T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI EPİLEPTİK ENSEFALOPATİ HASTALARINDA miR-324, miR-34c VE miR-335'İN PATOFİZYOLOJİYE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUBA KÖSE ALMALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ENDER M. ÇOŞKUNPINAR

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ

DOKTORA TEZİ
ARALIK/2025

İTHAF

“Hatırası ile bana güç veren sevgili dedeme, çalışmaya katkı sağlayan tüm çocuklar ve özverili ailelerine ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Akademik yolculuğumun en başından bugüne kadar bilgi ve deneyimiyle bana ışık tutan, sabrı ve desteğiyle her adımda yolumu aydınlatan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve değerli danışmanım Prof. Dr. Ender M. Coşkunpınar'a en derin şükranlarımı sunarım. Bu yolculukta karşılaştığım tüm sıkıntılarda bana verdiği destek sayesinde bu noktaya ulaşmam mümkün oldu.

Ayrıca akademik gelişimimde katkıları olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan hiçbir zaman geri durmayan Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve tez sürecimde hem bilimsel katkıları hem de manevi destekleriyle yanımda olan sevgili çalışma arkadaşlarıma içten teşekkür ederim.

Çalışmanın örnek toplama aşamasında desteklerini esirgemeyen SBÜ Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Nöroloji Klinik Şefi Prof. Dr. Aycan Ünalp'e çok teşekkür ederim. Aynı klinikte görevli Uz. Dr. Serdar Pekuz, Dr. Nur Çalışkan ve Dr. Akın Öztürk'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Laboratuvarlarını kullanmam için bana kapılarını açan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Küçük Laboratuvardan Doç. Dr. Can Küçük ve Dr. Öğr. Üyesi Xiaozhou Hu'ya teşekkür ederim.

Bu süreçte sabırları, sevgileri ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan aileme ve en büyük motivasyon kaynağım olan sevgili eşime şükranlarımı sunarım. Ayrıca çalışmaya gönülleriyle katkıda bulunan, umutlarını bizlerle paylaşan çocuklar ve kıymetli ailelerine de teşekkür ederim.

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü (Proje No: 2024/097) ve TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Programı (Proje No: 125S132) tarafından maddi olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı BAP Koordinatörlüğü'ne ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR x
ÖZET xi
ABSTRACT xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. EPİLEPTİK ENSEFALOPATİ 4
2.1.1. Tanım ve Tarihçe 4
2.1.2. Epidemiyoloji 5
2.1.3. Etiyoloji 5
2.1.3.1. Genetik etiyolojiler 6
2.1.3.2. Yapısal (Semptomik) etiyolojiler 7
2.1.3.3. Diğer patofizyolojik mekanizmalar 8
2.1.4. Tanısal Süreç ve Sınıflandırma 8
2.2. MİKRO RNA 10
2.3. miRNA'LARIN NÖROLOJİK HASTALIKLARDAKİ ROLÜ 12
2.3.1. MikroRNA 324 13
2.3.2. MikroRNA 34c 13
2.3.3. MikroRNA 335 14
3. GEREÇ VE YÖNTEM 15
3.1. GEREÇLER 15
3.1.1. Gönüllülerden Kan Örneklerinin Toplanması 15
3.1.2. Kimyasallar ve Kitler 15
3.1.3. Cihazlar 16
3.2. YÖNTEMLER 17
3.2.1. Tam Kandan Total RNA İzolasyonu 17
3.2.2. miRNA İzolasyonu 17
3.2.3. mRNA cDNA Sentezi 19
3.2.4. miRNA cDNA Sentezi 19
3.2.5 mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Analizi 20

3.2.6. miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Analizi 21
3.2.7. İstatistiksel Analiz 22
4. BULGULAR 23
4.1 HASTA GRUBU DEMOGRAFİK VE KLİNİK VERİLERİ 23
4.2. miRNA EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLARI 25
4.2. mRNA EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLARI 30
5. TARTIŞMA 36
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 39
KAYNAKLAR 40
EKLER 45

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1: Ensefalopati veya ilerleyici nörolojik bozulma ile seyreden epilepsi sendromları 9

Tablo 3. 1: Kimyasallar ve Kitler 15

Tablo 3. 2: Cihazlar 16

Tablo 3. 3: Revers transkriptaz reaksiyon karışımı 19

Tablo 3. 4: Revers transkriptaz termal döngü protokolü 19

Tablo 3. 5: Reaksiyon çözeltisi 20

Tablo 3. 6: Real-time PCR reaksiyon çözeltisi 20

Tablo 3. 7: Real-time PCR Programı 21

Tablo 3. 8: Real-time PCR reaksiyon çözeltisi 21

Tablo 3. 9: Real-time PCR Programı…….. 22

Tablo 4. 1: Hasta Grubuna Ait Demografik ve Klinik Özellikler 23

Tablo 4. 1 (Devam) 24

Tablo 4. 2: Epileptik Ensefalopati miRNA Ekspresyonu Kat Değişimi 28

Tablo 4. 3: Epileptik Ensefalopati hastalarında mRNA Ekspresyonu Kat Değişimi 34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1: Epileptik ensefalopatilerin etiyolojisi ve etkileri 6

Şekil 2. 2: ILAE 2017 epilepsi sınıflandırması 9

Şekil 2. 3: miRNA biyogenezi 11

Şekil 2. 4: miRNA-324 genomik lokalizasyonu 13

Şekil 2. 5: miRNA-34c genomik lokalizasyonu 13

Şekil 2. 6: miRNA-335 genomik lokalizasyonu 14

Şekil 4. 1: miRNA ekspresyonu clustergram grafiği 25

Şekil 4. 2: hsa-miR-335-5p (a), hsa-miR-324-5p (b) ve hsa-miR-34c-5p (c) qRT-PCR Amplifikasyon Eğrisi 26

Şekil 4. 3: hsa-miR-335-5p (a), hsa-miR-324-5p (b) ve hsa-miR-34c-5p (c) qRT-PCR Melting Curves ve Melting Peaks 28

Şekil 4. 4: miR-34c-5p (a) ve miR-335-5p (b) ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması . 29

Şekil 4. 5: hsa-miR-324-5p ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması 29

Şekil 4. 6: miR-34c-5p, miR-324-5p ve miR-335-5p'nin relatif kat değişimlerinin (fold change) hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması 30

Şekil 4. 7: mRNA ekspresyonu clustergram grafiği 30

Şekil 4. 8: IL1B (a), HMGB1 (b) ve SCN3A (c) qRT-PCR Amplifikasyon Eğrisi 32

Şekil 4. 9: IL1B (a), HMGB1 (b) ve SCN3A (c) qRT-PCR Melting Curves ve Melting Peaks 33

Şekil 4. 10: IL1B (a), HMGB1 (b) ve SCN3A (c) ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması 34

Şekil 4. 11: IL1B, HMGB1 ve SCN3A'nın relatif kat değişimlerinin (fold change) hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması 35

SİMGELER VE KISALTMALAR

3'UTR : 3' Kodlanmayan Bölge

ASO : Antisens oligonükleotit

cryo-EM : Kriyoelektron Mikroskobu

DEE : Gelişimsel ve Epileptik Ensefalopati

DEE/EE-SWAS: Uykuda Diken Dalga Aktivasyonlu Epileptik Ensefalopati

DGCR8 : DiGeorge kritik bölge geni 8

EDTA : Etilendiamintetraasetik Asit

EE : Epileptik Ensefalopati

EEG : Elektroensefalografi

EIMFS : Göç Eden Fokal Nöbetlerle Seyreden Bebeklik Epilepsisi

FCD : Fokal Kortikal Displazi

FIRES : Febril Enfeksiyonla İlişkili Epilepsi Sendromu

ILAE : Uluslararası Epilepsiyle Savaş Komisyonu

LIMK1 : LIM Kinaz 1

miRNA : Mikro RNA

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

mTLE : Mesial Temporal Lob Epilepsisi

NGS : Yeni Nesil Dizileme

TLR : Toll Benzeri Reseptör

TSC : Tüberoz Skleroz Kompleksi

XPO5 : Exportin 5

ÇOCUKLUK ÇAĞI EPİLEPTİK ENSEFALOPATİ HASTALARINDA miR-324, miR-34c ve miR-335'in PATOFİZYOLOJİYE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Epileptik ensefalopatilerin oluşumunda etkili olduğu düşünülen miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin ve miRNA hedef gen ilişkisinin tespit edilmesi, epileptik ensefalopatilere ilişkin ülkemizde oluşturulabilecek gen panellerinde kullanılabilecek aday biyobelirteçlerin tespiti ve prognoza yönelik uygulanan tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Pediatri departmanında tanı konulan 1 aylık ve 18 yaş arası 30 Epileptik Ensefalopati tanılı hasta ve 20 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Gönüllüler "gönüllü olur formu" imzaladıktan sonra rutin izlem sırasında 2 ml EDTA'lı tüpe kan örneği alındı. Plazma örneklerinden miRNA ve tam kandan hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin tespiti için Trizol ile Total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen miRNA ve mRNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri spektrofotometrik ölçümle tespit edildi. Elde edilen miRNA ve mRNA örneklerinden ticari cDNA sentez kitleri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA örnekleri ile Real Time PCR yapılarak genlerin ekspresyon seviyeleri tespit edildi. Genlerin ekspresyon seviyeleri ΔΔCt (Delta delta Ct) yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen veriler Geneglobe programı ile değerlendirildi. İstatistik olarak anlamlılık sınırı $P>0.05$ kabul edildi.

Bulgular: miRNA analizlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamış olmakla birlikte, miR-34c-5p ve miR-335-5p'nin hasta grubunda artış eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. miR-324-5p düzeylerinin ise her iki grupta benzer olduğu görülmüştür. Hedef gen analizlerinde IL1B ekspresyonunun hasta grubunda anlamlı düzeyde arttığı (38.55 kat; $p=0.046$), HMGB1 geninde ise 9.42 katlık bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı ortaya konmuştur. SCN3A geninde 37.10 katlık bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Sonuç: Bu bulgular, epileptik ensefalopatilerde periferik inflamatuvar yanıtın özellikle IL1B üzerinden belirginleşebileceğini; miRNA düzeylerinin ise hastalığın klinik özellikleri ve örnek türüne bağlı olarak heterojen bir düzenlenim gösterebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Epileptik Ensefalopati, miRNA, miR-324-5p, miR-335-5p, miR-34c-5p

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF miR-324, miR-34c, AND miR-335 ON PATHOPHYSIOLOGICAL IN CHILDHOOD EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY PATIENTS

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to determine the expression levels of miRNAs thought to be effective in the formation of epileptic encephalopathies and miRNA target gene relationships, to identify candidate biomarkers that can be used in gene panels that can be created in our country for epileptic encephalopathies, and to contribute to the development of prognostic treatment protocols.

Materials and Methods: The study included 30 patients diagnosed with Epileptic Encephalopathy, aged between 1 month and 18 years, diagnosed at the Pediatrics Department of the Dr. Behçet Uz Pediatric Diseases and Surgery Training and Research Hospital of the University of Health Sciences, and 20 healthy volunteers. The volunteers signed a consent form and collected blood samples in a 2 ml EDTA tube during routine follow-up. Total RNA was isolated manually from plasma samples to determine the expression levels of miRNA and target genes from whole blood. The purity and concentration of the isolated miRNA and mRNA were determined by spectrophotometric measurement. cDNA synthesis was performed from the obtained miRNA and mRNA samples using commercial cDNA synthesis kits. Real-time PCR was performed on the cDNA samples to determine gene expression levels. Gene expression levels were analyzed using the ΔΔCt (Delta delta Ct) method. The data obtained were analyzed using the Geneglobe program. Statistically, $P>0.05$ was accepted as the significance limit.

Results: While no statistically significant difference was detected between the groups in miRNA analyses, miR-34c-5p and miR-335-5p showed a trend towards an increase in the patient group. Levels of miR-324-5p were similar in both groups. Target gene analyses revealed a significant increase in IL1B expression in the patient group (38.55-fold; $p=0.046$), and despite a 9.42-fold increase in the HMGB1 gene, no statistically significant difference was found. Despite a 37.10-fold increase in the SCN3A gene, no statistically significant difference was found.

Conclusion: These findings suggest that the peripheral inflammatory response in epileptic encephalopathies may be particularly pronounced through IL1B, while miRNA

levels may show heterogeneous regulation depending on the clinical features of the disease and the sample type.

Key Words: Epileptic Encephalopathy, miRNA, miR-324-5p, miR-335-5p, miR-34c-5p

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, dünya genelinde 50 milyondan fazla insanı etkileyen, tekrarlayan nöbetlerle ve beyinde anormal elektiriksel aktivitelerle karakterize, en yaygın kronik nörolojik bozukluktur (1). Epilepsinin etiyolojisi çok yönlüdür ve hem genetik hem de çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimini içerir (2, 3). Çocukluk çağında epilepsi çocukların %0,5'ini etkilemektedir. 0-10 yaş aralığında her 150 çocuktan 1'i epilepsi teşhisi almaktadır (4). Morbidite esas olarak 5 yaş altı çocuklarda yoğunlaşırken, mortalite ise 15-19 yaş arası ergenlerde daha sık görülmektedir. Erkeklerde hastalık yükü kadınlara göre daha fazladır (5). Çocuklarda epilepsi tedavisi, hastalığın özel tipine, etiyolojisine, çocuğun yaşına ve genel sağlık durumuna göre büyük farklılıklar gösterir. Tedavinin temel amacı, nöbetleri kontrol altına almak, eşlik eden gelişimsel ve bilişsel sorunları (komorbiditeleri) iyileştirmek ve hastanın yaşam kalitesini artırmaktır (1). Epilepsi sınıflandırması, Uluslararası Epilepsiyle Savaş Komisyonu (ILAE) tarafından belirlenen kılavuzlara göre yapılmaktadır. Sınıflandırma; klinik özellikler, etiyoloji ve yaşa bağlı sendromları kapsar (3, 5).

Ensefalopati, yaygın beyin işlev bozukluğuyla karakterize bir durumdur ve bilişsel veya motor kapasitelerde azalmaya yol açar. Bu durum, akut veya kronik, durağan veya ilerleyici olabilir. Metabolik bozukluklar, iltihaplanma, hipoksi/iskemi veya çok odaklı yaralanmalar gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir (6). Epileptik Ensefalopati (EE), epileptik nöbetlerin ve nöbetler arası epileptiform aktivitenin nörolojik gelişimi olumsuz etkileyerek, gelişimsel gerileme, duraklamaya yol açtığı bir durumdur. Hastalıkta erken başlangıçlı nöbetler görülmektedir. Genellikle bebeklik veya çocukluk döneminde başlar (7, 8). Epileptik ensefalopatilerin ilk tanımlamaları, 1857 yılında Dr. James Edward West'in adını taşıyan West Sendromu ile başlamıştır. 2001 yılında ILAE "Epileptik Ensefalopati" kavramını sınıflandırma sistemlerine dahil etmiştir (9).

Epilepsi ile ilişkilendirilen genlerin keşfi, 1990'larda aile çalışmalarıyla (örn. CHRNA4, KCNQ2 ve SCN1B) başlamış ve hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında yer almıştır. Son 5 yılda büyük ölçekli yeni nesil dizileme (NGS) çalışmaları sayesinde genetik epilepsilerin tanı oranları önemli ölçüde artmıştır (6,

10). Epileptik Ensefalopati hastalarının yaklaşık yarısında altta yatan genetik bir bozukluk tespit edilmektedir. Hastalığın etiyolojisinde de novo mutasyonlar en sık görülen neden olsa da otozomal resesif ve X'e bağlı kalıtım paternleri de görülmektedir (11, 12). Genetik nedenler genellikle iyon kanalları (SCN1A, KCNQ2, SCN2A), sinaptik iletim (STXBP1, UNC13A) ve hücresel sinyal yolakları (GNAO1, CDKL5) ile ilişkili genlerdeki de novo mutasyonlardır (13, 14). Genetik tanı hastalığın seyrini ve prognozunu anlamanın yanı sıra, antisens oligonükleotitler (ASO'lar) gibi gen hedeflerine yönelik (örneğin GNAO1 veya SCN1A mutasyonları için) veya mTOR inhibitörleri (everolimus vb.) gibi kişiselleştirilmiş, hassas tıp tedavilerinin geliştirilmesine olanak sağlar (12, 14, 15). Ayrıca, mikro RNA'lar (miR- 34c-5p, miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-138-5p) gibi gen ifadesini düzenleyen moleküller de epilepsi patogenezinde rol oynayarak potansiyel biyobelirteçler ve terapötik hedefler olarak araştırılmaktadır (16, 17).

