

ARZU TEMİZYÜREK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**GENETİK ABSANS EPİLEPSİ MODELİ WAG/RİJ SIÇANLARDA NANOPARTİKÜL
BAĞLI ANTİEPİLEPTİK İLACIN KAN BEYİN BARIYERİ DİNAMİKLERİ VE
ANTİEPİLEPTOJENİK ETKİLERİ**

ARZU TEMİZYÜREK

**DANIŞMAN
PROF. DR. ERDEM TÜZÜN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
PROF. DR. MEHMET KAYA**

**SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

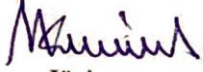
TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü . Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İleri Nörolojik Bilimler Programında Doktora öğrencisi Arzu TEMİZYÜREK tarafından Prof. Dr. Erdem TÜZÜN'ün danışmanlığında hazırlanan "Genetik Absans Epilepsi Modeli WAG/RİJ Sıçanlarda Nanopartikül Bağlı Antiepileptik İlacın Kan Beyin Bariyeri Dinamikleri ve Antiepileptojenik Etkileri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 29/04/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri-Danışman

Prof. Dr. Erdem TÜZÜN
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Sinirbilim Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Mutlu KÜÇÜK
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar,
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Laboratuvar Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Nurcan ORHAN
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Mehmet KAYA
Koç Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı

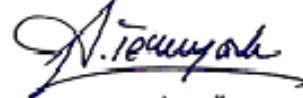


Jüri

Doç. Dr. Serkan EMİK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa,
Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi,
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

BEYAN

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


Arzu TEMİZYÜREK

İTHAF

Eşim Ahmet ve oğlum Ali Yaman'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince sabırla beni dinleyip her türlü koşulda desteğini esirgemeyen, en yıldıgım anda dahi mücadeleye devam diyen ve kendisini her zaman örnek alacağım kıymetli hocam Prof. Dr. Mehmet KAYA'ya; yine her türlü sabır ve içtenlikle beni destekleyen tez danışman hocam Prof. Dr. Erdem TÜZÜN'e, nanopartiküllerimizi özenle altın titizliğinde hazırlayan değerli hocam Doç.Dr.Serkan EMİK'e; tez projemin oluşum aşamasından tamamlanma aşamasına kadarki süreçte desteklerini ve güler yüzünü esirgemeyen sevgili dostum Canan UĞUR YILMAZ'a; tez çalışmalarında motivasyonumun hep yüksek seviyede olmasını sağlayan Doç. Dr. Nurcan ORHAN, Prof. Dr. Nadir ARICAN, Doç. Dr. Mutlu KÜÇÜK, Prof. Dr. Bülent AHISHALI; Dr. Öğretim Üyesi Gül BAKIRER ÖZTÜRK, Fatma TEKELİ'ye; destekleri için ayrıca Prof. Dr. Candan GÜRSES'e; hiç yılmadan her türlü sorularıma cevap veren, yardımlarını esirgemeyen hep gülen sevgili arkadaşlarım Müge ATIŞ ve Uğur AKCAN'a; Boğaziçi Üniversitesi deney hayvanı laboratuvarında hiçbir emeğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Leyla DİKMEDAŞ'a, davranış deneylerimde ekipman ve motivasyon desteği ile sevgili dostum Veteriner Hekim Burcu ÇEVRELİ'ye; Koç Üniversitesi Deney Hayvanları Bölümü'nde çalışan başta Dr. Cihan Taşkın olmak üzere Veteriner Hekim Nilhan COŞKUN, Ahmet KOCABAY, Mustafa DEMİR, M.Oğuzkan YARALI ve Elif hanıma; tez çalışmamın ICP-MS bölümünde yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Özge ÇAVUŞLAR'a; bu süreç içerisinde EEG konusunda desteğini esirgemeyen ve her türlü koşulda koşup gelen Metin BAHÇECİ'ye ve tabiki bugünlerimi göremeyen fakat gördüklerine inandığım melek annem ve babam'a, zamanlarının büyük bir bölümünü aldığım sevgili eşim ve oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	9
ŞEKİLLER LİSTESİ	10
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	13
ÖZET	18
ABSTRACT.....	19
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	20
2. GENEL BİLGİLER	24
2.1. Epilepsi	24
2.1.1. Epileptogenez.....	25
2.1.2. Epilepsinin Sınıflandırılması	29
2.1.2.1. Absans Epilepsiler.....	31
2.1.2.2. Absans Epileptogenez ve Patofizyoloji.....	33
2.1.2.3. Absans Epilepsi Hayvan Modelleri.....	45
2.1.2.4. Davranışsal Etkiler	55
2.2. Beyin Bariyerleri.....	55
2.2.1. Beyinde Bariyer Özelliği Olmayan Alanlar.....	58
2.2.2. Kan-beyin Bariyerinin Bağlantı Yapıları.....	59
2.2.3. Epilepsi ve Kan-Beyin Bariyeri.....	64
2.2.4. Kan-Beyin Bariyerinde İlaç Taşınımı.....	66
2.2.5. Absans Epilepside İlaç Taşınımı.....	73
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	78
3.1. Deney Planı.....	78
3.1.1. Deney Hayvanları Prosedürleri.....	79
3.1.1.1. Stereotaksi Cerrahi Metodu İle Elektrotların İlgili Beyin Bölgelerine Yerleştirilmesi	80

3.1.1.2. EEG Kayıtlarının Alınması	82
3.1.2. Enjekte Edilecek Malzemeler	83
3.1.2.1. Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	83
3.1.2.2. Altın Nanopartiküllere Lakozamid Konjugasyonu	85
3.1.2.3. Altın Nanopartikül ve İlaç Enjeksiyonları	86
3.1.2.4. Altın Nanopartiküllere Lakozamid Konjugasyonu ve LCM Analizi için Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopi (UV-VIS) Ölçümleri.....	86
3.1.2.5. Altın Nanopartiküllerin İşaretlenmesi	87
3.1.2.6. <i>İn Vivo</i> Görüntüleme İşlemleri.....	88
3.1.2.7. Davranış Deneyleri.....	89
3.1.2.8. Perfüzyon ve Ötenazi	91
3.1.2.9. Elektronmikroskopi	92
3.1.2.10. Hemogram Analizleri.....	92
3.1.2.11. Altın Nanopartikül Miktar Tayini için İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP- MS) Analizleri	93
3.1.2.12. Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopi (UV- VIS) Prosedürleri ile İlaç Analizi	94
3.1.3. İstatistik.....	94
4. BULGULAR.....	96
4.1. Altın Nanopartikül Karakterizasyonu ve Sentezi	96
4.1.1. Altın Nanopartiküllere Lakozamid Konjugasyonu, LCM Analizi için Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopi (UV-VIS) Ölçümleri	98
4.1.2. Altın Nanopartiküllerin İşaretlenmesi	100
4.2. EEG Bulguları.....	101
4.3. Davranış Deneyi Bulguları	108
4.4. XLC 680 ile İşaretli ANP+LCM, LCM Görüntüleme Bulguları.....	110
4.5. ICP-MS Bulguları	113
4.6. Beyin Kesitlerinde Elektronmikroskopik Bulgular	116
4.7. Hemogram Bulguları	119
5. TARTIŞMA	120
KAYNAKLAR	130
ETİK KURUL KARARI	156
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	159

ÖZGEÇMİŞ	160
----------------	-----



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Epilepsinin Uluslararası Epilepsi Derneği'nin 2017 yılı sınıflandırması (Scheffer ve ark. 2017'den Türkçeleştirilmiştir).	30
Tablo 2-2: Epilepsi nöbetlerinin Uluslararası Epilepsi Derneği'nin 2017 yılı sınıflandırması (Fischer ve ark. 2017'den Türkçeleştirilmiştir).	30
Tablo 2-3: Çocukluk çağı absans epilepsisi ile ilgili mutasyonlar (Crunelli ve ark. 2002'den Türkçeleştirilmiştir).	45
Tablo 2-4: Sıçan ve fare genetik modellerinin özellikleri (Crunelli ve ark. 2002'den Türkçeleştirilmiştir).	53
Tablo 2-5: Farklı absans nöbet tiplerinde antiepileptik etkinlik (Vrielynck 2013'den Türkçeleştirilmiştir)	74
Tablo 3-1: Hayvan grupları ve gruplar ile yapılacak analizler	79
Tablo 4-1: Gruplara ait hemogram verileri	119

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Merkezi sinir sistem hasarı, reaktif gliyosis ve nöbetler arasındaki etkileşim	26
Şekil 2-2: İktal EEG'de (insan) görülen 3Hz'lik genel diken dalga örneği (www.epilepsydiagnosis.org).	33
Şekil 2-3: Jeneralize absans epilepsinin oluşumuna dair 5 teorinin şematik izlenimi (Meeren ve ark. 2005'ten Türkçeleştirilmiştir).....	35
Şekil 2-4: Absans ilişkili diken dalga deşarj'larının başlatılması ve genelleştirilmesi.	36
Şekil 2-5: Diken dalga deşarjlarında ana afferent-efferent bağlantılar.	37
Şekil 2-6: Tipik absans epilepsi nöbetlerine ait nöronal döngüler (Wang ark. 2009; Han ark. 2012'den Türkçeleştirilmiştir).	39
Şekil 2-7: Kortikotalamik ağın şematik çerçevesi (Chen ve ark. 2017'den Türkçeleştirilmiştir).	40
Şekil 2-8: GABA _B reseptörlerinin lokalizasyonu ve fizyolojik rolleri (Han ve ark. 2012'den Türkçeleştirilmiştir).	43
Şekil 2-9: İnsan ve kemirgen diken dalga deşarjları (Depaulis ve ark. 2018).	46
Şekil 2-10: Kemirgenlerde, arka beyin, serebellar ve kortikal döngüleri içeren trigeminal sistem (Kleinfeld ve ark. 1999'dan Türkçeleştirilmiştir).	48
Şekil 2-11: Yüz somatosensör korteksinde diken dalga deşarj'larının başladığını gösteren çok aşamalı elektrot EEG kaydı (Polack ve ark. 2007'den Türkçeleştirilmiştir).	49
Şekil 2-12: Kan-beyin bariyeri dahil nörovasküler ünitenin görünümü (Barar ve ark.2016'dan Türkçeleştirilmiştir).	57
Şekil 2-13: Kan-beyin bariyeri ve beyinin diğer bariyerleri (Stock ve ark. 2017'den Türkçeleştirilmiştir).	57
Şekil 2-14: Beyinde bariyer olmayan yapılar	58
Şekil 2-15: Beyin endotel bağlantı yapıları ve transport sistemleri (Benarroch 2012'den Türkçeleştirilmiştir).	60
Şekil 2-16: Beyin endotel hücresinde ilaçların taşınma mekanizmaları.....	61
Şekil 2-17: Beyinin bariyeri ve glimfatik dolaşım sistemleri (Basseville ve ark. 2016'dan Türkçeleştirilmiştir).	62

Şekil 2-18: Kan-beyin bariyerinin bileşimi ve patolojik koşullarda oluşan ana değişiklikler (Saraiva ve ark. 2016'dan Türkçeleştirilmiştir).....	65
Şekil 2-19: Kan-beyin bariyeri'nde nanopartiküllerin beyin iletimi için taşıma mekanizmaları (Saraiva ve ark. 2012).	69
Şekil 2-20: Nanopartikül yapısı (Saraiva ve ark. 2012'den Türkçeleştirilmiştir).....	70
Şekil 2-21: ANP'lerin indüktif eşleşmiş plazma spektrometresi ICP-MS cihazında analiz mekanizması.....	73
Şekil 2-22: Lakozamid'in hastalığı modifiye edici etki sağlayabileceği mekanizmalar (Wilson ve Khanna 2015'ten Türkçeleştirilmiştir).	76
Şekil 3-1: EEG kaydı için elektrotların yerleştirileceği hipokampusün CA1 bölgesi (Ferland ve Schrader 2011; Paxinos ve Watson 2007).....	82
Şekil 3-2: EEG kayıtlarının alındığı sistem (System plus Micromed, Italy).	83
Şekil 3-3: EEG kayıtlarının alınması için beyine yerleştirilen elektrotların bağlandığı port sistemi.....	83
Şekil 3-4: Görüntülemeye kullanılan IVIS (<i>Invivo</i> Imaging System Caliper Lumina III) cihazı.....	88
Şekil 3-5: Yükseltilmiş artı labirent platformu (EPM- Elevated Plus Maze).....	90
Şekil 3-6: Hemogram analiz cihazı (MINDRAY).....	92
Şekil 3-7: Homojenizatör cihazı	93
Şekil 3-8: ICP-MS cihazı (Agilent Technologies, 7700 series ICP-MS, ABD).....	94
Şekil 4-1: Dinamik ışık saçınımı (DLS) ölçümleri ile belirlenen ortalama ANP çapı ve PDI değerleri.....	96
Şekil 4-2: Sentezlenen ANP yüzeyinin FT-IR görüntüsü.....	97
Şekil 4-3: ANP'lerin transmisyon elektron mikroskopi görüntüleri (Ok).	98
Şekil 4-4: LCM'nin UV-VIS ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.	99
Şekil 4-5: ANP'ye konjuge olan LCM miktarının spektral görüntüsü.	99
Şekil 4-6: Sentezlenen ve fonksiyonelize edilen ANP'lerin boyut ölçüm analizi.	100
Şekil 4-7: LCM grubunu temsil eden enjeksiyon öncesi ve sonrasındaki EEG paternleri ve analizleri.	102
Şekil 4-8: ANP grubunu temsil eden enjeksiyon öncesi ve sonrasındaki EEG paternleri ve analizleri.....	103
Şekil 4-9: ANP+LCM grubunu temsil eden enjeksiyon öncesi ve sonrasındaki EEG paternleri ve analizleri.	104

Şekil 4-10: Deney gruplarındaki hayvanların diken dalga deşarjlarının amplitüt değerleri.	105
Şekil 4-11: Deney gruplarındaki hayvanların diken dalga deşarjlarının frekans değerlerindeki değişimler.	106
Şekil 4-12: Deney gruplarındaki hayvanların nöbet sıklığındaki değişimler.	107
Şekil 4-13: Beş günlük enjeksiyon sonunda yükcsiltmiş artı labirent testinde platformun sadece açık alanında geçirilen süreleri.	108
Şekil 4-14: Beş günlük enjeksiyon sonunda yükcsiltmiş artı labirent testinde platformun açık alan + açık alana yönelme süreleri.	109
Şekil 4-15: ANP+LCM grubu ile LCM grubunun beş günlük enjeksiyon sonrası beyin dokusuna geçişin IVIS cihazında floresan yoğunluk görüntüleri.	112
Şekil 4-16: Beş günlük enjeksiyon sonucunda beyin dokusuna geçen ANP+LCM+XLC680'nin floresan yoğunluk miktarlarının günlere dağılımı.	113
Şekil 4-17: ICP-MS cihazında analiz edilen beyin dokusundaki ANP'lerin ppb biriminden dağılımları	114
Şekil 4-18: Beş günlük enjeksiyon sonunda ANP+LCM ve ANP grubuna ait hayvanların beyin korteksi ve orta beyin bölgelerinde biriken ANP miktarı.	115
Şekil 4-19: Sham grubundaki WAG/Rij sıçanların beyininin hipokampus (sol) ve beyin korteksi (sağ) bölgelerine ait morfolojik görüntüler.	116
Şekil 4-20: ANP grubundaki WAG/Rij sıçanların beyininin hipokampus (sol) ve beyin korteksi (sağ) bölgelerine ait morfolojik görüntüler.	116
Şekil 4-21: LCM grubundaki sıçan beyininin hipokampus (sol) ve beyin korteks (sağ) bölgelerine ait morfolojik görüntüler.	117

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AAN:	Atipik absans nöbetler
A β :	Amiloid beta proteini
AE:	Antiepileptik
AMPA:	Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropriyonik-asit
ANP:	Altın nanopartikül
AP-1:	Aktivatör protein-1
ATR:	Attenuated total reflection
ASE:	Absans status epileptikus
AY-9944:	Kolesterol sentetaz inhibitörü
Au ³⁺ :	Altın
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
BDZ:	Benzodiazepin
BCRP:	Göğüs kanseri direnç proteini
CAE:	Çocukluk çağı epilepsisi
CA1:	Hipokampusün anatomik olarak CA1 bölgesi
Ca ²⁺ :	Kalsiyum
CA:	Canlı ağırlık
cAMP:	Siklik amino monofosfat
Cav:	Voltaj kapılı kalsiyum kanalı
CBZ:	Karbamezapin
CLB:	Klonazepam
Cl ⁻ :	Klor
COMP-H:	Floresan işaretleyici enjektörü
COMP-I:	Floresan işaretleyici filtresi
COMP-G:	Floresan işaretleyici saklama şişesi
Ctx:	Korteks
C-T:	Kortikotalamik
CRMP2:	Collapsin response mediator protein-2

Da: Dalton

DBS: Derin beyin stimölasyonu

DDD: Diken dalga deşarjı

DD: Diken dalga

DMSO: Dimetilsölfoksit

DLS: Dinamik Işık Saçınımı

DTCP: Düşük eşikli kalsiyum iyon potansiyeli

EB: Evans Blue

ECM: Ekstraselüler matriks organizasyonu

EEG: Elektroensefalografi

EM: Elektronmikroskopi

eNOS: Endotelial nitrik oksit sentetaz

EPM: Yükseltilmiş artı labirent

EPSP: Eksitator postsinaptik potansiyel

ESM: Etesuksimid

FITC: Dekstran ile konjuge floresan izotiyosiyanat

FFI: Feed forward inhibisyon

FS: Ateşli nöbetler (febril nöbetler)

FT-IR: Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi

FUS: Odaklanmış ultrason

GABA: Gama amino bütirik asit

GABA_BR: GABA_B reseptörü

GAERS: Strazburg'dan genetik absans epileptik sıçan

GAG: Glikozaminoglikan

GEFS: Febril nöbet jeneralize epilepsisi

GFAP: Gliyal fibriller asidik protein

GHB: Gama hidroksibütirik asit

GLU: Glukoz

Glut-1: Glukoz taşıyıcı-1

GLUT: Glukoz taşıyıcı reseptör

GMAN: Göz miyoklonisi ile seyreden absans nöbetler

GSH: Glutatyon

GTCS: Jeneralize tonik-klonik nöbetler

HAuCl₄: Kloroaurik asit

HCN: Hiperpolarize aktive edilmiş siklik nüleotit

Hz: Herz

HVA: Yüksek voltaj aktif

HVS: Yüksek voltaj diken

ICP-MS: İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi

IGE: İdiyopatik jeneralize epilepsi

IL-1: İnterlökin-1

ILAE: Uluslararası Epilepsi Birliği

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentetazın-1

IPSP: İnhibitör postsinaptik potansiyel

IR: Infrared

IVC: Bireysel havalandırmalı kafes

IVIS: Canlı görüntüleme sistemi

K⁺: Potasyum

KBB: Kan-beyin bariyeri

Kir₃: Potasyum iyon kanalı

LCM: Lakozamid

LGS: Lennox-Gestaut Sendromu

M: Molar

MAN: Miyoklonik absans nöbetler

MMP: Matriks metalloproteinaz

MDR: Çoklu ilaç direnç geni

Mg²⁺: Magnezyum

mPFC: Mediyal prefrontal korteks

MRP: Çoklu ilaç direnç proteini

MSS: Merkezi sinir sistemi

NaBH₄: Sodyum tetrahidridoborat
Nav: Voltaj kapılı sodyum kanalı
NH₂: Amin
NMDA: N-metil-D- aspartat
NMR: Nükleer manyetik rezonans
NP: Nanopartikül
nRe: Talamusun retiküler çekirdeği
nRT: Talamusun retiküler çekirdeği
NRT: Nukleus retikülaris talami
P1: Piramidal nöronal
PBS: Fosfat tampon
PDI: Polidisperslik indeksi
PEG: Polietilenglikol
PEG-COOH: Karboksipolietilenglikol
PG: Proteoglikan
P-gp: P-glikoprotein
PHT: Fenitoin
POm: Posterio-mediya
PSD: Postsinaptik dansite
PTZ: Pentilentetrazol
PV: Kortikal parvalbumin
ROS: Reaktif oksijen
SD: Standart sapma
SE: Status Epileptikus
SH: Tiyol
sICAM-1: Serum çözünabilir adezyon molekülü-1
SoCx: Somatosensöryel korteks
SRN: Spesifik röle çekirdeği
SUDEP: Epilepside ani beklenmedik ölüm
sVCAM-1: Serum vasküler adezyon molekülü-1

SWD: Diken dalga desarjı
TAN: Tipik absans nöbetler
Tau: Mikrotubul ilişkili protein
TBH: Travmatik beyin hasarı
T-C: Talamokortikal
TEM: Tranmisyon elektron mikroskobu
TetraAc: Tetrasetat
TGA: Termogravimetrik analiz
THIP: Tetrahidroizoksazolo piridinol
TLE: Temporal lob epilepsisi
TNF-alfa: Tümör nekroz faktör alfa
TJ: Sıkı bağlantı
UV: Ultraviyole
UV-VIS: Ultraviyole ve görünür ışık spektroskopisi
VGSC: Voltaj kapılı sodyum kanalı
VM: Ventro-mediya
VPm: Ventro-posteriyo mediya
WAG/Rij: Rijswijk'ten Wistar albino Glakso
XCL680 CF: Floresan işaretleyici protein
ZO-1: Zonula okludens-1

ÖZET

TEMİZYÜREK, A. (2019). Genetik absans epilepsi modeli WAG/Rij sıçanlarda nanopartikül bağlı antiepileptik ilacın kan-beyin bariyeri dinamikleri ve antiepileptojenik etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Epilepsi, dünya'da 65 milyondan fazla insanı etkileyen kronik nörolojik bir hastalıktır. Epilepsinin alt gruplarından biri olan absans epilepsi çocuklarda ve ergenlerde otozomal dominant kalıtmı ve genetik altyapılı bir epilepsi türü olarak görülmektedir. Antiepileptik ilaçların başlıca beyin kan damarlarının endotel hücrelerince oluşturulan kan-beyin bariyeri (KBB) nedeniyle beyine geçişlerindeki sınırlama, etkin tedavinin önünü önemli bir ölçüde kapatmaktadır. Erişkin WAG/Rij sıçanların kullanıldığı bu çalışmada, nöro-nanoteknoloji yöntemlerinde bir taşıyıcı olarak kullanılan altın nanopartikül (ANP) lakosamid (LCM) ile ilişkilendirildikten sonra, bu antiepileptik ilacın nöbetler üzerine olan etkileri gösterilmeye çalışıldı. ANP'nin nöbetler üzerine olan uzun süreli etkilerini görmek için sağ ve sol hipokampusu yerleştirilen elektrotlar aracılığıyla elektroensefalografi (EEG) kaydı alındı ve anksiyete seviyelerini göstermek için yükseltilmiş artı labirent testi gerçekleştirildi. Ayrıca, *in vivo* görüntüleme (IVIS), indüktif eşleşmiş plazma spektrometresi (ICP-MS) ve elektron mikroskopi yöntemleri kullanılarak ANP'lerin beyindeki varlıkları tespit edildi. Aynı zamanda deneylerin sonunda hayvanların hemogram analizleri yapıldı. Bazal verilerle kıyaslandığında, ANP'li veya ANP'siz LCM uygulanması ortalama amplitüt ve frekans değerlerinde azalmalara yol açtı ($p<0.01$). ANP+LCM enjeksiyonları anksiyete düzeyinde anlamlı şekilde azalmaya neden oldu ($p<0.01$). *In vivo* görüntülemelerde elde edilen değerler, LCM'nin ancak ANP varlığında beyin parankimine daha fazla değerde ulaştığını gösterdi ($p<0.01$). Ultrastrüktürel incelemelerde, ANP'lerin nöronal yapılar dahil KBB endotel hücrelerinde bulunduğu tespit edildi. ANP, LCM, ANP+LCM ile 5 günlük tedavi sonunda hemogram değerlerinde anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Sonuç olarak, ANP'nin antiepileptojenik etkinlik açısından LCM'nin KBB'den geçişinde etkili bir araç olduğu ve daha da önemlisi düşük dozda LCM'nin ANP+LCM şeklinde uygulanmasının nöbetlerin amplitütü ve frekansı üzerine güçlü bir etki yaptığını söylemek mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Absans epilepsi, altın nanopartikül, elektroensefalografi, kan-beyin bariyeri, lakozamid

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28022

ABSTRACT

TEMİZYÜREK, A. (2019). Blood brain barrier dynamics and antiepileptogenic effects of antiepileptic drug- bound nanoparticle in WAG/Rij rats as a genetic absence epilepsy model. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Neuroscience. PhD thesis. İstanbul

Epilepsy is a neurological disease that affects more than 65 million people worldwide. Absence epilepsy is seen in children and adolescents. The blood-brain barrier (BBB) constituted by the endothelial cells of the brain microvessels limits the passage of circulatory substances into the brain parenchyma. In this study, adult WAG/ Rij rats were used to show the effects on seizures of lacosamide (LCM) associated with gold nanoparticle (GNP). To see the long-term effects of GNP on seizures, EEG recordings were obtained by electrodes placed in the right and left hippocampus, and an Elevated Plus Maze (EPM) test was performed. The presence of GNPs in the brain was determined by using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and electron microscopy. At the same time, hemogram analysis of the animals were performed at the end of the experiments. Application of LCM with or without GNP caused significant decreases in amplitude, and seizure frequency values compared to baseline values ($p < 0.01$). GNP+LCM injections significantly decreased anxiety levels as well ($p < 0.01$). The findings obtained from IVIS showed that LCM reached higher levels of brain parenchyma in the presence of GNP ($p < 0.01$). In ultrastructural examinations, GNPs were found in the neuronal structures after passing BBB endothelial cells. There were no significant changes in hemogram values. Our results suggest that GNP is an effective transfer agent in terms of antiepileptogenic efficacy in the passage of LCM through the BBB, and more importantly, the application of low dose LCM as GNP+LCM strongly influences the amplitude, and frequency of seizures.

Keywords: Absence epilepsy, blood-brain barrier, electroencephalography, gold nanoparticle, lacosamide

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 28022

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan epilepsi, hastalık insidansı bakımından oldukça yüksek seyreden ve hastanın yaşam kalitesinin iyileştirilmesine yönelik ilaç tedavisini gerektiren patolojilerden biridir (Brennan ve ark. 2017). Bu projede özellikle absans epilepsi modelinin seçilmiş olmasının nedeni, hastalığın çocukluk çağında görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri olması ve bu çocuklarda yaşamın ileri dönemini uzun bir süre ile kapsayarak hastalığın olumsuz belirtilerinin yaşanacak olması ve ilaca dirençlilik ya da ilaç tedavisinin kesilmesinden sonra nöbetlerin tekrar nüks edebilme olasılığının bulunmasıdır (Stefan 1982; Panayiotopoulos ve ark. 1997; Capovilla ve ark. 2001; Loiseau 2002; Panayiotopoulos 2005a). Hastalığın sosyo-kültürel, sosyo-ekonomik ve eğitim hayatına yansıyabilecek olumsuz etki boyutu çalışmanın hedefini etkin dozda terapötik ajanın kan-beyin bariyeri (KBB) endotel hücrelerinden beyin parankimal alanına geçirilebileceği yeni bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesi ile anti-epileptojenik etkinin incelenmesi temellendirir.

Projenin araştırma sorusunu başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere, beyin kaynaklı çeşitli bozuklukların tedavisi ile ilgili olarak birçok ilaç geliştirilmesine rağmen etkin bir ilaç tedavisi nasıl sağlanabilir (Saraiva ve ark. 2016) sorusu oluşturur. Yeni moleküllerin sunulması ya da süregelen, yani daha önce var olan moleküllerin rehabilitasyonunu gerçekleştirecek ve hedeflenen bölgeye ilacın aktarımını sağlayacak sistemin yetersizliği projenin şekillenmesinde temel yaklaşımı oluşturmaktadır.

Beyinde nöronların optimal şartlarda çalışmasını sağlayan bariyer özelliği taşıyan kan damarlarının endotel hücreleri sahip oldukları özel taşıma sistemleri ile ancak lipofilik yapıdaki ve çok küçük moleküllerin geçişine izin vermektedir (Abbott ve ark. 2010; Boyer ve ark. 2014). Projenin kapsamında yer alan KBB ve bu yapıda ortaya çıkan değişikliklerin iyi bir şekilde anlaşılması, nanotaşıyıcılar gibi hem çok yönlü hem de gelecek vadeden moleküllerin beyinin kolay ulaşılamayan ve zarar görmüş bölgelerine ulaştırılmasında hedefe yönelik yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunacaktır (Lockman ve ark. 2002; Barbu ve ark. 2009; Cupaioli ve ark. 2014).

Epilepsi ve özellikle WAG/Rij sıçanlar ile yapılan çalışmalar daha çok tanı amaçlı enflamatuvar, patofizyolojik süreçler ve prognoza yönelik belirteçler ile ilgili

yapılan araştırmalardır (Pedram ve ark. 2015; Ramazan ve ark. 2016). Diğer çalışmalar ise ilaçların KBB'den büyük oranda geçişini sınırlandıran sistemler hakkındadır (Haque ve ark. 2012). Bu projenin amacı, KBB'yi aşıp hedeflenen bölgede etki gösteremeyen ve etkin bir tedavi oluşturamayan ilaçları güncel nanoteknolojik taşıyıcı sistemler aracılığı ile özellikle absans epilepsinin de dahil olduğu nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili bir şekilde kullanıma sunmaktır.

Nanoteknoloji gibi yeni nesil teknolojilerin kullanımı ile KBB'nin sınırlayıcı özelliği, spesifik taşıyıcı sistemler ile aşılabacak ve terapötik ajanların hedeflenen beyin bölgesine taşınması ile ilacın sadece istenen bölgede etkin olması sağlanarak olası çevre doku hasarı en aza indirilmiş olacaktır. Bu sayede, klinikte kullanılan ilacın aşırı dozu ile oluşan yan etkilerin azaltılması ya da ilacın biyoyararlanımının artırılması sayesinde, ek ilaç kombinasyonlarına gerek duyulduğu durumlarda; hem tedaviye verdiği cevabın daha etkin olması hem de ek ilaç kullanımı engellenmiş olacaktır. Nanotaşıyıcılar sayesinde etkinlik sağlama amacı ile uygulanan ilaç modifikasyonu işlemlerine de gerek duyulmayacaktır. Bu yönü ile düşünüldüğünde bu çalışmanın hem bilimsel anlamda hem de ekonomik açıdan fayda sağlaması hedeflenmektedir.

Epilepsi tedavilerinde klasik uygulama yollarının oluşturduğu birtakım olumsuzluklar çalışmalarda bildirilmiştir (Dwibhasyam ve ark. 2008; Sharma ve ark. 2014). Özellikle beyin parankimine direkt olarak yapılan uygulamaların cerrahi işlem gerektirmesi ya da burun içi uygulamalar gibi mukozaya emdirilmek suretiyle yapılan işlemlerin getirmiş olduğu konforsuzluk, sadece istenen bölgeye yönlendirilen ilaç bağlı NP'ler ile daha kolay yolla uygulama seçeneği sunularak giderilecektir. *İn vivo* çalışmalarda NP'lere ilişkin toksisite çalışmaları yeterli değildir. İlaça bağlı NP temelli yaklaşımlar, özellikle epilepsinin absans formu gibi çocukluk çağında başlayıp hayatın uzun bir dönemini kapsayan süreçte uygulama alanı bulması, çevre dokulara verilen hasar ve toksisite gibi araştırmaların uzun vadeli sonuçlarının değerlendirilme olasılığını güçlendirecek ve çalışmanın kliniğe de yansıtılmasına imkan verecektir. Nanoyapıların kullanılması ile hücre spesifikitesinin artırılması; antiepileptik ilaçların KBB'den elimine edilmesinin engellenmesi ve bu bağlamda ilaçların KBB'den geçişini sınırlandıran p-glikoprotein (P-gp) gibi bazı transport moleküllerinin "bypass" edilmesini sağlayacaktır. Böylelikle, ilaca ilişkin toksisitenin azaltılması, ilacın hedeflenen bölgelere gidip kontrollü bir şekilde salınım yapması ile antiepileptik

ilaçların beyinde etkinliğinin artırılması mümkün görülmektedir (Rossi 2012). Literatürde, hastalığın engellenmesi ya da doğal sürecinin değiştirilmesi ile ilgili ilaçların antiepileptojenik etkilerinin araştırılmasına yönelik genetik, kimyasal veya elektriksel uyarım uygulamasını da içeren çeşitli epileptik hayvan modelleri kullanılmıştır. Kullanılan bu hayvan modelleri içerisinde genetik modeller, spontan nöbetli olma ve nöbet paterni açısından insan epilepsi nöbetlerine benzerliği nedeni ile tercih edilmiştir. Projede kullanılacak olan bu genetik modellerden WAG/Rij sıçanların, özellikle farmakolojik profil açısından da absans epilepsi modeli olarak geçerliliği kabul edilmiştir (Renier ve ark. 2000; Sahin ve ark. 2017).

Projede tercih edilen lakozamid (LCM) adlı antiepileptik ilacın, voltaj kapılı yavaş sodyum kanallarına etki ederek nöbetleri baskıladığı bildirilmiştir (D'Orsi 2014).

LCM'nin projede tercih edilmesinin ana sebebi, bu ilacın beyine yeterli miktarda geçememesi, dolayısıyla beklenen potansiyel etkinin zayıf olması nedeniyle klinikte ek ilaç kombinasyonlarına gerek duyulmasıdır (Kellinghaus 2009; Cawello 2017; Brodie 2017; Dean 2012). Bu anlamda, P-gp gibi hücre zarında bulunan ve tek yönlü çalışan taşıyıcı proteinlerin aşırı ekspresyonu etkili olması gereken alandaki LCM konsantrasyonunu bu ilacı tekrar kana geri göndererek beyinde etkin seviyenin altına kolayca düşürebilmektedir (Liu ve ark. 2012; Gáll ve Vancea 2018). Aynı zamanda, LCM'nin çoklu ilaç direnç proteini taşıyıcısı için bir substrat olduğu (Zhang ve ark. 2013) ve bu açıdan bakıldığında, LCM'nin projenin KBB dinamikleri açısından ideal bir antiepileptik ajan olduğu da söylenebilir.

Çalışmada yer alan ANP'lerin glukoz ile etiketlenmiş formları ile birlikte kullanılacak olması, antiepileptojenik süreçlere etkisi bakımından verilerin kliniğe yansıtılmasını sağlayacak seviyededir.

Terapötik ajanların kandan beyin parankimine taşınmasında, belirli yolakların aktiflenmesi ve bariyer tip endotel hücrelerinin zar yüzeylerine özgün olarak tasarlanan NP'lerin etkili birer ajan olması hedeflenmektedir (Wiley ve ark. 2013; Masserini ark. 2013). Absans epilepsi tedavisinde, ilaç bağlı ANP'lerin KBB'den kolayca ve tedavi dozunda beyine geçişinin başarılması tedavinin etkinliği ve kliniğe yansıtılması açısından önemli bir adımdır. Yapılan çalışmalar ve literatür taramaları,

tedavi alanında yapılan çalışmaların yeterli olmadığını, *in vivo* alışmalara daha fazla ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Epilepsinin bir hastalık olduğu olgusuna ilk defa eski Mısır'da ve eski Babil İmparatorluğu zamanında değinilmiştir (Temkin 1994). Epilepsi jeneralize yada parsiyel nöbetler şeklinde sonuçlanabilecek karmaşık ağların beyinde oluşturduğu anormal elektriksel aktiviteler ile tekrarlayan nöbetler şeklinde karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır (Bennevitz ve ark. 2009; Liu ve ark. 2010). İnsidansı oldukça yüksek olan epilepsi mevcut tedavi olanaklarının sınırlı ve yetersiz olması dolayısıyla hastanın yaşam kalitesini ve sosyal hayatını olumsuz olarak etkilemektedir. Travmatik beyin hasarı, iskemik inme, intraserebral kanamalar, enfeksiyon, tümör, kortikal displasi, bazı nörodejeneratif hastalıklar, kompleks febril nöbetler ya da status epileptikus (SE) nöbetleri gibi uzamış akut semptomatik nöbetlerin sebep olduğu beyin hasarı sonucu ortaya çıkan epilepsi vakalarının yaklaşık %40 kadarında etiyoloji bilinmektedir (Banerjee ve ark. 2009). Epilepsi insanların risk faktörlerinin belirlenebildiği beyin ile ilgili tek hastalık olmasına rağmen, bu risk içerisinde olan kişilerde epilepsinin gelişimini tam olarak engelleyebilecek profilaktik bir tedavi bulunmamaktadır (Dichter 2009 a,b). Epilepside nöbetler jeneralize ya da parsiyel şekilde görülmekle birlikte jeneralize nöbetler daha yaygın olup her iki hemisferi de birlikte etkiler. Buna karşın parsiyel nöbetler beyinde daha spesifik bir alan ile sınırlı olup belirli bir odakta kaynaklanır.

Epilepsi etiyolojiye bağlı olarak 3 ana kategoriye ayrılabilir. İdiyopatik, semptomatik (edinsel) ve tahmini semptomatik (kriptojenik olarak da adlandırılır). İdiyopatik epilepsilerin basit nöronal regülasyonların farklılaşmasına neden olan genetik bozukluklardan kaynaklandığı düşünülürken, edinsel epilepsilere beyinde hasar oluşturan tümör gibi fokal bir odak ya da metabolik bozukluklardan kaynaklanan epileptik bir lezyonun neden olduğu düşünülür. Kriptojenik epilepsiler muayene sırasında ortaya çıkarılması zor ya da imkansız olan tahmini bir lezyon ile ilişkilendirilir (Löscher ve ark. 2010).

2.1.1. Epileptogenez

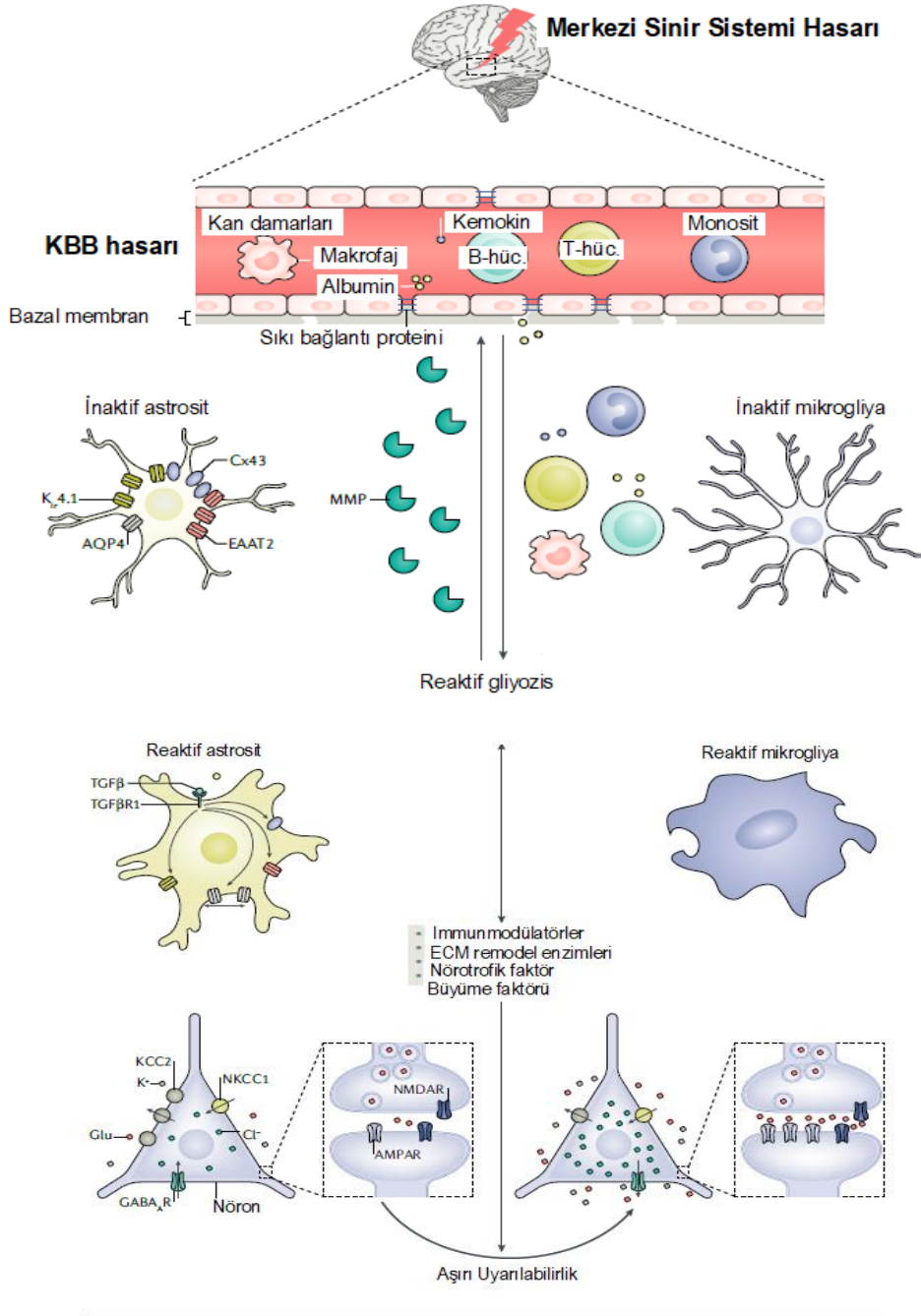
Gowers (1881) yaklaşık 130 yıl önce ilk olarak, beyin hasarı ile semptomatik epilepsinin başlangıcı arasında aylar boyunca süren nöbetsiz latent bir aralığın olduğunu fark etmiştir. Beyin hasarı ile bariz nöbetlerin ortaya çıkması arasındaki zaman alıcı süreç epilepsiye neden olabilmektedir. Yaygın olarak kabul edilen hipotez, semptomatik epilepsi vakalarının birçoğunu karakterize eden ve tam olarak anlaşılamayan bir yolağın nonepileptik bir beyini spontan tekrarlı nöbetlerin görüldüğü bir beyine çevirdiği şeklindedir (Herman ve ark. 2002; Pitkänen ve ark. 2010). Farklı hastalarda değişken uzunluğa sahip olan ve sonuç olarak kronik epilepsiye yol açan hasar ile indüklenmiş süreç **epileptogenez** olarak adlandırılmaktadır (Löscher ve ark. 2010). Diğer bir ifade ile normal nöronal ağdaki değişikliklerin hipereksitabilite kazanması ile tekrarlayıcı spontan nöbetlerin ortaya çıkması durumu epileptogenez olarak tanımlanır. Epileptogenezi tek bir mekanizma değil, birçok mekanizmanın bir kombinasyonu şeklinde düşünebiliriz ki bu süreç yapısal, nörokimyasal ve hücresel yapılarda meydana gelen çeşitli değişiklikler ile başlar (Gürses 2018). Her ne kadar insan epilepsisinin ortaya çıkışı hayvan modellerindeki gibi olmasa da birçok hayvan modeli insanlardaki epileptogenezi anlamak için kullanılmıştır. Özellikle status epileptikus (SE) ile indüklenmiş hayvan modelleri kullanılarak; birçok hücrede sayısal değişimler, ölüm, gliozis, nörogenezis, aksonal ve dendritik plastisite ile ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesi ve anjiyogenezis saptanmıştır. Ek olarak posttravmatik hasar ile oluşturulan hayvan modelleri, genetik absans modeller de Rijswijk'ten Wistar albino Glakso (WAG/Rij) sıçan, Strazburg'dan genetik absans epileptik sıçan (GAERS) tercih edilmiştir. En çok temporal lob epilepsisi (TLE) üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Nörodejenerasyon: Epileptogenezdeki süreçte en iyi tanımlanan bölgeler amigdala, entorinal, peririnal, parahipokampal korteks ile talamus ve serebellumun da dahil olduğu birçok ekstraporal bölgelerdir (Pitkänen ve Sutula 2002; Liu ve ark. 2003; Gürses 2018).

2. Nörogenez: Sadece epilepsi değil, farklı hastalıklarda da nörogenezin düzeyleri farklı olabilmektedir. Diğer yandan nörogenezin kronik hastalıklarda azalma gösterdiği bilinmektedir. Nörogenez daha çok normal erişkin memelilerde hipokampusun dentat gyrusunun subgranüler bölgesinde ve lateral ventrikülün

subventriküler bölgesinde görülür (Seri ve ark. 2001; Rikani ve ark. 2013; Gürses 2018).

3. Gliyozis: Epileptojenik hasarlanmayı takiben glial fibriller asidik protein (GFAP) ekspresyonundaki artışın yanında sitokin, kemokin ve ekstraselüler proteinlerde de artış görülür ve özellikle artışı gerçekleşen bu maddeler epileptogenez için ortam hazırlamış olurlar (Lukasiuk ve ark. 2006; Gürses 2018).



Şekil 2-1: Merkezi sinir sistem hasarı, reaktif gliyozis ve nöbetler arasındaki etkileşim

(www.Nature.com/nrn; Patel ve ark. 2019'dan Türkçeleştirilmiştir).

Şekil 2.1’de görüldüğü üzere, KBB’nin artan geçirgenliği ve beyin parankimi içine salgılanan immün hücreleri direkt hasarlanma ile birlikte reaktif gliozisi indükler. Reaktif gliyozis nöronal hasarlanmaya karşı gliyal hücrelerdeki morfolojik (hücre gövdelerinin hipertrofisi) ve fizyolojik değişiklikler (birçok gliyal proteinin ekspresyonu ve fonksiyonları) anlamına gelmektedir. Bu hasarlanma sürecindeki reaktif gliyalar birçok nörotrofik faktörler, immunmodülatör enzimlerin salınımına neden olarak ilgili reseptörlerin ekspresyonunu ve fonksiyonlarını modüle ederek uyarıcı ve inhibitör nörotransmisyon süreçlerine katılır. Özellikle reaktifleşmiş gliyadan salınan sitokinler amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropriyonik-asit (AMPA) reseptörlerinin postsinaptik yoğunluğunu ve uyarıcı nötransmisyonunu artırabilmektedir. Bu açıdan gliyal hücreler sadece nöronlara yapısal ve tropik destek sağlayan pasif seyirciler değil, aynı zamanda aktif olarak nöronal fizyolojiye de katılan yapılardır. Sonuç olarak nöbetler, nöromodülatör moleküllerin salınımını daha da artırarak, gliyozis ve nöbetlerin kısır döngüsünü ayarlayarak, gliyotik durumu şiddetlendirebilir (Patel ve ark. 2019; [www. Nature.com/nrn](http://www.Nature.com/nrn)). Gliyaların epileptogenez sürecine katkıları gösterilmiş olmasına rağmen epilepsi konusunda gliyalar ile ilgili halen çözümlenmeyi bekleyen sorular bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi özellikle epilepsinin nöropatolojisi ile ilişkili olarak; kontrolsüz, şiddetli, reaktif gliyozis tablosunu önleyen faktörlerin ve bu faktörler antiepileptik tedavileri geliştirmede stratejilerden birisi olup olamayacağıdır (Patel ve ark. 2019).

4. Aksonal büyüme/filizlenme: İnme, SE ve kafa travması sonrası epileptojenik hasarın mossi liflerin filizlenmesini tetiklediği çalışmalarda gösterilmiştir. İnsanda entorinal kortekste ve sıçanda hipokampusun CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerin aksonlarında filizlenmeler belirlenmiştir. Glutaminerjik nöronlara ek olarak, gama amino bütirik asit (GABA)’erjik inhibitör aksonlarda da hem sıçan hem de insanda filizlenmeye rastlanmıştır. Hasarlanmaya karşın en sık verilen yanıt olmakla birlikte beyin dışı organlarda inceleme yapılmamıştır (Elliot ve ark. 2003; Lukasiuk ve ark. 2006;; Gürses 2018).

5. Aksonal hasar: Epileptojenik hasarlanmalarda sık görülür ve süresi birkaç dakikadan yaklaşık bir yıla kadar uzayabilir (King ve ark.2005; Pitkänen ve McIntosh 2006; Gürses 2018).

6. Dendritik plastisite: Dendritlerin kaybı, dallanma göstermesi veya her ikisi birden hem insan hem hayvan çalışmalarında TLE’de gösterilmiştir (Von Campe ve ark. 1997; Isokawa ve ark. 2000; Gürses 2018).

7. Anjiyogenez: KBB’deki hasarlanma sonucunda anjiogenik faktörlerin ekspresyonu ile endotelial hücre proliferasyonu ve anjiyogenezdeki artış en sık görülen değişikliklerdir. KBB’deki hasarlanma ve anjiogenezin epileptiform aktivite ve iktogenez tetikleyip kısır bir döngünün başlamasına neden olduğu düşünülmektedir (Van Vliet ve ark. 2007; Chopp ve ark. 2008; Gürses 2018).

8. Ekstraselüler matrikste değişiklikler: Tüm değişikliklerin gerçekleştiği ortamı ifade eder. Proteinaz ailelerinin (metaloproteinaz, plazminojen aktivatörleri) henüz araştırma aşamasında olduğu bildirilmektedir (Lukasiuk ve ark. 2006; Vezzani ve Friedman 2011; Gürses 2018).

9. Kazanılmış kanalopatiler: SE sonrası oluşan modellerde ligand ve reseptör kapılı kanalların incelenmesinde, bu yapıların fonksiyonlarında belirgin değişiklikler ortaya çıktığı gözlenmiş ve bu nedenle kazanılmış kanalopatiler olarak tanımlanmıştır. Dendritik somatik ve aksonal kanallardaki bu değişiklikler haftalarca sürebilmektedir (Gürses 2018).

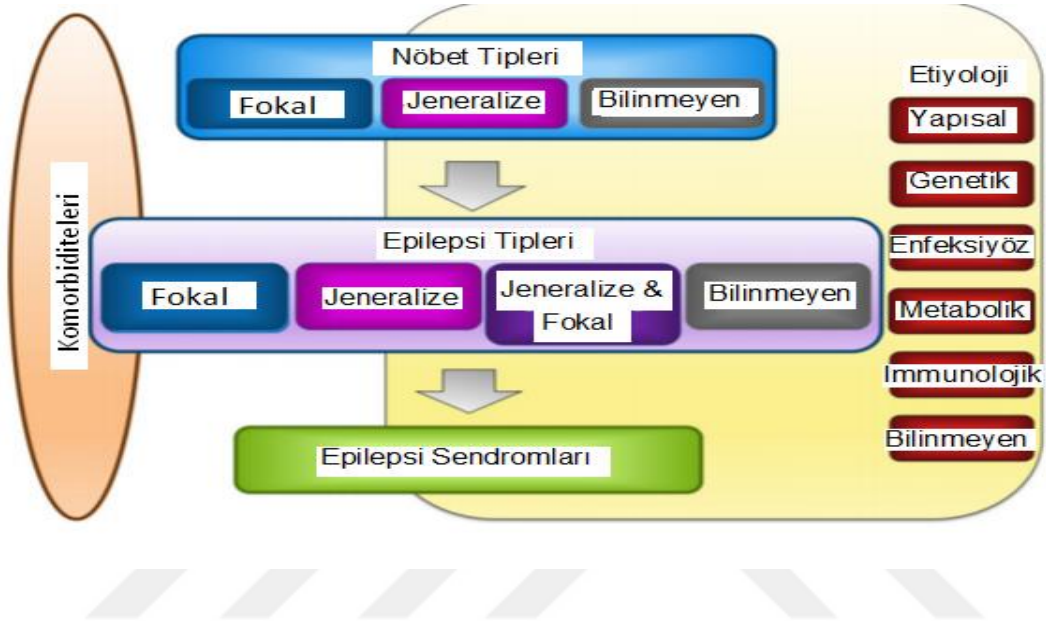
Enflamasyonun epileptogenezde potansiyel biyoışaretleyiciler olabileceği fikri ortaya çıkmış ve çeşitli sitokinler ile adezyon moleküllerinin sentezinin arttığı hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Vezzani ve ark. 2005; 2011; Gürses 2018). Yapılan çalışmalarda serum sitokin düzeyleri ile nöbetler arasında düzeylerinin yükseldiği ve nöbet şiddeti ile korele olduğu gösterilmiştir (Lehtimäki ve ark. 2007; Gürses 2018). Adezyon molekülleri ile yapılan çalışmada ise serum çözünabilir interselüler adezyon molekülü-1 (sICAM-1), serum ve beyin omurilik sıvısı (BOS) çözünabilir vasküler hücre adezyon molekülü-1(sVCAM-1) düzeylerinin ilaca dirençli epilepsi hastalarında ilaca yanıtı hastalara ve yeni epilepsi tanısı konan hastalara göre yüksek olduğu gösterilmiştir (Luo ve ark. 2014; Gürses 2018). Epileptogenezin anlaşılması ile epileptojenik beyin hasarına yönelik risk faktörünü teşkil eden biyoışaretleyicileri bulmak, ortaya çıkan epilepsiyi önlemek ve hatta önceden tespit etmek gibi durumlara açıklık getirilebilecektir (Gürses 2018).

