

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN ABSANS EPİLEPTİK
SIÇANLARDA KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITINA (KPY) ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sabriye KARADENİZLİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin
Fizyoloji Doktora Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2018

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN ABSANS EPİLEPTİK
SIÇANLARDA KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITINA (KPY) ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sabriye KARADENİZLİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Fizyoloji Doktora Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Deniz ŞAHİN

Bu Tez Çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir
Proje Numarası: 2017-035
Etik Kurul Onay Numarası: KOÜ HADYEK 7/2-2015

KOCAELİ
2018

KABUL VE ONAY

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(Tez Onay Sayfası)

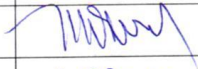



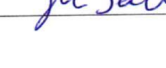
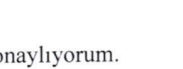
Tez adı: Endoplazmik Retikulum (ER) Stresinin Absans Epileptik Sıçanlarda Katlanmamış Protein Yanıtına Etkisinin Araştırılması

Tez yazarı: Sabriye KARADENİZLİ

Tez savunma tarihi: 20.06.2018

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Deniz ŞAHİN

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan Prof.Dr.Kasım ÖZLÜK	
Üye Prof.Dr.Hale MARAL KIR	
Üye Prof.Dr.Nurbay ATEŞ	
Üye Doç.Dr.Fatma KAYA DAĞISTANLI	
Üye Doç.Dr.Gamze TANRIVERDİ	
Üye (Danışman) Prof.Dr.Deniz ŞAHİN	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

...../...../20

Prof. Dr.

Enstitü Müdürü

ETİK KURUL



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



PROJE NO: 2015 /25 BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Endoplazmik retikulum (ER) stresinin absans epileptik sıçanlarda katlanmamış protein yanıtına (KPY) etkisinin araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Doç. Dr. Deniz ŞAHİN/ Kocaeli Üni Tıp Fak Fizyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Arş. Gör. Sabriye KARADENİZLİ, Doç. Dr. Murat KASAP, YARD. Doç. Dr. Gürler AKPINAR, Prof. Dr. Nurbay ATEŞ

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	x
--------------------------	----------------------------------	---

KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararına varılmıştır.	
	KARAR NO: KOU HADYEK 7/2 -2015	KARAR TARİHİ: 09.07.2015

ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili, Raportör	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deneysel Hayvanları Araştırma Birimi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Ülkem CİLASUN Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Murat KASAP Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Üye	KOU Deneysel Hayvanları Araştırma Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>[Signature]</i>
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>[Signature]</i>

ÖZET

ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN ABSANS EPİLEPTİK SİÇANLARDA KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITINA (KPY) ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Endoplazmik Retikulum (ER), transkripsiyon sonrası modifikasyonlardan başlayarak, proteinlerin doğru katlanmasına kadar birçok hücrel fonksiyonla ilişkilidir. Hücre içi kalsiyum dengesindeki bozulmalar, ER'in fizyolojik dengesini bozarak ER stresi oluşturmaktadır. Nörodejenaratif hastalıkların patolojisinin ER stresi ile ilişkili olduğu söylenmekle birlikte epilepsi ile ER stres arasında ilişkiyi gösteren çalışmalar çok sınırlıdır. Çalışmamızın amacı, düşük ve yüksek doz Tapsigargin (Tg) uygulayarak uyarılan ER stresinin, Wistar Albino Glaxo/Rijswick (WAG/Rij) ırkı sıçanlarda davranış-öğrenme, epileptik aktivite üzerine etkilerinin, korteks ve talamus dokularında moleküler düzeyde etkilerinin araştırılmasıdır.

Yöntem: Çalışmamızda 6-8 aylık WAG/Rij ırkı erkek sıçanlar kullanıldı. Epileptik aktivite, davranış-öğrenme testleri ve moleküler çalışmalar için ayrı gruplar oluşturuldu. Tg ve/veya Serum Fizyolojik(SF), Dimetil-sülfoksit(DMSO)'nun intraserebroventriküler uygulanabilmesi için kanüller ve/veya EEG kayıtları için elektrotlar yerleştirildi. Epileptik aktiviteyi değerlendirmek için EEG kayıtları alındı. Davranış-öğrenme deneyleri için lokomotor aktivite, pasif kaçınma ve water-maze testi yapıldı. Moleküler çalışmalar için GRP78 ve ERp57 protein değişimleri western blot tekniği, PERK, XBP-1, ATF6, CACNA1H mRNA ifadelerini incelemek için RT-PCR tekniği kullanıldı.

Bulgular: 20 ng ve 200 ng Tg uygulaması lokomotor aktivite ve pasif kaçınma üzerine etkili bulunmadı, water-maze testinde 200 ng Tg uygulaması, naif ve 20 ng Tg uygulanan gruba göre anlamlı düşüş görüldü. 20 ng Tg uygulamasında SWD aktivitesinin, 24. Saatte SF, DMSO ve 200 ng Tg gruplarına göre yüksek olduğu ve 48.saatte yüksek kaldığı tespit edildi. 20 ng Tg uygulanan grupta, talamus dokusunda GRP78 protein miktarı, Eif2ak3, CACNA1H ve XBP-1 mRNA ifadesinin arttığı gözlemlendi. 200 ng Tg uygulamasında talamus dokusunda ATF6 mRNA ifadesinde artış görüldü.

Sonuç: Düşük doz ER stres koşullarında artan GRP78 protein miktarı, Eif2ak3, XBP-1 ve CACNA1H mRNA ifadesi, talamik nöronların hayatta kalma süreçlerini tetikleyerek SWD aktivitesi üzerine artırıcı etki gösterebilir. Yüksek doz ER stress koşullarında artan ATF 6 mRNA ifadesi pro-apoptotik süreçleri tetikleyerek SWD aktivitesini düşürmüş olabilir.

Anahtar sözcükler: Absans epilepsi, ER stresi, GRP78, ATF6, EIF2AK3, CACNA1H

ABSTRACT

INVESTIGATING THE IMPACT OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS (ERS) ON UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR) IN ABSANCE EPILECTIC RATS

Objective: Endoplasmic Reticulum(ER) is associated with many cellular functions, from post-transcriptional modifications to the correct folding of proteins. Disturbances in intracellular calcium balance disrupts the physiological balance of ER. Although studies have shown that the pathology of neurodegenerative diseases is associated with ER stress, studies showing a relationship between epilepsy and ER stress are very limited. The aim of our study was to investigate the effects of ER stress induced by low and high doses of Thapsigargin(Tg) on behavioral learning, epileptic activity, and molecular levels in cortex and thalamus tissues of Wistar Albino Glaxo/Rijswick (WAG / Rij) rats.

Methods: 6-8 month old WAG/Rij male rats were used in this study. Separate groups were created for epileptic activity, behavioral-learning tests, and molecular studies. Electrodes for EEG recordings and cannulas for applying Tg, SF(Saline) and DMSO(Dimethyl sulfoxide) intracerebroventricularly, were placed on skull. EEG recors were taken to assess epileptic activity. Locomotor activity, passive avoidance and water-maze test were performed for behavior-learning experiments. RT-PCR technique was used to examine the expression of PERK, XBP-1, ATF6, CACNA1H mRNA and western blot technique to examine GRP78 and ERp57 protein changes.

Results: 20 ng and 200 ng Tg administration were not effective on locomotor activity and passive avoidance, 200 ng Tg administration showed a significant decrease in water-maze test compared to naive and 20 ng Tg group. It was found that the activity of SWD in 20 ng Tg administration was higher than SF(Saline), DMSO and 200 ng Tg groups at 24th hour and had remained to be high in 48th hour. In the group treated with 20 ng Tg increased GRP78 protein amount, Eif2ak3, CACNA1H and XBP-1 mRNA expression in the thalamus were observed. An increase in expression of ATF6 mRNA in the thalamus tissue was observed with 200 ng Tg administration.

Conclusions: Increased level of GRP78 protein amount EIF2AK3, XBP-1 and CACNA1H mRNA expression in low-dose ER stress conditions may exert an enhancing effect on SWD activity by triggering survival processes of thalamic neurons. Increased ATF 6 mRNA expression in high-dose ER stress conditions may have reduced SWD activity by triggering pro-apoptotic processes.

Keywords: Absance epilepsy, ER stress, GRP78, ATF6, EIF2AK3, CACNA1H



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca bilimsel bakış açısıyla daima örnek olan danışmanım, değerli hocam Prof.Dr. Deniz ŞAHİN'e, tez çalışmalarımı sürdürürken her konuda desteğini esirgemeyen saygıdeğer Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Nurbay ATEŞ'e

Tez çalışmalarım süresince bana engin bilgileriyle katkıda bulunan Doç.Dr. Gül İLBAY, Doç.Dr. Ayşe KARSON ve Doç.Dr. Yusufhan YAZIR'a

Bana laboratuvarlarının kapısını açan ve engin bilgileriyle yönlendiren değerli hocalarım Prof.Dr. Murat KASAP ve Doç.Dr. Gürler AKPINAR'a,

Zorlu koşullarda çalışma enerjisini ve desteğini esirgemeyen Dr.Öğr.Üyesi Zehra Seda Ünal Halbutoğulları ve Arş.Gör. Mehmet SARIHAN'a

Çalışmam boyunca bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili dostlarım Dr.Sema KURNAZ ÖZBEK, Arş.Gör. Özgür Doğa ÖZSOY ve

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Arş.Gör.Fazilet DEDE, Dr.Tuba ŞAHİN ve DETAB çalışanlarına,

Eğitimim süresince gösterdikleri destek, anlayış ve hoşgörü için sevgili dostlarıma, annem Günnar KARADENİZLİ, babam Erol KARADENİZLİ ve kardeşim Sabiha ORDUKUZKUN'a teşekkür ederim.

Sabriye KARADENİZLİ
KOCAELİ, Haziran 2018

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

/ / 2018

Sabriye KARADENİZLİ

İmza

TEZ DENETLEME LİSTESİ

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program,yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

..... / / 2018

Prof.Dr. Deniz ŞAHİN

İmza

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
ETİK KURUL	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	ix
TEZ DENETLEME LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
ÇİZİMLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Epilepsi Tanımı	1
1.2. Epilepsi Nöbetleri ve Sınıflandırılması	1
1.3. Epilepsinin Etiyolojisi ve sınıflandırılması	5
1.4. Epilepsinin Epidemiyolojisi	6
1.5. Absans Epilepsi	7
1.6. Absans Epilepsi Teorileri	10
1.6.1. Sentrensafalik Teori.....	10
1.6.2. Kortikal Teori	10
1.6.3. Kortikoretiküler Teori.....	11
1.6.4. Talamik Saat Teorisi.....	12
1.6.5. Kortikal Odak Teorisi.....	13
1.7. Absans Epilepsi Modelleri.....	14
1.8. Absans Epilepsi Patofizyolojisi	17
1.9. Absans epilepsi patolojisinde T-tipi Ca ²⁺ kanalının rolü.....	18
1.10. Endoplazmik retikulum ve kalsiyum metabolizması.....	19
1.11. Endoplazmik Retikulum stresi ve katlanmamış protein yanıtı.....	20
1.12. GRP78	21
1.13. PERK.....	22
1.14. ATF 6.....	23
1.15. IRE1/XBP-1:	23
1.16. ERp57	24

1.17. Tapsigargin	24
2.AMAÇ	26
3. YÖNTEM.....	29
3.1. Hayvanların Eldesi ve Genel Deney Prosedürü	29
3.2. Çalışmada kullanılan solüsyonlar	30
3.3. EEG elektrotlarının ve kanülün intraserebroventriküler yerleştirilmesi için uygulanan cerrahi işlemler	31
3.4.Tapsigargin, Serum Fizyolojik ve Dimetilsülfoksidin İntraserebroventriküler Uygulanması	32
3.5. Elektrofizyolojik Parametrelerin Kaydedilmesi ve Değerlendirilmesi	32
3.6. Davranış Testlerinin Uygulanması ve Değerlendirilmesi	32
3.6.1. Lokomotor Aktivitesi	32
3.6.2. Water Maze (Morris'in Su Labirenti) Testi	33
3.6.3. Pasif Kaçınma Testi.....	33
3.7. Sıçanların İntrakardiyak Perfüzyonu ve Dokuların Elde Edilmesi	34
3.8.Western Blot Tekniği İçin Dokulardan Protein Örneklerinin Elde Edilmesi.....	34
3.8.1.Elde Edilen Protein Örneklerinin Konsantrasyonunun Bradford Yöntemiyle Ölçülmesi	34
3.8.2. Protein Örneklerinin Yürütülmesi Ve Protein Kalitesinin Belirlenmesi.....	35
3.8.3. Kalitesi Belirlenen Protein Örneklerinden Havuz Hazırlanması.....	35
3.8.4. Yürütülen Protein Örneklerinin Membrana Aktarılması, Kontrolü Ve İmmünoyotlama	36
3.9.RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	37
3.9.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	38
3.10. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Intraserebroventriküler Kanülün Doğru Yerleştirildiğinin Gösterilmesi- Doğrulanması .	39
4.2. Lokomotor Aktivitesinin Değerlendirilmesi	40
4.3. Pasif Kaçınma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	41
4.4. Water Maze Sonuçlarının Değerlendirilmesi	43
4.5. EEG Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	44
4.5.1. SF Uygulamasının EEG Aktivitesi Üzerine Zamana Göre Etkisinin Değerlendirilmesi	44
4.5.2. DMSO Uygulamasının EEG Aktivitesi Üzerine Zamana Göre Etkisinin Değerlendirilmesi	45
4.5.3. 20 ng Tg uygulamasının EEG aktivitesi üzerine zamana göre etkisinin değerlendirilmesi	46

4.5.4. 200 Ng Tg Uygulamasının EEG Aktivitesi Üzerine Zamana Göre Etkisinin Değerlendirilmesi	47
4.5.5. Tüm Grupların Eeg Aktivitelerinin Zamana Göre Karşılaştırılması.....	49
4.6.1. GRP78 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	50
4.6.2. Erp57 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	51
4.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	52
4.7.1. Eif2ak3 (PERK geni).....	52
4.7.2. XBP-1 Geni	53
4.7.3. ATF6 Geni.....	54
4.7.4. CACNA1H Geni	55
4.8 Tüm Verilerin Özeti.....	57
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AE	Absans Epilepsi
AMPA	2-amino-3-(3-hidroksi-5-metilizosoksazol-4-yl) propiyonik asit
ANNA-1	Tip 1 anti-nöral nükleer faktör (Anti-neural nuclear factor type-1)
ATF 4	Aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (Activating transcription factor 4)
ATF 6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (Activating transcription factor 6)
ATP	Adenozin trifosfat
BCC	Bikukulin
BSA	Bovin serum albümin
CaBP	Kalsiyum bağlayan proteinler (Calcium binding protein)
cADPR	siklik ADP-riboz
CHOP	Cytosine-cytosine-adenine-adenine-thymine-Enhancer-Binding Protein (C/EBP) Homologous Protein
CICR	Kalsiyum kaynaklı kalsiyum salınması
CMV	Sitomegalovirüs
DMSO	Dimetil-sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EEG	Elektroensefalogram
EMBASE	Excerpta Medica dataBASE
EMG	Elektromiyografi
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	Katlanmamış protein yıkımı
GABA	Gamma aminobutirik asit
GAD65	Glutamik asit dekarboksilaz
GAERS	Genetik absans epileptik sıçanlar Strasbourg
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GHB	Gamma-hidroksi-biturat
GluR5	Glu(K5) kainat reseptörü
GRP78	Glukoz regule edici protein 78 (Glucose regulated protein 78)
HCN1	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1
HIV	İnsan bağışıklık eksikliği virüsü (Human immunodeficiency virüs)
Hsp70	Isı şok proteini (heat shock protein) 70
Hz	Hertz

ILAE	International League Against Epilepsy (Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği)
IRE 1	İnozitol gerektiren enzim 1 (İnositol requiring enzyme 1)
KA	Kainik asit
KDa	Kilo Dalton
KDEL	ER şaperonlarında Lys-ASp-Glu-Leu motifi
KPY	Katlanmamış protein yanıtı
MEDLINE	Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLARS)
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NE	Nükler zarf (Nuclear envelope)
NMDAR	N-metil D-Aspartat reseptörleri
PCL	Penislin
PDIA3/ERp57	Protein disülfid izomeraz A3
PERK	Protein Kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz
PTX	Pikrotoksin
PTZ	Pentiltetrazol
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SERCA	Sarko-endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz
SF	Serum Fizyolojik
SPo	Korteksin Peri-Oral Bölgesi
SR	Sarkoplazmik retikulum
STZ	Streptozosin
SWD	Diken Dalga Deşarjları (Spike Wave Discharges)
Tg	Tapsigargin
TRN	Talamik retiküler nükleus (Talamic reticular nucleus)
VB	Ventrobazal çekirdek
VBKK	Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları
VGKC	Voltaj kapılı potasyum kanalları kompleksi (voltage gated potassium channel complex)
VPA	Valporik Asit
WAG/Rij	Wistar Albino Glaxo/Rijswick
WB	Western Blot

XBP-1

X kutusu bağlanma proteini-1



ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Nöbet çeşitlerinin güncel sınıflandırılması.....	4
Çizim 1. 2. Tipik bir absans epilepsi nöbetinin EEG kaydı.	9
Çizim 1. 3. Absans epilepsi teorileri.....	14
Çizim 1. 4. ER stresi sırasında aktif olan yolaklar ve moleküller.....	22
Çizim 3. 1. i.c.v. için kullanılan kanüllerin özellikleri ve sağ ventriküle yerleştirilmesi.....	31
Çizim 3. 2. Bant yoğunluklarının ölçülmesi.....	35
Çizim 3. 3. Membrana aktarılan proteinlerin Ponceau S boyası kullanılarak kontrol edilmesi.....	37
Çizim 4. 1. Kanüllerin doğru bölgeye yerleştirilmesi için kullanılan malzeme, alet ve cihazlar.	39
Çizim 4. 2. Intraserebroventriküler enjeksiyonun doğrulanması-verifikasyon.....	40
Çizim 4. 3. Tüm grupların A: enjeksiyon öncesi ve B: 24 saat sonrası lokomotor aktivitelerinin karşılaştırılması.....	41
Çizim 4. 4. Tüm grupların elektrik uygulamasından 24 saat sonra karanlık bölgeye geçme süreleri.....	42
Çizim 4. 5. Tüm grupların bazal ve ilaç uygulamasından 24 saat sonra pasif sakınma testinin karşılaştırılması.....	43
Çizim 4. 6. Water-maze testi sonuçları karşılaştırılması.....	44
Çizim 4. 7. i.c.v SF enjeksiyonunun A: SWD sayısı, B: toplam SWD süresi ve C: ortalama SWD süresi üzerine etkisi.	45
Çizim 4. 8. i.c.v DMSO enjeksiyonunun A: SWD sayısı, B: toplam SWD süresi ve C: ortalama SWD süresi üzerine etkisi.....	46
Çizim 4. 9. 20 ng Tg uygulamasının A: SWD sayısı, B: toplam SWD süresi ve C: Ortalama SWD süresi üzerine zamana göre etkisi.	47
Çizim 4. 10. 200 ng Tg uygulamasının A: SWD sayısı, B: Toplam SWD süresi ve C: Ortalama SWD süresi üzerine zamana göre etkisi.	48
Çizim 4. 11. Tüm grupların bazal ve ilaç uygulamasından 1.,24. ve 48.saat sonra SWD sayısının değerlendirilmesi.....	49
Çizim 4. 12. Tüm grupların bazal ve ilaç uygulamasından 1.,24. ve 48.saat sonra ortalama SWD süresinin değerlendirilmesi.....	50
Çizim 4. 13. Tüm grupların bazal ve ilaç uygulamasından 1.,24. ve 48.saat sonra toplam SWD süresinin değerlendirilmesi.....	50
Çizim 4. 14. GRP78 protein miktarının gösterilmesi.....	51
Çizim 4. 15. ERp57 protein miktarının gösterilmesi.....	52
Çizim 4. 16. Talamusve korteks dokusunda Eif2ak3 gen ifadelerinin karşılaştırılması.	53
Çizim 4. 17. Talamus ve korteks dokusunda XBP-1 gen ifadelerinin karşılaştırılması.....	54
Çizim 4. 18. Talamus ve korteks dokusunda ATF6 gen ifadelerinin karşılaştırılması.	55
Çizim 4. 19. Talamus ve korteks dokusunda CACNA1H gen ifadelerinin karşılaştırılması.	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Epileptik nöbetlerin klinik ve elektroensefalografik sınıflandırması.....	2
Çizelge 1.2. Absans nöbetlerin bulunduğu sendromların ILAE tarafından sınıflandırılması	9
Çizelge 3.1. Deney için kullanılan hayvan grupları	29
Çizelge 3.2. İmmunoblotlama için havuz oluşturulan protein örnekleri.....	36
Çizelge 3.3. Değerlendirilen proteinler için kullanılan antikorların özellikleri	37
Çizelge 4.1. Bazal ve 24.saat lokomotor aktivitelerinin ortalamaları.	40
Çizelge 4. 2. Tüm grupların elektrik uygulandıktan 24 saat sonra karanlık bölgeye geçme süreleri.	42
Çizelge 4. 3. Kadranda yüzme sürelerinin ortalamaları	43
Çizelge 4. 4. SF uygulamasının zamana bağlı etkisinin SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süresi ortalamaları.....	44
Çizelge 4. 5. DMSO uygulamasının zamana bağlı etkisinin SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süresi ortalamaları.....	45
Çizelge 4. 6. 20 ng Tg uygulamasının zamana bağlı etkisinin SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süresi ortalamaları.....	47
Çizelge 4. 7. 200 ng Tg uygulamasının zamana bağlı etkisinin SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süresi ortalamaları.....	48
Çizelge 4. 8. Tüm grupların GRP78 protein miktarları.....	51
Çizelge 4. 9. Tüm grupların ERp57 protein miktarları.....	52
Çizelge 4. 10. Eif2ak3 gen ifadelerinin ortalamaları,.....	53
Çizelge 4. 11. XBP-1 gen ifadelerinin ortalamaları, veriler ortalama \pm SEM olarak ifade edildi.	54
Çizelge 4. 12. ATF 6 gen ifadelerinin ortalamaları.....	55
Çizelge 4. 13. CACNA1H gen ifadelerinin ortalamaları.....	56
Çizelge 4. 14. SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg uygulamalarının SWD sayısı üzerine etkisi (anlamlı \uparrow artışı, \downarrow azalışı, - anlamlı olmayan verileri ifade etmektedir)	57
Çizelge 4. 15. SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg uygulamalarının Water Maze testi üzerine etkisi (anlamlı \uparrow artışı, \downarrow azalışı, - anlamlı olmayan verileri ifade etmektedir).....	57
Çizelge 4. 16. SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg uygulamalarının talamus dokusunda GRP78 ve ERp57 protein miktarına, Eif2ak3, XBP-1, ATF6 ve CACNA1H mRNA ifadesi üzerine (anlamlı \uparrow artışı, \downarrow azalışı, - anlamlı olmayan verileri ifade etmektedir).....	57

1. GİRİŞ

1.1. Epilepsi Tanımı

Henüz sinir sistemi hastalıkları için sistemli tanı yöntemlerinin bulunmadığı 1870 yılında, ünlü nörolog John Hughlings-Jackson ‘Konvulsiyonlar ile ilgili bir çalışma’ adlı makalesinde epilepsinin tanımını ‘Konvulsiyon sadece bir semptomdur ve kaslar üzerine etki eden sinir dokusunda ara sıra görülen, aşırı ve düzensiz deşarjlar anlamına gelmektedir’ şeklinde yapmıştır. Hughlings-Jackson, korteksin geleneksel olarak uyarılmayan bir doku olduğuna inanılmasına rağmen, epilepsi nöbetlerinin korteksten kaynaklandığını varsaymıştır. Epileptik nöbetlerin büyük bir olasılıkla korteks ve striatum beyin bölgelerinde bulunan gri maddenin kararsızlığından kaynaklandığını ileri sürmüştür (York ve Steinberg 2006).

Epilepsi nöbeti, beyinde anormal, aşırı ve senkronize nöronal aktivite kaynaklı geçici belirtiler veya semptomlar olarak tanımlanmaktadır. 2004 yılında epilepsi nöbeti için yapılan bu tanımlama, 2014 yılında tekrar değerlendirildiğinde değişmeyerek aynı şekilde ifade edilmiştir (Falco-Walter ve diğ. 2018). Epilepsi nöbeti, klinikte motor, sensöriyel, duygusal, bilişsel ve otonom, sıklıkla pozitif (fokal ve/veya jeneralize kasılmalar ve halüsinasyonlar gibi), nadiren negatif belirtilerle (çevreyle olan ilişkinin kesilmesi) şekillenmektedir (Derwentv1998, Engel 2002). Kısacası epilepsi, tekrarlayıcı nöbetlerle tanımlanan ve en az iki kere tekrarlanma eğiliminde olan nörolojik bir rahatsızlıktır. 2014 yılında epilepsinin ‘hastalık’ yerine ‘rahatsızlık’ olarak belirtilmesi daha uygun görülmüştür (Fisher ve diğ. 2005, Fisher ve diğ. 2017). Nöbetler farklı beyin bölgelerinden kaynaklanabilir. Epileptik nöbetlerin klinik tablosunu buldukları farklı anatomik yapılar belirlemektedir (Gale 1988).

1.2. Epilepsi Nöbetleri ve Sınıflandırılması

Epilepsi nöbetleri, International League Against Epilepsy (ILAE=Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği) 1981 sınıflandırmasına göre genel olarak üç ana grupta toplanabilir;

- 1) Parsiyel nöbetler
- 2) Jeneralize nöbetler
- 3) Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler (Çizelge 1.1).

Çizelge 1. 1. Epileptik nöbetlerin klinik ve elektroensefalografik sınıflandırması (ILAE 1981, www.turkepilepsi.org.tr).

EPİLEPTİK NÖBETLER		
Parsiyel (fokal, lokal) nöbetler	Jeneralize nöbetler (konvülfif-konvülfif olmayan)	Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler
<p>a)Basit parsiyel nöbetler -Motor semptomlu -Somatosensoriyel veya özel duysal semptomlu -Otonomik semptomlu -Psişik semptomlu</p>	<p>-Absans nöbetleri Tipik Absans nöbetleri Atipik absans -Miyoklonik nöbetler -Klonik nöbetler -Tonik nöbetler -Tonik-klonik nöbetler -Atonik nöbetler (astatik) (ani düşme nöbetleri)</p>	<p>Yeterli bilgi olmayışı nedeni ile yukarıdaki kategorilere dahil edilemeyen nöbetlerdir. Çiğneme, ritmik göz hareketleri gibi bazı yenidoğan dönemi nöbetleri bunlardandır. -Parsiyel : kısmi, bütünü bir bölümü -Somato : vücut; sensoryel -Otonomik: istem dışı hareketlerle ilişkili örneğin kalp hızı, terleme gibi -Psişik: hem akli hem de beyni etkileyen -Otomatizm; kişinin kontrolü altında olmayan yarı amaçlı hareketler. Örneğin yalanma, yutkunma hareketleri, elbiseleri çekiştirme ve sarhoş gibi yürüme şeklinde hareketler. - Sekonder jeneralize; sınırlı bir bölgeden başlayıp yaygın hale dönüşen (genelde tonik-klonik nöbet oluşur)</p>
<p>b)Kompleks parsiyel nöbetler (bilinç bozukluğu ile giden) -Basit parsiyel başlangıcı izleyen bilinç bozukluğu Basit parsiyel başlangıcı izleyen bilinç bozukluğu Otomatizmlerle giden -Bilinç durumunun başlangıçtan itibaren bozulması Sadece bilinç bozukluğu ile giden Otomatizmlerle giden</p>		
<p>c)Sekonder jeneralize nöbete dönüşen parsiyel nöbetler -Basit parsiyel nöbetin jeneralize nöbete dönüşmesi -Kompleks parsiyel nöbetin jeneralize nöbete dönüşmesi -Basit parsiyel nöbetin kompleks parsiyel nöbete dönüşmesi ve ardından jeneralize nöbete dönüşmesi</p>		

1) Parsiyel nöbetler: Nöbetler beynin belirli bir bölgesinde bulunan hücre topluluğunun aktivasyonu sonucu oluşuyorsa parsiyel nöbetlerden bahsedilir. Vücudun belirli bölgelerinde kasılmalarla karakterize olan şekli ‘basit parsiyel nöbetler’ olarak adlandırılırken, parsiyel nöbetlere bilinç kaybı eklendiğinde kompleks parsiyel nöbetler olarak adlandırılmaktadır. Klinik ve EEG bulguları ilgili bölgenin işlevsel özelliklerini işaret etmektedir (Derwent 1998).

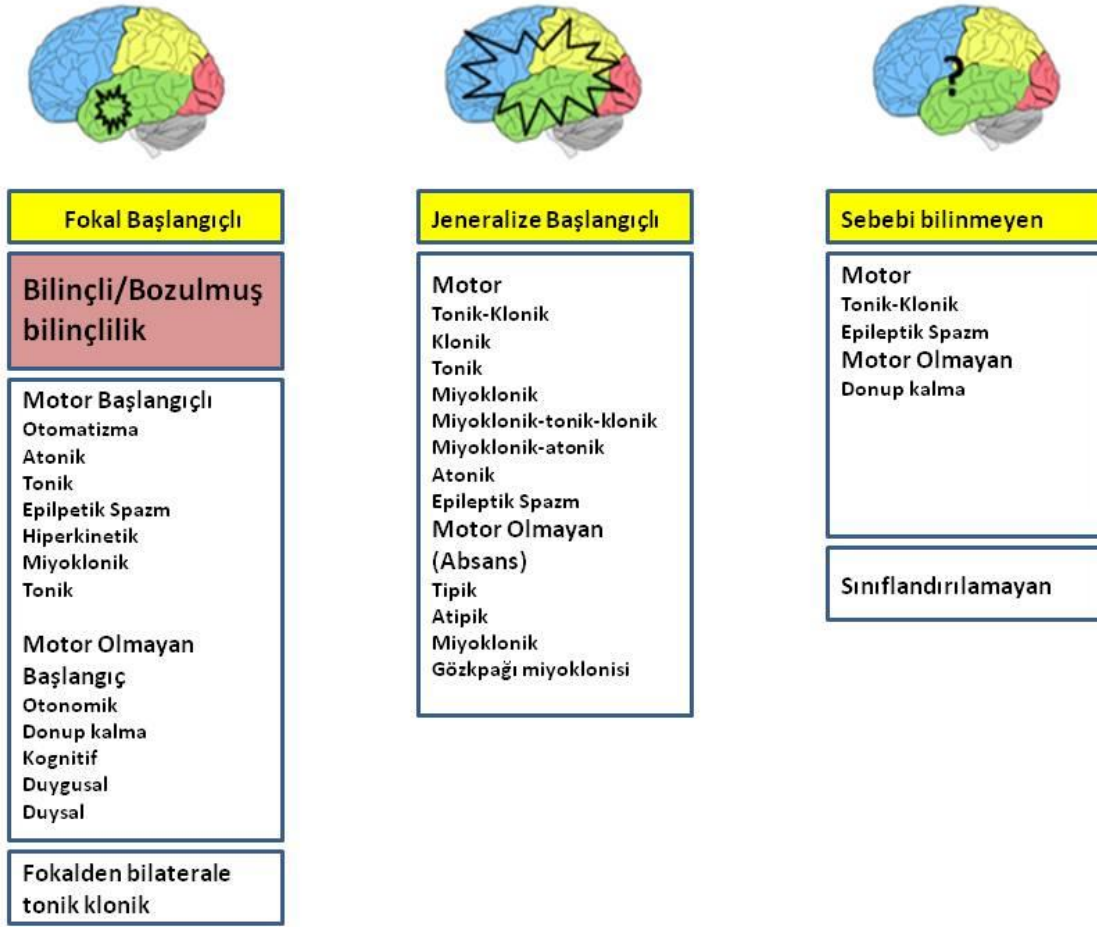
2) Jeneralize nöbetler: Beynin her iki yarım küresinde aynı anda başlayan nöbet aktivitesidir.

Bu nöbet tipleri ayrıca epilepsilerin lokalizasyona göre sınıflandırılmasına yardımcı olmaktadır.

3) Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler: Yeterli bilgi olmaması nedeniyle kategorilere dâhil edilemeyen nöbet tipidir.

Nöbetler sadece kasılmayla karakterize değildir, etkilediği beyin bölgesine göre uyuşukluk, karıncalanma hissi, tad, işitsel ya da görsel duyularla ilgili halüsinasyonlara sebep olabilir. Bu tür nöbetlere **duysal nöbetler** adı verilir. Kusma, terleme, kızarma veya göz bebeklerinin genişlemesiyle karakterize nöbet tiplerine ise **otonom nöbetler** denir.

2017 yılında ILAE epilepsi nöbetlerini yeniden sınıflandırmış ve nöbetleri genel olarak; fokal, jeneralize ve bilinmeyen şeklinde üç ana başlıkta toplamıştır (Çizim 1.1).



Çizim 1. 1. Nöbet çeşitlerinin güncel sınıflandırılması, 2017 (<https://www.epilepsy.org.au/about-epilepsy/understanding-epilepsy/seizure-types-and-classification/>; Fisher ve diğ. 2017, genişletilmiş versiyon).

1981'den 2017'ye nöbet tipi sınıflandırılmasındaki değişiklikler şu şekildedir;

- 1) Parsiyel (kısmi) nöbetler yerine fokal (odak) terimi kullanılmaktadır.
- 2) Nöbet tipleri fokal, jeneralize başlangıçlı ya da sebebi bilinmeyen olabilir.
- 3) Sebebi bilinmeyen nöbetler, hala sınıflandırılabilen özelliklere sahip olabilir.
- 4) Bilinç (farkındalık), fokal nöbetlerin sınıflandırıcısı olarak kullanılır.
- 5) İdrak bozukluğu, basit parsiyel, kompleks parsiyel, sekonder jeneralize nöbetler gibi kavramlar elimine edilmiştir.
- 6) Yeni fokal nöbet tipleri otomatizmaları, otonomik, davranış tutukluğu, bilişsel, duygusal, hiperkinetik, duysal ve iki taraflı tonik-klonik nöbetlere odaklanmayı içerir. Atonik, klonik, epileptik spazmlar, miyoklonik ve tonik nöbetler fokal veya jeneralize olabilir.

7) Yeni jeneralize nöbetler; gözkapağı miyoklonili absans, miyoklonik absans, miyoklonik-tonik-klonik, miyoklonik-atonik ve epileptik spazmları içermektedir (Fisher ve diğ. 2017).

1.3. Epilepsinin Etiyolojisi ve sınıflandırılması

ILAE, epilepsi için altı etiyolojik kategori tanımlamıştır; genetik, metabolik, yapısal, immünolojik, enfeksiyöz ya da bilinmeyen kaynaklar (Falco-Walter ve diğ. 2018, Katsarou ve diğ. 2017).

1) **Genetik etiyoloji:** Epilepsi için patojenik olduğu düşünülen özgün bir hastalığa neden olan gen bölgesinde ya da sayısında gerçekleşen değişiklikler, epilepsinin genetik sınıflandırması içinde yer almaktadır. Moleküler genetik tanısı yapılmadan aile hikayesinde epilepsi tanısı konmuş olması ve tipik EEG paternlerinin görülmesi de genetik etiyolojisine dâhil edilmektedir. Ancak genetik kaynaklı epilepsilerin çoğunda aile hikâyesi bulunmamaktadır ve genetik değişiklikler hastada yeni oluşmuştur (Hildebrand ve diğ. 2013).

