

T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMPORAL LOB EPİLEPSİSİ OLAN BİREYLERDE VE  
KAİNİK ASİT İLE OLUŞTURULAN SIÇAN EPİLEPSİ  
MODELİNDE SİNAPTİK VEZİKÜL GLİKOPROTEİNİ 2  
(SV2) AİLESİ İZOFORMLARININ SEVİYELERİNİN  
BELİRLENMESİ VE YENİ BİR RADYOAKTİF TRACER  
OLARAK [<sup>3</sup>H]UCB-J'NİN KULLANILMASI

Burcu AZAK PAZARLAR

0000-0003-4199-1974

DOKTORA

DANIŞMAN: Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR

2022/İZMİR

T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEMPORAL LOB EPİLEPSİSİ OLAN BİREYLERDE VE  
KAİNİK ASİT İLE OLUŞTURULAN SIÇAN EPİLEPSİ  
MODELİNDE SİNAPTİK VEZİKÜL GLİKOPROTEİNİ 2  
(SV2) AİLESİ İZOFORMLARININ SEVİYELERİNİN  
BELİRLENMESİ VE YENİ BİR RADYOAKTİF TRACER  
OLARAK [<sup>3</sup>H]UCB-J'NİN KULLANILMASI**

**Burcu AZAK PAZARLAR**

**0000-0003-4199-1974**

**DOKTORA**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR**

**Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Yönetim birimi tarafından 2019-TDR-SABE-0002 numaralı proje ve  
TUBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı 2214 Yurt Dışı  
Doktora Sırası Araştırma Bursu ile desteklenmiştir.**

**2022/İZMİR**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/ 08/ 2022

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Eser Öz Oyar, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı

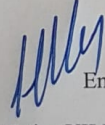
Üye: Prof. Dr. Ahmet Koyu, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Selen Akyol Bahçeci, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Nuran Ekerbiçer, İzmir Tınaztepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Gökhan Cesur, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

ONAY: Bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Hatice YILDIRIM SARI

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

o Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

25/07/2022



Burcu AZAK PAZARLAR



## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Prof. Dr. Eser Z OYAR danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip elebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

25/07/2022

Ad-Soyad

Burcu AZAK PAZARLAR



## TEŞEKKÜR

*Bu tez çalışmasını 2214-Doktora Sırası Yurt Dışı Araştırma Burs Programı ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na;*

*Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen; bana fazlasıyla destek olan, anlayışı, sabrı ve desteğiyle bu süreci başarı ile tamamlamamda her türlü fırsatı sunan danışmanım Sayın Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR'a;*

*Beni laboratuvarında misafir ederek, bu tezin şekillenmesi ve tamamlanmasında yadsınamaz katkısı olan, bilimsel gelişimimde önemli etkiler yaratan Sayın Prof. Dr. Jens Mikkelsen'e;*

*Birlikte çalıştığım; aynı odayı paylaştığım ve aynı mesleği icra ettiğim için kendimi şanslı hissettiğim; bana tüm bildiklerini cömertçe öğreten, gerektiğinde benimle laboratuvarında sabahlayan, gözüm kapalı her işimi teslim edebildiğim ve en yorgun en enerjisiz olduğumuz anlarda dahi sonsuz anlayış, sabır ve disiplinle sorunlarımı çözmeye çalışan, biricik dostum Arş. Gör. Cansu Bilister Eğilmez'e;*

*Bu tez'de araştırılmak üzere dokularının alınması ve incelenmesine izin veren bilim destekçisi hastalara, Prof. Dr. Lars Pinborg ve Jesper Bo'ya;*

*Bilgi birikimlerinden faydalandığım İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziyojji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr Ahmet KOYU ve Sayın Doç. Dr Alper Erdoğan'a;*

*Ayrıca, elimi her uzattığımda yardımlarını esirgemediği ve her türlü teknik ve sosyal desteği karşılıksız sağladığı için İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi personeli Özge Kartal'a;*

*Herşeyden önemlisi epilepsinin anlaşılabilmesi adına önemli bilgiler sağlayan bu tezin gerçekleşebilmesi için hayatını veren hayvanlara;*

*Radyokimya alanında sağladığı bilgilerin karşılığında hayatını kanser olarak kaybeden öncü bilim kadını Marie Curie'ye;*

*Kendileri de en az benim kadar öğrenme meraklısı olan, benim için tüm sınırlarını zorlayan; gece gündüz benimle çalışan, her zaman farklı bakış açılarıyla problemlerimi çözen, ayrıca bilgi birikimi ve el becerileri ile laboratuvarında her türlü desteği sağlayan kız kardeşlerim Cansu Azak ve Arş. Gör. Gizem Çizmeci'ye;*

*Bilimsel bakış açısı ve çalışma disiplinini her zaman imrenerek örnek aldığım; beni herkesten daha çok eleştiren ve bu sayede gerek bu tezin gerek giriştiğim her işin başarısının en önemli sebeplerinden biri olan biricik eşim Sercan'a;*

*Tutkularımın peşinden sabır ve liyakatle gitmeyi, adalet duygusunu ve hak yememeyi öğreten; her sabah şikâyet etmeden işe koyulan ve hala daha her gün üreterek, emek vererek çalışmanın ne denli kutsal olduğunu gösteren kıymetli annem ve babam'a*

*Gönülden bir teşekkürü bir borç bilir; önlerinde sonsuz minnetle eğilirim.*

## ÖZET

Sinaptik vezikül glikoproteini 2A (SV2A), presinaptik vezikülde lokalize olan, levetirasetamı bağlayan ve muhtemelen hipokampusta inhibitörük nörotransmisyonu düzenleyen bir transmembran proteindir. SV2A bir epileptik ilaç hedefidir ve muhtemelen sinaptik yoğunluğun bir *in vitro* biyobelirteçidir. Levetirasetamın SV2A'da bağlandığı bölgeye yüksek afinite ile bağlanan yeni bir radyo-izleyici, [<sup>11</sup>C]UCB-J, *in vivo* görüntüleme için kullanılmıştır. Bu nedenle, epileptogenez sırasında presinaptik plastisiteyi incelemek için ilgi çekici bir fırsat olduğu düşünülmektedir. [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin sıçan ve insan korteksindeki bağlanma özellikleri, bu tezde reseptör otoradyografisi ile araştırılmıştır. Tekrarlanan doygunluk deneyleri, sıçanlar ve insanlar arasında K<sub>D</sub> değerlerinin benzer olduğunu ortaya koymuştur ve bu sonuç *in vivo* deneysel verilerin klinikte insanlara çevrilebileceğini göstermektedir. Sıçan ve insan korteksindeki yer değiştirme deneylerimiz, brivarasetam ve levetirasetamın [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin bağlanmasını inhibe etme konusunda güçlü bir potansiyele sahip olduğunu gösterdi ve böylelikle [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin SV2A proteinine özgü olduğunu göstermektedir.

Epileptogenez sırasında presinaptik plastisitenin bir belirteci olarak [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasının potansiyelini değerlendirmek için, sistemik ve lokal kainik asit uygulaması ile indüklenen status epileptikuslu sıçanların beyin bölgelerinde [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin SV2A'ya bağlanmasındaki değişiklikleri zamana bağlı olarak inceledik. Başlangıçtaki status epileptikustan sonra farklı zaman noktalarında beyin dokularını örnekledik. Her iki modelde de akut fazlarda birçok beyin bölgesinde [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasında ani ve önemli bir azalma gözlemlendi. Bağlanmadaki azalmalar 1-10 gün içinde meydana geldi ve azalmanın pike yaptığı zaman noktası modeller arasında biraz farklıydı. İlginç bir şekilde, sistemik modelde, çoğu alanda tedaviden 30-90 gün sonra bağlanma seviyesinde tam restorasyon gözlemlendi ve bu muhtemelen nöronal yeniden yapılanmayı yansıtmaktadır. Ancak lokal enjeksiyondan sonra hipokampus, temporal ve piriform korteksdeki bağlanma bazal seviyelere geri dönemedi. Zamana bağlı bağlanma profili lokal modelde ipsilateral ve kontralateral bölgelerde ayrıca bir lateralizasyon gösterdi. Ayrıca, SRS başlangıç zamanı ile SV2A seviyesi arasında bir korelasyon olmadığı da gözlemlendi.

SV2 ailesi, SV2A, SV2B ve SV2C olarak adlandırılan üç izoformu içerir. Bu proteinler ayrıca, SV2A'nın bir epileptik ilaç hedefi ve bir sinaptik yoğunluk biyobelirteç olarak önerilmesinden sonra, son yıllarda artan bir ilgi görmeye başlamıştır. Şimdiye kadar kemirgenlerdeki ve insan beynindeki anatomik dağılımları hakkında kısıtlı da olsa bir bilgiye sahibiz. Bununla birlikte, TLE hastalarının korteksindeki SV2 genlerinin spesifik ekspresyon paternleri ve ekspresyonlarının epilepsideki klinik sonuçlardan nasıl etkilendiği halen tartışılmaktadır. Bunu detaylandırmak için eş zamanlı kantitatif PCR deneyleri yaptık ve klinik veriler ile SV2 ifadelerinin seviyesi arasındaki olası ilişkiyi analiz ettik. Ancak; yaş, nöbet sıklığı, epilepsi süresi ve SV2 gen ekspresyonu arasında ilişki olmadığını gösterdik. Levetiracetam ile tedavi edilen ve diğer AED'lerle tedavi edilen hastalar arasında da SV2 ekspresyon paternlerinde hiçbir fark görülmedi ve cinsiyetinde ifade düzeylerini etkilemediği de ortaya konuldu.

Bu veriler nöbetlerden sonra presinaptik SV2A miktarındaki değişiklikleri göstermektedir ve SV2A'nın spontan nöbetleri ortaya çıkarmada ve/veya epileptogenez için bir biyobelirteç olmada önemi olduğunu göstermektedir. [<sup>3</sup>H]UCB-J gibi yeni radyo-izleyiciler kullanılarak SV2A bağlanması, epileptogenez sırasında presinaptik plastisiteyi saptamak için güvenilir bir yöntemdir ve daha genel olarak sinaptik plastisiteyi göstermek için kullanılması muhtemeldir.

## ABSTRACT

Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) is a transmembrane protein localized in the presynaptic vesicle, that binds levetiracetam and probably regulates inhibitory neurotransmission in the hippocampus. SV2A is an epileptic drug target and likely a biomarker of synaptic density. A novel radiotracer, [<sup>11</sup>C]UCB-J, that binds to the levetiracetam site with high affinity is used for in vivo imaging, thus representing an attractive opportunity to study presynaptic plasticity during epileptogenesis. The binding characteristics of [<sup>3</sup>H]UCB-J in rat and human cortex was investigated by in vitro receptor autoradiography. Repeated saturation experiments revealed  $K_D$  values are similar between rats and humans showing in vivo experimental results can be translated to humans in the clinic. Displacement experiments in rat and human cortex showed that brivaracetam and levetiracetam have a strong potential to inhibit the binding of [<sup>3</sup>H]UCB-J revealing [<sup>3</sup>H]UCB-J is specific to SV2A protein.

To evaluate the potential of [<sup>3</sup>H]UCB-J binding as a marker of presynaptic plasticity, we examined changes in [<sup>3</sup>H]UCB-J binding to SV2A over time in the brain regions of rats with status epilepticus induced by systemic and local kainic acid. Brain tissues were sampled at different time points after the initial status epilepticus. In both models, a decrease in [<sup>3</sup>H]UCB-J binding was observed in several brain areas in the acute phases. Reductions in binding occurred within 1-10 days, and the peak was slightly different between models. Interestingly, in the systemic model, full restoration in the binding level 30-90 days after the treatment in most areas probably reflects neuronal reorganization. However, after the local injection, the binding in the hippocampus, and temporal and piriform cortices did not return to basal levels. The time-course profile also displayed lateralization in the local model. The results also showed that there was no correlation between SRS onset time and the SV2A level of the rat.

Further SV2 family includes three isoforms called SV2A, SV2B, and SV2C. These proteins also have started to receive increasing attention in recent years, after SV2A was proposed as an epileptic drug target and a synaptic density biomarker. So far, we gained insight into their anatomical distributions in rodents and human brains.

However, specific expression patterns of SV2 genes in the cortex of TLE patients and how their expressions are affected by clinical outcomes in epilepsy are still under debate in the human brain. To elaborate on this, we performed quantitative PCR and analyzed the possible relationship between clinical data and the level of SV2 expressions. However; we found that there is no relationship between age, seizure frequency, duration of epilepsy, and SV2 gene expression. No difference was found in SV2 expression patterns between Levetiracetam-treated and other AEDs-treated patients. Sex does not influence expressions.

These data demonstrate changes in the amount of presynaptic SV2A after seizures and suggest that SV2A has importance in eliciting spontaneous seizures and/or being a biomarker for epileptogenesis. SV2A binding using novel radiotracers such as [<sup>3</sup>H]UCB-J is a reliable method to detect presynaptic plasticity during epileptogenesis and is likely to be used for demonstrating synaptic plasticity more generally.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	iii
ETİK BEYAN.....	v
ABSTRACT.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xviii
GİRİŞ.....	1
<b>1. GENEL BİLGİ.....</b>	<b>6</b>
1.1. <i>Epilepsi</i> .....	6
1.1.1.    Tanım.....	6
1.1.2.    Sınıflandırma.....	7
1.1.3.    Epilepsinin Etiyolojisi.....	9
1.2. <i>Epileptogenezin Patobiyolojisi</i> .....	9
1.3. <i>In-vivo Temporal Lob Epilepsi Modeli Olarak Kainik Asit (KA)</i> .....	11
1.3.1.    KA.....	11
1.3.2.    Kainik Asit Reseptörleri (KAR).....	11
1.4. <i>SV2A ve Epilepsi Patolojisindeki Yeri</i> .....	13
1.4.1.    SV2A.....	13
1.4.2.    SV2A ve Epilepsi Bağlantısı.....	15
1.5. <i>Güncel Tanı ve Tedavi Yaklaşımları</i> .....	16
1.6. <i>SV2A'yı Hedefleyen Levetiracetam'ın Etkinliği ve Tedavideki Rolü</i> .....	17
1.7. <i>SV2 Glikoprotein Ailesinin Diğer Üyeleri</i> .....	19
1.8. <i>Sinaptik Plastisitenin Görüntülenmesi ve UCB Radyoligandları</i> .....	22
1.9. <i>Reseptör Ligand Bağlanma DeneYleri ve Otoradyografi</i> .....	28
1.9.1.    Otoradyografi.....	28
1.9.2.    Reseptör Bağlanma Teorisi ve Bir Radyoligandın Karakterizasyonu.....	29
1.9.3.    Hedef Tanımlama ve Radyokimya.....	35
<b>2. GEREÇ-YÖNTEM.....</b>	<b>36</b>
2.1. <i>in-vivo Temporal Lob Epilepsi Modeli</i> .....	36
2.1.1.    Deneysel Dizayn 1: Sistemik KA Uygulaması ile Epilepsi Modeli Oluşturulması.....	39
2.1.2.    Deneysel Dizayn 2: Lokal KA Uygulaması ile Epilepsi Modeli Oluşturulması.....	40
2.1.3.    Nöbet (konvulsiyon) derecelerinin ve sıklığının <i>Racine</i> skalasına göre değerlendirilmesi.....	45
2.1.4.    Kesit Alma Aşamaları.....	47
2.1.5.    Hedef Bölgeler (ROI).....	49



2.1.6.	Radyoligand Bağlama Çalışması.....	50
2.2.	<i>Temporal Lob Epilepsisi Hastalarından Elde Edilen Doku Üzerine Analizler</i> .....	56
2.2.1.	Biyopsilerin Toplanması ve Hasta Onamı.....	56
2.2.2.	Temporal Lobe Epilepsisi'nde Lobektomi ve Cerrahi Prosedür .....	58
2.2.3.	Hastalara Ait Veriler.....	58
2.2.4.	<i>İn-vitro</i> Otoradyografi İle İnsan Beyin Dokusunda UCB-J Bağlanma Karakterizasyonları (K <sub>i</sub> , IC <sub>50</sub> , K <sub>D</sub> ve Bmax Değerlerinin Belirlenmesi) .....	63
2.2.5.	Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile SV2 Gen Ailesine Ait Üyelerin Gen İfade Düzeylerinin Saptanması.....	63
2.3.	<i>Veri Analizi ve İstatistik</i> .....	70
2.3.1.	Radyoligand Bağlanma Analizleri İçin .....	70
2.3.2.	Gen İfadesi Analizleri İçin.....	70
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>72</b>
3.1.	<i>[<sup>3</sup>H]UCB-J'nin Sıçan Beyin Dokusundaki Bağlanma Karakteristikleri</i> .....	72
3.1.1.	Beyin Bölgelerine Ait K <sub>D</sub> ve Bmax Değerleri.....	72
3.1.2.	Levetirasetam, Brivarasetam ve UCB-J için Sıçan Korteksindeki IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> Değerleri.....	74
3.2.	<i>Sıçan Temporal Lob Epilepsi Modelinden Elde Edilen Bulgular</i> .....	76
3.2.1.	Hayvanlardaki Davranışsal Sonuçlar <i>Racine</i> Bulguları ve Spontan Tekrarlayan Nöbetlerin Ortaya Çıkışı .....	76
3.2.2.	Sistemik KA ile Oluşturulan Epilepsi Modelinde Bağlanmanın Zamansal Ve Uzaysal Değişimi	76
3.2.3.	Lokal KA ile Oluşturulan Epilepsi Modelinde Bağlanmanın Zamansal ve Uzaysal Değişimi	81
3.2.4.	SRS Ortaya Çıkış Zamanı ile Bağlanma Düzeyinin İlişkilendirilmesi.....	88
3.3.	<i>İnsan Dokusundan Elde Edilen Veriler</i> .....	92
3.3.1.	<i>[<sup>3</sup>H]UCB-J'nin İnsan Beyin Dokusundaki Bağlanma Karakteristikleri</i> .....	92
3.3.2.	Temporal Lob Epilepsisi Hastalarında SV2A, SV2B, SV2C Genlerinin İfade Düzeyi ve Klinik Veriler ile İlişkisi.....	96
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>103</b>
4.1.	<i>[<sup>3</sup>H]UCB-J Bağlanmasının Hem İnsan Dokusunda Hem De Sıçan Dokusundaki Karakterizasyonuna Dair Tartışma</i> .....	103
4.2.	<i>İn Vivo Çalışmalarımızın Sonuçlarına Dair Tartışma</i> .....	105
4.3.	<i>TLE Hastalarının Biyopsi Materyallerinden Elde Edilen Bulgulara Dayalı Tartışma</i> .....	112
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>117</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....		<b>120</b>
<b>EKLER</b> .....		<b>131</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....		<b>132</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AED	Anti-Epileptik İlaç
AP	Antero-Posterior
Bmax	Maksimum Bağlanma Düzeyi
BPND	Bağlanma Potansiyeli
BRIVA	Brivasetam
BSA	Sığır Serum Albumini
CBZ	Karbamazepin
cDNA	Komplementer DNA
CLB	Klobazam
Cq	Döngünün Geçildiği Nokta
Ct	Eşik Döngü
dCA1	Dorsal Cornu Ammonis 1
dCA3	Dorsal Cornu Ammonis 3
DG	Dentat Girus
dps	Nöbet Sonrası Geçen Gün Sayısı
dsDNA	Çift Zincirli DNA
DV	Dorso-Ventral
E	Erkek
EEG	Elektroensefalografi
FCD	Fokal Kortikal Displazi
FDA	Food And Drug Administration
FDG	Florodeoksiglukoz
FEN	Fenitoin
FIAS	Fokal Bozulmuş Farkındalık Nöbeti
fmol	Femto mol
HS	Hipokampal Skleroz
IC <sub>50</sub>	Inhibisyon sabiti (%50)
ILAE	International League Against Epilepsy
i.c.v	İntraserebroventriküler
İHP	İntrahipokampal
İP	İntraperitoneal
K	Kadın
KA	Kainik Asit
KAR	Kainik Asit Reseptörü
K <sub>D</sub>	Ligandın hedefe afinitesi
K <sub>i</sub>	Ligandın Hedeften Ayrışma Sabiti
KO	Knock Out
LAC	Lakozamid
LEV	Levetirasetam
LTG	Lamotrigin
MFS	Major Fasilitatör Super Protein Ailesi
ML	Medio-Lateral
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Messenger RNA

MTS	Medial (Mesial) Temporal Lob Sklerozu
nCi	nanoCurie
NTC	Kalıp DNA Örneği İçermeyen Kontrol
OXC	Okskarbazepin
PER	Perampanel
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PN	Pregabalin
ROI	Region Of Interest (Ölçümü Yapılan Bölge)
RT-qPCR	Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	Standart Sapma
SRS	Spontan Rekürren Nöbet
ssDNA	Tek Zincirli DNA
SV2	Sinaptik Vezikül Glikoproteini 2
SV2A	Sinaptik Vezikül Glikoproteini 2 A
SV2B	Sinaptik Vezikül Glikoproteini 2 B
SV2C	Sinaptik Vezikül Glikoproteini 2 C
TE	Tissue Equivalent
TLE	Temporal Lob Epilepsisi
TM	Trans Membran
TPM	Topiramet
vCA1	Ventral Cornu Ammonis 1
vCA3	Ventral Cornu Ammonis 3
VPA	Valproat
ZNS	Zonesamid

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1:</b> Epileptogenezis (40) .....	11
<b>Şekil 2:</b> SV2A'nın membran yerleşiminin ve aminoasit diziliminin şematik gösterimi .....	13
<b>Şekil 3:</b> SV2A'ya biçilen roller (57) .....	15
<b>Şekil 4:</b> Klinik olarak onaylı ve kullanımda olan anti-epileptik ilaçların etki mekanizmaları (2) .....	17
<b>Şekil 5:</b> LEV ve SV2A arasındaki potansiyel bağlanma bölgeleri. ....	18
<b>Şekil 6:</b> Saturasyon bağlanma eğrisi.....	31
<b>Şekil 7:</b> Otoradyografi basamakları.....	34
<b>Şekil 8:</b> Sistemik deneysel tasarım.....	40
<b>Şekil 9:</b> Kafatasında Bregma ve Lambda gibi referans noktaların gösterilmesi .....	41
<b>Şekil 10:</b> Stereotaksik enjeksiyon.....	43
<b>Şekil 11:</b> Hayvanlarda cerrahi girişim prosedürleri.....	44
<b>Şekil 12:</b> Lokal deneysel tasarım.....	45
<b>Şekil 13:</b> Enjeksiyon bölgesinin doğrulanması .....	45
<b>Şekil 14:</b> Video görüntüleme ve davranışsal değerlendirme sistemi .....	46
<b>Şekil 15:</b> KA ile tedavi edilen sıçanlarda nöbet derecelerinin gösterilmesi .....	47
<b>Şekil 16:</b> Kesit alma aşamaları .....	48
<b>Şekil 17:</b> Ölçüm yapılan ROI'lerin atlas üzerinde sınırlarının gösterilmesi.....	50
<b>Şekil 18:</b> İnsan, domuz ve sıçan bölümlerinin görüntüsü .....	52
<b>Şekil 19:</b> Sıçan beyin kesitlerinde radyoligandın inkübasyon süresinin test edilmesi.....	53
<b>Şekil 20:</b> Bir TLE hastasına ait rezekte doku örneği .....	57
<b>Şekil 21:</b> Temporal lobektomi aşamaları ve anterior temporal lobektomi ve amigdalo-hippokampektominin şematize özeti (124) .....	58
<b>Şekil 22:</b> Bağlı floresan ve döngü sayısı .....	64
<b>Şekil 23:</b> [ <sup>3</sup> H]UCB-J'nin doyumluk bağlama çalışmaları için temsili otoradyografik görüntüler.....	72
<b>Şekil 24:</b> [ <sup>3</sup> H]UCB-J'nin Sprague Dawley sıçan beyinde doyumluk bağlama çalışmalarından türetilen bölgesel spesifik bağlanma eğrileri.....	73
<b>Şekil 25:</b> [ <sup>3</sup> H]UCB-J Sıçan Korteksinde levetirasetam, brivaracetam ve soğuk UCB-J ile inhibisyon.....	75
<b>Şekil 26:</b> Sistemik KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında hipokampüste [ <sup>3</sup> H]UCB-J bağlanma paternini gösteren otoradyogramlar ve kantitatif bağlanma düzeyini gösteren bar grafikleri .....	78
<b>Şekil 27:</b> Sistemik KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında farklı kortikal alanlarda [ <sup>3</sup> H]UCB-J bağlanma paternini gösteren bar grafikleri.....	79
<b>Şekil 28:</b> Sistemik KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında subkortikal alanlarda [ <sup>3</sup> H]UCB-J bağlanma paternini gösteren otoradyogramlar ve kantitatif bağlanma düzeyini gösteren bar grafikleri .....	80
<b>Şekil 29:</b> Lokal KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında hipokampüste [ <sup>3</sup> H]UCB-J bağlanma paternini gösteren otoradyogramlar ve kantitatif bağlanma düzeyini gösteren bar grafikleri .....	83

<b>Şekil 30:</b> Dorsal hipokampusun alt hücrese gruplarındaki bağlanmaların daha detaylı otoradyogramlarla gösterilmesi.....	84
<b>Şekil 31:</b> Ventral hipokampüsteki bağlanma paterninin representatif otoradyogramlarla daha detaylı gösterilmesi.....	84
<b>Şekil 32:</b> Lokal KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında farklı kortikal alanlarda [ <sup>3</sup> H]UCB-J bağlanma paternini gösteren bar grafikleri.....	85
<b>Şekil 33:</b> Lokal KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında subkortikal alanlarda [ <sup>3</sup> H]UCB-J bağlanma paternini gösteren otoradyogramlar ve kantitatif bağlanma düzeyini gösteren bar grafikleri.....	87
<b>Şekil 34:</b> Beynin en büyük beyaz cevheri olan korpus kallozumda bağlanma paterninin zamansal olarak gösterimi, kesitler bregmaya -0.9 mm mesafedendir. .	88
<b>Şekil 35:</b> Lokal KA uygulamasında hayvanlarda SRS'lerin ortaya çıkma zamanı ile sahip oldukları SV2A düzeyi arasındaki ilişki.....	90
<b>Şekil 36:</b> Sistemik uygulamasında hayvanlarda SRS'lerin ortaya çıkma zamanı ile sahip oldukları SV2A düzeyi arasındaki ilişki.....	91
<b>Şekil 37:</b> Saturasyon grafiği.....	92
<b>Şekil 38:</b> İnsan korteksinde Levetiracetam, Brivaracetam ve soğuk UCB-J ile [ <sup>3</sup> H]UCB-J inhibisyon deneyleri .....	94
<b>Şekil 39:</b> İnsan ve sıçan korteks bağlanma karakteristiğinin temsili olarak karşılaştırılması .....	95
<b>Şekil 40:</b> SV2A, SV2B ve SV2C gen ifadesinin 22 hastadaki düzeyinin ve dağılımının gösterimi .....	97
<b>Şekil 41:</b> Kadın ve erkek bireylerdeki SV2 gen ifade düzeyinin karşılaştırılması .....	98
<b>Şekil 42:</b> Yaş ve SV2 izoform ifade düzeyleri arasındaki ilişki .....	99
<b>Şekil 43:</b> Hastalığın süresi ile kişideki SV2 izoform düzeyi arasındaki ilişki .....	100
<b>Şekil 44:</b> Nöbet sıklığı (frekansı) ile SV2 izoformlarının seviyeleri arasındaki ilişki .	101
<b>Şekil 45:</b> Farklı ilaç rejimleri uygulanan hastalar ile Levetiracetam uygulanan hastaların SV2 düzeyleri arasındaki fark .....	102
<b>Şekil 46:</b> Değişen SV2A yoğunluğu neyi temsil eder? .....	118

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> Nöbet Tiplerinin Sınıflandırılması.....	8
<b>Tablo 2:</b> SV2 glikoprotein ailesinin genel özellikleri (Bu tablo derlenmiştir (9,11,12))	21
<b>Tablo 3:</b> SV2A, SV2B ve SV2C'nin fonksiyonlarının özeti (Rossi ve arkadaşları 2022'den Türkçeleştirilmiştir) (57).....	22
<b>Tablo 4:</b> Beyinde sinapsların görüntülenmesinde kullanılan temel metodların özeti (Serrano ve arkadaşları 2022'den Türkçeleştirilmiştir) (87).....	24
<b>Tablo 5:</b> Sinaptik yoğunluğun ölçümünde belirteç olarak kullanılan pre- ve post-sinaptik proteinlerin özeti (Serrano ve arkadaşları 2022'den Türkçeleştirilmiştir) (87) .....	26
<b>Tablo 6:</b> Ölçüm yapılan ROI'lerin tablo halinde verilmesi.....	49
<b>Tablo 7:</b> TLE hastalarına ait klinik veriler .....	62
<b>Tablo 8:</b> SV2A, SV2B, SV2C ve GAPDH genlerine atı primerlerin özellikleri.....	65
<b>Tablo 9:</b> Sprague Dawley sıçan beyininin çeşitli beyin bölgelerinde [3H]UCB-J'nin bağlanma özellikleri .....	74
<b>Tablo 10:</b> Doygunluk ve inhibisyon deneyleri için bağlanma özelliklerine genel bakış .....	75
<b>Tablo 11:</b> Doygunluk ve inhibisyon deneyleri için bağlanma özelliklerine genel bakış .....	93

## GİRİŞ

Temporal lob epilepsisi (TLE), temporal lobun eksitasyon ve inhibisyon ağları arasındaki dengesizlikten kaynaklanan tekrarlayan spontan nöbetlerin ortaya çıkması ile karakterize yaygın bir nörolojik bozukluktur (1). TLE sadece semptomatik tedavisi olan kontrolü zor ve önceden tahmin edilerek önlenmesi mümkün olmayan bir hastalıktır (2). Birden fazla epilepsi tipi ve sınıflandırması olmakla birlikte, özellikle TLE erişkinlerde en sık görülen tip ve çoğunlukla ilaca dirençli bir epilepsi türüdür. Güncel olarak ilaca dirençli olan epilepsi hastalarından en etkili tedavi yaklaşımı epileptik odağın cerrahi rezeksiyonudur (3). Bununla birlikte, ne yazık ki temporal lob rezeksiyonu uygulanan hastaların ~%30'u hala daha nöbet geçirmeye devam etmektedir (4). Etkili tedavi ve tanı yaklaşımları oluşturmak veya cerrahinin etkinliğini artırmak için TLE'nin biyolojik sebeplerini ortaya çıkarmak büyük önem taşımaktadır.

Epileptogenez, normal işleyen bir beynin, provoke edilmemiş, tekrarlayan nöbetleri tetikleyen bir beyne veya doku parçasına dönüşmesi sürecidir (5). Bu dönüşüm süreci, membran proteinlerinin düzensizliği ve/veya disfonksiyonu, iyon kanallarının veya reseptörlerin azlığı, çokluğu veya işleyişindeki hatalar, belirli bir sinir ağında nöron ölümü, sinir dokuda inflamasyon, nöron ölümü sonrası meydana gelen hücrel boşluğu dolduracak şekilde oluşan gliosis ve anormal şekilde gelişen aksonal ve dendritik filizlenme, sinapsların uygunsuz şekilde yeniden düzenlenmesi gibi farklı biyolojik süreçleri içerir (5–7). Bu tür hücrel değişiklikler sonunda hem GABAerjik internöron kaybı gibi devre düzeyinde değişikliklere hem de tekrarlayan uyarıcı, eksitator sinaptik bağlantıların oluşmasına yol açar (8).

Sinaptik vezikül glikoprotein 2 (SV2) protein ailesi SV2A (kromozom 1), SV2B (kromozom 15) ve SV2C (kromozom 5) olmak üzere üç farklı gen tarafından kodlanan, yapısal olarak %60 dizi benzerliğine sahip 3 protein üyesinden oluşur ve SV2 protein ailesi “Major Facilitator Super Family” olarak adlandırılan bir üst protein süper-ailesine dahildir (9). SV2 proteinleri esas olarak presinaptik veziküllerin membranında lokalizedir (10) ve sinaptik fonksiyonda henüz rollerinin sınırları netleştirilmemiş olsa da önemli bir rol oynadığı kabul edilir (2,11).

SV2A, beyinde hemen her yerde eksprese edilen sinaptik vezikül glikoproteinidir (12). İmmünohistokimya ve westernblot teknikleri ile yapılan çalışmalar, TLE hastalarının korteks ve hipokampusunda SV2A protein düzeylerinin azaldığını desteklemektedir (13,14).

İzoformlar arasında SV2A, antiepileptik bir ilaç olan levetirasetam için bir bağlanma hedefi olduğundan büyük bir ilgi görmüştür (15). Son zamanlarda aynı protein, sinaptik dansite için bir biyobelirteç olarak çok daha fazla ilgi çekmiştir (16). SV2A proteinine bağlanarak radyoaktif ışına veren seçici Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) radyoligandları, psikiyatrik ve nörolojik hastalıklarda nöroplastisiteyi izlemek için kullanılmıştır (17–23).

TLE'deki anormal plastisiteyi, yani normal nöronal bağlantıların epileptik bir beyin oluşturacak şekilde anormal sinapslara dönüşümünün zamansal süreçteki değişikliklerini hala bilmiyoruz, bu nedenle sinaptik bir biyobelirteç olarak önerilen SV2A'nın epileptik bir beyinde zamansal ve uzaysal olarak izlenmesi, TLE'deki sinaptik kayıp ve sinaptik reorganizasyon aşamalarının takip edilmesi için değerli bir yaklaşım sağlayabilir. SV2A seviyesini takip etmek, görüntülemek ve ölçmek ve buna göre deneysel modellerde sinaptik kayıp ve yeni sinaptik bağlantıların ve ağların kurulmasındaki değişiklikleri izlemek için ilgili uygun araçlara, metodlara ve materyallere çok ihtiyacımız var.

[<sup>3</sup>H]UCB-J, yüksek afinite ve spesifikte özellikle SV2A proteinine bağlanan ve yarı nicel otoradyografi çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilen yeni ve güvenilir bir radyo ligandır. Birkaç UCB radyo ligandı özellikle epilepsi hastalarının pozitron emisyon tomografisi çalışmalarında kullanılmış ve epilepsi patolojisi ile ilişkili beyin bölgelerinde manyetik rezonans sonuçlarındaki yapısal anatomik değişimler yani skleroz bulguları ile de uyumlu olacak şekilde epilepsi hastalarında daha düşük SV2A seviyesi bulunmuştur ve daha düşük sinaptik yoğunluk ile UCB radyoliganlarının bağlanma seviyesi arasında ilişki kurulmuştur (19,20). SV2A'ya özgü radyoligandlarla yapılan önemli PET çalışmalarına rağmen, SV2'nin diğer izoformları ve bunların farklı ifadeleri hakkında çok az şey bilinmektedir.



Epilepsi tanısı bireylerde ilk nöbet görüldüğü zaman konulduğundan, bu hastalarda sürecin ne sebeple ve ne zaman başladığı ve epileptik odağın nasıl bir hücresel ve biyokimsiyal süreçle kazanıldığı insanlarda tespit edilememektedir. Bu durum epilepsi patolojisinin yani epileptogenezi tetikleyen süreçlerin ve bu süreçte beyinde nelerin ne kadar bir süre içerisinde geliştiğini anlamamız için zamansal olarak epileptogenez sürecinin izlenmesi gerekmektedir. Yani zamansal ve uzaysal olarak sinaptik kaybın ve yeniden yapılanma modelinin izlenmesinin patolojiyi anlayabilmek için esas olduğunu görülmektedir. Etik olgular çerçevesinde insan beyninden post mortem örnekleme dışında örnekleme yapamamak, sadece ilaca dirençli olup temporal lob cerrahisi geçiren hastalardan örnek toplayabilmek ve bu örneklerin patogenezin başındaki dokuyu temsil etmemesi ve sadece patogenez kazanıldıktan sonraki dokuyu temsil etmesi bu patolojinin tüm yönlerini taklit etmek adına deneysel TLE modellerini kullanmaya olan ihtiyaca daha fazla işaret etmektedir.

Kainik asidin (KA) hem sistemik hem de hipokampal uygulaması, temporal lob epilepsisinin güvenilen hayvan modelidir (24). KA, hipokampustaki GABAerjik internöronlarda hızlı ve şiddetli bir nöronal dejenerasyona neden olur ve hipokampusun KA ve glutamat reseptörlerince zengin olması sonucu bu eksitotoksin epileptojenik zonun (nöbet üreten bölge/ başlangıç bölgesi) hipokampus olduğu bir nöbet ve dolayısıyla TLE patolojisini taklit eder (25).

Genel bilimsel literatürden kazandığımız bilgi dağarcığımıza dayanarak ve SV2A'nın epilepsi patolojisindeki yerini aydınlatmaya çalışan bilgi birikime katkıda bulunmak için bu tez çalışması kapsamında üç farklı deneysel metodoloji planladık:

Birinci hedefimiz tritium işaretli UCB radyoligandının sıçan ve insan beyin dokusunda bağlanma karakteristiğinin farmakolojik olarak belirlenmesi ve metodolojinin optimize edilmesiydi. Bu amaçla bağlanma, saturasyon, yarışmalı inhibisyon gibi deneyler yaparak radyoligand dokuya spesifik olarak karakterize ettik. Radyoligandın deneylerde kullanılacak konsantrasyonunu, dokuya olan afinitesini ve sensitivitesini yani güvenilirliğini belirledik.

Birinci hedefimizi gerçekleştirdikten sonra bu tezin esas amacı olarak da adlandırabileceğimiz şekilde; epileptogenezin sürecini tüm yönleri ve detayları ile

taklit etmek için zamana dayalı bir deneysel tasarım oluşturmayı amaçladık. Sıçanlarda status epileptikus indüklemek için KA'nın hem sistemik hem de tek taraflı intrahipokampal enjeksiyon modellerini oluşturduk ve sinaps seviyesinin bir yansıması olabilecek SV2A protein seviyesindeki zamansal değişiklikleri ölçerek epileptogenez sürecinde sinaps kaybı ve kazanımını görüntülemeyi hedefledik, diğer alt bir amaç olarak KA'nın farklı enjeksiyon yollarının bu değişimler üzerindeki farklı etkilerini karşılaştırmayı amaçladık. Ancak en temelde, zamansal deney tasarımıımızda epileptogenezin farklı aşamalarında [<sup>3</sup>H]UCB-J radyoligandının bağlanma profilini izledik. Buradaki hedefimiz temel bir bilgiye katkıda bulunabilecek iki farklı *in-vivo* KA epilepsi modeli ile temsil edilen tüm epileptogenez süreci boyunca sinaptik yoğunluk değişikliklerini izlemek için [<sup>3</sup>H]UCB-J otoradyografisinin klinik öncesi kullanım için güçlü bir potansiyele sahip olup olmadığını değerlendirmektir. Böylece klinikte PET görüntüleme için kullanılan UCB-J radyoligandlarını onaylayacak prelinik, *ex vivo* ve *in vitro* deneylerde kullanılabilir bir yöntemsel model ortaya konmuş ve doğrulanmış olacaktır.

Diğer bir amacımız ise translasyonel olarak *in vivo* verilerimizi klinikle bağdaştırmaktır. Bu nedenle cerrahi ile ilaca dirençli TLE hastalarından rezekte edilen temporal neokorteks dokusunu kullanmayı ve hem [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasını hem de gen ekspresyon seviyelerini değerlendirmeyi amaçladık. Hastaya ait epilepsi süresi, nöbet sıklığı, yaş, cinsiyet ve antiepileptik ilaç tedavisinin türü gibi klinik verilerle ilgili ekspresyon trendlerindeki değişiklikleri göstermeyi amaçladık. Böylelikle prelinik olarak elde ettiğimiz verileri insan dokusundan elde ettiğimiz verilerle karşılaştırmayı planladık.

Bu tez yukarıda sıralanan amaçları gerçekleştirmek doğrultusunda yürütülmüştür. Tezin gerçekleştirilebilmesi için Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR yürütücülüğünde bir BAP projesinden destek alınmıştır. Hayvan deneyleri, Ege Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde Araştırma Görevlisi ve Veteriner Hekim Cansu Bilister Eğilmez'in yadsınamaz katkıları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dokulara ait tüm analizler Prof. Dr. Jens Mikkelsen'in danışmanlığında ve Dr. Mikkelsen'in proje fonlarıyla (Elsass Fonden, Rigshospitalet Internal Fund) Neurobiology Research Unit, University of Copenhagen kurumunda

gerçekleştirilmiş, Prof. Dr. Eser Z OYAR'ın danışmanlığında ise İzmir Katip elebi niversitesi'nde raporlanmıştır. Bu tez kapsamında üretilen ve elinizdeki rapora yansıtılan tüm veri ve yorumların insanlığa ve bilime faydalı olması temenni ederim.

## 1. GENEL BİLGİ

### 1.1. Epilepsi

#### 1.1.1. Tanım

Epilepsi genel olarak tekrarlayan spontan nöronal aktivite ile karakterize kronik nörolojik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Ancak epilepsiyi basit ve tek bir hastalık veya semptom olarak açıklamak pek mümkün değildir. Birçok farklı nedenden kaynaklanabilen, beynin veya nöronal ağların fonksiyon bozukluğunu yansıtan süreçleri kapsamaktadır (26). Dünya çapında her yaştan yaklaşık 50 milyon insanı ve onların ailelerini de etkileyen hem sosyal hem de ekonomik olarak ciddi sonuçlar doğuran medikal bir durumdur (27).

Nöbet (*seizure*); kelimesinin temeli Yunancadır ve ele geçirmek anlamına gelmektedir. Terminolojik olarak ise nöbet ani ve şiddetli olay olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla epilepsi hastalığı için ani ve şiddetli meydana gelen, bireyin hem bilişsel hem motor süreçlerinin ele geçirilmişçesine kendi kontrolü dışında işleme durumu epileptik nöbet şeklinde adlandırabiliriz (26). Nöbet ve epilepsi bir arada çok kullanılan terimler olmasına ve çok karıştırılmasına rağmen aralarında fark bulunmaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi epilepsi tekrarlayan ve spontan olarak görülen nöbetlerdir. Epileptik nöbet ise, nöronların aşırı ve hipersenkron deşarjının neden olduğu paroksizmal bir değişikliktir (28). Tek bir nöbet geçirmiş bir kişi için, nöbetin provoke edilmiş olması ihtimali ve bir daha nöbet geçirmeme olasılığı göz önüne alındığında bu kişinin epilepsi hastası olduğu söylenememektedir (29).

Epileptik nöbetin özelliklerine bağlı olarak da farklı tanımlamalar yapılmaktadır. Bu özelliklerden ilki nöbetin başlangıç ve bitişinin şeklidir. Bu özelliklere göre tanımlamalarda status epileptikus karşımıza çıkmaktadır. Status epileptikus uzun süreli ve/veya tekrarlayan nöbetlerdir ve klinik semptomlar ile EEG analizi tanısına izin vermektedir. Bir diğer tanımlama kriteri klinik belirtilerdir ve duysal, motor ve otonomik alanlardan hangisinin etkilendiğine göre bir sınıflandırma yapılır. Hastaların kullandıkları ilaçlara bağlı olarak çeşitli semptomlar görülmektedir ve tanımlar bu belirtileri de kapsamaktadır. Saptanması en zor özellik ise nöronlarda meydana gelen anormal senkronizasyondur. Bunun için EEG kaydı alınması ve

kayıtlarda epileptik deşarj kalıplarının görölmesi gerekmektedir (26). Tüm bu tanımlamaların ışığında nöbetler sınıflandırılarak bilimsel olarak kabul edilen terminolojik bir konsensus oluşturulmuştur (30).

### **1.1.2. Sınıflandırma**

Nöbet ve epilepsilere ait güncel sınıflandırma 2017 yılında Uluslararası Epilepsiye Karşı Lig (ILAE) tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırma genel olarak dört temel bileşenden oluşmaktadır. Her bir kategori de kendi içerisinde belirli kriterleri içermektedir.

Bunlar;

- ⇒ Nöbetler
- ⇒ Epilepsiler
- ⇒ Epilepsi sendromları
- ⇒ Etiyolojidir (31)

Nöbetler; nöbetin beyindeki orjini, nöbet sırasındaki farkındalık derecesi ve vücut hareketinin düzeyi gibi özellikleri göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır. Nöbetin beyindeki orjini özelliğine göre nöbetler fokal veya genelarize olabilmektedir. Diğer bir özellik olan farkındalık derecesine göre ise nöbet sırasında farkındalığın kaybolması veya kaybolmaması şeklinde sınıflandırılırken, vücut hareketlerinin katılımına göre motor veya non-motor başlangıçlı olarak değerlendirilmektedir. Tüm bu özelliklerin ışığında temel model olarak aşağıdaki Tablo 1’de belirtildiği şekilde nöbetler sınıflandırılmaktadır.

<b>Fokal</b>	<b>Generalize</b>	<b>Bilinmeyen</b>
Farkındalık Kaybolmamış/ Farkındalık Kaybolmuş	Motor - Tonik-klonik - Diğer motor	Motor - Tonik-klonik - Diğer motor
Motor/Non-Motor Başlangıçlı	Non-motor - Absans	Non-motor
Fokalden Bilateral Tonik Klonik Nöbete Dönüşen		Sınıflandırılmamış

**Tablo 1:** Nöbet Tiplerinin Sınıflandırılması

Fokal nöbetler, serebral hemisferin belirli bir alanında patolojik nöronal aktivasyon sonucu oluşan geçici nöbetlerdir (32). Nöbet sırasında kişi çevresinde olup bitenlerin tam olarak farkındayken oluşan nöbetlere fokal-farkında nöbetler denir. Ancak çoğunlukla kişiler nöbet sırasında farkındalığını kaybederek bazı olayları hatırlamakta güçlük çekmektedir. Bu tür nöbetlere ise fokal-bozulmuş farkındalık nöbetleri (FIAS) denmektedir. Fokal nöbetlerle ilişkili en önemli terim “Aura” dır. Hastaların nöbetler gerçekleşmeden önce psşik bir önsezi gibi bu süreci hissetmesini kapsamaktadır. Bu his garip bir tat, koku, midelerinde yükselen bir dalgalanma veya kişiye göre değişen farklı şekillerde de ortaya çıkabilmektedir (30,33). Bunun yanı sıra fokal nöbetler tek bir odaktan çıktıktan sonra diğer serebral hemisfere de ilerleyebilmektedir (31).

Jeneralize nöbetler her iki hemisfere de yayılarak etkiyen nöbetlerdir. Genel olarak bu tip nöbetlerde farkındalığın kaybolmasından dolayı farkındalığa dair alt sınıflandırma yapılmamaktadır. Motor veya non-motor generalize nöbetler olarak alt sınıflara ayrılmaktadır. Motor nöbetler tonik-klonik, klonik, tonik, miyoklonik, miyoklonik-tonik-klonik, miyoklonik-atonik, atonik veya epileptik spazmları içerirken, motor olmayan nöbetler tipik veya atipik absans nöbetleri kapsamaktadır (9).

Başlangıcı bilinmeyen nöbetler ise ya uykuda ya da hastanın tek başına olduğu durumlarda ortaya çıkan dolayısı ile de tanımlama yapılamayan nöbetlerdir. Nöbetin özelliğinden ziyade başlangıç durumunun bilinmezliğine dair bir tanımlamadır (4).

