gruplarında anlamli bir şekilde azaldi ($p<0,05$). NGF gen ekspresyon seviyesi ise Kontrol grubuna kiyasla Akut PTZ ve Kronik PTZ gruplarında anlamli bir şekilde artti ($p<0,05$).

10. Akut PTZ ve Kronik PTZ grupları gen ifadeleri açısından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında benzer olduğu görülmüştür. Bu benzerlik, Akut PTZ ve Kronik PTZ'nin benzer moleküler mekanizmalara sahip olabileceğini veya gen ifadelerinde ortak yolların etkilendiğini gösterebilir. Örneğin, her iki grup da PTZ'nin neden olduğu nörotransmitter düzenlemesine benzer bir yanıt gösterebilir veya aynı adaptif yanıtların tetiklendiği genetik mekanizmalara sahip olabilirler.
11. Akut PTZ, Kronik PTZ (tutuşma) ve Absans epilepsili WAG/Rij sıçan gruplarında hem korteks hem de hipokampus dokusunda TRP iyon kanalları ve NGF gen ifadesinin etkilendiği düşünülmektedir. Bu etkileşim, epilepsi mekanizmasının anlaşılmasında ve epilepsi tedavisi üzerinde çalışmalar yapılırken dikkate alınması gereken önemli bir bulgudur.
12. Akut ve Kronik PTZ gruplarında korteksde TRP iyon kanalları ile büyüme faktörlerinin gen ifade seviyelerinin etkilenmediği sadece hipokampusta TRPM2 ve TRPM8 gen ifadelerinin azaldığı, NGF gen ifadesinin ise arttığı bulunmuştur. Absans epilepsili WAG/Rij sıçan grubunda ise kortekste TRPM3 TRPM8, TRPV1 ve NGF gen ifadesinin arttığı, hipokampusta TRPM3 ve TRPV1 gen ifadesinin arttığı bulunmuştur.
13. Farklı epilepsi modellerinde gen ifadeleri farklılıklar gösterebilmektedir. Çalışmamızda da deneysel akut epilepsi, deneysel kronik epilepsi ve doğuştan epilepsiye sahip hayvanlar olan genetik epilepsi modellerinde TRP iyon kanallarında ve nörotrofik faktörlerde etkili olan genlerin ekspresyonlarındaki farklılığın bağımsız bir mekanizma ile gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Bunun nedeni kanal sayısı, bu genlerin yoğunluğu ve yerleşimi olabilir. Ancak sunulan çalışma problemin bütününe açıklamaya yetmemektedir.
14. İleride yapılacak çalışmalarla; belirtilen iyon kanallarının agonistleri ve antagonistleriyle farklı kombinasyonların oluşturulmasına, elde edilecek

bulguların geliştirilmesine, histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalara ihtiyaç vardır.

15. Gelecekte yapılacak hayvan modelleri ve klinik çalışmalar TRP iyon kanallarının ve nörotrofik faktörlerin epileptogenezdeki rollerinin anlaşılmasına önemli katkılar sağlayabilir.



7. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.)

1. Trinka E, Kwan P, Lee B, Dash A. Epilepsy in Asia: Disease burden, management barriers, and challenges. *Epilepsia*. 2019;60 Suppl 1:7-21.
2. Devinsky O, Vezzani A, O'Brien TJ, Jette N, Scheffer IE, de Curtis M, et. al. Epilepsy. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18024.
3. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-21.
4. Gong XW, Li JB, Lu QC, Liang PJ, Zhang PM. Effective connectivity of hippocampal neural network and its alteration in Mg²⁺-free epilepsy model. *PLoS One*. 2014;9(3):e92961.
5. Baykan B, Gürses C, Gökyiğit A. *Epilepsi*. 2. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.
6. Dibbens LM, Harkin LA, Richards M, Hodgson BL, Clarke AL, Petrou S, et al. The role of neuronal GABA(A) receptor subunit mutations in idiopathic generalized epilepsies. *Neurosci Lett*. 2009;453(3):162-65.
7. Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci*. 2004;27(5):262-69.
8. Wang ZJ, Heinbockel T. Essential Oils and Their Constituents Targeting the GABAergic System and Sodium Channels as Treatment of Neurological Diseases. *Molecules*. 2018;23(5):1061.
9. Zandi N, Zaniani NR, Moghimi A, Roohbakhsh A. Protective effects of M8-B, a TRPM8 antagonist, on febrile- and pentylenetetrazol-induced seizures. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2019;79(1):86-91.
10. Wallace R. Mutations in GABA-receptor genes cause human epilepsy. *Lancet Neurol*. 2002;1(4):212.
11. Bambal G, Çakıl D, Ekic F. Epilepsi Oluşum Mekanizmaları. *Konuralp Tıp Dergisi*. 2011;3(3):42-5.
12. Madeja M, Margineanu DG, Gorji A, Siep E, Boerrigter P, Klitgaard H, et. al. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology*. 2003;45(5):661-71.
13. Stafstrom CE. Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(8):983-1004.
14. Hixson KM, Cogswell M, Brooks-Kayal AR, Russek SJ. Evidence for a non-canonical JAK/STAT signaling pathway in the synthesis of the brain's major ion channels and neurotransmitter receptors. *BMC Genomics*. 2019;20(1):677.
15. Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, et al. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci*. 2001;4(1):52-62.
16. Celesia GG. Disorders of membrane channels or channelopathies. *Clin Neurophysiol*. 2001;112(1):2-18.
17. Sjöström PJ, Rancz EA, Roth A, Häusser M. Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev*. 2008;88(2):769-840.

18. Jaworski T. Control of neuronal excitability by GSK-3 β : Epilepsy and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(9):118745.
19. Hwang SM, Lee JY, Park CK, Kim YH. The Role of TRP Channels and PMCA in Brain Disorders: Intracellular Calcium and pH Homeostasis. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:584388.
20. Akay A, Sümer-Turanlıgil N, Uyanıkgil Y. İyon kanalları ve epilepsi patojenezindeki rolleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.* 2010;19(2):72-84.
21. Lerche H, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Ion channels and epilepsy. *Am J Med Genet.* 2001;106(2):146-59.
22. Nazıroğlu M. Epilepsi nörobiyolojisinde TRPM2 katyon kanallarının rolünün sıçan hipokampus sinir hücrelerinde araştırılması [Doktora Tezi]. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2018.
23. Clare JJ. Targeting ion channels for drug discovery. *Discov Med.* 2010;9(46):253-60.
24. Kawamoto EM, Vivar C, Camandola S. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Front Pharmacol.* 2012;3:61.
25. Bezprozvanny IB. Calcium signaling and neurodegeneration. *Acta Naturae.* 2010;2(1):72-82.
26. Kumar P, Kumar D, Jha SK, Jha NK, Ambasta RK. Ion Channels in Neurological Disorders. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2016;103:97-136.
27. Popugaeva E, Pchitskaya E, Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity? *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(4):998-1004.
28. Harguindey S, Polo Orozco J, Alfarouk KO, Devesa J. Hydrogen Ion Dynamics of Cancer and a New Molecular, Biochemical and Metabolic Approach to the Etiopathogenesis and Treatment of Brain Malignancies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17):4278.
29. Hong C, Jeong B, Park HJ, Chung JY, Lee JE, Kim J, et al. TRP Channels as Emerging Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases. *Front Physiol.* 2020;11:238.
30. Thapak P, Vaidya B, Joshi HC, Singh JN, Sharma SS. Therapeutic potential of pharmacological agents targeting TRP channels in CNS disorders. *Pharmacol Res.* 2020;159:105026.
31. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003;426(6966):517-24.
32. Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(8):601-20.
33. Nilius B. Transient receptor potential TRP channels as therapeutic drug targets: next round! *Curr Top Med Chem.* 2013;13(3):244-46.
34. Morelli MB, Amantini C, Liberati S, Santoni M, Nabissi M. TRP channels: new potential therapeutic approaches in CNS neuropathies. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013;12(2):274-93.
35. Preti D, Szallasi A, Patacchini R. TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2012;22(6):663-95.
36. Skryma R, Prevarskaya N, Gkika D, Shuba Y. From urgency to frequency: facts and controversies of TRPs in the lower urinary tract. *Nat Rev Urol.* 2011;8(11):617-30.
37. Holzer P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharmacol Ther.* 2011;131(1):142-70.

