



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE PİLOKARPİN İLE OLUŞTURULAN TEMPORAL
LOB EPİLEPSİSİ MODELİNDE DUAL LEUCINE ZIPPER
KINASE İNHİBİTÖRÜ GNE-3511'İN EPİLEPTOGENEZ VE
BİLİŞSEL-DAVRANIŞSAL DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ**

DİLAN ACAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güldal Süyen

İSTANBUL-2022



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE PİLOKARPİN İLE OLUŞTURULAN TEMPORAL
LOB EPİLEPSİSİ MODELİNDE DUAL LEUCINE ZIPPER
KINASE İNHİBİTÖRÜ GNE-3511'İN EPİLEPTOGENEZ VE
BİLİŞSEL-DAVRANIŞSAL DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ**

DİLAN ACAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güldal Süyen

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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 olmadığı beyan ederim.

10/01/2022

Dilan Acar

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan; araştırmacı olma yolunda bana tüm imkanları sağlayarak her koşulda anlayışlı ve destekleyici olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Güldal Süyen'e,

Tez çalışmamın biyokimyasal değerlendirmeleri için Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Devrim Özarlan'a, histolojik değerlendirmeleri için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Öğr. Grv. Gamze Tümentemur'a,

Yüksek lisans eğitimimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Dr. Meltem Kolgazi, Doç. Dr. Hande Yapışlar ve Dr. Mehmet Ergen'e,

Tezimde benimle birlikte çalışan değerli çalışma arkadaşlarım; ACU Deneysel Hayvanları Merkezi'nden Vet. Hek. Samed Özer, Can Berk Asaroğlu, İrem Ekin Sayın Serra Nur Selek ve Emre Tunçcan'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan değerli arkadaşlarım Sümeyye Çilingir, Merve Çatakçı, Sılasu Arıkan ve Simge Şenay'a,

Son olarak hayatın tüm zorlukları ve güzellikleriyle dimdik durarak azmimi ve inancımı borçlu olduğum biricik anneme, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen her zaman yanımda olan teyzeme, kavga ede ede, güle güle daha beraber büyüyeceğim kardeşime teşekkürü borç bilirim.

Bu tez, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (2020/03/08).

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 Epilepsi	6
2.1.1 Epilepsi tanımı ve tarihçesi.....	6
2.1.2 Epilepsi epidemiyolojisi	7
2.1.3 Epilepsi etiyolojisi.....	8
2.2 Epilepsi Nöbet Sınıflandırması	8
2.2.1 Jeneralize başlangıçlı nöbetler	9
2.2.2 Fokal başlangıçlı nöbetler	10
2.3 Temporal Lob Epilepsisi.....	11
2.3.1 Hipokampal skleroz (Mezial temporal skleroz)	11
2.3.2 Temporal lob epilepsisi ve bilişsel hasar	11
2.4 Deneysel Temporal Lob Epilepsi Modelleri.....	12
2.4.1 Kainik asit modeli.....	12
2.4.2 Pilocarpin modeli	13
2.4.3 Lityum-pilocarpin modeli	13
2.5 Epilepsi Fizyopatolojisi	14
2.6 Mitojen Aktive Protein Kinaz Ailesi.....	15
2.6.1 JNK.....	16
2.6.2 c-Jun-N-terminal kinaz'ların nörodejeneratif mekanizmalardaki rolü .	17
2.6.3 Dual leucine zipper kinase	18
2.7 Dual Leucine Zipper Kinase İnhibitörleri	20
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1 Deney Hayvanları Temini.....	22

3.1.1	Deney gruplarının oluşturulması.....	22
3.2	Status Epileptikus Oluşturulması.....	24
3.2.1	SE indüksiyonu sonrasında tedavi ve bakım	25
3.3	Bilişsel-Davranışsal Testler	26
3.3.1	Açık alan testi.....	26
3.3.2	Yükseltilmiş artı labirent testi.....	27
3.3.3	Morris su tankı testi	28
3.4	Dokuların Toplanması	29
3.5	Histolojik Analizler	30
3.5.1	Kesitlerin alınması ve boyanması	30
3.6	Biyokimyasal analizler	31
3.6.1	c-Jun protein düzeyi ölçümü	31
3.6.2	Malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyi tayini.....	35
3.6.3	İstatistiksel Analiz.....	36
4	BULGULAR.....	37
4.1	Bilişsel-Davranışsal Testler	37
4.1.1	Açık alan testi.....	37
4.1.2	Yükseltilmiş artı labirent testi.....	38
4.1.3	Morris su tankı testi	41
4.2	Histoloji Analizi	46
4.3	Biyokimyasal Analizler	49
4.3.1	c-Jun protein düzeyi ölçümü	49
4.3.2	MDA ve GSH düzeyi tayini	51
5	TARTIŞMA	55
6	SONUÇ.....	63
7	KAYNAKLAR.....	64
8	EKLER.....	75
	EK 1. Etik Kurul Raporu	75
9	ÖZGEÇMİŞ.....	76

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ACU DEHAM	Acıbadem Üniversitesi Deneysel Hayvanları Merkezi
ANOVA	Yönlü varyans analizi
ASK1	Apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1
BSA	Bovine serum albümin
DG	Dentat girus
DLK	Dual Leucine Zipper Kinase
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar
GSH	Glutasyon
ILAE	Epilepsiye Karşı Uluslararası Birlik
IL-6	İnterlökin 6
IL-10	İnterlökin 10
JIP	c-Jun N-terminal kinaz etkileşimli proteinler
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
LTP	Uzun süreli potansiyasyon
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MDA	Malon Dialdehit
MEKK	Mitojen aktive protein kinaz kinaz
MLK	Karışık soy kinaz
MKK7	Mitojen aktive protein kinaz kinaz 7
MSS	Merkezi sinir sistemi
PBST	Tween ile fosfat tamponlu salin
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
PI	Proteaz inhibitörü
TNF α	Tümör nekroz faktör alfa

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. SE indüksiyonu sonrası besin takviyesi yapılışı	26
Resim 2. Açık alan testi uygulama alanı	27
Resim 3. Yükseltilmiş artı labirent testi uygulama alanı	28
Resim 4. Morris su tankı testi uygulama alanı	29
Resim 5. Sıvı azotta cryo tüp içerisinde dondurulan hipokampus örnekleri.....	30
Resim 6. Hipokampus örneklerinin homojenizasyonu	31
Resim 7. Trans-Blot Turbo transfer cihazı.....	34
Resim 8. MDA ölçümü için kaynatma işlemi	35
Resim 9. Ponceau s boyası ile membran görüntüsü	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. ILAE 2017 Genişletilmiş Nöbet Sınıflandırması.....	9
Şekil 2. MAPK yolakları (94)	16
Şekil 3. DLK sinyal yolağı (122)	19
Şekil 4. DLK inhibitörlerinin HTS gelişimi (122).....	21
Şekil 5. Çalışma protokolü.....	24
Şekil 6. Geçilen kare sayısı	38
Şekil 7. Açık kolda kalma süresi (sn).....	40
Şekil 8. Anksiyete skoru	41
Şekil 9. Günlere göre platform bulma süresi (sn)	42
Şekil 10. Hedef kadranda geçirilen süre (sn)	44
Şekil 11. Yüzülen mesafe (cm)	45
Şekil 12. Platform çaprazlama sayısı	46
Şekil 13. Kontrol grubu hipokampus kesiti ışık mikroskopi görüntüleri.....	47
Şekil 14. SE grubu hipokampus kesiti ışık mikroskopi görüntüleri.....	47
Şekil 15. 1 mg/kg grubu hipokampus kesiti ışık mikroskopi görüntüleri	48
Şekil 16. 5 mg/kg grubu hipokampus kesiti ışık mikroskopi görüntüleri.....	48
Şekil 17. Dejenere nöron sayısı.....	49
Şekil 18. c-Jun ve GAPDH bant görüntüleri.....	50
Şekil 19. Göreceli bant yoğunluğu (c-Jun/GAPDH)	51
Şekil 20. MDA düzeyleri	53
Şekil 21. GSH düzeyleri.....	54

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. DeneY grupları ve yapılan uygulamalar.....	23
Tablo 2. Modifiye edilen Racine skalası.....	25
Tablo 3. 12% Poliakrilamid yürütme jeli (1x).....	32
Tablo 4. 4% Poliakrilamid yükleme jeli (1x).....	33
Tablo 5. Grupların açık alan testi ortalamaları ve standart hataları.....	37
Tablo 6. Grupların yükseltilmiş artı labirent testi ortalamaları ve standart hataları ..	39
Tablo 7. Morris su tankı testi günlük ortalamalar ve standart hataları.....	42
Tablo 8. Morris su tankı testi prob deneme ortalamalar ve standart hataları.....	43
Tablo 9. Biyokimyasal analizlerin ortalama ve standart hataları.....	52

ÖZET

Farelerde Oluşturulan Pilokarpin ile Oluşturulan Temporal Lob Epilepsisi Modelinde Dual Leucine Zipper Kinase İnhibitörü GNE-3511'in Epileptogenez ve Bilişsel-Davranışsal Değişiklikler Üzerine Etkisi

Epilepsi fizyopatolojisinde inflamasyon, nöron kaybı anahtar faktörleri oluşturmaktadır. Kronik nörodejeneratif hastalıklarda Dual Leucine Zipper Kinase'in (DLK) aktifleşmesinin apoptotik yollar üzerinden nöron ölümü ve akson dejenerasyonuna yol açtığı bilinmektedir. **Amaç:** Çalışmada, pilokarpin modeliyle oluşturulmuş temporal lob epilepsisinde (TLE) DLK inhibitörü GNE-3511 ile DLK/JNK yolağının baskılanması ve bu inhibisyonun hipokampal hasar ve epilepsiye bağlı bilişsel ve davranışsal bozukluklar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. **Yöntem:** Status epileptikus (SE) indüksiyonu için pilokarpin modeli kullanılmıştır. SE indüksiyonunu takiben fareler rastgele SE indüklenmiş ve tedavi olarak GNE-3511 için 2 ayrı doz grubu (1 mg/kg ve 5 mg/kg), SE indüklenmiş aracı grubu ve naif grup olmak üzere toplam 4 gruba ayrılmıştır. Tedaviden 6 hafta sonra bilişsel-davranışsal testler olarak Morris su tankı, yükseltilmiş artı labirent ve açık alan testi yapılmıştır. Davranış deneylerinin sonunda alınan beyin dokuları ve hipokampuslar ile hedef proteinleri varlığını göstermek amacıyla Western blot yöntemi uygulanıp ayrıca histolojik ölçüm ve antioksidan ve oksidan düzey tayini yapılmıştır. **Bulgular:** SE grubuna kıyasla tedavi gruplarında dejenerasyonun azaldığı görüldü ($p < 0.001$). Bilişsel-davranışsal olarak bellek performansı değerlendirmesinde anlamlı düzelme olduğu görüldü ($p < 0.001$). Anksiyetenin, lokomotor aktivitenin ve lipid peroksidasyonunun azaldığı görüldü ($p < 0.001$). **Tartışma:** Pilokarpin ile oluşturulan temporal lob epilepsisi modelinde DLK inhibitörü GNE-3511'in uygulanmasının, hipokampusteki dejenerasyonu azalttığı, bilişsel-davranışsal olarak bakıldığında öğrenme ve bellek performansındaki bozukluğu, lipid peroksidasyonu, temporal lob epilepsi modeliyle artan anksiyeteyi ve lokomotor aktiviteyi azalttığı görüldü.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, c-Jun N-terminal kinaz, Epilepsi, İnflamasyon, Nörodejeneratif hastalıklar

ABSTRACT

Effect of Dual Leucine Zipper Kinase Inhibitor GNE-3511 on Epileptogenesis and Cognitive-Behavioral Changes in Temporal Lobe Epilepsy Model Induced by Pilocarpine in Mice

Inflammation and neuronal loss are key factors in the pathophysiology of epilepsy. It is known that activation of Dual Leucine Zipper Kinase (DLK) in chronic neurodegenerative diseases causes neuron death and axon degeneration through apoptotic pathways. **Aim:** In this study, the inhibition of the DLK / JNK pathway with the DLK inhibitor GNE-3511 in temporal lobe epilepsy (TLE) by pilocarpine induced model and the effect of this inhibition on cognitive and behavioral disorders due to hippocampal damage and epilepsy were investigated. **Methods:** Pilocarpine model was used for Status Epilepticus (SE) induction. Following SE induction, mice were randomly divided 4 group as SE induced and treatment group which includes 2 different doses (1 mg/kg and 5mg/kg) of GNE-3511, SE induced sham and naive group. Six weeks after treatment, Morris water maze, elevated plus maze and open field test were performed as cognitive-behavioral tests. Western Blot method was applied to show the presence of target proteins in brain tissues and hippocampus also histological measurement, antioxidant and oxidant levels were determined. **Results:** Degenerated neurons were decreased in the treatment groups compared to the SE group ($p<0.001$). It was observed that there was a significant improvement in cognitive-behavioral evaluation of memory performance ($p<0.001$). Increased anxiety, locomotor activity and lipid peroxidation were decreased ($p<0.001$). **Discussion:** In the temporal epilepsy model induced by pilocarpine, the application of the DLK inhibitor GNE-3511 decreased the degeneration in the hippocampus, lipid peroxidation, cognitive-behavioral impairment in anxiety, locomotor activity, learning and memory performance.

Keywords: Apoptosis, c-Jun N-terminal kinase, Epilepsy, Inflammation, Neurodegenerative diseases

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, epileptik nöbetler oluşturmak için kalıcı bir eğilim gösteren ve bu durumun nöro-biyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçları ile karakterize edilmiş heterojen bir beyin hastalığıdır (1). Epilepsinin nedeni çoğunlukla bilinmese de; inme, travmatik beyin hasarı, enfeksiyon ve genetik mutasyonlar gibi beyin fonksiyonunu etkileyebilecek her türlü etken epilepsiye neden olabilmektedir (2). Tedavinin temel basamağını antiepileptik ilaçlar oluşturmaktadır ve bu ilaçlar hastalığın altında yatan nöropatolojik süreci düzeltmeden nöbet oluşumunu baskılayarak etki göstermektedir. Ancak, epilepsi hastalarının yaklaşık %30'u bu konvansiyonel antiepileptik ilaçlara karşı direnç göstermektedir (3). Bu durum epilepsi araştırmaları kapsamında yeni tedavilerin geliştirilmesi ve epilepsi/epileptogenez biyobelirteçlerinin belirlenmesi ihtiyacını ortaya koymaktadır (4).

Epileptogenez süreci, bir nöronal ağdaki eksitatör ve inhibitör aktivite arasındaki dengenin kaybıyla nöronal işlemlerin bozulması ve nöronal kayıpları içermektedir (5). İlk beyin hasarının hipokampal hücre kaybıyla sonuçlandığı ve ardından kollateral aksonal filizlenme, sinaptik devrelerin yeniden düzenlenmesi son olarak spontan nöbetler oluşana kadar limbik devrelerde inhibisyon ve eksitasyon arasındaki dengeyi etkilediği düşünülmektedir (6,7).

Epilepsi hastalarında nörobilişsel bozukluklar sıklıkla görülmektedir. Yetişkin hastalarda bilişsel şikayetlerin çoğunu zihinsel yavaşlık, hafıza güçlükleri ve dikkat eksiklikleri oluşturmaktadır (8). Temporal lob epilepsisi (TLE), yetişkinlerde en sık görülen dirençli fokal epilepsi tipidir. Son yıllarda geliştirilen antiepileptik ilaçların artışına rağmen TLE hastalarının %30'unun ilaca dirençli olduğu bilinmektedir (9). Deneysel hayvanlarında pilokarpin ile oluşturulan deneysel TLE modeli araştırmalarda sıklıkla kullanılan geçerli bir modeldir. Başlangıçta oluşturulan SE sırasında muskarinik yanıtı takip eden sekonder glutamaterjik jeneralizasyon, özellikle limbik bölgelerde yüksek kalsiyum konsantrasyonu, mitokondrial yetmezlik ve yaygın nekrotik nöron ölümüne yol açar. Nöron ölümünü izleyen tamir aşamasında ise astroglial yanıt, nörogenez, filizlenme ve devresel reorganizasyon, yeni ve aşırı uyarılabilir devreler oluşumuna yol açar (10–12).

Epilepsi patogenezi ile ilgili yapılan çalışmalar, epileptik nöbetlere bağlı hücre ölümünün apoptotik süreçle oluşabileceğini göstermiştir. Epileptogenez mekanizmasının hala varsayımsal olmasıyla birlikte, inflamasyonun da belirgin bir rol oynadığını gösteren çalışmalar artmaktadır. Travmatik beyin hasarı, merkezi sinir sistemi (MSS) ve inme gibi akut beyin hasarları epilepsiye neden olabilirken, inflamasyon, nöron kaybı fenomeninin anahtar faktörleridir (13,14).

Epilepside ekstrasellüler stresle tetiklenen önemli diğer bir yolak olan mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ailesinin üyeleri olan c-Jun N-terminal kinazlar (JNK'ler), çok çeşitli uyarılara yanıt olarak aktifleştirilir. Hücrenin inflamasyon, oksidatif stres, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı, ozmotik stres veya hücre iskeleti değişiklikleri gibi çeşitli biyotik veya abiyotik stres olaylarına maruz kalması özellikle önemlidir (15). c-Jun-N-terminal kinaz'lar ayrıca, gen ekspresyonu, sitoskeletal protein dinamikleri ve hücre ölümü/sağkalım yolları üzerindeki etkileri yoluyla nöronal fonksiyonlar, immünolojik etkiler ve embriyonik gelişim gibi önemli fizyolojik süreçleri düzenler (16). Pilocarpin modeli ile yapılan bir çalışmada, sık konvulsif nöbetler geçiren kronik epileptik sıçanların hipokampusunun CA1 bölgesindeki JNK izoformlarının agregasyonu ve hiperaktivasyonu gösterilmiştir (17).

Strese özgü JNK aktivasyonu, nöronlarda MKK4/7 yolu aracılığıyla DLK aktivasyonu ile gerçekleşir ve bu aktivasyon henüz bilinmeyen bir mekanizma ile PERK sinyalini artırır (18–20). Bu yolların indüksiyonu, pek çok nöronda apoptoz ve akson dejenerasyonuna yol açan c-Jun ve adenosin trifosfat gibi transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi yoluyla yaygın bir transkripsiyonel hasara yol açar. Kronik nörodejeneratif hastalıklarda da nöron ölümü ve akson dejenerasyonu DLK'ye bağlı stres yolağının aktiflenmesi ile gerçekleşmektedir (19,21,22).

Dual leucine zipper kinase geninin silindiği genetik olarak tasarlanmış farelerin kullanıldığı bir çalışmada, aksotomi ya da vinkristin tedavisinden sonra nöronların dejenerasyonunun DLK'ye bağımlı olduğu gösterilmiştir (19,23). Benzer şekilde, *in vivo* optik sinir hasarı modelinde, DLK ekspresyonu olmayan nöronların nörodejenerasyondan korunduğu saptanmıştır (21). Daha sonra yayınlanan bir makalede, DLK nakavt farelerde kainik asit ile oluşturulan eksitotoksikite modelinde,

DLK aktivitesi kaybının nöronları eksitotoksisite kaynaklı dejenerasyondan koruduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmanın bir parçası olarak DLK geninin tüm dokularda silindiği fareler, DLK silinmesinden 3 ay sonra incelenmiş ve histolojik, elektrofizyolojik veya davranış anormallikleri bulunmamıştır (24). Bu, inhibitör tedavisini takiben DLK sinyal kaybının iyi şekilde tolere edileceğini düşündürmektedir.

Dual leucine zipper kinase inhibitörlerinin epilepsi modellerinde kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple çalışmamızda pilokarpin modeliyle oluşturulmuş TLE'de DLK inhibitörü GNE-3511 ile DLK/JNK yolağının baskılanması ve bu inhibisyonun hipokampal hasar ve epilepsiye bağlı bilişsel ve davranışsal bozukluklar üzerinde etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Epilepsi

2.1.1 Epilepsi tanımı ve tarihçesi

En yaygın beyin hastalıklarından epilepsinin dünya çapında 70 milyondan fazla insanı etkilediği bilinmektedir. Spontan rekürren nöbet oluşturma yatkınlığı ile karakterize olup çok sayıda nörobiyolojik, bilişsel ve psikososyal sonuçları içerir. Epilepsi hastalarının tümünde nöbet görülürken her nöbet görülen kişi epilepsi hastası değildir.

Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) tarafından 2014 yılında epilepsi tanımı yeniden yapılmıştır. Buna tanıma göre 24 saatten uzun aralıklarla ortaya çıkan herhangi provoke edici bir nedenin (alkol, toksinler, ilaçlar ve metabolik bozukluklar gibi) bulunmadığı nöbetleri olanlar; tek nöbeti olmasına rağmen yaklaşık %60 ve üzerinde, 10 yıl içinde ikiden fazla provoke olmadan tekrarlayan nöbet riski olanlar ya da bir epileptik sendrom (Juvenil miyoklonik epilepsi gibi) tanısı olanlar epilepsi hastası olarak tanımlanmaktadır (25).

Tarihsel literatürün incelemelerine göre nöbetin en erken tanımı, Mezopotamya'dan milattan önce 2500'e kadar uzanan Sümer belgelerinde bulunmaktadır (26). Orta Çağ boyunca (476-1492) epilepsi hakkındaki bilimsel yaklaşımlarda gerileme yaşanmıştır. Semptomlar şeytani mülkiyet fikri olarak tanımlanmıştır (27). Ancak bu süreçte İbn-i Sina (milattan sonra 980-1037) Al-Quanun fi al-Tibb kitabıyla epileptoloji alanına katkılarda bulunmuştur. Nöbetleri vücudun farklı bölümleri ile ilişkilendirip aynı zamanda nöbetlerden önce görülen şiddetli anksiyete ve heyecan gibi semptomları tanımlamıştır (28).

Rönesans (1300-1600) ile bir tartışma dönemi başlamış, yeni gözlemlerle beraber klinik bilgi genişletilmiştir. Epilepsinin (nöbetlerin) frengi, iskorbüt, çiçek hastalığı ve kızamık gibi yeni keşfedilen bazı hastalıkların bir sonucu olduğunu ifade etmiştir (29).

19. yüzyılın sonlarında ve 20. yüzyılın başlarında Elektroensefalografi (EEG)'nin ortaya çıkmasıyla elde edilen veriler ile daha doğru klinik tanımlar eşlik etmiştir. Fokal ve generalize ayrımı farklı iki epileptiform EEG paterninin bulunmasıyla desteklenmiştir (30).

1964 yılında Gastaut liderliğinde ILAE, bir nöbet sınıflandırma sistemi geliştirdi. Sonraki sınıflandırma ise 2010 yılında Berg ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. 2017 yılında, 1981-1989-2010 yıllarındakileri kapsayacak ve eksiklerini tamamlayacak şekilde ILAE tarafından yeni nöbet ve epilepsi sınıflaması geliştirilmiştir. 2017 sınıflamasında epilepsi tipi yine fokal, jeneralize, jeneralize-fokal birlikte ve bilinmeyen olarak gruplandırılmıştır. Buna ek olarak jeneralize-fokal epilepsi yeni bir kategori olarak karşımıza çıkmakta ve her iki tip nöbeti olan hastaları kapsamaktadır (31).

2.1.2 Epilepsi epidemiyolojisi

Epilepsi; her yaşta, ırktan, coğrafi bölgeden ve sosyal sınıftan insanı etkileyebilen en yaygın nörolojik hastalıklardan biridir. Nöbet oluşturmaya ve tekrarlamaya yatkınlığın yanı sıra bireylerin yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen nörolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçlara sahiptir (5).