Yeniden yapılandırılmış sınıflandırılmaya göre epilepsiler 4 ana kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; fokal, generalize, kombine generalize ve fokal/bilinmeyen şeklindedir. Nöbetlerde belirtildiği şekilde, fokal epilepsiler tek odaklı, bir hemisferle sınırlı nöbetlerdir ve klinik olarak da tespit edilebilir. Benzer şekilde generalize epilepsiler birçok nöbet tipinden oluşmaktadır. Kombine generalize ve fokal epilepsiler ise video-elektroensefalografi (EEG) ile tespit edilebilen ve genellikle bebek veya çocuklarda görülen bir durumdur. Belirtilen şekilde fokal veya generalize olarak kategorize edilemeyen nöbetlerde ise bilinmeyen olarak adlandırılmaktadır (4).

Üçüncü aşamadaki bileşen ise Epilepsi Sendromudur. Epilepsi sendromu bir bütün olarak nöbet tiplerini, hastanın EEG kaydını ve bununla birlikte diğer görüntüleme parametrelerini de içeren özellikler bütünü kapsamaktadır. Özellikleri ayrıntılı olarak tanımlanmış birçok epileptik sendrom bulunmaktadır. Çocukluk absans epilepsisi, West sendromu ve Dravet sendromu bunlardan birkaçıdır (ILAE).

### **1.1.3. Epilepsinin Etiyolojisi**

İlk epileptik nöbetin gözlemlendiği andan itibaren en önemli bileşenlerden biri olarak beyinde yapısal bir etiyolojik farklılık olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu aşamadan sonra ek olarak beş etiyolojik grup belirlenmiştir. Bunlar; genetik, infeksiyöz, metabolik, immun ve bilinmeyendir. Bir hastanın epilepsisi birden fazla etiyolojik kategoride sınıflandırılabilir. Etiyolojilerin kendi içerisinde hiyerarşisi bulunmamaktadır ve etiyolojik grup esas olarak hastaya yaklaşımı ve tedavi sürecinin yönlendirilmesi açısından önem taşımaktadır (26).

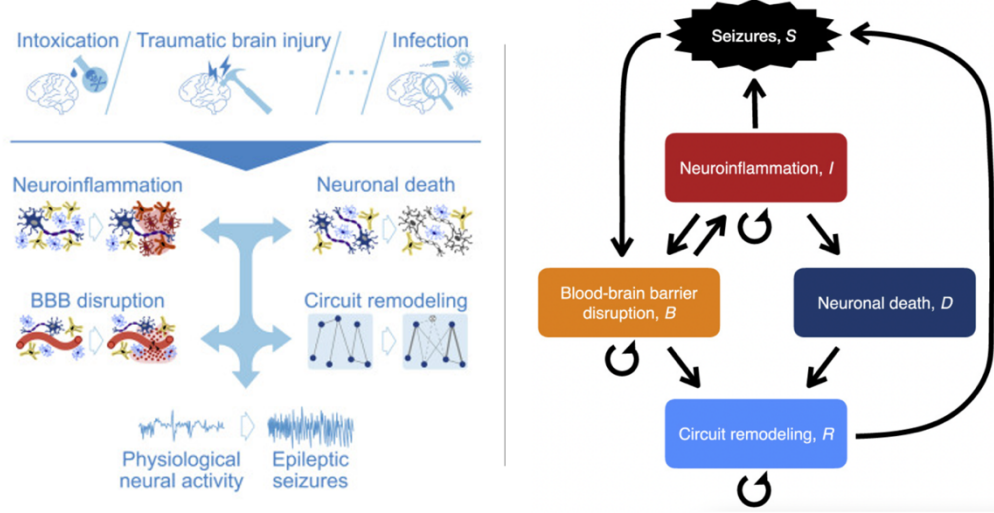
### **1.2. Epileptogenezin Patobiyolojisi**

Yukarıda belirtilen etiyolojik alt yapı ile beraber beyindeki nöronal ağın eksitasyona duyarlılığının arttığı ve sonucunda da spontan tekrarlayan nöbetlerin oluşma olasılığının arttığı sürece epileptogenezis denilmektedir (35). Geleneksel bir tanım olarak ise epileptogenez, epileptojenik hasar ile ilk klinik nöbetin ortaya çıkışı

arasındaki geçen ve “sessiz (latent) dönem” olarak isimlendirilen süreci kapsamaktadır. Ancak yeni bulgular göstermektedir ki bu süreçteki hücrel değişiklikler epileptik nöbet ortaya çıktıktan sonra da devam etmektedir. Epileptogenez sürecine ilişkin bilgilerimizin ise çoğunluğu status epileptikusun yapay yollarla (kimyasal veya elektriksel stimülasyon yolları) tetiklendiği çalışmalardan gelmektedir ve genellikle hipokampusa odaklanmaktadır (6).

Histopatolojik ve elektrofizyolojik sonuçlar epileptogenez sürecinin aydınlatılması için önemli olan iki mekanizmayı desteklemektedir. Bunlardan ilki spesifik GABAerjik internöronların kaybı, bir diğeri ise akson filizlenmesi ve yeni tekrarlayan uyarıcı devrelerin oluşumudur (7). İlk mekanizma status epileptikus veya diğeri etiyojilerden kaynaklı olabilecek beyin hasarından sonra GABAerjik inter nöronların hızlı kaybını içermektedir ve bu kayıp tüm süreç boyunca da devam etmektedir. Klinik ve in vivo modellerle çalışmalar, GABAerjik inter nöronların özellikle hipokampusun dentat girus ve CA1 (Cornu Ammonis 1) alanında kaybının epileptogenez ile ilişkili olduğu hipotezini de desteklemektedir (36). İkinci mekanizmada sinaptik reorganizasyon sonucu “yosunlu lif filizlenmesi” ve artan tekrarlayan uyarıcı devreler hipotezine dayanmaktadır. Çeşitli elektrofizyolojik veriler ile de yeni yosunlu lif bağlantılarının neredeyse tamamının eksitator olduğu ortaya konmuştur (37). Yosunlu liflerin filizlenmesi ve sinaptik reorganizasyon, yine hipokampusta özellikle dentat girusta önemli olsa da, bu uyarıcı yeni devrelerin oluşumu, hipokampusun diğeri alanları ile beraber neokorteksin birçok bölgesinde de bu sürece verilen bir cevap olarak nitelendirilmektedir. Çalışmalarla gösterilen bir diğeri önemli nokta da hipokampusun CA1 bölgesinin eksitotoksik nöronal ölüm ve kayıplara karşı oldukça hassas olduğudur. CA1'deki nöronların sayısı, mezial temporal sklerozun önemli bir belirteçidir (38). İki temel mekanizma ile bu sürece katkısı olan birçok farklı hücrel ve moleküler değişiklikler de epileptogenez sürecinde gözlemlenmektedir. Bu değişiklikler içerisinde sıklıkla  $Ca^{+2}$  metabolizmasında, astrosit transportunda, glutamat sentetaz gibi enzimlerin sentezinde veya kullanımındaki değişiklikler araştırılmaya devam etmektedir (39) (Şekil 1).





Şekil 1: Epileptogenezis (40)

### 1.3. *In-vivo* Temporal Lob Epilepsi Modeli Olarak Kainik Asit (KA)

#### 1.3.1. KA

KA, L-glutamatın siklik bir analogu ve iyonotropik KA reseptörlerinin bir agonistidir. 1950'lerin başında, tropikal sularda bulunan bir kırmızı algden (*Digenea simplex*) izole edilmiş ve ekstrakte edilmiştir (41). KA ilk olarak parazitik solucan *Ascaris lumbricoides*'in neden olduğu bir hastalık olan askariyazisi ortadan kaldırmak için bir askarisit olarak kullanılıyordu. Ancak daha sonra, sıçanlarda kortikal nöronlarda uzun süreli uyarıcı tepkileri indüklediği bulunmuştur (42). Böylece KA'nın güçlü bir glutamat analogu olarak kullanılabilceği ve güçlü depolarizasyonları ve TLE'nin merkezi bir fenomeni olan hücre ölümünü indükleyebileceği gösterilmiştir (43,44). Bu durum, yeni glutamat reseptör alt tiplerinin tanımlanmasına, glutamaterjik yapıların ve yolakların daha iyi karakterizasyonuna ve nihayetinde insan TLE'de olduğu gibi latent periyodun ardından refrakter spontan nöbetlerin takip ettiği yeni bir temporal lob epilepsi hayvan modelinin geliştirilmesine giden yolu açmıştır (25).

#### 1.3.2. Kainik Asit Reseptörleri (KAR)

Geçtiğimiz otuz yıl boyunca, birçok çalışma KA reseptörlerinin (KAR'ler) lokalizasyonunu başarılı bir şekilde haritalandırmıştır. Amigdalada (45), entorhinal kortekste (46), bazal ganglionlarda (47) ve beyincikte (48) farklı ifade seviyelerinde KAR bulunabilir. Ayrıca hipokampüste hem presinaptik hem de postsinaptik olarak

yüksek oranda ifade edilirler (43). KA1 alt birimleri (Uluslararası Temel Bilim ve Klinik Farmakoloji Veritabanına göre aslında GluK4 olarak bilinir), CA3 piramidal hücrelerde yüksek oranda ifade edilir; ancak CA1 piramidal hücrelerde yalnızca zayıf şekilde ifade edilir (48,49). KA2 (GluK5) alt birimleri ise hem CA1 hem de CA3 piramidal hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir (48). Bu nedenle, KA1 ve KA2 reseptörlerinin glutamata yüksek afinitesi ve hipokampusun CA3 bölgesindeki yüksek ekspresyon oranları, bu bölgeyi KA tarafından indüklenen eksitotoksik hasara karşı oldukça duyarlı hale getirir ve sıklıkla hipokampus bölgesi bu nedenle KA ile indüklenen nöbet modelinde nöbet başlangıç bölgesi olur (25,50). Daha spesifik olarak, CA3'ün iktojenik özellikleri ve daha genel olarak, KA uygulamasının ardından senkronize aktiviteler üretme kapasitesi, stratum lucidum olarak tanımlanabilecek yosunlu lif tabakasının sinaptik bağlantılarındaki yüksek afiniteli KAR'lerinin varlığına ve KAR ifadesi yüksek piramidal nöronların aktivasyonuna bağlanabilir (25).

Diğer KAR alt birimleri (sırasıyla GluR5 ve GluR6 alt birimleri veya diğer adlarıyla GluK1 ve GluK2 gibi) de KA'nın uyarıcı etkisine katkıda bulunur; GluR6, CA3 piramidal hücrelerinde yüksek oranda ifade edilirken, GluR5, hem CA1 hem de CA3 alt alanlarındaki GABAerjik inter nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir (43).

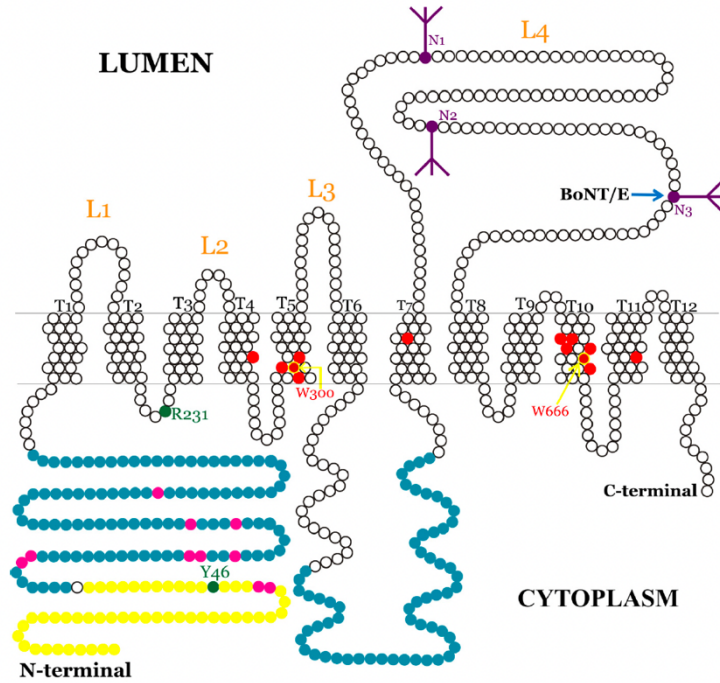
Ayrıca diğer önemli bir nokta ise, epileptik hastaların ve epileptik hayvanların beyinlerinden alınan histolojik örneklerde gözlemlenen yosunlu lif filizlenmesine NMDA ve AMPA reseptörlerinin katkısı ortaya konmuş olsa da (51,52), son çalışmalar KAR'lerin de bu fenomene önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir. Epileptik hastalarda yosunlu lif filizlenmesi, GluR5 up-regülasyonunun artmasıyla ilişkilidir (53) ve bu tür bir regülasyon, KA uygulanan sıçanlarda yosunlu lif filizlenmesinden bile önce gelir (54). Bu veriler, KAR'lerin, bu yeni ve işlevsel olarak anormal sinapslardan kaydedilen epileptiform aktivitenin oluşumuna yüksek oranda dahil olabileceğini düşündürmektedir (55). Bu nedenle KA ile indüklenen status epileptikus modeli kronik dönemlerde incelendiğinde sadece bir nöbet modeli değil aynı zamanda iyi bir epileptogenez modelidir.

## 1.4. SV2A ve Epilepsi Patolojisindeki Yeri

### 1.4.1. SV2A

Sinaptik vezikül glikoprotein 2 (SV2), omurgalılarda sinaptik veziküllerde bol miktarda bulunan ve korunmuş bir proteindir. SV2 proteinleri üç izoformda bulunur; SV2A, SV2B ve SV2C (10). SV2 protein dizisi, diğer G proteini ilişkili reseptör protein ailelerinininkine benzer. İlk 6 transmembran (TM) alanı, insan glikoz taşıyıcısını içeren bir taşıyıcı ailesine (MFS) homologdur ve son TM alanları, nörotransmitter taşıyıcılara homologdur (12).

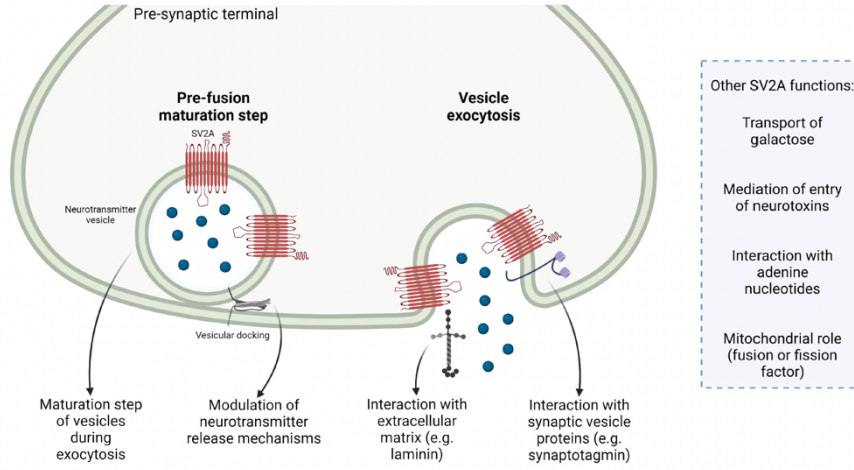
SV2A, 742 amino asitten oluşan 82.6 kDa'lık bir proteindir. SV2A, TM alanı 6 ve 7 arasında büyük bir sitoplazmik döngü ve TM alanı 7 ve 8 arasında büyük bir intralüminal döngü ile 12 TM alanına sahiptir. Ayrıca, SV2A büyük bir korunmuş N-ucuna ve kısa bir C-ucuna sahiptir (Şekil 2) (12). N terminalinin, sinaptik vezikül ekzositozunda yer alan sinaptotagmin-1'i bağladığı gösterilmiştir. Bağlanma bölgesi, sinaptotagmin-1'in C2B alanı ile etkileşime giren 57 amino asitten oluşur. Bağlanma,  $Ca^{2+}$ ya bağımlıdır (56).



Şekil 2: SV2A'nın membran yerleşiminin ve aminoasit diziliminin şematik gösterimi

N-terminalinin (sarı) ilk 57 amino asidi, SYT-1'in C2B domaini ile etkileşim bölgesine karşılık gelir. Presinaptik bölgede meydana gelen vezikülün membrana kaynaşması ve ayrışması şeklinde süregelen membran trafiği işlemleri için SV2A'nın Tyr46 (yeşil) bölgesi gereklidir. N-terminalindeki varsayılan fosforilasyon bölgeleri pembe ile gösterilmiştir ve varsayılan ATP-bağlanma bölgeleri mavi ile gösterilmiştir. BoNT/A ve BoNT/E'nin nöronlara girişi için üç adet varsayılan glikozilasyon bölgesi mor renkte gösterilmiştir. Racetam bağlanmasında rol oynayan on dört amino asit rapor edilmiştir (kırmızı). Arg231, MFS taşıyıcı protein motifidir. Trp300 ve Trp666 bölgelerinin rolü bilinmese de SV2A'nın görevi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Amino asitler, UniProt tarafından rapor edilen bölgelere göre dağıtılmıştır (SV2A-Q02563). L, lümen alanı; T, transmembran alanını göstermektedir (Şekil 2).

SV2A'nın rolü netlik kazanmamış olsa da aşağıdaki Şekil 3'te özetlendiği gibi birden çok mekanizmada rol aldığına dair kanıtlar vardır. SV2A özet olarak bazı varsayımsal rollere sahiptir: 1. Veziküler ekzositoz sırasında füzyon öncesi olgunlaşma aşamasına katılır 2. Kalsiyum girişi ve nörotransmitter salınımı arasındaki eşleşmeyi modüle ederek veya nörotransmitter salınımında yer alan makineleri düzenleyerek, çoklu mekanizmalar yoluyla nörotransmisyonu dahil olur. 3. Hücre dışı matris bileşenleri (örneğin laminin) ve kalsiyum sensörü olan sinaptotagmin gibi diğer sinaptik vezikül proteinleri ile etkileşime girer. 4. Diğer olası işlevleri, galaktozun taşınması, nörotoksinlerin veziküler girişine aracılık, adenin nükleotidlerinin vezikül içine alımı, mitokondriyal etkileşim ile füzyon veya fisyon faktörü olarak rolleri bildirilmiştir (11,57,58).



**Şekil 3:** SV2A'ya biçilen roller (57)

#### 1.4.2. SV2A ve Epilepsi Bağlantısı

SV2A'nın işlevi tam olarak anlaşılmasa da SV2A nakavt (Knock out; KO) çalışmaları, SV2A'nın normal sinir iletimi için gerekli olduğunu göstermiştir (2). Crowder vd. (1999), SV2A geninin silinmesi yöntemini kullanarak oluşturduğu SV2A için homozigot KO farelerin doğumda normal görüldüğünü ancak sonradan normal gelişim göstermediğini (P7'den sonra) ve şiddetli motor nöbetler geliştirerek (P6-P10 civarında) 3 haftalıkken öldüğünü gösterdi (59). Aynı ekip heterozigot KO farelerin ise kontrol farelerine kıyasla normal şekilde geliştiği ancak nöbetler göstererek daha kısa bir ömre sahip olduğunu gösterdiler. Bu veriler, normal bir nörotransmisyon sürecinin SV2A'ya bağlı olduğunu ve SV2A ekspresyon seviyelerine duyarlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, SV2A KO fareleri, sinaps ve sinaptik veziküllerin yoğunluğunu veya morfolojisini değiştirmemiştir; bu durum SV2A'nın sinaptik veziküllerin biyogenezinde yer almadığını göstermektedir. Janz ve arkadaşları (1999) ise SV2B KO farelerin SV2A KO'lar kadar şiddetli nöbetler göstermediğini ve aynı öldürücü fenotipe sahip olmadığını da göstermiştir (60). SV2 KO hücrelerinde vezikül salımının azaldığı da gösterilmiştir (61).

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-QPCR), immünohistokimya, western blot çalışmaları ile TLE hastalarının hipokampusunda ve anterior temporal neokorteksinde SV2A mRNA seviyesinin, protein ekspresyonunun ve spesifik radyoligand bağlanma yoğunluğunun azaldığı da gösterilmiştir (13,14,62).

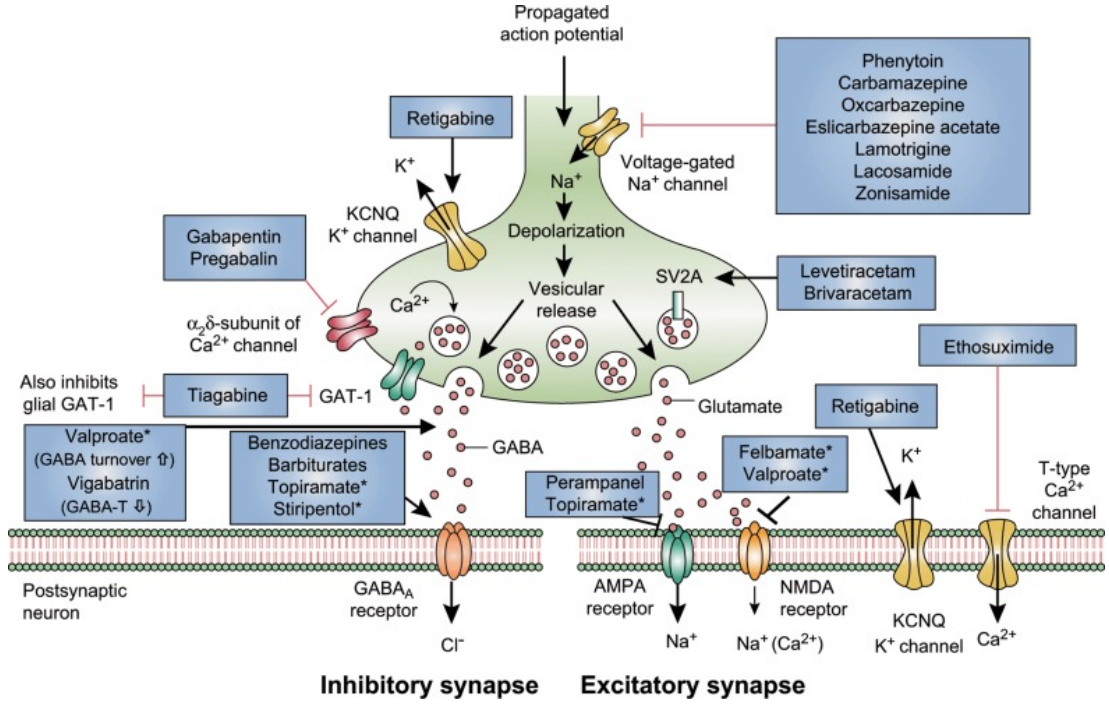
Anti-epileptik ilaç levetirasetamın farmakoforundan SV2A izleyicilerinin sentezi, SV2A PET uygulamasını epilepsi çalışmalarıyla oldukça alakalı hale getirdi. SV2A'nın epilepsideki ifadesi, patolojinin ilerlemesi sırasında karmaşık ve değişken bir model göstermektedir. [<sup>18</sup>F]UCB-H PET çalışması ile KA kaynaklı temporal lob epilepsi oluşturulmuş sıçan beyinde patolojik olarak epileptogenetik ilerlemenin farklı evreleri (erken, geç, latent ve kronik) sırasında SV2A düzeyinde bazı varyasyonlar saptandı. Analiz, sağlıklı hayvanlarda [<sup>18</sup>F]UCB-H bağlanmasında ilerleyici bir artış ve fazlar boyunca epileptik hayvanlarda ise sağlıklılara göre daha küçük bir artış gösterdi. Ancak latent ve kronik fazda, epileptik hayvanlarda [<sup>18</sup>F]UCB-H bağlanması, birkaç beyin bölgesinde kontrol deneklerine kıyasla önemli ölçüde azaldı (20). Temporal lob epilepsisinde SV2A ekspresyonunun azalması, epileptik hastalarda [<sup>11</sup>C]UCB-J PET çalışmasında da görülmüştür. Özellikle, epileptojenik (ipsilateral) medial temporal lobda kontralateral lob ile karşılaştırıldığında SV2A yoğunluğunda azalmalar, ve varsayılan nöbet başlangıç bölgesinde ciddi düzeyde SV2A seviyesinde azalma tespit edildi ve bu bulgular SV2A proteininin beyinde görüntülenmesini hastaların cerrahi öncesi değerlendirmesinde faydalı olabileceğini gösterdi (18,19).

### **1.5. Güncel Tanı ve Tedavi Yaklaşımları**

Güncel olarak kullanılan 40'tan fazla anti-epileptik ilaç mevcuttur. Bu ilaçların hepsi nöbetleri kontrol altına almak yaklaşımı ile kullanılırken henüz epilepsinin oluşumunu önleyecek, epileptogenezi durduracak bir terapi bulunmamaktadır. Mevcut antiepileptiklerin çeşitli etki mekanizmaları vardır ve hatta bazen bir antiepileptik birden çok etki mekanizmasına sahiptir. Bazı ilaçların kesin etki mekanizmaları anlaşılamamıştır (63).

Bazı antiepileptikler, sodyum kanalları üzerinde etki gösterirler ve bu kanalların tekrarlayan aktivasyonlarını bloke ederek (fenitoin, karbamazepin) veya yavaş inaktivasyonlarını hızlandırarak (lakoamid) hücrenin depolarize olmasını engellerler. Bir grup antiepileptik, T tipi kalsiyum kanallarını (etosuksimit, valproik asit) veya N- ve L tipi kalsiyum kanallarını (zonisamid) bloke ederek depolarizasyonu

önleyerek nöbetleri kontrol ederler (63–65). Şekil 4’te güncel ilaçların etki ettiği hedefler şematize olarak gösterilmiştir.



**Şekil 4:** Klinik olarak onaylı ve kullanımda olan anti-epileptik ilaçların etki mekanizmaları (2)

### 1.6. SV2A’yı Hedefleyen Levetiracetam’ın Etkinliği ve Tedavideki Rolü

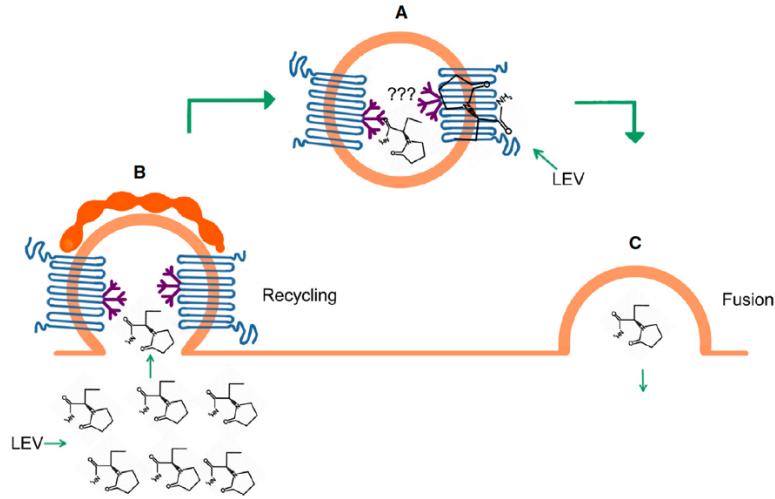
Son birkaç yılda epilepsiyi sadece nöbetleri kontrol eden anti-epileptiklerle tedavi etmenin, epilepsi hastalarında mevcut olduğu bilinen komorbiditeleri kapsamadığı için yetersiz olduğu netlik kazanmıştır (66). Bu gerçekler, daha etkili olabilecek ve daha tolere edilebilir bir yan etki profiline sahip olabilecek yeni etki mekanizmalarına sahip yeni ilaçların araştırılmasını motive etmeye devam etmektedir. Bunlar arasında levetirasetam (LEV), SV2A ile etkileşim yoluyla yeni ve farklı ana etki mekanizması nedeniyle diğer anti-epileptiklerden ayrılmaktadır (2,15,67).

LEV, 1992 yılında keşfedilmiştir ve parsiyel, miyoklonik ve tonik-klonik nöbetlerin tedavisinde kullanılan yeni ikinci nesil bir antiepileptik ilaçtır. 2000 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (American Food and Drug Administration; FDA), oral formülasyonun fokal nöbetler, miyoklonik nöbetler ve



birincil jeneralize nöbetlerin tedavisinde yardımcı tedavi olarak kullanımını onaylanmıştır. Şu anda mevcut olan diğer antiepileptik ilaçlarla kimyasal olarak ilgisi olmayan bir pirridolin türevidir. a-etil-2-okso-1-pirrolidin asetamidin (ucb L059 olarak da bilinir) S enantiomeridir (68). Moleküler formülü  $C_8H_{14}N_2O_2$  ve bağıl molar kütlesi 170.21 g/mol'dür (69). Sıçan beyninden alınan ham sinaptozomal ve sinaptik vezikül fraksiyonlarının foto-afinite etiketleme deneyleri, LEV'nin SV2A ile işaretlenebilir olduğunu ortaya çıkarmıştır (15). Ancak LEV'in SV2B ve SV2C'ye bağlandığı gözlemlenmemiştir. İnsan, sıçan ve fare SV2A homolojisi, ligand afinitesi ve bağlanma kinetiği açısından gösterilmiştir (70,71).

LEV'nin anti-epileptik etkilerini nasıl gösterdiği ve olası mekanizmalar net olarak tanımlanmamıştır. En alakalı etki mekanizmasının, SV2A olarak bilinen presinaptik bir proteine bağlanma yoluyla olduğu öne sürülmektedir. SV2A proteini, kalsiyuma bağımlı veziküler nörotransmitter salınımına aracılık eden salgı vezikül zarlarının bir parçasıdır. LEV'nin SV2A'ya bağlanması vezikül salınım oranını düşürüyor gibi görünmektedir (2,15,70).



**Şekil 5:** LEV ve SV2A arasındaki potansiyel bağlanma bölgeleri.

(A) LEV, SV2A'nın hem BoNT/A (Botulinum A) ve BoNT/E'yi de bağlayan büyük luminal alanın yüksek oranda glikosile edilmiş ilmeğine (mor) hem de SV2A'nın transmembran bölmelerine bağlanabilir (B) LEV, aynı zamanda endositoz sırasında sinaptik veziküllere girebilir (C) vezikül füzyonu sırasında sinaptik aralığa da kaçır (12).



SV2A-LEV bağlanmasına dahil olduğu görülen on dört TM amino asidi tanımlanmıştır (72) (Şekil 5 ). SV2A dizi analizi ve modellemesi, bu amino asitlerin diğer Major Facilitator Super Family (MFS) olarak adlandırılan ve bünyesinde çok çeşitli taşıyıcı proteinleri barındıran protein ailesindeki taşıyıcılarının kritik amino asitlerine eşdeğer olduğunu göstermiştir (72,73), bu da SV2A'nın LEV'yi bağlayarak taşıyabileceğini veya LEV'nin SV2A'ya bağlanarak diğer moleküllerle ilişkisini engellediğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, LEV bağlanmasının SV2A proteininde konformasyonel bir değişikliğe neden olmadığı da gösterilmiştir (74).

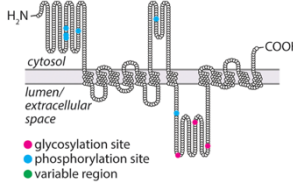
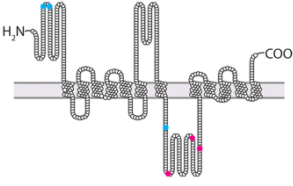
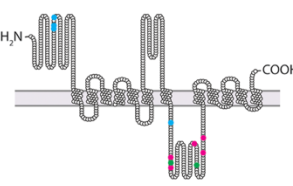
Çok sayıda çalışma, LEV'nin etkisini doğrudan veya dolaylı olarak gösterebildiği SV2A proteininin yanı sıra birçok başka moleküler hedef bildirmiştir (75,76). Ek olarak, önemli kanıtlar LEV'nin anti-iktojenik, antiepileptojenik, nöroprotektif, antiinflamatuvar ve antioksidan etkilere sahip olduğunu göstermiştir (77–79). Son zamanlarda LEV, epilepsi ve diğer durumlardaki bazı güncel gereksinimleri karşılayabilen ilginç özelliklere sahip çok hedefli bir ilaç olarak gösterilmektedir (80).

### **1.7. SV2 Glikoprotein Ailesinin Diğer Üyeleri**

SV2 glikoproteinleri, nöronların ve endokrin hücrelerinin salgı keseciklerinde/veziküllerinde bulunan (Buckley ve Kelly, 1985) bir protein ailesini oluşturan keratan sülfat proteoglikanlarıdır (81).

SV2 ailesinin SV2A, SV2B ve SV2C olmak üzere 3 üyesi vardır. Yapı olarak benzerdirler, ancak beyinde ifade edildikleri anatomik yapılar farklıdır. SV2A en fazla bazal gangliyonlar ve talamus gibi subkortikal alanlarda olmak üzere tüm beyin bölgelerinde bulunan baskın izoformdur. Buna karşılık, SV2B tercihen korteks ve hipokampusta eksprese edilir (82,83). SV2A'nın beyin her yerinde ifade edilmesi yakın zamanda otoradyografi ile doğrulanmıştır; bu protein, değişken ekspresyon seviyeleri ile tüm gri madde yapılarında dağılmaktadır (84). Nöronlar ağırlıklı olarak tek bir izoformu ifade eder, ancak SV2A ve SV2B'nin ifade modelleri kısmen örtüşmektedir ve hipokampusun piramidal nöronları gibi bazı nöronlar her iki izoformu da ifade edebilmektedir. Bazen, her iki izoform da aynı sinaptik kesecik içinde birlikte ifade edilebilir. İki izoformun ekspresyon paternlerinin veziküllerin nörotransmitter içeriği ile veya diğer sinaptik proteinlerin ekspresyon paternleri ile

korelasyon göstermemesi dikkat çekicidir. Bu bulgular, SV2A ve SV2B'nin veziküler dinamiklerde aynı veya benzer işlevleri yerine getirebileceğini düşündürmektedir (82). SV2C alt tipi yapısı diğer izoformlarınkine çok benzer, ancak anatomik dağılımı çok sınırlıdır, striatum, substantia nigra, pons, medulla oblongata ve olfaktor bulbus gibi filogenetik olarak daha eski beyin bölgelerinde yüksek seviyeler ile ifade edilirken neokortekste ve hipokampüste yok denecek kadar az ifadeye sahiptir (10). Floresan immünohistokimya ve *in situ* hibridizasyon çalışması, striatal kolinerjik internöronlarda ve nigrostriatal mezolimbik dopaminerjik nöronlarda SV2C'nin spesifik olarak ifade edildiğini göstermiştir (85). Tablo 2 izoformların birbiri ile karşılaştırılmasını göstermektedir.

	<b>SV2A</b>	<b>SV2B</b>	<b>SV2C</b>
<i>Gen</i>	Kromozom 1	Kromozom 15	Kromozom 5
<i>Yapı</i>			
<i>Lokalizasyon</i>	Trigeminal ve fasial nukleus hariç tüm beyin bölgelerindeki inhibitorik ve eksitatorik sinapslar	Beyinde SV2A'dan sonra en yaygın ifade edilen SV2 proteindir. Ancak çoğunlukla eksitator sinapslarda bulunur, en yaygın kortikal bölgelerde bulunur. Subkortikal alanlarda, hipokampusun dentat girus bölgesinde, globus pallidus, ventral talamus ve substansia nigra pars retikulata'da bulunmaz	İnhibitör sinapslarda bulunur. Özellikle olfaktor tuberkulus, globus pallidus, ventral pallidum, substantia nigra, thalamus, nukleus akumbens de yaygındır. Dopaminerjik nöron sinapslarında da yaygındır. SV2C ifadesi serebral korteks ve hipokampüste yok denecek kadar azdır.
<i>Fonksiyon</i>	-Normal sinaptik vezikül fonksiyonları ve nörotransmitter salınımı -Botulinum toksini için bağlanma bölgesi -Veziküler yapının presinaptik membrana çapalanması -Synaptotagmin 1 proteininin membran trafiğinin düzenlenmesi -Ca, ATP, Glukoz taşıyıcısı (kanıt gerektiren veri)	-Normal sinaptik vezikül fonksiyonları ve nörotransmitter salınımı -Botulinum toksini için bağlanma bölgesi -Alzheimer patolojisinde amiloid toksisitesinin azaltılması	-Normal sinaptik vezikül fonksiyonları ve nörotransmitter salınımı -Botulinum toksini için bağlanma bölgesi -GABA ve Dopamin salınımı
<i>Bulunduğu sinaps</i>	GABAerjik ve glutamaterjik	Glutamaterjik	Gabaerjik, Glutamaterjik, Dopaminerjik, Kolinerjik
<i>KO çalışmaları</i>	Ca ile indüklenen nörotransmisyonunda azalma ve epileptik nöbetler, hatta ölüm meydana gelir	Bu knock out rodentler yaşayabilir ve amiloid beta ile oluşan nörotoksositeye karşı da direnç geliştirir (86)	Dopamin salgısında azalma görülür
<i>Bağlanma özellikleri</i>	UCB-J, Levetiracetam, Brivacetam	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış

**Tablo 2:** SV2 glikoprotein ailesinin genel özellikleri (Bu tablo derlenmiştir (9,11,12))

Veziküler süreçlerin anahtar mekanizmalarına katıldıkları yaygın olarak kabul edilmesine rağmen, SV2 ailesi üyelerinin biyolojik önemi belirsizdir. Bununla birlikte, protein yapıları ve özelliklerine dayalı olarak, taşıma aktivitesi, sinaptotagmin ile etkileşim, veziküler geri alım, veziküler kalsiyum duyarlılığının düzenlenmesi, vezikülleri hazırlama ile nörotransmisyona katılım, kolayca serbest bırakılabilen vezikül havuzunun modülasyonu, veziküller ve hücre dışı matris ile etkileşim gibi spesifik rol test edilmiştir. SV2 proteinleri ayrıca nörotoksinlerin veziküler girişinden sorumludur ve muhtemelen bir mitokondriyal fonksiyona sahip olabilir (Tablo 3).

<b>Fonksiyonlar</b>	<b>Analiz edilen SV2 izoformları</b>
Galaktoz transferi	SV2A
Sinaptotagmin ile interaksiyon	SV2A
	SV2B
	SV2A/SV2B
	SV2A/SV2C
Sinaptotagmin trafiği ve ekspresyonunun düzenlenmesi	SV2A
Nörotransmitterlerin salınımının düzenlenmesi	SV2A
	SV2A/SV2B
Kalsiyumun neden olduğu ekzositoz sırasında veziküllerin olgunlaşma aşamasına katılım	SV2A
	SV2A/SV2B
Veziküllerin boyutsal adaptasyonlarının modülasyonu	SV2A
Laminin ile interaksiyon	Spesifize edilmemiş
	SV2A/SV2B/SV2C
	SV2A/SV2B
Botulinum ve tetanoz nörotoksinlerinin hücresel girişine aracılık	SV2C
	Spesifize edilmemiş
Füzyon veya fisyon faktörü olarak mitokondriyal rol	SVA2A
Adenin nükleotitleri ile interaksiyon	SV2A/SV2B
Sinaptik vezikül proteinleri ile interaksiyon	SV2A

**Tablo 3:** SV2A, SV2B ve SV2C'nin fonksiyonlarının özeti (Rossi ve arkadaşları 2022'den Türkçeleştirilmiştir) (57)

### 1.8. Sinaptik Plastisitenin Görüntülenmesi ve UCB Radyoligandları

Canlı beyindeki uygun sinaptik sayıların ve bağlantıların önemi göz önüne alındığında, psikiyatrik ve nörolojik durumların araştırılması ve teşhisi için sinaps yoğunluklarını en doğru yolla belirlemek gerekir. Ancak sinapsları saymak ve

yoğunluklarını ölçmek yeni bir kavram değildir. Aslında, çoğunluğu *ex vivo* olarak gerçekleştirilmesine rağmen, çok sayıda doğrulanmış yöntem mevcuttur (Tablo 4). Sinaptik yoğunluğun *in vivo* ölçümü önemli ölçüde daha zordur ve yeni görüntüleme yöntemleri bunu başarmaya çalışmaktadır (87).

	<b>Metodoloji</b>	<b>Sinaptik Hedef</b>	<b>Avantaj</b>	<b>Dezavantaj</b>
<b><i>Ex vivo</i></b>	Elektron Mikroskopisi	Sinaps yapısı ve yoğunluğunun görüntülenmesi	Sinapsların gerçek sayısının belirlenmesini sağlar  İnhibitör ve eksitator sinaps ayrımı sağlar	Pahalı, zaman alıcı, kompleks teknik
	Histoloji ve İmmunohistokimya	Dendritik spinelerin morfolojisinin ve yoğunluğunun saptanması, pre ve post sinaptik protein miktarlarının belirlenmesi	Ucuz ve kolay  İnhibitör ve eksitator sinaps ayrımı sağlar	Bazı antikorlar spesifite ve sensitivitede problem oluşturur, her sinapsın dendritik spine'ı yok (örneğin elektriksel sinapslar). Her hastalıkta sinaptik proteinler etkilenmeyebilir
<b><i>In vivo</i></b>	SV2A PET radyoizleyicileri	Presinaptik protein SV2A'nın belirlenmesi	Sinaptik yoğunluğun in vivo değerlendirilmesini sağlar  Hem hayvan hem insan dokusunda çalışılabilir, bu nedenle translasyonel	Düşük uzaysal rezolusyon, radyoaktif madde uygulanması, inhibiötr ve eksitator sinaps ayrımı yapmak mümkün değil
	Manyetik Rezonans Görüntüleme	Glutamat konsantrasyonunun belirlenmesi	PET'den daha yüksek uzaysal rezolüsyon sağlar, kişiye madde/ilaç verilmesine gerek yoktur	PET'e göre spesifite ve sensitivite düşük, Glutamat iyi bir sinaptik belirteç değil çünkü astrositlerde de bulunabilir. Ayrıca inhibitör sinapsları saymak mümkün değil

**Tablo 4:** Beyinde sinapsların görüntülenmesinde kullanılan temel metodların özeti (Serrano ve arkadaşları 2022'den Türkçeleştirilmiştir) (87)

Sinapsların PET ile görüntülenmesinin popüler hale gelmesinden önce, sinaptik niceleme ancak otopsi veya cerrahi rezeksiyonlardan sonra beyin numunelerinde *in vitro* olarak elde edilebiliyordu. 2010'ların ortalarına kadar elektron mikroskobu ve sinaptik proteinlerin immünohistokimyasal etiketlemesi bu tür analizler için altın standart yöntemlerdi. Şimdiye kadar birçok pre- ve post-sinaptik protein sinapsların *in vitro* veya *ex vivo* görüntülenmesi ve sayılması için kullanılmaktadır (Tablo 5).

	<b>Lokalizasyon</b>	<b>Proteinler</b>	<b>Sinapstaki Rolü</b>	<b>Bulunduğu Sinaps Türü</b>
Presinaps	Vezikül	vGLUT(1-3)	Veziküler depolama-Glutamat	Eksitator sinapslar, astrositler, mikroglialar
		vGAT	Veziküler depolama-GABA/Glisin	İnhibitör sinapslar
		Sinapsin 1,2	Mevcut sinaptik vezikül sayısını düzenleme	Tüm sinapslar ve astrositler
		Sinaptofizin 1(a,b)	Endositozu düzenleme	Tüm sinapslar ve astrositler
		Sinaptotagmin 1	Kalsiyum sensözü, ekzositozu düzenleme	Tüm sinapslar ve astrositler
		SV2(A)	Endo- ve ekzositozu düzenleme	Tüm sinapslar
	Aktif zon	Bassoon	Aktif zonun organizasyonu ve montaj	Tüm sinapslar
	Vezikül füzyon makinesi	SNAP-25	Vezikülün füzyonu, Ca regülasyonu, SNARE üyesi	Tüm sinapslar ve astrositler
		Syntaxin-1	Vezikülün füzyonu, SNARE üyesi	Tüm sinapslar ve astrositler
		vMAP	Vezikülün füzyonu, SNARE üyesi	Tüm sinapslar ve astrositler
Adhezyon	Nöreksin	Sinapsların oluşumu ve farklılaşması	Tüm sinapslar	
	Adhezyon	Nöroligin (1-4)	Sinapsların oluşumu ve sağ kalımı	1,3,4 eksitator sinapslarda 2 inhibitör sinapslarda
Postsinaps	İskelet	SNAP-25	Post sinaptik bölgede reseptör trafiği spine morfogenezi ve plastisite	Eksitator sinapslar
		PSD-95 (a,b)	Eksitator reseptörlerin postsinaptik bölgede konumlandırılacağı yerlerin düzenlenmesi	Eksitator sinapslar
		Homer (1-3)	Sinaptogenez	Eksitator sinapslar
		Shank (1-3)	Sinaptogenez ve spine olgunlaşması	Eksitator sinapslar
		Gefirin	Postsinaptik bölgede inhibitör reseptörlerin yerlerinin stabilizasyonu	İnhibitör sinapslar

**Tablo 5:** Sinaptik yoğunluğun ölçümünde belirteç olarak kullanılan pre- ve post-sinaptik proteinlerin özeti (Serrano ve arkadaşları 2022'den Türkçeleştirilmiştir) (87)



Sinapsların *in vivo* görüntülenmesinin altında yatan kavram, uygun spesifik radyo-izleyiciler sayesinde sinaptik veziküllere gömülü proteinleri hedefleyerek sinaptik yoğunluğun PET görüntüleme ile elde edilebilmesidir (88).

SV2A ve epilepsi arasındaki ilişkinin keşfi, sıçan beyni ve omuriliğinde LEV'in bağlanma bölgelerini belirlemek amacıyla ilk SV2A radyo izleyicinin yani [<sup>3</sup>H]ucb 30889'un geliştirilmesini tetikledi (89). UCB Pharma'nın (Braine-l'Alleud, Belçika) LEV'in SV2A'ya bağlandığını göstermesi ve LEV'in radyo izleyici işaretli formlarının geliştirilerek SV2A'nın izlenebileceğini göstermesi ile birkaç PET araştırma merkezi, SV2A PET radyo izleyicilerinin geliştirilmesine başladı (16).

UCB Pharma (Braine-l'Alleud, Belçika) SV2A'nın rolünü ve işlevini daha iyi anlamak ve SV2A'yı işaretleyerek PET ile görüntülenmesine olanak sağlamaya uygun özelliklere sahip yüksek afiniteli ligandları belirlemek amacıyla bir araştırma programı başlatmıştır (90). SV2A'ya bağlanabilirliği için test edilen 500'ün fazla bileşik denenmiştir. Ancak üç bileşik, UCB-A, UCB-H ve UCB-J, farmakolojik ve etiketlemelerine dayalı olarak öncü bileşikler olarak gösterilmiştir.

Genel olarak konuşursak, bir bileşiğin PET ligandı olarak elverişliliği biyolojik hedefe seçiciliğine (30 kat ila > 100 kat arasında), hedefe afinitesine ( $K_D$ ) (genellikle düşük nM aralığında olmalıdır) ve ayrıca hedefin afinitesi ve yoğunluğu arasındaki ilişkiye ( $B_{max}/K_d \geq 10$ ) bağlıdır. Düşük  $K_D$ , kısa yarı ömürlü radyonüklidlerle kullanım için gerekli olan ligand-hedef bağlanmasının yüksek birleşme oranını ve nispeten yavaş ayrışma oranlarını yansıtır. Ancak yüksek afinite, merkezi sinir sisteminin PET görüntülenmesinin en büyük engellerinden biri olan spesifik ve spesifik olmayan bağlanmayı ayırt etmek için de önemlidir. Nispeten düşük moleküler ağırlıklı (> 700 Da) olması ve kan-beyin bariyerini geçme yeteneğini gösteren orta derecede lipofilisiteye ( $\log D = 1-3$ ) sahip olması başarılı bir PET ligandı olmanın diğer önemli özellikleridir (91).

