T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

WAG/Rij SIÇANLARDA *Ginkgo biloba*'nın NÖRONAL EKSİTABİLİTE ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN *In Vitro* KALSİYUM GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Metehan AKÇA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM

Fizyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Fizyoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

EYLÜL 2020

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

10.09.2020

Metehan AKÇA

ÖZET

WAG/Rij Sıçanlarda *Ginkgo biloba*'nın Nöronal Eksitabilite Üzerindeki Etkilerinin *in vitro* Kalsiyum Görüntüleme Yöntemi ile İncelenmesi

Amaç: Epilepsi nöronların aşırı ve senkron uyarılması ile gelişen nöbetlerle karakterize yaygın nörolojik bir hastalıktır. *Ginkgo biloba* bitkisinin standardize özütü olan EGb 761 demans, dikkat eksikliği ve vertigo gibi sinir sistemi rahatsızlıklarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde EGb 761'in prokonvulsan bir etkiye sahip olabileceğine ilişkin yayınlar bulunmaktadır. Sunulan doktora tezinde, genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761 ve onun etken bileşenleri olan ginkgolid A, B, C ve bilobalidin nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkilerinin hücre içi kalsiyum değişimi üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak, EGb 761 ve etken bileşenleri ile ilişkili hücre içi kalsiyum yanıtında voltaj-kapılı kalsiyum kanalları ve iyonotropik glutamat reseptörlerinin rolü araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Deneylerde WAG/Rij ve onun köken aldığı Wistar sıçanlardan (P_{0-4}) elde edilen kortikal nöron kültürü kullanıldı. Hücre içi kalsiyum seviyesine ilişkin ölçümler Fluo-4 kalsiyum indikatör boyası kullanılarak SD konfokal mikroskop altında gerçekleştirildi. Kültürdeki nöronları uyarmak için 30 mM KCl ve 100 µM glutamat kullanıldı.

Bulgular: WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültürüne uygulanan EGb 761'in 200 µg/ml dozu hücre içi kalsiyum seviyesini arttırdı. EGb 761'in etken bileşenlerinden ginkgolid B de 10 ve 100 µM dozlarda hücre içi kalsiyum artışına yol açtı. Kortikal nöron kültürüne nikardipin, mibefradil ve dantrolen uygulanması ginkgolid B'nin neden olduğu hücre içi kalsiyum artışını önledi.

Sonuçlar: WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761'in nöronal uyarılabilirlikte bir artışa neden olduğu ve bu artıştan ginkgolid B'nin sorumlu olduğu saptandı. Ayrıca ginkgolid B'nin L- ve T-tipi voltaj-kapılı kalsiyum kanalları ile riyanodin reseptörlerini kullanarak bu artışı sağladığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: EGb 761, kalsiyum görüntüleme, nöronal uyarılabilirlik, WAG/Rij sıçan

ABSTRACT

Investigation using *in vitro* Calcium Imaging Method of The Effects of *Ginkgo biloba* on Neuronal Excitability in WAG/Rij Rats

Aim: Epilepsy is a common neurological disease characterized by seizures that develop with excessive and synchronous stimulation of neurons. EGb 761, a standardized extract of the Ginkgo biloba plant, is widely used in nervous system disorders such as dementia, attention deficit and vertigo. In the literature, there are publications stating that EGb 761 may have a proconvulsant effect. In the presented PhD thesis, it was aimed to investigate the effects of EGb 761 and its active components ginkgolide A, B, C and bilobalid on neuronal excitability in cortical neuron culture obtained from WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy through intracellular calcium change. For this purpose, the role of voltage-gated calcium channels and ionotropic glutamate receptors in the intracellular calcium response associated with EGb 761 and its components was investigated using the calcium imaging method.

Material and Methods: The cortical neuron culture obtained from WAG/Rij and Wistar rats (P_{0-4}) was used in the experiments. Measurements of intracellular calcium level were carried out under SD confocal microscope using Fluo-4 calcium indicator dye. 30 mM KCl and 100 μM glutamate were used to stimulate neurons in the culture.

Results: 200 μg/ml dose of EGb 761 applied to WAG/Rij rat cortical neuron culture increased the intracellular calcium level. Ginkgolide B, one of the active components of EGb 761, also caused an increase in intracellular calcium at 10 and 100 μM doses. Administration of nicardipine, mibefradil and dantrolene to cortical neuron culture prevented the intracellular calcium increase caused by ginkgolide B.

Conclusion: It was determined that EGb 761 caused an increased excitability in cortical neuron culture obtained from WAG/Rij rats and ginkgolide B was responsible for this increase. It was also found that ginkgolide B provides this increase by using L- and T-type voltage-gated channels and ryanodine receptors.

Keywords: EGb 761, calcium imaging, neuronal excitability, WAG/Rij rat

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve imkanlarıyla yetişmemde büyük emek sahibi olan, bilimselliği ve akademik değerlere olan hassasiyetinden dolayı kendisini rol model olarak benimsediğim değerli hocam ve danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Doktora tezimdeki hücre kültürü ve kalsiyum görüntüleme çalışmalarında destek ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK, Dr. Öğr. Üyesi Neşe ALTUNCU'ya, Arş. Gör. Sadık BAY ve Arş. Gör. Gülsena BAYDAŞ'a şükranlarımı sunarım. Hayatımın her aşamasında sonsuz sevgi ve desteklerini hissettiğim sevgili aileme, hayatıma girdiği günden itibaren bana destek veren, her an arkamda olup pes edebileceğim durumlarda beni yüreklendiren en güzel nasibim sevgili eşim Dr. İmran İNCE AKÇA'ya sonsuz teşekkürler.

Bu doktora tez çalışmasını 1001-TÜBİTAK-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında 115S348 numaralı ve "*Absans epilepsinin WAG/Rij sıçan modelinde Ginkgo biloba'nın nöronal eksitabiliteye etkileri üzerine karşılaştırmalı bir araştırma: Bir in vivo elektrofizyolojik ve in vitro kalsiyum görüntüleme çalışması*" başlıklı proje ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Metehan AKÇA

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ŞEKİL LİSTESİ xx
TABLO LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ…… 1
2. GENEL BİLGİLER …… 5
2.1. *Ginkgo biloba* ……...5
2.1.1. *Ginkgo biloba* Yaprak Özütü: EGb 761 …… 6
2.1.2. Ginkgo biloba'nın Biyolojik Etkileri …… 7
2.1.2.1. EGb 761'in Nörolojik Etkileri ……..... 8
2.1.2.2. EGb 761'in Kan Akımı Üzerindeki Etkileri …….. 8
2.1.2.3. EGb 761'in Antiinflamatuar Etkisi ……..... 9
2.1.2.4. EGb 761'in Endokrin Sistem Üzerindeki Etkileri …….... 9
2.1.2.5. EGb 761'in Antioksidan Etkileri……...10
2.1.3. *Ginkgo biloba*'nın Metabolizması……10
2.1.4. *Ginkgo biloba*'nın Etki Mekanizmaları……11
2.2. Kalsiyum İyonu……. …… 12
2.2.1. Hücre İçi Kalsiyum Seviyesinin Düzenlenmesi…….. 13
2.2.1.1. Hücre Membranına Bağlı Düzenlenme ……13
2.2.1.1.1. Hücre Membranındaki Kalsiyum Pompaları ve Değiş-Tokuş Proteinleri……. 13
2.2.1.1.2. Hücre Membranındaki Kalsiyum Kanalları……... 14
2.2.1.2. Hücre Organellerine Bağlı Kalsiyum Düzenlenmesi…… 20
2.2.2. Kalsiyum Sinyalizasyonu……21
2.2.3. Kalsiyumun Fizyolojik İşlevleri…….. 22
2.2.4. Hücre İçi Kalsiyum Seviyesinin Tespiti……...24
2.3. Epilepsi…… 27
2.3.1. Epilepsinin Epidemiyolojisi……. 29
2.3.2. Epilepsinin Sınıflandırılması……29
2.3.2.1. Nöbetlerin Sınıflandırılması……..30
2.3.2.2. Epilepsilerin Sınıflandırılması……...32
2.3.2.3. Epilepsi Sendromları Sınıflandırılması…… 33
2.3.3. Epilepsinin Etiyolojisi……... 33
2.3.3.1. Yapısal Etiyoloji……34
2.3.3.2. Genetik Etiyolojiler……... 34
2.3.3.3. Enfeksiyöz Etiyolojiler……..35

2.3.3.4. Metabolik Etiyolojiler…….. 35
2.3.3.5. İmmünolojik Etiyolojiler……...35
2.3.3.6. Bilinmeyen Etiyolojiler…… 35
2.3.4. Epilepsinin Tanısı……35
2.3.5. Epilepsinin Tedavisi…… 36
2.3.5.1. Antiepileptik İlaç Tedavisi…… 36
2.3.5.2. Epilepsi Cerrahisi…….. 40
2.3.5.3. Nörostimülasyon Tedavisi…… 40
2.3.5.4. Diyet Terapisi……... 41
2.3.6. Deneysel Epilepsi Modelleri…… 41
2.3.7. Absans Epilepsi ve Genetik Absans Epilepsi Modelleri……..43
3. GEREÇ VE YÖNTEM …… 47
3.1. Deney Hayvanları ……...47
3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler…… 47
3.3. Deney Dizaynı ……48
3.4. Kortikal Nöron Kültürü ….……50
3.5. Kalsiyum Boyama …….. 51
3.6. Hücrelerin Floresan Işıma Değerlerinin Tespiti ……53
3.7. İstatistiksel Analiz ……... 54
4. BULGULAR …… 55
4.1. Wistar ve WAG/Rij Sıçanlardan Elde Edilen Kortikal Nöronlarda Uyarılabilirlik Düzeylerinin Karşılaştırılması …… 55
4.2. Wistar Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 Dozlarının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi ……55
4.3. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 Dozlarının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi …… 57
4.4. Wistar Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 Etken Bileşenleri ve Bunların Dozlarının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi ……...59
4.5. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 Etken Bileşenleri ve Bunların Dozlarının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi ……...62
4.6. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe Ginkgolid B'nin Sebep Olduğu Hücre içi Kalsiyum Seviyesindeki Artışa Aracılık Eden Kalsiyum Kanal Tipinin Belirlenmesi ……65
4.7. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 ve İyonotropik Glutamat Reseptörleriyle Etkileşiminin Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi …… 67
4.8. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe Ginkgolid B ve İyonotropik Glutamat Reseptörleriyle Etkileşiminin Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi …… 70
5. TARTIŞMA …….. 73
5.1. EGb 761'in Wistar ve WAG/Rij Sıçanların Kortikal Nöronlarında Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi ……..76

5.2. EGb 761 Etken Bileşenlerinin Wistar ve WAG/Rij Sıçanların Kortikal Nöronlarında Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi ……...…80
5.3. WAG/Rij Sıçanlardan Elde Edilen Kortikal Nöron Kültüründe Ginkgolid B'nin Neden Olduğu Hücre İçi Kalsiyum Seviyesindeki Artışa Aracılık Eden Kalsiyum Kaynağının Belirlenmesi …… 83
5.4. EGb 761 ve Ginkgolid B'nin Hücre İçi Kalsiyum Artışında İyonotropik Glutamat Reseptörleri ile İlişkisi ……...……... 86
6. SONUÇLAR…….. 89
7. KAYNAKLAR……..……..90
ETİK KURUL İZNİ…… 106
ÖZGEÇMİŞ……. 107

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. *Ginkgo biloba* ağacı ve bilimsel sınıflandırması……. 5

Şekil 2.2. Ginkgolidler ve bilobalidin kimyasal yapısı…… 7

Şekil 2.3. Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının yapısı……. 15

Şekil 2.4. ILAE tarafından 2017 yılında yapılan nöbet tiplerine ilişkin sınıflandırma……..31

Şekil 2.5. ILAE tarafından 2017 yılında yapılan epilepsi tiplerine ilişkin sınıflandırma…… 33

Şekil 3.1. KCI uyarımını kapsayan deney dizaynı ve iş akış diyagramı……....49

Şekil 3.2. Glutamat uyarımını kapsayan deney dizaynı ve iş akış diyagramı……49

Şekil 3.3. Primer kortikal nöron kültürü. Kültür işlemleri sonrasındaki görüntü…….. 52

Şekil 3.4. SD konfokal mikroskop ve kalsiyum görüntüleme sisteminden bir görüntü…… 53

Şekil 4.1. Wistar sıçan kortikal nöron kültürüne uygulanan EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri ….56

Şekil 4.2. Wistar sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri…….. 57

Şekil 4.3. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültürüne uygulanan EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri…..58

Şekil 4.4. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri……. 59

Şekil 4.5. Wistar sıçan kortikal nöron kültüründe uygulanan EGb 761 etken bileşenleri ve bunların dozlarının hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri……60

Şekil 4.6. Wistar sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761'in etken bileşenleri ve dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri……61

Şekil 4.7. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 etken bileşenlerinin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri….63

Şekil 4.8. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 etken bileşenlerinin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri ……... 64

Şekil 4.9. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe 10 µM ginkgolid B ve bazı kalsiyum kanal blokerlerinin etkileşimlerinin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri…….. 66

Şekil 4.10. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe 10 µM ginkgolid B ve kalsiyum kanal blokerlerinin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri…… 67

Şekil 4.11. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 ve Glutamaterjik sistem etkileşiminin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri ……... 68

Şekil 4.12. WAG/Rij sıçan nöron kültüründe EGb 761 ve iyonotropik glutamat reseptör etkileşiminin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri ……69

Şekil 4.13. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe ginkgolid B ve Glutamaterjik sistem etkileşiminin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri……71

Şekil 4.14. WAG/Rij sıçan nöron kültüründe ginkgolid B ve iyonotropik glutamat reseptör etkileşiminin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri…… 72

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. *Ginkgo biloba* yaprağında bulunan kimyasal maddeler……6

Tablo 2.2. Etki mekanizmalarına göre antiepileptik ilaçların sınıflandırılması…… 38

Tablo 2.3. Bazı deneysel epilepsi modelleri…… 42

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları…….47

Tablo 3.2. Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe yapılan çalışmalar ve bu çalışmalarda kullanılan deney grupları …… 49

Tablo 3.3. WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe yapılan çalışmalar ve bu çalışmalarda kullanılan deney grupları…….. 50

Tablo 4.1. Wistar ve WAG/Rij sıçanların kortikal nöron kültürlerinde bazal (kontrol) kayıt ve KCl uyarımına ilişkin hücre içi kalsiyum seviyeleri……..55

SİMGE ve KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AMPA	Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CaMK	Kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz
CCD	Yük bağlaşımlı aygıt (Charge-coupled device)
CREB	cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
DKKK	Depo kontrollü kalsiyum kanalları
EDRF	Endotelyal kaynaklı gevşetici faktör
EEG	Elektroensefalogram
EGb 761	Ginkgo biloba standardize özütü
FRET	Floreans rezonans enerji transferi
GEARS	Strasbourg kökenli genetik absans epilepsili sıçan
HBA	Hibernate A
ILAE	Uluslararası Epilepsiyle Mücadele Birliği
IP_3R	İnositol trifosfat reseptörü
MAPK	Ras/mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz
MSS	Merkezi sinir sistemi
NBA	Nörobazal A
NCD	Na^{+}/Ca^{+2} değiş-tokuş proteini
NMDA	N-metil-D-aspartat
PAF	Platelet aktive edici faktör
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PMCA	Plazma membranı Ca^{+2} ATPaz
PTZ	Pentilentetrazol
RKKK	Reseptör kontrollü kalsiyum kanalları
RyR	Riyanodin reseptörü
SD	Spinning disk
SUDEP	Epilepside ani beklenmedik ölüm
VKKK	Voltaj-kapılı kalsiyum kanalları
WAG/Rij	Wistar albino glaxo / Rijswijk sıçan

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ginkgo biloba yaprak özütü (EGb 761) antioksidan etkinlik, trombosit aktive edici faktörün engellenmesi, membran dinamiğindeki değişiklikler ve glukokortikoid sentezinin engellenmesini de kapsayan pek çok fizyolojik sürece etki etmektedir (1). EGb 761 nörotransmitter yolakları, iyon kanalları, transkripsiyonel faktörler ve nörovasküler fonksiyonlar gibi fizyolojik süreçler üzerinden sinir sistemini etkilemektedir (2, 3). EGb 761 içerikli ilaçlar özellikle organik beyin sendromuna bağlı gelişen unutkanlık, dikkat eksikliği, ruhsal uyum bozuklukları, baş dönmesi, baş ağrısı, kulak çınlaması gibi bazı nörolojik bozuklukların tedavisinde reçete edilmekte ve kullanılmaktadır (4, 5).

Nöronal uyarılabilirlik düzeyi sinir sistemindeki eksitatör ve inhibitör sistemler arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. Bu dengenin eksitatör sistemler lehine bozulması nöronlarda ani, aşırı ve senkronize deşarjları başlatarak epileptik nöbet oluşumuna yol açmaktadır (6). Epilepsi tekrarlayan nöbetlerle karakterize ve toplumun yaklaşık %1'lik bölümünü etkileyen yaygın nörolojik bir hastalıktır (7). Beyin travmaları, merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonları, beyinin damarsal bozuklukları, tümör, dejeneratif MSS hastalıkları ve febril konvulsiyonlar epilepsiye neden olan bazı patolojik durumlar arasında yer alsa da epilepsi vakalarının %70'inde herhangi bir sebep tespit edilememektedir. Epilepsi hastalarının 1/3'ünde nöbetlerin mevcut antiepileptik ilaçlar ile kontrol altına alınamaması, bazı nöbet tiplerinde hastalığa ilişkin oluşum mekanizmalarının henüz aydınlatılamamış olması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için deneysel epilepsi modellerinin kullanımını ve bu modeller üzerinde mekanizmayı aydınlatmaya ve daha etkili antiepileptik ilaç geliştirmeye yönelik çalışmaları zorunlu kılmaktadır (8, 9).

Daha öncesinde jeneralize nöbetler altında sınıflandırılan absans nöbetler, Uluslararası Epilepsiyle Mücadele Birliği'nin (ILAE) 2017 yılındaki yeni sınıflandırma algoritmasına göre jeneralize motor olmayan nöbet şeklinde kategorize edilmiştir (10). Absans nöbetler klinik olarak geçici bilinç kaybı, hareketsizlik, göz kırpma ve el-yüz otomatizmalarıyla karakterizedir (11). Absans epilepside görülen 3-4,5 Hz frekanslı ve 3 saniyeden daha uzun süreli diken-dalga kompleksleri ayırt edici iktal elektroensefalogram (EEG) bulgusu olarak kabul edilmektedir (12, 13).

Talamokortikal devrenin absans epilepsi oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (14). Absans epilepsiye ilişkin patogenezin aydınlatılması ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi süreçlerinde, diğer epilepsi tiplerinde olduğu gibi deneysel epilepsi modellerinin kullanımı oldukça önem arzetmektedir. Nöbetlerin oluşum mekanizması, EEG paternlerinin ve semptomların insandaki absans nöbetlere benzemesi nedeniyle Wistar albino glaxo / Rijswijk sıçan (WAG/Rij) ve Strasbourg kökenli genetik absans epilepsili sıçan (GEARS) ırkı genetik absans epilepsili sıçan modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır (15, 16).