2) **Metabolik Etiyoloji:** Metabolik bozukluklardan kaynaklı epilepsi hastalarından bahsetmektedir. Ancak akut-semptomatik nöbetle sonuçlanan geçici metabolik bozukluğu olan bir kişide nöbetlerin ateşlendiği şekilde değerlendirilemez. Bu nedenle bu kişilerde epilepsi bulunmaz. Metabolik epilepsilerin çoğu genetik etiyoloji sınıfına girmektedir ancak bazıları sonradan edinilmiş olabilir. Örneğin; piridoksin bağımlı nöbetler ve serebral folat yetersizliği (Parikh ve diğ. 2015).

3) **Yapısal Etiyoloji:** Klinik bulgular ve EEG ile uyumlu, hastanın nöbetine sebep olduğu sonucuna varılmış nörolojik görüntünün elde edilmesi, yapısal etiyoloji içerisinde değerlendirilmektedir (Lapalme-Remis ve Cascino 2016). Nöbet semiyolojisi ve EEG bulguları ile uyuşmayan görüntüler, hastanın epilepsisi ile ilişkili değildir. Bu nedenle epilepsinin tanımlanması esnasında dikkate alınmaz (Scheffer ve diğ. 2017).

4) **İmmunolojik Etiyoloji:** Epilepsinin başlamasına sebep olan oto-immunolojik hastalıklardan bahsedilir. Antikor aracılı limbik ensefalit, bilinmeyen orijinli epilepside giderek artan oranda kabul gören bir nedendir, ancak bu etiyolojinin sadece limbik veya ekstrasellöz ensefaliti işaret etmediğine dikkat edilmelidir. Otoimmün ensefalit ve epilepsi arasındaki bağlantı, nöronal hücre içi antikorlarla (GAD65, ANNA-1 ve Ma) ve nöronal hücre yüzey antikorlarıyla (VGKC kompleksi, NMDAR, AMPA, GABA-B ve GluR5) kurulmuştur (Correll 2013, Toledrano ve Pittock 2015).

5) **Enfeksiyöz Etiyoloji:** Bir akut enfeksiyon nedeniyle nöbet geçiren bir hastayı değil, kronik enfeksiyon sonucu gelişen epilepsiyeye sahip olan hastayı belirtir. Nöbeti artmadığı sürece akut enfeksiyon geçiren bir hastanın durumu epilepsi olarak nitelendirilemez

(dolayısıyla epilepsi tipi sınıflandırma yapılmamalıdır). Enfeksiyöz etiyolojilere örnek olarak şunlar verilebilir: nörosistiserkoz, Human Immunodeficiency Virus (HIV), Cytomegalovirus (CMV), serebral toksoplazmoz. Bunların birçoğu yapısal etiyoloji olarak da düşünülebilir. Tedavi edilmiş bir enfeksiyondan dolayı nöbet geçirmiş hastalar (örneğin; menenjit), enfeksiyon kaynaklı epilepsi içerisinde sınıflandırılabilir (Vezzani ve diğ. 2016).

6. Bilinmeyen Etiyoloji: Sebebi hala tespit edilememiş epilepsi hastalarını tarif etmektedir.

Epilepsiler etiyolojik bir zeminde 3 ana başlık altında toplanmıştır;

1) İdiopatik Epilepsi: Sebebi bilinmeyen epilepsi türü olarak tanımlanmıştır. Genellikle ailesel kökenli veya genetik olduğu düşünülmektedir. İdiopatik epilepsilerde gelişme basamakları normaldir ve herhangi bir patolojik süreç tespit edilemez. Ailesel özellik dikkati çeker.

2) Semptomatik Epilepsiler: Tanımlanması ve anlaşılması kolay olan epilepsi türüdür. Altta yatan biyokimyasal veya organik sebepler bilinmektedir. Enfeksiyöz hastalıklar, tümör ve geçirilmiş travmalar epilepsinin seyrini etkiler.

3) Kriptojenik Epilepsiler: Sebebi bilinmeyen epilepsi türlerine verilen genel bir addır. Genellikle semptomatik olduğu düşünülür. Ancak sınıflandırılmaya yetecek ölçütlere sahip değildir.

Etiyolojik durumu belirlenmiş olan durumlar “epilepsi”, belirlenmemiş olanlar ise “epilepsi sendromu” olarak tanımlanır.

1.4. Epilepsinin Epidemiyolojisi

Epilepsi; her yaşta, çeşitli coğrafik bölgelerde, farklı sosyal ve ekonomik şartlarda görülebilen ve dünya genelinde 65 milyon insanı etkileyen nörolojik bir rahatsızlıktır (Katsarou ve diğ. 2017). Görülme sıklığı motor nöron hastalıklarından yüz kat, multipl sklerozdan on kat daha fazladır (Porter 1993). 2010 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, WHO=World Health Organisation) epilepsiyi, baş ağrısından sonra ikinci en sık görülen ve sıkıntı veren nörolojik rahatsızlık olarak tanımlamıştır (Fiest ve diğ. 2016). Epilepsinin görülme sıklığı ülkelerin gelişmişlik düzeyine göre değişmektedir. Evrensel bir rahatsızlık olmasına rağmen, görülme sıklığı eşit olmayan bir dağılım göstermektedir. Epilepsi hastalarının %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir. Epilepsi insidansının ve prevalansının düşük gelirli ülkelere oranla daha yüksek olduğu ve bu durumun düşük gelirli ülkelere tedaviye ulaşımın daha zor olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Espinosa-Jovel ve diğ. 2018). Antiepileptik tedavi gören hastaların %20-30'u tedaviye yanıt vermemektedir (Kwan ve Brodie 2000).

Fiest ve arkadaşlarının Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE, MEDLARS) ve EMBASE (Excerpta Medica dataBASE) verilerine dayanarak yapmış oldukları meta-analiz çalışmalarında, aktif epilepsi prevalansını 1000 kişide 6.8, yaşam boyu prevalansı ise 1000 kişide 7.90 olarak hesaplamışlardır. Epilepsinin yıllık kümülatif insidansının 100.000 kişide 67.77, insidans oranının ise 10000 kişide 61.44 olduğunu hesaplamışlardır. Yaş ve cinsiyetin epilepsi prevalansını etkilemediğini ancak yaşam boyu prevalans ve insidans oranının orta ve düşük gelirli ülkelerde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Fiest ve diğ. 2016).

1.5. Absans Epilepsi

Absans epilepsi, aktivitenin durması ve geçici bir bilinç değişikliği ile ilişkili olarak yaygın, konvulsif olmayan nöbetlerle karakterize olan özel bir epileptik sendromdur. Bu absans nöbetleri, genellikle hastalarda hafif otomatizma ya da uzuvları, göz küresini veya göz kapaklarını etkileyen orta derecede tonik-klonik bileşenlerle görülür (Panayiotopoulos 1999). Tipik absans nöbetleri EEG’de bilateral, senkron ve düzenli 3-Hz SWD ile ilişkilidir. Bu nöbetler ilk önce 5-7 yaş civarında görülür ve daha sonra sessiz uyanıklık, dikkatsizlik ve uyku ile uyanış arasındaki geçişlerde düzenli olarak meydana gelir. Genellikle 10-20 saniyeden (sn) az sürer, ancak bazı hastalarda sık görülür. Absans nöbetlerinin farmakolojik duyarlılığı oldukça eşsizdir: diğer birçok epilepsi formunda etkisiz olan etosüksimid tarafından bastırılır, fakat tedavisi için aynı zamanda bazı geniş spektrumlu antiepileptik ilaçlar da kullanılır (örn. Valproat ve daha az etkinlik için lamotrijin) (Tenney ve Jain 2014, Glauser ve diğ. 2013). Jeneralize konvulsif ve parsiyel nöbetlere karşı oldukça etkili olan karbamazepin ve fenitoin ile absans nöbetleri şiddetlenirler (Panayiotopoulos 1999). Absans nöbetleri yanında bilişsel ve duysal komorbiditeler de tanımlanmıştır ancak başka nörolojik bozukluklarla ilişkili değildir (Caplan ve diğ. 2008). Tipik çocukluk çağı epilepsisinde, ergenlik döneminde hastaların yaklaşık %70’inde düzelme görülmektedir.

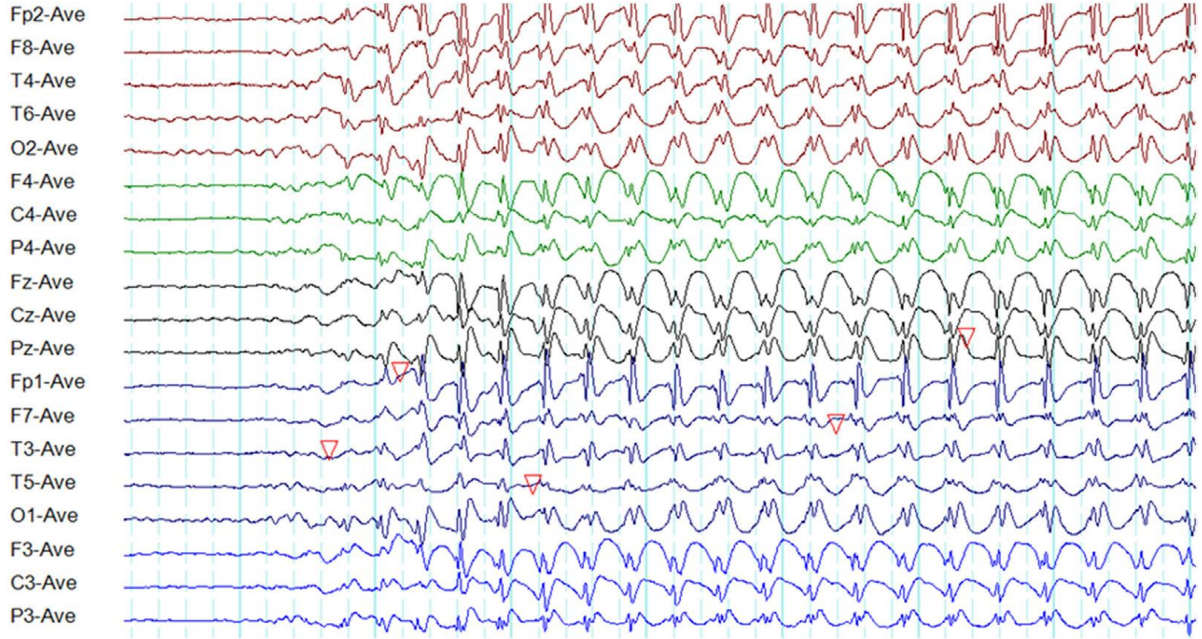
Genetik jeneralize epilepsiler, klinik özelliklerine ve elektroensefalogram (EEG) karakteristiğine göre sınıflandırılan ve tanısı konan elektroklinik sendromlar olarak tanımlanmaktadır (Berg ve diğ. 2010, Scheffer ve diğ. 2017). Genetik jeneralize epilepsi yaygındır ve epilepsi tanısının yaklaşık %20’sini oluşturur (Jallon ve Latour 2005). Jeneralize absans epilepsilerin EEG kayıtlarında ayırt edici özelliği; bilateral senkron, simetrik ve jeneralize ‘diken dalga deşarjları’dır (SWD=Spike Wave Discharge). Absans nöbeti tanımlayan SWD’nin süresi hakkında genel bir fikir birliği yoktur. Sadlier ve arkadaşları absans nöbetleri iki kritere göre tanımlamıştır; (1) herhangi bir zamanda klinik

bulgulara eşlik eden SWD'ler ve (2) klinik bulguların eşlik etmediği ve 2 sn.den fazla süren SWD'ler. 2 sn.den az süren, klinik bulguların eşlik etmediği deşarjlar interiktal fragmanlar olarak adlandırılmaktadır (Sadleir ve diğ. 2009). SWD kompleksinin maksimum genliği en sık fronto-sentral bölgede (%96,3) görülür, bunu fronto-polar (%2,4) ve oksipital (%1.3) bölgeler izler. Son yapılan çalışmalarda klinik bulgular olsun ya da olmasın 3 sn. ve daha fazla süren SWD, absans nöbet olarak değerlendirmektedir (Dlugos ve diğ. 2013).

Çeşitli absans nöbetleri tanımlanmıştır (Berg ve diğ. 2010, Luders ve diğ. 2006; Getaut 1970). En çok bilinen ve 1981'de ilk olarak ILAE tarafından tanımlanan, tipik ve atipik absans nöbetlerdir. Her iki nöbet arasında büyük farklar vardır. Tipik absans nöbeti, klinik özelliklere ve iktal ile interiktal özelliklere göre tanımlanır. Tipik bir absans epilepsi nöbetinde SWD frekansı 2-4 Hz aralığında görülmektedir (Çizim 1,2). Atipik absans nöbetli bireylerin genellikle yavaş bir EEG arka planı vardır. Bu nöbet tipine genellikle zihinsel yetersizlik ve diğer birçok nöbet tipi eşlik edebilir. Tıbbi tedaviye daha zayıf yanıt verir ve daha kötü bir klinik tablo sergiler (Çizelge 1.2).

Çocukluk çağı absans epilepsisi ve juvenil absans epilepsisi, bu sendromların her birinde nöbet türü tipik absans nöbeti olan arketipik absans epileptik sendromlarıdır (ILAE 1981, 1989). ILEA çocukluk çağı epilepsisi için sendrom sınıflandırması aşağıdaki kriterleri içermektedir:

- (1) Okul çağındaki çocuklarda ortaya çıkar (6–7 yaş arası pik görülmektedir),
- (2) Sık absans nöbetler görülür (günde birkaç defa veya daha fazla),
- (3) EEG, normal bir arka plan aktivitesi üzerinde, genellikle 3 Hertz (Hz), bilateral, senkron simetrik SWD'ler ortaya koymaktadır (Çizim 1.2),
- (4) Ergenlik döneminde sıklıkla jeneralize tonik-klonik nöbetler gelişir. Absans nöbetler, daha seyrek olabilir ya da nadiren tek nöbet tipi olarak devam edebilir.



Çizim 1. 2. Tipik bir absans epilepsi nöbetinin EEG kaydı. Frontosentral maksimada jeneralize, simetrik, senkron ve düzenli 3 Hz SWD görülmektedir (Seneviratne ve diğ. 2017).

Çizelge 1.2. Absans nöbetlerin bulunduğu sendromların ILAE tarafından sınıflandırılması (Carney ve Jackson 2014)

Sendrom	Absans Epilepsi türü	Diğer epilepsi türleri
Jeneralize genetik epilepsilerin alt sendromları		
Çocukluk çağı absans epilepsi	Tipik absans epilepsi	Generalize tonik klonik nöbet
Juvenil absans epilepsi	Tipik absans epilepsi	Generalize tonik klonik nöbet, miyokloni, absans status
Juvenil miyoklonik absans epilepsi	Tipik absans epilepsi	Generalize tonik klonik nöbet, miyokloni
Gözkapağı miyoklonili absans nöbet	Gözkapağı miyoklonili tipik absans epilepsi	Generalize tonik klonik nöbet, miyokloni
Miyoklonik absans nöbetli epilepsi	Miyoklonik absans epilepsi	Generalize tonik klonik nöbet
Diğer Sendromlar		
Lennox-Gastaut sendromu	Atipik absans epilepsi	Tonik nöbetler, Generalize tonik klonik nöbet, fokal nöbetler
Genetik epilepsiye eşlik eden febril nöbetler		Generalize tonik klonik nöbet, miyokloni, diğerleri

1.6. Absans Epilepsi Teorileri

1.6.1. Sentrensafalik Teori

1941'de Jasper ve Kershman, petit mal absans nöbetleri olan hastaların EEG'lerini analiz ederek nöbetleri, her iki hemisferde ani başlayan ve sonlanan ve yüksek diken dalga aktivitesi ile karakterize etmişlerdir. Kortikal kökenli bir kanıt bulunmadığından dolayı Jasper ve Kershman nöbetlerin subkortikal bir kökene sahip olduğunu öne sürmüşlerdir (Jasper ve Kershman 1941). Varsayılan subkortikal odak eş zamanlı olarak her iki hemisfere de yansımaktadır. Böyle bir subkortikal odak varlığı, 1942 yılında Morison ve Dempsey tarafından talamokortikal bağlantıların araştırılması ile desteklenmiştir. Spesifik talamokortikal projeksiyon sistemine ek olarak, talamusun intralaminar nükleusları olan nispeten küçük talamik bir bölgeden köken alan nonspesifik diffüz bağlantıları olan ikinci bir talamokortikal projeksiyon sisteminin varlığını göstermişlerdir. Ayrıca bu intralaminar talamik projeksiyonların tüm kortekse yayıldığını ancak özellikle maksimum SWD'lerin görüldüğü parietal ve frontal bölgelere yayıldığını göstermişlerdir (Marison ve Dempsey 1942). Bu bulgular ışığında 1947'de Jasper ve Droogleever Fortuyn 'Talamik stimülasyon modu' olarak adlandırılan ilk deneysel diken dalga modelini oluşturmuşlardır (Jasper ve Fortuyn 1947). İntralaminar talamusun sn.de 3 kez uyarılmasının, hafif anestezili kedilerde 3 sn.de bir bilateral eş zamanlı diken dalga EEG paterni üretebildiğini bulmuşlardır. 3 Hz intralaminar talamik uyarının kedi ve maymunlarda absans nöbetlere benzer davranışlara yol açtığını göstermişlerdir (Hunter ve Jasper 1949). Penfield, bilinci koordine eden ve her iki hemisfere projeksiyon yapan bu yaygın sinir sistemini sentrensafalik entegrasyon sistemi olarak tanımlamıştır (Penfield 1952). Bu sistemin beyin sapında ve diensefalonda yer aldığı ileri sürülmüştür. Sentrensafalik sistem, bilinç kaybı ile EEG'de bilateral başlangıçlı jeneralize nöbetlerden sorumlu tutulmuştur (Çizim 1,3).

1.6.2. Kortikal Teori

Jeneralize deşarjlar için santral odak hipotezi destek alsa da, 1952'de Gibbs ve Gibbs, yaygın kortikal süreçlere bağlı olarak SWD'lerin kortekste oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. Hastalardaki bulgular ayrıca sentrensafalik teorisinin geçerliliği hakkında ciddi şüpheler doğurmuştur. 1953 yılında Bennett, petit mal nöbetleri olan hastalara, korteksi besleyen karotis artere konvulsif ilaç olan pentilenetetrazol (PTZ) enjeksiyonunun, jeneralize SWD aktivitesi oluşturduğunu göstermiştir (Bennett 1953). Aksine, bu ilaç diensefalon ve beyin sapını besleyen vertebral arter içine enjekte edildiğinde bu tür tepkiler gözlenmemiştir. Gloor bu bulguları hastalar ve kedilerde doğrulamıştır (Gloor 1968, 1969). Jeneralize nöbetleri olan hastalarda tek taraflı intrakarotid PTZ enjeksiyonunun, klinik olarak petit

mal durumuna benzeyen uzamış bilateral senkronize jeneralize paroksizmal SWD'lere neden olduğu gözlenmiştir. Diğer yandan, intravertebral uygulama nöbet deşarjlarının zayıflamasına neden olmuştur. Bu bulgular Gloor'un jeneralize kortikoretiküler epilepsiler kavramının temelini oluşturmuştur.

Sentrensefalik teoriyi destekleyen Panfield ve Jasper, kortikal uyarının ya da kortikal bir lezyonun absans nöbete yol açmasının imkansız olduğunu öne sürmüşlerdir. Ancak Bancaud bu görüşü çürütmüştür (Bancaud 1969). Hastalardan alınan derin kayıtlar, nöbet sırasında meydana gelen deşarjların başlangıçta kortekste, özellikle de frontal lobda bir lezyon bölgesinde lokalize olabileceğini göstermiştir. Bu gözlemler sonucu, SWD'lerin, kortikokortikal yollarla tüm korteks boyunca hızlı bir şekilde yayılan ve frontal korteksteki fokal deşarjlar aracılığıyla olduğu ileri sürülmüştür. Klinik gözlemler temelinde kortikal teorisinin diğer savunucuları Lüders ve Liedermeyer'dir. Bu araştırmacılara göre, birincil jeneralize epilepsi, kortikal anormalliğin ifadesidir (Lüders ve diğ. 1984, Niedermeyer 1972). Talamusun jeneralize epilepsilerin oluşumuna kesinlikle katıldığını ancak normal fizyolojik talamokortikal etkileşimleri yürütmede ikincil görevi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Primer jeneralize epilepsilerde jeneralize SWD mezofrontal kortekste üretilir ve hızlıca tüm korteks boyunca yayılır (Niedermeyer 1996). Bu görüş, jeneralize nöbetlerin derin elektrot kayıtlarıyla fokal orijinin tespit edilmesi ve aynı elektrotla uyarılması sonucu nöbetlerin ortaya çıkma olasılığına dayanmıştır (Çizim 1.3).

1.6.3. Kortikoretiküler Teori

Gloor, SWD'lerin oluşumunda kortikoretiküler mekanizmanın rol oynadığını ileri sürmüştür. Kortikoretiküler teoriye göre, SWD'lerin oluşmasında hem korteks hem de talamik retiküler çekirdeklerin ve beyin sapının rolü olduğunu bildirmiştir (Gloor 1968, Gloor 1969). Prince ve Farrell tarafından geliştirilen hayvan modeliyle kortikoretiküler teori desteklenmiştir (Prince ve Farrell 1969). Bu araştırmacılar, penisilin (PCL) kedilerde jeneralize, bilateral, senkron SWD'lere neden olduğunu göstermişlerdir. Bu 'kedi PCL jeneralize epilepsi modeli', insan primer absans epilepsi modeli olarak kabul görmüştür (Gloor ve diğ. 1990). Uyku içciklerini çağrıştıran kedi talamus orta hattının düşük frekanslı uyarılması ve rekürren cevaplar, PCL uygulandıktan sonra bilateral jeneralize SWD'lerin oluşumunu uyarmıştır. Epileptik deşarjların korteksin anormal cevaplarından mı yoksa talamustan gelen anormal yayılımdan mı kaynaklandığı sorusu, PCL'nin kortikal uygulamasının SWD üretebildiği bir deney ile cevaplanırken, PCL'nin talamusa uygulanması SWD oluşumuna yol açmamıştır. Gloor ve arkadaşları, SWD oluşumunda sorumlu olan kritik faktörün korteksin uyarılabilirliğindeki artış olduğunu ileri

sürmüşlerdir. Bu aşırı uyarılabilir epileptojenik durumda kortikal nöronlar, talamokortikal yayılımlara içcik yerine SWD oluşturarak yanıt vermektedir. Hem talamus hem de korteksin varlığı SWD gelişmesi için gerekmektedir, SWD'lerin bilateral senkronizasyonu için *corpus callosum*'a intiyaç vardır. Faz-kilitli ateşleme çalışmalarında deşarjların kortekste talamusa göre birkaç döngü daha erken başladığı görülmüştür (Avoli ve diğ. 1983). Bu durum, korteksin ilk olarak SWD patlamasının paroksizmal salınımını başlattığını ve ikincil olarak talamusu sürüklediğini göstermektedir. Salınım harekete geçirildiğinde, talamus ve korteksin birbirini tetiklediği açıkça görülmesine rağmen, talamik nöronların kortikal karşılıklarına (muadillerine) göre biraz daha erken ya da sonra ateşlendiği görülmüştür. Kortikoretiküler teori, en çok kabul gören absans teorilerinden biri olmakla beraber, korteks ve talamusun nispi katkıları ve tam mekanizmaları hala tartışma konusudur. Kedi PCL modelinin insan absans epilepsi modeli için geçerli bir model olup olmadığı tartışmaya açık bir konudur. Kedi PCL modelinin en önemli dezavantajı, SWD kortikal uyarılabilirliğinin farmakolojik olarak artırılmış olabileceğinden, korteksin rolünün aşırı vurgulanmış olmasıdır (Çizim 1.3).

1.6.4. Talamik Saat Teorisi

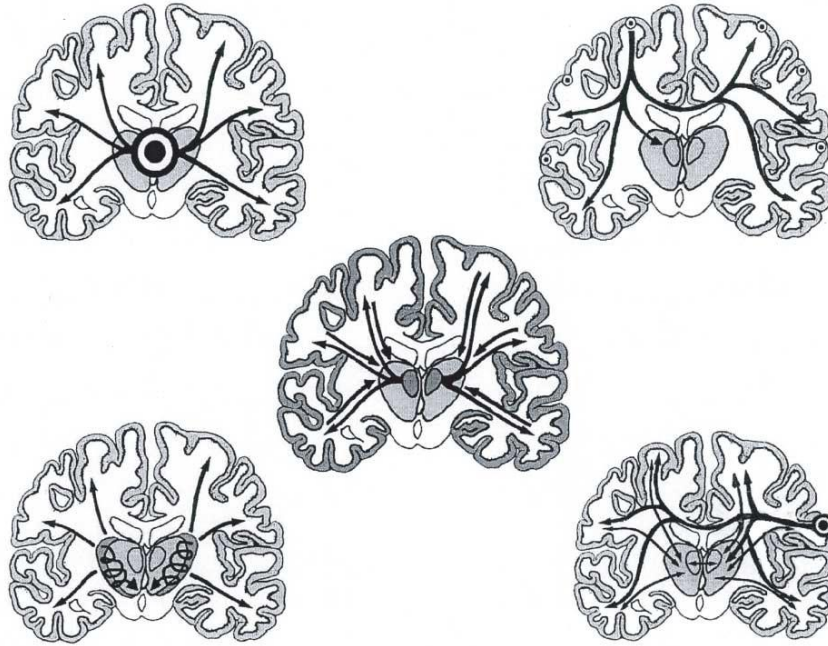
Buzsáki, 1991 yılında, belirli bir sıçan suşu olan Fischer 344 sıçanlarında meydana gelen spontan SWD'lerin (yüksek voltajlı içcikler) talamokortikal mekanizmalarını araştırmıştır. Korteks yokluğunda talamik yüksek voltajlı içciklerin oluşumu devam ederken, talamik lezyon oluşturulan hayvanlarda kortikal içciklerin kaybolduğunu gözlemlemişlerdir. Daha spesifik olarak, retiküler talamik çekirdeğin seçici lezyonlarının yüksek voltajlı içikleri baskıladığını göstermişlerdir. Serbest hareket eden sıçanlardan alınan kayıtlarda, kortikal ve talamokortikal relay hücrelerinin EEG diken dalgasıyla eş zamanlı ateşlendiği, buna karşın retiküler talamik nükleus nöronlarının yavaş dalga bileşeni sırasında ateşlendiği görülmüştür. Lokal yüksek voltajlı içciklerin alan potansiyellerinin talamausta korteksten birkaç döngü daha erken başladığı görülmüştür ve talamusta ateşlenen ritmik hücre sayısının, deşarjların EEG kayıtlarında görünür olmadan önce kademeli olarak arttığı gözlenmiştir. Buzsaki bu gözlemlere dayanarak, 'talamik saatin' deşarjlardan sorumlu olduğunu ileri sürmüştür (Buzsaki 1991). Retiküler talamik nükleus, talamik saat için pacemaker hücrelerini içermektedir. Birkaç retiküler talamik hücrenin ateşlenmesi talamokortikal relay hücrelerinde patlamaya neden olmaktadır ve bu durum daha çok retiküler talamik hücrenin uyarılmasına yol açmaktadır.

1.6.5. Kortikal Odak Teorisi

Meeren ve arkadaşları Wistar albino Glaxo-Rijswijk (WAG/Rij) ırkı sıçanlarda lineer olmayan ilişki analiz yöntemini kullanarak yapmış oldukları çalışmada, nöbet boyunca çoklu SWD'lerin oluşmasından sorumlu somatosensör korteksin perioral bölgesinde tutarlı bir kortikal “odak” göstermişlerdir (Meeren ve diğ. 2002). Bu odak arkasındaki diğer kortikal alanlarda artan mesafeyle paralel olarak SWD'lerin sürekli geciktiğini ve SWD'lerin ortalama yayılma hızının 1,5 metre/sn(m/sn) olduğunu gözlemlemişlerdir. Fonksiyonel olarak birbirine bağlı kortikal ve talamik bölgelerin her birinin diğerini etkilediği ve bu iki yönlü bağlantının yönünün tek bir nöbet boyunca değişebildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, ilk 500 milisaniye (msn) boyunca kortikal odağın talamusu tutarlı bir şekilde yönettiği, sonrasında ise ritmik deşarjın sürdürülmesi boyunca korteks ve talamusun karşılıklı etkileşim ile birbirlerini yönettikleri bulunmuştur. Bu sonuçların tümü, talamusun deşarjlar için birincil uyarı kaynağı olarak davrandığını belirten ortak varsayımla uyumsuzdur.

Sıçanlarda talamik birimlerin kortikal birimlerde uyarıya yol açtığını gösteren hücresel talamokortikal ilişkilere yönelik daha önceki bulgular, yapılan bu çalışmalarda kortikal kayıtların perioral fokal alandan nispeten uzak yerlerden elde edilmiş olduğu gerçeği ile açıklanabilir. Bu duruma, farklı kortikotalamik zaman ilişkileri neden olabilir. Çalışmadan elde edilen bulgular, jeneralize SWD oluşumunda kortikal bir odağın lider bir rol oynadığını göstermektedir. İki taraflı olarak jeneralize SWD oluşumunun, nöbetlerin yayılması için uygun bir durumda olan anatomik ve fonksiyonel olarak bozulmamış kortikotalamik ağda mümkün olduğu öne sürülmektedir. Bu durum, kendiliğinden patlayan kortikal piramidal hücrelerin, talamokortikal relay ve retiküler talamik hücrelerin hafif ve orta düzeyde hiperpolarizasyonu ile karakterize edilir; bu da onları yüksek frekanslı aksiyon potansiyeli patlamaları üretmeye oldukça yatkın kılar. Kortikal odakta ilk önce normal veya epileptik diken oluşmaktadır. Eksitator hücrelerin geniş ara bağlantı özelliği sayesinde, kortikal ağın yeterince engellenememesi ve kontrol edilememesi durumunda, kortikal odak “kaçak” uyarının oluşması için son derece duyarlı hale gelir (Luhmann ve diğ. 1995). Böyle bir kaçış durumunda, birkaç piramidal hücrenin senkronize olarak patlaması, diğer eksitator hücrelerin hızlı bir şekilde uyarılmasına ve nöronların hızlı bir şekilde topluca uyarılarak, epileptik diken oluşumuna neden olur. İlk oluşan diken, somatosensoryel korteksin perioral bölgesinde (S1po) görülür. Daha sonra hızlıca tüm kortekse yayılarak jeneralize deşarjlar şeklini alır. Bu ilk olay, oluşan dikenleri diken dalga aktivitesine çeviren, bozulmamış talamokortikal ağ içinde bir dizi süreci başlatır. İlk birkaç

döngü sırasında, kortikal odak talamusu harekete geçirir ve böylece korteks ve talamusun birbirini tetikleyerek uyarıyı amplifiye ettiği devre başlamış olur. Diken-dalga aktivitesinin korteks üzerindeki hızlı yayılımı, kısa aralıklı intrakortikal liflere ve uzun aralıklı asosiyasyon liflerine sahip hücrelerin popülasyonuna bağlıdır. Bunlar korteks altında yer alan beyaz maddeye ilerleyerek diğer kortikal bölgelerle kapsamlı bağlantılar kurarlar. GABAerjik inhibisyonun bozulması, WAG/Rij ırkı sıçanların intrakortikal ağını bu yayılmaya karşı oldukça hassas hale getirir. Somatosensoriyel korteksin perioral kısmı, GABA inhibisyonunun daha şiddetli bozukluğuna maruz kalarak zayıf bir kortikal odağa ya da “sıcak noktaya” dönüşür ve diken üretimi için düşük bir eşik değerine sahip olur. Bu kortikal odak, deşarjların ana tetikleyicisidir, ancak daha sonraki korteks ve talamus arasındaki etkileşimler göz önünde bulundurulursa, kortikal odak teorisinin kortikal ve kortikoretiküler teoriler arasında bir sentez olduğu görülmektedir.



Çizim 1. 3. Absans epilepsi teorileri, (Meeren ve diğ. 2005)

1.7. Absans Epilepsi Modelleri

Absans epilepsinin patofizyolojisini anlamak, jeneralize idiyopatik epilepsi hakkındaki ve nöbetler sırasında eş zamanlı yanıt vermeme açısından genel anlayışımızı geliştirmek için önemlidir. Aslında, absans epilepsi genellikle diğer epilepsi formları ile paylaştığı birçok EEG ve davranış özellikleriyle jeneralize epilepsinin prototipik bir formu olarak kabul edilir. Mevcut antiepileptik ilaçlar ve çoğu durumda remisyonu ile kontrol

edilmesi gerçeğiyle birlikte klinikte absans epilepsi çalışılması, çoğu hastanın genç yaşından dolayı nadiren görülmektedir. Bu nedenle, absans epilepsi ile ilgili mevcut mekanistik bilgimiz farelerde ve sıçanlarda genetik ve farmakolojik modellerde yapılan deneylerden toplanmıştır (Jarre ve diğ. 2017). Bununla birlikte, bazı hastaların daha şiddetli fenotipler (örn. Bilişsel kusurlar, remisyon yok) geliştirmesi ve ilişkili beyin fonksiyonlarının (örneğin, bilinç) mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ihtiyacı, absans epilepsi ile ilgili çalışmayı oldukça alakalı hale getirmektedir.

Farmakolojik ajanlar akut yada kronik uygulanarak absans epilepsi modeli oluşturulabilir. Tipik ya da atipik absans epilepsi modelleri oluşturmak için PCL, Bikukuin (BCC), pentilentetrazol (PTZ), Pikrotoksin (PTX), gamma-hidroksi biturat (GHB) kullanılan kimyasal ajanlardır, bu ajanlar GABAerjik sistem üzerine etkilidir. Bunun yanı sıra kronik uygulanan metilazoksümetanol asetat (AY-MAM) ve kolesarol sentaz inhibitörü (AY-9944) atipik absans epilepsi modelleri oluşturmak için kullanılmaktadır (Cortez ve diğ. 2015).

Genetik hayvan modelleri için tek gen mutasyonuna sahip fare modelleri olan stargazer, leaner, mocha, ducky, letharjik kullanılmaktadır. Absans tipi konvulsif olmayan nöbet kriterlerini taşıyan ve çok kullanılan deneysel modeller arasında spontan SWD'ye sahip poligenetik modeller olan WAG/Rij ve GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) ırkı sıçanlar kullanılmaktadır. Bu hayvan modelleri, insan absans epilepsisinin davranışsal ve karakteristik özelliklerini bir arada taşımaktadır (Vergnes ve diğ. 1982, Coenen ve Luijtelaar 2003).