Şu anda, yukarıda belirtilen iyi bir PET ligandı olma özellikleri dikkate alındığında [<sup>11</sup>C]UCB-J ve [<sup>18</sup>F]UCB-H, nörolojik veya psikiyatrik bozuklukları olan hastalarda SV2A PET görüntüleme için en yaygın kullanılan iki radyo-izleyicidir (16). SV2A PET'in ilk uygulandığı hasta popülasyonu TLE hastalarıydı. TLE hastalarının

hipokampusündeki yüksek bağlanma potansiyelini (BP<sub>ND</sub>) ve asimetri indekslerini keşfettiler, böylelikle nöbet zonunun belirlenmesinde SV2A'nın belirteç olarak kullanılmasını önerdiler (18,19). Şimdiye kadar epilepsi, Alzheimer hastalığı, şizofreni, depresyon ve kafa travması gibi nörolojik durumlar için SV2A'nın *in vivo* izlenmesinde ve sinaptik yoğunluğun tespitinde bu ligandlar kullanılmıştır (17,19,21,23,92,93).

Birçok klinik hastalık üzerinde insan çalışmaları yürütülmüş olsa da ilgili hastalık hayvan modellerini kullanan klinik öncesi araştırmalar, klinik görüntüleme bulgularını doğrulamak için bilgilendiricidir.

Ancak *in vitro* SV2A izlenmesinde yani otoradyografi de <sup>11</sup>C ve <sup>18</sup>F işaretli UCB radyoligandları kısa yarı ömürlü olduklarından (sırasıyla yarı ömürleri 20.4 dk ve 109.8 dk) kullanılamamakta ve UCB-J'nin trityum işaretli formu >12 yıl yarı ömre sahip olduğundan [<sup>3</sup>H]UCB-J tercih edilmektedir.

## **1.9. Reseptör Ligand Bağlanma Deneyleri ve Otoradyografi**

### **1.9.1. Otoradyografi**

Radyoligandların bir hedef proteine spesifik bağlanması otoradyografi adı verilen *in vitro* bir teknikle test edilebilir ve bu yöntemle hedef proteininin dağılımı ve seviyesi ölçülebilir. Proteinlerin *in vitro* olarak geleneksel miktar tayini ya western blot ya da enzime bağlı immünosorbent deneyleri (ELISA) yoluyla antikorlar kullanılarak yapılır. Bununla birlikte, antikorların nicelleştirilmesi çoğu zaman yanıltıcıdır ve standart protein ölçümlerine oldukça bağlıdır. Seçici bir radyoligand kullanan otoradyografi, protein miktar tayinine ve bağlanma yerlerinin belirlenmesine daha duyarlıdır (87).

Otoradyografi, basitliği ve nispeten düşük maliyeti nedeniyle yeni geliştirilen PET izleyicilerini karakterize etmek için yararlı olduğunu kanıtlamıştır, radyoizleyici/- işaretleyici metabolizması, ligand seçiciliği ve hedef lokalizasyonu hakkında bilgi sağlar (94). Ayrıca, otoradyografi, kemirgen beyinlerinin küçük anatomik yapılarında bağlanmanın miktar tayinini ve lokalizasyonunu sağlayan PET'ten daha yüksek uzamsal çözünürlüklü görüntüler ( $\mu\text{m}$  vs.  $\text{mm}$ ) sağlar. Canlı beyindeki uygun sinaptik

sayıların ve bağlantıların önemi göz önüne alındığında, psikiyatrik ve nörolojik durumların araştırılması ve teşhisi için yoğunluklarını belirlemenin doğru yollarına ihtiyaç vardır. Ancak sinapsları saymak ve yoğunluklarını ölçmek yeni bir kavram değil. Aslında, çoğunluğu *ex vivo* olarak gerçekleştirilmesine rağmen, çok sayıda doğrulanmış yöntem mevcuttur. Sinaptik yoğunluğun *in vivo* ölçümü önemli ölçüde daha zordur ve yeni görüntüleme yöntemleri bunu başarmaya çalışmaktadır. PET ile karşılaştırıldığında ise otoradyografi daha sensitiftir. Yani otoradyografi daha düşük miktarlardaki hedefleri daha yüksek rezolusyonlarda görüntülememize yarar. Bu da prelinik çalışmalar için oldukça önemlidir.

### 1.9.2. Reseptör Bağlanma Teorisi ve Bir Radyoligandın Karakterizasyonu

Reseptör bağlama teorisi, Michaelis-Menten'in substratları ve enzimleri içeren çalışmasından türetilmiştir (95). Bu teori 1913'ten bu yana yüzyıllardır biyokimya alanına hâkim olmuştur (96). Reseptör bağlanma deneylerinde, bir substrat yerine bir radyoaktif ligand kullanılır ve sonuç, ligandın reseptöre bağlanmasıdır. Bu, kütle hareketi yasasını türetir (Denklem 1).

Denklem 1

$$[\text{ligand}] \times [\text{receptor}] \times K_{\text{on}} = [\text{receptor} \cdot \text{ligand}] \times K_{\text{off}}$$

Bu denklem tersine çevrilebilir bir reaksiyondur. Ligand, reseptöre kimyasal olarak ayrılamaz bir biçimde bağlanmaz. Bu bağlanma, bir ligand-reseptör kompleksi oluşturur. Sonuç olarak, ligand reseptöre "bağlanabilir" (bu durumda birleşme hız sabiti  $k_{\text{on}}$ 'dur) veya "bağlanamaz" (bu durumda ise ayrışmanın hız sabiti  $k_{\text{off}}$ 'tur). Yukarıda bahsedilen bileşenlerin dengede olduğu durumdaki reaksiyonda (Denklem 2),  $k_{\text{off}}$  ve  $k_{\text{on}}$  oranı ayrışmanın denge sabiti olarak tanımlanır; yani  $K_D$ 'dir (birimi nM'dir).

Denklem 2s

$$\frac{[\text{ligand}] \times [\text{receptor}]}{[\text{receptor} \cdot \text{ligand}]} = \frac{K_{\text{off}}}{K_{\text{on}}} = K_D$$

Bağlanma etkileşiminin gücü (yani afinite),  $K_D$ 'nin tam tersidir. Dolayısıyla ligandın afinitesi ne kadar yüksek olursa,  $K_D$  değeri o kadar düşük olur. Reseptör bağlanma analizlerinin bir diğer önemli yönü, bir doku örneğindeki reseptörlerin toplam yoğunluğuna veya konsantrasyonuna atıfta bulunan  $B_{max}$ 'tır. Reseptör bağlama teorisi,  $K_D$  ve  $B_{max}$ 'ın ölçülmesine yardımcı olur. Kütle eylemi yasası bu denklem için de kullanılabilir (Denklem 3)(97).

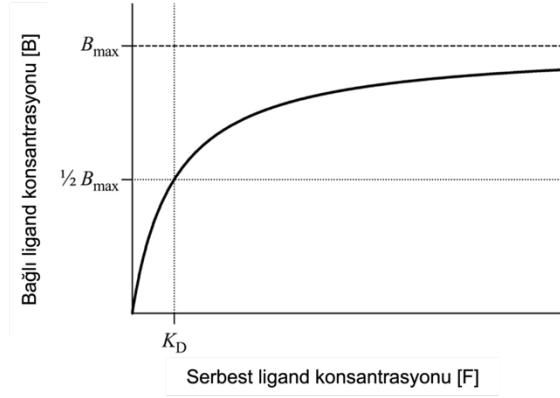
Denklem 3

$$B = \frac{B_{max} \times F}{K_D + F}$$

Denklem 3'te B bağlı radyoligand konsantrasyonu olduğunda, F serbest radyoligand konsantrasyonudur. Uygulamada, bu değerlerin her ikisi de bilinmektedir. B, testin sonuç ölçüsüdür, F ise testte kullanılan konsantrasyondur. B'ye karşı F konsantrasyonu olarak çizilen bu denklem,  $B_{max}$ 'ta yatay bir asimptot ile hiperbolik bir eğri üretir (Şekil 6). Bu, tüm reseptörleri doyumak için yeterli F kullanılıyorsa, B'nin  $B_{max}$ 'a eşit olduğu anlamına gelir. Bu eğri üzerindeki diğer kritik nokta,  $B_{max}$ 'ın %50'sinde F konsantrasyonudur (Şekil). B,  $B_{max}$ 'ın %50'sine ( $B_{max}/2$ ) eşit olduğunda, Denklem 3  $F = K_D$ 'yi gösterecek şekilde çözülebilir. Diğer bir deyişle,  $K_D$ , reseptörlerin %50'sini doyumak için gerekli olan serbest ligand konsantrasyonudur.  $B_{max}$  ve  $K_D$  oranı, Mintun ve arkadaşları (1984) (98) tarafından tanımlandığı gibi BP'dir (Denklem 4).

Denklem 4

$$BP = \frac{B_{max}}{K_D}$$



Şekil 6: Saturasyon bağlanma eğrisi

Bu simüle edilmiş grafikte, serbest ligand konsantrasyonu ( $[F]$ ) arttıkça, ligandın giderek daha fazla kısmı reseptörlere bağlanır. Tüm reseptör bölgeleri doyduğunda, bağlı konsantrasyon ( $[B]$ )  $B_{max}$ 'a eşittir. Bu hiperbolik fonksiyon,  $B_{max}$ 'ın %50'sinde serbest ligand konsantrasyonuna eşit olan ayrışma sabiti  $K_D$ 'nin hesaplanmasına yardımcı olur.

*In vitro* otoradyografi en verimli şekilde uzun ömürlü radyonüklidler ile; yani  $^{125}I$  ( $t_{1/2} = 59.4$  gün),  $^{14}C$  ( $t_{1/2} = 5730$  yıl),  $^{35}S$  ( $t_{1/2} = 87.5$  gün),  $^{32}P$  ( $t_{1/2} = 14.3$  gün) ve trityum ( $^3H$ ) ile yapılır.  $t_{1/2} = 12,3$  yıl).  $[^{11}C]$ - ve  $[^{18}F]$ -etiketli radyoligandlar otoradyografide kullanılabilse de gerekli olabilecek üretim miktarı nedeniyle uygulanabilir değildir. Trityum, uzun yarı ömrü ve düşük enerjili  $\beta$ - emisyonu (18,5 KeV) nedeniyle radyoetiketleme ligandları için en çok kullanılan radyonükliddir.  $\beta$ - parçacığı doku içinde sadece birkaç mikrometre hareket edebilir, bu da 10  $\mu m$  kadar keskin bir çözünürlük sağlayan birinci sınıf görüntüleme sistemleri ile büyük uzaysal çözünürlük sağlar (99,100).

Radyoligandlar genellikle hesaba katılması gereken bir miktar spesifik olmayan bağlanmaya (NSB) da sahiptir. Bu nedenle, birbirinin aynı iki bitişik kesit otoradyografiye tabi tutulur. Otoradyografide bir doku kesiti total bağlanmaya (TB) maruz kalır, yani doku kesiti ile yalnızca radyoligand inkübe edilir. Diğer kesit ise spesifik olmayan bağlanmayı (NSB)'yi temsil eder, yani radyoligand, hedef için yüksek afiniteye sahip hatta 10.000 kat fazla konsantrasyonda ancak radyo işaretleyici ile etiketlenmemiş rekabet eden bir ligandla inkübe edilir. Bu rekabet eden ligand, tüm

hedef reseptörlere bağlanarak onların işgal edilmesini sağlar. Böylece, radyoligandın spesifik bağlanması (SB), Denklem 5 ile hesaplanabilir.

Denklem 5

$$SB = TB - NSB$$

Etiketlenmemiş ligandın, hedef olmayan bağlanma bölgelerine değil, yalnızca hedefe bağlanmasını sağlamak için tercihen radyo etiketli ligandan farklı bir kimyasal yapıya sahip olmalıdır (94). Otoradyografi analizleri sıklıkla üç farklı yolla gerçekleştirilir:

1. Doygunluk (saturasyon) testleri:  $K_D$  ve  $B_{max}$  (bir doku kesitinde veya hedef alanda görülebilecek maksimum bağlanma ki bu oradaki total reseptör veya protein miktarının göstergesidir)'ı pratik olarak hesaplamak için kullanılır. Bunun için, yaklaşık olarak aynı reseptör konsantrasyonuna sahip farklı doku kesitleri aynı radyoligandın artan konsantrasyon serisine maruz bırakılır. Bunun için aynı beyin dokusundaki bitişik anatomik pozisyonlardan alınmış ardışık kesitler kullanılır. Dengeye ulaşan bağlanma seviyesi ölçülür yani ligandın konsantrasyonu artırılrsa da bağlanma düzeyi artık değişmiyorsa o noktada bağlanmanın dengeye ulaştığı düşünülür ve lineer olmayan bir grafik modeli kullanılarak uygulanan radyoligand konsantrasyonuna karşı bağlanma derecesini gösteren bir eğri çizilir.
2. İnhibisyon (Rekabet, Kompetisyon, Uzaklaştırma) deneyleri: Otoradyografi, rekabet halindeki bir soğuk bileşiğin (yani radyoaktivitesi olmayan bir bileşik) afinitesini belirlemek için de kullanılabilir. Bunun için inkübasyon solüsyonu içerisindeki radyoligand konsantrasyonu sabit tutulurken, farklı kesitlerde soğuk bileşiğin değişen ve giderek artan konsantrasyonları kullanılır. Radyoligandın ölçülen spesifik bağlanması, uygulanan soğuk bileşiğin konsantrasyonuna karşı eğri olarak çizilir (fonksiyon olarak) (97).

Bir ligandın ilgilenilen bir hedef proteine bağlanma özellikleri, aynı zamanda, sabit bir radyoligand konsantrasyonundaki bağlanma düzeyinin, bir soğuk ligandın artan konsantrasyonlarının mevcudiyetinde ölçüldüğü rekabetçi deneyler ile de belirlenebilmektedir. Bu deneylerden  $IC_{50}$  değeri belirlenebilir.  $IC_{50}$  değeri, radyoligandı bağlanma bölgelerinin %50'sinden uzaklaştıran soğuk ligand

konsantrasyonunu gösterir. IC50 değeri, radyoligandın sabit konsantrasyonuna bağlı olarak deneyden deneye değişebilir. IC50 temelinde, inhibitör sabiti  $K_i$ , Cheng-Prusoff denkleminde hesaplanır:

$$K_i = \frac{IC50}{1 + \frac{[S]}{K_d}}$$

Burada [S] radyoligandın sabit konsantrasyonudur ve  $K_D$ , doyma deneyleri ile belirlenen radyoligand için  $K_D$ 'dir (101).  $K_i$ , radyoligand mevcut değilse spesifik bağlanma bölgelerinin %50'sini bağlayacak olan soğuk ligand konsantrasyonunu gösterir (102).  $K_i$  böylece soğuk ligandın hedef proteine olan afinitesini tahmin eder.

3. Grup karşılaştırması: *in vivo* PET'de ve *in vitro* diğer protein saptama metodlarında olduğu gibi, hasta veya model organizmanın kontrolünde veya ilaç tedavisi karşılaştırmalarında hedef proteindeki farkı ölçmek için otoradyografi kullanılabilir. Bunda, farklı gruplardan elde edilen doku kesitlerine aynı radyoligand konsantrasyonları eklenir, bağlanma ölçülür ve sonuçlar karşılaştırılır. İki tür karşılaştırma yapılabilir: i) Toplam reseptör yoğunluğu veya  $B_{max}$  ölçülebilir ki bu  $K_D$  değerinin 4 veya 5 kat üzerinde bir inkübasyon konsantrasyonu kullanıldığında mümkündür ii)  $K_D$  ve  $B_{max}$ 'ı birleştiren bağlanma potansiyeli veya BP ölçülür. Bu,  $K_D$ 'den daha düşük radyoligand konsantrasyonları ile gerçekleştirilebilir. Örneğin, deneydeki değişkenlerin radyoligand afinitesini değiştirip değiştirmediğinden emin olunmak için bu tahliller kullanılabilir.

Radyoaktivite görüntüleme, geleneksel olarak röntgen filmleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak fosfor görüntü plakaları (IP) veya gaz dedektörleri (103) gibi daha yeni yöntemler çok daha yüksek hassasiyet ve çözünürlük sağlamaktadır. IP'ler, ışıkla uyarılabilir fosfor ( $BaFBr:Eu^{2+}$ ) ile kaplanmış yarı esnek ekranlardır. Radyoaktif beyin kesitleri bu plakalarla yakın temas halinde tutulur. Dokudaki proteine bağlanan radyonüklidlerden yayılan iyonlaştırıcı radyasyon, plaka içindeki  $Eu^{2+}$ 'ı  $Eu^{3+}$ 'ya dönüştürür ve yayılan elektron da brom içinde hapsolür. IP ışıkla uyarıldığında brom, yakalanan elektronları serbest bırakarak  $Eu^{3+}$ 'yı "uyarılmış"  $Eu^{2+}$ 'ya dönüştürür. Uyarılmış  $Eu^{2+}$ , görüntü plakası tarayıcısındaki fotoçoğaltıcı

tüpler tarafından alınır ve 16 bitlik bir görüntüye dijitalleştirilir (yani her pikselin 0 ile 65.536 arasında bir gri skalaya sahip olduğu parlaklık yayararak stabil hale gelir) (104). Bir otoradyografi deneyi gerçekleştirmek için gerekli pratik adımlar Şekil 7'de gösterilmiştir. Yeni bir radyoligand değerlendirildiğinde, bizim çalışmamızda da olduğu gibi çok sayıda değerlendirme ve optimizasyon yapılır.



**Şekil 7:** Otoradyografi basamakları

Enzim veya reseptör hedeflemesi ilk olarak 1939'da [<sup>131</sup>I]-iyodür kullanılarak insanlarda gerçekleştirilmiştir. O zamandan beri, bu alanda uzun bir yol kat edilmiştir. 2010 yılında, 2600 yeni radyoligandın *in vitro* veya *in vivo* olarak test edildiği ve bunların %20'sinin insanlarda test edildiği tahmin edilmektedir (105). Terapötik etkinlikleri doğru bir şekilde değerlendirmek için ilaç geliştirmeden önce bir PET radyoligandı geliştirilmelidir. Radyoligand geliştirme aşaması, önce hedef seçimi ve radyokimya ile başlar, sonra *in vitro* ve *in vivo* testler ile devam eder ve son olarak insan üzerindeki testler ile tamamlanır.

Radyoligand geliştirmenin çok maliyetli bir iş olduğunu belirtmek gerekir. Maliyet, radyo-etiketleme, hayvan çalışmaları, insan çalışmaları vb. ile ilişkilidir. Radyoligand geliştirmenin bu multidisipliner yaklaşımında kimyagerleri, biyologları, fizikçileri ve matematikçileri içeren ve farklı adımlarda ve süreçlerde gerekli olabilecek muazzam bir maliyeti vardır. Bu mali yükü azaltmanın tek yolu üretilen veri kalitesini etkilemeden tüm aşamalarda optimum sonuçlar üretmektir. Bunu akılda



tutarak, aşağıda açıklanan tüm adımlar, bir radyoligandın başarısını güvenle önermek için gereken deney sayısını azaltarak yüksek kaliteli veriler üretme niyetindedir.

### 1.9.3. Hedef Tanımlama ve Radyokimya

Genomik öncesi çağda, ilaç etkinliği çalışmaları, *in vitro* deneyler ve/veya postmortem çalışmaların yardımıyla hastalıkların genetik bağlantıları bulundu ve bu da hastalıkların temelinde olabilecek ilgili hedef proteinler için ipuçları doğurdu. Son yıllarda, gen haritalama ve dizileme nedeniyle ek ve daha ileri genetik hedefler belirlendi (105). Bununla birlikte, PET ve otoradyografi gibi orijinal ve konvansiyonel yaklaşımlar hala gündemdedir, güvenilir ve oldukça başarılı sonuçlar sağlanmaktadır. Moleküler biyolojideki ilerlemeler nedeniyle, ilgi duyulan birçok hedef daha da belirgin şekilde ortaya çıktı ve radyokimyasalların hedefe olan özgünlüklerinin artırılmasında fayda sağladı. Merkezi sinir sistemi alanı içindeki ilgili hedefler (reseptör, protein vs.) aşağıdakileri içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir:

1. Potansiyel ilaç hedefleri olan veya olabilecek tek bir proteinin görüntülenmesi (Levetirasetamın hedefi olarak SV2A)
2. İlaç hedefi olmayabilen ancak ayırıcı tanı ile ilgili olan tek bir proteinin görüntülenmesi (Sinaptik dansitenin/sinaps sayısının bir belirteci olarak SV2A)
3. Protein kümelerinin görüntülenmesi, küme halinde bir grup proteinin hastalığın ilerlemesi için belirteç olarak kullanılabilmesi durumlarda (örneğin nörodejenerasyonda Amiloid  $\beta$ , ve tau proteinlerinin birlikte görüntülenmesi gibi)
4. Nörobiyolojiyi anlamaya yardımcı olabilecek hedef her türlü protein veya enzim için görüntüleme (örneğin nikotik asetil kolin reseptörlerinin görüntülenmesi veya inflamasyonun bir belirteci olarak TSPO proteininin görüntülenmesi).

## 2. GEREÇ-YÖNTEM

### 2.1. *in-vivo* Temporal Lob Epilepsi Modeli

Çalışma protokolü Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından onaylanmıştır (Onay no. EGEHAYMER-2019-003) ve tüm çalışmalar Laboratuvar Hayvanlarının İnsani Bakımı ve Kullanımı Politikasına uygun olarak yapılmıştır.

İyi bir bilimsel çalışma sorduğunuz bilimsel sorulara yanıt ararken kurduğunuz hipoteze yönelik en uygun test yöntemlerinin seçilmesi ile ve hipotezinizi test ederken kullandığınız yöntem ve gereçlerin geçerliliği ve tekrarlanabilirliği ve en önemlisi neden o yöntemleri seçtiğinizi açıklayabilmenizle mümkündür. Bu amaçla aşağıda bu tezin oluşturulmasında kullandığımız deneysel yöntemi ve sebeplerini açıklayarak başlıyoruz.

Yapılan çalışmalara göre sistemik ve intraserebral KA uygulaması nöronlarda aşırı uyarılmaya ve eksitotoksisteye sebep olan iyi bir epilepsi modeli oluşturmaktadır (106). Bu tez çalışması kapsamında sonuçların tekrar edilebilirliği ve metodlar arasındaki tutarlılık açısından her iki modeli de kullanmayı uygun gördük.

#### **Çalışmamızda hem sistemik hem lokal modelin kullanılacak ve karşılaştırılacak olmasının altında yatan metodolojik sebep:**

Sıçanlarda hem sistemik hem de intrahipokampal enjeksiyonların, KA reseptörlerine etki ederek eksitotoksisteye ve epileptik nöbetlere neden olacağını biliyoruz (106). Hipokampus, KA eksitotoksistesi için en savunmasız bölgedir ve epilepsi patolojisi için nöbet başlangıç noktası olarak adlandırılır (25). Uygulamalar ister sistemik (i.p.) ister intrahipokampal yapılsın hipokampus KA'ten en çok etkilenen bölge olacaktır. Ancak sistemik KA uygulamasının indüklediği nöronal lezyonlar daha fazla bölgeyi kapsamaktadır. Çünkü korteks, serebellum, bazal ganglionlar, talamus gibi ekstrapokampal bölgelerin de KAR vardır. KA eksitotoksistesi bu bölgeleri de etkilemekte ve nöronal değişikliklere neden olmaktadır (107). Bu süreç farklı beyin bölgeleri arasında nöbetlerin yayılmasında rol oynayabilir.

İntrahipokampal ve sistemik enjeksiyonlar sonrası status epileptikusa kadar olan latent periyod, davranış belirtileri, latent ve kronik dönemlerin elektroensefalografik özellikleri benzer sonuçlar doğurmaktadır. Ana fark, her uygulama yolunun neden olduğu nöropatolojik hasarın kapsamıdır. İntraserebral uygulama temporal lob epilepsili insanlarda olduğu gibi, tek taraflı temporal lob lezyonları üretmektedir (108). Bir metodun ya da diğerinin seçimi cevaplanması gereken sorulara bağlı olacaktır. KA'nın intraserebral uygulaması sınırlı patolojik lezyonlarda epileptiform aktiviteyi, SV2 izoformlarının hipokampüsteki ve projeksiyon yaptığı bölgelerdeki değişimlerini araştırmak için kullanılabilir. Oysa birden fazla beyin bölgesinin KA'ya hassasiyetini ve tüm beyinde SV2 izoformlarının daha yaygın bir epileptik duruma yanıtını incelemek için sistemik uygulama kullanılmalıdır.

Kainik asidi intrahipokampal yolla uyguladığımızda, bu model temporal lob epilepsisini birebir taklit edecek ve nöbet başlangıç bölgesi hipokampus olacak, eksitotoksisite özellikle bu bölgelerde meydana gelecektir (108,109). Nöbetler, sadece iktal aktivitelerle diğer bölgeler arasında yayılacak (110). Bu modelde eksitotoksisitenin bölgeler arası yayılması beklenmemektedir sadece iktal aktivite ve deşarjlar yayılacaktır.

Öte yandan, KA ip olarak uygulandığı zaman, çoğunlukla yine hipokampüse etki ederek hipokampal bölge kökenli nöbetlere yol açacak (girişte bahsedildiği gibi KAR'ların hipokampüste zengin olmasından dolayı) ancak bunun yanı sıra hipokampus dışı bölgelere de ulaşan KA bu bölgelerdeki reseptörleri aracılığıyla da ektrahipokampal nöbet başlangıç bölgeleri oluşturabilecektir (111). İntraserebral ve sistemik uygulamalar sonucu oluşan nöropatolojik değişiklikler aynı olmasına rağmen bu değişikliklerin kapsamı sistemik uygulamalarda daha büyüktür.

Özetlemek gerekirse; intrahipokampal enjeksiyon, hipokampüsün CA3-CA4 bölgelerini tercihli bir şekilde tahrip etse de sistemik KA uygulaması, total beyin eksitotoksisitesine neden olmaktadır. Literatür incelendiğinde ister sistemik ister serebral uygulama yoluyla olsun KA epilepsi modelleri ile SV2A seviyeleri arasındaki ilişki kurulmamıştır. Bu sebeple SV2A'nın KA ile indüklenen epilepsi patolojisindeki

rolünü ortaya koyarken her iki modeli de değerlendirmek ve varsa modeller arası farklılığı ortaya koymak önemli olacaktır. Çünkü çalışmanın amacı SV2A'nın epilepside sadece hipokampal bölgede nasıl değiştiği değil; SV2 seviyeleri açısından ekstrapokampal bölgelerdeki farklılıkları da belirlemek ve bölgeler arası nöbet yayılımının değerlendirilmesinde SV2A bir biyobelirteç olarak kullanılabilir mi sorusunun cevabını ararken her iki modeli birlikte değerlendirerek karşılaştırmaktır.

**Çalışmamızda intraserebral uygulama olarak intraserebroventriküler veya intraamigdaloidal enjeksiyonun değil intrahipokampal uygulamanın seçilmesinin ve doz seçiminin arkasındaki sebep:**

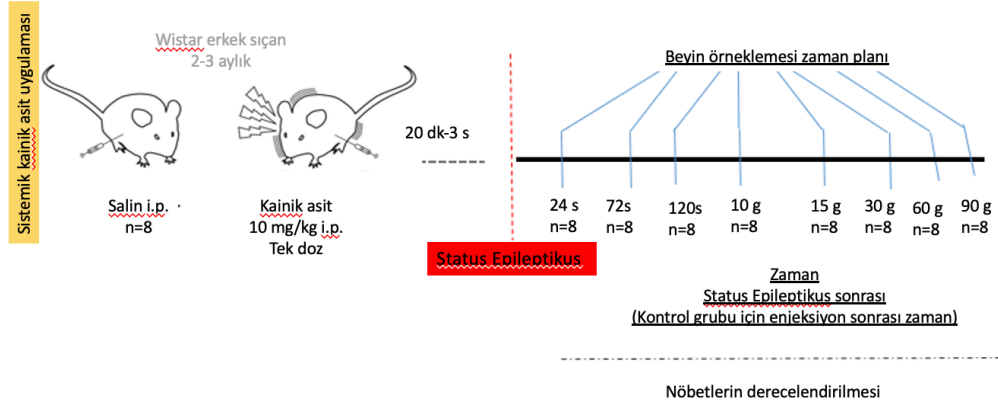
Levesque ve Avoli'nin 2013 (24) yılında yaptığı derleme makalede KA'nın intraserebral ve sistemik uygulamalarının meydana getirdiği nöropatolojik, davranışsal ve elektroensefalografik özellikler incelenmektedir. Burada KA'nın intraserebral uygulama ile verilmesi için 3 farklı uygulama biçimi önerilmektedir: 1. İntraserebroventriküler (i.c.v.), 2. İntraamigdaloidal, 3. Intrahipokampal (İHP)(24). Literatür incelendiğinde KA'nın i.c.v. enjeksiyonlarında 0.8 µg'dan daha yüksek dozlar kullanıldığında hipokampüsün kaudal bölgeleri hasarlanmakta çünkü verilen doz beyin omurilik sıvısının dolaştığı tüm beyin dokularını etkilemekte ve özellikle sınırlı bir şekilde lokal olarak hipokampüste nöbet başlangıç zonu oluşturulmasının önüne geçmektedir (112). Beynin tüm bölgelerinin KA eksitotoksitesinden etkilenmesini istediğimiz uygulama grubu zaten sistemik (i.p.) uygulama ile oluşturulacaktır. İntraamigdaloid enjeksiyonlar da ise hem mortalite oranı diğer iki uygulamaya göre daha yüksektir hem de nöbet başlangıç noktası amigdala olup nöbetler buradan önce ipsilateral hipokampüse sonra kontralateral amigdala ve hipokampüse ulaşır (112,113). Ayrıca yine intraamigdaloid enjeksiyonlarda generalize nöbetler elde etmek için letal doz olan 1.6 µg'lara kadar çıkılması gerekmektedir bu da mortaliteyi %55'e yükseltir ve salivasyon ve exophthalmos gibi ek komplikasyonlara da yol açar (112,114). İntrahipokampal enjeksiyonlar ise ölüm oranının daha az olması, 0.4-1.0 µg gibi ılımlı KA dozlarının kullanılması, spesifik olarak hipokampüsün CA3 ve CA4 nöronlarının hasarlanması, nöbet başlangıç zonlarının hipokampüs olması açısından bizim çalışmamız için daha uygundur (115).

Nöronal dejenerasyonların tipi, davranışsal sonuçlar, elektroensefalografik özellikler her 3 uygulama grubunda da aynı olmasına ve temporal lob epilepsisini iyi bir şekilde temsil etmelerine rağmen hipokampüse spesifik sınırlı bir uygulama yapılması amaçlandığından ve nöbetlerin hipokampüsten başlaması istendiğinden özellikle intrahipokampal uygulama tercih edilmiştir ve sistemik uygulama ile karşılaştırılmıştır.

### **2.1.1. Deneysel Dizayn 1: Sistemik KA Uygulaması ile Epilepsi Modeli Oluşturulması**

Erişkin erkek sıçanlar (ortalama 200-250 gr) standart 12 saat ışık 12 saat karanlık döngüsünde tutularak su ve gıdaya erişimleri serbest bırakılmıştır. Tüm deneyler deney hayvanları yerel etik kurulunun kurallarına ve hayvan refahına uygun yapılmıştır.

Sistemik KA ile indüklenen TLE oluşturmak için Sprague-Dawley yetişkin erkek sıçanlara (200-250 g) 10 mg/kg KA intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Verilecek KA miktarı her bir sıçanın vücut ağırlığına göre belirlenmiştir, steril salin solüsyonu içerisinde çözdürülen KA solüsyonu önce pH'sı 7.4 olacak şekilde ayarlanıp sonra oda ısısında intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilmiştir. Her bir hayvana enjekte edilen hacimsel miktar kalbe olan venöz dönüşün artışı önlemek için 300 mikrolitre olarak belirlenmiştir. Zamana dayalı bir çalışma oluşturmak için, hayvanların beyinleri farklı zamanlarda örneklenmiştir (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 ve 90 (status epileptikustan sonra geçen gün sayısına göre (pds))). Hayvanlar gruplara rastgele atanmıştır ve her grupta (n=8) olacak şekilde ayarlanmıştır. Kontrol grubu intraperitoneal steril salin enjeksiyonu ile oluşturulmuştur ve aynı örneklem grupları (enjeksiyondan sonra 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 ve 90 gün sonra), her grupta n=8 olacak şekilde gruplanmıştır. Sakrifikasyon ketamin (75-100 mg/kg i.p.)- ksilazin (10 mg/kg i.p.) anestezisi altında servikal dislokasyon ile yapılmıştır (Şekil 8).

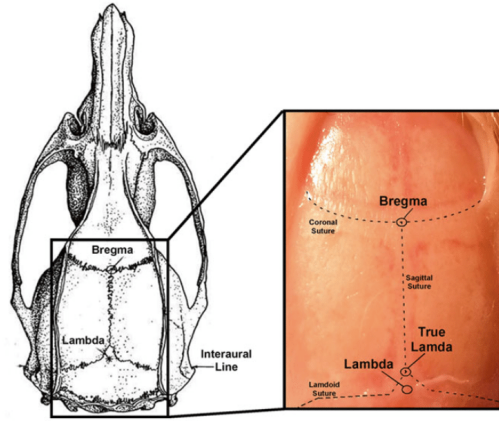


**Şekil 8:** Sistemik deneysel tasarım

### 2.1.2. Deneysel Dizayn 2: Lokal KA Uygulaması ile Epilepsi Modeli Oluşturulması

Erişkin erkek sıçanlar (ortalama 200-250 gr) standart 12 saat ışık 12 saat karanlık döngüsünde tutularak su ve gıdaya erişimleri serbest bırakılmıştır.

Hayvanlar önce vücut ağırlıklarına göre belirlenen ketamin (75-100 mg/kg i.p.)- ksilazin (10 mg/kg i.p.) anestezisi altına alınmıştır. Daha sonra ağrı algıları ayak tabanını bir pensle sıkıştırma yöntemi ile kontrol edilerek ağrı duyuları olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ağrılı uyarana ayaklarını çekerek yanıt veren hayvanlara ek doz anestezi yapılmıştır (önceki dozun yarısı kadar). Anestezi altındaki sıçanın kafa derisi traş edilmiştir ve batikonla temizlenmiştir. Bistüri ile ortalama 1 cm uzunluğunda düz ve net bir kesik atılmıştır. Açığa çıkan kafatasında kaygan bir zemin yaratan periost ve bağ dokunun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bregma ve gerçek lambda noktaları bir stabilo kalem yardımı ile ayrımı gözle daha kolay olacak şekilde işaretlenmiştir (Şekil 9). Hayvan daha sonra stereotaksik çerçeveye kulak barları yardımı ile oturturulmuş, çenesi de aynı stereotaksik çerçevenin ağızlık kısmına sabitlenmiştir. Bu aşamada hayvanın dilinin hava yolunu kapatmamasına özen gösterilmiştir. Hayvan çerçeveye sabitlendikten sonra kafatasının düz bir düzlemde olduğundan emin olunmuş eğer eğim varsa gerekli düzenlemeler yapılmıştır (Şekil 10).

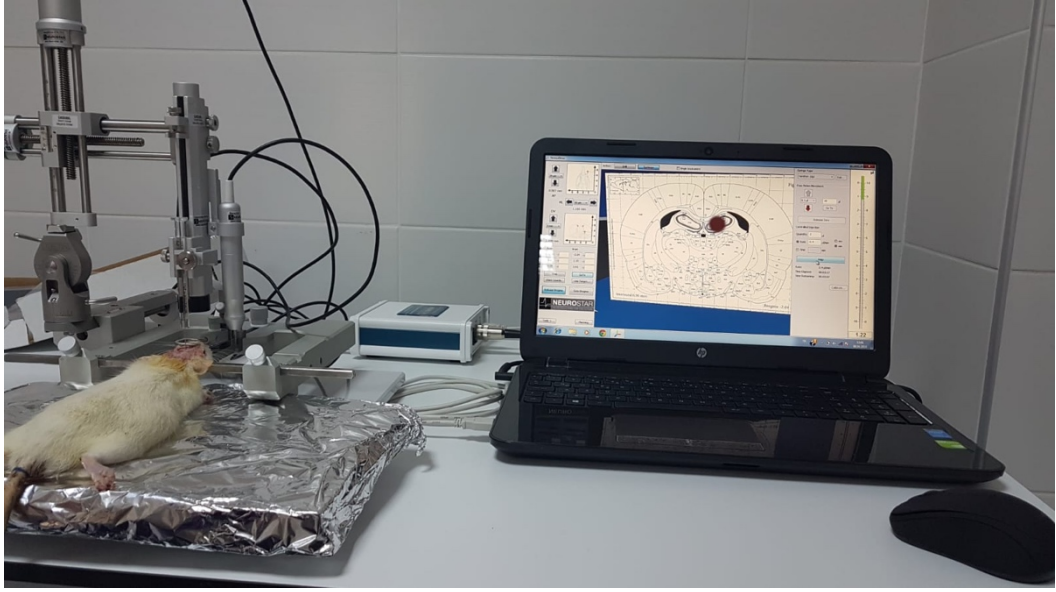


**Şekil 9:** Kafatasında Bregma ve Lambda gibi referans noktalarının gösterilmesi

Stereotaksik cihazda bulunan hem drill hem de enjektöre bregma ve lambda noktaları tanıtılmış, atlas entegre otomatik bir sistem olan cihazda hedef bölge otomatik olarak seçilmiştir. Enjeksiyon için seçilen koordinat hipokampusün CA3 bölgesidir ve Paxinos and Watson'ın sıçan beyin atlası kullanılarak (116) belirlenmiştir. Bregma referans noktası alınarak ve anterior posterior (AP)  $-2.04$  mm; mediolateral (ML)  $1.10$  mm; dorsoventral (DV)  $3.81$  mm koordinatları kullanılmıştır. Bu koordinat hipokampusün en rostral kısmındaki CA3 grubu hücreleri hedeflemektedir. Bu koordinatın seçilmesinin sebepleri 1) bu bölge hipokampusün en rostral yani anterior-posterior düzlemde en uç noktasıdır. Dolayısı ile CA3 hücre grubuna toksin enjekte edilirken, enjektör ucunun oradan geçerken oluşturacağı travmatik hasarının hacimsel olarak kapsamının en aza indirileceği alandır ve inceleme yapılacak bölgelerde yani hipokampusün daha kaudal ve ventral bölgelerinde (yani bregmaya  $-3.6$  mm ve  $-5.2$  mm mesafesindeki CA3 hücrelerinde) görülen etkinin enjeksiyonun kendi travmatik hasarı olmadığından sadece KA'nın yıkıcı etkisi olduğundan emin olunacaktır 2) Dorso-ventral düzlemde bu koordinat daha dorsaldeki bir CA3 bölgesini hedeflediğinden yine bu düzlemde enjektörün gideceği mesafenin en minimal mesafe olduğu saptamıştır, böylelikle başka ilişkili beyin dokularına verilen travmatik zararın kapsamı minimal düzeyde tutulmuştur. 3) Bu nokta beyni besleyen ana arterlerden uzaktır ve enjeksiyonun kanama ya da hipoksi oluşturma etkisi bu şekilde elimine edilmeye çalışılmıştır.

Enjeksiyondan önce hedef bölgenin hemen üzerindeki kafatası kemiğinde ortalama 0.8 mm (bu mesafe hayvandan hayvana farklılık göstermektedir) drill yapılmış, drille kafatasının aşıldığı düşünüldüğünde kortekste bir hasar vermemek için kontrollü ilerleme yapılmış ve bir insülin enjektörü ile gerçekten duranın aşılıp aşılmadığı kontrol edilmiştir. Daha sonra yukarıda verilen koordinatta enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Hayvanlara bu otomatize stereotaksik robot (Neurostar GmbH, Almanya) kullanılarak steril salin içinde çözündürülmüş 0.8 µg/2 µl (1.875 mM) KA enjekte edilmiştir. Enjeksiyon 30 gauge kanül ile 1.0-µl Hamilton mikroşırıngası kullanılarak, akış hızı 1µl/dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulama hızı KA gibi glutamaterjik sistemi uyaran ajan veya toksinler için önemlidir. Çünkü ketamin ksilazin gibi NMDA reseptör blokajı yapan ajanlar ile anestezi sağlanmışken tam tersi antagonistik bir mekanizma ile NMDA reseptörlerine bağlanıp uyaran KA gibi bir madde aniden enjekte edildiğinde sıçanların stereotaksik girişimi esnasında uyanmalarına sebep olabilir. Ayrıca enjeksiyon için girilen bölgede enjeksiyondan sonra 5 dk beklenerek solüsyonun geri tepmesi engellenmiştir. Enjeksiyon tek taraflı (unilateral) gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonun yapıldığı bölgedeki kafatası açıklığı dental dolgu maddesi ile kapatılmıştır. Dental dolgu maddesi sıvı ve katı formda olan iki kimyasalın karıştırılması ve polimerize olması ile iş görmektedir. Ancak polimerize olurken ısı çıkartmayan bir malzeme seçilmesi önemlidir. Bu polimerizasyon süresi 2 dk içerisinde tamamlanır ve hayvan anesteziden uyanmadan önce sütür işlemi, tek ve devamlı sütür tipi halinde yapılmış, hayvanlara batikon ve lidokain ağrı kesici uygulaması yapılmıştır. Hayvanlar dikişleri iyileşene kadar tekli kafeslerde tutulmuş (ortalama 4-5 gün). Günlük post-operatif bakımlar ise aksatılmamıştır (Şekil 11).

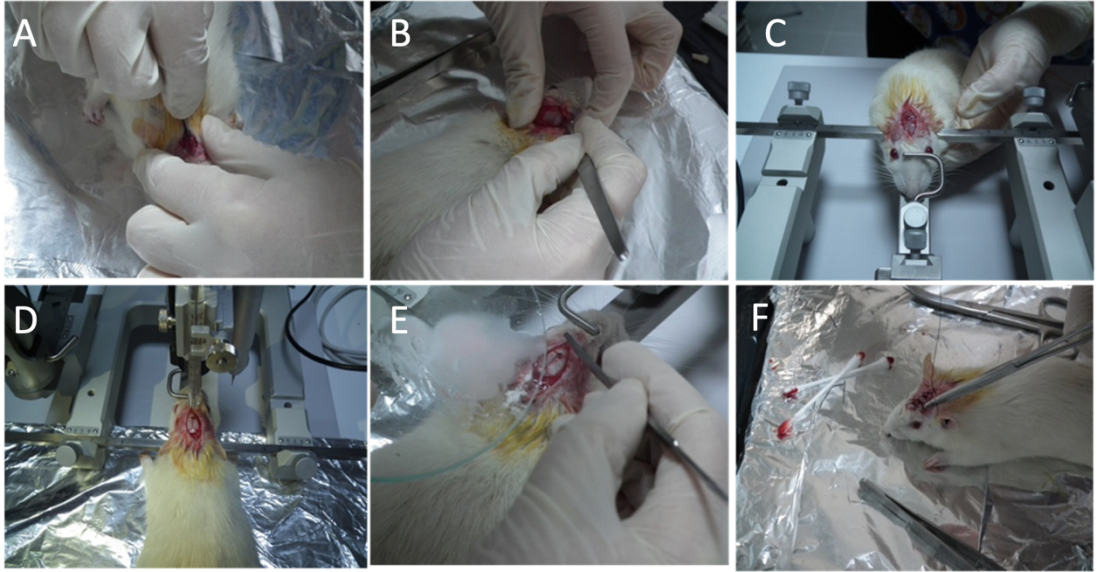




**Şekil 10:** Stereotaksik enjeksiyon

Aynı şekilde kontrol grubuna da 2 µl steril % 0,9'luk izotonik salin solüsyonu aynı koordinatlara enjekte edilmiştir. Kontrol hayvanları sham operasyon geçirmiş enjeksiyonun içeriğindeki farklılık haricinde kontrol hayvanları her türlü şekilde KA uygulanan hayvanlarla aynı uygulamalara tabi tutulmuştur.

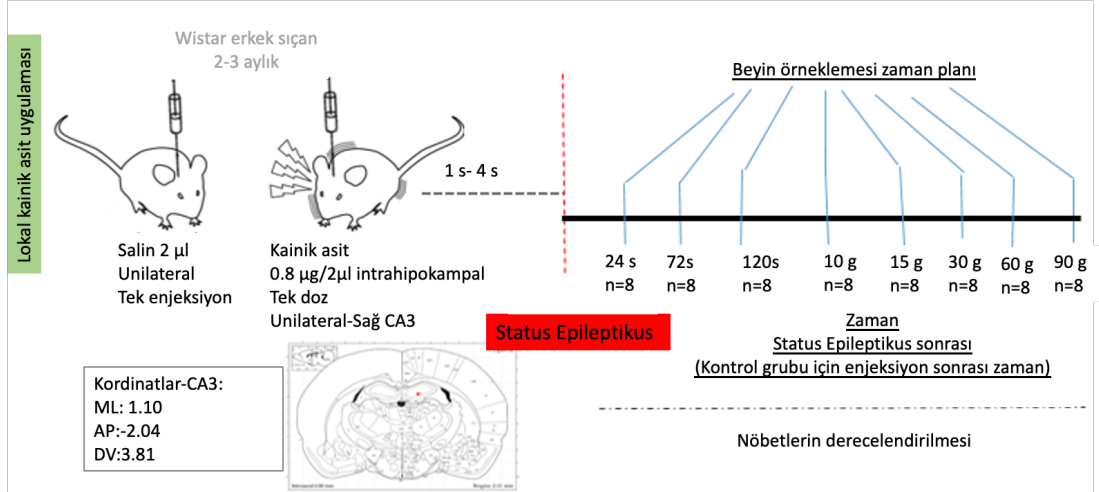
İntrahipokampal uygulama bölgesinin doğruluğunun gösterilmesi için 1 sıçana 2µl KA solusyonu karıştırılmış 2µl evans mavisi enjekte edilerek enjeksiyon bölgesi gösterilmiştir.