Gerek ilaç olarak reçete edilen ve gerekse geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarında bitkisel tedavi alternatiflerinden biri şeklinde yoğun olarak kullanılan *Ginkgo biloba*'nın, birkaç klinik çalışmada epileptik nöbetlere yol açabileceği bildirilmiştir (17-20). Özellikle *Ginkgo biloba* fındığı (tohumu) tüketimine bağlı olarak gerçekleştiği bildirilen nöbetlere tohum içerisindeki 4-metoksipridoksin bileşiğinin neden olduğu belirlenmiştir (17). *Ginkgo biloba* yaprak özütleri veya yutulabilir tabletlerinde 4-metoksipiridoksin bulunmadığı için bu preparatların güvenli olduğu düşünülmekle birlikte, bir vaka sunumunu kapsayan çalışmada nöbet kontrolü sağlanmış epilepsi hastalarında takviye amacıyla kullanılan *Ginkgo biloba* ekstraktının kontrol altındaki nöbetlerin tekrar başlamasına neden olduğu bildirilmiştir (21). Deneysel çalışmalarda ise *Ginkgo biloba*'nın hem prokonvülsan ve hem de antikonvülsan etkilere sahip olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır (22-24). İlhan ve arkadaşları (2006), farelerde pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan tutuşma modelinde oral yoldan uygulanan 100 mg/kg EGb 761'in nöbet latensi ve skorunu azaltarak koruyucu bir etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (22). Diğer bir çalışmada, Wistar sıçanlarda lityum-pilokarpin ile oluşturulan status epileptikus modelinde 50 ve 100 mg/kg dozlarda uygulanan *Ginkgo biloba* yaprak özütünün nöbet şiddetini anlamlı seviyede azalttığı bulunmuştur (24). Çinçila tavşanları kullanılarak gerçekleştirilen hipokampal elektriksel uyarım modelinde ise EGb 761, epileptojenik odak oluşturmak için gerekli olan akım miktarında, tam tutuşma oluşturacak elektrostimulasyon sayısında ve nöbet latensinde azalmaya yol açarak tüm konvulsif parametrelerin artışına neden olmuştur (23). Literatürdeki mevcut çalışmalar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, EGb 761 ve onun etken bileşiklerinin nöronal eksitabilite ve bu epileptik nöbetler üzerindeki etkisini mekanizmaya dayalı olarak yeterince

incelenmediği ve bu bakımdan normal popülasyonda veya epilepsi hastalarında EGb 761'ın güvenli bir şekilde kullanılabileceğine dair ciddi bir belirsizliğin olduğu görülmüştür.

Kalsiyum iyonu ikinci haberci olarak birçok hücre içi fonksiyona aracılık etmektedir. Kalsiyuma bağımlı hücre içi sinyal yolağı nörotransmitter salınımı başta olmak üzere farklı şekillerde nöronal aktivite ile etkileşmektedir. Bu nedenle hücre içi kalsiyum değişiminin epileptogenez ve nöbet oluşumunun her ikisi ile bağlantılı olması beklenen bir durumdur. Son yıllarda yapılan bir çalışmada kalsiyum sinyalinin antiepileptik ilaçların geliştirilmesinde ümit verici bir hedef olduğu ifade edilmiştir (25). Kalsiyum sinyali, nöronal eksitabilite üzerinde anlık veya geç etkilere sahiptir. Anlık etkilere kalsiyuma bağımlı potasyum kanallarının ve voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının aktivasyon ve inaktivasyonu örnek verilebilir (26, 27). İyon kanallarının fosforilasyonu veya defosforilasyonunu etkileyen kalsiyum sinyali uzun süren etkilere sahiptir ve özellikle nöronal eksitabilite ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (25, 28, 29). Bazı hayvan modellerindeki çalışmalar, çeşitli kalsiyum kanallarının epileptik nöbetlerin yayılmasında oldukça önemli olduğunu göstermiştir. Örneğin absans epilepsinin genetiği ve mekanizmasına yönelik çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir model olan GAERS sıçanlarda, nöbet gelişimine T-tipi kalsiyum kanal akımındaki bir artışın eşlik ettiği bildirilmiştir (30, 31). Epileptogenezin kalsiyum hipotezi, nöronal kalsiyum dengesindeki değişimlerin epilepsinin patogenezinde temel bir rol üstlenebileceğini ileri sürmektedir (32, 33). İyonotropik bir glutamat reseptörü olan N-metil D-aspartat (NMDA)'nın aşırı aktivasyonuna bağlı hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonundaki irreversibl artış eksitotoksik nöronal hücre ölümü ile ilişkilendirilirken (34), NMDA reseptör aktivasyonu ve bu aktivasyonun uzaması ile oluşan hücre içi reversibl kalsiyum artışının epilepsinin indüksiyonu ile bağlantılı olduğu ifade edilmiştir (35-37). Sonuç olarak kalsiyumun epileptogenez ile bağlantılı uzun dönemli plastisitede ve nöbet oluşum mekanizmasında önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (32, 38, 39).

Sunulan doktora tezinde, postnatal 0-4 günlük WAG/Rij sıçanlar ve bu sıçanların izole edildikleri Wistar ırkı sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültürü ve floresan kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak EGb 761 dozları ve bunun etken bileşenleri olan ginkgolid A, B, C ve bilobalid dozlarının uyarılabilirliğin bir

göstergesi olan hücre içi kalsiyum düzeyi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu etken bileşenlerin nöronal uyarılabilirlik üzerindeki muhtemel etki mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla hücre içi kalsiyum seviyesindeki değişime yol açabilecek ilgili kalsiyum kaynağının tespitine yönelik planlama yapılmıştır. Hücre dışı kalsiyum kaynağını belirlemek için hücre membranında yer alan L- ve T-tipi voltaj-kapılı kalsiyum kanalları nikardipin ve mibefradil ile, hücre içi kalsiyum kaynağının belirlenmesi için endoplazmik retikulumda bulunan riyanodin reseptörleri ise dantrolen ile bloklanmıştır. Ayrıca EGb 761 ve ginkgolid B'nin nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkisinde iyonotropik glutamat reseptörlerinin rolü de araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Ginkgo biloba*

Ginkgo biloba, çevresel koşul ve strese karşı yüksek direncinden dolayı herhangi bir ciddi değişiklik olmaksızın binlerce yıldır yaşamını sürdüren bir bitki türüdür. Bu özelliği nedeniyle yaşayan fosil olarak adlandırılmaktadır. Dünya üzerinde değişmemiş en yaşlı ağaç olarak kabul edilmekte ve sistematik açıdan bitkiler alemi içerisinde bilinen yakın bir akrabası bulunmamaktadır. Bu nedenle "Ginkgophyta" adında kendine ait bir şubeye dahil edilmiştir. Bu şubenin tek üyesi *Ginkgo biloba*'dır. *Ginkgo biloba*'nın açık tohumlu bitkiler ile kapalı tohumlu bitkiler arasındaki bağlantı olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.1; 40).

"Ginkgo" kelimesi Japonca telaffuzundan köken almış olup, Japonca'daki gümüş meyve anlamına gelen "Yin-Kwo" kelimesinin karşılığıdır. Tür ismindeki biloba ise yapraklarının iki loplu (bilobed) olmasından dolayı kullanılmıştır. İngilizce'de "maidenhair tree" denilen *Ginkgo biloba* ülkemizde "mabet ağacı" olarak tanınmaktadır (41).



- **Alem**: Plantea
- **Bölüm:** Ginkgophyta
- **Sınıf:** Ginkgoopsida
- **Takım:** Ginkgoales
- **Aile:** Ginkgoaceae
- **Cins:** Gingko
- **Tür:** *Ginkgo biloba*

Şekil 2.1. *Ginkgo biloba* ağacı ve bilimsel sınıflandırması (42)

Ginkgo biloba 20-30 yılda olgunluğa ulaşır ve 30-40 yılda tohum üretmeye başlar (43, 44). Erken dönemlerde genellikle uzunlamasına gelişen ince gövdeli ve seyrek yapraklı ağaçlar, ilerleyen dönemlerde yaklaşık 20-40 m uzunluğa ve 2-4 m çapa ulaşabilirler. Ayrıca yaşlandıkça apikal kısımları genişlemektedir (45).

Ginkgo biloba'nın yaprak ve meyveleri geleneksel ve tamamlayıcı Çin tıbbında pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (46). Özellikle *Ginkgo biloba* yaprak

ve meyveleri kalp, astım ve bronşit gibi akciğer problemlerinde, mesane rahatsızlıklarında, işitme kaybı ve vertigo gibi hastalıklarda kullanılmaktadır (47, 48).

2.1.1. *Ginkgo biloba* Yaprak Özütü: EGb 761

Ginkgo biloba yaprak özütleri farmakolojik amaçla ilk olarak 1965 yılında Almanya'da üretilmesine karşın, ticari olarak insanlarda kullanımı ilk olarak 1975 yılında Fransa'da EGb 761 adıyla başlamıştır ve dünya çapında en fazla satılan bitkisel ürünler arasına girmiştir (49-51).

Ginkgo biloba yapraklarındaki kimyasal bileşim ağacın cinsiyeti, gelişim periyodu, yaşı, toprak tipi gibi faktörlere bağlıdır (52). Klinik uygulamalarda bitki özütlerinin özellikle kimyasal maddenin dozu ve içeriğinin standardizasyonu önemlidir. Geleneksel ve tamamlayıcı tıpta kullanılan bitkisel biyoaktif maddelerin modern tıp uygulamalarında yer bulabilmesi için bu bitki özütlerinin standart hale getirilmesi gerekmektedir. Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının yanısıra modern tıpta pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan *Ginkgo biloba* yaprak özütü, EGb 761 adıyla standardize edilmiştir. Bunun dışında farklı özütler bulunmasına rağmen, EGb 761 pre-klinik ve klinik çalışmalarda en sık kullanılan ayrıca farmakolojik ve toksikolojik özellikleri en fazla aydınlatılmış bitkisel özütlerden birisidir (53).

Tablo 2.1. *Ginkgo biloba* yaprağında bulunan kimyasal maddeler (49, 58,59)

Kimyasal sınıfı	İlgili sınıfa ait örnekler
Terpenoidler	Diterpenler: Ginkgolid A, B, C, J, K, M Seskiterpen: Bilobalid
Flavonoidler	Kemferol, Kuarsetin, İsoginkgetin, Rutin, Luteolin
Biflavonoidler	Skiadopitisin, Ginkgetin, İsoginkgetin, Amentoflavon, Bilobetin, 5'metoksibilobetin
Nonfenolikler	Askorbik asit, D-Glukarik asit, Kinik asit, Şikimik asit
Organik asitler	Protokaşenik asit, *p*-Hidrobenzoik asit, Vanilik asit, Kafeik asit, *p*- Kumarik asit, Ferulik, Klorojenik asit, 6-Hidroksikinurenik asit, Ginkgolik asit
Poliprenol	Di-trans-poli-cis-oktadekaprenol
Diğerleri	Vakslar, Steroidler, 2-heksanal, Kardanoller, Şekerler, Kateşinler, Proantosiyanidinler, Fenoller, Alifatik asitler, Ramnoz

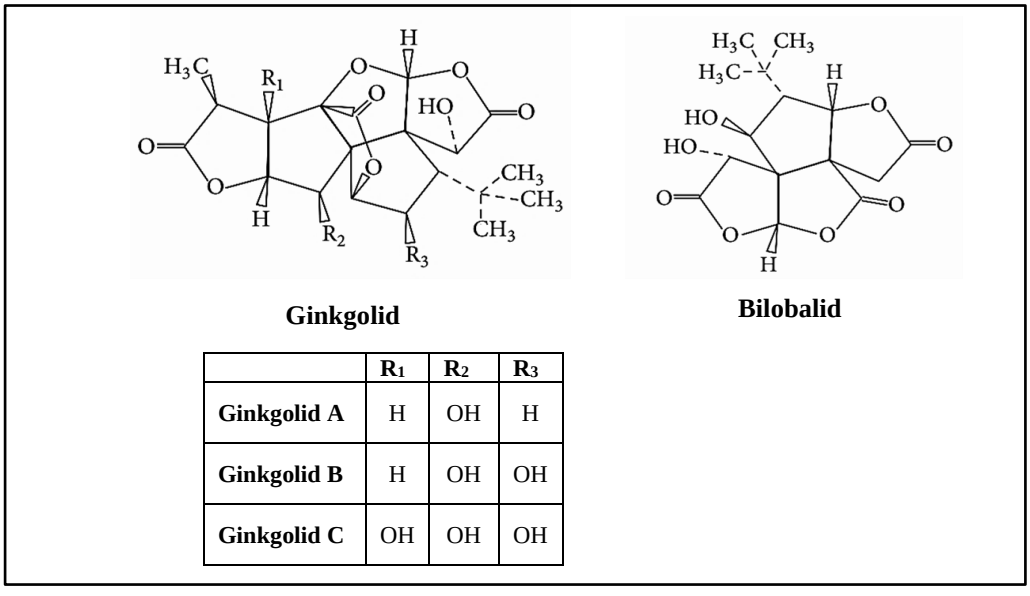
Ginkgo biloba yaprağında bulunan temel kimyasal maddeler Tablo 2.1.'de verilmiştir. Kurutulmuş yapraklardan elde edilen standardize Ginkgo yaprak özütü

%22-27 flavonoid glikozitleri, %5-7 terpen trilaktonları (%2,8-3,4 ginkgolid A, B ve C, %2,6-3,2 bilobalid) ve 5 ppm'dan az ginkgolik asit içermektedir (54). Alerjik, immünotoksik ve diğer istenmeyen etkilerinden dolayı alkilfenoller ve alkilbenzoik asitler özütten uzaklaştırılır (55). *Ginkgo biloba* özütü Avrupa piyasasında Tebonin, Tanakan, Rökan ve Kaveri ticari isimleri altında ilaç olarak kullanılmaktadır (56). EGb 761, Dr. Wilmar Schwabe farmakoloji şirketi tarafından üretilen *Ginkgo biloba* yaprak özütüdür. Sentezi 27 adımlık ekstraksiyon işlemini kapsamakta ve yapraklardan 50:1 oranında özüt elde edilmektedir (57).

2.1.2. EGb 761'in Biyolojik Etkileri

Ginkgo biloba'nın biyolojik ve farmakolojik etkilerinden sorumlu olan kimyasal maddeler esas olarak terpeneoidler (ginkgolidler ve bilobalid; Şekil 2.2.) ve flavanoid glikozitleridir. Bu nedenle standardize özüt ve ticari *Ginkgo biloba* ürünlerinde bu maddeler yer almaktadır (54).

Ginkgo biloba yaprak özütü antioksidan sistem, platelet aktive edici faktör, hücre membranındaki sinyal iletimi ve glukokortikoid sentezi gibi fizyolojik süreçleri etkilemektedir (57).



	R_1	R_2	R_3
Ginkgolid A	H	OH	H
Ginkgolid B	H	OH	OH
Ginkgolid C	OH	OH	OH

Şekil 2.2. Ginkgolidler ve bilobalidin kimyasal yapısı (57)

2.1.2.1. EGb 761'in Nörolojik Etkileri

Ginkgo biloba yaprak özütünün insanda özellikle öğrenme ve hafıza problemleri üzerindeki olumlu etkileri bildirilmiştir. Fare ve sıçanlarda yapılan bir çalışmada 100 mg/kg dozundaki *Ginkgo biloba* yaprak özütünün 4-8 hafta oral yolla verilmesinin operant şartlanma testine ilişkin öğrenme ve hafıza performansında artış sağladığı gösterilmiştir (60). Diğer bir çalışmada EGb 761'in (40 mg/kg ip, 1-3 hafta) 6 ve 22 aylık Swiss farelerde öğrenmeyi olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (61). Ayrıca *Ginkgo biloba* yaprak özütünün sıçanlarda alüminyum klorid ile indüklenmiş öğrenme ve hafıza bozukluklarında iyileşmeye neden olduğu tespit edilmiştir (62). *Ginkgo biloba* yaprak özütü genel ve lokal kan akımı ve mikrosirkülasyonu düzenleme, hipoksiye karşı koruma, trombosit agregasyonunu inhibe etme, kılcal damar geçirgenliği azaltma gibi özellikleri nedeniyle serebrovasküler hastalıklarda etkili olmaktadır (63).

Ginkgo biloba yaprak özütünün sinir sistemi üzerindeki olumlu etkinliğinin kortikosteroid üretimini azaltarak serebral kan akımını düzeltmesi, glukoz alım ve kullanımını artırması, ATP üretimini yükseltmesi, mitokondrial metabolizma ile hücre içi ve dışı iyon dengelerini etkilemesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (55).

Deneysel çalışmaların yanısıra *Ginkgo biloba*'nın insan üzerindeki etkileride incelenmiştir. *Ginkgo biloba* MSS üzerindeki bilinen ve hafızayı güçlendirici etkileri nedeniyle insanlarda takviye edici diyet ürünü olarak sıklıkla kullanılmaktadır (64-68). Ahlemeyer ve Krieglstein'in *Ginkgo biloba*'nın Alzheimer hastalığı üzerindeki terapötik etkilerini gösteren farmakolojik çalışmaları bulunmaktadır (64). Alzheimer hastalığı beta amiloid protein birikimi ve serbest radikallerin neden olduğu nörolojik bir hastalıktır. EGb 761'in nöroprotektif etkisinin antioksidan özelliğinden ve ayrıca beta amiloid indüklü toksisite ile hücre ölümünü engelleyici özelliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (69-72). EGb 761'in 240 mg/kg/gün dozundaki kullanımının dejeneratif Alzheimer tipi demans ve multi-infarkt demansda hafızayı kuvvetlendirdiği tespit edilmiştir (73).

2.1.2.2. EGb 761'in Kan Akımı Üzerindeki Etkileri

EGb 761, eritrositlerin deformabilitesini artırıp agregasyonunu azaltarak eritorositlerin ve dolayısı ile vizkositedeki azalmaya bağlı olarak tüm kan dokusunun akışkanlığında artışa sebep olmaktadır (74).

Ginkgo biloba vasküler sistem üzerindeki etkilerinin endotelyal kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) aracılığı ile ve muhtemelen nitrik oksitin üzerinden gerçekleştirmektedir. Nitrik oksitin sığır endotel hücre kültüründe prostasiklin salınımını inhibe ettiği bildirilmiştir. *Ginkgo biloba* yaprak özütü, nitrik oksiti uzaklaştırarak prostasiklinin etkisini arttırdığı ifade edilmiştir (74, 75). Ayrıca fazla nitrik oksit çeşitli MSS hastalıklarına sebep olmaktadır. Bastianetto ve arkadaşları EGb 761'in nitrik oksitle indüklenen toksititeye karşı hipokampal hücreler üzerinde koruyucu bir etkisinin olduğunu ifade ederek, bu etkinin sadece flavonoidlerin antioksidan özelliğinden kaynaklanmadığını aynı zamanda nitrik oksitin uyardığı protein kinaz C aktivitesinin inhibisyonu yoluyla da gerçekleştirildiğini belirtmişlerdir (69, 77). Sıçan aortik endotel preparatında yapılan deneysel çalışmada EGb 761'in nitrik oksit yolağındaki etkisine ek olarak prostasiklin salınımını da artırdığı tespit edilmiştir (75).