38. Watanabe H, Iino K, Ohba T, Ito H. Possible involvement of TRP channels in cardiac hypertrophy and arrhythmia. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(3):283-94.
39. Smith PK, Nilius B. Transient receptor potentials (TRPs) and anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13(1):93-100.
40. Zhu G, Gulsvik A, Bakke P, Ghatta S, Anderson W, Lomas DA, et al. Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mol Genet*. 2009;18(11):2053-62.
41. Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):381-404.
42. Kaneko Y, Szallasi A. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol*. 2014;171(10):2474-507.
43. Pingle SC, Matta JA, Ahern GP. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(179):155-71.
44. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature*. 2001;411(6840):957-62.
45. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(5):357-72.
46. Jeske NA, Patwardhan AM, Ruparel NB, Akopian AN, Shapiro MS, Henry MA. A-kinase anchoring protein 150 controls protein kinase C-mediated phosphorylation and sensitization of TRPV1. *Pain*. 2009;146(3):301-7.
47. Simon SA, Nicoleis MAL. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. In: Liedtke WB, Heller S, editors. *CRC Press/Taylor & Francis*; 2007.
48. Goswami C. TRP-mediated cytoskeletal reorganization: implications for disease and drug development. In: Szallasi A, Bíró T, editors. *TRP Channels in Drug Discovery. Methods in Pharmacology and Toxicology, Springer Protocols*. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Humana Press/Springer; 2012. pp. 13–39.
49. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, et al. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*. 1998;58(7):1515-20.
50. Silverman HA, Chen A, Kravatz NL, Chavan SS, Chang EH. Involvement of Neural Transient Receptor Potential Channels in Peripheral Inflammation. *Front Immunol*. 2020;11:590261.
51. Brederson JD, Kym PR, Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol*. 2013;716(1-3):61-76.
52. Jimenez I, Prado Y, Marchant F, Otero C, Eltit F, Cabello-Verrugio C, et al. TRPM Channels in Human Diseases. *Cells*. 2020;9(12):2604.
53. Vennekens R, Menigoz A, Nilius B. TRPs in the Brain. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2012;163:27-64.
54. Miller BA, Zhang W. TRP channels as mediators of oxidative stress. *Adv Exp Med Biol*. 2011;704:531-44.
55. Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol*. 2005;493(4):596-606.

56. de Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*. 2011;163(7):1479-94.
57. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*. 2007;448(7150):204-8.
58. Calvo RR, Meegalla SK, Parks DJ, Parsons WH, Ballentine SK, Lubin ML, et al. Discovery of vinylcycloalkyl-substituted benzimidazole TRPM8 antagonists effective in the treatment of cold allodynia. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(5):1903-7.
59. Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, et al. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*. 2007;54(3):379-86.
60. Caspani O, Zurborg S, Labuz D, Heppenstall PA. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS One*. 2009;4(10):e7383.
61. Lashinger ES, Steinginga MS, Hieble JP, Leon LA, Gardner SD, Nagilla R, et al. AMTB, a TRPM8 channel blocker: evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(3):F803-10.
62. Yudin Y, Rohacs T. Regulation of TRPM8 channel activity. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;353(1-2):68-74.
63. Rohacs T, Thyagarajan B, Lukacs V. Phospholipase C mediated modulation of TRPV1 channels. *Mol Neurobiol*. 2008;37(2-3):153-63.
64. Linte RM, Ciobanu C, Reid G, Babes A. Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurones by inflammatory mediators. *Exp Brain Res*. 2007;178(1):89-98.
65. Zakharian E, Cao C, Rohacs T. Gating of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers. *J Neurosci*. 2010;30(37):12526-34.
66. Sawamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S. Neurobiology of TRP Channels. Chapter 16: TRP Channels in the Brain. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC PRes/Taylor&Francis; 2017.
67. Iughetti L, Lucaccioni L, Fugetto F, Predieri B, Berardi A, Ferrari F. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. *Neuropeptides*. 2018;72:23-29.
68. Parpura V, Zorec R. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev*. 2010;63(1-2):83-92.
69. Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep*. 2013;1(2):167-76.
70. LaFrance WC, Leaver K, Stopa EG, Papandonatos GD, Blum AS. Decreased serum BDNF levels in patients with epileptic and psychogenic nonepileptic seizures. *Neurology*. 2010;75(14):1285-91.
71. Hou X, Wang X, Zhang L. Conditional downregulation of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B blocks epileptogenesis in the human temporal lobe epilepsy hippocampus. *Neurol India*. 2010;58(1):29-34.
72. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci*. 2001;24(1):47-53.
73. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(4):299-309.

74. Scharfman HE. Functional implications of seizure-induced neurogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2004;548:192-212.
75. Dhir A. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci.* 2012;Chapter 9:Unit9.37.
76. Hansen SL, Sperling BB, Sánchez C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylentetrazole-kindled mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004;28(1):105-13.
77. Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298(3):986-95.
78. Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, Willmore LJ. Role of glutamate and GABA transporters in development of pentylentetrazol-kindling. *Neurochem Res.* 2009;34(7):1324-31.
79. Marangoz C. Deneysel Epilepsi Modelleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 1997;14(3):147-86.
80. da Silva LF, Pereira P, Elisabetsky E. A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *Gen Pharmacol.* 1998;31(1):47-50.
81. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005;46(4):470-72.
82. Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology.* 2020;54(2):185-91.
83. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55(4):475-82.
84. Saxena S, Li S. Defeating epilepsy: A global public health commitment. *Epilepsia Open.* 2017;2(2):153-5.
85. Alpcan A, Bayar Muluk N, Inal M, Kömürcü Erkmén S, Şencan Z. Peripheral and central smell regions in children with epilepsy: An MRI evaluation. *J Clin Neurosci.* 2022;95:99-105.
86. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology.* 2017;88(3):296-303.
87. Neligan A, Hauser WA, Sander JW. The epidemiology of the epilepsies. *Handb Clin Neurol.* 2012;107:113-33.
88. Bell GS, Neligan A, Sander JW. An unknown quantity--the worldwide prevalence of epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55(7):958-62.
89. Singh A, Trevick S. The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurol Clin.* 2016;34(4):837-47.
90. Yuen AWC, Keezer MR, Sander JW. Epilepsy is a neurological and a systemic disorder. *Epilepsy Behav.* 2018;78:57-61.
91. Yamamoto T. Recent Advancement of Technologies and the Transition to New Concepts in Epilepsy Surgery. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2020;60(12):581-93.
92. Yang L, Wang Y, Chen Z. Central histaminergic signalling, neural excitability and epilepsy. *Br J Pharmacol.* 2022;179(1):3-22.
93. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet.*

2019;393(10172):689-701.

94. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. *N Engl J Med*. 2003;349(13):1257-66.
95. Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, Kullu I, Angelopoulou E, Paudel YN. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. *Life Sci*. 2021;265:118826.
96. Kim LG, Johnson TL, Marson AG, Chadwick DW. Prediction of risk of seizure recurrence after a single seizure and early epilepsy: further results from the MESS trial. *Lancet Neurol*. 2006;5(4):317-22.
97. Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(12):1557-72.
98. "ILAE" EpilepsyDiagnosis.org/Diagnostic Manuel. [Internet]. [cited 2023 May 25]. Available from: <https://www.epilepsydiagnosis.org/>
99. Fisher RS, Cross JH, D'Souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*. 2017;58(4):531-42.
100. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1985;26(3):268-78.
101. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1989;30(4):389-99.
102. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-85.
103. Guerrini R, Pellacani S. Benign childhood focal epilepsies. *Epilepsia*. 2012;53 Suppl 4:9-18.
104. Beaumanoir A, Nahory A. Les epilepsies benignes partielles: 11 cas d'epilepsie partielle frontale a evolution favorable. *Revue d'Electroencephalographie et de Neurophysiologie Clinique*. 1983;13(3):207-11.
105. Berkovic SF, McIntosh A, Howell RA, Mitchell A, Sheffield LJ, Hopper JL. Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann Neurol*. 1996;40(2):227-35.
106. Sveinbjornsdottir S, Duncan JS. Parietal and occipital lobe epilepsy: a review. *Epilepsia*. 1993;34(3):493-521.
107. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res*. 2018;139:73-9.
108. Pack AM. Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *Continuum (Minneap Minn)*. 2019;25(2):306-21.
109. Bhasin H, Sharma S. The New International League Against Epilepsy (ILAE) 2017 Classification of Seizures and Epilepsy: What pediatricians need to know! *Indian J Pediatr*. 2019;86(7):569-71.
110. Meldrum BS, Bruton CJ. Epilepsy. In: *Greenfield's Neuropathology*. New York: Oxford University Press; 1992.
111. Pitkänen A, Engel J. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics*. 2014;11(2):231-41.
112. Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and

- networks. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(5):371-82.
113. Pinault D, O'Brien TJ. Cellular and network mechanisms of genetically-determined absence seizures. *Thalamus Relat Syst.* 2005;3(3):181-203.
 114. Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orbán G, Errington AC, Lorincz ML, et al. Enhanced tonic GABAA inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med.* 2009;15(12):1392-98.
 115. Galanopoulou AS. GABA(A) receptors in normal development and seizures: friends or foes? *Curr Neuroparmacol.* 2008;6(1):1-20.
 116. Helbig I, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet Neurol.* 2008;7(3):231-45.
 117. O'Brien TJO. Localization-related epilepsies due to specific lesions. *Epilepsy: a comprehensive textbook.* 1997;2433-46.
 118. Berg AT, Mathern GW, Bronen RA, Fulbright RK, DiMario F, Testa FM, et al. Frequency, prognosis and surgical treatment of structural abnormalities seen with magnetic resonance imaging in childhood epilepsy. *Brain.* 2009;132(Pt 10):2785-97.
 119. Scheffer IE, Heron SE, Regan BM, Mandelstam S, Crompton DE, Hodgson BL, et al. Mutations in mammalian target of rapamycin regulator DEPDC5 cause focal epilepsy with brain malformations. *Ann Neurol.* 2014;75(5):782-87.
 120. Perucca P, Scheffer IE, Harvey AS, James PA, Lunke S, Thorne N, et al. Real-world utility of whole exome sequencing with targeted gene analysis for focal epilepsy. *Epilepsy Res.* 2017;131:1-8.
 121. Ricos MG, Hodgson BL, Pippucci T, Saidin A, Ong YS, Heron SE, et al. Mutations in the mammalian target of rapamycin pathway regulators NPRL2 and NPRL3 cause focal epilepsy. *Ann Neurol.* 2016;79(1):120-31.
 122. Fisher RS. Cellular mechanisms of the epilepsies. *Epilepsy.* London: Chapman & Hall, 1995;35-58.
 123. Miles R, Blaesse P, Huberfeld G, Wittner L, Kaila K. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, Chapter 45: Chloride Homeostasis and GABA Signaling in Temporal Lobe Epilepsy. 4th ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
 124. Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Cresto N, et al. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med.* 2014;6(244):244ra89.
 125. Chipaux M, Charpier S, Polack PO. Chloride-mediated inhibition of the ictogenic neurones initiating genetically-determined absence seizures. *Neuroscience.* 2011;192:642-51.
 126. Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature.* 1995;378(6552):75-8.
 127. Merlo D, Mollinari C, Inaba Y, Cardinale A, Rinaldi AM, D'Antuono M, et al. Reduced GABAB receptor subunit expression and paired-pulse depression in a genetic model of absence seizures. *Neurobiol Dis.* 2007;25(3):631-41.
 128. Inaba Y, D'Antuono M, Bertazzoni G, Biagini G, Avoli M. Diminished presynaptic GABA(B) receptor function in the neocortex of a genetic model of absence epilepsy. *Neurosignals.* 2009;17(2):121-31.
 129. Babb TL. Pathological findings in epilepsy. Surgical treatment of the epilepsies. 1987;511-40.
 130. Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH. Temporal lobe

- volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 1984;25(6):729-40.
131. Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol*. 2004;73(1):1-60.
 132. Babb TL. Pathological substrates of epilepsy. *The treatment of epilepsy: principles and practice*. 1993;55-70.
 133. Vivash L, Tostevin A, Liu DS, Dalic L, Dedeurwaerdere S, Hicks RJ, et al. Changes in hippocampal GABAA/cBZR density during limbic epileptogenesis: relationship to cell loss and mossy fibre sprouting. *Neurobiol Dis*. 2011;41(2):227-36.
 134. Borges K, Gearing M, McDermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, et al. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol*. 2003;182(1):21-34.
 135. Kobow K, Auvin S, Jensen F, Löscher W, Mody I, Potschka H, et al. Finding a better drug for epilepsy: antiepileptogenesis targets. *Epilepsia*. 2012;53(11):1868-76.
 136. Pitkänen A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data. *Neurology*. 2002;59(9 Suppl 5):S27-33.
 137. Williams-Karnesky RL, Sandau US, Lusardi TA, Lytle NK, Farrell JM, Pritchard EM, et al. Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3552-63.
 138. Machnes ZM, Huang TC, Chang PK, Gill R, Reist N, Dezsai G, et al. DNA methylation mediates persistent epileptiform activity in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013;8(10):e76299.
 139. Xu Y, Nguyen D, Mohamed A, Carcel C, Li Q, Kutlubaev MA, et al. Frequency of a false positive diagnosis of epilepsy: A systematic review of observational studies. *Seizure*. 2016;41:167-74.
 140. van Dijk JG, Thijs RD, Benditt DG, Wieling W. A guide to disorders causing transient loss of consciousness: focus on syncope. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(8):438-48.
 141. “National Institute for Health and Care Excellence” Epilepsies in children, young people and adults. [Internet]. [cited 2023 May 25]. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng217>
 142. Maganti RK, Rutecki P. EEG and epilepsy monitoring. *Continuum (Minneap Minn)*. 2013;19(3 Epilepsy):598-622.
 143. Bronen RA, Fulbright RK, Spencer DD, Spencer SS, Kim JH, Lange RC, et al. Refractory epilepsy: comparison of MR imaging, CT, and histopathologic findings in 117 patients. *Radiology*. 1996;201(1):97-105.
 144. Cendes F. Neuroimaging in investigation of patients with epilepsy. *Continuum (Minneap Minn)*. 2013;19(3 Epilepsy):623-42.
 145. Wyllie E. Wyllie’s treatment of epilepsy: principles and practice. In: Cascino GD, Gidal BE, Goodkin HP, editors. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
 146. Poduri A, Sheidley BR, Shostak S, Ottman R. Genetic testing in the epilepsies-developments and dilemmas. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(5):293-99.
 147. Morris GL, Gloss D, Buchhalter J, Mack KJ, Nickels K, Harden C. Evidence-based guideline update: vagus nerve stimulation for the treatment of epilepsy: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2013;81(16):1453-59.
 148. Salanova V, Witt T, Worth R, Henry TR, Gross RE, Nazzaro JM, et al. Long-term efficacy and safety of thalamic stimulation for drug-resistant partial epilepsy. *Neurology*.

2015;84(10):1017-25.

149. Bergey GK, Morrell MJ, Mizrahi EM, Goldman A, King-Stephens D, Nair D, et al. Long-term treatment with responsive brain stimulation in adults with refractory partial seizures. *Neurology*. 2015;84(8):810-17.
150. Jankovic J, Mazziotta JC, Pomeroy SL, Newman NJ. *Bradley's Neurology in Clinical Practice E-Book*. 8th. Elsevier Health Sciences; 2021.
151. Schevon CA, Ng SK, Cappell J, Goodman RR, McKhann G Jr, Waziri A, et al. Microphysiology of epileptiform activity in human neocortex. *J Clin Neurophysiol*. 2008;25(6):321-30.
152. Acharya UR, Sree SV, Swapna G, Martis RJ, Suri JS. Automated EEG analysis of epilepsy: A review. *Knowledge-Based Systems*. 2013;45:147-65.
153. "Laboratory of Functional Neuroscience and Pathologies (LNFP)" Detection of EEG transients in neonates. [Internet]. [cited 2023 May 25]. Available from: <https://www.upicardie.fr/ressources-lnfp/detection-of-eeeg-transients-in-neonates/>
154. Raedt R, Van Dycke A, Van Melkebeke D, De Smedt T, Claeys P, Wyckhuys T, et al. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurol Scand*. 2009;119(5):293-303.
155. Faure JB, Marques-Carneiro JE, Akimana G, Cosquer B, Ferrandon A, Herbeaux K, et al. Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(5):644-53.
156. Ni H, Li C, Tao LY, Cen JN. Physical exercise improves learning by modulating hippocampal mossy fiber sprouting and related gene expression in a developmental rat model of penicillin-induced recurrent epilepticus. *Toxicol Lett*. 2009;191(1):26-32.
157. Calais JB, Valvassori SS, Resende WR, Feier G, Athié MC, Ribeiro S, et al. Long-term decrease in immediate early gene expression after electroconvulsive seizures. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013;120(2):259-66.
158. Sloan DM, Zhang D, Bertram EH. Increased GABAergic inhibition in the midline thalamus affects signaling and seizure spread in the hippocampus-prefrontal cortex pathway. *Epilepsia*. 2011;52(3):523-30.
159. Kotloski R, McNamara JO. Reduction of TrkB expression de novo in the adult mouse impairs epileptogenesis in the kindling model. *Hippocampus*. 2010;20(6):713-23.
160. Kinboshi M, Shimizu S, Mashimo T, Serikawa T, Ito H, Ikeda A, et al. Down-Regulation of Astrocytic Kir4.1 Channels during the Audiogenic Epileptogenesis in Leucine-Rich Glioma-Inactivated 1 (Lgi1) Mutant Rats. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1013.
161. Alpdogan S, Neumaier F, Hescheler J, Albanna W, Schneider T. experimentally induced convulsive seizures are modulated in part by zinc ions through the pharmacoresistant Cav2.3 calcium channel. *Cell Physiol Biochem*. 2020;54(2):180-194.
162. Depaulis A, Charpier S. Pathophysiology of absence epilepsy: Insights from genetic models. *Neurosci Lett*. 2018;667:53-65.
163. Peeters BW, Kerbusch JM, Coenen AM, Vossen JM, van Luijtelaar EL. Genetics of spike-wave discharges in the electroencephalogram (EEG) of the WAG/Rij inbred rat strain: a classical mendelian crossbreeding study. *Behav Genet*. 1992;22(3):361-68.
164. Gauguier D, van Luijtelaar G, Bihoreau MT, Wilder SP, Godfrey RF, Vossen J, et al. Chromosomal mapping of genetic loci controlling absence epilepsy phenotypes in the WAG/Rij rat. *Epilepsia*. 2004;45(8):908-15.