Mikro RNA'lar (miRNA), 20 ila 25 nükleotit uzunluğunda, protein kodlamayan, tek zincirli, endojen RNA molekülleri sınıfıdır. Gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası düzeyde düzenlemede önemli bir rol oynarlar. İnsan genlerinin yaklaşık %60'ı miRNA'lar tarafından düzenlenir ve bunlar insan genomunun %2-3'ünü oluşturur (18, 19). Mikro RNA'lar, kan gibi biyolojik sıvılarda nispeten kararlı oldukları için, hastalık teşhisinde potansiyel biyobelirteç olarak kabul edilirler (16, 19). Nörolojik hastalıklarda miRNA'ların anormal ekspresyonu yaygın olarak gözlemlenmiştir. Nöro inflamasyon, nörodejenerasyon ve sinaptik yeniden düzenleme gibi çeşitli patofizyolojik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (20). miR-34c-5p'nin nöro inflamasyon üzerindeki düzenleyici etkisi çok sayıda çalışma ile kanıtlanmıştır. İlaca dirençli epilepsi hastalarında nöro inflamatuar sürecin altında yatan moleküler mekanizmayı araştıran bir çalışmada, biyoinformatik analiz sonucunda miR-34c-5p'nin ilaca dirençli epilepsi hastalarında kontrol popülasyonuna kıyasla önemli ölçüde down regüle olduğu ortaya konmuştur. Ardından, lusiferaz raportör deneyleri, inflamasyonla ilişkili aracılar olan HMGB1'in miR-34c-5p'nin hedef geni olduğunu göstermiştir. İlaca dirençli epilepsili sıçanlarda, ilaca duyarlı epilepsili sıçanlara kıyasla miR-34c-5p'nin down regüle olduğu, HMGB1 ve IL-1B'nın ekspresyonunda artış olduğu bulunmuştur (19, 21). Mir-335-5p'in voltaj kapılı sodyum kanal proteinlerini kodlayan genlerin regülasyonunda etkili olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Sıçan epilepsi modelinden alınan dokular ile ilaca dirençli epilepsisi

olan hastalardan alınan plazma örneklerinden tüm genom miRNA taraması yapıldığı bir çalışmada miR-335-5p'nin ortak olarak bulunduğu tespit edilmiştir. miR-335-5p'nin voltaj kapılı sodyum kanal proteinlerini kodlayan genlerin regülasyonunda etkili olduğu bulunmuştur. miR-335-5p'ye karşı antisens oligonükleotidlerin intraserebroventriküler enjeksiyonu sonucu, fare beyninde SCN1A, SCN2A ve SCN3A'nın up regüle olduğu gösterilmiştir (22). Epilepsi hastalığı ile ilişkilendirilen potasyum kanallarının yapısının araştırıldığı bir başka çalışmada ise fare deneyleri sonucunda miR-324-5p'nin KCND2 (Kv4.2) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (23).

Epileptik Ensefalopatilerin ortaya çıkışı ile ilişkili mekanizmalar net olarak bilinmemektedir. EE'in genetik temellerinin anlaşılması tedavi seçimi ve prognozun belirlenmesi açısından yol göstericidir. Çalışmamızda, Epileptik Ensefalopatilerin oluşumunda etkili olduğu düşünülen miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin ve miRNA hedef gen ilişkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Ülkemizde oluşturulabilecek gen panellerinde kullanılabilecek aday biyobelirteçlerin tespiti ve prognoza yönelik uygulanan tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkıda bulunulması da hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EPİLEPTİK ENSEFALOPATİ

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

Epilepsi, ILAE tanımına göre "beyinde, en az 24 saat arayla meydana gelen iki veya daha fazla provoke edilmemiş nöbetle sonuçlanan bir hastalık" olarak tanımlanır. Epileptik ensefalopatiler, ILAE tarafından "epileptiform anormalliklerin serebral fonksiyonun ilerleyici bozukluğuna katkıda bulunduğuna inanılan durumlar" olarak tanımlanmıştır (24, 25). Bu tanım, yalnızca dirençli nöbetlerin değil, aynı zamanda Elektroensefalografi (EEG) arka planında görülen şiddetli epileptiform deşarjların da serebral fonksiyonun ilerleyici düşüşüne katkıda bulunduğuna işaret eder (24).

Epilepsiye ait bilinen en eski yazılı belgelerden biri, M.Ö. 1067-1046 yılları arasında Mezopotamya bölgesinde bulunan Akad dilinde yazılmış bir tablettir. Antik Yunan'da Hipokrat, yazdığı "Kutsal Hastalık Üzerine" (M.Ö. 400) metnin de epilepsiden bahsetmiştir. Ayrıca Aristoteles de uyku ve rüyalar üzerine yaptığı çalışmalarda epilepsiden bahsetmiştir. Hans Berger'in 1929 yılında insan elektroensefalogramını (EEG) tanımlaması epilepsi araştırmalarında önemli bir çığır açmıştır. Epilepsinin çağdaş ve standart tanımı, 2005 yılında ILAE tarafından yapılmıştır (26, 27).

"Ensefalopati" terimi, tıbbın birçok alanında uzun zamandır kullanılmaktadır ve kökenini tam olarak belirlemek zordur. 1841'de W.J. West, West sendromunu "çocukluk çağ konvülsiyonlarının kendine özgü bir formu" olarak tanımlamış, ardından 1945'te Lennox- Gastaut sendromu Lennox tarafından tanımlanmış ve 1966'da Gastaut ve arkadaşları tarafından detaylandırılmıştır (27). Modern epileptik ensefalopati kavramı, Henri Gastaut tarafından oluşturulmuş ve ILAE terminolojisine dahil edilmiştir. 2001 yılında ILAE Sınıflandırma ve Terminoloji raporunda hastalığın tanımını "epileptiform anormalliklerin kendilerinin serebral fonksiyonda ilerleyici bozukluğa katkıda bulunduğuna inanılan durumlar." olarak güncellemiştir. 2017 yılında ILAE, "Epileptik Ensefalopati" kavramı "Gelişimsel ve Epileptik Ensefalopati (DEE)" olarak genişletmiştir. Bu revizyon, altta yatan etiyolojinin (genetik veya yapısal) genellikle tek

başına gelişimsel bozukluğa neden olduğunu ve epileptik ensefalopatinin bu gelişimsel ensefalopatinin üzerine eklenerek çocuğun gelişimini daha da olumsuz etkilediğini kabul etmiştir (9, 28).

2.1.2. Epidemiyoloji

Epilepsi, küresel çapta 50 ila 70 milyondan fazla kişiyi etkileyen ve nörolojik bozukluklar arasında hastalık yükü açısından beşinci sırada yer alan yaygın bir merkezi sinir sistemi (MSS) hastalığıdır. Küresel hastalık yükünün yaklaşık %1'ine katkıda bulunur. Dünya genelinde yılda 2 milyondan fazla yeni vaka teşhis edilmektedir (5). Epilepsinin görülme sıklığı (insidans) yıllık olarak 100.000 kişide 50.4 ila 81.7 arasında değişmektedir. Epilepsi prevalansı, ciddi kafa travması, inme ve intrakraniyal enfeksiyonlardan sağ kalan insan sayısının artması ve hastaların beyin tümörleriyle daha uzun yaşaması nedeniyle artma eğilimindedir (29).

2021 yılında dünya genelinde 8 milyondan fazla çocuk ve ergen epilepsi ile yaşamaktaydı. Hastalık yükü, erkek çocuklarında kız çocuklarına göre daha fazladır. Morbidite öncelikle 5 yaşın altındaki çocuklarda yoğunlaşırken, mortalite (ölüm) ağırlıklı olarak 15-19 yaş arası ergenlerde meydana gelmektedir. İnsidansın yaşa göre dağılımında, Latin Amerika ve Doğu Sahra Altı Afrika hariç tüm bölgelerde 5 yaş altı yaş grubu en yüksek orana sahiptir (Yüksek gelirli Asya Pasifik'te %33.6) (5).

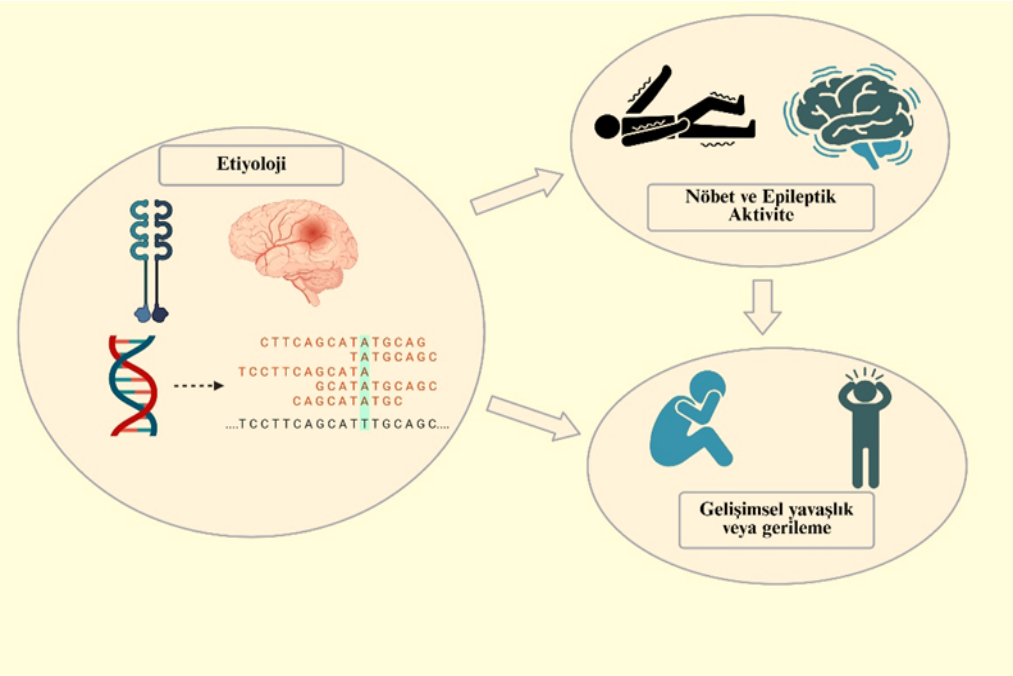
Gelişimsel ve Epileptik Ensefalopati nispeten yeni bir terim olduğundan, bu tanımlamaya özgü epidemiyolojik veriler yeni ortaya çıkmaktadır. Genel olarak gelişimsel ve epileptik ensefalopatinin kümülatif insidansının 100.000 çocukta 169, prevalansının 100.000 çocukta 112 (veya 590 çocukta 1) olduğu tahmin edilmektedir (30).

2.1.3. Etiyoloji

Epileptik Ensefalopati (EE) ve Gelişimsel ve Epileptik Ensefalopatiler (DEE), erken başlangıçlı sıklıkla şiddetli nöbetler, gelişimsel gerilik veya gerileme ile karakterize olan ve çok sayıda etiyolojiye sahip nörogelişimsel bozukluklardır (8).

ILAE, epilepsilerin etiyolojisini altı ana kategoriye ayırır: genetik, yapısal, metabolik, enfeksiyöz, immün ve bilinmeyen (Şekil 2. 1) (3, 29). Epileptik ensefalopatilerin etiyolojisi bu kategorilere girmekle birlikte, özellikle çocukluk

döneminde şiddetli epilepsilerin altında yatan nedenlerin belirlenmesinde genetik faktörler giderek artan bir önem taşımaktadır (13, 24).



Şekil 2. 1: Epileptik ensefalopatilerin etiyolojisi ve etkileri (https://BioRender.com adresinde oluşturuldu)

Epileptik Ensefalopatilerin ana etiyolojik ve patofizyolojik mekanizmaları şunlardır:

2.1.3.1. Genetik etiyolojiler

Genetik nedenler, DEE hastalarının %50'den fazlasında yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak tespit edilmektedir. DEE'lerin monogenik nedenleri olarak 900'den fazla gen tespit edilmiştir. Bu durumlar genellikle de novo dominant mutasyonlar olarak ortaya çıksa da otozomal resesif, X'e bağlı veya mitokondriyal kalıtım paternleri de mevcuttur (10, 31).

Monogenik DEE'ler, genellikle altta yatan genetik kusurla ilişkilidir ve nörogelişimsel anormallik nöbet yükünden ziyade genetik kusurdan kaynaklanır (13). İyon Kanalopatileri; DEE patofizyolojisinde ilk tanımlanan ve hala en büyük sınıfı oluşturan genler iyon kanallarını kodlayan genlerdir. Dravet sendromunun ortaya

çıkışında çok çeşitli SCN1A mutasyon tiplerinin etkili olduğu gösterilmiştir. KCNQ2 geni mutasyonları ise Erken İnfantil DEE nedenidir. KCNT1 geni mutasyonları göç eden fokal nöbetlerle seyreden bebeklik epilepsisine (EIMFS) yol açar. SCN2A geni mutasyonları Ohtahara sendromu ve EIMFS gibi şiddetli neonatal başlangıcı epilepsiye neden olabilir. GABRB3 geni mutasyonları, epilepsi tedavisinde kullanılan vigabatrine aşırı duyarlılığa neden olan DEE fenotiplerine yol açabilir (13,25,31,32). STXBP1 geninin fonksiyon kaybı mutasyonları Ohtahara sendromu ve West sendromu gibi erken infantil DEE'ye neden olur (31). ATP1A2 ve ATP1A3 genleri mutasyonları, polimikrogyri ve erken derin epileptik ensefalopati dahil olmak üzere şiddetli nörogelişimsel fenotiplere neden olabilir (33). TMEM63B de novo heterozigot varyantları, erken başlangıçlı DEE ve ilerleyici nörodejenerasyon ile ilişkilidir. Vakaların çoğunda hematolojik anormallikler görülür (34).

Epilepsi vakalarının yaklaşık üçte ikisi poligenik kalıtım mekanizmalarından kaynaklanmaktadır. Poligenik epilepsiler, düşük penetrasyonlu, birden fazla gen lokusu arasındaki etkileşimden ve çevresel tetikleyicilerden kaynaklanır (12). Birincil genetik kusuru taşıyan hastalarda bile (örneğin SCN1A mutasyonu), hastalığın şiddetini, nöbet başlangıç zamanını ve ilaca yanıtı belirleyen genetik modifiye ediciler bulunur. Örneğin, STXBP1 ile ilişkili epilepsinin şiddeti, sinaptik vezikül salınımını kontrol eden SYN1 ve SYN2 gibi modifiye edici genlerden etkilenir (12, 31). De novo patojenik varyantlara sahip DEE hastalarının %8'inin ebeveynlerinin genetik mozaisizmi olduğu bulunmuştur (35).

2.1.3.2. Yapısal (Semptomik) etiyolojiler

DEE'ler, altta yatan belirgin bir beyin anormalliği veya hasarı sonucu ortaya çıkabilir; bu durumlara "semptomik etiyoloji" denir. Semptomatik etiyoloji, ilaca dirençli epilepsi gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. İncelenen refrakter nöbet vakalarının %86'sında semptomik etiyoloji bildirilmiştir. Fokal Kortikal Displazi (FCD), polimikrogyri, lissensefali ve Tüberoz Skleroz Kompleksi (TSC) gibi durumlar yapısal anomali örneğidir. Perinatal hipoksik- iskemik ensefalopati, enfeksiyonlar, perinatal inme ve travmatik beyin yaralanması gibi durumlar edinilmiş nedenlerdir (31, 36).

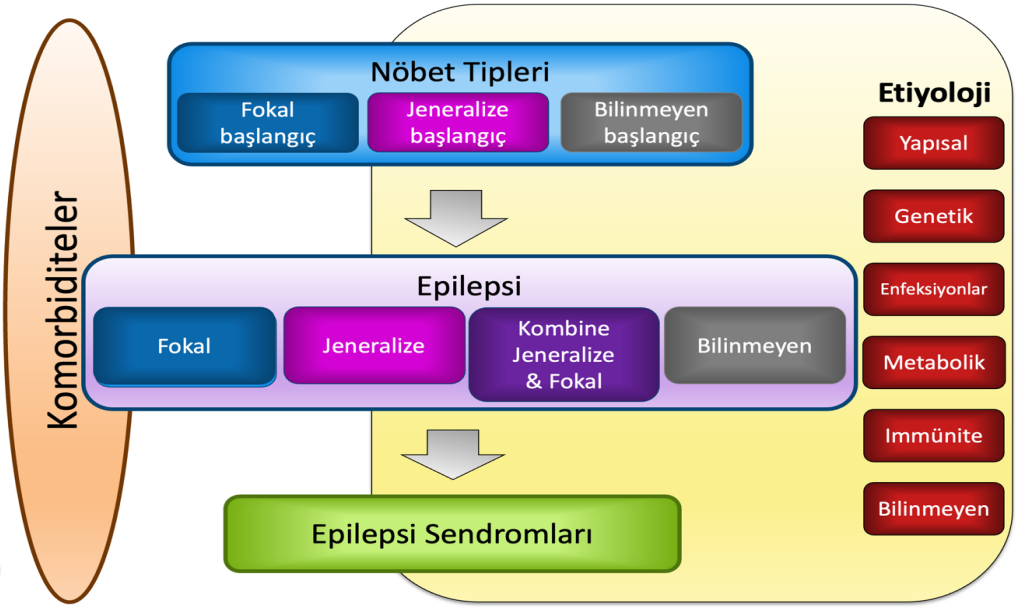
2.1.3.3. Diğer patofizyolojik mekanizmalar

Genetik ve yapısal kusurların ötesinde, DEE'lerin patofizyolojisine katkıda bulunan çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Epileptogenezin inflamatuar yönleri dikkat çekmektedir. Epileptik nöbetlerin kendisi nöro enflamasyona neden olabilir ve bu da epileptogenezi ağırlaştırabilen bir kısır döngü oluşturabilir (10). Rasmussen ve Febril Enfeksiyonla İlişkili Epilepsi Sendromu (FIRES) gibi otoimmün ilişkili bozukluklar, nöro enflamasyonun DEE'lerdeki rolüne örnektir. Özellikle uyku sırasında sürekli spike-wave aktivasyonu (DEE/EE-SWAS veya ESES) ile karakterize bozukluklarda, uykudaki sinaptik homeostazi sürecinin bozulması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (25). TMEM63B ve ATP1A2/A3 ile ilişkili şiddetli ensefalopatilerde, yaygın bozulmuş iyon akıları ve osmotik dengesizliğe karşı hassasiyet nedeniyle elektrojenizmin değiştiği ve bunun da epileptojenik yapısal beyin hasarına yol açabileceği düşünülmektedir (34).