Epilepsi insidans çalışmalarında bir meta-analize göre yılda 61.4/100.000 olarak bildirilmiştir (32). İnsidans, düşük/orta gelirli ülkelerde yılda 139,0/100.000 görülürken yüksek gelirli ülkelerde yılda 48,9/100.000 görülmüştür. Bu sonucun risk altındaki popülasyonların, perinatal risk faktörlerine, MSS enfeksiyonlarına maruziyetleri ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (33).

Epilepsi prevalansı, risk ve etiyolojik faktörlerin dağılımına, tanıdaki nöbet sayısına veya yalnızca aktif epilepsinin (aktif prevalans) dahil edilmesi ya da yaşam boyu prevalansın da dahil edilmesine bağlı olarak değişebilmektedir. Epilepsinin genel yaşam boyu yaygınlığı 7.60/1.000, aktif prevalans ise 6.38/1.000'dir (32).

2.1.3 Epilepsi etiyolojisi

Epilepsinin etiyolojisi klinik seyir ve prognoz için çok önemli olmasına rağmen mevcut çalışmalar epilepsi için ayrıntılı bir etiyolojik açıklama gösterememektedir (34). Epilepsinin geniş heterojenliği, etiyolojisi sadece klinik bulguları, nörogörüntüleme özellikleri ve komorbiditeleri olarak görülür (35). Mevcut bilgilere göre epilepsinin genel olarak genetik, yapısal veya metabolik ve nedeni bilinmeyen olmak üzere üç ana etiyolojisi vardır (36).

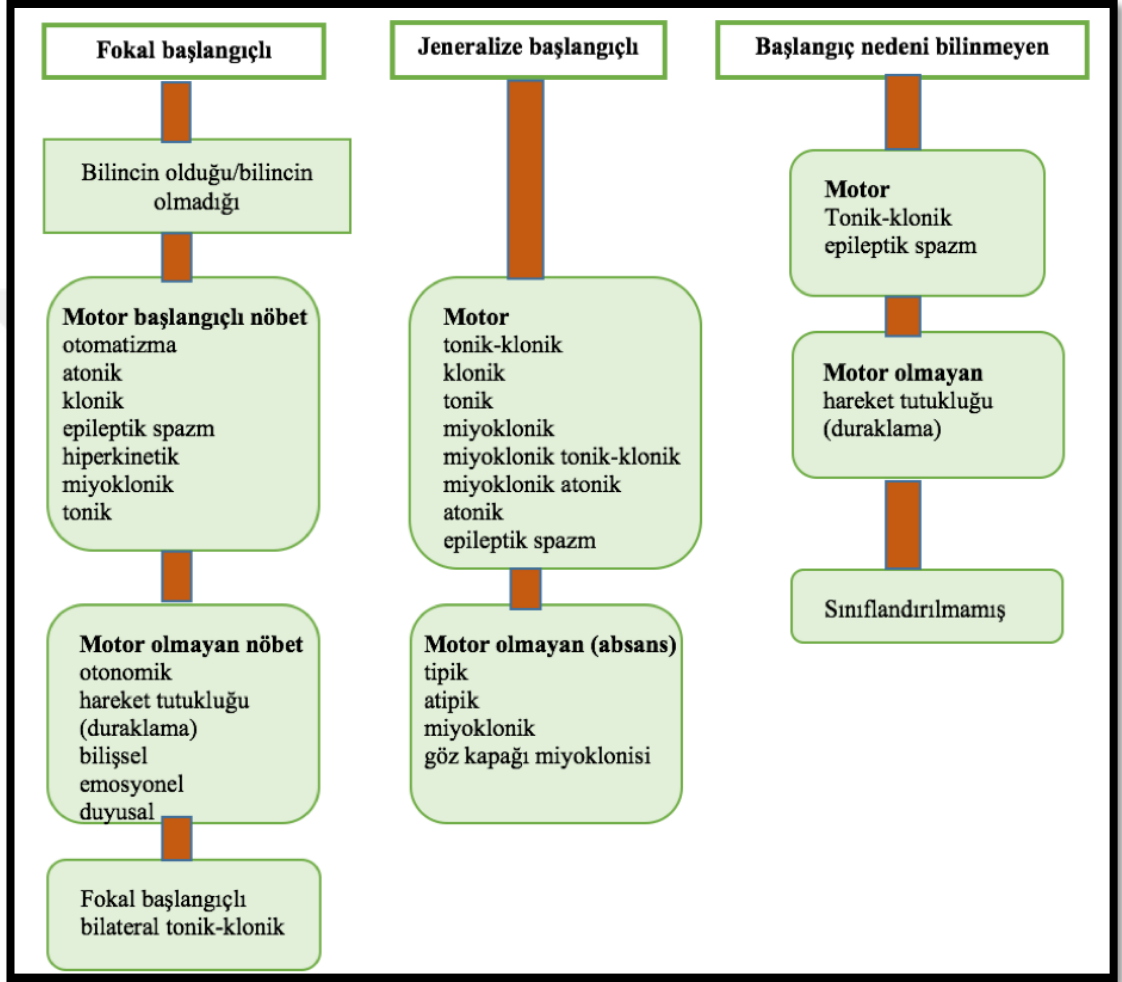
Farklı yaş gruplarında epilepsi etiyolojisi:

- i) Hipoksik-iskemik ensefalopati, MSS enfeksiyonları, travma, MSS'nin doğumsal anormallikleri ve metabolik bozukluklar neonatal ve erken çocukluk çağı epilepsisinin başlıca nedenleridir.
- ii) İlk çocukluk (3-6 yaş) dönemi ve ikinci çocukluk (7-11 yaş) dönemlerinde görülen ateşli havaleler, travmalar ve enfeksiyonlar ortak etiyolojiye sahiptir.
- iii) Çocukluk çağında epileptik sendromlar genellikle sıklıdır.
- iv) Beyin ve medulla spinalis lezyonlarına sekonder olarak ortaya çıkan epilepsi ergenlik dönemi ve sonrasında görülebilir.
- v) Serebrovasküler hastalıklar, yaşlılarda epilepsinin önde gelen nedenidir. Ayrıca MSS tümörleri, travma ve diğer dejeneratif hastalıklar yaşlılarda epilepsiye neden olabilir (37).

2.2 Epilepsi Nöbet Sınıflandırması

Nöbetler, beyindeki bir nöronal hücre grubunun anormal aşırı ve eş zamanlı nöronal aktivitesine bağlı geçici semptom ve bulgular olarak tanımlanır (38). Epilepsinin sınıflandırılmasında: Nöbetlerin başlangıç şekli, hastanın yaşı, nöbet paterni, aile öyküsü elektroensefalogram (EEG) ve manyetik rezonans görüntüleme bulguları dikkate alınır (39). Sınıflandırma, klinisyen için nöbet tipi ve buna bağlı ilaç belirlemeyi kolaylaştırarak hastanın en uygun tedaviyi almasına olanak sağlar.

ILAE, 2017 yılında nöbet ve epilepsi sınıflandırmasını ve terminolojiyi güncellemiştir (Şekil 1). Çoğu zaman hastaların sadece epilepsi tanısı alması yeterli olmamaktadır. Tanı mümkün olduğunca spesifik ve kesin olmalıdır. Bu amaçla, sınıflandırma nöbet tipi, epilepsi tipi ve sendrom olmak üzere üç düzeyde yapılır.



Şekil 1. ILAE 2017 Genişletilmiş Nöbet Sınıflandırması

2.2.1 Jeneralize başlangıçlı nöbetler

Jeneralize başlangıçlı nöbetler, nöronal ağın herhangi bir noktasından kaynaklanıp her iki hemisfer kortikal ve subkortikal yapılara yayılır. Bu gruptaki nöbetlerin büyük çoğunluğunda farkındalık bozulur. Jeneralize başlangıçlı nöbetler motor semptomların varlığına göre motor ve nonmotor semptomlu (absans) olarak iki grupta sınıflandırılmıştır (Şekil 1).

Tonik-klonik nöbetler sürekli kas kasılması ve bu kasılmayı takip eden kloniler ile karakterizedir. Tonik nöbetlerde, devamlı kas kasılması ve katılığı izlenir. Klonik nöbetlerde ise ritmik sızramalar tüm vücutta görülür. Miyoklonik nöbetlerde, klonik nöbetlerden farklı olarak ritmik özellik göstermeyen ani sızramalar vardır.

Miyoklonik-tonik-klonik nöbetler, miyoklonik ani sızramalar ile başlayıp tonik-klonik nöbete dönüşürler. Miyokolonik-atonik nöbetler, miyoklonik sızramayı takiben kas tonusunun azalması sonucu düşme atakları şeklinde ortaya çıkar. Kas tonusunun kaybolması Atonik nöbetlerde görülür.

Tipik motor olmayan (absans) nöbetlerinde bilinç kaybı ani başlar ve ani sonlanır. Atipik absans nöbetlerinde, başlangıç ve bitişini net tanımlamak kolay değildir ve bilinç kaybı tam olmayabilir. Miyoklonik absans nöbetleri, miyoklonik sızramalar şeklindedir. Göz kapağı miyoklonili absans nöbetlerinde, göz kapağında miyoklonik sızramalar ve göz küresinin yukarı deviyasyonu nöbetlere eşlik eder (40).

2.2.2 Fokal başlangıçlı nöbetler

Fokal başlangıçlı nöbetler, tek bir hemisferde, bir veya birkaç anatomik lokasyondan başlayabilir. Fokal başlangıçlı nöbetler, üç aşamada değerlendirilir. Birinci aşama bilincin değerlendirilmesidir. Hastalar bilincin olduğu ve bilincin olmadığı nöbetler şeklinde iki grupta değerlendirilir. Bilinç durumundaki değişiklikler hasta ve hasta yakınlarından alınan anamneze göre veya nöbet sırasında hastanın doktor veya sağlık personeli tarafından muayene edilmesi ile belirlenir. Fokal başlangıçlı nöbetlerde ikinci aşama nöbet sırasında ortaya çıkan klinik bulgulara göre motor başlangıçlı nöbet ve motor olmayan nöbet olarak ikiye ayrılır. Üçüncü aşama nöbetin yayılımı ile ilişkilidir. Fokal başlangıçlı olup bilateral tonik-klonik nöbete dönüşen nöbetler olarak sınıflandırılır (38).

Aura terimi sıklıkla fokal nöbetlerle ilişkilendirilmiş olup déjà vu aurası, garip bir tat, koku, midede yükselen bir his, dudak şapırdatma ya da el ovuşturma gibi tek başına ortaya çıkabilir. Bu durumlar bilincin olduğu fokal auralı nöbetler olarak adlandırılır (41,42).

2.3 Temporal Lob Epilepsisi

Temporal lob epilepsisi, bir fokal epilepsi tipi olup temporal lobun bir veya birkaç anatomik lokasyonu ile başlayıp nöronal bağlantı ağı yoluyla komşu beyin dokuya geçebilmektedir (43). Epilepsi hastalarının yaklaşık %60'ını temporal lob epilepsili hastalar oluşturmaktadır (44). Temporal lob epilepsisi, epilepsi sınıflandırmasına göre 2 gruba ayrılmaktadır. İlk olarak en yaygın görülmekte olan ve esas etki alanının temporal medial yapılardan hipokampus, entorhinal korteks, amigdala, parahipokampal girus olan medial epilepsidir. Lateral ya da neokortikal epilepsi olarak adlandırılan ikinci tip ise temporal-parietal ve temporal-okspital bölgeleri içeren temporal neokorteks üzerinde etki göstermektedir (45).

2.3.1 Hipokampal skleroz (Mezial temporal skleroz)

Hipokampus epileptolojide en çok çalışılan beyin bölgesidir. Cerrahi müdahale ile başarı elde edilebilen ilaç dirençli epilepsilerde en çok görülen patolojilerden biri olan hipokampal skleroz (46); genellikle temporal lob epilepsisiyle bağlantılı olsa da, post-mortem çalışmalarda nadir de olsa diğer epilepsi sendromlarında görülmüştür. İnsidansı tüm epilepsi sendromlarında %30.5-%45 arasında değişmekte iken, medial temporal lob epilepsisinde bu oranlar %56'ya çıkmaktadır (47). Kesin olarak kanıtlanmamış olsa da genel kanı sonradan edinilmiş bir patoloji olduğu doğrudur. ILAE'nin hipokampal skleroz sınıflaması daha çok piramidal hücrelerin kaybı üzerine olsa da granül hücrelerinin dağılımında artış ve granül hücrelerinin yosunsu liflerinde dallanma ve aracı nöronlarda azalma da sık karşılaşılan bulgulardandır (48).

2.3.2 Temporal lob epilepsisi ve bilişsel hasar

Epilepsili bireylerin yaşam kalitesi öğrenme, hafıza, dikkat ve yürütücü işlevler dahil olmak üzere bir veya birden fazla alanda bilişsel bozukluk göstermektedir. İçlerinde en yaygın görülen ise bilişsel işlev bozukluğudur (49). İnflamasyon yoluyla oluşan bilişsel işlev bozukluklarının kesin mekanizması bilinmemektedir. Bununla

birlikte bilişsel hasar olarak ortaya çıkan nöronal işlev bozukluklarına, sitokinlere bağlı inflamatuvar sinyallerin kronik aktivasyonu ve artmış beyin sitokin sinyallerinin yol açtığı düşünülmektedir (50,51).

MSS içerisindeki inflamatuvar mekanizmalar, nöronlar ve glial hücreleri arasındaki sitokin aracılı etkileşimler yoluyla bilişsel hasara yol açmaktadır (52). Aktive olan mikrogial hücre, bilişsel hasarla ilgili olduğu bilinen oksidatif stres yoluyla doku hasarı ve nörotoksositeye sebep olan reaktif oksijen türleri ve inflamatuvar mediatörlerini üretir (53).

Nörogenez, hafıza sağlamlaştırılmasında hipokampüse bağlı öğrenmede önemli bir rol oynar (54). Mitokondriyal disfonksiyona bağlı inflamasyon ve artan oksidatif stres hipokampal nörogenezi azaltarak doğrudan ya da dolaylı olarak bilişsel işlevleri olumsuz yönde etkileyebilmektedir (55).

2.4 Deneysel Temporal Lob Epilepsi Modelleri

2.4.1 Kainik asit modeli

Kainik asit, sistemik yolla (30-60 dakika içinde 6-15 mg/kg) ya da hipokampus içi (fokal) enjeksiyonla (5-60 dakika içinde 0.4-2.0 µg) uygulanabilir. Hipokampus içi uygulama, limbik yapılardan diğer beyin bölgelerine ilerleyen epileptiform deşarjların gelişmesine yol açar ve daha düşük ölüm oranları ile ilişkilidir (56). Sistemik uygulama ise 5 mg/kg/saatlik çoklu dozlarla kontrol edilebilir ve daha yüksek ölüm oranları ile ilişkilidir. Devamlı nöbetler, yosunlu lif filizlenmesi ve spontan rekürren nöbet oluşumuna sebep olur (57).

KA uygulandığında esas olarak limbik sistem, amigdala, medial talamus, septum ve korteksi etkilenir. Ancak nöbetler, KA reseptörlerinin bol olduğu hipokampustan kaynaklanır. CA1 bölgesinde maksimum nörodejenerasyon gözlenir (58,59). Ancak, CA2 gibi hipokampus bölgeleri ve dentat girusun (DG) granüler hücreleri KA'dan etkilenmez. Ayrıca, entorinal korteks, talamus ve serebral korteks gibi diğer bölgelerde de indüksiyondan 24 saat sonra nöronal kayıp görülür (60).

2.4.2 Pilokarpin modeli

Turski tarafından ilk kez çalışılan bu modelde intraperitoneal pilokarpin uygulanan fare (300–350 mg/kg) ve sıçanlarda (400 mg/kg) önce davranışsal değişimler ve limbik nöbetler, 1-2 hafta sonrasında itibaren de SE ve nörodejenerasyon gözlemlenmiştir (61).

Pilokarpin, kolinerjik sistemin (M1 muskarinik reseptörleri) aktivasyonu ile nöbetleri başlatır ve NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörünü aktive ederek nöbetin devam etmesine neden olur (62). Pilokarpin ayrıca yüksek IL-1 β seviyeleri nedeniyle kan-beyin bariyerine zarar vererek nöbetin ilerlemesine katkıda bulunur. Beyine periferik veya hipokampus içi enjeksiyon ile uygulanabilir. Hipokampusün CA1 ve CA3 bölgesi, amigdala ve piriform korteks gibi beyin bölgeleri pilokarpin kaynaklı nöronal hasara oldukça yatkındır (63).

Uygulama sonrası oluşmuş SE; tonik-klonik nöbetler, ardından latent dönem (nöbetsiz dönem) ve spontan rekürren nöbet ile karakterize edilen kronik epilepsi gelişimi ile tanımlanır (64). İlk SE'yi takiben, hayvanlarda tekrarlayan nöbetlerin gelişmesi yaklaşık 7 gün (65), DG'nin iç moleküler tabakasına doğru filizlenen yosunsu lif ve insan TLE'sine benzer nörodejenerasyon geliştirmek ise birkaç hafta sonra ortaya çıkar (63).

2.4.3 Lityum-pilokarpin modeli

Lityum ile kombinasyonunda pilokarpinin sıçanlarda konvülsif aktivitesi güçlenir ve sıçanların yüksek yüzdesinde SE geliştirir (66). Lityum ön koşullandırması (3 mEq/kg), nöbet eşliğinin düşmesine neden olur ve sıçanlarda nispeten daha düşük dozlarda (30 mg/kg) pilokarpin ile nöbet induksiyonuna yol açabilir. Ek olarak, bölünmüş dozlarda uygulanan pilokarpinin ölüm oranlarını etkili bir şekilde azalttığı da görülmüştür (64). İlginç bir şekilde, bunların her ikisi de bahsedilen dozlarda tek başına uygulandığında elektrofizyolojik rahatsızlıklara neden olmaz (66). Lityum eğer

pilokarpin indüksiyonundan 24 saat önce verilirse, enflamasyon kaskadını aktive eder ve böylece BBB geçirgenliğini artırarak nöbet eşiğini düşürür (67).

Lityum ön tedavisi ve devamında uygulanan daha düşük dozlarda pilokarpin, tek başına pilokarpininkine benzer davranışsal, elektrofizyolojik ve nöropatolojik etkiler üretir (68).

Bunlara karşın, daha güncel yapılan çalışmalarda geleneksel pilokarpin modeline lityum eklenmesinin uyarıcı potansiyelde ve nöbet eşiğinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı kanıtlanmıştır (69,70). Schauwecker (2011) tarafından hazırlanan bir başka raporda ise pilokarpinin farklı fare suşlarında değişken etkisi tanımlandı. Özellikle BALB/cJ ve C57BL/6J suşlarının pilokarpin kaynaklı SE ve nörodejenerasyona karşı oldukça dirençli ve duyarlı olduğunu gözlemledi (71).

2.5 Epilepsi Fizyopatolojisi

Epileptogenez süreci, epileptik olmayan bir beynin spontan, tekrarlayan nöbetler oluşturabilen bir beyne dönüşme sürecidir (5,72). Bu süreç, nöral ağdaki eksitator ve inhibitör dengenin bozulması ile karakterize olup uzun vadede normal nöronal işlemeyi bozabilmektedir (5). Jeneralize epilepsilerde epileptojenik ağlar bilateral olarak talamokortikal yapılara dağılırken fokal epilepsi için bu alan bir hemisfer içerisinde olup genellikle limbik veya neokortikal yapıları içerir (73,74).

Epileptojenik ağları oluşturan eksitasyon ve inhibisyon arasındaki dengesizlik her zaman bir eksitasyonun artışı ya da inhibisyon kaybı kaynaklı olmamaktadır. İnhibisyondaki anormal artış da absans nöbetlerde olduğu gibi bazı koşullarda tetikleyici unsur olabilmektedir (75,76). Çoğu jeneralize epilepsilerin genetik altyapısı olduğu düşünülürken özellikle ilaca dirençli olan fokal epilepsilerde yapısal serebral anomaliler vurgulanmaktadır (77–79). Yapısal anomalilerin sebep olduğu nöbet aktivitelerinin fizyopatolojik mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Nöbetler ilk olarak kortikal nöronların anormal aktiviteleri sonucu oluşurken ikincil olarak glial hücreler ve beyaz cevherdeki aksonlar dahil olabilmektedir. En iyi saptanan epileptojenik lezyon, hastalardan cerrahi operasyon sonrası alınan beyin dokularından

anlaşılmış olan mezial temporal sklerozdur (80). Patolojik bulgular spesifik alanlarda eksitator ve inhibitör nöron kayıpları, aksonal filizlenme, sinaptik reorganizasyon, glial fonksiyon ve yapıdaki değişiklikleri göstermektedir (81). Başlangıçta beyin hasarının hipokampal hücre kaybıyla oluştuğu sonrasında onu takiben kollateral aksonal filizlenme ve sinaptik devrenin yeniden düzenlendiği düşünülmektedir. Ardından spontan tekrarlı nöbetler oluşana kadar limbik yapılarda inhibisyon ve eksitasyon arasındaki dengeyi etkiler (6).

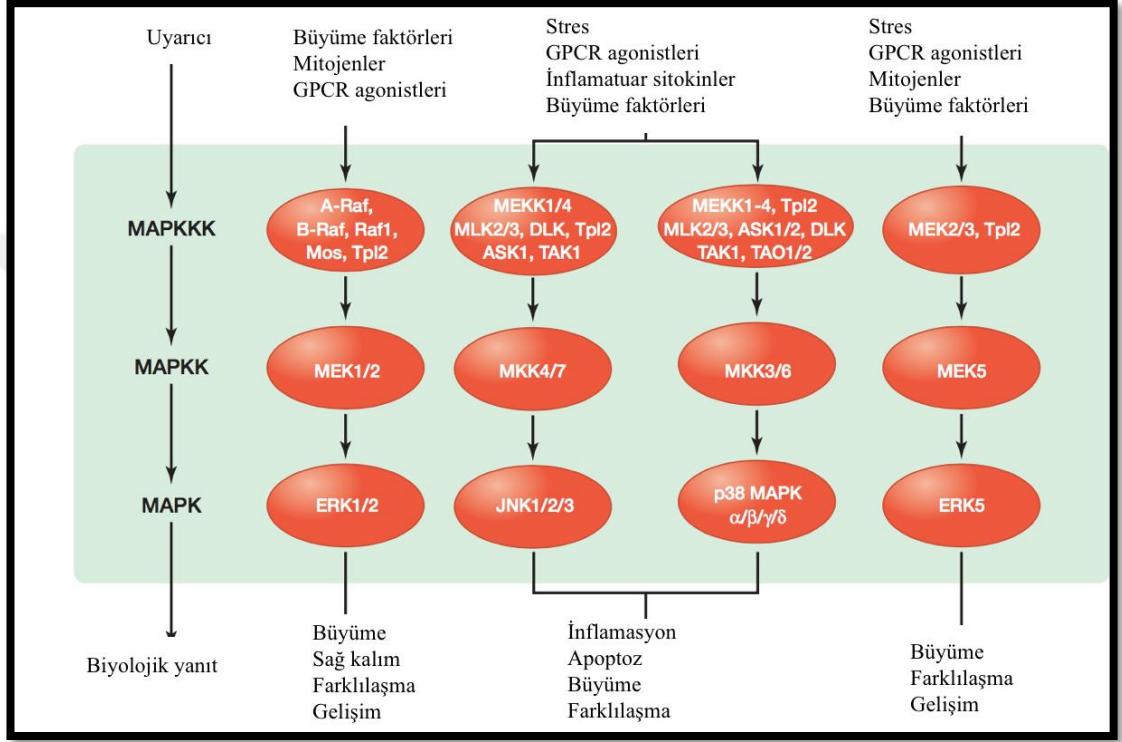
Epileptogenezin temel fizyopatolojisi hala anlaşılammıştır ancak inflamatuvar yolağın anahtar bir role sahip olduğu düşünülmektedir (82,83). Travmatik beyin hasarı, MSS'deki enfeksiyonlar ve inme gibi akut beyin hasarları epilepsiye neden olabilirken inflamasyon, nöronal kayıp, plastisite ve nöronal devrelerin yeniden düzenlenmesi fizyopatolojinin araştırılmasında önemli süreçlerdir (14). Mevcut araştırmalar inflamasyonun epilepside önemli bir rol oynadığını göstermektedir ancak inflamasyonun epilepsiye yol açıp açmadığı veya inflamasyonun epilepsinin bir sonucu olup olmadığı konusunda tartışmalar devam etmektedir (84).