165. Liang J, Zhang Y, Wang J, Pan H, Wu H, Xu K, et. al. New variants in the CACNA1H gene identified in childhood absence epilepsy. *Neurosci Lett*. 2006;406(1-2):27-32.
166. Hughes JR. Absence seizures: a review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behav*. 2009;15(4):404-12.
167. Chioza B, Everett K, Aschauer H, Brouwer O, Callenbach P, Covanis A, et. al. Evaluation of CACNA1H in European patients with childhood absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 2006;69(2):177-81.
168. Powell KL, Cain SM, Ng C, Sirdesai S, David LS, Kyi M, et. al. A Cav3.2 T-type calcium channel point mutation has splice-variant-specific effects on function and segregates with seizure expression in a polygenic rat model of absence epilepsy. *J Neurosci*. 2009;29(2):371-80.
169. Midzyanovskaya IS. Absence and mixed forms of epilepsy in WAG/Rij rats: characteristics and brain aminergic modulations. PhD thesis, NICI; 2006. Nijmegen: Printpartners Ipskamp.
170. Midzyanovskaya IS, Kuznetsova GD, van Luijtelaar EL, van Rijn CM, Tuomisto L, Macdonald E. The brain 5HTergic response to an acute sound stress in rats with generalized (absence and audiogenic) epilepsy. *Brain Res Bull*. 2006;69(6):631-38.
171. de Bruin NM, van Luijtelaar EL, Cools AR, Ellenbroek BA. Dopamine characteristics in rat genotypes with distinct susceptibility to epileptic activity: apomorphine-induced stereotyped gnawing and novelty/amphetamine-induced locomotor stimulation. *Behav Pharmacol*. 2001;12(6-7):517-25.
172. Birioukova LM, Midzyanovskaya IS, Lensu S, Tuomisto L, van Luijtelaar G. Distribution of D1-like and D2-like dopamine receptors in the brain of genetic epileptic WAG/Rij rats. *Epilepsy Res*. 2005;63(2-3):89-96.
173. Sarkisova K, van Luijtelaar G. The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression [corrected]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(4):854-76.
174. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*. 1969;224(5216):285-87.
175. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989;2(4):1313-23.
176. Takada Y, Numata T, Mori Y. Targeting TRPs in neurodegenerative disorders. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(3):322-34.
177. Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev*. 2014;66(3):676-814.
178. Lee K, Jo YY, Chung G, Jung JH, Kim YH, Park CK. Functional Importance of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Neurological Disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:611773.
179. Koivisto AP, Belvisi MG, Gaudet R, Szallasi A. Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(1):41-59.
180. Zhao S, Rohacs T. The newest TRP channelopathy: Gain of function TRPM3 mutations cause epilepsy and intellectual disability. *Channels (Austin)*. 2021;15(1):386-97.
181. Wang R, Tu S, Zhang J, Shao A. Roles of TRP Channels in Neurological Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:7289194.
182. Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, et al. Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature

- affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(17):6745-50.
183. Mittermeier L, Demirkhanyan L, Stadlbauer B, Breit A, Recordati C, Hilgendorff A, et al. TRPM7 is the central gatekeeper of intestinal mineral absorption essential for postnatal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(10):4706-15.
 184. McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002;416(6876):52-8.
 185. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 2002;108(5):705-15.
 186. Cao E. Structural mechanisms of transient receptor potential ion channels. *J Gen Physiol*. 2020;152(3):e201811998.
 187. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):165-217.
 188. Benítez-Angeles M, Morales-Lázaro SL, Juárez-González E, Rosenbaum T. TRPV1: Structure, Endogenous Agonists, and Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3421.
 189. Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem*. 2018;87:141-65.
 190. Yang F, Vu S, Yarov-Yarovoy V, Zheng J. Rational design and validation of a vanilloid-sensitive TRPV2 ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(26):E3657-66.
 191. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24.
 192. Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell*. 2002;108(3):421-30.
 193. Mishra SK, Tisel SM, Orestes P, Bhangoo SK, Hoon MA. TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. *EMBO J*. 2011;30(3):582-93.
 194. Laursen WJ, Schneider ER, Merriman DK, Leal B, Chaves J, Carvalho C, et al. Brain expression of inflammatory mediators in mesial temporal lobe epilepsy patients. *Journal of neuroimmunology*. 2017;313:82-8.
 195. Laursen WJ, Anderson EO, Hoffstaetter LJ, Bagriantsev SN, Gracheva EO. Species-specific temperature sensitivity of TRPA1. *Temperature (Austin)*. 2015;2(2):214-26.
 196. Huang Y, Fliegert R, Guse AH, Lü W, Du J. A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell Calcium*. 2020;85:102111.
 197. Belrose JC, Jackson MF. TRPM2: a candidate therapeutic target for treating neurological diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(5):722-32.
 198. Sita G, Hrelia P, Graziosi A, Ravegnini G, Morroni F. TRPM2 in the Brain: Role in Health and Disease. *Cells*. 2018;7(7):82.
 199. Zheng Q, Zhu T, Hu H, Zhao Y, Ying Y, Luo X, et al. TRPM2 ion channel is involved in the aggravation of cognitive impairment and down regulation of epilepsy threshold in pentylenetetrazole-induced kindling mice. *Brain Res Bull*. 2020;155:48-60.
 200. Zsurka G, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *Lancet Neurol*. 2015;14(9):956-66.
 201. Fourgeaud L, Dvorak C, Faouzi M, Starkus J, Sahdeo S, Wang Q, et al. Pharmacology of JNJ-28583113: A novel TRPM2 antagonist. *Eur J Pharmacol*. 2019;853:299-307.
 202. Zhao S, Yudin Y, Rohacs T. Disease-associated mutations in the human TRPM3 render the

- channel overactive via two distinct mechanisms. *Elife*. 2020;9:e55634.
203. Zhao Y, Jiang WJ, Ma L, Lin Y, Wang XB. Voltage-dependent anion channels mediated apoptosis in refractory epilepsy. *Open Med (Wars)*. 2020;15(1):745-53.
 204. Zamudio-Bulcock PA, Everett J, Harteneck C, Valenzuela CF. Activation of steroid-sensitive TRPM3 channels potentiates glutamatergic transmission at cerebellar Purkinje neurons from developing rats. *J Neurochem*. 2011;119(3):474-85.
 205. Dymont DA, Terhal PA, Rustad CF, Tveten K, Griffith C, Jayakar P, et al. De novo substitutions of TRPM3 cause intellectual disability and epilepsy. *Eur J Hum Genet*. 2019;27(10):1611-18.
 206. Van Hoeymissen E, Held K, Nogueira Freitas AC, Janssens A, Voets T, Vriens J. Gain of channel function and modified gating properties in TRPM3 mutants causing intellectual disability and epilepsy. *Elife*. 2020;9:e57190.
 207. McCoy DD, Palkar R, Yang Y, Ongun S, McKemy DD. Cellular permeation of large molecules mediated by TRPM8 channels. *Neurosci Lett*. 2017;639:59-67.
 208. Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel WF, Lander GC, Lee SY. Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science*. 2018;359(6372):237-41.
 209. Shibasaki K, Yamada K, Miwa H, Yanagawa Y, Suzuki M, Tominaga M, et al. Temperature elevation in epileptogenic foci exacerbates epileptic discharge through TRPV4 activation. *Lab Invest*. 2020;100(2):274-84.
 210. Bautista D, Julius D. Fire in the hole: pore dilation of the capsaicin receptor TRPV1. *Nat Neurosci*. 2008;11(5):528-9.
 211. Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature*. 2007;449(7162):607-10.
 212. Christie S, Wittert GA, Li H, Page AJ. Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:420.
 213. Nazıroğlu M. TRPV1 Channel: A Potential Drug Target for Treating Epilepsy. *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(2):239-47.
 214. Ahern GP, Brooks IM, Miyares RL, Wang XB. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci*. 2005;25(21):5109-16.
 215. Ciura S, Liedtke W, Bourque CW. Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: a mechanical process involving TRPV1 but not TRPV4. *J Neurosci*. 2011;31(41):14669-76.
 216. Tai C, Himes D, MacVicar BA. Translocation of TRPC5 channels contributes to cholinergic-induced plateau potential in epilepsy. In *Journal of Neurochemistry*. 2009;109:277-78.
 217. Fu M, Xie Z, Zuo H. TRPV1: a potential target for antiepileptogenesis. *Med Hypotheses*. 2009;73(1):100-2.
 218. Gibson HE, Edwards JG, Page RS, Van Hook MJ, Kauer JA. TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron*. 2008;57(5):746-59.
 219. Tsagareli MG, Nozadze I. An overview on transient receptor potential channels superfamily. *Behav Pharmacol*. 2020;31(5):413-34.
 220. García-Rodríguez C, Bravo-Tobar ID, Duarte Y, Barrio LC, Sáez JC. Contribution of non-selective membrane channels and receptors in epilepsy. *Pharmacol Ther*. 2022;231:107980.
 221. Ramírez-Barrantes R, Cordova C, Poblete H, Muñoz P, Marchant I, Wianny F, et al.