2.1.2.3. EGb 761'in Antiinflamatuar Etkisi

EGb 761 trombosit agregasyonu, alerjik reaksiyonları, genel inflamatuar yanıtı ve makrofajların proinflamatuar süreçlerini azaltarak antiinflamatuar etki göstermektedir. Görülen antiinflamatuar özellikler ginkgolidlerin ve flavonoidlerin kombine etkisinden kaynaklanmaktadır. Trombosit agregasyonunun arttığı astım, greft reddi ve toksik şok gibi immün bozukluklarda, ginkgolidler spesifik ve büyük ölçüde trombosit agregasyonundaki artışı antogonize ederek periferal kan akımını artırır (77, 78).

Ginkgo biloba yaprak özütündeki flavanoidler araşidonik asit metabolizmasındaki siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe etmektedir. Bu enzimlerin inbisyonu tromboksan A_2 ve lökotrienler gibi inflamatuar kimyasalların üretimini azaltır (79, 80).

2.1.2.4. EGb 761'in Endokrin Sistem Üzerindeki Etkileri

Stres dolaşımdaki epinefrin, norepinefrin ve kortikosteron hormon konsantrasyonlarını arttırmaktadır. EGb 761 ise bu maddelerin plazma konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır (81). EGb 761 hipotalamusta kortikotropin salgılayıcı hormon ve vazopresin salınımını, hipofizde ise adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımını azaltmaktadır (82). *Ginkgo biloba* ürünlerinde yer alan ve bir toksik madde olan ginkgolik asitin anksiolitik etkisinin

olduğu bildirilmiştir. Ginkgolik asitin oluşturduğu anksiolitik etkinin yanında *Ginkgo biloba* yaprak özütü monoamin oksidaz enzimini inhibe ederek beyinde norepinefrin, serotonin ve diğer biyojenik aminlerin konsantrasyonlarını arttırmaktadır (83, 84).

2.1.2.5. EGb 761'in Antioksidan Etkileri

Ginkgo biloba yaprağından elde edilen özütlerde bulunan flavonoid glikozitlerin ve proantosiyanidinlerin serbest radikal temizleme özelliği bulunmaktadır. Bu nedenle EGb 761, ateroskleroz gibi oksidatif stres kaynaklı rahatsızlıkları önleyici role sahiptir (85, 86). Ayrıca süperoksit, hidroksil ve peroksil radikalleri ve nitrik oksit temizleyici özelliğinden dolayı sinyal transdüksiyonunu ve nörosensöriyel sistemi de etkileyebilir (49).

Terpenoidler, özellikle ginkgolid A süperoksit, flavonoidler ise süperoksit ve hidroksil radikallerinin temizlenmesinde daha etkilidir (87-89). Sprague-Dawley sıçanlarda *Ginkgo biloba* yaprak özütünün topikal olarak uygulanması epidermiste, sistematik uygulanması ise karaciğer, kalp ve böbrekte süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitesini uyarmaktadır (90). EGb 761 alloksanın toksik etkisine karşı radikal temizleyici özelliği ve glukoz kullanımını uyararak pankreatik hücreleri korumaktadır (91).

2.1.3. EGb 761'in Metabolizması

Ginkgo biloba yaprak özütü kullanımında önerilen dozlar; intermittan kladikasyo hastaları için 120-160 mg/gün, serebrovasküler yetersizlik, erken dönem Alzheimer hastalığı ve dirençli depresyonda ise 240 mg/gün'dür (92). Kleijnen ve Knipschild *Ginkgo biloba*'nın etkinliği ve güvenliği ile ilgili yayımladıkları derlemede en az 40 klinik uygulamada 120-160 mg/gün şeklindeki dozda 1-3 ay süre ile uygulandığında herhangi ciddi yan etkisinin olmadığını bildirmektedir (56).

Ginkgo biloba tohumunda bulunan ginkgotoksin, nörotoksik etkiye sahiptir ve konvulsiyon, bilinç kaybı ve ölüme neden olabileceği bildirilmiştir. Ginkgotoksin beyinde glutamattan GABA dönüşümünü inhibe ederek nöbetlere sebep olabileceği bildirilmektedir (93).

Ginkgo biloba'nın diğer olası yan etkileri arasında kanama riskinde artış da bulunmaktadır. Pıhtılaşma ve damar geçirgenliğinde oluşturduğu etkiler nedeniyle kanama bozukluklarına sebep olduğu vakalar bildirilmiştir (94-96).

Ginkgo biloba yaprak özütü oral uygulamalar sonrasında insan ve kemirgenlerde iyi absorbe edilmektedir (97, 98). Sıçanlarda 360 mg/kg EGb 761'in en az %60 oranında absorbe edildiği gösterilmiştir. Kanda 90 dakikada pik değerine ulaşmaktadır. Radyoaktif karbonla işaretlenen EGb 761'in oral kullanımdan 3 saat sonra mide ve bağırsakta radyoaktif ışıma miktarı maksimum değerine ulaşmaktadır. Bezler ve nöronal dokular EGb 761'e yüksek afinite göstermektedir. Oral EGb 761 uygulamasında 72 saat sonra verilen dozun %38'i solunum, %22'si idrar ve %29'u gaita ile vücuttan atılmaktadır (99).

Ginkgolid A ve ginkgolid B idrarla sırasıyla %70 ve %50 oranlarında değişmemiş formda atılırken bilobalid %30 oranında atılmaktadır. Bu veriler Ginkgolid A ve B'nin vücutta modifiye edilmeden absorbe edilip, dolaşımda yer aldığını göstermektedir (56). EGb 761'in (80 mg) oral yolla alınmasının ardından insanlarda ginkgolid A ve ginkgolid B için maksimum plazma seviyeleri ve süreleri sırasıyla 15 ng/ml - 1,4 ve 24 ng/ml - 2 saat olarak tespit edilmiştir. Ginkgolid A, B ve bilobalidin yarılanma süreleri sırasıyla 1,8, 2 ve 3 saat olarak bulunmuştur (53).

2.1.4. EGb 761'in Etki Mekanizmaları

Ginkgo biloba'nın fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden sorumlu maddeler terpen trilaktonlar ve flavonoidlerdir. Yaşlılığa bağlı demans ve Alzheimer hastalıklarının oluşumuna enerji metabolizması ve mitokondrial bozuklukların sebep olduğu bilinmektedir. EGb 761'in Alzheimer hastalığının patofizyolojisindeki azalmış mitokondri fonksiyonları üzerindeki etkisi sıklıkla irdelenmiş ve bu noktada EGb 761'in koruyucu etkisinin ginkgolidlerden ve bilobalidden kaynaklandığı ifade edilmiştir (100, 101). PC12 hücreleriyle yapılan *in vitro* deneyde 10 µg/ml EGb 761'in (300 ng/ml bilobalid ve 300 ng/ml ginkgolidleri içerir) H_2O_2'ye karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (65). Aynı konsantrasyonda mitokondrial solunum zinciri komplekslerini koruduğu da farklı deneysel çalışmalarda saptanmıştır (100, 101). Ayrıca EGb 761 (10 µg/ml) sodyum nitroprussit ile uyarılmış mitokondrial membran potansiyelini düşürmekte, 5 µg/ml dozda ise ATP seviyesini stabilize edebilmektedir (102). EGb 761'in mitokondrial sistemlerdeki koruyucu etkisinin iki muhtemel mekanizma üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu mekanizmalar platelet aktive edici faktör (PAF) reseptörünün antagonize edilmesi ve klor kanallarının aktivitesinin değiştirilmesi yoluyla gerçekleşmektedir (103, 104).

Terpen trilaktonları PAF reseptörleri üzerinden PAF'in etkisini inhibe etmektedir. PAF reseptörlerini antagonize edici etkisi diğer terpen trilaktonlara göre ginkgolid B'de daha kuvvetlidir (105). PAF lökosit fonksiyonları, platelet agregasyonu ve proinflamatuar sinyalizasyonun bir mediatörüdür. Terpen trilaktonların PAF'ı antagonize ederek kan sirkülasyonundaki iyileşmeyi gerçekleştirebilir. Aşırı PAF nöronal hasara yol açtığından bu yolağın inhibe edilmesi nöronal sağkalımda ve iskemik beyin hasarını önlemede rol oynamaktadır (104, 106).

Terpen trilaktonları klor kanalları üzerinden de fizyolojik etkilerini ortaya koymaktadır. Sıçanların hipokampal nöronlarında glisinle aktifleştirilen klorür kanalları terpen trilaktonları tarafından bloklanmaktadır. Klor kanallarını bloklamada ginkgolid B ve C nispeten daha etkili iken ginkgolid A daha az etkili bulunmuştur (103). Ginkgolid B yarışmasız olarak glisin akımını bloklamaktadır ve eğer glisin reseptörü β alt birimini içeriyorsa inhibisyondaki duyarlılık daha da artarak düşük dozlarda da ginkgolid B'nin etkinlik göstermesine neden olmaktadır (107).

EGb 761, özellikle de ginkgolid B etken bileşeni fizyolojik bazal seviyeleri etkilemeden strese bağlı serum kortikosteron artışını engellemektedir (108). Sıçan adrenokortikal hücrelerinde ginkgolid B adrenal periferal tip-benzodiazepin reseptörlerinin mRNA ve ligand bağlayıcı proteinlerinin azalmasına neden olmaktadır. Bu durum kortikosteroid sentezini azaltmaktadır (109).

Tchantchou ve arkadaşları (2007) EGb 761'in Alzheimer hastalığının transgenik fare modelinde yetişkin hipokampal nörojenezi ve CREB'nin fosforilasyonunu arttırdığını, bunun yanı sıra bilobalid ve kuarsetinin ortak bir yolak aracılığıyla hipokampal nöronlarda nörogenez ve sinaptogenezi uyardığını göstermiştir (110, 111).

2.2. Kalsiyum İyonu

Canlılığın devam edebilmesi, fizyolojik pek çok fonksiyonun yerine getirilmesinde kalsiyum (Ca^{+2}) oldukça önemli bir rol üstlenir. Kas kasılması, nöronlardan transmitter salınımı, endokrin ve ekzokrin hücrelerin sekresyonu, hücre döngüsü, gen ekspresyonunun kontrolü ve programlı hücre ölümü gibi olaylar kalsiyum iyonu tarafından kontrol edilen veya kalsiyum iyonundan etkilenen süreçlerden bazılarıdır (112). Kalsiyum aynı zamanda hücre içi sinyalizasyonda ikinci haberci olarak rol alan en önemli aracılardan biridir. Kalsiyumun sinyal özellikleri

iyonun dinamik karakterinden kaynaklanır. Sitoplazmada serbest kalsiyum konsantrasyonu oldukça düşük konsantrasyonda (<0,0001 mM) bulunurken hücre dışında yaklaşık 10000 kat daha fazla konsantrasyonda (2,5 mM) bulunur (113). İki ortam arasındaki kimyasal gradiyent farkının çok yüksek olması ilgili kanal proteinlerinin açılması halinde hücre içerisine çok hızlı bir iyon akımına sebep olur. Hücre içi kalsiyum seviyesinde geçici bir değişim gerçekleşir ve bu değişim hücre içi fonksiyonlara ilişkin mekanizmaları harekete geçirir (114).

2.2.1. Hücre İçi Kalsiyum Seviyesinin Düzenlenmesi

Sitoplazma kalsiyum düzeyi iki kaynak aracılığı ile kontrol edilir. Kalsiyum sağlayan bu kaynaklardan ilki hücre dışı sıvı diğeri ise endoplazmik retikulum ve mitokondri (bazı durumlar için lizozom) gibi hücre organelleridir. Herhangi bir andaki hücre içi kalsiyum konsantrasyonu plazma membranından kalsiyum girişi ve çıkışı arasındaki denge ile hücre içi depolardaki kalsiyum değişimine bağlıdır. Ayrıca hücre içi serbest kalsiyum miktarı parvalbumin, kalbindin veya kalretinin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin tamponlama kapasitesinden etkilenir (114). Kalsiyum homeostazisini incelerken hücre ve organel membranlarındaki kalsiyum kanallarına değinilmesi gerekmektedir.

2.2.1.1. Hücre Membranına Bağlı Düzenlenme

Hücre membranı kaynaklı kalsiyum homeostazisini sağlayan aracılar genellikle hücre dışına kalsiyum atılımını sağlayan kalsiyum pompaları, kalsiyum değiş-tokuş proteinleri ile konsantrasyon gradiyentine bağlı kalsiyum girişini sağlayan membranda yer alan kalsiyum kanallarıdır.

2.2.1.1.1. Hücre Membranındaki Kalsiyum Pompaları ve Değiş-Tokuş Proteinleri

Hücre içi kalsiyum düzeyinin düşük konsantrasyonlarda tutulması, hücrede yer alan kanal proteinlerinin aktivasyonuyla sağlanır. Hücre membranı aracılığıyla hücre dışına kalsiyum atılımını sağlayan iki sistem vardır. Bunlar; (i) yüksek afiniteli, düşük kapasiteli Ca^{+2} ATPaz (PMCA) pompaları ile (ii) düşük afiniteli, yüksek kapasiteli ve elektrokimyasal gradiyent ile kontrol edilen Na^{+}/Ca^{+2} değiş-tokuş (NCD) proteinleridir (113).

PMCA sitozolik kalsiyum konsantrasyonu 0,1-0,2 mM aralığında iken baskın bir rol oynarken, NCD kalsiyum konsantrasyonu 1-10 mM'a yükseldiğinde daha aktif

rol üstlenir. PMCA sitozolik kalsiyum seviyesinin devamlılığını sağlarken, NCD kanalları ise kalsiyum seviyesindeki daha büyük değişimlerde yani dinamik süreçlerde baskın rol oynamaktadır. Farklı çalışmalar her iki sistemin de hücrelerde birlikte bulunduğunu ve sinyalizasyonda birbirinden faklı rollerinin olduğunu bildirmektedir (115, 116).

PMCA fosfotidilinositolun mono ve difosfat türevleri olan asidik fosfolipitler tarafından aktive edilir. PMCA'ların işlevleri ayrıca kalmodulin ve kalsiyum ile aktive olan diğer enzimler tarafından da kontrol edilir. PMCA dört farklı izoforma (PMCA1-4) sahiptir. PMCA1 ve PMCA4 vücutta yaygın olarak bulunurken, PMCA2 ve PMCA3 özellikle beyinde bulunmaktadır. Bu pompaların gen ekspresyonu hücre içi kalsiyum sinyalizasyonu tarafından kontrol edilir (116).

Uyarılabilir olmayan hücrelerde baskın olarak PMCA hücreden kalsiyum çıkışını sağlarken, uyarılabilir dokularda bu görev ağırlıklı olarak NCD kanalları aracılığıyla gerçekleşir. NCD'nin kalsiyum pompalama kapasitesi PMCA'dan on kat daha fazladır. NCD, PMCA pompalarının aksine bir enzim değildir. Üç adet sodyumu hücre içine alırken, bir kalsiyumu hücre dışına atan taşıyıcı bir proteindir. Membran potansiyeli ile sodyum ve kalsiyum iyonlarının termodinamik değerlerine bağlı olarak bu taşıyıcı proteinler ters yönde de çalışarak hücre içine kalsiyum alabilirler (115). Hücre içi pH ve ATP seviyesi, diğer iyonlar ile redoks faktörleri tarafından NCD'in aktivitesi düzenlenebilir. Şu ana kadar memelilerde üç farklı gen ile bağlantılı üç farklı NCD izoformu klonlanmıştır. NCX1 beyin ve kalp dahil olmak üzere birçok dokuda bulunmaktadır. NCX2 ve NCX3 esas olarak nöronal ve iskelet kas dokularında bulunur (117). NCD'nin üç izotipi de nöronlarda birlikte eksprese edilmekte ve özellikle yoğun olarak bulunan NCX2 kalsiyum homeostazisinde kilit rol oynamaktadır. Nöronlarda NCX3 izotipi beyin iskemisine bağlı hasarların azaltılmasında görev yapmaktadır (118).

2.2.1.1.2. Hücre Membranındaki Kalsiyum Kanalları

Plazma membranında PMCA ve NCD kanallarının dışında kalsiyum kanalları da bulunmaktadır. Kalsiyum kanalları transmembran proteinleridir ve dinlenim anında hücreye kalsiyum girişini engelleyen kapılara sahiptirler. Bu kapılar açıldığında büyük grandient farkından dolayı kalsiyum hızlıca sitoplazmaya girer. Kalsiyum kanalları, kapı mekanizmalarına göre 3 sınıfa ayrılır:

(i) Voltaj kapılı kalsiyum kanalları (VKKK), membran potansiyeline bağlı olarak açılıp kapanır.

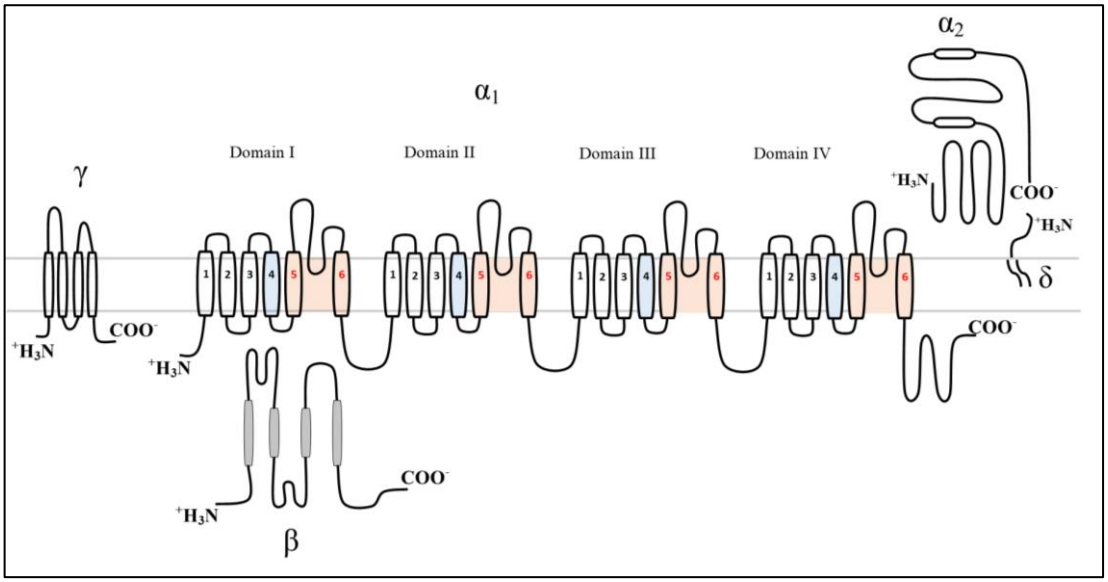
(ii) Reseptör kontrollü kalsiyum kanalları (RKKK), reseptöre bağlanan ligantın kontrol ettiği kapı mekanizmasına sahiptir.

(iii) Depo kontrollü kalsiyum kanalları (DKKK), endoplazmik retikulumdaki kalsiyum seviyesine bağlı olarak kontrol edilmektedir (119).

Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalları

VKKK en iyi karakterize edilmiş kalsiyum kanallarıdır ve yüksek kalsiyum seçiciliğine sahiptir. VKKK sadece uyarılabilir dokularda değil vücutta diğer doku tiplerinde de yaygın olarak bulunur. VKKK moleküler olarak 4 veya 5 alt birimden (α_1, β, $\alpha_2\delta$, γ) oluşur (Şekil 2.3). Fizyolojik ve farmakolojik özelliklerine göre VKKK'ları L, N, P/Q, R ve T tipi olmak üzere 5 grupta sınıflandırılır (120).

VKKK'nın en büyük alt birim olan α_1 (190-250 kDa) kanalın tipini, fizyolojik ve farmakolojik özelliklerini belirlemektedir. Kanalın iletim yapısı, voltaj sensörü ve kapı mekanizması başta olmak üzere kanala ait çoğu ana kompartmanı α_1 alt birimi oluşturur. Hücre içi ikinci haberci sistemleri, toksinler ve ilaçlar α_1 birimi üzerinden kanalın aktivitesini düzenler. α_1 alt birimi her biri altı transmembran segment (S1-S6) olmak üzere dört homolog domainden (I-IV) meydana gelir. S1-S4 segmentleri voltaj sensörü olarak görev alırken, kanalın iletkenliğini ve seçiciliğini S5 ve S6'nın oluşturduğu por halkası belirler (121).



Şekil 2.3. Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının yapısı (122)

Hücre içinde yer alan β alt birimi 50-65 kDa ağırlığında hidrofilik bir proteindir. β alt biriminin yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanallarında α_1 alt birimiyle birlikte eksprese olduğu, düşük voltajla aktive olan kalsiyum kanallarında ise β alt biriminin birlikte ekspresyonunun olmadığı bildirilmiştir (123). $\alpha_2\delta$ alt birimi tek gende kodlanan 125 kDa ağırlığında bir alt birimdir. Prepolipeptit olarak eksprese edilen protein posttranslasyonel işlemler sonrasında disülfit bağıyla bir araya getirilerek fonksiyonel formuna ulaşır (124). Dört transmembran segmentli γ alt birimi iskelet kası, kalp kası ve beyin hücrelerindeki kalsiyum kanallarında bulunur ve 25,1 kDa ağırlığındadır (125).

Kalsiyum kanalları sembolize edilirken "Ca" kısaltması kalsiyum elementinin simgesi olduğu için kullanılır. Sonrasında "voltaj kapılı" kanal olduğunu ifade eden "v" harfi yazılır. Kanal alt tiplerini belirlemek için α_1 alt biriminin üç alt ailesinden (1-3) hangisi olduğu ve keşfediliş sırası rakamla alt indis olarak yazılır. Örnek verecek olursak $Ca_{v1.1}$ kanalı voltaj kapılı 1. tip α_1 alt birimli ve bu alt birim tipine ilişkin ilk keşfedilen kanalı ifade etmektedir. Kalsiyum kanallarının Ca_{v1} ($Ca_{v1.1}$-$Ca_{v1.4}$) alt ailesi L tipi kalsiyum akımına aracılık eder. Ca_{v2} ($Ca_{v2.1}$-$Ca_{v2.3}$) kanalları sırasıyla P/Q, N ve R tipi kalsiyum akımlarını oluşturur. Ca_{v3} ($Ca_{v3.1}$- $Ca_{v3.3}$) alt ailesi ise T tipi kalsiyum akımını sağlayan kanallardır (122).

Ayrıca VKKK için yüksek voltajla ve düşük voltajla aktive olan kalsiyum kanalları şeklinde bir başka sınıflandırma daha yapılır. L, P/Q, N ve R tipi akımları oluşturan kanallar yüksek voltaj ile aktive olurken, T tipi kalsiyum akımını oluşturan kanallar düşük voltajda aktive olur (126).

Ca_{v1} alt ailesine ait L tipi kalsiyum kanalları iskelet ve kalp kası hücrelerinde eksitasyon-kontraksiyon eşleşmesini sağlar. Nöronlarda ise hücre gövdesi ve dentritlerde bulunarak sekresyon ve gen ekspresyonu gibi fonksiyonların yürütülmesinde görev alır. Ca_{v2} kanalları sinaptik transmisyon, nörotransmitter salınımı ve dentritik kalsiyum geçişlerinden sorumludur. T tipi kalsiyum akımından sorumlu olan Ca_{v3} kanalları kardiyomiyosit ve talamik nöronlar gibi pacemaker ve tekrarlayan spontan aksiyon potansiyellerinin oluşumunda rol oynamaktadır. L tipi ve T tipi kalsiyum kanalları çoğu hücre tipinde bulunmasına rağmen N, P/Q ve R tipi kalsiyum kanalları daha çok nöronlarda yoğun olarak bulunur (122).

L-Tipi Kalsiyum Kanalları

Kalp kası, düz kas ve iskelet kasında kalsiyum akımından sorumlu temel kanal türü L tipi kalsiyum kanallarıdır. L tipi kanallar yüksek voltaj aktive olur ve kanal iletkenlikleri yüksektir. Voltaj bağımlı inaktivasyonu düşük olan L tipi kalsiyum kanalları cAMP bağımlı protein fosforilasyonu yolağı ile regüle edilir. Dihidropiridin, fenilalkilamin ve benzodiazepin gibi ilaçlar L tipi kalsiyum kanallarını inhibe eder (127, 128). L tipi kalsiyum akımının endokrin hücrelerde hormon salınımı, nöronlarda gen ekspresyonunun düzenlenmesi, sinaptik girdinin integrasyonu ve transmitter salgılanması gibi süreçlerde rol oynadığı tespit edilmiştir (129).

T-Tipi Kalsiyum Kanalları

1975'de deniz yıldızı yumurtalarında L tipi kanallardan farklı özellikte bir kalsiyum akımı keşfedilmiştir (130). Sonrasında dorsal kök gangliyonlarında voltaj-kenetleme (voltage-clamp) çalışmalarında bu akımın karakteristik özellikleri belirlenmiştir (131, 132). Keşfedilen bu yeni kalsiyum akımı, L tipi akımı ile kıyaslandığında çok daha negatif membran potansiteli değerlerinde aktive olur, inaktivasyonu çabuk gerçekleşir, deaktivasyonu oldukça yavaştır ve bilinen kalsiyum kanal antagonistlerine karşı duyarsızdır. Bu kalsiyum akımını sağlayan kanallara "geçici açılan" (transient openings) tanımlamasından dolayı T tipi kalsiyum kanalları adı verilmiştir (132).

N, P/Q ve R-Tipi Kalsiyum Kanalları

Dorsal kök gangliyonlarında tüm hücre voltaj-kenetleme ve tek kanal kayıtları, N tipi kalsiyum akımının varlığını göstermiştir. N tipi kalsiyum kanalları, başlangıçta aktive olduğu voltaj değeri ve inaktivasyon oranı gibi özellikleri nedeniyle diğer iki kanaldan ayrılmaktadır. N tipi kalsiyum kanalları, L tipi kanallardan daha negatif membran potansiyeli değerlerinde aktive olup daha hızlı inaktive olurken, T tipi kanallardan daha pozitif membran potansiyeli değerinde aktive olup daha yavaş inaktive olmaktadır (132). Bu kanallar L tipi kanalları bloke eden organik blokerlere karşı duyarsızdır fakat bir deniz salyangozunun zehiri olan ω-konotoksin GVIA ve ilişkili peptitler tarafından bloklanmaktadır. N tipi kalsiyum kanallarının voltaj bağımlılığı ve kalsiyum akımındaki kinetiği nöronlarda önemli oranda farklılık göstermektedir (133).

Peptit yapılı toksinlerin etkileri analiz edildiğinde üç farklı kalsiyum akımı daha görülmüştür. P tipi kalsiyum akımı ilk olarak purkinje nöronlarından kaydedilmiştir (134). Örümcek zehri olan ω-agatoksin IVA'ya olan yüksek duyarlılığı nedeniyle farklı bir kalsiyum akımı olarak kabul edilmiştir (135). Q tipi kalsiyum akımı ilk olarak serebellar granüler nöronlarda kaydedilmiştir (136). Q tipi kalsiyum kanalları ω-agatoksin IVA ile daha düşük afiniteyle bağlanmakta ve bloklanmaktadır. Serebellar granüler nöronlarındaki R tipi kalsiyum akımı çoğu spesifik organik ve peptit yapılı kalsiyum kanal blokerlerine karşı dirençlidir. Bazı hücre tiplerinde bir tarantula türünden elde edilen SNX-482 olarak adlandırılan bir peptit ile bloklanabilmektedir (137).

Reseptör Kontrollü Kalsiyum Kanalları

RKKK nörotransmitter gibi spesifik ligandların reseptöre bağlanmasıyla hücreye kalsiyum girişini sağlayan kanallardır. Özellikle nöronlarda glutamat reseptörleri RKKK'ın en önemlilerinden biridir. Glutamatın aktive ettiği iki ayrı grup reseptör bulunmaktadır. Bunlar iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleridir. İyonotropik glutamat reseptörleri kendi içinde 3 tipe ayrılır. Bunlar α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asite (AMPA) duyarlı reseptörler, N-metil-D-aspartata (NMDA) duyarlı reseptörler ve kainat reseptörleri şeklinde gruplandırılır. İlk ikisi hücre içi kalsiyum homeostazisine katkıda bulunmaktadır. AMPA reseptörleri merkezi sinir sisteminde hızlı eksitatör sinapslarda görev almaktadır. Temelde sodyum ve potasyum iyonlarına geçirgen olduğu bilinse de kalsiyum iyonlarına da geçirgen olabilir. NMDA reseptörleri sodyuma olan geçirgenliği sayesinde postsinaptik depolarizasyona katkı sağlamakta ve ayrıca kalsiyum geçirgenliği ile de hücre içi fizyolojik yanıtların oluşumunda görev almaktadır. NMDA reseptörleri magnezyum blokajı altında voltaja bağımlı bir aktivasyon özelliğine sahiptir. Bundan dolayı NMDA reseptörleri AMPA reseptörlerine göre glutamata daha geç yanıt verirler. NMDA reseptörleri özellikle öğrenme ve hafıza süreçlerinde oldukça önemli görev üstlenirler. Magnezyum blokajının kalkması, uzun süreli hafızanın konsodilasyonu için gerekli olan CREB-bağımlı gen ekspresyonunun indüklenmesini sağlar (138).

Hem AMPA hem de NMDA reseptörleri tetramerik yapıda olup homo- veya heterotetramerlerden oluşur. AMPA reseptörleri GluA1'den GluA4'e kadar farklı alt birimlerin birleşiminden oluşur. Genellikle AMPA reseptörlerinin sadece Na^+ ve K^+

iyonlarına geçirgen olduğu ve Ca^{+2} geçirgenliğinin olmadığı bilinir. AMPA reseptörlerinin %90'nında bulunan GluA2 alt birimi polipeptit yapısının M2 kanal segmenti 607 pozisyonunda pozitif yüklü arjinin amino asitini bulundurur. Bu alt birimde pozitif yüklü amino asit bulunması konformasyonel olarak reseptörün kalsiyuma geçirgenliğini oldukça azaltır. Geri kalan bazı AMPA reseptör tiplerinde ise aynı pozisyonda glutamin amino asiti bulunur ve bu konformasyon kalsiyum iyonunun geçişine imkan sağlar (139, 140).

NMDA reseptörlerinin spesifik özellikleri alt ünite kombinasyonuna, reseptörün fosforilasyon durumuna ve membran potansiyeline bağlı olarak belirlenir (141). NMDA reseptörleri farklı genler tarafından kodlanan 7 alt ünitenin farklı kombinasyonlarda birleşiminden meydana gelir. Bu alt birimler GluN1 alt birimi, dört farklı GluN2 alt birimi (GluN2A, GluN2B, GluN2C ve GluN2D) ve iki farklı GluN3 alt birimi (GluN3A ve GluN3B) şeklinde 3 alt sınıfa ayrılır. NMDA reseptörleri tipik olarak GluN1-GluN2 veya GluN2-GluN3 alt birimlerinin birlikteliğinden oluşur. NMDA alt ünitelerinin kompozisyonu bir plastisiteye sahiptir ve biyofiziksel, farmakolojik ve sinyal özellikleri bakımından çok sayıda reseptör alt tipinin oluşumuna sebep olur (142). NMDA reseptörlerinin sebep olduğu kalsiyum iyonu girişi CREB bağımlı gen ekspresyonunu düzenleyerek uzun süreli sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza süreçlerinin gelişimini sağlar (143). NMDA reseptörlerinin aktivasyonu serebellar parelel liflerinin purkinje hücreleriyle yaptığı sinapslarda ve neokortikal sinapslarda uzun süreli depresyonun (LTD) indüklenmesi için de gereklidir (144).

Metabotropik glutamat reseptörleri yedi transmembran domainden oluşan G proteinine bağlı reseptörlerdir. Sekiz ayrı gen ile kodlanan domainler (mGluR1-8) homodimer formundadır. GluR1 memeli MSS'inde en fazla bulunan metabotropik reseptördür. Bu reseptörler iki ayrı nöronal depolarizasyona neden olur. İlki hücre içi kaynaklardan salınan kalsiyumla ilişkili hızlı ve geçici bir depolarizasyon tipi iken, diğeri TRP kanallarının aktivasyonu sonucu oluşan uzamış ve daha büyük depolarizasyon tipidir (145).

Depo Kontrollü Kalsiyum Kanalları

Voltaj ve reseptör kontrollü kalsiyum kanallarının varlığı uzun yıllardır bilinmesine rağmen DKKK'nın moleküler tanımlamaları ve mekanizmaları 2006

yılından itibaren saptanmaya başlanmıştır. Bu kanallar endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımıyla aktif hale gelirler. Başlangıçta bu kanalların uyarılabilir olmayan hücrelerde bulunduğu düşünülse de sonradan nöron ve iskelet kası gibi hücre tiplerinde de varlığı tespit edilmiştir. DKKK'ların hücre içi kalsiyum depolarının yeniden dolmasını sağlayan bir aracı mekanizmayı oluşturduğu düşünülmektedir. Ancak son bulgular, bu kanallardan kaynaklanan kalsiyum girişinin spesifik sinyal yolaklarını da aktive ettiğini göstermiştir (146).

Moleküler yapı olarak DKKK, EF-el benzeri kalsiyum bağlayıcı transmembran protein ailesine aittir. İki farklı izoformu bulunur. Bunlar transmembran stromal etkileşim molekülü-1 ve 2'dir (STIM1-2) ve endoplazmik retikulum içinde bulunur. STIM1 ve STIM2 kalsiyum sensörü olarak işlev görür. STIM, plazma membranındaki ORAI alt birimlerinin oluşturduğu DKKK ile bağlantılıdır. ORAI protein ailesi 3 izoforma sahiptir ve ORAI1 kanalın por yapısını oluşturan alt birimdir (147, 148).

2.2.1.2. Hücre Organellerine Bağlı Kalsiyum Düzenlenmesi

Sitoplazmadaki kalsiyum seviyesinin belirlenmesinde bazı organeller oldukça önemlidir. Özellikle endoplazmik retikulum, büyük kalsiyum tamponlama kapasitesi nedeniyle hücre içindeki ana kalsiyum deposu olarak kabul edilir. Kalsekuestrin ve kalretikulin gibi kalsiyum bağlayan proteinler endoplazmik retikulum içerisinde kalsiyumun yoğunlaştırılmasına katkı sağlar (112). Endoplazmik retikulum içerisindeki kalsiyum iyon konsantrasyonu milimolar düzeyinde bulunmaktadır. Endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımı riyanodin reseptörleri (RyR) ve inositol-1,4,5-trifosfat reseptörleri (IP_3R) olarak adlandırılan iki tip reseptör aracılığıyla gerçekleşmektedir. IP_3R pek çok hücre tipinde yaygınken, RyR özellikle nöron ve iskelet kaslarında daha fazla bulunur. IP_3R'den kalsiyum salınımı G proteinine bağlı reseptörlerin aktivasyonu sonucu oluşan ikinci haberci IP_3'ün bağlanmasına bağlı olarak gerçekleşirken, RyR'lerinde ise kalsiyum salınımı sitoplazmadaki kalsiyum artışıyla olur. Bu nedenle RyR'inden kalsiyum salınımı için "kalsiyuma bağımlı kalsiyum salınımı" tanımlaması yapılır (149).

IP_3R üç farklı gen bölgesinde kodlanmaktadır. IP_3R1 özellikle beyin ve düz kaslardan yaygın olarak eksprese edilen dominant izotiptir. IP_3R3 de beyinin yanısıra sindirim kanalında oldukça fazla eksprese edilir. Reseptörün etkinliği kalsiyum, ATP ve protein kinaz A fosforilasyonu ile kontrol edilir. Kalsiyum iyonu IP_3R aktivitesini

iki yönlü olarak etkileyebilir. Hücre içi konsantrasyonuna bağlı olarak hem uyarıcı hem de baskılayıcı etki gösterir (150). Hücre içi kalsiyum 300 nM seviyesine kadar IP_3R'lerini güçlü şekilde uyarırken, daha yüksek değerlerde baskılayıcı etki gösterir. Kalsiyuma bağlı inhibisyonun sitozolik kalsiyum sinyalinin sonlanmasına katkı sağladığı tahmin edilmektedir (151).

Riyanodin reseptörleri de üç farklı gen bölgesinde kodlanmaktadır. RyR1 iskelet kası ve beyinde eksprese olmaktadır. RyR2 beyinde (özellikle serebellumda) baskın olarak bulunurken, RyR3 hipokampus, striatum ve diensefalonda en fazla olmak üzere farklı beyin bölgelerinde yer almaktadır (152).

Kalsiyumun tekrar endoplazmik retikuluma geri depolanması P tipi Ca^{+2} ATPaz (SERCA) pompaları aracılığıyla gerçekleşir. Böylece hücrenin uyarılması sonucu oluşan geçici kalsiyum artışı plazma membranındaki NCD ve PMCA kanaları ile birlikte endoplazmik retikulumdaki Ca^{+2} ATPaz sayesinde tekrar istirahat değerlerine hızlıca döner (153).

Mitokondri, hücre içi kalsiyum sinyalini düzenleyen önemli öğelerden birisidir. Kalsiyum, mitokondrinin enerji sağlama süreçlerinde ATP üretim kabiliyetini düzenler. Mitokondrial matrikste kalsiyum seviyesinin artması sitrik asit döngüsündeki piruvat deoksijenaz, izositrat dehidrojenaz ve α-ketoglutarat dehidrojenaz enzimlerinin aktivitesini arttırır. Ayrıca kalsiyum F_1F_0-ATPaz'ın çalışmasını ise doğrudan düzenler (154). Mitokondri membranındaki mitokondrial kalsiyum uniporter kanalları matrikse kalsiyum girişini sağlar. Bu uniporterların çalışması solunum zincirindeki aktivitenin oluşturduğu negatif membran potansiyeli ile kontrol edilir (155). Mitokondrial NCD, mitokondriden kalsiyum atılımını sağlar. Ayrıca mitokondriden kalsiyum çıkışı mitokondrial permeabilite transizyon poru (mPTP) aracılığıyla da gerçekleşir. Mitokondrinin bir diğer kritik fonksiyonu apoptotik hücrelerde tanımlanmıştır. Mitokondrideki kalsiyum seviyesinin belirli bir eşik değeri aşması halinde mitonkondri membranında bulunan mPTP aktive olur. mPTP'nin aktive olması ile apoptotik indükleyici faktör ve sitokrom c gibi bazı faktörlerin etkinliği sonrasında apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (156).