**Şekil 11:** Hayvanlarda cerrahi girişim prosedürleri

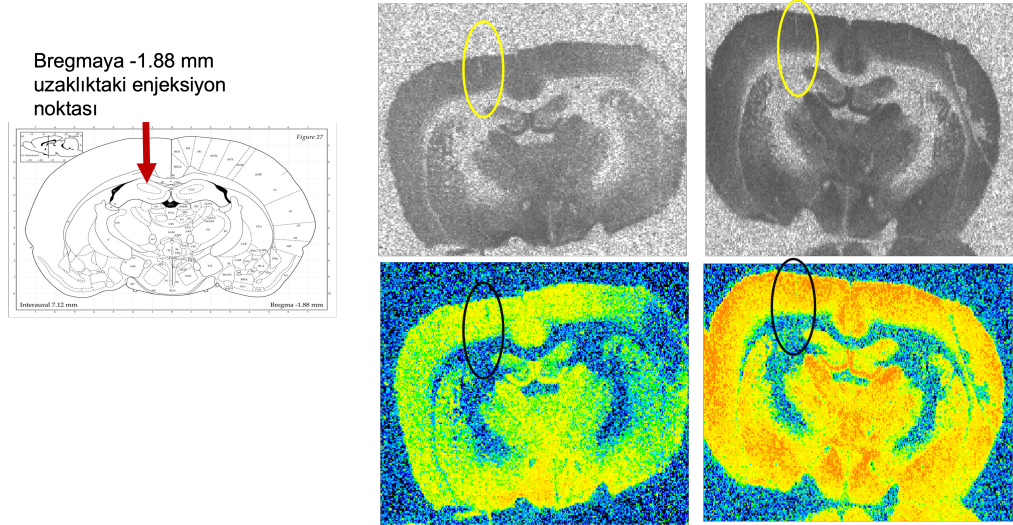
A) Bistüri ile kafa derisinin açılması B) bağ dokunun temizlenmesi C) hayvanın stereotaksik çerçeveye yerleştirilmesi D) drill ve enjeksiyon E) dental dolgu maddesi uygulaması F) Sütür atma

Uygulamalardan sonra yine lokal uygulama tasarımı da sistemik uygulama tasarımı da olduğu gibi zamansal bir izlem süreci oluşturulmuş benzer şekilde sıçanların beyinleri farklı zamanlarda örneklenmiştir (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 ve 90 (status epileptikustan sonra geçen gün sayısına göre). Hayvanlar gruplara rastgele atanmış ve her grupta n=8 olacak şekilde ayrılmıştır. Kontrol grubu ise intrahipokampal salin enjeksiyonundan sonra 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 ve 90 gün olarak farklı gruplara ayrılmıştır. Ötanazi ketamin (75-100 mg/kg i.p.)- ksilazin (10 mg/kg i.p.) anestezisi altında servikal dislokasyon ile yapıldı (Şekil 12).



**Şekil 12:** Lokal deneysel tasarım

Hem gri tonlu hem de renklendirilmiş otoradyogramlar gözleendiğinde (Şekil 13) her hayvanda enjeksiyon bölgesi mikroenjektörün geçerek hasarladığı dokudan ve otoradyogramda oluşturduğu silik görüntüden doğrulanmıştır.



**Şekil 13:** Enjeksiyon bölgesinin doğrulanması

### 2.1.3. Nöbet (konvulsiyon) derecelerinin ve sıklığının *Racine* skalasına göre değerlendirilmesi

KA modeli, epileptik insanlarda da gözlemlendiği gibi, başlangıçta yıkıcı bir hasar meydana getiren status epileptikus ve bunu takiben tekrarlayan nöbetler ortaya çıkana kadar gözlenen bir latent period meydana getirerek iyi bir epilepsi modeli

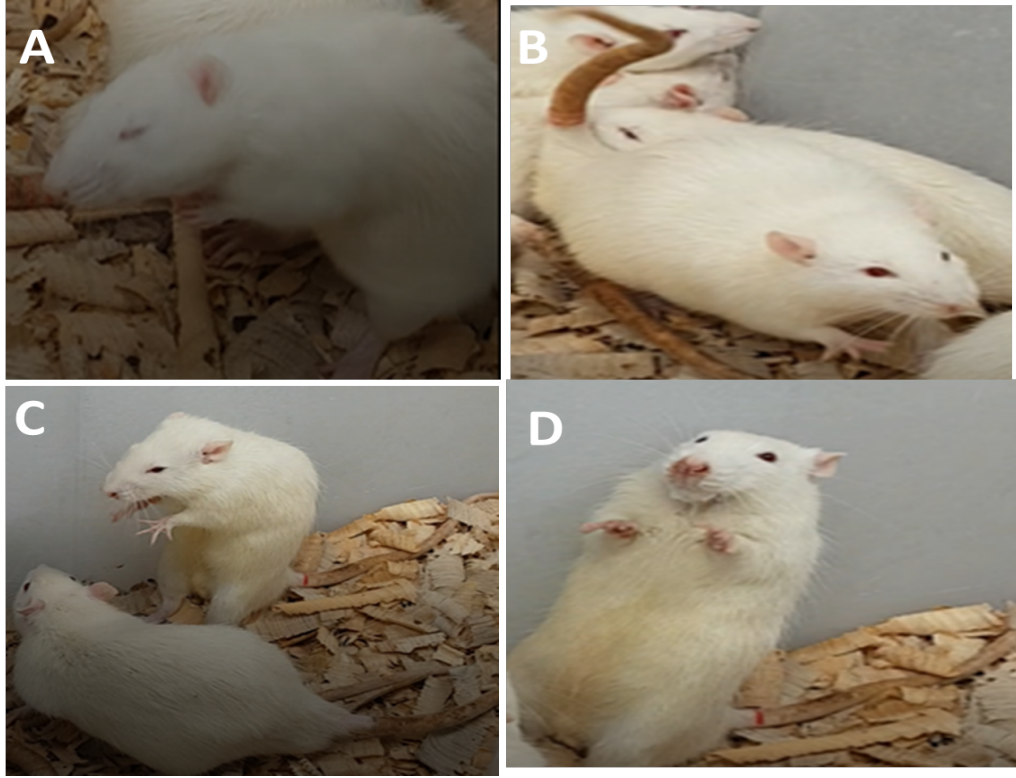
oluşturur (24). Çalışmamızda hayvanlarda epilepsi oluşumu nöbet (status epileptikus) geçirilmesi ile belirlenmiştir ve nöbetler derecelendirilmiştir. Enjeksiyondan sonra tüm sıçanlar izlenmiş ve video kayıtları alınmıştır (Şekil 14). İntrahipokampal KA uygulanmış hayvanlar anesteziden uyandıktan ortalama 2 saat sonra ve intraperitoneal KA uygulamasından ortalama 20 dakika ila 3 saat sonra nöbet geçirdiği gözlenmiştir ki bu veri literatürle uyumludur (117,118). Bu sürede nöbet geçirmeyen hayvanlar KA'ya karşı dirençli olabilecekleri düşünülerek çalışma sonuçlarının standardizasyonu için çalışmadan çıkarılmıştır.



**Şekil 14:** Video görüntüleme ve davranışsal değerlendirme sistemi

Nöbet değerlendirmesi, Racine'nin nöbet sınıflandırmasına dayanarak yapılmıştır (119). Kullanılacak değerlendirmeler şu şekildedir: reaksiyon yoksa 0; stereotipik ağız hareketleri, göz kırpması ve hafif fasiyal klonuslar var ise 1; kafa sallama ve çoklu fasiyal klonuslar varsa 2; ön ekstremitelerde ani myoklonik refleksler ve seyirmeler gözlenirse 3, ön ekstremitelerde klonik konvülsiyonlar ve ayağa kalkma hareketleri meydana gelirse 4, genel klonik konvülsiyonlar ve denge kaybı gözlenirse 5 puanlama değeri kullanılacaktır (Şekil 15). Status epileptikus en az 40 dakika süren generalize konvülsiyonlar olarak tanımlanmaktadır ve Racine'in sınıflandırmasında 4. ve 5. puanlama derecesi status epileptikus kapsamına girmektedir (117). Bu nedenle sadece 4. ve 5. dereceye ulaşarak status epileptikus geçiren hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir.





**Şekil 15:** KA ile tedavi edilen sıçanlarda nöbet derecelerinin gösterilmesi

A) Wet-Dog shake (Islak köpek tarzı silkelene) B) Ön ekstremitelerde klonus C) Ayağa kalkma, şahlanma D) Tonik-klonik aktivite, postür kaybı ve ardından düşme, ekzoftalmi ve tükürük salgılanması eşliğinde

Deneyin sonlandırılmasında anestezi altında servikal dislokasyon kullanılmıştır. Enjeksiyon sonrası hem i.p. hem de intrahipokampal uygulama grubunda bölüm 2.1.1 ve 2.1.2’de belirtildiği gibi farklı zamanda (ilk nöbetten 1 gün, 3 gün, 5 gün, 10 gün, 15 gün, 30 gün, 60 gün, 90 gün sonra) örnekleme yapılarak nöbet sonrası zamansal değişimler ortaya konulmuştur. Deney sonunda beyin bölgeleri buz üzerinde disekte edilmiştir.

#### **2.1.4. Kesit Alma Aşamaları**

Kesitler Leica marka frozen mikrotom kullanılarak alındı. Dondurucudan çıkarılan beyin örnekleri önce 15 dk mikrotom içerisinde -20°C ye uyum sağlayana kadar beklendi. Bu aşama kesit alırken doku yırtılması olmaması adına önemlidir.

Daha sonra beynin kaudal kısmı bir bistüri ile düz olacak şekilde kesildi ve doku gömme maddesi ile mikrotom'un tutucu kısmına sabitlendi. Ön çalışmamızda 8-20  $\mu\text{m}$  aralığında bir kalınlığa sahip bir kesitin otoradyografi çalışması için uygun olduğu anlaşıldı. Hedef proteinin ölçülmesi istenilen her bir bölge (Region of interest, ROI) anatomik veya histolojik hücre tabakaları, sıçan beyin atlasına göre belirlendi ve kesitler sıçan beyin atlasında belirtilen bregmaya olan uzaklıklarına uygun şekilde alındı. Her bir ROI için bir lam üzerine 4 veya 5 ardışık kesit alınarak teknik replikalar oluşturuldu. Ayrıca bir hayvan için bu şekilde en az 3 lam oluşturuldu (Şekil 16).



**Şekil 16:** Kesit alma aşamaları

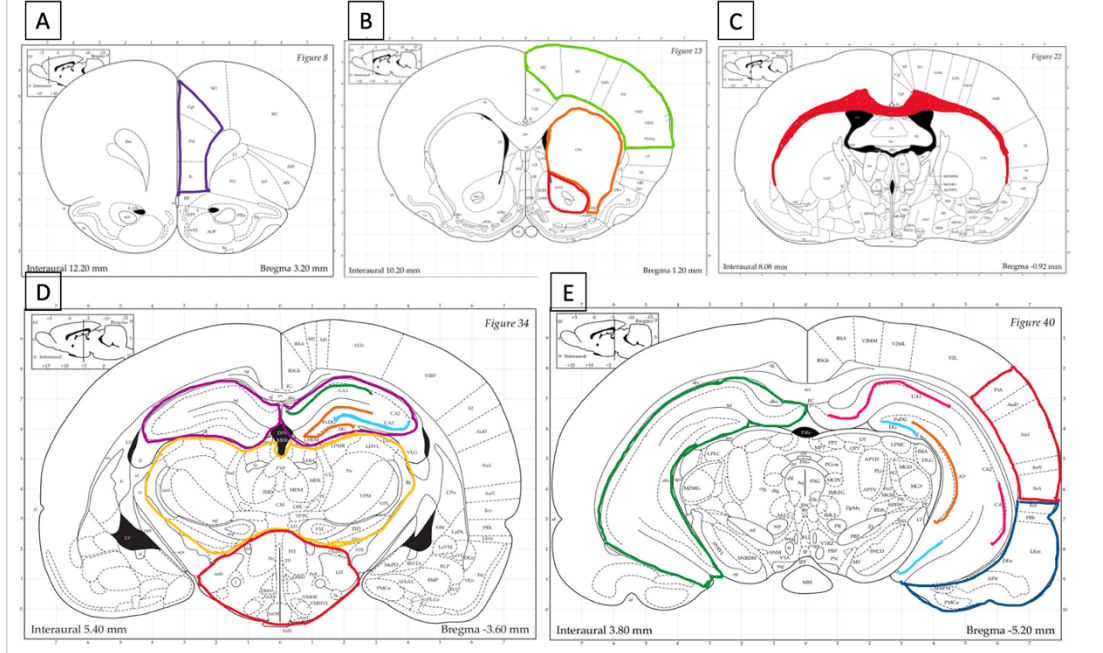
### 2.1.5. Hedef Bölgeler (ROI)

Kesitin bregmaya olan uzaklığı (mm)	ROI (Hedef bölge)	Sağ	Sol	Total
+3.2	Prefrontal Korteks	+	+	+
	Orbitofrontal Korteks	+	+	+
	Singulat Korteks	+	+	+
+1.2	Striatum (CPU)	+	+	+
	Sensori-Motor Korteks	+	+	+
	Nukleus Akumbens	+	+	+
-0.9	Korpus Kallosum	-	-	+
-3.6	Ca1	+	+	-
	Ca3	+	+	-
	Dentate Girus	+	+	-
	Talamus	-	-	+
	Hipotalamus	-	-	+
	Temporal Korteks	+	+	+
-5.2	Piriform Korteks	+	+	+
	Ventral Hipokampus	+	+	+
	dCA1	+	+	-
	vCA1	+	+	-
	Dentat Girus GD (granular dorsal)	+	+	-
	Dentat Girus GD (granular ventral)	+	+	-
	vCA3	+	+	-

**Tablo 6:** Ölçüm yapılan ROI'lerin tablo halinde verilmesi

Tablo 6'da hedef proteine bağlanan radyoligandın bağlanma seviyesinin ölçüleceği bölgeler ve atlasla göre anatomik pozisyonları ve adlandırılmaları belirtilmiştir. Ayrıca enjeksiyon yapılan taraf ile yapılmayan taraf arasında bir

karşılaştırma yapıp yapılmadığı da spesifik olarak o bölge için belirtilmiştir. Şekil 17’de ise atlas üzerinde ölçüm yapılan ROI’lerin sınırları renkli çizilerek gösterilmiştir.



**Şekil 17:** Ölçüm yapılan ROI’lerin atlas üzerinde sınırlarının gösterilmesi

Bregmaya olan mesafelerine göre A) +3.2 mm B)+1.2 mm C) -0.92 mm D) -3.6 mm E) -5.2 mm

## 2.1.6. Radyoligand Bağlama Çalışması

### 2.1.6.1. [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin memeli sinir dokusunda bağlanma özelliklerinin belirlenmesi

Öncelikle protokolün optimize edilmesi için otoradyografi kullanılarak, SV2A'yı hedefleyen radyoligand [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin bağlanma özellikleri, sıçan, domuz ve insan olmak üzere üç memeli türünün serebral korteksinde araştırıldı.

Otoradyografinin doğrulanması ve optimizasyonu için sıçan beyinleri kullanıldı. Ancak bu sıçanlar yukarıda *in vivo* temporal lob epilepsisi modelinin oluşturulmasında kullanılan sıçanlardan bağımsız sıçanlardır ve Kopenhag üniversitesi vivaryum’undan uygun etik kurulla elde edilmiştir. Bu çalışmalarda bir dişi Sprague Dawley sıçanı (Charles River (Almanya)) ve bir erkek Long Evans sıçanı (Charles River (Almanya)) kullanıldı. Sprague Dawley sıçanı 12 haftalıkken ve Long Evans 20



haftalıkken (~400g) sakrifiye edildi. Beyinler hızla çıkarıldı ve tamamen donana kadar toz haline getirilmiş kuru buz üzerine yerleştirildi. Ayrıca 9 haftalıkken (~ 20 kg) sakrifiye edilen bir dişi evcil domuzdan (ID #123) bir domuz beyni elde edildi.

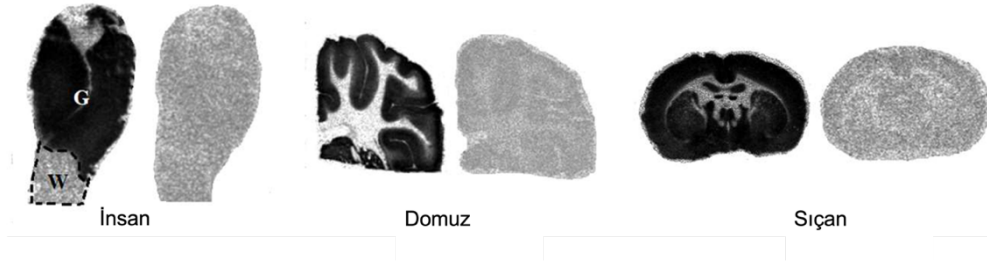
İnsan korteksi, ilaca dirençli temporal lob epilepsisinin tedavisi için beyin cerrahisi sırasında temporal korteksin bölümlerinin rezeksiyonu yapılan 38 yaşındaki bir kadın hastadan (Hasta kodu: HB53) elde edildi. Doğrulama için kullanılan tüm beyinlerden, bir kriyostat kullanılarak 20 µm kalınlığında sıçanlar için koronal olmak kaydıyla kesitler alındı ve önceden pozitif yükü kaplanmış lamlara yerleştirildi (Superfrost PLUS kat. # J1800AMNZ, Thermo Scientific). Kesitler daha sonra oda sıcaklığında bir saate kadar kurutuldu ve kullanıma kadar -80°C'de saklandı.

Kullanılan bileşikler ve radyoligand işaretleyici-izleyiciler:

Radyoligandlar yani [<sup>3</sup>H]UCB-J (UCB1537649, (R)-1-((3-((11)C-metil-(11)C)piridin-4-il)metil)-4-(3,4,5-triflorofenil)pirrolidin-2 - bir) bileşikler, UCB pharma şirketi (Braine l'Alleud, Belçika)'nde sentezlendi ve Quotient Bioresearch Ltd. (Birleşik Krallık) tarafından radyo-etiketlendi. Bu bileşiğin spesifik aktivitesi 24 Ci/mmol ve radyokimyasal konsantrasyonu 1 mCi/mL (20.04.2016) olarak belirlendi. Her deney için deney gününe ait spesifik aktivite belirlendi.

Brivaracetam (BRIVIACT, 10 mg/mL) ve Levetiracetam (KEPPRA, 100 mg/mL), farmasötik ürünler olarak UCB Pharma S.A'dan (Brüksel, Belçika) elde edildi ve Rigshospitalet'teki eczane tarafından sağlandı.

Her üç türden (insan, domuz, sıçan) elde edilen beyin kesitleri hem gri hem de beyaz madde içeriyordu. SV2A, presinaptik veziküllerin zarında konumlandığı için, kesitlerin sadece gri cevher kısımlarında [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanması gözlemlendi beyaz cevherde gözlenmedi (Şekil 18). İnkübasyon solüsyonuna [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin yanı sıra 10 mM olan yüksek bir Levetiracetam konsantrasyonunun eklenmesiyle, radyoligandın neredeyse tamamen uzaklaştığı ve bağlanma göstermediği gözlemlendi. Bu, [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin bağlanmasının SV2A'ya yani sinapslara özgü olduğunu göstermektedir.



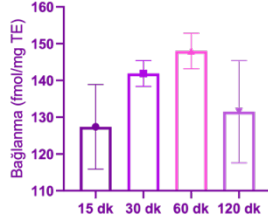
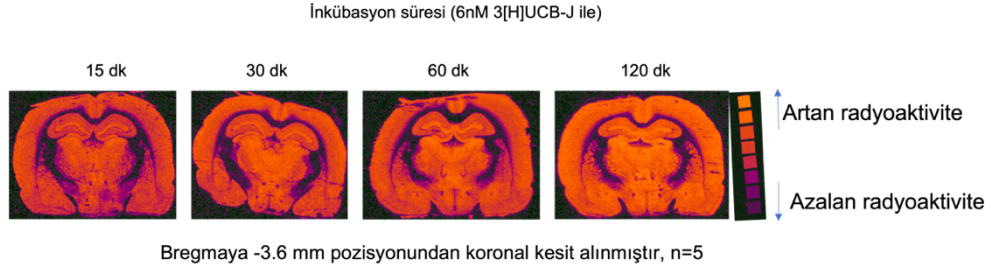
**Şekil 18:** İnsan, domuz ve sıçan bölümlerinin görüntüsü

(Bu çalışma V. Fagerholt ile iş birliği içinde yürütülmüştür.)

Gri ve beyaz cevher, insan kesitinde sırasıyla G ve W kısaltmaları ile gösterilmektedir. Her tür için sol taraftaki kesitler 6 nM [<sup>3</sup>H]UCB-J ile inkübe edildi ve total bağlanma gösterildi. Sağ taraftaki kesitler ise 6 nM [<sup>3</sup>H]UCB-J ve 10 mM levetirasetam ile inkübe edildi ve spesifik olmayan bağlanma gösterildi. Soldaki total bağlanma kesitlerinde tüm gri cevher siyahtır, bu da neredeyse hiç bağlanmanın görülmeyeceği beyaz cevhere kıyasla gri cevherde [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin yüksek oranda bağlandığını gösterir. Spesifik olmayan bağlanmayı gösteren kesitlerde neredeyse hiçbir [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanması gözlemlenmedi. Ancak yine de spesifik bağlanmanın hesaplanması TB-NSB=SB olacak şekilde hesaplandı.

#### 2.1.6.2. İnkübasyon ve maruz kalma süresinin belirlenmesi

[<sup>3</sup>H]UCB-J'nin beyin kesitlerine bağlanması için yeterli olan optimal inkübasyon süresini belirlemek için, sıçan beyin kesitleri artan sürelerde (15, 30, 60, 120 dakika) 6 nM [<sup>3</sup>H]UCB-J ile inkübe edildi. Beyin kesitlerinden elde edilen bağlanma sonuçlarına göre farklı inkübasyon sürelerinin bağlanma düzeylerine pek etkisi olmamıştır. Bu analizin sonucunda bağlanma düzeyleri, [<sup>3</sup>H]UCB-J ile 15 dakika  $127.4 \pm 11.5$  fmol/mg tissue equivalent (TE), 30 dakika  $141.9 \pm 3.5$  fmol/mg TE, 60 dakikada inkübasyon için  $148 \pm 4.8$  fmol/mg ve 120 dakikada inkübe edilen kesitler için  $131.5 \pm 13.9$  fmol/mg TE olarak belirlenmiştir. Normalde tam bağlanma için 15 dk yeterli olsa da uzun süreli inkübasyonun spesifik olmayan bağlanmayı artırmaması gerçeği ile, doku mevcudiyeti ve bütünlüğünün bozulmamasını da dikkate alarak doygunluğa tam ulaşmayı sağlamak için bu tezdeki deneylerde inkübasyon 60 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 19).



**Şekil 19:** Sıçan beyin kesitlerinde radyoligandın inkübasyon süresinin test edilmesi

Kesitler, görüntüleme plakasına (fosfor plake) maruz kaldıktan beş gün sonra görüntülendi. Her zaman noktası için temsili bir bölüm gösterilmiştir

#### 2.1.6.3. Saturasyon deneyleri

Daha önce açıklanan deneysel koşullar ve tampon çözeltiler, saturasyon analizi için de kullanıldı. Saturasyon analizinin inkübasyon kısmı için, kesitler (n = 6), [<sup>3</sup>H]-UCB-J'nin değişen konsantrasyonlarını (0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 12 nM) içeren ön yıkama tamponu (5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EGTA ve %0.5 BSA (pH 7.4) yani 50 mM Tris-HCl tamponu) içinde inkübe edildi ve toplam bağlama (TB) belirlendi. Spesifik olmayan bağlanma (NSB)'nın belirlenmesi için aynı değişen ve konsantrasyonda [<sup>3</sup>H]UCB-J içeren tampon solüsyonu serisine ek olarak her birine 10 mM Levetirasetam (Keppra, UCB pharma, Brüksel, Belçika) eklenerek ikinci bir seri oluşturuldu. Kesitler 60 dakika bu solüsyonlarda inkübe edildi. İnkübasyonun sonlandırılması için kesitlere 4°C'de ön inkübasyon tamponu ile 5 dakikalık üç yıkama yapıldı ve ardından yine 4°C'de deiyonize H<sub>2</sub>O (dH<sub>2</sub>O) içinde hızlı durulama yapıldı.

Yıkandıktan sonra, lamalar hızla havada kurutuldu ve bir paraformaldehit buhar odasında gece boyunca soğuk depoda (4°C) sabitlendi. Ertesi gün, kesitler fazla nemi gidermek için 45-60 dakika bir eksikatöre taşındı ve daha sonra trityum duyarlı görüntü plakaları (BAS-IP TR2040, Science Imaging Scandinavia AB, Nacka, İsveç)

ile otoradyografi için bir kasete yerleştirildi aynı kasete radyoaktif trityum standartları ARC (American Radiolabeled Chemicals, Inc, ABD) ve [<sup>3</sup>H] mikro ölçekli Batch 21A (GE Healthcare, UK) da eklendi. Görüntü plakaları üç gün boyunca radyoaktif maddeyle muamele edilen lamlara maruz bırakıldı. Pozlamadan sonra, görüntü plakaları bir Fujifilm BAS 1000 tarayıcı (Fujifilm Europe, GmbH, Duesseldorf, Almanya) kullanılarak okundu. Kalibrasyon, kantifikasyon ve veri değerlendirmesi Image J yazılımı (NIH Image, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak yapıldı.

Decay correction yani zamana bağlı radyoaktif bozunma miktarının düzeltilerek hesaplandığı trityum standartlarının dört parametrelili genel eğri uyumu (David Rodbard, NIH), ortalama piksel yoğunluğunu (gri tonlamalı) mg doku başına nanocurie cinsinden hesaplanan radyoaktivite miktarına yani nCi/mg TE (Tissue equivalent)'ye dönüştürmek için kullanıldı. TB, lamlarda kortikal gri cevherde belirlenirken; NSB levetirasetam uygulanan kesitlerin gri cevherinde ve tüm lamlarının kortikal beyaz maddesinde belirlendi. Son olarak, radyoligandın bozunma düzeyi ile düzeltilmiş spesifik aktivitesi nCi/mg TE'yi fmol/mg TE'ye dönüştürmek için kullanıldı. Spesifik bağlanma, TB ve NSB arasındaki fark olarak hesaplandı.

Veriler, GraphPad Prism (v. 9.0.0; GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak analiz edildi. Tüm radyoligandlar için doğrusal olmayan regresyon analizi (One site-Fit total ve non-specific binding) kullanıldı. Doygunluk deneyleri için kullanılan curve fitting, "one-site fitting total and non-specific binding fonksiyonu" idi. Kullanılan fitting yöntemi, "regression with no weighting" idi. Bu deneyin sonunda K<sub>D</sub> ve B max değerleri belirlendi, bu değerler bir canlıya ait doku örneğinde hedef proteini görüntülemek için gereken radyoişaretleyicinin inkübasyonda kullanılması gereken konsantrasyonunu ve dokudaki beklenen maksimum bağlanma düzeyini belirlememize yardımcı olmuştur.

#### 2.1.6.4. İnhibisyon (Displacement/Uzaklaştırma) deneyleri

İnhibisyon veya rekabetçi bağlanma çalışması için koronal beyin bölümleri kullanıldı. Bu aşamada kullanılan tüm otoradyografi prosedürü yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sadece [<sup>3</sup>H]UCB-J radyoligandının bağlanmasını inhibe edebilecek 3 farklı soğuk ligandın farklı konsantrasyonları ile 3 farklı seride

inkübasyon gerçekleştirilmiştir. SV2A proteinine bağlanan ancak bağlandığı için radyoligandın bağlanmasını engelleyerek ışınmaya meydana gelmesini engelleyen ligandlara bu aşamada soğuk ligand adı verilmiştir. Otoradyografi prosedüründe her bir kesit 6 nM [<sup>3</sup>H]UCB-J konsantrasyonu içeren solüsyona sokulurken, aynı solüsyona artan konsantrasyonlarda soğuk ligandlar yani levetirasetam (0 µM – 27.3 mM), brivaracetam (0 µM – 3.03 mM) ve UCB-J (radyo-işaretsiz) (0 µM – 37.5 µM) ilave edilmiştir. Bu deneyin sonunda log IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, K<sub>i</sub> gibi değerler genel bilgi kısmında verilen denklemlerle belirlenmiştir. Bu değerler bir radyoligandın bağlanmasının inhibe edilerek tamamen uzaklaştırılması için gereken soğuk liganda ait konsantrasyon değerlerini belirlememize yardımcı olmaktadır.

#### 2.1.6.5. Sistemik ve lokal KA uygulaması yapılan sıçanlardan elde edilen beyin kesitlerinde yapılan bağlanma deneyi

Her hayvandan (n=8) 20 µm kalınlığında seri koronal kesitler, süper donmuş cam lamlara (Thermo scientific) monte edildi. Beyin kesitleri, % 0.5 bovin serum albümini (BSA), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA içeren 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.4) içinde oda sıcaklığında 10 dakika boyunca iki kez önceden inkübe edildi. Önceki doygunluk bağlama çalışmalarımıza göre, 6 nM [<sup>3</sup>H]-UCB-J tam doygunluk gösterdi (Sonuçlara 3.1.2.1 bölümünden ulaşılabilir). Bu nedenle inkübasyon, 6 nM [<sup>3</sup>H]-UCB-J (UCB Pharma, Belçika) içeren bir ön inkübasyon tamponu içinde 60 dakika boyunca gerçekleştirildi. Daha sonra, lamlar 10 dakika boyunca buz gibi soğuk bir ön inkübasyon tamponunda iki kez yıkandı ve bir paraformaldehit odasında gece boyunca kurutulmadan önce kısa bir süre buz gibi distile suya daldırıldı. Lamlar daha sonra [<sup>3</sup>H] standart ARC (American Radiolabeled Chemicals, Inc, ABD) ve [<sup>3</sup>H] mikro ölçekli Batch 21A (GE Healthcare, UK) ile birlikte 4°C'de üç gün boyunca FUJI görüntüleme fosfor plakalarına maruz bırakıldı.

Radyoligandla bağlanmış lamların fosfor plakalara maruziyetinden sonra görüntü plakası bir FUJIFILM Biyo-Görüntüleme Analizörü BAS-2500 cihazı ile tarandı. Cihazın ayarları standart ayarlar olarak belirlendi (standart ayarlar: resolution 100, gradation 16bit, dynamic range selector L5 S100 (latitude and sensitivity)). Otoradyogramları içeren görüntü dosyaları, görüntü dosyalarını açmak için ISAC

eklentisi kullanılarak “Fiji, ImageJ” yazılımı kullanılarak analiz edildi. [<sup>3</sup>H] mikro ölçekli standardının (ARC) gri değerlerinden ve bilinen mevcut [3H] konsantrasyonlarından (0.561-27.3 nCi/mg TE) standart bir eğri oluşturuldu. Her görüntü dosyası için (ROI) Fijiden ölçülen gri seviyelerin radyoaktivite seviyelerine dönüştürülmesi için standart eğrilerden interpolasyon yapıldı. Buna izin veren Rodboard işlevi kullanılarak her bir gri değer için bilinen radyoaktivite değerlerinden kurulan standart eğriden bilinmeyen radyoaktivite düzeyleri belirlendi (120). Her doku kesiti için üçlü ölçümler yapılarak teknik replikalar oluşturuldu.

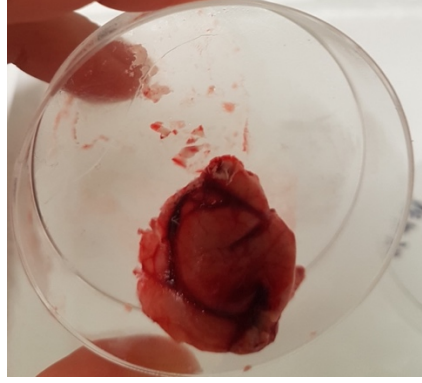
Beyaz cevher bağlanması, spesifik olmayan bir bağlanma olarak belirlendi. Beyaz cevherdeki bağlanma ölçüldü ve ROI ölçümlerinin gri cevher değerlerinden çıkarıldı. Gri cevher optik yoğunlukları, bilinen konsantrasyonların [nCi/mg] standartlarıyla ilişkilendirildi. İnterpolasyonlu değerler daha sonra dokudaki bağlı radyoligand [fmol/mg TE] miktarına hesaplandı.

## **2.2. Temporal Lob Epilepsisi Hastalarından Elde Edilen Doku Üzerine Analizler**

### **2.2.1. Biyopsilerin Toplanması ve Hasta Onamı**

Operasyondan önce her hastadan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Çalışma tasarımı Rigshospitalet, University of Copenhagen kurumuna ait klinik araştırmalar yerel etik kurulu tarafından onaylanmıştır (Ethical statement no: H-2-2011-104). En az 2 ila 3 anti epileptik ilaca yanıt vermeyen ve nöbetleri kontrol altına alınamayan ilaca dirençli tip hastalar Copenhagen University, Neurocentre, Epilepsy Clinic departmanında görev yapan nörolog Prof. Dr. Lars Hageman Pinborg (MD, Ph.D.) tarafından EEG ve Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) bulguları da dikkate alınarak cerrahi rezeksiyona yönlendirilmiştir. Cerrahi işlemler Nöroşirurji Profesörü Jesper Bo tarafından gerçekleştirilmiştir. Klinik değerlendirmeler, semptomatik bulgular, MRG ve EEG bulguları ışığında hasta onayı ile anestezi altında cerrahi işlemler yapılmıştır. Çalışmanın bu kısmı, Üniversite Hastanesi Kopenhag Nöroloji Departmanındaki nörologlar ve nöroşirurji uzmanları tarafından gerçekleştirildi. Tez kapsamında cerrahi müdahaleler yer almadığı için işlemin

detaylarının verilmesi uygun bulunmamış sadece rezekte dokunun özellikleri verilmiştir. Okuyucunun anatomik olarak çıkarılan biyopsiye dair fikir elde edebilmesi için kısa bir bilgi sağlanmıştır (Detaylı bilgi için 2.2.2.). Rezeksiyondan saniyeler içerisinde elde edilen doku kuru buzda dondurulup (Şekil 20), sonraki analizler için biyobankaya transfer edilmiş ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.



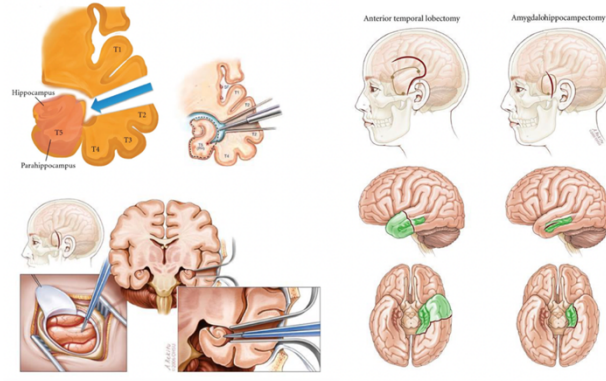
**Şekil 20:** Bir TLE hastasına ait rezekte doku örneği

Epilepsi cerrahisi için hasta seçimi, önce cerrahi öncesi değerlendirmeden faydalanması gereken potansiyel cerrahi adaylarını belirlemeyi ve ardından değerlendirilen her bir bireyde cerrahi için *risk: yarar* oranının kabul edilebilir olup olmadığını belirlemeyi amaçlayan iki aşamalı bir prosedürdür. İlk adıma girmek için üç ana kriter yerine getirilmelidir: (i) hasta (veya küçük çocuklar ve zihinsel engelli hastalar için ebeveynleri) cerrahi öncesi değerlendirmenin amacını anlamalı ve cerrahi tedavi olasılığı üzerinde anlaşmaya varmalıdır. (ii) hasta, uygun tıbbi tedaviye rağmen, engelleyici nöbetler geçirmelidir ve (iii) mevcut görüntüleme ve elektroklinik veriler, cerrahi olarak tedavi edilebilir bir epileptik sendrom olasılığı ile tutarlı olmalıdır (121). Ayrıca spesifik olarak hastanın uzun süredir terapi gördüğü 2 veya 3 antiepileptik ilaçtan faydalanmaması, nöbetlerin mezial temporal lob başlangıçlı oluşu, hastada ani epileptik nöbet bağlı ölüm (SUDEP) riskinin artması, nöbetlerin auralı oluşu (tipik olarak koku, epigastrik duyu, korku, déjà vu), MRG bulgularında mezial temporal skleroz pozitif (MTS+) veya negatif (MTS-) olması, video EEG telemetrisi ile ön temporal bölgeye lateralize (örn., F7/T1 veya F8/T2) iktal ve interiktal deşarjların varlığı ile epileptojeniz zonun sınırlarının belirlenebiliyor oluşu, EEG bulguları ile aynı tarafta lateralize veya daha büyük olan temporal lob

hipometabolizması, nöropsikolojik bozukluklar ve hafıza kayıpları hastanın cerrahiye aday olduğuna işaret eder (122).

### 2.2.2. Temporal Lobe Epilepsisi'nde Lobektomi ve Cerrahi Prosedür

Orta fossa ile aynı hizada olacak şekilde ve Sylvian fissürü açığa çıkaracak şekilde bir temporal kraniotomi yapılır. Rezeksiyonun posterior genişliği baskın temporal lobda 4,5 cm, baskın olmayan lobda ise 5,5 cm olarak belirlenir. İlk aşama, koronal düzlemde temporal boynuzu medial sınır olarak tutarken, lateral neokorteksin ve Sylvian fissürüne paralel olan fusiform girusun bir bölümünün çıkarılmasından oluşur. Daha sonra amigdala, unkus, fimbria, hipokampus ve kollateral eminens tespit edilir, kesilir ve işlemi tamamlamak için parahipokampal girus ile birlikte rezeke edilir (123). İki temel yaklaşımla epileptojenik zon çıkarılır. Bu yaklaşımlar 1) anterior temporal lobektomi 2) spesifik amygdalaoidal hipokampal diseksiyondur (Şekil 21).



**Şekil 21:** Temporal lobektomi aşamaları ve anterior temporal lobektomi ve amigdalohippokampektominin şematize özeti (124)

### 2.2.3. Hastalara Ait Veriler

İnsan neokorteks örnekleri, Kopenhag, Rigshospitalet'teki Nöroloji ve Nöroşirürji Departmanında temporal lob rezeksiyonu ameliyatı geçiren ilaca dirençli temporal lob epilepsi hastalarından alındı. Bu çalışmada epileptojenik bölge olan hipokampüse ulaşmak için çıkarılan temporal neokorteks dokusu kullanılmıştır. Çalışma Danimarka Başkent Bölgesindeki Etik Kurul tarafından onaylandı (H-2-



2011-104) ve ameliyattan önce tüm hastalardan yazılı bilgilendirilmiş onam alındı. Tablo 7, çalışmada kortikal dokusu kullanılan 22 TLE hastası (13 kadın ve 9 erkek, yaşları 18-58) hakkında bilgi vermektedir. Nöbet tipi tüm hastalar için Fokal Bozulmuş Farkındalık Nöbetleri (Focal Impaired Awareness Seizure, FIAS) idi ancak değişken sıklıklarda idi (1 ila 12 nöbet/ay). Kişilerin epilepsiden muzdarip olma süreleri yani epilepsi süresi 4-44,5 yıl aralığında idi. MRG sonuçlarına göre 3 hasta dışında tüm hastalarda MTS bulgusu görüldü. Hipokampusun histopatolojik incelemesi ile de teyit edildiği gibi hastalardan biri histolojik olarak normal hipokampusa sahipken, 20 hastada hipokampal skleroz (HS), bir hastada gliozis saptandı. Ancak, hemen hemen tüm hastalarda histopatolojik incelemeye göre kortikal doku normaldi, ancak 2 hastada fokal kortikal displazi (FCD) tespit edildi. Tüm hastalar için, rezekt edilen alanı yani hem hipokampus hem de neokorteksi içeren alanda EEG parametrelerinde anormallikler vardı. İncelenen temporal kortekste iktal veya interiktal aktivitelerin varlığı gibi kalitatif EEG bulguları da Tablo 7'de belirtilmiştir. Önceki veya yeni ilaç tedavileri ve son levetirasetam dozundan rezeksiyona kadar geçen süre Tablo 7'de listelenmiştir.

Örnek	Cinsiyet	Cerrahi Girişim Sırasındaki Yaşı	Epilepsi Hastası Olması Süresi (Yıl)	Nöbet Tipi	Nöbet Sıklığı (Kez/Ay)	İnteriktal EEG (Dominant)	İktal EEG	MRG Bulgusu	Histo-Patolojik Bulgu	LEV veya BRIVA Geçmişi	Cerrahi Operasyona Yakın Zamanda Kullanılan Antiepileptik İlaç	Son LEV Dozundan Rezeksiyona Kadar Geçen Süre (Saat)
HB2	E	50	44,5	FIAS	1	n.a.	n.a.	Sağ MTS	HS, korteks normal	-	OXC + PN Clonazepam	n.r.
HB4	K	58	11	FIAS	5,5	n.a.	n.a.	Sol MTS	HS, korteks normal	LEV	LTG, TPM	n.r.
HB5	E	30	17	FIAS	5	n.a.	n.a.	Normal	Hipokampus n.a., korteks normal	LEV	LEV	4s
HB8	K	42	39	FIAS	2,5	n.a.	n.a.	MTS	HS, korteks normal	LEV	LEV, CBZ, CLB	4s
HB9	K	41	25	FIAS	1	Sağ Temporal Korteks	Sağ Temporal Korteks	Normal	Normal	LEV	LAC, LEV	7s
HB10	E	57	4	FIAS	2	Sol Temporal Korteks	Sol Temporal Korteks	MTS	HS, korteks normal	-	LAC, VPA, CBZ	n.r.
HB11	E	33	17	FIAS	2	n.a.	n.a.	MTS	HS, korteks normal	LEV	LAC, TPM	n.r.

<b>HB12</b>	K	56	5	FIAS	10	n.a.	n.a.	MTS	HS, korteks normal	LEV	TPM, LEV	4s
<b>HB14</b>	K	33	5	FIAS	8	n.a.	n.a.	MTS	HS, korteks normal	LEV	TPM, LEV	4s
<b>HB15</b>	E	28	15	FIAS	4	n.a.	n.a.	MTS	HS, korteks FCD	LEV	OXC, TPM, LEV	4s
<b>HB16</b>	E	47	18	FIAS	3	Sol Temporal Korteks	Sol Temporal Korteks	MTS	HS, korteks normal	LEV	VPA, LTG, LAC, TPM	n.r.
<b>HB18</b>	K	55	52	FIAS	2	n.a.	n.a.	MTS	HS, korteks normal	LEV	CBZ, ZNS	n.r.
<b>HB20</b>	K	18	9	FIAS	7	n.a.	n.a.	MTS	HS, korteks normal	LEV	LEV	7s
<b>HB21</b>	E	49	25	FIAS	3	n.a.	n.a.	MTS	Hipokampuste Gliosis, korteks normal	-	LTG, LAC, CBZ	n.r.
<b>HB27</b>	E	39	36	FIAS	3,5	n.a.	n.a.	MTS	HS, korteks normal	LEV	PER, LAC, ZNS	n.r.
<b>HB29</b>	K	28	22	FIAS	4,5	Temporal Korteks	Temporal Korteks	MTS	Hipokampus n.a., korteks normal	LEV	LEV, CLB, LTG	4s

<b>HB33</b>	E	51	30	FIAS	3,5	Temporal Korteks	Temporal Korteks	MTS	Hipokampus n.a., korteks normal	LEV	LEV, LAC	4s
<b>HB34</b>	K	58	14	FIAS	3	Temporal Korteks	Temporal Korteks	MTS	Hipokampus n.a., cortex normal	LEV	LTG, LEV	4s
<b>HB48</b>	E	36	26	FIAS	12	Temporal Korteks	Temporal Korteks	MTS	HS, korteks normal	LEV	LTG, LEV	4s
<b>HB51</b>	K	44	6,5	FIAS	4,5	Temporal Korteks	Temporal Korteks	MTS	HS, korteks normal	LEV, BRI	LTG, ZNS, BRI	7s
<b>HB53</b>	K	38	35,5	FIAS	4,5	Temporal cortex	Temporal Korteks	Normal	Hipokampus normal, korteks FCD	LEV	FEN, LTG, LEV, LAC	7s
<b>HB55</b>	K	52	38	FIAS	4	Temporal Korteks	Temporal Korteks	MTS	HS, korteks normal	LEV	CBZ, LEV, LAC	4s

**Tablo 7:** TLE hastalarına ait klinik veriler

Hastaların hepsi Fokal Bozulmuş Farkındalık Nöbetleri (Focal İmpaired Awareness Seizure; FIAS) olarak bildirilen nöbet tipi olarak rapor edilmiştir. Diğer kısaltmalar şu şekildedir: Kadın (K), Erkek (E), MTS (Medial Temporal Skleroz), HS (Hipokampal Skleroz), FCD (Fokal Kortikal Displazi), MRG (Manyetik Rezonans Görüntüleme), EEG (Elektroensefalografi), AED'ler (Anti-epileptik ilaçlar); Karbamazepin (CBZ), Brivaracetam (BRI), Klobazam (CLB), Fenitoin (FEN), Lakozamid (LAC), Levetiracetam (LEV), Lamotrigin (LTG), Okskarbazepin (OXC), Valproat (VPA), Zonesamid (ZNS), Perampanel (PER), Pregabalin (PN), Topiramamat (TPM), n.r. (ilgili değil), n.a. (mevcut değil)

#### **2.2.4. *In-vitro* Otoradyografi İle İnsan Beyin Dokusunda UCB-J Bağlanma Karakterizasyonları ( $K_i$ , $IC_{50}$ , $K_D$ ve $B_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi)**

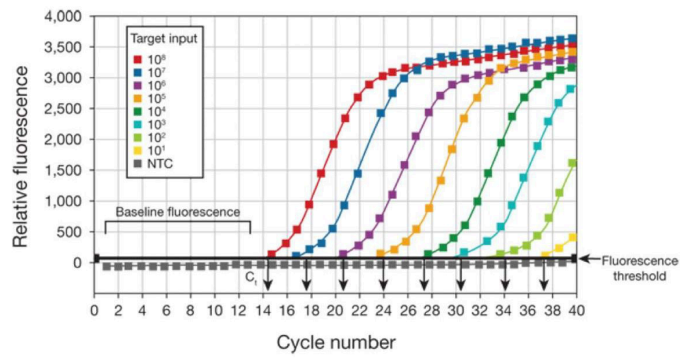
[<sup>3</sup>H]UCB-J radyo-izleyici kullanıldı. [<sup>3</sup>H]UCB-J, [<sup>3</sup>H]UCB1537649/UCB-J((R)-1-((3-((11)C-metil-(11)C)piridin-4-il)metil)-4- (3,4,5-trifloro fenil)pirolidin-2-on), UCB Pharma S.A. (Brüksel, Belçika) tarafından sentezlendi ve sağlandı ve Pharmarom, Quotient Bioresearch (Birleşik Krallık) tarafından radyo etiketlendi. [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin spesifik aktivitesi 24 Ci/mmol ve radyokimyasal konsantrasyonu 41.7 MBq (20.04.2016) idi. Radyo etiketli olmayan UCB-J, UCB Pharma (Brüksel, Belçika) tarafından sağlandı. Levetiracetam (Hospira, 100mg/mL) ve brivaracetam (Briviactâ 10mg/mL), UCB Pharma S.A.'dan (Brüksel, Belçika) satın alınmıştır.

Bölüm 2.1.6.3 ve 2.1.6.4'de de belirtildiği şekilde saturasyon ve inhibisyon/uzaklaştırma deneyleri yapıldı. Bu sayede belirlenen  $K_i$ ,  $IC_{50}$ ,  $K_D$  ve  $B_{max}$  değerleri yorumlanarak, sıçanlarda olduğu gibi insan dokusunda da SV2A proteinini tespit etmek için gereken radyoligand konsantrasyonu, dokuda beklenen maksimum bağlanma ve bu bağlanmanın spesifikliğini doğrulamak, SV2A'dan başka bir hedefe bağlanmadığını göstermek için 3 farklı soğuk liganda ait inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir.