- Perspectives of TRPV1 Function on the Neurogenesis and Neural Plasticity. *Neural Plast.* 2016;2016:1568145.
222. Kim J, Lee S, Kim J, Ham S, Park JHY, Han S, et al. Ca²⁺-permeable TRPV1 pain receptor knockout rescues memory deficits and reduces amyloid- β and tau in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2020;29(2):228-37.
 223. Szolcsányi J. Effect of capsaicin on thermoregulation: an update with new aspects. *Temperature (Austin).* 2015;2(2):277-96.
 224. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999;51(2):159-212.
 225. Yonghak P, Miyata S, Kurganov E. TRPV1 is crucial for thermal homeostasis in the mouse by heat loss behaviors under warm ambient temperature. *Sci Rep.* 2020;10(1):8799.
 226. Garami A, Shimansky YP, Rumbus Z, Vizin RCL, Farkas N, Hegyi J, et al. Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacol Ther.* 2020;208:107474.
 227. Cao Z, Balasubramanian A, Pedersen SE, Romero J, Pautler RG, Marrelli SP. TRPV1-mediated Pharmacological Hypothermia Promotes Improved Functional Recovery Following Ischemic Stroke. *Sci Rep.* 2017;7(1):17685.
 228. Yarmolinsky DA, Peng Y, Pogorzala LA, Rutlin M, Hoon MA, Zuker CS. Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System. *Neuron.* 2016;92(5):1079-92.
 229. Paricio-Montesinos R, Schwaller F, Udhayachandran A, Rau F, Walcher J, Evangelista R, et al. The Sensory Coding of Warm Perception. *Neuron.* 2020;106(5):830-841.e3.
 230. Tóth BI, Szallasi A, Bíró T. Transient receptor potential channels and itch: how deep should we scratch? *Handb Exp Pharmacol.* 2015;226:89-133.
 231. Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3655-60.
 232. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 2012;166(2):510-21.
 233. Duarte Y, Cáceres J, Sepúlveda RV, Arriagada D, Olivares P, Díaz-Franulic I, et al. Novel TRPV1 channel agonists with faster and more potent analgesic properties than capsaicin. *Front Pharmacol.* 2020;11:1040.
 234. Zheng W, Wen H. Heat activation mechanism of TRPV1: New insights from molecular dynamics simulation. *Temperature (Austin).* 2019;6(2):120-31.
 235. Poblete H, Oyarzún I, Olivero P, Comer J, Zuñiga M, Sepulveda RV, et al. Molecular determinants of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) binding to transient receptor potential V1 (TRPV1) channels. *J Biol Chem.* 2015;290(4):2086-98.
 236. Yazici AT, Gianti E, Kasimova MA, Lee BH, Carnevale V, Rohacs T. Dual regulation of TRPV1 channels by phosphatidylinositol via functionally distinct binding sites. *J Biol Chem.* 2021;296:100573.
 237. Yilmaz M, Naziroğlu M, Kutluhan S, Yilmaz N, Yürekli VA, Vural H. Topiramate modulates hippocampus NMDA receptors via brain Ca²⁺ homeostasis in pentylenetetrazol-induced epilepsy of rats. *J Recept Signal Transduct Res.* 2011;31(2):173-9.
 238. Ma Z, Tanis JE, Taruno A, Foskett JK. Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Pflugers Arch.* 2016;468(3):395-403.

239. Zang Z, Li S, Zhang W, Chen X, Zheng D, Shu H, et al. Expression Patterns of TRPC1 in Cortical Lesions from Patients with Focal Cortical Dysplasia. *J Mol Neurosci*. 2015;57(2):265-72.
240. Zhou FW, Roper SN. TRPC3 mediates hyperexcitability and epileptiform activity in immature cortex and experimental cortical dysplasia. *J Neurophysiol*. 2014;111(6):1227-37.
241. Phelan KD, Shwe UT, Cozart MA, Wu H, Mock MM, Abramowitz J, et al. TRPC3 channels play a critical role in the theta component of pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Epilepsia*. 2017;58(2):247-54.
242. Kim YJ, Kang TC. The role of TRPC6 in seizure susceptibility and seizure-related neuronal damage in the rat dentate gyrus. *Neuroscience*. 2015;307:215-30.
243. Phelan KD, Shwe UT, Abramowitz J, Birnbaumer L, Zheng F. Critical role of canonical transient receptor potential channel 7 in initiation of seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(31):11533-38.
244. Katano M, Numata T, Aguan K, Hara Y, Kiyonaka S, Yamamoto S, et al. The juvenile myoclonic epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death. *Cell Calcium*. 2012;51(2):179-85.
245. Aarts MM, Tymianski M. TRPMs and neuronal cell death. *Pflugers Arch*. 2005;451(1):243-9.
246. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.
247. Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*. 2006;139(4):1405-15.
248. Sun FJ, Guo W, Zheng DH, Zhang CQ, Li S, Liu SY, et al. Increased expression of TRPV1 in the cortex and hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci*. 2013;49(1):182-93.
249. Saffarzadeh F, Eslamizade MJ, Ghadiri T, Modarres Mousavi SM, Hadjighassem M, Gorji A. Effects of TRPV1 on the hippocampal synaptic plasticity in the epileptic rat brain. *Synapse*. 2015;69(7):375-83.
250. Nazıroğlu M, Övey İS. Involvement of apoptosis and calcium accumulation through TRPV1 channels in neurobiology of epilepsy. *Neuroscience*. 2015;293:55-66.
251. Müller M, Pape HC, Speckmann EJ, Gorji A. Effect of eugenol on spreading depression and epileptiform discharges in rat neocortical and hippocampal tissues. *Neuroscience*. 2006;140(2):743-51.
252. Wang Z, Zhou L, An D, Xu W, Wu C, Sha S, et al. TRPV4-induced inflammatory response is involved in neuronal death in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Cell Death Dis*. 2019;10(6):386.
253. Gunes H, Ozdemir E, Arslan G. Coenzyme Q10 increases absence seizures in WAG/Rij rats: The role of the nitric oxide pathway. *Epilepsy Res*. 2019;154:69-73.
254. Gonca E, Barut F, Şahin D. The effect of generalized seizure activity on ischemia-induced cardiac arrhythmias and myocardial injury with histopathological evaluation in anesthetized rats. *Turk J Med Sci*. 2018;48(6):1293-301.
255. Davoudi M, Shojaei A, Palizvan MR, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J. Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. *Epilepsy Res*. 2013;106(1-2):54-63.
256. Aygun H, Ayyildiz M. Vortioxetine increases absence-like seizures in WAG/Rij rats but