2.1.2. Epilepsinin Sınıflandırılması

Temelleri 1909 yılında atılan ve 1960'lı yıllarda Henri Gastaut (Gastaut ve ark. 1964 a, 1969 b,c) tarafından konsept niteliğinde yeni bir sınıflandırma önerisi ile önemli bir ivme kazanan Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (The International League Against Epilepsy- ILAE) epilepsinin tedavisine ve araştırılmasına yönelik sınıflandırmalar yapmıştır. Sınıflandırmaların epilepsi vakalarında nöbet tiplerinin belirlenmesine, potansiyel nöbet tetikleyicilerinin aydınlatılmasına ve prognoza hizmet etmesi kaçınılmazdır. Ayrıca öğrenme güçlüğü, entellektüel faaliyetlerde bozukluk, otizm gibi komorbite riskleri ile ani ölüm risklerine (Sudden Unexpected Death in Epilepsy- SUDEP) açıklık getirmesi açısından önemlidir. Antiepileptik tedavi sürecinin de yönlendirilmesinde sınıflandırmanın etkisi yadsınamaz. Özellikle 1985 yılında ILAE tarafınca epilepsi ve epileptik sendromlar şeklindeki sınıflandırmanın uzun yıllar tartışılmasından sonra 1989 yılında yapılan sınıflandırmanın tüm dünyada yaygın olarak etkisi olmuştur. Sınıflandırma özellikle epilepsinin tedavi edilmesinde ve epilepsi araştırmalarında yol gösterici olmuştur. Yapılan sınıflandırmanın (1989) bugüne kadar geçerliliği kabul görse de, bilimsel anlamda yapılan çalışmaların epilepsi vakalarında teşhis ve tedavi yaklaşımını ve epilepsi anlayışını değiştirmesi, epilepsi ve altında yatan mekanizmalara daha güncel bir yaklaşımın gerekli olduğunu göstermiştir. Bu açıdan ILAE tarafınca 2017 yılında yeni bir epilepsi sınıflandırılması (Tablo 2.1) yapılarak daha çok etiyoloji temelli bir yapılandırmaya gidilmiştir. 3 kademeli bir sınıflandırmayı öngören yeni sınıflandırmada antiepileptik tedavinin yönlendirilmesi adına her kademeye mutlaka etiyolojinin entegre edildiği görülmektedir. Bu anlamda, ilk kademede Tablo 2.1 görüldüğü üzere nöbetlerin (fokal, jeneralize ve bilinmeyen) ikinci aşamada epilepsi tiplerinin (fokal, jeneralize, kombine fokal-jeneralize ile bir de bilinmeyen bir epilepsi grubu) ve en son olarak epileptik sendromların sınıflandırıldığı görülmektedir. Tablo 2.2'de ayırıcı nöbetlerin 2017 yılı itibari ile sınıflandırılması da yer almıştır (Fischer ve ark. 2017). Nöbet tipi teşhisinin ardından bir sonraki adım, fokal epilepsi de dahil olmak üzere epilepsi tipinin tanısı ve jeneralize edilmesidir. Her aşamada teşhis ve potansiyel terapötik etkilerinin önemi açısından etiyolojinin vurgulanması amaçlanarak etiyoloji; yapısal, genetik, enjeksiyöz, metabolik, immünolojik ve bilinmeyen şeklinde 6 alt gruba bölündüğü dikkati çekmektedir. Terminolojik anlamda da yapılan değişiklikte “gelişimsel ve epileptik ensefalopati” kelimeleri ile “benign” kelimesi yerine “self-

limited” (kişiyi özgü) ve “pharmacoresponsive” (ilaca duyarlı) kelimelerinin de eklenmesi ile daha spesifik tanımlamalara yer verilmektedir (Scheffer ve ark. 2017).

Tablo 2-1: Epilepsinin Uluslararası Epilepsi Derneği’nin 2017 yılı sınıflandırması (Scheffer ve ark. 2017’den Türkçeleştirilmiştir).



Tablo 2-2: Epilepsi nöbetlerinin Uluslararası Epilepsi Derneği’nin 2017 yılı sınıflandırması (Fischer ve ark. 2017’den Türkçeleştirilmiştir).

FOKAL	JENERALİZE	BİLİNMEYEN
Bilinçli/ Bilinç Kayıplı	Motor	Motor
Motor	Tonik- Klonik	Tonik- Klonik
Otomatizmalı	Klonik	Epileptik Spazmlar
Atonik	Tonik	
Klonik	Miyoklonik	
Epileptik Spazmlar	Miyoklonik-Tonik-Klonik	
Hiperkinetik	Miyoklonik- Atonik	
Miyoklonik	Atonik	
Tonik	Epileptik Spazmlar	
Motor Olmayan	Motor Olmayan (Absans)	Motor Olmayan
Otonomik	Tipik	Davranış Tutukluluğu
Davranış Tutukluluğu	Atipik	
Kognitif	Miyoklonik	
Emosyonel	Göz Kapağı Miyoklonisi	
Sensoryel		
Fokal-Bilateral tonik – klonik		Sınıflandırılmayan

2.1.2.1. Absans Epilepsiler

İlk olarak 1705 yılında Poupart, sonraları Tissot (1770) absans nöbet tiplerini tanımlamışlardır. Epileptik absans kelimesinden ilk defa Calmeil (1824) bahsetmiştir. Esquirol (1838) jeneralize *grand mal* nöbet gruplarına karşı *petit mal* terimini geliştirmişken; Gowers 1881 yılında absans nöbetler hakkında oldukça detaylı bilgiler vermiştir. 1920'li yıllarda Hans Berger'in elektroensefalografiyi hayata geçirmesi ile birlikte EEG kayıtlarında absans spesifik iktal deşarjların klinikte ortaya çıkarılmasında etkili olmuştur (Gibbs ve ark. 1935). İleriki yıllarda ILAE hem sınıflandırmaya hem de terminolojiye açıklık getirmiştir (Gastaut ark. 1969c). EEG ile birlikte video monitörizasyonunun da birlikte kullanılması ile absans epilepsi çok daha ayrıntılı şekilde incelenme imkanı bulmuştur (Penry ve ark. 1975; Stefan 1982). Absans nöbetler birçok farklı epilepsi türünde yaygındır ve tüm yaşları kapsayabilir. Nöbetlerin, üç yüzyılı aşkın bir süre önce sınıflandırılmasına rağmen bu hastalığın patofizyolojisi, genetiği, tedavisi, prognozu ve eşlik eden komorbiditeleri alanında araştırmalar halen yapılmaya devam edilmektedir (Tenney ve ark. 2013).

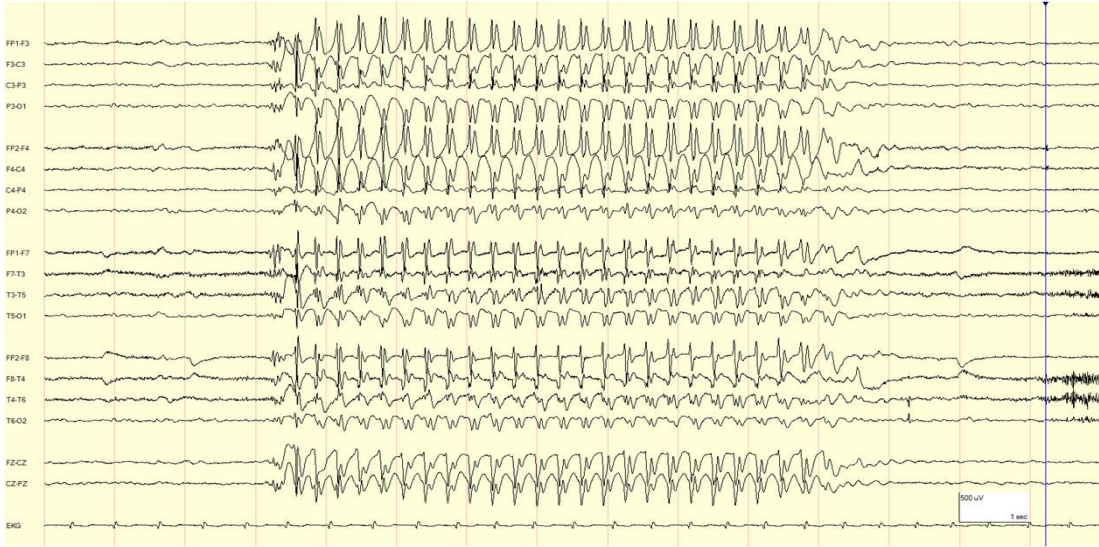
Epilepsili çocuklarda nöbetlerin yaklaşık %10'unun tipik absans nöbetler şeklinde olduğu bildirilmektedir. Yıllık insidansı genel nüfusta 0.7 ila 4.6/100.000, ve 0-15 yaş arası çocuklarda 6 ila 8/100.000 olarak tahmin edilmektedir. Genel popülasyonda yaygınlık 5 ila 5/100.000 kişidir. Benzer sonuçlar Amerika Birleşik Devletleri (Connecticut) ve Avrupa merkezli (İskandinavya, Fransa) nüfus çalışmalarında da gösterilmiştir. Absans epilepsilerde başlangıç yaşı 3 ila 13 yıl arasında değişmekte olup, 6- 7 yıl arasında pik yaptığı söylenmektedir (Posner 2008). Epilepsi, insidansının yüksek olması ve özellikle absans epilepsi türünün çocukluk çağında da görülmesi ve ömrün uzun bir zamanını kapsayan belirtileri olması nedeniyle kişinin hem ekonomik hem de sosyokültürel hayatını etkileyen geniş kapsamlı nörodejeneratif hastalıklardan bir tanesidir. Bu yönü ile bakıldığında absans epilepsiye karşı etkin bir farmakolojik tedavi yaklaşımının gerekliliği kaçınılmazdır (Richards ve ark. 2003; Rogawski ve Löscher 2004). Etiyopatogenetik olarak ele alındığında absans epilepsiler hem insanda hem de hayvanda nöbetler açısından neredeyse en iyi şekilde karakterize edilen hastalık grubundandır (Danober ve ark. 1998; Richards ve ark. 2003).

Absans nöbetler ani olarak şekillenen diken dalga deşarjları ile karakterizedir (Berg ve ark. 2010). Kayıtsızlık, hareketsizlik, uyarana cevap vermeme, bakakalma, geçici bilinç kaybı ve genellikle nöbet sonucu gelişen olayların toparlanamaması şeklinde sonuçlanır (Berg ve ark. 2010). Gibbs, Davis ve Lennox, bozulmuş bilincin 3 Hz'lik diken ve yavaş dalga kompleksi ile ilişkisini EEG üzerinde tanımlamıştır (Gibbs ve ark. 1935). Absans epilepsi birçok kognitif, davranışsal ve emosyonel bozukluklar ile ilişkilendirilerek (Vega ve ark. 2011) nöbetler sırasında gözlemlenen bilinç, kognüsyon ve hafıza problemleri absans epilepsinin uzun dönem sonuçları olarak tarif edilmiştir (Caplan ve ark. 2008). Jeneralize epilepsili hastalar jeneralize nöbet tiplerine sahiptir ve genel nöbet tiplerine eşlik eden tipik interiktal ve/veya iktal EEG bulgularına sahip olabilirler (örneğin jeneralize diken dalga). Absans nöbetler jeneralize motor olmayan nöbet tiplerindendir (Blumenfeld ve ark. 2003) ve nöbetler en son ILAE (2017) sınıflandırılmasına göre; tipik, atipik, göz kapağı miyoklonili absans veya miyoklonik absans epilepsiler olarak sınıflandırılırlar (Fisher ve ark. 2017).

2.1.2.1.1. Tipik Absans Nöbetler

Tipik bir absans epilepsi nöbeti, şiddeti değişebilen ani başlangıçlı ve bilinç değişiklikleri ile karakterize jeneralize bir nöbet tipidir. Nöbetler sırasında meydana gelen olaylar için hafıza bozukluğu söz konusu iken özellikle ergenler için bir miktar bilincin korunduğu söylenebilir. Göz kapaklarının, baş, kaşların, çene, perioral veya diğer yüz parçalarının klonik hareketleri, en tipik olarak 3Hz'de meydana gelebilir. Uzuvarların miyoklonusu nadiren ortaya çıkabilir. Oral ve manuel otomatizmler yaygındır ve nöbet başlangıcından önce meydana gelen bu davranışların ısrarla devam etmesi söz konusu olabilir. Absans status epilepticus (ASE) görülebilir (www.epilepsydiagnosis.org). ASE, idiyopatik jeneralize epilepsiler içerisinde görülen, konvulsif olmayan davranışsal ve kognitif değişiklikleri içeren sürekli ya da intermitant epileptik aktiviteler ile karakterize bir SE'dir (Treiman 1995).

Tipik absans nöbetlerde iktal evrede diken dalga (Şekil 2.2) mutlaka görünmelidir. Çocukluk çağı absans epilepsisinde tipik absans nöbetlerde düzenli 3Hz'lik jeneralize diken dalgalar oluşur. Ergenlik döneminde başlayan absans nöbetlerde ise, diken dalgalar daha hızlı (3.5-6 Hz) düzensiz, jeneralize çoklu dalgalar (poly- spike) şeklindedir.



Şekil 2-2: İktal EEG'de (insan) görülen 3Hz'lik genel diken dalga örneği (www.epilepsydiagnosis.org).

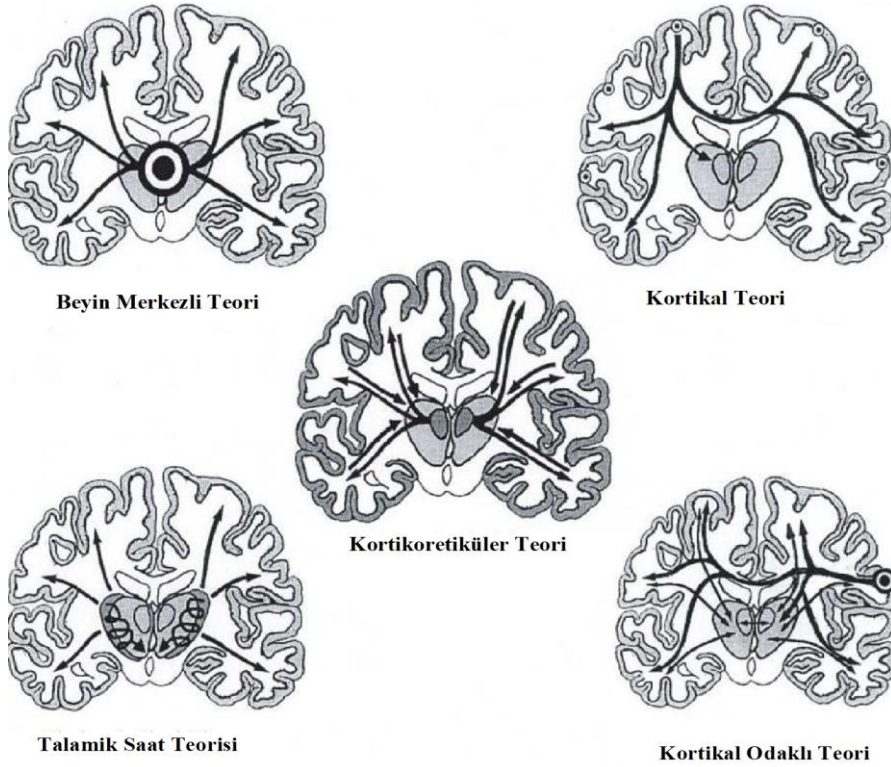
2.1.2.1.2. Atipik Absans Nöbetler

Jeneralize nöbetlerdendir. Atipik absans nöbetlerinin daha az ani başlangıçlı olması ve daha fazla bilinç kaybının yaşanması bu nöbetleri tipik absans nöbetlerden ayırır. Genellikle başın kas tonusu kaybı, gövde ya da bacaklarda (sıklıkla kademeli bir çökme) ve ince miyoklonik gerginlik gibi diğer özellikler ile ilişkilendirilirler. Atipik absans nöbetler öncelikle ciddi öğrenme ve epileptik ensefalopatilerin, özellikle Lennox-Gastaut sendromu nörolojik yetersizliği olan çocuklarda görülen epileptik nöbetlerdendir. İktal EEG paternleri, tipik absans nöbetlere göre daha yavaş, genellikle 1,5 ile 2,5 Hz arasında olan dalgaları gösterir (Panayitopoulos 2018).

2.1.2.2. Absans Epileptogenez ve Patofizyoloji

İdiopatik jeneralize epilepsilerin bir alt tipi olan absans epilepsinin kortikotalamik sistemdeki patolojik etkileşimlere bağlı olarak şekillendiğine inanılmaktadır. Diken Dalga Deşarjları'nın (DDD) oluşumunda temel niteliğindeki ağ mekanizmalarının anlaşılması özellikle çocukluk çağı epilepsileri ile diğer idiyopatik jeneralize epilepsiler gibi genetik anomalilere dair önemli bilgiler sunmaktadır. İnsan, transgenik veya inbred hayvan modellerinde yapılan nörobiyolojik araştırmalara göre absans epilepsinin patofizyolojisi birbirleri ile benzerlik göstermektedir. Ancak, ilişkili davranışsal bileşenlerin bulunmadığı, halihazırdaki anti-absans ilaçlara karşı

gelişebilen bilinmeyen duyarlılıklar ve anestetik protokollere etkilerin oluşabileceği deneysel sistemlerin bu anlamda mutlaka dikkate alınması gerekmektedir. Özellikle sonuçların yorumlanması açısından patofizyolojik olarak farklılıkların vurgulanması önemlidir (Crunelli ve ark. 2002). Jeneralize absans nöbetlerin patofizyolojisi üzerine 5 teori (Şekil 2.3) oluşturulmuştur. 1954'te önerilen beyin merkezli teoriye göre, talamus orta hattına doğru projekte olan deşarjların derin yerleşimli difüz özellikte olan subkortikal bir uyarı odağından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Jeneralize absans epilepsiye neden olan patofizyolojik mekanizmalardan birini 1991'de "talamik saat" teorisi oluşturmaktadır, bu anlamda retiküler talamik çekirdeğin, talamik saat için kortekse yapılacak olan ritmik iletileri gerçekleştirmek üzere tetikleyici (pace maker) hücrelerini içerdiği anlamına geldiği ileri sürülmüştür. Buna karşın diğer araştırmacılar ise absans nöbetlerin oluşumunda kortekste deşarjların öncü bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, diken dalga deşarjlarının kortekste fokal başlangıçlı ve hızla jeneralize olduğu da öne sürülmüştür. 1968'de kabul edilen kortikoretiküler teoride ise, DDD'lerdeki iğlerin (spindle) oluşumunda etkili olan talamokortikal mekanizmalarla bağlantılı olduğu bildirilmiştir. 50'li ve 60'lı yıllarda (Niedermayer 1996), DDD'lerin frontal korteksten mi (Bancaud ve ark. 1969) yoksa beyin merkezli olarak mı (Hunter ark. 1949; Jasper ark. 1947) şekillendiği tartışmasına Gloor kortikoretiküler hipotezi ile bir uzlaşma getirmiştir (Gloor ve ark. 1988). Buna göre beyin korteksi hipereksite olduğunda talamusta oluşturulan ritmik spindle osilasyonları diken dalga deşarjlarına çevrilmektedir. Epileptik sıçanlarda yapılan bir çalışmada DDD oluşumunda fonksiyonel olarak sağlam bir talamokortikal ağın gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Meeren ve ark. 2005). Bahsedilen çalışmada, çoklu diken dalgaların nonlinear sinyal ilişki analizleri yapılarak kortikotalamik bağlantılar açıklanmaya çalışılmış, somatosensöryel alanda tutarlı bir odağın olduğu gösterilmiştir. Böylelikle, nöbetin ilk evrelerinde korteks talamusu harekete geçirirken, daha sonra korteks ve talamus karşılıklı olarak ritmik deşarjları ayarlayarak ve güçlendirerek birbirlerini harekete geçirir. Bu şekilde jeneralize epilepsi için geliştirilen "kortikal odaklı" teorinin kortikal ve talamik teoriler arasında köprü oluşturduğu söylenebilir.

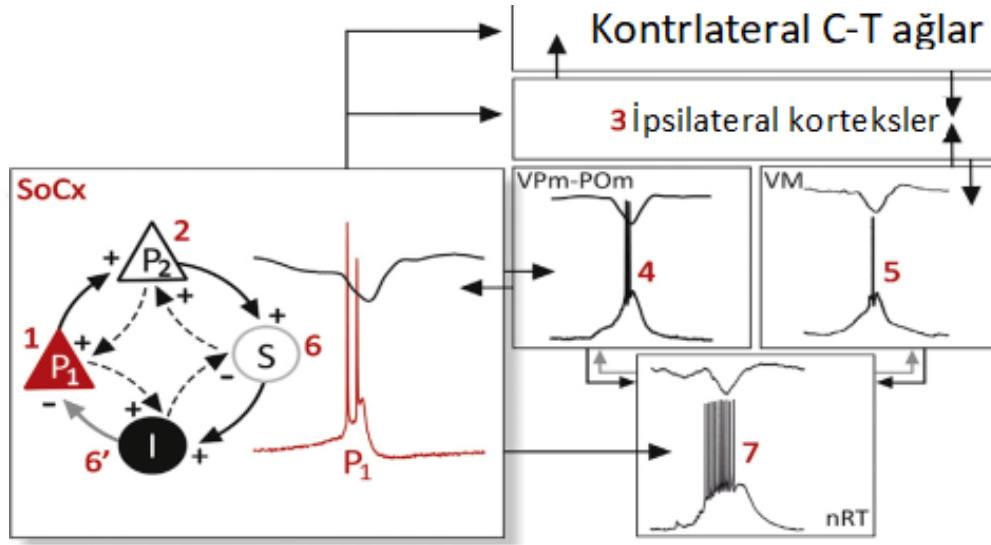


Şekil 2-3: Jeneralize absans epilepsinin oluşumuna dair 5 teorinin şematik izlenimi (Meeren ve ark. 2005'ten Türkçeleştirilmiştir).

Şekil 2.3'de solda talamik teoriler yer almaktadır. Penfield ve Jasper'ın beyin merkezli teorisi (1954) ve Buzsáki'nin (1988) talamik saat teorisi. Sağda ise kortikal teorilere yer verilmiştir. Bancaud, Lüders ve meslektaşları ile Niedermeyer'in (1972) kortikal teorileri ile Meeren ve diğerlerinin (2002) kortikal odak teorisi. Ortada, Gloor'un (1968) kortikoretiküler teorisi (Lüders ve ark. 1984'ten modifiye edilmiş) bulunmaktadır.

Absans nöbetlerin başladığı anatomik bölge ve mekanizmaları uzun zamandır tartışılmaktadır. Genetik modellerde ve birçok elektro-klinik çalışmalarda elde edilen deneysel bulgular, patojenik ve pro-iktojenik özellikler açısından kortikal bir orjini desteklemektedir. Asemptomatik veya interiktal dönemlerde, kortikal iktojenik nöronlar spesifik sinaptik ve/veya intrinsik defektlere bağlı olarak 10-12 Hz'lik düzensiz salınım gösterirler. Uyanıklıkta küçük bir azalma meydana geldiğinde, 10-12 Hz'lik iktojenik hücre popülasyonu (Şekil 2.4 sol panel) senkronize şekilde devreye girer, giderek gelişir ve birçok döngüden sonra 7-8 Hz'lik bir paterne ulaşır. Bunun eksitator-inhibitör sinaptik sinyallemlerde bir dengesizliğe neden olduğu görülmektedir. Lokal paroksizmal aktivite akışına paralel olarak, somatosensöryel korteksin (SoCx) piramidal nöronları, sırayla, uzak kortikal bölgelere ve talamik

çekirdeklere doğru ritmik ve güçlü sinaptik uyarımı aktarır, daha sonra retiküler çekirdek'in (nRT) GABAerjik nöronlarına gelerek talamokortikal nöronların aktivitesini engeller (Şekil 2.4 sağ panel). Bununla birlikte, talamik nöronların T-akımı patolojik olarak arttığından, rebound (yansıyan) özellikleri ve senkronize patlamaları destekleyerek çoğaltılır. Bu da ritmik talamik uyarımın kortikal alanlara yayılarak nöbet aktivitesini güçlendirir, dolayısıyla DDD'lerin jeneralize olmasına izin verir.

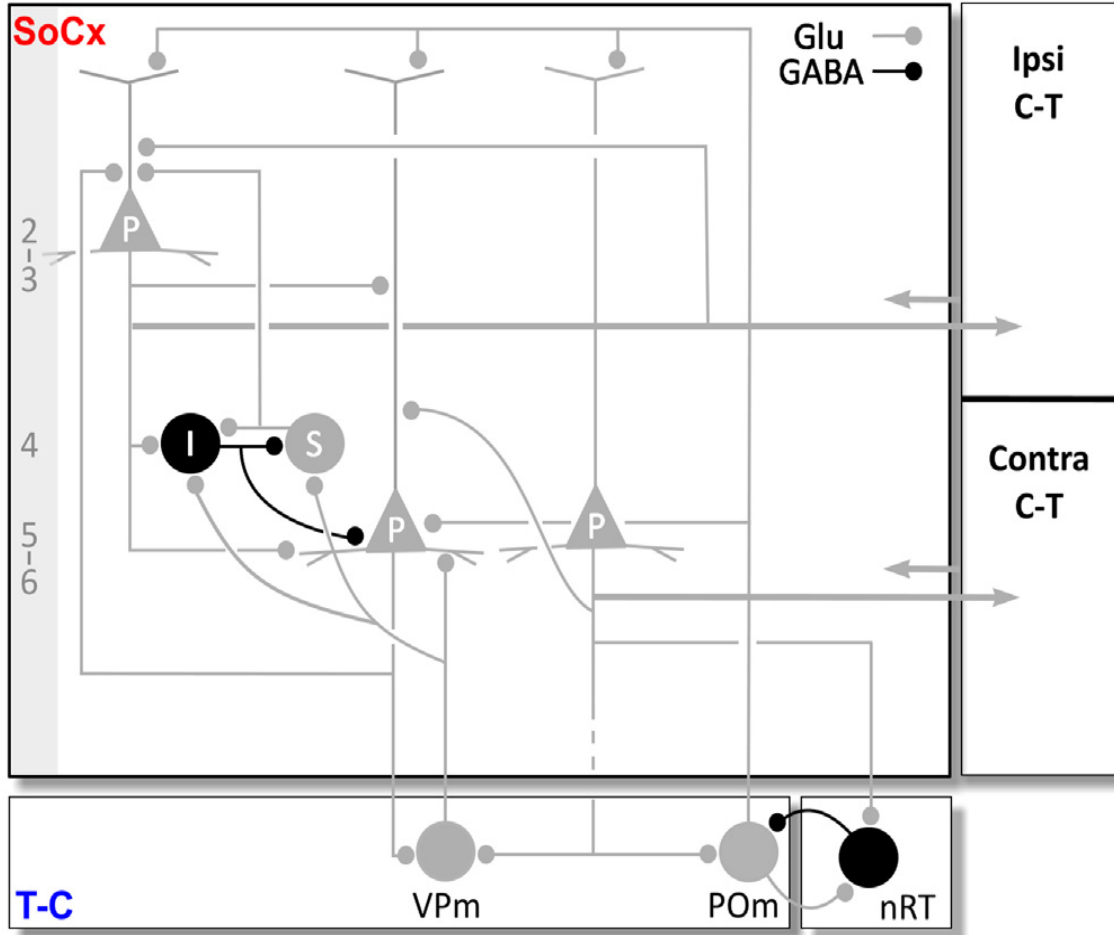


Şekil 2-4: Absans ilişkili diken dalga deşarjı'nın başlatılması ve genelleştirilmesi

VPM: ventro-posteriyo mediyal çekirdek; POM: posteriyo-mediyal çekirdek (talamusun); nRT: talamusun retiküler çekirdeği; VM: talamusun ventro-mediyal çekirdeği. Kırmızı sayılar edilen paroksizmal aktivitelerin sıralı akışını göstermektedir. Daha önce *in vivo* hücre içi kayıtlardan hesaplanan nöronal ateşleme gecikmelerinden (yüzeye göre) derlenmiştir (Lübke ve ark. 2007; Feldemeyer ve ark. 2013'ten türkçeleştirilmiştir).

İktojenik ağ olarak tanımlanan primer somatosensoryel korteks (SoCx) içinde, nöbet aktivitesi ilk olarak derin katmanlı piramidal nöronlarda (P1; 1), daha sonra epileptik aktiviteyi ipsilateral kortikal alana (3) doğru ilerleten üst tabaka piramidal hücrelerde (P2; 2) meydana gelir. Diğer kortikal bölgelerin yanı sıra somatosensoryel korteks, iktal deşarjları somatosensoryel (VPM – POM; 4) ve spesifik olmayan talamik (VM; 5) çekirdeklere taşır. S1 stellat hücreleri (S; 6) ve lokal GABAerjik internöronlar (I; 6) eşzamanlı olarak aktive edilir ve bu da iktojenik bölgedeki DDD'lerin aktivitesinin pozitif ve negatif kontrolünü sağlar. Talamik hücrelerin deşarjı, nRT'nin (7) GABAerjik nöronların geç ateşlemesi ile kısıtlanmış olmasına rağmen, talamo-kortiko-talamik döngülerdeki DDD'lerin kontrolüne katılır. Kortikal

ve talamik nöronların bu ardışık aktivasyonu aynı zamanda diğer hemisferde de meydana gelir ve nöbet aktivitesinin transkallozal etkileşimlerle hızlı bir şekilde jeneralize olması sağlanır.



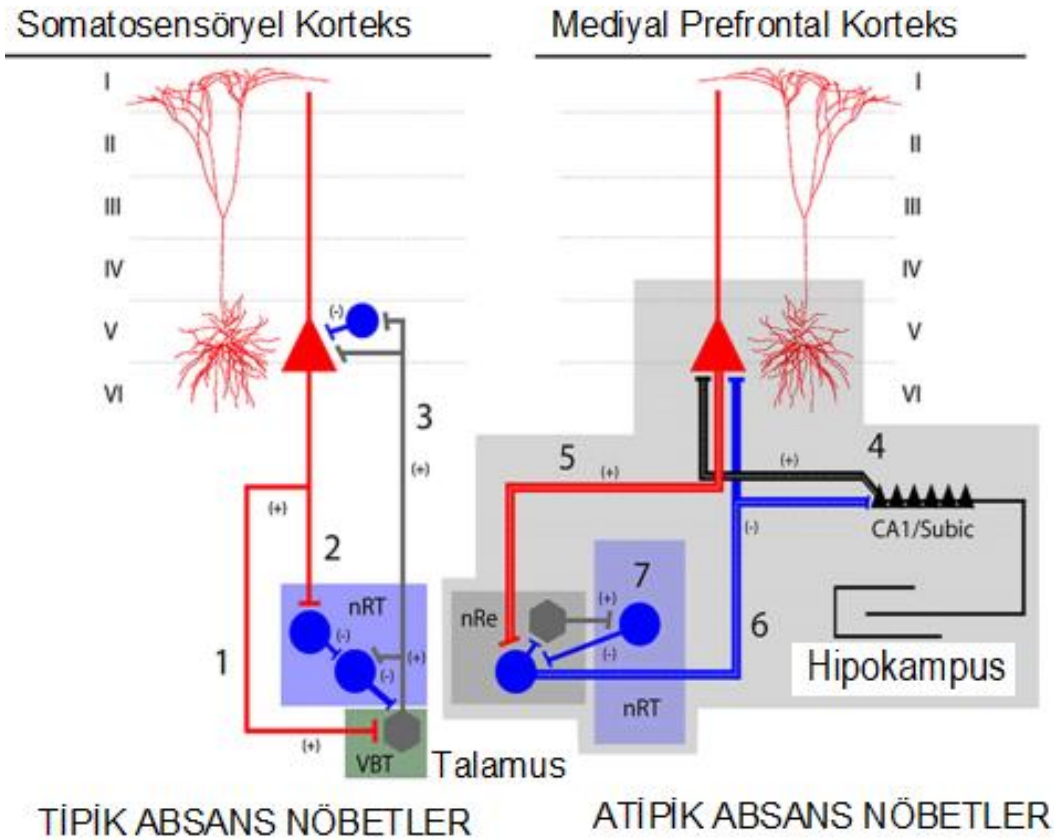
Şekil 2-5: Diken dalga deşarjlarında ana afferent-efferent bağlantılar.

Primer somatosensoriyel korteks (SoCx), piramidal nöronları (P) bağlan karmaşık sinaptik ağ çalışmalarından oluşur; GABAerjik interneronlar (I) ve farklı kortikal katmanlarda (solda) yerleşen stellat nöronları (S). Glutamaterjik (Glu) ve GABAerjik sinapsları sırasıyla gri ve siyah olarak gösterilmiştir (Lübke ve ark. 2007; Feldemeyer ve ark. 2013).

Talamo-kortikal (T-C) nükleusları (VPm, ventro-posteromedial; POm, posterior medial) birbirleri ile bağlantı halindedir (Şekil 2.5). Kortiko-talamik ve talamo-kortikal nöronlar nRT'nin GABAerjik nöronlarına bağlanır ve bu da talamo-kortikal hücreleri inhibe eder. SoCx ayrıca ipsi- (Ipsi C-T) ve kontra-lateral (Contra C-T) kortiko-talamik ağlar ile karşılıklı bağlantılar sağlar. WAG/Rij sıçanlarda yapılan bir çalışmada, spontan, genetik olarak belirlenmiş DDD'lerin önce somatosensöryel

kortekste başladığı, buradan talamusun çekirdeğine uğramadan önce hızla diğer kortikal bölgelere yayıldığı gösterilmiştir (Meeren ark. 2002). Benzer olaylar dizisi, 1-2,5 Hz'lik yavaş EEG DDD'leri sırasında, LENNOX-GASTAUT sendromunun iktal özelliklerini andıran durumlar kedilerde ortaya çıkarılmıştır (Neckelmann ve ark. 1998).

Elde edilen klinik ve deneysel bulgular, DDD'lerin tamamen senkronize ve jeneralize bir EEG paroksizmi olarak kabul edilen klasik görüşle çeliştiğini göstermiştir. Kedi ve sıçan genetik modellerinde yapılan çalışmalarda DDD sırasında korteksin V/ VI. Tabakalarına ait nöronlarından alınan intraselüler aktivite kayıtlarında bu aktivitelerin ana komponentinin ritmik depolarizasyonlar olduğu gözlemlenmiş ki bunların klasik olarak konvulzif epilepsi, West ile Lennox- Gastaut sendromlarındaki dalgalardan farklı olduğu bildirilmiştir (Ayala ve ark. 1983; Giaretta ve ark. 1987; Carpier ve ark. 1999). DDD'ler sırasında meydana gelen depolarizasyonlar biyofiziksel mekanizması bilinmeyen hiperpolarize edici katmanda ortaya çıkar. Bu depolarizasyonlarla ilişkili aksiyon potansiyelleri talamusa eş zamanlı ritmik ve senkronize girdiler sağlar. Nukleus retikularis talami (NRT) nöronlarında güçlendirilmiş ve senkronize DDD'lerin kortikal etkileri kesişen kortikotalamik girdilerle birlikte eksitator postsinaptik potansiyellerin (EPSP) patlamaları ile sonuçlanır. Bir önceki hiperpolarizasyonun yardımıyla, düşük eşikli (T-tipi) kalsiyum (Ca^{2+}) iyon potansiyeli (DTCP) ile her bir EEG diken dalgalarına karşılık gelen uzamış yüksek frekanslı aksiyon potansiyeli patlamalarına neden olmaktadır (Talley ark. 2000). Anormal ateşleme paternlerine, artmış düşük eşikli T-Tipi Ca^{2+} varlığı GAERS ırkı sıçanlar ile yapılan bir çalışmada gözlemlenmiştir (Tsakiridou ve ark. 1995). Genetik olarak belirlenmiş spontane aktivitelerin altında yatan kortikal anomaliler içerisinde, derin katmanları içeren N-metil-D- aspartat (NMDA) aracılı eksitasyonlar ya da II. ve III. Katmanlarda yer alan GABA aracılı inhibisyonların azalması da yer alabilmektedir (Pumain ve ark. 1992; Luhman ve ark. 1995). Absans nöbet fenotipleri devre bağımlıdır. Tipik absans nöbetler, talamokortikal bağlantılardan atipik nöbetler ise kortiko-talamo-hipokampal devrelerden üretilir ki atipik nöbetlerin kognitif etkileri bu döngü ile ilişkilendirilmektedir.



Şekil 2-6: Tipik absans epilepsi nöbetlerine ait nöronal döngüler (Wang ark. 2009; Han ark. 2012'den Türkçeleştirilmiştir).

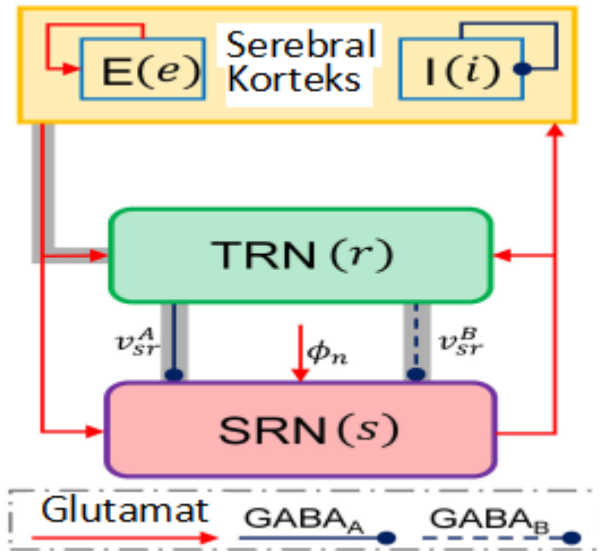
Nöbetlerin başladığı somatosensöryel korteksin perioral bölgesine ait V. ve VI. tabakalar arasındaki resiprokal bağlantıları, ventrobazal talamusu (VBT) (1 ve 3), talamusun kaudal retiküler çekirdeğini (nRT) (2). Kırmızı: Glutamaterjik nöronlar. Mavi: GABAerjik nöronlar. (-) İnhibisyonu gösterirken (+) uyarımı gösterir. nRT: Talamusun kaudal retiküler çekirdeği nRe: Talamusun çekirdeklerinin toplandığı bölgeyi içerir (Wang ark. 2009; Han ark. 2012'den Türkçeleştirilmiştir).

Öne sürülen hipoteze göre; sağda (Şekil 2.6) atipik nöbetleri başlatan epileptiform olayında, nöbetler mediyal prefrontal korteksin (mPFC) V. ve VI. tabakalarından köken alır ve daha sonra talamusun çekirdeklerinin toplandığı yerlere (nRe) (5) projekte olur ve buradan projeksiyonlar tekrar mPFC'ye geri döner. Buradan yine mPFC'ye geri dönmek üzere monosinaptik bağlantı ile hipokampusün CA1 (6) bölgesi ile ilişki kurulur (4). Bu yansıyan devre, nRE ve rostral nRT GABAerjik nöronlar arasındaki karşılıklı intratamamik bağlantılar tarafından modüle edilir ve yönlendirilir (Han ve ark. 2012). Döngü talamokortikal aktivitenin IV. tabakada yer alan nöronlara ulaşması ile tamamlanır ve son bulur.

Kortikotalamik ağların feed-forward inhibisyonları (FFI- Feed Forward Inhibition) ile ilgili olarak yapılan model çalışmalar ağ bağlantıları ilişkilerine daha ayrıntılı bir bakış açısı getirmiştir. Kortikotalamik (CT) sistemin biyofiziksel ortalama alan modelinin kullanıldığı modelde talamik FFI'ların absans nöbetlerin kontrolünde etkili olabileceği gösterilmiştir. Anatomik olarak Şekil 2.6'da açıklanan nöral projeksiyonlar ile birlikte talamik FFI'ler “**mikrodevre motifi**” olarak adlandırılır (Paz ve ark. 2015; Chen ve ark. 2017). Bu çalışmaya göre kortikotalamik ağda 4 ana nöral hücre popülasyonu yer almaktadır.

1. Eksitator piramidal nöron popülasyonu (e)
2. İnhibitör internöron popülasyonu (i)
3. Talamusun retiküler çekirdeği (TRN) (r)
4. Spesifik röle çekirdeği (SRN) (s)

Ağ içindeki bağlantılar (Şekil 2.7) genel olarak, eksitator glutamat ve inhibitör GABA tarafından yönetilir.



Şekil 2-7: Kortikotalamik ağın şematik çerçevesi (Chen ve ark. 2017'den Türkçeleştirilmiştir).

Solit ve kesik çizgiler TRN'den SRN'ye, sırasıyla $GABA_A$ (v_A sr) ve $GABA_B$ (v_B sr) sinapslarının aracılık ettiği projeksiyonları ayırmak için gösterilmiştir. SRN'ye spesifik olmayan eksternal bir girdi “ ϕ_n ” olarak belirtilmiştir. Gri gölgeli yollar talamik feed- forward inhibisyonları (FFI) işaret etmektedir (Chen ve ark. 2017'den Türkçeleştirilmiştir).

Şekil 2.7’de görüldüğü üzere talamik retiküler çekirdeğin (TRN) nöronları beyin korteksinden (Ctx) gelen uyarıcı sinyalleri alır ve her iki GABA aracılı inhibitör sinyaller talamusun spesifik röle çekirdeklerine (SRN) gönderilir. Bunlar ayrıca Ctx’den gelen uyarıcı sinyaller tarafından da yönlendirilir. GABA_A ve GABA_B inhibisyonlarının bağıl güçleri açısından her ikisi tarafından farklı zaman aralıklarında gerçekleştirilen baskılanma etkili bir mekanizma olabilir ve bu şekilde farklı nöron popülasyonları için çoklu ateşleme paternlerine neden olabilmektedir. Böylelikle mekanik olarak, bu çiftli baskılanma etkisinin kortikotalamik sistemde absans nöbetlerin başlamasından sorumlu olabileceği bildirilmektedir. Özet olarak bu mekanizmalarda serebral korteks ile talamik retiküler çekirdek (TRN) ve daha sonra doğrudan serebral korteks tarafından yönlendirilen talamusun SRN’ye giden yolağın kontrol mekanizmasına dahil olabileceği bildirilmiştir (Chen ve ark. 2017).

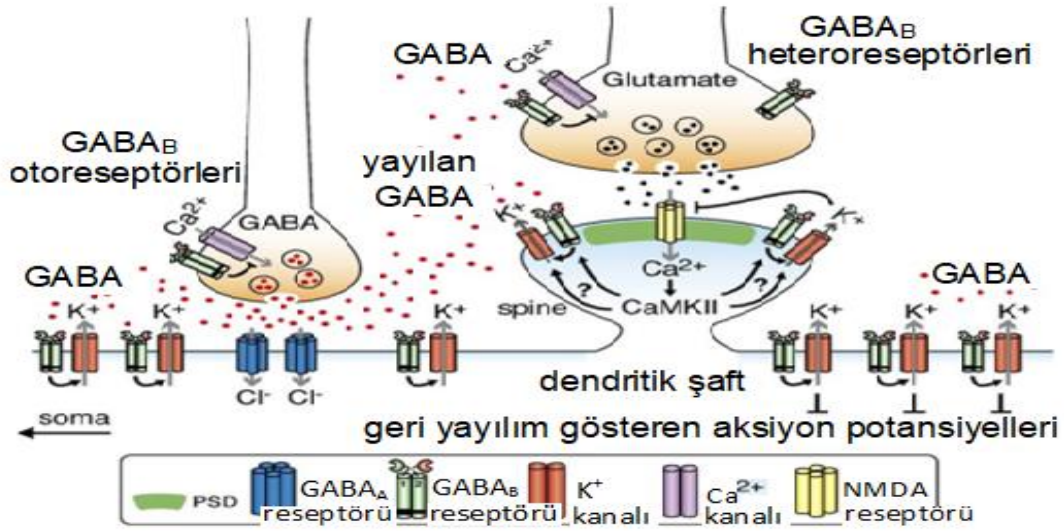
Daha ileri araştırmalar, TRN-SRN yolundaki GABA_A ve GABA_B aracılı inhibisyonların absans nöbetlerin düzenlenmesinde birlikte rol oynadığını göstermektedir. Hatta hem talamus hem de neokortekste FFI kaybının nöronların aşırı uyarılmasına ve epileptik nöbetlere neden olabileceği deneysel olarak rapor edilmiştir (Paz ve ark. 2015). Bunların dışında, yine bazal gangliyonların da GABAerjik olan nigro-talamik ve pallidokortikal yolları kullanarak absans nöbetlerin kontrolünü yaygınlaştırdığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Böylelikle, talamik FFI mekanizmalarının, absans nöbetlerin kontrolünde katkıda bulunan bir iç düzenleyici mekanizma olarak hizmet edeceği konusunda sezgisel bir anlayış sağlanmaktadır. Kortikotalamik sistemdeki bu etkileşimlerin engellenmesi DDD’lerin baskılanmasını sağlayabileceği ve bu sayede absans nöbetlerin önlenebileceği fikrini oluşturmaktadır (Chen ve ark. 2017).

Kortikal parvalbumin (PV) ve internöronlarda P/Q tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı (Cav2.1) kanal fonksiyonunun koşullu olarak ablasyonu sonucu neokortekste FFI mekanizmasının kaybına neden olduğu ve jeneralize nöbetlere yol açtığı bulunmuştur (Rossignol ve ark. 2013, Chen ve ark. 2017). Bu yönüyle de anti-epileptik ilaçların geliştirilmesine yönelik yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesine zemin hazırlayabilmektedir. Onun dışında yeni terapötik odakların keşfi açısından bu döngülerin nöbetlerin önlenmesi açısından önemi büyüktür. Örneğin, derin beyin stimülasyonu (DBS) epileptik nöbetlerin tedavisinde başvurulan cerrahi

yöntemlerinden bir tanesidir (Lega ve ark. 2010; Salanova 2018). Açıklanan yolların beyinin anatomik bölgelerine de bağımlı olması bu odaklar üzerinde özellikle en etkili odağın hem anatomik olarak bulunması hem de parametrelerine açıklık getirilmesine yönelik çalışmaların gerekliliğini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. En sık bildirilen doğrudan uyarım alanı, talamus olduğu söyleniyor ki deneysel kanıtlar, direkt olarak talamik stimülasyonlar ya da indirekt olarak farklı nöronal modülasyonların epileptik nöbetleri kontrol edebileceğini göstermektedir.

2.1.2.2.1. DDD'lerinin Hücresel Patofizyolojisi

GABA beyindeki ana inhibitör nörotransmitterdir ve hem ligand kapılı iyon kanallarını ($GABA_{AR}$ ve $GABA_{CR}$) hem de metabotropik G-protein bağlı reseptörleri ($GABA_{BR}$ 'ler) aktive edebilir. $GABA_{AR}$ ve $GABA_{CR}$ 'in aktivasyonu, klor (Cl^-) iyonlarının akışı ve hızlı inhibitör postsinaptik potansiyel (IPSP) üretimi ile sonuçlanır. $GABA_B$ reseptörü ($GABAB_R$), heteromultimer yapıda, R1a, R1b ve R2 olmak üzere 3 alt üniteye sahip metabotropik bir reseptördür. K-kanalı tetramerizasyon yapısı ile G-protein aracılı potasyum (K^+) kanalı elemanları aracılığıyla yavaş ve sürekli inhibitör yanıtları yönetir. Bu yönüyle yapılan deneysel modellerde, $GABAB_R$ agonistlerinin nöbetleri şiddetlendirdiği antagonistlerinin ise baskıladığı görülmüştür. Bu durum Lennox- Gastaut sendromunun atipik absans nöbetlerinin hem transgenik $GABA_R$ hem de AY-9944 (kolesterol sentez inhibitörü) modellerinin karakteristiğini yansıtmaktadır (Han ve ark. 2012).



Şekil 2-8: GABA_B reseptörlerinin lokalizasyonu ve fizyolojik rolleri (Han ve ark. 2012'den Türkçeleştirilmiştir).

PSD: Postsinaptik dansite

GABA_B reseptörleri presinaptik, postsinaptik ve ekstrasinaptik membranlar üzerinde yer almaktadır. Presinaptik GABA_B reseptörleri voltaja duyarlı Ca²⁺ kanallarının aktivitesini down- regüle ederek veya salınım mekanizmalarını doğrudan inhibe ederek nörotransmitter salınımını engeller. Şekil 2.8'de görüldüğü üzere, GABA_B otoresseptörleri GABA salınımını inhibe ederken, GABA_B heteroreseptörleri glutamat ve diğer birçok nörotransmitterin salınımını inhibe eder. Bazı GABA_B heteroreseptörleri ortamdaki GABA tarafından aktive edilirken, diğerleri de inhibitör terminallerden GABA yayılımı ile aktive edilebileceği bildirilmektedir (Han ve ark. 2012). Postsinaptik GABA_B reseptörleri membranı hiperpolarize eden Kir3-tipi K⁺ kanallarını aktive ederek baskılayıcı postsinaptik akımları (IPSC-Inhibitory Postsynaptic Currents) indükler, NMDA reseptörlerinin voltaja duyarlı magnezyum (Mg²⁺) bloğunu ve şanti uyarıcı akımları destekler. Yüksek frekanslı iletim sırasında GABA kendi salınımını GABA_B otoresseptörü üzerindeki bir etki ile bastırarak kontrol altına alır (Han ve ark. 2012).

Glutamaterjik metabolizmada ve sinaptik sinyallemede patojenik değişiklikler antiepileptiklerin genetik modellerinin SoCx'inde de bulunmuştur. NMDA'ya bağlı sinaptik yanıtlar GAERS'in neokorteksinde daha geniş çapta dağılmıştır ve daha uzun sürelidir (Pumain ve ark. 1992). Ayrıca GAERS'in SoCx'inde stargazing mRNA ve AMPA reseptör proteinleri, GluA1 ve GluA2'de bir artış ile birlikte (Powell ve ark.

2008) aşırı eksprese edilir ve epileptik patofizyolojide önemli bir rolü olduğu düşünülür (Kennard ve ark. 2011).

Absans epileptogenezde moleküler patofizyoloji çalışmalarında öne sürülen hipotezlerde, epileptogenezde iyon kanallarının defektlerinden bahsedilmektedir. Nöronal uyarılabilirlik ve aktivite artışından sorumlu olan voltaj-kapılı iyon kanalları ile sinaptik sinyalleme fonksiyonlarında ortaya çıkacak defektlerin SoCx ve çevresinde epileptik salınımlara neden olabileceği söylenmektedir. Özellikle, voltaj-kapılı sodyum (Nav1.1, Nav1.6) kanallarının mRNA'larının WAG/Rij SoCx'de artmış olduğu bulunmuştur (Klein ve ark. 2004). Diğer yandan, enflamatuvar mekanizmaların, edinilmiş fokal epilepsilerle ilişkili epileptogenezde kritik olduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerinde, glial hücrelerin ve interlökin-1 β gibi pro-enflamatuvar moleküllerin destekleyici rolünü gösteren birçok çalışma ileri sürülmüştür (Vezzani ve ark. 2010).