2.1.4. Tanısal Süreç ve Sınıflandırma

ILAE 2017 yılında revize ettiği epilepsi sınıflandırma çerçevesinde, hastanın tanısını koymak, araştırmayı ilerletmek ve antiepileptik tedavilerin geliştirilmesi için kritik bir araç olarak tasarlanmıştır. Bu yeni sınıflandırma, farklı klinik ortamlara uyum sağlamak üzere çok düzeyli bir yaklaşımla sunulmuştur. Mümkün olduğunda, klinisyenin hastanın etiyolojisi ile her üç seviyede de tanı koymaya çalışması önerilmektedir (28).

Epilepsi sınıflandırmasının başlangıç noktası nöbet tipidir. Bu aşama, klinisyenin hastanın yaşadığı paroksismal olayın kesinlikle epileptik bir nöbet olduğu tanısını koyduğunu varsayar. İkinci aşama, hastanın nöbet tipinin yanı sıra EEG ve nörogörüntüleme çalışmalarının sonuçlarının da dikkate alınmasıdır. Son aşama, özgül bir epilepsi sendromu tanısıdır. Bir epilepsi sendromu, bir arada görülme eğiliminde olan nöbet tipleri, EEG ve görüntüleme özelliklerini içeren bir özellik kümesidir. Sendromlar genellikle yaşa bağımlı özelliklere (başlangıç yaşı ve remisyon), nöbet tetikleyicilerine, günlük varyasyonlara, prognoza ve bazen ayırıcı komorbiditelere sahiptir (Şekil 2. 2) (8, 10, 28).



Şekil 2. 2: ILAE 2017 epilepsi sınıflandırması

Epileptik ensefalopatiler, yaşa ve elektroklinik özelliklere göre sınıflandırılan bir dizi sendromu kapsar (Tablo 2.1).

Tablo 2. 1: Ensefalopati veya ilerleyici nörolojik bozulma ile seyreden epilepsi sendromları

Sendrom	Başlangıç Yaşı	Temel Klinik Özellikler	Sıklıkla İlişkilendirilen Genler
Ohtahara Sendromu	Neonatal (37)	Tonik nöbetler, burst-suppression EEG, gelişimsel gecikme (38, 39)	STXBP1, ARX, CDKL5, KCNQ2(40)
Erken Myoklonik Ensefalopati	Neonatal (37)	Myoklonik nöbetler, burst-suppression EEG (41, 42)	SLC25A22, metabolik genler (43)
West Sendromu	3-12 ay (44)	İnfantil spazmlar, gelişimsel regresyon, hipsaritmi EEG (44, 45)	ARX, CDKL5, STXBP1, TSC1/2 (46)
Dravet Sendromu	<1 yaş (47)	Ateşle tetiklenen nöbetler, status epileptikus, gelişimsel gerileme (48, 49)	SCN1A, nadiren PCDH19, SCN2A, GABRA1 (50)
Landau–Kleffner Sendromu	3-7 yaş (51)	Rolantik nöbetler, negatif miyoklonus, atonik nöbetler; emporoparietal bölgelerdeki EEG anormallikleri (51)	GRIN2A geni mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir (35)
Lennox- Gastaut Sendromu	1-8 yaş (52)	Tonik, atonik, atipik absans nöbetleri; bilişsel bozulma; yavaş spike-wave EEG (53)	SCN1A, CHD2, ALG13 (54)

2.2. MİKRO RNA

MikroRNA'lar (miRNA), gen ifadesini düzenleme yeteneğine sahip, kodlama yapmayan RNA'lar sınıfına aittir (55). miRNA'lar, genellikle 21-22 nükleotit (nt) uzunluğunda kısa, tek sarmallı moleküllerdir (56). İnsan genomunun yaklaşık %1'ini kodlarlar. Mannchester Üniversitesi tarafından oluşturulan miRBase veri tabanında güncel verilere göre insanda 1.917 miRNA tanımlanmıştır (57). İlk keşfedilen miRNA, 1993 yılında *C. elegans* larval gelişim zamanlamasını düzenlediği keşfedilen lin-4'tür Bu keşif, RNA moleküllerinin yalnızca protein sentezi için şablon görevi gördüğü yönündeki eski görüşe meydan okumuştur (58).

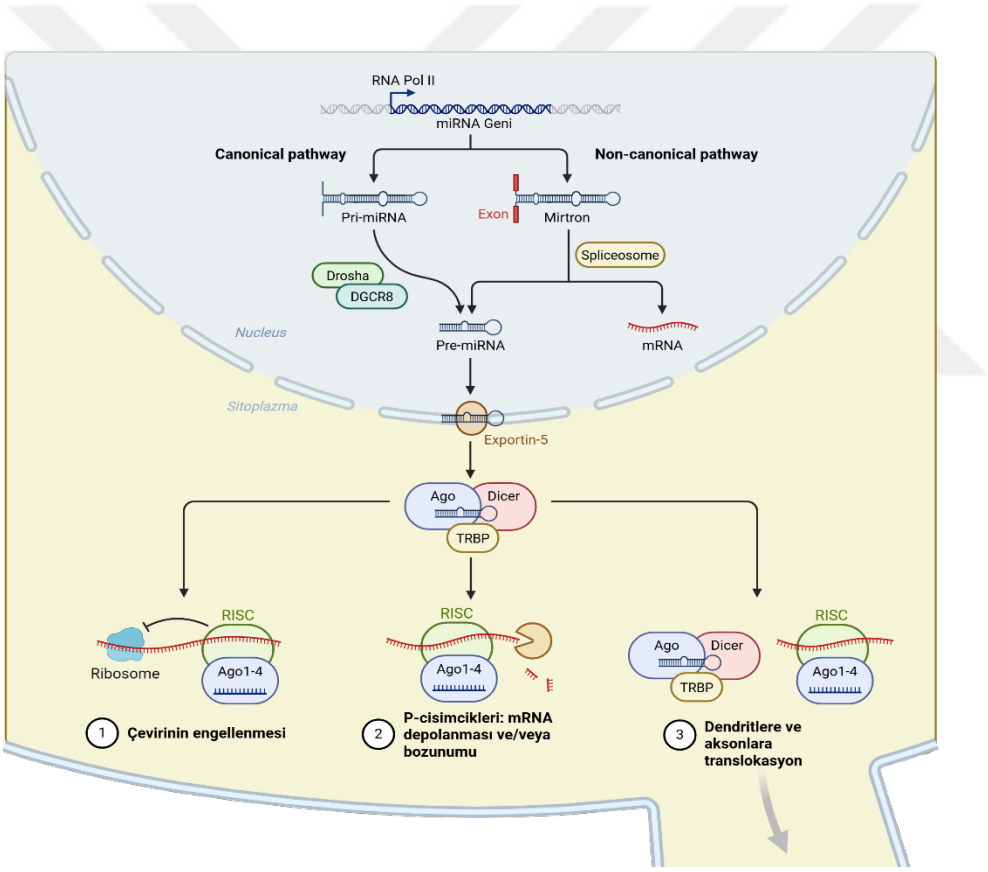
miRNA'lar, gen ifadesini transkripsiyon sonrası düzeyde negatif olarak düzenlerler (59). İşlevlerini gerçekleştirmek için, hedef mRNA'lara, kısmi tamamlayıcılık yoluyla, çoğunlukla mRNA'nın 3' kodlanmayan bölgesine (3'UTR) bağlanarak etki ederler. Bu bağlanma, mRNA'nın yıkımına veya translasyonunun (protein sentezinin) baskılanmasına yol açar (59–61).

Nükleus ve sitoplazmada aşamalı bir dizi biyogenez işlemi geçiren pri-miRNA'lar fonksiyonel hale gelir (58). miRNA'lar, RNA polimeraz II tarafından genlerinden uzun birincil transkriptler (pri-miRNA) olarak oluşturulur. Pri-miRNA'lar, ayırt edici saç tokası benzeri yapılar halinde katlanır. Pri-miRNA'lar, nükleusta Microprocessor adı verilen bir heterodimer kompleks tarafından tanınır ve kesilir (62). Bu kompleks, DROSHA (bir RNase III enzimi) ve onun kofaktörü olan DGCR8'den (DiGeorge kritik bölge geni 8) oluşmaktadır. Bu kesim sonucunda yaklaşık 80 nükleotid uzunluğunda olan öncü miRNA (pre-miRNA) oluşur (62).

Microprocessor'ın tanıma ve kesim hassasiyeti, büyük ölçüde pri- miRNA'nın yapısına bağlıdır. DROSHA ve DGCR8'in kompleks yapısı, pri- miRNA saç tokalarını işlemek üzere nasıl tanıdıklarını ortaya koyan kriyoelektron mikroskobu (cryo-EM) çalışmalarıyla aydınlatılmıştır (62). DGCR8, pri-miRNA ilmeğinin bazal segmentine bağlanır ve katalitik RNAz DROSHA için bir çapa görevi görür (63). Pri-miRNA'nın alt gövde bölgesine yerleştirilmiş GHG motifi, DROSHA'nın RNA tanınmasına yardımcı olur ve nükleotid hassasiyetinde kesim yapmasını sağlar (62).

Pre-miRNA, Exportin 5 (XPO5) proteini ve RanGTP kompleksi aracılığıyla sitoplazmaya ihraç edilir (58). XPO5/RanGTP kompleksi, pre-miRNA'nın 2 nükleotidlik 3' çıkıntısını ve çift sarmallı gövdesini tanır (63). Sitoplazmada, pri-miRNA, RNase III

enzimi DICER ve kofaktörü TRBP (transaktivasyon yanıt elemanı RNA'ya bağlanan protein) tarafından daha fazla işlenir. Bu süreç, DICER'ın DROSHA tarafından bırakılan 2 nükleotidlik çıkıntılara ve belirgin 5'-terminal fosfat ve 3'-OH uçlarına güvenmesine dayanır. DICER kesimi, olgun miRNA (kılavuz iplik) ve onun tamamlayıcı ipliği olan yolcu ipliğinden oluşan 21- 25 nükleotidlik çift sarmallı bir RNA üretir (62). Çift sarmallı RNA, Argonaute (AGO) proteinlerinin (özellikle AGO2) çekirdeğini oluşturduğu RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) içine yüklenir (63). Bu yükleme, şaperon protein kompleksleri (HSC70/HSP90) tarafından desteklenir (62). Çift sarmal çözülür; olgun miRNA RISC'e yüklenirken, yolcu ipliği serbest bırakılır ve parçalanır (Şekil 2. 3) (58).



Şekil 2. 3: miRNA biyogenezi (https://BioRender.com adresinde oluşturuldu)

2.3. miRNA'LARIN NÖROLOJİK HASTALIKLARDAKİ ROLÜ

miRNA'lar, epilepsi ve nörodejeneratif hastalıklarda nöronal işlev ve yap ile ilgili bir dizi süreci düzenler. İyon kanallarını hedef alarak nöronun elektriksel uyarılabilirliğini ve nöbet insidansını etkileyebilirler (55). miR-129-5p, dendritlerde mTORC1'e (memeli Rapamisin hedefi kompleksi 1) bağlı bir mekanizma ile potasyum kanalı Kv1.1'in translasyonunu baskılar. Bu mekanizmanın epilepsi gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (62). miR-27a-3p, mesial temporal lob epilepsisinde (mTLE) KCNB1 ve KCNQ2 gibi iyon kanalı genlerini düzenleyerek nöronların elektriksel uyarılabilirliğini etkiler (55).

Kronik nöro enflamasyon, epilepsinin patogenezine katkıda bulunan temel bir özelliktir (63). miR-146a, deneysel ve insan temporal lob epilepsisindeki enflamasyonla ilişkili bir miRNA'dır (64). Astrosit aracılı enflamatuvar tepkinin anahtar düzenleyicisidir. NF-kB ve MyD88'i içeren bir geri besleme sisteminin parçası olarak, IL-1RI ilişkili protein kinaz-1 (IRAK1), IRAK2 ve TRAF6 gibi enflamatuvar yolak bileşenlerini hedef alarak negatif bir düzenleyici olarak işlev görür (58). miR-155 ve miR-21'in bağışıklık tepkisi ve Toll benzeri reseptör (TLR) modülasyonu için kritik olduğu gösterilmiştir, ancak bu çalışmaların çoğu nöronal olmayan dokularda gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bu iki miRNA da astrositler de dahil olmak üzere glial kaynaklı hücrelerde zenginleştirilmiştir ve muhtemelen nöro inflamatuar sinyal yolaklarında rol oynarlar. Ashhab ve arkadaşları, pilokarpin kaynaklı status epileptikus ve dirençli temporal lop epilepsili çocuklardan alınan insan beyin örneklerinde miR-155 ekspresyonunun değiştiğini bulmuşlardır (65).

miRNA'lar, dentritik diken gelişimi ve sinaptik plastisite gibi süreçlerde de kritik rol oynar. miR-134, beyne özgü bir miRNA olup, dentritik diken gelişimini düzenler ve LIM kinaz 1 (LIMK1)'i hedef alarak dentritik diken yapısını etkiler. miR-134'ün susturulması, nöroprotektif ve uzun süreli nöbet bastırıcı etkiler yaratmıştır (66). miR-132, MSS bozukluklarında önemli bir düzenleyici rol oynayan oldukça korunmuş bir moleküldür. miR-132'nin ifade düzeyleri çeşitli nörolojik bozukluklarda değişkenlik gösterir ve hastalığın başlangıcı ve ilerlemesiyle yakından bağlantılıdır. MSS'deki miR-132 ifade düzeyi, nöronal göç ve entegrasyon, dendritik büyüme ve karmaşıklık, sinaptogenez, sinaptik plastisite ve ayrıca inflamasyon ve apoptoz aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli uyaranlar ve sinyal yolları tarafından düzenlenir (67,68).

2.3.1. MikroRNA 324

miR-324, insan hastalıklarının patogenezinde önemli etkileri olan miRNA'lara bir örnektir. Bu miRNA, gen susturulmasında rol oynar. Gen ontolojisi çalışmaları, miR-324'ün hücrelerin lösemi inhibitör faktörüne verdiği yanıtlar, uzun süreli sinaptik güçlendirme, sitokin üretiminin pozitif düzenlenmesi ve sesin duyusal algısı gibi çeşitli süreçlerde olası bir rolü olduğunu göstermiştir (69,70). İnsanlarda miR-324, 17p13.1 kromozomunda bulunan MIR324 geni tarafından kodlanır (Şekil 2. 4) (71).



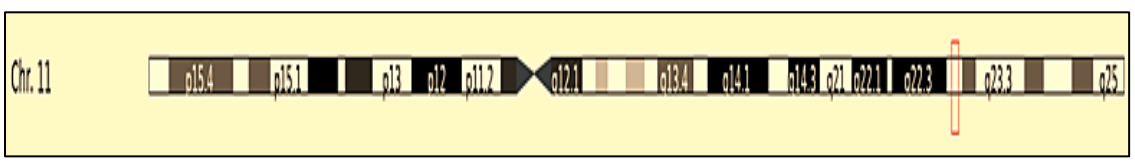
Şekil 2. 4: miRNA-324 genomik lokalizasyonu (71)

miR-324-5p vücudun her yerinde ifade edilse de beyinde diğer dokulardan çok daha fazla ifade edilir ve bu da beyindeki gen düzenlemesinde önemli bir rol oynadığını gösterir. Çeşitli çalışmalar, miR-324-5p'nin ve hedefi olan Kv4.2'nin dendritik diken oluşumunu düzenleyebileceğini öne sürmektedir, ancak miR-324-5p'nin yapısal ve işlevsel dendritik diken düzenlemesindeki kesin rolleri bilinmemektedir (72).

Hayman ve arkadaşları tarafından miR-324-null fareler üzerinde yapılan bir çalışmada miR-324'ün epilepsi ilişkili genler üzerindeki düzenleyici aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmada SUOX ve CD300lf genlerinin miR-324'ün hedef genleri olduğu gösterilmiştir (71).

2.3.2. MikroRNA 34c

miR-34c, özellikle ilaca dirençli epilepsilerde incelenen ve potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilen bir mikro RNA'dır (73). İnsanlarda 11q23.1 kromozomunda bulunan MIR34C geni tarafından kodlanır (Şekil 2. 5) (74).



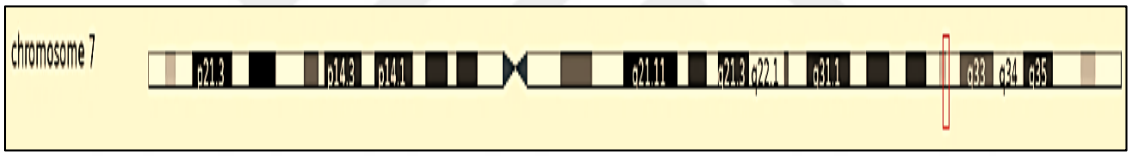
Şekil 2. 5: miRNA-34c genomik lokalizasyonu (74)

Dirençli epilepsi hastası çocukların serumunda miR-34c-5p'nin biyobelirteç potansiyelini inceleyen bir çalışmada, genel olarak epilepsi hastalarında serum seviyelerinde bir azalma gözlenmiş ve ilaç dirençli grupta bu seviyeler daha düşük bulunmuştur (73).

Kainik asit ile indüklenmiş epilepsi sıçan modellerinde yapılan deneylerde, ilaca dirençli hayvanlarda miR-34c-5p'nin aşağı regülasyonu ve buna paralel olarak HMGB1 ve IL-1B'nın yukarı regülasyonu gözlemlenmiştir (75).

2.3.3. MikroRNA 335

miR-335-5p, epilepside nöronal uyarılabilirliği kontrol etmeyi amaçlayan telafi edici mekanizmaların bir parçası olarak görülmektedir ve potansiyel terapötik hedef veya biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (76). İnsanlarda 7q32.2 kromozomunda bulunan MIR335 geni tarafından kodlanır (Şekil 2. 6) (77).