2.6 Mitojen Aktive Protein Kinaz Ailesi

Mitojen aktive protein kinaz'lar, çeşitli hormonal, kimyasal ve fiziksel uyarınları hücrel tepkilere dönüştürerek çoklu hücrel fonksiyonları düzenlerler. Birçok ökaryotik hücrede bulunup diğer mekanizmaların yanı sıra hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü, yaşlanması ve apoptozun kontrolünden sorumludurlar (85,86). Bu kinaz ailesi 4 ana kaskad oluşturur: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK 1/2), ERK5, p38 ve JNK'ler (87,88) (Şekil 2.). Tüm bu kaskadlar *scaffold* proteinler aracılığıyla sıralı fosforilasyon ile sinyalleri yaymasıyla beraber gen ifadesindeki modifikasyonlarda önemli role sahiptir. Her MAPK kademesi farklı uyarıcılara yanıt vererek hücre çevresindeki ortama uygun cevabın oluşturulmasını sağlar.

ERK 1/2 aktivitesi, büyüme faktörleri, insülin, G-protein-bağlı reseptörlerin aktivitesine bağlı ligandlar, sitokinler, ozmotik basınç ve mikrotübül düzensizliği tarafından kontrol edilir (89). Buna karşılık, büyüme faktörleri, oksidatif stres ve

hiperozmolarite ERK5'i uyarabilir (90). p38 izoformları, oksidatif stres, ultraviyole (UV) radyasyon ayrıca inflamatuvar sitokinlere yanıt verir (91). Son olarak JNK'ler ise iyonlaştırıcı radyasyon, oksidatif stres, sitokinler, protein inhibitörleri, DNA hasar verici ajanlar, G-protein bağlı reseptörler, büyüme faktörlerinin varlığı gibi bir çok uyarıcı tarafından tetiklenirler (92,93).



Şekil 2. MAPK yolları (94)

2.6.1 JNK

MAPK sinyal proteinlerinin bir üyesi olan JNK'ler ilk olarak 1994 yılında Kyriakis ve arkadaşları tarafından sikloheksimide maruz kalan kemirgenlerin karaciğerinde aktif protein olarak tanımlanmıştır. JNK proteinleri, strese ve apoptoza bağlı reseptörlere duyarlı olup G-protein bağlı reseptörler ve reseptör tirozin kinazın spesifik ligandları tarafından aktive edilir (92,95). TNF- α , IL-1 β sitokinleri gibi birçok ekstraselüler uyarıcı JNK'leri aktive eder (92). c-Jun-N-terminal kinaz'ı aktive eden kinazlar arasında mitojen aktive protein kinaz kinaz 4 ve mitojen aktive protein kinaz kinaz 7 (MKK7) bulunur. Bu kinazların yukarı yönlü yolağında sırasıyla mitojen

aktive protein kinaz kinaz kinaz 7 (TAK), karışık soy kinaz 3 (MLK-3), mitojen aktive protein kinaz kinaz 1 ve 4 (MEKK-1, MEKK-4) ve apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1 (ASK1) bulunur. Spesifik olarak MEKK1-4, ASK1-2 genellikle çevresel stres tarafından indüklenerek MKK4'ü aktive eder. Sitokinler tarafından aktive edilen MKK7 ise MLK1/2/3 tarafından fosforile edilir. JNK'nin tam aktivasyonu için iki kinazın iş birliği gerekir (95–99).

Hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunan birçok substrat JNK tarafından fosforile edilir. İlk tanımlanan JNK substratı, Ser63 ve Ser73 kalıntılarında fosforile edildiğinde stabilitesini ve transkripsiyonel aktivitesini arttıran c-Jun'dur. c-Jun'un yüksek ekspresyonu ve protein seviyeleri hücre ölümünden önceki periyoda denk gelir (100–103).

c-Jun-N-terminal kinaz'ın 3 farklı gen tarafından kodlanan jnk1, jnk2 ve jnk3 adlı izoformları vardır (104). Memelilerde JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) her yerde eksprese edilirken JNK3 (MAPK10) genellikle beyinde ve daha az oranda olmak üzere kalp ve testislerde eksprese edilir. Spesifik olarak hipokampüste, JNK3 hipokampal alanların çoğuna yayılırken JNK1 CA3, CA4 ve dentat girusta bulunur (104–107).

Hücreler, enzim aktivitesinin olmamasına rağmen fonksiyonel modüller oluşturan aynı sinyal yolunun çeşitli bileşenlerine eklenen birtakım bağlayıcı proteinlerinin etkileşimi yoluyla bir sinyal kaskadının özgülüğünü ve etkinliğini sağlar (108–111). c-Jun-N-terminal kinaz sinyal yolu, JNK etkileşimli proteinler (JIP'ler) ile etkileşime girerek bir JNK sinyalleşme fonksiyonel modülü oluşturur. JIP'ler JNK'nin aktivasyonunu, MKK7 gibi MAPK kademesinin farklı bileşenlerine ek olarak MLK3 ya da DLK gibi bazı MAP3K'leri bir çoklu enzim kompleksi haline getirerek kolaylaştırır (110,111).

2.6.2 c-Jun-N-terminal kinaz'ların nörodejeneratif mekanizmalardaki rolü

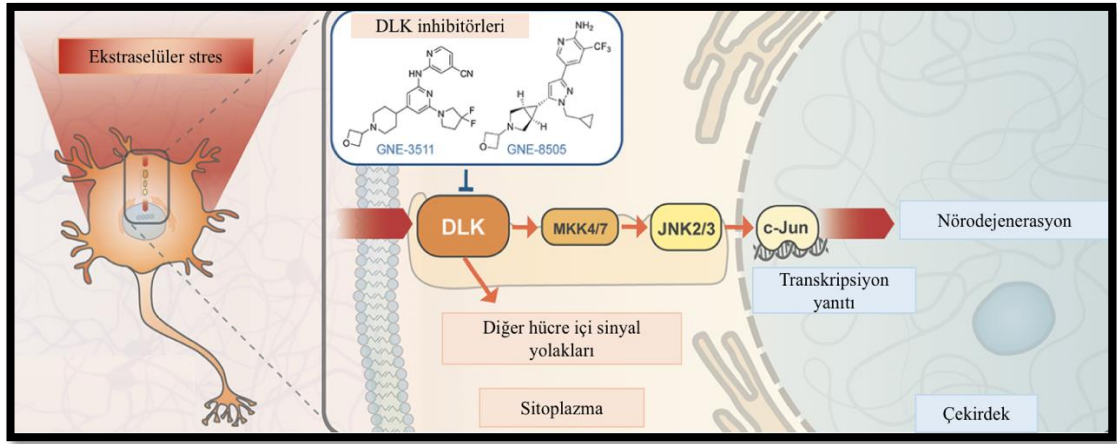
Sinir sisteminde JNK yolağının aktivasyonu, embriyonik gelişim sırasında doğal olarak meydana gelen ya da farklı beyin patolojilerinde ortaya çıkan nöronal hücre ölümü süreçleri ile ilişkilendirilmiştir (112). JNK aktive olduğunda bu aktivasyon

süresinin oluşturulan yanıtın tipini belirlediği öne sürülmüştür. Bu nedenle sürekli JNK aktivitesi apoptoz ile ilişkiliyken, geçici aktivasyon hücre hayatta kalma ve proliferasyon süreçleri ile ilgilidir (113–117). Apoptotik süreci, ölüm reseptörleri aktivasyonu üzerinden gerçekleşen ekstrinsik yolak ya da mitokondriyal süreçlerle intrinsik yolak başlatmaktadır. JNK, proapoptotik genlerin yukarı regülasyonu ile apoptotik sinyalleme gerçekleştirebilir ya da doğrudan anti- ve pro-apoptotik proteinlerin fosforilasyonu ile mitokondriyal aktiviteyi düzenleyerek apoptozun başlatılmasında önemli bir role sahiptir (114,118). Bu bağlamda, JNK'nın hem proapoptotik genlerin düzenlenmesinde rol oynayan p53'ün stabilitesi ve transkripsiyonel aktivitesini hem de DNA hasarı ve oksidatif stres kaynaklı apoptozu düzenleyebildiği bilinmektedir (113–116).

JNK'ler, özellikle eksitotoksikite kaynaklı serebral iskemi, epilepsi, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıklarında önemli rol oynamaktadır (115,116,119). KA ile indüklenen epilepsi modelindeki nöronal kayıp, JNK aktivasyonu ve c-Jun fosforilasyonu tarafından indüklenen nükleer translokasyon aracılığıyla edilebilir (113–115,118). JNK'lerin hücre altı lokalizasyonları ve yukarı yönlü yolları ile ilgili çalışmaların JNK sinyal iletim yollarının daha iyi anlaşılması için gerekliliği öne sürülmüştür (16).

2.6.3 Dual leucine zipper kinase

Dual leucine zipper kinase'ler, ilk olarak 1994 yılında karışık soy kinaz (MAP3K) alt ailesinin bir üyesi olarak karakterize edilen bir serin/treonin protein kinazıdır (97). MAP3K'ler, MAP2K'lerin aktivasyonu ardından JNK'ler ile sonuçlanan bir fosforilasyon kademesinin parçasıdır (120). Nöronal stres veya hasarlanma durumunda DLK dimerleşir ve aktivasyonu, bir dizi fosforilasyonu içeren MKK7 fosforilasyonu ile aktive edilen JNK ile sonuçlanır (121). Aktive edildiğinde, MKK7 çeşitli JNK izoformlarını fosforile edebilir, hücre içindeki transkripsiyon faktörlerini apoptoz veya nöronal rejenerasyon için hazırlar (21) (Şekil 3).



Şekil 3. DLK sinyal yolağı (122)

Uzamış JNK aktivasyonunun apoptoz ile sonuçlanması sebebiyle JNK'nin inhibisyonu, on yıldan fazla bir süredir nöronal koruma için terapötik bir odak olmuştur (21,123). Bununla birlikte, geçici JNK aktivasyonunun hücre sağkalımını desteklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (124). Bu sebeple JNK'nin yukarı yönlü yolağındaki DLK gibi kinazlar JIP'ler ile farklı, benzersiz multiprotein komplekslerine sahip olabilecekleri için daha iyi bir hedef olabileceği düşünülmektedir (18,99,125,126).

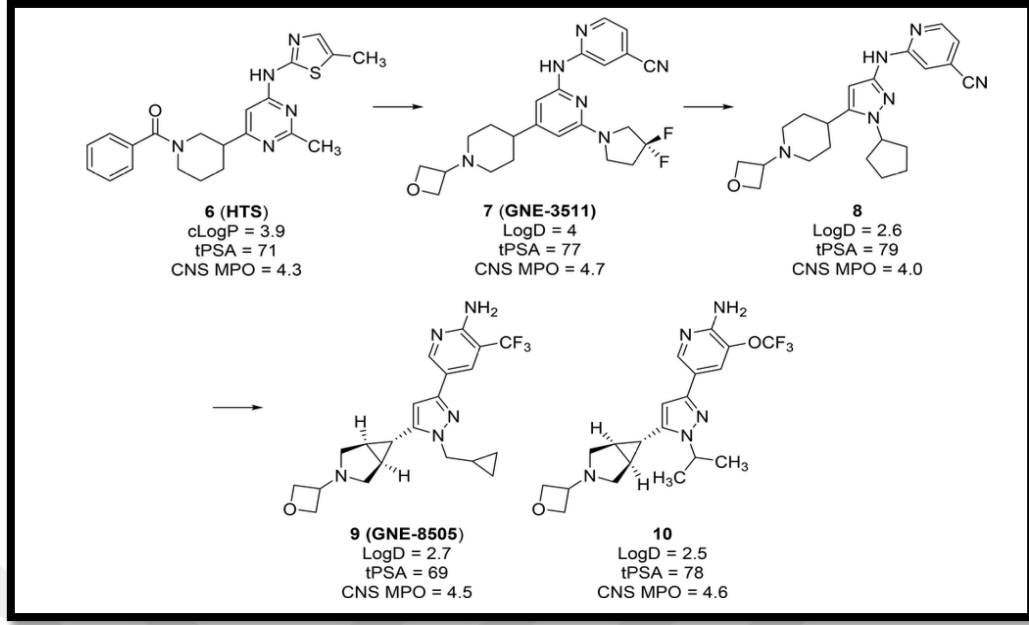
Dual leucine zipper kinase'in hastalıklar üzerinde açıkça tanımlanmış ve onaylanmış bir rolü olmamasına rağmen bazı yeni çalışmalar, DLK'nin nöronal hücre ölümü ve akson dejenerasyonu üzerindeki önemini *in vitro* ve *in vivo* olarak göstermiştir (122). Johns Hopkins Üniversitesi Genentech ekipleri tarafından farelerde yapılan optik sinir hasarı modelinde DLK ekspresyonunun engellenmesinin nöronları nörodejenerasyondan koruduğu görülmüştür (21,127). Bir başka çalışmada DLK sinyalleme kaybının, kainik asit modeli ile indüklenmiş eksitotoksisite kaynaklı nöronal dejenerasyondan hem *in vitro* hem de *in vivo* düzeyinde koruduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda DLK fonksiyonunun aksonal hasar ile sınırlı olmadığı aynı zamanda nöronal hasar yanıtı için de gerekli olduğu anlaşılmıştır. Aynı çalışmanın bir parçası olarak, DLK geni silinmiş farelerin 3 ay sonraki analizlerinde herhangi bir histolojik, elektrofizyolojik anormalliğin görülmediği bildirilmiştir. İnhibisyonu takiben DLK sinyalleme kaybının tolere edilebildiğine işaret eden bu

sonucun daha kapsamlı anlaşılabilmesi için geniş davranış analizlerinin de yapılması gerektiği belirtilmiştir (24).

2.7 Dual Leucine Zipper Kinase İnhibitörleri

Nörodejeneratif hastalıklar için nöronal kaybı yavaşlatabilecek terapötik bir yol bulunmamaktadır. Sonuç olarak, tedavi için çekici bir yaklaşımı temsil ettikleri için dejenerasyonun altında yatan mekanizmaları hedefleyen moleküllere büyük ilgi vardır (128,129). JNK'ler hem akut hem de kronik nörodejeneratif paradigmalardaki rolü nedeniyle ilgi görmüştür (130). Dikkat çekici bir şekilde, nöronlarda JNK1 sinyalinin DLK'dan etkilendiği yönünde veri bulunmamaktadır. Bu da bu yolun JNK2/3 bağımlı stres sinyalinin spesifik olarak düzenlediğini düşündürmektedir (18,24). İnsanlarda bulunan üç JNK geninden JNK3, nöronal dejenerasyondaki fonksiyonel rolü ve MSS'de seçici ekspresyona dayalı olarak özellikle ilgi çekici olmuştur (131–135). DLK'yı hedeflemek, nöronlarda JNK aracılı hasar sinyalini etkilerken, farklı işlevlere sahip olduğu diğer hücre tiplerinde JNK yolu aktivitesini etkilemeyeceği için daha avantajlı olduğu düşünülmüştür (136).

2014 yılında Genetech, yüksek hızda aktivite tarama (HTS) ile JNK/c-Jun sinyal yolundaki (MKK4) homolog karışık soy kinazlar (MLK1/2/3) ve kinazlar üzerinde seçiciliği olan, GNE-3511 adında beyne nüfuz eden inhibitor geliştirildiğini bildirdi (130).



Şekil 4. DLK inhibitörlerinin HTS gelişimi (122)

İnhibitörler ile yapılan çalışmalar, gen nakavtı kullanılan genetik fare çalışmalarını tamamlayan farmakolojik *in vivo* çalışmalarının temelini oluşturur. İnhibitör etkinliği, Alzheimer, Parkinson, optik sinir hasarı ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS) modelleri üzerinde denenerek DLK'nin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü araştırılmaktadır (122).

Öncü inhibitör olarak belirlenen GNE-3511, *in vitro* çalışmalarında nöronları dejenerasyondan koruduğu ve iki farklı hastalık için uygulanan hayvan modelinde doza bağlı aktivitesi gösterilmiştir. Bu sonuçlar, DLK'nın spesifik farmakolojik inhibisyonunun çoklu endikasyonlarda terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir (130).

Bu bağlamda çalışmamızın hipotezini, GNE-3511 ile yapılan DLK inhibisyonunun epileptogenez sürecinde TLE'de olduğu bilinen hipokampal skleroz ve bilişsel hasar üzerinde etkili olması oluşturmaktadır. GNE-3511'in beklenmekte olan bu etkilerini gösterebilmek için davranış deneyleri, protein düzeyi analizleri histopatolojik değerlendirme, oksidan parametrelerin analizleri yapılması hedeflenmiştir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları Temini

Bu çalışmada hayvanlar Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden (DEHAM) temin edildi. Çalışma için 53 adet (20-25 gr) C57BL/6 ırkı farelerin kullanılması planlandı. Çalışmanın yapılabilmesi için Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ACU-HADYEK) 03.02.2021 tarihli 2021/07 sayılı karar ile etik kurul izni alındı. Farelerde yapılan tüm uygulamalar National Institutes of Health (NIH) tarafından hazırlanmış laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım rehberine uygun olarak gerçekleştirildi. Araştırma süreci boyunca fareler 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünde, uygun nem ve sıcaklık (22-25 °C) koşullarının sağlandığı ortamda tutuldu. Farelerin beslenmesinde hazır pellet yem kullanılıp suları kafeslerin üzerinde erişebilecek şekilde yerleştirildi. Haftada 2 gün olacak şekilde kafes temizliği yapıldı.

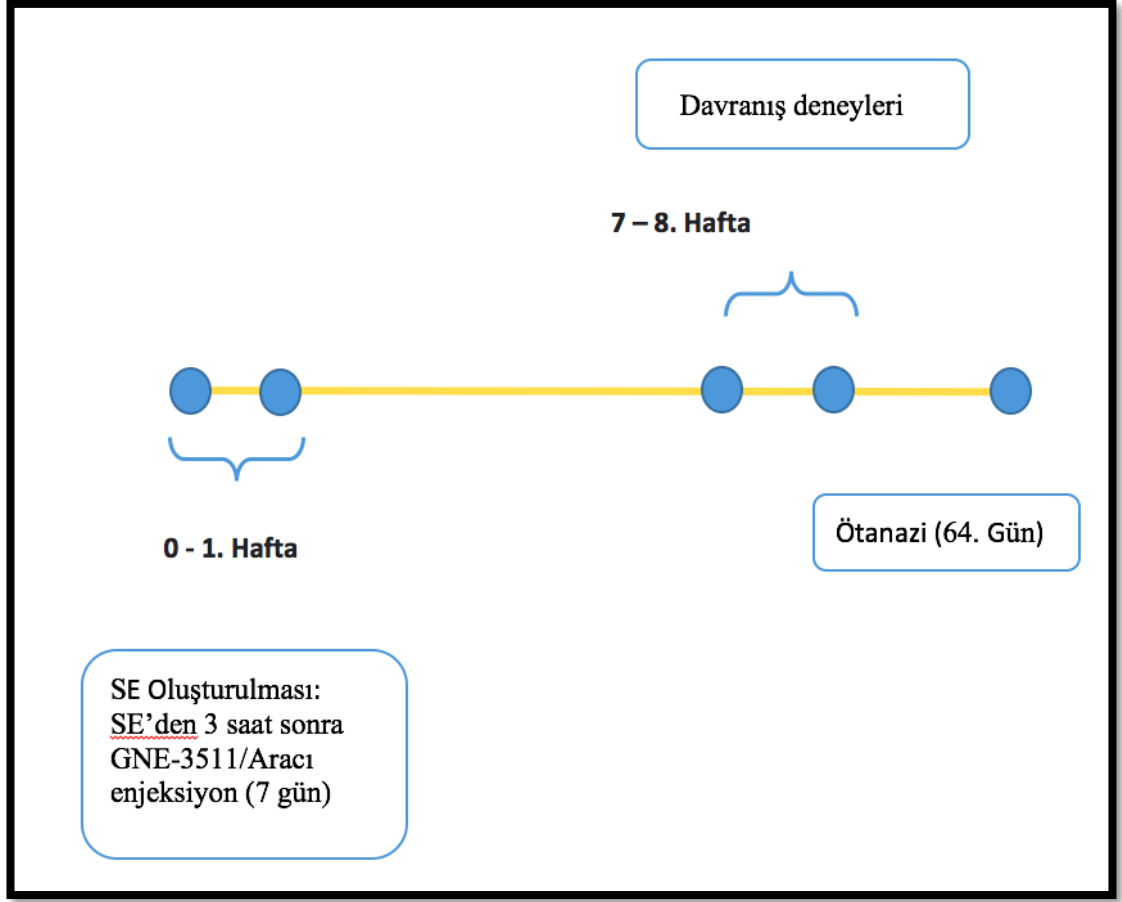
3.1.1 Deney gruplarının oluşturulması

Fareler rastgele 4 gruba ayrıldı. Örneklem büyüklüğünü belirlemek için G Power 3.1 programı kullanıldı. %95 güven sınırında, 0,05 hata payı ile çalışmanın güç oranını %95 elde etmek için grup başına en az 6 hayvan olacak şekilde planlandı. Mortalite yüksekliği sebebiyle toplamda 53 hayvan ile tüm gruplar tamamlandı. Epileptogenezin erken evresini hedef almak amacıyla SE başlangıcından 3 saat sonra tedaviye başlandı. Deney grupları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 1. Deney grupları ve yapılan uygulamalar

Tabloda uygulama yapılan gruplar için ✓, uygulama yapılmayan gruplar için X işareti kullanılmıştır. Aracı: GNE-3511 inhibitörünün çözünmesi için %2 Tween 80, %2 Gliserin ve çift distile su (ddH2O) kullanıldı.