2.2.2. Kalsiyum Sinyalizasyonu

Kalsiyum sinyali fertilizasyon, sekresyon, kas kasılması, metabolik kontrol, öğrenme-hafıza süreçleri ve hücre ölümü gibi yaşamın her adımında önem arz

etmektedir. Nöronlarda ise elektriksel uyarılma, nörogenez, nöronal farklılaşma, aksonal gelişme, dentritik organizasyon ve sinaptik plastisite gibi süreçleri kontrol etmektedir. Ayrıca bazı durumlarda nöronal ölüme kritik ölçüde katkı sağlamaktadır (157). Kalsiyum iyonu ve sinyali ikinci haberci olarak proteinlerin fosforilasyonu veya degradasyonunu kontrol eder. Moleküler seviyede kalsiyum sinyali mRNA'ların transkripsiyonu ve posttrankripsiyonel modifikasyonlarında, translasyon ve proteinlerin translasyon sonrası regülasyonlarında rol oynamaktadır (158).

2.2.3. Kalsiyumun Fizyolojik İşlevleri

Kalsiyum iyonu canlı sistemlerde fertilizasyondan başyalarak hücrelerin farklılaşması ve ölümüne kadar her aşamada önemli roller oynamaktadır (149).

Kas kontraksiyonundaki rolü kalsiyum iyonunun ilk keşfedilen hücresel fonksiyonlarından birisidir. Kaslarda aksiyon potansiyeli sonrası sarkoplazmik retikulum başta olmak üzere kalsiyum kaynaklarından sitoplazmaya kalsiyum girişi olur. Çizgili kaslarda kalsiyum, troponin molekülü ile etkileşerek aktin ve miyozin miyofilamentleri arasındaki tropomiyozin engelini kaldırılarak kasılmaya ilişkin süreci başlatmış olur. Düz kaslarda mekanizma farklı olsa da kalsiyum iyonu kalmodulin ile kompleks oluşturarak miyozin hafif zincir kinaz enzimini aktifler ve kasılma sürecini başlatır (159).

Hemostaza ilişkin süreçte kalsiyum iyonu pek çok basamakta görev almaktadır. Trombosit aktivasyonu, trombositlerin damar çeperine yapışması ve trombosit tıkacının oluşmasında kalsiyum iyonu olmazsa olmaz faktörlerden birisidir. Yapılan araştırmalar trombositlerin subendotelyel tabakaya tutunabilmesi için von Willebrand faktörle birlikte kalsiyumun da ortamda bulunması gerektiğini göstermiştir (160). Trombositlerde hücre içi kalsiyumun artışı hücrenin metabolizması ve salgılanan aktif maddelerin üretimini etkiler (161). Pıhtılaşma sürecine baktığımızda ise çok sayıda pıhtılaşma faktörünü oluşturan reaksiyonlarda kalsiyum kofaktör olarak görev yapmaktadır (162).

Fertilizasyonda yumurtanın aktive olması sitozolik kalsiyum seviyesinin yükselmesine bağlıdır. Lokal olarak gerçekleşen Ca^{+2} girişi yumurta hücresinde depolarizasyona sebep olur. Membranda oluşan depolarizasyon yumurta hücresinin sperm ile etkileşimine imkân sağlar (163).

Tüm nöronlarda kalsiyumun oldukça önemli işlevleri bulunmaktadır. Hücrenin uyarılabilirliğini doğrudan etkileyen kalsiyum, aksiyon potansiyelinin başlatılması ve oluşumunda sodyum ile birlikte görev yapmaktadır. Potasyum iyonu genellikle hücrenin repolarizasyonunu sağlar. Sinir terminallerinde sitozolik kalsiyum artışı transmitter içeren veziküllerin membrana yaklaşması ve ekzositozunda görev alır. SNARE proteinlerinin transmitterlerin ekzositozunda yürüttüğü işlevlerin önemli kısmı kalsiyum iyonuna bağımlı olarak gerçekleşir (164, 165). Sinaptik transmisyondaki görevi kalsiyum iyonunu nöronal plastisitede önemli kılmaktadır. Sinapstan salınan transmitter miktarı, aktif zon büyüklüğü ve postsinaptik reseptör yoğunluğu gibi plastisite ile doğrudan ilişkili süreçlerde kalsiyum iyonu görev alır (166).

Hücre içi kalsiyum seviyesinin gen ekspresyonunu etkilediği yıllardır bilinmektedir. Kalsiyumun gen ekspresyonu üzerindeki etkisi ilk olarak hücre kültüründe ekstra kalsiyum yüklenmesi ile birlikte prolaktin gen ekspresyonunun 200 kat arttığının gözlenmesi sonucu tespit edilmiştir (167). MSS'de kalsiyuma- bağımlı transkripsiyon kontrolü dentritik morfogenezi ve sinaptik modifikasyonları gerektiren proteinlerin oluşumunu etkilemektedir. Gen regülasyonuna ilişkin kalsiyumun görev aldığı yolaklar arasında en iyi karakterize edileni kalmodulin ve kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz (CaMK) sistemidir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu arttığında kalsiyum kalmodulinle birleşerek CaMK kompleksini oluşturur. CaMK özellikle CaMKIV ve CaMKII, oldukça kritik öneme sahip bir transkripsiyon faktörü olan cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteinini (CREB) fosforile eder (168).

Embriyonik nöron kültüründe CREB fosforilasyonu özellikle voltaj kapılı L tipi kalsiyum kanallarından kaynaklanan kalsiyum girişiyle mümkün olurken, NMDA reseptörlerinden kaynaklanan kalsiyum girişi CREB'de geçici bir fosforilasyon sağlayabilir. CREB'in transkripsiyonel aktivitesi ayrıca protein kinaz A (PKA) ve Ras/mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) gibi kalsiyum sinyaline bağımlı yolakları da düzenlemektedir. CREB, nörogenez ve sinaptik plastisitede kritik rol oynayan beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) aktivasyonuna da katkı sağlar. Protein kinazlara ilave olarak kalsinörin gibi protein fosfatazlar da Ca^{+2} indüklü gen regülasyonuna katkı sağlamaktadır. Sonuç olarak kalsiyum gen ekspresyonunu doğrudan transkripsiyonel faktörlere bağlanarak etkilemektedir (113).

Protein fosforilasyonu, serin/treonin (Ser/Thr) veya tirozin köklerini modifiye eden enzimatik reaksiyonlardır. Birçok Ser/Thr tipi protein kinaz ve Ser/Thr protein fosfataz kalsiyum tarafından regüle edilmektedir. Protein kinaz C (PKC) haricinde genellikle bu kinazların etkinliği kalmoduline kalsiyumun bağlanmasıyla düzenlenir. CaMKII nöronlarda bolca bulunur. Postsinaptik dentritlerde sinaptik fonksiyonların ve plastisitenin oluşumunda kritik öneme sahiptir. CaMKII ayrıca hipokampal CA1 bölgesinde uzun süreli potansiyalizasyona sebep olan Thr286'nın otofosforilasyonunu modüle ederek öğrenme ve hafıza gibi hipokampusla ilişkili davranışların gelişimine de katkı sunar (169). CaMKII, AMPA ve NMDA reseptörlerini içeren çok fazla sayıda sinaptik proteinin fosforilasyonundan da sorumludur. PKA ve PKC gibi diğer kinazlar da sinaptik plastisiteyi etkilemektedir. Atipik PKC izoformunun (PKCζ) inhibisyonu sadece LTP'yi engellemekle kalmayıp var olan hafızanın da kaybolmasına neden olmaktadır (170).

Kalsiyum iyonunun hücre içinde aşırı düzeyde bulunması toksik etki gösterebilir ve hücre için apoptoz gibi süreçleri başlatabilir. Hücre hasarına sebep olan çoğu durumda plazma membranı üzerinden aşırı kalsiyum girişi gerçekleşmektedir. Bu aşırı kalsiyum girişi bazı hidrolitik enzimleri (başta proteazlar) etkileyen sinyal yolaklarında kalıcı aktivasyona sebep olur ve nihayetinde hücrelerde geri dönüşümü olmayan hasar gelişir (171). Hücrelerin ölümü her zaman spontan veya patolojik bir sürecin indüklemesiyle gerçekleşmez, doğal bir süreçle ve programlı bir şekilde de gerçekleşebilir. Kapsamlı bir moleküler süreç olan apoptozda Ca^{+2}, düşük ağırlıklı Ca^{+2} bağımlı nükleazlar, DNaz-I, kalsiyumla aktive olan tiyol proteaz, kalpain enzimleri üzerinden görev alır (172).

2.2.4. Hücre İçi Kalsiyum Seviyesinin Tespiti

Kalsiyum iyonunun hücre içinde yürüttüğü farklı fonksiyonlara ilişkin süreç transmitter salınımında mikrosaniyeler ölçeğinde iken, gen ekspresyonunda dakikalar hatta saatleri bulabilir (173). Zaman dilimi, amplitüdü ve hücresel kompartmanlardaki lokal etkileri hücre içi kalsiyum sinyaline ilişkin fonksiyonlarının temel belirleyicileridir. Kalsiyum indikatörleri ve görüntüleme tekniklerinin gelişmesi ile birlikte hücre içi kalsiyum görüntülemeye ilişkin oldukça büyük aşama kaydedilmiştir. Hücre içi kalsiyum seviyesini belirleyen indikatörler iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar genetik kodlanan floresan proteinler ve kimyasal olarak geliştirilmiş florofor

boyalardır. Kalsiyum indikatörleri sadece difüzyona uğrayabilen serbest kalsiyum iyonlarına bağlanır. Hücredeki kalsiyumun büyük kısmı çeşitli kalsiyum tamponlarına bağlı olarak bulunur. Bağlı ve serbest kalsiyum arasındaki oran hücreye ve hücre içindeki kompartmana göre değişlik gösterir. Genelleme yapılacak olursa sitozolik kalsiyum 100:1 oranında tamponlanmaktadır. Yani her 100 kalsiyum iyonundan sadece biri serbest kalsiyumdur. Bu oran endoplazmik retikulumda 10:1 oranındadır (174, 175).

Kalsiyum görüntülemeye ilişkin tarihsel gelişim, iki alandaki gelişmelerle paralellik gösterir. Bunlardan ilki kalsiyum indikatörlerindeki gelişme, diğeri ise kullanılan ekipmandaki teknolojik ilerlemedir. Hücresel kalsiyum dinamiklerini incelemeye imkân sağlayan ilk kalsiyum indikatörlerinden birisi, aequorin gibi biyolüminesans kalsiyum bağlayıcı fotoproteinlerdir (176). Diğer kalsiyum indikatörü, kalsiyuma bağlı absorbans değişikliği gösteren sentetik bir bileşik olan arsenazo III'tür (177). Aequorin ve arsenazo III, kalsiyum bağımlı nöronal süreçlerin açıklanmasında erken dönemde önemli bilgilerin elde edilmesini sağlasa da boyanın hücreye verilmesindeki problemler nedeniyle bunların kullanımı zahmetli bir yöntemdi (178, 179). Kalsiyum görüntüleme alanındaki büyük ilerleme, Roger Tsien ve meslektaşları tarafından geliştirilen daha hassas ve çok yönlü floresan kalsiyum indikatörlerinin keşfiyle olmuştur (180). Bu indikatörler EGTA veya BAPTA gibi kalsiyum seçici şelatörler ile floresan kromoforların hibridizasyonu ile elde edilmiştir. İlk floresan kalsiyum indikatörler quin-2, fura-2, indo-1 ve fluo-3'dur. Biyolojik deneylerde ilk kullanılan, ultaviole ışıkla (339 nm) uyarılan quin-2'dir (181). Quin-2 belirgin bir parlaklığa sahip değildir ve hücrede floresan ışıma için yüksek kalsiyum konsantrasyonlarına ihtiyaç duymaktadır (182). Bu indikatör sınıfının diğer üyesi olan fura-2, quin-2'ye göre daha üstün özelliğe sahiptir ve sinir bilimciler arasında oldukça popülerdir. Fura-2, 350 ve/veya 380 nm dalga boyunda uyarılır ve gösterdiği kalsiyum bağımlı floresan değişimi quin-2'ye göre çok daha fazladır. Ayrıca fura-2'ye ilişkin uyarılma ışınları değiştirilip oranlanarak elde edilen sinyalden kantitatif kalsiyum ölçümü yapılabilmektedir (183). İlerleyen yıllarda geniş uyarılma spekturumuna sahip ve kalsiyum afinitesi fazla olan çok sayıda indikatör geliştirilmiştir. Oregon yeşili BAPTA ve fluo-4 boyaları bunlardandır (184). Bu boyalar uygulamadaki kolaylık ve yüksek sinyal/gürültü oranı sağlaması nedeniyle sinir bilimciler tarafından yaygın

şekilde kullanılmaktadır. Fluo-4 tek dalga boyu ile uyarılan bir boyadır. Parlak ve stabil ışınsal veri sağlamaktadır. Argon lazerde 488 nm'de eksitasyon oluşturmaktadır. Parlaklığının fazla olması ve kullanılacak boya konsantrasyonunun azalması fototoksik etkiyi azaltmaktadır. Bir diğer avantajı ise çok düşük arka plan absorbans göstermesinden dolayı düşük boya konsantrasyonuyla yüklenerek inkübasyon süresinin kısalmasıdır (185).

Kalsiyum görüntülemede bir sonraki büyük buluş yine Roger Tsien laboratuvarlarında protein bazlı genetik kodlu kalsiyum indikatörlerinin geliştirilmesi olmuştur. Genetik olarak kodlanan kalsiyum indikatörlerinin öncül tiplerinin kinetik yanıtlarının yavaş olması ve düşük sinyal/gürültü oranları gibi nedenlere bağlı olarak kullanım alanları oldukça kısıtlı olsa da ilerleyen yıllarda büyük gelişmeler kaydedilmiştir (186). Genetik kodlu kalsiyum indikatörlerinin iki önemli çeşiti ön plana çıkmaktadır. Bunlar Förster rezonans enerji transferi (FRET) ve tek florofordur. FRET uyarılmış donor florofor ile alıcı bir florofor arasındaki radyasyon olmayan enerji transferi ile gerçekleşmektedir (187). İki florofor arasındaki mesafe 10 nm'den az olmalıdır. İki molekül kalsiyum bağlayıcı bir proteinle (genellikle kalmodulin veya troponin) birbirine bağlanır. Kalsiyumun bağlı olmadığı durumda bir florofor belirli bir dalga boyunda (480 nm) ışıma yapar. Kalsiyum bağlanması sonucunda konformasyonel değişim floroforlar arasındaki mesafeyi azaltır ve diğer floroforun uyarılması gerçekleşir. Nihayetinde kalsiyum bağlandığında farklı dalga boyunda (530 nm) ışıma oluşarak hücre içindeki kalsiyumun değerlendirilmesine imkân sağlar. Örneğin ECFP ve Venüs proteininden oluşan YC 3.60, kalsiyumun bağlı olmadığı durumda mavi ışıma yaparken kalsiyum seviyesi arttıkça sarı renkte ışıma yapmaya başlar (188).

Floresan indikatörlerdeki gelişmeler yeni görüntüleme sistemlerindeki teknolojik ilerlemelerle birlikte gerçekleşmektedir. CCD (Charge-Coupled Device) kameraların video görüntüleme uygulamaları ve yüksek hızda konfokal mikroskop bu gelişmelerdendir (189). Floresan probların yüksek sinyal gücü görüntüleme teknolojilerindeki gelişmelerle birleşmesi, hücrelerdeki biyolojik süreçlerin gerçek zamanlı floresan görüntülenmesine imkân sağlamıştır. Bu alandaki temel ilerleme Winfried Denk ve arkadaşlarının iki-foton mikroskobunda yaptığı çalışmalarla gerçekleşmiştir (190). Bu kalsiyum görüntüleme tekniği sinir sistemi için de

kullanmıştır (191). Kalsiyum görüntüleme yapılan düzenekler genellikle kalsiyum inditakör boyalarını uyaracak belirli bir ışık kaynağı ile ışık algılayıcı sensörün bir mikroskopla birleştirilmesinden meydana gelmektedir. Işık kaynağı, uyarım dalga boyunun kolayca değiştirilebildiği cıva veya ksenon lambalardır. Eksitasyon ve emisyon ışınları genellikle dikroik aynalar tarafından mikroskop içinde konumlandırılır. Kalsiyum görüntüleme fotodiyot dizilerinin yanısıra yoğunlaştırılmış video kamera (yüksek hızlı kamera), CCD tabanlı kameralar ve tamamlayıcı metal oksit yarı iletken (CMOS) tabanlı kameralar kullanılarak gerçekleşir (192). Klasik fotodiyot dizileri, fotodiyot setlerinden meydana gelir ve her fotodiyot bir pikseli temsil eder. Fotodiyot dizileri çok yüksek dinamik aralık ve yüksek hızla fakat zayıf spasyal çözünürlükle karakterizedir. CCD temelli kameraları bir çip üzerine yoğun bir şekilde paketlenmiş fotodiyot dizilerinden oluşur. Klasik fotodiyot dizilerinin aksine CCD tabanlı kameralar seri sinyal okuma özelliğine sahiptir. Modern CCD tabanlı kameralar yüksek spasyal ve temporal çözünürlüğe sahipken her piksel seviyesindeki gürültü yüksektir. Derin beyin kısımlarındaki nöronlar görüntülendiğinde kontrast ve çözünürlük kalsiyum görüntüleme için oldukça sınırlı olduğu için bu teknikler özellikle nöron kültürü gibi *in vitro* kullanımlar için daha elverişlidir (193). Daha derin nöronların kalsiyum görüntülemesini yapabilmek için genellikle konfokal ve iki-foton mikroskobu kullanılır. Lazer tarama mikroskobu, lazer ışınlarının örneği taramasıyla görüntü elde eder (194). Konfokal mikroskop tek foton uyarımı yaptığından örnek alt ve üst plandan aydınlatılır ve bu durum görüntülenmeyen alanlarda ışın hasarına sebep olabilir. Konfokal mikroskoptaki ışın hasarı nöron kültüründe hücreleri etkileyebileceğinden *in vitro* uygulamalarda kullanımından kaçınılır. Çok fazla sayıda küçük delikten oluşan diskin dönmesi prensibi ile çalışan spinning disk tabanlı konfokal mikroskobun kullanımı, bazı çalışmalar için ışın hasarından korunmak adına daha uygundur. Her bir delikten süzülen ışın ayrı bir konfokal açıklık oluşturur ve CCD tabanlı kameralar kullanarak lazer tarama konfokal mikroskobuna göre daha yüksek frekanslı görüntüler elde edilir (195).