Şekil 2. 6: miRNA-335 genomik lokalizasyonu (76)

Tahmin edilen ve doğrulanmış miR-335-5p hedefleri arasında, SCN1A, SCN2A ve SCN3A yer almaktadır. Bu kanalların voltaj kapılı sodyum kanalları olarak fonksiyonel hedefler olduğu belirtilmiştir. Ant-335 (miR-335-5p'ye karşı bir antagomir) ile tedavi, fare beyninde SCN1A, SCN2A ve SCN3A transkriptlerinin yükselmesine ve hipokampal piramidal nöronların daha fazla uyarılabilirliğine yol açmıştır (76)

Travma sonrası epilepsi sıçan modelinde, glutamaterjik sistemle ilişkili miRNA-mRNA düzenleyici ağların izlendiği bir çalışmada travma sonrası epilepsi modelinde, miR-335 ekspresyon seviyeleri, kontrole kıyasla ön beyin dokusunda önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca glutamat reseptörü GRM4'ü doğrudan hedefleyebileceği belirtilmiştir (78).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Gönüllülerden Kan Örneklerinin Toplanması

Bu tez çalışması Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve 09/21 sayılı karar ile etik açıdan uygun bulunmuştur (EK-1). Çalışmamıza, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Pediatri departmanında Epileptik Ensefalopati tanısı almış 1 – 18 yaş arası 30 çocuk dahil edilmiştir. Tanı alan hastalar en az 6 aylık izlem süresini tamamlamasının ardından çalışmaya dahil edildi. Hasta grubuyla yaş ve cinsiyet durumu açısından eşleştirilmiş herhangi bir nörolojik hastalığı olmayan 20 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllülere "Gönüllü Olur Formu" (EK-2) imzalatılmıştır. Gönüllülerden rutin izlem sırasında EDTA'lı tüpe 2 ml periferik kan örneği alındı ve soğuk zincirle Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na nakledildi. Örneklerden aynı gün içinde miRNA ve mRNA izole edildi. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemle ölçüldükten sonra -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.1.2. Kimyasallar ve Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kitler kullanım amaçlarıyla Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1: Kimyasallar ve Kitler

Kimyasal ve Kit Adı	Kullanım Amacı
Etil Alkol (%99, Merck)	RNA presipitasyonu
Kloroform (Sigma, USA)	RNA pürifikasyonu
İzopropanol (Sigma, USA)	RNA presipitasyonu
Trizol (Qiagen, USA)	RNA pürifikasyonu

Tablo 3. 1 (devam)

miRcute Serum/Plasma miRNA Isolation Kit (Cat. No: GDP503) (Tiangen/ China)	miRNA İzolasyonu
miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit (Cat. No: GKR211-02) (Tiangen/ China)	cDNA sentezi
miRcute Plus miRNA qPCR Kit (SYBR Green) (Cat. No: GFP411-01) (Tiangen/ China)	PCR array
ABScript III RT Mix for qPCR Kit (Cat. No: RK20428) (ABclonal Technology, USA)	cDNA sentezi
miScript SYBR Green PCR Kit (Cat. No: 218076) (Qiagen, USA)	PCR array

3.1.3. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazların adı, markası ve kullanılma amaçları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3. 2: Cihazlar

Cihazın Adı	Kullanım Amacı
Masaüstü Soğutmalı Ultrasantrifüj (Gyrozen)	Genel Kullanım
+4 buzdolabı (Arçelik)	Genel Kullanım
Spektrofotometre ve Florometre (DENOVIX/DS-11FX)	DNA/RNA konsantrasyon ölçümü
Derin Dondurucu (-20ºC) (BOSCH/GSN36AI31)	Örneklerin Muhafazası
Derin Dondurucu (-80ºC) (DAIHAN/Duo Freez U500)	Örneklerin Muhafazası
Termal Döngü Cihazı (Thermal Cycler) (Blue-Ray/ tcst-9620)	cDNA Sentezi
Real-time PCR (Roche, LightCycler 480II)	Gen ekspresyonu işlemi
Otomatik pipet seti (Eppendorf)	Moleküler genetik çalışmalar
Distile su cihazı (Elga)	Genel kullanım
Kar buz makinesi (IMS-50)	Genel kullanım
Otoklav (ALP)	Malzeme sterilizasyon

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Tam Kandan Total RNA İzolasyonu

Hastalardan alınan kan örneklerinden TRIzol Reaktifi ile total RNA izole edilmiştir. RNA izolasyonu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi:

- EDTA'lı kan tüpünden 2 ml'lik tüpe 500 µl kan alındı ve 2 ml'lik temiz tüpe aktarıldı.
- Üzerine 1000 µl trizol eklendi ve peletin çözünmesi için vortekslendi.
- Homojenat üzerine 200 µl kloroform eklendi ve vortekslendi.
- +4°C'de 13000 rpm hızla 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı temiz tüplere aktarıldı ve üzerine 500 µl izopropil alkol eklenerek 5-10 dk sürekli alt üst edildi.
- +4°C'de 13000 rpm hızla 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım döküldü ve üzerine 1000 µl % 75'lik etil alkol eklendi.
- +4 0C'de 12000 rpm hızla 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım döküldü ve tüplerin ağzı açık bırakılarak oda ısısında kurutuldu.
- Üzerine 50 µl RNase Free Water eklenerek RNA çözdürüldü.
- RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre (DENOVIX DS-11 FX, ABD) ile ölçüldü.
- Elde edilen RNA, çalışma yapılana kadar -80°C'de saklandı.

3.2.2. miRNA İzolasyonu

- EDTA'lı tüpte bulunan tam kan 3500 rpm hızla 15 dakika santrifüj edilerek plazmanın ayrılması sağlandı. Elde edilen plazma temiz bir tüpe aktarıldı.
- 1,5 ml'lik tüpe 200 µl plazma aktarıldı ve üzerine 900 µl MZA Tampon eklendi. İyice karıştırmak için 30 saniye vortekslendi ve ardından karışım alt üst edildi.

- Nükleik asitleri ve proteinleri ayırmak için homojenat içeren tüp 5 dakika oda sıcaklığında (15- 30°C) tezgâh üzerinde inkübe edildi.
- Süpernatantın üzerine 200 µl kloroform eklendi ve tüp 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalandı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- +4°C'de 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden sonra 3 faza ayrılan numuneden RNA içeren üste kalan, renksiz, sulu faz yeni bir tüpe aktarıldı.
- Sulu faz çözeltisine 2 kat hacminde etanol (%96- 100) eklendi. Birkaç kez pipetlenerek karıştırıldı.
- Elde edilen sıvı ve oluşan çökelti RNase- Free Column miRelute içine aktarıldı, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Ardından 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Santrifüj sonrası filtre yeni temiz tüpe geçirildi, altta kalan sıvı tüp ile atıldı.
- Column miRelute üzerine 700 µl MRD Tampon eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Ardından kolonun yıkanması için 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpünde kalan sıvı döküldü.
- Column miRelute üzerine 500 µl RW Tampon eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Ardından kolonun yıkanması için 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpünde kalan sıvı döküldü.
- Bir önceki adım tekrarlandı.
- Kolon ve toplama tüpü oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlendi. 2 ml toplama tüpü atıldı.
- Column miRelute yeni bir 1,5 ml RNazsız santrifüj tüpüne aktarıldı, filtre üzerine doğrudan 20 µl RNazsız ddH_2O eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi.
- RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre (DENOVIX DS-11 FX, ABD) ile ölçüldü. Elde edilen RNA, çalışma yapılana kadar -80°C'de saklandı.

3.2.3. mRNA cDNA Sentezi

cDNA sentezi, ABScript III RT Master Mix for qPCR (ABclonal Technology, USA) kit protokolüne uygun şekilde termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. Her örnek için total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 0,2 ml'lik tüplerde tablo 3.3'te belirtilen konsantrasyonlarda karışım hazırlanmıştır. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. 3: Revers transkriptaz reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (20 µl)
5X ABScript III RT Mix	4 µl
Total RNA	4 µl
Nuclease- free H_2O	12 µl

Hazırlanan karışım termal döngü cihazına (Blue-Ray/ tcst-9620) yerleştirildi ve kit protokolüne uygun sıcaklıklarda cDNA sentezlenmiştir (Tablo 3.4). Elde edilen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3. 4: Revers transkriptaz termal döngü protokolü

Sıcaklık	Süre
55 °C	15 dk
85 °C	5 dk
4 °C	∞

3.2.4. miRNA cDNA Sentezi

Plazmadan izole edilen miRNA'lar, 2x miRNA RT Reaksiyon Tamponu ve RNaz içermeyen ddH_2O kısa süre santrifüjlenerek buz üzerine konuldu. Tablo 3.5'te yer alan malzemeler ile 20 µl total hacimde bir reaksiyon çözeltisi hazırlandı (tüm adımlar buz üzerinde gerçekleştirildi).

Tablo 3. 5: Reaksiyon çözeltisi

İçindekiler	Hacim (20 µl)
miRNA	3 µl
2x miRNA RT Reaksiyon Tamponu	10 µl
miRNA RT Enzim Mix	2 µl
RNase- Free ddH_2O	5 µl
Total Hacim	20 µl

Reaksiyon çözeltisi pipetlenerek hafifçe karıştırıldı ve tüpün duvarındaki damlaların giderilmesi için kısa süre santrifüjlendi. 42 °C'de 60 dakika, ardından 95 °C'de 3 dakika inkübe edildi. cDNA ürünlerini içeren reaksiyon çözeltisi kantitatif PCR aşamasına kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.5 mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Analizi

Ekspresyon seviyeleri miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, USA) kullanılarak LightCycler® 480-II Instrument 96 or 384 well plate (Roche, Switzerland) real- time PCR cihazında ölçülmüştür.

Ekspresyon seviyelerinin analizi öncesi, cDNA'ların dilüsyon oranlarını belirlemek amacıyla cDNA kontrol PCR'ı yapıldı. Melting Curve analizi ile en uygun dilüsyon oranı 1/5 olarak belirlendi. Çalışmada housekeeping gen olarak Beta Actin (ACTB) kullanılmıştır. Real-time PCR için Tablo 3.6'ya göre reaksiyon çözeltisi hazırlanmış ve Tablo 3.7'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. PCR özgünlüğü, melting curve analizi ile doğrulanmıştır.

Tablo 3. 6: Real-time PCR reaksiyon çözeltisi

Bileşenler	Hacim (20 µl)
2x Universal SYBR Green	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
ddH_2O	4 µl
cDNA	4 µl

Tablo 3. 7: Real-time PCR Programı

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman	Aşamalar
1x	95	10 dk	Pre- incubation
45x	95	15 sn	Amplification
	60	1 dk	
	72	10 sn	
	95	5 sn	Melting Curve
	65	1 dk	
	97	Continuos	
	40	30 sn	Cooling

3.2.6. miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Analizi

Real- time PCR reaksiyonları, miRcute Plus miRNA qPCR Kit (SYBR Green) (Tiangen, China) kullanılarak gerçekleştirildi.

Analize başlamadan önce, cDNA'ların dilüsyon oranlarını belirlemek amacıyla cDNA kontrol PCR'ı yapıldı. Melting Curve analizi ile en uygun dilüsyon oranı 1/10 olarak belirlendi. Çalışmada housekeeping gen olarak hsa-U6 kullanılmıştır. Real-time PCR için Tablo 3.8'e göre reaksiyon çözeltisi hazırlanmış ve Tablo 3.9'te belirtilen koşullarda LightCycler® 480-II Instrument 96 or 384 well plate (Roche, Switzerland) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR özgünlüğü, melting curve analizi ile doğrulanmıştır.

Tablo 3. 8: Real-time PCR reaksiyon çözeltisi

Bileşenler	Hacim (20 µl)
2x miRcute plus miRNA Premix (SYBR&ROX)	10 µl
Forward Primer	0,4 µl
Reverse Primer	0,4 µl
ddH_2O	7,2 µl
cDNA	2 µl

Tablo 3. 9: Real-time PCR Programı

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman	Aşamalar
1x	95	10 dk	Pre- incubation
45x	95	15 sn	Amplification
	60	1 dk	
	72	10 sn	
	95	5 sn	Melting Curve
	65	1 dk	
	97	Continuos	
	40	30 sn	Cooling

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Gen ekspresyon analizi sonucu elde edilen veriler, GeneGlobe Data Analysis Center (https://geneglobe.qiagen.com/tr/analyze) tarafından geliştirilen çevrimiçi yazılım programı ile analiz edildi. Tüm mRNA ve miRNA ekspresyon seviyeleri, Ct (Threshold Cycle) değeri kullanılarak değerlendirildi. Bu sonuçlar, her örnek için housekeeping genler kullanılarak normalize edildi (ΔCt). Her iki grup arasındaki kat değişimleri (fold change) ΔΔCt olarak hesaplandı. Her iki grup karşılaştırıldığında mRNA ve miRNA genlerinin diferansiyel ekspresyonu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak ifade edildi (79). Tüm istatistiksel analizlerde $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 HASTA GRUBU DEMOGRAFİK VE KLİNİK VERİLERİ

Hasta grubuna ait demografik ve klinik özellikleri Tablo 4.1'de özetlenmiştir. EE hastalarının ve sağlıklı kontrol gruplarının yaş ortalamaları sırasıyla 0,1 ± 8,37 ve 0,1 ± 10,15'tir. Hastaların EEG bulguları incelendiğinde 12 hastada Multifokal epileptik aktivite, 5 hastada Brust- Supresyon, 19 hastada jeneralize epileptik aktivite, 2 hastada fokal ESES ve 14 hastada fokal epileptik aktivite saptanmıştır. Hastalar gelişimsel ve davranışsal bozukluklar açısından değerlendirildiğinde, bütün hastalarda nöromotor gelişim geriliği mevcut. 13 hastada motor bulgular daha ağır ve ön planda, hastalar spastik tetraparezi (yatalak), 14 hasta da ise bilişsel, sosyal ve dil gelişimi daha ön planda ve buna bağlı olarak da hafif-orta düzeyde ince motor ve kaba motor gerilik mevcut. 1 hastada ağır hipotoni ve 1 hastada gelişim geriliği saptanmıştır.

Tablo 4. 1: Hasta Grubuna Ait Demografik ve Klinik Özellikler

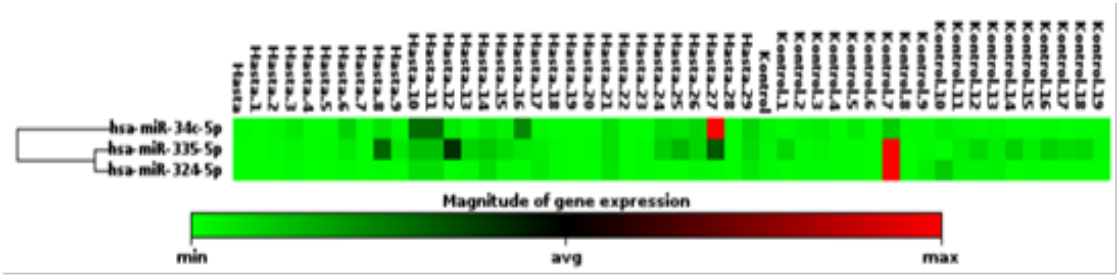
Örnek No	Yaş (Ay/Cinsiyet)	İlk Nöbet Yaşı (Ay)	EEG Bulguları	Nöbet Sıklığı
1	38 Ay/E	5	Multifokal, Jeneralize Burst-Supresyon	Her Gün
2	42 Ay/K	2	ESES	Her Gün
3	134 Ay/E	9	Fokal (Temporal, Frontal)	2 Haftada Bir
4	188 Ay/E	4	Multifokal	2 Haftada Bir
5	53 Ay/E	4	Multifokal	Her Gün
6	100 Ay/K	4	Multifokal, Jeneralize	2 Haftada Bir
7	96 Ay/ E	2	Multifokal	
8	53 Ay/E	6	Multifokal, Jeneralize, Burst-Supresyon	2 Haftada Bir
9	183 Ay/E	1	Multifokal, Jeneralize Burst-Supresyon	Ayda Bir
10	49 Ay/ K	2	Multifokal, Jeneralize Burst-Supresyon	Her Gün

Tablo 4. 2 (Devam)

11	219 Ay/ K	36	Fokal (Temporal, Oksipital)	2-3 Ayda Bir
12	110 Ay/ K	1	Multifokal, Jeneralize Burst-Supresyon	Her Gün
13	113 Ay/K	20	Jeneralize	Her Gün
14	89 Ay/E	11	Multifokal, Jeneralize	Her Gün
15	63 Ay/E	1	Fokal (Temporal, Frontal, Parietal)	Her Gün
16	130 Ay/E	48	Fokal (Temporal)	Yok
17	146 Ay/K	52	Fokal (Temporal, Oksipital), Jeneralize ESES	2 Haftada Bir
18	13 Ay/E	6	Fokal (Temporal, Oksipital), Jeneralize	2 Haftada Bir
19	130 Ay/E	40	Fokal (Frontal, Temporal), Jeneralize	Senede 1-2
20	57 Ay/K	18	Fokal (Frontal), Jeneralize	Her Gün
21	96Ay/E	1	Fokal (Frontal, Temporal)	Ayda Bir
22	205 Ay/E	5	Fokal (Frontal, Parietal)	6 Ayda Bir
23	21 Ay/K	5	Fokal (Temporal, Oksipital), Jeneralize	2 Haftada Bir
24	38 Ay/E	2	Jeneralize	Haftada Bir
25	219 Ay/E	16	Fokal (Parietal, Oksipital)	Senede 1-2
26	145 Ay/K	8	Fokal (Temporal), Jeneralize	Her Gün
27	97 Ay/K	5	Multifokal, Jeneralize	Haftada Bir
28	130 Ay/E	4	Fokal (Temporal), Jeneralize	Ayda Bir
29	144Ay/E	12	Multifokal, Jeneralize	Senede 1-2
30	100 Ay/E	3	Multifokal, Jeneralize	Haftada Bir