Gruplar	SE indüksiyonu	Tedavi/Aracı (2 defa/7 gün)	Davranış deneyi
Kontrol grubu (n=7)	X	X	✓
SE grubu (n=7)	✓	Sadece aracı uygulandı.	✓
1 mg/kg grubu (n=6)	✓	1 mg/kg GNE-3511 uygulandı.	✓
5 mg/kg grubu (n=8)	✓	5 mg/kg GNE-3511 uygulandı.	✓



Şekil 5. Çalışma protokolü

3.2 Status Epileptikus Oluşturulması

SE oluşturulacak deney grubundaki tüm farelere periferik kolinerjik etkileri önlemek amacıyla pilokarpinden 30 dakika önce 1 mg/kg Skopolamin Methil Bromür (S8502, Sigma Aldrich) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Pilokarpin hidroklorür (P6503, Sigma Aldrich) 100 mg/kg, 8 ml/kg intraperitoneal şekilde, SE başlangıcına kadar tekrarlanmış ve doz araları 20 dakika tutulmuştur. Maksimum 7 doz uygulanmıştır. SE başlangıcından 90 dakika sonra mortaliteyi azaltmak için Diazepam (Diazem) 10 mg/kg intraperitoneal enjeksiyonu yapılmıştır. Nöbet aktivitesinin tayini 1997 yılında Racine ve ark. tarafından geliştirilen Racine skalasının 2020 yılında Arshad ve ark. tarafından farelerde temporal lob epilepsi modeline modifiye ettikleri Racine skalası esas alınarak değerlendirildi (137).

Tablo 2. Modifiye edilen Racine skalası

Derece	Aktivite
1	İmmobilizasyon (donmuş postür)
2	Yüz otomatizmalar (bıyık seğirmeleri, ağız kapatıp açma)
2.5	Sertleşmiş/gerilmiş kuyruk
3	Kısmi vücut klonusu-ön ayak ya da arka ayak
4	Şaha kalkma
5	Tonik-klonik aktivite ile postür kaybı

3.2.1 SE indüksiyonu sonrasında tedavi ve bakım

SE oluşturulduğu gün ve sonrasında tedavi süreci boyunca her gün farelere sıvı ve besin takviyesi yapıldı. Tüm tedaviler sabah 8:00 ve akşam 20:00 saatlerinde olmak üzere 7 gün boyunca günde 2 defa gerçekleştirildi. İlk gün 0.5 ml sonraki günlerde 1 ml olacak şekilde %10'luk dekstroz subkutan olarak uygulanıp hayvanlar başlangıç kilolarına ulaşana kadar Hero baby karışık meyveli mama ve belirlenen sıvı takviyesi ile beslendi.



Resim 1. SE indüksiyonu sonrası besin takviyesi yapılışı

3.3 Bilişsel-Davranışsal Testler

Tüm farelere monitorizasyon süresinin bitiminde Açık alan testi, Yükseltilmiş artı labirent testi ve Morris su tankı testi uygulandı. Tüm testler, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (DEHAM) Ağrı ve Davranış Laboratuvarında gerçekleştirildi. Her test ayrı bir günde uygulanıp testler arasında bir gün ara verildi. Tüm testler tavandaki bir video kamera ile kayıt altına alınıp ve Noldus Ethovision XT sistemi ile bilgisayara aktarılıp analiz edildi. Fareler testten 1 saat önce odaya getirilip ortama alışmaları sağlandı. Test bitimi ardından deneme aralarında fareler test düzeneğinden çıkartılıp test alanı %70 etanol ile temizlendi.

3.3.1 Açık alan testi

Lokomotor ve keşif etkinliğini değerlendirmek için fareler 50x50 cm'lik açık alan labirentinin merkezine bırakılarak 5 dakika izlendi. Alan 16 kareye bölünerek geçtikleri kare sayısı kaydedildi (138).



Resim 2. Açık alan testi uygulama alanı

3.3.2 Yükseltilmiş artı labirent testi

Kaygı düzeylerini değerlendirmek için yerden 50 cm yükseklikte, iki açık (50 x 10 cm) ve iki kapalı (50 x 10 x 40 cm) koldan oluşan artı şeklinde bir labirenttir. Fareler labirentin orta noktasına konularak 5 dakika boyunca izlenip açık ve kapalı kolda geçirdikleri süreler ve kol değişimleri hesaplandı (139).



Resim 3. Yükseltilmiş artı labirent testi uygulama alanı

3.3.3 Morris su tankı testi

Morris su tankı testi öğrenme ve mekânsal bellek performansını değerlendirmek için uygulandı. Test, 5 gün süren bir protokolü içermekte olup su tankının içinde yer alan ve gizlenmiş platformun bulunması daha sonraki süreçte ise hatırlanması esasına dayanmaktadır. Deneyi gerçekleştirmek için çapı 90 cm ve derinliği 50 cm olan tankın içi 24-26°C'lik su ile doldurulup bir kadrana yerleştirilen platform su seviyesinin 1 cm altında tutuldu. 4 gün boyunca her gün iki oturum şeklinde uygulanan testte fareler belirli 4 noktadan 4 kez suya bırakılıp 90 saniye boyunca platformu bulmaları için yüzmelerine izin verildi. Bulamadıkları takdirde fareler platform üzerine yerleştirilip 30 saniye süreyle tutulup çevresel ipuçlarını görmelerine fırsat verildi. Her oturum için platformu bulma süresi kaydedildi. 5. Gün belleği test etmek için yapılan prob denemesinde platform kaldırılarak fareler bir kez 90 saniye yüzdürülüp platformun bulunduğu kadranda bulunma süresi ve platformu çaprazlama sayısı kaydedildi.



Resim 4. Morris su tankı testi uygulama alanı

3.4 Dokuların Toplanması

Davranış deneyinin sonunda tüm gruplarda ötanazi, servikal dislokasyon ile gerçekleştirildi. Ötanazi sonrası farelerin beyinleri çıkartılarak hipokampüsleri izole edildi. Sağ hipokampüs histolojik analizler için %10 tamponlu formaldehit içerisine, sol hipokampüs ise Western Blot analizi için cryo tüplere alınıp ardından sıvı azotta donduruldu. Malondialdehit ve glutatyon düzeyi analizleri için korteks alınıp tüm dokular -80'e kaldırıldı.



Resim 5. Sıvı azotta cryo tüp içerisinde dondurulan hipokampus örnekleri

3.5 Histolojik Analizler

Histolojik takip için ayrılan beynin sağ hemisferleri öncelikle %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonunda fikse edildi. 24 saat tespit edildikten sonra dokular çeşme suyunda yıkandı. Ardından yükselen alkol serilerinde sırasıyla %70, %90, %96 ve %100 dehidratasyon işlemi yapıldı. Daha sonra ksilen içinde saydamlaştırma yapıldı. Bir sonraki adımda önce yumuşak parafin (P3558- 1kg Sigma Aldrich, Paraplast Embedding Media, U.S.A) sonrasında sert parafinli bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitlerde hipokampus dokusunun histolojik yapısını göstermek için hematoksilin&eoizin boyası (H&E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar, ışık mikroskopunda (Zeiss) incelenip fotoğraflanarak histolojik değerlendirmelere alındı.

3.5.1 Kesitlerin alınması ve boyanması

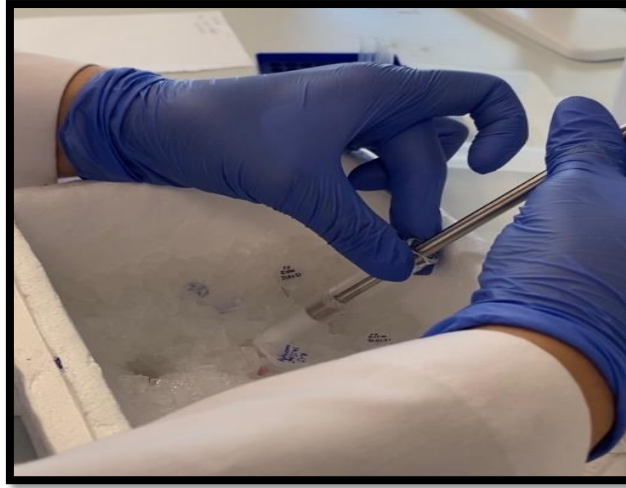
Her bloktan 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler etüvde 1 saat kurumaya bırakıldı. ksilende tutularak deparafinize edilerek parafini giderildi. Alçalan alkol serilerinden (100⁰, 96⁰ 80⁰, 70⁰) tutularak rehidrate edildi. Çeşme suyu altında 5

dakika bekletildikten sonra hematoksilene alınarak 15 dakika bekletildi. Hematoksilene boyamasından sonra 5 dakika çeşme suyu altında bekletildi. Eozin boyasında 2 dakika bekletildikten sonra alındı. Eozin'den sonra 5 dakika çeşme suyu altında bekletildi. Kesitler yükselen alkol serilerinden (70⁰, 90⁰, 96⁰, 100⁰, 100⁰) batırılıp çıkarılarak dehidrate edildi ve 40 dakika ksilen'de (Merck, Almanya) bırakıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

3.6 Biyokimyasal analizler

3.6.1 c-Jun protein düzeyi ölçümü

Hedef proteinin varlığını göstermek amacıyla Western blot yöntemi kullanıldı. Hipokampus dokularınınun homojenizasyonu, tartım doğrultusunda gerekli RIPA tampon çözeltisi içerisinde fenil metil sülfonil florid (PMSF) ve proteaz inhibitörü (PI) eklenerek yapıldı. 1 ml RIPA çözeltisi için 40 µl 25X PI, 5 µl 100 mM PMSF eklemesi yapıldı.



Resim 6. Hipokampus örneklerinin homojenizasyonu

Homojenize edilen örnekler buz içerisinde 1 defa 1 saniye süre ile sonikasyon işlemi yapıldı. Ardından tüm örnekler 14.000 g, +4 C° ve 15 dakika ayarında santrifüj edildi. Ayrılan supernatantlar ile 1500 µg/mL, 1200 µg/mL, 600 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL ve 100 µg/mL Bovine Serum Albümin (BSA) standartları Bradford

yöntemi ile ölçüm için hazırlandı. Örnekler 1:5 dilüe edilerek her kuyucukta 10 µl olacak şekilde 96-well-plate içerisinde Gen5 uygulaması kullanılarak spektrofotometre cihazında (BioTek) ölçümleri yapıldı. Dilüe edilen örnekler içerisinde 32 µl apirojen su, 8 µl örnek ile hazırlanıp toplamda 40 µl içerisinde 30 µl 3 kuyucuğa 10 µl olacak şekilde bölündü. BSA standartları 190 µl ve 10 µl apirojen su eklenerek yüklendi. Proteinler, Bradford hesaplamasından sonra 40 µg olacak şekilde içerisinde 2,4 µl 5X Loading dye ve 12 µl'ye tamamlayacak kadar apirojen su eklenip ısı bloğu Witeg cihazında 5 dakika 95 C°'de kaynatıldı.

Tablo 3. 12% Poliakrilamid yürütme jeli (1x)

30% Akrilamid	2 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25 ml
50% Gliserol	375 µl
ddH ₂ O	1375 µl
10% Amonyum persülfat	50 µl
Tetrametiletildiamin	5 µl
Total	5 ml

Tablo 4. 4% Poliakrilamid yükleme jeli (1x)

30% Akrilamid	325 µl
1 M Tris (pH 6.8)	625 µl
20% Sodyum dodesil sülfat	12,5 µl
ddH ₂ O	1512 µl
10% Amonyum persülfat	12,5 µl
Tetrametiletildiamin	5 µl
Total	2..5 ml

Ardından her kuyucukta 10 µl olacak şekilde %12 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (Tablo 4,5) ile yürütülüp daha sonra jel üzerindeki proteinler 25 V- 0.5 A ayarı ve 40 dakika transfer süresi ile nitroselüloz membrana aktarıldı.



Resim 7. Trans-Blot Turbo transfer cihazı

Transferi gerçekleşen membranlar, %5 oranında içerisinde %0.1 Tween 20 eklenen fosfat tamponlu salin (PBST) ve yağsız süt tozu eklenmiş solüsyon ile 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. Ardından 18 saat +4°C’de primer antikor ile inkübasyona bırakıldı. c-Jun primer antikor (60A8, Rabbit mAb, Cell Signaling Technology) için dilüsyon oranı 1:4000, sekonder antikor (anti-Rabbit) 1:2000 olacak şekilde uygulandı. Sekonder antikor öncesi membran 3 defa toplamda 30 dakika olacak şekilde PBST ile yıkandı. Sekonder antikor belirlenen dilüsyon oranı ile %1’lik süt içerisinde hazırlanıp 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor sonrası yıkamalar 2 defa PBST 1 defa fosfat tamponlu salin olacak şekilde yapıp 1:1 oranında kemoluminesans reaktifi (ECL) ile 4 dakika bekletildikten sonra Chemidoc cihazında Image Lab 5.0 programında görüntü alındı. Analiz için elde edilen bantların dansiteleri ölçüldü. İnternal kontrol olarak monoklonal anti-GAPDH antikor kullanıldı (140).

3.6.2 Malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyi tayini

MDA düzeyinin ve glutatyon miktarının ölçüldüğü bu yöntemde, beyin dokusundan alınan örneklerin tartımı yapıldıktan sonra 9 katına denk gelen miktarda %10 'luk dH₂O ile hazırlanan Triklorik asit (Merck, MW:163,39 Art.810) solüsyonu ile homojenizasyonu gerçekleştirildi. Homojenize edilen örnekler 9.000 rpm ve 4 C°'de 15 dakika süreyle santrifüj (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21R) edildi. Elde edilen süpernatantlar MDA ve GSH ölçümleri için bölündü. MDA ölçümü için 1:1 oranında Tiyobarbitürik asit (TBA: Sigma Aldrich, T-5500 MW: 144,1) ve süpernatant birleştirilip 15 dakika boyunca kaynatıldı.



Resim 8. MDA ölçümü için kaynatma işlemi

Kaynatma sonrasında 535 nanometrede UV-2600 spektrofotometre cihazında UVProbe programında okutuldu. $1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak lipid peroksidasyon düzeyi MDA cinsinden spektrofotometrik ölçümle ifade edildi. Glutatyon ölçümlerinde, santrifüj sonrası 250 μl süpernatant 1000 μl disodium fosfat ve 125 μl modifiye Ellman yöntemiyle hazırlanan solüsyon ile 10 dakika oda ısısında alüminyum folyo ile sarılıp bekletildi. Ellman yöntemi için 40 mg 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) (DTNB: Sigma, D-8130 MW: 396,4), 100 ml %1 Sodyum Nitrat

oranları kullanıldı. GSH miktarı, 412 nanometrede UV-2600 spektrofotometre cihazında UVProbe programında spektrofotometrik olarak belirlendi (141).

3.6.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için Sigma Plot 12.5 programı kullanıldı. Tüm veriler ortalama±standart hata şeklinde ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analiz (ANOVA) sonrası Tukey-Kramer çoklu testi ile değerlendirme yapıldı. İkili karşılaştırmalar için Student t-test yapıldı. P değerinin 0,05 ve 0,05'ten küçük olması ($p \leq 0,05$) anlamlı kabul edildi.

4 BULGULAR

Çalışmamızda, temporal lob epilepsisi modeli olan pilokarpin modeli uygulanarak 1 mg/kg ve 5 mg/kg olmak üzere iki farklı GNE-3511 dozu ile tedavi edilen C57BL/6 farelerde epileptogenez sürecinde; spontan reküran nöbet, bilişsel-davranışsal, biyokimyasal ve histolojik açıdan etkileri araştırılmış olup bu doğrultuda elde edilen bulgular aşağıda gösterilmiştir. G power analizi sonucu grup başına en az 6 hayvan sayısı hedeflenmiştir. Ancak mortalitenin yüksek olması sebebiyle 53 hayvan ile deneye başlanıp hedeflenen grup başı hayvan sayısına kalan 28 hayvan ile erişilmiştir.

4.1 Bilişsel-Davranışsal Testler

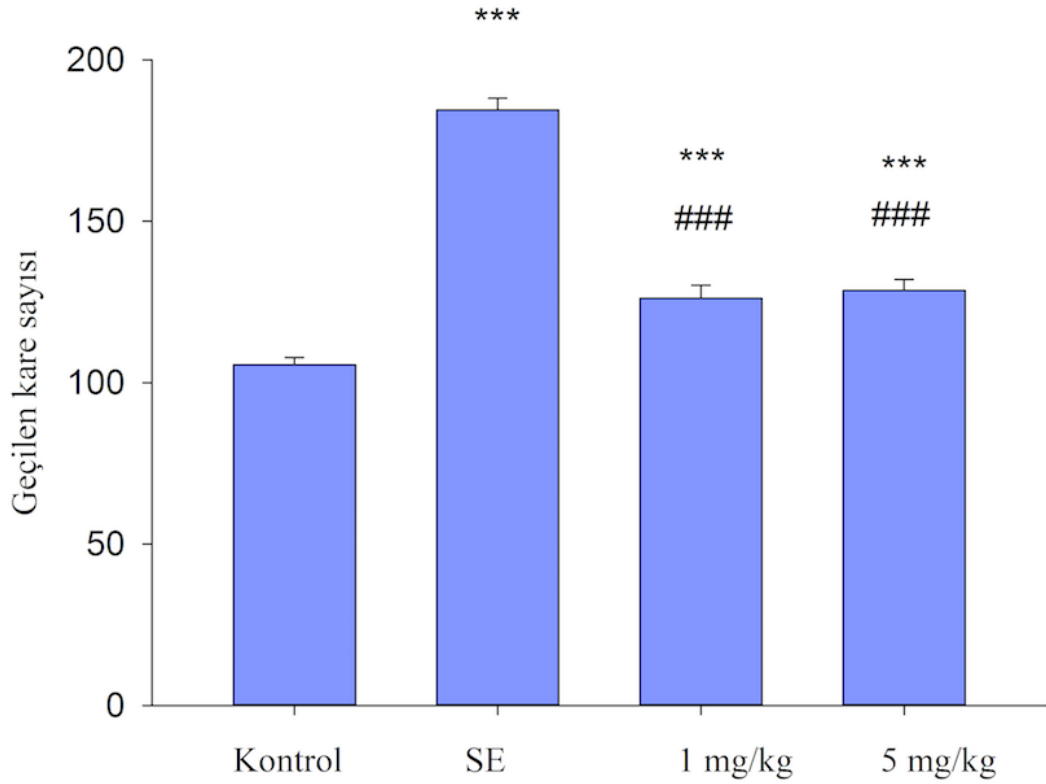
4.1.1 Açık alan testi

Grupların açık alan testi geçilen kare sayısı ortalamaları ve standart hataları Tablo 6'da gösterilmektedir. Grupların elde edilen verileri karşılaştırıldığında; Kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). SE grubu değerinin de tedavi grupları olan 1 mg/kg grubuna ($p<0.001$) ve 5 mg/kg grubuna ($p<0.001$) kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol grubu değerine göre tedavi grupları olan 1 mg/kg grubu ve 5 mg/kg grubu değerleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Tedavi grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 6).

Tablo 5. Grupların açık alan testi ortalamaları ve standart hataları

*** $p<0.001$ kontrol grubuna göre anlamlılık, ### $p<0.001$, ### $p<0.001$ SE grubuna göre anlamlılık, &&& $p<0.001$ kontrol grubuna göre anlamlılık

Açık Alan Testi	Kontrol grubu Ort± SEM	SE grubu Ort± SEM	1 mg/kg grubu Ort± SEM	5 mg/kg grubu Ort± SEM
Geçilen kare sayısı	105,57 ±2,66	185,50±3,62***	126,20±4,02### ***	128,57±3,42###***



Şekil 6. Geçilen kare sayısı

***p<0.001 Kontrol grubuna göre, ###p<0.001 SE grubuna göre anlamlılık

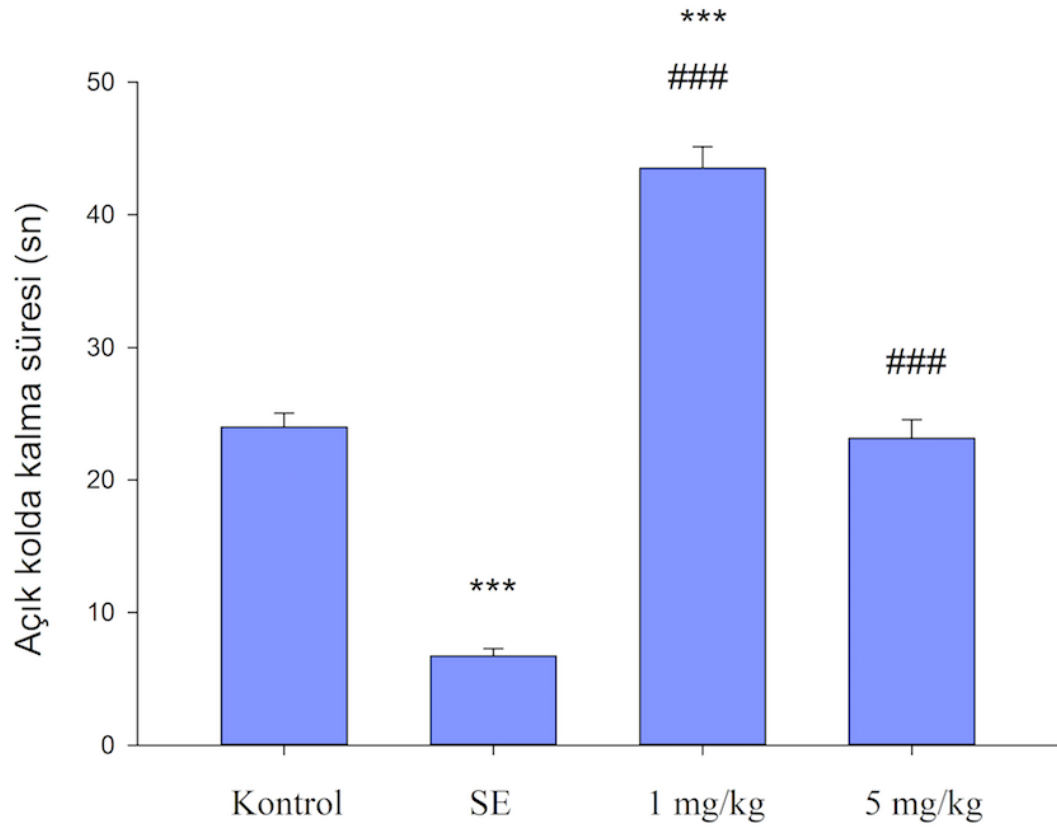
4.1.2 Yükseltilmiş artı labirent testi

Grupların yükseltilmiş artı labirent testinde bakılan parametreler ve standart hataları Tablo 7’de gösterilmektedir. Grupların açık kolda kalma süreleri (Şekil 7) karşılaştırıldığında; Kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda düşük bulunmuştur ($p<0.001$). SE grubu değerine göre tedavi grubu olan 1 mg/kg grubu ve 5 mg/kg grubu değeri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kontrol grubu değerine göre tedavi grupları olan 1 mg/kg grubu değeri ($p<0.001$) anlamlı olarak yüksek bulunurken 5 mg/kg grubu değeri anlamlı fark saptanmamıştır. Tedavi grupları karşılaştırıldığında 1 mg/kg grubu değeri 5 mg/kg grubu değerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Grupların anksiyete skorları (Şekil 8) karşılaştırıldığında; Kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda düşük bulunmuştur ($p<0.001$). SE grubu değerine göre tedavi grubu olan 1 mg/kg grubu ve 5 mg/kg grubu değeri anlamlı olarak yüksek ($p<0.001$) bulunmuştur. Kontrol grubu değerine göre tedavi grupları olan 1 mg/kg grubu değeri ($p<0.001$) anlamlı olarak yüksek bulunurken 5 mg/kg grubu değeri anlamlı fark saptanmamıştır. Tedavi grupları karşılaştırıldığında 1 mg/kg grubu değeri 5 mg/kg grubu değerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