Epilepside astrosit metabolizmasında da değişikliklerin ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, astrositlerin katılımının epileptogenez ve olgunlaşma aşamasında farklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca epileptik hayvanlarda SoCx nöronlarının progresif eksitatibilitesine ve/veya sinaptik hasar sürecine astrositlerin katılıp katılmadığı yada katılıyorsa hangi aşamada ne zaman katıldıklarını belirlemek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır (Depaulis ve ark. 2018). Bunun dışında hem kanal yapıları ile hem de GABA reseptör ilişkili çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır (Tablo 2.3).

Tablo 2-3: Çocukluk çağı absans epilepsisi ile ilgili mutasyonlar (Crunelli ve ark. 2002'den Türkçeleştirilmiştir).

Reseptör veya kanal (gen)	Kromozomal lokus	Mutant protein etkisi	Pedigri	Fenotip	Referans
GABA_A Reseptör γ2 altbirim (GABRG2)	5q31.1-33.1 (R43Q)	BDZ aracılı GABA _A reseptörünün potansiyelizasyon kaybı GABA etkisi üzerinde etkisi yok	1 aile	7 CAE (önceki FS ile 6), 12 FS, 3 FS+, 7 ve daha şiddetli IGE / Diğer epilepsiler	Wallace ve ark. 2001
GABA_A Reseptör γ2 altbirim (GABRG2)	5q31.1-33.1 (K289M)	GABA etki kaybı BDZ aracılı GABA _A reseptörünün potansiyelizasyona etkisi yok	1 aile	13 FS, 7 GEFS+	Baulac ve ark. 2001
Gerilim kapılı Ca²⁺ kanal α1A alt birimi (CACNA1A)	19p13.2-13.1 (R1820dur)	Ba ²⁺ akım kaybı	1 vaka	Absans (CAE), ataksi; 3 ila 8 yaşarası GTCS	Jouveneau ve ark. 2001

BDZ: Benzodiazepin; CAE: Çocukluk çağı absans epilepsisi; FS: Ateşli nöbetler; FS+: Ateşli nöbetler artı; GABA: γ -aminobütrik asit; GEFS+: Febril nöbet jeneralize epilepsisi +; GTCS: Generalize tonik-klonik nöbetler; IGE: İdiyopatik jeneralize epilepsi.

Bulgular çok boyutlu ve sinerjik morfofonksiyonel özelliklere sahip SoCx'un derin katmanları içerisinde onları iktojenik nöronlar yapan bir nöron popülasyonunun varlığını göstermektedir. Bu nöronlar, fokal ve aynı zamanda uzun mesafe kortikal ve talamik projeksiyonlar ile uyarıcı ve piramidal tip nöronlardır ve Korteks ile talamusta postsinaptik hedeflerinin deşarjına yol açarlar. Bu ilk iki özelliğin kortiko talamik döngülerdeki nöbet aktivasyonunun başlatılmasını ve sürdürülmesini desteklediği düşünülür. Talamus ise hem iç düzenleyici mekanizma hem de bir modülasyon merkezi olarak görev alabilmektedir.

2.1.2.3. Absans Epilepsi Hayvan Modelleri

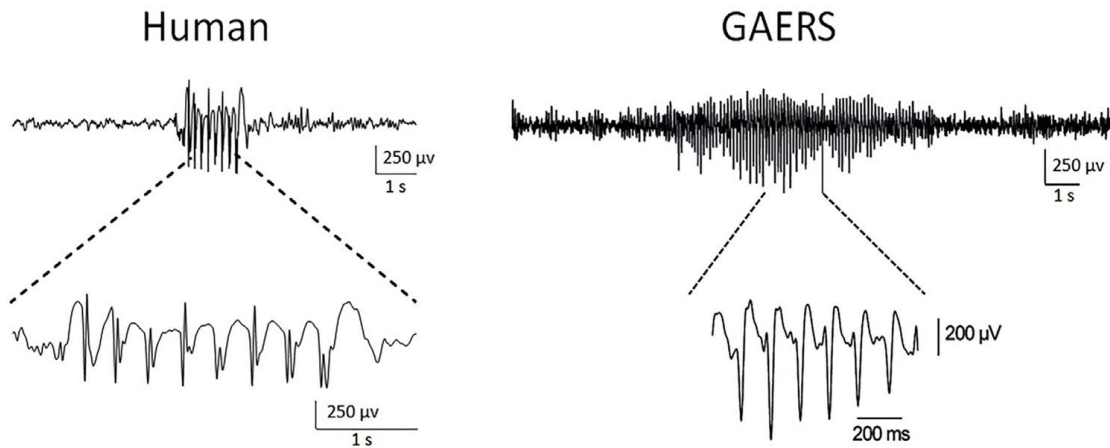
Absans epilepsi ile ilgili mevcut bilginin çoğu özellikle hayvan modellerinde ve daha spesifik olarak fare ve sıçanlardaki genetik modellerden elde edilen verilere dayanmaktadır. Bununla birlikte, bazı hastaların daha şiddetli fenotipler (örn. Bilişsel hasarlar, remisyon olmaması) geliştirmesi ve ilişkili beyin fonksiyonlarının mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ihtiyacı, antiepileptogenetik çalışmaları gerekli hale getirmektedir. Çalışılacak hayvan modelinin genetik olarak spontan epileptik olmasının yanında hastalığın hem klinik hem de doğal ortamına da daha yakın olması

bu alandaki çalışmalara eşsiz fırsatlar sunmakla kalmayıp, aynı zamanda insanda gözlenen absans epilepsinin patofizyolojisini ve evrimini anlamak için de ideal koşullar sağlamaktadır. EEG kayıtlarına dayanılarak davranışsal tutulum ile ilişkili spontan DDD'lerin oluşumunu gösteren sıçan ve farelerde farklı genetik modeller, tarif edilmiştir (Depaulis ve ark. 2018).

Bu modellerin absans epilepsinin anlaşılmasına katkıları 3 ana maddede toplanabilir:

1. Serbestçe hareket eden ya da hareketsiz hale getirilmiş hayvanlarda bir ömür boyunca düzenli olarak DDD'lerini kaydetme olasılığı,
2. Epileptik ve epileptik olmayan çizgiler arasındaki verilerin karşılaştırılması,
3. Nöbetlerin başlamasından önce epileptik hayvanları keşfetme olasılığı.

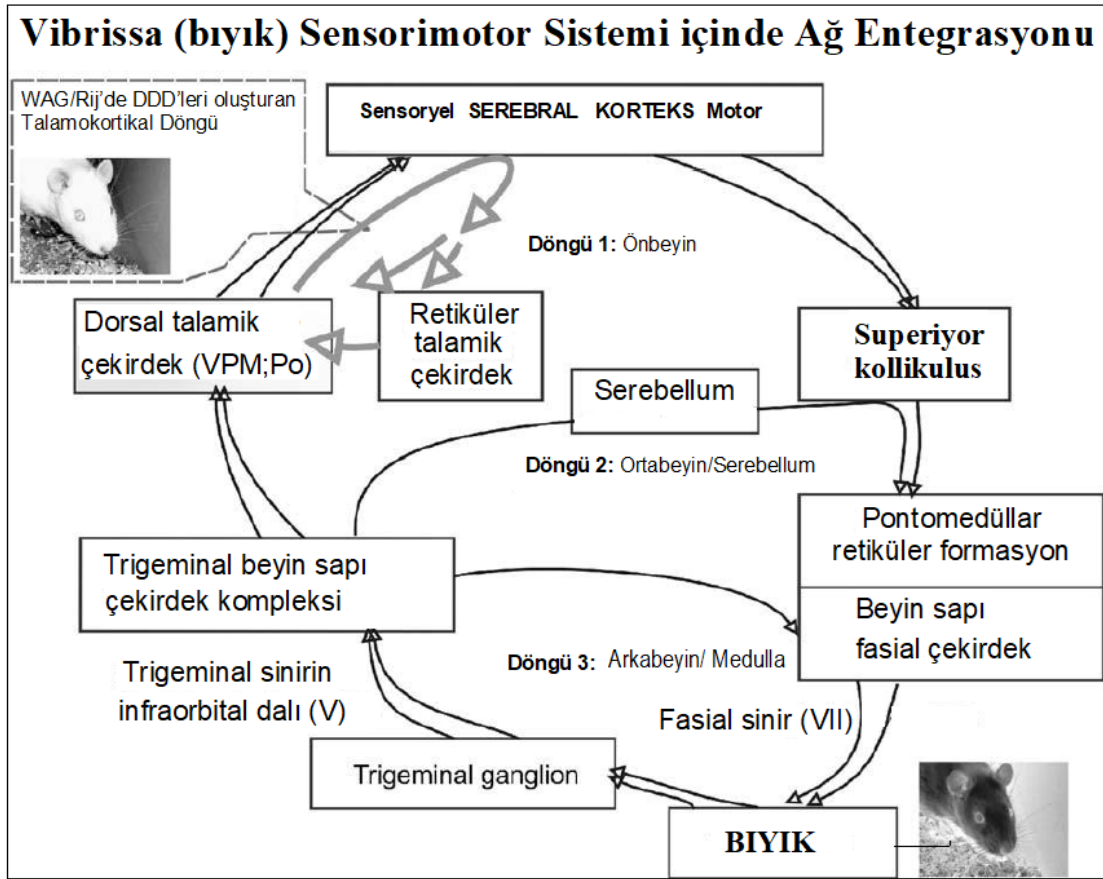
Bu modeller içerisinde en çok çalışılan WAG/Rij ile GAERS ırkı sıçanlardır. Monojenik mutasyonların tanımlandığı fareler daha çok absans epilepsinin patofizyolojisini anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu türlerde elektrofizyolojik yöntemler daha az tercih edilmiştir. Absans epilepsinin tüm genetik modellerinde, hayvanların parietal ve frontal kortekslerinden alınan EEG kayıtlarında, anormal bir arka plan aktivitesi üzerinde aniden başlayan ve biten bilateral ve senkronize DDD'leri sergiledikleri görülür (Şekil 2.9).



Şekil 2-9: İnsan ve kemirgen diken dalga deşarjları (Depaulis ve ark. 2018).

Şekil 2.9'da görüldüğü üzere, insan ve epileptik sıçanlarda (GAERS) EEG kayıtlarının yüksek (üst izler) ve düşük (alt izler) hızlarda karakteristik diken dalga paterni gösterme hızları, insanda ritmik 3 Hz civarında iken kemirgen modellerde 5 ile 9 Hz arasındadır.

GAERS sıçanlarda insanlarda olduğu gibi postiktal depresyon yoktur. Bu modellerde, türler ne olursa olsun, DDD'leri 5 ila 9 Hz arasında bir frekansa ve 1 saniyeden 60 saniyeye kadar bir süreye sahiptir. Bazı modellerde (örneğin, GAERS, WAG/Rij, Stargazer), diken dalga (DD) frekansı DDD'lerin başlangıcında daha yüksektir (sıçan modellerinde 11 Hz'e kadar), DDD'lerin başlangıcından birkaç saniye sonra 7–9 Hz'lik bir serbestlik genellikle gözlenir. Bu, DDD'lerinin altında yatan nöronların ateşleme dinamiklerini yansıtabilir ve DDD'lerinin ilk birkaç saniyesinde farklı devrelerin hızla kuvvetlenebileceği öne sürülmektedir. DDD'leri “davranışsal tutukluk” olarak adlandırılan hayvanların hareketliliğinin kesintiye uğramasıyla ilişkilendirilir. Hem farelerde hem de sıçanlarda bıyıkların ve/veya çene kaslarının ritmik seğirmesi de sıklıkla görülmektedir. Hem GAERS hem de WAG/Rij'de elektromiyografi (EMG) ölçümleri, DDD'leri sırasında boyun kas tonusunun azaldığını ve sonunda devam ettiğini göstermiştir. Bazı hayvanlarda, zaman zaman dilin dışarıya çıkması ve hafif çiğneme hareketleri gözlemlenebilmektedir. Antiepileptiklerin en önemli özelliklerinden biri olan DDD'ler sırasında ortamdaki kopma durumu, bir fare ya da gıda motifi üzerinde ya da pozitif motive edilmiş davranış testi kullanarak hem GAERS hem de WAG/Rij sıçanlarda ele alınmıştır. Diğer veriler, WAG/Rij'in absans epilepsili çocuklarda klinik verilerle uyumlu olarak DDD'ler sırasında geçen zamanı doğru olarak değerlendirmede göstermiştir (Depaulis ve ark. 2018).



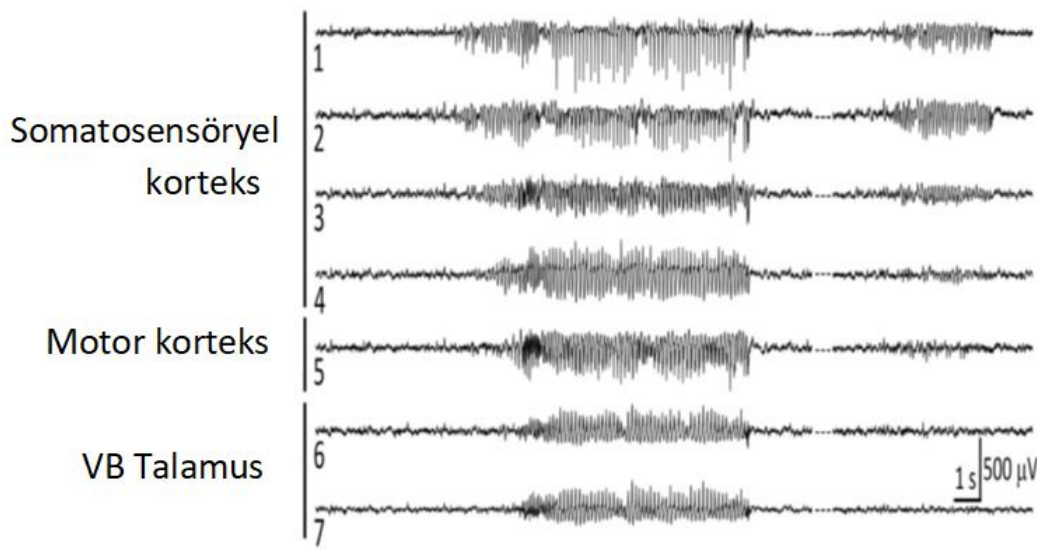
Şekil 2-10: Kemirgenlerde, arka beyin, serebellar ve kortikal döngüleri içeren trigeminal sistem (Kleinfeld ve ark. 1999'dan Türkçeleştirilmiştir).

WAG/Rij DDD tutan talamo-kortikal devre Şekil 2.10'da kalın gri oklarla gösterilmektedir. Bu devre bir ön beyin döngüsüne (Döngü 1) yerleştirilmiştir, bu nedenle, DDD'lerinin ana yolları büyük ölçüde vibrissa sensorimotor sisteminin ön beyin yapılarını kullanır. Şema trigeminal osilatör sistemin ana yollarını göstermektedir. Kısmen DDD'lerin oluşturulduğu kortikotalamo-kortikal döngü ile örtüşür (Sitnikova ve ark. 2004).

2.1.2.3.1. Tipik Absans Nöbetleri ile İlişkili Hayvan Modelleri

Tipik Absans epilepsi, uzun süreli generalize nonkonvulsif epileptik nöbetlerin prototipik formu olarak kabul edilmiştir. Hastalarda ve hayvan modellerinde yapılan son araştırmalar, bu nöbetlerin serebral korteksin sınırlı bölgelerinden kaynaklandığını göstermektedir. Bununla birlikte, nöbet başlangıcının hücresel ve lokal ağ süreçleri tam olarak bilinmemektedir. GEARS'lerde nöbetlerin yüz somatosensör korteksinden

kaynaklandığı gösterilmektedir (Şekil 2.11) ve epileptik deşarjların bu kortikal bölgenin V. ve VI. tabakasındaki nöronlarında başlatıldığı bildirilmiştir (Polack ve ark. 2007). Membran depolarizasyonuna bağlı belirgin bir hiperaktivite gösteren bu nöronlar, epileptik süreç sırasında uzak kortikal nöronların ateşlenmesine yol açar. İktojenik özellikleri ile tutarlı olarak, bu odaktan gelen nöronlar, epileptik forma dönüşen interiktal ve preiktal salınımlar sergilerler. Bu sonuçlar, absans epilepsinin “fokal hipotezini” doğrular ve absans nöbetlerin başlatılması ve generalize olması için hücrel bir senaryo yaratır (Polack ve ark. 2007).



Şekil 2-11: Yüz somatosensör korteksinde diken dalga deşarj'larının başladığını gösteren çok aşamalı elektrot EEG kaydı (Polack ve ark. 2007'den Türkçeleştirilmiştir).

2.1.2.3.1.1. Strazburg'dan Genetik Absans Epileptik (GAERS) Irkı Sıçan Modeli

Bu kemirgen modeli, normal bir arka plan EEG üzerinde aniden başlayan ve sonlanan 7-11 Hz'lik spontan DDD'ler ile karakterizedir. Bu deşarjlarla kilitlenen zamana ait iktal olay, hareketsizlik ve donakalmaktır. GABA ve γ -Hidroksibütirik asit (GHB), GAERS'lerde oluşan DDD'lerinde kritik bir rol oynamaktadır, ancak bunlar ayrıca pentilentetrazol (PTZ), 4,5,6,7-tetrahidroizoksazolo (5,4-c) piridin-3-ol (THIP) ve penisilin ile daha da şiddetlenmektedir (Marescaux ve ark. 1992). DDD'leri fasial somatosensör korteksinden köken alır ve her iki hemisfere yayılır. Nöbetler, GABA_AR ve GABA_BR agonistlerinin yanı sıra fenitoin ve karbamazepin ile güçlendirilirken etosüksimid benzodiazepinler ve GABA_BR antagonistleri tarafından bloke edilen

klasik bir farmakolojik profile sahiptir. GABA_BR antagonistleri ile tedavi edilen sıçanlarda bilişsel performansta artış sağlanmıştır (Getova ve ark. 1997; Polack ve ark. 2007).

2.1.2.3.1.2. WAG/Rij Irkı Sıçan Modeli

WAG/Rij ırkı sıçanlar, tipik absans epilepsi nöbetlerinin modellenmesinde GAERS'ten sonra yaygın olarak kullanılan genetik sıçan modelidir. GAERS modelinde olduğu gibi karakteristik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. WAG/Rij modelindeki DDD'leri somatosensöryel kaynaklı olmasına rağmen uyku DDD'lerindeki iğler (spindle) ile arasında bir ayrım vardır (Meeren ve ark. 2002; Han ve ark. 2012). Talamus içinde bilateral 7–11 Hz'lik DDD'yi uyku (spindle) dalgalarının oluşumu retiküler çekirdeğin (RTN) rostral kutbundan kaynaklandığı söylenebilir (Meeren ve ark. 2009; Han ve ark. 2012). Çoğu GABA_BR'nün R1 alt birimi için mRNA seviyeleri WAG/Rij sıçanların neokorteksinde azalırken R2 altı birimi için değişmemiştir. R1 alt birimleri bu modelin neokortikal piramidal hücrelerinin distal dendritlerinde lokalize olmazlar ki bunlar neokortikal hipereksitabiliteye katkıda bulunabilecek değişikliklerdir (Merlo ve ark. 2007; Han ve ark. 2012). RTN ve ventroposteromedial talamik çekirdek aktiviteleri, WAG/Rij'daki DDD'lerinin başlangıcından önce birleştirilir, bu da DDD'lerin bir araya getirilmiş delta-teta aktivitesinden türeyebileceğini ve nöbet başlangıcının, intrakortikal ve kortiko-talamik ilişkilerin güçlendirilmesi gerektiğinin bir göstergesidir. WAG/Rij sıçanların nöronlarınca üretilen ve farmakolojik olarak izole edilmiş uyarıcıya bağlı IPSP'yi bastırmak için daha yüksek dozlarda baklofen gerekmektedir (Han ve ark. 2012). Yapılan çalışmalar bu modelde presinaptik olarak GABA_BR'lerin aktivitesinin düşürülmesi, neokortekste hipereksitabiliteye katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Inaba ve ark. 2009).

2.1.2.3.1.3. GHB (gamma- hydroxybutiric acid) Uygulanmış Rodent Modeli

Bu modelde bilateral 7-9 Hz'lik DDD'leri talamokortikal döngüden kaynaklanır ve G-protein aracılı mekanizmalar, DDD'lerin patogenezinde rol oynar (Snead 1992; Han ve ark. 2012). GHB'nin büyük olasılıkla presinaptik GABA_B reseptörü olarak (Snead ve ark. 1996; Perez ve ark. 2007; Han ve ark. 2012) rol oynadığı söylenir. Tipik absans nöbetlerin diğer hayvan modellerine benzer şekilde GHB uygulanmış sıçanda hipokampusta DDD'leri görülmez. GluR2 alt biriminin

GHB'nin neden olduğu absans nöbetlerin başlatılmasında ve sürdürülmesinde rol oynayabileceğine dair bazı çalışmalar mevcuttur (Hu ve ark. 2001).

2.1.2.3.1.4. Letarjik (lh/lh) Fare Modeli

Letarjik (lh/lh) fare modelinde GABA_BR antagonistleri nöbetleri bastırırken, GABA_BR agonistleri alevlendirir. lh/lh farelerde absans nöbetlerin ifadesinde olası rol alan GABA_BR'i, GABA_BR'nin aktivasyonu ile disinhibisyona neden olabilir (Lin ve ark. 1993). Bu modelde talamokortikal bölgelerde absans nöbetlerin oluşturulmasında ve/veya yayılmasında rol oynayabilecek DNA-bağlanma aktivatör protein 1 (AP-1) ile nükleer cAMP elementlerinin artmış olduğu bildirilmiştir. GABA_BR antagonistleri ile yapılan çalışmalarda GABA_BR aracılı sinaptik yanıtların bu farelerde absans nöbetlere neden olabileceğini düşündürmüştür (Hosford ve ark. 1999).

2.1.2.3.2. Atipik Absans Nöbetler ile İlişkili Hayvan Modelleri

2.1.2.3.2.1. AY- 9944 Uygulanmış Rodent Modelleri

AY-9944, özellikle beyin gelişimi sırasında önbeyin bölgelerinde GABA_BR'in ekspresyon seviyelerini artıran bir kolesterol sentez inhibitörüdür. AY-9944'ün kemirgenlere uygulanması ile edilen modelde atipik absans nöbetleri taklit eden bir nöbet fenotipi üretilir. DDD ve iktal olay arasında sıkı bir on-off ilişkisinin bulunduğu tipik absans nöbetler ile ilgili olan modellerin aksine bu fenotipte, hayvanın hareket edebileceği yavaş DDD'leri 4-5 Hz'den oluşur. Ayrıca AY-9944 modelinde tipik absans nöbetlerin hayvan modellerine aykırı olarak, yavaş olan DDD'leri hipokampustan kaydedilebilir. Diğer bir fark ise, bu modellerde kognitif bozukluklara da rastlanılmasıdır. AY-9944 modelindeki nöbetler spontan, tekrarlayan şekildedir ve ömür boyu devam etmektedir (Huo ve ark. 2009). AY-9944, puberte öncesi atipik absans nöbetlerin başlangıcında ve yetişkinlikte maksimum seviyeye ulaşır.

2.1.2.3.2.2. Absans Nöbetlere ilişkin Transgenik Fare Modelleri

Bu modeldeki transgenik fareler R1a GABA_BR alt tipini aşırı şekilde eksprese ederler. Nöbet paternleri; tekrarlayan, spontan, bilateral, senkron özellikte ve 3-6 Hz'lik (Tablo 2.4) yavaş DDD şeklindedir. Absans nöbetleri etosüksimid tarafından bloke edilirken baklofen tarafından artırılır. Deşarjlar, bakakalma, yüzdeki miyoklonus ve bıyık seğirme gibi absans benzeri davranışlarla uygunluk gösterir. Bununla birlikte, AY-9944 modeline benzer şekilde ve tipik absans epilepsi modellerinin aksine, bu

fareler iktal olay sırasında hareket eder, hem talamokortikal hem de limbik devrede yavaş DDD'leri gösterir, hipokampal sinaptik bozukluk sergilerler. Plastisite ve öğrenme yeteneği önemli ölçüde etkilenmiştir. Absans nöbetlerin şiddeti transgenik fare modelinde GABA_BR alt birimine özgüdür (Han ve ark. 2012).



Absans epilepsi ile ilgili “stargazer fare modelinde (monojenik mutant fare modeli/genetik fare modeli) yapılan bir çalışmada nöbetler sırasında özellikle EEG ile aynı anda 2-foton mikroskop teknolojisi ve ardından yapılan patch-clamp yöntemleri kullanılarak görsel kortekste yer alan nöronların ateşlemesi incelenmiştir. Bu çalışmada nöbetler sırasında görsel kortekste nöronların ateşlenmesinde baskılanma olduğu ve böylece normalde beklenen nöron senkronizasyonunun olmadığı anlaşılmış bu da özellikle absans epilepside nöbet ile birlikte görülen çevreye karşı duyarsızlık ile ilgili önemli bilgiler sunabileceği düşüncesini oluşturmuştur. Aynı çalışmada nöronal aktivitenin nöbetten çok kısa süre öncesinde azaldığı ortaya konmuş ve gözlemlenen hipoaktifitenin nöbeti tahmin etmede bir veri olarak kullanabileceği fikrini vermiştir (Meyer ve ark. 2018). Diğer bir çalışmada KBB'de ilaçların etki mekanizmasını önemli derecede sınırlandıran ve uygulanan ilacın KBB'den tekrar kana geri gönderilmesine neden olan P-gp'ye karşı nanoteknolojiden yararlanılmıştır. Bu çalışmada P-gp inhibitörü olan verapamilin, nanopartikül ile konjuge edilen ve antikonvülzan olarak kullanılan karbamazin (CBZ) ilişkisi epileptik bir rat modelinde (isoniazid ile indüklenmiş) çalışılarak, verapamilin enkapsüle olan CBZ'nin etkili dozunu yaklaşık %30 oranında azalttığı ve CBZ'nin nanopartikül (poloksamer 188-kaplı PLGA nanopartikülü) formülasyonu ile antikonvülzan etkinin yaklaşık olarak 30 kat daha arttığı görülmüştür. Böylece ilacın ekstraselüler ortama geri gönderilmesi ile oluşan ilaca karşı direnç mekanizmasına açıklık getirilmiştir ve hedefe yönelik tedavi anlamında önemli bir adımdır (Zybina ve ark. 2018).

Hiperpolarize aktive edilmiş sıklık nükleotit kapılı (HCN) kanalları, nöronların uyarılabilirliğini ve elektriksel yanıtını kontrol etmede rol oynarlar. Yapılan çalışmalarda absans epilepsi sıçan modellerinde, bir HCN kanalının alt tipi olan HCN1'in fonksiyon bozukluğu veya ekspresyonu bulunmuştur. HCN1 eksikliğinin sıçanlarda absans epilepsisine neden olup olmadığını değerlendirmek için, transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleaz mutajeneziyle HCN1 nakavt sıçanlar geliştirilmiştir. Aynı şekilde HCN1 nakavt fare ile karşılaştırıldığında absans epilepsinin gelişmediği ve bu iki tür arasında farklılıkların olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak daha fazla çalışmalara ihtiyaç olduğu ve bu duruma açıklık getirilmesi gerektiği çalışmalarda belirtilmiştir (Nishitani ve ark. 2018).

2.1.2.4. Davranışsal Etkiler

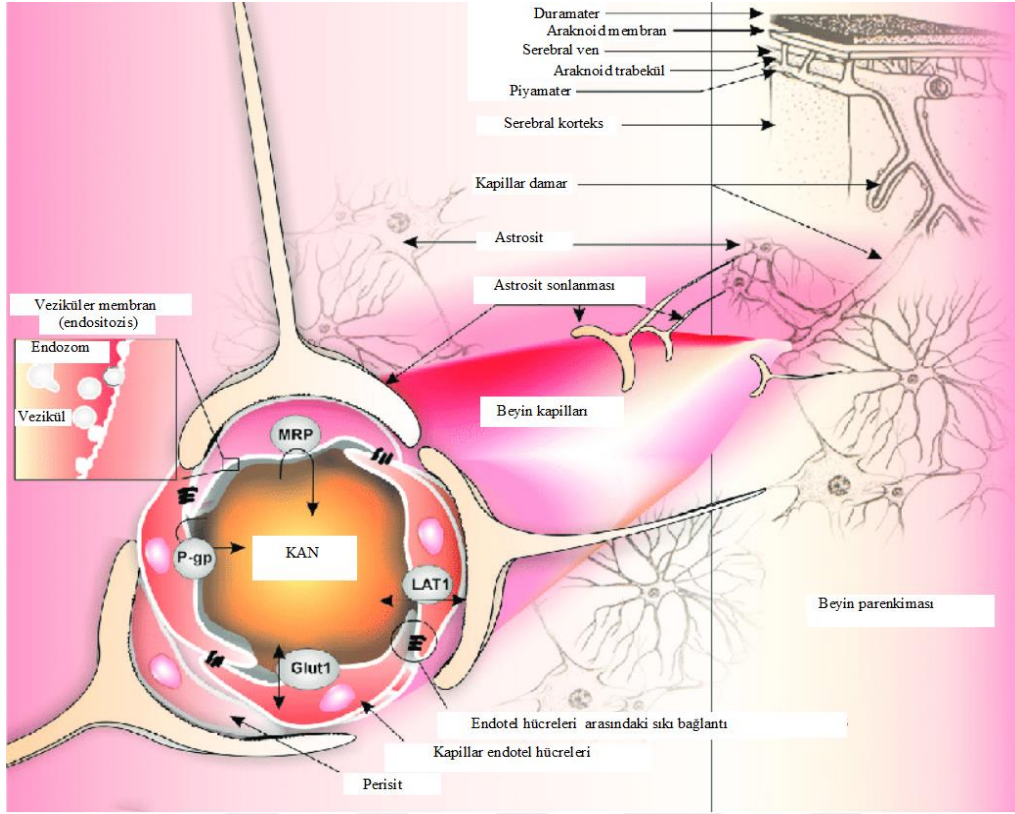
Kognitif bozukluk epilepsiye en fazla eşlik eden bozuklulardan bir tanesidir (Santini ve Pascal 2013). Özellikle çocukluk çağı epilepsisinde; olumsuz davranışlar, psikiyatrik, dil ve kognitif bozukluklar (dikkat problemleri, kaygı, depresyon, sosyal izolasyon ve düşük özgüven dahil) gibi yüksek derecede komorbidite oranları görülmektedir (Wirrell ve ark. 1997; Caplan ve ark. 2008; Vega ve ark. 2011). Absans epilepsinin davranış üzerindeki potansiyel etkisi hem GAERS hem de WAG/Rij ırkı sıçanda çalışılmıştır. Nonepileptik sıçanlarla karşılaştırıldığında, GAERS ve/veya WAG/Rij sıçanları, spontan lokomotor aktivite, beslenme, sosyal etkileşimler ve kaçınma davranışlarında bir fark göstermemiştir. Bununla birlikte sakkaroz tüketiminde azalma, yüksek anksiyete, zorlaştırılmış yüzme testinde immobilizasyon ile uzun süreli hafıza testinde azalmaya dikkat çekilmiştir (Sarkisova ve van Luijteleaar 2011). DDD oluşumunda Limbik sistem rol oynamaktadır. Çocukluk çağı absans epilepsisinde tüm beyin alanlarında fonksiyonel aktivite artışı kaydedilmiştir. Bu aktivite artışına bağlı olarak; limbik bölgeler, temporal lob ve talamokortikal yapıların birbiri ile ilintili olduğu çalışmalarda bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında, absans nöbetlerde limbik bölgelerin bu süreçlere tamamı ile iştirak ettiği sonucuna varılmıştır (Jean-Baptiste ve ark. 2013).

2.2. Beyin Bariyerleri

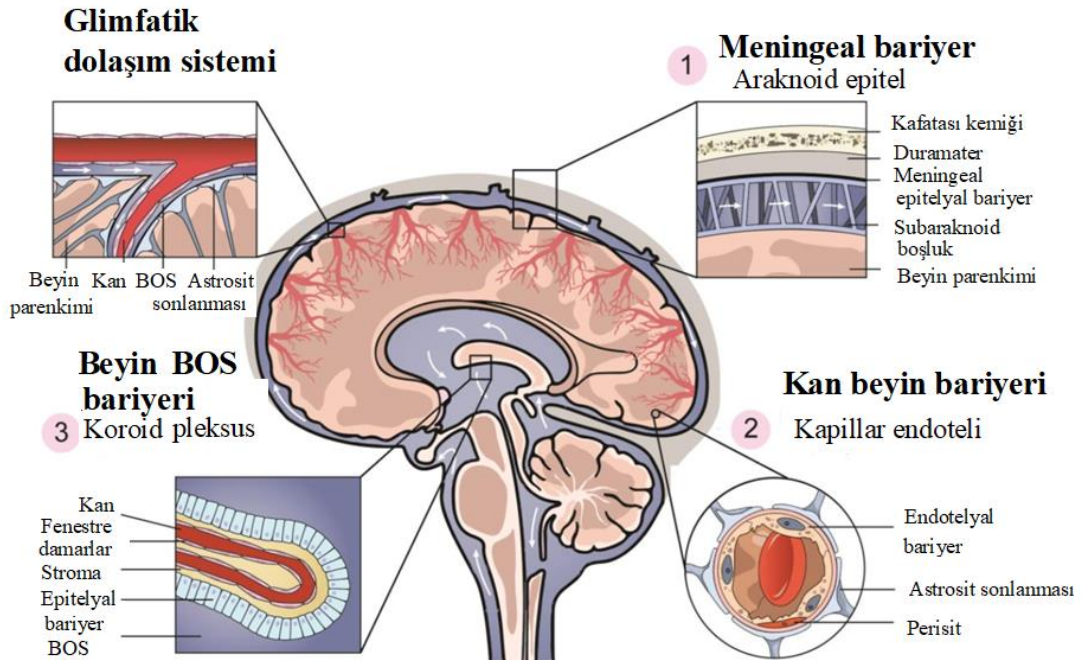
Merkezi sinir sistemini (MSS) korumakla görevli bariyer sistemleri (Şekil 2.13); KBB, araknoid bariyer ve koroid pleksustaki epitel hücrelerinden modifiye olan endim hücreleri tarafından oluşturulan kan-beyin omurilik sıvı bariyeri (Şekil 2.13) şeklinde sıralanabilir. Beyin kan damarlarının endotel hücrelerince oluşturulan KBB kan ile beyin dokusu arasındaki madde geçişini kontrol ederek nöronal homeostazın sağlanması ve devam ettirilmesi görevini üstlenir (Kaya ve Yılmaz 2018). KBB'nin endotel hücreleri, elemanı olduğu nörovasküler ünitenin (Şekil 2.12) diğer hücrelerini oluşturan perisit, astrosit, mikrogliya, oligodendroglia ve nöronlarla haberleşme halindedir. Diğer yandan, nöronal ağdaki anormal ve aşırı aktivasyon sonucu nöbetlerin ortaya çıkması ve epileptogeneze varan süreçlerle ilgili patofizyolojik mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, KBB'nin bu süreçlerde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, KBB'nin fonksiyonlarında meydana gelen değişikliklerin nöbet oluşumunda temel nedenlerden biri olup olmadığı veya nöbet

sonucunda bozulan KBB'nin nöbet sıklığının ve şiddetinin artmasına yol açıp açmadığı tam olarak açığa kavuşmuş değildir (Kaya ve Yılmaz 2018). Yapılan çalışmalar, KBB hasarının bazı nörodejeneratif hastalıkların belirtilerinin öncesinde şekillendiği konusunda önemli bulgular vermiştir. Bununla ilgili olarak beyin kapillar hasarı çalışmasında; Alzheimer ile ilişkili kognitif bozukluklarda ortaya çıkan belirtilerin öncesinde nörovaskülarizasyon bozuklukları ile KBB'deki hasarlanmasının erken evrede başlaması ve etkilerin amyloid- β proteini ($A\beta$) ve mikrotubul ilişkili proteinleri (tau) ile hangi düzeyde olduğu; nöropatolojik, nörogörüntüleme ve BOS analizleri ile gösterilmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışma, KBB ile ilişkili perisitler, çözünür trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü-8 ile 18 ve BOS biyobelirteci ile dinamik kontrastı arttırılmış manyetik rezonans görüntüleme sistemi ile desteklenmiştir. Böylece, Alzheimer Hastalığı gibi hastalıklarda, hastalığın ana göstergelerinden ($A\beta$ ve tau proteini gibi) bağımsız olarak şekillenen ve hastalığa ait bilinen klasik patofizyolojik süreçlerinin aksine, insanların hipokampuslerinde, beyin damarlanma bozuklukları ile KBB'deki hasarlanmanın erken evre "biyobelirteç" olabileceği fikrini vermiştir (Nation ve ark. 2019).

KBB merkezi sinir sistemindeki fizyolojik fonksiyonların sürdürülebilirliği için gerekli olan bir difüzyon bariyeridir. Bu bağlamda, transsellüler ve ve parasellüler taşıma sistemleri ile beyine madde geçişini sınırlar. Ayrıca, KBB'nin endotel hücreleri, üzerine oturdukları bazal lamina, perisit, astrosit, mikrogliya ve nöronlar ile fizyolojik ve farmakolojik olarak koordineli bir işbirliği içinde çalışarak beyni potansiyel nörotoksik maddelerden korur. Taşıyıcı protein ve reseptörler ile de içerdiği birçok spesifik yapılar ile özellikle transsellüler yolu kullanarak beyinin ihtiyacı olan maddelerin beyin parankimine geçişini kontrol eder (Kaya ve Yılmaz 2018).



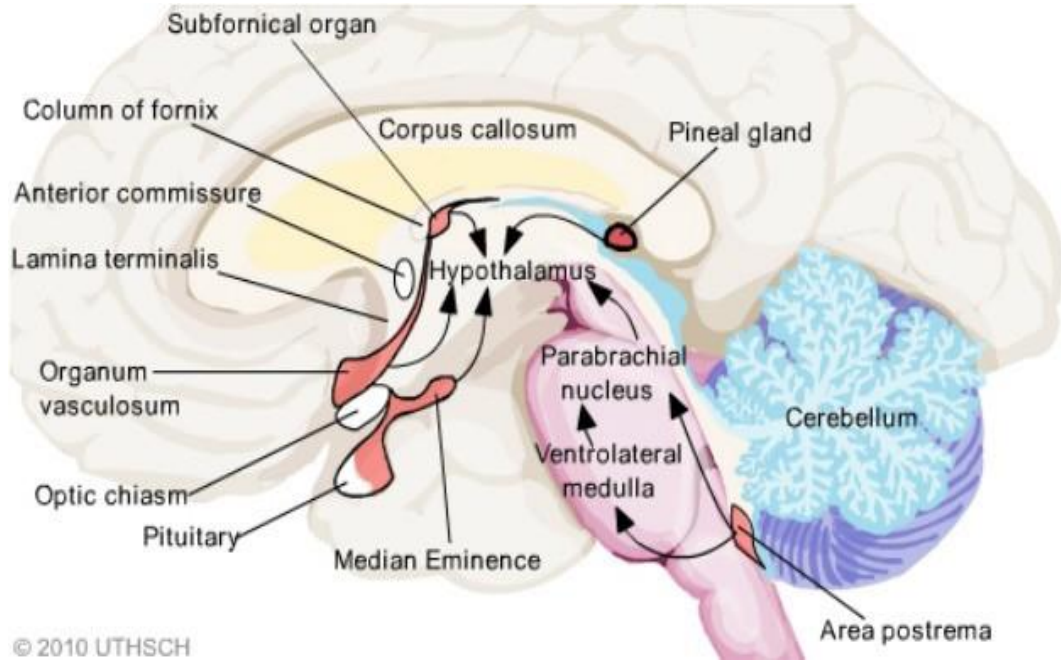
Şekil 2-12: Kan-beyin bariyeri dahil nörovasküler ünitenin görünümü (Barar ve ark.2016'dan Türkçeleştirilmiştir).



Şekil 2-13: Kan-beyin bariyeri ve beyinin diğer bariyerleri (Stock ve ark. 2017'den Türkçeleştirilmiştir).

2.2.1. Beyinde Bariyer Özelliği Olmayan Alanlar

Beyinde vasküler bariyer yapılarının bulunmadığı bölgeler mevcuttur. Bunlar area postrema, median eminens, nörohipofiz, pineal bez, subfornikal organ ve lamina terminale'stir (Kaya ve Yılmaz 2018). Beklentilerin aksine, MSS'nin beyin ventriküler ve sirkumventriküler alanları gibi bir bariyere maruz kalmadan fayda sağlayan bölgeleri vardır (Şekil 2.14). Beyinde ventriküler sistem dört boşluktan oluşur. Bunlar iki lateral ventrikül ile BOS üretilmesinden sorumlu koroid pleksus ve kapiler damarları içeren üçüncü ve dördüncü ventrikülden oluşur. Diğer önemli yapılar, üçüncü ve dördüncü ventrikül duvarlarını çevreleyen sirkumventriküler organlardır. Bu yüksek derecede vaskülarize edilmiş yapılar, fenestre edilmiş kapiler damarlara ve kan akımı ile beyin parankiması arasında doğrudan alışverişe izin veren zayıf bir astrositik temasa sahiptir. Yapılan çalışmalarda yükleri ve taşıma mekanizmaları ile ilişkili olarak NP'lerin intravenöz enjeksiyonunu takiben KBB dahil KBB bulunmayan bölgelerde ve özellikle ventrikül hipokampus ve kortikal tabakada difüzyon yolunun kullanarak biriktiği gözlemlenmiştir ki, bu alanların yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde kullanılacak ajanların beyine ulaşmada alternatif bir uygulama yolu olabileceğini düşündürmüştür (Xin ve ark. 2012).

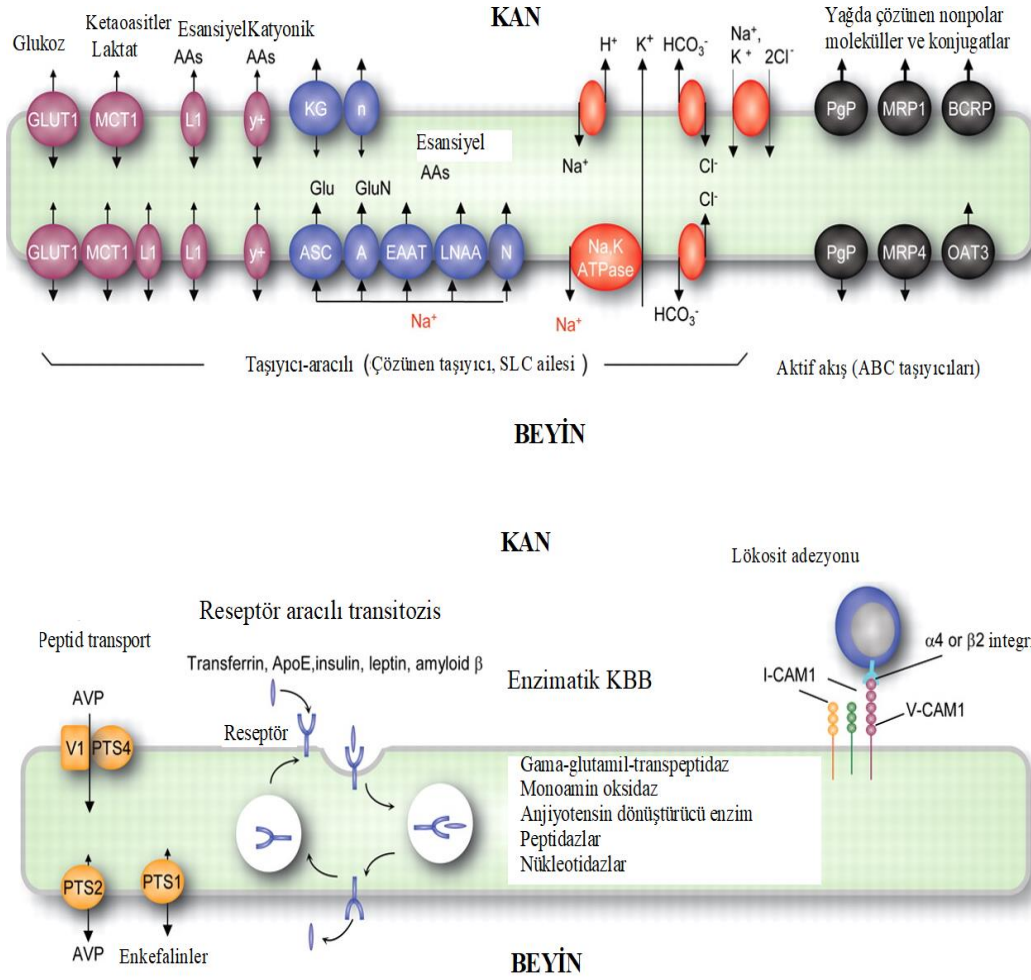


Şekil 2-14: Beyinde bariyer olmayan yapılar

<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s4/chapter11.html>

2.2.2. Kan-beyin Bariyerinin Bağlantı Yapıları

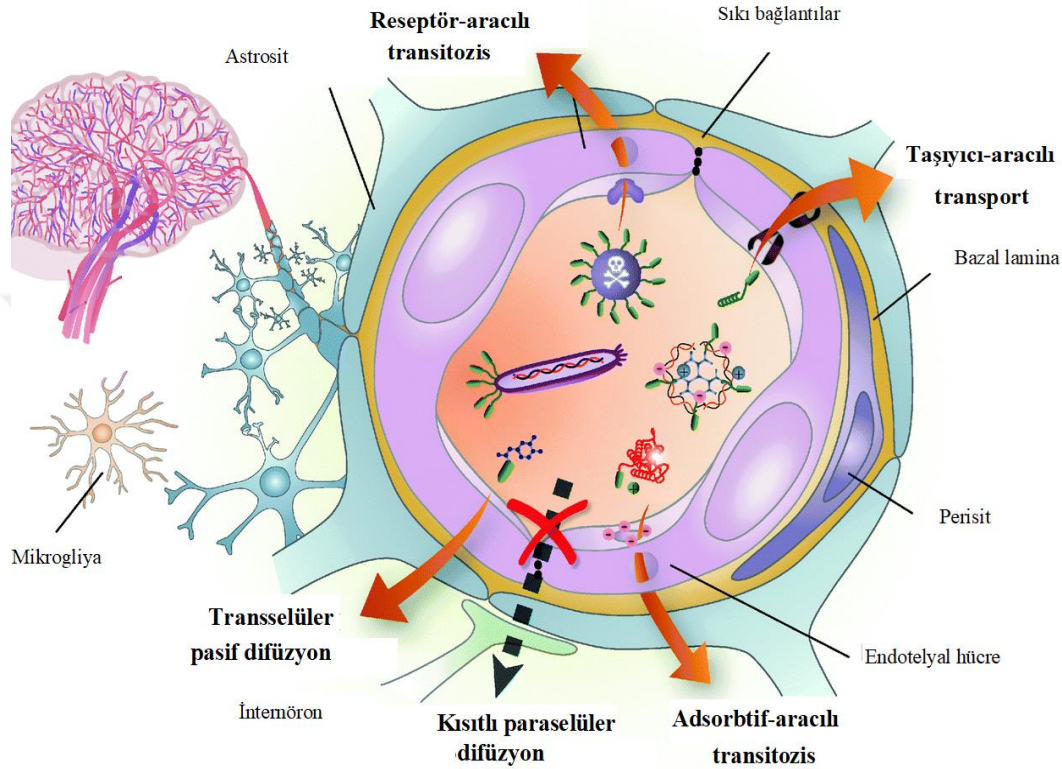
Bariyer nitelikteki beyin kapiler kan damar endotel hücrelerinin sıkı bağlantıları (TJ-Tight junction) ile bağlandıkları, fenestra yapıları içermedikleri ve çok az miktarda pinositik veziküllere sahip oldukları bilinmektedir (Coomber ve Stewart 1985; Poduslo ve ark. 1994; Engelhardt ve Sorokin 2009; De Bock ve ark. 2016; Kaya ve Yılmaz 2018). Bu sınırlama TJ bölgelerindeki transendotelial elektriksel direnci periferik kan damarlarının endotel hücrelerinde ölçülen 2-20 ohm.cm² değerinin üzerine pial damarlarında 1500 ohm.cm², parankimal kan damarlarında ise 8000 ohm.cm² değerlerine ulaştırır (Smith ve Rapoport 1986; Butt ve ark. 1990). KBB'nin endotel hücreleri üç önemli bariyer sistemine sahiptir. Bunlar, endotel hücreleri arasındaki TJ yapılarının oluşturduğu *fiziki bariyer*, suda eriyen besinlerin ve metabolitlerin taşınmasında rol oynayan *taşıma bariyeri* ve endotel hücrelerinin sitoplazmik alanında bulunan *enzimatik bariyerlerdir* (Şekil 2.15) (Abott ve ark. 2010; Daneman ve Prat 2015). Endotel hücrelerinin arasındaki sıkı ve adherens bağlantıların oluşturduğu yapılar fiziki bariyer işlevi görerek hidrofilik özellikteki iyon, makromolekül ve diğer yüklü partiküllerin beyine geçişini sınırlar.



Şekil 2-15: Beyin endotel bağlantı yapıları ve transport sistemleri (Benarroch 2012'den Türkçeleştirilmiştir).

Sıkı bağlantıların oluşturduğu parasellüler yolun aksine, transsellüler yol aracılığı ile oksijen, karbondioksit, barbitürat ve etanol gibi lipofilik moleküller kolaylıkla endotel lipid membranlardan difüze olurlar (Grieb ve ark. 1985). Bariyer tipteki beyin kan kapiler endotel hücrelerinin luminal ve abluminal tarafında bulunan taşıyıcı proteinler kan ve beyin parankimi kaynaklı maddelerin çift yönlü taşınmasında görev alırlar (Şekil 2.16) (Mittapali ve ark. 2010). Taşıyıcı proteinlerin taşıma işlevi aktif ve/veya kolaylaştırılmış difüzyon mekanizmaları ile sağlanır. Böylece glukoz ve aminoasitler endotel hücre membranında yerleşik taşıyıcı proteinler aracılığı ile taşınırken; insülin, leptin ve transferrin gibi büyük moleküller reseptör aracılı transitozis ile hücreye alınırlar (Şekil 2.15 ve 2.16) (Zhang ve Pradridge 2001). Bu taşıyıcı veya reseptör nitelikteki proteinler başlıca lipoproteinler monokarboksilat, nötral aminoasit, Toll benzeri glukoz taşıyıcıları, mannoz-6-fosfataz, albümin,

transferrin, tümör nekroz faktör (TNF)-alfa ve interlökin (IL)-1 reseptörlerinden oluşmaktadır (Serlin ve ark. 2015; Campbell 2016; Kaya ve Yılmaz 2018). Peptid ve protein gibi büyük molekül ağırlıklı hidrofilik moleküller genelde spesifik reseptör-aracılı veya adsorptif-aracılı transitozisle taşınırlar.



Şekil 2-16: Beyin endotel hücresinde ilaçların taşınma mekanizmaları

<http://riteshbawri.com/drugs-and-your-blood-brain-barrier/> 'den Türkçeleştirilmiştir.