4.2. miRNA EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLARI

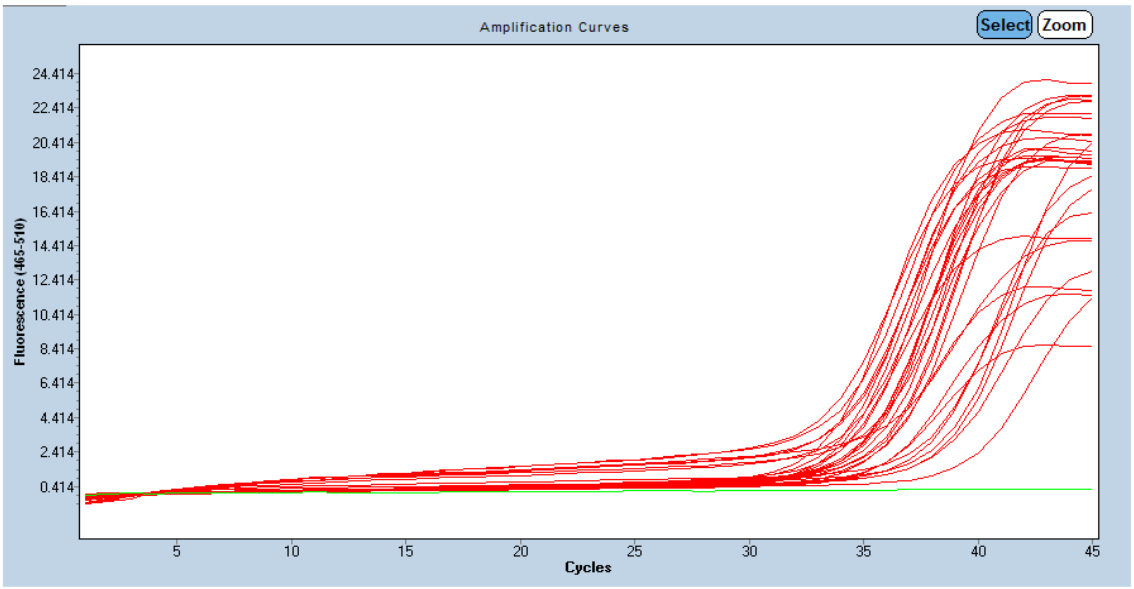
Tüm olguların hsa-miR-335-5p, hsa-miR-324-5p ve hsa-miR-34c-5p ekspresyon düzeylerinden oluşturulan clustergram grafiği Şekil 4.1'de verilmişti.



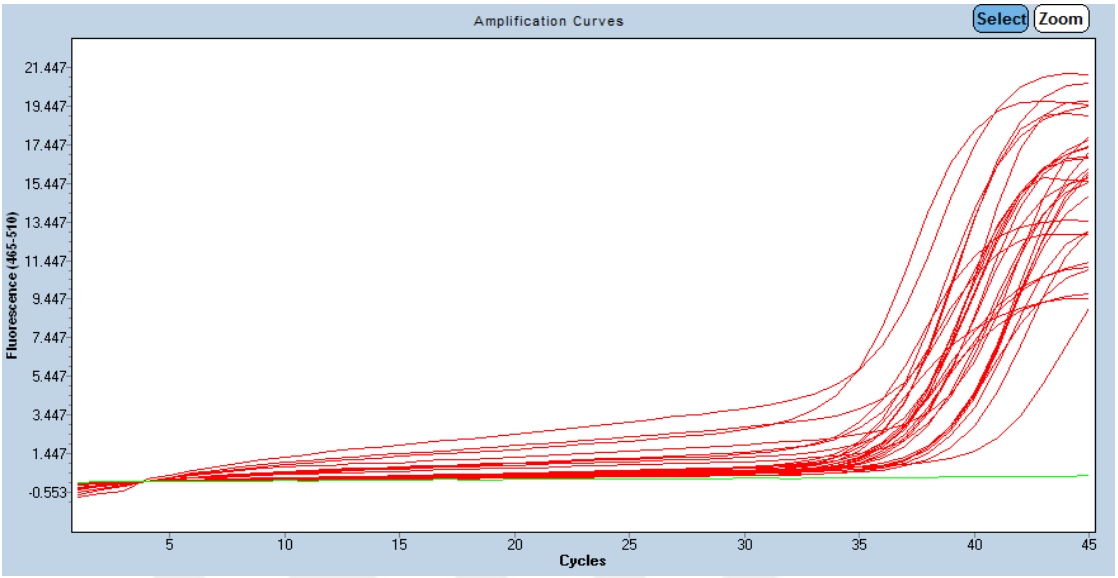
Şekil 4. 1: miRNA ekspresyonu clustergram grafiği

Epileptik Ensefalopati hastalarında 3 farklı miRNA'nın ekspresyon düzeyleri, qRT-PCR yöntemi kullanılarak tespit edildi (Şekil 4.2 a, 2b, 2c ve Şekil 4.3 a, 3b, 3c).

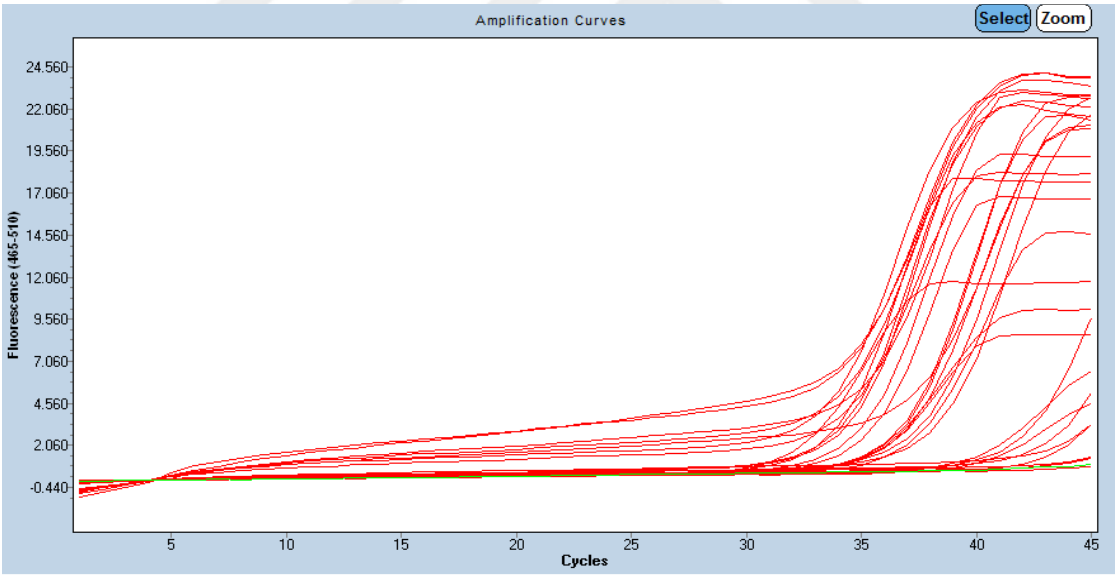
a)



b)

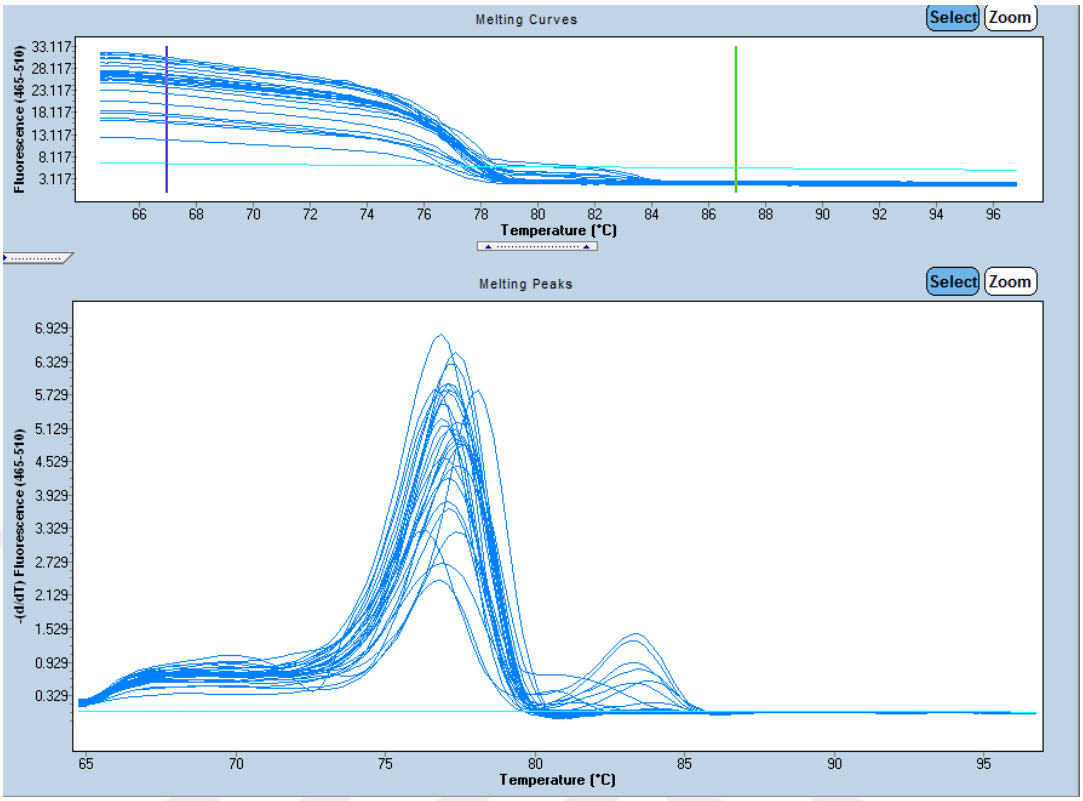


c)

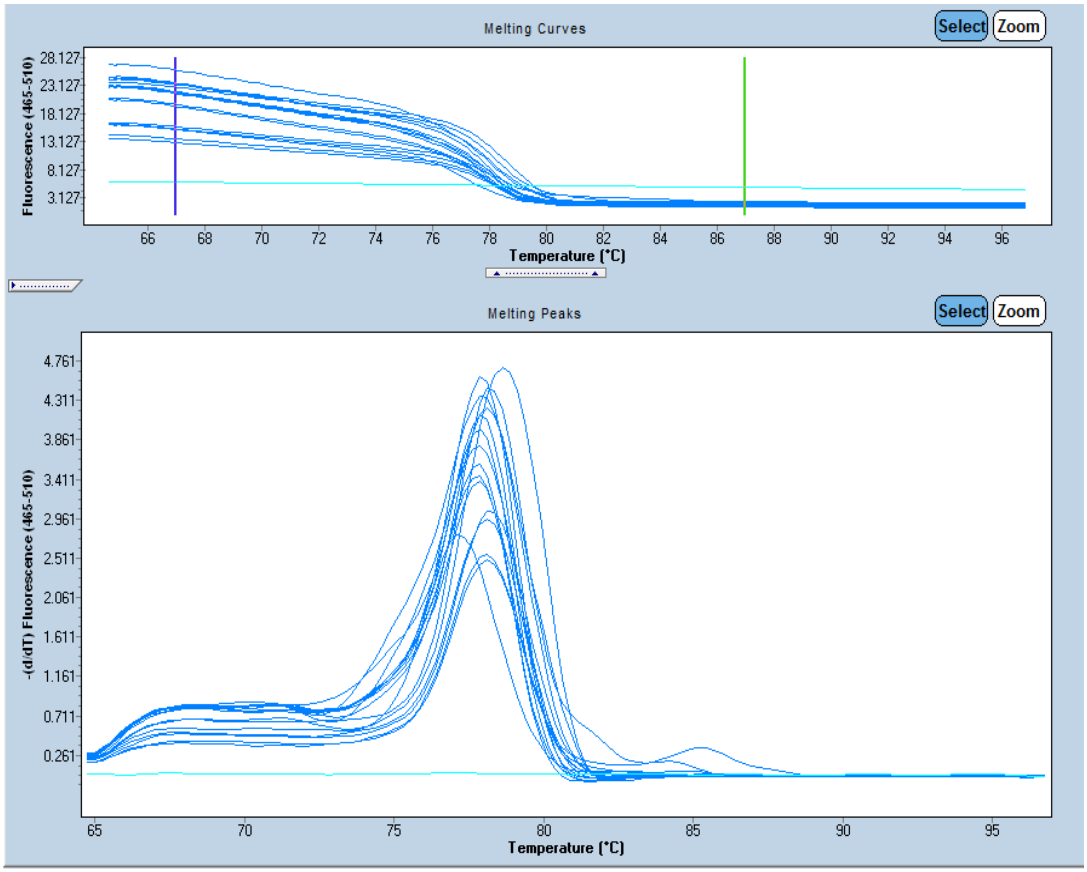


Şekil 4. 2: hsa-miR-335-5p (a), hsa-miR-324-5p (b) ve hsa-miR-34c-5p (c) qRT-PCR Amplifikasyon Eğrisi

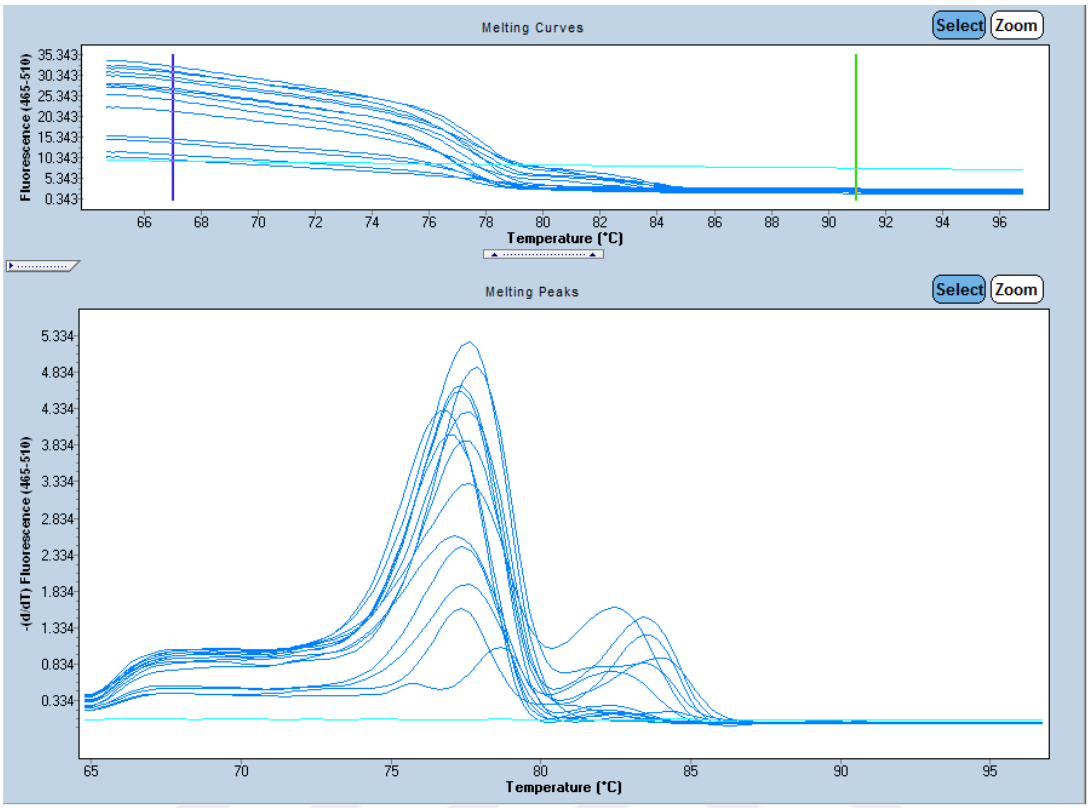
a)


Melting Curves
Select
Zoom
Fluorescence (465-510)
33.117
28.117
23.117
18.117
13.117
8.117
3.117
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96
Temperature (°C)
Melting Peaks
Select
Zoom
-(d/dT) Fluorescence (465-510)
6.929
6.329
5.729
5.129
4.529
3.929
3.329
2.729
2.129
1.529
0.929
0.329
65 70 75 80 85 90 95
Temperature (°C)

b)


Melting Curves
Select
Zoom
Fluorescence (465-510)
28.127
23.127
18.127
13.127
8.127
3.127
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96
Temperature (°C)
Melting Peaks
Select
Zoom
-(d/dT) Fluorescence (465-510)
4.761
4.311
3.861
3.411
2.961
2.511
2.061
1.611
1.161
0.711
0.261
65 70 75 80 85 90 95
Temperature (°C)

c)



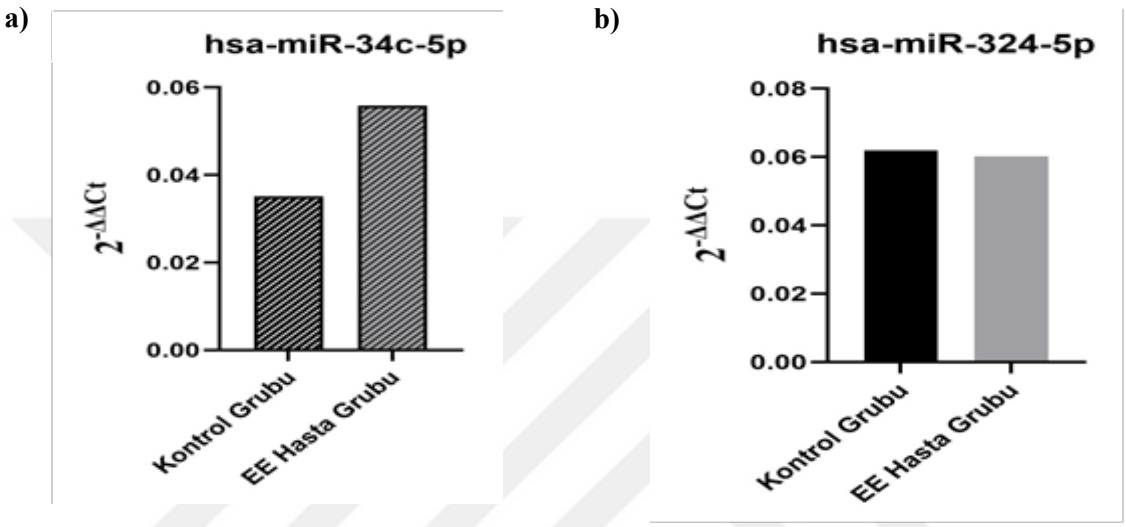
Şekil 4. 3: hsa-miR-335-5p (a), hsa-miR-324-5p (b) ve hsa-miR-34c-5p (c) qRT-PCR Melting Curves ve Melting Peaks

Kontrol grubu ile Epileptik Ensefalopati vakalarının miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. hsa-miR-335-5p (p:0.851825), hsa-miR-324-5p (p:0.244874) ve hsa-miR-34c-5p (p:0.136682) ekspresyon seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo 4.2).