Genetik olduklarından, bu modeller, bireylere, doğal durumlara yakın, klinik durumlara yakın çalışma konusunda eşsiz bir fırsat sunmakta ve böylece insan AE'sinin patofizyolojisini ve yaşam boyunca evrimini anlamak için ideal koşullar sağlamaktadır. Donakalmayla ilişkili spontan SWD'lerin ortaya çıkışını gösteren EEG kayıtlarına dayanan farelerde ve sıçanlarda farklı genetik modeller tarif edilmiştir. Üç ana özellik, bu modellere absans epilepsi anlayışına önemli bir değer katmaktadır;

- (1) SWD'leri, ömür boyu süren, serbestçe hareket eden ya da hareketsiz hale getirilmiş hayvanlarda düzenli olarak kaydetme imkanı,
- (2) Epileptik ve Epilepsi olmayan suşlar arasındaki verilerin karşılaştırılması,
- (3) Nöbetlerin başlamasından önce epileptik hayvanları keşfetme olasılığı,

Bu özellikler birçok araştırmada geniş bir şekilde çalışılmış olan iki sıçan modelinde bulunmaktadır; WAG/Rij ve GAERS. Monogenik mutasyonların bulunduğu fare

modellerinde elektrofizyolojik yöntemler daha az kullanılmasına rağmen, AE'nin patofizyolojisini anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Depaulis ve Charpier 2017). AE'nin tüm genetik modellerinde, hayvanlar, paryetal ve frontal korteksler üzerinde EEG kaydı alınırken, aniden başlayan ve desenkronize bir arka plan aktivitesi üzerinde aniden biten ve senkronize olan SWD'ler sergiler. İnsan hastalarda olduğu gibi, postiktal depresyon yoktur. Hayvan modellerinde, türler ne olursa olsun, SWD'ler 5 ila 9 Hz arasında bir frekansa sahiptir ve 1 saniyeden 60 saniyeye kadar sürebilmektedir. Ancak, SWD'lerin görülme sıklığı, modele, hayvanların yaşına ve test koşullarına bağlı olarak 1 ila 260 SWD/saat arasında çok değişken olabilir. Bazı hayvan modellerinde (örneğin, GAERS, WAG/Rij, Stargazer), spike frekansı SWD'lerin başlangıcında daha yüksektir (sıçan modellerinde 11 Hz'e kadar), ancak SWD'lerin başlangıcından birkaç saniye sonra yaklaşık 7–9 Hz'lik bir frekans görülür. Bu frekans değişimi, SWD'lerin altında yatan nöronların ateş örüntüsündeki dinamikleri yansıtabilir ve farklı devrelerin SWD'lerin ilk birkaç saniyesinde hızla toplanabileceğini göstermektedir. SWD'ler genellikle “davranışsal tutuklama” olarak adlandırılan hayvan hareketliliğinin kesintiye uğramasıyla ilişkilendirilir (van Luijtelaar ve Coenen, 1986, Vergnes ve diğ. 1982, Noebels ve diğ. 1990, Zwingman ve diğ. 2001, Noebels ve Sidman, 1979). Hem farelerde hem de sıçanlarda bıyıkların ve/veya çene kaslarının ritmik seğirmesi de sıklıkla görülmektedir. Hem GAERS hem de WAG/Rij'de EMG ölçümlerinin yapıldığı çalışmalarda, SWD'ler sırasında boyun kas tonusunun azaldığını ve bu azalmanın SWD süresinin sonuna kadar devam ettiğini gösterildi. Bazı hayvanlarda, zaman zaman dil çıkıntıları ile hafif çiğneme gözlenebilir. Absans epilepsinin temel özelliklerinden biri olan SWD'ler sırasında çevreyle bağlantının kesilmesi, hem ödül hem de pozitif motive edilmiş bir ayrımcılık testi kullanmak için bir kola baskı yapmak üzere sıçanlara eğitim vererek, hem GAERS hem de WAG / Rij sıçanlarında ele alınmıştır. SWD'ler sırasında hayvanlar kola basma hareketleri kesintiye uğradı ve nöbetlerin durması üzerine tekrar başladı (Vergnes ve diğ. 1991, van Luijtelaar ve diğ. 1991a, van Luijtelaar ve diğ. 1991b).

WAG/Rij ırkı sıçanlar inbred olarak üretilmiş ve EEG kayıtlarında SWD'ler saptanmıştır. Altı aylık tüm yetişkin WAG/Rij suşunda ortalama 5 saniye süren, 7-10 Hz frekanslarında ritmik deşarjlar görülmektedir. SWD'ler EEG kayıtlarında 2-3 aylıkken görülmeye başlar. Saatte yaklaşık 16-18, günde 300-400 deşarj görülmektedir. Nöbetler sırasında yüzde miyoklonik jerkler, bıyıkların seyirmesi, solunumda hızlanma, kafa sallama hareketi ve göz seğirmeleri eşlik etmektedir. Uyku-uyanıklık durumu SWD'lerin görülme sıklığını etkilemektedir (Coenen ve Luijtelaar, 2003).

1.8. Absans Epilepsi Patofizyolojisi

Absans epilepsi patofizyolojisi hakkında ilk bilgiler Jasper ve Droogleever-Fortuyn tarafından elde edilmiştir. Kedide yapmış oldukları çalışmalarda intralamik elektriksel uyarım sonucu kortikal EEG kayıtlarında bilateral, senkronize, 3 Hz frekanslı SWD'lerin oluştuğunu gözlememişlerdir (Jasper ve Fortuyn 1948). Sonrasında absans epilepsi patofizyolojisi hakkında yapılan çalışmalar talamusun ventrobazal çekirdeği (VB) ve talamik retiküler nöronlar (TRN) hücrelerinin rol aldığı talamik döngünün SWD oluşumu için önemli olduğu gösterilmiştir (Avoli ve Gloor 1982, Danober ve diğ. 1998, Blumenfeld, 2005). TRN hücreleri korteks ve talamus arasında bilgi transferinden sorumludur. Absans epilepsi patofizyolojisi hakkında çeşitli teoriler üretilmiş olsa da günümüzde SWD'lerin oluşumu için fonksiyonel ve anatomik olarak bozulmamış talamokortikal döngünün gerekli olduğu bilinmektedir. Meeren ve arkadaşlarının yapmış oldukları kortikal odak teorsinin temeli olan çalışmada, uyarımın somatosensöriyel korteks (Spo) bölgesinde başladığı ve tüm kortekse yayıldığını, ilk 500 ms korteksin odağı yönettiğini göstermişlerdir. Daha sonra SWD oluşumunun devamı için korteks ve talamus karşılıklı etkileşim içinde olur (Meeren ve diğ. 2002). Genetik absans epilepsili GAERS ve WAG/Rij ırkı sıçanlarda yapılan çalışmalar, kortikal odak teorisini destekler niteliktedir. Etosüksimid, lidokain ve fenitoin kortikal odağa uygulanmasının SWD oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir (Sitnikova ve van Luijtelaar, 2004, Manning ve diğ. 2004, Gurbanova ve diğ. 2006). Moleküler çalışmalar ise WAG/Rij ırkı sıçanlarda Spo bölgesinde sodyum kanallarının ekspresiyonunda artış, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 (HCN1) kanal ekspresiyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir (Klein ve diğ. 2004, Strauss ve diğ. 2003). GAERS ırkı sıçanlarda yapılan çalışmalarda ise SPo'nun V ve VI tabaka nöronlarından alınan kortikal kayıtlarda SWD'lerin bu bölgede başladığı gösterilmiştir (Polack ve diğ. 2007).

Absans nöbetler, normal uyku içcikleri osilatör ritimler üreten talamo-kortikal döngünün anormal döngüler üretmesi sonucu ortaya çıkar (Destexhe ve diğ. 1999). Absans nöbetler daha çok uykudan uyanıklığa geçiş sürecinde görülmektedir (Crunelli ve Leresche 2002). Felin jeneralize absans epilepsi modeli olan kedilerde kas içi PCL enjeksiyonu sonrası oluşan SWD'lerin 7-14 Hz frekansında olan uyku içciklerinden kaynaklandığı ve artarak devam ettiği gözlenmiştir (Gloor ve Fariello 1988). Anti-absans etkili etosüksimid uygulamasının in-vitro kesit preparatlarında talamik osilasyonların baskılandığı gözlenmiştir (Hugunard ve Prince 1994). Uyarılabilirliği artmış kortikal nöronlar, talamusta hızlı GABAA aracılı inhibisyon mekanizmasının yerine yavaş GABAB aracılı

inhibisyon mekanizmasını devreye soktuğu düşünölmektedir, normal uyku iğciklerinin oluşumunda TRN'da GABAA aracılı inhibisyon gerçekleşmektedir (Blumenfeld ve Coulter 2008). Bunun yanı sıra SWD oluşumunda korteks derin tabakalarında N-metil D-aspartat (NMDA) ile uyarılmış eksitasyonun arttığı ve II-III tabakalarda GABA ile uyarılmış inhibisyonun azaldığı düşünölmektedir (Pumain ve diğ. 1992, Luhmann ve diğ. 1995).

1.9. Absans epilepsi patolojisinde T-tipi Ca²⁺ kanalının rolü

Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları (VBKK), 1967 yılında tanımlanmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerine göre çeşitli VBKK'lar tespit edilmiştir. T-tipi (kısa süreli), L-tipi (uzun süreli), N-tipi, P-tipi, Q ve R tipi kanallar tanımlanmıştır. T-tipi kalsiyum kanalları düşük voltajlı uyarılar ile etkilenmektedir. Bu nedenle çeşitli dokularda pacemaker aktivitesi için önemlidir. T-tipi kalsiyum kanalları; sinoatriyal düğüm, atriyoventriküler düğüm, düz kas hücresi kalbin iletim dokusunda ve özellikle nöronlarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. İn-vitro kesit preparatlarında elektriksel uyarı ile oluşturulan talamik osilasyonlar, T-tipi kalsiyum kanallarını bloke eden etosüksimid ile baskılanmaktadır. SWD aktivitesinin kaynağı olan talamo-kortikal osilasyonlardan, talamus ve korteks arasında bilgi akışından sorumlu olan talamik retiküler çekirdekler (thalamic reticular nucleus, TRN) sorumludur (Avanzini ve diğ. 1993). Kendi içindeki nöronların yanı sıra talamik relay çekirdeklerine projeksiyon yapan TRN, GABAerjik nöronlardan meydana gelmektedir. GABAerjik aktivitenin artması uzun süren hiperpolarizasyona neden olarak düşük voltaj kapılı T-tipi kalsiyum kanallarının aktif hale gelmesinden sorumludur (Manning ve diğ. 2003). T-tipi kalsiyum kanalları Ca²⁺ dikenlerine neden olarak talamokortikal döngüdeki patlama tarzı (burst) anormal osilatör karakterin görülmesinde önemli rol alır (Huguenard ve Prince, 1992; Perez-Reyes, 2003). Yapılan birçok çalışma T-tipi Ca²⁺ kanallarının absans epilepsi ile ilişkisini göstermektedir. Genetik absans epilepsili sıçanlarda kalsiyum kanal mRNA ekspresiyon düzeyi ve T-tipi kalsiyum akımları özellikle TRN bölgesinde artış olduğu gözlenmiştir (Talley ve diğ. 2000; Tsakiridou ve diğ. 1995). Multifaktoriyel genetik bir hastalık olan absans epilepsi etiolojisinde, çocukluk çağı absans epilepsilli hastalarda, absans epilepsi genetik modeli olan GAERS suşu sıçanlarda, T-tipi kalsiyum kanal geni olan CACNA1H geninde mutasyon olduğu gözlenmiştir (Chen ve diğ. 2003; Powell ve diğ. 2009). Tipik absans epilepsi tedavisinde valproik asit ve etosüksimide (tek ya da kombine) iyi cevap verirken vigabatrin ve tiagabin gibi GABA-mimetik ilaçlar absans nöbetleri

kötüleştirmekte ve rodent modellerinde yapılan çalışmalardan da görüldüğü üzere SWD sayı ve süresini arttırmaktadır. Bu da absans epilepsisinin aslında bir inhibisyon mekanizma bozukluğu olabileceğini düşündürmektedir.

1.10. Endoplazmik retikulum ve kalsiyum metabolizması

Hücre içi kalsiyum akışı (Ca^{2+}), canlı organizmalarda gerekli olan önemli biyolojik olayların aktivasyonu ve düzenlenmesi için önemlidir. Hücre içindeki başlıca Ca^{2+} kalsiyum depoları olan Endoplazmik Retikulum (ER) ve Sarkoplazmik Retikulum (SR) hücre içi kalsiyumun dengelenmesinde ve artırılmasında merkezi rol oynamaktadırlar. Bu organellerin morfolojisi, kalsiyum bağlayıcı proteinlerin (CaBP'ler), düzenleyici proteinlerin, pompaların ve reseptörlerin dağılımı ile birlikte Ca^{2+} salma kinetiğini lokal ve global düzeyde etkilemektedir. Transkripsiyondan hücre büyümesine ve proliferasyona kadar, hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) geçici salınımları bir organizmanın ömrünü devam ettirmesi için çeşitli moleküler yolları harekete geçirir. Ca^{2+} sinyallemesinin etkinliği ve hızı, hücre içi ve hücre dışı Ca^{2+} konsantrasyonları arasındaki yaklaşık 20,000 kat farklılığı muhafaza etme yeteneği ile güçlendirilir (Clapham 2007). Uyarılmayan hücrelerde dinlenme durumunda Ca^{2+} konsantrasyonu yaklaşık $0,1 \mu M$ 'dır. Hücreler uyarıldıklarında sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonu $1 \mu M$ düzeyine çıkmaktadır, sonuçta birçok biyolojik süreci tetiklenmektedir (Berridge ve Bootman, 2000). Sitozolik Ca^{2+} 'daki bu artış, Ca^{2+} sinyalizasyon sisteminin uyarlanabilir yapısı ve organizasyonu nedeniyle hücre fonksiyonların geniş bir repertuarını kontrol edebilir. Ca^{2+} kanalları, pompaları ve CaBP'ler farklı dokularda ekspresyon edilmektedir. Ca^{2+} sinyal yolları gen ekspresyonu gibi yavaş, nörotransmitter salınımı gibi hızlı süreçlerin başlatılması için çeşitli mekansal-zamansal paternler üretmek üzere uyarlanmıştır (Berridge ve diğ. 2003; Berridge 1998; Dolmetsch 1998). Bu işlemleri başlatan büyük hücre içi Ca^{2+} depoları olan ER ve onun kas hücrelerinde özel formu olan SR'dur. ER, global bir etki yaratabilmek için inositol 1,4,5 trifosfat (IP3) başlayarak, reaktif oksijen türlerine kadar bir çok ürünle etkileşime girerek Ca^{2+} ve stres sinyallerini iletir. ER, hücre içi kalsiyum sinyalinin merkezidir. İnositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü (IP3R) ve ryanodin reseptörü (RyR), ER ve SR membranında bulunan birincil Ca^{2+} salım kanallarıdır (Berridge, 2009; Lanner ve diğ. 2010). Bu reseptörlerin kalsiyum aktivasyonu, kalsiyum kaynaklı kalsiyum salıverilmesi (CICR) olarak adlandırılan ve büyük ölçüde hızlı hücre içi Ca^{2+} geçişlerine katkıda bulunan rejeneratif bir kalsiyum salıverme süreci başlatır. CICR kas hücrelerinde ve kalp nöronları dahil nöronlarda yoğun olarak çalışılmıştır (Berridge, 1998; Marrion ve Adams, 1992;

Verkhatsky ve Shmigol, 1996). IP3 ve siklik ADP-riboz (cADPR) gibi ligandların, sırasıyla, IP3R ve RyR'yi kalsiyuma duyarlı hale getirdiği bilinmektedir (Endo, 2009; Seo ve diğ. 2015). Sarko-endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz (SERCA) pompası, ER / SR membranında bulunur ve Ca^{2+} sinyali sonlandırarak istirahat sitosolik [Ca^{2+}] 'yi eski haline getirir (Vandecaetsbeek 2011). Lümen içi ER Ca^{2+} ayrıca ER'nin fonksiyonuna aracılık eder (Burdakov ve diğ. 2005). ER'de Ca^{2+} dalgalanmaları protein katlanmasını etkiler ve katlanmamış protein yanıtının oluşmasını tetikler (Malhotra ve Kaufman, 2007). ER'nin heterojenliği ve plastisitesi, fonksiyonunun düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Rizzuto ve Pozzan 2006).

ER, üç farklı biçime sahip kesintisiz bir ağ olarak görünür ve özel işlevlere eşlik eder. Granüllü ER (GER) düzleştirilmiş keseler olarak görünür ve protein sentezi için ribozomlar içerir. Düz ER (SER), Ca^{2+} depolama ve serbest bırakmada anahtar işlevlere sahip, uzatılmış, silindirik bir ağdır. Çekirdeğin etrafı çevreleyen uzantısı nükleer zarf (NE) olarak adlandırılır. NE ayrıca ribozomlarla donatılmıştır ve gen transkripsiyonu için çekirdeği Ca^{2+} ile besler (Lam ve Galione 2013). ER, hücre kapasitesinin % 10'undan fazlasını alarak hücre boyunca uzanır. Bu şekilde ER, çeşitli organel ve membranlarla, yani plazma membranı, mitokondri, lizozomlar ve endozomlarla etkileşime girebilir. ER ile bu mikro- alanların etkileşimlerinin yerel düzenlenmesi, hücrel Ca^{2+} dinamiğinin kapsamlı kontrolünü sağlar.

1.11. Endoplazmik Retikulum stresi ve katlanmamış protein yanıtı

ER transkripsiyon sonrası modifikasyonlardan başlayarak, membran ve salgı proteinlerinin doğru katlanması kadar birçok hücrel fonksiyonla ilişkili bir organeldir. Proteinlerin fonksiyonlarını kazanabilmeleri için doğru katlanarak üç boyutlu yapılarını kazanmaları gerekmektedir. ER'de katlanmalardan sorumlu proteinler bulunmaktadır. ER'e gelen polipeptid zincirleri ER içerisinde bulunan bu moleküller sayesinde çeşitli düzenlemelerden geçerler ve daha sonra katlanırlar. ER'de katlanan proteinler karmaşık yapıda olanlardır, basit yapıları sitoplazmada katlanırlar (Dobson ve diğ. 1998). ER stresi olarak bilinen yanlış katlanmış protein birikimi katlanmamış protein yanıtı (KPY) olarak adlandırılan, translasyonun azaldığı, yanlış/katlanmamış proteinlerin yeniden katlandığı, en sonunda protein yıkımına (ERAD) kadar gidebilen bir süreci başlatmaktadır. Bu süreç proteostazi (ökaryotik protein homeostazisi) dengelemeye çalışmaktadır. Bununla birlikte yanlış katlanmış/katlanmamış proteinlerin aşırı birikimi protein katlanma

kapasitesini artırdığında, KPY dokunun homeostazisini devam ettirebilmek amacıyla stresli hücreyi ekarte etmek için apoptozu başlatmaktadır (Muraio ve Nishitoh 2017).

Bir hücre ER stresinin üstesinden gelmek için KPY olarak adlandırılan sinyal yolağının aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır. KPY'nin aktivasyonu PERK, ATF6 ve IRE1 olarak adlandırılan 3 farklı ER stres sensörü tarafından düzenlenmektedir. Katlanmamış protein cevabı üç çeşit sinyal yolağı bulunmaktadır;

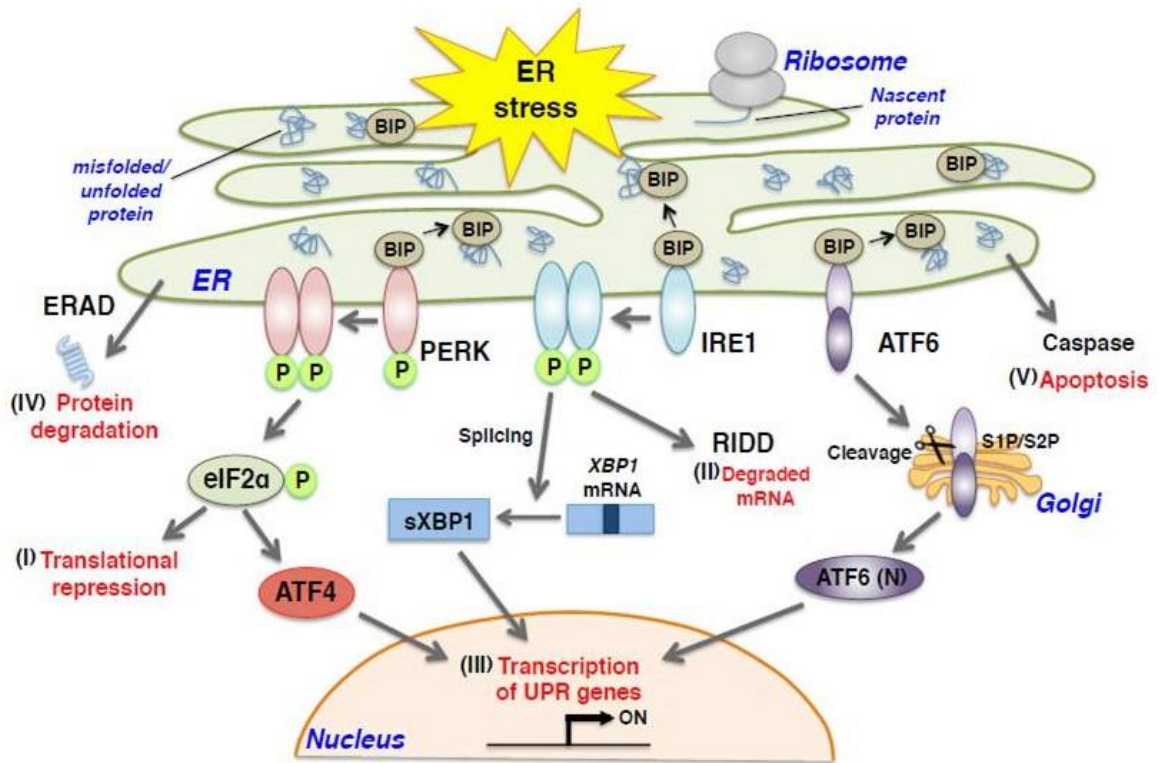
- * Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase, PERK) sinyal yolağı,
- * Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (Activating transcription factor, ATF6) sinyal yolağı
- * İnozitol gerektiren kinaz 1 (Inositol-requiring kinase-endoribonuclease, IRE1) sinyal yolu diğer adıyla IRE1 α /XBP-1 yolağı.

1.12. GRP78

BiP ve HSP5a olarak da bilinen 78-kDa glukoz regüle edilmiş protein GRP78, ER stresinden sonra aktif hale gelen, katlanmamış protein yanıtında iyi bilinen rolünün ötesinde çok fonksiyonlu bir proteindir. GRP78 hücre canlılığını sürdürmede birden fazla işlevi vardır. Farklı noktalarda ifadesi yüksek derecede düzenlenmiştir. Transkripsiyon seviyesinde, GRP78, Hsp5a geni tarafından kodlanır. Isı şoku protein-70 (Hsp70) familyasında en bol olan proteindir, fakat bu ailenin diğer üyelerinden farklı olarak, ısı şoku ile indüklenmez, çünkü GRP78 promotörü ısı şok elemanından yoksundur. GRP78'in seviyeleri hücre içinde nispeten düşük seviyelerde tutulur, ER ve kalsiyum homeostazisini etkileyen stresler altında önemli ölçüde artar. GRP78 ilk olarak 1977 yılında glikoz içermeyen ortamda kültürlenmiş tavuk embriyo fibroblastlarında güçlü bir şekilde indüklenen bir 78-kDa preaktifeini olarak keşfedilmiştir (Shiu ve diğ. 1977). Daha sonra, GRP78 ekspresyonunun, kalsiyum iyonofor A23187 gibi, tapsigargin ve BAPTA-AM gibi kalsiyum şelatörler ve tunikamisin gibi salgı inhibitörleri tarafından indüklenbildiği gözlemlendi (Resendez ve diğ. 1985, Suzuki ve diğ. 1991, Lee, 2006).

GRP78 moleküler şaperon olarak hareket etmektedir ve gelişmekte olan proteinlere bağlanır (Haas ve Wabl 1983). Sitolitik HSP70 gibi, N terminal ATPaz ve C-terminal peptid bağlayan bölgeleri içermektedir. GRP78 ayrıca kalsiyum bağlayan bir proteindir (Maattanen ve diğ. 2010). Yüksek kalsiyum konsantrasyonunda inhibe olur ancak kalsiyum yoksunluğunda ATPaz aktivitesi uyarılır. Bir ER sinyal peptidinin mevcudiyetinden dolayı, GRP78 esas olarak ER lümeninde bulunur, bununla birlikte bazı

koşullar altında sitozol, nukleus, mitokondri veya plazma membranına yeniden dağıtılır veya salgılanır (Suzuki ve diğ. 1991). Bu nedenle, farklı yerler GRP78'i farklı moleküller sinyalleme olaylarını tetikler. GRP78, protein sentezi boyunca hemen olgunlaşmamış polipeptid zincir veya doğru katlanmış proteinlere geçici olarak bağlanır. Bununla birlikte, yanlış katlanmış veya mutant proteinlerle ilişkisi uzar. Bu uzamış ilişki bağlanan proteinlerin yıkımıyla ilişkili bir sinyaldir ve çok basamaklı bir süreç olan ERAD, GRP78 ve yanlış katlanan proteini tanıyan diğer ER'de bulunan proteinler tarafından başlatılır. GRP78, ana efektörler olarak hareket eden üç ER transmembran proteinini işlevsel olarak düzenleyerek katlanmamış protein yanıtını düzenler; IRE1, ATF-6 ve PERK. GRP78, stressiz hücrelerde IRE1, PERK ve ATF6'ya bağlıdır ve akut ER stresi sırasında bu katlanmamış protein yanıt sensörlerinden ayrılır.



Çizim 1. 4. ER stresi sırasında aktif olan yollar ve moleküller (Murao ve Nishitoh, 2017).

1.13. PERK

PERK/eIF2α yolağı nörodejeneratif hastalıklarla oldukça ilişkilidir. PERK monomeri ER membranında N-terminal ucunda GRP78/BiP ile bağlı halde inaktif halde bulunmaktadır. C-terminal ucu ise kinaz bölgesi içermektedir (Cui ve diğ. 2011). GRP78'in PERK'den ayrılmasıyla aktif p-PERK oluşumu için dimerizasyon ve oto-fosforilasyon reaksiyonları gerçekleşir. Aktif PERK ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 (eIF2)'ün α

alt birimini ser51 bölgesinden fosforilleyerek genel protein sentezini durdurur (Harding ve diğ. 1999). PERK/p-eIF2 α kompleksinin oluşması tüm protein sentezini durdurmaz, ER stresi koşullarında anlatımı olan genler mevcuttur (Harding ve diğ. 2000, Lu ve diğ. 2004). Bu genlerden biri de hücre metabolizmasında, redoks homeostazında ve apoptozda rol alan aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4)'dür. Fizyolojik koşullar altında gen anlatımının durması stresli hücrenin stres durumunu ekarte etmesi ve doğru protein katlanmasını sağlamaktadır. Eğer hücre stres koşullarını aşabilirse p-eIF2 α , GADD34 tarafında de-fosforillenir (Novoa ve diğ. 2001). Ancak stres durumu devam ederse ATF4, apoptotik Cytosine-cytosine-adenine-adenine-thymine-Enhancer-Binding Protein (C/EBP) Homologous Protein (CHOP)'i aktif hale getirir. Hafif ER stresinden ve CHOP kontrollü ölüm sinyaline kadar PERK ile indüklenen koruma arasındaki anahtarı belirleyen zamanlama veya düzenleyici sinyaller anlaşılmamıştır, fakat nörodejenerasyon bağlamında son derece önemlidir.

1.14. ATF 6

ATF 6 basit lösin fermuar protein taşıyan tip 2 transmembran transkripsiyon faktörüdür. Diğer KPY yollarından farklı bir aktivasyon mekanizması mevcuttur. ER stresi şartlarında GRP78/BiP şaperonundan ayrıldıktan sonra ATF 6, ER'den Golgi aygıtına hareket eder. Golgi içerisinde bir serin proteinaz olan S1P ve bir metalloproteinaz olan S2P enzimleri tarafından kesilir. Parçalanan ATF 6'nın N-terminalinde bulunan bZIP bölgesi serbest kalır ve sitozole geçer. Sitozolden sonra nükleusa gider ve ER stresine baş etmek için önemli olan XBP1, GRP78, disülfid izomerazları (PDIs), arı ve ERAD proteinleri gibi UPR hedef genlerinin anlatımını artırır (Murao ve Nishitoh 2017). ATF6'nın bir diğer izoformu olan CREBH (ATF6 β) yine aynı proteolitik süreçten geçer ve nükleusa geçerek inflamatuvar genleri tetikler. ATF6'nın yanı sıra intra-transmembran proteolizis tarafından düzenlenen birkaç ER-transmembran proteini daha tanımlanmıştır. ATF6'dan farklı olarak bu proteinlerin ifadeleri dokular için özelleşmiştir ve çeşitlilik göstermektedir. ER stresi şartlarında aktif hale geldikleri ve KPY'ye katkıda buldukları bilinmesine rağmen tam olarak mekanizmaları açıklanamıştır (Murao ve Nishitoh 2017, Schönthal 2012).

1.15. IRE1/XBP-1:

Ökayotlarda oldukça korunmuş bir şekilde bulunan IRE1, N-terminal ucunda ER stresini algılayan kısım, C-terminal ucunda ise serin/treonin kinaz ve endoribonükleaz aktivitesi gösteren kısmı bulunmaktadır. GRP78'in N-terminal ucundan ayrılmasıyla

tetiklenen oligomerizasyon ve oto-fosforilasyon aracılığıyla aktif hale gelmektedir. Aktif IRE1'in endoribonükleaz kısmı, X bağlayıcı protein 1' (XBP1)'in adı verilen transkripsiyon faktörünün mRNA'sından 26 nükleotidlik intron parçasının çıkarılmasını katalize etmektedir. Bu reaksiyon sonucunda aktif sXBP1 transkripsiyon faktörü oluşmaktadır. sXBP1, öncelikle ER şaperonları ya da hücreyi koruyan genler gibi, protein katlanmasında önemli olan şaperonların ERAD, KPY genlerinin anlatımını artırmasının yanı sıra ER genişlemesine katkıda bulunan fosfolipitlerin sentezlenmesinde gereklidir. Bunun yanı sıra IRE1, ER protein yükünü azaltmak için düzenlenmiş IRE1 bağımlı yıkım (RIDD) olarak adlandırılan bir süreçle diğer mRNA'ların da yıkımını sağlamaktadır. IRE1, tümör nekroz ilişkili faktör 2 (TAF2) ile kompleks oluşturma yoluyla c-jun n terminal kinaz (JNK) yolağını ve ER membranı üzerinde apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 aktif hale getirerek apoptoza neden olur (Murao ve Nishitoh 2017, Schönthal 2012).

1.16. ERp57

ER içerisinde çözünebilen bir tiol-disülfid oksidoreduktaz olan ERp57, PDIs ailesine üyedir. ERp57 kalneksin ve kalretikulin adı verilen lektin şaperonlara bağlanarak yeni sentezlenmiş glikoproteinlerin katlanmalarına yardımcı olur (Frickel ve diğ. 2004). Bulunduğu hücre bölgesine göre çeşitli biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. ER içerisinde plazma membranında, mitokondri, sitoplazma içerisinde ve nukleusta bulunmaktadır. ERp57'nin düzenlenmesinin bozulması kanserden nörodejeneratif hastalıklara kadar çeşitli patolojilere zemin oluşturmaktadır (Hettinghouse ve diğ.2018).Şahin ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada WAG/Rij ırkı sıçanlarda ERp57 protein miktarının hem talamus hem de korteks dokusunda kontrole düşük olduğunu göstermişlerdir (Şahin ve diğ. 2018).

1.17. Tapsigargin

Tapsigargin (Tg), yapısal olarak *sesquiterpene lactone* olarak sınıflandırılmaktadır ve *Thapsia garganica* bitkisinden elde edilmektedir. Memeli hücrelerinde tümör başlatıcısıdır. Anti-malariyal ilaç olan artemisinin de bir *sesquiterpene lactone*'dur, ER membranında bulunan SERCA etkileyerek hücre içi Ca^{+2} dengesini bozmaktadır.Bu bileşik, mast hücreleri dahil olmak üzere bir dizi bağışıklık hücrelerinin aktivasyonundan ortaya çıkabilecek güçlü tahriş edici özelliklere sahiptir. Tg, aynı zamanda, tanımlanmış tümör promotörlerinin çoğunluğu gibi protein kinaz C'yi aktive etmese de, fare derisinde zayıf bir ikinci evre tümör promotörüdür (Jackson ve diğ. 1988). Bu bileşiğin plazma membran kalsiyum pompası da dahil olmak üzere diğer iyon-kapılı ATPaz üzerinde

herhangi bir etkisi yoktur. Tg, SERCA ile geri dönüşü olmayan bir reaksiyon oluşturmaktadır (Sagara ve diğ.1992). Ayrıca hücre içi Ca^{2+} dengesini bozması sebebiyle enzim mekanizmalarını da etkilemektedir.

Zhang ve diğ. yapmış oldukları bir çalışmada Tg'nin uyardığı ER stresinin iskemik beyin hasarına etkisini araştırmışlardır ve doza bağlı bir etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada C57BL/6 fareler kullanılmış ve i.c.v olarak 2-200 ng TG uygulanmıştır. 20 ng TG uygulamasının beyin hasarını azalttığını ancak daha yüksek dozlarda uygulanmasının beyin hasarını artırdığını göstermişlerdir (Zhang ve diğ. 2014).

Günümüzde ER Ca^{2+} depolarının epilepsi üzerine etkisi hakkında çok az sayıda çalışma vardır. Sokal ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada hipokampal nöron kültürlerinin bikukulin uygulaması öncesi Tg ile inkübasyonu, bikukulin kaynaklı uyarılmada azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Sokal ve diğ. 2000). Rutecki ve diğ. in vitro hipokampal dilimlere pilokarpin veya (RS) -3,5-dihidroksifenilglisin uygulamasıyla indüklenen iktal deşarjların, ER- Ca^{2+} depolarını etkileyen Tg veya dantrolene tarafından bloke edildiği göstermişlerdir (Rutecki ve diğ. 2002). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise, nitrik oksit ile indüklenen riyodin reseptörünün aktivasyonunun genetik olarak susturulmasının, kainatın neden olduğu status epileptikus tarafından tetiklenen hücre ölümüne karşı koruma sağladığı bulunmuştur (Mikami ve diğ. 2016).

2.AMAÇ

Absans epilepsi idiyopatik, jeneralize, çok faktörlü genetik etiyojolojiye bağlı nonkonvülsif bir epilepsi türüdür. Absans epilepsisi 16 yaşın altındaki her 100.000 çocuktan 2-8'ini etkiler, 3 ila 8 yaşları arasında başlar. Tipik absans nöbetlerinin karakteristik EEG bulgusu aniden başlayıp aniden biten bilateral, simetrik, senkronize 2.5-4 Hz frekansında SWD aktivitesidir. Absans epilepsili yetişkinlerin %10-15'inde SWD'ler, diğer jeneralize epilepsilerle kombine bir şekilde görülebilmektedir. Deneysel çalışmalarda kullanılan genetik absans epilepsili WAG/Rij ırkı sıçanlarda epileptik nöbetlerin klinik, farmakolojik ve EEG özellikleri, insan absans epilepsi nöbetleri ile benzerlik göstermektedir.

WAG/Rij ırkı sıçanlarda SWD'lerin ortaya çıkışında fonksiyonel ve anatomik olarak intakt bir talamokortikal döngünün gerekli olduğu, karşılıklı etkileşim ile birbirlerini yönettikleri kabul edilmektedir. Absans epilepsisinin talamokortikal döngü içerisinde kaynaklandığı bilinmekle birlikte altında yatan hücrel mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan birçok çalışma T-tipi Ca^{2+} akımlarının absans epilepsi ile ilişkisini göstermektedir. Öncelikle Ca^{2+} kanal mRNA ekspresyonlarının ve T-tipi Ca^{2+} akımlarının genetik absans epilepsili sıçanlarda özellikle talamik retiküler çekirdekte artış gösterdiği bulunmuştur. Tipik absans epilepsi tedavisinde kullanılan T-tipi Ca^{2+} kanalı antagonisti olan valproik asit ve etosüksimid (tek ya da kombine) nöbet paternini iyileştirmektedir.

ER ökaryotlarda protein katlanmalarının düzenlendiği en önemli organeldir. Kompleks yapıdaki proteinler ER'de katlanır. Ribozomlarda üretildikten sonra, ER'e gelen polipeptid zincirleri çeşitli düzenlemelerden geçerek katlanırlar. Protein katlanmasının kontrol edilmesi ve yanlış katlanan proteinin yıkıma gönderilmesi ER'in görevidir. ER fonksiyonunu aşan fizyolojik ve patolojik durumlarda lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi meydana gelir; bu durum ER stresi olarak tanımlanmaktadır. ER stresi oluştuğundan sonra hücrede homeostazı sağlamak ve stresten az zararla kurtulmak üzere KPY adı verilen bir takım hücre içi sinyal yollarından oluşan olaylar dizisi aktif hale gelmektedir. KPY öncelikle hücre yaşamının devamını sağlamaya çalışır, ancak stresle baş edemediği zaman apoptoz mekanizmaları devreye girmektedir. Glukoz yoksunluğu, Ca^{+2} homeostazının bozulması, viral enfeksiyon, genetik mutasyonlar, ve hipoksi gibi durumlar ER stresine neden olabilmektedirler.