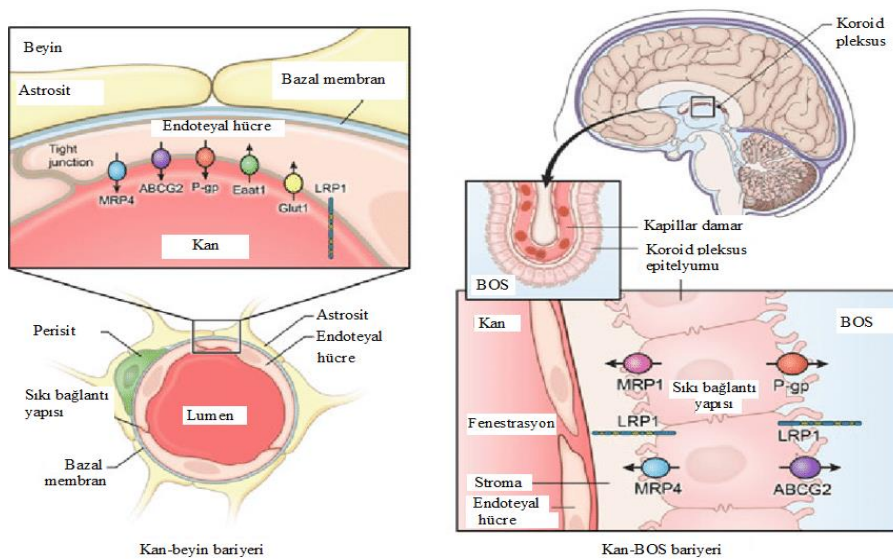
Fizyolojik koşullarda, TJ'lar aracılığı ile sağlanan parasellüler taşımadan ziyade endotel hücre membranında gerçekleşen transsellüler yolun daha aktif olduğu ileri sürülmektedir.

Bariyer tipteki kan kapiler damar endotel hücrelerinin hem luminal hem de abluminal yüzeylerinde bulunan ve KBB'nin endotel hücre sitoplazmasına geçen kan kaynaklı maddelerin tekrar kana geri gönderilmesinde iş gören tek yönlü çalışan pompalar mevcuttur. Bunlar başlıca çoklu ilaç direnç geni (MDR)-1, göğüs kanseri direnç proteini (BCRP) ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (MRP)'lerden (Şekil 2.17) oluşur. P-glikoprotein olarak tanımlanan MDR-1 yapımının dirençli epilepsi ve tümör vakalarında arttığı ve substratları olan antiepileptik ilaçları tekrar kana

pompaladıkları birçok çalışmada gösterilmiştir (Potschka ve ark. 2001; Abbott ve ark. 2002; Liu ve ark. 2012).

Bariyer tip endotel hücrelerinin adherens ve TJ yapılarında yer alan proteinler; okludin, kladin-1, 3, 5 ve 12 ile zonula okludens 1, 2 ve 3'ten oluşurken, singulin gibi birçok yardımcı protein bu yapıya destek vermektedir (Luissint ve ark. 2012; Tietz ve Engelhardt 2015; Kaya ve Yılmaz 2018). Bu proteinlerin anatomik ve fonksiyonel özellikleri sayesinde endotel parasellüler geçişi sıkı bir şekilde kontrol ederek hidrofilik ilaçların bu yolla beyine geçişini sınırlandırır.

Bariyer tip kan damarları ile beyin parankimi arasında sağladığı hücresel etkileşimler ile önem kazanan nörovasküler ünitenin yapısına katılan perisitler, endotel hücrelerinin yüzeyini sararak bu hücrelere anatomik destek verir. Anjiyogenezis süreçlerine de katılan perisitler yeni endotel hücreleri ile şekillenen kapiler damar oluşumunda rol alır ve bu damarların da bariyer tipte olması için destek sağlar (Hirschi ve D'Amore 1997; Balabanov ve Dore-Duffy 1998; Kaya ve Yılmaz 2018). Perisitler aynı zamanda KBB geçirgenliğini kontrol eder, parankimal alandaki nörotoksinlerin temizlenmesine yardımcı olur ve beyin kan akımının düzenlenmesi ile multipotent kök hücre potansiyeline de sahiptir (Mäe ve ark. 2011; Jessen ve ark. 2015; Ueno ve ark. 2016). Bunların yanında beyindeki komşu hücrelere fiziksel, biyokimyasal ve metabolik destek veren astrositler; nöronların yanında kapiler damar endotel hücrelerinin fonksiyonlarını da module edebilirler (Abbott ve ark. 2006; Kaya ve Yılmaz 2018).



Şekil 2-17: Beynin bariyeri ve glimfatik dolaşım sistemleri (Basseville ve ark. 2016'dan Türkçeleştirilmiştir).

Astrositler embriyonal dönemde KBB'nin yapı ve karakterlerinin oluşmasına katkıda bulunurken, erişkin dönemde bu yapının bütünlüğünün devam etmesi için hem TJ hem de taşıyıcı proteinlerin yapımını uyarır (Alvarez ve ark. 2013). Astrositlerin sahip oldukları uzantılarının sonlanma bölgelerinde fazla miktarda aquaporin-4 su kanal proteini sentezleyerek “glimfatik sistem” (Şekil 2.13) yoluyla perivasküler alanın temizlenmesinde önemli görevlere sahip oldukları düşünülmektedir (Iliff ve ark. 2012; Jessen ve ark. 2015; Ueno ve ark. 2016; Kaya ve Yılmaz 2018).

Endotel hücreleri, perisit ve astrositler kendi aralarındaki karşılıklı fizyolojik ve farmakolojik sinyal iletileri aracılığıyla KBB'nin fonksiyonunu düzenlerler. Perisit ve astrositler hem kapiler yatakta yeni damarlanmanın oluşmasında hem de mevcut ve yeni oluşan kan damarlarında bariyer özelliklerinin oluşması ve korunmasında görev alırlar. Astrositler, endotel hücrelerini birbirlerine bağlayan TJ bölgelerinin sıkı bir şekilde birbirlerine tutunmasına katkı vererek KBB bütünlüğünün korunmasına destek verirler. Ancak, KBB'ye doğrudan katkısının hangi boyutta olduğu henüz net olarak ortaya konulmamıştır. Beyin korteksindeki kan damarlarının endotel hücrelerini çevreleyen astrosit sonlanmalarının lazer ablasyon tekniği ile hasara uğratılmasına karşın, hasarın olduğu yerde endotel yapı bütünlüğünün bozulmadığı *in vivo* görüntüleme sistemi ile ortaya konulmuştur (Kubotera ve ark. 2019). Bahsedilen çalışmada, damar yapısının Evans blue (EB) ve dekstran ile konjuge floresan izotiyosiyanat (FITC) boya ile boyanması sonucunda astrosit sonlanmalarının ablasyonunun olduğu bölgelerde boyaların endotel yapılarından sızıntı oluşturmadığı görülmüştür. Ayrıca, immünohistokimya tekniklerinin de kullanıldığı yukarıdaki çalışmada, ablasyonun olduğu yerde hem reaktif hem de reaktif olmayan astrositlerin belirli bir zaman sonrasında kesilen bölgeye gelerek ayak sonlanmalarını tekrardan oluşturdukları da gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, astrosit sonlanmalarının KBB yapı bütünlüğünde direkt olarak fiziksel bir bariyer teşkil etmediği konusunda bir sonuca varılmıştır (Kubotera ve ark. 2019).

Astrosit, mikrogliya, lökosit ve hatta bariyer tipteki endotel hücrelerinden salgılanan bir çok sitokin ve diğer immün aktif maddeler KBB'nin fonksiyonlarını module edebilir, KBB'nin bütünlüğünü ve taşıyıcılarının miktarını değiştirebilir, patojenlere ve dolaşımdaki immün hücrelere karşı daha geçirgen hale getirebilir. KBB'nin sağlamlığını ve fonksiyonunu bozan başlıca ajanlar; TNF- alfa, proteazlar ve serbest radikallerdir (Abbott ve ark. 2006; Kaya ve Yılmaz 2018). Bunun aksine,

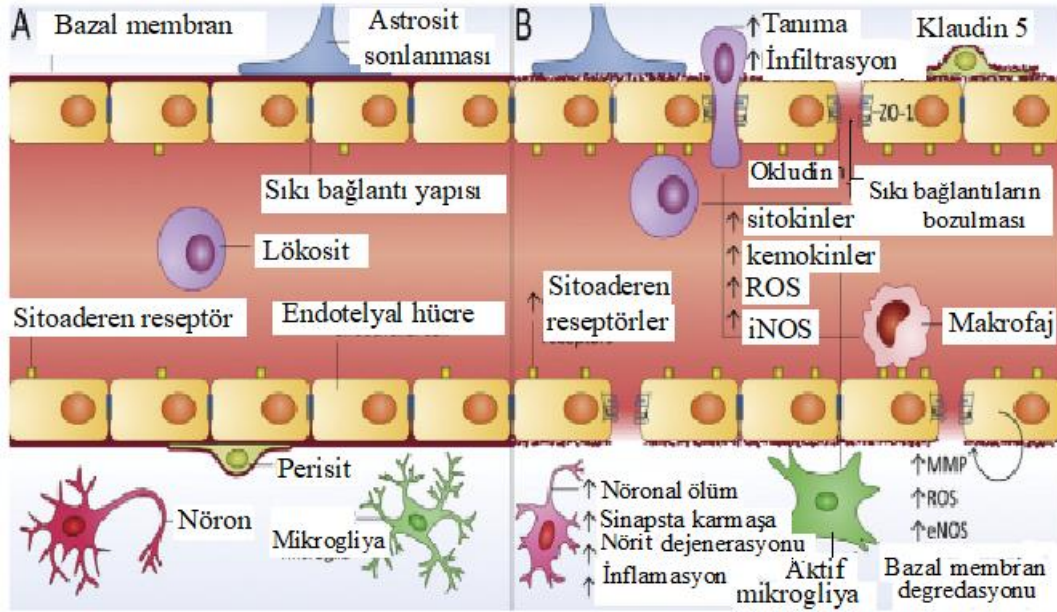
KBB'nin sağlamlığını artıran ajanlar ise; steroidler, hücre içi sıklık amino monofosfat (cAMP) artışı ve adrenomedulindir.

2.2.3. Epilepsi ve Kan-Beyin Bariyeri

Epilepside nöbet aracılı KBB disfonksiyonuna yol açan mekanizma (lar) yeterince anlaşılamamıştır, fakat son bulgular epilepsi etiyolojisi ve patolojisinin sadece nöronal disfonksiyona dayanmadığını; değişmiş bağışıklık yanıtın, glial disfonksiyonun, kalıcı beyin enflamasyonunun ve disfonksiyonel bir KBB'nin de epilepsi patofizyolojisinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Vezzani ve Granata 2005; Saraiva ve ark. 2016). Kan-beyin bariyerinin bozulması ile beyin kan kaynaklı maddelerin geçişinin arttığı bilinmekle birlikte KBB'deki geçirgenlik artışının da epilepsi nedenlerinden biri olabileceği ileri sürülmektedir. Nöbetlerin ortaya çıkışında da KKB'nin neden yada sonuç olarak bu süreç içerisinde yer alabilmektedir (Friedman 2011; Kaya ve Yılmaz 2018). Ayrıca, birçok araştırma bariyer zayıflığının hem sonuç hem de nöbet tetikleyicisi olduğunu göstermiştir (Marchi ve ark. 2012). KBB'de gözlenen işlev bozukluğunun kritik bir bileşeni olan beyin kapiler kan damarı yapılarında meydana gelen zayıflığın nöbetlerin daha da artmasına neden olduğu ileri sürülürken, ortaya çıkan nöbet şiddetindeki artışın da bariyer sızıntısını yönlendirdiği ve pozitif geri besleme döngüsüyle nöbet oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmada bariyer kaçığının potansiyel olarak refrakter epilepside antiepileptik ilaç direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Marchi ve ark. 2012). Bu araştırmacılara göre, albümin gibi serum proteinleri sızıntı yapan bir bariyerdan beyine girdikten sonra beyin parankimindeki antiepileptik ilaçlara bağlanır ve serbest bağlanmamış antiepileptiklerin beyin konsantrasyonunu düşürmek suretiyle beyindeki seviyelerini sınırlayarak antiepileptik ilaçların etkinliğini azaltır.

Kan-beyin bariyeri patolojilerinde glukoz taşıyıcı-1 (GLUT-1) eksikliğinin patolojik olarak beyin enerji seviyeleri ve fonksiyonu ile etkileşime girdiği ve bozulmuş olan KBB yapısı ile birlikte nöbetleri teşvik ettiği de ileri sürülmüştür (Janigro 1999; Kaya ve Yılmaz 2018). Diğer yandan beyin enflamasyonu, transkripsiyonel değişiklikler, astrogliosis ya da K^+ tamponlanmasındaki sorunlar gibi astrosit aktivitesini değiştirebilecek durumlar ve perisit aktivitesindeki değişiklikler nedeniyle meydana gelen KBB zayıflaması sonucunda uyarılabilirliğin artması ve

epilepsinin ortaya çıkması mümkün olabilmektedir (Şekil 2.18) (Kim ve ark. 2012; Weissberg ve ark. 2015; Kaya ve Yılmaz 2018).



Şekil 2-18: Kan-beyin bariyerinin bileşimi ve patolojik koşullarda oluşan ana değişiklikler (Saraiva ve ark. 2016'dan Türkçeleştirilmiştir).

A. KBB, TJ'ler ile yüksek oranda bağlanmış vasküler endotelial hücrelerden ve perisit katmanından oluşur. Bir bazal membran ve bir astrosit sonlanma endotel tabakasını çevrelemektedir. Nöronlar ve mikroglialar da fizyolojik koşullarda KBB bütünlüğünün sağlanmasında önemlidir.

B. Patolojik koşullarda, Şekil 2.18'de görüldüğü üzere KBB geçirgenliği artar. Matris metaloproteinaz (MMP) aktivitesindeki artış, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri endotelial hücrelerden endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) veya mikroglia /makrofaj hücrelerinden üretilmiş indüklenebilir NOS (iNOS) yoluyla bazal membran bozulmasına neden olan aktif mikroglia/makrofajlar aracılığı ile sitokinlerin ve kemokinlerin salınması ile TJ'lerin bozulmasına (okludin, zonula okludens (ZO-1 ve claudin 5 bütünlüğünde) ve bir enflamatuvar yanıtı yol açmaktadır. Tüm bu olaylar nöroenflamasyon, lökosit alımı ve beyin parankimi istilası, nöronal disfonksiyon ve nörodejenerasyon ile sonuçlanır (Saraiva ve ark. 2016).

Son çalışmalarda nöbetler sırasında salınan glutamatın bariyer tip endotel hücrelerinde MMP ekspresyonu ve aktivite seviyelerini arttırdığını, böylece bariyer sızıntısına katkıda bulunduğu varsayılmaktadır. Nöbetler sırasında salınan glutamatın, MMP-2 ve MMP-9 protein ekspresyonu ve aktivite seviyelerinde bir artışa işaret ederek KBB sızıntısı ile sonuçlandığına dair deney hayvanı çalışmaları hipotezi destekler niteliktedir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada nöbetlerin, MMP seviyelerini artıran ve TJ protein ekspresyon seviyelerini azaltarak bariyer sızıntısına neden olan, sitozolik fosfolipaz A2 yoluyla glutamat sinyalinin içeren bir yol ile

tetiklendiği gösterilmiştir (Rempe ve ark. 2018). Nörovasküler ünite MMP'lerin muhtemelen beyin kapiler damarlarını çevreleyen hücre dışı matrisi sindirerek ve yeniden düzenleyerek endoteli kaplayan TJ proteinlerini parçalayarak bariyer bütünlüğünü etkilemektedir (Lischper ve ark. 2010).

2.2.4. Kan-Beyin Bariyerinde İlaç Taşınımı

Başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere, beyin kaynaklı çeşitli bozuklukların tedavisi ile ilgili olarak birçok ilaç geliştirilmesine rağmen şu ana kadar etkin bir ilaç tedavisi sağlanamamıştır (Saraiva ve ark. 2016). Bununla birlikte, yeni moleküllerin sunulması ya da süregelen, yani daha önce var olan moleküllerin rehabilitasyonunu sağlayacak olan ilaç aktarımı en önemli çözümlerden biri olarak görülmektedir (Dwibhashyam ve ark. 2008). İlaç bağlı ANP'lerin özellikle deney hayvanı olarak genetik absans epilepsi modelinde kullanılacak olması, daha önce ilaç bağlı ANP'nin bu modelde çalışılmamış olması, bu çalışma ile projedeki verilerin birbirini teyit eden teknikleri içermesi proje sonuçlarının tıp alanında yeni bir tedavi yönteminin geliştirilmesine zemin hazırlaması açısından özgün olacağı düşünülmektedir. Beyinde nöronların optimal şartlarda çalışmasını sağlayan bariyer tipteki beyin kan damarlarının endotel hücreleri sahip oldukları özel bir taşıma sistemleri ile ancak 500 Da'dan daha küçük ve lipofilik yapıdaki moleküllerin geçişine izin vermektedir (Abbott ve ark. 2010; Boyer ve ark. 2014). Bariyer tip endotel hücrelerine ulaşan maddeler küçük molekül ağırlıklara sahip olsalar bile, eğer endotel hücre zarının başlıca luminal tarafında bulunan ve tek yönlü çalışan p-gp gibi pompalar tarafından tanınırlarsa hemen kana geri gönderilirler (Saraiva ve ark. 2016). Sonuç olarak, bariyer tipteki endotel hücrelerinin membranında sentezlenen P-gp, sistemik olarak uygulanan ilaçların beyine ulaşmasını çok büyük oranlarda sınırlandırır (Wanek ve ark. 2013). Çalışılan hayvan modellerinde P-gp'nin Phenitoin, Phenobarbital ve Levetiracetam gibi antiepileptik ilaçların eliminasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Volk ve Löscher 2005).

Tek yönlü çalışan p-gp gibi pompaların etkinliğini azaltmak veya devre dışı bırakacak tarzda ilaçların beyinde konsantrasyonunun artırılmasına yönelik bazı stratejiler geliştirilmiştir (Dwibhashyam ve ark. 2008). Bunlar başlıca; lipofilik analogların oluşturulması, ön ilaç kullanımı, kimyasal ilaç aktarımı, moleküler paketleme, taşıyıcı aracılı ilaç transportu, reseptör-vektör aracılı ilaç transportu

şeklinde sıralanan ve KBB geçirgenliğinin ilaç manipülasyonu ile artırılması şeklindeki metodolojik yaklaşımlar olarak sıralanabilir. İlaçların beyine etken dozda aktarımında önerilen metodolojiler arasında osmotik, biyokimyasal veya ultrasound dalgalarının kullanımı ile KBB yıkılması metodları gelmektedir (Cho ve ark. 2002; Dwibhashyam ve ark. 2008; Zhang ve ark. 2014). Son olarak nazal yolu kullanarak olfaktor ve trigeminal sinir üzerinden beyine ilaç aktarımı, intraventriküler/İntratekal aktarım veya interstisyel alana ilaç aktarımları şeklinde özetlenebilir (Thorne ve ark. 1995; Sakane ve ark. 1995; Marianecchi ve ark. 2017).

Yukarıda bahsedilen metodolojik yaklaşımların yanında, çeşitli patolojiler neticesinde KBB'de şekillenen modifikasyonların iyi bir şekilde anlaşılması NP gibi hem çok yönlü hem de gelecek vadeden moleküllerin beynin kolay olarak ulaşılabilen ve zarar görmüş bölgelerine ulaştırılmasında hedefe yönelik yenilikçi bir yaklaşım geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Nanotıp alanındaki gelişmeler, KBB'den ilaçların daha etkin bir şekilde geçişine yönelik yeni platformların oluşturulmasını sağlamıştır (Guerrero ve ark. 2010; Shilo ve ark. 2014; Umlauf ve Shusta 2019).

Şekil 2.20'da görüldüğü üzere nanotaşıyıcılar şekil, büyüklük, hidrofobik yapıları (hidrofobisite), kaplama, kimyasal ve yüzey yapıları açısından kendilerini modifiye edebilme ve özellikle reseptör aracılı yolları aktive edebilme yetenekleri dolayısıyla; beyin bariyerlerinden ilaçların transportunu sağlamada mükemmel bir sistem haline gelmiştir. Nanotaşıyıcılar sayesinde ilaçların beyine aktarılmasında ilaç modifikasyonuna gerek duyulmamaktadır. Ayrıca nanotaşıyıcıların kullanımı; hidrofilik moleküllerin dahi hem kan-beyin hem de beyin-omurilik sıvısı bariyerlerinden difüzyonunu kolaylaştırır. Bu sayede hücre spesifitesi artırılarak geçiş sınırlandırıcı transport moleküllerinin “by pass” edilmesi sağlanabilir. İlaç ya da diğer biyolojik aktif moleküller bu nanotaşıyıcılar içerisinde çözünebilir, enkapsüle edilebilir ya da yakalanabilir. Böylece hedef dokuya yönelmede, biyolojik anlamda doku ile kaynaşabilen bir nakil aracı özelliği kazanır.

Nanotaşıyıcıların beyine ilaç aktarımında başarılı olmalarında önerilen geçiş yolları olarak, bu taşıyıcıların endotel TJ yapılarını açarak bu aralıklardan, endotel hücre luminal yüzeyinde bulunan taşıyıcı protein veya reseptörlere bağlanarak (Şekil

2.19) basit difüzyon veya kaveolar yapıları aktive ederek geçtikleri önerilen hipotezler arasında bulunmaktadır (Gao ve ark. 2014; Zhang ve ark. 2014).

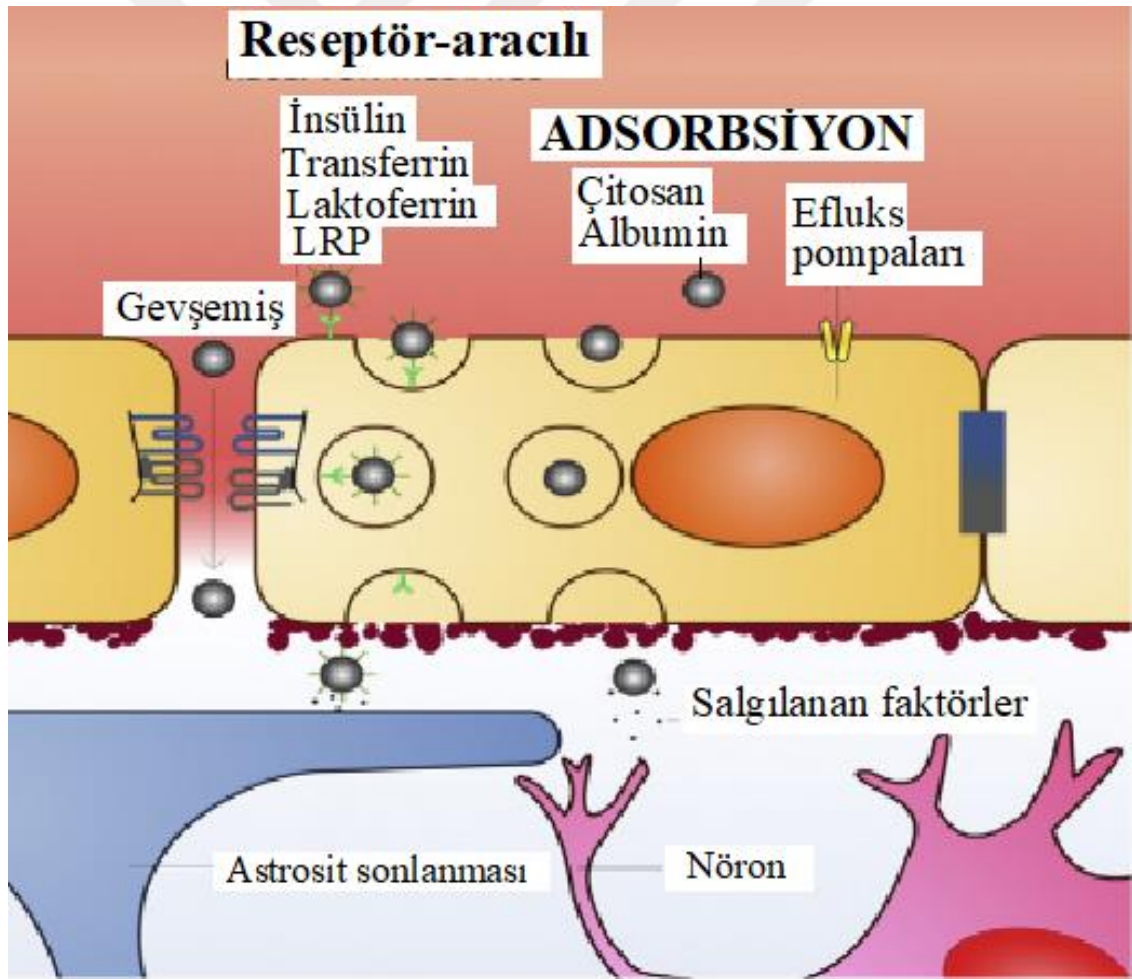
Nanoteknoloji, nöro-rejenerasyon açısından da teşvik edici bakış açıları sunar. Yüksek biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerine sahip nanomalzemeler hücreyi taklit edebilir. Aynı zamanda nanoteller, miseller gibi nanomalzemeler, lipozomlar ve karbon bazlı yapılar travma sonrası akut faz sırasında nöroproteksiyon sağlayabilirler. Bu anlamda ve peptit scaffold yapılarının sinirleri destekleyebildiğine ve sinir rejenerasyonunda etkili olabileceğine dair bilgiler mevcuttur (Tyler ve ark. 2013; Noak ve ark. 2019).

Nanotaşıyıcılar, karmaşık olan MSS'nin mikro çevresine daha iyi nüfuz etmek ve hedeflenen patoloji boyunca terapötik proteinlerin eşit dağılımını potansiyel olarak arttırmak için tasarlanmıştır (Mastorakos ve ark. 2015; Umlauf ve Shusta 2019). Hedefe yönelik tasarlanmış nanotaşıyıcılar ile post-vasküler beyindeki tümör hücreleri veya hücre dışı matris gibi protein bazlı terapötikler için depo görevi görecektir. Bu taşıyıcıların hedefte tutulmaları sağlanabilir. Bu bakımdan gelecekteki çalışmalar, KBB dinamiklerinin çok iyi bir şekilde anlaşılması ve özellikle patolojik bölgelerde birikmek üzere tasarlanmış yeni hedefleme ligandlarının geliştirilmesine odaklanmıştır. Bazı nörolojik hastalıklar, nano taşıyıcının hastalıklı bölgeye erişmesine izin verebilecek patolojik KBB bozulmasına neden olur. Bu anlamda FUS (Focused ultrasound- odaklanmış ultrason) teknolojileri yoluyla KBB bozulmasının uyarılması ile nanotaşıyıcının birikimi ilgili beyin bölgesinde artırabilmektedir. Ayrıca bu teknoloji ile mikrokürecikler içerisine hapsedilen ilaçların hastalıklı bölgeye yönlendirilmesi söz konusu olabilmektedir (Mauri ve ark. 2018; Umlauf ve Shusta 2019). Bu anlamda, KBB'nin hasarlandırılması tekniğinden yararlanılması nörodejeneratif hastalıklara tedaviler sunabilir (Umlauf ve Shusta 2019).

Nanoteknoloji temelli tedavi yaklaşımları özellikle antiepileptik ilaçların biyoyararlanımlarının zayıf olması ile ortaya çıkan ilaca karşı dirençli epilepsi türlerinin tedavi süreçlerinde tercih sebebi olmuştur (Rossi 2012). Bu anlamda; lipozomlar (Suntres 2011), polimerik nanopartiküller (NP) (Lu ve ark. 2000), nano-emülsiyonlar (Shakeel ve ark. 2007), solid lipid yapılı NP'ler (Azeem ark. 2009) ile manyetik NP'ler (Chomoucka ve ark. 2010; Jabir ve ark. 2012) antiepileptik ilaçların beyin parankimine ulaştırılmasında kullanılmıştır. Nanotaşıyıcıların hedef dokuya

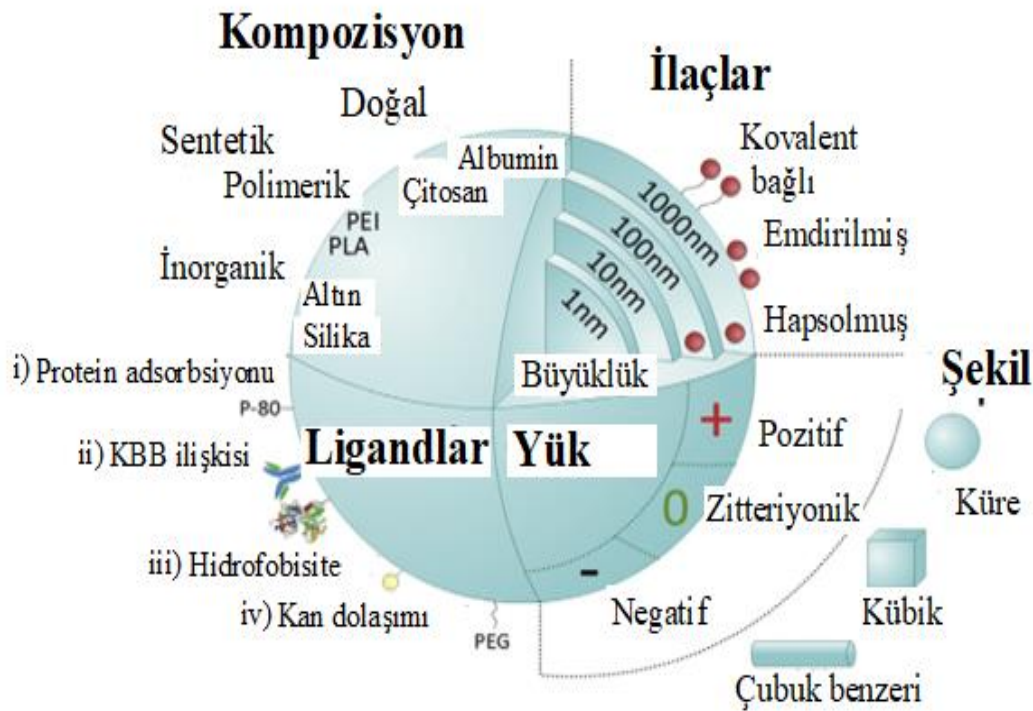
biyolojik anlamda kaynaşabilen nakil aracı özelliği gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir ve bu özellikleri ile seçici olmaları onları ideal bir ilaç transport sistemi haline getirmiştir (Gao ve ark. 2014; Decuzzi ve ark. 2010; Kong ve ark. 2012).

Nanotaşıyıcıların beyine ilaç aktarımında özellikle bariyer tip endotel hücrelerinin luminal membranına yerleşik ligandlardan yararlanılır (Şekil 2.19). KBB reseptörleri veya transport sistemleri ile direkt olarak ilişkilenen dolaşımdaki proteinlerin adsorbsiyonuna dolaylı olarak etki eden ligandlar Poly(sorbate 80), KBB reseptörleri ya da transport sistemleri ile direkt ilişkili olan transferrin veya peptid gibi ligandlar veya elektriksel şarjı ve hidrofobisiteyi artıran ligandlar (örn. amfifilik peptidler) nanotaşıyıcıların başlıca hedefleri arasında bulunurlar (Abott ve ark. 2010; Gromnicova ve ark. 2013; Wilet ve ark. 2013; Shilo ve ark. 2014).



Şekil 2-19: Kan-beyin bariyeri'nde nanopartiküllerin beyin iletimi için taşıma mekanizmaları (Saraiva ve ark. 2012).

Çalışmalar, yüksek konsantrasyona sahip transferrin'in (her bir NP'e 100-200 molekül transferrin) ANP ile konjugasyonu sonucu beyin endotelial hücrelerine bağlı kaldığını göstermiştir (Wiley ve ark. 2013). Buna karşın düşük konsantrasyonlu transferrin (her bir ANP'ye 20-30 molekül transferrin) ile konjuge edilen ANP'nin, beyin parankimine salınmak ve transitozis'i gerçekleştirmek üzere reseptörü ile etkin bir şekilde reaksiyona girdiği görülmüştür (Tsuji 2000; Boado ve ark. 2007). Bu anlamda, glukoz gibi ligandlar ve transferrin gibi reseptörler özellikle epilepsinin teşhis ve tedavisinde hedeflenen ilaç taşıyıcıları olarak görev almaktadır (Bhaskar ve ark. 2010). Bunun dışında insülin reseptörü'nde KBB endoteli tarafından fazlaca eksprese edilen bir reseptördür ve reseptör aracılı transitoziste etkindir (Tsuji 2000; Boado ve ark. 2007). Bu açıdan KBB'deki reseptörler ile kısmen daha düşük yoğunlukta (düşük afinitede) reseptör ilişkisinde bulunan ligand ile konjuge edilmiş NP'lerin, daha iyi bir performansa sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 2-20: Nanopartikül yapısı (Saraiva ve ark. 2012'den Türkçeleştirilmiştir).

Merkez sinir sistemi terapilerinde etkili bir NP tasarlamak için, birtakım özelliklerin göz önünde bulundurulması gerekir. Bu anlamda aşağıdaki özellikler açısından nano sistemin sentezi, tasarımı ve biyolojik etkileşimi ile ilgili olarak dört ana konuya odaklanıldı (Noak ve ark. 2019).

- a) Aktif bileşiklerin, bunlara erişmeden önce etkileşimden ve bozulmadan korunmasını sağlamak,
- b) nanoparçacık ilaç sistemlerini KBB'ye taşımak,
- c) belirli yapıları hedeflemek,
- d) ve sürekli veya uyaranlara duyarlı bir şekilde salınım yapmaktır.

NP'ler ile öngörülen tedavilerde, tedavinin başarısını önemli derecede etkileyecek olan diğer bir nokta NP'nin KBB'nin de ötesinde nöral hücrelere ulaşmadan önce ekstraselüler matriks organizasyonu (ECM) ile etkileşime girecek olmasıdır. ECM'ler dokulardaki hücreleri kapsayan çok elemanlı ağ yapısı olarak ele alınacak olursa, hücrelerin biyolojik fonksiyonlarının yerine getirilmesi ve bunların hayatta kalmasının yanı sıra doku düzenlemesinde de zorunlu bir yapı olduğu görülür (Noak ve ark. 2019). Bu karmaşık ağlar, kollajenler ve laminler gibi fibriller proteinlerinde, proteoglikanlar (PG'ler) gibi fibril olmayan proteinler ve glikosaminoglikanlarda (GAG'lara ek olarak glikoproteinler) bol miktarda bulunur. *In vivo* dokuların sağlamlığını ve şeklini de düzenlemek suretiyle, uzamsal şekilde çok sayıda sinyal ileten belirli alanları ve doku homeostazisi için zorunlu ve hastalık ilerlemesinde çok önemli olan korunmuş yapı-fonksiyon ilişkilerini de desteklemektedir. Ayrıca hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanabilir ve nöronal fonksiyona aracılık etmek için sinyal mekanizmalarını aktive eder. ECM yapısı terapötik ajanların doku ile ilişkisini (biyo-dağılımını ve Emilimini, iletilen ilaçların hücre içi bölgelerdeki salınımını) önemli ölçüde modifiye edebilir. Bu yönü ile ECM *in vivo* ilaç metabolizmasının tüm seviyelerinde kilit bir rolü vardır ve ECM nanosistemler için terapötik hedef olarak çalışmalarda yer almıştır (Järveläinen ark. 2009; Noak ve ark. 2019).

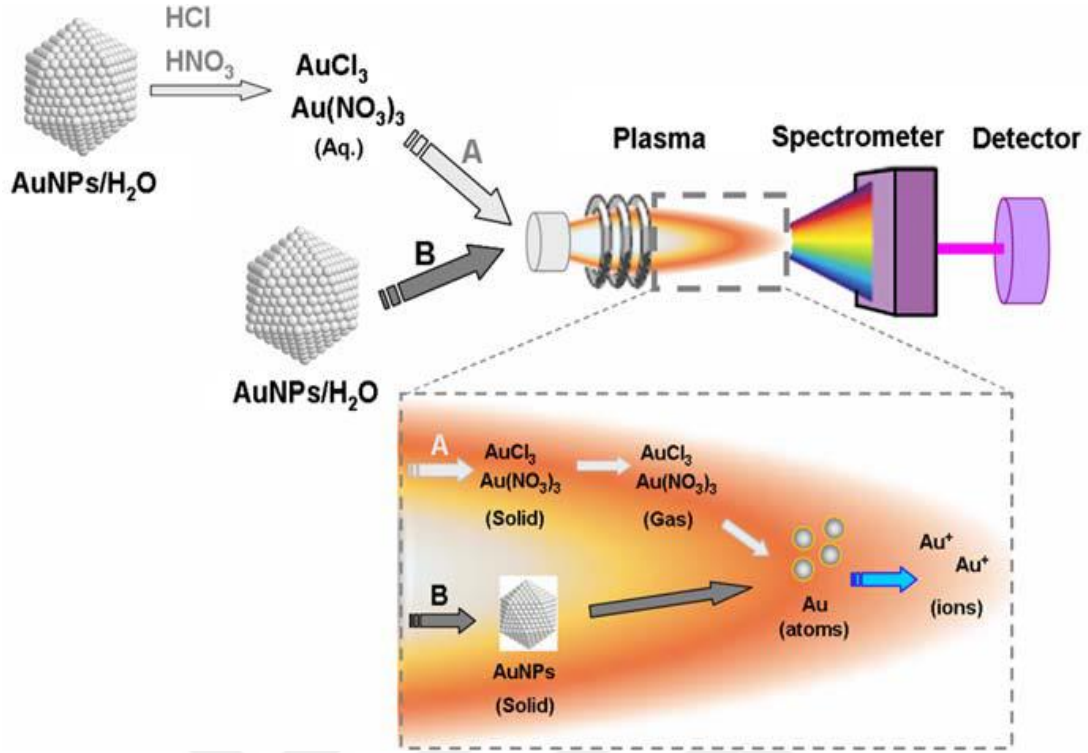
Projede kullanılan ANP'lerin beyine madde taşıma işlevinde rol oynamaları için sahip oldukları en önemli özelliklerden biri bir ligandla birlikte olma potansiyellerinin olmasıdır. Bu bağlamda ligand'ların hem sayıları hem de reseptör

afiniteleri, KBB'den beyine ilaç aktarımında önemlidir. Özellikle ANP'ler biyosensör uygulamalarına ilgi duyan biyolojik konjügasyon için mükemmel adaylardır. Son yıllarda biyosensör tasarımlarında etiket olarak kullanılan en önemli nanoparçacıklardan biridir. Yaklaşık 1 ile 1000 nm'nin arasında geniş bir büyüklük aralığında hazırlanabilirler. ANP'ler biyouyumludurlar ve biyomoleküllerin immobilizasyonu için geniş yüzey alanları oluştururlar. Yukarıdaki özelliklere ek olarak, basit bir kimyasal sentez ile elde edilirler.

Çalışmada Glut-1 beyin endotelinde ve astrositlerde eksprese edildiği için ve diğer kaplama ajanlarına göre çok daha etkili bir transport etkinliğine sahip olduğu için glukoz kaplı ANP'ler tercih edilmiştir (Gromnicova ve ark. 2016). Çalışmalar nanopartikülün kaplanması, hücrel bir ligand-spesifik nakil sistemi kullanmasa bile transport etkinliğini etkilediğini göstermektedir (Gromnicova ve ark. 2013).

ANP'ler immünojenik değildir ve daha küçük nanopartiküller (3-5 nm) yüksek dozlar dışında sitotoksik değildir (De la Fuente ve ark. 2005; Gromnicova ve ark. 2013). Ayrıca çalışmalar glukoz kaplı ANP'lerin endotelin canlılığında bir azalmaya neden olmadığı ve seçici olarak insan beyin endotelini in vitro olarak geçebildiğini ve astrositlerde lokalize olabildiğini göstermiştir (Gromnicova ve ark. 2013). ANP'lerin yüzey yükünün plazma zarına nüfuz etme yeteneklerini etkilediğini; katyonik nanopartiküllerin anyonik nanopartiküllere göre daha verimli transport edildiği çalışmalarda belirtilmiştir (Lin ve ark. 2010). Bu yönüyle endotel apikal plazma zarı üzerindeki yük transfer hızını kontrol etmede önemlidir. Dolayısıyla glukoz ile kaplanmış nanoparçacıkların (yüksüz) negatif yüke sahip olanlardan (glutatyon) daha etkili bir şekilde aktarılacağı söylenebilir.

Dokulardaki ANP miktar tayinleri Şekil 2.21'de şematize edilmiş şekilde analiz edilerek kantitatif bir değer elde edilir.



Şekil 2-21: ANP'lerin indüktif eşleşmiş plazma spektrometresi ICP-MS cihazında analiz mekanizması

(A) Altın ve (B) altın olmadan önceki altın erime (Allabashi ve ark. 2008'den Türkçeleştirilmiştir).

2.2.5. Absans Epilepside İlaç Taşınımı

Absans epilepside tedavisel yaklaşımlar (Tablo 2.5) özellikle biliş ve davranış açısından istenmeyen etkilere neden olmadan, nöbete yakalanma sıklığını mümkün olduğunca azaltmayı hedeflemektedir. Bununla birlikte, tedavinin kognitif bozukluklar ile yaşam kalitesi üzerindeki etkisi nadiren incelenmiştir. Bazı antiepileptik ilaçların, özellikle etosuksimid'in (ESM) “antiepileptojenik” etkisi hayvan çalışmalarında kanıtlanmıştır (Vrielynck ve ark. 2013). Çocuklarda görülen bazı nöbet tiplerinin birkaç yıl sonra kendiliğinden kaybolması tedavi süresini de kısıtlamaktadır, monoterapi bu nedenle tercih edilmektedir (Vrielynck ve ark. 2013).

Tablo 2-5: Farklı absans nöbet tiplerinde antiepileptik etkinlik (Vrielynck 2013'den Türkçeleştirilmiştir)

	TAN	AAN	GMAN	MAN	Temel avantajlar	Temel Dezavantajları
Valproat	+++	++	++	++	Tüm nöbet türlerine karşı etkili	Doğurganlık çağındaki bayanlarda kaçınılmalıdır
Etosuksimid	+++	++	+?	++	Minimal bilişsel yan etkiler	tonik-klonik nöbetlere karşı etkisiz
Lamotrijin	++	+	+?	+?	Uygun tolerans profili	Uzun doz titrasyonu
Levetirasetam	+	?	++	?	Uygun tolerans profili	
Rufinamid	?	++	?	++?	LGS'de ataklara karşı etkili	Sınırlı tecrübe
Benzodiazepin	++	++ (CLB)	++ (CNZ)	?	Hızlı etkili	Bağımlılık ve alışkanlık riski

Notlar: Etkinlik derecesi: +++ yüksek, ++ orta, + zayıf ? Bilinmeyen.

Kısaltmalar: Klobazam (CLB), klonazepam (CNZ), Lennox-Gastaut Sendromu (LGS)

Tipik absans nöbetler (TAN), Atipik absans nöbetler (AAN), Göz miyoklonisi ile seyreden absans nöbetler (GMAN), Miyoklonik absans nöbetler (MAN)

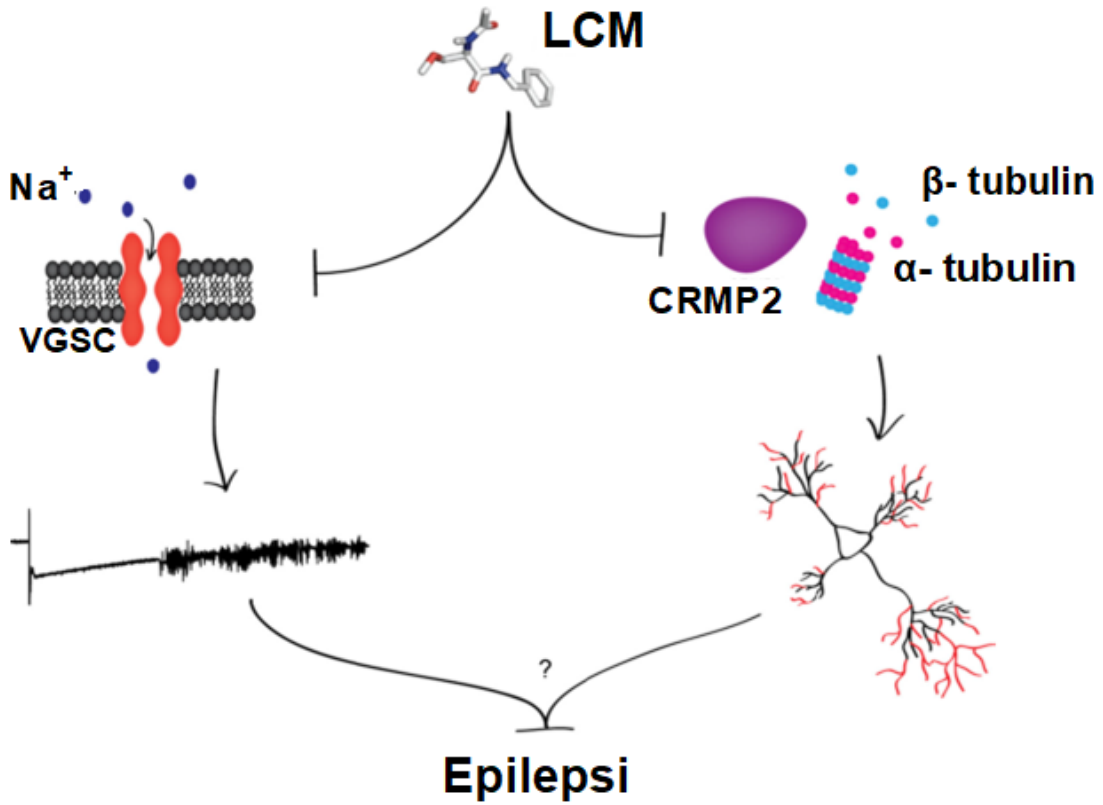
Absans nöbetlerin oluşumunun altında yatan mekanizma düşünülecek olursa kortikotalamik ağ içindeki GABA'erjik sistemlere bağlı olan ve özellikle T-tipi Ca^{2+} kanallarına bağlı salınım faaliyetleri göze çarpar. Fenitoin (PHT) ve karbamazepin (CBZ), terapötik konsantrasyonlarda voltaj kapılı Na^{+} kanallarını (VGSC'ler) inhibe ederek fokal ve jeneralize tonik klonik nöbetler için kullanılır. Fakat, bu ilaçlar absans nöbetlere karşı etkili değildir. Dolayısıyla bu ilaçların absans nöbetler için etkili olanlarını tanımlamak için kemirgenlerde pentilentetrazol ile nöbet oluşturulmuş, ancak etkili olamadıkları gösterilmiştir. Bahsedilen aynı çalışmada, düşük eşikli Ca^{2+} kanalları, HCN kanalları, $GABA_A$ ve $GABA_B$, glutamat ve dopamin reseptörleri ile enflamatuar süreçlerin dahil edilmesi tipik absans epilepsinin tedavisinde potansiyel terapötik hedefler olduğu bildirilmektedir (Weiergräber ve ark. 2010; Vrielynck ve ark. 2013).

Bunun dışında LCM geleneksel olarak Na^+ kanalı blokörlerinin hedeflemiş olduğu hızlı Na^+ kanalları yerine farklı olarak hızlı bileşeni etkilemeden, voltajla aktive olan yavaş Na^+ kanallarına müdahale ederek etki eder. Bu mekanizma içerisinde, LCM nöronal membranları stabilize ederek nöbetlerle ilişkili tekrarlayan nöronal ateşlemeyi bastırır ve epileptiform aktiviteyi engelleyebilir (Dean ve ark. 2012).

Sitokrom P450 proteinleri, ilaç metabolizması ve kolesterol, steroid ve diğer lipidlerin sentezi ile ilgili birçok reaksiyonu katalize eden monooksijenazlardır. CYP2C19 geni sitokrom P450 üst ailesinin bir üyesini kodlar. Bu proteinin endoplazmik retikulumda lokalize olması ve bazı antikonvülsif ilaçlar ile barbitüratlar dahil olmak üzere birçok ajanı metabolize ettiği bilinmektedir (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2C19>). CYP2C19 geni ile kodlanan sitokrom P450 (CYP) enzimi gibi birkaç enzim, aktif LCM'yi aktif olmayan bir metabolite metabolize etmede rol oynar. CYP2C19 enzim aktivitesi olmayan bireyler "CYP2C19 zayıf metabolizörleri" olarak bilinir. Bu nedenle, önerilen standart LCM dozları, CYP2C19 zayıf metabolizörler olan kişilerde de kullanılabilir (Dean ve ark. 2012; Cawello 2015).

LCM'nin sağlayabildiği mekanizmalar hastalığı modifiye edebilmektedir (Wilson ve Khanna 2015). LCM parsiyel başlangıçlı nöbetlerin tedavisi için onaylanmıştır (Kellinghaus 2009). LCM'nin yarı ömrünün 13 saat olması ilacın terapötik etkinliğinde günde 2 kez alınmasının yeterli olabileceği konusunda ayrıca bir avantaj olduğu bildirilmektedir (Kellinghaus 2009). Onun dışında hem oral doz hem de intravenöz LCM uygulanması sonucunda biyoyararlanımın aynı olması kullanım kolaylığı açısından da avantaj sağlamaktadır (Cawello 2015). Son araştırmalar, LCM'nin CRMP2'nin tubulin polimerizasyonunu artırma kabiliyetini ve böylelikle CRMP2 aracılı nörit büyümesini engelleyebildiğini göstermiştir. CRMP2, gelişmekte olan sinir sisteminde yüksek oranda eksprese edilir ve sayısız fosforilasyon reaksiyonları ile aksonal büyümeye aracılık eder. Ayrıca, CRMP2 aracılı tubulin polimerizasyonunun inhibisyonu, epileptik hipokampus ve neokortekste sıklıkla gözlenen anormal devre reorganizasyonunu azaltabilmektedir (Wilson ve Khanna 2015; Kellinghaus 2009). LCM'nin status epileptikus sonrası hipokampal nöron kaybını baskıladığı ve kronik epileptik dönemde ve aynı zamanda status epileptikustan sonra dentat girus ve CA3 bölgelerinde de aksonal filizlenmeyi inhibe ettiği

gözlemlenmiştir (Wang ve ark. 2018). Bu çalışmalardan anlaşılağı üzere, LCM'nin yalnızca Na^+ kanalı aktivitesini değil, aynı zamanda CRMP2 aracılı sinaptik yapılanmayı hedefleme kabiliyeti de bulunmaktadır (Şekil 2.22). Dolayısıyla LCM'nin anormal filizlenme ile epileptogenez arasındaki süreçlere katılımı, CRMP2 ile olan moleküler ilişkisi epilepsi gibi nöropatolojilerde LCM'yi antiepileptojenik potansiyeli olan hedefe yönelik çalışmalarda tercih sebebi edilen bir ajan haline getirmiştir.



Şekil 2-22: Lakozamid'in hastalığı modifiye edici etki sağlayabileceği mekanizmalar (Wilson ve Khanna 2015'ten Türkçeleştirilmiştir).

Yavaş Na^+ kanalının inaktivasyonu mevcut voltaj kapılı Na^+ kanallarının fraksiyonunda bir azalmaya yol açar. Bu mekanizma sayesinde, LCM epileptiform aktiviteyi engelleyebilir. CRMP2 aracılı tubulin polimerizasyonunun inhibisyonu, epileptik hipokampus ve neokortekste sıklıkla gözlenen anormal devre reorganizasyonunu azaltabilir. (Wilson ve Khanna 2015'ten Türkçeleştirilmiştir).