#### **2.2.5. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile SV2 Gen Ailesine Ait Üyelerin Gen İfade Düzeylerinin Saptanması**

RT-qPCR, moleküler tıp, biyoteknoloji ve teşhiste nicel veri analizi gereksinimini karşılayan ve mRNA ölçümü için tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. PCR kullanılarak, DNA'da veya tamamlayıcı DNA (cDNA) şablonunda belirli bir dizi kopyalanabilir ve diziye özgü oligonükleotitler, ısıya dayanıklı DNA polimerazları ve termal döngü kullanılarak bir milyon katına yükseltilebilir. Konvansiyonel PCR yöntemleri kullanırken, jel elektroforezi ve görüntü analizi ile amplifikasyondan sonra saptama ve niceleme yapılmaktadır. Ancak, gerçek zamanlı veya nicel PCR'de (gerçek zamanlı PCR veya kantitatif PCR/qPCR), PCR ürünü her döngünün sonunda ölçülür ve nicelendirilir. RT-qPCR, floresan raportör boya kullanır ve hedef gene ait analiz, her PCR döngüsü sırasında üretilen DNA miktarıyla doğru orantılı olan floresan sinyalindeki artışın ölçülmesine dayanır. Bireysel

kuyucuklarda gerçekleşen reaksiyonlar, floresansın tanımlanmış bir eşik arka plan floresansının üzerine çıktığı, eşik döngüsü (Cycle threshold, Ct) veya geçiş noktası (Cycle crossing point, Cp) olarak bilinen bir parametre olan bir PCR döngüsü ile karakterize edilir. Hedef genin miktarı ne kadar yüksek olursa, Ct o kadar düşük olur, yani floresans ışımaya o kadar erken bir döngüde ortaya çıkar. Floresanın ışımaya miktarına karşı döngü numarasına ile bir grafik çizilir, sistem PCR döngülerinin çalışması sırasında ürün birikimini temsil eden bir amplifikasyon grafiği oluşturur (Şekil 22).



**Şekil 22:** Bağlı floresan ve döngü sayısı

Her numuneden gelen floresan sinyalini gösteren bir çizim, döngü numarasına karşı çizilir. <https://www.rhenium.co.il/curveshapes/> adresinden alınmıştır.

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonunda her döngü üç temel adım oluşmuştur ve 40 döngü boyunca çalıştırılmıştır.

**1. Denatürasyon (Denaturation):** Daha yüksek sıcaklıkta inkübasyon, çift iplikli dsDNA'yı tek iplikçikler (ssDNA) halinde "eritmek" ve ssDNA'daki ikincil yapıyı gevşetmek için kullanılmıştır. Genellikle, DNA polimeraz, aktivite kaybetmeden dayanabilir, tipik olarak 95 °C civarındadır. GC içeriğinin arttırılmasıyla denatürasyon sıcaklığı arttırılabilir.

**2. Bağlanma (Annealing):** Tamamlayıcı diziler bu adım sırasında hibritleştirilir, bu nedenle primerlerin erime sıcaklığına ( $T_m$ ) dayalı olarak uygun bir sıcaklık kullanılır. Genellikle, primerin ( $T_m$ ) değerinin beş °C altı seçilmiştir.

3. Uzatma (Extention): DNA polimerazın aktivitesi 70-72°C'de optimaldir ve primerlerin uzaması saniyede 100 baza kadar bir hızda meydana gelir.

Kantitatif ters transkripsiyon PCR (RT-qPCR), başlangıç materyali RNA olduğunda kullanılmıştır, burada RNA önce ters transkriptaz ile cDNA'ya kopyalanır, daha sonra qPCR reaksiyonu için bu üretilen cDNA şablon olarak kullanılır.

#### 2.2.5.1. Primerlerin Dizaynı

Primerler Primer-BLAST kullanılarak tasarlanmıştır ve aşağıdaki kriterler göz önünde bulundurulmuştur: Primer uzunluğu 18-25bp, ürün boyutu 70-200bp, erime sıcaklığı (Tm) 62-65 °C, ekson-intron bağlantı aralığı, GC içeriği 50- %60 olması şartıyla in silico olarak dizayn edilmiştir ve LGC Biosearch teknolojilerinden (Kopenhag, Danimarka) satın alınmıştır. Ayrıca, primerler primer-dimer yoksa ve 1.8-2.1 arasında bir etkinliğe sahipse kabul edilmiştir.

Gen	Gen Id	Sekans	Baz Çifti	Ürün Uzunluğu	Tm
SV2A	NM_014849.4	F:5'-AGCGTGATGCCTGTGTCTC-3'	20 bp	168 bp	59.97
		R:5'-GCCAAAAGCTGTGGTCCTCTT-3'	21 bp		59.96
SV2B	NM_001167580.2	F: 5'-TGCCCTGTACTGTGTGATGG	20 bp	70 bp	59.68
		R: 5'- CATGGCAAACCAAACCACGG	20 bp		60.60
SV2C	NM_014979.3	F:5'-ATGATCGGTGGCATCTACGC-3'	20 bp	117 bp	63.3
		R:5'-GACGATGACAAAACACGCC-3'	20 bp		62.6
GAPDH	NM_002046.7	F:5'-	23bp	113 bp	58.49
		CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3'	22bp		59.10
		R:5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'			

**Tablo 8:** SV2A, SV2B, SV2C ve GAPDH genlerine ati primerlerin özellikleri

#### 2.2.5.2. Doku homojenizasyonu ve RNA elde edilmesi

Toplam RNA, 22 TLE hastasının temporal korteks rezeksiyonlarından Quick-RNA MiniPrep Kiti (ZymoResearch, R10564) kullanılarak ekstre edildi.

Protokol şunlardan oluşur: (I) Tampon Hazırlama, (II) Numune Hazırlama ve (III) Toplam RNA Saflaştırma.

✓ 24 ml RNA Yıkama Tamponu konsantresine (Wash buffer concentrate) (R1054) 96 ml %100 etanol (104 ml %95 etanol) veya 48 ml RNA Yıkama Tamponu konsantresine (R1055) 192 ml %100 etanol (208 ml %95 etanol) eklendi

✓ Liyofilize DNaz I, DNaz/RNaz-içermeyen su ile sulandırıldı, nazikçe ters çevirerek karıştırıldı ve donmuş alikotlar su eklenerek saklandı

## **(II) Numune Hazırlama**

Tüm adımları oda sıcaklığında gerçekleştirildi ve 10.000-16.000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi.

1. Uygun miktarda taze veya donmuş numune RNA Lizis Tamponuna daldırıldı ve homojenize edildi
2. Partikül kalıntılarını gidermek için santrifüjlendi ve temizlenen süpernatantı nükleaz içermeyen bir tüpe aktarıldı

## **III) Toplam RNA Saflaştırması**

Tüm adımlar oda sıcaklığında gerçekleştirildi ve aksi belirtilmedikçe 10.000-16.000 x g'de 30 saniye santrifüjleme yapıldı.

1. RNA Lizis Tamponunda parçalanmış numuneyi bir Toplama Tüpündeki Spin-Away™ Filtresine (sarı) aktarıldı ve genomik DNA'nın çoğunu çıkarmak için santrifüjlendi.

Filtreden geçirilen sıvıyı saklandı

2. Filtrelenerek elde edilen sıvıya (1:1) hacim etanol (%95-100) eklendi ve iyice karıştırıldı. Ardından numune bir Toplama Tüpü içindeki bir Zymo-Spin™ III CG kolona (yeşil) aktarıldı. Bu sefer filtreden geçen sıvı atıldı.

3. Kolona DNase I uygulaması yapıldı

(D1) Kolon 400 µl RNA Yıkama Tamponu ile yıkandı ve santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı atıldı

(D2) Nükleaz içermeyen bir tüpte 5 µl DNase I (1 U/µl), 75 µl DNA Digestion Buffer eklendi ve karıştırıldı. Karışımı doğrudan kolon matrisine eklendi.



(D3) Kolon oda sıcaklığında (20-30°C) 15 dakika inkübe edildi.

4. Kolona 400 µl RNA Prep Buffer eklendi ve santrifüjlendi. Kolondan geçirilen sıvı atıldı

5. Kolona 700 µl RNA Yıkama Tamponu eklendi ve santrifüjlendi. Kolondan geçirilen sıvı atıldı

6. 400 µl RNA Yıkama Tamponu eklendi ve yıkama tamponunun tamamen çıkarılmasını sağlamak için kolonu 1 dakika santrifüjlendi. Ardından kolon dikkatli bir şekilde nükleaz içermeyen bir tüpe aktarıldı

7. 100 µl DNase/RNase-Free Water doğrudan kolon matrisine eklendi ve santrifüjlendi

#### 2.2.5.3. Nükleik Asit Saflığının ve konsantrasyonunun değerlendirilmesi

RNA içeriği, bir Nanodrop 2000 spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. Nükleik asit ve proteinler sırasıyla 260nm ve 280nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Absorbans oranı, nükleik asit ve protein ekstraksiyonundaki saflığı ölçmek için kullanılır. ~2.0 oranı genellikle RNA için "saf" olarak kabul edilir. Benzer şekilde, 230 nm'deki absorbans, diğer kontaminasyonların sonucu olarak kabul edilir; bu nedenle, A260/A230 oranı da sıklıkla hesaplanır ve genellikle 2.0 aralığındadır. Bununla birlikte, ekstraksiyon prosedürlerinden kaynaklanan artık kimyasal kontaminasyonlar, nükleik asit konsantrasyonunu tahmin ettiğimizden daha fazla etkileyebilir ve diğer analizlerin (cDNA eldesi ve PCR) sonucunu da etkileyebilir. Örneğin, düşük bir A260/A280 oranı, 280 nm veya daha azında kontaminasyondan kaynaklanabilir. Bu, ekstraksiyon işleminde kullanılan reaktiflerle ilişkili kalıntı fenol kontaminasyonundan kaynaklanabilir. Benzer şekilde, düşük bir A260/A230 oranı, 230 nm veya daha azında, bazı protokollerde çöktürme için kullanılan karbonhidrat, artık fenol, artık guanidin ve glikojen nedeniyle olabilir.

#### 2.2.5.4. Ters transkripsiyon ile cDNA sentezi

cDNA, ImProm-II™ Ters Transkripsiyon Sistemi (Promega, ABD) kullanılarak 0.2µg RNA'dan sentezlendi. Konsantrasyon bir spektrofotometre (NanoDrop, ABD) kullanılarak ölçüldükten sonra, numuneler 1 µl Oligo(dT)15 primer

(0.5 µg/reaksiyon) ile karıştırıldı ve bir iCycler (Bio-Rad) içinde 60 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve inkübasyondan sonra 5 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra ters transkripsiyon reaksiyon karışımı (ImProm-IITM 5X Reaksiyon tamponu, MgCl<sub>2</sub>, dNTP karışımı, rekombinant RNasin ribonükleaz inhibitörü, ImProm IITM Ters transkriptaz, nükleaz içermeyen su) her numuneye ilave edildi. Son olarak, örnekler cDNA sentezi için iCycler'a yerleştirildi. Ters transkripsiyon için kullanılan döngüler 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 15 dakika idi. cDNA örnekleri 2 dakika boyunca buz üzerine yerleştirildi, ardından 80 µl 0.5xTris-EDTA tamponu (Fluka 93302) eklendi ve -20 °C'de saklandı.

#### 2.2.5.5.RT-qPCR

RT-qPCR, 5 µl cDNA, 15 µl ana karışım (iQ SYBR® Green Supermix (BioRad, California, ABD) ve ana karışıma her primerden 15 pmol ekleyerek total 20 µl reaksiyon karışımında gerçekleştirildi. Light Cycler 480 Real-Time PCR Sistemi (Roche Diagnostics, IN) kullanılarak 40 ila 50 döngü için 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 15 saniye ve 72 °C'de 15 saniye ve ardından bir erime eğrisi programı ile sabit bir döngüsel reaksiyon kuruldu. Kalıp cDNA örneğinin eklenmediği kontrol (NTC), ve her örneğe ait pozitif kontrol üçer kopya halinde kuyucuklara ekildi ve her 96 kuyucuklu plaka için plakalar arası kalibratör de reaksiyoan dahil edildi, bu yaklaşım plakaları karşılaştırmamızı sağladı. Amplikonlar Tablo 8'de listelenen primer setleri kullanılarak üretildi. Housekeeping genlerin validasyonu yapıldı. GAPDH bu deney için internal kontrol yani housekeeping gen olarak seçildi ve tüm SV2 genlerinin ekspresyonu housekeeping geninin ekspresyonuna göre relatif olarak ölçüldü.

#### 2.2.5.6.İfade düzeylerinin hesaplanması

Cq değerleri ölçüldükten sonra, kalibratör örneğine göre test örneğindeki hedef genin ekspresyon düzeyini belirlemek için farklı yöntemler kullanılabilir. Bunlardan birincisi  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  denklemini kullanan Livak Yöntemidir (125).

Göreceli gen ekspresyon analizi için Livak yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır ve gerçekleştirilmesi kolaydır. Bu yöntem hem hedef hem de referans genlerin, %100'e yakın ve birbirinin %5'i dahilinde verimliliklerle amplifiye edildiğini

varsayar. Livak yöntemini kullanmadan önce, hedef ve referans genlerin amplifikasyon verimlerini belirleyerek bu varsayımları doğrulamak esastır. Hedef ve referans genlerin benzer ve neredeyse %100 amplifikasyon verimliliğine sahip olduğunu belirledikten sonra, aşağıdaki talimatlar kullanılarak hedef genimizin farklı örneklerdeki ekspresyon seviyesindeki nispi fark belirlenmiştir:

1. Hem test numunesi hem de kalibratör numunesi için hedef genin Cq'sini referans (ref) genininkine normalize edin:

$$\Delta Cq(\text{test}) = Cq(\text{hedef, test}) - Cq(\text{ref, test})$$

$$\Delta Cq(\text{kalibratör}) = Cq(\text{hedef, kalibratör}) - Cq(\text{ref, kalibratör})$$

2. Test örneğinin  $\Delta Cq$  değerini kalibratörün  $\Delta Cq$  değerine normalize edin:

$$\Delta \Delta Cq = \Delta Cq(\text{test}) - \Delta Cq(\text{kalibratör})$$

İfade oranını hesaplayın:

$$2^{-\Delta \Delta Cq} = \text{normalleştirilmiş ifade oranı}$$

Sonuç, test numunesindeki hedef genin, referans genin ekspresyonuna normalize edilmiş kalibratör numunesine oranıdır. Hedef genin ekspresyonunun referans genin ekspresyonuna normalleştirilmesi, numune dokusu miktarındaki herhangi bir farkı telafi eder.

Hedef ve referans genler benzer amplifikasyon verimliliklerine sahip değilse, testleri optimize edebilir veya yeniden tasarlayabilir ya da Pfaffl yöntemini kullanabilirsiniz. Öte yandan, hedef ve referans genler aynı amplifikasyon verimliliğine sahipse, ancak verimlilik 2'ye eşit değilse, denklemdeki 2'yi gerçek amplifikasyon verimliliği ile değiştirerek Livak yönteminin değiştirilmiş bir formu kullanılabilir. Örneğin hem hedef hem de referans genin amplifikasyon verimliliği 1,95 ise aşağıdaki denklem kullanılmalıdır:

$$\text{Oran} = 1,95^{-\Delta \Delta Cq}$$

Göreceli gen ekspresyonunu hesaplamak için Livak yöntemi, yalnızca hedef ve referans genlerin amplifikasyon verimleri benzer olduğunda geçerlidir. İki PCR ürününün amplifikasyon verimleri aynı değilse, hedef genin farklı örneklerde nispi ekspresyonunu belirlemek için alternatif bir formül kullanılmalıdır (126). Bir referansa (ref) normalize edilmiş bir hedef için test numunesi ile kalibratör arasındaki ifade oranını belirlemek için aşağıdaki denklemi kullandık:

$$\text{Oran} = \frac{(E_{\text{target}}) \Delta Cq, \text{ hedef (kalibratör - test)}}{(E_{\text{ref}}) \Delta Cq, \text{ ref (kalibratör - test)}}$$
 burada  $E_{\text{target}}$ , hedef genin amplifikasyon verimliliğidir.  $E_{\text{ref}}$ , referans genin amplifikasyon verimliliğidir.  $\Delta Cq, \text{ ref (kalibratör - test)}$ , kalibratördeki referans genin  $Cq$ 'su eksi test numunesindeki referans genin  $Cq$ 'sudur.  $\Delta Cq, \text{ hedef (kalibratör - test)}$ , kalibratördeki hedef genin  $Cq$ 'su eksi test numunesindeki hedef genin  $Cq$ 'sudur. Yukarıdaki denklem, test numunelerinde ve kalibratör numunelerinde her genin (hedef ve referans) aynı amplifikasyon verimliliğine sahip olduğunu varsayar, ancak hedef ve referans genlerin aynı amplifikasyon verimliliğine sahip olması gerekli değildir.

## **2.3. Veri Analizi ve İstatistik**

### **2.3.1. Radyoligand Bağlanma Analizleri İçin**

Analiz GraphPad Prism 8.2 yazılımı ile yapılmıştır. Veriler, Ortalama  $\pm$  Standart Sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. İki grup karşılaştırılırken Non-paired-Student T testi, çoklu karşılaştırma yapılırken tek yönlü varyans analizi (One way-ANOVA) bağlanma seviyesinde grup farklılıklarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Bağlanma düzeyi ve klinik veriler arasındaki korelasyon Pearson ( $r$ ) veya Spearman korelasyon ( $\rho$ ) katsayısı kullanılarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde,  $<0.05$ 'lik bir p-değeri, tüm karşılaştırmalar için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ve posthoc analizler için, çoklu karşılaştırmalar için p-değeri düzeltilmemiştir.

### **2.3.2. Gen İfadesi Analizleri İçin**

Analiz GraphPad Prism 8.2 yazılımı ile yapılmıştır. Veriler, ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edilmiştir. İki grup karşılaştırılırken Non-paired- Student T testi, çoklu karşılaştırma yapılırken One way-ANOVA mRNA ifadesindeki grup farklılıklarını

değerlendirmek için kullanılmıştır. mRNA seviyeleri ve klinik veriler arasındaki korelasyon Pearson (r) veya Spearman korelasyon ( $\rho$ ) katsayısı kullanılarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde, <0.05'lik bir p-değeri, tüm karşılaştırmalar için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve post hoc analizler için, çoklu karşılaştırmalar için p-değeri düzeltilmemiştir

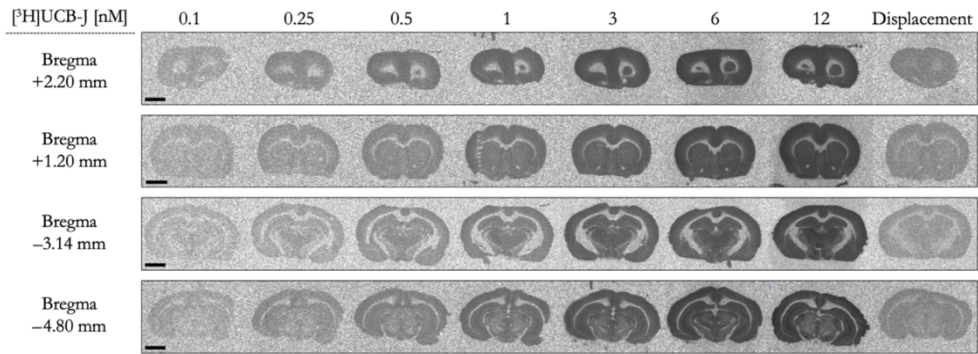
### 3. BULGULAR

#### 3.1.[<sup>3</sup>H]UCB-J'nin Sıçan Beyin Dokusundaki Bağlanma Karakteristikleri

##### 3.1.1. Beyin Bölgelerine Ait K<sub>D</sub> ve Bmax Değerleri

Stereotaksik bölgeye bağlı olarak aynı beyinin farklı bölgelerinde [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin K<sub>D</sub> ve Bmax'ındaki varyasyon olasılığını araştırmak için, dört farklı stereotaksik bölge incelendi. Ayrıca aynı beyin bölgesinin atlasa göre bregmaya farklı uzaklıklardaki kesitlerdeki bağlanma durumunun varyasyonları da incelendi. Örneğin hem neokorteks hem de dorsal hipokampus bregmaya iki farklı mesafedeki stereotaksik kesitte incelendi.

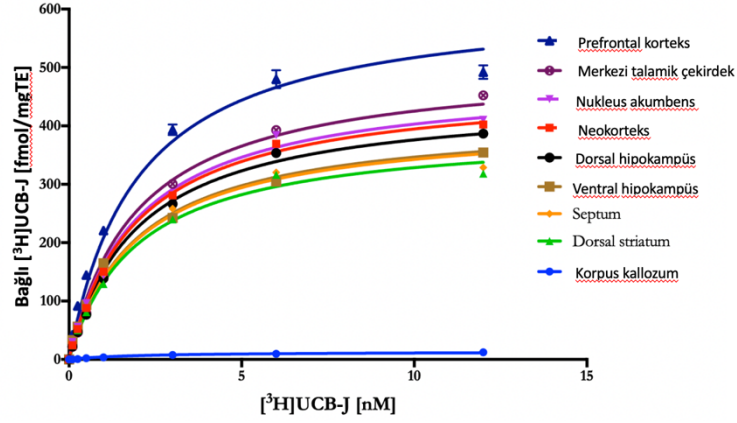
Analizler, ne neokortikal (bregma +1.20 mm'ye karşı -3.14 mm) ne de dorsal hipokampal (bregma -3.14 mm'ye karşı -4.80 mm) [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasında K<sub>D</sub> veya Bmax değerlerinde iki stereotaksik bölgede önemli farklılıklar ortaya koymadı. Bu, bir beyin bölgesindeki [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin bağlanma özelliklerinin stereotaksik bölgeye bağlı olmadığını gösterir (Şekil 23).



**Şekil 23:** [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin doyumluk bağlama çalışmaları için temsili otoradyografik görüntüler.

Dört stereotaksik bölge (+2.20 mm, +1.20 mm, -3.14 mm ve bregmadan -4.80 mm) için koronal beyin kesitleri (20 µm). Toplam bağlanmayı ve spesifik olmayan bağlanmayı tanımlamak için artan konsantrasyonlarda [<sup>3</sup>H]UCB-J (0.1-12 nM) ve inhibisyon (displacement) (6 nM [<sup>3</sup>H]UCB-J ve 10 mM LEVE) ile inkübe edilmiştir. Her beyin bölgesi için [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin spesifik bağlanması, toplam bağlanmadan spesifik olmayan bağlanmanın çıkarılmasıyla belirlendi. Bar = 4 mm

Sekiz beyin bölgesinin tümü için [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin K<sub>D</sub> değerleri, doyumluk bağlama çalışmalarından türetildi ve 1.35 nM ila 2.76 nM aralığında bazı farklılıklar gösterdi. Bununla birlikte, her beyin bölgesi için [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin spesifik bağlanma analizleri, K<sub>D</sub> değerinin belirli bir beyin bölgesinde diğer beyin bölgelerine göre önemli ölçüde bir farkı olmadığını ortaya çıkardı. Bu nedenle, ortalama K<sub>D</sub> (1.97 ± 0.17 nM) değeri hesaplandı ve bu değer prefrontal korteks, neokorteks, dorsal striatum, septum, dorsal hipokampus, ventral hipokampus, merkezi talamik çekirdek ve nükleus akumbens'teki [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin karşılaştırılabilir B<sub>max</sub> değerlerini belirlemek için eğri oluşturmada kullanıldı (Şekil 24 ve Tablo 9).



**Şekil 24:** [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin Sprague Dawley sıçan beyinde doyumluk bağlama çalışmalarından türetilen bölgesel spesifik bağlanma eğrileri

[<sup>3</sup>H]UCB-J'nin prefrontal korteks (PFC) (donanma), merkezi talamik çekirdek (mor), çekirdek akumbens (pembe), neokorteks (kırmızı), dorsal hipokampus (siyah), ventral hipokampus (kahverengi), septum (turuncu) ve dorsal striatum (yeşil)'daki spesifik bağlanma eğrileri [fmol/mg TE]. Belirli beyin bölgeleri için [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin bölgesel K<sub>D</sub> (nM) ve B<sub>max</sub> [fmol/mg TE] değerleri türetilmiştir. Korpus kallozum (mavi) referans bölge olarak seçilmiştir. Y ekseninde verilen belirli [<sup>3</sup>H]UCB-J konsantrasyonları (0,1, 0,25, 0,5, 1, 3, 6 ve 12 nM) ile orantılı [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin spesifik bağlanma değerlerine [fmol/mg TE] karşılık gelir. Veriler fmol/mg TE cinsinden ortalama ± SEM'i temsil eder. Grafik, GraphPad Prism 7.0'da oluşturulmuştur. N = 3/bölge, teknik üç kopya.

Beyin Bölgesi	<sup>3</sup> H]UCB-J Bağlanma Karakteristiği	
	Bmax [fmol/mg TE] ± SEM	Ortalama KD (nM)
Neokorteks	472.3 ± 3.7	1.97±0.17
Dorsal Striatum	393.1 ± 8.0	
Nukleus Akumbens	482.2 ± 8.1	
Septum	409.9 ± 6.6	
Dorsal Hipokampus	449.9 ± 4.6	
Ventral Hipokampus	414.5 ± 10.8	
Prefrontal Korteks	618.5 ± 10.2	
Merkezi Talamik Çekirdek	508.9 ± 10.5	
Korpus Kallozum	13.1 ± 1.2	Belirlenmedi

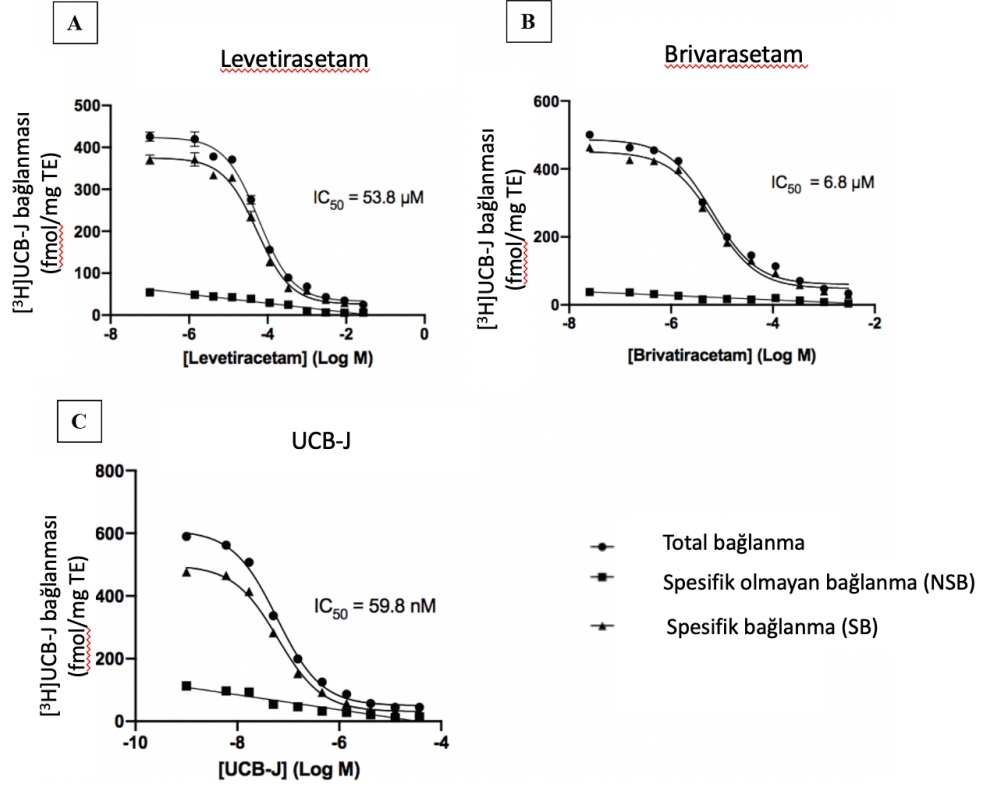
**Tablo 9:** Sprague Dawley sıçan beyninin çeşitli beyin bölgelerinde [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin bağlanma özellikleri

Tabloda gösterildiği gibi bölgesel Bmax değerlerinin doğru belirlenmesi için her beyin bölgesi için spesifik bağlanma eğrisi için ortalama K<sub>D</sub> (1.97 ± 0.17 nM) ayarlandı. N = 3/bölge, teknik üç kopya

### 3.1.2. Levetirasetam, Brivarasetam ve UCB-J için Sıçan Korteksindeki IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> Değerleri

Sıçan korteksindeki veri analizinden IC<sub>50</sub>'nin levetirasetam için 53.8 µM olduğu belirlendi; bu değer Brivaracetam için 6.8 µM ve soğuk UCB-J için 59.8 nM olarak saptandı. Levetirasetam için Log IC<sub>50</sub> -4.3 olarak hesaplanırken; brivaracetam ve UCB-J için Log IC<sub>50</sub> sırasıyla -5.2 ve -7.2 olarak belirlendi. K<sub>i</sub> değeri levetirasetam için 13.3 µM; Brivaracetam için 1.7µM ve soğuk UCB-J için 15.5nM olduğu saptandı (Şekil 25 ve Tablo 10).





**Şekil 25:** [<sup>3</sup>H]UCB-J Sıçan Korteksinde levetirasetam, brivaracetam ve soğuk UCB-J ile inhibisyon

(A) Levetiracetam (0  $\mu$ M – 27.3 mM), (B) Brivaracetam (0  $\mu$ M – 3.03 mM) veya (C) soğuk UCB-J (0  $\mu$ M – 37.5  $\mu$ M). Grafikler, soğuk ligandın bir fonksiyonu olarak fmol/mg TE cinsinden [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasını gösterir.

SIÇAN KORTEKS				
	Levetirasetam	Brivarasetam	UCB-J	[ <sup>3</sup> H]UCB-J
<b>IC50</b>	53.8 $\mu$ M	6.8 $\mu$ M	50.8 nM	
<b>Log IC50</b>	-4.3	-5.2	-7.2	
<b>Ki</b>	13.3 $\mu$ M	1.7 $\mu$ M	15.5 nM	
<b>K<sub>D</sub></b>				1.9 $\pm$ 0.2 nM
<b>Bmax</b>				768.4 $\pm$ 27.5 fmol/mg TE

**Tablo 10:** Doğunluk ve inhibisyon deneyleri için bağlanma özelliklerine genel bakış

## **3.2.Sıçan Temporal Lob Epilepsi Modelinden Elde Edilen Bulgular**

### **3.2.1. Hayvanlardaki Davranışsal Sonuçlar *Racine* Bulguları ve Spontan Tekrarlayan Nöbetlerin Ortaya Çıkışı**

Sistemik KA uygulanan sıçanlarda ilk status epileptikus enjeksiyonlardan sonra  $42\pm 17$  dakikada gözlemlenirken, lokal KA uygulanan sıçanlarda ise uygulamadan sonra  $116\pm 47$  dakikada gözlenmiştir. İlk enjeksiyondan sonraki 4 saat içerisinde sıçanların geçirdiği nöbetler aşağıda belirtilen davranışsal skala değerlerine göre değerlendirilmiştir (Racine, 1972);

1. Ani davranışsal tutukluk ve hareketsizlik
2. Orafasiyal hareketler
3. Boynun sarsıntı ile sirkelenmesi ve kafanın ıslak köpeklerde gözlenen silkelene hareketine benzer şekilde sallanması
4. Tek veya iki taraflı ön ekstremitte klonus
5. Hayvanın dengesini kaybederek düşmesine sebep olacak tonik klonik nöbetler ve bu şiddetli nöbetlere eşlik eden eksoftalmoz ve salivasyonda artış.
6. Şiddetli zıplama ve sıçramalar, tüm ekstremitelerin şiddetli kasılmaları sonucu ölüm

Her iki model için günlük video kayıtlarından gözlemlendiği gibi, ilk kez spontan meydana gelen ve tekrar eden nöbetlerin (SRS) başlama zamanı hayvanlar arasında farklılık göstermemiştir. KA ile SE indüksiyonundan sonra, 14 ila 88 gün sonra SRS'ler meydana gelmiştir ve SRS'ler, her iki model için de benzer bir zaman ölçeğinde tetiklenmiştir.

### **3.2.2. Sistemik KA ile Oluşturulan Epilepsi Modelinde Bağlanmanın Zamansal Ve Uzaysal Değişimi**

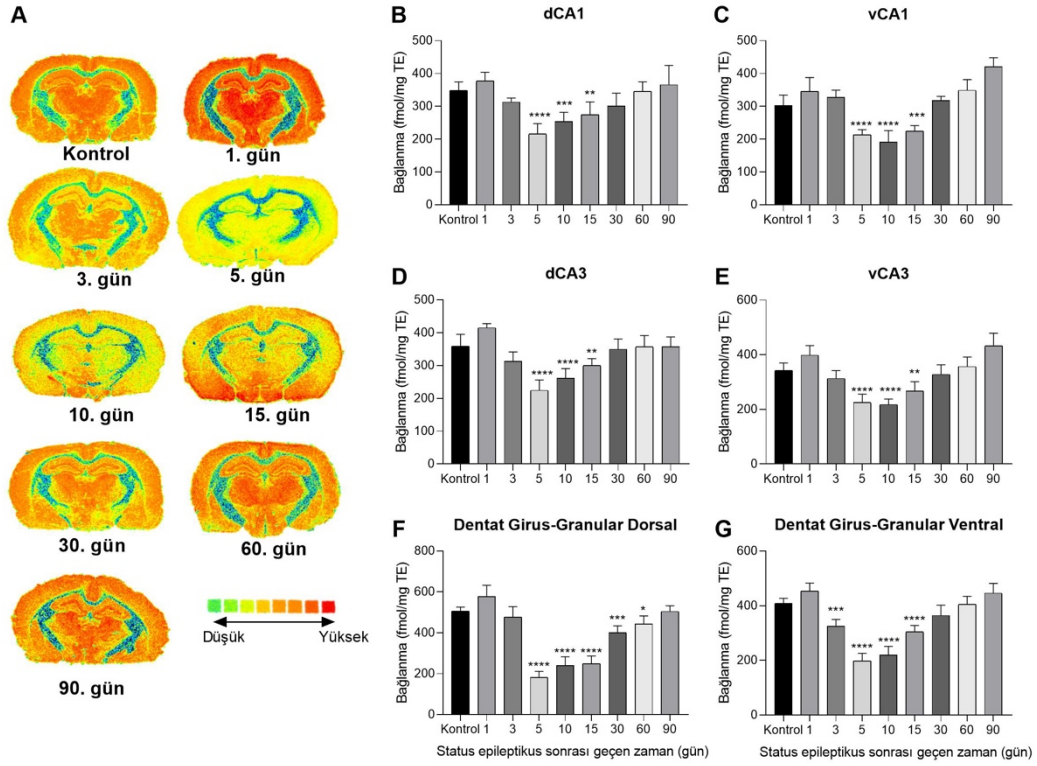
[<sup>3</sup>H]UCB-J'nin bağlanması, gri madde bölgeleri boyunca gözlenmiştir. Ancak, bazı bölgeler diğerlerinden daha fazla işaretlenmiştir (Şekil 26). Buna karşılık, beyaz madde neredeyse hiç bağlanma göstermemiştir. En yoğun olarak işaretlenen bölgelerden biri hipokampüstür. Özellikle kornu ammonis ve granüler hücre tabakası gibi yoğun bir şekilde paketlenmiş hücre katmanlarına sahip alanlar, muhtemelen

yüksek hücre ve sinaps yoğunluğunu yansıtan daha büyük bağlanma seviyeleri göstermiştir. Bu çalışmada dorsal ve ventral hipokampusun alt bölgelerinde, çeşitli kortikal ve subkortikal bölgelerde ve ayrıca beyaz maddede bağlanma seviyesi analizi gerçekleştirilmiştir. Temsili görüntüler, akut, sessiz (latent) ve kronik fazlar sırasında farklı bağlanma profilleri göstermiştir. Özellikle, beyaz alanda KA tedavisinden sonra hiçbir farklılık gözlenmemiştir. İki beyin hemisferinin (sağ ve sol) karşılaştırırken hiçbir bölgede lateralizasyon bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

### 3.2.2.1. Hipokampus

Bağlanma seviyesi, dorsal ve ventral hipokampusun alt bölgelerinde analiz edilmiştir. Epileptogenezin akut fazları sırasında hipokampusta bağlanmada kademeli bir azalma olmuştur. Özellikle en düşük seviye 3 ile 10 gün arasında gözlenmiştir. 3-10 günden sonraki zaman noktalarında, bağlanma profili zamana bağlı bir artış göstermiştir. Bu zaman noktaları, epilepsinin latent ve kronik fazlarını ve ayrıca [ $^3\text{H}$ ]-UCB-J bağlanma seviyesinin restorasyon fazını temsil etmektedir. Özellikle dentat girus, diğer alt bölgelere göre daha büyük ve daha kalıcı azalmalar göstermiştir (Şekil 26A).

İncelenen tüm bölgelerde, bağlanmadaki azalma 5. günde en büyük olmuştur (bazal seviyelere kıyasla  $p<0.0001$ ). Bu zaman noktasında, bağlanma seviyesi dCA1, dCA3, dDG'deki kontrole kıyasla %38, %37, %63 daha düşük bulunmuştur (Şekil 26B, 26D, 26F). CA3 ( $p<0.05$ ) ve DG bölgelerinde ( $p<0.001$ ) ventral kısımlardaki azalma dorsal kısımlara göre daha küçük bulunmuştur. Burada bağlanma seviyesi, vCA1, vCA3, vDG'deki kontrole kıyasla %29, %34, %51 daha düşüktür (Şekil 26C, 26E, 26G). 30. günde hem dorsal hem de ventral CA1 ve CA3'teki bağlanma seviyeleri bazal seviyeden istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Diğer hipokampal alt bölgelerin aksine, 30 gün sonra dDG'de büyük bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 26F). Sistemik KA'dan 90 gün sonra, hipokampusun herhangi bir alt bölümünde kontrol ile karşılaştırıldığında hiçbir fark gözlenmemiştir.



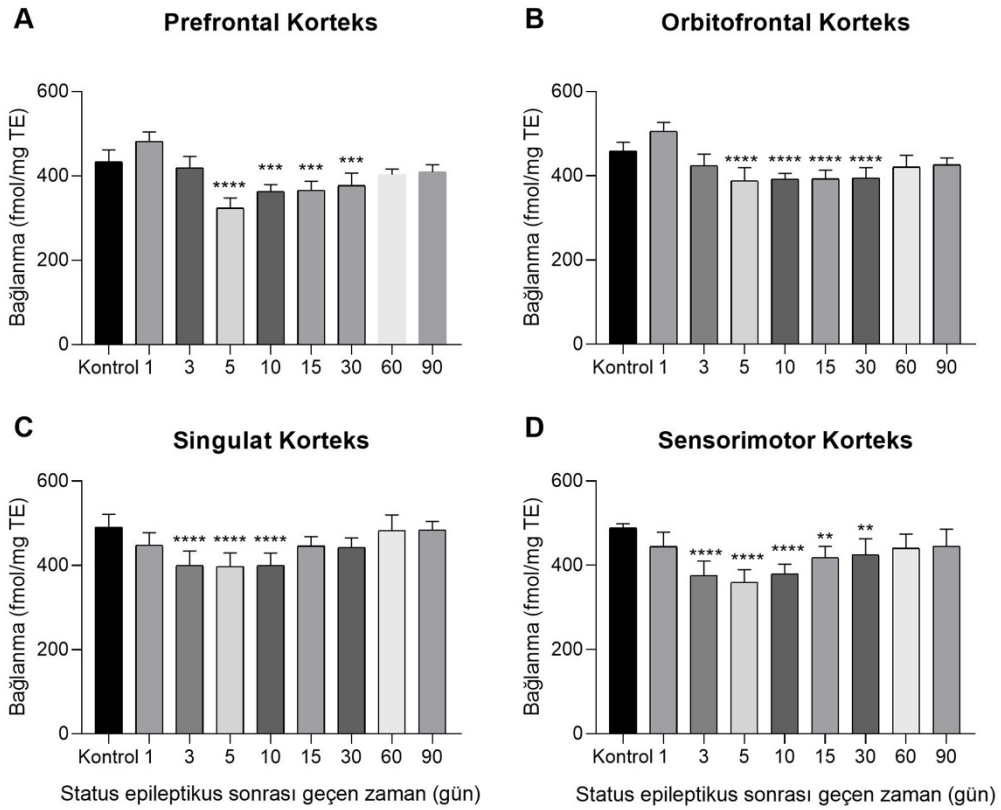
**Şekil 26:** Sistemik KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında hipokampüste [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma paternini gösteren otoradyogramlar ve kantitatif bağlanma düzeyini gösteren bar grafikleri

A) Temsili otoradyogramlar; bregmaya -3.6 mm mesafeden alınan kesitleri göstermektedir B) dCA1 C) vCA1 D) dCA3 E) vCA3 F) Dentat girus -Granular dorsal G) Dentat girus-Granular ventral (hipokampüsün alt bölgeleri ölçülürken dorsal olarak adlandırılan alanlar bregmaya -3.6 mm; ventral olarak tanımlanan alanlar bregmaya -5.2 mm mesafeden alınan kesitlerden ölçülmüştür)

### 3.2.2.2.Serebral korteks

Serebral korteks boyunca güçlü bir radyoligand bağlanması gözlenmiştir. Prefrontal korteks (Şekil 27A), orbitofrontal korteks (Şekil 27B), singulat korteks (Şekil 27C) ve sensorimotor korteks (Şekil 27D) gibi farklı kortikal bölgelerdeki bağlanma değişikliklerinin zaman profili bu bölgeler arasında ve hipokampüste benzerlik göstermiştir. Hipokampüste ve korteksin tüm bölümlerinde en büyük

azalmalar 5. günde tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 27A-D). Başlangıç kontrolü ile karşılaştırıldığında, bu zaman noktasında bağlanmadaki azalmanın singulat, sensorimotor, prefrontal ve orbitofrontal korteks için sırasıyla %18, %26, %25 ve %15 olduğu tespit edilmiştir. 5. gün zaman noktasından sonra, incelenen tüm neokortikal alanlarda bağlanma seviyesi kademeli olarak artış göstermiştir. Singulat kortekste bağlanma seviyesi, tedaviden 15 gün sonra başlangıç kontrollerinden istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Orbitofrontal, prefrontal ve sensorimotor korteksler gibi diğer bölgeler için bağlanma seviyesi, tedaviden 60 gün sonrasına kadar önemli ölçüde düşük olmaya devam etmiştir. Bağlanmada singulat korteks ile benzer bir zaman profili temporal ve piriform kortekslerde de gözlenmiştir.



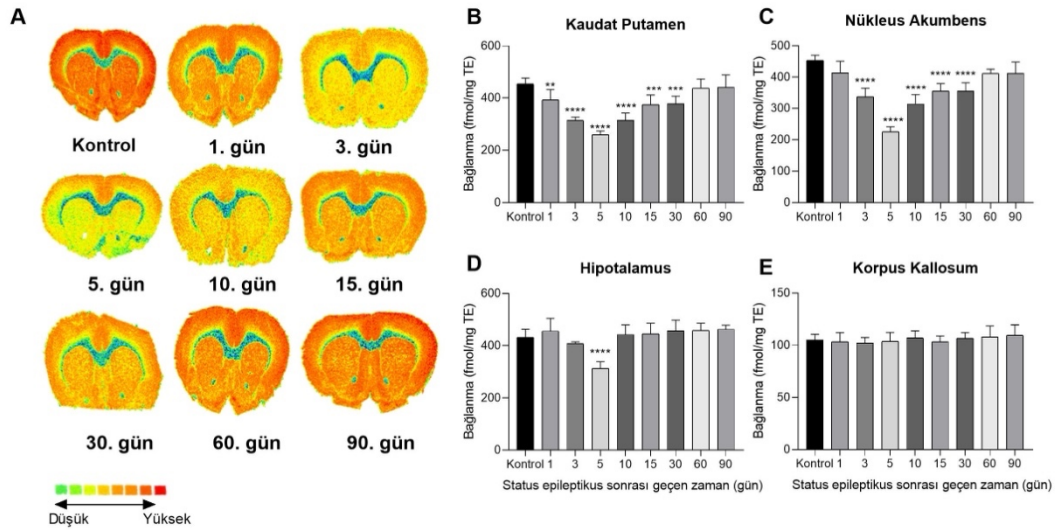
**Şekil 27:** Sistemik KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında farklı kortikal alanlarda [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma paternini gösteren bar grafikleri

A) Prefrontal Korteks (bregmaya +3.2 mm) B) Orbitofrontal Korteks ( bregmaya +3.2 mm) C) Singulat Korteks (bregmaya +3.2 mm) D) Sensorimotor (bregmaya +1.2 mm)

### 3.2.2.3.Subkortikal alanlar

Subkortikal alanlarda bağlanmadaki zaman profili hem korteks hem de hipokampustan farklı bulunmuştur. Kaudat-putamende 1 günden sonra hızlı bir düşüş görülmüştür ( $p < 0.01$ ) (Şekil 28B). Çekirdek akumbenste, 3 gün sonra bağlanmada güçlü bir azalma tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 28C). Striatumda, en düşük bağlanma seviyesi, 10 gün sonra görülen incelenen zaman noktaları arasında bulunmuştur (ardından %43 ve %50) ( $p < 0.0001$ ). Tüm subkortikal alanlarda bağlanma seviyesi, 60 gün sonra bazal seviyelerden farklı bulunmamıştır (Şekil 28A-B).

Buna karşılık, incelenen tüm zaman noktalarında hipotalamusta [ $^3\text{H}$ ]UCB-J bağlanmasında hemen hemen hiçbir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 28D). Ek olarak, korpus kallozumda herhangi bir zaman noktasında bağlanmada hiçbir fark izlenmemiştir (Şekil 28E).



**Şekil 28:** Sistemik KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında subkortikal alanlarda [ $^3\text{H}$ ]UCB-J bağlanma paternini gösteren otoradyogramlar ve kantitatif bağlanma düzeyini gösteren bar grafikleri

A) Temsili otoradyogramlar; bregmaya +1.2 mm mesafeden alınan kesitleri göstermektedir B) Kaudat Putamen (bregmaya +1.2 mm) C) Nükleus Akumbens

(bregmaya +1.2 mm) D) Hipotalamus (bregmaya -3.6 mm kesitleri gösteren Şekil 26'daki otoradyogramlarda görülebilir) E) Korpus Kallozum (bregmaya+1.2 mm)

### **3.2.3. Lokal KA ile Oluşturulan Epilepsi Modelinde Bağlanmanın Zamansal ve Uzaysal Değişimi**

Sağ dorsal hipokampusta gerçekleştirilen intrahipokampal KA enjeksiyonları, hem hipokampusta hem de ekstra hipokampal bölgelerde [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasında değişikliklere neden olmuştur ve zaman profilleri sistemik KA modeline benzerlikler göstermiştir. Lokal uygulamada, uygulamadan 1 ila 3 gün sonra hipokampusun hücresel tabakalarında hızlı bir yapısal hasar ve dağılma meydana gelmiştir. Temsili görüntüler incelenecek olursa, aralıklı ve dağınık işaretlenme, hücresel katmanlarda, özellikle DG'de kalitatif SV2A azalmalarını yani sinaptik kayıpları göstermektedir (Şekil 29A). Ayrıca, temporal korteksteki belirli alanlar, heterojen bir bağlanma modeli göstermiştir. Bu da yine kortikal alan içerisinde bazı hücre gruplarında SV2A kaybına bağlı seyrek işaretlenmeyi göstermektedir. Erken evrelerde, muhtemelen hücre kaybına bağlı olarak, enjeksiyon bölgesinin içinde ve çevresinde göreceli olarak daha düşük bağlanma seviyeleri görülmüştür. Enjeksiyon bölgesi etrafındaki ani değişikliklerin yanı sıra, iki hemisfer arasındaki akut fazlarda bağlanma seviyesinde bir lateralizasyon bulunmaktadır. Bağlanma profilindeki lateralizasyon, enjeksiyon bölgesinin içinde ve çevresinde ve sadece hipokampusu içeren çevre dokularda değil, aynı zamanda temporal ve piriform kortekslerde de görülmüştür. Özellikle epileptogenezin kronik fazlarında (10. gün ve sonrasında) hiçbir bölgede lateralizasyon saptanmamıştır.