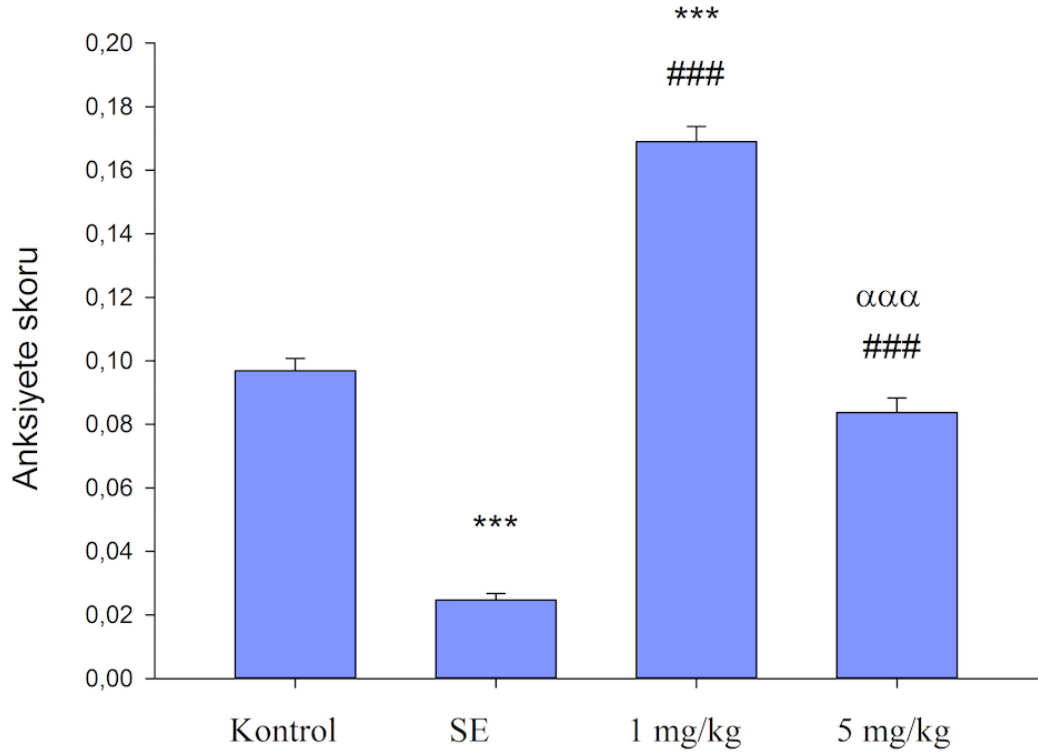
Tablo 6. Grupların yükseltilmiş artı labirent testi ortalamaları ve standart hataları
 $***p<0.001$ kontrol grubuna göre anlamlılık, $###p<0.001$ SE grubuna göre anlamlılık, $###p<0.001$ kontrol grubuna göre anlamlılık

Yükseltilmiş artı labirent testi	Kontrol grubu Ort± SEM	SE grubu Ort± SEM	1 mg/kg grubu Ort± SEM	5 mg/kg grubu Ort± SEM
Açık kolda kalma süresi (sn)	24,00±1,04	6,71±0,56 ^{***}	43,50±1,62 ^{###, ***}	23,14±1,42 ^{###}
Anksiyete skoru (Açık Kolda Geçirilen Süre/ Açık Kolda Geçirilen Süre+Kapalı Kolda Geçirilen Süre)	0,0969±0,00389	0,0247±0,00205 ^{***}	0,169±0,00470 ^{###, ***}	0,0837±0,00454 ^{###, ***, ααα}



Şekil 7. Açık kolda kalma süresi (sn)

***p<0.001 Kontrol grubuna göre anlamlılık, ###p<0.001 SE grubuna göre anlamlılık,



Şekil 8. Anksiyete skoru

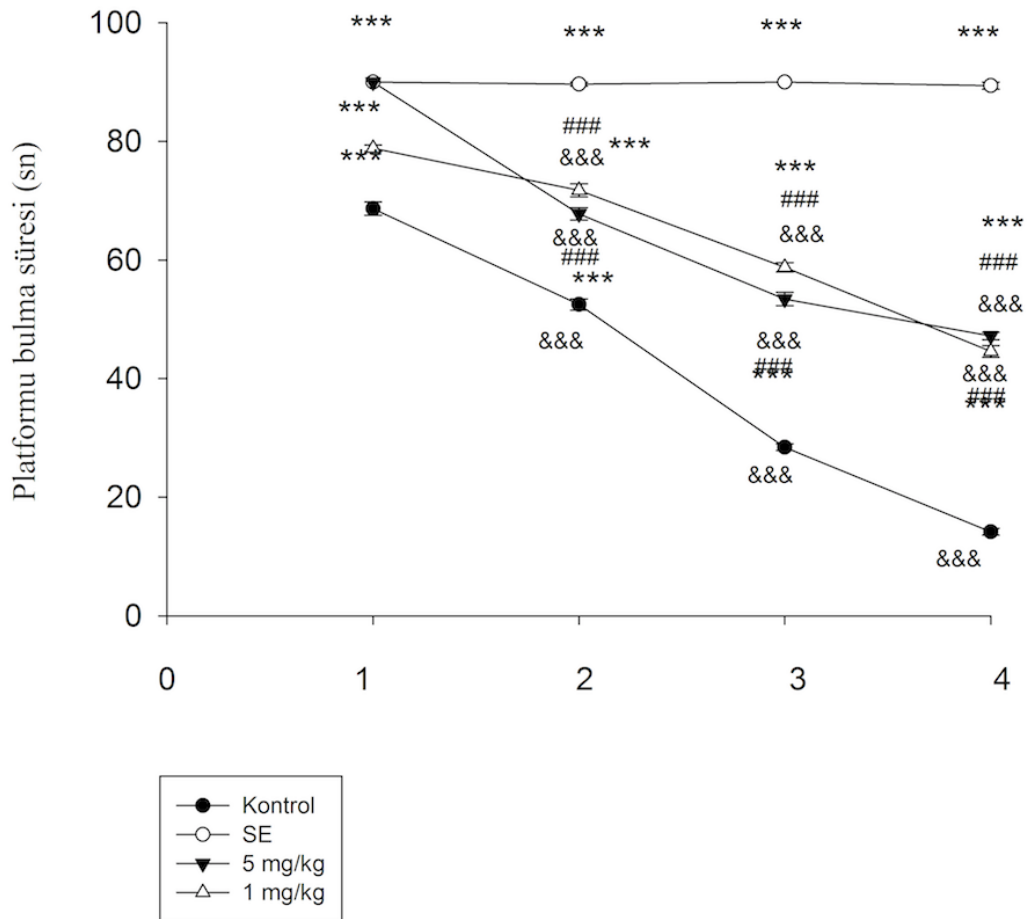
*** $p < 0.001$ Kontrol grubuna göre anlamlılık, ### $p < 0.001$ SE grubuna göre anlamlılık, ααα $p < 0.001$ 1 mg/kg grubuna göre

4.1.3 Morris su tankı testi

Birinci gün değerlerine göre Kontrol grubu, 1mg/kg grubu ve 5 mg/kg grubu değerleri anlamlı oranda kısalmıştır ($p < 0.001$). SE grubu değerleri arasında ise anlamlı fark bulunmamıştır. Günler bazında karşılaştırmalar yapıldığında; Kontrol grubu değerleri ile SE grubu değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$). SE grubu değerleri ile 1 mg/kg grubu ile 5 mg/kg grubu değerleri karşılaştırıldığında ilaç gruplarının platforma ulaşma sürelerinin anlamlı oranda daha kısa olduğu görülmüştür ($p < 0.001$). İlaç gruplarının bu değerleri Kontrol grubu değerlerine göre ise yüksek saptanmıştır ($p < 0.001$). İlaç grupları arasında da anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 7. Morris su tankı testi günlük ortalamalar ve standart hataları
 &&& p<0.001 1. Güne grububa göre, ###p<0.001 SE grububa göre, ***p<0.001 Kontrol grububa göre

Morris Su Tankı Testi Günlük Öğrenme	Kontrol grubu Ort± SEM	SE grubu Ort± SEM	1 mg/kg grubu Ort± SEM	5 mg/kg grubu Ort± SEM
1. gün	68,667±1,123	90±0***	90±0***	78,857±0,512 ***
2. gün	52,5±0,957&&&	89,656±0,344***	67,775±1,05 &&&,###,***	71,768±1,107 &&&,###,***
3. gün	28,417±0,542&&&	90±0***	53,425±1,108 &&&,###,***	58,786±0,794 &&&,###,***
4. gün	14,167±0,571&&&	89,406±0,594***	47,2±0,615 &&&,###,***	44,589±1,007 &&&,###,***



Şekil 9. Günlere göre platform bulma süresi (sn)
 &&& p<0.001 1. Güne grubuna göre, ###p<0.001 SE grububa göre, ***p<0.001 Kontrol grubuna göre

Prob fazı hedef kadranda geçirilen süre değerleri analiz edildiğinde; kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda düşük bulunmuştur ($p<0.001$). SE grubu değerine göre ise 1 mg/kg grubu değeri arasında anlamlı fark yoktur. Ancak 5 mg/kg grubu değeri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kontrol grubu ile ilaç verilen gruplar ve ilaç grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

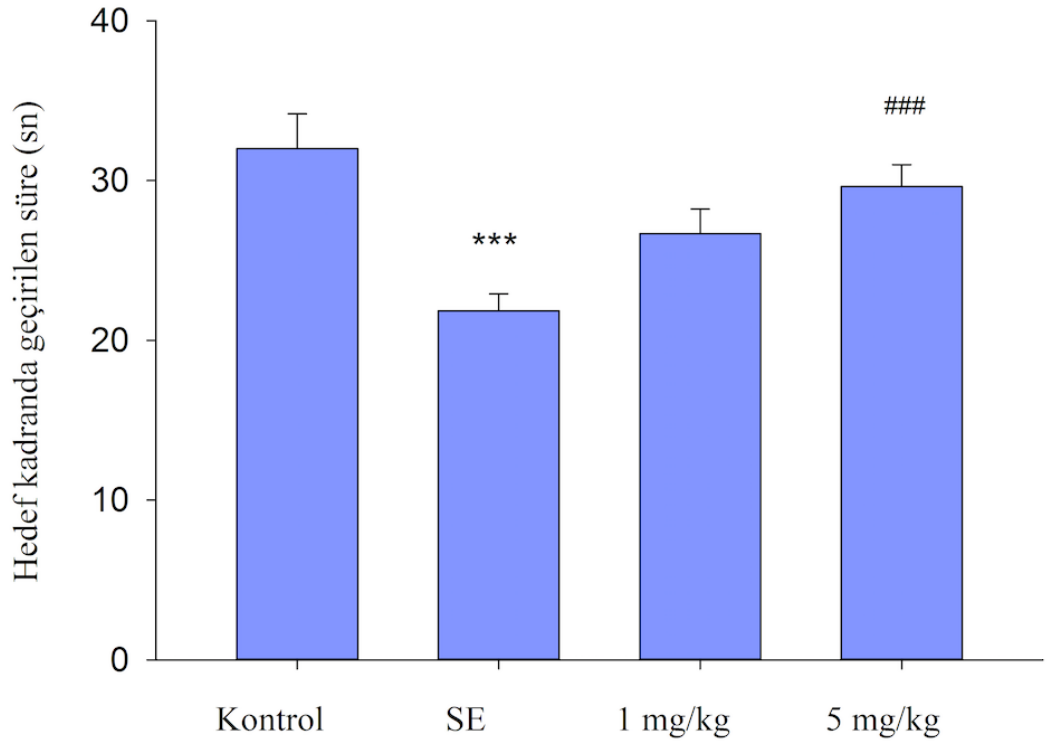
Prob fazı platformun bulunduğu alanı çaprazlama sayıları analiz edildiğinde; kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda düşük bulunmuştur ($p<0.001$). SE grubu değerine göre ise 1 mg/kg grubu değeri ($p<0.05$) ve 5 mg/kg grubu değeri ($p<0.001$) anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu değerine göre 1 mg/kg grubu değeri ve 5 mg/kg grubu değeri anlamlı oranda düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca 5 mg/kg değeri 1 mg/kg değerine göre yüksek saptanmıştır ($p<0.001$).

Prob fazı yzlen mesafeler analiz edildiğinde; Kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri ($p<0.05$), 1 mg/kg grubu değeri ($p<0.05$) ve 5 mg/kg grubu değeri ($p<0.01$) anlamlı oranda düşük bulunmuştur. Gruplar arası diğer karşılaştırmalarda bir anlamlılık saptanamamıştır.

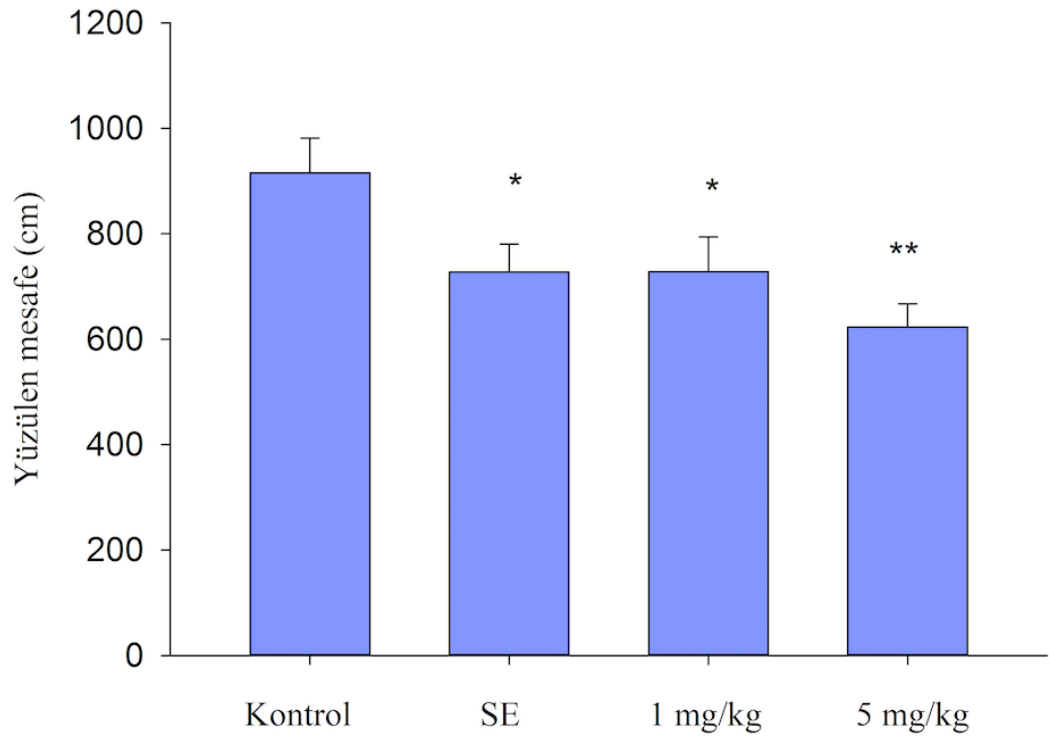
Tablo 8. Morris su tankı testi prob deneme ortalamalar ve standart hataları

* $p<0.05$ Kontrol grubuna göre, ** $p<0.01$ Kontrol grubuna göre, *** $p<0.001$ Kontrol grubuna göre, # $p<0.05$ SE grubuna göre, ### $p<0.001$ SE grubuna göre, ^{aaa} $p<0.001$ 1 mg/kg grubuna göre

Morris Su Tankı Testi Prob	Kontrol grubu Ort± SEM	SE grubu Ort± SEM	1 mg/kg grubu Ort± SEM	5 mg/kg grubu Ort± SEM
Hedef kadranda geçirilen süre (sn)	32,00±2,185	21,85±1,058***	26,68±1,541	29,62±1,371###
Platform aprazlama sayısı	4,42±0,202	0,57±0,202***	1,20±0,2***#	2,12±0,227***###, ^{aaa}
Yüzülen mesafe (cm)	915,75± 65,506	727,62±53,27*	728,42±65,612*	623,42±44,149**

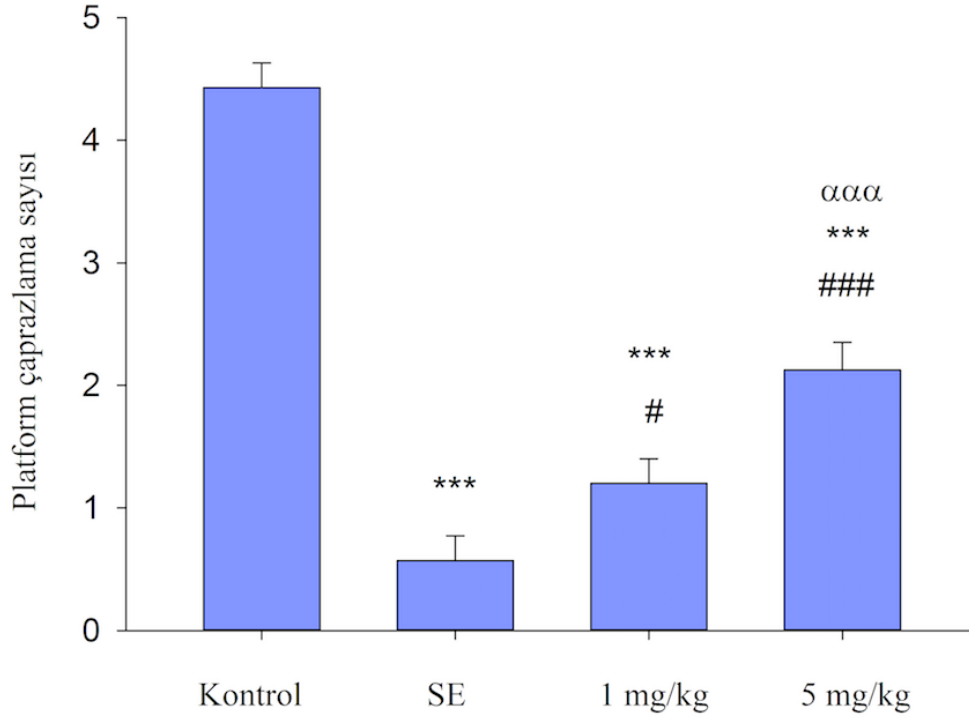


Şekil 10. Hedef kadranda geçirilen süre (sn)
*** $p < 0.001$ Kontrol grubuna göre, ### $p < 0.001$ SE grubuna göre



Şekil 11. Yüzülen mesafe (cm)

* $p < 0.05$ Kontrol grubuna göre, ** $p < 0.01$ Kontrol grubuna göre



Şekil 12. Platform çaprazlama sayısı

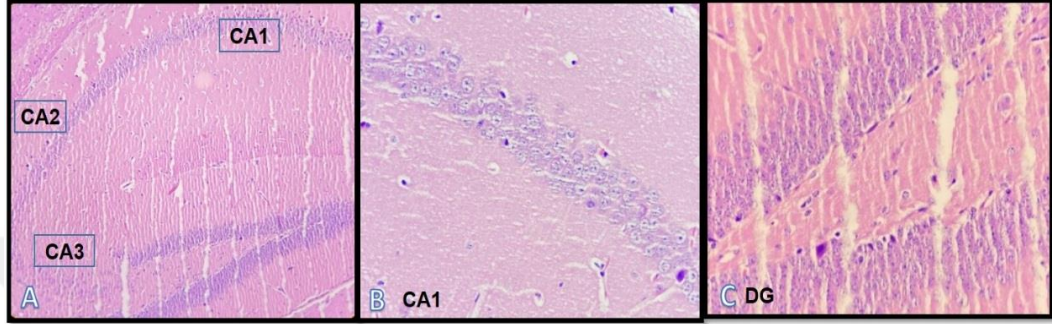
*** $p < 0.001$ Kontrol grubuna göre, # $p < 0.05$ SE grubuna göre, ### $p < 0.001$ SE grubuna göre, ^{aaa} $p < 0.001$ 1 mg/kg grubuna göre

4.2 Histoloji Analizi

Histolojik inceleme sonucunda grupların dejenerasyon nöron sayıları karşılaştırıldığında; Kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). SE grubu değerine göre tedavi grubu olan 1 mg/kg grubu ve 5 mg/kg grubu değeri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.001$). Kontrol grubu değerine göre tedavi grupları olan 1 mg/kg grubu değeri ($p < 0.05$) 5 mg/kg grubu değeri ($p < 0.001$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Tedavi grupları karşılaştırıldığında 1 mg/kg grubu değeri 5 mg/kg grubu değerine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.01$).

Kontrol grubuna ait bulgular: Kontrol gruplarına ait kesitlerde hipokampusun genel yapısı ve nöronlar normal görünümdeydi. Işık mikroskobu ile yapılan

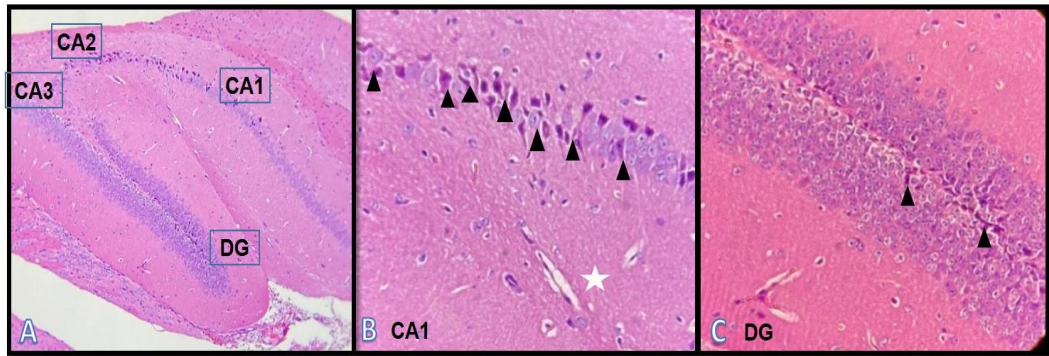
incelemede piramidal nöronlar, stratum pyramidalisin CA1, CA2, CA3 ve dentat girus (DG) bölgeleri ayırt edildi (Şekil 15A). CA1 bölgesinde hücrelerin çekirdekleri ökromatik belirgin çekirdekçikli ve nöronlar aralarında daha küçük çekirdekli birkaç glia hücresi saptandı (Şekil 15B). DG bölgesinin normal histolojik görünümünü koruduğu görüldü (Şekil 15C).



Şekil 13. Kontrol grubu hipokampus kesiti ışık mikroskopi görüntüleri

(Kontrol grubuna ait Hippocampus kesitinde CA1, CA2, CA3 ve DG alanlarının ışık mikroskopisi görüntüleri (A,B,ve C). CA1-CA2-CA3: hippocampus stratum piramidal tabakasını, DG'yi göstermektedir.)

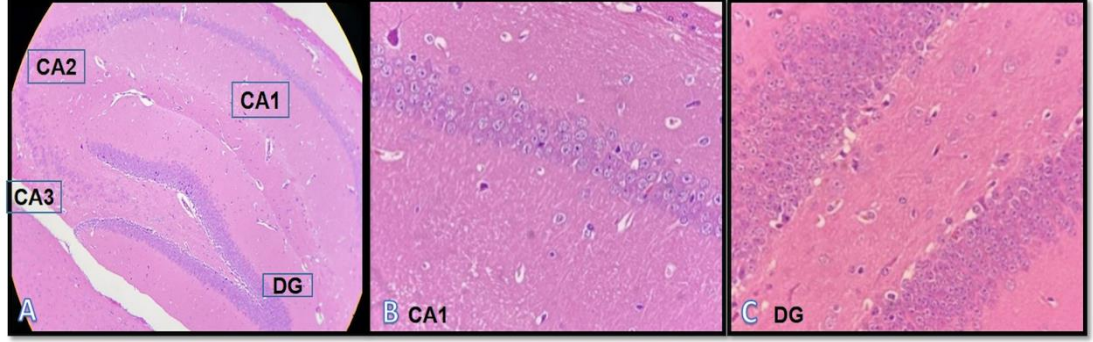
SE grubuna ait bulgular: SE gruplarına ait kesitlerde SE uygulanan grupta CA1, CA2, CA3 ve DG bölgeleri ayırt edildi (Şekil 16A). CA1 bölgesinde perikaryonları sınırlı olmayan bazal dendritleri belirgin piramidal nöronların sitoplazması büzülmüş dejenere nöronlar saptandı (Şekil 16B).