2.3. Epilepsi

Epilepsi toplumda %1 oranında görülen nörolojik bir hastalıktır. Sadece ABD'de yaklaşık 2,5 milyon insan epilepsi ve epileptik nöbetlerden etkilenmektedir. İnsidansı çocuklarda ve yaşlılarda daha yüksek olmak üzere yaş grubuna göre U şekilli

bir grafik ile karşımıza çıkmaktadır. Çocuklardaki yüksek oran gelişimsel faktörlerken, ileri yaşlarda malignite ve serebrovasküler hastalıklardan kaynaklanır (196). Yine ABD'de epilepsi ve nöbetlerinin toplam maliyeti doğrudan ve dolaylı olarak yılda ortalama 12,5 milyar dolar civarındadır ve her yıl yeni 200 000 yeni vaka teşhisi konulmaktadır (197).

Epilepsi, kronik ve ön görülemeyen epileptik nöbetlere yol açan ve ikincil olarak da nörobiyolojik, kognitif, psikolojik ve sosyal sonuçları olan beyin rahatsızlığıdır (198). Bütün çalışmalar genel popülasyonla karşılaştırıldığında epilepsili kişilerin ölüm riskinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Epilepside ani beklenmedik ölüm (sudden unexpencted death in epilepsy (SUDEP)), status epileptikus, intiharlar ve epileptik nöbetlerin sebep olduğu kazalar ölüm riskini arttıran temel faktörlerdir (199). Çoğu hastada epilepsinin nedeni bilinmemesine rağmen epileptik nöbetler beyin fonksiyonlarını etkileyen tüm durumlarda ortaya çıkabilir. Bu durumlar arasında travma ve inme gibi beyin hasarları, enfeksiyon, otoimmün hastalıklar ve genetik mutasyonlar sayılabilir (200).

Epileptik nöbet, beyindeki nöronların anormal, aşırı ve senkron aktivitesi sonucu oluşan objektif emareler veya subjektif semptomlar (bilincin kaybolması, his değişimleri, ani kasılmalar veya tonik katılık vs.) gösteren kısa süreli klinik bir durumdur. Epileptik nöbetler fokal, jeneralize veya bilinmeyen bir tarzda başlayabilir. Nöbetin başlangıç şekli özellikle nöbet tipini sınıflandırmada oldukça önemlidir. Nöbetler klinik bulgular, EEG ve nörogörüntüleme teknikleri kullanılarak sınıflandırılabilir (200).

Epilepsi tedavisinde çeşitli seçenekler bulunmaktır. İlk basamak tedavi stratejisi antiepileptik ilaç kullanımıdır. Antiepileptik tedavinin amacı nöbetleri kontrol altına almak ve oluşumunu engellemektir. Epilepsi hastalarında büyük oranda başarılı olan antiepileptikler, 1/3'lük kesimde nöbetleri kontrol altına alamamaktadır. İlaca dirençli bu kişilerde ise epilepsinin etiyolojisine bağlı olarak cerrahi, nörostimülasyon ve diyet gibi diğer tedavi süreçleri uygulanmaktadır. Dirençli epilepsi, hastanın erken ölüm riskini arttırır. Ayrıca hayat kalitesinde, bilişsel ve ruhsal durumununda bozulmaya yol açabilir (201, 202).

2.3.1. Epilepsinin Epidemiyolojisi

Epilepsi nörolojik hastalıklar içerisinde küresel hastalık yüküne üçüncü büyük katkıyı sağlamakta ve dünya çapında 65 milyon insanı etkilemektedir (203). Epilepsinin prevalansı 1000 kişide 6,4 ve yıllık insidansı 100 000 kişide 67,8 vakadır. Hem prevelans hem de insidans düşük ve orta gelirli ülkelerde yüksek gelirli ülkelere göre daha yüksektir (204). Düşük ve orta gelirli ülkelerde böylesine bir farkın oluşmasının nedeni bu ülkelerde görülen trafik kazalarının, doğumsal hasarların ve nöroenfektif hastalıkların daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (205). Genel olarak epilepsi yapısal, genetik, enfeksiyöz, metabolik, immün ve nedeni bilinmeyen etiyolojilere bağlı olarak gelişir (206). İnsidans ve prevelansda cinsiyet bakımından anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Ancak bazı çalışmalarda erkeklerde epilepsinin daha yaygın görüldüğü bildirilmektedir. Bunun nedeni, bölgesel olarak toplumdan soyutlanma ve evlilikte sorun yaşama gibi durumlara bağlı olarak kadınlara ilişkin veri girişinin daha düşük seviyede kalmasıdır (207).

2.3.2. Epilepsinin Sınıflandırılması

Epilepsi tipi ve etiyolojisinin belirlenmesi, seçileçek tedavi stratejisi ve hastalığın seyri açısından oldukça önemlidir. Epilepsinin sistematik sınıflandırılmasına ilişkin başlangıç 1909'da Uluslararası Epilepsi ile Savaş Ligi'nin (International League Against Epilepsy- ILEA) kuruluşuna kadar uzanır. 1960'larda Henri Gastaut ilk sistematik epilepsi sınıflandırmasını yapmıştır (208). Uzun süren tartışmalar ve yeni bilgilerin elde edilmesiyle 1985'de ILAE "Epilepsiler ve Epileptik Sendromların Sınıflandırılması" başlığıyla epilepsi sınıflandırması hususunda önemli bir eser yayımlamıştır (209). Bu sınıflandırma 1989'da revize edilmiş ve uzun yıllar geçerliliğini korumuştur (210). Son olarak epilepsi sınıflandırmasına ilişkin güncelleme 2017 yılında ILAE tarafından oluşturulan komisyonca yapılmıştır (Şekil 2.4 ve 2.5; 206). Epilepsinin sınıflandırılması dinamik bir süreç olup, konuya ilişkin bilgi ve tekniklerin gelişmesine paralel sınıflandırmalar da revize edilmektedir.

Epilepsi geçirilen nöbetlerle karakterize bir hastalık olduğu için sınıflandırmanın ilk adımı nöbet tipinin epileptik mi yoksa nonepileptik nöbet mi olduğuna karar vermektir. Sonrasında nöbet tipinin ait olduğu sınıf belirlenir. Nöbet tipinin belirlenmesinin ardından epilepsi tipi ve eğer mümkünse epileptik sendromun teşhisi hastanın semptomları, EEG ve nörogörüntüleme bulguları kullanılarak yapılır.

Sınıflandırma yapılırken her basamakta hastalığın etiyolojisi ve komorbid durumlar birlikte değerlendirilir (Şekil 2.5).

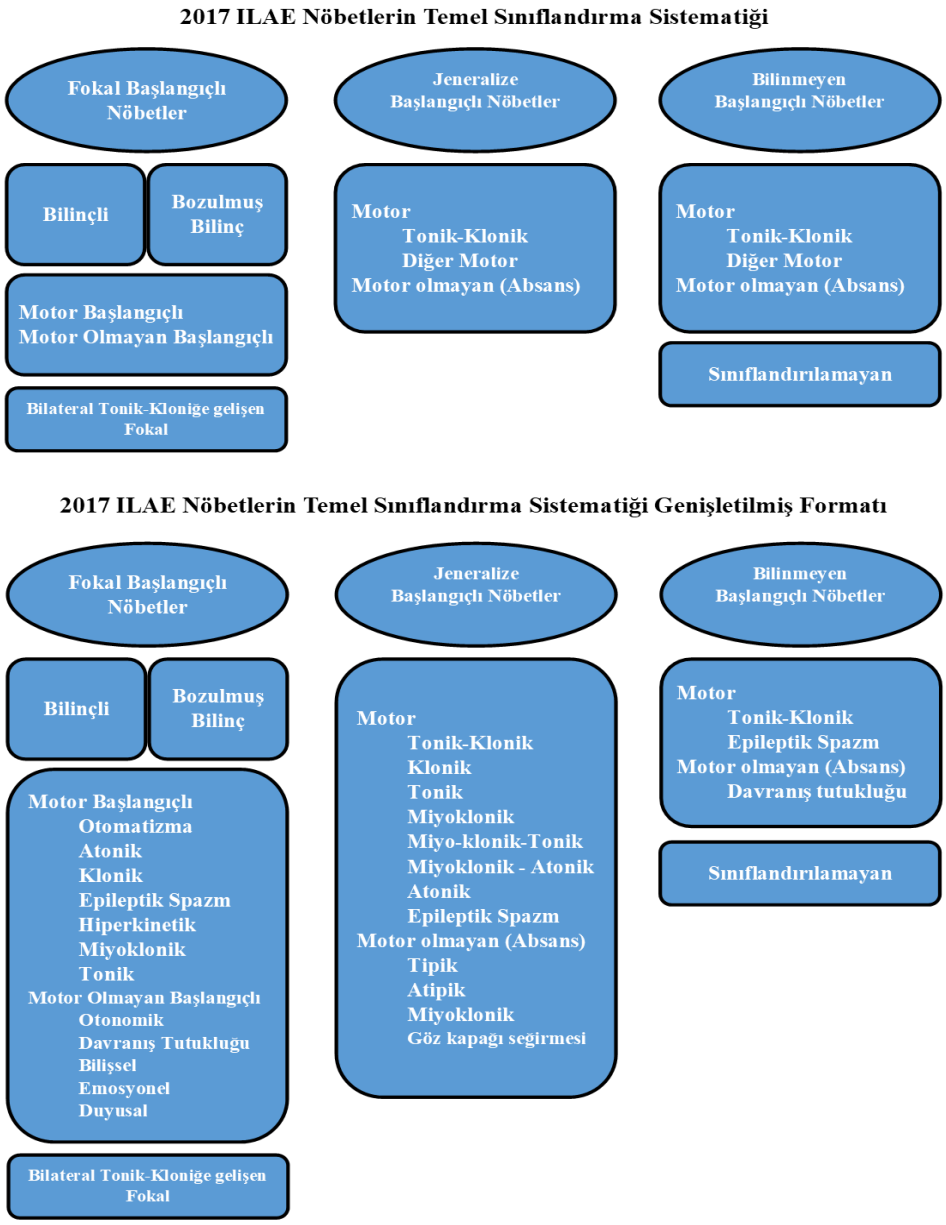
2.3.2.1. Nöbetlerin Sınıflandırılması

Nöbetlerin sınıflandırılması Hipokrat'a kadar dayanmaktadır. Önceleri nöbetler yaşa spesifik olarak ve beyin gelişimi baz alınarak sınıflandırılmaktaydı. Sonrasında anatomik temelli sınıflandırma yapılarak temporal, frontal, pariyetal, oksipital, diensefalik veya beyin sapı nöbetleri şeklinde gruplara ayrılmıştır. Epilepsinin patofizyolojisi hakkında bilgiler arttıkça hastalığın sadece lokal beyin anormalliğinden kaynaklanan semptomlar değil, bir nöronal ağ hastalığı olduğu anlaşılmıştır (211). Bu nedenle nöbetlerin neokortikal, talamokortikal, limbik ve beyin sapı nöronal ağında yer alan anormalliklerden kaynaklandığı düşünülmüştür (212). 1981 yılında ILAE komisyonu, nöbetlerde çekilen yüzlerce video-EEG'yi değerlendirerek nöbetleri parsiyel ve jeneralize başlangıçlı, basit ve kompleks parsiyel nöbetler ve çeşitli spesifik jeneralize nöbetler şeklinde sınıflandırmıştır (213). Bu sınıflandırma günümüzde hala geçerliliğini yaygın olarak korusa da 2017 yılında hazırlanan yeni raporda nöbetler sadece davranışsal değerlendirmeye bağlı kalarak değil klinik, etiyoloji ve diğer bazı veriler kullanılarak da sınıflandırılmaktadır.

Epileptik nöbetlere ilişkin sınıflandırma Şekil 2.4'ün üst kısmında ve genişletilmiş sınıflandırma ise alt kısmında şematize edilmiştir. Nöbetlerin sınıflandırılması, nöbetin fokal veya jeneralize olarak oluştuğu tespiti ile başlamaktadır. Fokal başlangıç beynin bir veya daha fazla odak noktasında doğan ve hemisferde sınırlı kalan nöbetlerdir. Jeneralize nöbetler ise beynin her iki hemisferine de yayılan nöbetlerdir. Eğer nöbetin başlangıcı saptanmadı veya ayırt edilemediyse "bilinmeyen başlangıç" olarak tanımlanmaktadır (10).

Fokal epilepsiler için bilinç seviyesi opsiyonel olarak nöbet tipine dahil edilebilir. Bilincin kaybolmadığı veya bilinç seviyesinde bir değişimin olmadığı nöbetler bilinçli fokal nöbet olarak da tanımlanmaktadır. Bilinçli fokal nöbet önceki sınıflandırmadaki basit parsiyel nöbete karşılık gelmektedir. Nöbetin herhangi bir döneminde bilinçte oluşan bozulma, o nöbetin bilincin bozulduğu fokal nöbet sınıfına dahil edilmesini sağlar. Bilincin bozulduğu bu fokal nöbetler 1981 yapılan sınıflandırmadaki kompleks parsiyel nöbetlerin karşılığıdır. Ayrıca fokal nöbetler, başlangıçta motor veya motor olmayan işaret ve semptom göstermelerine göre de alt

gruplara ayrılmaktadır. Eğer motor ve motor olmayan belirtiler nöbetin başlangıcında eş zamanlı görülüyorsa motor belirtiler daha belirgin olacaktır. Bilinçli ve bilinç bozulmuş fokal nöbetler motor veya motor olmayan başlangıçlı nöbetler olarak da sınıflandırılmaktadır. Nöbetin başlangıç lokasyonuna göre sınıflandırma anatomik temelli iken bilinç durumundaki değişime göre yapılan sınıflandırma davranış temellidir. Her iki metot da sınıflandırmada kullanılabilir. Fokal nöbet ismi bilinç durumu tespit edilemediğinde veya bilinmediğinde doğrudan motor veya motor olmayan başlangıçlı nöbet tipiyle tanımlanabilir (10).



Şekil 2.4. ILAE tarafından 2017 yılında yapılan nöbet tiplerine ilişkin sınıflandırma

1981 yılında yapılan sınıflandırmada fokal başlangıçlı sekonder jeneralize nöbet olarak tanımlanan başlangıçta fokal bir odaktan başlayan nöbet aktivitesi bilateral olarak tüm beyine yayılmaktadır. Bu nöbet tipi 2017 sınıflandırmasında "fokalden gelişen bilateral tonik-klonik nöbetler" olarak özel ayrı bir kategoride ele alınmıştır (10).

Jeneralize nöbetler motor ve motor olmayan (absans) nöbetler olarak ikiye ayrılmaktadır. Jeneralize nöbetlerin alt grupları temelde 1981 sınıflandırmasıyla büyük oranda benzerlik gösterir. Sınıflandırmanın son versiyonuna miyoklonik-atonik nöbetler (Doose sendromu; 214), miyoklonik-tonik-klonik nöbetler (juvenil miyoklonik epilepside yaygın; 215), miyoklonik absans nöbetler (216) ve göz kapağı miyoklonisi ile karakterize absans nöbetlerde (Jeavons sendromu; 217) ilave edilmiştir.

Bilinmeyen başlangıçlı nöbetler, nöbetin başlangıcının ayırt edilemediği veya henüz sınıflandırılması yapılmamış epilepsi tipleri için kullanılan bir terim olmuştur (10).

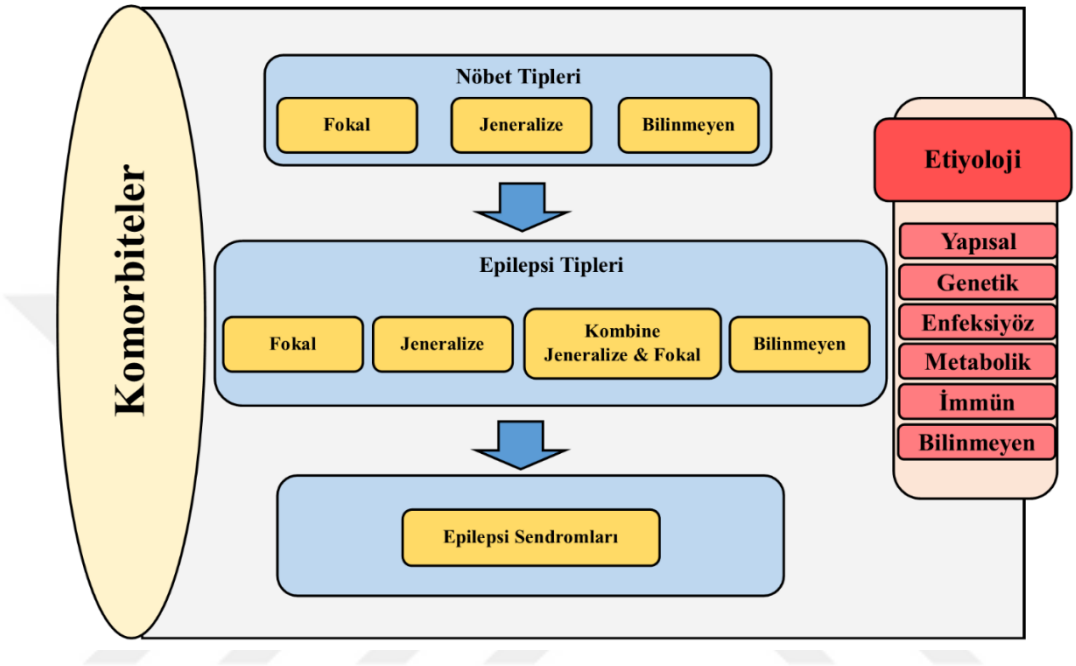
2.3.2.2. Epilepsilerin Sınıflandırılması

Epilepsi hastalığının sınıflandırılmasında kullanılan üç basamaktan ikincisi epilepsi tipinin belirlenmesidir (Şekil 2.5). Epilepsiler dört gruba ayrılmıştır. Bunlar fokal epilepsi, jeneralize epilepsi, kombine fokal-jeneralize epilepsi ve bilinmeyen epilepsidir. Epilepsi tiplerinde farklı nöbet fenotipleri görülebilir. Jeneralize epilepsili bireylerde absans, miyoklonik, atonik, tonik ve tonik-klonik gibi nöbetler meydana gelebilir. Jeneralize epilepsinin teşhisi, klinik zeminde EEG bulgularının desteklemesiyle yapılır. Jeneralize epilepside hastanın EEG'sinde tipik jeneralize diken-dalga aktivitesi göstermelidir.

Fokal epilepsiler, beynin bir hemisferinde sınırlı kalmak kaydıyla unifokal veya multifokal bozukluklardır. İnteriktal EEG'de tipik olarak epileptiform aktivite deşarjları gözlenir. Tıpkı jeneralize epilepside olduğu gibi fokal epilepside de klinik öykü eşliğinde EEG bulgularıyla teşhis konulur. Epilepsilerin sınıflandırılmasında yeni olan kombine fokal-jeneralize tipi hem fokal hem de jeneralize nöbetlerin birlikte görüldüğü epilepsi tipidir. Bu epilepsi tipinde iktal kayıt olmazsa olmaz değildir ancak teşhise oldukça yardımcı olur. İnteriktal kayıtlarda ise hem jeneralize diken-dalgalar hem de epileptiform aktivite deşarjları görülebilir (epileptiform aktiviteye ilişkin

deşarjların görülmesi teşhis için şart değildir). Dravet ve Lennox-Gastaut sendromlarında bu tip epileptik nöbetler görülmektedir.