Ayrıca, çalışmamızda deneysel yöntemler altında belirtildiği gibi, yaş uyumlu sham-opere kontrol grupları kullanılarak, stereotaksik enjeksiyonun kendisi de doku lezyonu yapabildiğinde, intrahipokampal enjeksiyonun SV2A protein seviyesine yani [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma seviyesine kendisinin etkisi araştırılmıştır. ROI'leri (korteks ve hipokampus gibi ölçüm yapılan bölgeler) herhangi bir müdahale olmadan doğrudan sakrifiye edilen (n = 8) ve ayrıca sham-opere edilen sıçanlarda (n = 8/grup başına; intrahipokampal olarak salın enjekte edilen) ve ardından 1., 3., 5., 10., 15., 30., 60. ve

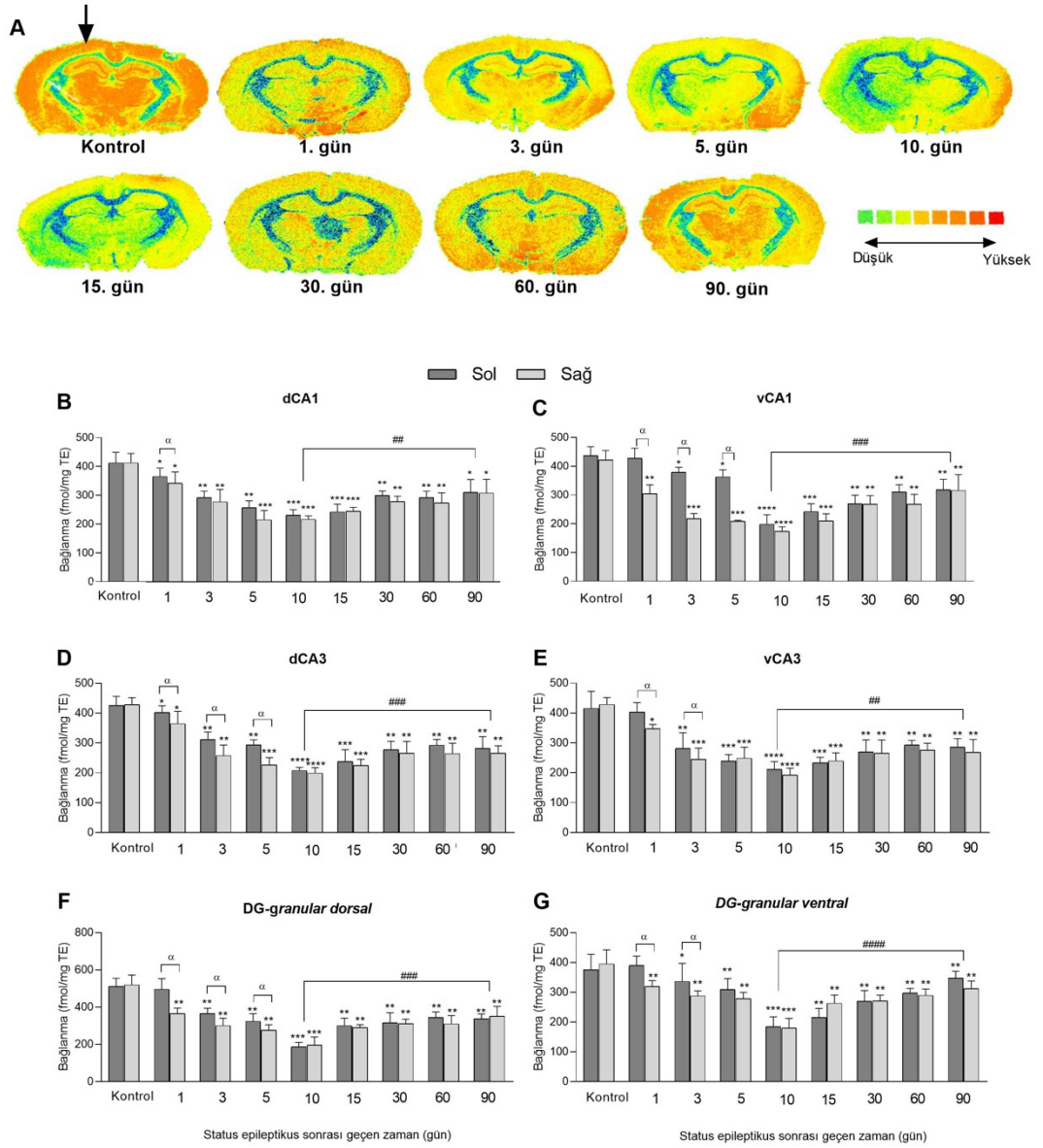
90. günlerde sakrifiye edilen kontrol sıçanlarda (korteks ve hipokampus gibi) karşılaştığımızda; bağlanma yoğunluğu açısından belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle kontrol grubu, sahte işlem görmüş tüm kontrol gruplarının ortalama bağlanma seviyesini temsil etmektedir.

### 3.2.3.1.Hipokampus

Hem dorsal (Şekil 29 B-D-F) hem de ventral alt bölgelerde (Şekil 29 C-E-G) bağlanmada kayda değer bir düşüş görülmüştür. Lateralizasyon nedeniyle, ipsilateral bölgedeki bağlanmanın azalması, her iki hemisferde önemli olmasına rağmen, daha erken zaman noktalarında daha büyüktür.

Hem dorsal hem de ventral hipokampusun tüm ipsilateral alt bölgelerinde 1 gün sonra bağlanmada belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 30, 31). Kontralateral bölgede, bağlanmadaki düşüş 3 gün sonra ortaya çıkmıştır ( $p < 0.05$ ). Bölgesel farklılıklar olmasına rağmen, azalmanın büyüklüğü ipsilateral tarafta 5 gün sonra belirgin olmuştur, ancak tüm bölgelerde 10 gün sonra zirve yapmıştır. Düşüşler dCA1'de yaklaşık %45 (Şekil 29B), vCA1'de %56 (Şekil 29C), dCA3'te %52 (Şekil 29D), vCA3'te %51 (Şekil 29E), dDG'de %62 (Şekil. 29F) ve vDG'de %52'dir (Şekil 29G). Yukarıda açıklandığı gibi, 1 gün, 3 gün ve 5 gün (akut fazlar) sonra ipsilateral ve kontralateral taraflar arasındaki bağlanma seviyesindeki farklılıklar gözlemlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Hipokampustaki bağlanmanın en düşük seviyede olduğu zaman noktasında 10 gün civarında iki bölge arasında bağlanmada bir fark görülmemiştir. Bağlanma seviyesi 90 güne kadar biraz artış göstermiştir. KA ile sistemik tedaviden sonra görülen zaman profilinin aksine, intrahippokampal KA'dan sonra bağlanma seviyesi hiçbir hipokampal bölgede kontrol seviyelerine ulaşmamıştır ( $p < 0.05$ ).

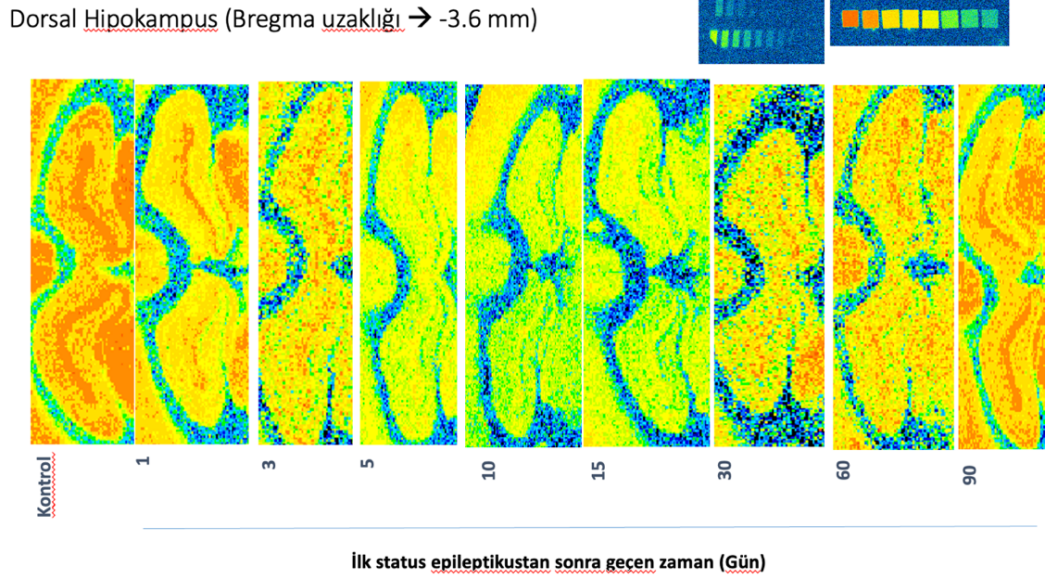




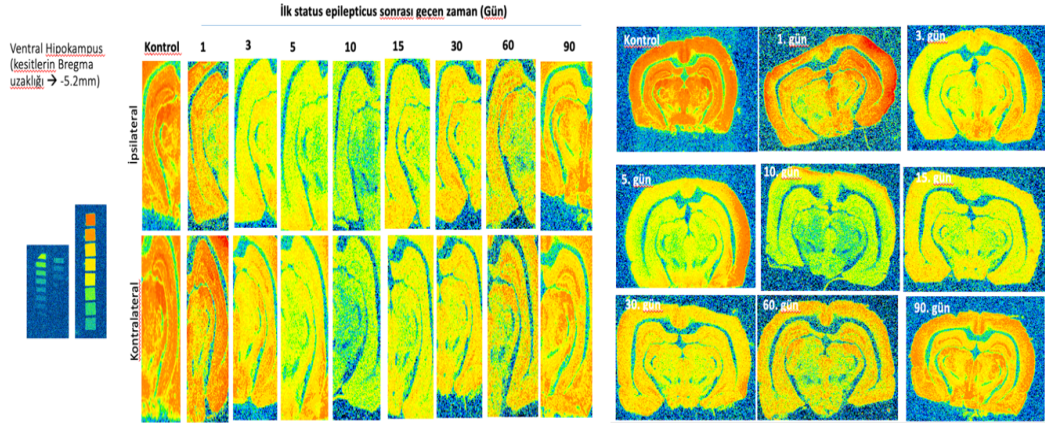
**Şekil 29:** Lokal KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında hipokampüste [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma paternini gösteren otoradyogramlar ve kantitatif bağlanma düzeyini gösteren bar grafikleri

A) Temsili otoradyogramlar; bregmaya -3.6 mm mesafeden alınan kesitleri göstermektedir B) dCA1 C) vCA1 D) dCA3 E) vCA3 F) Dentat girus-Granular dorsal G) Dentat girus-Granular ventral (hipokampüsün alt bölgeleri ölçülürken dorsal olarak adlandırılan alanlar bregmaya -3.6 mm; ventral olarak tanımlanan alanlar bregmaya -5.2 mm mesafeden alınan kesitlerden ölçülmüştür). Okla enjeksiyonun tarafı

gösterilmektedir. \* ile gösterilen istatistiki belirteçler zamansal gruplar arasındaki farklılığı, alfa ise sağ ve sol arası farklılığı gösterir



**Şekil 30:** Dorsal hipokampusun alt hüresel gruplarındaki bağlanmaların daha detaylı otoradyogramlarla gösterilmesi

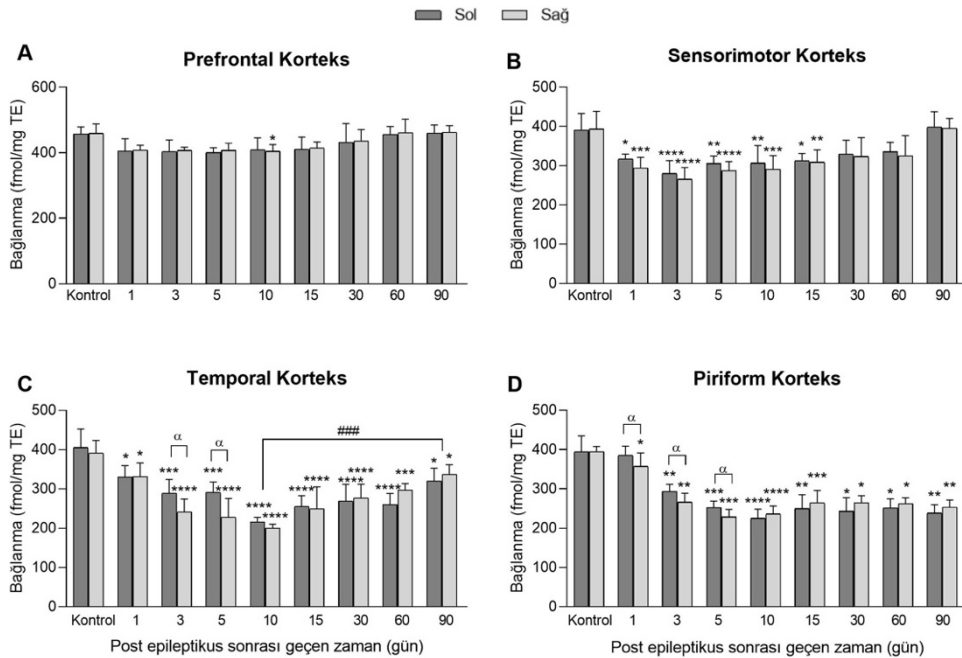


**Şekil 31:** Ventral hipokampüsteki bağlanma paterninin representatif otoradyogramlarla daha detaylı gösterilmesi

### 3.2.3.2.Korteks

Kortikal alt bölgelerde görülen bağlanma zaman profilleri, KA'nın sistemik uygulamasından sonra gözlenen profillerden farklı olduğu gibi her bir alt kortikal bölüm de birbirinden oldukça farklı bulunmuştur. Prefrontal kortekste (Şekil 32A), herhangi bir zaman noktasında bağlanmada hemen hemen hiçbir değişiklik görülmemiştir. Sensorimotor kortekste (Şekil 32B) ilk günlerde bağlanma seviyesi düşük bulunmuştur ve 3 gün sonra %30'luk bir azalma tespit edilmiştir. Ancak 30 gün sonra lateralizasyona rastlanmamıştır (Şekil 32B).

Buna karşılık, temporal (Şekil 32C) ve piriform kortekslerde (Şekil 32D), sadece 1 gün sonra belirgin azalmalar ve lateralizasyon görülmüştür (temporalde %42-48 ve piriform kortekste %40-49). Hipokampusta ise en düşük bağlanma seviyesi 10 gün sonra görülmüştür. Daha sonraki zaman noktalarında, bağlanma seviyesi iki hemisfer arasında hiçbir fark göstermemiştir, ancak bağlanma seviyesi, tedaviden 90 gün sonrasına kadar her iki taraftaki her iki kortikal alanda daha düşük kalmıştır (Şekil 32C ve 32D).

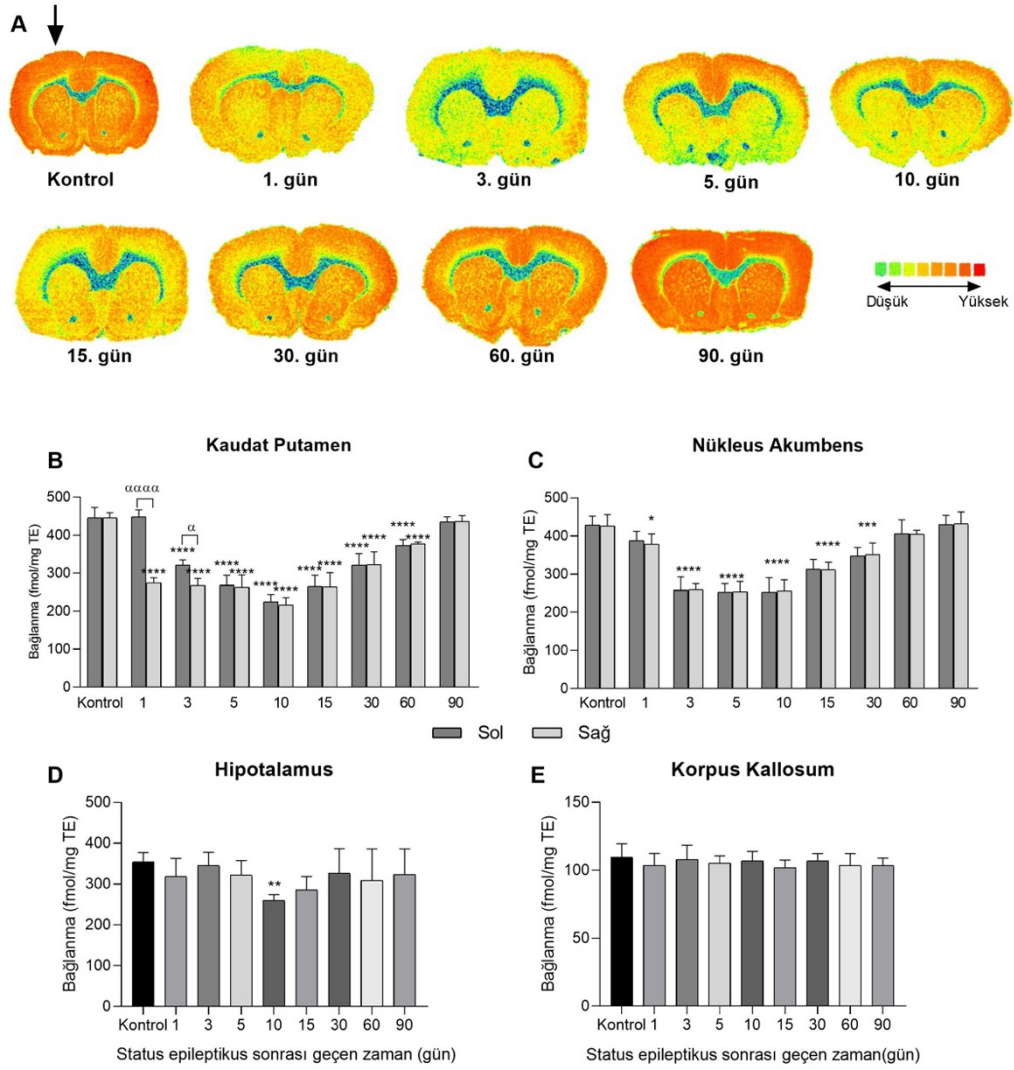


**Şekil 32:** Lokal KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında farklı kortikal alanlarda  $[^3\text{H}]$ UCB-J bağlanma paternini gösteren bar grafikleri

A) Prefrontal Korteks (bregmaya +3.2 mm) B Sensorimotor (bregmaya +1.2 mm) C) Temporal Korteks (bregmaya -3.6 mm) D) Piriform Korteks (bregmaya -5.2 mm) \* ile gösterilen istatistiki belirteçler zamansal gruplar arasındaki farklılığı, alfa ise sağ ve sol arası farklılığı gösterir

### 3.2.3.3.Subkortikal alanlar

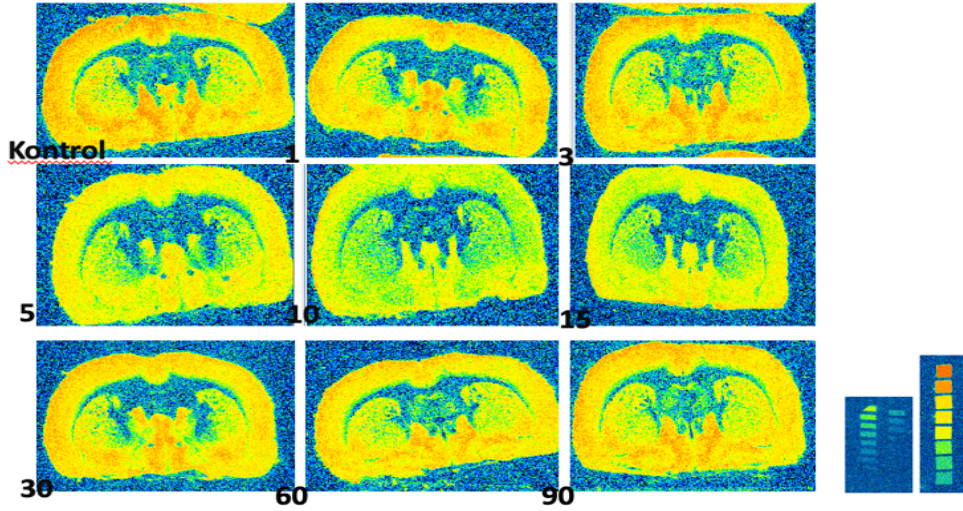
Seçilen subkortikal alanlarda bağlanmadaki zamansal profilin de bölgeye özgü olduğu bulunmuştur. Örneğin, kaudat-putamendeki bağlanma seviyeleri (Şekil 33A-C) sensorimotor korteksin profiline benzemektedir ve 3 gün sonra güçlü bir azalma göstermiştir ve seviye zamanla kademeli olarak bazal seviyelere dönmüştür. Kaudat-putamen (Şekil 33B) ve nükleus akumbens (Şekil 33C) arasındaki zaman profilleri benzer bulunmuştur. Hipotalamusta, bağlanma seviyeleri zaman içinde sabittir, tek bir zaman noktasında sadece küçük ama kayda değer bir fark bulunmuştur (Şekil 33D). Korpus kallozumda, beyin diğer seviyelerinde incelenen diğer beyaz cevher bölgelerinde de gözlendiği gibi (veriler gösterilmemiştir) bilateral olarak hiçbir zaman fark görülmemiştir (Şekil 33E, 34).



**Şekil 33:** Lokal KA ile oluşturulan epileptogenezin akut, latent ve kronik fazlarında subkortikal alanlarda [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma paternini gösteren otoradyogramlar ve kantitatif bağlanma düzeyini gösteren bar grafikleri

A) Temsili otoradyogramlar; bregmaya +1.2 mm mesafeden alınan kesitleri göstermektedir B) Kaudat Putamen (bregmaya +1.2 mm) C) Nükleus Akumbens (bregmaya +1.2 mm) D) Hipotalamus (bregmaya -3.6 mm kesitleri gösteren Şekil 26'daki otoradyogramlarda görülebilir) E) Korpus Kallozum (bregmaya+1.2 mm). \* ile gösterilen istatistik belirtiçler zamansal gruplar arasındaki farklılığı, alfa ise sağ ve sol arası farklılığı gösterir





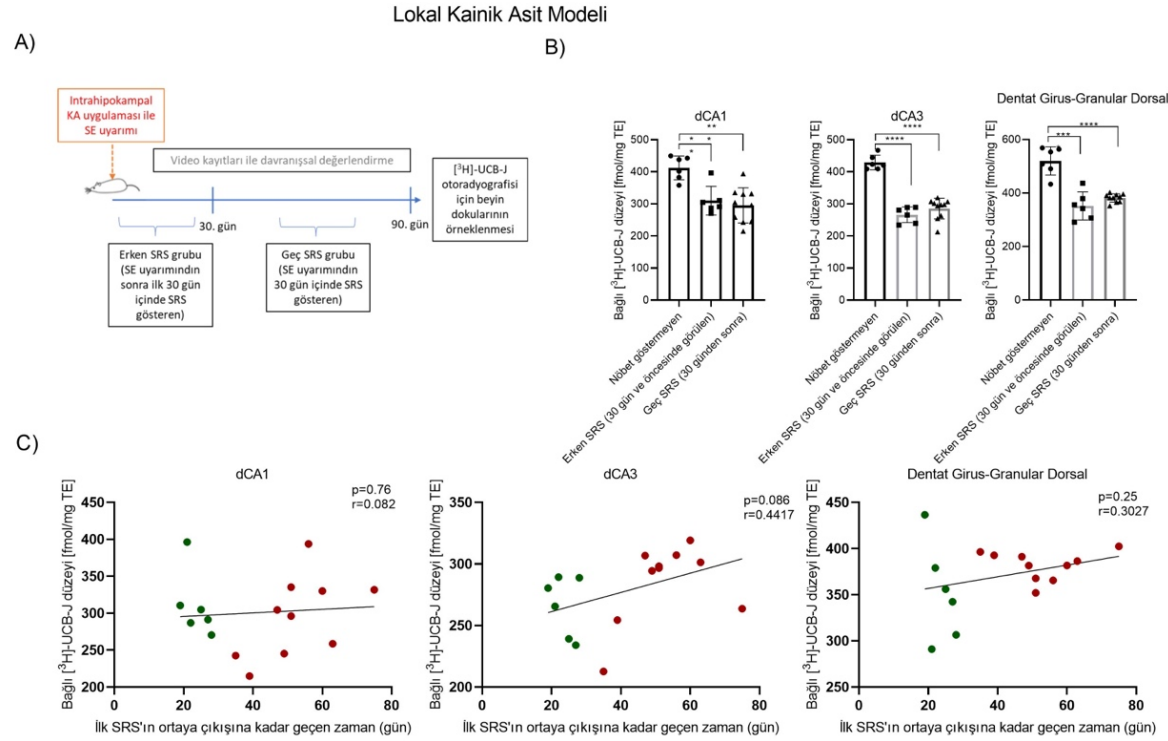
**Şekil 34:** Beynin en büyük beyaz cevheri olan korpus kallozumda bağlanma paterninin zamansal olarak gösterimi, kesitler bregmaya -0.9 mm mesafedendir.

#### 3.2.4. SRS Ortaya Çıkış Zamanı ile Bağlanma Düzeyinin İlişkilendirilmesi

Daha önce de değinildiği gibi her iki model için günlük video kayıtlarından elde edilen skorlama ile ilk kez spontan meydana gelen ve sonra kendiliğinden tekrar eden nöbetlerin (SRS) başlama zamanı hayvanlar arasında farklılık göstermemiştir. KA ile SE indüksiyonundan 14 ila 88 gün sonra SRS'ler meydana gelmiştir ve SRS'ler, her iki model için de benzer bir zaman ölçeğinde tetiklenmiştir.

Lokal tasarıma baktığımızda deney bitiminde yani 90 gün sonra hiç nöbet göstermeyen hayvanlardaki bağlanmaya oranla nöbet geçirenlerdeki bağlanma daha düşüktü ( $p < 0.0001$ ). Ancak erken dönemde yani ilk statustan sonraki 30 gün içinde nöbet geçirenler ve geç dönemde 30 ila 90 gün arasında nöbet geçirenler arasında bağlanma açısından bir fark yoktu. Bağlanma düzeyleri sadece hipokampüsün alt bölgeleri olan Dentat girus, CA3 ve CA1 bölgelerinde analiz edildi. Ayrıca korelasyon analizi yapıldığında da bu 3 bölgedeki radyoligand bağlanması düzeyi ile hayvanların nöbet geçirdiği gün sayısı arasında bir ilişki bulunamadı. Yani hayvanların sahip olduğu SV2A düzeyinin o hayvanın bireysel olarak daha erken ya da daha geç SRS deneyimleyeceğini göstermemektedir (Şekil 35).

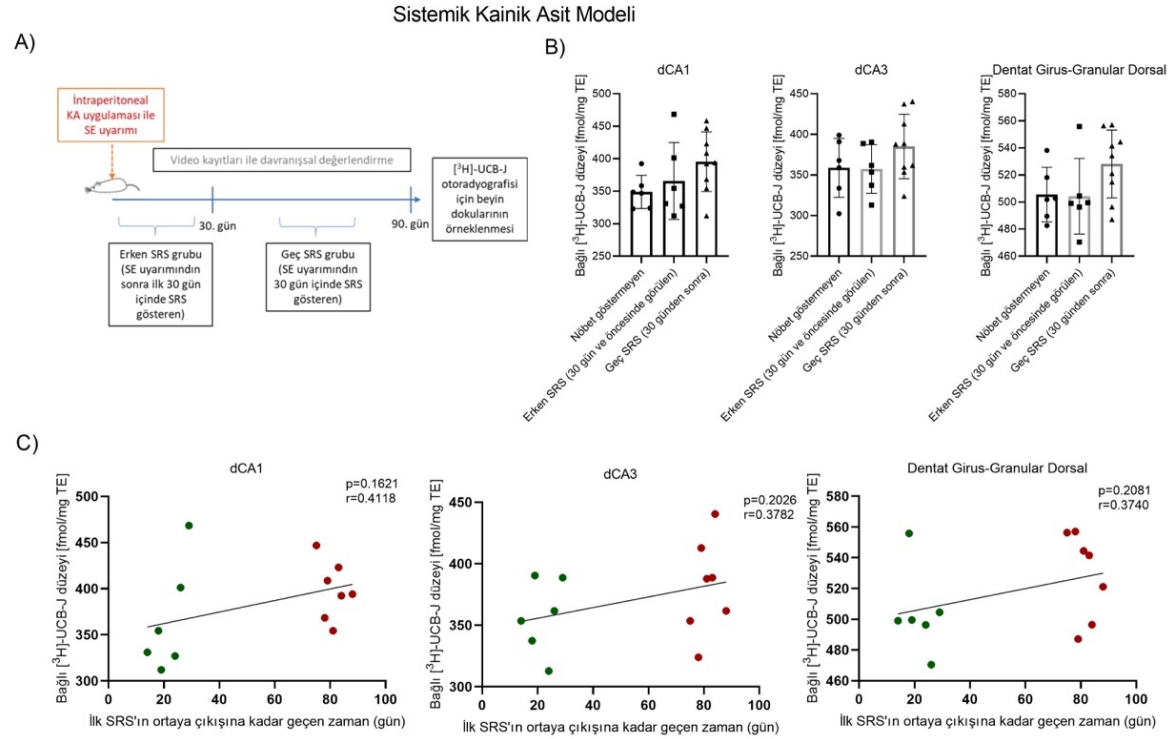
Sistemik dizayn incelendiğinde ise bağlanma düzeyinde nöbet geçirmeyenler, erken geçirenler ve geç geçirenler arasında bağlanmada 90. Gün sonunda hiçbir fark gözlenmemiş. Hayvanlarda hipokampusün 3 alt bölgesindeki bağlanma düzeyi ile SRS günü arasında yine bir ilişki saptanmamıştır (Şekil 36)



**Şekil 35:** Lokal KA uygulamasında hayvanlarda SRS'lerin ortaya çıkma zamanı ile sahip oldukları SV2A düzeyi arasındaki ilişki

A) Deneysel dizayn B) Hipokampusu alt bölgelerinde (dCA1, dCA3, Dentat girus-granular dorsal) hiç SRS göstermeyenler (n=6), erken (n=6) ve geç SRS gösteren (n=9) gruplarda SV2A düzeyini gösteren  $[^3\text{H}]\text{UCB-J}$  bağlanma düzeylerini gösteren bar grafikleri C) dCA1, dCA3, Dentat girus-granular dorsal bölgelerindeki SV2A düzeyi ve SRS çıkış vakti arasındaki korelasyon grafikleri (yeşil noktalar erken; kırmızı noktalar geç SRS deneyimleyen sıçanları temsil etmektedir).





**Şekil 36:** Sistemik uygulamasında hayvanlarda SRS'lerin ortaya çıkma zamanı ile sahip oldukları SV2A düzeyi arasındaki ilişki

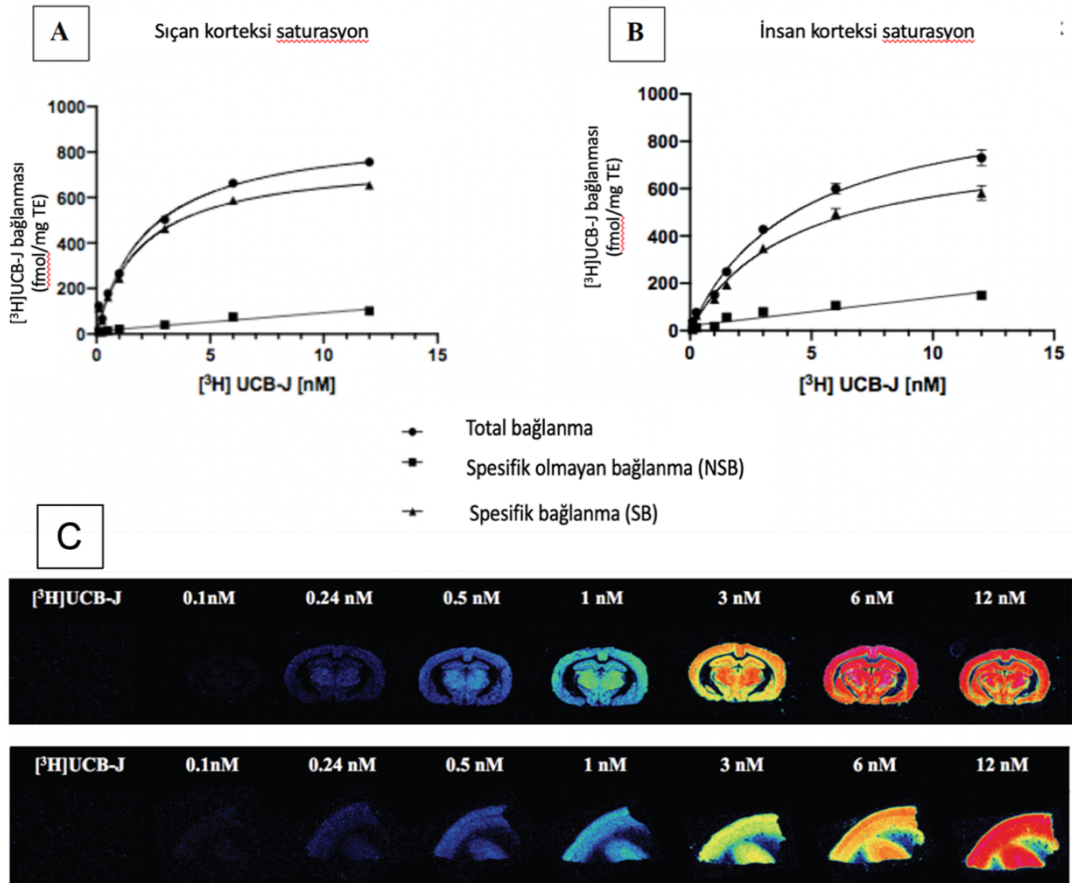
A) deneysel dizayn B)Hipokampüsü alt bölgelerinde (dCA1, dCA3, Dentat girus-granular dorsal) hiç SRS göstermeyenler (n=6), erken (n=6) ve geç SRS gösteren (n=9) gruplarda SV2A düzeyini gösteren  $[^3\text{H}]\text{UCB-J}$  bağlanma düzeylerini gösteren bar grafikleri C) dCA1, dCA3, Dentat girus-granular dorsal bölgelerindeki SV2A düzeyi ve SRS çıkış vakti arasındaki korelasyon grafikleri (yeşil noktalar erken; kırmızı noktalar geç SRS deneyimleyen sıçanları temsil etmektedir).

### 3.3. İnsan Dokusundan Elde Edilen Veriler

#### 3.3.1. [<sup>3</sup>H]UCB-J'nin İnsan Beyin Dokusundaki Bağlanma Karakteristikleri

İnsan beyninde [<sup>3</sup>H]UCB-J'ye ait farmakolojik bağlanma karakteristikleri belirlenirken bu değerler aynı zamanda diğer ilgilendiğimiz tür olan sıçan korteksindeki değerlerle de karşılaştırılmıştır (Şekil 37). Bu sebeple bu bölümde iki türe ait sonuçlar sadece korteksle sınırlı kalarak karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Korteksle sınırlı kalınmasının sebebi insana ait sadece kortikal dokunun resekte edilerek laboratuvarımıza verilmiş olmasıdır.

Aşağıda gösterilen saturasyon deneyleri için B<sub>max</sub> insan korteksi için  $802.0 \pm 38.9$  fmol/mg TE olarak bulunmuştur. K<sub>D</sub> ise  $4,2 \pm 0,5$  nM olarak belirlenmiştir (Tablo 11).



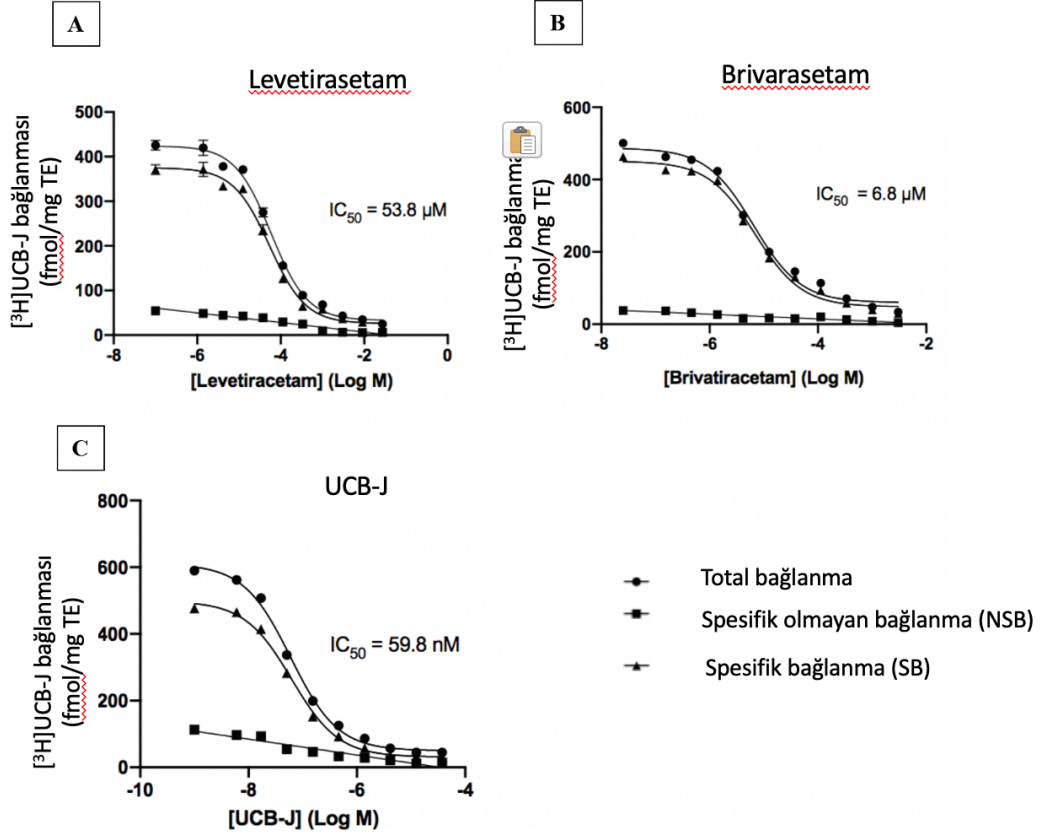
Şekil 37: Saturasyon grafiği

A) Sıçan Korteksi B) İnsan Korteksi. Grafikler toplam bağlanmayı, spesifik bağlanmayı ve spesifik olmayan bağlanmayı göstermektedir. X eksenini, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 6 ve 12 konsantrasyonları için nM cinsinden [<sup>3</sup>H]UCB-J'yi göstermektedir ve y eksenini, fmol/mg TE cinsinden bağlanmayı göstermektedir. NSB için korelasyon katsayısı (R<sup>2</sup>) sıçan için 0.88 ve insan için 0.89 idi. Veri noktaları, teknik kopyalara dayalı ortalama ± SEM'i temsil eder. C) Üste sıçan altta insana ait temsili otoradyogramlar

İnsan korteks dokusundaki inhibisyon grafiklerinden elde edilen farmakolojik bağlanma özellikleri aşağıdaki gibidir. IC<sub>50</sub>, Levetirasetam için 43.3 µM olarak; Brivaracetam için 6µM ve soğuk UCB-J için 75nM olarak belirlendi. Log IC<sub>50</sub> sırasıyla levetirasetam, brivaracetam ve soğuk UCB-J için -4.8, -5.6 ve -7.1' idi. Levetirasetam için Ki değeri 21.5 µM, brivaracetam için Ki değeri 0.7 µM ve soğuk UCB-J için Ki değeri 19.2 nM idi (Şekil 38, 39). Tüm yer değiştirme bağlama özellikleri aşağıdaki Tablo 11'de özetlenmiştir.

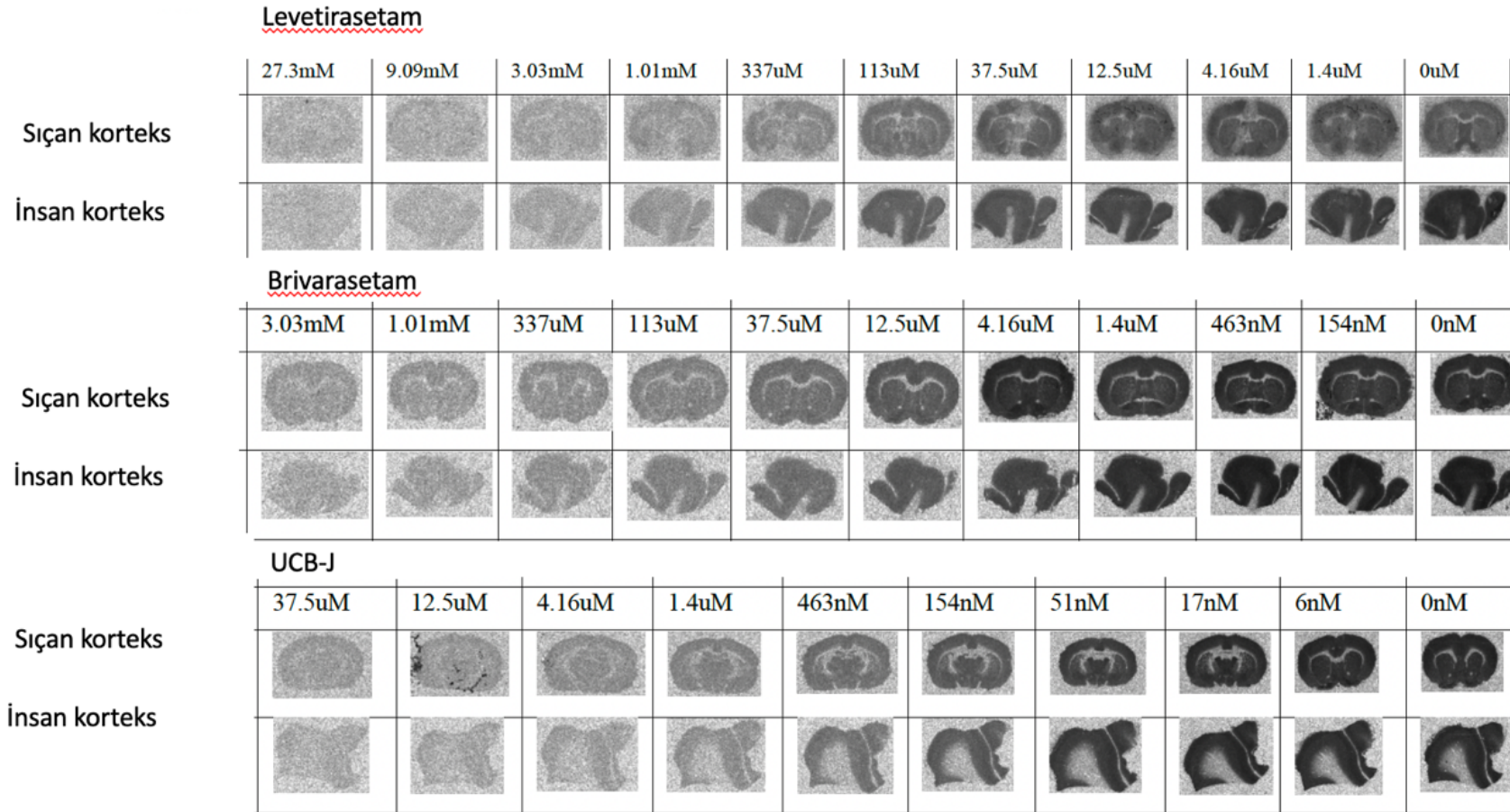
İNSAN KORTEKS				
	Levetirasetam	Brivarasetam	UCB-J	[ <sup>3</sup> H]UCB-J
<b>IC<sub>50</sub></b>	43.3 µM	6 µM	75 nM	
<b>Log IC<sub>50</sub></b>	-4.8	-5.6	-7.1	
<b>Ki</b>	21.5 µM	0.7 µM	19.2 nM	
<b>K<sub>D</sub></b>				4.2 ± 0.5 nM
<b>B<sub>max</sub></b>				802.0 ± 38.9 fmol/mg TE

**Tablo 11:** Doğunluk ve inhibisyon deneyleri için bağlanma özelliklerine genel bakış İnsan Korteksinin Doğunluk Deneylerinde [<sup>3</sup>H]UCB-J Bağlanmasının Farmakolojik Özellikleri: K<sub>d</sub> ve B<sub>max</sub>, bu amaçla doğrusal olmayan regresyon ile ham verilerden kullanılarak hesaplandı, değişken eğime sahip bir sigmoidal doz-yanıt eğrisini tanımlayan bir model kullanıldı.



**Şekil 38:** İnsan korteksinde Levetiracetam, Brivaracetam ve soğuk UCB-J ile  $[^3\text{H}]\text{UCB-J}$  inhibisyon deneyleri

(A) Levetirasetam (0  $\mu\text{M}$ - 27,3 mM), (B) Brivaracetam (0  $\mu\text{M}$  – 3,03 mM) veya (C.) soğuk UCB-J (0  $\mu\text{M}$  – 37,5  $\mu\text{M}$ ).



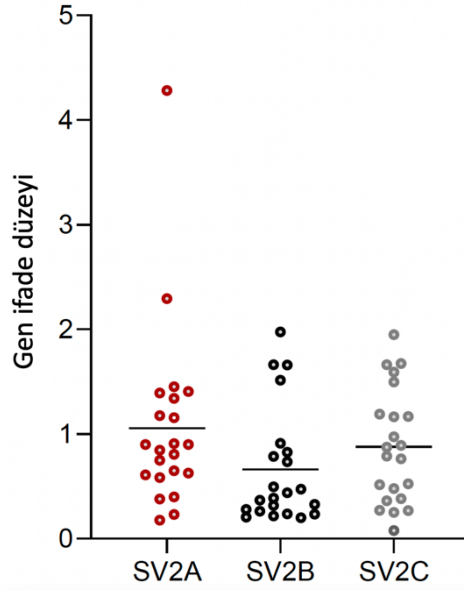
Şekil 39: İnsan ve sıçan korteks bağlanma karakteristiğinin temsili olarak karşılaştırılması

### 3.3.2. Temporal Lob Epilepsisi Hastalarında SV2A, SV2B, SV2C Genlerinin İfade Düzeyi ve Klinik Veriler ile İlişkisi

Bu çalışmada kullanılan epileptik hastaların lateral temporal korteksinden alınan rezeksiyonlar deneyimli bir histopatolog tarafından incelenmiştir ve dahil edilen hastaların çoğunda morfolojik olarak normal bulunmuştur (22 TLE hastasının sadece 2'sinde fokal kortikal displazi saptandı). Ayrıca, hipokampal veya kortikal morfoloji ve kalınlıktaki herhangi bir değişikliği belirlemek için MR görüntüleme yapılmıştır. Üç istisna dışında tüm hastalarda hipokampusta medial temporal lob sklerozu varken kortekslerde anormal MRG gözlenmemiştir.