Bu çalışmada ER stresi oluşturmak için kullanılacak olan Tg, yapısal olarak sesquiterpene lactone olarak sınıflandırılmaktadır ve hücre içi Ca^{+2} dengesinin

düzenlenmesinde rol alan birkaç mekanizmadan biri olan ER membranında bulunan SERCA kanallarını etkileyerek Ca^{+2} dengesini bozmaktadır. SERCA pompaları aracılığıyla Ca^{+2} 'un hücre içinden tekrar hücreye geri dönmesini engelleyerek hücre içerisinde ER stresinin oluşmasına ve KPY'nin başlamasına neden olmaktadır. ER içerisinde bulunan protein katlanma süreçlerinde rol alan ve kalsiyuma bağımlı olan moleküllerin (ERp57 gibi) işlevlerinin yerine getirmesini durdurmaktadır. Önemli bir hücre içi ikinci mesajcı olan Ca^{+2} , hücre siklusunun ilerlemesi, apoptoz ve çoğalma gibi birçok hücreye süreçte önemli rol oynamaktadır. Gelişen ER stresi ile tetiklenen apoptozun birçok dejeneratif hastalıkla ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmada WAG/Rij ırkı sıçanlara 20 ng ve 200 ng Tg iki farklı dozda i.c.v uygulanarak bozulan ER katlanma yanıtının, absans epilepsi patogenezi üzerine moleküler ve fonksiyonel düzeyde etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Bu amaçla moleküler, elektrofizyolojik ve davranış düzeyinde araştırmalar yapılacaktır.

Bu çalışmada beyin dokusunda ER stresi esnasında talamus ve korteks bölgelerinde aktif hale gelen yolakları moleküler olarak incelemek için GRP78 ve ERp57 protein miktarının değişimi western blot tekniği kullanılarak, PERK, XBP-1 ve ATF6 mRNA düzeyinde ifadeleri RT-PCR yöntemi kullanılarak araştırılacaktır. Ayrıca aynı dokularda ER stresinin, T-tipi kalsiyum kanallarının ekspresyon seviyelerine etkisi RT-PCR kullanılarak belirlenecektir.

ER stresi esnasında absans nöbet aktivitesi üzerine fonksiyonel etkiler EEG kaydı alınarak SWD sayı ve süreleri değerlendirilerek incelenecektir. ER stresin spasyal öğrenme ve bellek üzerine etkilerini değerlendirmek için davranış deneyleri olarak lokomotor aktivite testi, water maze testi ve pasif sakınma testleri yapılacaktır.

Hücreye fizyolojik süreçleri güçlü bir şekilde etkileyen ER katlanma yanıtı; hücrenin homeostazisinin sürdürülebilmesi için önemlidir. Bu nedenle katlanma yanıtında meydana gelen kusurlar birçok hastalığın patolojisiyle ilişkilidir. Bu çalışma iki farklı dozda Tg uygulaması ile bozulan ER katlanma yanıtının absans epilepsi patogenezi üzerine moleküler ve fonksiyonel düzeyde etkilerinin araştırılması; ER stresine karşı hassasiyetin belirlenmesini ve absans epilepsi patofizyolojisini etkileyen moleküler değişimlerin değerlendirilebilmesine olanak sağlayacaktır. Bu stresin meydana getirdiği ya da ağırlaştırdığı patolojik duruma karşı ilgili kaskadın işleyişine yönelik tedavi stratejileri geliştirebilir. Ayrıca absans epilepsi patogenezi / patofizyolojisine katılan ER stresi ve

KPY ile ilişkili moleküler belirlenerek tanı amaçlı belirteçlerin geliştirilmesinde katkıda bulunabilir.

Bu projede hedeflenen amaçlar aşağıda sıralandığı gibidir;

i. Absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda ER stresinin aktif hale getirdiği moleküler yolakların belirlenmesi; bu çalışmada beyin dokusunda ER stresi esnasında talamus ve korteks bölgelerinde aktif hale gelen moleküler yolakları incelemek için ER stresine yanıt kaskadında yer alan GRP78 ve ERp57 şaperonlarının protein miktarı ve PERK, XBP-1 ve ATF6'nın mRNA düzeyinde ifadeleri araştırmak.

ii. ER stresi süreçlerinde aktif hale gelen ER stres yollarının gösterilmesiyle, bu yolakların SWD aktivitesi ve T-tipi Ca kanalları üzerine etkisinin araştırılması; bu çalışmada ER stresi esnasında absans nöbet aktivitesi üzerine fonksiyonel etkiler EEG kaydı alınarak SWD sayı ve süreleri değerlendirilerek incelenmesi, ayrıca SWD aktivitesi oluşumunda önemli bir kanal olan T-tipi Ca²⁺ kanalının ekspresyon seviyeleri belirlenmesi.

iii. ER stresi süreçlerinde aktif hale gelen yolakların, davranış ve öğrenme üzerine etkisinin araştırılması,

Böylece bu çalışmada bozulan ER katlanma yanıtının moleküler, elektrofizyolojik ve davranış düzeyinde absans nöbet patogenezi üzerine etkisi araştırılacaktır. ER stresin spasyal öğrenme ve bellek üzerine etkilerini değerlendirmek için davranış deneyleri olarak lokomotor aktivite testi, water maze ve pasif sığınma testleri yapılacaktır.

3. YÖNTEM

3.1. Hayvanların Eldesi ve Genel Deney Prosedürü

Çalışmamızda 6-8 aylık, 250-350 gram ağırlığında erkek genetik absans epileptik WAG/Rij ırkı sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık-karanlık döngüsüne uygun, sabit ısı (20-40°C) odalarda, yiyecek ve içecek alımları serbest bırakılarak barındırıldı. Tüm hayvanlar cerrahi işlem sonrası sosyal izolasyonun etkisini azaltmak için her büyük kafeste 4 hayvan kalacak şekilde tutuldu. Yapılacak deneyler Kocaeli Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından KOÜ HADYEK 7/2 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Çizelge 3.1. Deney için kullanılan hayvan grupları

EEG kayıtları için;	N
1.Grup: 20 ng tek doz Tg uygulanan	8
2.Grup: 200 ng tek doz Tg uygulanan	8
3.Grup: Serum Fizyolojik kontrol grubu	8
4.Grup: % 4 dimetil sülfoksit (DMSO) grubu	8
Toplam	32
Davranış deneyleri için;	N
1.Grup: 20 ng tek doz Tg uygulanan	10
2.Grup: 200 ng tek doz Tg uygulanan	10
2.Grup: 200 ng tek doz Tg uygulanan	10
3.Grup: Serum Fizyolojik kontrol grubu	10
4.Grup: % 4 dimetil sülfoksit (DMSO) grubu	10
5.Grup: Naif Kontrol	
Toplam	50
Moleküler çalışmalar için;	
1.Grup: 20 ng tek doz Tg uygulanan	6
2.Grup: 200 ng tek doz Tg uygulanan	6
2.Grup: 200 ng tek doz Tg uygulanan	6
3.Grup: Serum Fizyolojik kontrol grubu	6
4.Grup: % 4 dimetil sülfoksit (DMSO) grubu	6
5.Grup: Naif Kontrol	6
Toplam	30

Çalışmada manipülasyon etkisini azaltmak ve her deneysel yöntem için ayrı hayvanlar kullanıldı. EEG kayıtları için 32, davranış deneyleri için 50 ve moleküler çalışmalar için 30 adet sıçan olmak üzere toplam 112 adet WAG/Rij ırkı sıçan kullanıldı.

3.2. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

Tris Tamponu (1,5 M; 100 mL);

18,15 gr Tris tartıldı ve 80 mL saf suda çözüldü. pH karıştırıcıda HCl kullanılarak 8,8'e ayarlandı ve 100 mL tamamlandı.

Tris Tamponu (0,5 M; 100 mL);

6 gr Tris tartıldı ve 80 mL saf suda çözüldü. pH karıştırıcıda HCl kullanılarak 6,8'e ayarlandı ve 100 mL tamamlandı.

Soyum dedosil sülfat solüsyonu (SDS, %10, 10 mL);

1 gr SDS dikkatlice tartılarak 10 mL saf su içerisinde karıştırıcıda çözüldü.

Amonyum persülfat (APS, %10, 10 mL);

1 gr APS (BioRAD, 1610700) dikkatlice tartılarak 10 mL saf su içerisinde karıştırıcıda çözüldü. +4 C'de muhafaza edildi.

Akrilamid-Bisakrilamid (%30, 100 mL);

29,2 gr akrilamid ve 0,8 gr akrilamid tartılarak 100 mL saf su içerisinde çözüldü. Filtre edilerek +4 C'de muhafaza edildi.

SDS-PAGE yürütme tamponu (1L);

30 gr Tris, 144 gr Glisin ve 10 gr SDS distile su içerisinde çözülür.

SDS-PAGE fiksatif (%40 metanol, %10 Asetik asit, 100 mL);

40 mL metanol, 10 mL asetik asit distile su ile 100 mL tamamlanarak karıştırıldı.

TBS tamponu (10X, 1L);

24.2 gr Tris, 80 gr NaCl distile su içerisinde çözülür.

Western Blot Transfer tamponu (100 mL);

0.58 gr Tris ve 0.29 gr Glisin, 375 µL %10 SDS 100 mL distile su içerisinde çözülür.

Bloklama solüsyonları (%5, 10 mL);

0,5 gr bloklama tozu ya da BSA, 10 mL TBS-T içerisinde çözüldü.

Ponceau S (100 mL);

0,1 gr Ponceau S tartılarak 0,5 ml asetik asit ile karıştırılır ve 100 mL saf suda çözülür.

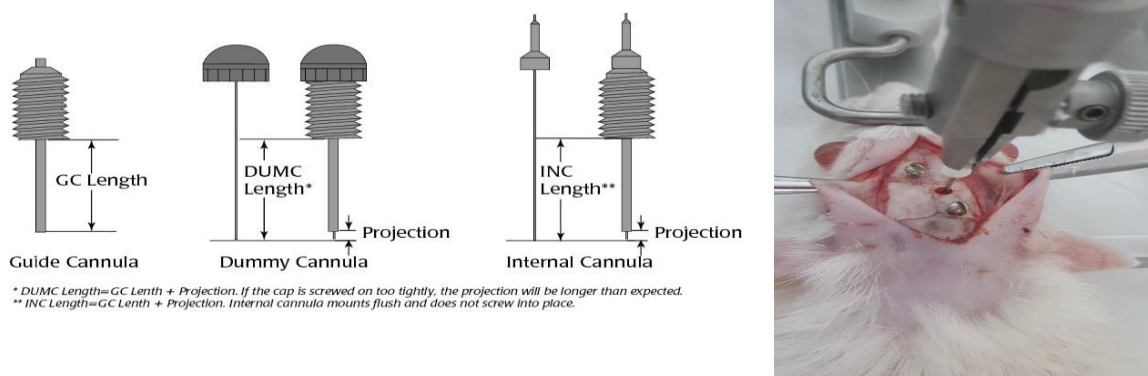
Metilen mavisi (%2, 10 mL);

0,2 gr metilen mavisi tartılarak 10 mL serum fizyolojik içerisinde çözüldü.

3.3. EEG Elektrotlarının Ve Kanülün İntraserebroventriküler Yerleştirilmesi İçin Uygulanan Cerrahi İşlemler

Cerrahi işlemler, tüm deney sıçanlarına intarperitoneal (i.p) uygulanan 90 mg/kg ketamin ve 12 mg/kg xylazin anestezisi altında gerçekleştirilmiştir. Anestezi derinliğini saptayabilmek için uyarıya cevaben oluşan kornea ve pençe refleksleri kontrol edildi. Sıçanların kafa tüyleri tıraş edildikten sonra kulaklarından ve ön dişlerinden stereotaksik (Stoelting) cihaza sabitlenerek orta hattan bir insizyon açılmıştır. Kafatası kemikleri üzerinde bulunan lambda ve bregma alanları ortaya çıkarılarak tüm elektrot ve kanüller Paxinos ve Watson'un (1998) sıçan beyni atlasında gösterilen koordinatlara göre takılmıştır. Bregma noktası sıfır '0' kabul edilerek koordinatlar hesaplandı. Elektrot ve kanüllerin sabitliğini artırmak için 2 adet sabitleme vidası yerleştirildi. Dental akrilik ile elektrot ve kanüller kafatası ve vidalara sabitlendi. Cerrahi işlemler sonrası hayvanlar 1 haftalık dinlenme periyoduna alındı ve takip edildi.

Tripolar EEG elektrodları (MS333/2A), bir ucu frontal korteks (Anteroparietal: 2,0 mm, Lateral: -3,5 mm), bir ucu oksipital kortekste (Anteroparietal: -6,0 mm, Lateral: -4,0 mm) ve referans ucu serebellum üzerinde olacak şekilde yerleştirilmiştir. İnternal kanüller (C313G), Paxinos ve Watson'un (1998) atlası dikkate alınarak sağ lateral ventriküle (Anteroparietal: -1,0 mm, Lateral: -1,5 mm, Vertikal: -3,5 mm) denk gelecek şekilde yerleştirilmiştir (Çizim 3.1). Kafa içi basınç değişimini ve sıvı kaçışını engellemek için kanüller, deney gününe kadar dummy kanülleri (C313FD/SPC) ile kapatıldı (Ateş ve diğ. 2004).



Çizim 3. 1. İntraserebroventriküler (i.c.v.) uygulama için kullanılan kanüllerin özellikleri ve sağ ventriküle yerleştirilmesi

3.4. Tapsigargin, Serum Fizyolojik ve Dimetilsülfoksidin İntraserebroventriküler Uygulanması

Bir haftalık iyileşme periyodu ardından hayvanlar deneylere alındı. Tg, dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmektedir. 1 mg Tg, 1 ml DMSO içerisinde çözümlenerek stok solüsyon hava akımlı kabin içerisinde hazırlandı ve 200 mikrolitrelik tüplerde alikotlandı. Kontrol grubu için serum fizyolojik, % 4'lük DMSO ve stok solüsyondan elde edilen tek doz halinde 20 veya 200 ng Tg (DMSO oranı % 4 olacak şekilde), toplam 1 mikrolitre hacim içerisinde Hamilton enjektörü yardımıyla i.c.v olarak sağ lateral ventriküle zerk edildi (Zhang ve diğ. 2014).

3.5. Elektrofizyolojik Parametrelerin Kaydedilmesi ve Değerlendirilmesi

Deney öncesi hayvanlar ortama ve sisteme alışabilmeleri için bir günlük kayıt alındı. EEG kayıtları için hayvanlar içinde talaş bulunan pleksiglas kafesler içerisinde mikrokonektörler aracılığı ile kayıt sistemine (BIOPAC MP100) bağlandı. Sabah saatlerinde bir saatlik bazal kayıt alınarak ilaçlar (SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg) uygulandı ve 1 saat boyunca kayıtları alındı. 24 saat sonra etkisini görebilmek için EEG kayıtlarına ertesi gün devam edildi. Çalışmanın EEG analizinin günlük sirkadyen ritimden etkilenmemesi için kayıtlar 08:00-12:00 saatleri arasında alınmıştır. EEG kayıtları analiz edilerek SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süreleri hesaplandı (Ateş ve diğ. 2004).

3.6. Davranış Testlerinin Uygulanması ve Değerlendirilmesi

SF, DMSO ve Tg'nin davranış üzerine etkisini gösterebilmek için bir hafta boyunca teste tabi tutuldular. Depresif durumlarını belirlemek için lokomotor aktivitesi, duygusal öğrenme için pasif kaçınma ve uzaysal (epizodik) öğrenme için water maze testi yapıldı. Davranış deneyleri öncesi sıçanlar çalışmanın yapılacağı odaya getirilerek 20 dakika kadar ortama alıştırdı.

3.6.1. Locomotor Aktivitesi

Locomotor aktivitesi (Commat) için 5 dakika alışma süresini (ortamı keşfetme hareketlerinin lokomotor aktivite sonuçlarını etkilememesi için) takiben yine 5 dakika boyunca hayvanın hareketleri kaydedilecektir. Bu test özellikle hayvanların spontan aktivite değişimleri değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır, uygulanan ilaçların davranışlar üzerine etkilerini gözlemlemeye yardımcı olmaktadır. Deneklerin agresifliğinin ve anksiyete durumlarının değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir testtir. Locomotor aktivitesi için kullanılan sistemde steryotipik, ambulatuvar, vertikal, horizontal hareketler, total hareket sayısı, kat edilen mesafe değerlendirildi. Horizontal hareket hayvanın yer değiştirme ya da dikilme olmaksızın yaptığı hareketlerdir. Vertikal ise dikilme hareketidir,

ambulator hareket ise deneğin dikilme dışında yaptığı gezinme hareketidir. Horizontal, vertikal ve steryotipik hareketler agresifliği hakkında bilgi vermektedir. Her üç hareketin toplamı total lokomotor aktivite olarak değerlendirilmektedir. Hayvanların sağlık durumlarını belirleyebilmek için ilaçların uygulanmasından önce ve ilaçların lokomotor aktivitesi üzerine etkisini görebilmek için uygulamadan 24 saat sonra lokomotor aktiviteleri ölçüldü.

3.6.2. Water Maze (Morris'in Su Labirenti) Testi

İçinde beyaz silikon boncukların bulunduğu içi su dolu genişçe bir su tankı ve içerisinde yerleştirilmiş bir platformdan oluşmaktadır. Bu testin amacı su tankı içine bırakılan sıçanın daha önce yeri öğretilmiş su içerisinde gizlenmiş platformu bulmaya ve su tankına bırakıldığında en kısa yoldan ve en kısa sürede platforma ulaşmaya çalışmasının değerlendirilmesidir. Bu test esnasında 4 günlük bir öğrenme periyodunda sıçanlar seçilen 3 kadrandan başlayarak bir dakika boyunca yüzdürüldü ve her yüzme periyodu sonrası 10 saniye boyunca platforma bırakılarak yerinin öğrenmesi sağlandı. Bu testi yaparken uygulayan kişinin aynı kıyafeti giymiş olması ve aynı yerde duruyor olması gerekmektedir. 5.gün platform tankın içinden çıkarıldı ve bir dakika içerisinde platformun bulunduğu alana giriş süresi ve kalma süresi değerlendirildi. Suyun sıcaklığı deney boyunca 24 ± 2 °C'de sabit tutuldu.

3.6.3. Pasif Kaçınma Testi

Pasif kaçınma testi (Ugo Basille 7551), bu testte birbirine eşit ebatta iki bölüm bulunmaktadır. Bu iki bölüm arasında açılan bir kapı ve altlarında bir ızgara bulunmaktadır. İki bölümden biri karanlık diğeri ise çok aydınlatılmıştır. Bu test esnasında sıçanların normal davranışı olan daha az aydınlık alanları tercih etme dürtüsü kullanılır. Ancak amnezik etkisi olduğu düşünülen ilaçlar bu deneyin sonucunu etkilerler. Pasif kaçınma düzeneği ile sıçanların öğrenme ve bellek performansları değerlendirilmekte kullanılan önemli bir metottur. Bu test iki gün sürmektedir. İlk gün sıçanlar aydınlık ortama konulur ve kapı açılır, sıçanın karanlık ortama girme süresi belirlenir. Karanlık ortama girmesi 300 saniye süren denekler deney dışı bırakıldı. Alıştırmadan 1 saat sonra sıçanlar tekrar düzeneğe aydınlık tarafta yerleştirilerek, karanlık alana geçtikten sonra 0,5 μ V elektrik şoku uygulandı. 24 saat sonra sıçanlar tekrar düzeneğe yerleştirilerek, karanlık alana geçiş süresi kaydedildi. Bu süreye retansiyon denir. Öğrenmiş olan sıçanlarda retansiyon süresi uzayacaktır, ancak verilen madde amneziye neden oluyorsa retansiyon süresinin düşük olacaktır.

Davranış deneyleri sıçanların aktif olduğu 09:00-12:00 saatleri arasında yapıldı (Göçmez ve diğ., 2015; Karson ve diğ., 2012; Şahin ve diğ., 2016).

3.7. Sıçanların İntrakardiyak Perfüzyonu ve Dokuların Elde Edilmesi

Yapılacak işlemler bittikten sonra sıçanların beyin dokuları elde edildi. Dokuları almadan önce moleküler çalışmaların sonucunun kan bileşenleri tarafından etkilenmemesi için sıçanlar ılık serum fizyolojik ile intrakardiyak perfüze edildi. Perfüzyon esnasında serum setinin iğnesi sol ventrikül içerisine sabitlendi ve sağ kulakçık kesilerek serum fizyolojik solüsyonunun dolaşım sistemi boyunca geçmesi sağlandı. Her bir sıçan için gerekli perfüzyon solüsyon miktarı ve perfüzyon zamanı ağırlığı ile orantılı olarak belirlendi. Perfüzyon sonrası beyin dokusu dikkatlice çıkarılarak ağırlığı ölçüldü ve soğuk ortamda gerekli beyin bölümleri (korteks ve talamus) elde edildi ve sıvı azot içerisinde hızla donduruldu. Sağ beyin bölgeleri steril ependorf tüplerine (1,5 mL) konularak RT-PCR uygulaması için gerekli olan RNA later solüsyonu eklendi. Western Blot (WB) için kullanılacak olan sol beyin bölgeleri yine steril ependorf tüpler (1,5 mL) içine koyularak hızlıca donduruldu.

3.8. Western Blot Tekniği İçin Dokulardan Protein Örneklerinin Elde Edilmesi

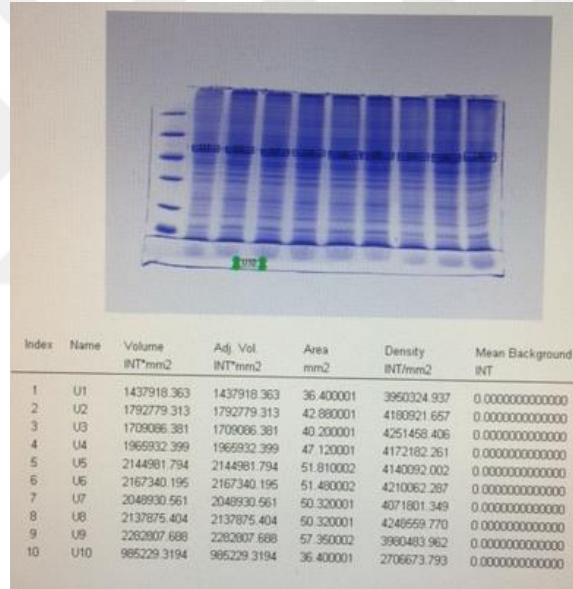
Sol korteks ve talamus dokuları 50 µg parçalar halinde ayrıldı. Dokular üzerine 400 µl, 0,1 M ve pH'sı 7,6'ya ayarlanmış Tris tamponu eklenerek homojenizatör yardımıyla, en yüksek hızda +4 derecede iki dakika boyunca parçalandı. Daha sonra homojenat üzerine 50 µl %20 SDS ve 1 mM DTT (Ditiotreitol) içeren çözelti eklendi, karıştırıldıktan sonra 95 derecede 3 dakika boyunca inkübe edildi. Hücre debrisinden kurtulmak için elde edilen homojenatlar 15000 rpm, +4 derecede 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Daha temiz protein örneklerinin eldesi için 20000 rpm'de tekrar santrifüj edildi. Bu aşamada proteazların aktivitesini durdurmak için tüm işlemler buz içinde yapıldı.

3.8.1. Elde Edilen Protein Örneklerinin Konsantrasyonunun Bradford Yöntemiyle Ölçülmesi

1 µl protein örneği üzerine 19 µl 2D buffer eklendi, örnek 1:20 oranında çözüldü. Daha sonra üzerine 980 µl Bradford çözeltisi eklenerek karanlık ortamda 5 dakika bekletildi. 20 µl 2D tamponu üzerine 980 µl Bradford çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Protein örnekleri 10 adet olacak şekilde gruplara ayrıldı ve her 10 adet protein örneği için taze kör hazırlandı. Elde edilen çözeltiler Nanodrop cihazında, kendi yazılımında Bradford için ayarlanan programda ölçüldü. Her protein örneği için en az 3 ölçüm yapıldı ve ortalamaları alınarak ml içerisinde bulunan protein miktarı µg cinsinden hesaplandı.

3.8.2. Protein Örneklerinin Yürütülmesi Ve Protein Kalitesinin Belirlenmesi

Protein örneklerinin kalitesinin belirlenmesi için 1D elektroforez yapıldı. Öncelikle yürütme jeli Bis-Acrilamid oranı %12, yükleme jeli Bis-Acrilamid oranı % 4 olan SDS-PAGE jelleri hazırlandı. Jeller bir iki gün buzdolabında bekletildikten sonra kullanıldı. Jeller kasetlere yerleştirilerek yürütme tankına konuldu ve içerisine yürütülecek jel kadar yürütme tamponu ekledi. Protein örnekleri 20 µg olacak şekilde yükleme boyası ve distile su içerisinde çözüldü. 5 dakika boyunca 100 derece de örnekler kaynatılarak jel üzerinde kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklara yüklenen örnek hacmi 20 µl olarak ayarlandı. Daha sonra örnekler yükleme jeli geçene kadar 120V, geçtikten sonra 180 V olacak şekilde bir saat boyunca yürütüldü. Yürütülen jeller kasetlerden çıkarılarak fiksatife alındı ve bir saat boyunca yatay çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Commasie blue boyası eklenerek gece boyunca jellerin boyanması beklendi. Boyanan jeller distile su ile boyadan arındırılarak bantların kalitesi değerlendirildi.



Çizim 3. 2. Bant yoğunluklarının ölçülmesi.

3.8.3. Kalitesi Belirlenen Protein Örneklerinden Havuz Hazırlanması

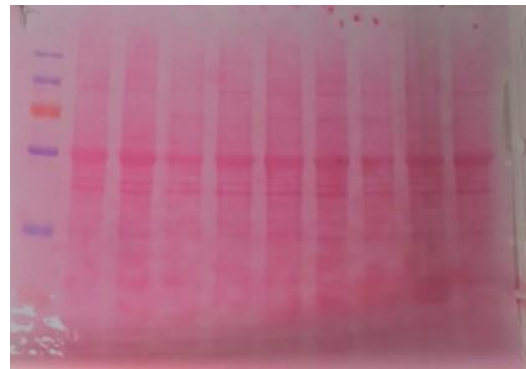
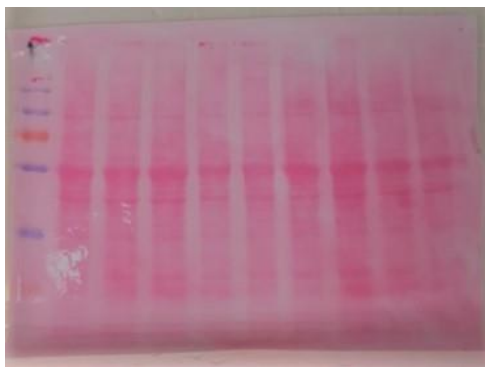
Protein kalitesi değerlendirilmiş olan örneklerden Western Blot uygulamaları için havuz oluşturuldu. Havuz oluşturmak çok sayıda örneği kullanılabilmesini kolaylaştırmaktadır. Öncelikle her çalışma için kuyucuklara yüklenecek örnek miktarı belirlendi ve tekrar sayısı göz önünde bulundurularak toplam kullanılacak protein miktarı hesaplandı. Bu hesaba uygun her grubun örnekleri kendi içerisinde belli miktarlarda aynı tüpe aktarıldı. Aktarılan örneklerin konsantrasyonu tekrar Bradford yöntemiyle ölçüldü. Talamus ve korteks için ayrı gruplar oluşturuldu, proteinlerin yüklemeleri bu gruplara göre yapıldı.

Çizelge 3.2. Western Blot için havuz oluşturulan protein örnekleri

Korteks Naif kontrol	n=6	NK
Korteks SF kontrol	n=6	SK
Korteks DMSO kontrol	n=6	DK
Korteks 20 ng Tg	n=6	T1K
Korteks 200 ng Tg	n=6	T2K
Talamus Naif kontrol	n=6	NT
Talamus SF kontrol	n=6	ST
Talamus DMSO kontrol	n=6	DT
Talamus 20 ng Tg	n=6	T1T
Talamus 200 ng Tg	n=6	T2T

3.8.4. Yürütülen Protein Örneklerinin Membrana Aktarılması, Kontrolü Ve İmmünoblotlama

ERp57 (SantaCruz, ABD) ve GRP78 (SantaCruz, ABD) proteinleri için 30 µg, %12 bis-acrilamid içeren jel içerisinde yürütüldü. 6x8 cm boyutlarında nitroselüloz membranlar(0,45 µm; Amersham, 10600002) kesildi. Proteinlerin daha iyi geçebilmesi için nitroselüloz membran metanol içeren TBS-T içerisinde birkaç dakika bekletildi. Elektriği iletmek için kullanılacak olan whatman kâğıtları TBS-T ile ıslatıldı. Altına iki adet whatman kağıdı, üstüne membran, mebranın üstüne jel ve jelin üstüne iki adet whatman kağıdı olacak şekilde sandviç hazırlandı. Hazırlanan sandviç proteinlerin yarı-kuru transferini sağlayan Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazına aktarıldı. Negatif yüklü proteinler, 25 dakika sabit 15 V'luk elektrik akımıyla anoda tekabül eden nitroselüloz membrana geçişi sağlandı. Proteinlerin membrana düzgün bir şekilde aktarıldığını kontrol etmek için Ponceau S boyası içerisinde bir dakika bekletildi ve proteinlerin eşit miktarda yüklenmesinin kontrolü yapıldı (Çizim 3.3).



Çizim 3. 3. Membrana aktarılan proteinlerin Ponceau S boyası kullanılarak kontrol edilmesi (Solda korteks dokusu, sağda talamus dokusu)

TBS-T ile membranlar bir dakika çalkalanarak Ponceau S boyası uzaklaştırıldı. Membranlar bloklama aşamasında % 5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde, oda ısısında bir saat çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra süt tozunu uzaklaştırmak için membranlar sırasıyla 15-5-5 dakika olacak şekilde TBS-T solüsyonuyla yıkandı. Membranlar yıkama sonrası her birinin protokolü tabloda verilen TBS-T içerisinde dilüe edilmiş antikolarla oda ısısında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar fazla antikordan arındırmak için tekrar sırasıyla 15-5-5 dakika olacak şekilde yıkandı. İkincil antikolar yine tabloda belirtildiği dilüsyonlarda TBS-T içerisinde dilüe edildi ve membranların üzerine eklenerek bir saat oda ısısında inkübe edildi. Membranlar tekrar 3 kere TBS-T yıkandı. ECL Western Blotting detection reagents kiti kullanılarak görüntüleme yapıldı. Membran üzerindeki proteinler kemilüminesans reaksiyonu sonucu elde edilen sinyal ile saptandı. Immun-Star HRP Peroxide tamponu ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer (Bio-Rad, ABD) eşit miktarda karıştırılarak membran üzerine iyice yayıldı. Streç film yardımıyla eşit yayılması sağlandı. Hypercassette (Amersham, Biosciences) içerisine yerleştirilen membranda oluşan sinyali gözlemleyebilmek için X-ray filmi kullanıldı.

Çizelge 3.3. Değerlendirilen proteinler için kullanılan antikoların özellikleri

Katalog numarası	Anikor Adı	Markası	Bloklama	Dilüsyon Oranı	İkincil Antikor ve Dilüsyon Oranı
	ERp57	SantaCruz	%5 süt tozu	1:500	Anti-mause-HRP/1:5000
	GRP78	SantaCruz	%5 süt tozu	1:500	Anti-mause-HRP/1:5000

3.9.RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Deney gruplarının göreceli gen ekspresyon analizi için RNA İzolasyon Kiti (Exiqon) ile total RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Dokular homojenizator (Ika Ultra-Turrax) kullanılarak, lizis solüsyonu ile homojenize edildi. Kitin önerdiği şekilde RNAaz içermeyen su ile sulandırılarak 20 µL Proteinaz K enzimi ile 55°C de 10 dk inkübe edildi. 14,000 x g de santrifüj sonrası süpernatant yeni bir tüpe aktararak hücre atıkları uzaklaştırıldı. Supernatanta 450 µL 96-100% ethanol eklenilerek, vortex ile karıştırıldı. Bu

karışım aşamalı olarak filtreli kolonlara aktarıldı. Santrifüj ile RNA içeriğinin kolonlara emdirilmesi sağlandıktan sonra kolonlar 2 farklı yıkama solusyonu ile 14,000x g'de 2 dk santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar 1 dk boş çevrilerek kalan etanolun uzaklaştırılması sağlandı. Saf olarak RNA'yı içeren kolonlar temiz bir ependorf tüpüne alındı. 50 µL elution buffer eklenerek santrifüj ile RNA'nın temiz ependorflara çöktürülmesi sağlandı.

Örneklerin saflığı ve miktarı Pikodrop cihazıyla ölçüldü. Saflığın istenilen 1,8-2,0 aralığında olduğu saptandı. Komplementer DNA (cDNA) sentez kiti ile (Biorad iScript™ cDNA Synthesis Kit); reaksiyon buffer, revers transkriptaz enzim ve nukleaz içermeyen su ve RNAlarımızın bulunduğu bir karışım hazırlanarak, termal cyclus cihazında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez reaksiyonu için hazırlanan karışımda bulunan RNA'ya Oligo DT ve random hexamer primerler bağlanmış ve reaksiyon karışımı içinde bulunan RNAdan cDNA sentezini gerçekleştirecek ters transkriptaz enzimi ve dNTP ile RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon için gerekli sıcaklıklar 5 dk 25°C, 30 dk 42°C, 5 dk 85°C 'dir. cDNA'lar -20°C'de PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) aşamasına kadar saklanmıştır.

3.9.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

PZR reaksiyonu için; Taqman hidroliz prob temelli (Applied Biosystems; Taqman Gene Expression assays) kantitatif Real-Time PCR yapıldı. Örneklerde Eif2ak3, XBP1, ATF6, CACNA1h genleri Real time PZR cihazında (Lightcycler480-II, Roche) çalışılmıştır. Housekeeping (Referans) gen olarak GAPDH geni kullanılmıştır. Deney gruplarında referans genlerinin ifadelerine göre hedef genlerin ifadeleri karşılaştırılmış ve sonuçlar Roche Light cyclus yazılımıyla $\Delta\Delta C_p$ metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.10. İstatistiksel Analiz

Çalışmada istatistiksel analizlerin yapılması için Graphpad Prism 6.0 programı kullanıldı. Elde edilen veriler normal dağılıma uygun olanlar parametrik tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA), olmayanlar için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi kullanılarak istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı. İki bağımsız değişken bulunan gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için çift yönlü varyans analizi (two way ANOVA) kullanıldı. $p < 0,05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. SWD analizleri için non-parametrik olmayan Friedman kullanıldı. Analizler Graphpad 6.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standart hata (Mean \pm SEM) olarak ifade edilmiştir.