- decreases penicillin- and pentylenetetrazole-induced seizures in Wistar rats. *Epilepsy Behav.* 2021;116:107797.
257. Deng J, Xu T, Yang J, Zhang KM, Li Q, Yu XY, et al. Sema7A, a brain immune regulator, regulates seizure activity in PTZ-kindled epileptic rats. *CNS Neurosci Ther.* 2020;26(1):101-16.
 258. Günaydin C, Arslan G, Bilge SS. Proconvulsant effect of trans-cinnamaldehyde in pentylenetetrazole-induced kindling model of epilepsy: The role of TRPA1 channels. *Neurosci Lett.* 2020;721:134823.
 259. Kaleel A, Kamel AZ, Aygun H, Kamil LAK, Kabak Y, Inal SB, et al. The Effect of Hemopressin Combined To CB1 Receptor Agonist and Antagonist on Epileptiform Activity in the Pentylenetetrazole Kindling Rat Model. *Acta Physiologica.* 2019;227:24.
 260. Doğan E, Aygün H, Arslan G, Rzayev E, Avcı B, Ayyıldız M, et al. The role of NMDA receptors in the effect of purinergic P2X7 receptor on spontaneous seizure activity in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Front Neurosci.* 2020;14:414.
 261. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.
 262. Bikandi J, San Millán R, Rementeria A, Garaizar J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics.* 2004;20(5):798-9.
 263. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
 264. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
 265. Raeymaekers L. Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol.* 2000;15(2):115-22.
 266. Kilias A, Tulke S, Barheier N, Ruther P, Häussler U. Integration of the CA2 region in the hippocampal network during epileptogenesis. *Hippocampus.* 2023;33(3):223-40.
 267. Ying Y, Gong L, Tao X, Yao Y, Ding J, Liu J, et al. TRPM2 regulates the excitability of hippocampal neurons through Kv7 channel in epilepsy. Preprint from Research Square. 2022;11.
 268. Hu H, Zhu T, Gong L, Zhao Y, Shao Y, Li S, et al. Transient receptor potential melastatin 2 contributes to neuroinflammation and negatively regulates cognitive outcomes in a pilocarpine-induced mouse model of epilepsy. *Int Immunopharmacol.* 2020;87:106824.
 269. Moriyama H, Nomura S, Imoto H, Inoue T, Fujiyama Y, Haji K, et al. Suppressive Effects of Transient Receptor Potential Melastatin 8 Agonist on Epileptiform Discharges and Epileptic Seizures. *Front Pharmacol.* 2021;12:766782.
 270. Zhang XB, Jiang P, Gong N, Hu XL, Fei D, Xiong ZQ, et al. A-type GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol. *PLoS One.* 2008;3(10):e3386.
 271. Szulczyk B, Spycka A. Menthol exerts TRPM8-independent antiepileptic effects in prefrontal cortex pyramidal neurons. *Brain Res.* 2022;1783:147847.
 272. Chuang HH, Neuhausser WM, Julius D. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron.* 2004;43(6):859-69.
 273. Choi IS, Cho JH, Nakamura M, Jang IS. Menthol facilitates excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat medullary dorsal horn neurons. *Brain Res.* 2021;1750:147149.

274. Bhaskaran MD, Smith BN. Effects of TRPV1 activation on synaptic excitation in the dentate gyrus of a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*. 2010;223(2):529-36.
275. Iannotti FA, Hill CL, Leo A, Alhusaini A, Soubrane C, Mazzarella E, et al. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(11):1131-41.
276. Gonzalez-Reyes LE, Ladas TP, Chiang CC, Durand DM. TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity in vitro and electrographic seizures in vivo. *Exp Neurol*. 2013;250:321-32.
277. Shirazi M, Izadi M, Amin M, Rezvani ME, Roohbakhsh A, Shamsizadeh A. Involvement of central TRPV1 receptors in pentylenetetrazole and amygdala-induced kindling in male rats. *Neurol Sci*. 2014;35(8):1235-41.
278. von Rüden EL, Jafari M, Bogdanovic RM, Wotjak CT, Potschka H. Analysis in conditional cannabinoid 1 receptor-knockout mice reveals neuronal subpopulation-specific effects on epileptogenesis in the kindling paradigm. *Neurobiol Dis*. 2015;73:334-47.
279. Shoudai K, Peters JH, McDougall SJ, Fawley JA, Andresen MC. Thermally active TRPV1 tonically drives central spontaneous glutamate release. *J Neurosci*. 2010;30(43):14470-75.
280. Socala K, Nieoczym D, Pieróg M, Wlaż P. α -Spinasterol, a TRPV1 receptor antagonist, elevates the seizure threshold in three acute seizure tests in mice. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015;122(9):1239-47.
281. Carletti F, Gambino G, Rizzo V, Ferraro G, Sardo P. Involvement of TRPV1 channels in the activity of the cannabinoid WIN 55,212-2 in an acute rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2016;122:56-65.
282. Saffarzadeh F, Eslamizade MJ, Mousavi SM, Abraki SB, Hadjighassem MR, Gorji A. TRPV1 receptors augment basal synaptic transmission in CA1 and CA3 pyramidal neurons in epilepsy. *Neuroscience*. 2016;314:170-78.
283. Zaitoun IS, Cikla U, Zafer D, Udho E, Almomani R, Suscha A, et al. Attenuation of Retinal Vascular Development in Neonatal Mice Subjected to Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Sci Rep*. 2018;8(1):9166.
284. Kong WL, Peng YY, Peng BW. Modulation of neuroinflammation: Role and therapeutic potential of TRPV1 in the neuro-immune axis. *Brain Behav Immun*. 2017;64:354-66.
285. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2003;140(5):790-801.
286. Cho SJ, Vaca MA, Miranda CJ, N'Gouemo P. Inhibition of transient potential receptor vanilloid type 1 suppresses seizure susceptibility in the genetically epilepsy-prone rat. *CNS Neurosci Ther*. 2018;24(1):18-28.
287. Nazıroğlu M, Taner AN, Balbay E, Çiğ B. Inhibitions of anandamide transport and FAAH synthesis decrease apoptosis and oxidative stress through inhibition of TRPV1 channel in an in vitro seizure model. *Mol Cell Biochem*. 2019;453(1-2):143-55.
288. Lee JG, Yon JM, Lin C, Jung AY, Jung KY, Nam SY. Combined treatment with capsaicin and resveratrol enhances neuroprotection against glutamate-induced toxicity in mouse cerebral cortical neurons. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(11):3877-85.
289. Citraro R, Russo E, Scicchitano F, van Rijn CM, Cosco D, Avagliano C, et al. Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR- α receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*. 2013;69:115-26.
290. Vilela LR, Medeiros DC, de Oliveira AC, Moraes MF, Moreira FA. Anticonvulsant effects