Önce RT-qPCR yöntemini kullanarak üç farklı SV2 izoformunun (SV2A, SV2B ve SV2C) mRNA ekspresyon seviyelerini analiz ettik. Bu analiz, beyin cerrahisi geçiren 22 TLE hastasından alınan beyin dokuları üzerinde yapıldı. TLE hastalarının rezeke edilmiş neokorteks doku örnekleri, önemli miktarlarda SV2A, SV2B ve SV2C mRNA'ları içeriyordu.

Temporal neokorteks dokularının qPCR tahminleri, TLE hastalarından rezeke edilen tüm dokuların SV2A mRNA ekspresyonu içerdiğini ortaya çıkardı. Ancak, referans geni GAPDH'ye normalize edilen SV2A'nın transkript düzeylerinin hastalar arasında oldukça değişken olduğu gösterilmiştir ( $1.058 \pm 0.868$ ). Ayrıca aynı örneklerdeki SV2B ve SV2C mRNA seviyeleri sırasıyla de değişkendi ve sırasıyla SV2B için  $0,6599 \pm 0,55$  ve SV2C için  $0,8786 \pm 0,55$  seviyesindeydi (Şekil 40).



**Şekil 40:** SV2A, SV2B ve SV2C gen ifadesinin 22 hastadaki düzeyinin ve dağılımının gösterimi

Gen ifade düzeyi kontrol gene (GAPDH) oranla hedef genlerin seviyesini (fold change) göstermektedir.

TLE hastalarının temporal neokorteksinde SV2A ve SV2B arasında pozitif bir korelasyon gözlemlendi.

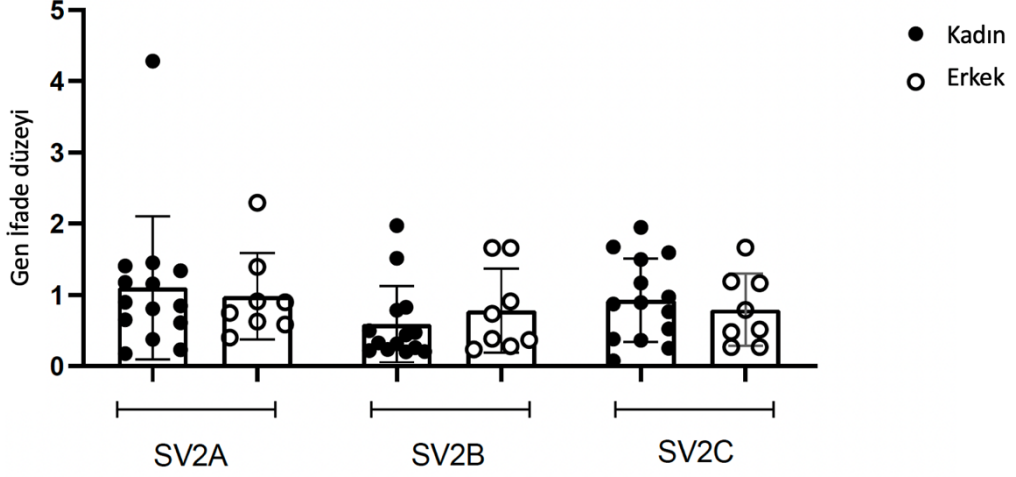
Ayrıca 22 TLE hastasından alınan temporal kortekste SV2A ve SV2B seviyelerinin nispi ekspresyonunu karşılaştırdık; SV2A ve SV2B genlerinin ekspresyonu önemli ölçüde korele olduğunu gözlemledik ( $r=0.5189$ ,  $p=0.0133$ ). Buna karşılık, SV2C mRNA seviyeleri ile diğer SV2 transkriptleri (SV2A mRNA için  $r=-0.1462$ ,  $p=0.5161$ ) ve SV2B için ( $r=0.1158$ ,  $p=0.6080$ ) arasında bir korelasyon bulunmadı.

TLE hastalarında ne cinsiyet ne de yaş SV2 izoformlarının ekspresyon seviyeleri üzerinde bir etkiye sahip değildir.

Mann-Whitney U Testi kullanılarak yapılan analiz, cinsiyetler arasında ifade açısından hiçbir fark ortaya koymadı. Üç SV2 transkripti için ifade edilme seviyeleri



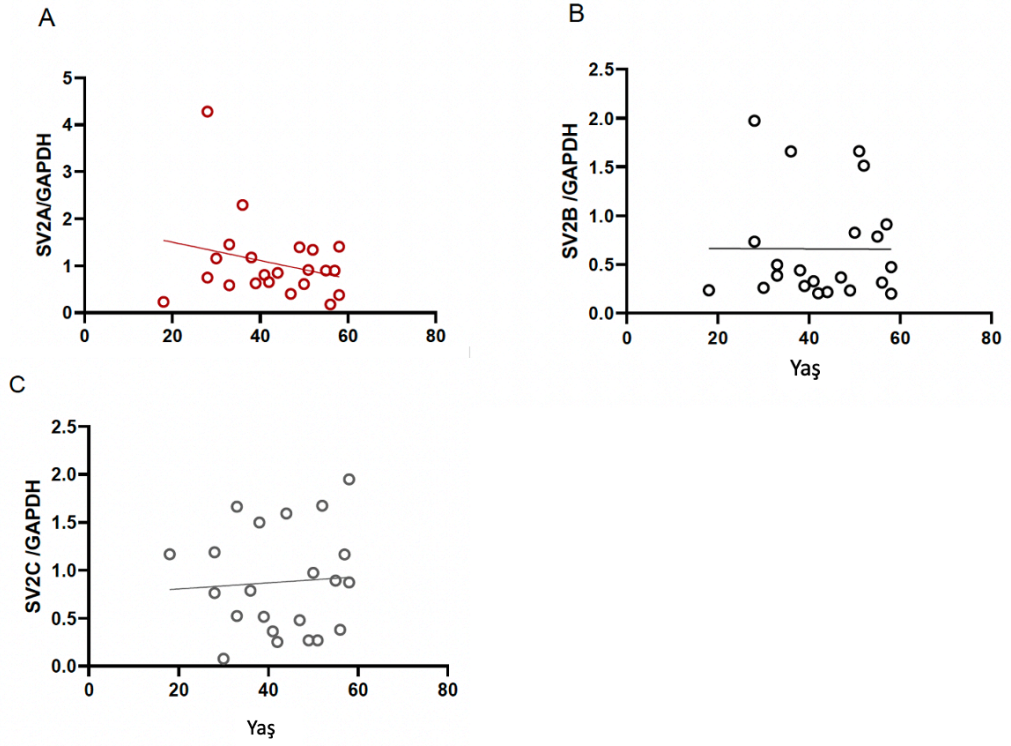
açısından cinsiyetlere özel bir eğilim bile yoktu; SV2A ( $p=0.9734$ ), SV2B ( $p=0.3650$ ) ve SV2C seviyeleri ( $p=0.6642$ ) (Şekil 41).



**Şekil 41:** Kadın ve erkek bireylerdeki SV2 gen ifade düzeyinin karşılaştırılması

Spearman korelasyon katsayısına göre cinsiyete benzer şekilde; SV2A ( $r=0.125$ ,  $p=0.618$ ), SV2B ( $r= 0.002$ ,  $p=0.99$ ) veya SV2C ( $r=0.083$ ,  $p=0.713$ ) ekspresyonunun yaş ile korele olduğuna dair hiçbir kanıt bulunamadı. Üç izoformdan herhangi biri yaşla birlikte ne arttı ne de azaldı (Şekil 42).

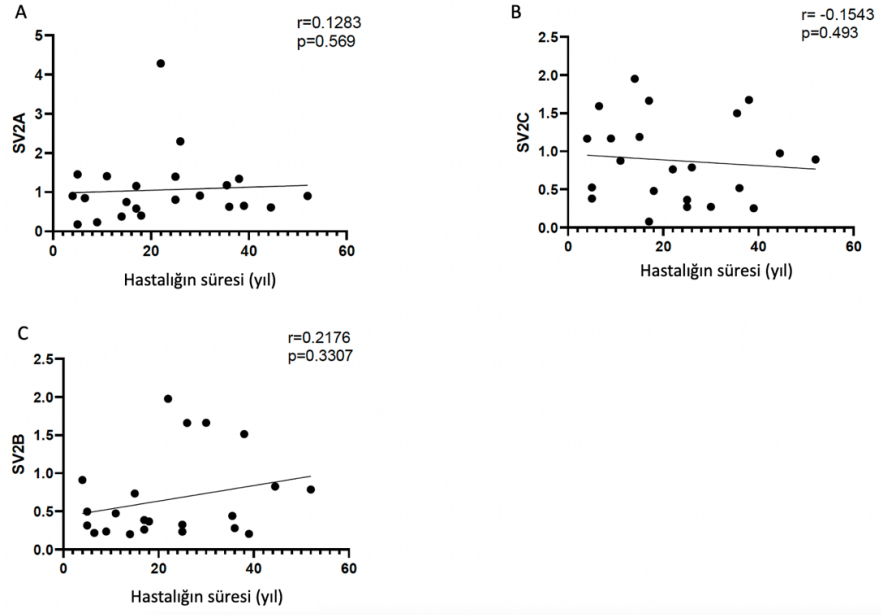




**Şekil 42:** Yaş ve SV2 izoform ifade düzeyleri arasındaki ilişki

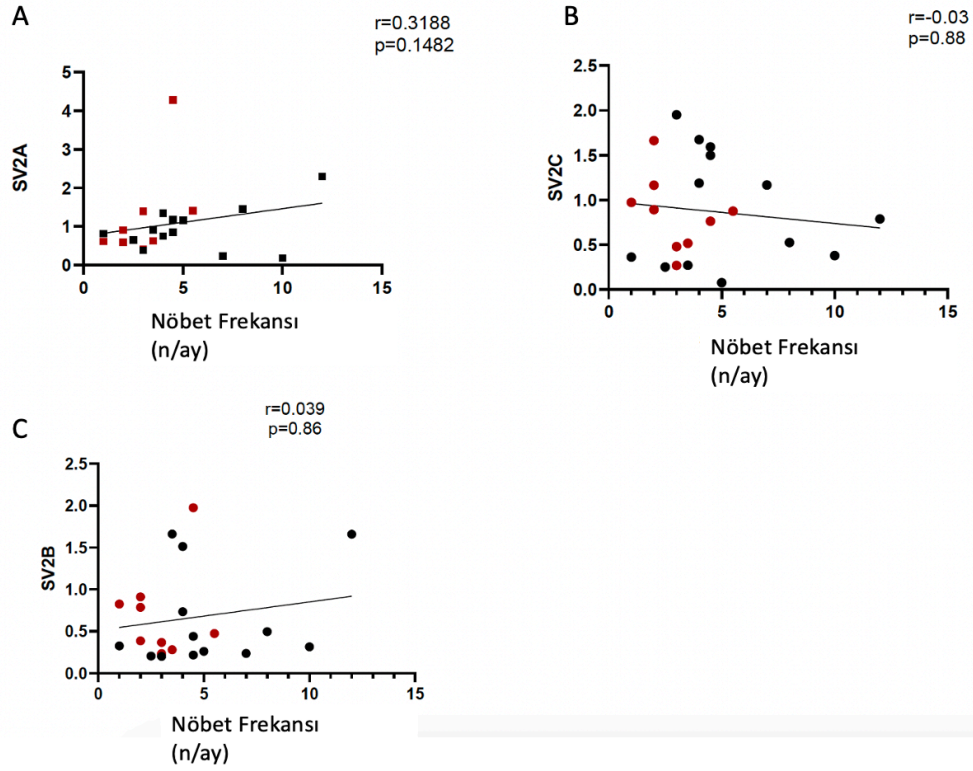
Epilepsi süresi ve nöbet sıklığı, SV2 genlerinin ekspresyonu üzerinde herhangi bir modülatör etkiye sahip değildir.

Spearman korelasyon katsayısı, epilepsi süresi (başlangıçtan itibaren kaç yıldır epilepsi hastası olduğu) ile SV2 gen ekspresyonu arasında korelasyon olmadığını gösterdi. (SV2A ( $r=0.1283$ ,  $p=0.569$ ), SV2B ( $r= 0.217$ ,  $p=0.330$ ) veya SV2C ( $r= -0.154$ ,  $p=0.793$ ) (Şekil 43).



**Şekil 43:** Hastalığın süresi ile kişideki SV2 izoform düzeyi arasındaki ilişki

Nöbet sıklığının ayrıca SV2 gen ekspresyonu (SV2A ( $r=0.318$ ,  $p=0.148$ ), SV2B ( $r= 0.039$ ,  $p=0.86$ ) veya SV2C ( $r= -0.034$ ,  $p=0.88$ )) ile ilişkili olmadığı da gösterilmiştir (Şekil 44).

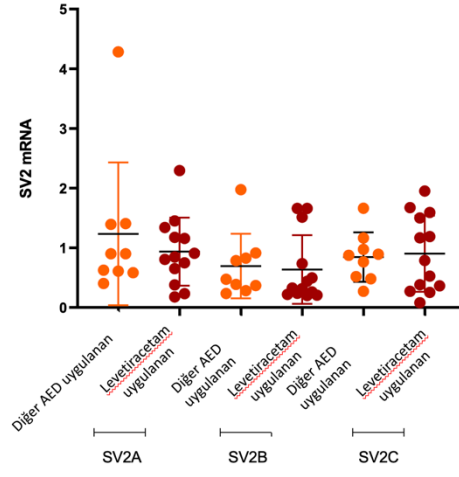


**Şekil 44:** Nöbet sıklığı (frekansı) ile SV2 izoformlarının seviyeleri arasındaki ilişki

Kırmızı noktalar Levetiracetam tedavisi alan bireyleri, siyah noktalar diğer antiepileptik ilaç tedavisi bireyleri göstermektedir.

Levetiracetam ilen tedavi görenler ile diğer AED'lerle tedavi edilen hastalar arasında SV2 gen ekspresyon düzeyinde hiçbir fark yoktu

Mann Whitney-U test sonuçlarına göre, SV2A ( $p=0.88$ ), SV2B ( $p=0.35$ ) ve SV2C ( $p=0.75$ ) ekspresyon seviyelerinde Levetiracetam ile tedavi edilen hastalar ile diğer AED'ler ile tedavi edilen hastalar arasında istatistiksel fark yoktu (Şekil 45).



**Şekil 45:** Farklı ilaç rejimleri uygulanan hastalar ile Levetiracetam uygulanan hastaların SV2 düzeyleri arasındaki fark

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. [<sup>3</sup>H]UCB-J Bağlanması Hem İnsan Dokusunda Hem De Sıçan Dokusundaki Karakterizasyonuna Dair Tartışma

Bağlanmanın doygunluğu, hedef protein üzerindeki tüm bağlanma bölgeleri ligand tarafından bağlandığında elde edilir. Maksimum spesifik bağlanma, B<sub>max</sub> olarak adlandırılır. Dengede hedef proteinler üzerindeki bağlanma bölgelerinin yarısını işgal etmek için gereken ligand konsantrasyonu, bağlanma afinitesini yansıtan denge ayrışma sabiti (K<sub>D</sub> değeri) olarak adlandırılır (127).

Düşük bir K<sub>D</sub> değeri, düşük bir ligand konsantrasyonunun reseptörlerin yarısını işgal etmek için yeterli olduğunu ve ligand için yüksek bir afiniteyi gösterir. Buna karşılık, reseptörlerin yarısını işgal etmek için yüksek bir ligand konsantrasyonu gerektiğinde, K<sub>D</sub> değeri yüksektir, bu da ligand için düşük afiniteye işaret eder (97,120,128).

NSB ve dolayısıyla yanlış sinyal izlenmesi ile ilgili potansiyel zorlukların otoradyografide dikkate alınması önemlidir. Radyoligand ilgili proteine yüksek özgüllüğe sahip olsa da ligand ayrıca spesifik olmayan hedeflere düşük afinite ile bağlanabilir. Bu nedenle, NSB deneysel olarak farklı faktörlerle minimize edilir. Örneğin; ön inkübasyon tamponu, radyoligand ile inkübasyondan önce numunedeki çeşitli proteinlere spesifik olmayan bir şekilde bağlanan ve böylece radyoizleyicinin NSB'sini azaltan sığır serum albümini (BSA) içerir. Ca<sup>2+</sup> şelatlayıcı EGTA, inkübasyon tamponu içinde çözülür ve Ca<sup>2+</sup>'ya bağlı hücre yapışmasını sınırlayabilir ve MgCl<sup>2+</sup>, endojen peptitler ile spesifik olmayan etkileşimleri engeller. NSB, birkaç yıkama adımı sırasında daha da azalır, ancak bu, radyoligand ile ilgilenilen protein arasında yüksek afinite gerektirir (129). Genellikle, NSB tamamen önlenemez ve artan radyoligand konsantrasyonu ile doygun olmayan lineer bir fonksiyon izleyecektir (128). Hem sıçan hem de insan korteksi doygunluk grafiklerinde ve otoradyogramlarında görüleceği gibi bahsedilen tüm bu öneriler göz önüne alındığı halde LEV ile test edilen NSB hala daha radyoaktif ışımaya vermiştir. Yani NSB sıfıra inmemiş ama çok güçlü bir inhibisyon yine de sağlanmıştır (Şekil 25, 38).

NSB için yaygın olarak kullanılan bir gösterge, yüksek konsantrasyonlarda etiketlenmemiş rekabetçi bir ligand kullanan paralel beyin kesitlerinde radyoligandın uzaklaştırılmaya çalışmasıdır. Böylece ilgili protein soğuk ligand tarafından bloke edilir ve sadece spesifik olmayan yani hedef dışında başka bölgelere bağlanan radyoligand miktarı saptanır. Radyoligandın etiketlenmemiş bir soğuk versiyonu, sıcak ligandla aynı hedeflere bağlanır, dolayısıyla yüksek bir soğuk ligand konsantrasyonu tam yer değiştirmeye neden olur. Ancak trityum işaretli UCB-J yerine işaretli UCB-J kullanmanın yani yapısal olarak identik bileşikleri kullanmanın dezavantajı vardır. Soğuk versiyonun sadece ilgilenilen bölgeyi değil aynı zamanda işaretli radyoligand gibi aynı spesifik olmayan hedefleri de yerinden etmesi ve NSB'nin yanlış negatif tespiti ile sonuçlanması olasıdır. Bu nedenle, NSB belirlenirken sadece spesifik bağlanma bölgesini paylaşan bir soğuk ligand tercih edilir, yani SV2A bağlanma bölgeleri ortak olan LEV veya BRIVA (128).

Radyoligand ve ilgili protein arasındaki spesifik bağlanma, toplam bağlanmadan NSB'nin çıkarılmasıyla belirlenir. Bağlanma artan radyoligand konsantrasyonları ile doymuş hale geldiğinden, spesifik bağlanma bir doyma eğrisinde gösterilmektedir. Spesifik bağlanma eğrisinden bağlanma özellikleri belirlenebilir. B<sub>max</sub> maksimum bağlanma kapasitesi olarak bulunur ve K<sub>d</sub>, Şekil 6'da gösterildiği gibi maksimum bağlanma bölgelerinin yarısını işgal etmek için gereken radyoligand konsantrasyonu ile belirlenir.

Önceki çalışmalarda çalışmamızla uyumlu olarak insan dokusunda 2,9-3,2 nM K<sub>D</sub> değerleri rapor edilmiştir (18,130,131). Otoradyografi bağlama çalışmalarının, bulunan K<sub>D</sub> değerinin 10 katlık bir konsantrasyonun bağlanma bölgelerini doyurduğu ve böylece maksimum protein yoğunluğu hakkında bilgi sağladığını düşündürür. Yani belirlenen K<sub>D</sub> değerinin 0.1-10 katının esas deneysel çalışmalarda kullanması gerektiği öne sürülmüştür (130). Ligand çok maliyetli bir ürün olduğundan, K<sub>d</sub>'nin 10 katı olan bir konsantrasyonun kullanılması genellikle finansal olarak mümkün değildir ve bu nedenle daha düşük konsantrasyonlar kullanılabilir. Bu tezin deneyinde ve mevcut literatüre dayanarak belirlenen K<sub>D</sub> değerine bağlı (Sıçan 1.97 nM, insan 4.2 nM) olarak makul olan 6nM'de bir konsantrasyon kullandık.

Genel olarak, türler arasında gözlemlenen  $K_D$  farklılıkları önemsiz bir öneme sahip görünmektedir. Sonuçlardan ve literatürden elde edilen genel bilgi, [ $^3H$ ]UCB-J bağlanmasının sıçan ve insanda benzer olduğudur. Bu projedeki  $K_i$  değerleri ile teyit edildiği gibi, ayrıca [ $^3H$ ]UCB-J bağlanmasının türler arasında değişmediği yani SV2A'nın türler arasında korunduğunu gösterir. Sıçan korteksindeki [ $^3H$ ]UCB-J çalışmaları insanlardaki veriler transle edilme özelliğine sahiptir. Bu iddia, nörolojik hastalığı olmayan insanlardan alınan dokular üzerinde yapılacak gelecekteki çalışmalarda daha da doğrulanmalıdır. Levetirasetam, brivaracetam ve soğuk UCB-J için SV2A'ya bağlanma kapasitelerinde veya afinitelerinde belirgin farklılıklar gözlemlendi. Levetirasetam en düşük afiniteye sahiptir, bunu sırayla brivaracetam ve UCB-J izlemektedir. UCB-J'nin hem sıçan hem de insan korteksinde Racetam'dan 100 kat daha güçlü olduğu görülmektedir. [ $^3H$ ] radyo etiketi, sıcak ve soğuk UCB-J bileşikleri arasındaki tek yapısal farkı sunduğundan, bu durum zaten beklendiği gibidir. Brivaracetamın levetirasetamdan 10 kat daha yüksek SV2A afinitesine sahip olduğu daha önce gösterilmiştir (132); benzer şekilde levetirasetam ile karşılaştırıldığında brivaracetamın daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu bulgunun klinik sonuçları olabilir, çünkü daha yüksek afiniteye sahip bileşikler hastalara daha düşük bir dozda verilebilir ve bu nedenle daha az hedef dışı yan etkiye neden olur. Bu nedenle, brivaracetam hasta gruplarının tedavisi için en azından kâğıt üzerinde daha iyi bir seçim gibi görünmektedir.

#### **4.2. *In Vivo* Çalışmalarımızın Sonuçlarına Dair Tartışma**

Bu çalışma hem sistemik hem de lokal KA uygulamasının, uygulamayı takiben ilk günlerde hem hipokampal alanlar hem de hipokampal alan dışı bölgelerde gri cevher alanlarında [ $^3H$ ]UCB-J'nin bağlanmasında azalmalar ürettiğini göstermektedir. İki bağımsız hayvan deney modelinde oldukça benzer değişikliklerin gösterilmesi bulguların tekrarlanabilirliğine işaret etmektedir. Bağlanmadaki değişikliğin büyüklüğü, bölgeler arasında ve iki farklı KA modeli arasında farklılık göstermektedir. Önemli olarak ve aşağıda tartışıldığı gibi, bağlanmadaki azalmayı, çoğu beyin bölgesinde tam bir restorasyon izlemektedir.

Hipokampus beklendiği üzere en çok etkilenen bölge olmuştur. Bu durum, hipokampusun KA nörotoksitesine karşı en savunmasız bölge olduğu ve KA

reseptörlerinin diğer bölgelere göre bu bölgede daha fazla olduğu gerçeğiyle uyumludur (44,107). Hipokampusta erken hasar oluşması da bu bölgenin nöbet başlangıç yeri olması gerçeğini desteklemektedir. Beyaz cevherde [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanması ihmal edilebilir düzeydedir ve sinaptik bölgelerin yokluğundan dolayı uygulama yolundan bağımsız olarak KA uygulanmasından etkilenmez (133). Bu bulguyla uyumlu bir şekilde, beyaz cevher daha önce *in vivo* görüntülemeye SV2A radyoligandları için bir referans bölge olarak kullanılmıştır (18,133). Bölgeye özgü bir değişim ve düzenleme olduğunu öne süren şekilde hipotalamusta bağlanmada hemen hemen hiçbir değişiklik gözlenmemiştir.

KA modeli tam anlamıyla TLE'nin translasyonel bir hayvan modelidir çünkü hastalığın tüm semptomatik ve klinik bulgularını taklit ettiği gibi; serebral korteks ve hipokampustaki dejeneratif ve nöroplastik değişiklikleri de göstererek patolojik süreçleri de taklit eder (1,134–137). Hipokampusta [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasının zaman profili, erken aşamalarda kademeli bir düşüş ve sonraki takip eden aşamalarda ilerleyici bir restorasyon göstermiştir. Bağlanmadaki azalma hücre ölümü, sinaptik kayıp ya da vezikül sayısındaki değişikliklerden kaynaklanmış olabilir. Bağlanmadaki yükselme, genellikle latent ve kronik epileptogenez dönemlerinde meydana gelen ve memelilerde aylar veya yıllar boyunca süren sinaptik yeniden yapılanmanın bir sonucu olabilir (8).

Plastik değişikliklerin birçoğu, eksitator ve inhibitör sinapslar arasında dengesizliklere neden olmaktadır ve özellikle hipokampal yapılarda anormal sinaptik plastisiteye, yeni ama işlevsiz sinaptik ağların kurulmasına ve glial hücre sayısında artış ile gliozise yol açmaktadır (5,138,139). Latent fazlardaki bu anormal yeniden düzenleme nedeniyle, hastalarda epilepsinin ayırt edici semptomu olan spontan tekrarlayan nöbetler meydana gelmektedir (140). Radyoligand bağlanma seviyesinin sinaptik yoğunluğu yansıttığı göz önüne alındığında (16), kronik dönemlerde bazal seviyelere geri dönen [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasını gösteren verilerimiz bu dönemlerde sinaptik yapılanmaya işaret ediyor ve kaybolan sinapsların yerine yenilerinin yapıldığını gösteriyor olabilir ancak bağlanmadaki bu yoğun artışın işlevsel sinapslar olarak ortaya çıkıp çıkmadığı belirsizdir. Deneysel dizaynda kullanılan hayvanlarda kronik dönemlerde spontan nöbetlerin ortaya çıktığı düşünüldüğünde



bağlanma düzeyindeki bu yeniden artışın, sağlıklı bir geri kazanım değil, disfonksiyonel sinapsların ortaya çıktığı bir geri dönüşüm veya yeniden yapılanma olduğu düşünülebilir.

[<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanması tarafından yansıtılan sinaps yoğunluğundaki iyileşmenin mutlaka geri dönüşümlü bir iyileşme olmayabileceğini, ancak hipokampusta daha uyarılabilir ağlara doğru kayan sinapslardaki değişiklikleri temsil edebileceğini düşünmekteyiz. [<sup>18</sup>F] Florodeoksiglukoz ([<sup>18</sup>F]FDG ) ligandı ile yapılan bir *in vivo* görüntüleme çalışması, epileptik sıçanlarda beynin zamana bağlı metabolik değişikliklerini göstermiştir (141). Mevcut bulgularımıza benzer şekilde, status epileptikuslu sıçan beyinlerinde, epileptogenezin akut ve latent fazlarında beyin glukoz metabolizmasında kademeli bir azalma gözlenmiştir. Lokal KA enjeksiyonundan sonra [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasındaki azalmaya benzer şekilde latent ve kronik fazlarda hipokampusta glukoz hipo-metabolizmasının kalıcı olması dikkat çekicidir. [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanması ve [<sup>18</sup>F]FDG bağlanmasının zaman profilindeki örtüşme, erken dönemlerde sinaptik kayıp ve bu kayba eşlik eden hipometabolizma; kronik dönemlerde ise sinaptik yeniden yapılanmaya ve bununla ilişkili nispeten hızlanan metabolizma arasındaki bir ilişkiyi gösteriyor olabilir.

İki farklı KA uygulama yolunun tercih edilmesindeki amacımız ise, ipsi ve kontralateral bölgelerde [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasının zaman profilindeki olası değişiklikleri araştırmaktır. Ve daha detaylı olarak anlatacak olursak temel amacımız; lokal uygulamada üretilen epileptojenik bölgeden kalkan interiktal deşajların, kontralateral bölgeye geçerek diğer hipokampus veya beynin diğer hemisferindeki peri-hipokampal alanlarda sinaptik dansitede meydana getireceği değişiklikleri ve bu değişikliklerin zamanlamasını ve boyutunu belirlemektir. Sistemik enjeksiyonların tüm beyin eksitotoksitesine neden olduğu, lokal intraserebral enjeksiyonların ise bölgesel eksitotoksitesine neden olduğunu ortaya konmuştur (24,142). Sonuçlarımız, bağlanmadaki azalmanın, lokal uygulamadan sonra daha erken meydana geldiğini ve bunun muhtemelen bir akut nöronal kaybın sonucu olduğunu göstermektedir (143). Bu nedenle, intrahipokampal KA akut nekrotik ölümü indüklerken, sistemik uygulamada daha sonraki zaman noktalarında programlanmış hücre ölümü nedeniyle hücreler kaybedilir (144). Öte yandan, bağlanmadaki azalmaların maksimuma ulaştığı

noktaların lokal tedaviden 10 gün sonra ve sistemik tedaviden 5 gün sonra olduğu görülmüştür. Lokal tedavi modelinde cerrahi operasyon esnasında anestezi için kullanılan ketaminin antagonistik etkisi bu zaman farklılıklarına katkıda bulunuyor olabilir. Ketaminin NMDA reseptörlerine KA ile yarışmalı olarak bağlandığını ancak antagonist olarak çalıştığını biliyoruz (145). Ketaminin KA'nın lokal tedavideki etkisini daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak hafiflettiği özetlenebilir (146).

Önceki çalışmalar, hipokampustaki intraserebral KA enjeksiyonlarının, enjekte edilen bölgede 48 saat içinde hücre ölümlerini tetiklediğini, ancak daha sonra iktal aktivitenin yayılması yoluyla kontralateral bölgede de hücresel kaybı indüklediğini göstermiştir (147). Nöbet iktal aktivitesi, aksonal projeksiyonlarla hipokampusun dorsalinden ventral kısımlarına ve ekstrapokampal ve kontralateral bölgelere yayılabilmektedir (109,147,148). Anormal elektriksel aktivitenin yayılması, 5 gün içinde diğer uzak bölgelerde sinaptik yoğunlukta değişikliklere neden olabilmektedir (147,149). Bu bilgilerle tutarlı bir şekilde, çalışmamızdaki ilk 3 gün içinde enjeksiyonun aynı tarafındaki hipokampus, temporal korteks ve piriform kortekste bağlanmadaki ani azalmayı, karşı taraftaki bölgede gecikmeli bir azalma takip etmiştir. Bu azalma paterninde gözlenen bu lateralizasyon tedaviden 10 gün sonrasına kadar yani akut fazlarla sınırlı kalmış ve daha sonra kaybolmuştur.

KA'ya karşı daha savunmasız olan nöronlar, özellikle DG, CA1 ve CA3 bölgelerinin GABAerjik internöronlarıdır (143,144). Bu bölgelerdeki çalışmamızda gözlemlenen azalma bu nedenle GABAerjik internöronlarda böyle bir azalmayı yansıtır olabilir. Bu varsayım, [<sup>3</sup>H]-UCB-J'nin bağlandığı SV2A ekspresyonunun GABAerjik nöronlarda daha bol olduğu gerçeğiyle de uyumludur.

Sistemik modelde, hipokampusta ve serebral korteks boyunca bağlanmadaki azalmanın, uygulamadan aylar sonra tam iyileşme ile bazal seviyelere döndüğünü bu çalışma ile ortaya çıkardık. Aksine, lokal KA enjeksiyonları hipokampus, temporal ve piriform kortekste büyük azalmalara yol açmıştır, ancak bu seviyeler tedaviden 3 ay sonra bile bazal seviyelere dönmemiştir. Lokal KA tedavisinin, davranışsal semptomlarda kendini göstermeyen ancak beyin devrelerinde daha şiddetli değişikliklere ve farklı sonuçlara neden olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda

sadece video bazlı davranışsal yani konvulsiyonel nöbetler değerlendirilmiştir. Her iki modelde de yani sistemik ve lokal uygulamalarda spontan nöbetlerin ortaya çıkışı benzerdir ancak konvulsiyonel olmayan ve EEG analizi ile ortaya konabilecek diğer epileptiform aktivitenin de çalışılması gerekliliğini bir kez daha vurgulamak isteriz. Ancak sunu da belirtmeliyiz ki Serrano ve ark., 2020 (20), KA enjeksiyonunun elektrografik sonuçlarını zaten incelemiş ve [<sup>18</sup>F]UCB-H bağlanması ile EEG parametreleri (nöbet sayısı/hafta, ortalama nöbet süresi vb.) arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Hem bu bulgular hem de Levesque ve Avoli'nin (2013) (24) zaten hem yerel hem de sistemik KA modellerinin davranış kalıplarının benzer olduğunu öne sürmesi, iki modeli ayırt etmek için EEG analizi yapmamızı engelledi. Buna rağmen, her iki modelde de hastalık semptomlarının ortaya çıkma zamanlamasının birbirinden farklı olmadığını ve sıçanların hipokampuslarında sahip olduğu SV2A seviyesi ile SRS'nin ortaya çıkış zamanlamasının hiçbir ilişkisi olmadığını gösterdik ki bu bizim bilgimize göre yeni bir bulgudur. EEG yerine video kaydına dayalı davranışsal/semptomatik değerlendirmeleri kullanan ve hala epileptogenezde SV2A'nın rolü hakkında önemli bilgiler sağlayan başka faydalı çalışmalar da vardır (150–152). Bu nedenle, hipotezimiz bağlamında EEG analizi yapılmadan davranışsal/hastalık belirtilerini incelemenin yeterli olduğuna inanıyoruz. Ayrıca, yerel ve sistemik arasındaki SV2A azalma paternleri arasındaki farklılıkların arkasındaki mantığı ele almak için, SRS başlangıcına kadar geçen süre (epilepsinin ayırt edici semptomu) ile hipokampusun SV2A seviyesi arasında bir ilişki olmadığını vurgulayan veriler sağladık (Şekil 35, 36).

İlginç bir şekilde, kortikal ve subkortikal bölgeler gibi ekstra hipokampal alanlar da etkilenmiştir. Prefrontal korteks, orbitofrontal korteks, singulat korteks ve sensorimotor korteks, her iki tedavi modelinde de hipokampusa kıyasla daha hafif azalmalar göstermiştir. Ancak, azalmaların büyüklüğü tüm kortikal alanlar karşılaştırıldığında temporal ve piriform kortekslerde daha yüksek bulunmuştur. Önceki çalışmalar, KA'nın piriform kortekste (153) ve temporal kortekste (107,154) belirgin lezyonları indüklediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte prefrontal, singulat ve orbitofrontal korteksler de KA toksisitesinden etkilenmektedir (155,156). Ek olarak, kaudat-putamen ve accumbens gibi subkortikal bölgeler de bağlanmada önemli azalmalar göstermiştir. KA'nın striatal lezyonlara neden olduğu bilinmektedir

(157). Hipokampus dışındaki bağlanmanın azalması, muhtemelen KA'nın kendi toksik etkisine değil, iktal aktiviteye atfedilir ki yukarıda açıklandığı gibi iktal aktivite yayılarak çoklu beyin ağını etkiler (158).

KA modeli temporal lob epilepsisi için onaylanmış ve kabul edilmiş bir model olmasına rağmen, optimizasyon ve yöntemin sağlam olması için hayvan modellerinin tüm hayvanlarda benzer semptomlara neden olması gerektiği unutulmamalıdır. Hayvanların KA gibi kemo-konvülzan maddelere karşı bireysel duyarlılığı nedeniyle, bu kadar az sayıda hayvan popülasyonu (3R, indirgeme kuralı; n, grup başına 8 idi), SV2A analizinin sonuçlarında büyük grup içi varyasyonlara yol açabilir. Bu bireysel varyasyonlar nedeniyle, bazı hayvanlar aynı dozda KA verilse bile nöbet yaşamazlar ve bazıları ilk nöbetleri olsa bile daha sonra SRS yaşamazlar. Bu nedenle, tasarımıımızın güvenilirliği için ilk yıkıcı olayın yani statusun boyutunu eşit tutmak, bu zamansal çalışmada hayvan modelinin optimizasyonu için çok önemlidir. Bu nedenle, KA'dan sonra sadece benzer şiddette status epileptikus ( $RS > 4$ ) yaşayan hayvanları ve epilepsinin yani epileptogenezin kazanıldığı bir kanıtı olarak spontan tekrarlayan nöbet yaşayan hayvanları çalışmaya dahil ettik. Diğer bir deyişle, kainik aside daha dirençli olan ve herhangi bir başlangıç status epileptikus yaşamayan ve kronik dönemde SRS gibi herhangi bir semptom göstermeyen sıçanların beyininde majör bir sinaptik değişiklik gözlenmeyeceği düşünülerek bu hayvanlar çalışma dışı bırakılmıştır. Bizim yaklaşımımıza benzer şekilde, Serrano ve ark., 2020 (20) çalışması da aynı amaç ile sıçanlar evre 5 yani tonik-klonik nöbet sergileyene kadar çoklu sistemik dozlarda KA uygulamıştır; ancak SRS tezahürü olmayan sıçanları dışlamamışlardır. Bunun aksine, Contreras-Garcia ve ark. (2018)(152)'da KA uygulaması sonrası derecesi farketmeksizin status geçirenleri ancak status gerçekleşikten sonra spontan nöbet gösteren sıçanları epileptik hayvanlar olarak kabul edilip çalışmaya dahil edilmişlerdir. Böylelikle bu mantıkla sıçanlardaki bireysel farklılıkları en aza indirgeyerek SV2A'nın epileptogenez sürecindeki değişimi izlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle biz de deneysel dizaynımızdaki dışlama kriterlerini önemli buluyoruz. Ancak bunun *in vivo* bir deneysel plan olduğu ve insanlarda bireysel farklılıkların bu sürece katkısı olduğu unutulmamalıdır. Ve büyük örneklemli hayvan çalışmaları ile bireysel farklılıklarında SV2A ile ilişkisinin kurulması gerektiğini düşünüyoruz.

Hem lokal hem sistemik model karşılaştırıldığında lokal KA uygulamasındaki daha yıkıcı ve geriye dönmeyen SV2A azalmasının, beyne direk bir girişim olan stereotaksik enjeksiyonun sonucu olduğu düşünülebilir. Ancak deneysel dizaynımız bu durumu elimine etmektedir. Çünkü intrahipokampal uygulamanın kendisinin oluşturduğu SV2A düzeyindeki azalma yani [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanması düzeyindeki azalmayı da spesifik olarak test ettik. Bu amaçla sham opere edilen, yani stereotaksik girişim sırasında yapılan her bir işlemin tekrar edildiği ancak KA yerine izotonik steril salin solusyonu enjekte edilen hayvanlar da yine farklı zaman dilimlerinde (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90 gün sonra) beyinler örneklenerek [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma paterni izlendi, ancak kontrol grupları arasında hiçbir değişim gözlenmedi. Ayrıca enjeksiyon noktasının dorsal CA3 bölgesine yapıldığı ve en rostraldeki (burna en yakın, en uç) CA3 bölgesi seçilerek yapıldığı unutulmamalıdır. Teknik detaylar incelendiğinde bregmaya -2.04 mm uzaklıkta (anterior-posterior düzlem) enjeksiyon yapılarak, bağlanma derecesine ait ölçümler -3.6 mm uzaklıktaki dorsal hipokampüste gerçekleştirilmiştir. Yani enjektörün hipokampüse girmesi ama en uç bölgeye girerek en az derecede mekanik hasar vermesi sağlanmıştır. Dolayısıyla ölçüm yapılan bölgelerde enjeksiyon kaynaklı bağlanmada azalma gözlenmemiştir.

Önceki çalışmalarda TLE hastalarının hipokampusunda ve neokorteksinde SV2A mRNA seviyesinde, protein ekspresyonunda ve spesifik radyoligand bağlanma yoğunluğunda azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir (13,14,19,62) ve SV2A düzeylerinin TLE hastalarında hipokampal skleroz derecesi ile korele olduğu gösterilmiştir (14). Bu çalışmalar, TLE hastalarının beynindeki SV2A düzeyindeki değişiklikler hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır ve değişiklikler muhtemelen kalıcı olduğundan lokal KA modelimizin bulguları ile daha iyi uyum sağlamaktadır.

SV2A'nın sinaptik yoğunluğun güvenilir bir göstergesi olduğu göz önüne alındığında, buradaki veriler sadece epileptogenezde değil aynı zamanda diğer nörodejeneratif bozukluklarda da otoradyografi ile [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma seviyesinin ölçülmesinin, hastalık evresindeki değişiklikleri veya nöronal devrelerin yeniden düzenlenmesini ölçmek için değerli bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

### 4.3. TLE Hastalarının Biyopsi Materyallerinden Elde Edilen Bulgulara Dayalı Tartışma

Lateral temporal korteks, epileptojenik bölgeye ulaşmak ve rezeke etmek için beyin cerrahisi ile çıkarılan tek doku parçasıdır. Canlı beyinden alınan doku olduğu için, SV2A'nın biyokimyasını ve insanlarda SV2'lerin ekspresyon seviyesi incelemek için çok iyi bir fırsattır. Çalışmamızda epileptik bireylerden elde edilen dokularda SV2A, SV2B ve SV2C'nin gen ifade düzeyleri ortaya konmuştur. Ve her bir hastanın sahip olduğu ifade düzeyi ile klinik verileri ve bireysel farklılıkları ilişkilendirilmeye çalışılmıştır.

İlk önce TLE hastalarından rezeke edilen temporal neokortekste SV2A, SV2B ve SV2C'nin ekspresyon modelleri gösterilmiştir. 22 TLE hastasının neokorteksinden elde edilen mRNA ekspresyonu ölçümlerine göre, üç izoformun seviyelerinde değişken bir dağılım vardır. Üçü için de bir noktada birikim gözlenmemiştir. Bu veriler, hipokampusta SV2 izoformlarının ekspresyon paterninde bireyler arası değişkenliği gösteren önceki verilerle tutarlıdır (14).

Sonuçlarımız ayrıca SV2A'yı kontrol deneklerinin kortikal bölgelerinde ölçmeyi hedefleyen ve bireyler arasında SV2A'nın dağınık dağılımını gösteren PET çalışmalarlarıyla da uyumludur (18,21,23,84). Hipokampustaki SV2A düzeyinin bireyler arasındaki yüksek varyasyonunun sebebi hipokampustaki patoloji olabilir ki bu durum patoloji düzeyi ile SV2 düzeyi arasında korelasyon varlığı gösterilerek desteklenmiştir. Ancak korteksteki SV2 düzeylerinin denekler arası değişkenliği biyolojik heterojenliğin (eğitim, yaş, cinsiyet vb) veya hastanın diğer klinik bulgularının bir sonucu olabilir ve dolayısıyla popülasyonun değişkenliğini temsil etmektedir. Burada, denekler arasında geniş bir SV2 izoformu ekspresyon seviyesi aralığı olduğunu gösterdik. Yaş, cinsiyet, ilaç tedavi rejimleri, epilepsi süresi, rezekte edilen dokudaki gri/beyaz cevher oranı gibi doku kompozisyonundaki olası farklılıklar açısından popülasyonun değişkenliğinin SV2 izoform seviyesindeki değişkenliğin sebebi olabileceğini öne sürerek bu hipotezimizi değerlendirdik.

Diğer taraftan; SV2B ve SV2A'nın neokortikal ekspresyon paterninin korele olduğunu ve aynı yönde hareket ettiğini gösterdik. Yani hastalar SV2A'ya sahip

olduğu oranda SV2B transkriptinin ekspresyonuna sahipler. SV2B'nin aksine, SV2C diğer izoformların ikisi ile de korele değildir. SV2C'nin insan beyni boyunca daha kısıtlayıcı bir dağılıma sahip olması sadece bazal ganglionlarda ifade edilmesi bu durumun sebebi olabilir (10,22). Aksine SV2A ve SV2B'nin daha yaygın olarak bulunması ve korteksteki seviyelerinin de yüksek olması ikisi arasındaki korelasyonu kuvvetlendiriyor olabilir (82). Ayrıca, SV2A ve SV2B proteinlerinin bölgesel olarak dağılımlarının örtüştüğünü ve hatta bazı rolleri paylaştıklarını biliyoruz. Çünkü SV2A/SV2B double knock out farelerin, yalnızca SV2A knock out farelerle karşılaştırıldığında (60) daha ciddi sonuçlar göstererek daha şiddetli nöbetler geçirdiklerini ve öldüklerini genetik mühendisliği çalışmaları göstermektedir.

Beklediğimiz gibi, sonuçlarımız cinsiyetler arasında da fark göstermedi. SV2 izoform seviyeleri değişkendi ve hem kadınlar hem de erkekler arasında büyük bir varyasyona sahipti.

Daha sonra yaş ve SV2 izoform seviyeleri arasındaki ilişkiye odaklandık. İlginç bir şekilde, yetişkinlerin neokorteks dokusunda yaş ile SV2 izoform seviyeleri arasında bir ilişki yoktur. Yaş, sağlık ve hastalık koşullarında sinaptik proteom bolluğunun modülasyonu yoluyla sinaptik plastisite için güçlü bir düzenleyici faktördür (159). Bazı önemli çalışmalar, SV2A protein ekspresyon seviyesinin yaşa bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (160,161); bu çalışmalar ideal olarak yaş ve SV2A düzeyi arasındaki ilişkiyi kurmaya çalışmıştır. Ancak bu çalışmaların sıçanlarda doğum sonrası gelişim süreçleri ile sınırlı olduğu unutulmamalıdır. Şimdiye kadar, sağlıklı deneklerde [<sup>11</sup>C]UCB-J ligandını kullanarak SV2A'yı hedefleyen PET görüntüleme çalışmalarından elde edilen kanıtlar, SV2A'nın frontal, oksipital, temporal ve posterior singulat kortekslerde yaşa bağlı bir şekilde azalttığını ortaya koydu (162). Ancak yetişkinlik dönemindeki yaşın neokorteksteki diğer izoform transkript ekspresyonunu etkileyip etkilemediği hala tartışılmaktadır.