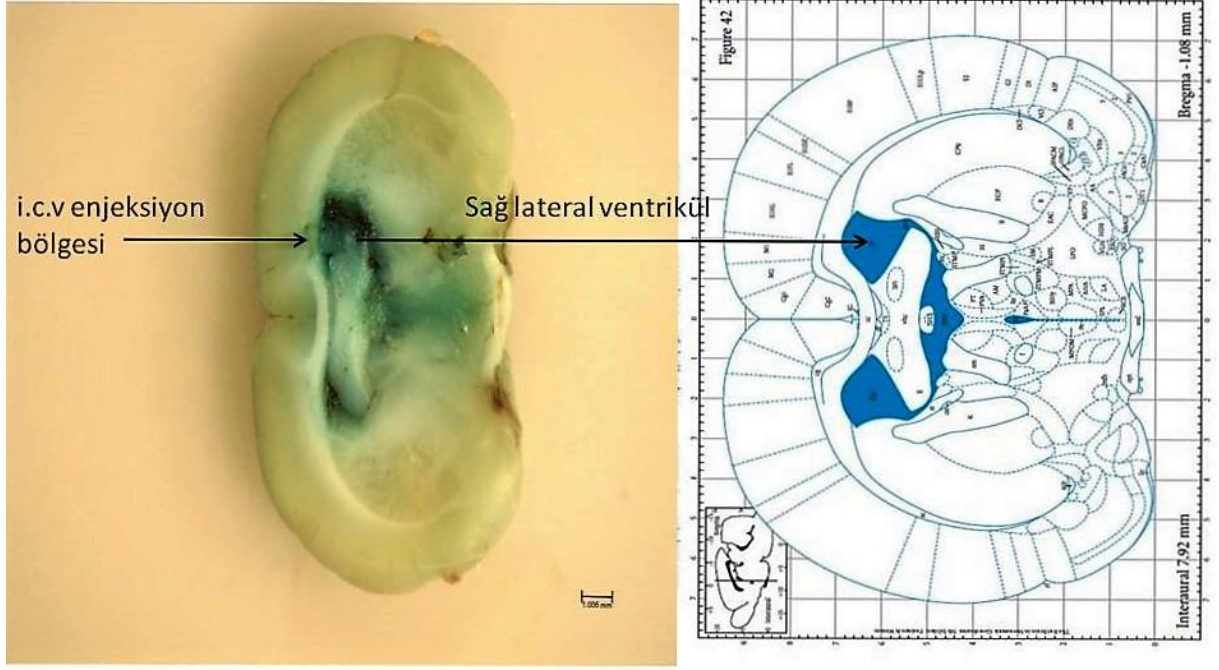
4. BULGULAR

4.1. İntraserebroventriküler Kanülün Doğru Yerleştirildiğinin Gösterilmesi-Doğrulanması

İlaçlar sağ ventriküle hamilton enjektörü ile 0,5 µl olacak şekilde uygulandı. İlaç enjeksiyonu için 22 gauge kanül (9 mm) ve projeksiyonu 0,5 mm'yi geçmeyecek şekilde internal kanül kullanıldı. İntraserebroventriküler verilen ilacın doğru bölgeye verildiğinden emin olmak için verifikasyon yapıldı. Eter anestezisi altında sıçanlara intraserebroventriküler %2 metilen mavisi uygulandı, 10 dakika içinde giyotin ile dekapite edildi. Çıkarılan beyin dokusu tamponlanmış %10 formaldehit içerisinde 5 gün boyunca bekletildi. 5.gün 1mm dilimler şeklinde kesilerek 15X Celestron Microcapture mikroskobunda görüntüsü alındı (Çizim 4.1 ve 4.2). Doğrulanamayan veriler değerlendirme dışı bırakıldı.



Çizim 4. 1. Kanüllerin doğru bölgeye yerleştirilmesi için kullanılan malzeme, alet ve cihazlar.



Çizim 4. 2. Intraserebroventriküler enjeksiyonun doğrulanması-verifikasyon, 15X

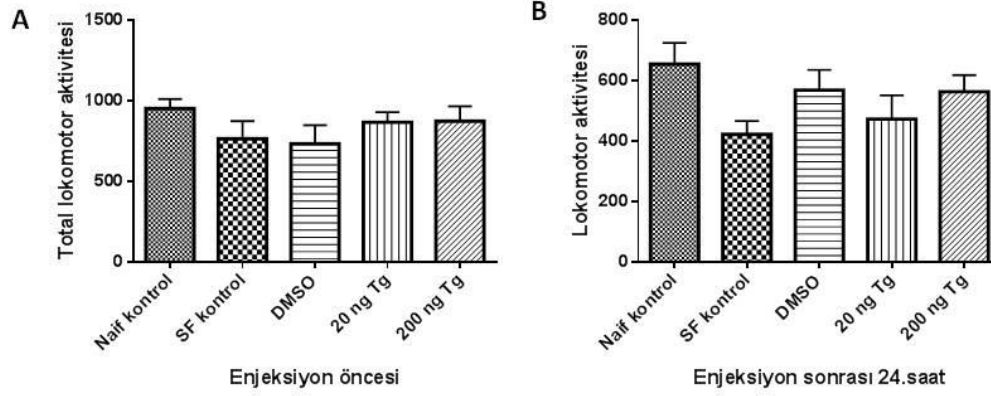
4.2. Lokomotor Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Davranış için kullanılan sıçanların cerrahi işlem sonrası 10 gün dinlenmeye bırakıldıktan sonra sıçanlar gruplara ayrıldı. Davranış çalışmaları için deney gruplarıyla birlikte (SF, DMSO, 20 ng TG ve 200 ng Tg) cerrahi işlem uygulanmamış naif kontroller de değerlendirmeye alındı. İlaç uygulaması öncesi/bazal ve 24 saat sonra lokomotor aktiviteleri kaydedildi. Bazal lokomotor aktiviteleri elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olduğu bulundu. Bazal lokomotor aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirmek için tek yönlü varyans (ANOVA) testi kullanıldı. Maddeler sağ lateral ventriküle enjekte edilmeden önce gruplar arasında bazal lokomotor aktivitelerinde anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$) (Çizim 4.3 ve Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Bazal ve 24.saat lokomotor aktivitelerinin ortalamaları.

Gruplar	Naif	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Enjeksiyon öncesi	953,0±58,64	764,0±110,2	733,5±115,4	868,0±62,38	874,7±92,22
Enjeksiyon sonrası 24.saat	655,6±70,88	422,6±44,54	569,6±66,56	473,0±78,36	564,6±54,3

SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg uygulamasının etkisini gözlemlemek için 24 saat sonra tüm grupların lokomotor aktivite testi tekrarlandı. Gruplar arasında bir anlamlılık bulunmadı. Bu sonuçlara göre SF, DMSO ve Tg uygulamasının lokomotor aktivitesi üzerine etkili olmadığı görüldü.



Çizim 4. 3. Tüm grupların A: enjeksiyon öncesi ve B: 24 saat sonrası lokomotor aktivitelerinin karşılaştırılması

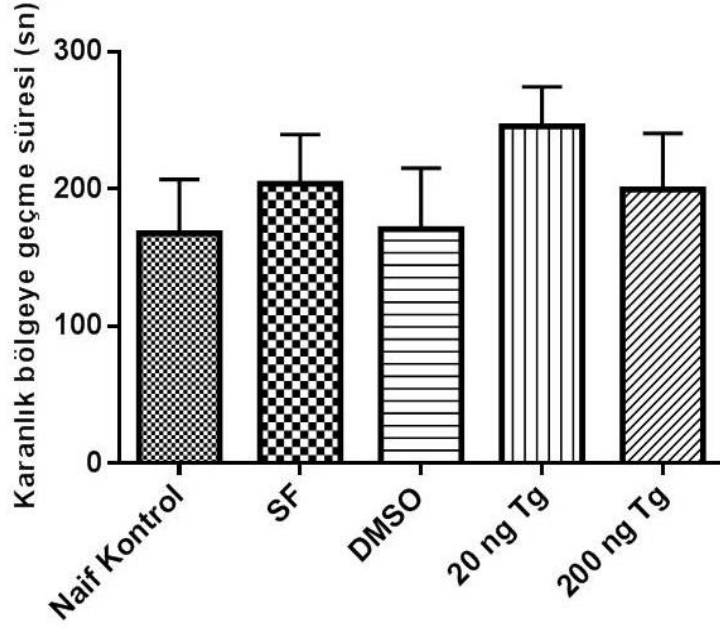
4.3. Pasif Kaçınma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deneye alınan sıçanların naif kontrollerle birlikte duysal uyaran (0,5 μ V) verilmeden önce karanlık bölgeye geçme süreleri değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olduğu hesaplandı ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA, parametrik) sonrasında Tukey's testi ile analiz edildi. Naif kontroller ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 4.2 ve Çizim 4.4).

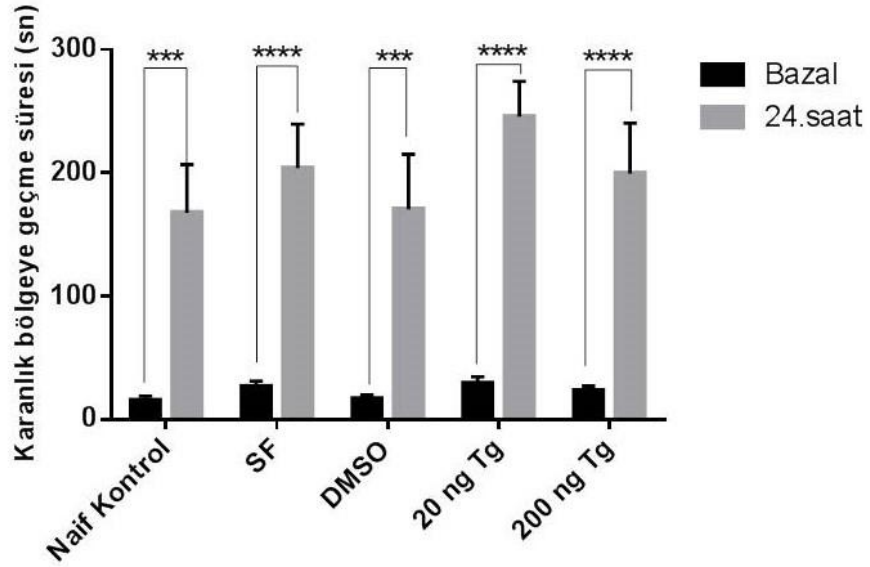
Duysal öğrenmeyi değerlendirmek için elektrik uygulandıktan 24 saat sonra sıçanlar tekrar aydınlık alana koyulup karanlık alana geçme süreleri değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygun olmadığı belirlendi ve parametrik olmayan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve sonrasına Kruskal Wallis testi kullanılarak analiz edildi. Naif kontroller ve gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0,05$). Bu sonuçlara göre Tg uygulamasının her iki dozunun duysal öğrenmeye etkili olmadığı gözlemlendi (Çizelge 4.2 ve Çizim 4.5).

Çizelge 4. 2. Tüm grupların elektrik uygulandıktan 24 saat sonra karanlık bölgeye geçme süreleri.

Gruplar	Naif	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Zaman					
Karanlık bölgeye geçme süreleri (sn)	167,5±39,37	204,0±35,64	170,6±44,53	245,6±28,68	199,6±40,64



Çizim 4. 4. Tüm grupların elektrik uygulamasından 24 saat sonra karanlık bölgeye geçme süreleri



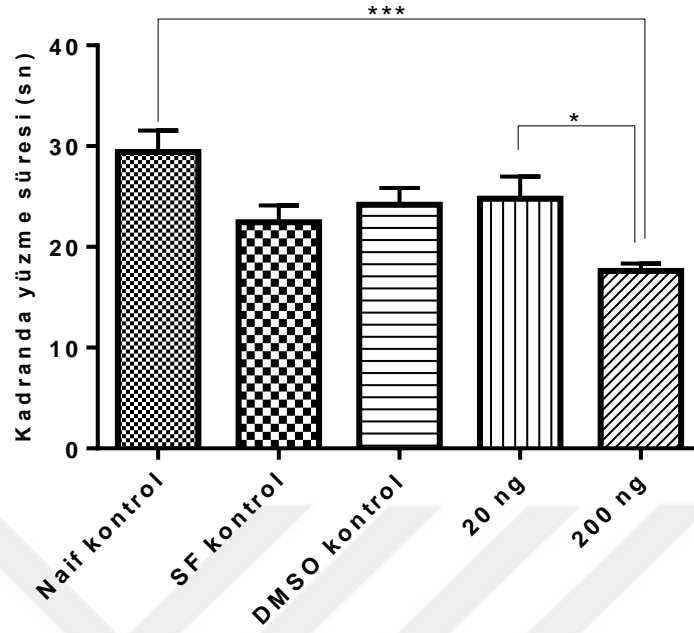
Çizim 4. 5. Tüm grupların bazal ve ilaç uygulamasından 24 saat sonra pasif sakınma testinin karşılaştırılması. Çift yönlü varyans analizi (Two-way Anova) ile yapılan iki bağımsız değişken analizine göre karanlık bölgeye geçme süreleri tüm gruplarda bazale oranla anlamlı bir şekilde arttığı görüldü, sonrasında yapılan Tukey's analizi ile bu artışın gruplar arasında anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p < 0,05$).

4.4. Water Maze Sonuçlarının Değerlendirilmesi

SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg sağ lateral ventriküle uygulaması naif kontrole göre tüm gruplarda platformun bulunduğu hedef kadranda yüzme zamanı azalmıştır. 200 ng Tg uygulanan grupta platformun bulunduğu kadranda yüzme süresi naif kontrole ve 20 ng Tg uygulamasına kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$). Veriler ortalama \pm SEM olarak elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olduğu hesaplandı ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA, parametrik) sonrasında Tukey's testi ile analiz edildi (Çizelge 4.3 ve Çizim 4.6.)

Çizelge 4. 3. Kadranda yüzme sürelerinin ortalamaları

Naif	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
29,43 \pm 2,117	22,44 \pm 1,670	24,18 \pm 1,681	24,78 \pm 2,208	17,62 \pm 0,723



Çizim 4. 6. Water Maze testi sonuçları karşılaştırılması.

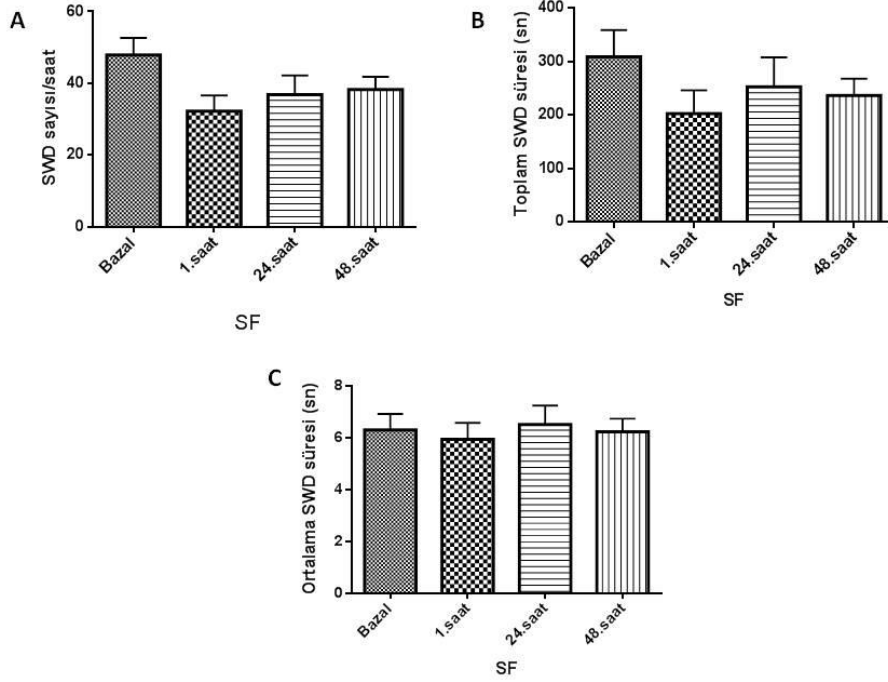
4.5. EEG Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

4.5.1. SF Uygulamasının EEG Aktivitesi Üzerine Zamana Göre Etkisinin Değerlendirilmesi

Sağ lateral ventriküle SF enjeksiyonu SWD aktivitesi üzerine etkisinin değerlendirildiğinde SWD sayısı, ortalama SWD süresi ve toplam SWD süresi üzerine zamana bağlı anlamlı bir değişiklik görülmedi. Veriler ortalama \pm SEM olarak değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi için non parametrik tek yönlü varyans (ANOVA) sonrasında Friedman testi kullanıldı (Çizelge 4.4 ve Çizim 4.7).

Çizelge 4. 4. SF uygulamasının zamana bağlı etkisinin SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süresi ortalamaları.

Gruplar	Bazal	1.saat	24.saat	48.saat
Zaman				
SWD sayısı	47,881 \pm 4,734	32,25 \pm 4,395	36,88 \pm 5,313	38,25 \pm 3,554
Toplam SWD süresi	309,2 \pm 49,52	202,8 \pm 43,59	252,9 \pm 54,79	237,0 \pm 31,09
Ortalama SWD süresi	6,317 \pm 0,613	5,947 \pm 0,639	6,522 \pm 0,731	6,243 \pm 0,505



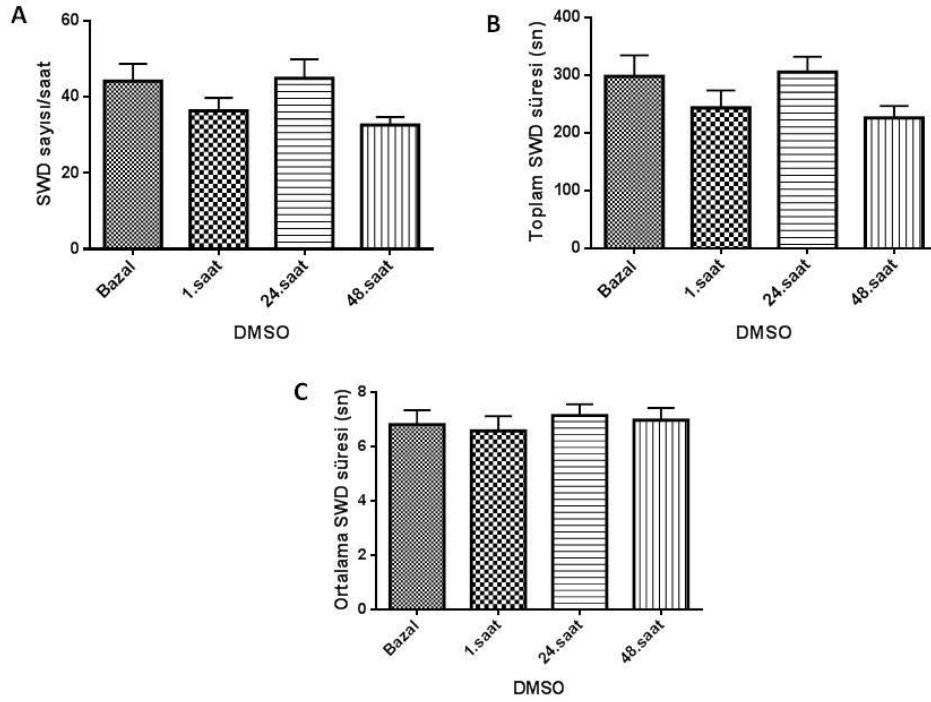
Çizim 4. 7. i.c.v SF enjeksiyonunun A: SWD sayısı, B: toplam SWD süresi ve C: ortalama SWD süresi üzerine etkisi.

4.5.2. DMSO Uygulamasının EEG Aktivitesi Üzerine Zamana Göre Etkisinin Değerlendirilmesi

Sağ lateral ventriküle DMSO enjeksiyonu SWD aktivitesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde SWD sayısı, ortalama SWD süresi ve toplam SWD süresi üzerine zamana bağlı anlamlı bir değişiklik görülmedi. Veriler ortalama \pm SEM olarak değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi için non parametrik tek yönlü varyans (ANOVA) sonrasında Friedman testi kullanıldı (Çizelge 4.5 ve 4.8).

Çizelge 4. 5. DMSO uygulamasının zamana bağlı etkisinin SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süresi ortalamaları

Gruplar	Basal	1.saat	24.saat	48.saat
Zaman				
SWD sayısı	44,13 \pm 4,561	36,38 \pm 3,327	44,88 \pm 5,012	32,63 \pm 2,078
Toplam SWD süresi	298,3 \pm 36,35	243,4 \pm 30,28	305,5 \pm 26,63	226,3 \pm 20,28
Ortalama SWD süresi	6,822 \pm 0,527	6,592 \pm 0,535	7,159 \pm 0,408	6,983 \pm 0,455



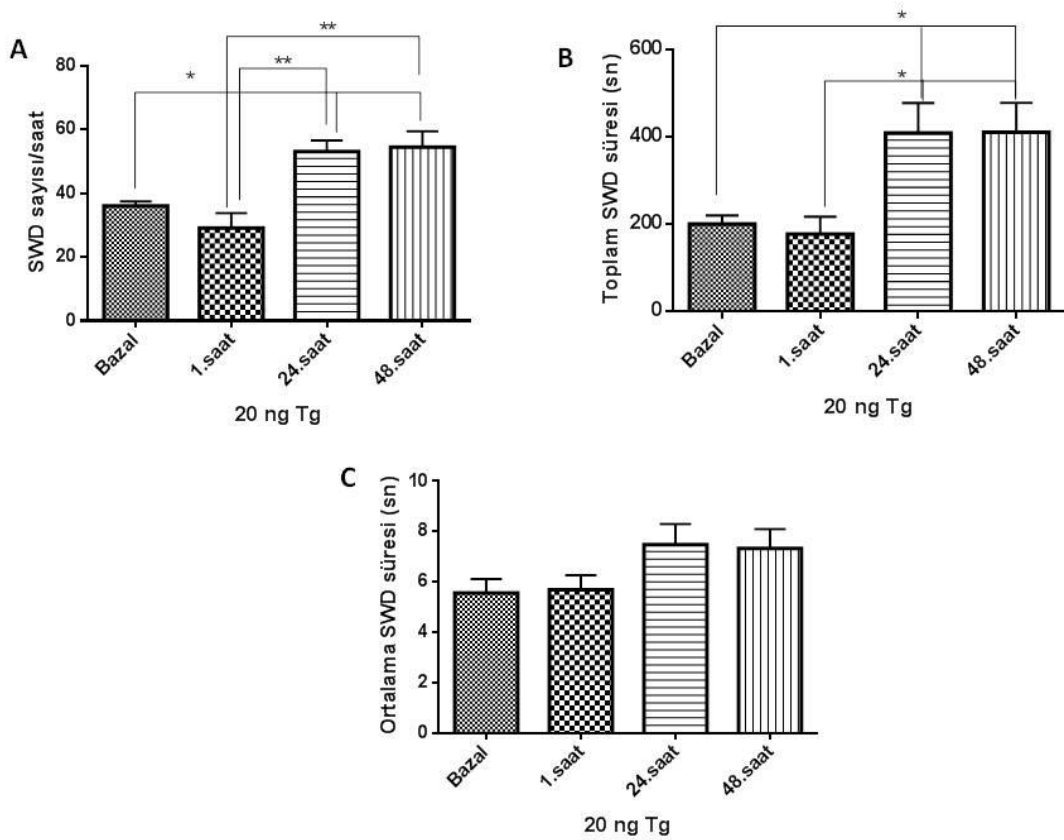
Çizim 4. 8. i.c.v DMSO enjeksiyonunun A: SWD sayısı, B: toplam SWD süresi ve C: ortalama SWD süresi üzerine etkisi.

4.5.3. 20 ng Tg uygulamasının EEG aktivitesi üzerine zamana göre etkisinin değerlendirilmesi

20 ng Tg uygulamasının SWD sayısında zamana göre karşılaştırdığımızda 24. ve 48. saatlerde SWD sayısının bazal döneme ve 1.saaate göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0,05$). 20 ng Tg uygulamasının toplam SWD süresi üzerine etkisi değerlendirildiğinde 24. ve 48. saatlerde SWD sayısının bazal döneme ve 1.saaate göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0,05$). ($p < 0,05$). 20 ng Tg uygulaması ortalama SWD süresi üzerine etkisi anlamlı bulunmadı. Veriler ortalama \pm SEM olarak değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi için non parametrik tek yönlü varyans (ANOVA) sonrasında Friedman testi kullanıldı (Çizelge 4.6 ve Çizim 4.9).

Çizelge 4. 6. 20 ng Tg uygulamasının zamana bağlı etkisinin SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süresi ortalamaları

Gruplar	Bazal	1.saat	24.saat	48.saat
Zaman				
SWD sayısı	36,13±1,381	29,13±4,631	53,13±3,523	54,50±4,932
Toplam SWD süresi	200,2±20,20	177,0±39,47	408,8±69,31	410,6±67,44
Ortalama SWD süresi	5,590±0,571	5,699±0,565	7,455±0,829	7,326±0,778



Çizim 4. 9. 20 ng Tg uygulamasının A: SWD sayısı, B: toplam SWD süresi ve C: Ortalama SWD süresi üzerine zamana göre etkisi.

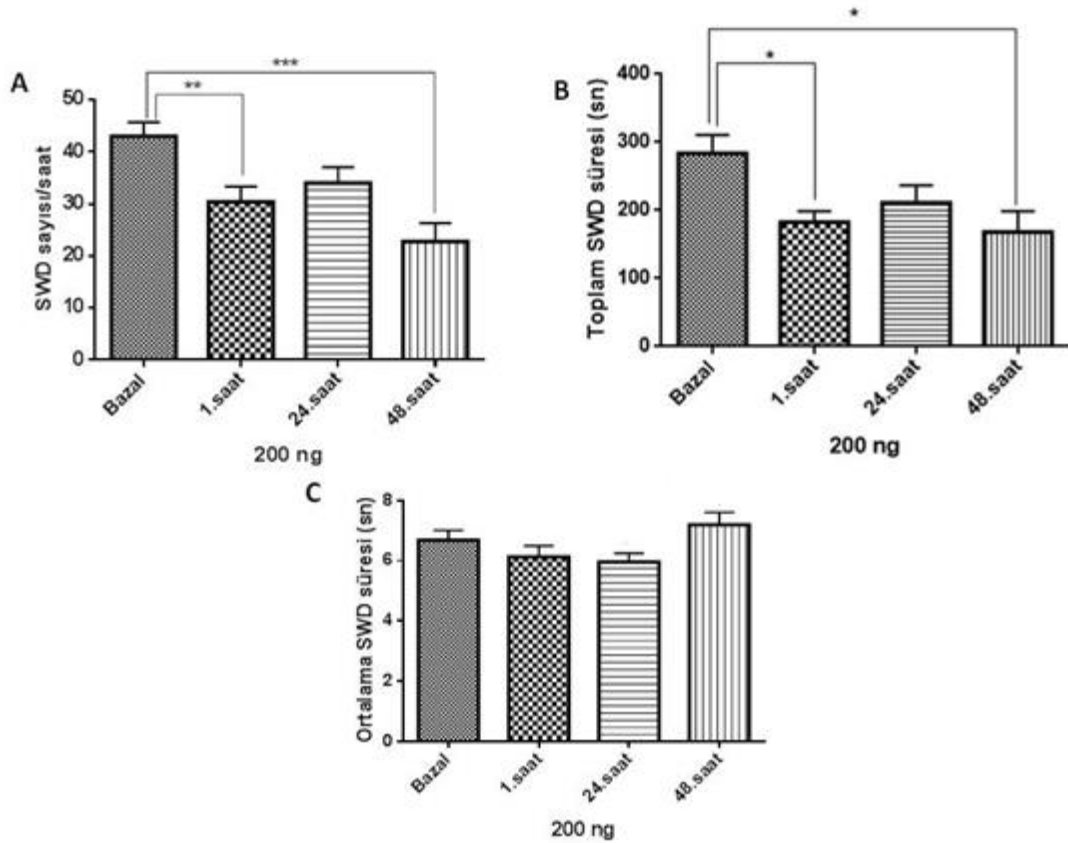
4.5.4. 200 ng Tg Uygulamasının EEG Aktivitesi Üzerine Zamana Göre Etkisinin Değerlendirilmesi

200 ng Tg uygulamasının SWD sayısı üzerine etkisini değerlendirdiğimizde tüm gruplarda bazale oranla düşüş görülmesine rağmen 48.saatteki azalma bazal döneme göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). 200 ng Tg uygulamasının ortalama SWD süresi üzerine etkisi değerlendirildiğinde bazal döneme göre 1., 24. saatlerde anlamlı olmayan azalma,

48. saatte anlamlı artış eğilimi görüldü ($p<0,05$). 200 ng Tg uygulamasının toplam SWD süresi üzerine zaman bağlı değişiklikleri incelendiğinde 1. ve 48.saatlerde bazale oranla toplam SWD süresinde anlamlı olarak azalma olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). 24.saatte görülen düşme eğilimi anlamlı çıkmamıştır. Veriler ortalama \pm SEM olarak değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi için non parametrik tek yönlü varyans (ANOVA) sonrasında Friedman testi kullanıldı. (Çizelge 4.7 ve Çizim 4.10).

Çizelge 4. 7. 200 ng Tg uygulamasının zamana bağlı etkisinin SWD sayısı, toplam SWD süresi ve ortalama SWD süresi ortalamaları

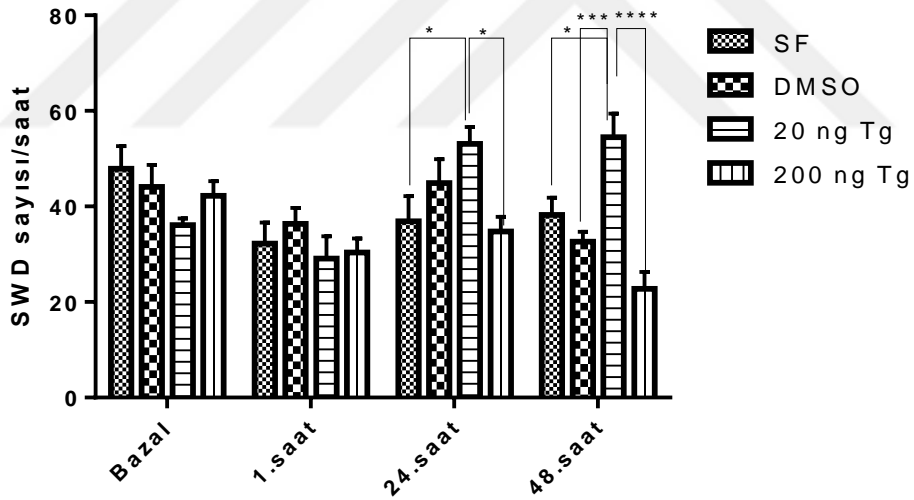
Gruplar	Bazal	1.saat	24.saat	48.saat
Zaman				
SWD sayısı	43,00 \pm 2,686	30,38 \pm 2,952	34,00 \pm 3,082	22,75 \pm 3,544
Toplam SWD süresi	283,7 \pm 26,83	182,8 \pm 16,09	211,1 \pm 25,30	168,2 \pm 30,46
Ortalama SWD süresi	6,686 \pm 0,326	6,122 \pm 0,374	5,964 \pm 0,285	7,194 \pm 0,408



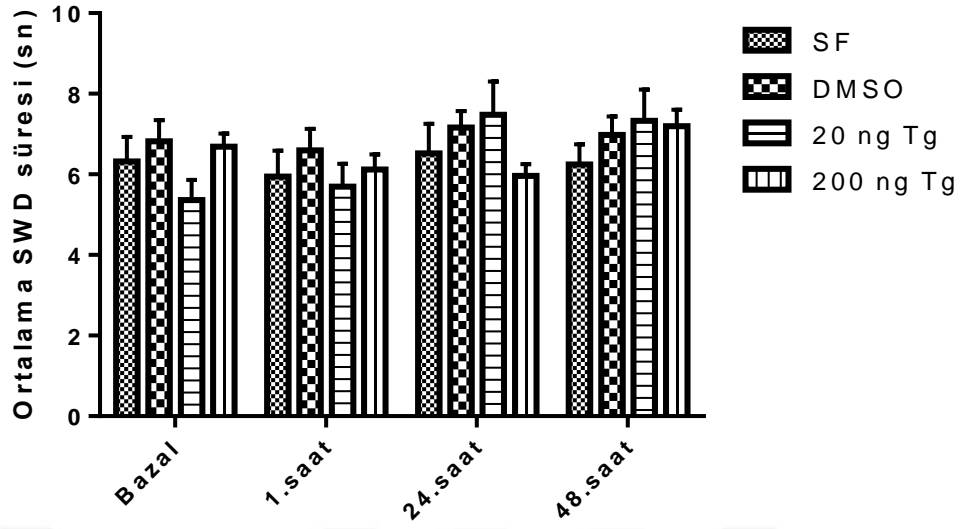
Çizim 4. 10. 200 ng Tg uygulamasının A: SWD sayısı, B: Toplam SWD süresi ve C: Ortalama SWD süresi üzerine zamana göre etkisi.

4.5.5. Tüm Grupların EEG Aktivitelerinin Zamana Göre Karşılaştırılması

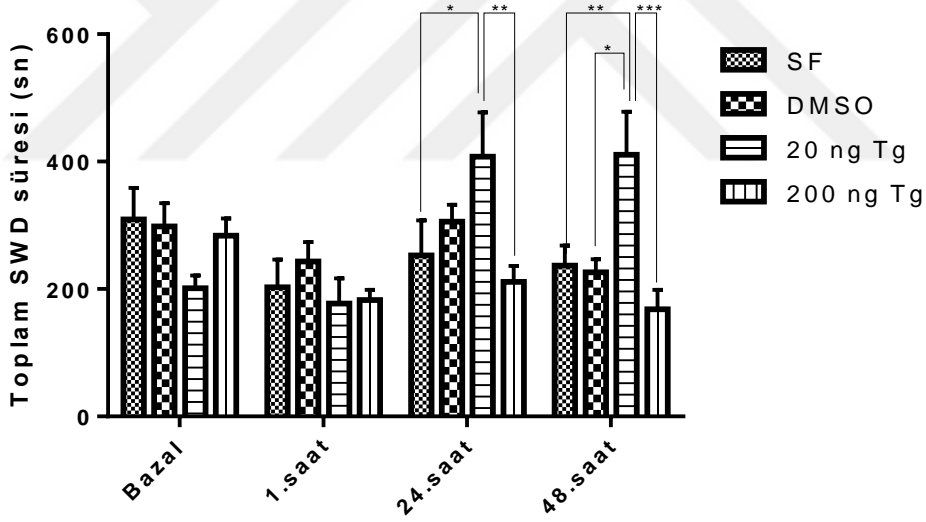
Tüm grupların bazal dönem ve SF, DMSO, 20 ng Tg, 200 ng Tg uygulamasından sonra 1., 24. ve 48.saat SWD aktiviteleri değerlendirildi. Ortalama SWD süresinde gruplar arasında zamana göre anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). 24.saatte 20 ng Tg grubunda SWD aktivitesini SF ve 200 ng Tg uygulanan gruba göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,05$). 48. saatte 20 ng Tg uygulaması SWD aktivitesini SF, DMSO ve 200 ng Tg uygulamasına göre anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Toplam SWD süreleri değerlendirildiğinde 24. saatte 20 ng uygulanan grupta artış, 200 ng uygulanan grupta azalma görüldü, bu farklılık her iki grup arasında anlamlı bir değişikliğe neden oldu. 48.saat toplam SWD süreleri incelendiğinde 20 ng Tg uygulanan grupta SF, DMSO ve 200 ng Tg uygulanan gruplara oranla anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,05$), 200 ng uygulanan grupta azalma görüldü. İstatistiksel analiz için çift yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) kullanıldı. Veriler ortalama \pm SEM olarak değerlendirildi.



Çizim 4. 11. Tüm grupların bazal ve ilaç uygulamasından 1.,24. ve 48.saat sonra SWD sayısının değerlendirilmesi.



Çizim 4. 12. Tüm grupların bazal ve ilaç uygulamasından 1.,24. ve 48.saat sonra ortalama SWD süresinin değerlendirilmesi.



Çizim 4. 13. Tüm grupların bazal ve ilaç uygulamasından 1.,24. ve 48.saat sonra toplam SWD süresinin değerlendirilmesi.