LCM'nin beyin parankimindeki dağılımı ile ilgili yapılan bir çalışmada beyin-plazma konsantrasyon oranı, toplam beyin-plazma konsantrasyon oranından daha düşük bir değer göstermiştir (Gall ve Vancea 2018). Bu da LCM'nin KBB boyunca

aktif bir transport işlemine maruz kalması gerektiği ve beyin-plazma konsantrasyon değerini düşüren bir mekanizma ile beyin dokusundan dışarıya pompalanabileceği anlamına gelmektedir (Gall ve Vancea 2018). Bu anlamda P-gp gibi eflüks proteinlerinin ekspresyonu, etkili olması gereken alandaki LCM konsantrasyonunu, etkin seviyenin altına kolayca düşürebilmektedir (Liu ve ark. 2012; Gall ve Vancea 2018). Bu nedenle LCM'nin KBB'ni etkin şekilde geçişi ile ilgili olarak nörofarmakokinetik parametrelerinin in vivo çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Gall ve Vancea 2018).

Çalışmamızda ilaç taşınım mekanizmalarına yeni bir bakış açısı getiren nano-nöroteknoloji ile ANP ile LCM ile ilişkilendirilerek KBB'den taşınarak hedef dokuya yönlendirilmesi ile absans nöbetlerin seviyesinde anlamlı değişiklikler oluşturmak üzere glukoz kaplı ANP'ler seçilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Planı

Deney Planı; öncelikle ANP'lerin ve takiben birlikte lakozamid'in (LCM) hazırlanması aşaması plan dahilinde ilk sırada yer almıştır. Bu bağlamda; ANP'lerin sentezi, karakterizasyonu, floresan protein ile işaretlenmesi, LCM ile konjugasyon işlemleri ile LCM'nin Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopi (UV-VIS) ölçümleri tamamlandıktan sonra, deney hayvanları prosedürlerine geçilmiştir. Deney Hayvanları prosedürleri (Tablo 3.1) için eşit sayıda (alt gruplar ile birlikte bazı gruplarda 18, bazı gruplarda 24 adet) erişkin erkek ve dişi WAG/Rij sıçanlar kullanılarak, çalışma grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur.

1. Sham grubu: WAG/Rij sıçanlarda spontan olarak görülen nöbetlerin olduğu grup.

2. Lakozamid etken maddeli antiepileptik ilaç grubu: Hayvan başına günde bir doz (35µg/ 100µl; i.v.) olmak üzere 5 gün boyunca sadece ilacın uygulanacağı grup.

3. Altın Nanopartikül grubu: Hayvan başına günde bir doz (50µg / 100µl; i.v.) olmak üzere 5 gün boyunca sadece nanotaşıyıcının uygulanacağı grup.

4. Altın Nanopartikül + İlaç (lakozamid) grubu: Hayvan başına günde bir doz (50µg ANP / 35µg İlaç/ 100µl; i.v.) olmak üzere 5 gün boyunca ilaç yüklü nanotaşıyıcının uygulanacağı grup.

Alt gruplar ile aşağıda ayrıntıları açıklanmak üzere tablodaki çalışmalar yapılmıştır.

Tablo 3-1:Hayvan grupları ve gruplar ile yapılacak analizler

Sham Grubu (WAG/Rij)	Elektron mikroskopu (EM) (6) Davranış (6)
LCM Grubu	EM (6) IVIS (6) Davranış (6)
ANP Grubu	EM (6) IVIS (6) ICP- MS (6) Davranış (6)
ANP+LCM grubu	EM (6) IVIS (6) ICP- MS (6) Davranış (6)

Hayvanların 3-5 aylık dönemleri, nöbet yönünden intrakraniyal EEG düzeneği ile takip edilmiştir. ANP, LCM ve ANP+LCM uygulamaları her gün (sabah), hayvan başına 1 doz (35µg/ 100µl) intravenöz (lateral kuyruk veni) olmak üzere yapılmıştır. Bu uygulamaya 5 gün boyunca devam edilmiştir. Enjekte edilen maddelerin enjeksiyon öncesinde ve enjeksiyondan 1 saat ile 24 saat sonrasında beyin dokusundaki miktarlarının ölçümleri için IVIS Cihazında *in vivo* görüntüleme yapılmıştır.

3.1.1. Deney Hayvanları Prosedürleri

WAG/Rij Sıçanlar her iki cinsiyette 5 aylık 280-350 gr. ağırlıklarında olacak şekilde Boğaziçi Üniversitesi Vivarium Laboratuvarında ve Koç Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma Merkezi'nde yetiştirildiler. Sıçanlar; 21⁰C sıcaklık, %50-60 nem, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış olan ışık döngülerine sahip olan oda koşullarında barındırıldılar. Altlık olarak steril talaş, bireysel havalandırmalı kafes (IVC) kullanıldı. Yemleri fizyolojik gereksinimlerine uygun olarak hazırlanmış olan pelet yemler ile ad libitum tarzında beslenme uygulandı. Postoperatif olarak ayrı bir odada, derlenme aşamasına gelene kadar kafeslerinde tek başına, altlıksız ve hipotermiye karşı özel önlemlerin alındığı yoğun bakım ünitesinde bakıldı.

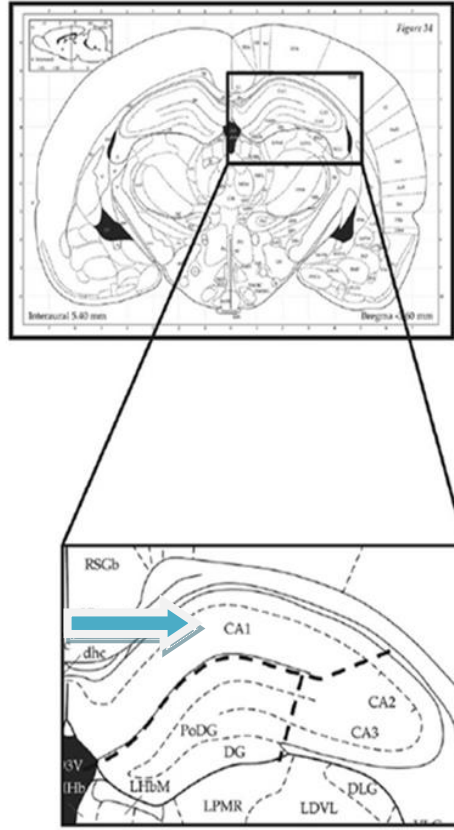
Monitörizasyonlarında özellikle ağrı kontrollerine hayvan refahı açısından özel önem verilmiş olup, ağrının yüz ifadesinde oluşturduğu değişikliklerin değerlendirilip derecelendirildiği “Grimace Scale (Ağrı Belirteçleri)” baz alındı. Ağrı belirteçleri olarak göz kapağı açıklığı, yanak ve bıyıkların yapısı, kambur duruş pozisyonu ile kulakların yapısına kadar olan belirtiler postoperatif formlara aktarıldı (Sotocinal ve ark. 2011). Ağrının yanı sıra enfeksiyon kontrolü sistemik ve lokal antibiyotik tedavisi ile önlenmeye çalışıldı, dehidrasyon durumları sıvı replasman tedavisi ile desteklendi.

Hayvanların genel sağlığını izlemek için kullanılacak yöntemlerde; hayvanların günlük yem alımlarının 5-6 gr/100gr Canlı Ağırlık (CA) su tüketimlerinin 5-10 ml/100 gr CA olmasına dikkat edildi. Operasyon bölgesinin şişlik, hiperemi ve kanama gibi komplikasyonları her gün takip edildi. Önerilen postoperatif bakım süresi minimum 3 gün olarak gerçekleştirildi. Postoperatif bakım döneminde, özellikle ağrı kontrolleri hergün yapılarak ağrı belirtileri 3R ağrı (Grimace Scale) belirteçlerine göre değerlendirilerek analjezik ilaç kullanımına özen gösterildi. Postoperatif bakım döneminde deri ve tüy yapısından, mukoza yapılarına, solunum paterninden uyaranlara cevaba kadar olan süreçler değerlendirildi. Ötenazi kriterleri olarak; deney sürecinde vücut ağırlıklarının %20 kadar kaybedilmesi, yeme içme fonksiyonlarının azalması ve iyileştirilemeyecek düzeyde enfeksiyon varlığı gibi durumlarda deney sonuna kadar beklenmeyip, hayvan refahını riske atacak kritik durumlarda karbondiyoksit ile ötenazisine dikkat edildi.

3.1.1.1. Stereotaksi Cerrahi Metodu İle Elektrotların İlgili Beyin Bölgelerine Yerleştirilmesi

Hayvanlara ketamin (100 mg/kg, i.p.) ve ksilazin (5-10 mg/kg, i.p.) anestezisi uygulandıktan sonra operasyon bölgesi (baş derisi) tüylerinden arındırıldı. Operasyon alanına önce alkol sonrasında antiseptik solüsyon sürülerek gerekli antisepsi sağlanması ile birlikte hayvan Stereotaksi Cihazına (Stereotact World Precision, Inc., USA) alınarak, kulak ve burun kısımları sabitlendi. Kafa derisine orta hat üzerinden kraniyalden kaudale doğru yaklaşık 2 cm’lik uzunlukta ensizyon yapıldı. Kafatası kemiği üzerindeki periost tabakası bir küret yardımı ile temizlendi. Paksinos (Paxinos 2009) sıçan beyin atlası rehberliğinde sağ ve sol hipokampus CA1 (bregmadan posterior: 3,1 mm, lateral: 2 mm, derinlik: 3,2 mm) koordinatları oluşturuldu. Bregmanın 2 mm lateralinde yer alan bölge elektrotların yerleştirilmesi için belirlendi

ve bunun için bu koordinata dışçı turu ile 0,6 mm çapında iki delik açıldı. Bregmanın 3,1 mm posteriorunda yer alan bölge ise Referans Elektrot için işaretlendi. Her iki bipolar elektrota eşit mesafe olacak şekilde (bregma anterior: -2,0 mm) tespit edilen bölgeye 1 mm çapında delik açılarak, bu deliğe 1,2 mm çapındaki vida yerleştirildi. Vida etrafı elektrot teli (teflonlu dış çap: 260 µm; iletken iç çapı: 200 µm; A-M Systems, Inc. #791900, Carlsvorw WA, USA) ile sarıldı. Bu arada, elektrotlardan kayıt alınabilmesi ve iletkenliğin sağlanması adına elektrot tellerden kayıtların alınacağı bölgeler teflonlarından (teflonları sıyrılarak) arındırıldılar. Teflonla kaplanmış paslanmaz çelik telden üretilen diğer bipolar elektrotlar ise koordinatları Paksinos sıçan atlası aracılığı ile belirlenen sağ ve sol hipokampus CA1 bölgesine (Şekil 3.1) 0,6 mm çapındaki deliklere, stereotaksi cihazının yardımıyla yerleştirildi. 3 girişli EEG portu kafatası kemiğine yerleştirilen vidaların üzerine, elektrot girişleri hayvanın sağ kısmında kalacak şekilde destekli bir şekilde akrilik madde kullanılarak sabitlendi. Akrilik maddenin kuruması beklendi. Portun yapısında yer alan ve EEG kayıtlarının alınmasında amplifikatör ile bağlantıyı sağlayan ara kablonun monte edileceği konnektör giriş kısmının etrafına elektrot teli sarıldı. Elektrot telin uç kısımları topraklamayı sağlamak üzere bir kısmı hayvanın sırt subkutan dokusuna yerleştirildi. Hayvanlar, operasyon tamamlandıktan sonra, enfeksiyon riskine karşı antibiyotik, ağrıya karşı analjezik uygulamalarını içeren 3 günlük postoperatif bakım dönemine alınarak monitörize edildi.



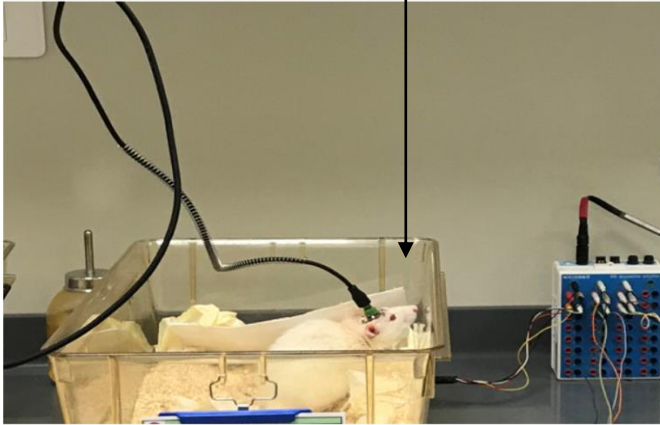
Şekil 3-1: EEG kaydı için elektrotların yerleştirileceği hipokampusün CA1 bölgesi (Ferland ve Schrader 2011; Paxinos ve Watson 2007).

3.1.1.2. EEG Kayıtlarının Alınması

Stereotaksi Cerrahi yöntemi ile hayvanın kafatasına intrakraniyal EEG portlarının yerleştirilmesi sonrasında postoperatif bakım dönemini atlatan hayvanlar sessiz bir operasyon odasına taşındılar. Hayvanlar, dışarıdan da gözlemlemeye imkan verecek pleksiglas kabin içerisine dikkatlice alındı. EEG kayıtlarının alınacağı sistem (System Plus Micromed; İtalya) (Şekil 3.2) ile bağlantıyı sağlayan konnektör kablonun bir ucu portun (Şekil 3.3) sol kısmında yer alan gözeneğe yerleştirildi. Diğer ucu ise EEG cihazının amplifikatörüne takıldı. EEG kayıtları alınırken eş zamanlı olarak hayvan davranışlarının da monitörizasyonu yerleştirilen kamera sistemi ile sağlandı. EEG kayıtları enjeksiyon öncesinde alınarak bazal kayıtlar olarak kaydedilirken, enjeksiyon sonrasında ANP, LCM ile LCM bağlı ANP'lerin KBB geçiş nöbet paternlerine etkisi şeklinde veriler sağlandı.



Şekil 3-2: EEG kayıtlarının alındığı sistem (System plus Micromed, Italy).



Şekil 3-3: EEG kayıtlarının alınması için beyine yerleştirilen elektrotların bağlandığı port sistemi

3.1.2. Enjekte Edilecek Malzemeler

Prosedürlerin enjeksiyon uygulamalarını içeren bölümlerinde, floresan işaretli ve işaretli olmak üzere 2 farklı özellikte nanotaşıyıcı tasarlandı.

3.1.2.1. Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Altın nanopartiküllerin suda çözünmesini ve partiküle konjuge edilecek ilaç etken maddesi ile etkileşime girebilmesini sağlayacak yüzeyi organik ligandlar ile kaplanmış ve boyutu 10 nm'den düşük ANP'ler hazırlandı. ANP'lerin sentezinde kullanılacak organik ligandların seçiminde bazı faktörler göz önüne alınarak üç farklı

tiyol (-SH) uç gruplu ligandın belirli miktar ve oranlarda kullanılması düşünülmektedir. Bunlar; ANP'lerin hem suda çözünürlüğünü hem de KBB'yi aşmasını kolaylaştıracak glukoz esaslı bir ligand, ANP'lerin suda çözünürlüğüne ve ilaç etken maddesi ile etkileşimine pozitif bir etkisi olan amino asit esaslı bir ligand (glutatyon) ve benzer olarak ANP'lerin sudaki çözünürlüğünü ve ilaç etken maddesi ile etkileşimini arttırıcı olması yanında, partiküllerin vücut içinde stabilitesine katkısı olan modifiye polietilenglikol (PEG) esaslı bir ligand olarak belirlendi. ANP'lerin hazırlanmasında doğrudan yöntem ve ligand değişimi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden hem daha az zaman alan hem de daha küçük parçacık hazırlanmasına imkân sağlayan doğrudan yöntem kullanıldı. ANP'nin sentezi, doğrudan yöntemde kloraurik asit (HAuCl_4), sodyum tetrahidridoborat (NaBH_4) ve tiyol uç gruplu ligandlar başlangıç maddeleri olarak kullanılarak oda sıcaklığında sentezlendi. Sentez reaksiyonlarında kullanılacak ligandların bir ucu tiyol (-SH) diğer ucu ise karboksil (-COOH) vb. fonksiyonel grup içerdiğinden, sentez reaksiyonları sürecinde ligandlar tiyol uç grupları üzerinden altın partiküllerin yüzeyine tutunarak partiküllerin yüzeyini kaplayacak, diğer uç grupları ise yüzeyde serbest bırakıldı. Bu sayede, ANP'ler hem sudaki çözünürlüğünü sağlayan bir ligand ile kaplanmış olacak hem de partiküllerin yüzeyinde daha sonradan ilaç etken maddesi ile etkileşime girebilecek serbest fonksiyonel uç gruplarının varlığı sağlanmış oldu (Yılmaz 2017).

ANP'ler, 25°C sıcaklıkta, tiyol (-SH) uç gruplu ligandlar varlığında Au(III) 'ün NaBH_4 ile indirgenmesi yöntemi ile sentezlendi. Bu amaçla, 4 ml distile su içinde çözülmüş kloraurik asit (HAuCl_4) çözeltisine (0,025 M, 1eq), 46 ml saf metanol içerisinde çözünüp ve bileşimi %78 Glu-TetraAc, %20 glutatyon (GSH) ve %2 karboksipolietilenglikol (PEG-COOH)'dan oluşan (5,5 eq) çözelti eklenerek 30 dakika hızlı bir şekilde karıştırıldı. Karıştırma devam ederken 1M'lık taze hazırlanmış NaBH_4 çözeltisi (22 eq) dört eşit porsiyonda içeriğe eklendi. Oluşan siyah renkli çözelti 2 saat daha karıştırılarak reaksiyonun tamamlanması sağlandı ve takiben, çözelti santrifüj tüplerine alınarak 10.000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilerek oluşan ANP'ler çöktürüldü. Elde edilen ürün arka arkaya 2 kez daha saf metanol içerisinde dağıtıldı ve santrifüj edildi. Son olarak çok az miktarda su içerisinde çözülüp, 10,000 Da'luk diyaliz membranına alınıp, distile su dolu 1L'lik bir balona yerleştirildi. Balon içerisindeki su günde 3 kere değiştirilerek saflaştırma işlemine üç gün devam edildi. Saflaştırma sonrası diyaliz membranındaki çözünmüş haldeki ANP'ler petri kaplarına alınarak vakum freze

dryer (Telstar LyoQuest HT40, İspanya) sistemi ile liyofilize edildi (Yılmaz 2017). Elde edilen ANP'lerin partikül boyutları Dinamik Işık Saçınımı (DLS-Dynamic Light Scattering) tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla 10 mM fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH=7,4) içinde dağıtılan ANP'lerin (0,1µg/ml) parçacık boyutu ve dağılımı DLS cihazı (Brookhaven BI-90 Plus, ABD) kullanılarak 25°C'de belirlenmiştir.

Altın nanopartiküllerin kimyasal yapıları ise Fourirer Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla Attenuated Total Reflection (ATR) aksesuarlı bir FT-IR cihazı (Bruker Alpha-P, Almanya) kullanılarak, örnekler 650-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, 16 tarama ile incelendi.

3.1.2.2. Altın Nanopartiküllere Lakozamid Konjugasyonu

Çalışmada ilaç etken maddesi olarak LCM kullanılacağından, ANP'lere ilaç etken maddesinin konjugasyonunun, ilaç etken maddesinin yapısında bulunan serbest amin (-NH₂) uç gruplarının, ANP yapısında bulunan serbest karboksil uç grupları ile hidrojen bağı yapması sonucu gerçekleşeceği öngörülmektedir. ANP'lere ilaç etken maddesi konjugasyonu için, literatürde sıklıkla kullanılan bir yöntem olan, taşıyıcı partikülün derişik ilaç çözeltisi ile 24 saat muamele edilmesi yöntemi kullanıldı. ANP yüzeyindeki karboksil uç grup miktarı sentez reaksiyonlarında kullanılan ligand miktarının değiştirilmesine bağılı olarak değiştirilebilecek ve gerçekleştirilecek bir seri sentez çalışması sonucu en yüksek miktarda lakozamid konjugasyonuna ulaşılacak şekilde ANP yüzey ligandlarının bileşimi optimize edildi.

Hazırlanan ANP'lerin karakterizasyonunda DLS yöntemi ile parçacık boyutu, Zeta potansiyeli ölçümü ile ANP'lerin kolloidal stabilitelerinin ve tanecik yüklerinin belirlenmesi, (TEM) ile DLS yöntemi ile belirlenen tanecik boyutunun teyit edilmesi ve tanecik şeklinin belirlenmesi, Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) ile kimyasal yapının aydınlatılması, Termogravimetrik analiz (TGA) ile termal özelliklerin ve ANP'nin metal ve organik bileşen içeriği (bir altın çekirdeğine bağılı ligand sayısı) belirlenmesi ve ultraviyole (UV) ile ANP'nin karakterizasyonuna ilaveten ANP'ye bağlanan lakozamid miktarının tayininde kullanıldılar. ANP'lere LCM (LCM; AdoQ BioScience, Kanada) etken maddesi yüklemesi aşağıda verilen prosedüre göre gerçekleştirildi. Xenolight 680 CF ile

işaretlenmiş belirli bir miktar ANP, konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde cam bir tüpte distile su içerisinde çözünerek, takiben bu ANP çözeltisi üzerine, 20 mg/ml konsantrasyonunda LCM sulu stok çözeltisinden eklendi ve tüp alüminyum folyo ile kaplandı. Nihai karışımdaki LCM/ANP oranı 18/1 (ağ/ağ) olup, bu karışım 100 rpm hızındaki yatay karıştırıcıda 48 saat süre ile karıştırıldı. Bu süre sonunda LCM-ANP çözeltisine hacminin 9 katı metanol eklendi (10/90, su/metanol) ve bu karışım 10 dakika 13.500 rpm'de (19000g) santrifüj edildi. Böylelikle 10/90 su/metanol karışımında çözünmeyen ANP'ler, bu çözeltide kolaylıkla çözünebilen ve ANP'ler ile etkileşimde olmayan serbest LCM'den ayrıldı. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen LCM-ANP'ler liyofilize edilerek, *in vivo* deneylerde kullanılmak üzere 500 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 10 mM PBS içinde çözündü. Santrifüj işlemi sonrası ele geçen üst sıvı (süpernatant) ise, serbest (ANP'lere bağlanmayan) LCM miktarının belirlenebilmesi için UV-VIS ölçümleri için saklandı.

3.1.2.3. Altın Nanopartikül ve İlaç Enjeksiyonları

Floresan işaretli ANP, LCM bağlı ANP, LCM ve ANP'ler IVIS görüntüleme prosedürünü kapsayan alt gruplara uygulanmak üzere hazırlanarak 5 gün boyunca 100 mikrolitre hacminde intravenöz (lateral kuyruk veninden) olarak uygulandı.

3.1.2.4. Altın Nanopartiküllere Lakozamid Konjugasyonu ve LCM Analizi için Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopisi (UV-VIS) Ölçümleri

ANP'lere LCM (LCM; AdoQ BioScience, Kanada) etken maddesi yüklemesi aşağıda verilen prosedüre göre gerçekleştirildi. Xenolight 680 CF ile işaretlenmiş belirli bir miktar ANP, konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde cam bir tüpte distile su içerisinde çözünerek, takiben bu ANP çözeltisi üzerine, 20 mg/ml konsantrasyonunda LCM sulu stok çözeltisinden eklendi ve tüp alüminyum folyo ile kaplandı. Nihai karışımdaki LCM/ANP oranı 18/1 (ağ/ağ) olup, bu karışım 100 rpm hızındaki yatay karıştırıcıda 48 saat süre ile karıştırıldı. Bu süre sonunda LCM-ANP çözeltisine hacminin 9 katı metanol eklendi (10/90, su/metanol) ve bu karışım 10 dakika 13.500 rpm'de (19000g) santrifüj edildi. Böylelikle 10/90 su/metanol karışımında çözünmeyen ANP'ler, bu çözeltide kolaylıkla çözünebilen ve ANP'ler ile etkileşimde olmayan serbest LCM'den ayrıldı. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen LCM-ANP'ler liyofilize edilerek, *in vivo* deneylerde kullanılmak üzere 500 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 10 mM PBS içinde çözündü. Santrifüj işlemi sonrası ele geçen üst sıvı

(süpernatant) ise, serbest (ANP'lere bağlanmayan) LCM miktarının belirlenebilmesi için UV-VIS ölçümleri için saklandı. ANP'lere LCM yüklemesi (konjugasyonu) sonrası ele geçen süpernatanttaki serbest LCM konsantrasyonu PG T80+ model bir ultraviyole ve görünür ışık spektrofotometresi (UV-VIS) kullanılarak 215 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak belirlendi ve ANP'lere konjuge olan LCM miktarı hesaplandı. Bu amaçla, öncelikle 5-30 µg/ml aralığında kalacak şekilde 6 farklı konsantrasyonda LCM çözeltisi (10/90, su/metanol) hazırlanarak 215 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü ve bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Takiben süpernatant örneğinin absorbans değeri ölçülerek, kalibrasyon eğrisinden elde edilen matematiksel denklem kullanılarak süpernatanttaki LCM konsantrasyonu belirlendi.

3.1.2.5. Altın Nanopartiküllerin İşaretlenmesi

Sentezlenen ANP, ANP+LCM'nin canlı görüntüleme sistemi (IVIS- Invivo Imaging System) ile incelenebilmesi için Xenolight 680 CF kiti (Perkin Elmer, İngiltere) kullanılarak, firmanın kit için optimize ettiği prosedür takip edildi. Bu prosedüre göre çalışmanın optimize olması için fosfat tampon çözeltisi (PBS) içindeki ANP konsantrasyonunun 1 mg/ml olması gerektiğinden tüm nanoparçacıklar 1 mg/ml olarak hazırlandı. 1 mg/ml'lik ANP'nin içine kit içinde verilen COMP-C olarak isimlendirilen pH 8,3'lük sodyum bikarbonattan 0,1 ml eklenip, yine kit içerisinde iletilen COMP-A'nın (CF680 SE) oda ısısına gelmesi sağlandıktan sonra, üzerine 25 µl dimetil sülfoksit (DMSO; COMP-B) eklenerek vortekslendi. Bu aşamada birbirinden bağımsız iki solüsyon hazırlanmış oldu. Hazırlanan ilk solüsyonun üzerine bir sonraki aşamada hazırlanan COMP-A+COMP-B karışımından 12 µl eklendi ve şişe alüminyum folyo ile sarılarak çalkalayıcıda yavaş hız ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda ANP'ler floresan işaretleyici ile konjuge hale geldi. Reaksiyon çözeltisinin purifiye edilmesi için hazırlanan son çözelti içinden alınan 0,3 ml karışım COMP-E'nin (NanoSepvial) üst bölmesine aktarılıp, üstteki tüm sıvı alt katmana geçene dek 14.000 rpm – 5/10 dk santrifüjlendi. Serbest boya içeren toplama tüpü boşaltılarak işaretlenmiş ANP'yi içeren NanoSep flakonunun üst bölmesine ~ 0,3 mL 1X PBS (COMP- D) eklenip, tüp hafifçe sallandı. Ultrafiltrasyon için 14.000 rpm – 5/10 dk santrifüj yapıldı. Bu adım iki kere daha tekrarlanarak konjuge olamayan floresan boyanın ANP karışımından ayrılması sağlandı. Ardından kit içinde verilen enjektör (COMP- H) ve enjektör filtresi (COMP- I) kullanılarak elde

edilen çözelti steril saklama şişesine (COMP- G) yavaşça süzüldü. Bu işlemlerin sonunda %80-90 verimlilikte işaretli nanopartikül hazır hale getirilmiş oldu.

3.1.2.6. *In Vivo* Görüntüleme İşlemleri

Enjeksiyon aşamasından önce ve sonrasında, ANP'nin KBB'yi aşp beyin dokusundaki birikimlerine istinaden ölçümlerin yapılması amacıyla IVIS cihazında görüntüleme işlemi yapıldı. Bunun için hayvanlara XenoLight® CF 680 Fluorescent Labeling Kit ile işaretlenmiş ANP, LCM ve ANP+LCM lateral kuyruk veninden enjekte edildi. Hayvanlar *in vivo* görüntüleme cihazına (Caliper Lumina III- Perkin Elmer) (Şekil 3.4) alınmadan önce inhalasyon (izofluran) anestezisine maruz bırakılarak hafif bir sedasyon sağlandı. Ardından inhalasyon anestezisi sisteminin bağlı olduğu cihazda hayvanlara dorsoventral, ventrodorsal ve lateral pozisyonlar verilerek cihazda ısıtıcı pedin yer aldığı tablanın üzerine yatırıldı. Kullanılan floresan işaret proteinin (XLC 680) probu seçildikten sonra probun aktif olduğu dalga boyları set edildi. Böylelikle ANP, ANP+LCM ile floresan işaretli LCM'nin beyin dokusundaki birikimleri hakkında kantitatif veriler elde edildi.



Şekil 3-4: Görüntülemede kullanılan IVIS (*Invivo* Imaging System Caliper Lumina III) cihazı

3.1.2.7. Davranış Deneyleri

Yükseltilmiş artı labirent testi (Elevated Plus Maze: EPM) (Şekil 3.5) davranışsal bir test olarak anksiyete davranışlarının altında yatan beyinin hipokampus, amigdala ve dorsal rafe çekirdeği gibi belirli bölgeleri ile GABA, glutamat, serotonin, hipotalamik–hipofiz–adrenal eksen nöromodulatorleri ve bunun gibi mekanizmaları incelemek için uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Kemirgenler bu labirentin içerisindeyken açık ve kapalı kolları geçen zaman ile bu kolları girişler hesaplanarak davranışsal tepkiler kolayca ölçülebilir. Açık ve kapalı alanlardaki aktivite, hayvanın korunan alanları tercih etme arasındaki çatışmayı ve yeni çevreleri keşfetmek için doğuştan gelen motivasyonlarını göstermektedir. Anti-anksiyete davranışı (artmış açık kol süresi ve/veya açık kol girişleri) aynı anda belirlenebilir. Hayvanlar, taşıma kafeslerine ayrı olarak yerleştirilir ve doğrudan davranış test odasının dışındaki koridorda bir arabada belirli bir süre bekletilir. Stres etkisine maruz kalma olasılığını önlemek için, tüm deney hayvanlarının testten önce taşıma kafeslerinde kısa bir zaman geçirmeleri önemlidir. Labirent odanın ortasına; hem açık hem de kapalı kolları benzer aydınlatma seviyelerine sahip olacak şekilde yerleştirilir (Alicia ve ark. 2007). Açık ve kapalı kolda geçirilen zaman, açık ve kapalı kola giriş sayısı, açık veya kapalı kol girişlerinin/zamanının oranı toplam kol girişleri/zamanı hesaplanabilir ve varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirmek için kullanılabilir (Alicia ve ark. 2007).



Şekil 3-5: Yükseltilmiş artı labirent platformu (EPM- Elevated Plus Maze)

Projenin metodolojisi gereği ANP, LCM ve LCM+ANP davranış deneylerinden biri olan EPM testinin ilave edilmesi hem uygulanan LCM'nin tek başına hem de ANP ile bağlanmış şeklinin 5 gün boyunca enjekte edilmesinin anksiyete üzerine etkisinin hangi boyutta olduğu konusunda fikir verecek olmasıdır. Ayrıca, deney sonuçlarının hem laboratuvar hem de görüntüleme prosedürlerinin klinik yansıması olarak desteklenmesi ve güçlendirmesi hedeflenmiştir. EEG, IVIS görüntüleme işlemleri ile birlikte prosedürlerin davranış deneyi ile desteklenmesi spontan epileptik özellik gösteren WAG/Rij ırkı sıçanlarda uygulanan ANP+LCM'nin anti-epileptojenik ve anksiyolitik etkilerin hangi seviyede olabileceği konusunda gelecek çalışmalara ışık tutacaktır. Bu özelliği ile anksiyetenin hangi seviyede olduğu her bir grup için ayrı şekilde değerlendirilmiştir.

Davranış deneyleri siyah pleksiglas yüzeye sahip levhadan oluşan ve 50 cm uzunluğu ile 10 cm genişliğinde dört kola (iki tanesi açık kollu, iki tanesi 30 cm yüksekliğinde kapalı kollu) sahip bir platform kullanıldı. Metodolojide yer alan (5 günlük) intravenöz enjeksiyonlardan 1 saat sonra, hayvanlar sessiz bir ortamda bu platformlara alınarak her biri için 5'er dakikalık video çekimleri gerçekleştirildi. Her bir sıçanın platforma getirilmesinden önce kollar kokuların bertaraf edilmesi amacı ile

%70'lik etanol ile temizlendi. Sıçanlar bu platformun ortasına (yüzleri deneyi yapan kişinin tersi yönde bakacak şekilde) bırakılarak açık veya kapalı koldan hangisini tercih ettiği ve bu kollarda kalma süreleri hesaplandı. Davranış deneylerinden çıkan hayvanlar tekrar kafeslerine alınıp rutin bakım odalarında barındırıldı. Açık kolda kalma süresi hesaplanırken hayvanın dört bacağını da birlikte açık alan platformuna çıkarmasına dikkat edildi. Açık alanda kalma sürelerine ilaveten hayvanların açık alana yönelme süreleri de hesaplanmıştır. Yönelme süreleri hesaplanırken kapalı platformun açık alana çıkış aşamasında hayvanın bu alana çıkmak için gösterdiği davranışlara ilişkin bekleme süreleri dikkate alınmıştır. Bu davranışlar açık alana doğru başın öne doğru uzatılması, iki ayağının üzerinde durulup çevrenin incelenmesi ya da koklanması, iki bacağın kapalı platformda kalıp diğer bacakların açık alanda yer alarak çevrenin incelenmesi gibi hareketleri açık alan yönelme hareketleri olarak anksiyetenin seviyesi konusunda bilgi vermektedir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecelerine göre anksiyete verisi olarak hem açık alanda bulunma hem de açık alana yönelme sürelerinin toplamı dikkate alınarak değerlendirme yapıldı.

3.1.2.8. Perfüzyon ve Ötenazi

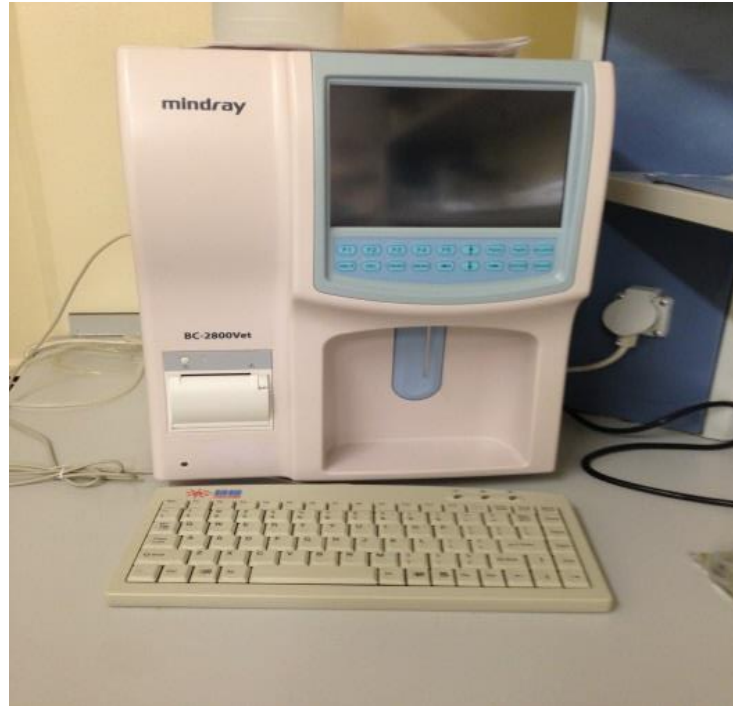
Hayvanlara perfüzyon işlemi için ketamin (80-100 mg/kg; i.p.) ve ksilazin (10 mg/kg; i.p.) anestezisi uygulandı. Sonrasında sternumun "processus xyphoidea" kısmında her iki kostanın arkus kostaları boyunca yanlara kas dokusunu da (diyafram kası dahil) kapsayan ensizyonlar yapılarak göğüs kafesine ulaşıldı. Her iki taraftan toraks kemiklerinin sırt omurları ile birleşim yerlerine yakın bölgelerinden kesilen kemikler ile sternum serbestleştirildi ve yukarıya doğru kaldırılarak kalp görünür hale getirildi. Kalbin sol ventrikülünden girilerek sağ atriuma doğru ilerletilen gavaj iğnesi aorta içerisinde görünür hale gelindiğinde, iğne sabitlendi ve sağ atriuma küçük bir kesi atılarak 75 ml serum fizyolojik (37°C) bolus olarak uygulandı. Böylelikle intravasküler kanın damarsal ağdan bertarafı sağlandı. Sıvının berraklaşmasını takiben (yaklaşık 15-20 sn), 15 dk süresince 200 ml fiksatif solüsyon [0,1 M fosfat tampon (pH: 7,4) içinde %2 paraformaldehit ve %2,5 gluteraldehit] verilerek perfüzyon işlemi tamamlandı. Fiksasyon işlemi sonrası ötenazi yapıldı. Yöntem olarak EM grupları için yüksek doz anestezi (150 mg/kg ketamin i.p., 10 mg/kg xylazin i.p.) uygulandı.

3.1.2.9. Elektronmikroskopi

Perfüzyon ve ötenazi işlemleri sonrasında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gece bekletilen hayvanların beyinleri dikkatlice çıkarıldı. Beyinlerden Vibratom cihazı (Vibratome 3000 plus, St Louis, MO, USA) ile $100\ \mu\text{m}$ kalınlığında koronal kesitler alınarak kesitler elektron mikroskopik incelemeler için hazır hale getirildi. Beyin dokuları epon bloklara gömüldü. Böylelikle bu bloklardan ultramikrotom aracılığı ile 500 angstrom kalınlığında çok daha ince kesitler elde edildi. Beyin dokusundan vibratom cihazı (Vibratome 3000 plus, St Louis, MO, USA) ile en son aşama olarak elde edilen kesitler bakır grid üzerine alınarak transmisyon elektron mikroskobunda (JEM JEOL 1011) incelendi. Böylelikle ANP, ANP+LCM ile LCM'nin KBB geçirgenlik dinamikleri ile ilgili olarak parankim içindeki dağılımını göstermek amacıyla elektron mikroskopik bulgulara ulaşıldı.

3.1.2.10. Hemogram Analizleri

Hayvanların perfüzyon işlemi sırasında, kalpten alınacak olan 120 μl kan, EDTA'lı tüplere aktarılarak hemogram cihazında (MINDRAY) (Şekil 3.6) analiz edildi. Hemogram ölçümleri sayesinde uygulanan NP'nin kanın şekilli elemanları ve oranları üzerine etkileri incelendi.



Şekil 3-6: Hemogram analiz cihazı (MINDRAY)

3.1.2.11. Altın Nanopartikül Miktar Tayini için İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP- MS) Analizleri

Beyin dokusuna aktarılan ANP'nin miktar tayini için ICP-MS (Agilent Technologies, 7700 series ICP-MS, ABD) cihazı kullanıldı. ICP-MS grupları için; giyotin ile depakapitasyon yöntemi ile ötenazi yöntemi tercih edildi. Ardından beyinin korteks, hipokampus ve serebellum bölgeleri ayrılarak tüplere aktarıldı ve -80°C 'de muhafaza edildi. Miktar tayini için, tüplere aktarılmış olan beyin dokularının üzerine fosfat tampon solüsyonu (PBS) konuldu. Sonrasında homojenizatör (Şekil 3.7) ile 4000 devirde homojenize edildi.



Şekil 3-7: Homojenizatör cihazı

Homojenize edilerek homojenat haline getirilen her bir örnek, sırası ile vorteksle karıştırıldıktan sonra 200 μl alınarak daha önceden kral suyu ile temizlenmiş 10 ml'lik tüplere konuldu. Homojenat içindeki suyun uzaklaştırılabilmesi için tüm örnekler 120°C 'de 50 dakika boyunca ısıtıldı. Sudan arındırılan homojenatların içeriğindeki altının açığa çıkabilmesi için, tüm örneklerin üzerine 1 ml kral suyu ve 375 μl hidrojen peroksit (H_2O_2 ; %30) eklenerek 10 gün süreyle oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda tüm örneklerin hacimleri distile su ile 10 ml'ye

tamamlandı. Tüp içerisinde oluşmuş tuzlardan kurtulmak için örnekler 15 ml santrifuj tüplerine alınarak 6000 rpm’de 5 dakika santrifujlendi. Sıvı kısım ICP-MS tüplerine aktarıldı. Standard kalibrasyon eğrisi 1-50 ppb arasında hazırlandı. Bu işlemin sonunda ICP-MS cihazında (Agilent Technologies, 7700 series ICP-MS, ABD) (Şekil 3.8) dokulardaki altın miktarı analiz edildi.



Şekil 3-8: ICP-MS cihazı (Agilent Technologies, 7700 series ICP-MS, ABD)

3.1.2.12. Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopi (UV- VIS) Prosedürleri ile İlaç Analizi

Hazırlanan LCM standart çözeltileri kullanılarak UV-VIS ölçümlerinden elde edecek bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Glukoz ile kaplanmış ANP’ye LCM konjugasyonu işlemi sonrası süpernatantta, konjuge olmadan kalmış olan serbest LCM miktarı kalibrasyon eğrisinden elde edilen matematiksel eşitlik kullanılarak hesaplandı ve buradan da ANP’ye konjuge olan LCM miktarına geçildi. Lakozamidin ANP konjugasyonu 100 mg /gr ANP olarak hesaplandı.

3.1.3. İstatistik

Örneklem büyüklüğünün belirlenebilmesi için G*Power Analiz Programı (G*3.1.9.2) kullanıldı. 4 Grup arasındaki anlamlılığının değerlendirilmesinde, öncelikle, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ardından Tukey HSD testi kullanıldı. Ayrıca çift yönlü varyans analizi’ne (two-way ANOVA) bazı değerlendirmelerde başvurulmuştur. EEG, ICP-MS, davranış testi ve hemogram analizlerinde tek yönlü varyans analizi kullanıldı. IVIS görüntüleme analizlerinde ise çift yönlü varyans

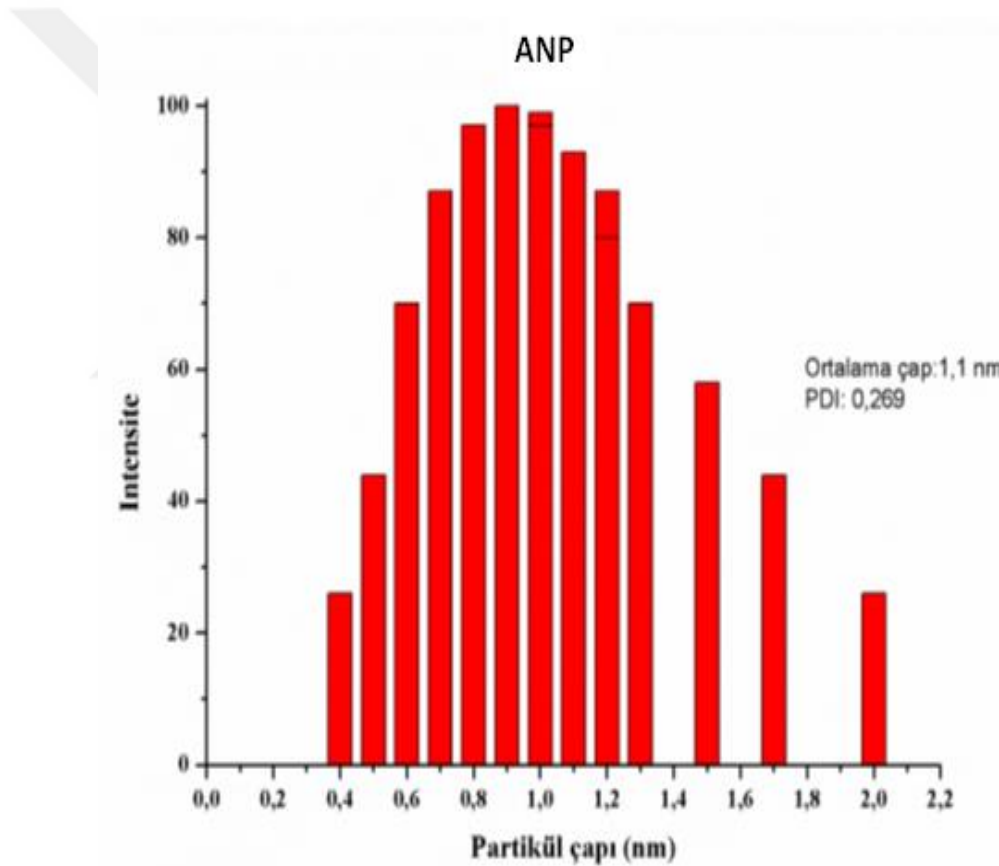
analizine başvuruldu. İstatistiksel değerdendirmede, her grubun karşılaştırılan değışkeni için ortalama $\pm$ standart sapma (SD) değeri kullanarak $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Altın Nanopartikül Karakterizasyonu ve Sentezi

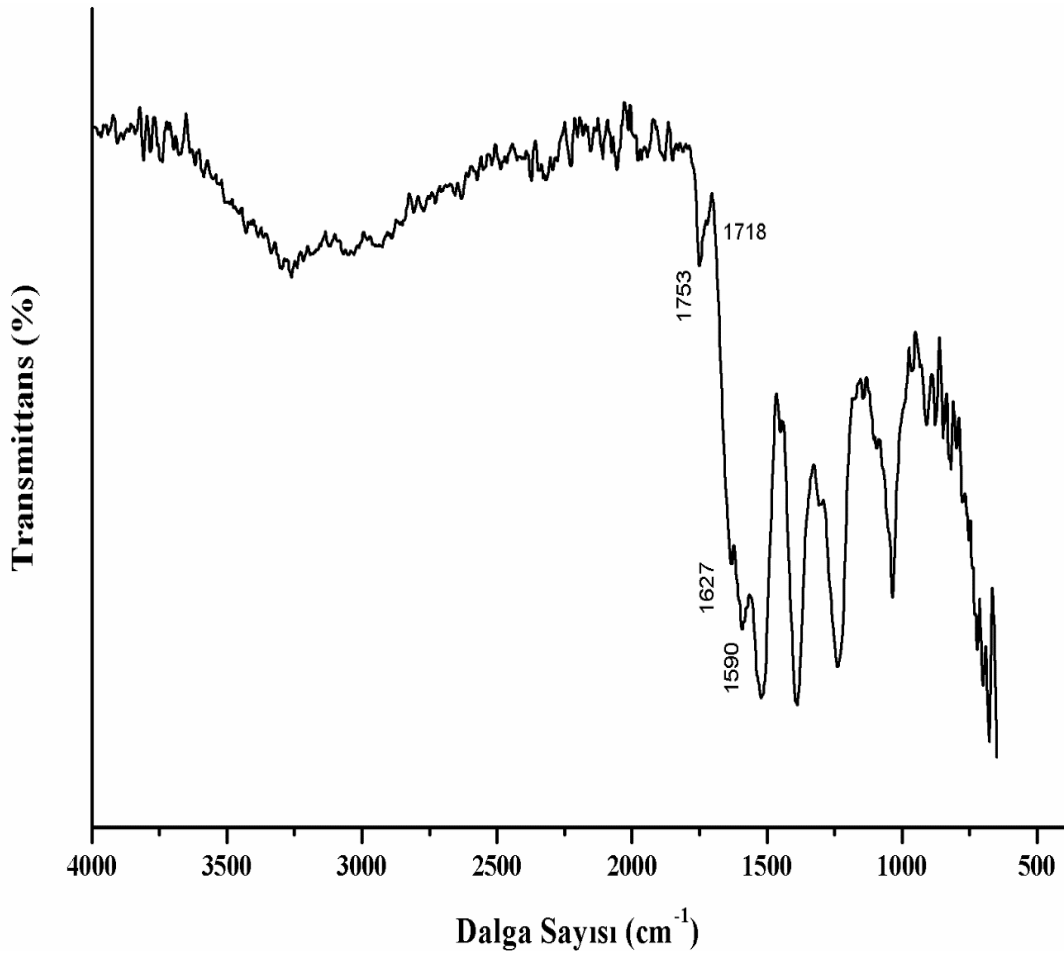
Sentezlenen ANP'lere ait dinamik ışık saçınımı (DLS) ölçümleri ile belirlenen ortalama partikül çapı ve polidisperslik indeksi (PDI) değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Sentezlenen partiküllerin ortalama çapları 1,1 nm olup partikül çapı dağılımı hakkında bilgi veren ve homojenliğin bir göstergesi olan PDI değeri 0,269 olarak belirlendi. Buna bağlı olarak oldukça dar bir partikül çapı dağılımına sahip ve 1 nm boyutlarında ANP sentezi gerçekleştirildi.



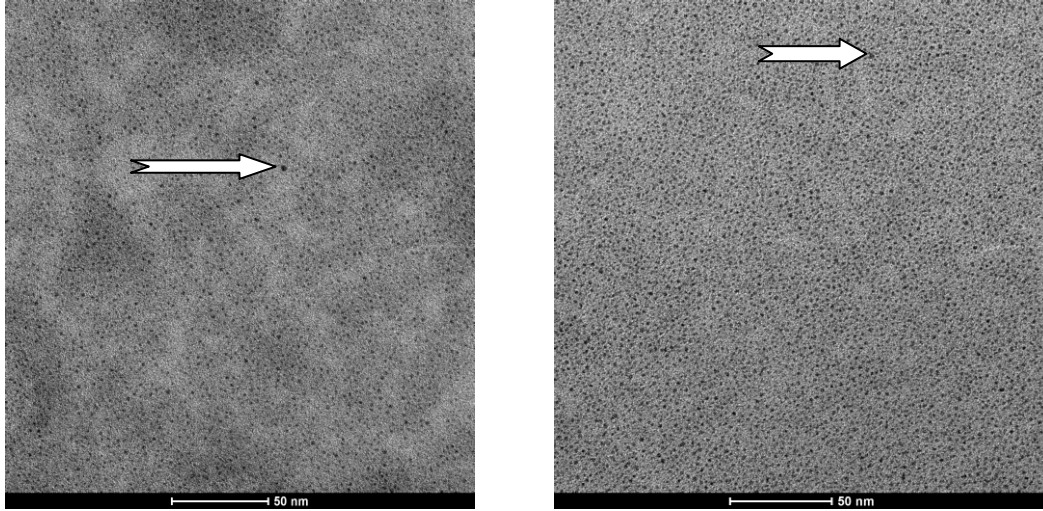
Şekil 4-1: Dinamik ışık saçınımı (DLS) ölçümleri ile belirlenen ortalama ANP çapı ve PDI değerleri.

ANP'ye eklenen glukoz üniteleri ve diğer tüm organik bileşiklere ait karakteristik infrared (IR) pikleri benzer olduğu için Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizlerinde sadece ayırt edici pikler incelenmiş ve ilgili titreşimler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2). ANP yapısındaki Glu-TetraAc ünitelerinde

bulunan asetat gruplarına ait C=O titreşimleri 1753; GSH ünitelerinde bulunan amino asit gruplarına ait C=O titreşimleri 1627 ve -NH₂ titreşimleri ise 1590 cm⁻¹ dalga sayılarında izlenmektedir. Altın nanoparçacık yapısının sentezinde kullanılan PEG-COOH'a ait karakteristik C=O titreşimleri ise 1718 cm⁻¹ bölgesinde bir omuz olarak belirlenmiştir. Tüm bu karakteristik titreşimlere ait pikler ANP yapılarında Glu-TetraAc, GSH ve PEG-COOH ünitelerinin varlığını göstermektedir.



Şekil 4-2: Sentezlenen ANP yüzeyinin FT-IR görüntüsü.