Bu çalışmanın bir başka spekülasyonu, hastanın ne kadar süredir epilepsi hastası olduğu ve/veya hastanın ne sıklıkla nöbet geçirdiği gibi klinik verilerin SV2 izoformları üzerine etkisidir. Açıkladığımız gibi, bu klinik sonuçların hiçbirinin SV2 izoform ifadeleri üzerinde etkisi görülmemiştir. Nöbet süresi ve nöbet paterni SV2

düzeyle ilgili değildir. Nöbet tipi ile ilgili olarak, tüm hastalarda fokal bozulmuş farkındalık nöbetleri (FIAS) görölmüştür. SV2A ile diğer nöbet tipleri arasındaki ilişkinin açıklığa kavuşturulmasının çok önemli olduğunu düşünüyöruz. Ancak bizim çalışmamızda da olduğu gibi farklı tipteki epilepsi hastalarının biyopsilerini depolayan biyobankalardaki ve kohortlardaki sınırlı doku depoları nedeniyle bu hedefe ulaşmak zordur. Bunun yanı sıra epileptik aktivitesi olan veya olmayan farklı bölgelerin SV2 ekspresyon seviyesi hakkında farklı sonuçlara sebep olabileceği kanaatindeyiz. Groot ve ark. (2010) (163), hastaların korteksinden elde ettiği epileptik aktivitesi olan veya olmayan peritümöral korteks dokusunda SV2A immünoreaktivitesinde önemli bir farklılık göstermedi. Bu nedenle rezeke edilen kortekslerde iktal ve interiktal aktivitelerin varlığı hakkında gerekli bilgileri Tablo 7’de derlediğimizi ve SV2 seviyeleri ile bir ilişkileri olmadığını da belirtmek isteriz.

Ayrıca LEV ile tedavi edilen hastalar, diğer epileptik ilaçla tedavi edilenlere kıyasla SV2 izoform düzeylerinde herhangi bir farklılık göstermemiştir. Levetirasetamın antikonvülsan etkisini SV2A’yı bağlayarak gösterdiği (2), diğer antiepileptik ilaçların ise katyon kanallarını modüle ettiği ve beynin uyarılabilirliğini azalttığı iyi bilinmektedir (164). Verilerimizle, levetirasetam tedavisinin, nöbet önleyici etkisini uygulamak için SV2 izoform ekspresyonunu modüle etmediğini ortaya koyduk. Bu bulgu, levetirasetamın nöbetlere müdahale etmek için SV2A’yı bağladığını ve modüle ettiğini gösteren önceki verilerle uyumludur.

Ancak sonuçlarımız göze alındığından bu bireylerde hali hazırda epilepsi zaten kazanıldığından yani epileptogenez çoktan bir noktaya ulaştığından bu seviyelerdeki değişimin epileptogenezin bir sonucu mu yoksa sebebi mi olduğunu ortaya koymak zordur. Bu durum yine epileptogenez sürecinde beyin dokusunun farklı zaman noktalarında örneklenebilme olasılığının yüksek *in vivo* dizaynımızın ne kadar önemli olduğuna vurgu yapmaktadır.

Diğer yandan kontrol dokusunun yokluğu ve bu düzeyleri sağlıklı ve epilepsili bireyler arasında karşılaştırılma yapılamaması da çalışmanın diğer bir zayıf yönüdür. Ancak sağlıklı bir bireyden beyin dokusu örnekleme imkânsız olduğu unutulmamalıdır. Bu aşamada sağlıklı bireylere ait post mortem dokuda seviyeler



belirlenip karşılaştırma yapılabilir ki gen ekspresyonu çalışmaları için post mortem doku kullanımı ve RNA eldesi oldukça zordur.

Diğer bir yorumumuz ise bu çalışmayı destekleyecek şekilde immunohistokimyasal bir boyama ile SV2A, SV2B ve SV2C protein seviyelerinin neokortekste gösterilmesi gerekliliğidir. Epileptojenik bölgede nöroplastik değişikliklerin varlığını doğrulamak için patolojik ve morfolojik hipokampal muayene yapılmıştır. Her bir dokudaki skleroz derecesi ve varsa korteksteki displazi benzeri anomaliler doku düzeyinde saptanmıştır. Ancak hiçbir bulgu ile SV2 izoformlarının seviyeleri arasında bir ilişki bulunamamıştır. Önceki çalışmalara bakıldığında post mortem dokular incelenmiş ve sklerotik hipokampal dokularda SV2 paraloglarının seviyesi bildirilmiştir (14,62) ve ayrıca hipokampal skleroz derecesi ile ilgili korelasyonları ortaya konmuştur. Ancak, bizim çalışmamız özgün olarak hipokampusta değil neokorteksteki değişiklikleri incelediği için bu çalışmaları doğrudan birbiri ile karşılaştıramayız. Bağlanma ve qPCR ile gözlemlenen herhangi bir değişikliğin hücresel temeli hakkında bir immünohistokimyasal incelemenin ek doğrulama sağlayacağını düşünmekteyiz. Ancak yarı kantitatif immünohistokimyasal analiz yapmamızı engelleyen bazı teknik sorunlar bulunmaktaydı ki; bunlardan en önemlisi, dokunun fikse edilmemiş ve donmuş olması idi. Ayrıca, burada lateral temporal neokorteksin incelendiği göz önünde bulundurulmalı ve temporal lobun medial kısmındaki odaklar söz konusu olduğunda, bu tür analizlerin zaten literatürde var olduğu unutulmamalıdır. Buradaki diğer bir önemli nokta ise dokuya spesifik olarak eksprese edilen SV2 izoformu değil bizzat farklı hücre alttıplerinde mesela farklı inhibitorik ve eksitatörük hücrelerde SV2 izoformlarının ifade düzeylerinin belirlenmesidir ki bu da tarafımızdan bu tez kapsamında olmayan başka bir çalışma ile gösterilmiştir (165).

Çalışmanın eksik yönlerinden birisi temporal lob epilepsisi hastalarından sadece ilaca dirençli tip hastaların dahil edilmiş olmasıdır. Mevcut antiepileptik ilaçlardan nöbet kontrolünde faydalanan hasta gruplarının beyin dokularındaki SV2 izoformu seviyeleri hala daha bilmiyoruz. Ancak ilaca yanıt veren epilepsi hastalarında cerrahi rezeksiyona gerek duyulmadığından böyle bir hasta popülasyonuna ait taze beyin dokusuna ulaşmak mümkün değildir. Post mortem olarak

bu iki farklı popülasyonun özellikle SV2A protein ifade seviyeleri açısından karşılaştırılması önemli veriler sağlayacaktır.

Genel olarak *in vivo* dizaynlara, biyopsi incelemesine ve klinik verilere dayanan bu çalışma şunu ortaya koymuştur: SV2A'nın epileptogenez sürecinden nasıl etkilendiği gösterilmiştir, deneysel modellerdeki zamansal ve uzamsal farkları açığa çıkarılmıştır. SV2A dışında diğer izoformların da patoloji için önemi giderek artan bir ilgiyle araştırılmalıdır. Otoradyografi ile [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma miktarının belirlenmesinin klinik öncesi *in vivo* modellerde ve insana ait biyopsilerde SV2A'nın tespiti için değerli bir yaklaşımdır. Ayrıca, patofizyolojilerinde nöronal plastisite değişikliklerini içeren, sinaptik kaybın temel mekanizma olduğu diğer nörolojik bozukluklarda da sinaptik yoğunlukları ölçmek için bu yöntemin kullanılma potansiyeli yüksektir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

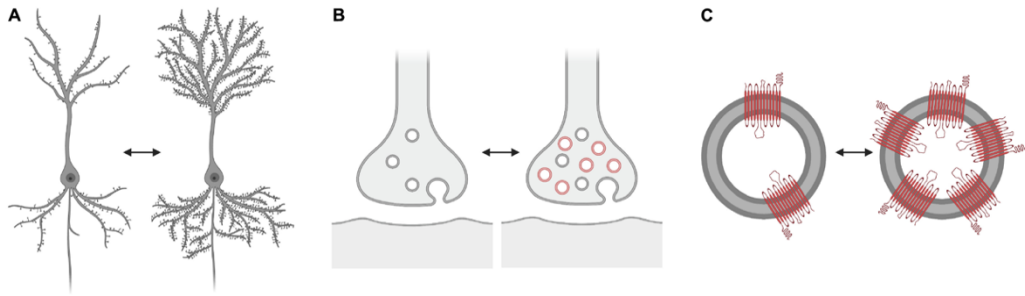
Sonuçlarımız, [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma modelinin zamana dayalı profilinin, epileptogenez süreci sırasında sinaptik yoğunluk değişiklikleri ile paralellik gösterdiğini göstermektedir. [<sup>3</sup>H]UCB-J, presinaptik belirteç SV2A'ya bağlandığından, bağlanma seviyesinin SV2A seviyesini ve dolayısıyla muhtemelen sinaps miktarını yansıttığını öneriyoruz, bu önerimiz sıçanlarda kainik asit sonrası UCB ligandı ile gerçekleştirilmiş PET görüntüleme sonucu ile de uyumludur (20). KA tedavisinden sonra akut dönemdeki [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma seviyesindeki azalma, hücre kaybını, herhangi bir hücre kaybı olmaksızın sinapslardaki hücre kaybını ve/veya SV2A protein miktarındaki seçici azalmaları yansıtabilir. Ayrıca zamansal profilimize göre [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanma seviyesinin akut fazlardaki düşüşü epileptogenezin patobiyolojisinde akut fazlarda meydana gelen sinaptik kayıp ile korelasyon göstermektedir; bunu takiben [<sup>3</sup>H]UCB-J radyoligandının kronik fazlarda artan bağlanma düzeyi aynı şekilde patobiyolojide kronik dönemlerde gözlenen sinaptik re-organizasyonla paralellik göstermektedir. Bu veriler hem SV2A'nın epileptogenez sürecinde sinaptik dansitede ve plastisitede meydana gelen değişiklikleri yansıtabilecek bir biyobelirteç olabileceğini hem de [<sup>3</sup>H]UCB-J otoradyografisinin SV2A'yı takip etmek için kolay, ucuz ve güvenilir bir araç olduğunu göstermektedir.

Ayrıca insan dokusundan elde ettiğimiz verilere göre SV2A dışındaki SV2B ve SV2C gibi izoformların bu patoloji ile değişip değişmediği ortaya koyulmalı ve radyoligandların bu izoformlara spesifitesi veya afinitesi göz önünde bulundurulmalıdır.

Öne sürdüğümüz veriler, otoradyografi ile [<sup>3</sup>H]UCB-J bağlanmasının belirlenmesinin, prelinik kullanım için epilepsideki nöroplastik değişikliklerin aşamaları sırasında SV2A seviyesini izlemek için değerli bir alternatif yaklaşım olduğunu ve klinik çalışmalarla tutarlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu yöntem patolojilerinin ardında kilit mekanizma olarak plastik değişiklikleri içeren diğer nörolojik bozukluk modellerinde sinaptik yoğunluk değişikliklerini ölçmek için de kullanılma potansiyeline sahiptir. Ancak daha sonraki uygulamalar için aşağıdaki soruların yanıtlanması gerekmektedir; SV2A düzeyindeki değişiklikler doğrudan sinaps sayısını yansıtıyor mu? Ve bunu, herhangi bir sinaptik yoğunluk değişikliği

olmaksızın sinaptik vezikül sayısındaki değişikliklerin veya SV2A protein miktarındaki değişikliklerin bir yansıması olarak yorumlamak ne ölçüde mümkündür (Şekil 46). Çünkü SV2A bağlanmasındaki bir azalmanın veziküllerde SV2A yoğunluğunun azalmasını, işlevsiz SV2A'yı ya da azalmış sayıda vezikülü temsil edebileceğinden, kesin olarak nöronal kaybı yansıtmayı yansıtmadığı bilinmemektedir. Tersine, hasarlı bir nöronun aslında aynı yoğunlukta SV2A proteinlerini içermeye devam edip edemeyeceği de bilinmemektedir. Bu yönler açıklığa kavuşturulmadan önce, sinaptopatilerin bir biyolojik belirteci olarak SV2A'nın uygunluğunun gösterilmesi gerekmektedir.

Canlı beyinde artan veya azalan SV2A-ligand bağlanmasının neyi temsil ettiği ve sinyalin nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıklardaki semptomatik süreçleri yansıtmayı yansıtmadığı ve yöntemin erken değişiklikleri tespit etmek için yeterince hassas olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır. Gelecekteki araştırmalar, azalmış SV2A-bağlanmasının sinaps kaybını, inaktif nöronlarda veya dejenere olmak üzere olan nöronlarda azalmış protein ekspresyonunu temsil edip etmediğini veya proteazlar tarafından aktif olarak bozunup bozulmadığını incelemelidir. Heurling arkadaşları'nın (2019) sorduğu gibi "*SV2A'nın görüntülenmesi ve sinaptopatiler için bir biyobelirteç olarak kullanılması: önemli bir umut ışığı mı yoksa sahte bir şafak mı?*"



**Şekil 46:** Değişen SV2A yoğunluğu neyi temsil eder?

Üç olasılık: A) Sinaptik vezikül glikoprotein 2A (SV2A)'ya bağlanan radyoligand seviyesinin değişmesi, "sinaptik yoğunluk"taki değişikliklerle ilişkilendirilebilir ki bu durum dendritik spine (diken)lerin sayısındaki bir değişiklik olarak örneklebilir) B) Aynı şekilde sinapsın işlevsel durumuna göre sinaps öncesi terminaldeki vezikül sayısındaki değişikliklerle ve dolayısıyla yoğunluklarından ziyade sinapsların işlevsel

özellikleriyle ilişkilendirilebilir C) Veziküllerdeki SV2A kopyalarının sayısındaki değişikliklerle ilişkilendirilebilir. Radyoligand tarafından etiketlenen SV2A kopyalarının sayısı da değişebilir. Alternatif senaryolar olarak verilen (B) ve (C) mutlaka genel sinaptik yoğunlukta bir değişiklik anlamına gelmez (57).

## KAYNAKLAR

1. Lévesque M, Avoli M, Bernard C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *J Neurosci Methods*. 15 Şubat 2016;260:45-52.
2. Löscher W, Gillard M, Sands ZA, Kaminski RM, Klitgaard H. Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond. *CNS Drugs*. Kasım 2016;30(11):1055-77.
3. Jandial R, McCormick PC, Black PM, editörler. Core techniques in operative neurosurgery. Philadelphia, Pa. London: Elsevier, Saunders; 2011. 704 s.
4. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, vd. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-21.
5. Pan G, Chen Z, Zheng H, Zhang Y, Xu H, Bu G, vd. Compensatory Mechanisms Modulate the Neuronal Excitability in a Kainic Acid-Induced Epilepsy Mouse Model. *Front Neural Circuits*. 29 Haziran 2018;12:48.
6. Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Ekim 2015;5(10):a022822.
7. Ben-Ari Y, Dudek FE. Primary and Secondary Mechanisms of Epileptogenesis in the Temporal Lobe: There Is a Before and an After. *Epilepsy Curr*. Eylül 2010;10(5):118-25.
8. Botterill JJ, Lu YL, LaFrancois JJ, Bernstein HL, Alcantara-Gonzalez D, Jain S, vd. An Excitatory and Epileptogenic Effect of Dentate Gyrus Mossy Cells in a Mouse Model of Epilepsy. *Cell Rep*. 26 Kasım 2019;29(9):2875-2889.e6.
9. Stout KA, Dunn AR, Hoffman C, Miller GW. The Synaptic Vesicle Glycoprotein 2: Structure, Function, and Disease Relevance. *ACS Chem Neurosci*. 18 Eylül 2019;10(9):3927-38.
10. Janz R, Südhof TC. SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience*. 1999;94(4):1279-90.
11. Bartholome O, Van den Ackerveken P, Sánchez Gil J, de la Brassinne Bonardeaux O, Leprince P, Franzen R, vd. Puzzling Out Synaptic Vesicle 2 Family Members Functions. *Front Mol Neurosci*. 2017 [a.yer 12 Temmuz 2022];10. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00148>
12. Mendoza-Torreblanca JG, Vanoye-Carlo A, Phillips-Farfán BV, Carmona-Aparicio L, Gómez-Lira G. Synaptic vesicle protein 2A: basic facts and role in synaptic function. *Eur J Neurosci*. 2013;38(11):3529-39.
13. Feng G, Xiao F, Lu Y, Huang Z, Yuan J, Xiao Z, vd. Down-regulation synaptic vesicle protein 2A in the anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy. *J Mol Neurosci MN*. Kasım 2009;39(3):354-9.
14. Crèvecoeur J, Kaminski RM, Rogister B, Foerch P, Vandenplas C, Neveux M, vd. Expression pattern of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. Şubat 2014;40(2):191-204.
15. Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, vd. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 Haziran 2004;101(26):9861-6.
16. Becker G, Dammicco S, Bahri MA, Salmon E. The Rise of Synaptic Density PET Imaging. *Molecules*. Ocak 2020;25(10):2303.

17. Chen MK, Mecca AP, Naganawa M, Finnema SJ, Toyonaga T, Lin SF, vd. Assessing Synaptic Density in Alzheimer Disease With Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Positron Emission Tomographic Imaging. *JAMA Neurol.* 01 Ekim 2018;75(10):1215-24.
18. Finnema SJ, Nabulsi NB, Eid T, Detyniecki K, Lin SF, Chen MK, vd. Imaging synaptic density in the living human brain. *Sci Transl Med.* 20 Temmuz 2016;8(348):348ra96.
19. Finnema SJ, Toyonaga T, Detyniecki K, Chen MK, Dias M, Wang Q, vd. Reduced synaptic vesicle protein 2A binding in temporal lobe epilepsy: A [11C]UCB-J positron emission tomography study. *Epilepsia.* 2020;61(10):2183-93.
20. Serrano ME, Bahri MA, Becker G, Seret A, Germonpré C, Lemaire C, vd. Exploring with [18F]UCB-H the in vivo Variations in SV2A Expression through the Kainic Acid Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Mol Imaging Biol.* 2020;22(5):1197-207.
21. Holmes SE, Scheinost D, Finnema SJ, Naganawa M, Davis MT, DellaGioia N, vd. Lower synaptic density is associated with depression severity and network alterations. *Nat Commun.* 04 Nisan 2019;10:1529.
22. Dunn AR, Hoffman CA, Stout KA, Ozawa M, Dhamsania RK, Miller GW. Immunochemical Analysis Of The Expression Of Sv2c In Mouse, Macaque And Human Brain. *Brain Res.* 01 Ocak 2019;1702:85-95.
23. Matuskey D, Tinaz S, Wilcox KC, Naganawa M, Toyonaga T, Dias M, vd. Synaptic Changes in Parkinson Disease Assessed with in vivo Imaging. *Ann Neurol.* Mart 2020;87(3):329-38.
24. Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* Aralık 2013;37(10 Pt 2):2887-99.
25. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.* Kasım 2000;23(11):580-7.
26. Fisher RS, Boas W van E, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, vd. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005;46(4):470-2.
27. Guerreiro CAM. Epilepsy: Is there hope? *Indian J Med Res.* Kasım 2016;144(5):657-60.
28. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Haziran 2015;5(6):a022426.
29. Scharfman HE. The Neurobiology of Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* Temmuz 2007;7(4):348-54.
30. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Van Emde Boas W, vd. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia.* 2010;51(4):676-85.
31. Sarmast ST, Abdullahi AM, Jahan N. Current Classification of Seizures and Epilepsies: Scope, Limitations and Recommendations for Future Action. *Cureus.* 12(9):e10549.
32. de Curtis M, Avoli M. Initiation, Propagation, and Termination of Partial (Focal) Seizures. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Temmuz 2015;5(7):a022368.
33. Sadler and RM, Rahey S. Prescience as an Aura of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia.* 2004;45(8):982-4.

34. Fisher RS, Bonner AM. The Revised Definition and Classification of Epilepsy for Neurodiagnostic Technologists. *Neurodiagnostic J.* 02 Ocak 2018;58(1):1-10.
35. Goldberg EM, Coulter DA. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci.* Mayıs 2013;14(5):337-49.
36. Buckmaster PS, Dudek FE. Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol.* 1997;385(3):385-404.
37. Dudek FE, Sutula TP. Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Prog Brain Res.* 2007;163:755-73.
38. Smith BN, Dudek FE. Short- and Long-Term Changes in CA1 Network Excitability After Kainate Treatment in Rats. *J Neurophysiol.* Ocak 2001;85(1):1-9.
39. DeLorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: The calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther.* Mart 2005;105(3):229.
40. Batulin D, Lagzi F, Vezzani A, Jedlicka P, Triesch J. A mathematical model of neuroimmune interactions in epileptogenesis for discovering treatment strategies. *iScience.* 17 Haziran 2022;25(6):104343.
41. Murakami S, Takemoto T, Shimizu Z. Studies on the Effective Principles of *Digenea simplex* Aq. I. *Yakugaku Zasshi.* 1953;73(9):1026-8.
42. Shinozaki H, Konishi S. Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain Res.* 01 Aralık 1970;24(2):368-71.
43. Bloss EB, Hunter RG. Hippocampal kainate receptors. *Vitam Horm.* 2010;82:167-84.
44. Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience.* 12 Ocak 2009;158(1):309-23.
45. Rogawski MA, Gryder D, Castaneda D, Yonekawa W, Banks MK, Lia H. GluR5 kainate receptors, seizures, and the amygdala. *Ann N Y Acad Sci.* Nisan 2003;985:150-62.
46. Patel S, Meldrum BS, Collins JF. Distribution of [3H]kainic acid and binding sites in the rat brain: in vivo and in vitro receptor autoradiography. *Neurosci Lett.* 20 Ekim 1986;70(3):301-7.
47. Jin XT, Smith Y. Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. *Adv Exp Med Biol.* 2011;717:27-37. doi: 10.1007/978-1-4419-9557-5\_3. PMID: 21713664; PMCID: PMC5567752.
48. Wisden W, Seeburg PH. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* Ağustos 1993;13(8):3582-98.
49. Sharman JL, Benson HE, Pawson AJ, Lukito V, Mpamhanga CP, Bombail V, vd. IUPHAR-DB: updated database content and new features. *Nucleic Acids Res.* Ocak 2013;41(Database issue):D1083-1088.
50. Lévesque M, Langlois JMP, Lema P, Courtemanche R, Bilodeau GA, Carmant L. Synchronized gamma oscillations (30-50 Hz) in the amygdalo-hippocampal network in relation with seizure propagation and severity. *Neurobiol Dis.* Ağustos 2009;35(2):209-18.
51. Okazaki MM, Molnár P, Nadler JV. Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth. *J Neurophysiol.* Nisan 1999;81(4):1645-60.
52. Ying Z, Babb TL, Comair YG, Bushey M, Touhalisky K. Increased densities of AMPA GluR1 subunit proteins and presynaptic mossy fiber sprouting in the fascia



- dentata of human hippocampal epilepsy. *Brain Res.* 06 Temmuz 1998;798(1-2):239-46.
53. Li JM, Zeng YJ, Peng F, Li L, Yang TH, Hong Z, Lei D, Chen Z, Zhou D. Aberrant glutamate receptor 5 expression in temporal lobe epilepsy lesions. *Brain Res.* 2010 Ocak 22;1311:166-74. doi: 10.1016/j.brainres.2009.11.024.
54. Bernard A, Ferhat L, Dessi F, Charton G, Represa A, Ben-Ari Y, Khrestchatsky M. Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci.* 1999 Subat;11(2):604-16. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00479.x.
55. Epsztein J, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Crépel V. Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J Neurosci.* 2005 Eylül 7;25(36):8229-39. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1469-05.2005.
56. Schivell AE, Mochida S, Kensel-Hammes P, Custer KL, Bajjalieh SM. SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site. *Mol Cell Neurosci.* Mayıs 2005;29(1):56-64.
57. Rossi R, Arjmand S, Bærentzen SL, Gjedde A, Landau AM. Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A: Features and Functions. *Front Neurosci.* 2022
58. Menten-Dedoyart C, Serrano Navacerrada ME, Bartholome O, Sánchez Gil J, Neirinckx V, Wislet S, vd. Development and Validation of a New Mouse Model to Investigate the Role of SV2A in Epilepsy. *PLoS ONE.* 18 Kasım 2016;11(11):e0166525.
59. Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, vd. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 Aralık 1999;96(26):15268-73.
60. Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Südhof TC. SV2A and SV2B function as redundant Ca<sup>2+</sup> regulators in neurotransmitter release. *Neuron.* Aralık 1999;24(4):1003-16.
61. Chang WP, Südhof TC. SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca<sup>2+</sup> -induced exocytosis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 28 Ocak 2009;29(4):883-97.
62. Van Vliet, E A, Aronica, E, Redeker, S, Boer, K and Gorter, J A. Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy. *Epilepsia.* 2009. 50: 422-433. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01727.x>
63. Subbarao BS, Silverman A, Eapen BC. Seizure Medications. [Updated 2022 Jul 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482269/>
64. Macdonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia.* 1995;36 Suppl 2:S2-12.
65. Manford M. Recent advances in epilepsy. *J Neurol.* 2017;264(8):1811-24.
66. Klein P, Friedman A, Hameed MQ, Kaminski RM, Bar-Klein G, Klitgaard H, vd. Repurposed molecules for antiepileptogenesis: Missing an opportunity to prevent epilepsy? *Epilepsia.* Mart 2020;61(3):359-86.
67. Alrabiah H. Levetiracetam. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2019;44:167-204.
68. Margineanu DG, Wülfert E. ucb L059, a novel anticonvulsant, reduces

bicuculline-induced hyperexcitability in rat hippocampal CA3 in vivo. *Eur J Pharmacol.* 24 Kasım 1995;286(3):321-5.

69. Lyseng-Williamson KA. Levetiracetam: a review of its use in epilepsy. *Drugs.* 05 Mart 2011;71(4):489-514.

70. Kumar A, Maini K, Kadian R. Levetiracetam. [Updated 2022 Jun 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499890/>

71. Gillard M, Chatelain P, Fuks B. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein. *Eur J Pharmacol.* 24 Nisan 2006;536(1-2):102-8.

72. Combining modelling and mutagenesis studies of synaptic vesicle protein 2A to identify a series of residues involved in racetam binding - PubMed [Internet]. [a.yer 12 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21936812/>

73. Nowack A, Yao J, Custer KL, Bajjalieh SM. SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms. *Am J Physiol - Cell Physiol.* Kasım 2010;299(5):C960-7.

74. Lynch BA, Matagne A, Brännström A, von Euler A, Jansson M, Hauzenberger E, vd. Visualization of SV2A conformations in situ by the use of Protein Tomography. *Biochem Biophys Res Commun.* 31 Ekim 2008;375(4):491-5.

75. Surges R, Volynski KE, Walker MC. Is levetiracetam different from other antiepileptic drugs? Levetiracetam and its cellular mechanism of action in epilepsy revisited. *Ther Adv Neurol Disord.* Temmuz 2008;1(1):13-24.

76. Vogl C, Mochida S, Wolff C, Whalley BJ, Stephens GJ. The synaptic vesicle glycoprotein 2A ligand levetiracetam inhibits presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels through an intracellular pathway. *Mol Pharmacol.* Ağustos 2012;82(2):199-208.

77. Itoh K, Taniguchi R, Matsuo T, Oguro A, Vogel CFA, Yamazaki T, vd. Suppressing effects of levetiracetam on neuroinflammation and phagocytic microglia: A comparative study of levetiracetam, valproate and carbamazepine. *Neurosci Lett.* 24 Ağustos 2019;708:134363.

78. Sarangi SC, Pattnaik SS, Katyal J, Kaleekal T, Dinda AK. An interaction study of *Ocimum sanctum* L. and levetiracetam in pentylenetetrazole kindling model of epilepsy. *J Ethnopharmacol.* 01 Mart 2020;249:112389.

79. Lévesque M, Behr C, Avoli M. The anti-ictogenic effects of levetiracetam are mirrored by interictal spiking and high-frequency oscillation changes in a model of temporal lobe epilepsy. *Seizure.* Şubat 2015;25:18-25.

80. Löscher W. The holy grail of epilepsy prevention: Preclinical approaches to antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology.* 01 Mayıs 2020;167:107605.

81. Scranton TW, Iwata M, Carlson SS. The SV2 Protein of Synaptic Vesicles Is a Keratan Sulfate Proteoglycan. *J Neurochem.* Temmuz 1993;61(1):29-44.

82. Bajjalieh SM, Frantz GD, Weimann JM, McConnell SK, Scheller RH. Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* Eylül 1994;14(9):5223-35.

83. Bajjalieh SM, Peterson K, Linial M, Scheller RH. Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 Mart 1993;90(6):2150-4.

84. Varnäs K, Stepanov V, Halldin C. Autoradiographic mapping of synaptic vesicle glycoprotein 2A in non-human primate and human brain. *Synap N Y N.* Ekim 2020;74(10):e22157.

85. Dardou D, Dassesse D, Cuvelier L, Deprez T, De Ryck M, Schiffmann SN.

- Distribution of SV2C mRNA and protein expression in the mouse brain with a particular emphasis on the basal ganglia system. *Brain Res.* 07 Ocak 2011;1367:130-45.
86. Detrait E, Maurice T, Hanon E, Leclercq K, Lamberty Y. Lack of synaptic vesicle protein SV2B protects against amyloid- $\beta_{25-35}$ -induced oxidative stress, cholinergic deficit and cognitive impairment in mice. *Behav Brain Res.* 01 Eylül 2014;271:277-85.
87. Serrano ME, Kim E, Petrinovic MM, Turkheimer F, Cash D. Imaging Synaptic Density: The Next Holy Grail of Neuroscience? *Front Neurosci.* 2022 Mar 25;16:796129. doi: 10.3389/fnins.2022.796129. PMID: 35401097; PMCID: PMC8990757.
88. Heurling K, Ashton NJ, Leuzy A, Zimmer ER, Blennow K, Zetterberg H, vd. Synaptic vesicle protein 2A as a potential biomarker in synaptopathies. *Mol Cell Neurosci.* Haziran 2019;97:34-42.
89. Gillard M, Fuks B, Michel P, Vertongen P, Massingham R, Chatelain P. Binding characteristics of [ $^3$ H]ucb 30889 to levetiracetam binding sites in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 30 Eylül 2003;478(1):1-9.
90. Mercier J, Provins L, Valade A. Discovery and development of SV2A PET tracers: Potential for imaging synaptic density and clinical applications. *Drug Discov Today Technol.* Kasım 2017;25:45-52.
91. Mathis CA, Lopresti BJ, Ikonovic MD, Klunk WE. Small-molecule PET Tracers for Imaging Proteinopathies. *Semin Nucl Med.* Eylül 2017;47(5):553-75.
92. Onwordi EC, Halff EF, Whitehurst T, Mansur A, Cotel MC, Wells L, vd. Synaptic density marker SV2A is reduced in schizophrenia patients and unaffected by antipsychotics in rats. *Nat Commun.* 14 Ocak 2020;11(1):246.
93. Fronczak KM, Li Y, Henchir J, Dixon CE, Carlson SW. Reductions in Synaptic Vesicle Glycoprotein 2 Isoforms in the Cortex and Hippocampus in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol.* Kasım 2021;58(11):6006-19.
94. Griem-Krey N, Klein AB, Herth M, Wellendorph P. Autoradiography as a Simple and Powerful Method for Visualization and Characterization of Pharmacological Targets. *J Vis Exp JoVE.* 12 Mart 2019;(145).
95. Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry.* 04 Ekim 2011;50(39):8264-9.
96. Srinivasan B. A guide to the Michaelis-Menten equation: steady state and beyond. *FEBS J.* 16 Temmuz 2021;
97. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Radioligand binding assays and their analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;897:31-77.
98. Mintun MA, Raichle ME, Kilbourn MR, Wooten GF, Welch MJ. A quantitative model for the in vivo assessment of drug binding sites with positron emission tomography. *Ann Neurol.* Mart 1984;15(3):217-27.
99. Kuhar MJ, Unnerstall JR. Quantitative receptor mapping by autoradiography: some current technical problems. *Trends Neurosci.* 01 Ocak 1985;8:49-53.
100. Wharton J, Polak JM. Receptor autoradiography: principles and practice [Internet]. Oxford; New York: Oxford University Press; 1993 [a.yer 27 Haziran 2022]. Erişim adresi: <http://books.google.com/books?id=INdqAAAAMAAJ>
101. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic

reaction. *Biochem Pharmacol.* 01 Aralık 1973;22(23):3099-108.

102. Hein P, Michel MC, Leineweber K, Wieland T, Wettschreck N, Offermanns S. Receptor and Binding Studies. İçinde: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, editörler. *Practical Methods in Cardiovascular Research* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005 [a.yer 24 Temmuz 2022]. s. 723-83. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0\\_37](https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0_37)

103. Delayre C, Sammaljärvi J, Billon S, Muuri E, Sardini P, Siitari-Kauppi M. Comparison of phosphor screen autoradiography and micro-pattern gas detector based autoradiography for the porosity of altered rocks. *Sci Rep.* 11 Haziran 2020;10(1):9455.

104. Amemiya Y, Miyahara J. Imaging plate illuminates many fields. *Nature.* Kasım 1988;336(6194):89-90.

105. Eckelman W. Changes: choosing a target? *Nucl Med Biol.* Ağustos 2011;38(6):765-9.

106. Mohd Sairazi NS, Sirajudeen KNS, Muzaimi M, Mummedy S, Asari MA, Sulaiman SA. Tualang Honey Reduced Neuroinflammation and Caspase-3 Activity in Rat Brain after Kainic Acid-Induced Status Epilepticus. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 2018;2018:7287820.

107. Zheng XY, Zhang HL, Luo Q, Zhu J. Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:457079.

108. Bertoglio D, Amhaoul H, Van Eetveldt A, Houbrechts R, Van De Vijver S, Ali I, vd. Kainic Acid-Induced Post-Status Epilepticus Models of Temporal Lobe Epilepsy with Diverging Seizure Phenotype and Neuropathology. *Front Neurol.* 2017;8:588.

109. Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La Salle G. A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res.* 09 Mart 1979;163(1):176-9.

110. Akaike K, Tanaka S, Tojo H, Fukumoto S, Imamura S, Takigawa M. Kainic acid-induced dorsal and ventral hippocampal seizures in rats. *Brain Res.* 04 Mayıs 2001;900(1):65-71.

111. Connell P, Bayat A, Joshi S, Koubeissi MZ. Acute and spontaneous seizure onset zones in the intraperitoneal kainic acid model. *Epilepsy Behav EB.* Mart 2017;68:66-70.

112. Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Meldrum BS. The role of epileptic activity in hippocampal and “remote” cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain Res.* 02 Haziran 1980;191(1):79-97.

113. Araki T, Simon RP, Taki W, Lan JQ, Henshall DC. Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. *J Neurosci Res.* 01 Eylül 2002;69(5):614-21.

114. Gurbanova AA, Aker RG, Sirvanci S, Demiralp T, Onat FY. Intra-amygdaloid injection of kainic acid in rats with genetic absence epilepsy: the relationship of typical absence epilepsy and temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 30 Temmuz 2008;28(31):7828-36.

115. Carriero G, Arcieri S, Cattalini A, Corsi L, Gnatkovsky V, de Curtis M. A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia.* Kasım 2012;53(11):1917-27.

116. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 7th Edition* [Internet]. [a.yer 26 Haziran 2022]. Erişim adresi: <https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in->

stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391949-6

117. Li TR, Jia YJ, Ma C, Qiu WY, Wang Q, Shao XQ, vd. The role of the microRNA-146a/complement factor H/interleukin-1 $\beta$ -mediated inflammatory loop circuit in the perpetuate inflammation of chronic temporal lobe epilepsy. *Dis Model Mech.* 23 Mart 2018;11(3):dmm031708.
118. Ambrogini P, Albertini MC, Betti M, Galati C, Lattanzi D, Savelli D, vd. Neurobiological Correlates of Alpha-Tocopherol Antiepileptogenic Effects and MicroRNA Expression Modulation in a Rat Model of Kainate-Induced Seizures. *Mol Neurobiol.* Ekim 2018;55(10):7822-38.
119. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Mart 1972;32(3):281-94.
120. Attie AD, Raines RT. Analysis of Receptor–Ligand Interactions. *J Chem Educ.* Şubat 1995;72(2):119-24.
121. Ryvlin P, Rheims S. Epilepsy surgery: eligibility criteria and presurgical evaluation. *Dialogues Clin Neurosci.* Mart 2008;10(1):91-103.
122. Miller JW, Hakimian S. Surgical Treatment of Epilepsy. *Contin Lifelong Learn Neurol.* Haziran 2013;19(3 Epilepsy):730-42.
123. Schaller K, Cabrilo I. Anterior temporal lobectomy. *Acta Neurochir (Wien).* 01 Ocak 2016;158(1):161-6.
124. Olivier A. Transcortical Selective Amygdalohippocampectomy in Temporal Lobe Epilepsy. *Can J Neurol Sci.* Mayıs 2000;27(01):S68-76.
125. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* Aralık 2001;25(4):402-8.
126. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 01 Mayıs 2001;29(9):e45.
127. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation - Hulme - 2010 - British Journal of Pharmacology - Wiley Online Library [İnternet]. [a.yer 12 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x>
128. Motulsky HJ, Neubig RR. Analyzing Binding Data. *Curr Protoc Neurosci* [İnternet]. Temmuz 2010 [a.yer 12 Temmuz 2022];52(1). Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142301.ns0705s52>
129. Nilsson LB. The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs. *Bioanalysis.* Aralık 2013;5(24):3033-50.
130. Nabulsi NB, Mercier J, Holden D, Carré S, Najafzadeh S, Vandergeten MC, vd. Synthesis and Preclinical Evaluation of 11C-UCB-J as a PET Tracer for Imaging the Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A in the Brain. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* Mayıs 2016;57(5):777-84.
131. Patel S, Knight A, Krause S, Teceno T, Tresse C, Li S, vd. Preclinical In Vitro and In Vivo Characterization of Synaptic Vesicle 2A-Targeting Compounds Amenable to F-18 Labeling as Potential PET Radioligands for Imaging of Synapse Integrity. *Mol Imaging Biol.* Ağustos 2020;22(4):832-41.
132. Binding characteristics of brivaracetam, a selective, high affinity SV2A ligand in rat, mouse and human brain: relationship to anti-convulsant properties - PubMed [İnternet]. [a.yer 28 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21575627/>
133. Rossano S, Toyonaga T, Finnema SJ, Naganawa M, Lu Y, Nabulsi N, vd.

- Assessment of a white matter reference region for 11C-UCB-J PET quantification. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. Eylül 2020;40(9):1890-901.
134. Cavazos JE, Cross DJ. The Role of Synaptic Reorganization in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Behav EB*. Mayıs 2006;8(3):483-93.
135. Isaeva E, Isaev D, Holmes GL. Alteration of Synaptic Plasticity by Neonatal Seizures in Rat Somatosensory Cortex. *Epilepsy Res*. Eylül 2013;106(0):280-3.
136. Tzeng TT, Tsay HJ, Chang L, Hsu CL, Lai TH, Huang FL, vd. Caspase 3 involves in neuroplasticity, microglial activation and neurogenesis in the mice hippocampus after intracerebral injection of kainic acid. *J Biomed Sci*. 06 Aralık 2013;20:90.
137. Suárez LM, Cid E, Gal B, Inostroza M, Brotons-Mas JR, Gómez-Domínguez D, vd. Systemic Injection of Kainic Acid Differently Affects LTP Magnitude Depending on its Epileptogenic Efficiency. *PLoS ONE*. 31 Ekim 2012;7(10):e48128.
138. Goldberg EM, Coulter DA. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. Mayıs 2013;14(5):337-49.
139. Puttachary S, Sharma S, Tse K, Beamer E, Sexton A, Crutison J, vd. Immediate Epileptogenesis after Kainate-Induced Status Epilepticus in C57BL/6J Mice: Evidence from Long Term Continuous Video-EEG Telemetry. *PLOS ONE*. 10 Temmuz 2015;10(7):e0131705.
140. Gu B, Dalton KA. Models and detection of spontaneous recurrent seizures in laboratory rodents. *Zool Res*. 18 Temmuz 2017;38(4):171-9.
141. Guo Y, Gao F, Wang S, Ding Y, Zhang H, Wang J, vd. In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study. *Neuroscience*. 15 Eylül 2009;162(4):972-9.
142. Mohd Sairazi NS, Sirajudeen KNS, Asari MA, Muzaimi M, Mummedy S, Sulaiman SA. Kainic Acid-Induced Excitotoxicity Experimental Model: Protective Merits of Natural Products and Plant Extracts. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2015;2015:972623.
143. Jin Y, Lim CM, Kim SW, Park JY, Seo JS, Han PL, vd. Fluoxetine attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *Brain Res*. 24 Temmuz 2009;1281:108-16.
144. Liu L, Hamre KM, Goldowitz D. Kainic Acid-Induced Neuronal Degeneration in Hippocampal Pyramidal Neurons Is Driven by Both Intrinsic and Extrinsic Factors: Analysis of FVB/N↔C57BL/6 Chimeras. *J Neurosci*. 29 Ağustos 2012;32(35):12093-101.
145. Zorumski CF, Izumi Y, Mennerick S. Ketamine: NMDA Receptors and Beyond. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 02 Kasım 2016;36(44):11158-64.
146. Vermoesen K, Smolders I, Massie A, Michotte Y, Clinckers R. The control of kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*. Haziran 2010;90(1-2):164-6.
147. Li L, Kriukova K, Engel J, Bragin A. Seizure development in the acute intrahippocampal epileptic focus. *Sci Rep*. 23 Ocak 2018;8(1):1423.
148. Zeidler Z, Brandt-Fontaine M, Leintz C, Krook-Magnuson C, Netoff T, Krook-Magnuson E. Targeting the Mouse Ventral Hippocampus in the Intrahippocampal Kainic Acid Model of Temporal Lobe Epilepsy. *eNeuro*. 08 Ağustos 2018;5(4):ENEURO.0158-18.2018.
149. Ben-Ari Y, Crepel V, Represa A. Seizures Beget Seizures in Temporal Lobe

Epilepsies: The Boomerang Effects of Newly Formed Aberrant Kainatergic Synapses. *Epilepsy Curr.* Mayıs 2008;8(3):68-72.

150. Contreras-García IJ, Cárdenas-Rodríguez N, Romo-Mancillas A, Bandala C, Zamudio SR, Gómez-Manzo S, vd. Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems. *Pharmaceuticals.* 13 Nisan 2022;15(4):475.

151. Contreras-García IJ, Gómez-Lira G, Phillips-Farfán BV, Pichardo-Macías LA, García-Cruz ME, Chávez-Pacheco JL, vd. Synaptic Vesicle Protein 2A Expression in Glutamatergic Terminals Is Associated with the Response to Levetiracetam Treatment. *Brain Sci.* 23 Nisan 2021;11(5):531.

152. Contreras-García IJ, Pichardo-Macías LA, Santana-Gómez CE, Sánchez-Huerta K, Ramírez-Hernández R, Gómez-González B, vd. Differential expression of synaptic vesicle protein 2A after status epilepticus and during epilepsy in a lithium-pilocarpine model. *Epilepsy Behav EB.* Kasım 2018;88:283-94.

153. *Frontiers | Consequences Of Kainic Acid-Induced Piriform Cortex Lesions And Therapeutic Potential Of Piriform Cortex Deep Brain Stimulation In The Intrahippocampal Kainic Acid Model [Internet].* [a.yer 12 Temmuz 2022]. Erişim adresi:

[https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fnhum.2014.214.00029/event\\_abstract](https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fnhum.2014.214.00029/event_abstract)

154. *Generalized Tonic-Clonic Seizure - StatPearls - NCBI Bookshelf [Internet].* [a.yer 12 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554496/>

155. Gill RS, Mirsattari SM, Leung LS. Resting state functional network disruptions in a kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *NeuroImage Clin.* 03 Kasım 2016;13:70-81.

156. Bartolomei F, Chauvel P, Wendling F. Epileptogenicity of brain structures in human temporal lobe epilepsy: a quantified study from intracerebral EEG. *Brain J Neurol.* Temmuz 2008;131(Pt 7):1818-30.

157. Coyle JT, Schwarcz R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature.* 16 Eylül 1976;263(5574):244-6.

158. Carboni M, De Stefano P, Vorderwülbecke BJ, Tourbier S, Mullier E, Rubega M, vd. Abnormal directed connectivity of resting state networks in focal epilepsy. *NeuroImage Clin.* 01 Ocak 2020;27:102336.

159. Wruck W, Adjaye J. Meta-analysis of human prefrontal cortex reveals activation of GFAP and decline of synaptic transmission in the aging brain. *Acta Neuropathol Commun.* 05 Mart 2020;8(1):26.

160. Vanoye-Carlo A, Gómez-Lira G. Differential expression of SV2A in hippocampal glutamatergic and GABAergic terminals during postnatal development. *Brain Res.* 15 Temmuz 2019;1715:73-83.

161. Crèvecoeur J, Foerch P, Doupagne M, Thielen C, Vandenplas C, Moonen G, vd. Expression of SV2 isoforms during rodent brain development. *BMC Neurosci.* 09 Ağustos 2013;14:87.

162. Fang XT, Toyonaga T, Hillmer AT, Matuskey D, Holmes SE, Radhakrishnan R, vd. Identifying brain networks in synaptic density PET (11C-UCB-J) with independent component analysis. *NeuroImage.* 15 Ağustos 2021;237:118167.

163. de Groot M, Toering ST, Boer K, Spliet WGM, Heimans JJ, Aronica E, vd. Expression of synaptic vesicle protein 2A in epilepsy-associated brain tumors and in the peritumoral cortex. *Neuro-Oncol.* Mart 2010;12(3):265-73.

164. Kobayashi K, Endoh F, Ohmori I, Akiyama T. Action of antiepileptic drugs on

neurons. *Brain Dev.* Ocak 2020;42(1):2-5.

165. Pazarlar BA, Aripaka SS, Petukhov V, Pinborg L, Khodosevich K, Mikkelsen JD. Expression profile of synaptic vesicle glycoprotein 2A, B, and C paralogues in temporal neocortex tissue from patients with temporal lobe epilepsy (TLE). *Mol Brain.* 16 Mayıs 2022;15(1):45.



## **EKLER**

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılının haziran ayında İzmir’de doğdum. İlkokul ve orta öğrenimimi Vali Rahmi Bey İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimimi Fatma Saygın Anadolu Lisesi’nde tamamladım. Ardından 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nü kazandım ve 2012 yılında bölüm üçüncüsü olarak mezun oldum. Lisans eğitimimi tamamladığım yıl Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Yüksek Lisans programına kabul edildim ve 2014 yılında bu programı da başarıyla tamamladım. Sinirbilim yüksek lisans eğitimim devam ederken 2013 yılında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Yüksek lisans programına da kabul edildim ve iki programı da eş zamanlı olarak yürüttüm. 2014 yılında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevliliğine atandım. 2016 yılında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda doktora programına kabul edildim. 2018 ve 2019 yıllarında her yıl 3’er ay olmak üzere Neurobiology Research Unit, Rigshospitalet, University of Copenhagen departmanında davetli misafir araştırmacı olarak bulundum. 2020 yılında TÜBİTAK-BİDEB 2214 yurt dışı araştırma burs programı kapsamında, tez projemin bir kısmını yürütmek amacıyla yine Neurobiology Research Unit departmanını 12 ay ziyaret ederek, Prof. Dr. Jens Mikkelsen’in danışmanlığında çalışmalar yürüttüm. Halen daha İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR’ın danışmanlığında ve Prof. Dr. Jens Mikkelsen ile iş birliği içerisinde doktora öğrencisi olarak eğitim almakta ve araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.