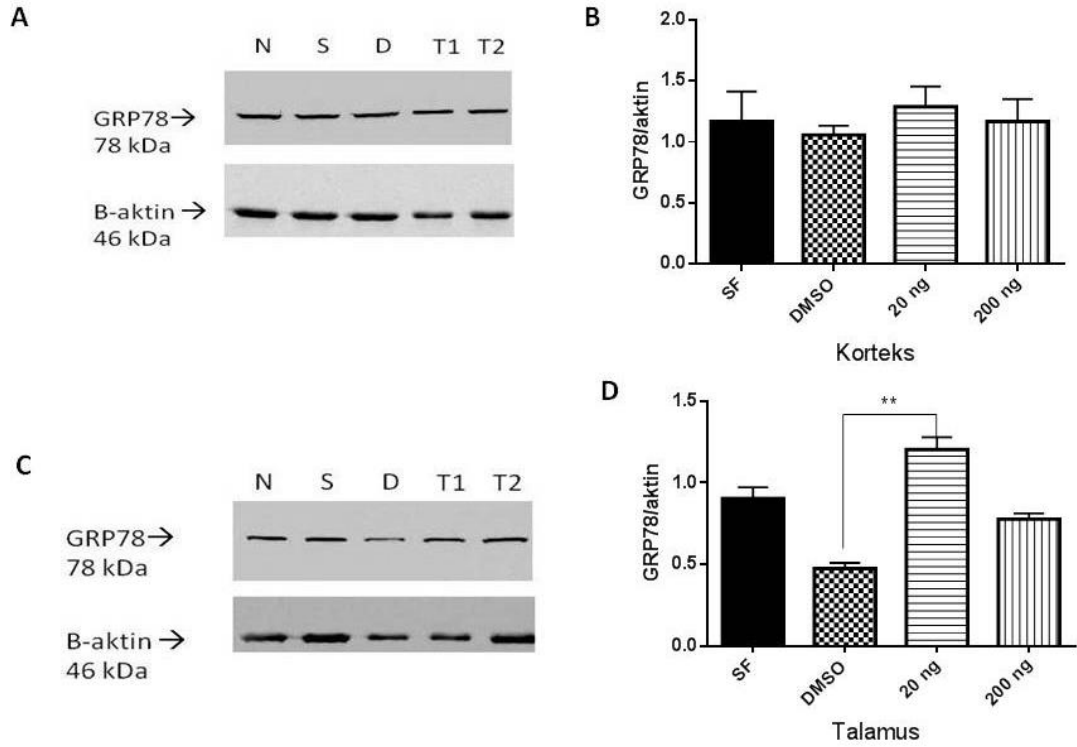
4.6.1. GRP78 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

GRP78 protein miktarlarını incelediğimizde talamus ve korteks dokusu Tg ile uyarılmış ER stresine GRP78 düzeyinde farklı yanıtlar verdiği görüldü. DMSO uygulaması talamus dokusunda GRP78 protein düzeyinde SF kontrolle oranla azalma görüldü. 20 ng Tg uygulanan grupta görülen artış kontrolü olan DMSO grubuna göre anlamlı bulundu

($p < 0,05$). Elde edilen veriler ortalama \pm SEM olarak değerlendirildi. İstatistiksel analiz için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi kullanıldı.

Çizelge 4. 8. Tüm grupların GRP78 protein miktarları

Gruplar	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Dokular				
Korteks	1,169 \pm 0,121	1,058 \pm 0,074	1,289 \pm 0,166	1,168 \pm 0,183
Talamus	0,904 \pm 0,034	0,476 \pm 0,034	1,205 \pm 0,747	0,778 \pm 0,034



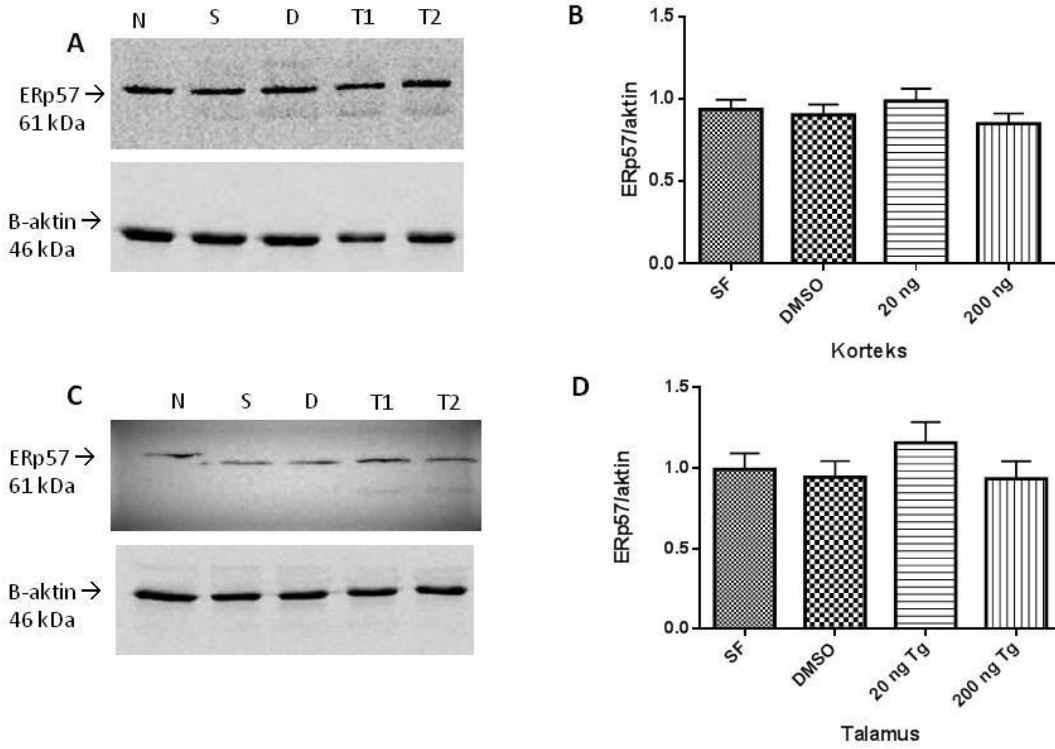
Çizim 4. 14. GRP78 protein miktarının gösterilmesi, A: Korteks bant görüntüleri, B: korteks dokusunda naife oranla grupların GRP78 protein miktarı C: Talamus bant görüntüleri, D:Talamus dokusunda naife oranla grupların GRP78 protein miktarı

4.6.2. ERp57 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

ERp57 protein miktarlarını incelediğimizde talamus ve korteks dokusu Tg ile uyarılmış ER stresine karşı anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Talamus dokusunda 20 ng Tg uygulanan grupta görülen artış eğilimi anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). Elde edilen veriler ortalama \pm SEM olarak değerlendirildi. İstatistiksel analiz için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi kullanıldı.

Çizelge 4. 9. Tüm grupların ERp57 protein miktarları

Grupla	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Dokular				
Korteks	0,938±0,057	0,904±0,064	0,987±0,076	0,851±0,062
Talamus	0,992±0,099	0,943±0,099	1,156±0,101	0,778±0,034



Çizim 4. 15. ERp57 protein miktarının gösterilmesi, A: Korteks bant görüntüleri, B: korteks dokusunda naife oranla grupların Erp57 protein miktarı C: Talamus bant görüntüleri, D: Talamus dokusunda naife oranla grupların ERp57 protein miktarı

4.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

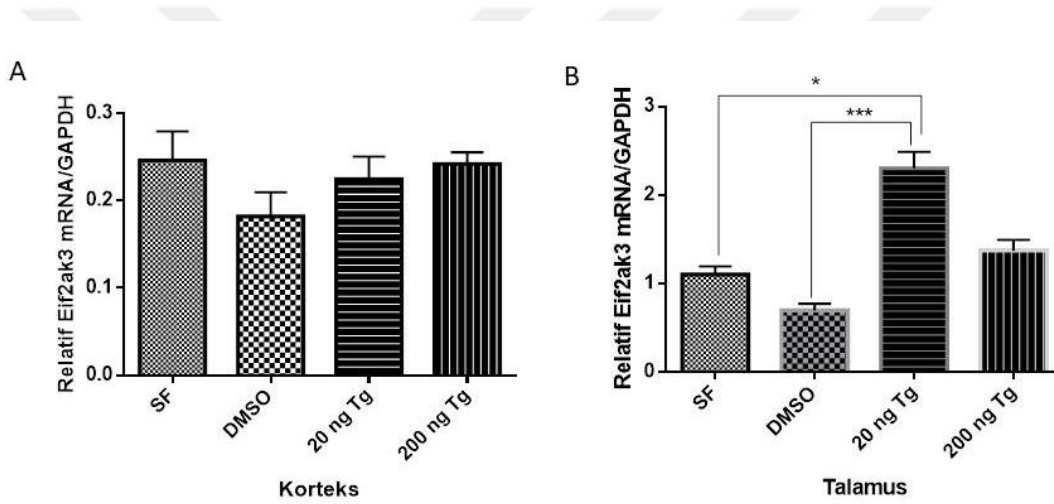
4.7.1. Eif2ak3 (PERK geni)

Eif2ak3 gen ifadesi düzeyinde incelendiğinde talamus dokusunda 20 ng Tg uygulaması tüm gruplara göre artış eğilimi gösterdi, bu artış eğilimi SF, DMSO gruplarına göre anlamlı bulundu ($p < 0,05$). DMSO uygulaması Eif2ak3 gen ekspresiyonu düzeyinde hem korteks hem talamus dokusunda SF kontrole göre olarak anlamlı olmayan azalma eğilimi gösterdi. Verilerin istatistiksel analizleri için öncelikle normal dağılıma

uygunlukları değerlendirildi. Normal dağılıma uygun olmayan tüm grupların karşılaştırılması non parametrik tek yönlü varyans analizi ve sonrasında Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi (Çizelge 4.10 ve Çizim 4.17).

Çizelge 4. 10. Eif2ak3 gen ifadelerinin ortalamaları,

Gruplar	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Dokular				
Korteks	0,2462±0,331	0,182±0,027	0,225±0,010	0,242±0,013
Talamus	1,103±0,091	0,695±0,077	2,302±0,184	1,372±0,121



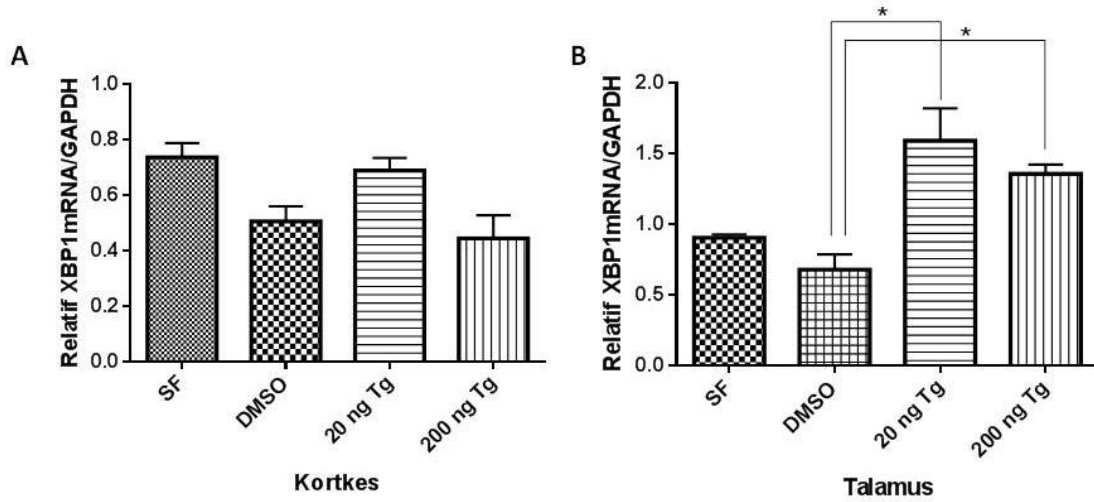
Çizim 4. 16. Talamus ve korteks dokusunda Eif2ak3 gen ifadelerinin karşılaştırılması. A: Korteks dokusunda tüm grupların karşılaştırılması, B: Talamus dokusunda tüm grupların karşılaştırılması.

4.7.2. XBP-1 Geni

XBP-1 geni ifadesi incelendiğinde talamus dokusunda 20 ng ve 200 ng Tg uygulaması, DMSO uygulamasına oranla anlamlı artış görüldü ($p < 0,05$). Korteks ve talamus dokusunda DMSO uygulaması SF uygulamasına oranla XBP-1 gen ifadesinde azalma görülmesine rağmen anlamlı bulunmadı. Korteks dokusunda 200 ng Tg uygulanan grupta tüm gruplara göre görülen azalma eğilimi anlamlı bulunmadı. Normal dağılıma uygun olmayan tüm grupların karşılaştırılması non parametrik tek yönlü varyans analizi ve sonrasında Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi (Çizelge 4.11 ve Çizim 4.18).

Çizelge 4. 11. XBP-1 gen ifadelerinin ortalamaları, veriler ortalama \pm SEM olarak ifade edildi.

Gruplar	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Dokular				
Korteks	0,738 \pm 0,051	0,507 \pm 0,057	0,690 \pm 0,045	0,446 \pm 0,082
Talamus	0,904 \pm 0,230	0,679 \pm 0,159	1,590 \pm 0,229	1,356 \pm 0,066



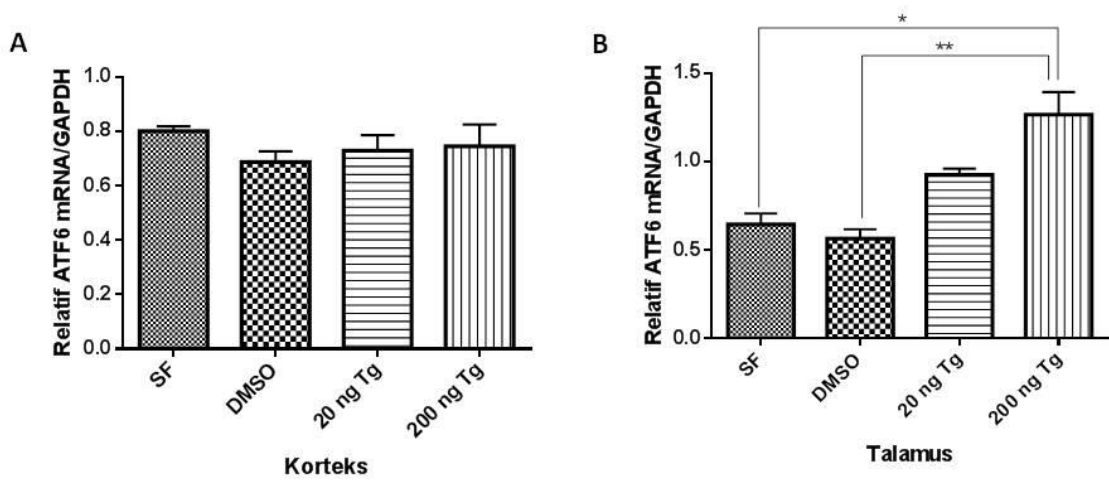
Çizim 4. 17. Talamus ve korteks dokusunda XBP-1 gen ifadelerinin karşılaştırılması. A: Korteks dokusunda tüm grupların karşılaştırılması, B: Talamus dokusunda tüm grupların karşılaştırılması

4.7.3. ATF6 Geni

ATF6 gen ifadesi incelendiğinde talamus dokusunda 20 ng ve 200 ng Tg uygulaması, DMSO uygulamasına oranla anlamlı artış görüldü ($p < 0,05$). 200 ng Tg uygulanan grupta SF kontrole göre anlamlı bir artış görüldü. Korteks ve talamus dokusunda DMSO uygulaması SF uygulamasına oranla ATF6 gen ifadesinde azalma görülmesine rağmen anlamlı bulunmadı. Normal dağılıma uygun olmayan tüm grupların karşılaştırılması non parametrik tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) ve sonrasında Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi (Çizelge 4.12 ve Çizim 4.19). DMSO gruplarına oranlanan 20 ng ve 200 ng gruplarını karşılaştırmak için non parametrik t testi ve sonrasında Mann Whitney U testi kullanıldı Talamus dokusunda ATF6 ekspresiyonu, 20 ng ve 200 ng Tg uygulanan grupta DMSO uygulamasına oranla anlamlı bir şekilde arttı. 200 ng uygulanan grupta görülen artış SF kontrole göre anlamlı bulundu.

Çizelge 4. 12. ATF 6 gen ifadelerinin ortalamaları

Gruplar	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Dokular				
Korteks	0,801±0,017	0,687±0,017	0,729±0,059	0,745±0,079
Talamus	0,646±0,060	0,565±0,052	0,925±0,035	1,266±0,126



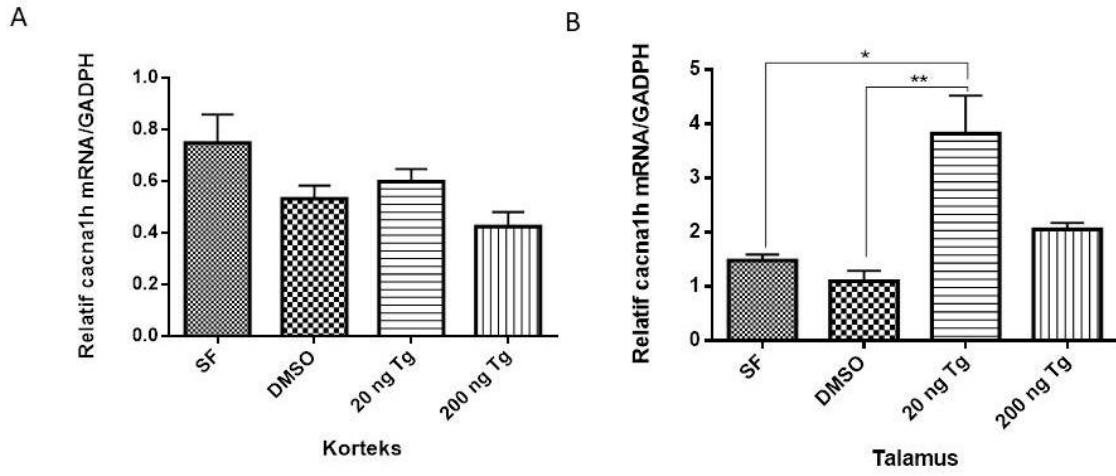
Çizim 4. 18. Talamus ve korteks dokusunda ATF6 gen ifadelerinin karşılaştırılması. A: Korteks dokusunda tüm grupların karşılaştırılması, B: Talamus dokusunda tüm grupların karşılaştırılması

4.7.4. CACNA1H Geni

CACNA1H gen ifadesi düzeyinde incelendiğinde talamus dokusunda 20 ng Tg uygulaması tüm gruplara göre artış eğilimi gösterdi, bu artış eğilimi SF, DMSO gruplarına göre anlamlı bulundu ($p < 0,05$). DMSO uygulaması CACNA1H gen ifadesi düzeyinde hem korteks hem talamus dokusunda SF kontrole göre anlamlı olmayan azalma eğilimi gösterdi. Verilerin istatistiksel analizleri için öncelikle normal dağılıma uygunlukları değerlendirildi. Normal dağılıma uygun olmayan tüm grupların karşılaştırılması non parametrik tek yönlü varyans analizi ve sonrasında Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi (Çizelge 4.13 ve Çizim 4.20).

Çizelge 4. 13. CACNA1H gen ifadelerinin ortalamaları

Gruplar	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Dokular				
Korteks	0,747±0,110	0,532±0,050	0,597±0,049	0,425±0,055
Talamus	1,480±0,107	1,100±0,190	3,820±0,703	2,056±0,116



Çizim 4. 19. Talamus ve korteks dokusunda CACNA1H gen ifadelerinin karşılaştırılması. A: Korteks dokusunda tüm grupların karşılaştırılması, B: Talamus dokusunda tüm grupların karşılaştırılması

4.8 Tüm Verilerin Özeti

Çizelge 4. 14. SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg uygulamalarının SWD sayısı üzerine etkisi (anlamli↑ artışı, ↓azalışı, - anlamli olmayan verileri ifade etmektedir)

SWD sayısı	BAZAL	1.SAAT	24.SAAT	48.SAAT
SF	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	-
20 ng Tg	-	-	↑	↑
200 ng Tg	-	-	↓	↓
Toplam SWD süresi	BAZAL	1.SAAT	24.SAAT	48.SAAT
SF	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	-
20 ng Tg	-	-	↑	↑
200 ng Tg	-	-	↓	↓

Çizelge 4. 15. SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg uygulamalarının Water Maze testi üzerine etkisi (anlamli↑ artışı, ↓azalışı, - anlamli olmayan verileri ifade etmektedir)

	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
Hedef kadranda yüzme süresi	-	-	-	↓

Çizelge 4. 16. SF, DMSO, 20 ng Tg ve 200 ng Tg uygulamalarının talamus dokusunda GRP78 ve ERp57 protein miktarına, Eif2ak3, XBP-1, ATF6 ve CACNA1H mRNA ifadesi üzerine (anlamli↑ artışı, ↓azalışı, - anlamli olmayan verileri ifade etmektedir)

	SF	DMSO	20 ng Tg	200 ng Tg
GRP78/Talamus	-	-	↑	-
ERp57/Talamus	-	-	-	-
Eif2ak3/Talamus	-	-	↑	-
XBP-1/Talamus	-	-	↑	↑
ATF-6/Talamus	-	-	-	↑
CACNA1H/Talamus	-	-	↑	-

5. TARTIŞMA

Hücrede önemli bir kalsiyum deposu olan ER, protein sentezi, katlanması, olgunlaşması ve taşınmasında önemli rol oynamaktadır (Palade 1956). Protein sentezi süreci hataya yatkındır ve ER, yanlış katlanmış/katlanmamış proteinlerin toksik birikimini önlemek için protein kalite kontrol mekanizmalarına sahiptir. ER'in protein katlanma yükü aşıldığında lümeninde biriken anormal proteinler ER stresi ve KPY adı verilen sinyal yollarını tetikler. ER stresinden baş etme başarısına göre hücre uyum ya da hücre ölüm mekanizmaları devreye girer. Hücre ER stresinden kurtulmak için ilk olarak protein sentezinin seçici olarak engellenmesi, şaperon sentezinin artması, ERAD ve ER hacminde artışa neden olan adaptif süreçler başlatır. Ancak ER kapasitesi, stresi azaltma ve adaptasyon konusunda başarılı olamadıysa proteostazis sağlanamaz ve kronikleşen ER stresi otofaji yollarını devreye sokar. Otofaji proteostazisi sağlayamazsa, hücreler en son olarak hücre ölümünü seçer (Vembar ve Brodsky 2008).

Çalışmamızda düşük ve yüksek doz Tg ile ER stres yollarının tetiklenmesi, absans epileptik aktiviteyi doz bağımlı olarak etkilemektedir. Düşük doz Tg'nin SWD aktivitesini artırıcı, yüksek Tg'nin azaltıcı etkilidir. Bu etki ilaç uygulamalarından 24 saat sonra ortaya çıkarken 48. Saatte daha da belirginleşmektedir. Davranış-öğrenme testlerinin bulgularına göre i.c.v uygulamalarının hiç biri lokomotor aktiviteyi değiştirmedir. Duysal öğrenmenin bir göstergesi olan pasif sakınma testinde de tüm gruplar arasında bir fark bulunmadı. Mekânsal öğrenmenin bir göstergesi olan water-maze testinde doğru kadranda kalış süresi en kısa yüksek doz Tg grubunda bulundu. Western blot ve RT-PCR bulgularımıza göre korteks bölgesinde tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken, talamus bölgesinde düşük doz Tg, GRP78 proteini, Eif2ak3 (PERK), XBP-1 ve T-Tipi Ca kanallarının geni CACNA1H mRNA ekspresiyonlarını arttırmıştır, yüksek doz Tg ise ATF6 ve XBP-1 mRNA ifadesini artırdı.

ER stresinin davranış üzerine etkisi bir insektisit olan deltametrin kullanılarak araştırılmıştır. 60 gün boyunca 3 günde bir olgun farelere deltametrin uygulayarak kronik ER stresinin etkisini araştırmışlardır ve kronik ER stresinin mekansal öğrenme üzerine olumsuz etkileri olduğunu bulmuşlardır (Hossain ve diğ. 2015). Lu ve arkadaşlarının (2011) yapmış oldukları çalışmada ise yüksek kalorili diyetin tetiklediği kronik ER stresinin mekansal öğrenmeyi azalttığı ancak antioksidan özellikte ursolik asit uygulandığında mekansal öğrenme üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Zhang ve arkadaşlarının (2013) yapmış oldukları çalışmada streptozotosin uygulayarak diyabet

oluşturdukları farelerin hipokampuslerinde ER stresi kaynaklı apoptozun meydana geldiği ve mekansal öğrenmeyi azalttığını gözlemlemişlerdir. Tg'nin nöronlar üzerine etkisi genellikle hücre kültürü düzeyinde araştırılmıştır. Yu ve arkadaşlarının (2014) bir kere uzun süreli stresin mekansal öğrenme ve ER stresi üzerine zamana bağlı etkisini araştırdıkları çalışmada, sıçanlara 1-4 ve 7 gün boyunca strese maruz bırakmışlardır. 7.gün yapmış oldukları water-maze testinde stres uygulanan grupta platformun bulunduğu kadranda yüzme süresinde azalma meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Stres sonrası aldıkları beyin dokularında pre-frontal kortekste zamana göre GRP78, ERp57 ve ATF6α protein miktarlarında ve mRNA seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir. 7.günde pik yapan bu moleküllerin yanı sıra apoptozda görev alan kaspaz 12, kaspaz 3 ve kaspaz 9 miktarlarının arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmada 1 ve 4 günlük strese maruz kalan sıçanlarda bu proteinlerin ifadesinin daha az olduğunu göstermişlerdir. Hafif ER stresi sırasında öncelikle hücreyi adapte etmeye çalışan GRP78 miktarı artmaktadır. GRP78 proteinlerin doğru katlanmasına rol alan önemli bir şaperon proteindir. ER stresi kronikleştikçe ve şiddeti arttıkça ER kapasitesi stresi kaldıramaz ve hücre apoptoza sürüklenir (Yu ve diğ 2015). Bizim çalışmamızda yüksek doz ER stresin platformun bulunduğu kadranda yüzme süresini azaltmıştır. Bunun yanı sıra talamus ve korteks dokusunda yapmış olduğumuz moleküler çalışmada, talamus dokusunda kontrole göre artan XBP-1 ve ATF6 mRNA ifadesi tespit ettik, ERp57, GRP78 protein miktarlarında ve Eifak3 mRNA ifadesinde kontrole göre değişiklik görülmedi. Korteks dokusunda anlamlı sonuçlar bulunmadı. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuç Tg ile uyarılan yüksek doz ER stresinin hücrenin adaptif mekanizmalarını aşarak ATF6'nin tetiklediği apoptotik süreçler aktifleşmiş olabilir. Tg'nin akut uygulamasının davranış üzerine etkisi hakkında çalışmalar bulunmamaktadır. Çalışmamızda, akut düşük doz ve yüksek doz Tg uygulamasının davranış ve öğrenme üzerine etkisi ilk kez araştırılmış olup, ER stresinin mekansal öğrenme üzerine doza bağımlı etkisinin olduğunu göstermiştir.

Zhang ve diğ. yapmış oldukları bir çalışmada Tg'nin uyardığı ER stresinin iskemik beyin hasarına etkisini araştırmışlardır ve doza bağlı bir etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada C57BL/6 fareler kullanılmış ve i.c.v olarak 2-200 ng Tg uygulanmıştır. 20 ng Tg uygulamasının beyin hasarını azalttığını ancak daha yüksek dozlarda uygulanmasının beyin hasarını artırdığını göstermişlerdir (Zhang ve diğ. 2014).Günümüzde ER kalsiyum depolarının işlevlerinin bozulmasıyla oluşan hücre içi kalsiyum dengesizliğinin epilepsi üzerine etkisi hakkında çok az sayıda çalışma vardır. Sokal ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada GABAA reseptör antagonistleri olan

bikukulin ve gabazin etkisini hipokampal nöron kültürlerinde araştırmışlardır. Bikukulin uygulaması öncesi Tg ile inkübasyonu, bikukulin kaynaklı uyarılda azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir, ancak gabazin uygulamasında bu azaltıcı etki görülmemiştir. Bikukulin kaynaklı nöronal uyarılmanın ER depolarından kalsiyum salınımına ihtiyacı olduğunu belirtmişlerdir (Sokal ve diğ. 2000). Rutecki ve diğ. in-vitro hipokampal dilimlere pilokarpin veya (RS) -3,5-dihidroksifenilglisin uygulamasıyla indüklenen iktal deşarjların, ER-Ca²⁺ depolarını etkileyen Tg veya dantrolene tarafından bloke edildiğini göstermişlerdir (Rutecki ve diğ. 2002). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise, nitrik oksit ile indüklenen ryanodin reseptörünün aktivasyonunun genetik olarak susturulmasının, glutamat agonisti olan kainik asitin (KA) neden olduğu status epileptikus tarafından tetiklenen hücre ölümüne karşı koruma sağladığı bulunmuştur (Mikami ve diğ. 2016).

ER stresinin epilepsi dahil çeşitli nörolojik hastalıklarda rol oynadığı öne sürülmüştür (Yamamoto ve diğ 2006, Ko ve diğ. 2015). Uzun süreli ER stresinin, epileptik beyinde nörodejenerasyona yol açan hücre içi sinyalleri tetiklediğini ve ER stresinin epilepsi kaynaklı nörodejenerasyonda önemli bir rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Sokka ve diğ. 2007, Ko ve diğ. 2015). Çeşitli kanıtlar, hem hayvan modellerinde hem de insan çalışmalarında ER stresinin epilepsi hastalıklarında etkili olduğunu göstermektedir. (Jang ve diğ. 2004; Chihara ve diğ. 2011; Torres-Peraza ve diğ. 2013).

Yamamoto ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada temporal lob epilepsili (TLE) hastaların otopsilerden elde edilen hipokampus örneklerinde ER stres şaperonlarında (GRP78, GRP94 ve kalneksin) bulunan bir motif olan Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) immunoreksiyonun kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ve kaspaz 6, 7 ve 9 miktarının kontrole oranla yüksek olduğunu göstermişlerdir. KDEL ifade eden nöronlarda aynı zamanda ayrılmış kaspaz 9 ifade etmiştir. TLE hastalarında nöbetlerin, ER stresine neden olduğunu ve ER içerisinde pro-apoptotik yolakları uyardığından bahsetmişlerdir (Yamamoto ve diğ. 2006). Sokka ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise KA uygulamasının sıçanların beyinlerinde ER membranının bozulmasına ve GRP78/BiP, CHOP ve kaspaz 12'yi aktif hale getirerek ER stresine neden olduğunu bulmuşlardır. ER stresinin küçük moleküllerle inhibisyonun çeşitli beyin hastalıklarında ve hasarlarında yararlı tedavi seçenekleri olabileceğini bildirmişlerdir (Sokka ve diğ. 2007). Yapılan diğer bir çalışmada epilepsi patolojisinde önemli olan iyon kanallarının mutasyonu hücrel toksisisteye neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu iyon kanallarının anti-epileptik ilaçlara

cevap veriyor ve nörotransmitter salınımı salınımında rol alıyorsa, iyon kanal genlerinde meydana gelen mutasyonlar epilepsi tedavisini zorlaştırabilir. GABAA reseptörünün $\gamma 2$ alt biriminin geni GABRG2 geni memeli beyninde yoğun olarak ifade edilmektedir ve ER içerisinde GABAA reseptörünün majör izoformu olan $\alpha\beta\gamma 2$ ünitesini oluşturmaktadır. Ancak doğru katlanmış reseptörler ER trafiğine katılarak hücre membranına ulaşırlar. GABRG2 genindeki mutasyonlar febril nöbetler ve çocukluk çağı epilepsisini de içeren genetik epilepsi sendromları, febril nöbet içeren generalize epilepsiler ve Dravet sendromu ile ilişkilidir. GABRG2 geninde meydana gelen mutasyonlar, mutant proteinlerin parçalanmasını yavaşlatır ve protein agregatlarının oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum ER lümeninde yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olarak ER stresi oluşturur. Sürekli ER stres koşulları nöronal ölüme neden olur. Gabrg2+/Q390X yaşlı farelerde GABA A reseptörünün $\gamma 2$ alt biriminin mutasyonları, proteinin nöron içerisinde birikmesine ve agregatlar oluşturmasının yanı sıra kaspaz-3'ü aktif hale getirdiğini göstermişlerdir (Kang ve MacDonald 2016).

ER stresi ve oksidatif stres arasında bağlantı bulunmaktadır (Inoue and Suzuki-Karasaki, 2013; Kunchithapautham ve diğ. 2014; Xu ve diğ. 2015). Serbest radikallerin üretimi ve yarattıkları toksisiteyi azaltan anti-oksidan sistem arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROT), ER stres ve oksidatif stres arasındaki bağlantıyı kuran önemli moleküllerdir. ROT'ların aşırı üretimi genellikle ER Ca²⁺ kanallarını hedef alarak, kalsiyum homestazisini bozarak ER stresine neden olmaktadır. ER'den sitozole kalsiyum akışı mitokondri metabolizmasında ROT üretimini uyarmaktadır (Zhang 2010). Her iki stres durumu birbirini etkilemektedir; oksidatif stres ER stresine neden olup KPY yollarını uyarırken, ER stres de ROT üretimini artırır, anti-oksidan enzim miktarını azaltmaktadır (Fedoroff 2006; Rouault-Pierre ve diğ. 2013; Xu ve diğ. 2005; Ozgur ve diğ. 2014). Zhu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada nöronal nitrik oksidin (nNOS)'un, PTZ-ile uyarılmış ER ve oksidatif stres sürecinde merkezi bir öneme sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu etkisini peroksinitrit aracılığıyla yapmaktadır. nNOS'un PTZ-uyarılmış epileptik farelerde hipokampal ER stres ve oksidatif hasarı tetiklemek için peroksinitrit aracılığıyla hareket ettiğini göstermişlerdir (Zhu ve diğ., 2017).

Son yapılan çalışmalar nöbet veya epilepsi kaynaklı ER stres mekanizmasının daha iyi anlaşılması, ER stres ve epilepsi arasındaki potansiyel bağlantıyı ortaya çıkarmak için çok önemli olduğunu belirtmişlerdir. Epilepsi ve ER stres arasındaki ilişkiyi konu alan çalışmaların çoğunluğu nöbet sonrasında aktif hale gelen ER stresi yollarının

değerlendirilmesidir. Çalışmamızda SERCA kanallarını inhibe eden Tg'nin yüksek ve düşük dozlarını kullanarak absans epileptik aktivite üzerine etkisini değerlendirdik. Düşük doz Tg ile uyarılan ER stresinin SWD aktivitesini artırıcı, yüksek doz ER stresinin ise azaltıcı etkisi olduğunu gözlemledik. WAG/Rij ırkı sıçanlarda, ER stresinin epilepsi nöbeti üzerine etkisini ilk defa bu çalışmayla gösterdik.