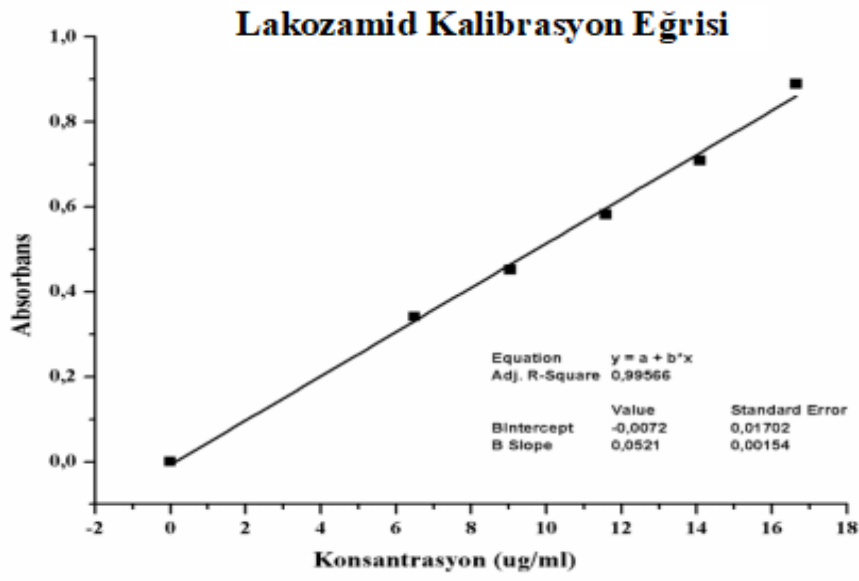


Şekil 4-3: ANP'lerin transmisyon elektron mikroskopi görüntüleri (Ok).

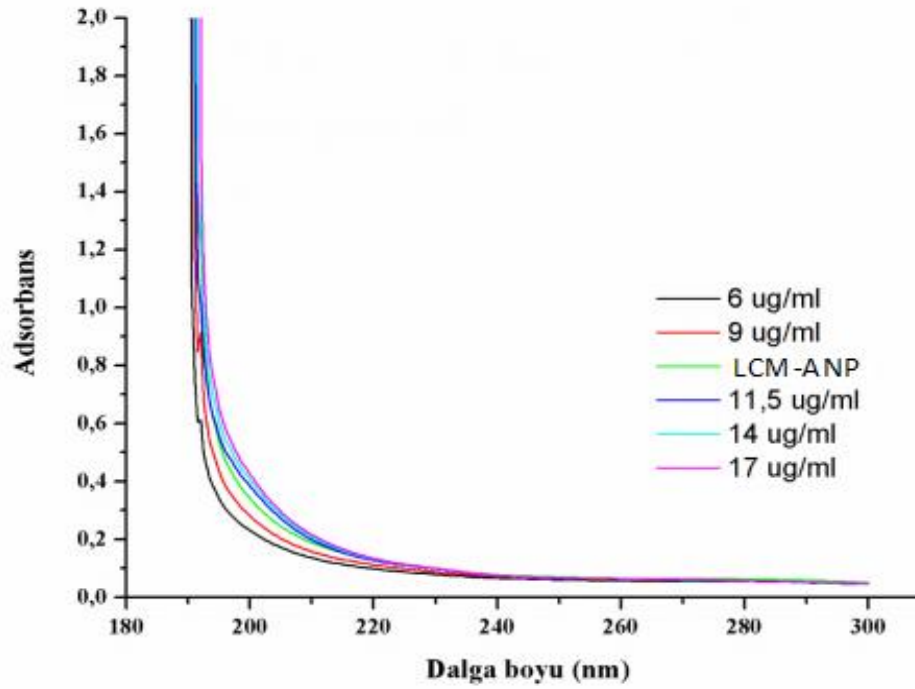
Transmisyon elektron mikroskopisinde elde edilen ANP'lerin morfolojisi ve boyutuna ilişkin bulgular görülmektedir (Şekil 4.3).

4.1.1. Altın Nanopartiküllere Lakozamid Konjugasyonu, LCM Analizi için Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopisi (UV-VIS) Ölçümleri

Hazırlanan LCM standart çözeltileri kullanılarak UV-VIS ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.4'de verilmiştir. İlgili grafiğe ait R² değeri 0,99566 olarak belirlendi. Glukoz ile kaplanmış ANP'ye LCM konjugasyonu işlemi sonrası süpernatantta, konjuge olmadan kalmış olan serbest LCM miktarı kalibrasyon eğrisinden elde edilen matematiksel eşitlik kullanılarak hesaplandı ve buradan da ANP'ye konjuge olan LCM miktarına geçildi. Ayrıca, ANP'ye konjuge olan LCM miktarının spektral grafiği de aşağıda görülmektedir (Şekil 4.5). Lakozamidin ANP konjugasyonu 100 mg/gr ANP olarak hesaplandı.



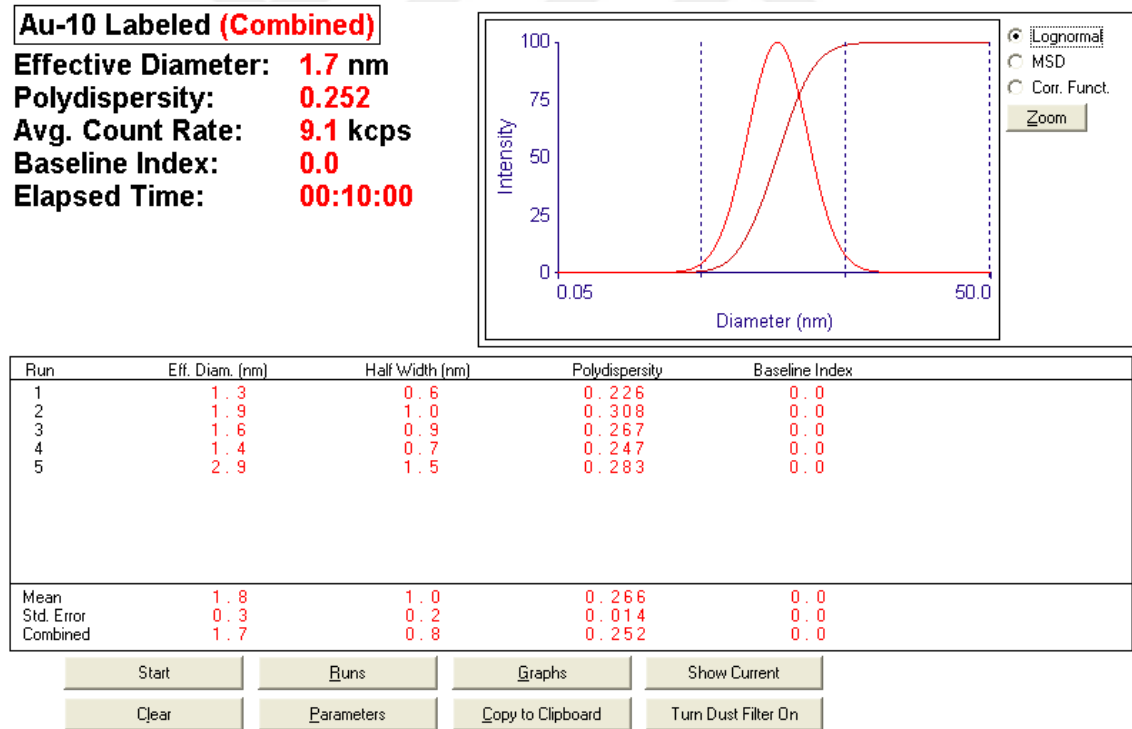
Şekil 4-4: LCM'nin UV-VIS ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4-5: ANP'ye konjuge olan LCM miktarının spektral görüntüsü.

4.1.2. Altın Nanopartiküllerin İşaretlenmesi

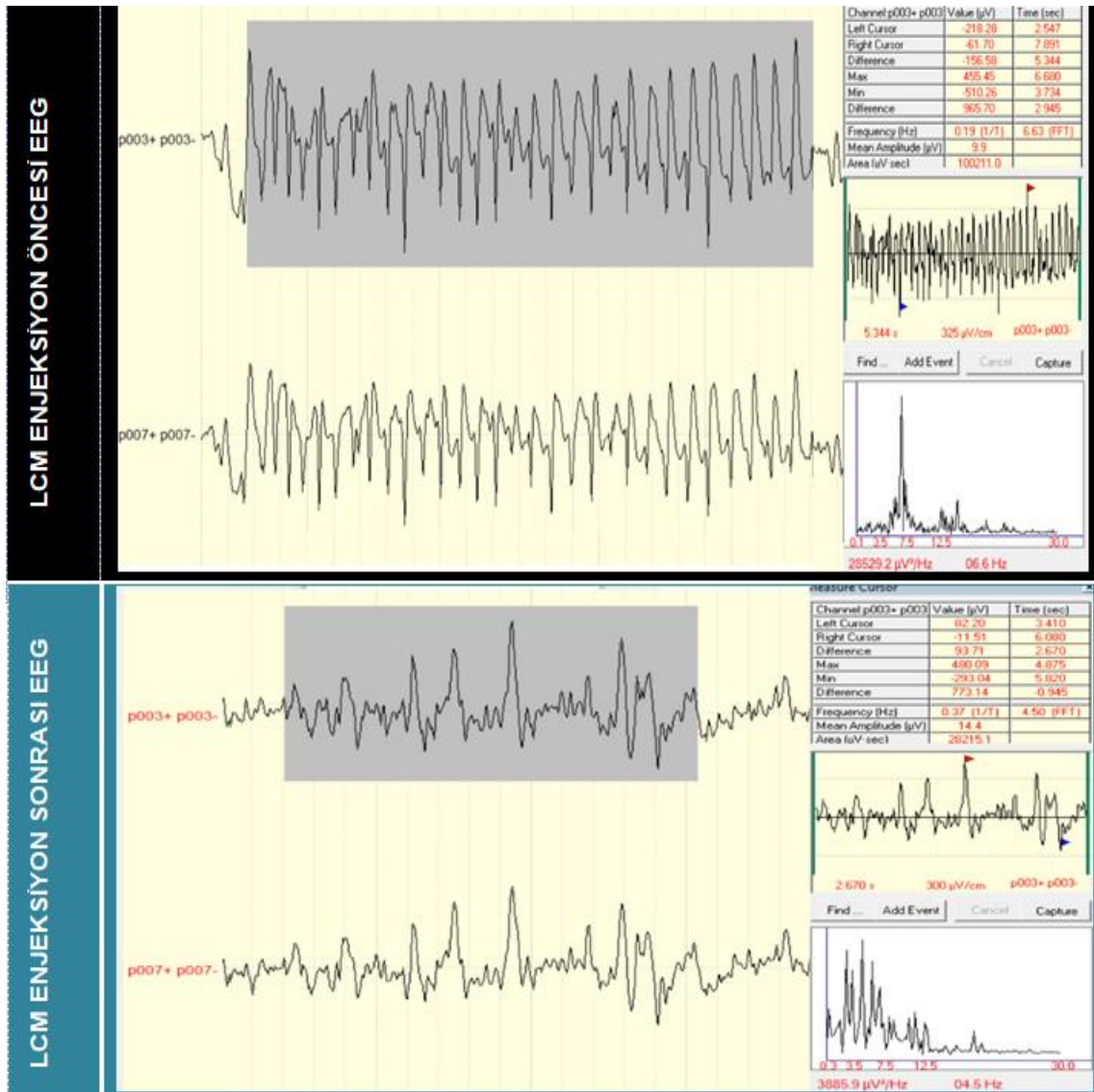
İstenen boyutta elde edilen ve yüzeyleri Glu-TetraAc, GSH ve PEG-COOH ile fonksiyonelleştirilen ANP'lerin IVIS analizleri için işaretlenme işlemi esnasında herhangi bir boyut değişiminin yaşanıp yaşanmadığının kontrolü amacıyla, işaretleme sonrası da DLS ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekil 4.6'dan da anlaşılabacağı gibi işaretleme sonrası partikül çaplarında çok düşük oranda bir değişim gözlenmiş ve ortalama partikül çapı 1,7 nm olarak belirlenmiştir. Bilindiği gibi ANP sentez çalışmalarında partikül sentezi sonrası her işlem partiküllerin boyutlarında büyümeye neden olabilmektedir. Ancak DLS ölçümlerinde de belirlendiği gibi işaretleme prosedürü sonrası partikül çapında 0,6 nm'lik bir büyüme gerçekleşmiştir. Ayrıca işaretleme prosedürü sonrası PDI değerinde de belirgin bir değişiklik izlenmemiştir.



Şekil 4-6: Sentezlenen ve fonksiyonelize edilen ANP'lerin boyut ölçüm analizi.

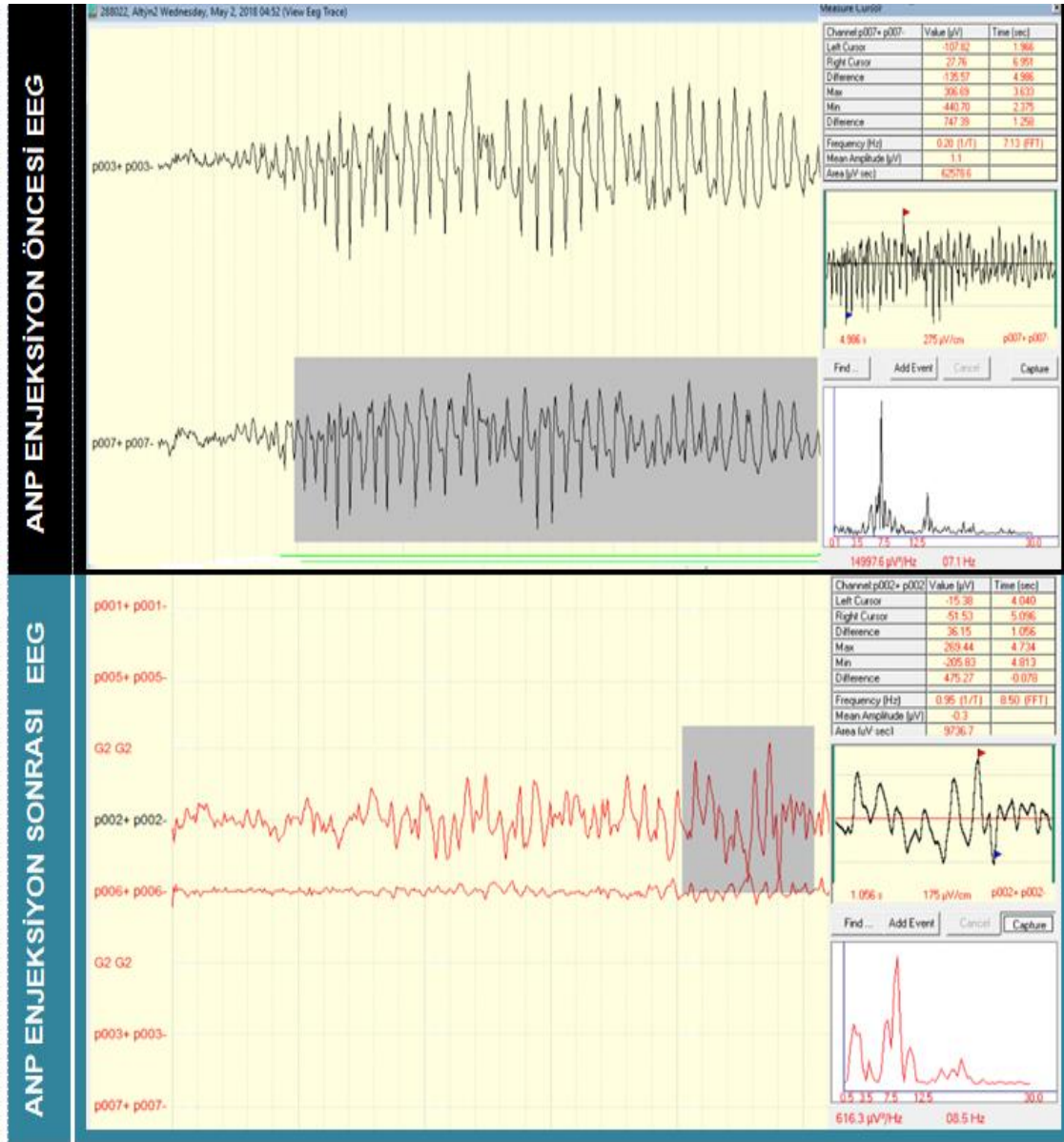
4.2. EEG Bulguları

Deney gruplarına ait EEG kayıtları ANP, LCM ve LCM+ANP enjeksiyon öncesi ve sonrasında alınmıştır. Her bir grubun bazal EEG dalgalarında yer alan DDD'lerine ait veriler ölçüm tabloları ile değerlendirilmiştir. Bu tablolarda (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9) özellikle EEG trasesinde seçilen bölgeye ait dalgaların amplitüt değerleri arasındaki maksimum ve minimum değerleri arasındaki fark ile frekans değerlerinin ölçümü dikkate alınmıştır. Tablolardaki (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9'a ait) değerlere istinaden istatistiki olarak anlamlılıkları karşılaştırılmıştır. Her bir gruba ait hem bazal EEG dalgalarının hem de beş günlük enjeksiyonlardan sonra elde edilen traselerin amplitüt ve frekans verilerine ait ölçüm tabloları aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9). İstatistiksel olarak değerlendirilen DDD'lerinin amplitüt (Şekil 4.10), frekans (Şekil 4.11) ve nöbet sıklıklarına (Şekil 4.12) ait grafikler aşağıda yer almaktadır. Genel olarak ANP, ve ANP+LCM gruplarındaki hayvanların EEG amplitüt değerlerinde bir azalma izlenirken, ANP+LCM grubunda hem amplitüt hem de frekans değerlerinde bir azalma kaydedilmiştir (Şekil 4.10 ve 4.11; $p<0.01$). LCM grubundaki hayvanlarda ise frekans değerlerinde azalma görülürken, amplitüt değerlerinin sham WAG/Rij sıçanlarındaki ile neredeyse aynı seviyede yüksek seyrettiği gözlemlendi. Sonuç olarak grupların nöbet sıklıklarında çok fazla bir değişiklik olmamakla birlikte dalgaların paternlerinde anlamlı değişikliklerin olduğu görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4-7: LCM grubunu temsil eden enjeksiyon öncesi ve sonrasındaki EEG paternleri ve analizleri.

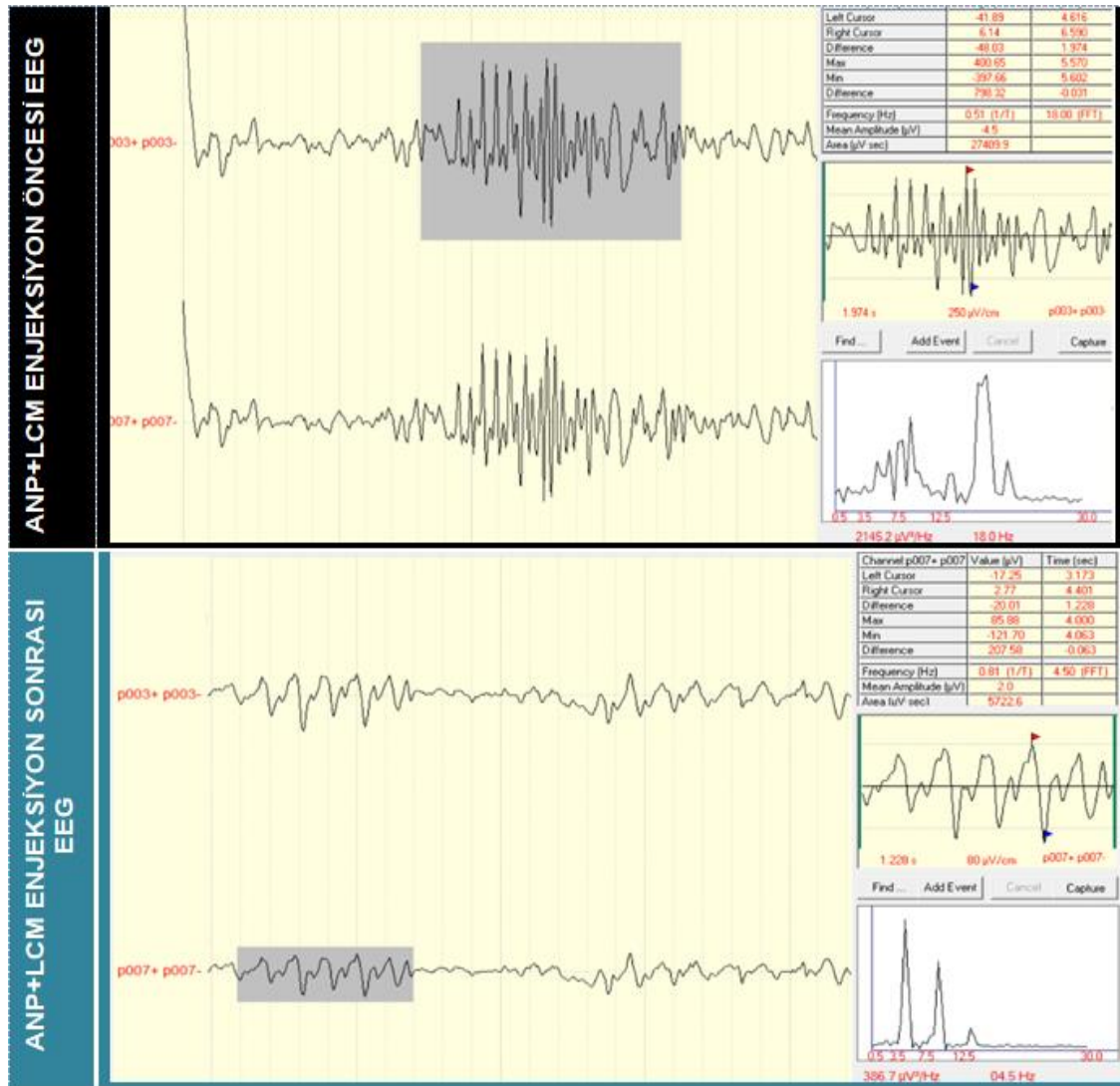
p003+p003-: Sol hipokampus, p007+p007-: Sağ hipokampus



Şekil 4-8: ANP grubunu temsil eden enjeksiyon öncesi ve sonrasındaki EEG paternleri ve analizleri.

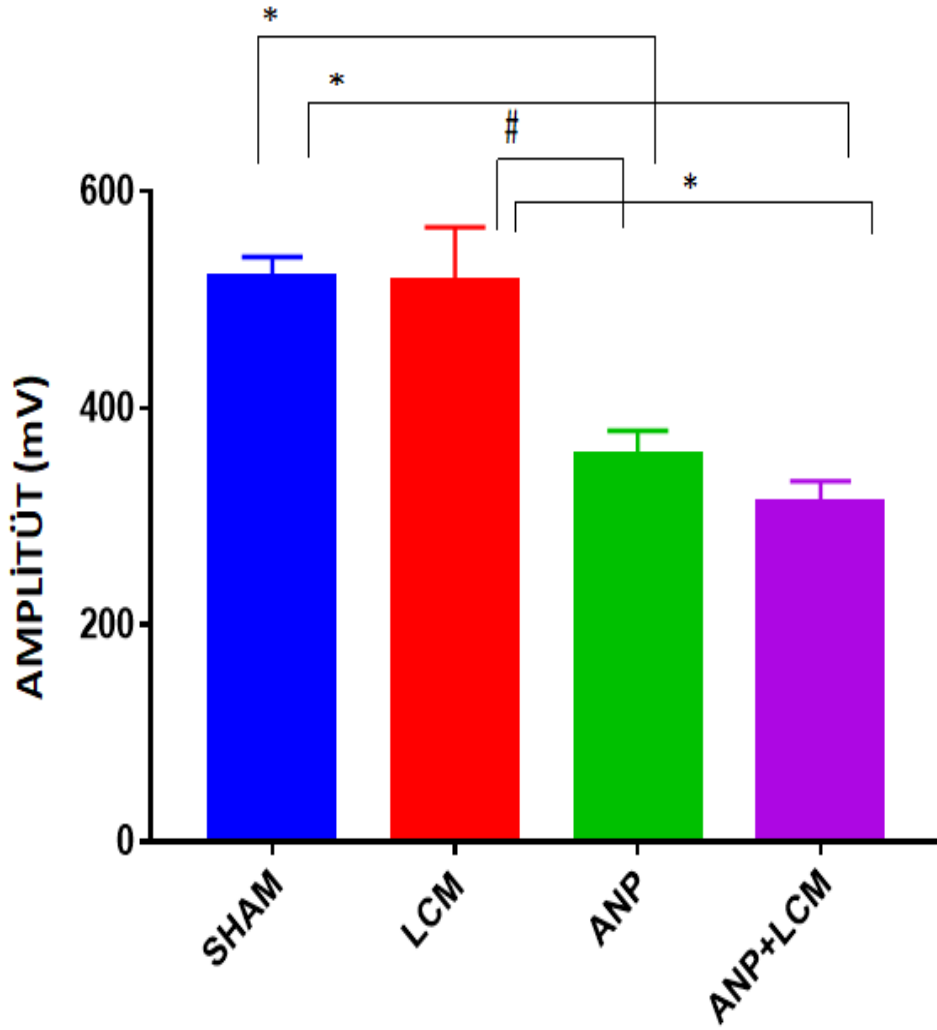
Enjeksiyon öncesinde: **p003+p003-**: Sol hipokampus, **p007+p007-**: Sağ hipokampus

Enjeksiyon sonrasında: **p002+p002-**: Sol hipokampus, **p006+p006-**: Sağ hipokampus



Şekil 4-9: ANP+LCM grubunu temsil eden enjeksiyon öncesi ve sonrasındaki EEG paternleri ve analizleri.

p003+p003-: Sol hipokampus, p007+p007-: Sağ hipokampus

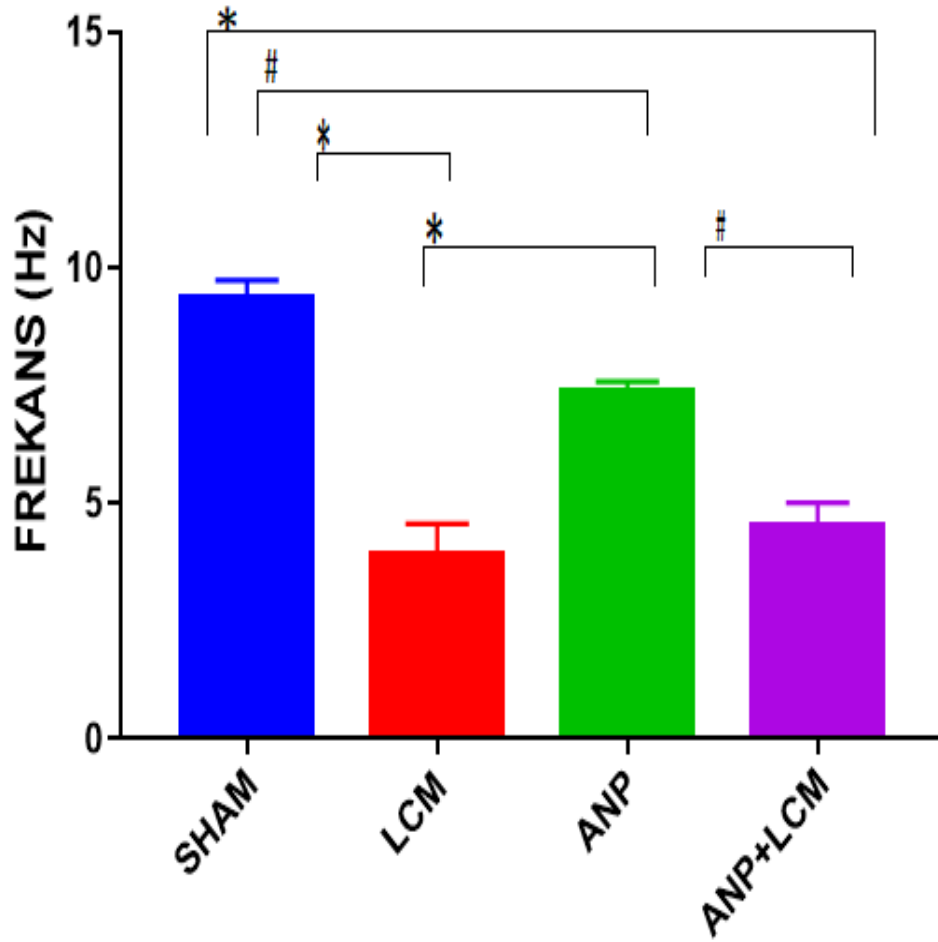


Şekil 4-10: Deney gruplarındaki hayvanların diken dalga deşarjlarının amplitüt değerleri.

*p<0.01 #p<0.05.

Gruplar, nöbet sırasındaki EEG dalgalarının amplitüt değerleri arasındaki fark açısından değerlendirildiğinde; sham grubu ile, ANP+LCM ve ANP ($p<0.01$), LCM grubu ile ANP ($p<0.05$) ve ANP+LCM grubu arasında anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.01$).

Grafikteki veriler ışığında amplitüt değerlerinin ANP+LCM grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (Şekil 4.10; $p<0.01$). Buna rağmen LCM grubunda bazal değerlere yakın bir amplitüt değerinin olduğu gözlemlenmiştir.

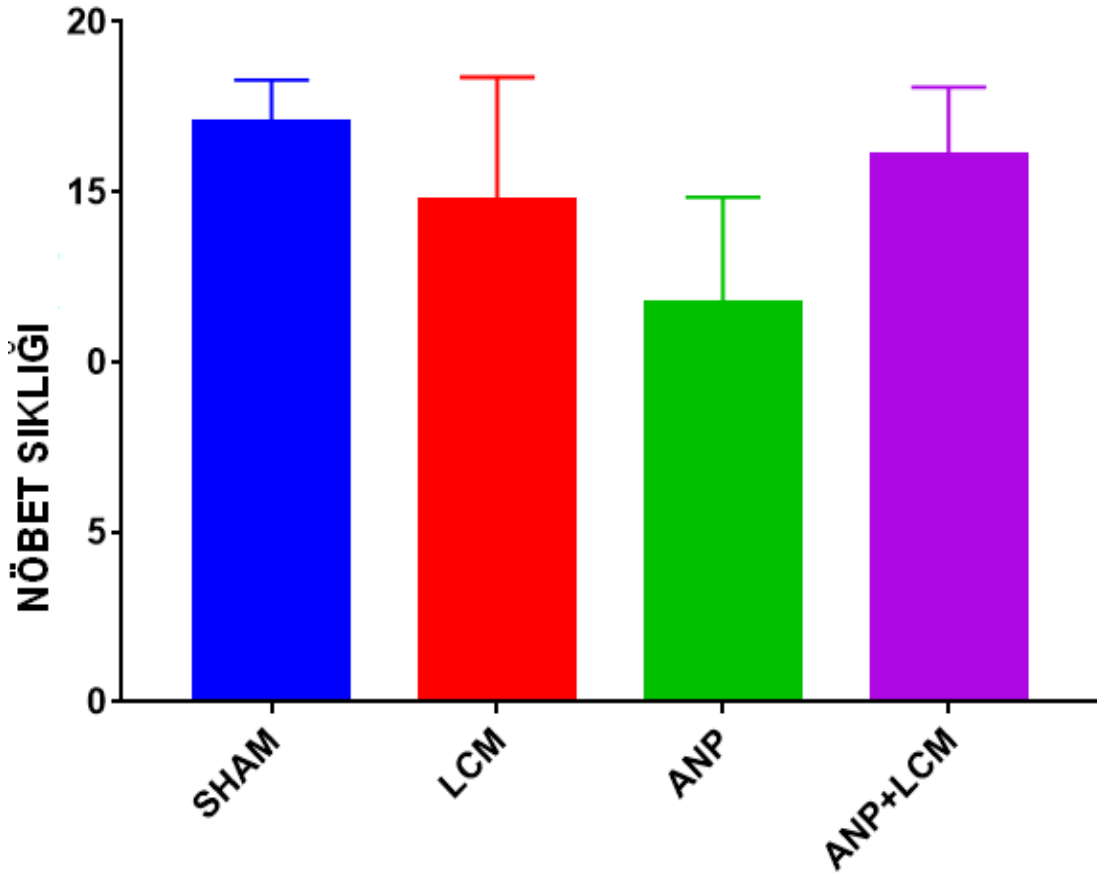


Şekil 4-11: Deney gruplarındaki hayvanların diken dalga deşarjlarının frekans değerlerindeki değişimler.

* $p < 0.01$ # $p < 0.05$.

Nöbetlerin frekans değerleri karşılaştırıldığında sham grubu ile ANP+LCM ($p < 0.01$), ANP ($p < 0.05$) ve LCM ($p < 0.01$) grupları arasında anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Diğer yandan ANP grubu ile ANP+LCM grubu arasında da anlamlı farklılıklar tespit edildi ($p < 0.05$). ANP ile LCM grupları arasında da fark bulunmasına ($p < 0.01$) rağmen, ANP+LCM ile LCM grupları arasında frekans değerleri açısından istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Genel olarak; ANP+LCM grubunda frekans

değerlerinde bazal EEG'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.11; $p<0.01$).

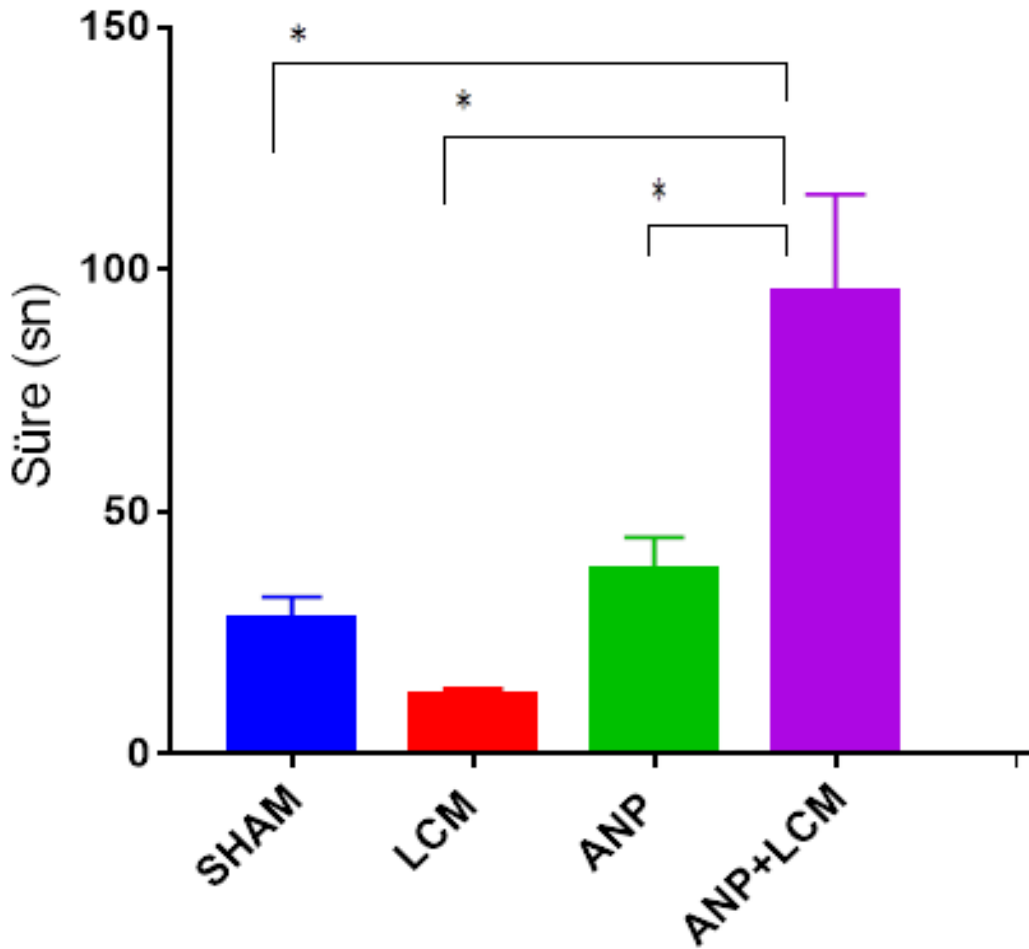


Şekil 4-12: Deney gruplarındaki hayvanların nöbet sıklığındaki değişimler.

Deney gruplarındaki hayvanlardan kaydedilen EEG verilerinin analizi sonucunda LCM, ANP ve ANP+LCM grubundaki hayvanların nöbet sıklıklarında azalma görülmekle birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.12).

4.3. Davranış Deneyi Bulguları

ANP+LCM grubundaki hayvanların açık alanda kalma süreleri ve açık alana yönelme süreleri diğer gruplardaki hayvanlar ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.13 ve 4.14 $p<0.01$). Sadece ilacın verildiği LCM grubunda ise Sham'e göre kıyaslandığında açık alanda kalma süreleri ve açık alana yönelme süreleri azalmıştır (Şekil 4.13 ve 4.14 $p<0.01$).

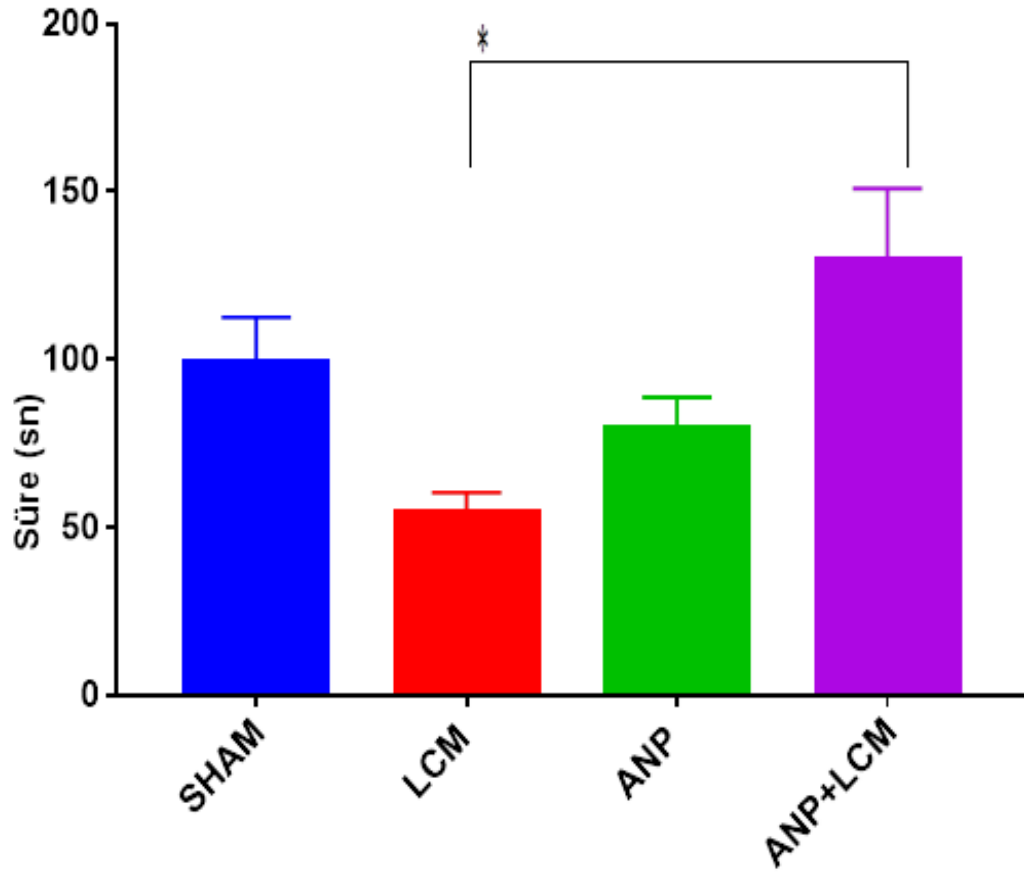


Şekil 4-13: Beş günlük enjeksiyon sonunda yüksektirilmiş artı labirent testinde platformun sadece açık alanında geçirilen süreleri.

* $p<0.01$.

Sham ile ANP+LCM grubu, LCM ile ANP+LCM, ANP ile ANP+LCM grupları arasında anlamlılık olduğu görülmektedir ($p<0.01$).

Sadece açık alanda geçirdikleri süre açısından karşılaştırıldığında ANP+LCM ve ANP grubunun sham grubuna göre açık alanda geçirdikleri süre artmıştır. Buna karşın LCM grubunda azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.13; $p<0.01$).



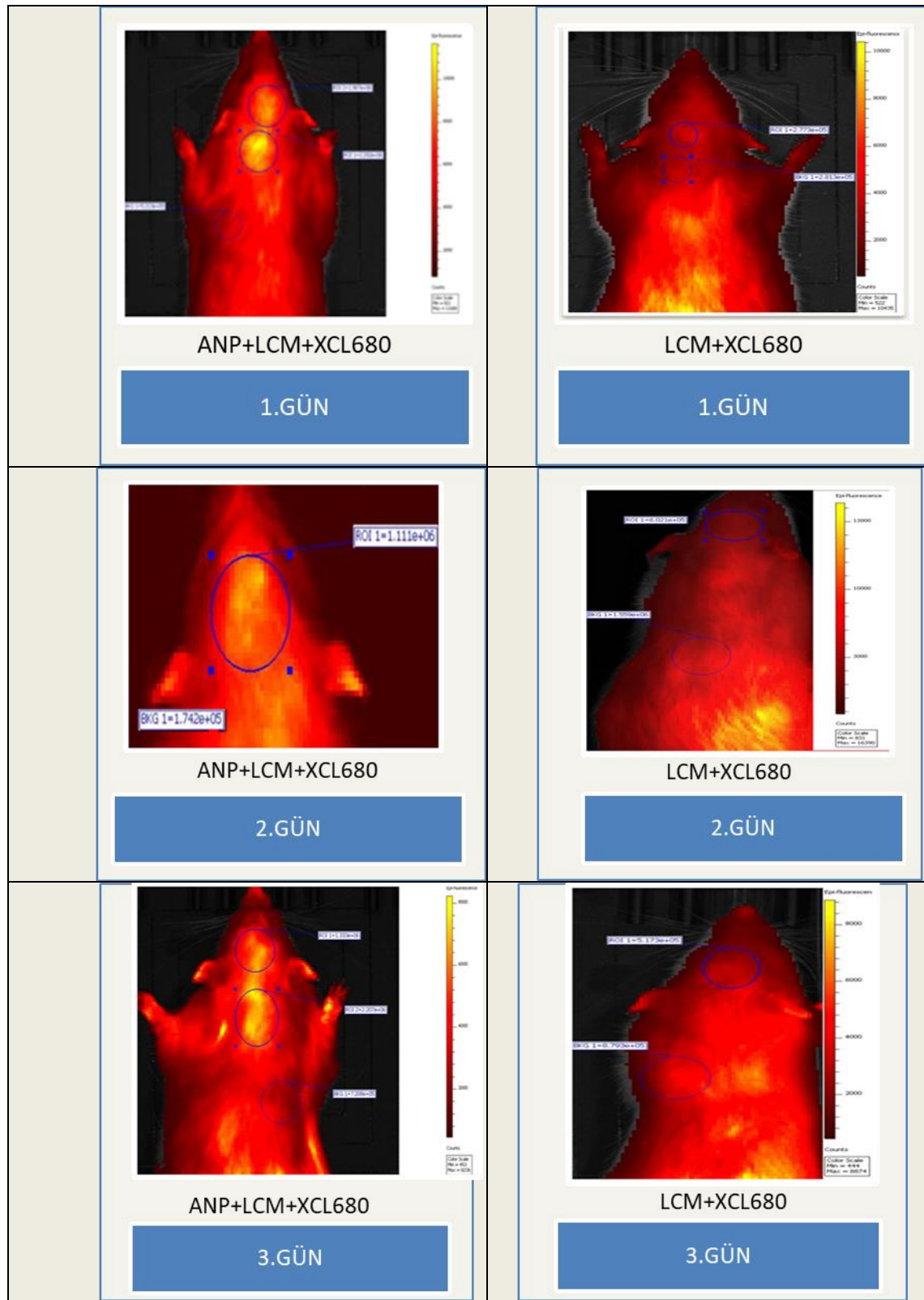
Şekil 4-14: Beş günlük enjeksiyon sonunda yüksektilmiş artı labirent testinde platformun açık alan + açık alana yönelme süreleri.

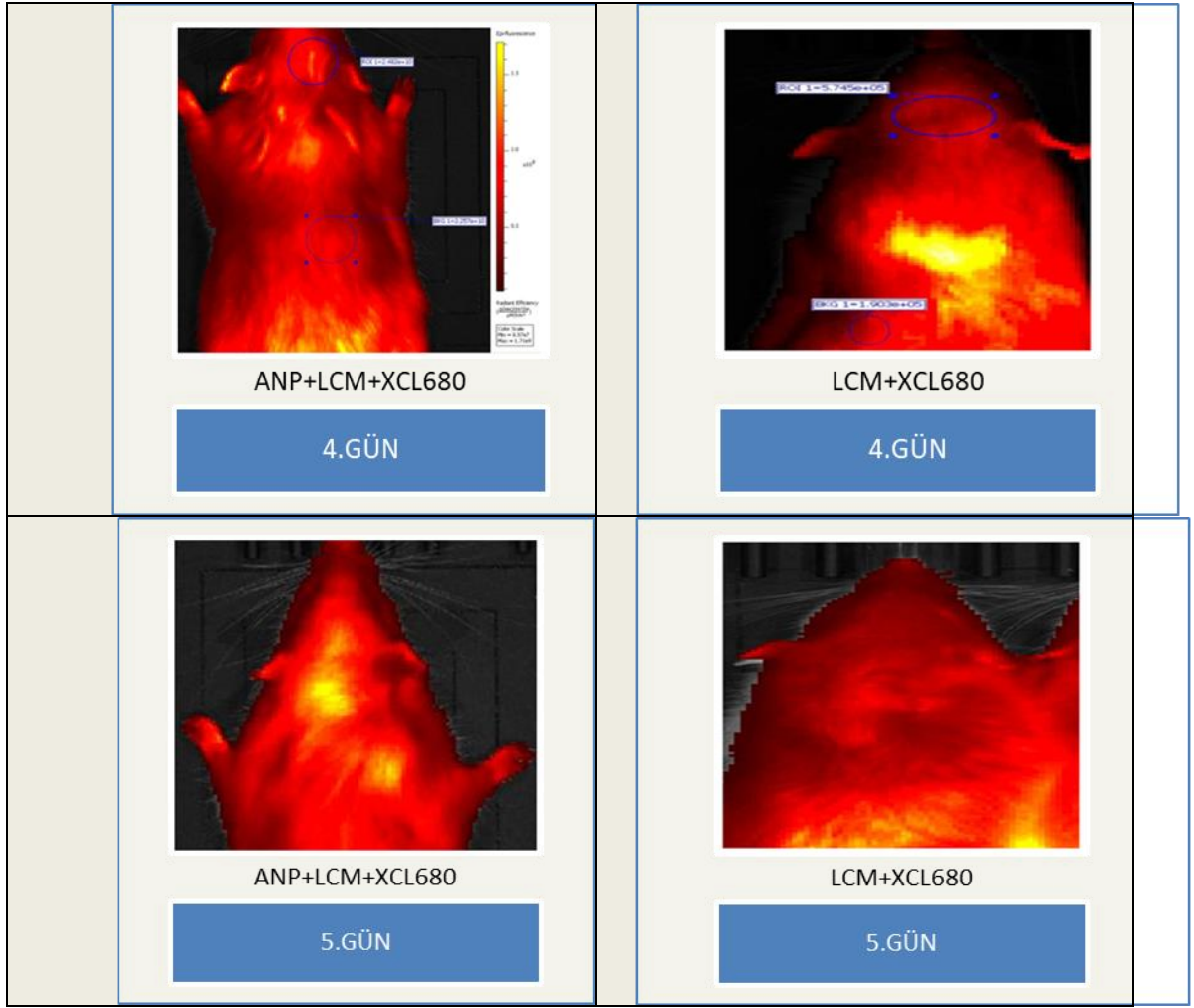
* $p<0.01$.

Açık alanda ve açık alana doğru yönelme ile ilgili olarak ANP+LCM ile LCM grubu arasında anlamlılık bulunmuştur ($p<0.01$). Genel olarak açık alan ve açık alana yönelme davranışlarında ANP+LCM grubunda bir artış söz konusu olmuştur. Hem açık alanda hem de açık alana yönelme aşamasında süre olarak daha fazla zaman geçirmişlerdir (Şekil 4.14; $p<0.01$).

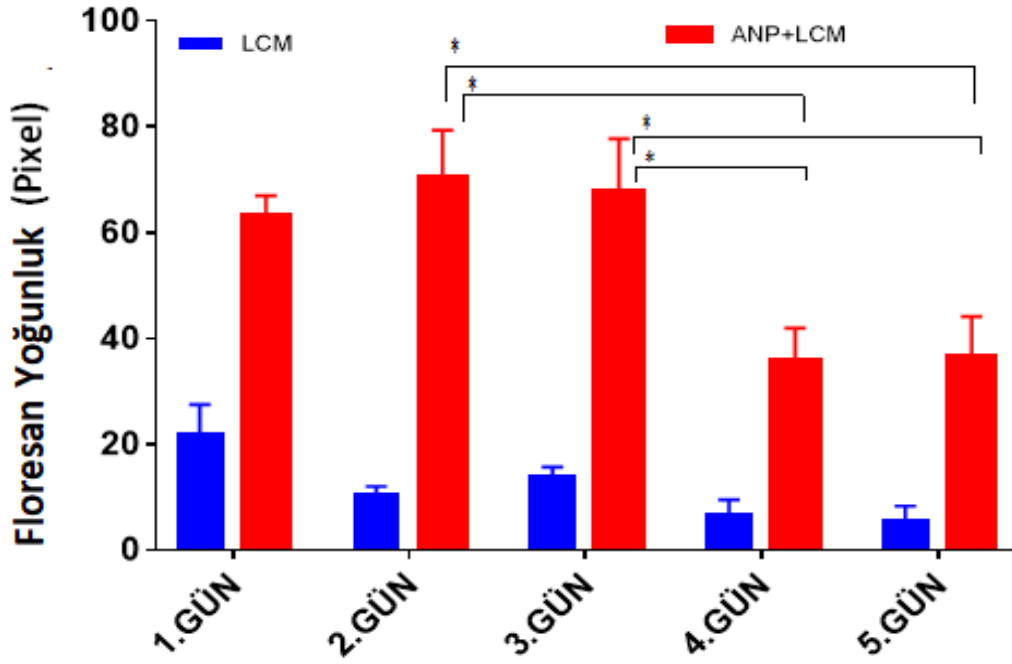
4.4. XLC 680 ile İşaretli ANP+LCM, LCM Görüntüleme Bulguları

IVIS cihazında görüntüleme işlemi tamamlandıktan sonra, görüntüler üzerinde floresan yoğunluğun ölçülmesinin istenildiği bölgelere işaretleyiciler (ROI- Region of Interest) konularak seçilen bölgedeki foton ışımlarının yaydığı enerjinin hesaplanması ile kantitatif değerlere ulaşılmıştır. Bunun için hem IVIS cihazının hem de imageJ programından yararlanılmıştır. XLC680 işaretli LCM ve ANP+LCM grubun beşer günlük i.v. uygulamalarından sonra alınan IVIS görüntülerinde, gün bazında beyin dokusuna geçişin floresan yoğunluk açısından ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.15). Floresan ışımaya veren XLC680 işaretli LCM ve ANP+LCM'lerin IVIS görüntüleme sistemi ile elde edilen floresan yoğunluk değerlerine göre; ANP+LCM miktarında anlamlı artışlar (Sarı renk) gözlenmiştir (Şekil 4.15 ve 4.16). Beyin dokusuna geçişin özellikle ANP+LCM grubunda, ikinci ve üçüncü gün arasında maksimum değere ulaştığı ve daha sonraki günlerde floresan yoğunluk açısından azalma olduğu izlenmiştir (Şekil 4.15 ve 4.16). ANP+LCM+XCL680 grubu LCM+XLC680 grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.16; $p<0.05$). İstatistiksel veriler ışığında floresan bağlı LCM'nin ancak ANP varlığında, KBB'yi aşıp beş günlük enjeksiyonlara ilişkin yüksek yoğunlukta beyin dokusunda akümüle olduğu görülmektedir (Şekil 4.16).