- of N-arachidonoyl-serotonin, a dual fatty acid amide hydrolase enzyme and transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) channel blocker, on experimental seizures: the roles of cannabinoid CB1 receptors and TRPV1 channels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;115(4):330-4.
291. Fargali S, Sadahiro M, Jiang C, Frick AL, Indall T, Cogliani V, et al. Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis. *J Mol Neurosci*. 2012;48(3):654-9.
 292. Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death. *Exp Cell Res*. 2012;318(11):1221-28.
 293. Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy--a missing link? *Epilepsy Curr*. 2005;5(3):83-8.
 294. Heinrich C, Lähäinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, et al. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2011;42(1):35-47.
 295. Takahashi M, Hayashi S, Kakita A, Wakabayashi K, Fukuda M, Kameyama S, et al. Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res*. 1999;818(2):579-82.
 296. Skupien-Jaroszek A, Walczak A, Czaban I, Pels KK, Szczepankiewicz AA, Krawczyk K, et al. The interplay of seizures-induced axonal sprouting and transcription-dependent Bdnf repositioning in the model of temporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2021;16(6):e0239111.
 297. Warburton A, Miyajima F, Shazadi K, Crossley J, Johnson MR, Marson AG, et al. NRSF and BDNF polymorphisms as biomarkers of cognitive dysfunction in adults with newly diagnosed epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2016;54:117-27.
 298. McNamara JO, Scharfman HE. Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th ed. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD); 2012.
 299. Wang F, Lin Y, Kang D, Chen F, Lin K, Su X. Distribution and expression of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophic factor-3 in refractory epilepsy-associated focal cortical dysplasia. *Clin Neuropathol*. 2017;36(5):233-9.
 300. Fernández-García S, Sancho-Balsells A, Longueville S, Hervé D, Gruart A, Delgado-García JM, et al. Astrocytic BDNF and TrkB regulate severity and neuronal activity in mouse models of temporal lobe epilepsy. *Cell Death Dis*. 2020;11(6):411.
 301. Hong Z, Li W, Qu B, Zou X, Chen J, Sander JW, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in epilepsy. *Eur J Neurol*. 2014;21(1):57-64.
 302. Chen NC, Chuang YC, Huang CW, Lui CC, Lee CC, Hsu SW, et al. Interictal serum brain-derived neurotrophic factor level reflects white matter integrity, epilepsy severity, and cognitive dysfunction in chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2016;59:147-54.
 303. Yu Y, Jiang J. COX-2/PGE2 axis regulates hippocampal BDNF/TrkB signaling via EP2 receptor after prolonged seizures. *Epilepsia Open*. 2020;5(3):418-31.
 304. Elliott RC, Lowenstein DH. Gene expression profiling of seizure disorders. *Neurochem Res*. 2004;29(6):1083-92.
 305. Elliott RC, Gall CM. Changes in activating protein 1 (AP-1) composition correspond with the biphasic profile of nerve growth factor mRNA expression in rat hippocampus after hilus lesion-induced seizures. *J Neurosci*. 2000;20(6):2142-9.
 306. Adams B, Sazgar M, Osehobo P, Van der Zee CE, Diamond J, Fahnestock M, et al. Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and

- attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci.* 1997;17(14):5288-96.
307. Tiveron C, Fasulo L, Capsoni S, Malerba F, Marinelli S, Paoletti F, et. al. ProNGF\NGF imbalance triggers learning and memory deficits, neurodegeneration and spontaneous epileptic-like discharges in transgenic mice. *Cell Death Differ.* 2013;20(8):1017-30.
 308. Aygun H, Akin AT, Kızılaslan N, Sumbul O, Karabulut D. Probiotic supplementation alleviates absence seizures and anxiety- and depression-like behavior in WAG/Rij rat by increasing neurotrophic factors and decreasing proinflammatory cytokines. *Epilepsy Behav.* 2022;128:108588.
 309. Alvim MKM, Morita-Sherman ME, Yasuda CL, Rocha NP, Vieira ÉL, Pimentel-Silva LR, et al. Inflammatory and neurotrophic factor plasma levels are related to epilepsy independently of etiology. *Epilepsia.* 2021;62(10):2385-94.
 310. Peltola J, Palmio J, Korhonen L, Suhonen J, Miettinen A, Hurme M, et al. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures. *Epilepsy Res.* 2000;41(3):205-11.
 311. Zhang D, Qiu L, Zhang Y, Sang Y, Zheng N, Liu X. Efficacy and safety of sodium valproate plus lamotrigine in children with refractory epilepsy. *Exp Ther Med.* 2020;20(3):2698-704.
 312. Kayama Y, Shibata M, Takizawa T, Ibata K, Nakahara J, Shimizu T, et. al. Signaling Pathways Relevant to Nerve Growth Factor-induced Upregulation of Transient Receptor Potential M8 Expression. *Neuroscience.* 2017;367:178-88.
 313. Kreitmann L, Miglietta L, Xu K, Malpartida-Cardenas K, D'Souza G, Kaforou M, et. al. Next-generation molecular diagnostics: Leveraging digital technologies to enhance multiplexing in real-time PCR. *Trends Analyt Chem.* 2023;160:116963.
 314. Bharate SS, Bharate SB. Modulation of thermoreceptor TRPM8 by cooling compounds. *ACS Chem Neurosci.* 2012;3(4):248-67.
 315. Mangan PS, Kapur J. Factors underlying bursting behavior in a network of cultured hippocampal neurons exposed to zero magnesium. *J Neurophysiol.* 2004;91(2):946-57.
 316. Avoli M. The epileptic hippocampus revisited: back to the future. *Epilepsy Curr.* 2007;7(4):116-8.
 317. Kauer JA. TRPV1: hot new channels in the brain. *Future Neurology.* 2008; 3(5):507-11.
 318. Rajakulendran S, Hanna MG. The Role of Calcium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(1):a022723.
 319. Storozhuk MV, Moroz OF, Zholos AV. Multifunctional TRPV1 Ion Channels in Physiology and Pathology with Focus on the Brain, Vasculature, and Some Visceral Systems. *Biomed Res Int.* 2019;2019:5806321.
 320. Marinelli S, Vaughan CW, Christie MJ, Connor M. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. *J Physiol.* 2002;543(Pt 2):531-40.
 321. Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, Micera A. Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(3):294-303.