GRP78, ER içerisinde bulunan proteinler içerisinde bir şaperon olan GRP78 kalsiyuma bağlanma ve protein katlanma süreçlerine katılmasının yanında erken ER stres/KPY sinyalinin ana başlatıcısı olarak önemli bir rol oynar. Yapılan birçok çalışma, çok sayıda hücrel ve mikroçevresel bozukluğun yanı sıra farmokolojik ajanların, artan ER stresıyla birlikte artmış GRP78 ifadesine yol açtıklarını ortaya koymuştur. GRP78 ifadesinin artması, hücrel ER stresinin oluştuğunu gösteren bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Healy ve diğ. 2009; Zhang ve Zhang 2010). GRP78, ER stresinin master düzenleyicisidir. GRP78, stressiz koşullarda ER lümeninde bulunan inaktif durumda kalmaları için KPY'de görev alan PERK, ATF6 ve IRE-1 α sensörlerine bağlı halde bulunur. ER stresi şartlarında GRP78, katlanmamış proteinlerin hidrofobik uçlarına bağlanmak için bu sensörlerden ayrılır. Böylece artan protein katlanma ihtiyacını karşılamak için gerekli olan sinyal yollarını başlatır. Aktifleşen sinyal yolları sadece diğer şaperonların değil ayrıca GRP78 ifadesini de artırır. Proteostazis tekrar sağlandığında sensörlerin inaktif formlarına dönmeleri için tekrar birleşecektir. GRP78, hücrenin adaptasyon ve hayatta kalma sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Daha da ötesi GRP78, hayatta kalma potansiyelini artırması nedeniyle tümör hücrelerine hipoglisemi ve hipoksi gibi kötü koşullara dayanmasına hatta gelişmesine neden olmaktadır. GRP78'in ifadesinin yükselmesi tümör dokusunun kemoterapiye karşı direnç sağlayabilir ve prognozu kötüleştirir (Fernandez ve diğ. 2000, Lee ve diğ. 2006, Wang ve diğ. 2009, Schönthal 2012).

Epilepsi ve bipolar rahatsızlıklarında tedavi amaçlı kullanılan VPA (valporik asit)'in GRP78, PDIs, HSP47, kalretikulin gibi ER ve sitoplazmada bulunan şaperonları arttırdığı gösterilmiştir (Kim ve diğ. 2005, Werstuck ve diğ. 2004, Chen ve diğ., 1999, Wang 1999). Şaperonlar gelişmekte olan proteinlerin katlanmasında önemli rol oynarlar. Spesifik şaperonların aşırı ifadesi, sitotoksik kimyasallar, oksidatif stres ve iskemi-reperfüzyonun da dahil olduğu hücre hasarına/ölümüne yol açan koşullara karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Reddy ve diğ. 2003, Morris ve diğ. 1997, Liu ve diğ. 1997, Shintani-Ishida ve diğ. 2006). Shi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada VPA'nin, KPY'den bağımsız histon asetilasyonu aracılığıyla GRP78 ve diğer şaperonların miktarını arttırdığını

göstermişlerdir. Bipolar bozukluk, Alzheimer hastalığı, diabetes mellitus, ateroskleroz ve epilepsi gibi hastalıklar ER stresiyle ilişkilidir ve bu hastalıklara etkili olduğu düşünülen VPA aracılı şaperon ifadesinin artırılmasının terapötik yararları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Shi ve diğ. 2007). Çalışmamızda düşük doz ER stresinin uygulanmasının 24.saatte SWD aktivitesini arttırdığı, yüksek doz uygulamasının azalttığı tespit edildi. Bununla birlikte düşük doz ER stresi uygulamasında GRP78 miktarı arttı. Bu sonuçlara göre artan GRP78 miktarı ve beraberinde aktif hale gelen yaşamsal süreçler SWD aktivitesinin artmasında rolü olabilir. VPA ile yapılmış olan çalışmada GRP78 miktarı artışı ER stresinden bağımsızdır. Bizim çalışmamızda GRP78 ile birlikte artmış olan diğer şaperonların gen ifadesi sinerjistik etkiyle SWD aktivitesi oluşumunu etkilemiş olabilir.

GRP78 inme sonrası nöronal sağ kalımı arttıran bir şaperondur (Rajdev ve diğ. 2000; Hoehn ve diğ. 2001, Kudo ve diğ. 2008, Oida ve diğ. 2008). Son yapılan çalışmalarda miR-181 GRP78'in düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. miR-181'in artması GRP78 ifadesini azaltmaktadır. miR-181 miktarının artması nöronal ölümü şiddetlendirirken, indirgenmiş miR-181 aktivitesi nöronal ölümü azaltan GRP78 ifadesini artırmaktadır (Ouyang ve diğ. 2012). Huang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada PTZ ile uyardıkları epilepsi modelinde miR-181 miktarının artması kognitif fonksiyonları bozduğunu Water Maze testinde 5.gün kaçış süresini uzatığı ve 6.gün hedef kadrana geçme süresinin azaldığını gözlemladiler (Huang ve diğ. 2015). Bizim çalışmamızda GRP78 miktarının talamus dokusunda düşük doz ER stresinde arttığı ve yüksek doz ER stresinde azaldığı gözlemlendi. Korteks dokusunda anlamlı bir fark çıkmadı. Bunun yanı sıra water-maze testinde 5.gün platformun bulunduğu kadrana girme süresinin yüksek doz ER stresinde azaldığını gözlemledik. Çalışmamızın sonuçları Huang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayla uyumlu çıkmıştır.

ERp57 kalneksin ve kalretikulin adı verilen lektin şaperonlara bağlanarak yeni sentezlenmiş glikoproteinlerin katlanmalarına yardımcı olur (Frickel ve diğ. 2004). Bulunduğu hücre bölgesine göre çeşitli biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. ER içerisinde plazma membranında, mitokondri, sitoplazma içerisinde ve nukleusta bulunmaktadır. ERp57'nin düzenlenmesinin bozulması kanserden nörodejeneratif hastalıklara kadar çeşitli patolojilere zemin oluşturmaktadır (Hettinghouse ve diğ.2018) .Şahin ve arkadaşlarının (2018) yapmış oldukları çalışmada WAG/Rij ırkı sıçanlarda ERp57 protein miktarının hem talamus hem de korteks dokusunda kontrole düşük olduğunu göstermişlerdir (Şahin ve diğ., 2018). Çalışmamızda düşük ve yüksek doz ER stres uygulanmasının ERp57 miktarına etkili olmadığı görüldü. Bu sonuç WAG/Rij ırkı

sıçanlarda ERp57'nin ER stresine cevap oluşturması için gerekli moleküler mekanizmanın zayıf olduğunu ya da ERp57'nin gen düzeyinde de ifadesinin az olduğunun göstergesi olabilir.

Eif2ak geni PERK proteininin ifade etmektedir. PERK, KPY'de çeşitli yolları aktif hale getirerek hücrenin ER stresi koşullarına karşı gelmesine yardımcı olmaktadır. PERK, bir transkripsiyon faktörü olan eIF2 α 'yı fosforilleyerek protein translasyonunu durdurarak ER'de biriken proteinlerin yarattığı ER stresini azaltmaktadır (Harding ve diğ. 1999). PERK aktivasyonu sırasında tüm genlerin ifadesini durdurmaz, ER stresini azaltmak için yardımcı olan şaperonların ifadesi devam eder. Fizyolojik koşullarda ve ılımlı ER stresi sırasında eIF2 α 'yı fosforillenmesinden kaynaklı protein translasyonundaki kesinti, hücrenin stres nedenini çözmesini ve uygun protein katlanmasını sürdürmesini sağlar. Stres koşulları iyileştiğinde GADD34, p- eIF2'nin defosforile olmasını sağlamaktadır. Eğer hücrel stres çözülmezse ATF4, CHOP ifadesini artırmaktadır. Hafif ER stresinde PERK ile uyarılan koruma ve CHOP kontrollü hücre ölümü arasında kararı veren zamanlama ve düzenleyici sinyaller hala tam olarak anlaşılammıştır. PERK aynı zamanda eIF2 α 'dan bağımsız olarak antioksidan genlerin düzenlenmesinde nükleer faktör benzeri 2 (Nrf2=nuclear factor erythroid derived like 2) transkripsiyon faktörünü fosforile eder. Stresiz koşullarda Nrf2, Keap ile kompleks halinde sitoplazmada bulunur. Nrf2, oksidanlara karşı hücrel direncin gelişmesinde önemli bir düzenleyicidir ve hücrenin hayatta kalma cevabı olarak p- eIF2 α 'dan bağımsız çalışmaktadır. KPY'nin PERK dalının aşırı ifadesi özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıkları ve tauopatiler dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda hastaların beyin dokularında gözlenir. Bu nedenle son zamanlarda, farelerde çok sayıda genetik ve farmakolojik çalışma terapötik fayda sağlamak ve hafızayı artırmak için KPY'nin inhibe edilmesinin etkinliğini göstermiştir. Özellikle yeni keşfedilen PERK antagonistleri kullanılarak, istenmeyen yan etkiler olmadan nöronal koruma sağlamak için PERK inhibisyon seviyesinin hassas bir şekilde ayarlanması gerektiği, güvenli ve etkili bir yaklaşım olduğu bildirilmiştir (Carmona-Aparicio ve diğ. 2015). Çalışmamızda düşük doz ER stresinin SWD aktivitesini 24.saatte artırdığını ve bu artışın 48.saatte devam ettiğini gözlemledik. Bu sonuç, hafif ER stres koşullarında PERK tarafından aktif hale gelen hücrel sağ kalım yolları SWD aktivitesi üzerine artırıcı etkisi olabileceğini göstermektedir.

IRE1 α /XBP-1 yolağında aktif hale gelen IRE1 α , XBP-1 mRNA'sının kırılmasını ve aktif formu olan XBP1s mRNA'sını oluşturur. XBP1s proteini nükleusa geçerek KPY yanıt elementine bağlanır ve ERAD, antioksidan etki, lipid biyosentezi ve protein katlanmasında

görev alan şaperonların transkripsiyon faktörü olarak görev yapar (Hetz ve diğ., 2011; Çetinkaya ve Dursun, 2016). XBP-1 tarafından uyarılan protein katlanma kapasitesinin artması ve yanlış/katlanmamış proteinlerin yıkımı proteostazisin sağlanmasına ve stres sonrası hücrenin sağ kalımına katkıda bulunmaktadır. XBP-1, lösün ZIP ailesi transkripsiyon faktörüdür ve son zamanlarda tavuk pınal bezinde ışık ile uyarılan genlerden biri olarak tanımlanmıştır ve kırılmış formu olan sXBP-1'in gen ifadesinde sirkadyen patern göstermektedir (Hatori ve diğ. 2011). XBP1 hedef genlerini etkileyen mTOR yolu aktive edildiğinde XBP1'in gen ifadesini etkileyerek, XBP-1'in kırılması ve ifadesini artmaktadır (Pfaffenbach ve diğ. 2010). Epileptik hastaların hipokampüsünde artmış XBP-1 ifadesi ve aktivasyonu gösterilmiştir (Liu ve diğ. 2011). Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mammalian target of rapamisin, mTOR) sinyalinin artması epilepsi patogenezinde sık rastlanan bir durum olduğu gösterilmiştir. mTOR inhibitörleri ile yapılan çalışmalar, özellikle rapamisinin anti-epileptojenik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Rapamisinin ayrıca anti-absans ve anti-inflamatuar etkilerinin olduğu bilinmektedir (Russo ve diğ. 2013). Çalışmamızda hem düşük doz hem yüksek doz ER stresi XBP-1 mRNA ifadesini artırmıştır. Çalışmamızda düşük doz ER stresi hem XBP-1 hem de SWD aktivitesini artırmıştır, bu sonuç stres durumunda kolaylıkla etkilenen mTOR sinyalleri tarafından etkilenmiş olabilir. Yüksek doz ER stresinde artan XBP-1 mRNA ifadesine rağmen SWD aktivitesinin azalmış olması XBP-1'in SWD aktivitesi üzerine yalnız başına etki etmediğini ve diğer sinyal yollarıyla birlikte hareket ettiğini düşündürmektedir.

T-tipi kalsiyum kanalları Ca^{2+} dikenlerine neden olarak talamokortikal döngüdeki patlama tarzı (burst) anormal osilatör karakterin görülmesinde önemli rol alır (Huguenard ve Prince, 1992; Perez-Reyes, 2003). Yapılan birçok çalışma T-tipi Ca^{2+} kanallarının absans epilepsi ile ilişkisini göstermektedir. Genetik absans epilepsili sıçanlarda kalsiyum kanal mRNA ifade düzeyi ve T-tipi kalsiyum akımları özellikle TRN bölgesinde artış olduğu gözlenmiştir (Talley ve diğ. 2000, Tsakiridou ve diğ. 1995). Multifaktoriyel genetik bir hastalık olan absans epilepsi etiyolojisinde, çocukluk çağı absans epilepsilli hastalarda, absans epilepsi genetik modeli olan GAERS suşu sıçanlarda, T-tipi kalsiyum kanal geni olan CACNA1H geninde mutasyon olduğu gözlenmiştir (Chen ve diğ. 2003; Powell ve diğ. 2009). Çalışmamızda talamus dokusunda SWD aktivitesini artıran düşük doz ER stresinin CACNA1H mRNA ifadesini de artırmıştır. CACNA1H mRNA ifadesi, T-tipi Ca^{2+} kanalı oluşumunun bir göstergesidir, düşük doz ER stresi ile SWD aktivitesindeki artış ile CACNA1H mRNA ifadesinin paralel bulunması genetik absans epilepsili

sıçanlarla yapılan çalışmalarla uyumludur. SWD aktivitesi ile T-tipi Ca akımları özellikle talamik retiküler nöron bölgesinde yakın ilişkilidir.

ATF6, l6sin fermuar ailesinden olan bir transkripsiyon fakt6r6d6r ve ER stresine cevap elementi olarak 7alışır. ATF6 XBP1 ve CHOP gibi genlerin d6zenlenmesinden sorumludur. IRE1 α ve ATF6 yolağı CHOP ifadesini artırmanın yanı sıra PERK, ATF4 ile se7eci olarak CHOP miktarını artırmaktadır (Chen ve diğ. 2002). CHOP, ER stresiyile uyarılmış apoptik yolaklarda 6nemli bir belirte7tir. CHOP h6crenin sağkalım ya da 6l6mle ilişkili genleri d6zenleyen transkripsiyon fakt6r6 gibi davranır. CHOP'un ařırđ ifadesi anti-apoptotik Bcl-2'de azalmaya fakat pro-apoptotik kaspaz 3, Bcl-X, BAX miktarlarında artışa neden olmaktadır (Li ve diğ. 2014). Yapılan bir 7alışmada ATF6'nın, makrofajlarda okside edilmiş LDL ile uyarılmış kolesterol birikimi ve apoptozu, CHOP miktarının artmasına neden olarak d6zenlediği g6sterilmiştir (Thorp ve diğ., 2009). Yapılan diğer bir 7alışmada ise ATF6'nın miyoblast farklılaşması sırasında spesifik olarak apoptotik miyoblastlarda aktif hale geldiğini g6stermişlerdir. Aktif ATF6'nın apoptozu aracılık etme yeteneğine sahip olduğu ve ATF6'nın ařırđ ifadesinin apoptozu neden olduğu bildirilmiştir. ATF6 sadece CHOP aracılı apoptotik s6re7lere katılmaz, ayrıca indirekt olarak olarak WW b6lge bağlanma proteini-1 (WBP-1=WW domain binding protein) aracılığıyla apoptozu tetiklediği g6sterilmiştir (Morishima ve diğ. 2011). ER stresi sırasında ATF6'nın kaspaz 12'yi de d6zenlediği bilinmektedir (Ma ve diğ. 2003). ATF6 sitosolik fragmanı, 7ok sayıda ER şaperonu kodlayan genin yanı sıra, XBP1'in transkripsiyonel ind6ksiyonundan sorumlu bir transkripsiyon fakt6r6d6r. Bununla birlikte, h6creler ER stresinden kurtulamadığında apoptoz meydana gelir.

Selektif olarak GRP78'in kaldırılması, ATF6 aracılığıyla NF- κ B'nin aktif hale gelmesine neden olmaktadır ve bu etkisini mTOR ile uyarılmış Akt defofrilasyonu aracılığıyla g6stermektedir (Nakajima ve diğ. 2011). Yine diğer bir 7alışmada ise *Escherichia coli*'den elde edilen subletalit6 sitotoksinin (subtilase cytotoxin, SubAB)'in GRP78 kaybına ve ATF6 yolağı aracılığıyla NF- κ B'nin aktivasyonuna neden olduğu g6sterilmiştir (Yamazaki ve diğ. 2009). 7alışmamızda y6ksek doz ER stresinin talamus dokusunda ATF6 mRNA ifadesini anlamlı olarak arttırdığını g6zlemledik, bunun yanı sıra anlamlı olmasa da GRP78 protein miktarında azalma tespit ettik. Y6ksek doz ER stresi SWD aktivitesi 6zerine azaltıcı etkisi bulundu. Azalan SWD aktivitesiyle birlikte artan ATF6 mRNA ifadesi, SWD oluşumunda apoptotik ya da inflamatuvar mekanizmaların 6nemli olabileceğini g6stermektedir.

Özetle çalışmamızda düşük ER stresi, hücre sağkalım mekanizmalarında önemli olan GRP78 protein miktarının, PERK geni olan Eif2ak3'nın, T-tipi kalsiyum kanalı CACNA1H mRNA ifadesini artırarak SWD aktivitesini artırmış olabilir. Yüksek doz ER stres, ATF6 aracılığıyla pro-apoptotik ve ya NF-k β inflamasyon mekanizmaları aracılığıyla SWD aktivitesi üzerine azaltıcı etkisi olabilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

20 ng Tg ile oluşturulan ER stresin 24.saatte, ilaç uygulamayan bazal döneme göre SWD aktivitesini arttırdığı ve talamus dokusunda, ER stresinin ana düzenleyicisi olan GRP78 protein miktarını artırdığı, Eif2ak3 (PERK), XBP-1 ve CACNA1H mRNA ifadesinde de artış olduğu gözlemlendi. 24.saatte SWD aktivitesinin yüksek olması ve 48 saatte bu yükselişin devam etmesi, çalışmamızın moleküler kısmıyla da uyumlu olarak mRNA ifadelerindeki yükselmelerin 48.saatte fonksiyonel olarak yolaklar üzerine etkisini göstermesi olabilir. Özellikle GRP78, Eif2ak3 (PERK) ve XBP-1 mRNA ifadelerinin SF ve/veya DMSO uygulamasına göre yükselmiş olduklarını görmemiz talamik nöronların ER strese karşı adaptasyon ve hayatta kalma sürecinde olduklarını gösterebilir.

200 ng Tg ile oluşturulan ER stresin 24.saatte ve 48. saatte, ilaç uygulamasının olmadığı bazal döneme göre SWD aktivitesini azalttığı ve talamus dokusunda, ER stresinin ana düzenleyicisi olan GRP78 protein miktarını azaltmış olmasına rağmen anlamlı çıkmamıştır. Eif2ak3 (PERK) ve CACNA1H mRNA ifadesinde SF ve DMSO uygulamasına göre değişiklik görülmedi. XBP-1 mRNA ifadesinde DMSO'ya göre artma gözlemlendi. ATF6 mRNA ifadesinde hem SF hem de DMSO uygulamasına göre artış tespit edildi. 200 ng Tg ile oluşturulan ER stres 24.saatte SWD aktivitesini azalmanın 48.saatte de belirginleşmesi, moleküler yolaklarda da ATF 6 gen ifadesinin artması ile paralel bulunmuştur. ATF6 artışı, nöronların ER stresine karşı adaptasyonlarının azaldığı pro-apoptotik süreci gösteriyor olabilir.

Bu çalışmada hücre sağkalımı ve ölümünü belirleyen ER stresi faktörlerinin SWD aktivitesi üzerine etkisinin olabileceği gösterilmiştir. Daha ileriki aşamalarında, yolakların SWD aktivitesi üzerine etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için hücre sağkalımını ve ölümünü etkileyen yolaklar değerlendirilebilir. Anti-apoptotik ve hücre sel sağ kalım süreçlerinde önemli olan Erk1/2, Akt gibi mitotik sinyal yolakları ve ya Bcl-2, FLIP gibi anti-apoptotik genler çalışılabilir. Apoptotik süreçlerde önemli olan kaspaz 3, kaspaz 9, kaspaz 12 ve CHOP genleri ve protein miktarları değerlendirilebilir.

Çalışmamızda gen ifadesinin 18-25 saat içerisinde artması nedeniyle SF, DMSO ve Tg uygulamasından 24 saat sonra beyin dokuları alınıp moleküler düzeyde çalışılmıştır. EEG kayıtlarının değerlendirilmesiyle ER stresinin 48.saatte de SWD aktivitesi üzerine etkili olduğu görülmüştür. ER stresi için araştırmış olduğumuz ER faktörlerinin protein miktarları western blot tekniğiyle 48.saatte elde edilen beyin dokularında bakılabilir.

SWD aktivitesinin azaldığı yüksek ER stresi koşullarında ATF6 miktarının artmış olduğunu tespit ettik. ATF6 aynı zamanda NF- κ B kaynaklı inflamasyon yollarını tetiklediği bilinmektedir. Bu amaçla NF- κ B ve sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi ER stresinin SWD aktivitesi üzerine etkisinin anlaşılmasına yardımcı olabilir.

ER stresi mTOR yollarıyla karşılıklı etkileşim içerisinde olduğu bilinmektedir. mTOR ayrıca epileptogenez sürecinde önemli olduğu ve epilepsi için terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle ER stresi sürecinin değerlendirilmesinin yanında mTOR yollarının etkisine de bakılabilir.



KAYNAKLAR

Ali H, Christensen SB, Foreman JC, Pearce FL, Piotrowski W, Thastrup O. The ability of thapsigargin and thapsigargin to activate cells involved in the inflammatory response. *Br J Pharmacol.* 1985 Jul;85(3):705-12.

Schönthal AH Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel prospects for Therapy *Scientica* Volume 2012, Article ID 857516, 26 pages <http://dx.doi.org/10.6064/2012/857516>.

Avanzini, G., Vergnes, M., Spreafico, R., ve Marescaux, C.1993. Calcium dependent regulation of genetically determined spike and waves by the RTN of rats, *Epilepsia*, 34,1-7.

Avoli, M., ve Gloor, P.1982. Interaction of cortex and thalamus in spike and wave discharges of feline generalised epilepsy. *Experimental neurology*, 76,196-217.

Avoli M, Gloor P, Kostopoulos G, Gotman J. An analysis of penicillin-induced generalized spike and wave discharges using simultaneous recordings of cortical and thalamic single neurons. *J Neurophysiol.* 1983; 50: 819-837.

Bancaud J. Physiopathogenesis of generalized epilepsies of organic nature (stereoencephalographic study). Gastaut H, Jasper HH, Bancaud J, Waltregny A (Ed). *The Physiopathogenesis of the Epilepsies*. Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1969.

Bennett FE. Intracarotid and intravertebral metrazol in petit mal epilepsy. *Neurology.* 1953; 3: 668-673.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ ve diğ. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.* 2010; 51: 676-685.

Berridge M.J. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 1998, 21, 13–26.

Berridge M.J, Lipp P. Bootman, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000, 1, 11–21.

Berridge M.J. Bootman M.D. Roderick H.L. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4, 517–529

Berridge M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1793, 933–940.

Blumenfeld, H., McCormick, D.A. (2000) Corticothalamic inputs control the pattern of activity generated in thalamocortical networks. *Journal of Neuroscience*, 20,5153– 5162.

Blumenfeld, H. Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia*, (2005), 46 (Supplement 9), 21-33.

Blumenfeld H, Coulter DA *Thalamocortical Anatomy and Physiology*. İçinde J Engel, TA Pedley (Ed.), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, (2nd ed.). *Oxford: Lippincott Williams & Wilkins*,2008, 354-368.

Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M and Fafournoux P. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 7192– 7204.

Burdakov, D.; Petersen, O.H.; Verkhratsky, A. Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell Calcium* 2005, 38, 303–310.

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

Caplan R., Siddarth P., Stahl L., Lanphier E., Vona P., Gurbani S., et al., Childhood absence epilepsy: behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities, *Epilepsia* 49 (2008) 1838–1846, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01680.x>.

Carmona-Aparicio L, Pérez-Cruz C, Zavala-Tecuapetla C, Granados-Rojas L, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J, Aristides Sampieri A, Coballase-Urrutia E, Cárdenas-Rodríguez N Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy *Int J Mol Sci.* 2015 Aug; 16(8): 18348–18367.

Chen, G.; Huang, L. D.; Jiang, Y. M.; Manji, H. K. J. *Neurochem.* 1999, 72, 1327.

Chen X, Shen J and Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 2002, 277: 13045 –13052

Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Yao, Z., Ding, K., Lo, W.H., Qiang, B., Chan, P., Shen, Y., Wu, X. 2003. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Annals of Neurology* 54, 239–243.

Chihara Y., Ueda Y., Doi T., Willmore L. J. (2011). Role of endoplasmic reticulum stress in the amygdaloid kindling model of rats. *Neurochem. Res.* 36, 1834–1839. [10.1007/s11064-011-0501-7](https://doi.org/10.1007/s11064-011-0501-7)

Clapham, D.E. Calcium signaling. *Cell* 2007, 131, 1047–1058.

Cnaan A., Shinnar S., Arya R., Adamson P.C., Clark P.O., Dlugos D., et al., Second monotherapy in childhood absence epilepsy, *Neurology.* 2017. 88,182–190, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000003480>.

Coenen AM, van Luijckelaar EL. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet.* 2003; 33: 635-655.

Correll, C. Antibodies in epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2013,13, 348

Cortez MA, Kostopoulos GK, Carter Snead III O. Acute and chronic pharmacological models of generalized absence seizures. *J Neurosci Methods.* 2015; S0165-0270(15)00325-8.

Cui W., Li J., Ron D. and Sha B. (2011) The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 423–428.

Crunelli V, Leresche N. Block of Thalamic T-Type Ca(2+) Channels by Ethosuximide Is Not the Whole Story. *Epilepsy Curr.* 2002 Mar;2(2):53-56.

Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci.* 2002 May;3(5):371-82.

Çetinkaya S, Gül Dursun H. Endoplazmik Retikulum Stresinde Hücre Sağkalım ve Ölüm Kararı, . 2016; 6(2): 56-63 | DOI: 10.5505/sakaryamedj.2016.03371 , Sakarya tıp dergisi

Danober L, Deransart C, Depaulis A ve diğ. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol.* 1998; 55(1): 27-27.

Depaulis A, Charpier S. Pathophysiology of absence epilepsy: Insights from genetic models. *Send to neurosci Lett.* 2018 22; 667: 53-65. doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.035

Dervent, A. Kavram Olarak Epileptik Nöbet ve Epilepsiler, İ. Ü. Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Komisyonu, Epilepsilerde Tanı ve Tedavi Sempozyumu, İstanbul (1998) 7-21.

De Sarno P1, Li X, Jope RS. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology.* 2002 Dec;43(7):1158-64.

- Destexhe A, McCormick DA, Sejnowski TJ. Thalamic and thalamocortical mechanisms underlying 3 Hz spike-and-wave discharges. *Prog Brain Res.* 1999;121:289-307.
- Dobson, C.M., Sali, A., Karplus, M.1998. Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Edit.* 37, 868-893.
- Dolmetsch, R.E.; Xu, K.; Lewis, R.S. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 1998, 392, 933–936.
- Dong D., Ni M., Li J. et al., Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Research*, vol. 68, no. 2, pp. 498–505, 2008.
- Endo, M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 2009, 89, 1153–1176.
- Engel, J. Epilepsy in the World Today: Medical Point of View, *Epilepsia*, 43(Suppl. 6) (2002) 12-13.
- Espinosa-Jovel C, Toledano R, Aledo-Serrano Á, García-Morales I, Gil-Nagel A. Epidemiological profile of epilepsy in low income populations. *Seizure.* 2018 Mar;56:67-72. doi: 10.1016/j.seizure.2018.02.002.
- Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2018 Jan;139:73-79. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2017.11.015.
- Fernandez P. M., Tabbara S. O, Jacobs L. K. et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 59, no. 1, pp. 15–26, 2000.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005 Apr;46(4):470-2.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.. *Epilepsia.* 2017 Apr;58(4):522-530. doi: 10.1111/epi.13670.
- Frickel EM1, Frei P, Bouvier M, Stafford WF, Helenius A, Glockshuber R, Ellgaard L. ERp57 is a multi functional thiol-disulfide oxidoreductase. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18277-87
- Gale, K..Progression and generalization of seizure discharge: anatomical and neurochemical substrates. *Epilepsia.* 1988. 21 supplement 21, 515-534.
- Gastaut H. Clinical and Electroencephalographical Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*, 1970, 11:102-113.
- Glauser T., Ben-Menachem E., Bourgeois B., Cnaan A., Guerreiro C., Kälviäinen R., et al., Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes, *Epilepsia.* 2013. 54, 551–563, <http://dx.doi.org/10.1111/epi.12074>.
- Glauser TA, Cnaan A, Shinnar S, Hirtz DG, Dlugos D, Masur D, Clark PO, Capparelli EV, Adamson PC; Childhood Absence Epilepsy Study Group. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy. *N Engl J Med.* 2010 Mar 4;362(9):790-9. doi: 10.1056/NEJMoa0902014.
- Gloor P. Generalized cortico-reticular epilepsies: some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge. *Epilepsia.* 1968; 9: 249-263.

Gloor P. Neurophysiological bases of generalized seizures termed centrencephalic. Gastaut H, Jasper HH, Bancaud J, Waltregny A (Ed). *The Physiopathogenesis of the Epilepsies*. Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1969.

Gloor P, Fariello G Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. *Trends in Neuroscience*, 1998, 11, 63–68.

Gloor P, Avoli M, Kostopoulos G. Thalamocortical relationships in generalized epilepsy with bilaterally synchronous spike-and-wave discharge. Avoli M, Gloor P, Kostopoulos G, Naquet R (Ed). *Generalized Epilepsy: Neurobiological Approaches*. Mass: Birkhäuser, Boston, 1990.

Gurbanova AA, Aker, RG, Berkman K., Onat FY, van Rijn CM, van Luijtelaar G.. Effect of systemic and intracortical administration of phenytoin in two genetic models of absence epilepsy. *British Journal of Pharmacology*, (2006), 148,1076-82.

Harding H. P., Zhang Y., Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*.1999. 397, 271–274.

Harding H. P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M. and Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell*. 2000. 6, 1099–108.

Haas I. G., Wabl M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306, 387–389. 10.1038/306387a0

Hatori M., Hirota T., Iitsuka M., Kurabayashi N., Haraguchi S., Kokame K., et al. (2011). Light-dependent and circadian clock-regulated activation of sterol regulatory element-binding protein, X-box-binding protein 1, and heat shock factor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4864–4869 10.1073/pnas.1015959108

Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol*. 2009 Dec 25;625(1-3):234-46. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.064. Epub 2009 Oct 14.

Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 \downarrow . *Physiol Rev*. 2011; 91: 1219–1243

Hettinghouse A, Liu R, Liu CJ. Multifunctional molecule ERp57: From cancer to neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*. 2018 Jan; 181:34-48. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.07.011.

Hildebrand MS, Dahl HH, Damiano JA, Smith RJ, Scheffer IE, Berkovic SF. Recent advances in the molecular genetics of epilepsy *J. Med. Genet.*, 50 (2013), pp. 271-279.

Huguenard JR, Prince DA. Clonazepam suppresses GABA_B-mediated inhibition in thalamic relay neurons through effects in nucleus reticularis. *J Neurophysiol*. 1994 Jun;71(6):2576-81.

Huguenard JR, Prince DA. Intrathalamic rhythmicity studied in vitro: nominal T-current modulation causes robust antioscillatory effects. *J Neurosci*. 1994 Sep;14(9):5485-502.

Huguenard JR, Prince DA. A novel T-type current underlies prolonged Ca⁽²⁺⁾-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus. *J Neurosci*. 1992 Oct;12(10):3804-17.

Hunter J, Jasper HH. Effects of thalamic stimulation in unanaesthetized animals. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1949; 1: 305-324.

Huguenard, J.R., Prince, D.A. (1994). Intrathalamic rhythmicity studied in vitro: nominal T-current modulation causes robust antioscillatory effects. *Journal of Neuroscience*, 14(9), 5485-5502.

Hoehn B, Ringer TM, Xu L, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK, Yenari MA. Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001 Nov;21(11):1303-9.

- Hossain MM, DiCicco-Bloom E, Richardson JR. Hippocampal ER stress and learning deficits following repeated pyrethroid exposure. *Toxicol Sci.* 2015 Jan;143(1):220-8. doi: 10.1093/toxsci/kfu226.
- Hussien Y, Podojil JR, Robinson AP, Lee AS, Miller SD and Popko B. ER Chaperone BiP/GRP78 Is Required for Myelinating Cell Survival and Provides Protection during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis *Journal of Neuroscience* 2 December 2015, 35 (48) 15921-15933; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0693-15.2015>
- Fedoroff N. (2006). Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Ann. Bot.* 98, 289–300. 10.1093/aob/mcl128
- Inoue T., Suzuki-Karasaki Y. (2013). Mitochondrial superoxide mediates mitochondrial and endoplasmic reticulum dysfunctions in TRAIL-induced apoptosis in Jurkat cells. *Free Radic. Biol. Med.* 61, 273–284. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.020
- Jackson TR1, Patterson SI, Thastrup O, Hanley MR. A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca²⁺ without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem J.* 1988 Jul 1;253(1):81-6.
- Jallon P, Latour P. Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia.* 2005;46 Suppl 9:10-4.
- Jang Y. S., Lee M. Y., Choi S. H., Kim M. Y., Chin H., Jeong S. W., et al. Expression of B/K protein in the hippocampus of kainate-induced rat seizure model. *Brain Res.* 2004. 999, 203–211. 10.1016/j.brainres.2003.11.047
- Jarre G., Guillemain I., Deransart C., Depaulis A., Genetic models of absence epilepsy in rats and mice, in: A. Pitkänen, P. Buckmaster, A.S. Galanopoulou, S.M. Moshe (Eds.), *Models of Seizure and Epilepsy*, second edition, Elsevier, 2017 (in press).
- Jasper HH, Kershman J. Electroencephalographic classification of the epilepsies. *Arch Neurol Psychiatry.* 1941; 45: 903-943.
- Jasper HH, Fortuyn JD. Experimental studies on the functional anatomy of petit mal epilepsy. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1947; 26: 272-298.
- Kang JQ, Macdonald RL. Molecular Pathogenic Basis for GABRG2 Mutations Associated With a Spectrum of Epilepsy Syndromes, From Generalized Absence Epilepsy to Dravet Syndrome. *JAMA Neurol.* 2016 Aug 1;73(8):1009-16. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.0449.
- Karson, A., Onat, F., Balcı, F., Ateş, N. 2008. Absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda lokomotor aktivite, öğrenme ve bellek. *Epilepsi*, 14(3), 167-175.
- Katsarou AM, Galanopoulou AS, Moshé SL. Epileptogenesis in neonatal brain. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017 Dec 23. pii: S1744-165X(17)30145-2. doi: 10.1016/j.siny.2017.12.004.
- Kim AJ1, Shi Y, Austin RC, Werstuck GH. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *J Cell Sci.* 2005 Jan 1;118(Pt 1):89-99.
- Klein JP, Khera DS, Nersesyan H, Kimchi EY, Waxman SG, Blumenfeld H. Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Res.* 2004 Mar 12;1000(1-2):102-9.
- Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, Imaizumi K, Takeda M. A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ.* 2008 Feb;15(2):364-75. Epub 2007 Nov 30.

Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N. Prevalence and incidence of epilepsy, A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. 2017 Jan 17; 88(3): 296–303.

Ko A. R., Kim J. Y., Hyun H. W., Kim J. E. Endoplasmic reticulum (ER) stress protein responses in relation to spatio-temporal dynamics of astroglial responses to status epilepticus in rats. *Neuroscience*. 2015. 307, 199–214. 10.1016/j.neuroscience.2015.08.061

Kunchithapautham K., Atkinson C., Rohrer B. Smoke exposure causes endoplasmic reticulum stress and lipid accumulation in retinal pigment epithelium through oxidative stress and complement activation. *J. Biol. Chem*. 2014. 289, 14534–14546. 10.1074/jbc.M114.564674

Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*. 2000 Feb 3;342(5):314-9.

Lam AKM., Galione A. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1833, 2542–2559.