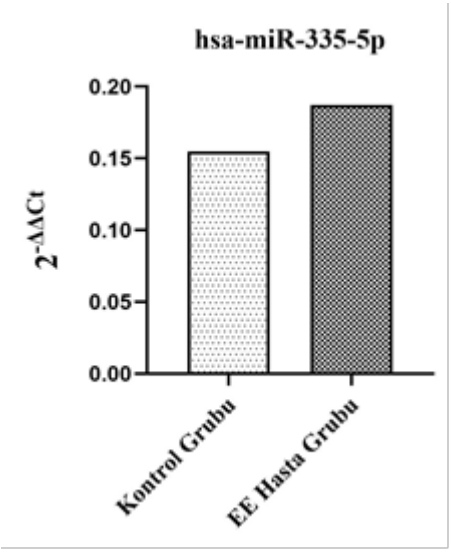
Tablo 4. 3: Epileptik Ensefalopati miRNA Ekspresyonu Kat Değişimi

	Kat Değişimi	**p Değeri**
hsa-miR-335-5p	1.21	0.851825
hsa-miR-324-5p	0.97	0.244874
hsa-miR-34c-5p	1.59	0.136682

Çalışmada incelenen miR-34c-5p, miR-324-5p ve miR-335-5p'nin 2^-ΔΔCt değerleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bununla birlikte miR-34c-5p ve miR-335-5p hasta grubunda artış eğilimi gösterirken (Şekil 4.4a, 4b), miR-324-5p düzeylerinin gruplar arasında benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).



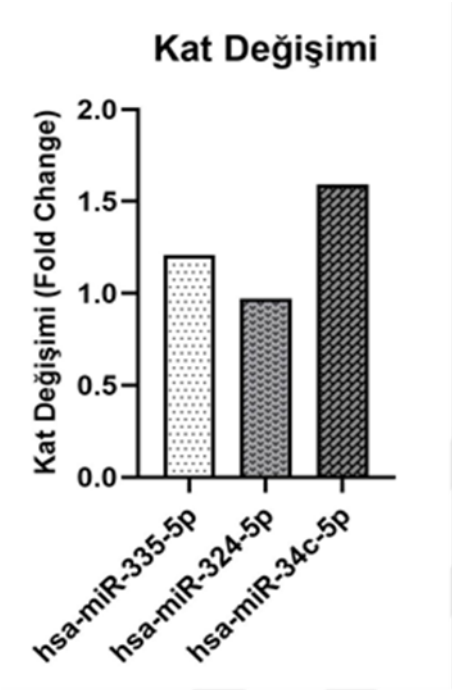
Şekil 4. 4: miR-34c-5p (a) ve miR-335-5p (b) ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması



Şekil 4. 5: hsa-miR-324-5p ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

miR-34c-5p, miR-324-5p ve miR-335-5p'nin hasta ve kontrol grupları arasındaki relatif kat değişimleri Şekil 4.6'da birlikte gösterilmiştir. Fold change analizinde gruplar

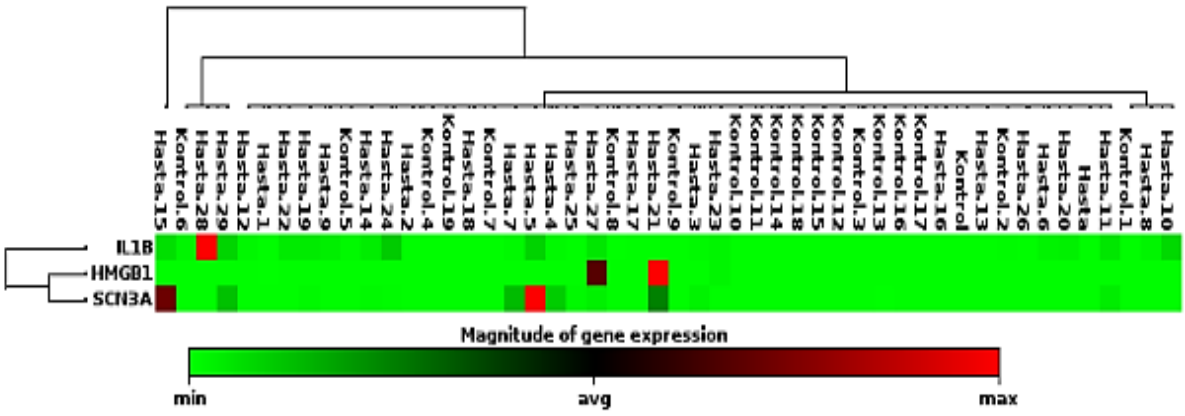
arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmemekle birlikte, miR-34c-5p ve miR-335-5p'de hasta grubunda artış eğilimi dikkati çekmektedir.



Şekil 4. 6: miR-34c-5p, miR-324-5p ve miR-335-5p'nin relatif kat değişimlerinin (fold change) hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması

4.2. mRNA EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLARI

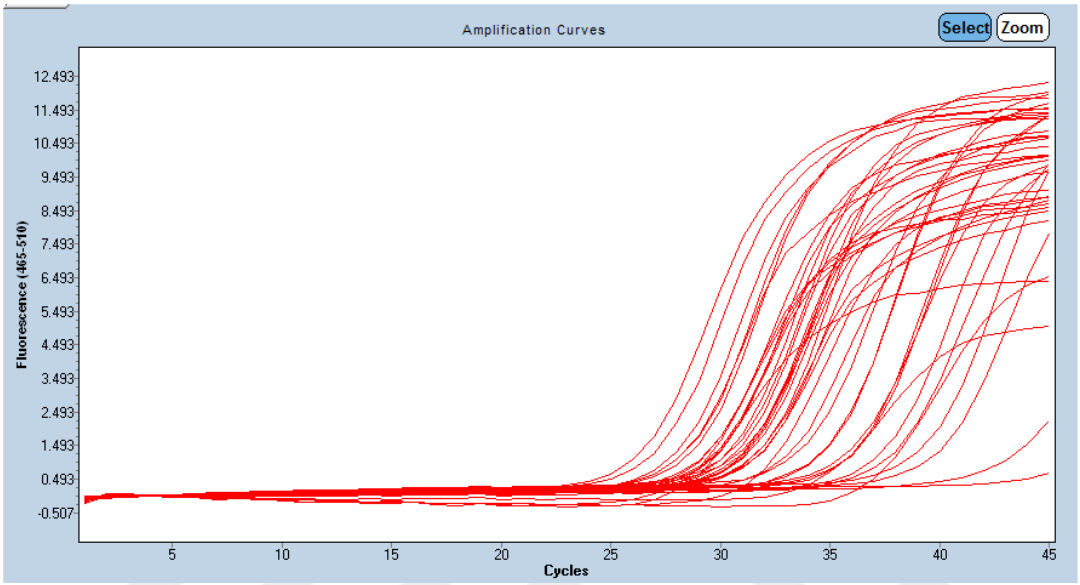
Analizlerin ikinci aşamasında miRNA'ların hedeflediği mRNA'ların ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve moleküler düzeydeki olası etkileşimlerin hasta grubunda nasıl seyrettiği değerlendirilmiştir (Şekil 4. 7).



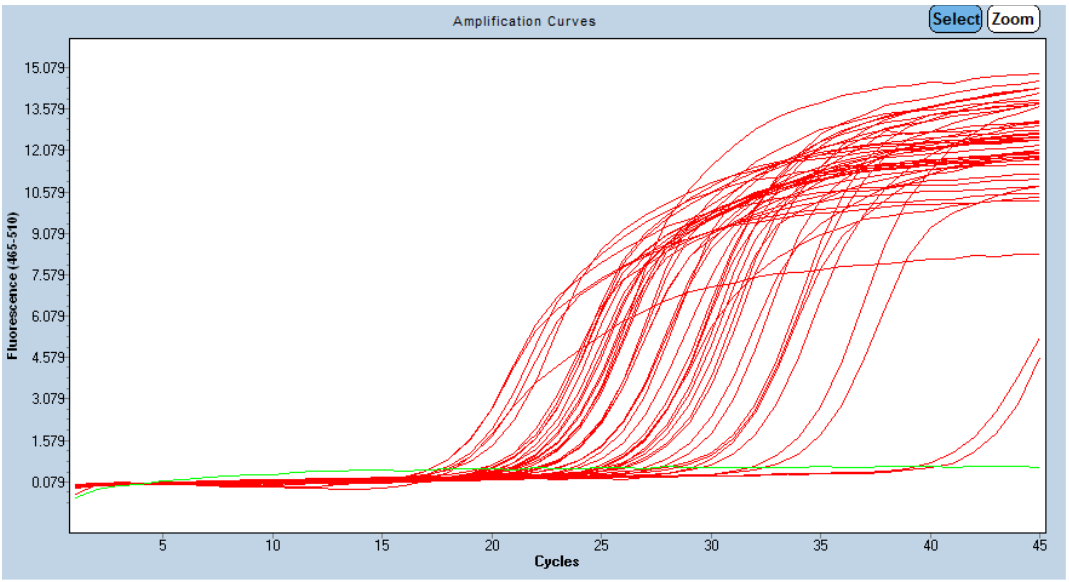
Şekil 4. 7: mRNA ekspresyonu clustergram grafiği

EE hastalarında 3 farklı mRNA'ın (IL1B, HMGB1 ve SCN3A) ekspresyon düzeyleri, qRT-PCR yöntemi kullanılarak tespit edildi (Şekil 4.8 a, 8b, 8c ve Şekil 4.9 a, 9b, 9c).

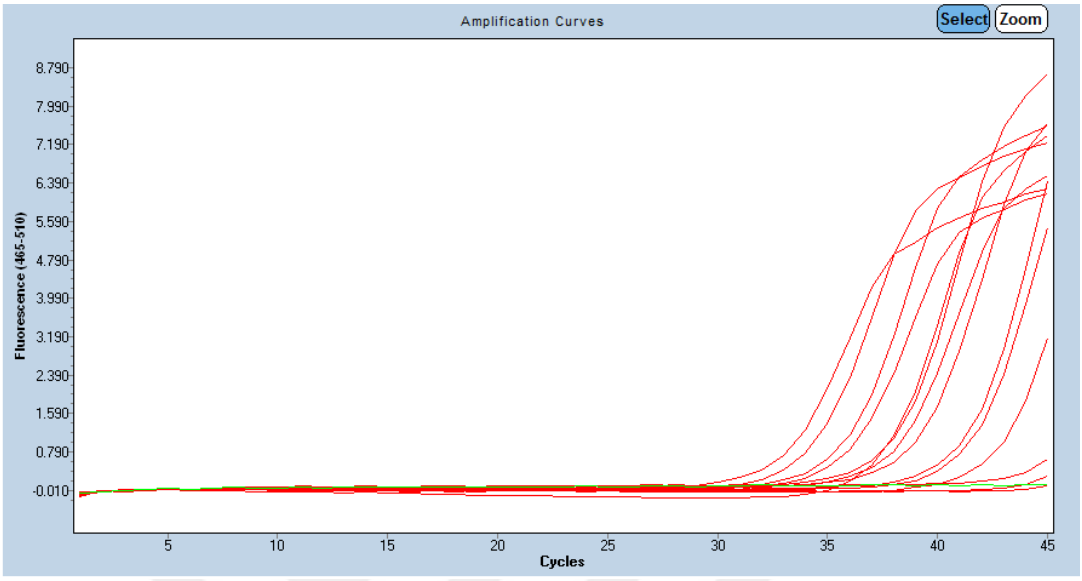
a)



b)

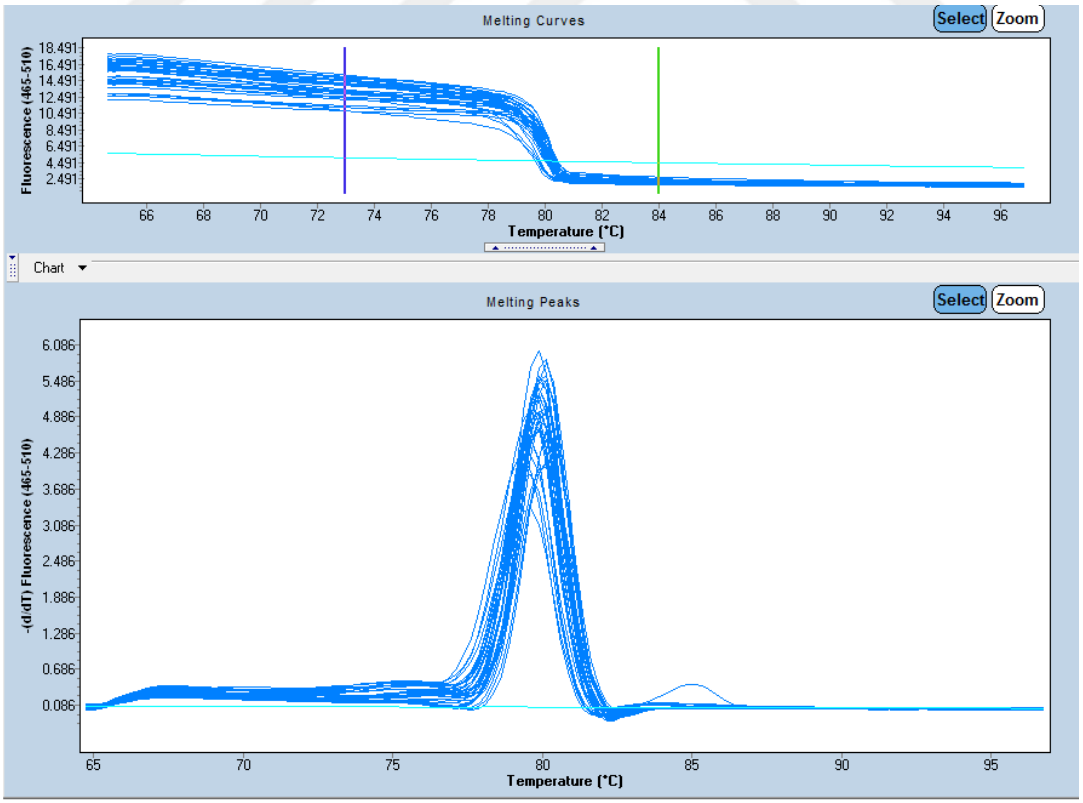


c)