Bilinmeyen epilepsi tipinde ise hekim bireyin epilepsi olduğunu anlar ancak epilepsi tipini ulaşılan yetersiz veriler nedeniyle sınıflandıramaz (10).



Şekil 2.5. ILAE tarafından 2017 yılında yapılan epilepsi tiplerine ilişkin sınıflandırma

2.3.2.3. Epilepsi Sendromlarının Sınıflandırılması

Epilepsi sınıflandırmasında üçüncü basamak epilepsi sendromlarının belirlenmesidir. Epilepsi sendromu nöbet tipleri, EEG ve beraberinde ortaya çıkma eğilimindeki bir dizi özellik anlamına gelir. Yaşa bağımlılık (nöbetin oluşma zamanı), nöbeti tetikleyen unsurlar, diurnal varyasyon, komorbiditeler, EEG ve görüntüleme bulguları, tedavi yanıtları, etiyoloji ve bazen prognoz epilepsi sendromlarının belirlenmesinde kullanılır (209, 210).

2.3.3. Epilepsinin Etiyolojisi

Hastanın ilk nöbet geçirdiği andan itibaren hekimin amaçlarından birisi, bireyin epilepsisinin altında yatan etiyolojiyi belirlemektir. Etiyolojinin belirlenmesi hastaya uygulanacak tedavinin seçiminde önem arzetmektedir. Çok sayıda etiyolojik grup tanımlanmıştır. Özellikle yapısal etiyolojinin teşhisinde nörogörüntüleme (MR gibi) teknikleri kullanılmaktadır. Yapısal etiyolojiye ilaveten genetik, enfeksiyöz, metabolik ve immün etiyolojilerle birlikte bilinmeyen etiyoloji grubu da

bulunmaktadır. Hastadaki epilepsi birden fazla etiyolojiden kaynaklanabilir. Etiyolojiler arasında hiyerarşi yoktur ve hangi etiyolojinin önemli olduğu şartlara göre değişir. Yapısal etiyoloji epilepsi cerrahisi bakımından önemli iken, genetik etiyoloji memelilerde mTOR inhibitörü olan rapamisin gibi yeni terapi seçeneklerinin düşünülmesine ve rehberlik etmesinde anahtar rol oynamaktadır (10).

2.3.3.1. Yapısal Etiyoloji

Yapısal etiyolojide epileptik nöbetlere neden olan yapısal anormallik, görüntüleme teknikleri ve elektrofizyolojik değerlendirmeler neticesinde tespit edilebilmektedir. Yapısal etiyolojiler inme, travma, enfeksiyon veya genetik (örneğin kortikal gelişim bozukluğu) unsurlardan kaynaklanabilir. Böylesi bozukluklar genetik temelli olsa bile yapısal bir anormallik oluşturduğundan etiyolojik açıdan bu sınıfta değerlendirilebilir (218,219). Yapısal etiyolojiler ile epilepsiler arasındaki ilişki iyi tanımlanmıştır. Bu duruma örnek olarak mesial temporal lop nöbetleri ile hipokampal sklerozun sıklıkla birlikte görülmesi verilebilir. Hipotalamik hamartom ile gelastik nöbetler, Rasmussen Sendromu ve hemikonvulsiyon-hemipleji epilepsi sendromu yapısal etiyolojilerle ilişkisi olan diğer örneklerdir. Yapısal anormalliklerin nedeninin başka faktörlerden kaynaklanmasına örnek olarak, polimikrogiri GPR56 gibi genlerin mutasyonundan veya intrauterin sitomegalovirus enfeksiyonundan kaynaklanan epilepsiler verilebilir (220).

2.3.3.2. Genetik Etiyolojiler

Epilepsinin genetik temeli, hastalığın ana semptomu nöbet olan bilinen veya tahmin edilen genetik mutasyonların araştırılmasıyla ortaya konulabilir. Genetik etiyolojinin ilk çıkarımları otozomal dominant hastalıklarda aile öykülerine dayanmaktadır. Bening ailesel neonatal epilepside KCNQ2 veya KCNQ3 gibi potasyum kanallarına ait gen bölgelerinde mutasyon görülmektedir (221). Aile öyküleri ve 1950'lerde Lennox'un ikiz çalışmalarıyla ortaya konulan diğer genetik temelli epilepsi tipleri çocukluk çağı absans epilepsisi veya miyoklonik juvenil epilepsidir (222). Genetik etiyolojiye ilişkin bilinen en iyi örnek Dravent sendromudur. Bu sendromda hastaların %80'den fazlasında SCN1A'nın patojenik varyantı bulunmaktadır (223). Genetik etiyolojinin varlığı hastalığın kalıtsal olarak aktarılacağı anlamına gelmez. Çevresel faktörler, gen varyantının yeterli düzeyde olması veya eklenen yeni mutasyonlar hastalığın doğrudan kalıtımını

değiştirebilmektedir (224, 225). Hasta mutasyon açısından mozaik fenotip de gösterebilir. Yani iki farklı hücre popülasyonuna sahiptir ve mozaikliğin derecesi epilepsinin şiddetini etkiler (226).

2.3.3.3. Enfeksiyöz Etiyolojiler

Dünya çapında enfeksiyon kaynaklı epilepsi gelişimi en sık karşılaşılan etiyolojidir (227). Dünyanın belirli bölgelerinde nörosistiserkoz, tüberküloz, HIV, serebral malarya, subakut sklerozan panensefalit, serebral toksoplazmoz, zika virüsü ve konjenital sitomegalovirüs enfeksiyonları epileptik nöbetlere neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlar bazen yapısal etiyolojilerle de uyum gösterebilir (10).

2.3.3.4. Metabolik Etiyolojiler

Bazı metabolik bozukluklarda epilepsi ile ilişkililendirilmiştir. Porfiri, üremi, amino asidopatiler veya piriodoksin bağımlı nöbetler örnek olarak verilebilir. Çoğu metabolik etiyolojinin genetik alt yapısı bulunmaktadır (10).

2.3.3.5. İmmünolojik Etiyolojiler

İmmünolojik nedenlere bağlı epilepsiler son zamanlarda yetişkinlerde ve çocuklarda tanımlanmaktadır. İmmünolojik etiyoloji MSS'de otoimmün inflamasyonlardan kaynaklanmaktadır. Otoimmün ensefalitlerin teşhisi ilgili antikorların gelişmesiyle birlikte hızla artmaktadır. Anti-NMDA reseptör ensefalit ve anti-LGI1 ensefalit immün etiyolojili epilepsilere verilebilecek örnekler arasındadır (227).

2.3.3.6. Bilinmeyen Etiyolojiler

Bilinmeyen etiyolojiden kasıt, oluşan epilepsinin sebeplerinin henüz tanımlanamamasıdır. Sahip olduğu epilepsinin altında yatan nedenler henüz tespit edilememiş pekçok hastada bilimsel gelişmelerle gerekli karakterizasyon yapılmaktadır.

2.3.4. Epilepsinin Tanısı

Epilepsi tanısının konulması klinik ve epidemiyolojik kanıtların birlikte değerlendirilmesine dayanmaktadır. 24 saatlik süreçte iki veya daha fazla uyarılmamış veya refleks nöbetin görülmesi, bir uyarılmamış veya refleks nöbet geçiren kişide (travma, inme gibi yapısal lezyonları veya beyin enfeksiyonu bulunan hastalarda) takip eden 10 yıl içerisinde %60'dan fazla nöbet tekrarlama ihtimalinin olması ve son olarak da iyi tanımlanmış epileptik sendromlardan birine ait bir veya daha fazla nöbetin

geçirilmesi gibi kriterlerden birinin bulunması durumunda epilepsi tanısı konulmaktadır (200). Epilepsi tanısının konulmasındaki ilk adım hastada görülen nöbetin epileptik olup-olmadığının ayrımını yapmaktır. Nöbetin tipini belirlemek, görgü tanığı olmadığında veya yetersiz tanımlamalarda oldukça güç olabilir. Tanının ikinci adımı nöbetin epileptik mi, refleks tipi nöbet mi veya akut semptomatik bulgu mu olup-olmadığının belirlenmesidir. Akut semptomatik nöbetler başlangıcı herhangi bir uyarıya bağlı olmayan nöbetlere göre daha düşük risk taşımaktadır. Birleşik Devletler'de yapılan bir araştırmaya göre akut semptomatik nöbet sonrasında 10 yıllık süre içerisinde uyarılmamış nöbet riski %18,7 iken, statik beyin lezyonu sonrasında uyarılmamış nöbet görülme riski %64,8'dir (228). Tanı konulmasında değerlendirilmesi gereken üçüncü unsur epilepsili hastanın başvurusuna neden olan nöbetin ilk nöbet olup-olmadığının irdelenmesidir. İzole edilmiş epileptik *dejavu* gibi çok fazla bilinmeyen nöbet tipi hastanın öncesinde geçirdiği nöbetlerden biri olabilir. Epileptik *dejavu* fizyolojik *dejavu* dan, daha uzun sürmesi (>5 s), daha yoğun ve rahatsız edici olması ve ayrıca hasta tarafından kontrol edilememesiyle ayrılır. Koku halüsinasyonları ve miyoklonik nöbetler hasta tarafından ihmal edilebilecek veya gözden kaçırılabilecek diğer nöbet tipleridir. Eğer öncesinde gözden kaçırılan nöbet tanımlanırsa epilepsi tanısı konulabilir. Dördüncü adım ise nöbet tipi, epilepsinin sınıflandırması ve eğer ilgili klinik semptomlar bulunuyorsa, epilepsi sendromuna ilişkin tanımlamaların yapılmasıdır (229).

Tanı koyulurken medikal öykü değerlendirilmesi, fiziksel muayene, EEG ve nörogörüntüleme tekniklerinden yararlanılmaktadır.

2.3.5. Epilepsinin Tedavisi

Epilepsi tedavisinin amacı nöbetleri önlemek veya kontrol altına almak, medikal ve nöropsikiyatrik komorbid durumların iyileşmesini sağlamak, tedaviye ilşkin yan etkileri minimize etmek ve hastanın yaşam kalitesini arttırmaktır. Antiepileptik ilaç tedavisi, epilepsi için birincil terapi seçeneğidir (230). Antiepileptik tedavinin etkili olmadığı dirençli epilesilerde veya nöbetlerin etiyolojisi gereğince cerrahi işlemler, nörostimülasyon ve diyet gibi tedavi stratejileri de tercih edilebilir.

2.3.5.1. Antiepileptik İlaç Tedavisi

Antiepileptik ilaçlar nöbetlerin oluşumu, yayılımı ve şiddetini baskılayan ilaçlardır. İlk keşfedilen antiepileptik ilaçlar (bromid ve fenobarbital) etkinliği ve yan

etkileri bakımından büyük dezavantaja sahiplerdi. 1990'lardan itibaren geliştirilen antiepileptik ilaçlar farmakokinetik özellikleri, ilaç etkileşimleri ve daha az yan etkilerinin olması bakımından daha etkili ilaçlardır. Bilimsel gelişmeler daha etkin ilaçların keşfine imkan sağlamasına rağmen bazı nöbetler yine de kontrol altına alınamamaktadır (231, 232). Yeni antiepileptik ilaçlar öncekilere göre daha özgün mekanizmalara sahiptir. Birinci nesil antiepileptik ilaçların iki temel etki mekanizması bulunmaktadır. Bunlar sodyum kanal blokajı ve GABAerjik iletinin potansiyasyonudur ki her iki mekanizmada nöronal deşarjı azaltmaktadır. Son geliştirilen antiepileptik ilaçlar spesifik GABA alt üniteleri ve sinaptik veziküllerin inhibisyonu sağlama yönünde mekanizmalara sahiptir. Antiepileptik ilaçlar ve etki mekanizmaları ve çeşitleri tablo 2.2'de özetlenmiştir (233).

Antiepileptik ilaçlar, nöronal aksiyon potansiyelini etkileyerek veya postsinaptik inhibisyon ile nöronal uyarılabilirliği değiştirerek etkinliklerini gösterirler. Voltaj-bağımlı sodyum kanalları nöronlarda aksiyon potasiyelinin depolarizasyonundan sorumlu olduğundan bu kanalların blokajı aksiyon potansiyeli oluşumunu engellemektedir. Antiepileptik tedavide sodyum kanallarının hedef alınması, birinci nesil antiepileptik ilaçların yaygın bir özelliğidir (234, 235). Sodyum kanallarını hedef alan birinci nesil antiepileptiklerden birisi de fenitoindir. Fenitoin depolarizasyon sonrası inaktive olmuş voltaj-kapılı kanallara bağlanarak sıklıkla ateşlenen nöronların refraktör periyodunu uzatır. Fenitoin ayrıca aksiyon potansiyelinin amplitüdünü ve ileti hızında da azalmaya sebep olur (234). Lamotrigin, karbamazepin ve fenitoinin hepsi voltaj-kapılı sodyum kanalının aynı reseptör bölgesine bağlanmaktadır (236). Birinci nesil antiepileptiklere ek olarak rufinamid, oksikarbamazepin ve lamotrigin gibi ikinci nesil antiepileptikler de voltaj-kapılı sodyum kanallarının inaktivasyon kapıları üzerinden aksiyon potansiyelinin süresini uzatarak antiepileptik bir etki ortaya koymaktadır (237).

GABAerjik sistemi potansiyalize etmek veya agonistlerini kullanmak birinci nesil antiepileptik ilaçlarda özellikle benzopiazepinlerde görülen bir diğer yaygın etki mekanizmasıdır. Bu mekanizma inhibisyon oluşturan klor kanallarını hedef almaktadır. Katyon girişini modifiye etmektense GABA agonistleri aracılığıyla klor kanallarını açık tutarak hiperpolarizasyon oluşturulmaktadır. Barbituratlar,

benzodiazepinlerden farklı bir bağlanma bölgesi üzerinden GABA reseptörlerine bağlanırlar. Valproik asit endojen GABA'nın parçalanmasını inhibe etmektedir (235).

Tablo 2.2. Etki mekanizmalarına göre antiepileptik ilaçların sınıflanırılması (233)

Etki Mekanizması	Nöronal İleti Üzerindeki Etkisi	Birinci Nesil Antiepileptikler	İkinci ve Üçüncü Nesil Antiepileptikler	Gelişim Aşamasındaki Antiepileptikler
Sodyum Kanal Blokajı (Hızlı İnaktivasyon)	İnaktivasyon evresini yavaşlatma (Refrakter periyotu uzatma)	Fenitoin Karbamazepin Valproat	Topiramat Zonisamid Okskarbazepin Lamotrigin Felbamat Rufinamid	
Kalsiyum Kanal Blokajı	Postsinaptik inhibisyon	Etosüksimid Valproat	Topiramat Zonisamid Gabapentin Lamotrigin Pregabalin	
GABA Agonisması /Potansiyasyonu	Hiperpolarizasyon	Benzodiazepin Barbiturat Valproat	Felbamat Topiramat Vigabatrin Stiripentol	Retigabin Nörosteroidler
NMDA Reseptör Blokajı	Eksitatör sinaptik aktiviteyi azalma		Felbamat	
AMPA Reseptör Blokajı	Eksitatör sinaptik aktiviteyi azalma		Topiramat	
SV2a Vezikül İnhibisyonu	Eksitatör sinaptik aktiviteyi azalma		Levetirasetam	Seletrasetam
Sodyum kanal Blokajı (Yavaş İnaktivasyon)	Nöronları uzamış depolarizasyondan kurtarma		Lakozamid	
Potasyum Kanal Blokajı		Okskarbazepin	Topiramat	
Potasyum Kanal Aktivasyonu				Retigabin

Yeni nesil ilaçlardan vigabatrin yapısal bir GABA analoğudur ve GABA degradasyonunu yapan GABA transaminaz enzimini inhibe eder. Sinaptik aralıkta GABA'nın degradasyonunun engellenmesi, GABA'nın sinaptik aralıkta daha uzun kalmasına ve GABAerjik sinyalin kuvvetlenmesine sebep olur. Tiagabin de GABA konsantrasyonunu arttıran bir antiepileptik ilaçtır. Ancak vigabatrinden farklı olarak GABA'nın nöron ve glia hücrelerine alımını azaltarak antikonvülsan etki gösterir (238). Birden fazla mekanizma üzerinden antiepileptik özellik gösteren topiramat da GABA etkinliğini arttırmaktadır (239). Retigabin GABA sentezini arttırarak, nöroaktif stereoidler GABA reseptörlerindeki stereoid yapılara bağlanarak, stiripentol $GABA_A$ reseptörlerinin açık kalma süresini uzatarak GABAerjik sinyali kuvvetlendirmekte ve antiepileptik tedavi seçenekleri arasında yer almaktadırlar (240, 241).

Kalsiyum kanallarının blokajı da antiepileptik etki oluşturmaktadır. Absans nöbetlerde kullanılan etosüksimid talamustaki düşük eşik değerine sahip kalsiyum kanallarını inhibe ederek etkinliğini göstermektedir. Valproat da etosüksimid gibi benzer mekanizmayla absans nöbetlerin kontrolüne katkı sağlamaktadır. Fenitoin presinaptik kalsiyum akımını, felbamat ve barbituratlar ise postsinaptik kalsiyum girişini inhibe ederek antiepileptik etki göstermektedir (235).

İkinci ve üçüncü nesil olarak kabul edilen yeni nesil antiepileptik ilaçlar daha spesifik farmakolojik hedefler üzerinden etki göstermektedir. Antiepileptik ilaç geliştirmede daha etkin, kolay tolere edilebilir, yan etkileri az olan ve ilaç-ilaç etkileşimi düşük kimyasallara bir yönelim bulunmaktadır. Yeni nesil antiepileptik ilaçların etki mekanizmalarının çeşitliliği daha fazladır.

Sinaptik veziküllerin ekzositozunu inhibe ederek sinaptik iletimi duraklatmak tedavi stratejilerinden birisidir. Levetirasetam sinaptik vezikül proteini 2a'yı (SV2a) inhibe ederek transmitter salınımını azaltır. Bu proteinin inhibisyonu eksitatör aktivitede geniş spektrumlu zayıflamaya neden olur (242). Brivarasetam ve seletrasetam bu presinaptik proteinin güçlü inhibitörleri olup, daha geniş spektrumda antiepileptik etkinlik gösterme potansiyeline sahiptir (243). Briverasetam ayrıca voltaj-kapılı sodyum kanallarının hızlı inaktivasyonunun inhibisyonuna dayalı ilave bir antikonvulsan etkiye sahiptir (244).

Beyinin temel eksitatör nörotransmitteri olan glutamata ilişkin reseptörlerin etkinliğini azaltmak, antiepileptik tedavi için akla gelebilecek diğer bir hedeftir. Bu amaçla NMDA reseptör antagonistleri kullanılmaktadır. Topiramat, zonisamid veya daha eski antiepileptikler olan felbamat ve fenobarbital NMDA reseptörlerini inhibe ederek hem postsinaptik nöronun uyarılmasını hem de hücreye kalsiyum girişini engeller (238, 245).