Lapalme-Remis S, Cascino GD. Imaging for adults with seizures and epilepsy *Continuum*, 22 (2016), pp. 1451-1479

Lanner, J.T.; Georgiou, D.K.; Joshi, A.D.; Hamilton, S.L. Ryanodine receptors: Structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2010

Lee E., Nichols P., Spicer D., Groshen S., Yu M. C., and Lee A. S. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Research*, vol. 66, no. 16, pp. 7849–7853, 2006.

Liu, H.; Bowes, R. C., 3rd; van de Water, B.; Sillence, C.; Nagelkerke, J. F.; Stevens, J. L. *J. Biol. Chem*. 1997, 272, 21751.

Liu G., Guo H., Guo C., Zhao S., Gong D., Zhao Y. (2011). Involvement of IRE1 α signaling in the hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res. Bull*. 84, 94–102 10.1016/j.brainresbull.2010.10.004

Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Cheng W, Zhang ZF, Shan Q. Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase β /nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain Behav Immun*. 2011 Nov;25(8):1658-67. doi: 10.1016/j.bbi.2011.06.009.

Lu P. D., Harding H. P. and Ron D. (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol*. 167, 27–33.

Luo B. and Lee A. S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*. In press.

Luhmann HJ, Mittmann T, van Luijtelaar G ve diğ. Impairment of intracortical GABAergic inhibition in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 1995; 22: 43-51.

Lüders H, Lesser RP, Dinner DS, Morris HH III. Generalized epilepsies: a review. *Cleve Clin Q*. 1984; 51: 205-226.

Lüders HO, Acharya J, Alexopoulos A, Baumgartner C, Bautista J, Burgess R, Carreño M, Diehl B, Dinner D, Ebner A, Foldvary N, Godoy J, Hamer H, Ikeda A, Källén K, Kellinghaus C, Kotagal P, Lachhwani D, Loddenkemper T, Mani J, Matsumoto R, Möddel G, Nair D, Noachtar S, O'Donovan CA, Rona S, Rosenow F, Schuele S, Szabo CA, Tandon N, Tanner A, Widdess-Walsh P. Are epilepsy classifications based on epileptic syndromes and seizure types outdated? *Epileptic Disord*. 2006 Mar;8(1):81-5.

Ma Y, Hendershot LM. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2003;278:34864–34873. doi: 10.1074/jbc.M301107200.

- Määttänen P., Gehring K., Bergeron J. J. M., Thomas D. Y. (2010). Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 500–511. 10.1016/j.semcdb.2010.03.006
- Manning JP, Richards DA, Leresche, N., Crunelli, V., Bowery, N.G. (2004). Cortical area specific block of genetically determined absence seizures by ethosuximide. *Neuroscience*, 123 (1), 5-9.
- Manning, J.P.A., Richards, D.A. ve Bowery, N.G. 2003. Pharmacology of absence epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(10), 542-549.
- Malhotra, J.D.; Kaufman, R.J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007, 18, 716–731.
- Marrion NV, Adams PR. Release of intracellular calcium and modulation of membrane currents by caffeine in bull-frog sympathetic neurones. *J Physiol.* 1992 Jan;445:515-35.
- Meeren H, van Luijtelaar G, Lopes de Silva F ve diğ. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol.* 2005; 62: 371-376.
- Meeren, H.K., Pjin, J.P., Van Luijtelaar E.L.J.M., Coenen, A.M. ve Lopes da Silva, F.H.. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *The Journal of Neuroscience*, (2002), 22,1480-1495.
- Morris, J. A.; Dorner, A. J.; Edwards, C. A.; Hendershot, L. M.; Kaufman, R. J. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 4327.
- Morison RS, Dempsey EW. A study of thalamocortical relations. *Am J Physiol.* 1942; 135: 281-292.
- Mikami, Y.; Kanemaru, K.; Okubo, Y.; Nakaune, T.; Suzuki, J. et al. Nitric Oxide-induced Activation of the Type 1 Ryanodine Receptor Is Critical for Epileptic Seizure-induced Neuronal Cell Death. *EBioMedicine* 2016, 11, 253–261.
- Murao N, Nishitoh H. Role of the unfolded protein response in the development of central nervous system. *J Biochem.* 2017 Sep 1;162(3):155-162. doi: 10.1093/jb/mvx047.
- Nakajima S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Saito Y, Kato H, Huang T, Yao J, Paton AW, Paton JC, Kitamura M. Selective abrogation of BiP/GRP78 blunts activation of NF- κ B through the ATF6 branch of the UPR: involvement of C/EBP β and mTOR-dependent dephosphorylation of Akt. *Mol Cell Biol.* 2011 (8):1710-8. doi: 10.1128/MCB.00939-10.
- Niedermeyer E. Primary (idiopathic) generalized epilepsy and underlying mechanisms. *Clin Electroencephalogr.* 1996; 27: 1-21.
- Noebels JL, Sidman RL. Inherited epilepsy: spike-wave and focal motor seizures in the mutant mouse tottering. *Science.* 1979 Jun 22;204(4399):1334-6.
- Noebels JL1, Qiao X, Bronson RT, Spencer C, Davisson MT. Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the mouse with prolonged corticalseizures. *Epilepsy Res.* 1990 Nov;7(2):129-35.
- Novoa I, Zeng H, Harding H. P. and Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J. Cell Biol.* 2001. 153, 1011–1022.
- Oida Y, Izuta H, Oyagi A, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, Hara H. Induction of BiP, an ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Brain Res.* 2008 May 7;1208:217-24. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.068.

- Ouyang YB, Lu Y, Yue S, Xu LJ, Xiong XX, White RE, Sun X, Giffard RG. miR-181 regulates GRP78 and influences outcome from cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Neurobiol Dis.* 2012 Jan;45(1):555-63. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.012. Epub 2011 Sep 24.
- Ozgun R., Turkan I., Uzilday B., Sekmen A. H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 65, 1377–1390. 10.1093/jxb/eru034
- Palade G.E., (1956), “The Endoplasmic Reticulum”, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2 (4), 85-98.
- Panayiotopoulos CP. Absence epilepsies. Engel JJ, Pedley TA (Ed) *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
- Panayiotopoulos CP. Treatment of typical absence seizures and related epileptic syndromes. *Paediatr Drugs.* 2001; 3: 379-403.
- Panayiotopoulos C.P., Typical absence seizures and their treatment, *Arch. Dis. Child.* 1999. 81, 351–3o55.
- Parikh, S., Nordi Jr., D.R., De Vivo, D.C., Chapter 31: epilepsy in the setting of inherited metabolic and mitochondrial disorders. In: Wyllie, E. (Ed.), *Wyllie’s Treatment of Epilepsy: Principles and Practice*, 2015. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 388–407.
- Carney PW, Jackson GD. Insights into the Mechanisms of Absence Seizure Generation Provided by EEG with Functional MRI. *Front Neurol.* 2014; 5: 162.
- Penfield W. Epileptic automatisms and the centrencephalic integrating system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1952; 30: 513-528.
- Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83, 117-161.
- Pfaffenbach K. T., Nivala A. M., Reese L., Ellis F., Wang D., Wei Y., et al. (2010). Rapamycin inhibits postprandial-mediated X-box-binding protein-1 splicing in rat liver. *J. Nutr.* 140, 879–884 10.3945/jn.109.119883
- Polack, P O, Guillemain, I. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *Journal of Neuroscience*, 2007, 27(24), 6590-6599.
- Powell, K.L., Cain, S.M., Ng, C., Sirdesai, S., David, L.S., Kyi, M., Garcia, E., Tyson, J.R., Reid, C.A., Bahlo, M., Foote, S.J., Snutch, T.P., O'Brien, T.J. 2009. A Cav3.2 T-type calcium channel point mutation has splice-variant-specific effects on function and segregates with seizure expression in a polygenic rat model of absence epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 29(2), 371-380.
- Prince DA, Farrell D. “Centrencephalic” spike-wave discharges following parenteral penicillin injections in the cat. *Neurology.* 1969; 19: 309-310.
- Pumain R, Louvel J, Gastard M, Kurcewicz I, Vergnes M. Responses to N-methyl-D-aspartate are enhanced in rats with petit mal-like seizures. *Journal of Neural Transmission*, 1992, 35 (Suppl.), 97–108.
- Rajdev S, et al. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol.* 2000;47:782–91
- Reddy, R. K.; Mao, C.; Baumeister, P.; Austin, R. C.; Kaufman, R. J.; Lee, A. S. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 20915.

- Resendez Jr., E., Attenello, J.W., Grafsky, A., Chang, C.S. and Lee, A.S.: Calcium ionophore A23187 induces expression of glucose-regulated genes and their heterologous fusion genes. *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985) 1212-1219.
- Rizzuto, R.; Pozzan, T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: Molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* 2006, 86, 369–408.
- Rouault-Pierre K., Lopez-Onieva L., Foster K., Anjos-Afonso F. et al. HIF-2alpha protects human hematopoietic stem/progenitors and acute myeloid leukemic cells from apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cell Stem Cell.* 2013. 13, 549–563. 10.1016/j.stem.2013.08.011
- Russo E. , Citraro R., Donato G., Camastra C., Juliano R, Cuzzocrea S. , *et al.* mTOR inhibition modulates epileptogenesis, seizures and depressive behavior in a genetic rat model of absence epilepsy *Neuropharmacology*, 69 (2013), pp. 25-36
- Rutecki, P.A.; Sayin, U.; Yang, Y.; Hadar, E. Determinants of ictal epileptiform patterns in the hippocampal slice. *Epilepsia* 2002, 43 (Suppl. S5), 179–183
- Sadleir LG, Scheffer IE, Smith S, Carstensen B, Farrell K, Connolly MB. EEG features of absence seizures in idiopathic generalized epilepsy: impact of syndrome, age, and state. *Epilepsia.* 2009 Jun;50(6):1572-8. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.02001.x.
- Şahin D, Erdolu CO, Karadenizli S, Ateş N, Kara A, Bayrak G, Beyaz S, Demir B (2016). effects of gestational and lactational exposure to low dose mercury chloride hgcl 2 on behaviour learning and hearing thresholds in wag rij rats. *excli journal*(15), 391-402., doi: 10.17179/excli2016-315.
- Sahin D, Karadenizli S, Kasap M, Oztas B, Kir HM, Akpinar G, Ates N. Decreased ERp57 Expression in WAG/Rij Rats Thalamus and Cortex; Possible Correlation with Absence Epilepsy. *Protein Pept Lett.* 2018 Feb 6. doi: 10.2174/0929866525666180207101650.
- Sarkisova K., van Luijteleaer G., The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35 (2011) 854–876, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>.
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain A, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang Y., Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017. 58, 512–521.
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.
- Seo, M.D.; Enomoto, M.; Ishiyama, N.; Stathopoulos, P.B.; Ikura, M. Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2015, 1853, 1980–1991.
- Seneviratne U, Cook MJ, D’Souza WJ. Electroencephalography in the Diagnosis of Genetic Generalized Epilepsy Syndromes. *Front Neurol.* 2017; 8: 499.
- Sokal DM, Mason R, Parker TL. Multi-neuronal recordings reveal a differential effect of thapsigargin on bicuculline- or gabazine-induced epileptiform excitability in rat hippocampal neuronal networks. *Neuropharmacology.* 2000 Sep;39(12):2408-17.

Shi Y, Gerritsma D, Bowes AJ, Capretta A and Werstucka GH, Induction of GRP78 by valproic acid is dependent upon histone deacetylase inhibition, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17 (2007) 4491–4494

Shiu, R. P. C., Pouyssegur, J., and Pastan, I. (1977) *Proc. Natl. Acad. Ingolia*, T. D., Craig, E. A., and McCarthy, B. J. (1980) *Cell* 21,669- *Sci. U. S. A.* 74, 3840-3844.

Shintani-Ishida, K.; Nakajima, M.; Uemura, K.; Yoshida, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 345, 1600

Sitnikova, E., G. van Luijtelaar (2004). Cortical control of generalized absence seizures: effect of lidocaine applied to the somatosensory cortex in WAG/Rij rats. *Brain Research*, 1012(1-2), 127-137.

Sokal, D.M.; Mason, R.; Parker, T.L. Multi-neuronal recordings reveal a differential effect of thapsigargin on bicuculline- or gabazine-induced epileptiform excitability in rat hippocampal neuronal networks. *Neuropharmacology* 2000, 39, 2408–2417.

Sokka AL, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the ratbrain. *J Neurosci.* 2007 Jan 24;27(4):901-8.

Strauss U, Kole MH, Bräuer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA. An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2004 Jun;19(11):3048-58.

Suzuki C. K., Bonifacino J. S., Lin A. Y., Davis M. M., Klausner R. D. (1991). Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2⁺)-dependent association with BiP. *J. Cell Biol.* 114, 189–205. 10.1083/jcb.114.2.189.

Talley, E.M., Solórzano, G., Depaulis, A., Perez-Reyes, E., Bayliss, D.A. 2000. Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 75(1), 159-165.

Tenney J.R., Jain S.V. Absence epilepsy: older vs newer AEDs, *Curr. Treat. Options Neurol.* 2014. 16, 290, <http://dx.doi.org/10.1007/s11940-014-0290-9>.

Thorp E, Li Y, Bao L, Yao PM, Kuriakose G, Rong J and Fisher EA, et al. Brief report: increased apoptosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe2/2 mice lacking macrophage Bcl-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, 29: 169– 172

Tsakiridou, E., Bertollini, L., de Curtis, M., Avanzini, G., Pape, H.C. Tsakiridou 1995. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 15(4), 3110-3117.

Toledrano, M., Pittock, S.J. Autoimmune epilepsy. *Semin. Neurol.* 2015, 35, 245–258

Torres-Peraza J. F., Engel T., Martín-Ibáñez R., Sanz-Rodríguez A., Fernández-Fernández M. R., Esgleas M., et al. Protective neuronal induction of ATF5 in endoplasmic reticulum stress induced by status epilepticus. *Brain* 136(Pt4). 2013. 1161–1176. 10.1093/brain/awt044

van Luijtelaar ELJM, Coenen AML. Effects of remacemide and its metabolite FPL 12495 on spike-wave discharges, Electroencephalogram and behaviour in rats with absence epilepsy. *Neuropharmacology.* 1995, 34; 419-425.

Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P., Raeymaekers L., Wuytack F., Vanoevelen, J. The Ca(2+) pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011, 3, a004184

- van Luijtelaar E.L., Coenen A.M., Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats, *Neurosci. Lett.* 70 (1986) 393–397.
- van Luijtelaar E.L., de Bruijn S.F., Declerck A.C., Renier W.O., Vossen J.M., Coenen A.M. Disturbances in time estimation during absence seizures in children, *Epilepsy Res.* 9 (1991) 148–153.
- van Luijtelaar E.L., Van der Werf S.J., Vossen J.M., Coenen A.M. Arousal, performance and absence seizures in rats, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 79 (1991) 430–434
- Vembar S.S., Brodsky J.L., (2008), ‘One step at a time: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 944-957.
- Vergnes M, Marescaux C, Micheletti G, Reis J, Depaulis A, Rumbach L, Warter JM. Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci Lett.* 1982 Nov 16;33(1):97-101.
- Vergnes M., Marescaux C., Boehrer A., Depaulis A., Are rats with genetic absence epilepsy behaviorally impaired, *Epilepsy Res.* 9 (1991) 97–104.
- Verkhatsky A, Shmigol A. Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium.* 1996 Jan;19(1):1-14.
- Vezzani, A., Fujinami, R.S., White, H.S., Preux, P.M., Blömcke, I., Sander, J.W., Löscher, W. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol.* 2016. 131, 211–234.
- Wang J., Yin Y., Hua H. et al. Blockade of GRP78 sensitizes breast cancer cells to microtubules-interfering agents that induce the unfolded protein response. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 13, no. 9 B, pp. 3888–3897, 2009.
- Wang JF, Bown C, Young LT. Differential display PCR reveals novel targets for the mood-stabilizing drug valproate including the molecular chaperone GRP78. *Mol Pharmacol.* 1999 Mar;55(3):521-7.
- Werstuck, G. H.; Kim, A. J.; Brenstrum, T.; Ohnmacht, S. A.; Panna, E.; Capretta, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 5465.
- Xu C., Bailly-Maitre B., Reed J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. 2005. *J. Clin. Invest.* 115, 2656–2664. 10.1172/JCI26373
- Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, Tagawa Y, Okamura M, Ogata R, Huang T, Nakajima S, Yao J, Paton AW, Paton JC, Kitamura M. Activation of the Akt-NF- κ B Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response. *J Immunol.* 2009, 15; 183(2): 1480–1487.
- York GK, Steinberg DA. An Introduction to the Life and Work of John Hughlings Jackson. *Med Hist Suppl.* 2006.
- Yu B, Wen L, Xiao B, Han F, Shi Y. Single Prolonged Stress induces ATF6 alpha-dependent Endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process in medial Frontal Cortex neurons. *BMC Neurosci.* 2014 Oct 21;15:115. doi: 10.1186/s12868-014-0115-5.
- Yuanyuan Shi,^a David Gerritsma,^b Anna J. Bowes,^c Alfredo Capretta^b and Geoff H. Werstuck^a, Induction of GRP78 by valproic acid is dependent upon histone deacetylase inhibition, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17 (2007) 4491–4494
- Yassir Hussien, Joseph R. Podojil, Andrew P. Robinson, Amy S. Lee, Steven D. Miller and Brian Popko ER Chaperone BiP/GRP78 Is Required for Myelinating Cell Survival and Provides Protection during

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience* 2015, 35 (48) 15921-15933; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0693-15.2015>

Yamamoto A, Murphy N, Schindler CK, So NK, Stohr S, Taki W, Prehn JH, Henshall DC. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Mar;65(3):217-25.

Sagara Y, Fernandez-Belda F, Meis L, Inesi G. Characterization of the Inhibition of Intracellular Ca²⁺ Transport ATPases by Thapsigargin” Vol. 267, No. 18, Issue of June 25, pp. 12606-12613,1992.

Zhu X, Dong J, Han B, Huang R, Zhang A, Xia Z, Chang H, Chao J, Yao H. Neuronal Nitric Oxide Synthase Contributes to PTZ KindlingEpilepsy-Induced Hippocampal Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Damage. *Front Cell Neurosci*. 2017 Nov 28;11:377. doi: 10.3389/fncel.2017.00377.

Zwingman TA, Neumann PE, Noebels JL, Herrup K. Ricker is a new variant of the voltage-dependent calcium channel gene *Cacna1a*. *J Neurosci*. 2001 Feb 15;21(4):1169-78.

Zhang X, Yuan Y, Jiang L, Zhang J, Gao J, Shen Z, Zheng Y, Deng T, Yan H, Li W, Hou WW, Lu J, Shen Y, Dai H, Hu WW, Zhang Z, Chen Z. Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury: Involvement of PARK2-dependent mitophagy. *Autophagy*. 2014 Oct 1;10(10):1801-13. doi: 10.4161/auto.32136.

Zhang X, Xu L, He D, Ling S. Endoplasmic reticulum stress-mediated hippocampal neuron apoptosis involved in diabetic cognitive impairment. *Biomed Res Int*. 2013;2013:924327. doi: 10.1155/2013/924327

Zhang K. (2010). Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 3, 33–40.

Zhang L. H. and Zhang X. Roles of GRP78 in physiology and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 110, no. 6, pp. 1299–1305, 2010.

ÖZGEÇMİŞ

Sabriye KARADENİZLİ
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı
Kocaeli, TÜRKİYE
+905334239871
sabriyekaradenizli@gmail.com

Eğitimi:

2012-	Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Bölümü, Doktora Öğrencisi (PhD)
2007 - 2010	Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Bölümü, Yüksek Lisans (MSc)
2004 - 2008	Istanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (Yandal)
2003 - 2007	Istanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Lisans)
1999- 2001	Marmara Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laborantlık Bölümü

İş bilgileri:

2011-	Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji A.D. Araştırma Görevlisi.
--------------	--

ARAŞTIRMA ALANLARI

Epilepsi, Nörodejeneratif Mekanizmalar, ER stres, Kanser Biyolojisi, Nörosinematik, Davranış psikolojisi

TEKNİK BİLGİLER

Hücre kültürü, Sitotoksite testleri, NK aktivitesi, RT-PCR, Western Blot, Proteomik, Elektrofizyoloji

1.YAYINLAR

Uluslararası Makaleler:

Akdemir Z.S., Kayaman-Apohan N., Kahraman M.V., Kuruca S.E., Güngör A., Karadenizli S. Preparation of biocompatible, UV-cured fumarated poly(ether-ester)-based tissue-engineering hydrogels. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2011;22(7):857-72.

Bayramoğlu G., Kayaman-Apohan N., Kahraman M.V., Karadenizli S., Kuruca S.E., Güngör A. Preparation of bow tie-type methacrylated poly(caprolactone-co-lactic acid) scaffolds: effect of collagen modification on cell growth. Polymers for Advanced Technologies. 2012 23(10) : 1403–1413.

Engin KN, Kuruca SD, Akgün Dar K, Çetin MB, Karadenizli S, Gürevin Ergin E, Yemişçi B, Bilgiç Gazioğlu S, Arslan M. (2015). The Evaluation of Human Tenon s Fibroblasts and Endothelial Cell Responses to Antifibrotics Alone and in Combination with a Tocopherol. Current Eye Research, 40(1), 19-29., Doi: 10.3109/02713683.2014.909496.

Göçmez SS, Yazır Y, Şahin D, Karadenizli S, Utkan T. (2015). The effect of a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 3 bromo 7 nitroindazole on spatial learning and memory in rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior(131), 19-25., Doi: 10.1016/j.pbb.2015.01.013.

Şahin D, Erdolu CO, Karadenizli S, Ateş N, Kara A, Bayrak G, Beyaz S, Demir B (2016). effects of gestational and lactational exposure to low dose mercury chloride hgcl 2 on behaviour learning and hearing thresholds in wag rij rats. *excli journal*(15), 391-402., doi: 10.17179/excli2016-315.

Dede F, Karadenizli S, Özsoy ÖD, Eraldemir FC, Şahin D, Ateş N. (2017) The Effects of Adenosinergic Modulation on Cytokine Levels in a Pentylenetetrazole-Induced Generalized Tonic-Clonic Seizure Model. *Neuroimmunomodulation*. 24(1):54-59. doi: 10.1159/000478659.

Kuruca SE, Karadenizli S, Akgun-Dar K, Kapucu A, Kaptan Z, Uzun G. (2017) The effects of 17β-estradiol on blood brain barrier integrity in the absence of the estrogen receptor alpha; an in-vitro model. *Acta Histochem*. 2017 Jul;119(6):638-647. doi: 10.1016/j.acthis.2017.07.005.

Ulusal Makaleler:

Engin K.N., Erdem-Kuruca S., Özcan-Arıcan G., Çetin B., Arıcan E., Serbes U., Akgün-Dar K., Karadenizli S., Kapucu A. α-tokoferol ve güncel antifibrotik ajanların tek ve kombine kullanımında insan endotel hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin in vitro incelenmesi. *Journal of Glaucoma-Cataract Oftalmoloji Dergisi*. 2009; 4(2):93-99.

Uzunhan T.A., Katakış Z., Kuruca S.E., Çetin B., Karadenizli S., Akdeniz N., Atasever B., Deniz G. Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda doğal öldürücü (NK) hücreler üzerine etkileri. *Çocuk Dergisi* 11(4): 160-169, 2011.

2.BİLDİRİLER

Uluslararası Bildiriler:

Erdem-Kuruca S, Karalı N, Çetin B, Karadenizli S, Karakaş Z. The Antileukemic Potential Of New Derivatives of 5-Fluoro-1H-Indole-2,3-Dione-3-Thiosemicarbazone on in Vitro Cell Lines, 2008 112: Abstract 5055, Blood

Engin KN, Erdem-Kuruca S, Özcan-Arıcan G, Çetin B, Arıcan E, Serbes U, Akgün-Dar K, Karadenizli S, Kapucu A. Evaluation of apoptotic effects of single and combined use of

current antifibrotic agents on human endothelial cells. ARVO Florida, ABD 2009.

Çetin B., Erdem-Kuruca S, Akgün-Dar K, Karadenizli S., Gurel E, Ozturk G, Yılmaz A, Deniz G, Yanasik M. Apoptotic effects of corticosteroids on pure CD34⁺ hematopoietic stem cells and modulation of this effect with cytokines. Blood 2010; 116: Abstract: 4770.

Uzunhan T.A., Katakas Z., Kuruca S.E., Karadenizli S., Çetin B., Akdeniz N., Deniz G, Devocioğlu Ö. Chemotherapy effects on natural killer cells in children with acute leukemia. Blood 2010; 116: Abstract: 4770.

Çetin M. B., Karadenizli S., Serbes U., Akgün- Dar K., Arıcan G. Ö., Engin K.N., Kuruca S. E. Apoptotic and antiproliferative effects of single and combined use of alpha tocopheral and antifibrotic agents, on human endothelium cells:A comparative evaluation, 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress, Süleyman Demirel University, Isparta, 22-27 June 2010.

Karadenizli S., Üzüm G., Kuruca S.E., Dar K.A., Çetin M.B., Kapucu A., The effect of estrogen on ethanol induced blood brain barrier disruption in an in vitro model. Turkish-FEPS Physiology Congress, September 3-7, 2011, Yeditepe University, Istanbul-Turkey.

Çetin M.B., Erdem-Kuruca S., Akgün-Dar K., Gürel E., Karadenizli S., Öztürk G., Apoptotic Effects of Corticosteroids on CD34+ Hematopoietic Stem Cells and Modulation of This Effect with Several Cytokines. Turkish-FEPS Physiology Congress, September 3-7, 2011, Yeditepe University, Istanbul-Turkey.

Karadenizli, S, Uzum, G, Kuruca, SE, Akgun-Dar, K, Cetin, MB, Kapucu, A, 17-betaestradiol increases ethanol induced disruption of blood-brain barrier; responsibility of inducible nitric oxide synthase. 22nd IUBMB Congress/37th FEBS Congress, Poster number: 16-62. SEP 04-09, 2012, Seville, SPAIN. FEBS JOURNAL, Volume: 279, Page 381.

Engin KN, Yemişçi B, Erdem-Kuruca S, Gürel E, Ak-Gün Dar K, Özcan-Arıcan G, Karadenizli S, Bilgiç S, Çetin B, Serbes U, Arıcan E, Arslan M. Evaluation of human Tenon's fibroblast and endothelium cell responses against single and combined use of current antifibrotics: In vitro study, 17-20 July 2013, 5th Glaucoma Congress, Vancouver.

Göçmez SS, Özer C, Şahin D, Karadenizli S, Utkan T. Effects of chronic treatment with fluoxetine moclobemide and agomelatine on rat isolated thoracic aorta. 26th ECNP Congress, 2013.

Karadenizli, S, Uzum, G, Kuruca, SE, Akgun-Dar, K, Cetin, MB, Kapucu, A. The effect of 17 beta estradiol on in vitro blood brain barrier model. RNA metabolism: Chsnging Paradigms in Neurodegeneration. 26-29 May, 2014. Trieste, Italy.

Karadenizli S, Şahin D, Kasap M, Akpınar G, Öztaş B, Kır H, Kuşkay S. Differential Expression of protein disulfide isomerase 3 (PDIA 3) between genetic absence epileptic

WAG/Rij and Wistar Rats in the thalamic and parietal brain regions. IFCC WorldLab,20-26 June 2014, Istanbul, Turkey.

Karadenizli S, Şahin D, Kasap M, Akpınar G, Öztaş B, Kır H, Ateş N. Analysis of ERp57 in thalamic tissue of genetic absence epileptic WAG Rij rats by using proteomic approaches. 9th European Summer School/ Advanced Proteomics, 2015, Brixen, Italy.

Beyaz S, Şahin D, Karadenizli S, Günce B, Erdolu CO, Demir B, Ateş N. EFFECTS OF CONTINUOUS LOW DOSE MERCURYCHLORIDE HGCL2 EXPOSURE IN GESTATIONAL AND LACTATION PERIODS ON SWD ACTIVITY AND SUBCONVULSIVE DOSE PTZ INDUCED SEIZURE IN GENETICALLY ABSENCE EPILEPTIC WAG RIJ RATS. 31st International Epilepsy Congress 2015, Istanbul, Turkey.

Şahin D, Erdolu CO, Günce B, Beyaz S, Karadenizli S, Kara A, Demir B, Ateş N. EFFECTS OF LOW DOSE MERCURY CHLORIDE HGCL2 EXPOSURE IN GESTATIONAL AND LACTATIONAL PERIODS ON BEHAVIOR LEARNING AND HEARING LOSS IN WAG RIJ RATS. 31st International Epilepsy Congress, 2015, Istanbul, Turkey.

DEDE F, KARADENİZLİ S, ÖZSOY ÖD, ERALDEMİR FC, ATEŞ N. The effects of adenosinergic system modulation on TNF and IL 1 levels in the brain after PTZ induced convulsive seizure. Neurizons-Speak Your Mind, 2016, Göttingen, Germany.

KARADENİZLİ S, ŞAHİN D, ATEŞ N. Effects of different doses of Retigabine on aged genetic absence epileptic WAG Rij rats. Neurizons-Speak Your Mind, 2016, Göttingen, Germany.

Fatma Kaya Dagistanli, Sule Ozdas, Sabriye Karadenizli, Deniz Sahin. Effects of Low Dose Mercury Exposure on Rat Pancreas During Gestational and Lactational Periods. ICHC 2017, Antalya, Turkey.

Karadenizli S, Şahin D, Dede F, Ateş N. The effects of ER stress induced by different dose of Thapsigargin on generalized convulsive seizure. 32nd International Epilepsy Congress, 2-5 September 2017, Barcelona, Spain.

Şahin D, Erdolu CO, Karadenizli S, Ateş N. Anti-absence effect of sildenafil (5-phosphodiesterase inhibitor) in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. 32nd International Epilepsy Congress, 2-5 September 2017, Barcelona, Spain.

S. KARADENİZLİ, D. SAHİN , H. KENAR , C. YILMAZ OZDOĞAN, N. ATEŞ. Effects of retigabine on ER stress induced by thapsigargin and tunicamycin in PC12 cells; a comparative study. SFN 2017, 11-15 September, Washington DC, America.

F. DEDE, S. KARADENİZLİ, O. OZSOY, D. SAHİN, F. ERALDEMİR, N.ATES. The effect of adenosinergic modulation on oxidative stress in convulsive seizure induced by pentylene tetrazol. SFN 2017, 11-15 September, Washington DC, America.

Ulusal Bildiriler:

Karadenizli S, Çetin B, Erdem-Kuruca S, Karalı N. 5-Triflurometoksi-1H-İndol-2,3,-Dion-3-Tiyosemikarbazon Türevlerinin Miyeloid ve Lenfoid Lösemi hücreleri üzerine in vitro sitotoksik etkileri. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Kariyer Günleri 2008, İstanbul, Türkiye.

Engin KN, Erdem-Kuruca S, Özcan-Arıcan G, Çetin B, Arıcan E, Serbes U, Akgün-Dar K, Karadenizli S, Kapucu A. α -tokoferol ve güncel antifibrotik ajanların tek ve kombine kullanımında insan endotel hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin in vitro incelenmesi. XXXXII. TOD Ulusal Kongresi. Antalya, Türkiye. 2008.

Engin K.N., Yemisci B, Erdem-Kuruca S., Akgun-Dar K., Karadenizli S., Çetin B., Gürel E., Serbes U, Özcan-Arıcan G., Güncel antifibrotik ajanlar ve alfa-tokoferolün tek ve kombine kullanımlarının insan Tenon fibroblast ve endotel hücreleri üzerine etki paternleri: in vitro değerlendirme, XXXXIV. TOD Ulusal Kongresi, 2010, İstanbul, Türkiye.

Kaya Nusret Engin, Bülent Yemisci, Gül Ozcan Arıcan, Kadriye Akgun Dar, Ugur Serbes, Sabriye Karadenizli, Muhittin Taşkapılı, Beyza Cetin, Ebru Gürel, Sema Bilgiç, Ercan Arıcan, Serap Erdem Kuruca. Tek ve kombine antifibrotik kullanımlarına insan Tenon fibroblast ve endotel hücre yanıtlarının kapsamlı in vitro değerlendirmesi. 45.TOD Ulusal kongresi, 5-6 Ekim 2011, Girne, KKTC

Karadenizli S, Şahin D, Öztaş B, Kasap M, Akpınar G, Kır H, Ateş N. Investigation of Thalamic Brain Regions Protein Profiles of Genetical Absence Epileptic WAG Rij and Wistar Rats Strain. 11.Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2013, İzmir, Türkiye.

Göçmez SS, Özer C, Şahin D, Karadenizli S, Utkan T, Gacar N. Uzun süreli Flouxetin, Moclobemid ve Agomelatin uygulamasının izole sıçan torasik aorta düz kası yanıtları üzerine etkileri, 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2013, Antalya.

Karadenizli S, Şahin D, Ateş N. GENETİK ABSANS EPLEPSİLİ WAG RİJ SIÇANLARDA RETİGABİNE NİN SWD AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ. 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2013, Ankara, Türkiye.

Karadenizli S, Şahin D, Ateş N. Age dependent effects of retigabin on genetic absenceepileptic WAG Rij rats. 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Doi: 10.2399/ana.15.v, 2015, Konya, Türkiye.

Dede F, Karadenizli S, Ateş N. Adenozinerjik sistem modülasyonunun konvulsif nöbet üzerine etkisi ve sitokinlerle ilişkisi. 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2016, Ankara, Türkiye.

4.ÖDÜLLER

1) En iyi poster ödülü, 2011

Determining in vitro responses of human tenon fibroblasts and endothelium cells to the single and combined effects of current antifibrotics 45.TOD National Congress, 5-6 November 2011, Girne, Cyprus.

2) Golden Rose Genç Araştırmacı ödülü, 2015

1st International Brain School, Süleyman Demirel University Medical School, Isparta, Turkey.

3) ICGEB kurs katılım ödülü, 2014

RNA metabolism; changing paradigms in neurodegeneration, 26-29 Mayıs, Trieste, İtalya.

4) ICGEB kurs katılım ödülü, 2013

Application of Neuronal Stem Cells and Mouse Models in Neuroscience Workshop, 2-5 Ekim 2013, Zagreb Üniversitesi Beyin Araştırmaları Merkezi

5.KURSLAR

- 1) VII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, 19-23 Ekim 2009, Kocaeli Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi.
- 2) İmmünohistokimya ve Western Blot Eğitimi Nöroimmunoloji Uygulamaları, 27-29 Haziran 2012, İstanbul Üniversitesi Denetsel Tıp Araştırma Enstitüsü.
- 3) 3.Voltametri Kursu, 11 Kasım 2012, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji, 4. İleri Hücresel Sinir Bilim Toplantısı.
- 4) II.Temel Proteomiks Kursu, 17-21 Aralık 2012, Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Birimi.
- 5) Deneysel Hayvanlar Kullanım Sertifikası-B Kategorisi Araştırmacılar için, 23 Mayıs 2013, Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneysel Etik Kurulu
- 6) RNA metabolism; changing paradigms in neurodegeneration, 26-29 Mayıs, Trieste, İtalya.

- 7) Application of Neuronal Stem Cells and Mouse Models in Neuroscience Workshop, 2-5 Ekim 2013, Zagreb Üniversitesi Beyin Araştırmaları Merkezi, Zagreb, Hırvatistan (Yarı Burslu, ICGEB tarafından desteklenmiştir).
- 8) Nöron Kültürü Kursu, 3-6 Şubat 2015, İstanbul Medipol Üniversitesi
- 9) 9th European Summer School-Advanced Proteomics. 2-8 Ağustos 2015, Brixen, İtalya.
- 10) Kalsiyum Sinyali, Hücre Kültürü, Patch-Clamp ve western Blot eğitimi, 24 Ağustos-4 Eylül 2015, 1. Uluslararası Beyin Okulu, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi