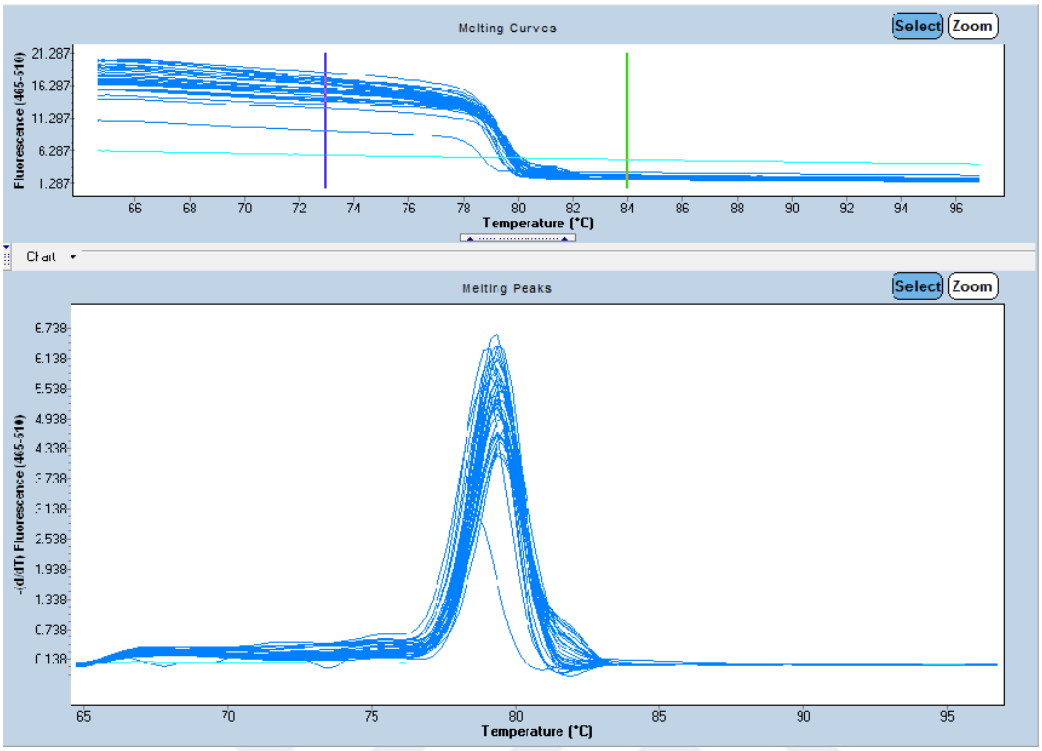


Şekil 4. 8: IL1B (a), HMGB1 (b) ve SCN3A (c) qRT-PCR Amplifikasyon Eğrisi

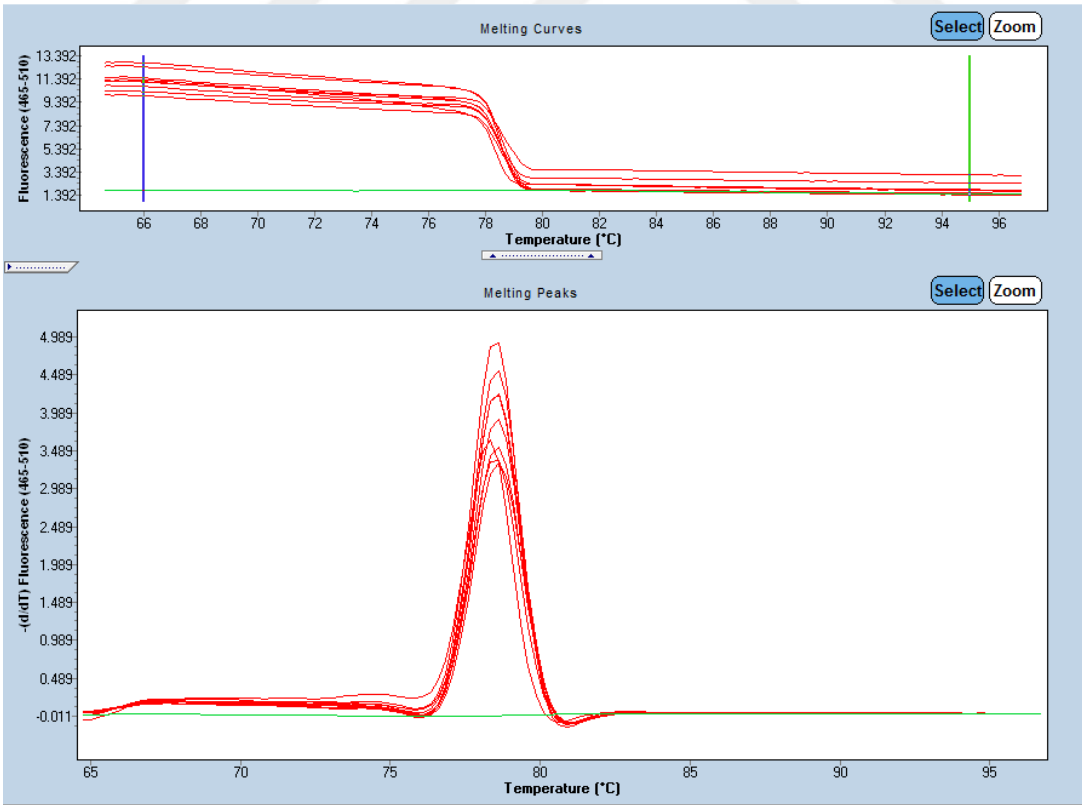
a)



b)



c)



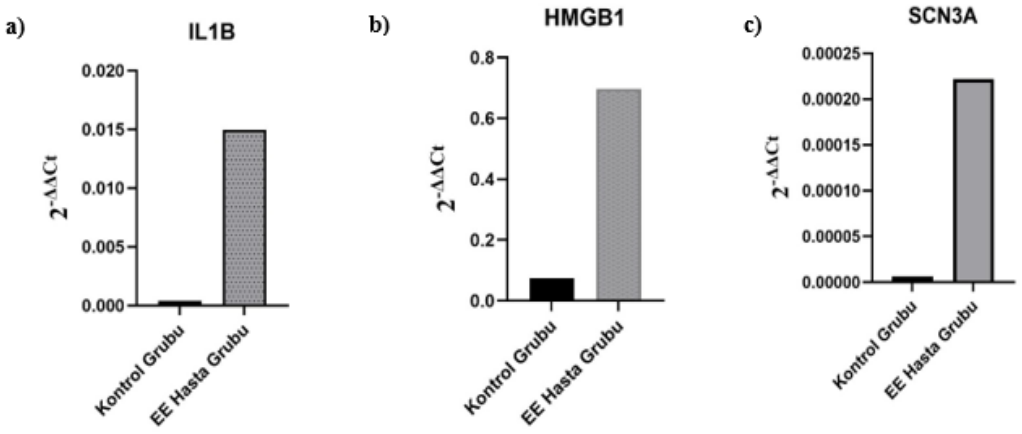
Şekil 4. 9: IL1B (a), HMGB1 (b) ve SCN3A (c) qRT-PCR Melting Curves ve Melting Peaks

Gruplar arasındaki gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması sonucu miR-34c-5p'nin hedef geni IL1B ekspresyon düzeyinde anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir (p: 0.046050). Diğer bir hedef gen olan HMGB1'in ekspresyon seviyesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (p: 0.249738). miR-335-5p'nin hedef geni SCN3A'ın ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p: 0.109532) (Tablo 4.3).

Tablo 4. 4: Epileptik Ensefalopati hastalarında mRNA Ekspresyonu Kat Değişimi

	Kat Değişimi	**p Değeri**
IL1B	38.55	0.046050*
HMGB1	9.42	0.249738
SCN3A	37.10	0.109532

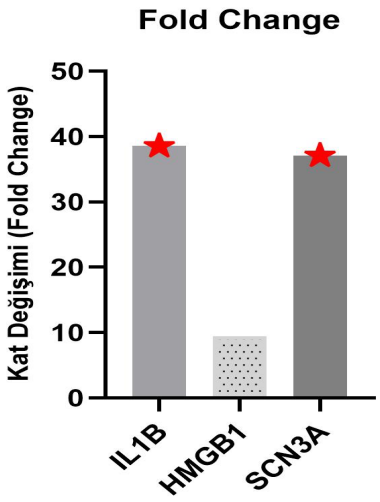
Çalışmada incelenen IL1B, HMGB1 ve SCN3A'nın 2^-ΔΔCt değerleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 10a, 10b ve 10c).



Şekil 4. 10: IL1B (a), HMGB1 (b) ve SCN3A (c) ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

IL1B, HMGB1 ve SCN3A'nın hasta ve kontrol grupları arasındaki relatif kat değişimleri Şekil 4.11'de birlikte gösterilmiştir. Fold change analizinde gruplar arasında

IL1B ve SCN3A için istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmiştir. HMGB1'de kat değişimi olsa da anlamlı bir düzeyde değildir.



Şekil 4. 11: IL1B, HMGB1 ve SCN3A'nın relatif kat değişimlerinin (fold change) hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Bugüne kadar epileptik ensefalopatilerden sorumlu çok sayıda genetik varyant tanımlanmıştır. Epileptik nöbetlere karşı artan duyarlılığın bilişsel bozulmayla ilişkili olduğu da bilinmektedir. Literatürde hem epilepsinin hem de gelişimsel ensefalopatinin bilinen genetik varyantların semptomları olduğu yönünde veriler yer alır. Dolayısıyla, mutasyona uğramış gen, beynin anormal işleyişini ve ardından hem ensefalopatiyi hem de epileptogenezi yönetir. Günümüzde hem gelişimsel ensefalopati hem de epilepsiyle ilişkili çok sayıda miRNAnın patogenezde farklı fonksiyonlarla rol alabildiğini ve epileptik ensefalopatiler için birer biyobelirteç olarak kullanılabilir olduğunu ifade eden çalışmalar vardır ve hala devam etmektedir.

Buradan hareketle yapılan bu çalışmada miR-335-5p, miR-34c-5p ve miR-324-5p'nin hasta ve kontrol gruplarındaki ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiş ve miR-335-5p'de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasta grubunda yukarı yönlü bir eğilim gözlenmiştir. Bu bulgu, Heiland vd. (2023) tarafından bildirilen ve tedaviye dirençli epilepsi hastalarının plazmasında miR-335-5p düzeylerinin arttığını gösteren sonuçlarla uyumludur. Bununla birlikte, aynı çalışmada hayvan modellerinde ve rezeksiyon materyallerinde miR-335-5p'nin hipokampal dokuda azaldığı, ancak kanda arttığı vurgulanmıştır. Çalışmamızın plazma/kan temelli analiz olması nedeniyle hasta grubunda gözlenen artış eğilimi, Heiland ve arkadaşlarının insan plazmasında bildirdiği yönelimle tutarlılık göstermektedir. Ayrıca ilgili çalışmada miR-335-5p'nin voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC) ekspresyonunu baskıladığı ve modülasyonunun nöbet şiddetini etkilediği gösterilmiştir. Hasta grubumuzda miR-335-5p artış eğiliminin, nöro inflamasyon ve iyon kanalı düzenlenmesine ilişkin kompansatuar bir yanıtı yansıtabileceği düşünülmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmamızdaki miR-335-5p eğilimi literatürdeki plazma kaynaklı bulgularla uyumlu olup, epileptik ensefalopatilerde periferik miRNA profillerinin klinik ve biyolojik önemine işaret etmektedir.

miR-34c-5p düzeyleri epileptik ensefalopati hastalarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemekle birlikte, genel olarak hafif bir artış eğilimi saptanmıştır. Bu bulgu, Fu vd. (2020) tarafından yayımlanan çalışmadan bazı yönleriyle ayrışmaktadır. Fu ve arkadaşları hem insan serumunda hem de hayvan modellerinde miR-34c-5p'nin ilaç-dirençli epilepsi olgularında belirgin şekilde azaldığını ve bu azalmanın HMGB1 ve IL1B düzeylerinde artışla birlikte nöro inflamasyonu

artırdığını bildirmiştir. Ayrıca aynı çalışmada miR-34c-5p düşüklüğünün HMGB1'i doğrudan hedeflediği ve hedef gen ekspresyonundaki artışın epileptogenezde nöronal kaybı kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Bizim verilerimizde miR-34c-5p'de artış eğilimi görülmesi, çalışmamızın hasta grubunun farklılık göstermesi, örnek tipinin hippokampal doku yerine periferik kan/plazma olması ve klinik heterojenitenin daha yüksek olması gibi metodolojik ve klinik farklılıklarla açıklanabilir. Buna rağmen, HMGB1 ve IL-1B'nın nöro inflamasyon ve epileptogenezde kritik rol oynadığı yönündeki literatür bilgisi düşünüldüğünde, miR-34c-5p'nin periferik düzeylerindeki değişikliklerin hastalık şiddeti veya inflamatuvar yanıtla ilişkili olabileceği değerlendirilebilir. Dolayısıyla çalışmamız, Fu vd. (2020)' nin tanımladığı mekanizma ile tam uyum göstermese de miR-34c-5p'nin epilepsi patofizyolojisindeki rolünü destekleyen ve bu miRNA'nın klinik alt gruplar arasında farklı davranabileceğine işaret eden tamamlayıcı veriler sunmaktadır (19).

Çalışmamızda miR-324-5p ekspresyonunun epileptik ensefalopati hastaları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği bulunmuştur. Ancak literatürde, özellikle Gross vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, miR-324-5p'nin nöbet başlangıcında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, status epileptikusun hemen ardından miR-324-5p düzeylerinin hızla yükseldiğini, bunun sonucunda Kv4.2 (KCND2) mRNA'sının RISC kompleksine çekilerek susturulduğunu ve Kv4.2 proteininin belirgin şekilde azaldığını bildirmiştir (80). Kv4.2'nin nöronal uyarılabilirliği azaltan A-tip potasyum akımının ana düzenleyicisi olması nedeniyle, miR-324-5p aracılı bu baskılanma nöbet eşiğinin düşmesine ve epileptik aktivitenin kolaylaşmasına katkıda bulunmaktadır. Aynı çalışmada miR-324-5p'nin antagonize edilmesinin hem nöroprotektif etki oluşturduğu hem de kainik asit ile indüklenen nöbet başlangıcını geciktirdiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda miR-324-5p düzeylerinde anlamlı bir artış saptanmaması, örneklerin periferik kandan elde edilmesi, zamanlamanın akut nöbet döneminden uzak olması ve hasta grubunun klinik heterojenliği gibi faktörlerle ilişkili olabilir. Bununla birlikte literatürde tanımlanan mekanizmalar, miR-324-5p'nin epilepside iyon kanal regülasyonu ve nöronal uyarılabilirlik üzerinde önemli bir modülatör olarak işlev görebileceğini desteklemektedir.

Literatürde miRNA- mRNA eksenindeki dengesizliklerin epileptik ensefalopati patofizyolojisinde kritik rol oynadığı bildirilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, miRNA

düzeylerine ek olarak miRNA'ların hedeflediği mRNA'ların ekspresyon profilleri de analiz edilmiştir. Bu kapsamda, çalışmamızda IL1B, HMGB1 ve SCN3A genlerinin gruplar arasındaki gen ekspresyonu seviyeleri karşılaştırılmıştır ve miR-34c-5p'nin hedef geni IL1B ekspresyon düzeyinde anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum Epileptik Ensefalopatide inflamatuvar yanıtın önemli ölçüde etkilendiğini göstermektedir. Bu bulgu, literatürde IL1B'nin nöbet oluşumu ve nöronal hiperaktivite üzerindeki belirleyici rolünü gösteren çalışmalarla uyumludur. Galbanik asitin nöbetler üzerindeki etkilerini inceleyen bir araştırma, Pentilentetrazol (PTZ) ile nöbet indüklenen NMRI farelerinde Galbanik asitin (GA) etkisini belirlemeyi amaçlamıştır (81). Deneyde, farelerin kan örnekleri alındıktan ve dekapitasyon sonrası hipokampus izole edildikten sonra, bu bölgede IL-1B, TNF-α ve TLR4 genlerinin ekspresyonu ölçülmüştür. Galbanik asit enjeksiyonu, kontrol grubuna kıyasla beyin dokusunda IL1B genlerinin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. GA'nın, nitrit seviyelerini ve TNF-α, IL1B ve TLR4 genlerinin ekspresyonunu azaltarak beyindeki inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı ve bunun sonucunda PTZ enjeksiyonunu takiben nöbet başlangıcının gecikmesine yol açtığı öne sürülmüştür. Çalışmamızda IL1B ekspresyonunda gözlenen değişiklikler, epileptogenezde miR-34c-5p ve IL1B ilişkisinin potansiyel bir düzenleyici mekanizma olarak rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda miR-34c-5p'nin diğer bir hedef geni olan HMGB1'in ekspresyonunun epileptik ensefalopati hastaları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği bulunmuştur. Fakat literatürde HMGB1'in bazı epilepsi türlerinde belirgin şekilde aktivasyonun yüksek olduğu bilgisi mevcuttur. Rasmussen ensefaliti üzerine yapılan bir çalışmada, rezeke edilen epileptik kortikal dokularda HMGB1, TLR2, TLR4 ve RAGE ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (82). Bu bulgular, RE lezyonlarında HMGB1 ve ilgili reseptörlerinin (TLR2, TLR4, RAGE) aktivasyonunu içeren kronik bir inflamatuar durumun varlığına dair kanıtlar sunmaktadır. HMGB1 ve karşılık gelen reseptörlerinin epilepsi dokusunda yukarı regüle edilmesi, bu yolun RE'de nöbetlerin oluşumunda ve muhtemelen epileptogenezin kendisinde bir rol oynadığını desteklemektedir. Bu sonuçlar, HMGB1-TLRs-RAGE eksenini hedef alan anti-inflamatuar ajanların, RE ile ilişkili epilepsinin tedavisi için yeni adaylar olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu yolun hedeflenmesi, kronik epilepsi ile ilişkili bilişsel işlev bozukluğu gibi komorbiditeleri de hafifletmeye yardımcı olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında epileptik ensefalopati hastalarında miR-34c-5p, miR-324-5p ve miR-335-5p'nin periferik ekspresyon düzeyleri ile bu miRNA'ların hedeflediği HMGB1, IL1B ve SCN3A genlerinin mRNA düzeyleri değerlendirilmiştir. miRNA analizlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamış olmakla birlikte, miR-34c-5p ve miR-335-5p'nin hasta grubunda artış eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. miR-324-5p düzeylerinin ise her iki grupta benzer olduğu görülmüştür. Hedef gen analizlerinde IL1B ekspresyonunun hasta grubunda anlamlı düzeyde arttığı (38.55 kat; p=0.046), HMGB1 geninde ise 9.42 katlık bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı ortaya konmuştur. SCN3A geninde 37.10 katlık bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p: 0.109532). Bu bulgular, epileptik ensefalopatilerde periferik inflamatuvar yanıtın özellikle IL1B üzerinden belirginleşebileceğini; miRNA düzeylerinin ise hastalığın klinik özellikleri ve örnek türüne bağlı olarak heterojen bir düzenlenim gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca hasta ve kontrol sayısının artırılması, özellikle istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmayan ancak biyolojik açıdan artış eğilimi gösteren miRNA'larda gerçek farkların daha net ortaya konulmasına katkı sağlayabilir.