Şekil 14. SE grubu hipokampus kesiti ışık mikroskopi görüntüleri

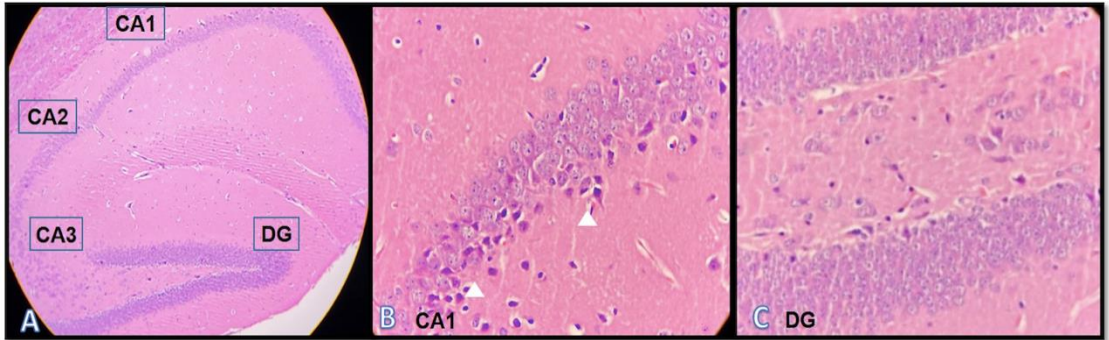
(SE uygulanan gruba ait kesitlerde CA1 bölgesinde bazofilik sitoplazmalı piramidal nöronlar aralarında çekirdekleri kondanse sitoplazma büzülmüş dejenere nöronlar (siyah ok başı) perivasküler ödem (beyaz yıldız) gözlemlendi (B). DG bölgesinde piknotik nöronlar (siyah ok başı) görüldü (C).)

1 mg/kg grubuna ait bulgular: 1 mg/kg grubuna ait kesitlerde CA1, CA2, CA3 bölgeleri ve DG Kontrol grubuna benzerdi (şekil 15A). Piramidal hücrelerin küresel şeklindeki çekirdekleri normal görünümüne sahipti. DG bölgesinin normal histolojik görünümünü koruduğu görüldü (Şekil 17C).

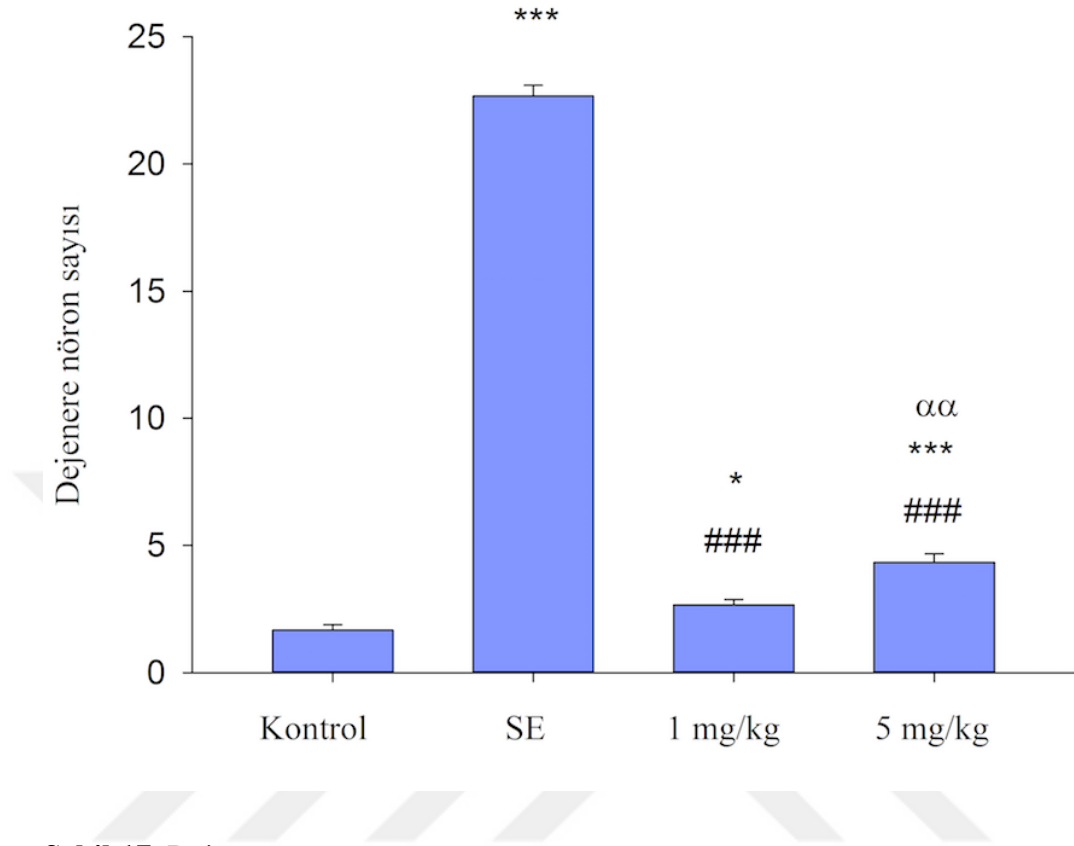


Şekil 15. 1 mg/kg grubu hipokampus kesiti ışık mikroskopi görüntüleri (1 mg/kg grubuna ait hipokampus kesitinde CA1, CA2, CA3 ve DG alanlarının ışık mikroskobik görüntüleri (A,B,ve C).)

5 mg/kg grubuna ait bulgular: 5 mg/kg grubuna ait kesitlerde nöronların hacmi ve şekli normal morfolojide olduğu görüldü (şekil 16A). DG bölgesinin histolojisi Kontrol grubuna benzer olduğu görüldü (şekil 16C).



Şekil 16. 5 mg/kg grubu hipokampus kesiti ışık mikroskopi görüntüleri (5 mg/kg grubuna ait hipokampusun CA1 bölgesinde ökratik çekirdek, belirgin çekirdekçik ve seyrek şekilde dejeneren nöron (beyaz ok başı) izlendi.)



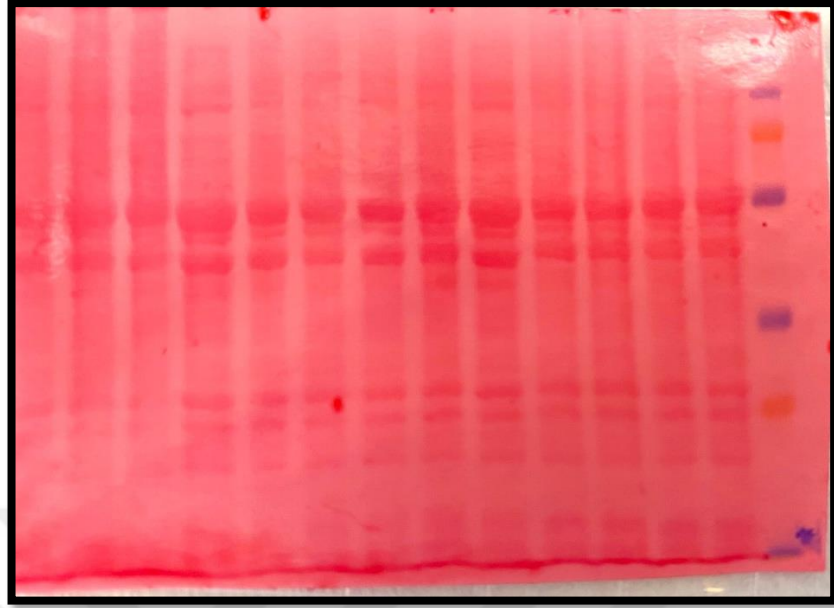
Şekil 17. Dejenere nöron sayısı

***p<0.001 Kontrol grubuna göre anlamlılık, ###p<0,001 SE grubuna göre anlamlılık, ααp<0.01 1 mg/kg tedavi grubuna göre anlamlılık

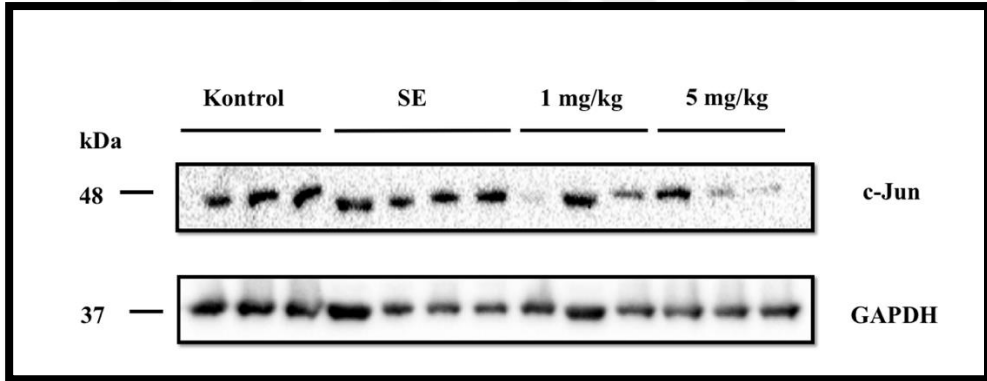
4.3 Biyokimyasal Analizler

4.3.1 c-Jun protein düzeyi ölçümü

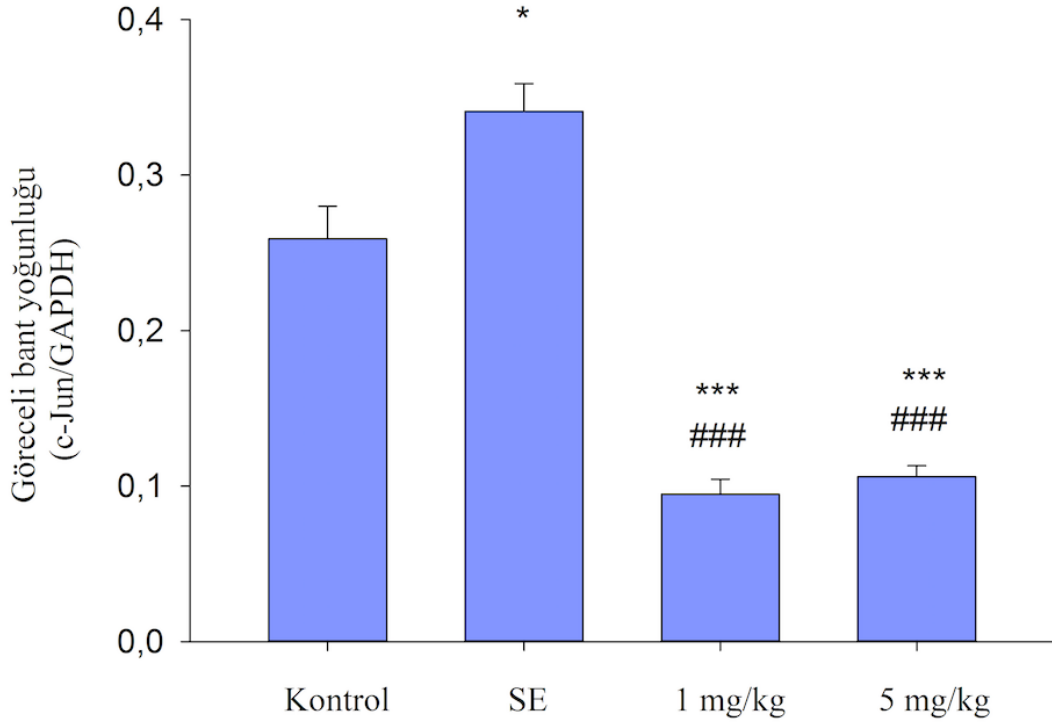
c-Jun protein düzeyi ölçümü için Western Blot yöntemi uygulanmıştır. Grupların c-Jun düzeyleri (Şekil 21) karşılaştırıldığında; Kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). SE grubu değerine göre tedavi grubu olan 1 mg/kg grubu ve 5 mg/kg grubu değeri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Kontrol grubu değerine göre tedavi grupları olan 1 mg/kg grubu değeri ve 5 mg/kg grubu değeri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Tedavi grupları karşılaştırıldığında 1 mg/kg grubu değeri ile 5 mg/kg grubu değeri arasında anlamlı fark bulunmamıştır.



Resim 9. Ponceau s boyası ile membran görüntüsü



Şekil 18. c-Jun ve GAPDH bant görüntüleri



Şekil 19. Göreceli bant yoğunluğu (c-Jun/GAPDH)

* $p < 0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılık, *** $p < 0.001$ kontrol grubuna göre anlamlılık
$p < 0.001$ SE grubuna göre anlamlılık,

4.3.2 MDA ve GSH düzeyi tayini

Grupların Korteks dokusundan ölçümleri yapılan MDA düzeyleri (Tablo 9) karşılaştırıldığında; Kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). SE grubu değerine göre tedavi grubu olan 1 mg/kg grubu değeri ($p < 0,001$) ve 5 mg/kg grubu değeri ($p < 0.05$) anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Kontrol grubu değerine göre tedavi grubu olan 1 mg/kg grubu değeri arasında fark bulunmazken 5 mg/kg grubu değeri ($p < 0.05$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Tedavi grupları karşılaştırıldığında 1 mg/kg grubu değeri ile 5 mg/kg grubu değeri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$, Şekil 20).

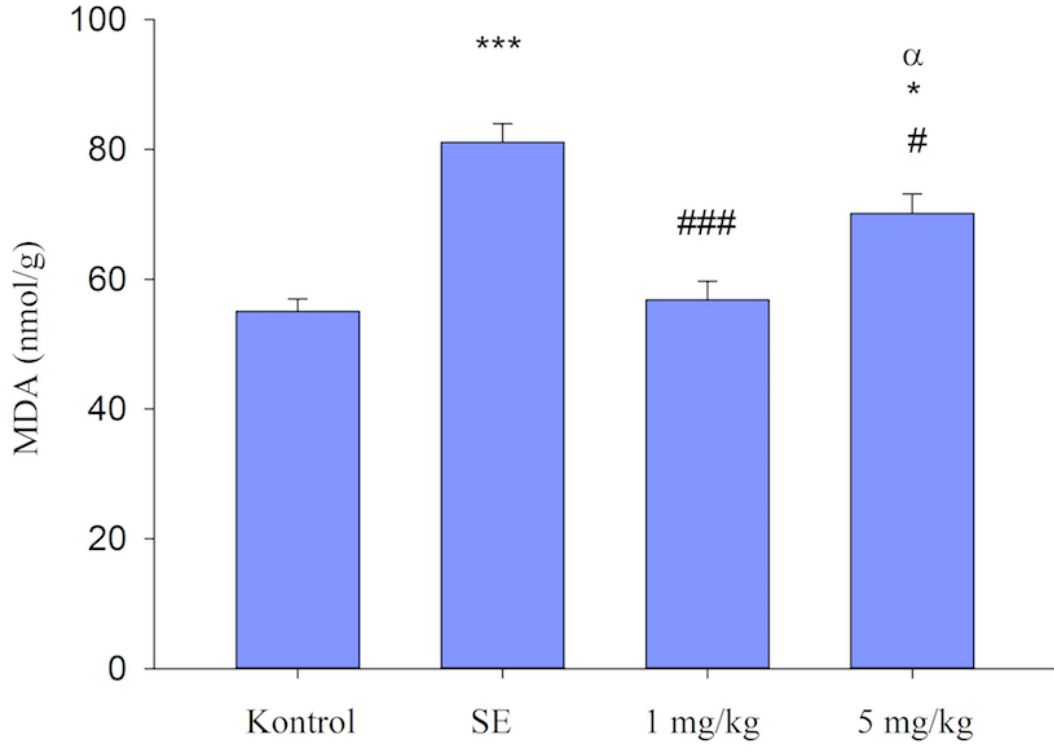
Grupların Korteks dokusundan ölçümleri yapılan GSH düzeyleri (Tablo 9) karşılaştırıldığında; Kontrol grubu değerine göre SE grubu değeri anlamlı oranda düşük bulunmuştur ($p < 0.001$). SE grubu değerine göre tedavi grubu olan 1 mg/kg grubu değeri ($p < 0.05$) anlamlı olarak düşük bulunurken ve 5 mg/kg grubu değerleri

($p<0.001$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu değerine göre tedavi grubu olan 1 mg/kg grubu değeri ($p<0.001$) anlamlı olarak düşük bulunurken ve 5 mg/kg grubu değeri ($p<0.05$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Tedavi grupları karşılaştırıldığında 1 mg/kg grubu değerine göre ile 5 mg/kg grubu değeri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$, Şekil 21).

Tablo 9. Biyokimyasal analizlerin ortalama ve standart hataları

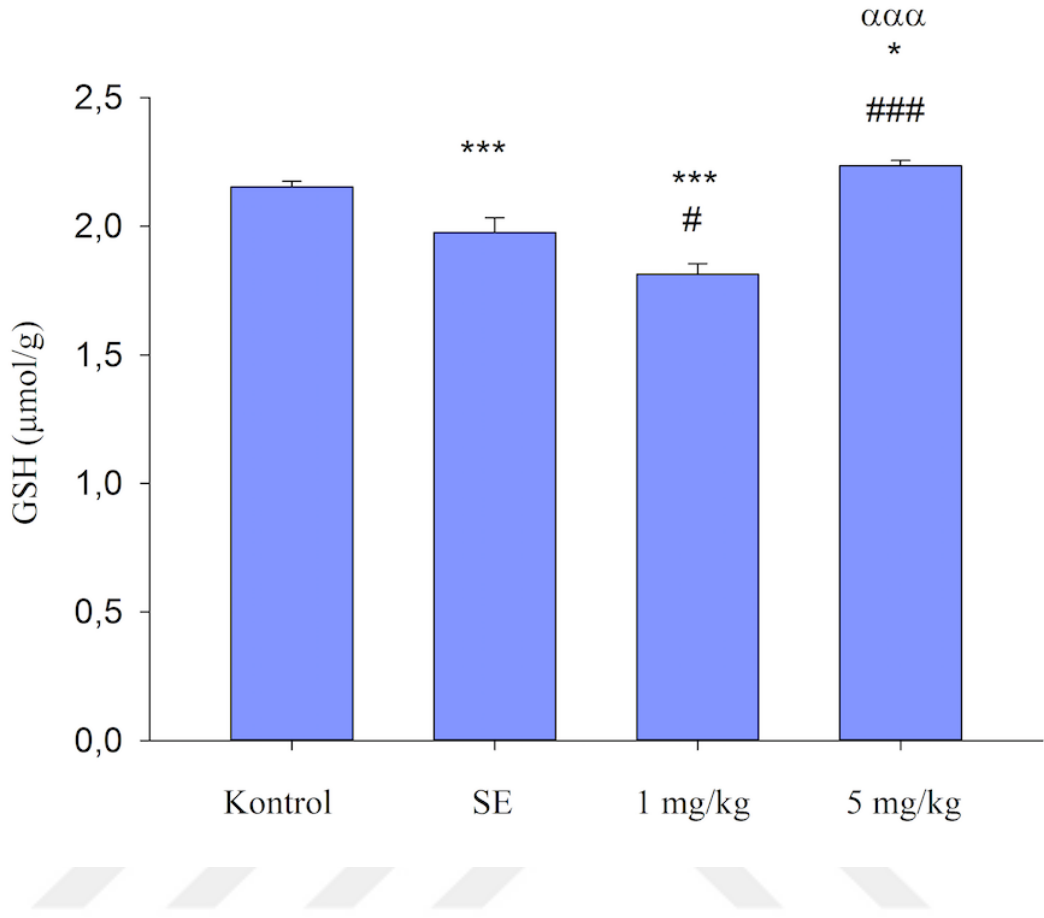
*** $p<0.001$ kontrol grubuna göre anlamlılık, # $p<0.05$ ### $p<0.001$ SE grubuna göre anlamlılık, &&& $p<0.001$ & $p<0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılık, ^a $p<0.05$ ^{aaa} $p<0.001$ 1 mg/kg tedavi grubuna göre anlamlılık

Biyokimyasal analizler	Kontrol grubu	SE grubu	1 mg/kg grubu	5 mg/kg grubu
	Ort± SEM	Ort± SEM	Ort± SEM	Ort± SEM
MDA	55,06±1,86	81,07±2,90***	56,80±2,92###	70,11±3,03#,* ^a
GSH	2,15±0,02	1,97±0,05***	1,81±0,04#***	2,23±0,02###,* ^{aaa}



Şekil 20. MDA düzeyleri

*p<0.05 kontrol grubuna göre anlamlılık, ***p<0.001 kontrol grubuna göre anlamlılık, ###p<0.001 SE grubuna göre anlamlılık^ap<0.05 1 mg/kg tedavi grubuna göre anlamlılık



Şekil 21. GSH düzeyleri

***p<0.001 kontrol grubuna göre anlamlılık, ###p<0.001 SE grubuna göre anlamlılık, #p<0.05 SE grubuna göre anlamlılık, αααp<0.001 1 mg/kg tedavi grubuna göre anlamlılık

5 TARTIŞMA

Epilepsi, tekrarlayan nöbetlerle karakterize yaygın bir nörolojik hastalıktır. Epilepsi ile ilişkili komorbiditeler kompleksi, tüm dünyadaki sağlık sistemleri için büyük bir yüküdür. Temporal lob epilepsisi (TLE), erişkinlerde en sık görülen fokal epilepsi formlarından biridir (142). DLK'nin akut nöronal hasarlanmada ve kronik nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (122). DLK inhibitörlerinin, TLE modeli üzerinde denendiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu sebeple çalışmada, TLE'de sık görülen hipokampal skleroz, bilişsel-davranışsal bozukluklar üzerinde DLK inhibitörü GNE-3511'in 1 mg/kg ve 5 mg/kg olmak üzere iki dozunun etkinliği araştırılmıştır.

Açık alan testi, lokomotor aktivite, anksiyete, stereotipik davranışları analiz etmek için kullanılır (143). Locomotor aktivitedeki değişiklikler, değişen nörolojik süreçlerin göstergesi olabilmektedir. Bu sebeple anormal beyin fonksiyonlarını yansıtabilir. Deney hayvanının açık alanda daha fazla vakit geçirmesi stres düzeyinin daha az olduğunu gösterebilmektedir (144). Bunun yanı sıra yapılan bazı epilepsi çalışmalarında SE indüklenen hayvanlarda motor aktivitenin arttığı gözlenmiştir (145–147). Çalışmamızda açık alan testinde lokomotor aktivite analiz edilmiştir. Analiz için geçilen kare sayısının hesaplandığı bu testte, SE grubunda lokomotor aktivitenin Kontrol ve tedavi gruplarına göre anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Aynı zamanda 1 mg/kg ve 5 mg/kg tedavi gruplarının Kontrol grubuna göre lokomotor aktivitesi yüksek bulunmuştur. Sonuçlar doğrultusunda tedavi uygulanan gruplarda lokomotor aktivitenin Kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür.

Pilokarpin ile indüklenen SE modellerinde artmış aktivitenin, lokomasyonu etkileyen hipokampal-akümbens yolağının anormal aktivitesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (146,148). Nükleus akümbensteki hipokampal afferent nöronlar ventral tegmental alandan dopaminerjik liflerle etkileşime girerek, limbik ve motor sistemler arasında etkin bir fonksiyonel arayüz oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada hipokampusun elektrikle uyarılmasının veya nükleus akümbenste glutamat reseptör agonistlerinin lokal enjeksiyonlarının, sıçanlarda lokomotor aktiviteyi arttırdığı

görülmüştür (149). Bir başka araştırmada pilokarpin indüksiyonunu takiben aynı dönem içerisinde hem hipokampüsün CA1 bölgesindeki interiktal aktivite hem de lokomotor aktivite artışı görülmüştür. Ancak bu aktivite paternindeki değişimlerin suprakiazmatik çekirdekte ya da intergenikulat yaprakta hücre kaybı olmadan görülmüştür. Dolayısıyla lokomotor aktivite artışının bu bölgelerdeki nöbet aktivitesi kaynaklı fonksiyonel değişikliklerden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (146). Bu bağlamda çalışmamızda SE'yi takiben artmış lokomotor aktivitenin DLK inhibisyonu sonrası azalması yönünde elde ettiğimiz bulguların nöbet aktivitesi üzerinden farklı bir mekanizma ile etki etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Anksiyete, tehdit algısıyla ilişkilendirilmiş olumsuz bir duygusal durumdur. Potansiyel tehdit beklentisi veya olumsuz sonuçlar ile karakterizedir. Bu duygudurumun patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına yönelik bir adım hayvan modellerinin kullanılmasıdır (150). Yükseltilmiş artı labirent testi, artı şeklini oluşturan dört koldan oluşur. Karşılıklı konumlanan iki kol yükseltilmiş duvarla çevrili iken diğer iki kol açık olmalıdır (151). Test, kaygısı daha az olan hayvanın labirentin açık kolunu daha fazla ziyaret ederken kaygısı yüksek olan hayvanın kapalı kolda daha fazla vakit geçirmesi eğilimine dayanmaktadır (152). Epilepside yapılan bazı çalışmalar anksiyete benzeri davranışın arttığını gösterirken (153) bazılarında azaldığı gösterilmiştir (154). Yine de epilepside artmış anksiyete hem TLE hastaları raporlarında bildirilmiş hem de pilokarpin ile oluşturulan TLE modellerinde görülmüştür (155).

Bu bağlamda çalışmamızda anksiyeteyi değerlendirmek için uygulanan yükseltilmiş artı labirent testinde açık ve kapalı kollarda kalma süreleri ve bu sonuçlarla elde edilen anksiyete skorları değerlendirilmiştir. Kontrol ve tedavi grupları ile kıyaslandığında SE grubunun açık kolda daha az vakit geçirdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra tedavi gruplarından 1 mg/kg grubunun açık kolda kontrolden daha fazla zaman geçirdiği saptanmıştır. Çalışmamızın anksiyete değerlendirmesi sonucunda tedavi edilen gruplarda açık kolda bulunma sürelerindeki artış ile anksiyetenin azaldığı görülmüştür.

Deneysel kanıtlar, kronik epilepsinin özellikle pilokarpin ile oluşturulan epilepsy modelinde, ventral ve dorsal hipokampüste ve amigdalada geniş hasara neden olduğunu ortaya koymaktadır (156). Amigdala lezyonunun boyutundaki farklılıkların, tehdit algısındaki farklılıklardan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (157). Bu gözlemler davranışsal tepkisellikteki farklılıkların, epileptik durumdan ziyade altta yatan beyin hasarıyla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (156). Dolayısıyla DLK inhibisyonu ile hedef alınan beyin hasarı üzerinde nöronal koruyucu etki ile SE'ye bağlı artmış anksiyete üzerinde azaltıcı bir etki yaptığı düşünülebilir.

Epilepsi hastalığında hafıza bozuklukları, şikayetleri sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Bu şikayetlerin çoğunluğunu, nöbetlerinin doğrudan hafıza ile ilişkili beyin yapılarıyla bağlantılı olduğu TLE hastaları oluşturmaktadır (158). Temporal lob, öğrenme ve belleğin dahil olduğu ana yapı olması dolayısıyla spontan nöbetler sonucunda bu yapıların zarar görmesi birtakım bellek bozukluklarına sebebiyet verebilmektedir (159,160).

Uzamsal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi için Morris su tankı testi yapılmıştır. Test, bırakılan farklı konumlardan etrafta bulunan çevresel ipuçlarından faydalanarak gizlenmiş platformu bulmaya dayanmaktadır. Uzamsal öğrenme, bu denemelerin tekrarı ile değerlendirilirken, referans bellek performansı platformun kaldırıldığı prob deneme gününde değerlendirilir. Değerlendirme, platformun yokluğunda platformun bulunduğu kadranda bulunma tercihinə dayanır.

Grupların kendi içlerindeki 4 günlük performanslarının değerlendirmesinde, SE grubunun öğrenme eğrisinin değişmediği, 1. güne kıyasla platformu bulma latansında anlamlı bir azalma olmadığı görülmüştür. Kontrol, 1 mg/kg ve 5 mg/kg gruplarında 1. günlerine kıyasla platformu bulma latansı anlamlı olarak azalmış, öğrenmenin gerçekleştiği görülmüştür. Temporal lob epilepsisinde uzamsal öğrenme ve bellek hasarı olduğunu gösteren çalışmalar (161,162) doğrultusunda, GNE-3511 inhibitörü ile yapılan DLK inhibisyonunun uzamsal öğrenme üzerinde iyileştirici etkisi olduğu görülmüştür.

Gün bazında platform bulma latansının, gruplar arası farklarına bakıldığında 1 mg/kg, 5mg/kg ve kontrol gruplarının 2, 3 ve 4. günlerde SE'ye oranla anlamlı olarak düştüğü görülmektedir. 5. gün prob denemesinde ilk 4 günde platformun bulunduğu hedef kadranda geçirilen zaman değerlendirildiğinde SE grubunun Kontrol ve 5 mg/kg grubuna göre daha az vakit geçirdiği görülürken Kontrol ve ilaç grupları arasında bir fark görülmemiştir. Yüzülen mesafenin SE ve tedavi gruplarında Kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Platform çaprazlamada sayısı değerlendirildiğinde SE grubunun çaprazlama sayısının Kontrol ve ilaç gruplarına göre daha düşük olduğu ayrıca 1 mg/kg grubunun 5 mg/kg tedavi grubuna göre daha düşük çaprazlama sayısına sahip olduğu görülmüştür. Yapılan diğer çalışmalarda pilokarpin ile oluşturulmuş SE modellerinde hafıza bozuklukları olduğu gösterilmiştir (161,162).

SE kaynaklı öğrenme ve hafıza bozukluklarına bağlı nöronal mekanizmalar henüz açıklanamamıştır. Ancak uzun süreli potansiyasyonda (LTP) ve sinaptik etkinlikteki kalıcı değişikliklerin hücresel boyutta bu bozuklukla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Pilokarpin ile indüklenen SE modeli ile yapılan bir çalışmada LTP oluşumunun SE indüksiyonu itibariyle 1 hafta boyunca bozulduğu gösterilmiştir. Bu durumun epileptik aktivitenin neden olduğu sinaptik yanıtın saturasyonu ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür (163). Başka bir çalışmada, epileptiform aktivitenin, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit (AMPA) reseptör aracılı CA3-CA1 sinaps iletiminin N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerine bağlı artışına yol açtığını ve böylece ilave sinaptik potansiyasyonu engellediği öne sürülmüştür (164). NMDA reseptör alt tipi olan GLuN2B antagonisti ile yapılan çalışmada SE sonrasında LTP'deki düşüşün engellendiği görülmüştür. Ekstrasinaptik GluN2B NMDA reseptörleri nörotoksisite, dejenerasyon ve hücre ölümü ile de ilişkilendirilmiştir. DLK aktivasyonunun hücre dışı stres faktörleri ile aktive olup hücre ölümü ile ilişkili olduğu bilinmektedir (163).

Çalışmamızda temporal lob epilepsisinde bozulduğu bilinen öğrenme ve bellek performansının DLK inhibitörü GNE-3511 ile azaldığı görülmektedir. Hedef kadranda geçirilen zaman değerlendirildiğinde SE grubunun Kontrol ve 5 mg/kg grubuna göre daha az vakit geçirdiği görülmüştür. Platform çaprazlama sayısına bakıldığında SE

grubunun Kontrol ve tedavi gruplarına göre daha az çaprazlama sayısına sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla DLK inhibisyonu ile beklenen nöronal koruyucu etki bu mekanizma üzerinden SE sonrası öğrenme ve hafıza bozukluğu üzerinde iyileştirici etki yapmış olabileceğini düşündürmektedir.

Hipokampal skleroz fokal epilepsinin ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca yeni başlangıçlı fokal epilepsili yetişkinlerin yaklaşık %10'unda mevcuttur (165). Sadece nöron ölümüyle değil aynı zamanda kronik epilepsi ve hafıza bozukluklarının altında yatan nöronal bağlantı ve ağ davranışındaki değişikliklerle karakterizedir (165). Uzun süreli nöbetleri takiben hipokampal hasarın altında yatan mekanizmalara ilişkin bilgiler büyük ölçüde SE hayvan modellerinden elde edilmiştir (166). Nöronal hasar, epileptik aktivitenin epileptik aktivite süresince glutamat reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla nöronal ölüme aracılık ettiği eksitotoksisteden kaynaklanmaktadır. NMDA reseptörleri yoluyla aynı zamanda spesifik AMPA reseptör alt tipleri yoluyla hücre içi aşırı kalsiyum akışı hücre ölümüne yol açan bir dizi reaksiyonla sonuçlanır (167–169). Henüz insana yönelik bir terapiye geçilememiş olsa da deneysel çalışmalar nöronal korumaya yönelik başka yaklaşımlar olabileceğine işaret etmektedir (165).

DLK, gelişim sırasında nöronlarda stres kaynaklı JNK aktivitesi için gerekli olan ve dorsal kök gangliyonun hem nörodejenerasyonu hem de akson rejenerasyonu için gerekli olan bir karışık soy kinazdır (18). DLK proteinin aksondaki konumu, aksonal yaralanmaya karşı bir hasar sensörü görevi gördüğü hipotezine yol açmıştır (21,22). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda DLK fonksiyonunun aksonal hasar ile sınırlı olmadığı aynı zamanda nöronal hasar yanıtı için de gerekli olduğu anlaşılmıştır (24). DLK'nin stres kaynaklı JNK sinyalini düzenlediği ve bu sinyalin MSS hastalıklarında JNK yolaklarının aksine kurduğu spesifik bağlantı ile yapması doğrudan nöronal disfonksiyonu hedeflemek anlamına gelmektedir. Yetişkinlerde DLK kaybının tolere edilmesi ve DLK inhibitörünün DLK sinyalinin hücrede oluşturduğu transkripsiyonel stres yanıtını tersine çevirebilmesi bir terapötik potansiyele işaret etmektedir (170). Bu bilgilere dayanarak pilokarpin ile oluşturduğumuz TLE modelinde DLK inhibisyonunun TLE sonucu oluşan hipokampal skleroz üzerinde nöronal koruyucu

etkinliği araştırılmıştır. Alınan hipokampusler ile hipokampüste nöronal hücre kaybının değerlendirilmesi için histoloji analizi yapılmıştır.

Işık mikroskopisi düzeyinde incelenen piramidal nöronlar, CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinde ayırt edilmiştir. SE grubunda CA1 bölgesinde sitoplazması büzülmüş dejenere nöronlar saptanmıştır. Ayrıca perivasküler ödem ve DG bölgesinde ise piknotik nöronlar görülmüştür. 1 mg/kg ve 5 mg/kg grubunun kontrol grubuna benzer sonuçlara sahip olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra 5 mg/kg grubunda rastlanan seyrek dejenere nöronların 1 mg/kg ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı saptanmıştır. Alzheimer, Parkinson ve optik sinir hasarı modellerinde GNE-3511 ile yapılan DLK inhibisyonunun nöronal koruyucu etkisi, çalışmamızda pilokarpin ile oluşturduğumuz TLE modelinde de görülmüştür (21,170).

JNK yolağı, stres uyarınları ile aktive olan c-Jun dahil olmak üzere birtakım transkripsiyon faktölerinin aktivasyonuna sebep olur. Bu aktivasyon uyarıcının tipine ve uzunluğuna bağlı olarak apoptoz, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi çeşitli hücrenel yanıtlara sebebiyet vermektedir (171). Yapılan bir çalışmada DLK'nın nöronal apoptoza JNK yolağı ve c-Jun fosforilasyonu üzerinden aracılık ettiği belirtilmiştir (172). Kullanılan DLK inhibitörü GNE-3511'in c-Jun protein seviyelerini üzerindeki etkisinin ölçümü için Western Blot yöntemi uygulanmıştır. Protein seviyesi tayini için göreceli bant yoğunluğu analizi yapılmıştır. Sonuçta, SE grubunun c-Jun protein seviyesinin Kontrol ve tedavi gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Tedavi gruplarındaki azalmış c-Jun seviyeleri TLE modelinin kronik döneminde de DLK inhibisyonunun protein düzeyinde hala etkili olduğunu göstermektedir.

Reaktif oksijen türleri pilokarpin ile indüklenen nöbet ve SE gelişiminde rol oynamaktadır. Çalışmaların gösterdiği bazı kanıtlar oksidatif stresin nöbet sonuçlarından bağımsız olarak kimyasal indükleme yöntemi kaynaklı da oluşabileceğini göstermektedir (173). Pilokarpin ile indüklenen SE modeli ile yapılan çalışmalar, nöbet aktivitesi ile ilişkili davranışsal, histopatolojik ve nörokimyasal

değişimler hakkında bilgi sağlamıştır (174,175). Bu doğrultuda yapılan bazı çalışmaların sonuçları SE dolayısıyla lipid peroksidasyonunda artışı glutatyon seviyelerinde ise azalmanın olduğunu destekler niteliktedir (176).

Bu doğrultuda oksidan parametrelerin değerlendirilmesi için korteks dokusu üzerinde MDA ve GSH düzeyleri analiz edilmiştir. MDA seviyelerinin, SE grubunda Kontrol ve tedavi gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Tedavi dozlarının kıyaslanması sonucunda ise 5 mg/kg grubunun 1 mg/kg grubuna göre daha yüksek MDA seviyelerine sahip olduğu saptanmıştır. GSH seviyelerine bakıldığında Kontrol grubu değerine göre SE ve 1 mg/kg grubu değeri düşük bulunurken 5 mg/kg grubu değeri yüksek bulunmuştur. SE grubu değerine ile tedavi grupları kıyaslandığında 1 mg/kg grubu değeri düşük bulunurken ve 5 mg/kg grubu değerleri yüksek bulunmuştur. Tedavi grupları karşılaştırıldığında 1 mg/kg grubu değerine göre ile 5 mg/kg grubu değeri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. DLK inhibisyonu ile oksidan parametrelerin gösterildiği bir çalışma yapılmamıştır. Ancak pilokarpin ile oluşturulan TLE modelimizde SE grubunda önceki çalışmalarını destekler nitelikte artmış lipid peroksidasyon ve azalmış glutatyon seviyeleri görülmüştür. Lipid peroksidasyonun analizini gerçekleştirmek için yapılan MDA düzeyi tayini sonuçlarına bakıldığında sonuçlar DLK inhibisyonunun bu seviyeleri azalttığını göstermektedir. GSH düzeylerinde yüksek doz grubunun SE'de görülen düşük glutatyon seviyesini yükselttiği görülürken düşük doz grubunda bu etki görülmemiştir.

Epilepsi hastalığında lipid peroksidasyon rolünü ve enzim aktivitesinin önemini gösteren çokça çalışma olmasına rağmen henüz bu enzimlerin SE'yi hangi mekanizmalar ile etkilediği anlaşılmamıştır (177). Oksidatif stresin SE dolayısıyla beyindeki artışı, beyinde büyük miktarlarda oksitlenebilir lipidler ve metaller içermesi ancak diğer dokulardan daha az antioksidan mekanizmaya sahip olması ile açıklanmaktadır (178). SE dolayısıyla antioksidan mekanizmaların işlevlerindeki azalma ile lipid peroksidasyonundaki ve serbest radikal konsantrasyonlarındaki artışın kolaylaşabileceği düşünülmektedir (179).

Öte yandan E vitamini, lipid peroksidasyonunu önleyen en güçlü lipid-çözünür antioksidan olup hücrelerde reaktif oksijen moleküllerinin üretiminin ana yeri olan mitokondriyi korumada özel bir role sahiptir. Mitokondriyal E vitamininin oksidasyonuna lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumu, değişen enzim aktivitesi ve elektriksel iletkenlik eşlik ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, reaktif oksijen moleküllerinin üretimi aşırı olduğunda, antioksidan kapasitesi aşırı yüklenir ve bu da oksidatif stres ve hücresel oksidatif hasarın gelişmesine neden olmaktadır. E vitamininin, hücre ölümü, hayatta kalma ve yenilenme ile ilgili yolları modüle edebildiği bilinmektedir (180). Ayrıca, hem in vitro hem de in vivo kanıtlar, özellikle inflamatuvar süreçlerde E vitamini metabolitlerinin düzenleyici potansiyelini göstermiştir (181). Chiricosta ve arkadaşlarının 2019 yılındaki bir çalışmada E vitamininin MAPK yolağını düzenleyebildiği gösterilmiştir (180). JNK'ların da dahil olduğunu gösteren çalışma, bulgularımızın DLK-JNK aktivasyonunun engellenerek lipid peroksidasyonu azaltılmış olabileceğine işaret etmektedir.

6 SONUÇ

Sonuç olarak çalışmada, pilokarpin ile oluşturulan temporal lob epilepsisi modelinde DLK inhibitörü GNE-3511'in uygulanmasının, hipokampüsün CA1, CA2, CA3 ve dentat girus bölgelerindeki nöronal dejenerasyonu azalttığı, oksidatif stres kaynaklı artmış lipid peroksidasyon seviyesini azalttığı, bilişsel-davranışsal olarak bakıldığında öğrenme ve bellek performansındaki bozukluğu, temporal lob epilepsi modeliyle artan anksiyeteyi ve lokomotor aktiviteyi azalttığı görüldü.



7 KAYNAKLAR

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE OFFICIAL REPORT A practical clinical definition of epilepsy. 2014;475–82.
2. Dooling SW, Costa-mattioli M. of the Brain to Prevent Epilepsy. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2018;24(1):3–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.014>
3. Outcomes M. Treatment Outcomes in Patients with Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs A 30-Year Longitudinal Cohort Study. 2017;
4. Caro C De, Iannone LF, Citraro R, Sarro G De, Constanti A, Cryan JF, et al. Equally contributed of. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.002>
5. Fisher RS, Boas WVE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy : Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). 2005;46(4):470–2.
6. Jensen F, Lo W, Mody I, Potschka H, Prince D, Sierra A, et al. Finding a better drug for epilepsy : Antiepileptogenesis targets Mechanisms of Epileptogenesis. 2012;53(11):1868–76.
7. Thijs RD, Surges R, Brien TJO, Sander JW. Seminar Epilepsy in adults. *Lancet* [Internet]. 2019;6736(18). Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
8. Rijckevorsel K Van. Cognitive problems related to epilepsy syndromes , especially malignant epilepsies. 2006;
9. Schuele SU, Lüders HO. Intractable epilepsy : management and therapeutic alternatives. 2008;
10. Medicina EP De. Spontaneous Recurrent Seizures in Rats : An Experimental Model of Partial Epilepsy. 1990;14:511–7.
11. Boyet S, Marescaux C, Nehlig A. Relationship between Neuronal Loss and Interictal Glucose Metabolism during the Chronic Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy in the Immature and Adult Rat. 2001;241:227–41.
12. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto A, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats : Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous Recurrent Seizures. 1991;32(6):778–82.
13. Vezzani A, Masa L, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. 2012;7(1):31–40.
14. Klein P, Dingledine R, Aronica E, Bernard C, Boison D, Brodie MJ, et al. Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults : Do they translate ? 2017;(November).
15. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. 2000;287(January):664–6.
16. Misheva M, Bogoyevitch MA. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein- Protein Partnerships. 2016;793–835.