Şekil 4-15: ANP+LCM grubu ile LCM grubunun beş günlük enjeksiyon sonrası beyin dokusuna geçişin IVIS cihazında floresan yoğunluk görüntüleri.



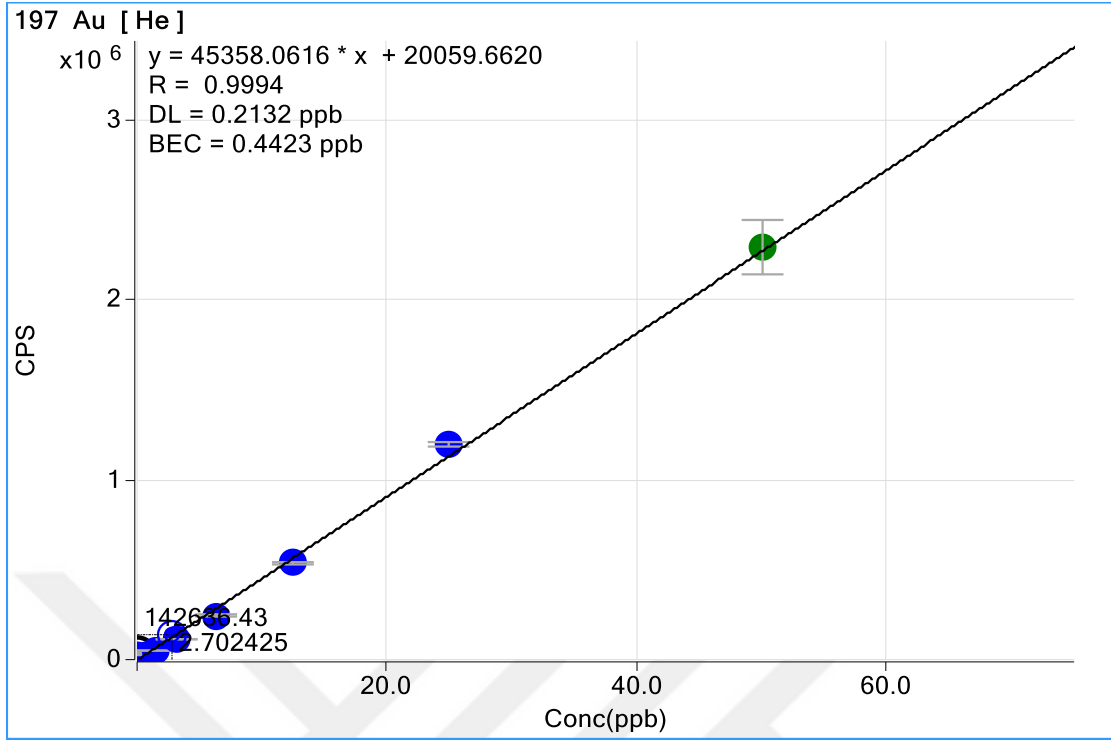
Şekil 4-16: Beş günlük enjeksiyon sonucunda beyin dokusuna geçen ANP+LCM+XLC680'nin floresan yoğunluk miktarlarının günlere dağılımı.

* $p < 0.05$. Floresan yoğunluklar <http://imagej.net/> programı ile hesaplanmıştır.

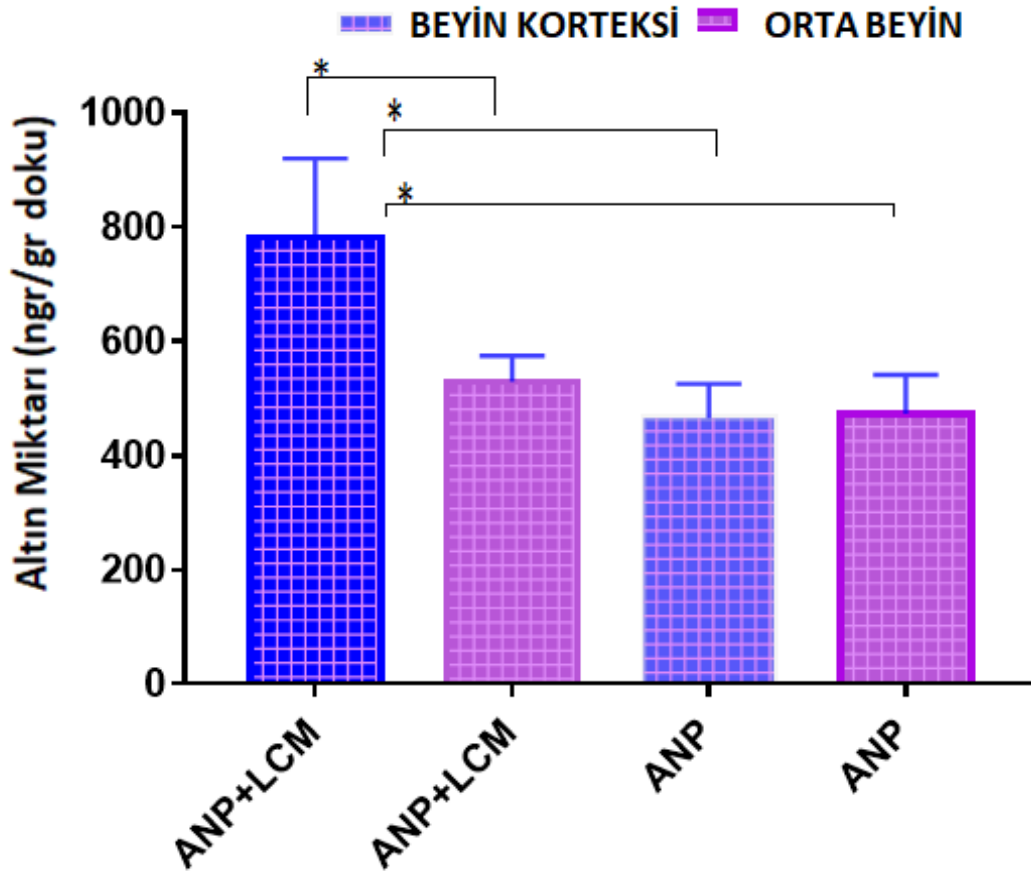
Beyin dokusuna geçen ANP+LCM+XCL680'nin 2. gün ile 4.ve 5. günler arasında, 3.gün ile 4.ve 5.günler arasında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur ($p < 0.05$). Beş günlük enjeksiyonların sonucunda, ANP+LCM+XCL680 grubunda günler arasında beyin dokusuna geçiş floresan yoğunluk bakımından değerlendirildiğinde, LCM+XCL680 grubuna göre artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.16; $p < 0.05$).

4.5. ICP-MS Bulguları

ICP-MS cihazında analiz edilen dokularda, ANP'lerin beyinin korteks ve orta beyin bölgelerine ilişkin birikimleri ppb olarak belirlendi (Şekil 4.17). İstatistiksel analizlerin yapılmasında ppb birimi olarak elde edilen altın miktarları gram dokudaki nanogram birimine çevrilerek grafikte ngr/ gr doku şeklinde analiz edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4-17: ICP-MS cihazında analiz edilen beyin dokusundaki ANP'lerin ppb biriminden dağılımları



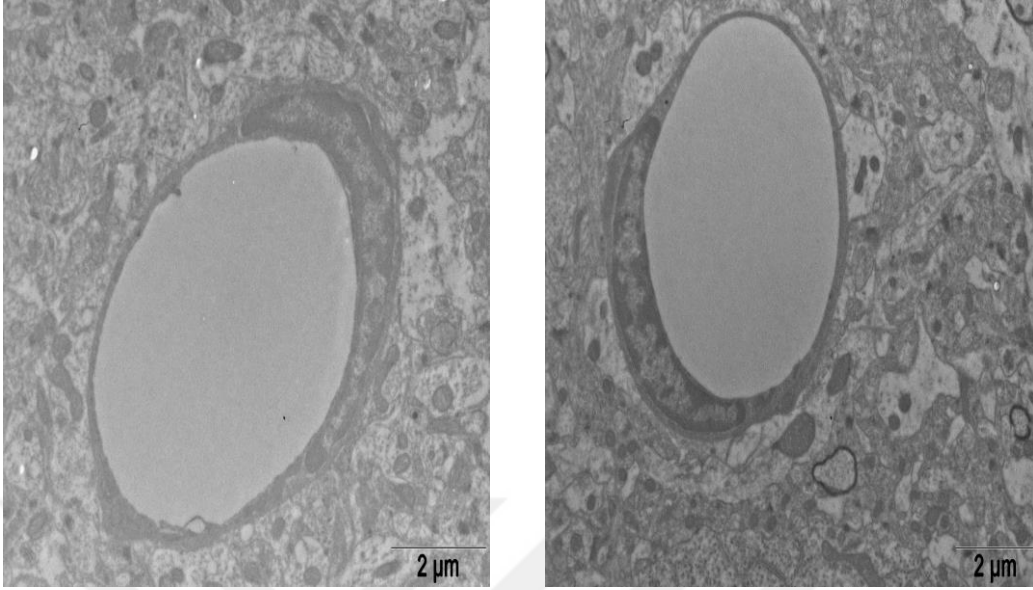
Şekil 4-18: Beş günlük enjeksiyon sonunda ANP+LCM ve ANP grubuna ait hayvanların beyin korteksi ve orta beyin bölgelerinde biriken ANP miktarı.

* $p < 0.01$

ANP+LCM grubundaki beyin korteksine geçen altın miktarı ile aynı grubun orta beyini, yine ANP+LCM grubunun korteksindeki birikim ile ANP grubunun korteksi ve orta beyini arasında anlamlı derecede fark gözlemlenmiştir ($p < 0.01$).

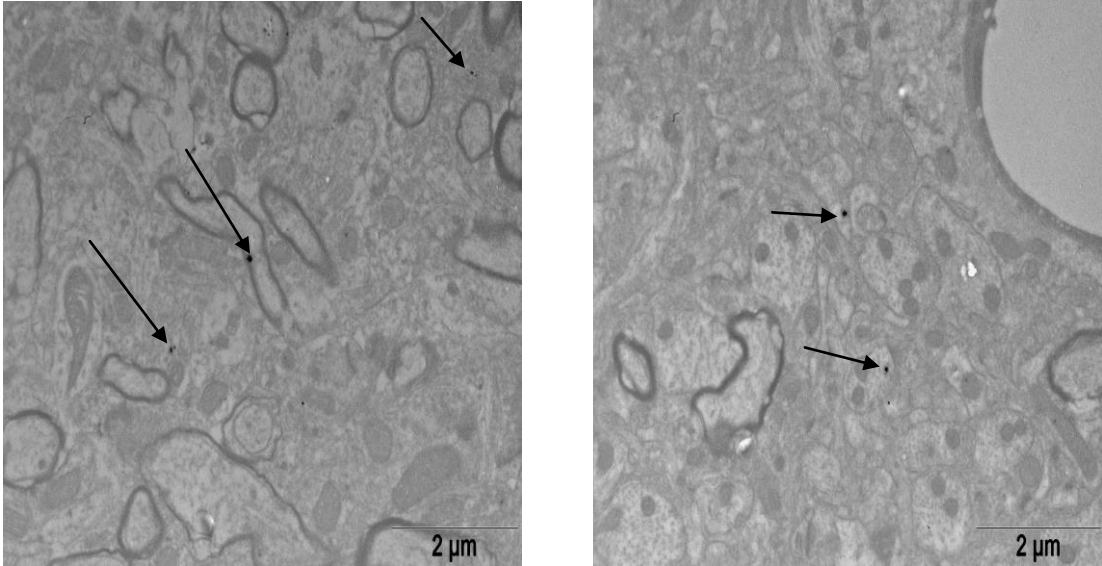
Beyin dokusuna geçen ANP'lerin, LCM bağlı olan grupta daha çok korteks bölgesinde arttığı görülmüştür. Farklı miktarlarda beyinin orta beyin bölgelerinde de ANP miktarında birikmiş olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18; $p < 0.01$).

4.6. Beyin Kesitlerinde Elektronmikroskopik Bulgular



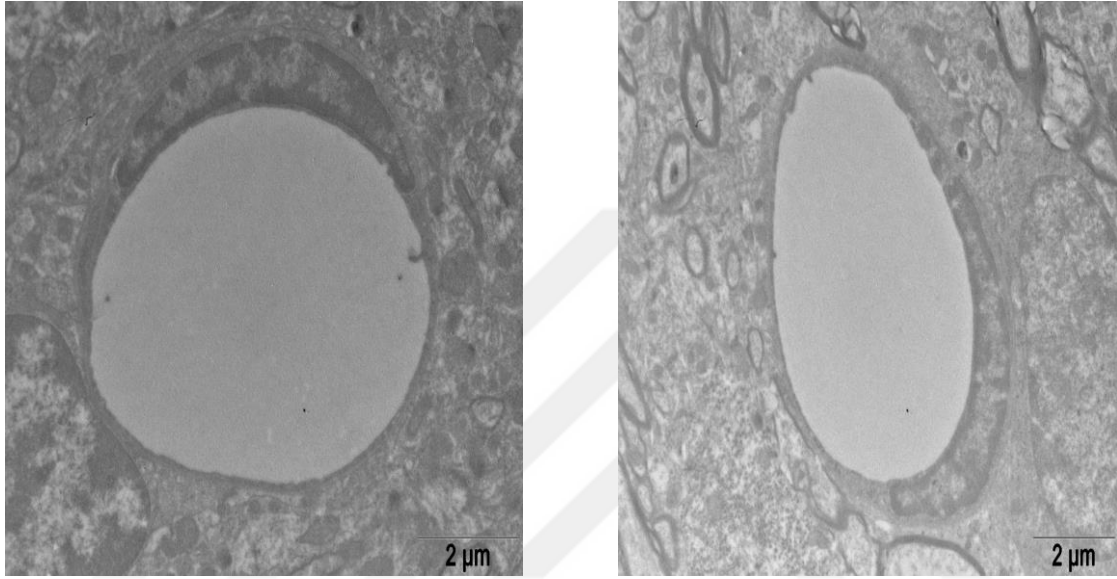
Şekil 4-19: Sham grubundaki WAG/Rij sıçanların beyininin hipokampus (sol) ve beyin korteksi (sağ) bölgelerine ait morfolojik görüntüler.

Sham grubunu oluşturan WAG/Rij sıçanlara ANP uygulanmadığı için bu hayvanların beyin bölgelerinde herhangi bir ANP varlığı söz konusu değildir.



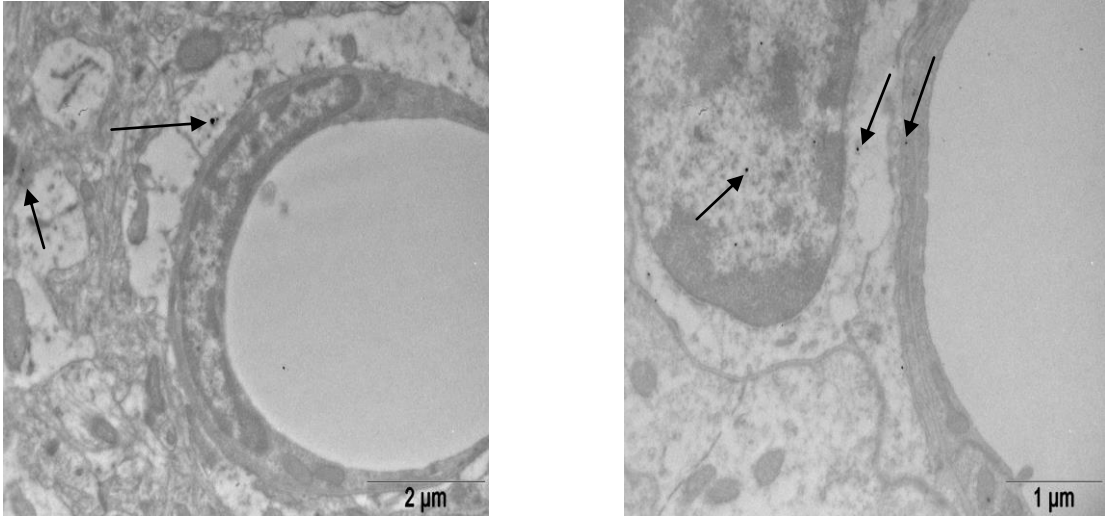
Şekil 4-20: ANP grubundaki WAG/Rij sıçanların beyininin hipokampus (sol) ve beyin korteksi (sağ) bölgelerine ait morfolojik görüntüler.

WAG/Rij hayvanlara ANP enjeksiyonlarını takiben 5. gün sonunda ANP'lerin kapiler kan damarlarının endotel hücrelerini aşp parankimal alandaki nöronal yapılara kadar ulaştığı Şekil 4.20'de görülmektedir. Siyah oklarla gösterildiği üzere ANP'lerin daha miyelinli yapılara ulaşmaya çalıştığı ve bazılarının da miyelin yapısı içine kadar ulaştığı görülmektedir.

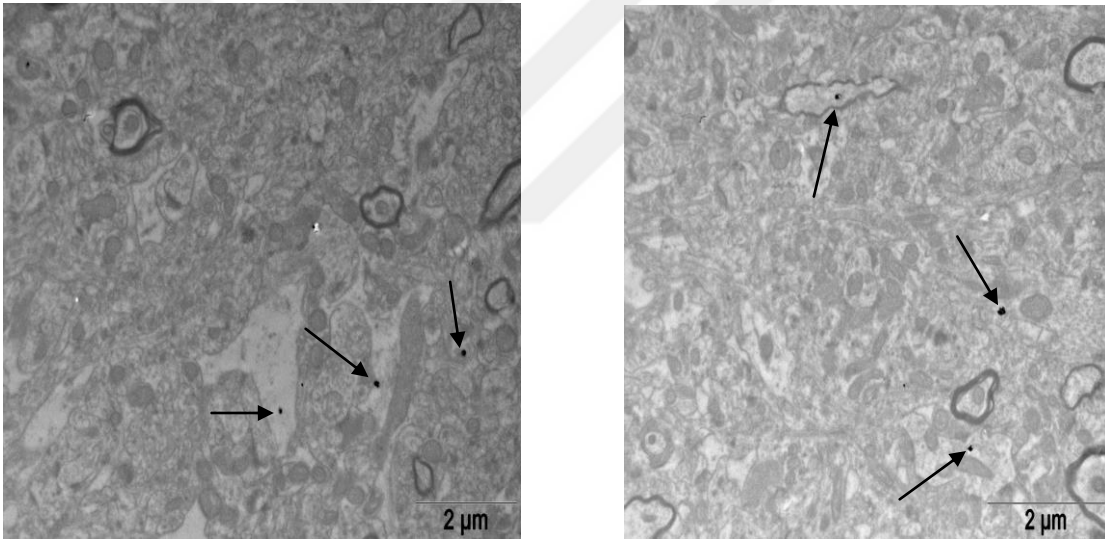


Şekil 4-21: LCM grubundaki sıçan beyininin hipokampus (sol) ve beyin korteks (sağ) bölgelerine ait morfolojik görüntüler

LCM grubunu oluşturan WAG/Rij sıçanlara ANP uygulanmadığı için bu hayvanların beyin bölgelerinde herhangi bir ANP varlığı söz konusu değildir (Şekil 4.21)



Şekil 4-22: ANP+LCM grubundaki sıçan beyininin hipokampus bölgelerinde ANP'lerin lokalizasyonuna ait morfolojik görüntüler



Şekil 4-23: ANP+LCM grubundaki sıçan beyininin korteks bölgelerinde ANP'lerin lokalizasyonuna ait morfolojik görüntüler

WAG/Rij hayvanlara ANP enjeksiyonlarını takiben 5.gün sonunda ANP'lerin kapiler kan damarlarının endotel hücrelerini aşp parankimal alandaki nöronal yapılara kadar ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.22). Siyah oklarla gösterildiği üzere ANP'lerin daha miyelinli yapılara ulaşmaya çalıştığı ve bazılarınının da miyelin yapısı içine kadar ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.23).

4.7. Hemogram Bulguları

Hemogram değerleri ilgili parametreler Tablo 4.1’de verilmiştir. Tablo 4.1’deki veriler ışığında; Hematokrit değerlerinde; ANP ile ANP+LCM grupları arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0.05$). Hemogloblin değerlerinde ise, ANP ile ANP+LCM grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.01$). Granülosit değerleri karşılaştırıldığında; sham ile ANP grubu arasında ($p<0.05$); LCM ile ANP grubu arasında ($p<0.01$) anlamlı bir fark görüldü. Deney gruplarındaki hayvanların trombosit verileri değerlendirildiğinde, LCM ile ANP ve LCM ile ANP+LCM grupları arasında istatistiksel anlamlılık tespit edildi ($p<0.01$).

Tablo 4-1: Gruplara ait hemogram verileri

HEMOGRAM PARAMETRELERİ	REFERANS DEĞERLER	SHAM	ANP	ANP+LCM	LCM
Alyuvarlar	5.6- 7.89 x 10 ¹² /L	9.97	7.12	10.64	9.52
Hematokrit	36.0- 46.0	51.70	42.69	56.36*	54.10
Hemogloblin	12.0-15.0 g/dL	15.05	11.66	16.30*	14.92
Akyuvarlar	2.9- 15.3 X 10 ⁹ / L	13.35	7.53	13.29	15.77
Lenfositler	2.6- 13.5 x 10 ⁹ /L	10.15	5.14	9.35	12.38
Monositler	0.0-0.5 x 10 ⁹ /L	0.37	1.16	0.37	0.59
Granülositler	0.4-3.2 x 10 ⁹ / L	4.21	1.66*	3.49*	4.96*
Trombosit Değerleri	100- 1610 x10 ⁹ / L	1.033.94	351.29	644.93	1.343.42*

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın en temel amacı genetik olarak spontan epileptik özellikte olan WAG/Rij ırkı sıçanlara KBB engelini aşma potansiyeli olan yeni nesil nanotaşıyıcı sistemlerin antiepileptik ilaç ile entegre edilerek uygulanmasının ardından, enjekte edilen LCM'nin epileptogenez üzerindeki uzun süreli etkilerini görebilmektir. Bu çalışmanın en önemli sonucu, altın nanotaşıyıcıya konjuge olan LCM'nin, aynı yapıya konjuge olan glukoz ligandı varlığında Glut-1'i kullanarak beyine geçen LCM'nin WAG/Rij sıçanlarda gözlenen nöbetlerin amplitütü ve frekansında azalmaya neden olduğunun gösterilmesidir.

Projenin kapsamında yer alan KBB ve bu yapıda ortaya çıkan değişikliklerin iyi bir şekilde anlaşılması, nanotaşıyıcılar gibi hem çok yönlü hem de gelecek vadeden moleküllerin beyinin kolay ulaşılamayan ve zarar görmüş bölgelerine ulaştırılmasında hedefe yönelik yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunacaktır (Lockman ve ark. 2002; Barbu ve ark. 2009; Cupaioli ve ark. 2014).

Absans epilepsilerde başlangıç yaşı 3 ila 13 yıl arasında değişmekte olup 6- 7 yıl arasında pik yaptığı söylenmektedir (Posner ve ark. 2008). Epilepsi, insidansının yüksek olması ve özellikle absans epilepsi türünün çocukluk çağında da görülmesi ve ömrün uzun bir zamanını kapsayan belirtileri olması nedeniyle kişinin hem ekonomik hem de sosyokültürel hayatını etkileyen geniş kapsamlı nörodejeneratif hastalıklardan bir tanesidir.

Lakosamidi absans epilepsi hayvan modelinde kullanmanın en önemli gerekçelerinden biri LCM'nin KBB'den beyine geçişinde istenen miktarın aşağıda belirtildiği üzere beyin dokusuna yeteri kadar ulaşamaması yanında, özellikle absans epilepside ilaç dirençli vakaların da olduğu birçok çalışmada gösterilmiş olmasıdır (Stewart ve ark. 2012; Franzoni ve ark. 2015). Çok merkezli bir retrospektif çalışmada 92 ilaç dirençli absans nöbetli hastanın %49'nun ilaç kullanımına karşın nöbetlerin dirençli olarak devam ettiği rapor edilmiştir (Franzoni ve ark.2015). Diğer yandan, dirençli absans epilepsinin patofizyolojisinde Glut-1 protein sendromunun da rol oynadığı ileri sürülmüştür (Ragona ve ark. 2014).

Lakosamidin bir p-glikoprotein substratı olduğu (Zhang ve ark. 2013) ve bu nedenle KBB'nin endotel hücreleri tarafından kan geri pompalandığı düşünüldüğünde,

dirençli epilepsinin tedavisinde etkin bir şekilde iş göremediği ileri sürülebilir. Daha da ötesi, aktif transport mekanizmaları ile KBB'den beyine taşınan LCM bu geçiş yolağını kullanması nedeni ile antikonvulzan ve antiepileptik özelliklerinin sınırlı kalacağı ileri sürülmüştür (Zhang ve ark. 2013; Gáll ve ark. 2018). Bu bağlamda, bir absans epilepsi hayvan modeli olan WAG/Rij sıçanlarda düşük dozda (35 µg) kullanım şansı olan LCM'yi KBB geçme potansiyeli olan bir nanotaşıyıcıya eklemlendirerek kullanmak absans nöbetler üzerine olan olası etkilerini görmek için önemli olacaktır. Ayrıca, miligramlarla ifade edilen yüksek dozları ile karşılaştırıldığında çalışmamızda mikrogram dozlarda kullanılan bu ilacın yaratacağı yan etkilerin de oldukça sınırlı kalması çok muhtemeldir.

Epilepsi ve özellikle WAG/Rij sıçanlar ile yapılan çalışmalar daha çok tanı amaçlı enflamatuvar, patofizyolojik süreçler ve prognoza yönelik belirteçler ile ilgili yapılan araştırmalardır (Pedram ve ark. 2015; Ramazan ve ark. 2016). Bu çalışmanın en özgün yanını oluşturulan metodolojide; ANP, LCM ve ANP konjuge LCM'nin hedeflenen bölgeye yönlendirilmesi ile antiepileptojenik süreçlerin incelenmesi oluşturmaktadır. Aynı laboratuvar da daha önce yapılan bir çalışmada aynı maddelerin model olarak kainik asit ile oluşturulan TLE'de denenmiş olması ve KBB dinamikleri üzerindeki etkilerinin ortaya konulması bu çalışmaya yön göstermesi bakımından önemli veriler sağlamıştır (Yılmaz 2017). Yılmaz'ın çalışmasında sadece bir enjeksiyon ve 24 saat sonundaki etkileri gösterilmiştir (Yılmaz 2017). Bu çalışmada ise LCM'nin uzun süreli etkilerinin doz açısından da katkı sağlayacağı düşüncesine temel oluşturmuştur. Aynı çalışmada, en önemli ana amaçlardan birini yüzeyi fonksiyonelleştirilmiş olan ANP ile ANP+LCM konjugasyonlarına glukoz ligandının da eklemlendirilmesi oluşturmaktadır. Beyinde bariyer tip endotel hücrelerinde bulunan Glut-1 proteininin önerilen ilacın KBB'den geçişinin sağlanması yönünde önemli bir avantaj sağlaması beklenmektedir.

Nanotaşıyıcılara antiepileptik ilaçların bağlanarak epileptik beyine aktarılması ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu bakımdan çalışmada model olarak ta farklı bir epilepsi alt türü (absans epilepsi) seçilerek etkilerin beşer günlük yapılan nanotaşıyıcı ile birlikte LCM enjeksiyonları ile epileptogenez üzerindeki uzun dönem etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda, gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın önemli bir

boşluğu doldurması kaçınılmaz olacaktır. Ancak, yine de bu konuda kronik süreci içerecek daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Genetik model olarak tercih edilen WAG/Rij ırkı sıçanların EEG paternlerinin incelenmesi ve insandaki absans epilepsi nöbetlerin EEG profiline benzerlik göstermesi (Sitnikova ve ark. 2017) çalışmanın deney hayvanı absans modelinin oluşturma aşaması açısından özgünlük sağlamıştır. Çalışmamızda, EEG paternlerindeki olumlu sayılabilecek değişiklikler, davranışsal olarak anksiyete düzeyinin azalması, ANP bağlı LCM'in floresan ışıma seviyelerinin IVIS cihazında beyin dokusunda artış göstermesi bahsi geçen moleküllerin KBB'yi aşarak antiepileptik ilacın etki mekanizmalarını harekete geçirdiğini göstermiştir. Nöbet paternleri sırasındaki davranışsal belirtilerin gözlemlenmesi proepileptik değişikliklerin olabileceği konusunda bilgi sağlamıştır. Ayrıca ICP-MS sistemi kullanılarak ANP'lerin beyin korteks ve orta beyin bölgelerinde birikimlerinin gösterilmesi taşıyıcı sistemin etkin bir şekilde KBB transport yollarını aktif şekilde kullanabileceği fikrini güçlendirmektedir. Hemogram analizleri ile desteklenen çalışmada, her bir grubun kan parametrelerindeki değişimleri ortaya konarak diğer analiz sistemleri ile birlikte LCM, ANP ve ANP+LCM'nin klinik yansımaları ve özellikle taşıyıcı sistemin risk değerlendirilmeleri açısından bir ön fikir verisi olarak kaydedilmiştir.

Antiepileptikler için nano boyutlu taşıyıcıların geliştirilmesinde göz önünde bulundurulması gereken önemli şartlar literatürde belirtilmiştir (Torre ve ark. 2014). Bunlardan en önemlileri; kan dolaşımında uzun süre degrede olmadan kalabilmeleri, toksik olmamaları, boyut olarak küçük olmaları ve yüksek kapasitede ilacı taşıyabilmeleridir. Çalışmamızda kullanılan ANP'lerin karakterizasyonu ve sentezlenmesi aşamalarında boyutunun diğer nanopartiküllerden daha küçük olması (1.1nm) ve glükoz ile fonksiyonelleştirilmiş olması hedefe yönelmesi konusunda KBB dinamikleri açısından avantaj sağlamıştır. Bu çalışmada kullanılan ANPlerin ortalama çapları 1.1 nm civarında olurken glükoz, LCM ve PEG ile bir kargo oluşturulması sonrasında da toplam kargonun çapının 1.7 nm civarında olduğu hesaplanmıştır. Bu değerdeki bir kargonun KBB'nin endotel hücrelerinde bulunan Glut-1'e glükoz ligandı ile bağlanmasının yanında hücre zarından difüzyon ile taşınması ANP sayesinde söz

konusu olabilmektedir. Elde edilen bulgular ışığında özellikle ANP+LCM nin uzun dönem enjeksiyonlarında kan dolaşımında da uzun süre kalabildiği gözlemlenmiştir.

Nörodejeneratif hastalıkların *in vitro* ve *in vivo* hayvan modellerinde kullanılan nanotaşıyıcıların boyutları, şekli sertliği, yüzey yükü ve bileşimi ve çökme özelliklerinin fonksiyonel olmaları bağlamında önemli oldukları bilinmektedir. Özellikle bu nanotaşıyıcıların boyutlarının beyindeki bariyer tip kan damarlarının endotel hücrelerinden geçebilmelerinde en önemli özelliklerinden biri olduğu önerilmektedir. Bu bağlamda, literatür taraması yapıldığında katı lipid nanotaşıyıcıların boyutlarının yaklaşık 76-145 nm (Picone ve ark. 2009; Gobbi ve ark. 2010), dendrimer boyutlarının 20-89 nm olduğu (Chafekar ve ark. 2007) ve klatrin ve kaveolin tarafından inhibe edildikleri (Poovaiah ve ark. 2018), polylactic-co-glycolic acid (PEG)-coated hexadecyl cyanoacrylate nanotaşıyıcı boyutlarının 83-96 nm (Bhavna ve ark. 2014), Chitosan 67-147 nm (Trapani ve ark. 2011), nanogel boyutlarının 20-200 nm (Soni ve ark. 2016), nanoemulsions boyutlarının 20–200 nm (Solans 2005), liposomlarının boyutlarının 40 nm altında (Chen ve ark. 2017) ve nihayet misellerin 5 to 20 nm arasında (Trapani ve ark. 2011) oldukları ileri sürülmüştür. Son yıllarda teknolojilerin gelişmesine bağlı olarak yukarıda da ifade edildiği üzere ANP boyutlarının diğer nanotaşıyıcılara kıyasla önemli düzeyde yaklaşık olarak 1 nm civarına kadar küçültülmesi bu nanotaşıyıcının deneysel çalışmalarda kullanılmasını diğer nanotaşıyıcılara göre daha avantajlı bir duruma getirmektedir.

Epilepsinin ortadan kaldırılması veya etkilerinin en aza indirilmesi ile ilgili ortaya çıkarılan epileptogenezdeki patofizyolojik mekanizmaların çözümüne yönelik yeni mekanistik yaklaşımlar yanında, antiepileptik ilaçları taşıyan nano malzemelerin de epilepsinin hayvan modellerinde kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır (Cano ve ark. 2018). Solid lipid nanotaşıyıcı veya misellere yüklenen klozepamın tek başına uygulanan ilaç etkisine kıyasla daha fazla şiddette antikonvülzan etkiler sağladığı bildirilmiştir (Leyva-Gómez ve ark. 2014). Karbamezapinin “poly lactic-co-glycolic acid” (PLGA) nanotaşıyıcısı ile birlikte beyindeki antikonvülzan etkisi tek başına uygulanmasına kıyasla 30 kat daha fazla etkili olduğu izoniazid ile indüklenen dirençli epilepsi sıçan modelinde gösterilmiştir (Zybina ve ark. 2018). Oksarbazepinin PLGA nanotaşıyıcısına yüklenmesinin ardından beyine dokusuna daha fazla oranda geçtiği ileri sürülmüştür (Lopalco ve ark. 2015). Hidrojel yapıdaki nanotaşıyıcıya fenotoin

yüklenmesinin ardından beyine geçen fenotoin miktarının elektroşok ve pentilentetrazolle indüklenen generalize tonik-klonik nöbetlerin şiddetini azalttığı bildirilmiştir (Wang ve ark. 2016). Yukarıda bahsedilen çalışmalarda daha çok indüklenen nöbet modelleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan bir çalışmada lityum pilokarpin ile indüklenen epilepsi modelinde, epileptik odakta immun sistem hücrelerinin identifiye edilmesi ve epileptik odağın tanımlanması amacıyla floresan işaretli nanopartiküller sistemik olarak intravenöz yol ile enjekte edilerek odağın lokalizasyonu hakkında bilgilere ulaşılmıştır (Portnoy ve ark. 2016). Çalışmamızda, indüklenen modellerden ziyade, nöbetlerin spontan olarak geliştiği genetik absans epilepsi modelinin kullanılacak olması ve bu model üzerinde ANP'lerin çalışılıyor olması literatüre ayrıca bir katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda tercih edilen LCM adlı ilaç fonksiyonelleştirilmiş bir amino asit bileşiği olup, antinosiseptif ve nöroprotektif aktivitelere sahiptir. Parsiyel başlangıçlı nöbetler için ilave tedavi olarak kullanmak üzere sentezlenen, hızlı inaktivasyonu etkilemeden voltaj kapılı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonunu seçici olarak artıran LCM, hipereksite olmuş nöronal membranları stabilize etmektedir (de Biase ve ark. 2017; Hoy ve ark. 2018; Farrokh ve ark. 2019). Ayrıca, çoğu dokuda eksprese edilen bir sitozolik fosfoprotein olan kollapsin protein 2'ye (CRMP2; DPYSL2) bağlanma özelliğindedir ki, CRMP2 sinir sisteminde büyüme konisi çöküşünün bir aracısı olarak işlev görerek akson sayısını, uzunluğunu ve nöronal polariteyi değiştirme özelliğindedir (Kellinghaus 2009; Wilson ve Khanna 2015).

WAG/Rij sıçanların beyinlerine yerleştirilen elektrotların EEG sistemi ile bağlantılarının sağlanması sonrasında ANP, LCM ve ANP+LCM'nin beşer günlük kuyruk veninden yapılan enjeksiyonları öncesinde ve sonrasında alınan EEG kayıtları değerlendirilmiştir. WAG/Rij sıçanların nöbetlerinde DDD'leri 7-10 Hz'lik frekans ve 200-1000 μ V'luk amplitüt değerlerine sahiptir (Depaulis ve ark. 2018). ANP, ANP+LCM, LCM'nin gruplarındaki WAG/Rij hayvanların nöbet sıklıklarında az da olsa azalmalar gözlemlenmesine rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilmemiştir. Ancak genel olarak nöbet paternlerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. DDD'lerin paternleri gruplara göre değerlendirildiğinde, ANP+LCM grubunda hem amplitüt hem de frekans değerlerinde anlamlı olarak azalmaların olduğu görülmüştür. ANP+LCM grubu için bu azalma, ilk aşamada KBB dinamiklerinde transport sistemlerinin aktive olup molekülün beyine geçtiğinin nöronal ateşleme bazında olan

bir göstergesidir. Diğerisi ise; LCM'nin ANP varlığında beyin parakimine geçtikten sonra ANP ile bağlantısallık mekanizmalarının aktive olup DDD'leri üzerine etkili olduğunu söylemek mümkün görünmektedir. Amplitüt ve frekanslarda gözlenen bu azalmaların beyin parankimine geçen ANP+LCM'deki her iki molekülün birlikte mi yoksa LCM'nin ANP'den ayrılıp tek başına etkisinden mi kaynaklandığı ve hangi düzeylerde etkili olduğu çok açık değildir. O yüzden gelecek çalışmalarda LCM'nin ANP'den salınım mekanizmalarına ilişkin araştırmalara ihtiyaç vardır. EEG seviyelerinde elde edilen diğer bir bulgu ise, ANP'nin tek başına uygulanması ile birlikte amplitüt ve frekans değerlerinde (ANP+LCM grubu kadar olmasa da) azalmaya neden olmasıdır. O yüzden, yukarıda bahsi geçen ilacın bağlandıktan sonra salınım mekanizmalarının da mutlaka incelenecek olması, ANP'nin de nöbet paternleri üzerinde etkili olabileceği düşüncesine aydınlık getirecektir.

LCM'nin EEG üzerindeki genel etkilerinden biri olan frekans değerlerinin azalması ve bu azalma ile birlikte kognüsyonda iyileşmenin olduğuna dair bilgiler literatürde mevcuttur (Lancman ve ark. 2016), fakat çalışmamızda LCM'nin tek başına yani ANP'siz uygulanması ile ilgili verilerde frekans değerlerinin azaldığı, buna rağmen sham grubuna göre amplitüt değerlerinin neredeyse sham grubu seviyesinde yüksek seyrettiği gözlemlenmiştir. Bu veriler, aynı zamanda anksiyete üzerindeki etkisini incelediğimiz davranış deneyi sonuçları ile de korele olduğu düşüncesini pekiştirmiştir. Özellikle LCM grubunun EPM testinde, açık alan ve açık alana yönelme eğilimlerinde azalmalar görülmüştür. Ayrıca LCM'nin yan etkilerinin ve toksik süreçlerinin incelendiği bir çalışmada az bir oranda da olsa anksiyete durumlarında artış gözlemlenebileceği bildirilmiştir (Lancman ve ark. 2016). Yapılan açık alan testinde doz ile ilişkili olarak WAG/Rij sıçanlarda (90-180 mg/kg/gün dozunda verilen LCM) çevreyi keşfetme ve yeni çevreye oryantasyon gibi davranışlarında sham'e göre biraz daha az zaman geçirdiklerine dair bilgiler bulunmaktadır ki (VIMPAT 2017), bizim çalışmamızda da yer alan EPM davranış testinde, tek başına LCM uygulanmasının açık alana çıkma (çevreyi keşfetme ve oryantasyon) sürelerinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, yukarıda bahsedilen çalışmada biyokimyasal parametrelerden kolesterol düzeyleri, alkalik fosfataz, alkalik transaminaz değerlerinin arttığı tespit edilmiştir ve karaciğerdeki bu artışın fizyolojik adaptif mekanizmalar ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (VIMPAT 2017). Dolayısıyla, LCM kimyasal yapısının aminoasit bazlı olması ve doz ile ilişkili

olarak karaciğer enzimleri üzerinde etkili olabileceği ve bunun neticesinde çalışmamızda anksiyete değerlerine etkili olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmiştir. Bu yüzden LCM ve ANP+LCM ile ilgili olarak özellikle nöroefektif etkilerin daha iyi anlaşılması adına sıçanlarda doz ile birlikte biyokimyasal parametrelerin de inceleneceği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anksiyete ile ilgili davranışların araştırıldığı açık alanda kalma ve açık alana yönelme süreçleri içerisinde beyinin belirli bölgelerinin aktif hale gelmesi sözkonusudur. ANP+LCM grubunun EEG traselerindeki DDD'lerinin frekans ve amplitüt değerlerindeki olumlu durum EPM davranış testi ile de korele olarak tespit edildi. ANP+LCM grubundaki WAG/Rij sıçanların sham grubuna göre açık alanda ve açık alana yönelme zamanlarında belirgin şekilde artış oluşu, bu grubun anksiyete düzeyinde olumlu gelişmelerin ortaya çıktığı konusunda fikir verir. Yine, ANP grubunda da EEG verileri ile korele olarak her ne kadar ANP+LCM grubundaki veriler kadar olmasa da anksiyete düzeylerinin sham'e göre daha olumlu olduğu söylenebilir. Bu durum, ANP'nin beyin parekiminde özellikle absans epileptik nöbetlerin kaynaklandığı talamokortikal yolakların ilişkili olduğu bölgelerde birikim göstermesi ile de açıklanabilir. Diğer yandan, LCM grubundaki hayvanların EPM testinde açık alanı çok fazla tercih etmemelerinin nedeni ilacın yan etkisinin bir sonucu olabilir. Ayrıca görüntüleme verileri ve diğer laboratuvar bulguları ile korele olacak şekilde davranış bulgularının da klinik olarak yansımaları anksiyetenin belirli bir seviyede azalmasının ancak, ANP varlığında olabileceği fikrini güçlendirmektedir.

Beyin parankimindeki ANP'lerin birikimleri ICP-MS cihazı ile ölçülmüş ve altın ile ilgili elde edilen verilerin hem IVIS hem de elektron mikroskopi verileri ile örtüştüğü gösterilmiştir. Diğer gruplardaki hayvanların beyinlerindeki altın varlığı ile kıyaslandığında, özellikle ANP+LCM grubundaki hayvanların beyin korteks bölgelerinde anlamlı şekilde birikim olduğu ICP-MS analizleri ile tespit edilmiştir. Aynı zamanda, orta beyin bölgelerinde de ANP+LCM birikimi sözkonusudur. Sadece ANP'nin olduğu grupta yine beyin korteksi ve orta beyinde birikim gözlemlenmiştir. Elektron mikroskopi bulguları da ANP'lerin hem tek ANP verilen hem de ANP+LCM uygulanan hayvanların hem beyin korteksi hem de hipokampus bölgelerinde varlığı gösterilmiştir. Morfolojik değerlendirmelerde ANP'lerin kan damarlarının endotel

hücrelerinin içinden ziyade parankimal alana geçtiği ve bölgelere yerleştiği ve özellikle de aksonal yapıların miyelin bölgelerinde oturduğu tespit edilmiştir.

Literatürde klasik kortiko-retiküler teoriye göre, hipereksite edilebilir bir beyin korteksinin absans epilepsi nöbeti oluşumu için bir önkoşul olduğu belirtilmektedir (Tolmacheva ve ark. 2004). Yine nöbetlerin talamokortikal kökenli olduğu farklı bir literatürde de bildirilmiştir (Sitnikova ve ark. 2017). Bu çalışmalar ışığında, ANP ve ANP+LCM gruplarındaki hayvanların beyin korteks bölgelerindeki ICP-MS ile ölçülen ANP birikimleri nöbetlerin paternlerindeki değişimin korteks kaynaklı olabileceği konusunda bir ön fikir vermektedir. ANP'nin neden özellikle beyin korteks bölgesini daha çok tercih ettiği sorusu ise akla gelebilir. Bu konuda spektral analizlerin çoklu olarak yapılabileceği floresan görüntüleme sisteminin çalışmalara entegre edilebileceği reseptör düzeyindeki araştırmalar ile duruma açıklık getirilebilir. ICP-MS analizleri sonucunda elde edilen diğer bir bulgu ise, bir günlük ANP enjeksiyonuna (Yılmaz 2017) kıyasla, ANP'nin beş günlük enjeksiyonları sonrasında anlamlı bir şekilde beyindeki miktarlarının artış göstermesidir. Böylelikle bir sonraki çalışmada antiepileptik ilacın doz ayarlamalarında ANP'nin gün bazında artırılan miktarına kolayca entegre edilebilme olanağı bulacaktır.

ICP-MS verileri ile birlikte beyin parankimine geçen ANP ve ANP+LCM'nin canlı hayvanda görüntülenmesi çalışmanın özgünlüğü açısından ayrı bir önem taşır. Canlı görüntüleme sistemi IVIS şimdiye kadar esas olarak tümör büyümesinin dinamiklerini aydınlatmak üzere kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada glioblastoma multiforme tümörünün hücre hatlarının fareye ortotopik olarak verilmesinden sonra nanopartikül ve fotodinamik terapinin IVIS sistemi kullanılarak biyodağılım süreçleri incelenmiştir (Tsai ve ark. 2018). Bununla birlikte epileptik beyinlerde meydana gelen ve hızla değişen moleküler değişimlerin araştırılması için de IVIS görüntüleme sistemi kullanılmaya başlanmıştır. Bu anlamda yapılan bir çalışmada status epileptikus geçiren hayvanların beyinlerinde biyoluminesan prob kullanılarak genlerin doku spesifik aktivasyonları gösterilmiştir (Rossignol ve ark. 2014). IVIS görüntüleme sisteminin diğer çalışmalardan farklı olarak; ANP, ANP+LCM'nin ve özellikle absans epilepsi modelinin KBB dinamikleri amacıyla kullanılması literatüre ayrıca katkı sağlayacaktır. Floresan ışığa veren XLC680, hem ANP hem de LCM'ye bağlanarak floresan yoğunluk açısından değerlendirilmiştir.

ANP+LCM'nin beyin parankimindeki birikimi LCM'nin ancak ANP varlığında beyin dokusuna geçiş yaptığını göstermektedir. Beyin dokusuna ANP+LCM geçişinin özellikle 3. günde maksimum seviyeye gelip sonraki günlerde azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın ilacın belirli bir günde pik seviyeye ulaşmasına bağlı olabileceği ve özellikle doz ile ilişkili seviyelerinin daha ayrıntılı şekilde ortaya konması gerektiği düşüncesini oluşturmıştır.

Nanotaşıyıcıların herhangi bir ortamda nasıl davranacakları konusuna halen bir açıklık getirilmediği ve nanotaşıyıcıların risk değerlendirilmesine ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Dağlıoğlu ve ark. 2018). Bu bağlamda, çalışmada her bir grubun hemogram değerleri de ölçülerek kan parametreleri hakkında bilgi edinilmiştir. LCM ve ANP+LCM gruplarındaki hayvanların alyuvar ve ilişkili olarak hematokrit miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı olmasada bir artış olduğu tespit edilmiştir. Onun dışında diğer parametrelerde referans aralıklar ile sham WAG/Rij sıçanlar arasında büyük bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, 5 günlük tedavi sonrası hem ANP, LCM ve ANP+LCM kullanımlarının ardından bu maddelerin birlikte veya tek başına kullanıldıklarında toksisite bakımından kan parametreleri üzerinde olumsuz bir etkilerinin olmadığı da söylenebilir.

ANP ile birlikte beyine etken dozda aktarılan LCM'nin beyinin nöbet kaynaklı yolları üzerinde bulunan anatomik bölgelerde birikerek absans epilepsi modelinde gözlenen nöbet paternlerini değiştirmesi uygun bir taşıyıcı sisteminin sağlandığı bilgisini verebilir. Ayrıca uzun dönem enjeksiyonlar ile hayvanlarda herhangi bir mortalite ile karşılaşılması ve kan parametrelerinde belirgin bir toksik etkinin de görülmemesi bu partiküllerin risk değerlendirmelerine olumlu bir katkı sunabilecekleri söylenebilir. ANP, LCM ve ANP+LCM'nin uzun dönem uygulanması ile IVIS değerlerindeki pik seviyeleri ve buna korele olan anksiyete düzeyleri, antiepileptik ilacın ANP ile uygun bir şekilde doze edilmesine de imkan sağlayacaktır.

Sonuç olarak, WAG/Rij sıçanların kullanıldığı bu çalışma; LCM'nin glikoz ligandı ile birlikte ANP'ye eklenmesiyle KBB'yi aşıp düşük dozlarda (35 µg) dahi beyine ulaşması sonucunda, miligram düzeyleri ile ifade edilen yüksek dozlara ihtiyaç kalmadan terapötik etkinlik açısından hayvanlardan elde edilen EEG amplitütlerinde ve frekanslarında azalmaya yol açtı. Bu sonuçlar, nanotaşıyıcı birlikteliğinde uygulanan LCM'nin en azından nöbetlerin şiddetinin azaltılması bağlamında

değerlendirmeye alınabiliceğini göstermektedir. Bu metodolojinin kullanılması ilaca karşı şekillenebilecek dirençlilik, biyoyararlanım ve kontrollü salınım profillerinin oluşturulmasına imkan sağlamış olacaktır. Elde edilen bulgular; antiepileptik ajan açısından doz, nöbet odağı açısından yeni terapötik odakların keşfi, taşıyıcı malzeme olarak daha yenilikçi nanomalzemelerin tasarımı gibi çalışmalara inceleme olanağı sunması açısından temel oluşturacaktır.



KAYNAKLAR

Abbott N.J., Khan E.U., Rollison C.M. ve ark. Drug resistance in epilepsy: The role of the blood-brain barrier. *Novartis Found Symp*, 2002; 243: 38-47; discussion 47-53,180-185.

Abbott, A.A.K. Patabendige, D.E.M. Dolman, S.R. Yusof, D.J. Begley, Structure and function of the blood–brain barrier, *Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 13–25.

Abbott N.J., Ronnback I., Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 2006;7:41-53.

Abramovici S, Bagić A. Epidemiology of epilepsy. *Handb Clin Neurol*. 2016;138:159-71.

Alicia W., Cheryl A. F. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2:2.

Allabashi R., Stach W., Escosura-Muniz A., Liste-Calleja L., Merkoç A., ICP-MS: a powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving. *Journal of Nanoparticle Research*. (2008).

Alvarez J.I., Katayama T., Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*. 2013; 61(12): 1939-1958.

Ayala G. F. The paroxysmal depolarizing shift. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1983;124:15–21

Azeem A., Rizwan M., Ahmad F.J., Iqbal Z., Khar R.K., Aqil M., Talegaonkar S. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. *AAPS PharmSciTech.*, 2009; 10: (1), 69- 76.

Balabanov R.I., Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood brain barrier. *J Neurosci Res*.1998; 53(6): 637-644.

Bancaud J. In the Physiopathogenesis of the Epilepsies (eds Gastaut H., Jasper, H., Bancaud J. & Waltregny C. C.) (1969) 158–185.

Bancaud J. Physiopathogenesis of generalized epilepsies of organic nature (stereoencephalographic study). In: Gastaut H., Jasper H.H., Bancaud J., Waltregny

A., eds. *The Physiopathogenesis of the Epilepsies*. Springfield, Ill: Charles C Thomas Publisher; 1969:158-185.

Banerjee PN., Filippi D., Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res.* 2009; 85:31–45.

Barar J., Rafi M.A., Pourseif MM., Omid Y. Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *Bioimpacts.* 2016; 6(4):225-248.