Bu sonuçlara dayanarak gelecekte daha geniş ve homojen örneklemle yapılacak çalışmaların bulguların doğrulanmasına katkı sağlayacağı; IL1B'deki anlamlı artışın nöbet sıklığı, EEG bulguları ve klinik şiddet gibi parametrelerle ilişkilendirilerek klinik anlamının değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Periferik kan örneklerinin sınırlılıkları göz önüne alındığında, BOS veya cerrahi rezeksiyon materyallerinin incelendiği çalışmalar biyolojik yorumları güçlendirebilir. Ayrıca miRNA–mRNA eksenindeki ilişkilerin ortaya konulabilmesi için hücre kültürü ve hayvan modellerinde yapılacak fonksiyonel doğrulama deneylerine ihtiyaç vardır. IL1B, HMGB1 ve diğer inflamatuvar belirteçlerin birlikte değerlendirileceği çoklu biyobelirteç panellerinin epileptik ensefalopatilerde tanısal ve prognostik değeri artırabileceği öngörülmektedir. Bunun yanında hastalık heterojenitesi göz önüne alınarak genetik varyantlar, nöbet tipi, başlangıç yaşı ve ilaç yanıtına göre alt grup analizlerinin yapılması, moleküler sonuçların klinik anlamının daha net ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ma X, Wang Z, Niu Y, Zhao J, Wang X, Wang X, et al. Stem cell repair strategies for epilepsy. *Neural Regen Res* 2026;21(4):1428–1446.
2. Su K, Ma Y, Zhou M, Liu Y, Li C, Jiang Y, et al. De novo missense variants of UNC13A are implicated in epileptic encephalopathies and neurodevelopmental disorders. *Genes Dis* 2025;12(2):1–5.
3. Cavirani B, Spagnoli C, Caraffi SG, Cavalli A, Cesaroni CA, Cutillo G, et al. Genetic Epilepsies and Developmental Epileptic Encephalopathies with Early Onset: A Multicenter Study. *Int J Mol Sci* 2024;25(2). doi:10.3390/ijms25021248.
4. Costa EM de A da Silva BM, Thomazin IM, Porto IO, Pereira CU, Rabelo NN, et al. Epilepsy in childhood: an update on management. *Archives of Pediatric Neurosurgery* 2023;5(1): e1582023.
5. Su Z, Lu J, Shi Y, Qi B, Guo Z. Global, regional, and national children and adolescent epilepsy burden, 1990–2021: an analysis based on the global burden of disease study 2021. *Ann Med* 2025;57(1):2534087.
6. Helbig I, von Deimling M, Marsh ED. Epileptic encephalopathies as neurodegenerative disorders. In: *Advances in Neurobiology*.Vol 15.; 2017:295–315.
7. Mao M, Jancovski N, Kushner Y, Teasdale L, Truong P, Zhou K, et al. Developmental dysfunction in a preclinical model of Kcnq2 developmental and epileptic encephalopathy. *Neurobiol Dis* 2025;205(September 2024). doi: 10.1016/j.nbd.2024.106782.
8. Guerrini R, Conti V. Epileptic encephalopathies and progressive neurodegeneration. *Rev Neurol (Paris)* 2024;180(5):363–367.
9. Capovilla G, Wolf P, Beccaria F, Avanzini G. The history of the concept of epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 2013;54(SUPPL.8):2–5.
10. Scheffer IE, Zuberi S, Mefford HC, Guerrini R, McTague A. Developmental and epileptic encephalopathies. *Nat Rev Dis Primers* 2024;10(1). doi:10.1038/s41572-024-00546-6.
11. Bernardo P, Cuccurullo C, Rubino M, De Vita G, Terrone G, Bilo L, et al. X-Linked Epilepsies: A Narrative Review. *Int J Mol Sci* 2024;25(7). doi:10.3390/ijms25074110.
12. Rizvi S, Raza ST, Mahdi F. Genetic modifiers of epilepsy: A narrative review. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2025:104038.
13. Syrbe S. Developmental and epileptic encephalopathies- Therapeutic consequences of genetic testing. *Medizinische Genetik* 2022;34(3):215–224.
14. Shomer I, Mor N, Raviv S, Budick-Harmelin N, Matchevich T, Avkin-Nachum S, et al. Personalized allele-specific antisense oligonucleotides for GNAO1-neurodevelopmental disorder. *Mol Ther Nucleic Acids* 2025;36(1):102432.
15. Burbano LE, Li M, Jancovski N, Jafar-Nejad P, Richards K, Sedo A, et al. Antisense oligonucleotide therapy for KCNT1 encephalopathy. *JCI Insight* 2022;7(23):1–19.
16. Wang Q, Shi X, Li PP, Gao L, Zhou Y, Li L, et al. microRNA profilings identify plasma biomarkers and targets associated with pediatric epilepsy patients. *Pediatr Res* 2024;95(4):996–1008.
17. Ünalp A, Coskunpinar E, Gunduz K, Pekuz S, Baysal BT, Edizer S, et al. Detection of Deregulated miRNAs in Childhood Epileptic Encephalopathies. *Journal of Molecular Neuroscience* 2022;72(6):1234–1242.
18. Zhang M, Han Y. MicroRNAs in chronic pediatric diseases (Review). *Exp Ther Med* 2024;27(3):1–8.
19. Fu M, Tao J, Wang D, Zhang Z, Wang X, Ji Y, et al. Downregulation of MicroRNA-34c-5p facilitated neuroinflammation in drug-resistant epilepsy. *Brain Res* 2020;1749(September):147130.
20. Martinez B, Peplow P V. MicroRNAs as potential biomarkers in temporal lobe epilepsy and mesial temporal lobe epilepsy. *Neural Regen Res* 2023;18(4):716–726.

21. Tu L, Long X, Song W, Lv Z, Zeng H, Wang T, et al. MiR-34c acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by inducing endoplasmic reticulum stress through targeting HMGB1. *Onco Targets Ther* 2019;12:5729–5739.
22. Heiland M, Connolly NMC, Mamad O, Nguyen NT, Kesavan JC, Langa E, et al. MicroRNA-335-5p suppresses voltage-gated sodium channel expression and may be a target for seizure control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023;120(30). doi:10.1073/pnas.2216658120.
23. Tiwari D, Brager DH, Rymer JK, Bunk AT, White AR, Elsayed NA, et al. MicroRNA inhibition upregulates hippocampal A-type potassium current and reduces seizure frequency in a mouse model of epilepsy. *Neurobiol Dis* 2019; 130:104508.
24. Esmaeeli Nieh S, Sherr EH. Epileptic Encephalopathies: New Genes and New Pathways. *Neurotherapeutics* 2014;11(4):796–806.
25. Kobayashi K, Shibata T, Tsuchiya H, Akiyama M, Akiyama T. Hypotheses of pathophysiological mechanisms in epileptic encephalopathies: A review. *Brain Dev* 2025;47(1):104318.
26. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55(4):475–482.
27. Kaculini CM, Tate-Looney AJ, Seifi A. The History of Epilepsy: From Ancient Mystery to Modern Misconception. *Cureus* 2021;13(3). doi:10.7759/cureus.13953.
28. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017;58(4):512–521.
29. Falco-Walter J. Epilepsy-Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Semin Neurol* 2020;40(6):617–623.
30. Poke G, Stanley J, Scheffer IE, Sadleir LG. Epidemiology of Developmental and Epileptic Encephalopathy and of Intellectual Disability and Epilepsy in Children. *Neurology* 2023;100(13): E1363–E1375.
31. McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol* 2016;15(3):304–316.
32. Hill SF, Ziobro JM, Meisler MH. Genetic interaction between Scn8a and potassium channel genes Kcna1 and Kcnq2. 2022;(May):125–131.
33. Vetro A, Nielsen HN, Holm R, Hevner RF, Parrini E, Powis Z, et al. ATP1A2- and ATP1A3- associated early profound epileptic encephalopathy and polymicrogyria. 2021. doi:10.1093/brain/awab052.
34. Vetro A, Pelorosso C, Balestrini S, Matsumoto N, Ratto GM, Guerrini R, et al. Stretch-activated ion channel TMEM63B associates with developmental and epileptic encephalopathies and progressive neurodegeneration Authors ARTICLE Stretch-activated ion channel TMEM63B associates with developmental and epileptic encephalopathies and pro. :1356–1376.
35. Møller RS, Liebmann N, Larsen LHG, Stiller M, Hentschel J, Kako N, et al. Parental mosaicism in epilepsies due to alleged de novo variants. *Epilepsia* 2019;60(6): e63–e66.
36. Karaoğlu P, Yiş U, Polat Aİ, Ayanoğlu M, Hiz S. Clinical predictors of drug-resistant epilepsy in children. *Turk J Med Sci* 2021;51(3):1249–1252.
37. Ohtahara S, Yamatogi Y. Ohtahara syndrome: With special reference to its developmental aspects for differentiating from early myoclonic encephalopathy. *Epilepsy Res* 2006;70(SUPPL.1):58–67.
38. Yamatogi Y, Ohtahara S. Early-infantile epileptic encephalopathy with suppression-bursts, Ohtahara syndrome; its overview referring to our 16 cases. *Brain Dev* 2002;24(1):13–23.
39. Fusco L, Pachatz C, Di Capua M, Vigevano F. Video/EEG aspects of early-infantile epileptic encephalopathy with suppression-bursts (Ohtahara syndrome). *Brain Dev* 2001;23(7):708–714.
40. Pavone P, Spalice A, Polizzi A, Parisi P, Ruggieri M. Ohtahara syndrome with emphasis on recent genetic discovery. *Brain Dev* 2012;34(6):459–468.

41. Khan S, Al Baradie R. Epileptic Encephalopathies: An Overview. *Epilepsy Res Treat* 2012; 2012:1–8.
42. Bernardina BD, Dulac O, Fejerman N, Dravet C, Capovilla G, Bondavalli S, et al. Early myoclonic epileptic encephalopathy (E.M.E.E.). *Eur J Pediatr* 1983;140(3):248–252.
43. Spoto G, Saia MC, Amore G, Gitto E, Loddo G, Mainieri G, et al. Neonatal Seizures: An Overview of Genetic Causes and Treatment Options. *Brain Sci* 2021;11(10). doi:10.3390/BRAINSCI11101295.
44. Saemundsen E, Ludvigsson P, Rafnsson V. Risk of autism spectrum disorders after infantile spasms: a population-based study nested in a cohort with seizures in the first year of life. *Epilepsia* 2008;49(11):1865–1870.
45. Vigevano F, Fusco L, Cusmai R, Claps D, Ricci S, Milani L. The idiopathic form of West syndrome. *Epilepsia* 1993;34(4):743–746.
46. Pavone P, Polizzi A, Marino SD, Corsello G, Falsaperla R, Marino S, et al. West syndrome: a comprehensive review. *Neurol Sci* 2020;41(12):3547–3562.
47. Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia* 2011;52 Suppl 2(SUPPL. 2):3–9.
48. Esterhuizen AI, Mefford HC, Ramesar RS, Wang S, Carvill GL, Wilmshurst JM. Dravet syndrome in South African infants: Tools for an early diagnosis. *Seizure* 2018; 62:99–105.
49. Anwar A, Saleem S, Patel UK, Arumaithurai K, Malik P. Dravet Syndrome: An Overview. *Cureus* 2019;11(6). doi:10.7759/CUREUS.5006.
50. Mei D, Cetica V, Marini C, Guerrini R. Dravet syndrome as part of the clinical and genetic spectrum of sodium channel epilepsies and encephalopathies. *Epilepsia* 2019;60 Suppl 3(S3):S2–S7.
51. Landau WM, Kleffner FR. Syndrome of acquired aphasia with convulsive disorder in children. *Neurology* 1957;7(8):523–530.
52. Asadi-Pooya AA, Sharifzade M. Lennox-Gastaut syndrome in south Iran: Electro-clinical manifestations. *Seizure* 2012;21(10):760–763.
53. Camfield PR. Definition and natural history of Lennox-Gastaut syndrome. *Epilepsia* 2011;52 Suppl 5(SUPPL. 5):3–9.
54. Riva A, D'Onofrio G, Amadori E, Arzimanoglou A, Auvin S, Bagnasco I, et al. Lennox–Gastaut syndrome unveiled: Advancing diagnosis, therapies, and advocacy-insights from the Genoa International Workshop. *Epilepsia* 2025. doi:10.1111/EPI.18696.
55. Su Z, Li Y, Chen S, Liu X, Zhao K, Peng Y, et al. Identification of Ion Channel-Related Genes and miRNA-mRNA Networks in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Front Genet* 2022; 13:853529.
56. Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, Denti MA. Circulating miRNAs as Biomarkers for Neurodegenerative Disorders. *Molecules 2014, Vol. 19, Pages 6891-6910* 2014;19(5):6891–6910.
57. https://www.mirbase.org/browse/results/?organism=hsa (Erişim tarihi: 27.11.2025)
58. Brennan GP, Henshall DC. MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. Nature Reviews Neurology 2020 16:9 2020;16(9):506–519.
59. Xie G, Chen H, He C, Hu S, Xiao X, Luo Q. The dysregulation of miRNAs in epilepsy and their regulatory role in inflammation and apoptosis. *Functional & Integrative Genomics 2023 23:3* 2023;23(3):287-.
60. Li S, Lei Z, Sun T. The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: a review. *Cell Biology and Toxicology 2022 39:1* 2022;39(1):53–83.
61. Khemka N, Morris G, Kazemzadeh L, Costard LS, Neubert V, Bauer S, et al. Integrative network analysis of miRNA-mRNA expression profiles during epileptogenesis in rats reveals therapeutic targets after emergence of first spontaneous seizure. *Scientific Reports 2024 14:1* 2024;14(1):15313-.
62. Gross C, Tiwari D. Regulation of Ion Channels by MicroRNAs and the Implication for Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2018;18(9):60-.
63. Bofill-De Ros X, Vang Ørom UA. Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biol* 2024;21(1):1–8.

64. Leitão AL, Enguita FJ. A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-coding RNA* 2022;8(1):10.
65. Xie G, Chen H, He C, Hu S, Xiao X, Luo Q. The dysregulation of miRNAs in epilepsy and their regulatory role in inflammation and apoptosis. *Functional & Integrative Genomics 2023 23:3* 2023;23(3):287-.
66. Gross C, McGann AM, Tiwari D. How Soon is Soon Enough? Consideration of Timing and Disease Etiology for microRNAs in Epilepsy. *Epilepsy Currents* 2025. doi:10.1177/15357597251366441
67. Brennan GP, Henshall DC. microRNAs in the pathophysiology of epilepsy. *Neuroscience Letters* 2018; 667:47–52.
68. Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, McKiernan RC, Tanaka K, Mouri G, et al. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nature medicine* 2012;18(7):1087.
69. Mu C, Gao M, Xu W, Sun X, Chen T, Xu H, et al. Mechanisms of microRNA-132 in central neurodegenerative diseases: A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2024;170. doi: 10.1016/j.biopha.2023.116029.
70. Kadkhoda S, Hussen BM, Eslami S, Ghafouri-Fard S. A review on the role of miRNA-324 in various diseases. *Frontiers in Genetics* 2022; 13:950162.
71. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR324&keywords=miR-324
72. Parkins E V., Brager DH, Rymer JK, Burwinkel JM, Rojas D, Tiwari D, et al. Mir324 knockout regulates the structure of dendritic spines and impairs hippocampal long-term potentiation. *Scientific Reports 2023 13:1* 2023;13(1):21919-.
73. Hayman DJ, Modebadze T, Charlton S, Cheung K, Soul J, Lin H, et al. Increased hippocampal excitability in miR-324-null mice. *Scientific Reports 2021 11:1* 2021;11(1):10452-.
74. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR34C(Erişim tarihi: 24.11.2025)
75. Bohosova J, Vajcner J, Jabandziev P, Oslejskova H, Slaby O, Aulicka S. MicroRNAs in the development of resistance to antiseizure drugs and their potential as biomarkers in pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 2021;62(11):2573–2588.
76. Ghafouri-Fard S, Hussen BM, Abak A, Taheri M, Jalili Khoshnoud R. Aberrant expression of miRNAs in epilepsy. *Molecular Biology Reports 2022 49:6* 2022;49(6):5057–5074.
77. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR335 (Erişim tarihi: 24.11.2025
78. Zhang X, Ma Y, Zhou F, Zhang M, Zhao D, Wang X, et al. Identification of miRNA–mRNA regulatory network associated with the glutamatergic system in post-traumatic epilepsy rats. *Frontiers in Neurology* 2022; 13:1102672.
79. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* 2001;25(4):402–408.
80. Gross, C., Yao, X., Engel, T., Tiwari, D., Xing, L., Rowley, S., Danielson, S. W., Thomas, K. T., Jimenez-Mateos, E. M., Schroeder, L. M., Pun, R. Y. K., Danzer, S. C., Henshall, D. C., & Bassell, G. J. (2016). MicroRNA-Mediated Downregulation of the Potassium Channel Kv4.2 Contributes to Seizure Onset. Cell reports, 17(1), 37–45.
81. Asgharzadeh, N., Ghavamnia, S., Amini-Khoei, H., Lorigooini, Z., Mardani, M., Bijad, E., Shahrani, D., Shahrani, M., & Korrani, M. S. (2025). Galbanic acid delays the development of seizures by modulating the expression of TNFα, IL1β, and TLR4 genes and reducing hippocampal nitrite levels and may be useful in the treatment of epilepsy. Neuroscience letters, 853, 138200.
82. Luan, G., Gao, Q., Zhai, F., Chen, Y., & Li, T. (2016). Upregulation of HMGB1, toll-like receptor and RAGE in human Rasmussen's encephalitis. Epilepsy research, 123, 36–49.