17. Tai TY, Warner LN, Jones TD, Jung S, Fender J, Liu Y, et al. ANTIPILEPTIC ACTION OF C-JUN N-TERMINAL KINASE (JNK) INHIBITION IN AN ANIMAL MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY. *Neuroscience* [Internet]. 2017;(February). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.02.024>
18. Ghosh AS, Wang B, Pozniak CD, Chen M, Watts RJ, Lewcock JW. DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity. *194(5):751–64*.
19. Signaling SP, Simon DJ, Pitts J, Hertz NT, Te M, Molina H, et al. Axon Degeneration Gated by Retrograde Activation Axon Degeneration Gated by Retrograde Activation of Somatic Pro-apoptotic Signaling. 2016;1–15.
20. Larhammar M, Huntwork-rodriguez S, Jiang Z, Solanoy H, Ghosh AS, Wang B, et al. Dual leucine zipper kinase-dependent PERK activation contributes to neuronal degeneration following insult. 2017;4:1–27.
21. Watkins TA, Wang B, Huntwork-rodriguez S, Yang J, Jiang Z, Eastham-anderson J. DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury. 2013;110(10):4039–44.
22. Shin JE, Cho Y, Beirowski B, Milbrandt J, Cavalli V, Diantonio A. Report Dual Leucine Zipper Kinase Is Required for Retrograde Injury Signaling and Axonal Regeneration. *Neuron* [Internet]. 2012;74(6):1015–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.028>
23. Miller BR, Press C, Daniels RW, Sasaki Y, Milbrandt J, Diantonio A. B R I E F C O M M U N I C A T I O N S axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. 2009;12(4):387–90.
24. Pozniak CD, Ghosh AS, Gogineni A, Hanson JE, Lee S, Larson JL, et al. Dual leucine zipper kinase is required for excitotoxicity-induced neuronal degeneration. 2013;210(12).
25. Thurman DJ, Beghi E, Begley CE, Berg AT, Buchhalter JR, Ding D, et al. ILAE EPIDEMIOLOGY COMMISSION REPORT Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy *Epidemiologic Methods for the*. 2011;52(1):2–26.
26. Panteliadis CP, Vassilyadi P, Fehlert J, Hagel C. Historical documents on epilepsy : From antiquity through the 20th century. *Brain Dev* [Internet]. 2017;39(6):457–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2017.02.002>
27. Gross RA. A brief history of epilepsy and its therapy in the western hemisphere. 1992;12:65–74.
28. Dadmehr M, Amini-behbahani F, Eftekhari B, Minaei B, Bahrami M. Peritoneum as an origin of epilepsy from the viewpoint of Avicenna. 2018;10–3.
29. Bird J, Chb MB. *Brain and Mind*. 1991;106(December).
30. Wolf P. Seminars in Epileptology History of epilepsy : nosological concepts and classification Early history : scientific. 2014;16(3):261–9.
31. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Boas VE, et al. Revised

- terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies : Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology , 2005 – 2009. 2010;51(4):676–85.
32. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Dykeman J, Pringsheim T, et al. Prevalence and incidence of epilepsy A systematic review and meta-analysis of international studies. 2016;
 33. Beghi E, Hesdorffer D. Prevalence of epilepsy — An unknown quantity Prevalence of Epilepsy Uniform What Might Be the Reasons for. 2014;55(7):963–7.
 34. Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. 2011;52(6):1052–7.
 35. Terwindt GM. Unravelling the heterogeneity of epilepsy for optimal individualised treatment : advances in 2019. 2020;19(January):1–3.
 36. Algin İ, Erdiñç O. Epilepsi. 2016;38(1):35–41.
 37. Considerations B. THE LITERATURE OF Book Reviews and Notices. 2018;155–64.
 38. Brodie MJ, Zuberi SM, Scheffer IE, Fisher RS. Seminar in Epileptology The 2017 ILAE classification of seizure types and the epilepsies : what do people with epilepsy and their caregivers need to know ? 2018;20(2):77–87.
 39. Sjøraas CL, Bakken IJ, Aaberg KM, Lossius MI, Stoltenberg C, Chin R. Seizures , syndromes , and etiologies in childhood epilepsy : The International League Against Epilepsy 1981 , 1989 , and 2017 classifications used in a population-based cohort. 2017;1–12.
 40. Pack BAM. Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. 2019;(April):306–21.
 41. Falco-walter JJ, Sche IE, Fisher RS. The new de fi nition and classi fi cation of seizures and epilepsy. 2018;139(July 2017):73–9.
 42. Fisher RS, Bonner AM. The Revised Definition and Classification of Epilepsy for Neurodiagnostic Technologists. Neurodiagn J [Internet]. 2018;58(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1080/21646821.2018.1428455>
 43. Bartolomei F, Wendling F, Vignal J, Kochen S, Bellanger J, Badier J. Seizures of temporal lobe epilepsy : identi ® cation of subtypes by coherence analysis using stereo-electroencephalography. 1999;110:1741–54.
 44. Manford M, Hart YM. National General Practice Study of Epilepsy (NGPSE): Partial seizure patterns in a general population. 1992;(October):1911–7.
 45. Rosa M, Pascual Q. Temporal Lobe Epilepsy : Clinical Semiology and Neurophysiological Studies. 2007;416–23.
 46. Blümcke I. Epilepsy & Behavior Neuropathology of focal epilepsies : A critical review. Epilepsy Behav [Internet]. 2009;15(1):34–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.02.033>
 47. Catarino CB, Novy J, Belluzzo M, Yogarajah M, Martinian L, Peacock JL, et al. The lifelong course of chronic epilepsy : the Chalfont experience. 2013;
 48. Thom M. Accepted Article. :1–35.
 49. Leeman-markowski BA. Tre a t m e n t o f C o g n i t i v e Deficits in Epilepsy. Neurol Clin NA [Internet]. 2016;34(1):183–204. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2015.08.008>

50. Dantzer R, Connor JCO, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression : when the immune system subjugates the brain. 2008;9(january).
51. Cunningham C, Sanderson DJ. Brain , Behavior , and Immunity Malaise in the water maze : Untangling the effects of LPS and IL-1 b on learning and memory. 2008;22:1117–27.
52. Bioscience G. Cytokines and Cognition—The Case for A Head-to-Toe Inflammatory Paradigm. 2002;2041–56.
53. Costa J, Siqueira LD, Mazeraud A, Azevedo EP, Foguel D, Castro-faria-neto HC, et al. Age-related cognitive impairment is associated with long-term neuroinflammation and oxidative stress in a mouse model of episodic systemic inflammation. 2018;1–13.
54. Drapeau E, Aguerre S, Abrous DN. Learning-Induced Survival of New Neurons Depends on the Cognitive Status of Aged Rats. 2007;27(22):6037–44.
55. Kodali M, Hattiangady B, Shetty GA, Bates A, Shuai B, Shetty AK. Curcumin Treatment Leads to Better Cognitive and Mood Function in a Model of. Brain Behav Immun [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.01.009>
56. Carriero G, Arcieri S, Cattalini A, Corsi L, Gnatkovsky V, Curtis M De. FULL-LENGTH ORIGINAL RESEARCH A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. 2012;53(11):1917–27.
57. Harma ALOKKS, Eams RAYR, Ordan WIHJ, Iller MAAM, Hacker HLEONT, Nyder PAULWS. Mesial Temporal Lobe Epilepsy : Pathogenesis , Induced Rodent Models and Lesions. 2007;984–99.
58. Rao MS, Hattiangady B, Reddy DS. Hippocampal Neurodegeneration , Spontaneous Seizures , and Mossy Fiber Sprouting in the F344 Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. 2006;1105(February):1088–105.
59. Ben-ari Y, Cossart R, Ben-ari Y. Kainate , a double agent that generates seizures : two decades of progress. 2000;2236(0).
60. Drexel M, Preidt AP, Sperk G. Neuropharmacology Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. 2012;63:806–17.
61. Nirwan N, Vyas P, Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy : a narrative review. 2018;
62. Program N, Hall S. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure. 1997;94(November):13311–6.
63. Covolan L. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. 1996;26:123–9.
64. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. 2008;172:143–57.
65. Goffin K, Nissinen J, Laere K Van, Pitkänen A. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in

- pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. 2007;205:501–5.
66. Jope S, Morrisett A, Program N. Characterization of Lithium Potentiation of Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Rats. 1986;480.
 67. Marchi N, Oby E, Batra A, Uva L, Curtis M De, Hernandez N, et al. InVivo and InVitro Effects of Pilocarpine : Relevance to Ictogenesis. 2007;48(10):1934–46.
 68. Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. THE FUNCTIONAL ANATOMY AND PATHOLOGY OF LITHIUM-PILOCARPINE AND HIGH-DOSE PILOCARPINE SEIZURES. 1987;23(3).
 69. Gröticke I, Hoffmann K, Löscher W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. 2007;207:329–49.
 70. Müller CJ, Bankstahl M, Gröticke I, Löscher W. Pilocarpine vs . lithium – pilocarpine for induction of status epilepticus in mice : Development of spontaneous seizures , behavioral alterations and neuronal damage. Eur J Pharmacol [Internet]. 2009;619(1–3):15–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.07.020>
 71. Schauwecker PE. The relevance of individual genetic background and its role in animal models of epilepsy. Epilepsy Res [Internet]. 2011;97(1–2):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.09.005>
 72. Pitkänen A, Jr JE. Past and Present Definitions of Epileptogenesis and Its Biomarkers. 2014;
 73. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Peltola J, Roulet E, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy : Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. 2017;1–9.
 74. Crunelli V, Leresche N, Pierre U. CHILDHOOD ABSENCE EPILEPSY : GENES , CHANNELS , NEURONS. 2002;3(May).
 75. Pinault D, O TJ. seizures Cellular and network mechanisms of genetically-determined absence seizures. 2015;(February 2007):181–203.
 76. Cope DW, Giovanni G Di, Fyson SJ, Orbán G, Errington AC, Magor LL, et al. Enhanced tonic GABA A inhibition in typical absence epilepsy. 2009;15(12).
 77. Helbig I, Scheff IE, Mulley JC, Berkovic SF. Navigating the channels and beyond : unravelling the genetics of the epilepsies. 2008;
 78. Li LM, Fish DR, Sisodiya SM, Shorvon SD, Alsanjari N, Stevens JM. High resolution magnetic resonance imaging in adults with partial or secondary generalised epilepsy attending a tertiary referral unit. 1995;384–7.
 79. Berg AT, Mathern GW, Bronen RA, Fulbright RK, Dimario F, Testa FM, et al. Frequency , prognosis and surgical treatment of structural abnormalities seen with magnetic resonance imaging in childhood epilepsy. 2009;
 80. Babb TL, Brown J, Pretorius J, Jeffrey P, Crandall PH. Temporal Lobe Volumetric Cell Densities in Temporal Lobe Epilepsy. 1984;25(6):729–40.
 81. Borges K, Gearing M, Mcdermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, et al. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model.

- 2003;182:21–34.
82. Yuen AWC, Keezer MR, Sander JW. Epilepsy & Behavior Epilepsy is a neurological and a systemic disorder. *Epilepsy Behav* [Internet]. 2018;78:57–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.10.010>
 83. Vezzani A, Lang B, Aronica E. Immunity and Inflammation in Epilepsy. 2015;1–22.
 84. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2010;7(1):31–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2010.178>
 85. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates , the MAPK-Activated Protein Kinases. 2012;76(2):2012.
 86. Busquets O, Ettcheto M, Cano A, Manzine PR, Elena S, Espinosa-jim T, et al. Role of c-Jun N-Terminal Kinases (JNKs) in Epilepsy and Metabolic Cognitive Impairment. 2020;
 87. Sabapathy K. Role of the JNK Pathway in Human Diseases [Internet]. 1st ed. Vol. 106, Protein Phosphorylation in Health and Disease. Elsevier Inc.; 2012. 145-169 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-396456-4.00013-4>
 88. Sun Y, Liu W, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou H. Signaling pathway of MAPK / ERK in cell proliferation , differentiation , migration , senescence and apoptosis. 2016;9893(October).
 89. Pinto DJ, Patrick SL, Huang WC, Connors BW. Initiation , Propagation , and Termination of Epileptiform Activity in Rodent Neocortex In Vitro Involve Distinct Mechanisms. 2005;25(36):8131–40.
 90. Wang X, Finegan KG, Robinson AC, Knowles L. Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. 2006;2099–108.
 91. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. 2010;417:403–17.
 92. Davis RJ. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. 2000;103:239–52.
 93. Cui J, Zhang M, Zhang Y, Xu Z. Invited review Key words. 2007;28(5):601–8.
 94. Morrison DK. MAP Kinase Pathways. 2012;1–6.
 95. Coffey ET. signalling in neurons. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2014;15(5):285–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3729>
 96. Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK : the Many and Varied Substrates of the c-Jun N-Terminal Kinases. 2006;70(4):1061–95.
 97. Gallo KA, Johnson GL. MIXED-LINEAGE KINASE CONTROL OF JNK AND p38 MAPK PATHWAYS. 2002;3(September):3–12.
 98. Coffey ET, Hongisto V, Dickens M, Davis RJ, Courtney MJ. Dual Roles for c-Jun N-Terminal Kinase in Developmental and Stress Responses in Cerebellar Granule Neurons. 2000;20(20):7602–13.
 99. Kishimoto H, Nakagawa K, Watanabe T, Kitagawa D, Momose H, Seo J, et al. Different Properties of SEK1 and MKK7 in Dual Phosphorylation of Stress-induced Activated Protein Kinase SAPK / JNK in Embryonic Stem Cells *. 2003;278(19):16595–601.
 100. Reid AY, Staba RJ. Limbic Networks : Clinical Perspective [Internet]. 1st ed. Vol. 114,

Modern Concepts of Focal Epileptic Networks. Elsevier Inc.; 2014. 89-120 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-418693-4.00005-4>

101. Noebels J. Pathway-driven discovery of epilepsy genes. 2015;18(3).
102. Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. 2007;3185–202.
103. Chao T, Hayashi M, Tapping RI, Kato Y, Lee J. MEKK3 Directly Regulates MEK5 Activity as Part of the Big Mitogen-activated Signaling Pathway *. 1999;1(9):36035–9.
104. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. 1996;15(11):2760–70.
105. Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willesen M, Nicolaus T, Raivich G, et al. Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. 2005;21(October 2004):363–77.
106. Kuan C, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, et al. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. 2003;
107. Carboni L, Carletti R, Tacconi S, Corti C, Ferraguti F. Differential expression of SAPK isoforms in the rat brain . An in situ hybridisation study in the adult rat brain and during post-natal development. 1998;57–68.
108. Resnick L, Fennell M, Resnick L. Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. 2004;9(21).
109. Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis RJ. Interaction of a Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Module with the Neuronal Protein JIP3. 2000;20(3):1030–43.
110. Kim AH, Sasaki T, Chao M V. JNK-interacting Protein 1 Promotes Akt1 Activation *. 2003;278(32):29830–6.
111. Yasuda JUN, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ. The JIP Group of Mitogen-Activated Protein Kinase Scaffold Proteins. 1999;19(10):7245–54.
112. Pitkänen A, Sutula TP. Review Is epilepsy a progressive disorder ? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. 2002;1(July):173–81.
113. Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Beas-zarate C, et al. An overview of investigational antiapoptotic drugs with potential application for the treatment of neurodegenerative disorders. 2010;587–604.
114. Ferrer I, Puig B, Freixes M, Ribé E, Dalfó E, Avila J. Current Advances on Different Kinases Involved in Tau Phosphorylation , and Implications in Alzheimer ’ s Disease and Tauopathies. 2005;3–18.
115. Ferrer I, Blanco R, Carmona M. Differential expression of active , phosphorylation-dependent MAP kinases , MAPK / ERK , SAPK / JNK and p38 , and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. 2001;94:48–58.
116. Oleinik N V, Krupenko NI, Krupenko SA. Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. 2007;7222–30.
117. Bozyczko-coyne D, Kane TMO, Wu Z, Dobrzanski P, Murthy S, Vaught JL, et al. CEP-1347 / KT-7515 , an inhibitor of SAPK / JNK pathway activation , promotes survival and blocks

- multiple events associated with A β -induced cortical neuron apoptosis. 2001;849–63.
118. Verma G, Datta M. The Critical Role of JNK in the ER-Mitochondrial Crosstalk During Apoptotic Cell Death. 2011;(June):1791–5.
 119. Lerma J, Marques JM, Neurociencias I De, Alicante SJ De. Review Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron* [Internet]. 2013;80(2):292–311. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.045>
 120. Behrens A, Sibilio M, Wagner EF. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. 1999;21(march):326–9.
 121. Merritt SE, Mata M, Nihalani D, Zhu C, Hu X, Holzman LB. The Mixed Lineage Kinase DLK Utilizes MKK7 and Not MKK4 as Substrate *. 1999;274(15):10195–202.
 122. Siu M, Ghosh AS, Lewcock JW. Dual Leucine Zipper Kinase Inhibitors for the Treatment of Neurodegeneration. 2018;
 123. Jnk W. JNK inhibitors as anti-inflammatory and neuroprotective agents. 2013;539–51.
 124. Zhang C, Ventura J, Hu A, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. Chemical Genetic Analysis of the Time Course of Signal Transduction by JNK. 2006;701–10.
 125. Engstro W, Ward A, Moorwood K. The role of scaffold proteins in JNK signalling. 2010;56–66.
 126. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. 1998;4(December):21407–10.
 127. Welsbie DS, Yang Z, Ge Y, Mitchell KL, Zhou X, Martin SE. Functional genomic screening identifies dual leucine zipper kinase as a key mediator of retinal ganglion cell death. 2013;110(10):4045–50.
 128. Dawson TM, Dawson VL, Dawson TM, Dawson VL. Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease Published by : American Association for the Advancement of Science Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. 2016;302(5646):819–22.
 129. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. 2004;631–40.
 130. Patel S, Cohen F, Dean BJ, Torre KD La, Deshmukh G, Estrada AA, et al. Discovery of Dual Leucine Zipper Kinase (DLK, MAP3K12) Inhibitors with Activity in Neurodegeneration Models. 2015;
 131. Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, et al. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. 2016;
 132. Borsello T, Clarke PGH, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, et al. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. 2003;9(9).
 133. Fernandes KA, Harder JM, Fornarola LB, Freeman RS, Clark AF, Pang I, et al. Neurobiology of Disease JNK2 and JNK3 are major regulators of axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2012;46(2):393–401. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.02.003>

134. Yang DD, Kuan C, Whitmarsh AJ, Zheng TS, Rinco M, Davis RJ, et al. Absence of excitotoxicity- induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. 1997;389(October):865–70.
135. Yoon SO, Park DJ, Ryu JC, Ozer HG, Tep C, Shin YJ, et al. Article JNK3 Perpetuates Metabolic Stress Induced by A b Peptides. *Neuron* [Internet]. 2012;75(5):824–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.024>
136. Mata M, Merritt SE, Fan G, Yu GG, Holzman LB. Characterization of Dual Leucine Zipper-bearing Kinase , a Mixed Lineage Kinase Present in Synaptic Terminals Whose Phosphorylation State Is Regulated by Membrane Depolarization via Calcineurin *. 1996;271(28):16888–96.
137. Arshad MN, Naegele JR. www.bio-protocol.org/e3533. 2020;10(4):1–18.
138. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. 2015;(February):1–6.
139. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated Plus Maze for Mice. 2008;(December):1–4.
140. Taylor SC, Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. 2014;2014.
141. Kolgazi M, Cantali-ozturk C, Deniz R, Ozdemir-kumral ZN, Yuksel M. ScienceDirect Nesfatin-1 alleviates gastric damage via direct antioxidant mechanisms. 2015;3:2–9.
142. Begley CE, Durgin TL. The direct cost of epilepsy in the United States : A systematic review of estimates. 2015;56(9):1376–87.
143. Prut L, Belzung C, Rabelias UF, Psychobiologie E. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors : a review. 2003;463:3–33.
144. Kraeuter A, Guest PC. Chapter 9. 1916:99–103.
145. Mares P, Suchomelova L, Broz G, Druga R, Pitka A, Kubova H. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. 2004;19(i).
146. Stewart LS, Leung LS. Behavior Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. 2003;4:153–60.
147. Szyndler J, Wierzba-bobrowicz T, Sko A, Walkowiak J, Lechowicz W, Turzyn D. Behavioral , biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures. 2005;81:15–23.
148. Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AVJ, Amsterdam N, Vrije N. Convergence and Segregation of Ventral Striatal Inputs and Outputs. :49–63.
149. Donzanti BA, Uretsky NJ. EFFECTS OF EXCITATORY AMINO ACIDS ON LOCOMOTOR ACTIVITY AFTER BILATERAL MICROINJECTION INTO THE RAT NUCLEUS ACCUMBENS : POSSIBLE DEPENDENCE ON DOPAMINERGIC MECHANISMS. 1983;22(8).
150. Alsaif M, Bahn S, Ernst A, Guest PC, Hradetzky E, Kluge W, et al. BEHAVIORAL AND MOLECULAR BIOMARKERS IN TRANSLATIONAL ANIMAL MODELS FOR NEUROPSYCHIATRIC. Vol. 101.

151. Handley SL, Mithani S. Archives of Pharmacology Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. 1984;1–5.
152. Square B. THE CONTRIBUTION OF BEHAVIOURAL STUDIES TO THE. 1987;26:877–86.
153. Vrinda M, Sasidharan A, Aparna S, Srikumar BN, Kutty BM, Rao BSS. Enriched environment attenuates behavioral seizures and depression in chronic temporal lobe epilepsy. 2017;1–11.
154. Gulec G, Isbil-buyukcoskun N, Kahveci N, Sengun E, Ozluk K. Pharmacology , Biochemistry and Behavior Immediate and delayed treatment with gabapentin , carbamazepine and CNQX have almost similar impact on cognitive functions and behavior in the lithium-pilocarpine model in rats. Pharmacol Biochem Behav [Internet]. 2016;148:128–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2016.07.003>
155. William M, Cristiane S, Bonfanti D, Paula A, Marques F, Mello N De, et al. Epilepsy & Behavior Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. Epilepsy Behav [Internet]. 2016;55:92–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.001>
156. Inostroza M, Cid E, Menendez L, Prida D, Sandi C. Different Emotional Disturbances in Two Experimental Models of Temporal Lobe Epilepsy in Rats. 2012;7(6):14–7.
157. Inostroza M, Cid E, Brotons-mas J, Gal B, Aivar P, Yoryani G, et al. Hippocampal-Dependent Spatial Memory in the Water Maze is Preserved in an Experimental Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats. 2011;6(7).
158. Kapur N, Prevett M. Unexpected amnesia : are there lessons to be learned from cases of amnesia following unilateral temporal lobe surgery ? 2003;126(12).
159. Behavior SS, Gilliam F, Hecimovic H, Sheline Y. Behavior Psychiatric comorbidity , health , and function in epilepsy q. 2003;4:26–30.
160. Vrinda M, Arun S, Srikumar BN, Kutty BM, Rao BSS. SC. J Chem Neuroanat [Internet]. 2018; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.02.005>
161. Detour J, Schroeder H, Desor D, Nehlig A. A 5-Month Period of Epilepsy Impairs Spatial Memory , Decreases Anxiety , but Spares Object Recognition in the Lithium-pilocarpine Model in Adult Rats. 2005;46(4):499–508.
162. Pearson JN, Schulz KM, Patel M. Specific alterations in the performance of learning and memory tasks in models of chemoconvulsant-induced status epilepticus. Epilepsy Res [Internet]. 2014;1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.04.003>
163. Kryukov KA, Kim KK, Magazanik LG, Zaitsev A V. Status epilepticus alters hippocampal long-term synaptic potentiation in a rat lithium-pilocarpine model. 2016;1191–5.
164. Abegg MH, Ehrenguber MU, McKinney RA, Beat HG. Epileptiform activity in rat hippocampus strengthens excitatory synapses. 2003;439–48.
165. Walker MC. Hippocampal Sclerosis : Causes and Prevention. 2015;
166. Meldrum B. 9 . Excitotoxicity and epileptic brain damage. 1991;10:55–61.

167. Tanaka H, Grooms SY, Bennett MVL, Zukin RS. The AMPAR subunit GluR2 : still front and center-stage 1. 2000;886:190–207.
168. Weiss JH, Sensi SL. Ca²⁺ – Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors : possible key factors in selective neurodegeneration. 2000;(1999):365–71.
169. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at DUKE MEDICAL CENTER LIBRARY on January 18, 2013. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1994 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. 1994;
170. Pichon CE Le, Meilandt WJ, Dominguez S, Solanoy H, Lin H, Ngu H, et al. Loss of dual leucine zipper kinase signaling is protective in animal models of neurodegenerative disease. 2017;394(August):1–15.
171. Ferraris D, Welsbie D. Dual leucine zipper kinase as a therapeutic target for neurodegenerative conditions. 2013;1923–34.
172. Chen X, Rzhetskaya M, Kareva T, Bland R, Doring MJ, Tank AW, et al. Antiapoptotic and Trophic Effects of Dominant-Negative Forms of Dual Leucine Zipper Kinase in Dopamine Neurons of the Substantia Nigra In Vivo. 2008;28(3):672–80.
173. Freitas RM. Neuroscience Letters Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. 2009;462:225–9.
174. Freitas RM, Fonteles MMF. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine- induced status epilepticus in Wistar rats. 2005;272:1307–12.
175. Hort J, Broz G. Interstrain differences in cognitive functions in rats in relation to status epilepticus. 2000;112:77–83.
176. Shin E, Ho Y, Kim A, Nah S, Hoon J, Chae J, et al. Ginsenosides attenuate kainic acid-induced synaptosomal oxidative stress via stimulation of adenosine A_{2A} receptors in rat hippocampus. 2009;197:239–45.
177. Mccord JOEM. Superoxide Radical: Controversies, Contradictions, and Paradoxes.
178. Bellissimo MI, Abdalla SP, Grac M. Superoxide dismutase , glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. 2001;46:121–8.
179. Kudin AP, Yaw-b N, Vielhaber S, Christian E, Kunz WS, Kudin AP, et al. Metabolism and Bioenergetics : Characterization of Superoxide-producing Sites in Isolated Brain Mitochondria Characterization of Superoxide-producing Sites in Isolated Brain Mitochondria *. 2004;
180. Chiricosta L, Gugliandolo A, Tardiolo G, Bramanti P. Transcriptomic Analysis of MAPK Signaling in NSC-34 Motor Neurons Treated with Vitamin E. 2019;
181. Birringer M, Lorkowski S. Critical Review Vitamin E : Regulatory Role of Metabolites. (8):1–8.

8 EKLER

EK 1. Etik Kurul Raporu



9 ÖZGEÇMİŞ