Barbu E., Molnar J., Tsibouklis D.C. Gorecki. The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood–brain barrier, *Expert Opin. Drug Deliv.* 6 (2009) 553–565.

Barclay J. ve ark. Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 21, 6095–6104 (2001).

Basseville A., Hall M.D., Chau C.H., Robey R.W., Gottesman M., William D. F., Susan E. Bates. *The ABCG2 Multidrug Transporter*. Chapter 2016.

Baulac S., Huberfeld G., Gourfinkel-An I., Mitropoulou G., Beranger A., Prud'homme JF., Baulac M., Brice A., Bruzzone R., LeGuern E. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nature Genetics.* 2001 28(1):46-8

Bhavna M.S., M.Ali, S. Baboota J. K., Sahni A. Bhatnagar ve ark. Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2014;40(2): 278–287.

Benarroch E. Blood–brain barrier Recent developments and clinical correlations. *Clinical Implications of Neuroscience Research.* 2012; 78 (16).

Bennewitz M.F., Saltzman W.M. Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2009;6(2):323-36.

Bhaskar S.; Tian F.; Stoeger T.; Kreyling W.; de la Fuente J.M.; Grazu V.; Borm P.; Estrada G.; Ntziachristos V.; Razansky D. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. Part. *Fibre Toxicol.* 2010;7.

Bennewitz M. F. ve Saltzman W. M. (2009). Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics*, 6(2), 323-336.

Berg A.T. ve ark. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009 *Epilepsia*. 2010; 51(4): 676-685.

Blumenfeld H. From molecules to networks: cortical/subcortical interactions in the pathophysiology of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia*. 2003. 44 Suppl 2: 7-15.

Blumenfeld H. Ve McCormick D. A. Corticothalamic inputs control the pattern of activity generated in thalamocortical networks. *J. Neurosci*. 2000;20:5153–5162.

Boado R.J., Zhang Y., Pardridge W.M. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood–brain barrier, *Biotechnol. Bioeng*. 2007;96:381–391.

Boyer J., Di Ponio F., El-Ayoubi F., Glacial K., Ganeshamoorthy C., Driancourt M.G. ve ark. Instruction of circulating endothelial progenitors in vitro towards specialized blood–brain barrier and arterial phenotypes, *PLoS One*. 2014;9: e84179.

Brennan G. P. ve Henshall D. C. (2017). microRNAs in the Pathophysiology of Epilepsy. *Neuroscience Letters*.

Brodbeck J. ve ark. The ducky mutation in *Cacna2d2* results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated $\alpha 2\delta 2$ protein with abnormal function. *J. Biol. Chem*. 2001;277: 7684–7693.

Brodie MJ. Sodium Channel Blockers in the Treatment of Epilepsy. *CNS Drugs*. 2017;31(7):527-534.

Burgess D. L. ve Noebels J. L. Single gene defects in mice: the role of voltage-dependent calcium channels in absence models. *Epilepsy Res*. 1999; 36:111–.

Burgess, D. L., Jones J. M., Meisler, M. H. ve Noebels J. L. Mutation of the Ca^{2+} channel β subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell*. 1997; 88:385–392.

Butt A.M., Jones H.C., Abott N.J. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J.Physiol, (Lond.)*. 1990;429:47-62.

Buzsáki G. The thalamic clock: emergent network properties. *Neuroscience*. 1991; 41:351-364.

Campbell A.W. The Blood-Brain Barrier. *Altern Ther Health Med*. 2016; 22(2): 6-8.

Cano A., Ettcheto M., Espina M., Auladell C., Calpena A.C., Folch J.V. ve ark. Epigallocatechin-3-gallate loaded PEGylated-PLGA nanoparticles : a new anti-seizure strategy for temporal lobe epilepsy. *Nanomedicine*. 2018;14 (4): 1073-1085

Caplan R., Siddarth P., Stahl L., Lanphier E., Vona P., Gurbani S., Koh S., Sankar R., Shields WD. Childhood absence epilepsy: Behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities. *Epilepsia* 2008;49:1838–1846.

Capovilla.G. ve ark. 2001. A clinical spectrum of the myoclonic manifestations associated with typical absences in childhood absence epilepsy. A video-polygraphic study. *Epileptic Disord*. 3, 57–62.

Cawello W. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Lacosamide. *Clin Pharmacokinet* (2015) 54:901–914.

Chafekar S. M., Malda H.M., Merx E. W., Meijer D., Viertl H. A., Lashuel ve ark. Branched KLVFF tetramers strongly potentiate inhibition of beta-amyloid aggregation. *Journal Chem BioChem*. 2007;15(8):1857-1864.

Charpier S. ve ark. On the putative contribution of GABA receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges. *Neuropharmacology*. 1999; 38:1699–1706

Chen M., Guo D., Xia Y., Yao D. Control of Absence Seizures by the Thalamic Feed-Forward Inhibition *Frontiers in Computational Neuroscience*, 2017;11: 31.

Chen C., Zhu S., Wang S., Zhang W., Cheng Y., Yan X. Multiparameter Quantification of Liposomal Nanomedicines at the Single-Particle Level by High-Sensitivity Flow Cytometry. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(16):13913-13919.

Cho C.W., Lin Y., Cobb W.N. Ultrasound-induced mild hyperthermia as a novel approach to increase drug uptake in brain micro vessel endothelial cells. *Pharm Res.* 2002;115:413–24.

Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol. Res.* 2010; 62: (2), 144-149.

Chopp M., Li Y., Zhang J. Plasticity and remodelling of brain. *J Neurol Sci.* 2008;265:97-101.

Coenen A. M., Drinkenburg W. H., Inoue M. ve van Luijckelaar E. L. Genetic models of absence epilepsy, with emphasis on the WAG/Rij strain of rats. *Epilepsy Res.* 12, 75–86 (1992).

Coomber BI., Stewart PA. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res.* 1985;30 (1):99-115.

Cox G. A. ve ark. Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice. *Cell.* 1997;91:139–148.

Crunelli V., Leresche N. Childhood Absence Epilepsy: Genes, channels, neurons and networks. *Nature Reviews Neuroscience.* 2002; 3:371.

Cupaioli F.A., Zucca D., Boraschi L. Zecca Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? *Prog. Neurobiol.* 119-120 (2014) 20–38.

Daneman R., Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(1):a020412.

Danover L., Deransart C., Depaulis A., Vergnes M., Marescaux C. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol.* 1998;55(1):27-57.

Dağlıoğlu Y., Özkan H. Y. Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksikite Deneylerindeki Önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi* 2018, 1 1-17.

Dean L. In: Pratt V., McLeod H., Rubinstein W., Kattman B., Malheiro A. *Medical Genetics Summaries.* Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012-2018.

De Biase S., Valente M., Gigli G.L., Merlino G. Pharmacokinetic drug evaluation of lacosamide for the treatment of partial-onset seizures. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(9):997-1005.

De Bock M., Van Haver V., Vandenbroucke R.E., Decrock E. ve ark. Into rather unexplored terrain-trascellular transport across the blood-brain barrier. *Glia.* 2016; 64(7): 1097-1123.

De la Fuente J.M., Berry C.C. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjug Chem.* 2005;16: 1176–1180.

Decuzzi P. B., Godin T., Tanaka S., Lee Y., Chiappini C. X., Liu ve ark. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles, *J. Control. Release* 141 (2010) 320–327.

Depaulis A., Charpier S. Pathophysiology of absence epilepsy: Insights from genetic models. *Neuroscience Letters.* 2018;667: 53-65.

Dichter M.A. (2009a) Posttraumatic epilepsy: the challenge of translating discoveries in the laboratory to pathways to a cure. *Epilepsia* 50 (Suppl 2):41–45.

Dichter MA (2009b) Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch Neurol* 66:443–447.

D’Orsi G., Pascarella M.G., Ferrara M.A., Specchio L. M. Lacosamide in absence status epilepticus., *Seizure* 23 (2014) 397–398.

Dwibhashyam V. S. N. M. Ve Nagappa A. N. Strategies for enhanced drug delivery to the central nervous system. *Indian journal of pharmaceutical sciences.* 2008; 70(2):145.

Elliot R.C., Miles M.F., Lowenstein DH. Overlapping microarray porfiles of dentate gyrus gene expression during development and epilepsy associated neurogenesis and axon outgrowth. *J Neurosci.* 2003; 23.2218-2227.

Engelhardt B., Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol.*2009;31(4): 497-511.

Farrokh S., Erdman M., Bon J., Tesoro E. Use of Newer Anticonvulsants for the Treatment of Status Epilepticus. *Pharmacotherapy.* 2019(5).

Feldmeyer D., Brecht M., Helmchen F., Petersen C.C.H., Poulet J.F.A., Staiger J.F. ve ark. Barrel cortex function, *Prog. Neurobiol.* 2013; 103: 3–27.

Ferland C.L. ve Schrader A. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: a potential role of sirtuins. *Neuroscience.* 2011; 104-114.

Fisher R.S. The New Classification of Seizures by the International League Against Epilepsy 2017. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017;17(6):48.

Fletcher C. F. ve ark. Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell.* 1996; 87:607–617.

Franzoni E. ve ark. Refractory absence seizures: An Italian multicenter retrospective study. *Eur J Paediatr Neurol.* 2015; 19(6):660-4.

Friedman A. Blood–brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: A puzzle of a chicken and egg? *Epilepsia.* 52(8):19–20, 2011.

Gáll Z., Vancea S. Distribution of lacosamide in the rat brain assessed by in vitro slice technique. *Arch Pharm Res.* 2018;41(1):79-86.

Gao X., Qian J., Zheng S., Changyi Y., Zhang J., Ju S. ve ark. Overcoming the blood– brain barrier for delivering drugs into the brain by using adenosine receptor nanoagonist, *ACS Nano* 8 (2014) 3678–3689.

Gastaut H., Caveness W.F., Landolt W. ve ark. A proposed international classification of epileptic seizures. *Epilepsia.* 1964a; 5:297–306.

Gastaut H. Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures. *Epilepsia.* 1969b; 10: 2–13.

Gastaut H. Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia.* 1969c; 10: 14–21.

Getova D., Bowery N.G., Spassov V. Effects of GABAB receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. *Eur J Pharmacol.* 1997;320:9–13.

Giaretta D., Avoli M. Ve Gloor P. Intracellular recordings in pericruciate neurons during spike and wave discharges of feline generalized penicillin epilepsy. Brain Res.1987; 405:68–79

Gibbs F.A., Davis H., Lennox W.G. The EEG in epilepsy and in conditions of impaired consciousness. Arch Neurol Psychiat. 1935.34: 1134- 48.

Gloor P. Generalized cortico-reticular epilepsies: Some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge. Epilepsia. 1968; 9:249-263.

Gloor P. Neurophysiological bases of generalized seizures termed centrencephalic. In: Gastaut H, Jasper HH, Bancaud J, Waltregny A, eds. The Physiopathogenesis of the Epilepsies. Springfield, Ill: Charles C Thomas Publisher; 1969:209-236.

Gobbi M., Re F. M., Canovi M., Beeg M., Gregori S. Sesana ve ark. Lipid-based nanoparticles with high binding affinity for amyloid- β 1-42 peptide, Biomaterials. 2010;31(25);6519–6529.

Grieb P., Forster R.E., Strome D. ve ark. O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator dilution technique. J. Appl. Physiol, 1985;58:1929-1941.

Gromnicova R., Davies H., Sreekanthreddy P., Romero I.A., Lund T., Roitt I.M., Phillips J.B., Male D. K. Glucose-Coated Gold Nanoparticles Transfer across Human Brain Endothelium and Enter Astrocytes In Vitro. PLOS ONE (2013).

Gromnicova R., Yilmaz C. U., OrhanN., Kaya M., Davies H., Williams P. ve Male D. (2016). Localization and mobility of glucose-coated gold nanoparticles within the brain. Nanomedicine, 11(6), 617-625.

Guerrero S., Araya E., Fiedler J.L., Arias J.I., Adura C., Albericio F. ve ark. Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide, 1. Nanomedicine (Lond.). 5 (2010) 897–913,

Gürses C. (2018). *Epilepsi. İçinde Epileptogenez.* İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri; 37-42.

Han H.A., Cortez M.A., Snead III O.C., GABA_B Receptor and Absence Epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of Epilepsies 4th Edition. 2012.1-21.

Haque S., Md S., Alam M.I., Sahni J.K., Ali J., Baboota S. Nanostructure-based drug delivery systems for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012 Ap;38(4):387-411.

Herman S.T. (2002) Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology* 59:S21–S26.

Hirschi K.K., D'amore P.A. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS.*79:419-428.

Hosford D.A., Lin F.H., Wang Y. ve ark. Studies of the lethargic (lh/lh) mouse model of absence seizures: regulatory mechanisms and identification of the lh gene. *Adv Neurol.* 1999;79:239–252.

Hosford D. A. ve ark. Neural network of structures in which GABA_B receptors regulate absence seizures in the lethargic (lh/lh) mouse model. *J. Neurosci.* 15, 7367–7376 (1995).

Hoy S.M. Lacosamide: A Review in Focal-Onset Seizures in Patients with Epilepsy. *CNS Drugs.* 2018 May;32(5):473-484. doi: 10.1007/s40263-018-0523-7.

Hu R.Q, Cortez M.A., Man H.Y. ve ark. Gamma-hydroxybutyric acid-induced absence seizures in GluR2 null mutant mice. *Brain Res* 2001;897:27–35.

Huber J.D., Witt K.A., Hom S., Eggleton R.D., Mark K.S., Davis T.P. Inflammatory pain alters blood–brain barrier permeability and tight junctional protein expression, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280 (2001) 1241–1248.

Hunter J. ve Jasper H. H. Effects of thalamic stimulation on unanesthetized animals. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1949;1:305–324

Huo J.Z., Cortez M.A., Snead O.C. 3rd. GABA receptor proteins within lipid rafts in the AY-9944 model of atypical absence seizures. *Epilepsia* 2009;50:776–788.

Iannetti P. ve ark. Ictal single photon emission computed tomography in absence seizures: apparent implication of different neuronal mechanisms. *J. Child. Neurol.* 16, 339–344 (2001).

Illiff J.J., Wang M., Liao Y. ve ark. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012; 4(147) 111.

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;17:121–131.

Ingram E. M., Tessler S., Bowery N. G., Emson P.C. Glial glutamate transporter mRNAs in the genetically absence epilepsy rat from Strasbourg. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 75, 96–104 (2000).

Isokawa M. Remodelling dendritic spines of dentate granule cells in temporal epilepsy patients and the rat pilocarpine model. *Epilepsia*. 2000; 41:14-17.

Jabir N.R., Tabrez S., Ashraf G.M., Shakil S., Damanhoury G.A., Kamal M.A. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int. J. Nanomed*. 2012; 7: 4391-4408.

Jando G. ve ark. Spike-and-wave epilepsy in rats: sex differences and inheritance of physiological traits. *Neuroscience*. 1995;64: 301–317

Janigro D. Blood-brain barrier, ion homeostasis and epilepsy: possible implications towards the understanding of ketogenic diet mechanisms. *Epilepsy Research*. 1999;37(3):223-232.

Jasper H. H. ve Droogleever F. J. Experimental studies of the functional anatomy of petit mal epilepsy. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerve Ment. Dis*. 1947;26: 272–298

Järveläinen H., Sainio A., Koulu M., Wight T.N., Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2009;61(2):198-223.

Jean-Baptiste F., Gladys A., Jose C.E.M., Brigitte C., Arielle F., Karin G., Estelle K., Lorene P., Jean-Christophe C., Astrid N. A comprehensive behavioral evaluation in the lithium–pilocarpine model in rats: Effects of carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia*. 2013;54(7):1203–1213,.

Jessen N.A., Munk A.S., Lundgaard I. ve ark. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res.* 2015; 40(12):2583-2599.

Jouveneau A., Eunson L.H., Spauschus A., Ramesh V., Zuberi SM., Kullmann DM., Hanna MG. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet.* (2001) 8;358(9284):801-7.

Kantheti P. e ark. Mutation in AP-3 δ in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron.* 1998;21:111–122.

Kaya M., Yılmaz C.U. (2018). *Epilepsi. İkinci Baskı. İçinde, Epilepside Kan-beyin Bariyeri ve Önemi. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri*; 43-52.

Kellinghaus C. Lacosamide as treatment for partial epilepsy: mechanisms of action, pharmacology, effects, and safety. *Ther Clin Risk Manag.* 2009; 5: 757-766.

Kennard J.T.T., Barmanray R., Sampurno S., Ozturk E., Reid C.A., Paradiso L. ve ark. Stargazin and AMPA receptor membrane expression is increased in the somatosensory cortex of Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg, *Neurobiol. Dis.* 2011;42:48–54.

Kim S.Y., Buckwalter M., Soreq H. ve ark. Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. *Epilepsia.* 2012;53(6):37-44.

King Jr J.T., Carlier P.M., Marion D.W. Early Glasgow Outcome Scale scores predict long term functional outcome in patients with severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2005; 22:947-954.

Klein J.P., Khera D.S., Nersesyan H., Kimchi E.Y., Waxman S.G., Blumenfeld H. Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy, *Brain Res.* 2004;1000: 102–109.

Kleinfeld D., Berg R.W., O'Connor S.M., Anatomical loops and their electrical dynamics in relation to whisking by rat. *Somatosensory and Motor Research.* 1999; 16: 69–88.

Kong S.D., J. Lee, Ramachandran S., Eliceiri B.P., Shubayev V.I., Lal R. Ve ark. Magnetic targeting of nanoparticles across the intact blood–brain barrier, *J. Control. Release* 164 (2012) 49–57.

Kubotera H., Ikeshima-Kataoka H., Hatashita Y., Mascaro A.L.A., Pavone F.S., Inoue T. Astrocytic endfeet re-cover blood vessels after removal by laser ablation. *Nature Scientific Reports*. (2019) 9:1263

Kücker S., Töllner K., Piechotta M. ve Gernert M. (2010). Kindling as a model of temporal lobe epilepsy induces bilateral changes in spontaneous striatal activity. *Neurobiology of disease*, 37(3), 661-672.

Lancman M.E., Fertig E.J., Trobliger R.W., Perrine K., Myers L., Iyengar S.S., Malik M. The effects of lacosamide on cognition, quality-of-life measures, and quality of life in patients with refractory partial epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 2016; 61: 27–33.

Lega B. C., Halpern C. H., Jaggi J. L.ve Baltuch G. H. Deep brain stimulation in the treatment of refractory epilepsy: update on current data and future directions. *Neurobiol. Dis.* 2010;38:354–360.

Lehtimäki K.A., Keränen T., Palmio J. ve ark. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 2007;116:226-230.

Levitt P. ve Noebels, J. L. Mutant mouse tottering: selective increase of locus ceruleus axons in a defined single-locus mutation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1981; 78: 4630–4634.

Leyva-Gómez ve ark. Nanoparticle formulation improves the anticonvulsant effect of clonazepam on the pentylenetetrazole-induced seizures: behavior and electroencephalogram. *J Pharm Sci*. 2014;103(8):2509-19.

Lin F.H., Cao Z., Hosford D.A. Increased number of GABAB receptors in the lethargic (lh/lh) mouse model of absence epilepsy. *Brain Res* 1993;608:101–106.

Lin J., Zhang H., Chen Z., Zheng Y. Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS Nano* 4: (2010); 5421–5429.

Lischper M., Beuck S., Thanabalasundaram G., Pieper C., Galla H.J. Metalloproteinase mediated occludin cleavage in the cerebral microcapillary endothelium under pathological conditions. *Brain Res.* 2010;1326:114–127.

Liu RS., Lemieux L., Bell GS ve ark. The structural consequences of newly diagnosed seizures. *Ann Neurol.* 2003; 53:312-324.

Liu J.Y., Thom M., Catarino C.B. ve ark. Neuropathology of the blood-brain barrier and pharmaco-resistance in human epilepsy. *Brain.* 2012; 135(10):3115-3133.

Liu Q., J. Hou X., Chen G., Liu D., Zhang H. ve ark. P-glycoprotein mediated efflux limits the transport of the novel anti-Parkinson's disease candidate drug FLZ across the physiological and PD pathological in vitro BBB models, *PLoS One* 9 (2014), e102442.

Lockman P.R., R.J.Mumper, M.A., Khan D.D. Allen, Nanoparticle technology for drug delivery across the blood–brain barrier, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (2002) 1–13.

Loiseau P. 2002. Childhood absence epilepsy and related syndromes. In: Roger J., Bureau M., Dravet C., Genton P., Loiseau J. ve ark. 1990. Survey of seizure disorders in the French southwest. I. Incidence of epileptic syndromes. *Epilepsia* 31, 391–396.

Lopalco A., Hazem A., Nunzio D., Erik R. Oxcarbazepine-loaded polymeric nanoparticles: development and permeability studies across in vitro models of the blood–brain barrier and human placental trophoblast, *International Journal of Nanomedicine*, 2015;10 1985–1996.

Löscher W., Brandt C. Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research, *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Pharmacol Rev.* 2010 62:668–700

Lu, L., Peter S.J., Lyman D.M., Lai H.L., Leite S.M., Tamada J.A., Uyama S., Vacanti J.P., Robert L., Mikos A.G. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly(dl-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*, 2000, 21, (18), 1837-1845.

Luhmann H. J., Mittmann T., Van Luijtelaa G. Ve Heinemann U. Impairment of intracortical GABAergic inhibition in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy* 1995;22: 43–51

Luissint A.C., Artus C., Glacial F. ve ark. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS*, 2012; 9(1): 23.

Lukasiuk K., Dabrowski M., Adach A. ve ark. Epileptogenesis-related genes revisited. *Prog. Brain Res.* 2006;158:223-241.

Luo J., Wang W., Xi Z. ve ark. Concentration of Soluble Adhesion Molecules in Cerebrospinal Fluids and Serum of Epilepsy Patients. *J Mol Neurosci.* 2014.

Lübke J., Feldmeyer D. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex, *Brain Struct. Funct.* 2007; 212: 3–17.

Lüders H., Lesser R.P., Dinner D.S., Morris H.H. III. Generalized epilepsies: a review. *Cleve Clin Q.* 1984;51:205-226.

Marescaux C., Vergnes M., Depaulis A. Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl* 1992;35:37–69.

Marchi N., Granata T., Alexopoulos A., Janigro D. The blood–brain barrier hypothesis in drug resistant epilepsy *Brain.* 2012; 135(4): e211.

Marianecchi C., Rinaldi F., Hanieh P.N., Di Marzio L., Paolino D., Carafa M. Drug delivery in overcoming the blood–brain barrier: role of nasal mucosal grafting. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11: 325–335.

Masserini M. Nanoparticles for brain drug delivery. *ISRN biochemistry.* 2013.

Mastorakos P., Zhang C., Berry S., Oh Y., Lee S., Eberhart C.G., Woodworth G., Suk J.S., Hanes J. Highly PEGylated DNA nanoparticles provide uniform and widespread gene transfer in the brain. *Adv Healthc Mater.* 2015; 4:1023-1033.

Mauri G., Nicosia L., Xu Z., Di Pietro S., Monfardini L., Bonomo G., Varano G.M., Prada F., Vigna Della P., Orsi F. Focused ultrasound: tumour ablation and its potential to enhance immunological therapy to cancer. *Br J Radiol.* 2018; 91:20170641.

Mäe M., Armulik A., Betsholtz C. Getting to know the cast-cellular interactions and signaling at the neurovascular unit. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(26): 2750-2754.

Meeren H.K., Pijn JP, van Luijtelaar EL, Coenen A.M., Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci.* 2002;22:1480-1495.

Meeren HK., van Luijtelaar EL., Lopes da Silva FH., Coenen A. Evolving Concepts on the Pathophysiology of Absence Seizures. *Arch. Neurol.* 2005; 62: 375.

Meeren H.K., Veening J.G., Mödersheim T.A., Coenen A.M., van Luijtelaar G. Thalamic lesions in a genetic rat model of absence epilepsy: dissociation between spike-wave discharges and sleep spindles. *Exp Neurol* 2009;217:25–37.

Meier H. The neuropathology of ducky, a neurological mutation of the mouse. A pathological and preliminary histochemical study. *Acta Neuropathol.* 1968;11: 15–28.

Merlo D., Mollinari C., Inaba Y. ve ark. Reduced GABAB receptor subunit expression and paired-pulse depression in a genetic model of absence seizures. *Neurobiol Dis.* 2007;25:631–641.

Meyer J., Noebels J., Smirnakis S., Maheshwan A. Asynchronous suppression of visual cortex during absence seizures in stargazer mice. *Nature Communications.* 2018; 9: 1938.

Mittapali R.K., Manda V.K., Adkins C.E. ve ark. Exploiting nutrient transporters at the blood-brain barrier to improve brain distribution of small molecules. *The Deliv.* 2010;1: 775-784.

Mousavia S.R, Arcaroa J.A., Leung S.L., Tenney R.J., Mirsattaria M.S. Functional connectivity of the hippocampus to the thalamocortical circuitry in an animal model of absence seizures. *Epilepsy Research* 137 (2017) 19-24.

Midzianovskaia I. S., Kuznetsova G. D., Coenen A. M., Spiridonov A. M., Van Luijtelaar. E. L. Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats. *Brain Res.* 2001;911:62–70

Nation ve ark. Blood–brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nature Medicine.* 2019; 25:270–276.

Neckelmann D., Amzica F. Ve Steriade. M. Spike–wave complexes and fast components of cortically generated seizures. III. Synchronizing mechanisms. *J. Neurophysiol.* 80, 1480–1494 (1998).

Niedermeyer E. *The Generalized Epilepsies: A Clinical Electroencephalographical Study.* Springfield, Ill: Charles C Thomas Publisher; 1972.

Niedermeyer E. Primary (idiopathic) generalized epilepsy and underlying mechanisms. *Clin. Electroencephalogr.* 27, 1–21 (1996).

Nishitani A., Kunisawa N., Sugimura T., Sato K., Yoshida Y., Suzuki T., Sakuma T., Yamamoto T., Asano M., Saito Y., Ohno Y., Kuramoto T. Loss of HCN1 subunits causes absence epilepsy in rats. *Brain Research.* 2018; S0006-8993(18) 30556-0.

Noack ve ark. The bloodbrain barrier and beyond: Nano based neuropharmacology and the role of extracellular matrix, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* (2019).

Noebels J. L. ve Sidman R. L. Inherited epilepsy: spike–wave and focal motor seizures in the mutant mouse tottering. *Science.* 1979;204:1334–1336.

Noebels J. F. 1994. In: *Idiopathic Generalized Epilepsies* (eds: Malafosse, A. ve ark.) John Libbey & Co. Ltd, London. 215–225.

Noebels J. F. 1999. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds Delgado-Escueta, A. V., Wilson, W. A., Olsen, R. W. & Porter, R. J.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 227–238.

Panayiotopoulos C.P. ve ark. 1997. Idiopathic generalised epilepsy in adults manifested by phantom absences, generalized tonic–clonic seizures, and frequent absence status. *J. Neurosurg. Psychiatry* 63, 622–627.

Panayiotopoulos C.P., 2005a. Idiopathic generalized epilepsies: a review and modern approach. *Epilepsia* 46 (Suppl. 9), 1–6.

Panayiotopoulos C.P. Atypical absence seizures. *Neurology medLink.* 2018.

Patel D.C., Tewari B.P., Chaunsali L., Sontheimer H. Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nature Reviews Neurosience.* 2019.

Paz J. T. ve Huguenard J. R. Microcircuits and their interactions in epilepsy: is the focus out of focus? *Nat. Neurosci.* 2015;18:351–359.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam; Boston MA: Academic Press/ Elsevier 6th Edition (2007).

Pedram M.Z, Shamloo A., Alasty A., Ghafar-Zadeh E. Toward Epileptic Brain Region Detection Based on Magnetic Nanoparticle Patterning. *Sensors* 2015, 15, 24409-24427.

Penry J.K., Porter R.J., Dreifuss R.E. Brain. Simultaneous recording of absence seizures with video tape and electroencephalography. A study of 374 seizures in 48 patients. 1975;98(3):427-40.

Picone P., M. L. Bondi., Montana G., Bruno A., Pitarresi G., Giammona G. Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by Ab oligomers: Improved delivery by solid lipid nanoparticles, *Free Radical Res.* 2009, 43(11):1133–1145.

Pitkänen A., Sutula T. Is Epilepsy a progressive disease? Prospects for new therapeutic approaches in temporal lobe epilepsy. *Lancet Neurology*, 2002;1:173-181.

Pitkänen A. ve McIntosh TK. Animal models of posttraumatic epilepsy *J Neurotrauma*. 2006; 23:241-261.

Poduslo JF., Curran GL., Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 1994;91(12): 5705-5709.

Polack P.O., Guillemain I., Hu E., Deransart C., Depaulis A., Charpier S. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci.* 2007;27:6590–6599.

Poovaiah N., Davoudi Z., Peng H., Schlichtmann B., Mallapragada S., Narasimhan B., Wang Q. Treatment of neurodegenerative disorders through the blood-brain barrier using nanocarriers. *Nanoscale*. 2018;10(36):16962-16983.

Portnoy E., Polyak B., Inbar D., Kenan G., Rai A., L. Wehrli S.L., Roberts T. P.L., Bishara A., Mann A., Shmuel M., Rozovsky K., Ben-Hur T., Magdassi S., Ekstein D., Eyal S. Tracking inflammation in the epileptic rat brain by bi-functional

fluorescent and magnetic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. (2016); (12), 5, 1335-1345.

Posner E. Absence seizures in children. *BMJ Clinical Evidence*. 2008: 0317.

Potschka H., Fedrowitz M., Loscher W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport*, 2001; 12: 3557-3560.

Powell K.L., Kyi M., Reid C.A., Paradiso L., D'Abaco G.M., Kaye A.H. ve ark. Genetic absence epilepsy rats from Strasbourg have increased corticothalamic expression of stargazin, *Neurobiol. Dis.* 2008; 31: 261–265

Pumain R., Louvel J., Gastard M., Kurcewicz I. ve Vergnes M. Responses to N-methyl-D-aspartate are enhanced in rats with petit mal-like seizures. *J. Neural Transm.* 1992;35: 97–108

Qiao X. ve Noebels. L. Developmental analysis of hippocampal mossy fiber outgrowth in a mutant mouse with inherited spike-wave seizures. *J. Neurosci.* 1993; 13: 4622–4635.

Ragona F., Matricardi S., Castellotti B., Patrini M., Freri E., Binelli S., Granata T. Refractory absence epilepsy and glut1 deficiency syndrome: a new case report and literature review. *Neuropediatrics*. 2014;45(5):328-32.

Ramazan Y. ve ark. The Role of Netrin-1 in Absence Epilepsy Pathophysiology. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg.* 2016; 7(25): 19-22.

Rempe R.G., Hartz Anika M.S., Soldner Emma L.B., Sokola B.S., Alluri S.R., Abner E.L., Kryscio R. J., Pekcec A., Schlichtiger J., Bauer B. Matrix Metalloproteinase-Mediated Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epilepsy. *Journal of Neuroscience*. 2018; 38 (18): 4301-4315;

Renier W. O., Coenen A. M. L. Human absence epilepsy: the WAG/Rij rat as a model. *Neuroscience Research Communications*. 2000; 26(3), 181-191.

Rhyu I. J., Abbott L. C., Walker D. B., Sotelo C. An ultrastructural study of granule cell/Purkinje cell synapses in tottering (tg/tg), leaner (tgla/tgla) and compound heterozygous tottering/leaner (tg/tgla) mice. *Neuroscience*. 1999;90:717–728

Richards D.A., Manning J.P., Barnes D., Rombola L., Bowery N.G., Caccia S., Leresche N., Crunelli V. Targeting thalamic nuclei is not sufficient for the full anti-absence action of ethosuximide in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Res.* 2003;54(2-3):97-107

Rikani A.A., Choudry A.M., Zenonos G. ve ark. Spatially regulated adult neurogenesis. *Ann Neurosci.* 2013;20(2): 67-77.

Rossignol E., Kruglikov I., Van Den Maagdenberg, A. M. J. M., Rudy B. ve Fishell G. (2013). Ca_v 2.1 ablation in cortical interneurons selectively impairs fast-spiking basket cells and causes generalized seizures. *Ann. Neurol.* 74, 209–222.

Rossignol E., Kobow K., Simonato M., Loeb J.A., Grisar T., Gilby K.L., Vinet J., Kadam S.D., Becker A.J. WONOEP appraisal: New genetic approaches to study epilepsy. *Epilepsia*, 55(8):1170–1186, 2014.

Rogawski M.A., Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(7):553-64.

Rossi M.A. Targeting anti-epileptic drug therapy without collateral damage: nanocarrier-based drug delivery. *Epilepsy Curr.*, 2012, 12, (5), 199-200.

Sahin D., Yilmaz C. U., Orhan N., Arican N., Kaya M., Gürses C., Ahishali B. Changes in electroencephalographic characteristics and blood-brain barrier permeability in WAG/Rij rats with cortical dysplasia. *Epilepsy & Behavior.* 2017; 67: 70-76.

Sakane T., Akizuki M., Taki Y., Yamashita S., Sezaki H., Nadai T. Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: The relation to the molecular weight of drugs. *J Pharm Pharmacol.* 1995;47:379–81.

Salanova V. Deep brain stimulation for epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2018; 88:21-24. Santini L. ve Pascal P. Cognitive and Behavioral Comorbidities in Epilepsy: The Treacherous Nature of Animal Models. *Epilepsy Curr.* 2013; 13(4): 182–183.

Saraiva C., Praça C., Ferreira R., Santos T., Ferreira L., Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brainbarrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release.* 2016; 235:34–47.

Sarkisova K., Van Luijtelaar G. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression . 2011;35(4):854-76.

Scheffer E., Berkovic S., Capovilla G., Connolly B.M., French J., Guilhoto L., Hirsch E., Jain S., Mathern W.G., Mosh L.S., Nordli R.D., Perucca E., Tomson T., Wiebe S., Zhang Y.H., Zuberi M.S. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia. 2017; 58(4):512–521.

Seri B., Garcia- Vertugo J.M., McEwen B.S. ve ark. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J. Neurosci. 2001;21(18):7153-7160.

Serlin Y., Shelef I., Knyazer B. ve ark. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. Semin Cell Dev. Biol. 2015;38: 2-6.

Shakeel F., Baboota S., Ahuja A., Ali J., Aqil M., Shafiq S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. AAPS PharmSciTech. 2007; 8: 4.

Sharma N. ve Mishra N. Importance of Lipid Nanoparticles in the Treatment of Epilepsy: a Focus on Nasal Delivery. J Pharm Sci Innov. (2014); 3: 199-207.

Shilo M., Motiei M., Hana P., Popovtzer R. Transport of nanoparticles through the blood–brain barrier for imaging and therapeutic applications. Nanoscale 2014; 6: 2146–2152.

Sitnikova E., Van Luijtelaar G. Cortical control of generalized absence seizures: effect of lidocaine applied to the somatosensory cortex in WAG/Rij rats. Brain Research. 2004; 1012:127–137.

Sitnikova E. Sleep spindles in rats with absence epilepsy. Sleep Spindles & Cortical Up States (2017).

Steinlein O. K., Noebels J. L. Ion channels and epilepsy in man and mouse. Curr. Opin. Genet. Dev. (2000);10, 286–291

Smith Q.R., Rapoport S.I. Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride. J Neurochem. 1986;46(6):1732-1742.

Snead O.C.3rd. Evidence for G protein modulation of experimental-generalized absence seizures in rat. *Neurosci Lett.* 1992;148:15–18.

Snead O.C.3rd. Relation of the [3H] gamma-hydroxybutyric acid (GHB) binding site to the gammaaminobutyric acidB (GABAB) receptor in rat brain. *Biochem Pharmacol.* 1996;52:1235–1243.

Solans C., P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar and M. J. Garcia-Celma, Nano-emulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2005, 10(3–4):102–110.

Soni Kruti S., Desale S.S., Bronich T.K. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *J Control Release.* 2016; 240:109-126.

Sotocinal S. G., Sorge R. E., Zaloum A., Tuttle A. H., Martin L. J., Wieskopf J. S., McDougall J. J. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular pain*, 7, 1744-8069.

Stefan H. 1982. Basic temporal structure of absence symptoms. In: Kazamatsuri, H., Seino, M., Ward, A.A. (Eds.). *Advances in Epileptology: The 13th Epilepsy International symposium.* Raven Press, New-York.

Stewart L.S., Cortez M.A., Snead OC 3rd. Environmental enrichment improves behavioral outcome in the AY-9944 model of childhood atypical absence epilepsy. *Int J Neurosci.* 2012;122(8):449-57.

Stock D., Gelb S., Pasternak O., Ben-Zvi A., Putterman C. The blood brain barrier and neuropsychiatric lupus: new perspectives in light of advances in understanding the neuroimmune interface. *Autoimmunity Reviews.* 2017;16(6):612-619.

Suntres Z.E. Liposomal Antioxidants for Protection against Oxidant-Induced Damage. *J. Toxicol.* 2011.

Talley E. M., Solorzano G., Depaulis A., Perez-Reyes E. Ve Bayliss D. A. Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000; 75: 159–165

Temkin O. (1994). *The Falling Sickness: A History of Epilepsy from the Greeks to the Beginnings of Modern Neurology*. Johns Hopkins University Press

Tenney J. R. ve Glauser T. A. (2013). The current state of absence epilepsy: can we have your attention? *Epilepsy Currents*. 13(3), 135-140.

Thorne R.G., Emory C.R., Ala T.A., Frey W.H. Brain, Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res*. 1995;692:278–82.

Tietz S., Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions. *J Cell Biol*. 2015; 209(4): 493-506.

Tolmacheva E.A., Gilles van Luijtelaarb., Chepuranova S.A., Kaminskijc Y., Pavel Mare. Cortical and limbic excitability in rats with absence epilepsy. *Epilepsy Research*. 2004; 62: 189–198.

Torre A., Luna-Bárcenas G., Orozco-Suárez S., Salgado-Ceballos H., García P., Lazarowski A., Rocha L. Pharmacoresistant epilepsy and nanotechnology., *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2014;1;6:329-340.

Trapani E., De Giglio D., Cafagna N., Denora G., Agrimi T. ve ark. Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery, *Int. J. Pharm*. 2011; 419(1–2): 296–307.

Treiman D.M. Eletroclinical features of status epilepticus. *J. Clin. Neurophysiol*. 1995;12(4):343–62.

Tsai Y.C., Vijayaraghavan P., Chiang W.H., Chen H. H., Liu T.I., Shen M.Y., Omoto A., Kamimura M., Soga K., Chiu H.C. Targeted Delivery of Functionalized Upconversion Nanoparticles for Externally Triggered Photothermal/Photodynamic Therapies of Brain Glioblastoma. *Theranostics* 2018; 8(5): 1435-1448.

Tsakiridou E., Bertollini L., de Curtis M., Avanzini G. ve Pape H. C. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J. Neurosci*. 1995: 3110–3117

Tsuji A. 2000. Specific mechanisms for transporting drugs into brain, in: Begley D.J., Bradbury M.W., Kreuter J. (Eds.). *The Blood–brain Barrier and Drug delivery to the CNS*, Dekker, New York. 121–144.

Tyler J.Y., XU X.M., Cheng J.X. Nanomedicine for treating spinal cord injury. *Nanoscale*. 2013; 5(19): 8821-8836.

Ueno M., Chiba Y., Murakami R. ve ark. Blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in normal and pathological conditions. *Brain Tumor Pathol*, 2016; 33(2): 89-96.

Umlauf J.B., Shusta E.V. Exploiting BBB disruption for the delivery of nanocarriers to the diseased CNS. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019;60:146–152

Van Vliet EA., da Costa Araujo S., Redeker S. Ve ark. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2007;130: 521-534.

Van Luijtelaar G., Onat F., Gallagher MJ. Animal models of absence epilepsies: What do they model and do sex and sex hormones matter? *Neurobiol Dis*, 2014; 72: 167-179.

Vega C, Guo J, Killory B., Danielson N., Vestal M., Berman R., Martin L, Gonzalez J.L., Blumenfeld H., Spann M.N. Symptoms of anxiety and depression in childhood absence epilepsy. *Epilepsia* (2011);52:70–74.

Vezzani A., Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*. 2005;46:1724-1743.

Vezzani A., Auvin S., Ravizza T., Aronica E. Glia–neuron interactions in epilepsy: inflammatory mediators, *Epilepsia*. 2010; 51- 55.

Vezzani A., French J., Bartfai T. ve ark. The role of inflammation in epilepsy. *Net Rev Neurol*, 2011;7:31-40.

Vezzani A., Friedman A. Brain Inflammation as a biomarker in epilepsy. *Biomark.Med*. 2011;5(5):6-7-614.

Volk H.A., Loescher W. Multidrug resistance in epilepsy: Rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of Pglycoprotein compared with rats with drug responsive seizures. *Brain* 2005;128:1358–1368.

Von Campe., Spencer DD., de Lanorella NC. Morphology of dentate gyrus cells in the human epileptogenic hippocampus. *Hippocampus*. 1997;7:472-488.

Vrielynck P. Current and emerging treatments for absence seizures in young patients. *Neuropsychiatr Dis. Treat.* 2013; 9: 963–975.

Wallace R.H., Marini C., Petrou N., Harkin L.A., Bowser D.N., Panchal R.K., Williams D.A., Sutherland G.R., Mulley J.C., Scheffer I.E., Berkovic S.F.. Mutant GABA_A receptor γ 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nature Genetics.* 2001;28: 49–52.

Wanek T., Mairinger S., Lange O. Radioligands targeting P-glycoprotein and other drug efflux proteins at the blood–brain barrier. *Journal of labeled compounds and radioharmaceuticals.* 2013.

Wang X., Stewart L., Cortez M.A., Wu Y., Velazquez J.L., Liu C.C., Shen L, Snead OC 3rd. The circuitry of atypical absence seizures in GABA(B)R1a transgenic mice *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;94(1):124-30.

Wang Y. et al. Electroresponsive Nanoparticles Improve Antiseizure Effect of Phenytoin in Generalized Tonic-Clonic Seizures. *Neurotherapeutics.* 2016;13(3): 603–613.

Wang X1., Yu Y., Ma R., Shao N., Meng H. Lacosamide modulates collapsin response mediator protein 2 and inhibits mossy fiber sprouting after kainic acid-induced status epilepticus. *Neuroreport* (2018) 7;29(16):1384-1390.

Weiergräber M., Stephani U., Köhling R. Voltage-gated calcium channels in the etiopathogenesis and treatment of absence epilepsy. *Brain Res Rev.* 2010;62:245–271.

Weissberg I., Wood L., Kamintsky L. et al. Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF- β /ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction. *Neurobiol Dis.* 2015;78:115-125.

Wiley D.T., Webster P., Gale A., Davis M.E. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013; 110(21): 8662-8667.

Wilson S., Khanna R. Specific Binding of Lacosamide to Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP2) and Direct Impairment of its Canonical Function:

Implications for the Therapeutic Potential of Lacosamide. *Molecular Neurobiology*. (2015): (2), 599-609.

Wirrell E.C., Camfield C.S., Camfield P.R., Dooley J.M., Gordon K.E., Smith B. Long-term psychosocial outcome in typical absence epilepsy. Sometimes a wolf in sheeps' clothing. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997;151:152–158

Wolburg H., Lippoldt A. Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation, *Vasc. Pharmacol*. 38 (2002) 323–337.

Xin H., Sha X., Jiang X., Chen L., Law K., Gu J. The brain targeting mechanism of Angiopep-conjugated poly(ethylene-glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles, *Biomaterials*. 2012; 33:1673–1681.

Yang Z., Liu Z. W., Allaker R. P., Reip P., Oxford J., Ahmad Z. ve Reng G. (2013). A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. In *Nanotechnology, the Brain and the Future* (pp. 313-332).

Yilmaz C.U. (2017). Temporal lob epilepsi hayvan modelinde ilaç bağlı nanopartiküllerin tedavi düzeyi ve kan-beyin bariyeri dinamikleri. *Tez*.

Zhang C., Pradridge W.M. Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *J. Neurochem*. 2001; 76: 1597-1600.

Zhang C., Chanteux H., Zuo Z., Kwan P., ve Baum L. Potential role for human P-glycoprotein in the transport of lacosamide. *Epilepsia*. 2013; 54(7):1154-1160.

Zhang C., Wan X. ve ark. Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice, *Biomaterials*. 2014; 435:56–465

Zybina A., Anshakova A., Malinovskaya J., Melnikov P., Baklaushev V., Chekhonin V., Maksimenko O., Titov S., Balabanyan V., Kreuter J., Gelperina S., Abbasova K. Nanoparticle-based delivery of carbamazepine: A promising approach for the treatment of refractory epilepsy. *International Journal of Pharmaceutics*, (2018): 547, 1-2, 10-23.

<https://ncit-stage.nci.nih.gov/ncitbrowser/pages/message.jsf>.

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2C19>

<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s4/chapter11.html>

<http://riteshbawri.com/drugs-and-your-blood-brain-barrier/>

<http://imagej.net/>

www.epilepsydiagnosis.org

www.Nature.com/nrn



ETİK KURUL KARARI



BOĞAZİÇİ ÜNİVERSİTESİ
Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

07.11.2017

Sayın Prof. Dr. Erdem Tüzün,

Başvurusunu yaptığınız "Genetik absans epilepsi modeli WAG/Rij sıçanlarda nanopartikül bağlı antiepileptik ilacın kan beyin bariyeri dinamikleri ve antiepileptojenik etkileri" adlı, 08.06.2017 tarih ve kodlu proje, Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (BÜHADYEK) 07.11.2017 tarihli toplantısında görüşülerek onaylanmıştır. Bu proje Arzu Temizyürek'in sorumluluğunda yürütülecektir.

Saygılarımızla,
BÜHADYEK Üyeleri:

Prof. Dr. Burak Güçlü (Başkan)
(Boğaziçi Univ., Biyomedikal Müh. Enstitüsü)

Prof. Dr. Mehmet Kaya
(Koç Univ., Tıp Fakültesi, Fizyoloji Böl.)

Yrd. Doç. Dr. Necla Birgül İyison
(Boğaziçi Univ. Moleküler Biyoloji ve Genetik Böl.)

Doç.Dr.Hande Yapışlar
(Acıbadem Univ.Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.B.D.

Yrd. Doç. Dr. Elif Aysimi Duman
(Boğaziçi Univ. Psikoloji Böl.)

Veteriner Hekim Arzu Temizyürek
(Boğaziçi Univ. Vivarium)

Mete Demircan

Toplantıda bulunmamıştır.



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi:	19.09.2018
Protokol No:	2018.HADYEK.022
Sorumlu Araştırmacı:	Mehmet Kaya
Araştırma Başlığı:	Genetik absans epilepsi modeli WAG/Rij sıçanlarda nanopartikül bağlı antiepileptik ilacın kan-beyin bariyeri dinamikleri ve antiepileptojenik etkileri
Başlangıç tarihi:	20.09.2018
Hayvan türü ve sayıları:	72 adet WAG/Rij Sıçan

Koç Üniversitesi Etik Kurulu'na değerlendirilmek üzere başvuruda bulunduğunuz yukarıda künyesi yazılı projenizin başvuru dosyası ve ilgili belgeleri, Üniversitemiz "Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu" tarafından araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir.

Üniversite Senatosunun 5 Şubat 2016 tarih ve 2016/2 sayılı oturumunda kabul edilen "Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) yönergesi" uyarınca yapılan inceleme sonucunda çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir. Araştırmaya yukarıda verilen başlangıç tarihi itibarıyla başlayabilirsiniz.

Notlar:

- Araştırma başlangıç tarihinin gecikmesi durumunda Etik Kurul'a başvurularak tarihlerin değiştirilmesi gereklidir.
- Etik Kurul incelemesi ve onayı olmadan bu araştırmada kullanılan prosedürler, formlar ya da protokollerde herhangi bir değişiklik yapılamaz.

Saygılarımla,

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Başkan



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi: 19.09.2018

Protokol No: 2018.HADYEK.022

Koç Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından yapılan inceleme sonucunda çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

KÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu						
Unvanı/ Adı/ Soyadı	Kurum	Katılım		Araştırma ile ilişkisi		İmza
		Var - Yok	Var - Yok	Var - Yok	Var - Yok	
Prof. Dr. Hakan S Orer Başkan	KÜ Tıp Fakültesi	☒	☐	☐	☒	Hakan Orer
Dr. Ali Cihan Taşkın Başkan Vekili	KÜ Fen Fakültesi	☐	☐	☐	☐	
Doç. Dr. Fuat Balcı	KÜ İnsani Bilimler ve Edebiyat Fakültesi	☐	☐	☐	☐	
Prof. Dr. Mehmet Kaya	KÜ Tıp Fakültesi	☐	☐	☐	☐	
Doç. Dr. Seda Kızılel	KÜ Mühendislik Fakültesi	☐	☐	☐	☐	
Hasbi Kurt	Türkiye Biyologlar Derneği	☐	☐	☐	☐	
Yrd. Doç. Dr. Gülsün Güneş	Marmara Üniversitesi	☒	☐	☐	☒	Gülsün Güneş
Doç. Dr. Serkan Kır SK Dışarı	KÜ Fen Fakültesi	☒	☐	☐	☒	Serkan Kır

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/ Adı/ Soyadı: Prof. Dr. Hakan S. Orer

İmza: *Hakan Orer*

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI*Yazar Arzu Temizyürek***Gönderim Tarihi:** 07-Nis-2019 11:49PM (UTC+0300)**Gönderim Numarası:** 1107583215**Dosya adı:** tez-intihal_d_zeltildi.docx (206.54K)**Kelime sayısı:** 27725**Karakter sayısı:** 192881**GENETİK ABSANS EPİLEPSİ MODELİ “WAG/RİJ”
SIÇANLARDA NANOPARTİKÜL BAĞLI ANTİEPİLEPTİK İLACIN
KAN BEYİN BARIYERİ DİNAMİKLERİ VE ANTİEPİLEPTOJENİK
ETKİLERİ**

ORIJINALLIK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%1İNTERNET
KAYNAKLARI**%1**

YAYINLAR

%6

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Arzu	Soyadı	TEMİZYÜREK
Doğ.Yeri	Memmingen/ ALMANYA	TC Kim No	52090525222
Uyruğu	T.C.	Email	arzutemizyurek@gmail.com

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Yük.Lis.	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Sorumlu Veteriner Hekim	Boğaziçi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Merkezi	2010-2018
2.	Gözlemci Veteriner Hekim	Animal Hospital Boston/USA	2006-2008
3.	Veteriner Hekim	İzmir Büyükşehir Bel. Sağlık İş. Md.	2005-2006

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	---
Almanca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	90.00

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Sertifikaları

- İleri Mikrocerrahi/ Ortotopik Ksenograft modellerinin oluşturulması 2017, Jackson Laboratuvarı, Bar Harbor, ME, ABD
- Embriyo Manipülasyonu, MAM TÜBİTAK, 2017, Kocaeli, TÜRKİYE
- Stereotaksik Cerrahi, Ankara, 2016, TÜRKİYE
- Deney Hayvanları Sertifikası, KATEGORİ B, 2010, İstanbul, TÜRKİYE
- ISO / 17025, TÜRKAK, 2012, İstanbul, TÜRKİYE
- İleri Mikrocerrahi, 2011, Zürih, İSVİÇRE
- Monoklonal Antikor Üretimi, 2011, Kocaeli, TÜRKİYE
- Katılım Sertifikası, Deneysel Hayvan Kullanımı, FELASA KATEGORİ C, 2013, İzmir, TÜRKİYE
- Küçük Hayvan Cerrahisi Sürekli Eğitim Sertifikası, 2007, Illinois, ABD
- Küçük Hayvan Acil ve Yoğun Bakım, 2007, Tufts Üniversitesi, Boston, ABD

Ödülleri

2019 Veteriner Halk Sağlığı Hizmet Ödülü

2011 Onur Belgesi (Veteriner Halk Sağlığı)