Retigarbin gibi antiepileptik ilaçlar ise KCNQ2 ve KCNQ3 (Kv7.3) voltaj-kapılı potasyum kanallarını aktive eder ve açık kalma süresini uzatarak antiepileptik etkinlik göstermektedir (246).

Voltaj-kapılı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonu diğer antiepileptik mekanizmalara nazaran daha yeni bir stratejidir. Bu mekanizma için ilk keşfedilen antiepileptik ilaç olan lakosamid, ateşleme frekansı yüksek olan nöronlarda tekrarlayan deşarjlar oluşturarak depolarizasyon döneminin uzamasına neden olur.

Yavaş inaktivasyon hızlı inaktivasyona göre muhtemelen yapısal bir değişiklik gerektirdiği için uygulamada uzun zaman periyodu gerektirir. Lakosamidin klinik olarak refraktör parsiyel epilepsi ve status epileptikus hastaları için uygulanabilir bir seçenek olarak görülmektedir (247, 248).

2.3.5.2. Epilepsi Cerrahisi

İlaca dirençli epilepsi hastaları için eğer epileptik odak tanımlanabilir ve ameliyatla çıkarılabilir durumda ise epilepsi cerrahisi tercih edilen bir tedavi seçeneği olur. Fokal başlangıçlı epilepsi hastaları için cerrahi, güvenilir ve etkin bir tedavi sağlamaktadır (249). Epilepsi cerrahisi fokal rezektif cerrahi, çoklu subpial transeksiyon, anterior korpus kallozotomi veya hemisferektomi işlemlerini içermektedir (250). Epilepsi cerrahisinin değerlendirilmesi uzun süreli EEG monitörizasyonu ile başlar. Fokal başlangıçlı epilepsinin tipi, nöbetin başlangıç bölgesi belirlenerek cerrahi için değerlendirilir (251). Nörogörüntüleme teknikleri, özellikle yapısal etiyolojiye sahip epilepsi tiplerinin cerrahisi açısından büyük önem taşımaktadır. MR epileptik lezyonların teşhisinde %60-90 oranında güvenilir veriler sağlamaktadır (252). Temporal lob epilepsisi en yaygın epilepsi tiplerindendir ve mezial temporal lob epilepsisi de en sık görülen tipidir. MR'da hipokampal atrofi ve artmış sinyal özelliği ile kolaylıkla teşhis edilen mezial temporal lob epilepsisinde anterior temporal lobektomisi, postoperatif sonuçları diğer temporal lob epilepsilerine göre daha iyi sonuçlar vermektedir (202).

2.3.5.3. Nörostimülasyon Tedavisi

Nörostimülatör cihaz implantasyonu dirençli epilepsi hastaları için alternatif tedavi metotlarından birisidir. Vagal sinir uyarımı, duyarlı nörostimülasyon (responsif nörostimülasyon) ve diğer deneysel nörostimülasyon modaliteleri nörostimülasyon terapileri için kullanılmaktadır (250, 251). Vagus sinir stimülasyonu, epilepsi hastaları için ilk kabul gören nörostimülasyon tekniğidir. Randomize kontrol çalışmalarında terapötik vagal sinir stimülasyonu yapılan hastalarda 3 aylık sürede nöbet frekansının %24-31 oranında azaldığı, subterapötik uyarımda ise %6-15'lik bir azalma olduğu bildirilmiştir (253). Uyarımın iki yıl sürmesi halinde hastaların yarısında nöbet sıklığının %50'den fazla azaldığı tespit edilmiştir (254).

2.3.5.4. Diyet Terapisi

Epilepsi tedavisi için başvurulan bir diğer yöntem ketojenik diyettir. Ketojenik diyet uygulanan hastaların yarısında %50'den fazla ve üçte birinde %90 oranında nöbetlerin azaldığı, bazı hastalarda ise nöbetlerin hiç oluşmadığı görülmüştür (255). Ketojenik diyet özellikle metabolik etiyolojiye sahip epilepsiler (Glut1 ve piruvat dehidrojenaz eksikliği gibi) ve refraktör status epileptikus için etkin bir tedavi seçeneğidir (256). Ketojenik diyet dirençli fokal ve jeneralize epilepsi hastalarında da etkilidir. Bununla birlikte ketojenik diyet zayıf tolere edilebilirliği ve yan etkileri (kabızlık, kusma, enerji ve açlık eksikliği gibi) nedeniyle uygulamada kısıtlamalara sahiptir. Ayrıca ketojenik diyet uzun vadede besin eksikliği, çocuklarda büyüme bozuklukları, anormal lipit profili, osteopeni ve böbrek taşı gibi komplikasyonlara yol açmaktadır (257).

2.3.6. Deneysel Epilepsi Modelleri

Epilepsi tedavisine ilişkin yeni nesil antiepileptik ilaçların geliştirilmesi ve özellikle ilaca dirençli epilepsi türleri için yeni tedavi stratejilerinin araştırılması önem arzetmektedir. Yeni nesil antiepileptik ilaçların etkinlik ve muhtemel yan etkilerinin belirlenmesinde ve ayrıca epilepsiye ilişkin henüz aydınlatılamamış bazı mekanizmaların araştırılmasında deneysel epilepsi modelleri kullanılmaktadır. Tracy Putman ve Houston Merrtit tarafından 1937'de fenitoinin antikonvulsan aktivitesi bir hayvan modelinde keşfedildiğinden beri hayvan modelleri epileptogenezin anlaşılmasında ve yeni antiepileptik tedavilerin geliştirilmesinde anahtar rol oynamaktadır (258). Günümüze kadar insandaki epilepsi semptomlarına benzer çok sayıda deneysel epilepsi modeli geliştirilmiştir. Her modelin kendi içinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (259).

İdeal bir epilepsi modelinin karşılaması gereken temel bazı kriterler bulunmaktadır. İlk olarak EEG, nöbet ve epilepsinin ayırt edici özelliklerinden birisi olduğu için epilepsi modeli insandaki epileptik nöbetlere benzer elektrofizyolojik paterni sergilemelidir. İkinci önemli kriter ise etiyolojilerin benzer olmasıdır. Bu nedenle altta yatan genetik yatkınlık, hasar vb. durumlar modelde de bulunmalıdır. Üçüncü kriter, modellenen epilepsi tipi insanda belirli bir yaş grubunda bulunuyorsa, nöbet başlangıcı insandakine benzer bir yaş aralığında hayvanda da oluşturulabilmelidir. Dördüncü kriter, insandaki epilepsi spesifik bir patoloji

oluşturuyorsa hayvan modelinde de aynı patoloji görülmelidir (örneğin fokal lezyonlar, kortikal displazi). Beşinci kriter, epilepsinin deneysel hayvan modelinin antiepileptik ilaçlara verdiği yanıt ve ilaçların etki mekanizmaları insandakine benzemelidir. Son olarak da hayvan modelleri insandaki epileptik nöbet davranışlarını iyi taklit edebilmelidir (259).

Tablo 2.3. Bazı deneysel epilepsi modelleri (260, 261).

Model Sınıfı	Model	Nöbet/Epilepsi Tipi	Özellikler/Uygulama
Kimyasal Ajanlarla Oluşturulan Epilepsi Modelleri	Pilokarpin Modeli	Fokal Epilepsi (Özellikle Temporal Lob Epilepsisi)	350-385 mg/kg ip.
	Lityum-Pilokarpin Modeli	Status Epileptikus	3 mEq/kg Li + 30-60mg/kg, ip
	Kainik Asit Modeli	Status Epileptikus ve Kronik Nöbetler	Sistemik veya intrahipokampal enjeksiyon
	Floroiltil Modeli	Neonatal Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetller	Solunum yoluyla uygulama
	Pentilentetrazol Modeli	Jeneralize Nöbetler	30-120 mg/kg (Tutuşma ve tek doz modeline göre değişir)
	Penisilin Modeli	Fokal Nöbetler	500 IU, ic
	Pikrotoksin Modeli	Fokal Nöbetler	
	Tetanus Modeli	Fokal Nöbetler	
	Tetradotoksin Modeli	İnfatil Spazm	
	Bikukulin ve Striktin Modeli	Fokal Nöbetler	
	Alüminyum, Kobalt ve Çinko Modeli	Fokal Nöbetler	
Elektriksel Stimülasyon Modelleri	Elektriksel Tutuşma Modeli	Jeneralize Nöbetler	60 Hz
	Maksimal Elektroşok Modeli	Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetler	150 mA, 60 Hz Kornea, kulak veya transkraniyal
Genetik Modeller	GAERS ve WAG/Rij Modeli	Absans Nöbetler	
	Odyojenik Epilepsi Modeli	Vahşi Koşu ve Tonik Klonik Nöbetler	
	SCN1A-2A-1B Mutasyon Modelleri	Jeneralize Epilepsi	
	SCN1A Mutasyon Modeli	İnfant Miyoklonik Epilepsi (Dravet Sendromu)	
	ARX Mutasyon Modeli	İnfatil Spazm (West Sendromu)	
Gelişimsel Modeller	Febril Nöbet Modeli	Neonatal Nöbet	
	Hipoksik/İskemik Model	Neonatal Epilepsi Modeli	
Travma Modelleri	Ağırlık Düşürme Modeli	Uygulanan protokole göre değişken	
	Sıvı Perküsyon Model	Uygulanan protokole göre değişken	

Elliden fazla deneysel epilepsi modeli bulunmaktadır. Kimyasal ajanlarla (lokal veya sistemik uygulanan), elektrik stimülasyonuyla, genetik olarak, gelişimsel yolla ve travma ile epilepsi modelleri oluşturulabilir. Tablo 2.3.'de yaygın olarak kullanılan epilepsi modelleri verilmiştir. Bunların dışında hücre dışı ortamın tamamen kontrol altında tutulduğu *in vitro* modeller epilepsi araştırmalarında kullanılmaktadır. *In vivo* modellere göre daha yeni olan *in vitro* modeller doku dilimlerinde, hücre kültürü ve organotipik kültürlerde gerçekleştirilmektedir (260).

2.3.7. Absans Epilepsi ve Genetik Absans Epilepsi Modelleri

Absans nöbetler çocukluk çağı absans epilepsisi, juvenil absans epilepsi ve juvenil miyoklonik epilepsi olmak üzere çok sayıda idiopatik/genetik jeneralize epilepside görülen nöbet tipidir (262). Atipik absans nöbetler Lennox-Gastaut sendromlu hastaların %60'ından fazlasında görülmektedir. Absans (yitiklik, yokluk) terimi ilk olarak 1705 yılında ilgili nöbeti tanımlamak içi kullanılmış ve 20. yüzyılın başlarında piknolepsi olarak adlandırılmıştır. Pyknos Antik Yunanca'da "çok sık ve gruplanmış" anlamına gelmektedir (263). Sonrasında absans epilepsiler küçük hastalık anlamında "petit mal" olarak adlandırılmıştır. ILAE'nin 2017 yılındaki sınıflandırmasına göre jeneralize motor olmayan nöbet grubuna dahil edilmiştir (10).

Absans nöbetler klinik olarak geçici bilinç kaybı (ani başlangıçlı), hareketsizlik, hareketlerde ani kesilme, göz kırpma ile birlikte el ve yüz otomatizmalarıyla karakterizedir (11). İktal EEG bulgusu olarak 3-4,5 Hz, >3 s süreli diken-dalga kompleksleri absans nöbetler için oldukça ayırt edici özelliklerdir (12, 13). Absans nöbeti olan 47 çocukta yapılan bir çalışmada 339 nöbetin ortalama iktal süresi 9,4±7 s (veri aralığı 1-44 s) olarak bulunmuştur (264). Absans nöbetler, 6-7 yaş ve 12 yaş civarında olmak üzere iki yaş grubunda daha sık görülmektedir (265). Tipik absans nöbetlerin yanısıra nöbet başlangıç ve bitişi daha az belirgin olan, bilinç bozulma dereceleri değişken ve nöbetleri daha uzun süren atipik absans nöbetler de bulunmaktadır (213). Atipik absans nöbetler genellikle uyuklama esnasında oluşur ve tipik absans nöbetlerin aksine hiperventilasyon veya fotik stimülasyon ile proveke edilemez (266). Atipik absans nöbetlerin EEG yapıları düzensiz, asimetrik ve düşük amplitüdlü 1,5-2,5 Hz yavaş diken-dalga komplekslerinden oluşmaktadır (12).

Etiyolojik olarak çoğu jeneralize epilepsilerde olduğu gibi absans epilepsinin de genetik temellerinin olduğu bilinmektedir. 1951'de Lennox tek yumurta ikizlerinde

yaptığı çalışmada hastaların %66'sında EEG diken-dalga kompleksi bakımından uyumluluk görüldüğünü bildirmiştir (267). Doose ve arkadaşları 3 Hz diken-dalga yapısını absans epilepsili 252 hastada tanımlamış ve multifaktöriyal kalıtım özelliğinde olduğunu öne sürmüştür (268). Absans epilepsinin etiyolojisinde voltaj-kapılı T tipi kalsiyum kanalları ve $GABA_A$ reseptörüne ilişkin CACNA1A ve GABRG2 ile GABRG3 genlerinin rol oynadığı düşünülmektedir (269-271).

Absans nöbet patofizyolojisinde kortiko-talamo-kortikal devre ana rol oynamaktadır (14). Bu devrede yer alan nöronlarlardan kortikal IV. tabakada bulunan nöron glutamaterjiktir. Bu nöronlar talamusun retiküler nükleuslarına projekte olurlar. Diğer bir nöron grubu talamik aktarıcı nöronlarıdır ki talamustan kortikal piramidal nöronlara eksitatör sinyal taşırlar. Bu nöronal devrenin son elemanları ise talamik nöronlar arasında ve talamus içindeki devrelerde görev alan GABAerjik nöronlardır (271).

Absans epilepsiye ilişkin oluşum mekanizmları ve ilaç araştırmalarının yapılabilmesi için çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir. Kedilerde penisilin modeli, pentilentetrazol modeli ve gama hidroksibütirik asit modeli başlıca kullanılan absans epilepsi modelleridir (272, 273). Absans epilepsinin insanlardaki genetik faktörlere bağlı olduğunun bilinmesi nedeniyle bu alandaki genetik sıçan modelleri insanda görülen absans epilepsiyi daha iyi yansıttığı ve geçerliliğinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (15). In-bred üretimle oluşturulan GAERS ve WAG/Rij sıçan ırkları genetik absans epilepsi çalışmalarında kullanılan en geçerli modellerdir (274, 275).

EEG'de spontan diken-dalga deşarjların varlığı geçerli bir absans epilepsi modeli için en önemli kriterdir. Geçmişte bazı araştırmacılar sıçanların kendi soyları içinde belirli oranda davranış duraklaması ve bıyık titremesinin eşlik ettiği diken-dalga komplekslerinin olduğunu gözlemlemiştir (276). Marescaux ve Vergnes'ın grubu tarafından Strazburg soyu Wistar sıçanlar ile yürütülen kapsamlı bir araştırmada diken-dalga kompleksleri 6-12 aylık sıçanların %31'inde tanımlanmıştır. Sonrasında bu sıçanlar kendi aralarında melezlenerek hem diken-dalga deşarjlarının sayısının hem de insidansın arttığı bir soy üretilmiş ve "Strasbourg Kökenli Genetik Absans Epilepsili Sıçanlar" (Genetic Absance Epileptic Rats of Strasbourg; GAERS) olarak adlandırılmıştır (277). Jeneralize ve konvulsif olmayan tipteki nöbetler GAERS

ırkında 40-120 günlükten itibaren görülmeye başlar ve yaş ilerledikçe nöbetlerin sayısı ve süresi artarak devam eder (278).

1986'da Luijtelaar ve Coenen erişkin Wistar sıçanların EEG kayıtlarında diken-dalga deşarjlarının absans epilepsinin klinik semptomlarıyla birlikte görüldüğünü keşfettiler (279). Araştırmacılar 6 aylık erkek ve dişi sıçanların saatte yaklaşık 16-20 deşarj sergilediğini ve ortalama nöbet süresinin ise 5 s olduğunu gösterdiler. Diken-dalga deşarjları sıçanlar 2-3 aylıkken görülmeye başlamakta fakat daha erken dönemlerde görülmemektedir (280). WAG/Rij ırkı 1924'de Glaxo laboratuvarlarında A.L. Bacharach tarafından Wistar sıçanlarından üretilen WAG soyunun bir alt tipidir. WAG/Rij sıçanlar erkek ve dişi kardeş çiftleştirilmesine dayanan inbred yolla üretilmektedir. WAG/Rij sıçanların diken-dalga deşarjları 1-30 s sürmekte ve 7-10 Hz frekansında oluşmaktadır (281). Nöbetlerin görülme yaşında olduğu gibi diken-dalga deşarjlarının frekansında da insan absans epilepsisi ve genetik absans epilepsi modeli arasında farklılık görülmektedir. 6 aylık sıçanlarda saatte 16-18, günde yaklaşık 300-400 diken-dalga deşarjı meydana geldiği ve cinsiyet bakımından deşarj farklılığının oldukça az olduğu bildirilmiştir (280).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları

Deneylerde, postnatal 0-4 günlük (P_{0-4}) Wistar ve genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanlar kullanıldı. Bu hayvanlar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ından temin edildi. Sıçanlar besin ve su kısıtlaması olmaksızın, 22±2 °C sıcaklık, %60 nem ve 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü altında yetiştirildi. Hücre kültürü ve kalsiyum görüntüleme çalışmaları İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER) Laboratuvarları'nda yapıldı. Deneysel çalışmalar ve hayvanlara uygulanacak işlemler İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 12.07.2017 tarih ve 35 nolu etik kurul izni kapsamında belirlenen usul ve esaslara göre gerçekleştirildi.

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları

Kimyasal	***Üretici Firma***	***Kullanım Amacı***
L-15	*Sigma*	Kültür besiyeri
Neurobasal A (NBA)	*Gibco*	İnkübasyon besiyeri
Hibernate A	*Gibco*	Diseksiyon besiyeri
Poly-L-Lizin	*Sigma*	Petri kaplama
Papain	*Sigma*	Enzimatik parçalama
Antibiyotik-Antimikotik Solüsyon	*Sigma*	Mikrobiyal aktiviteyi önleme
GlutaMAX	*Gibco*	Besiyeri takviyesi
B-27 Serum-Free Supplement	*Gibco*	Besiyeri takviyesi
DNaz	*Sigma*	Kültür esnasında hücreleri yapışmasını engelleme
FBS	*Sigma*	Papain aktivitesini durdurma
Fluo-4	*Invitrogen*	Kalsiyum indikatör boya
HBSS	*MultiCell*	Kalsiyum boyama işleminde yıkama solüsyonu
Pluronik Asit	*Sigma*	Boyama solüsyonu
EGb 761	*Abdi İbrahim İlaç San. A.Ş.*	Ginkgo biloba standardize özütü
Ginkgolid A	*Sigma*	EGb 761 etken bileşenlerinden
Ginkgolid B	*Sigma*	EGb 761 etken bileşenlerinden
Ginkgolid C	*Sigma*	EGb 761 etken bileşenlerinden
Bilobalid	*Sigma*	EGb 761 etken bileşenlerinden
Nikardipin HCI	*Sigma*	Voltaj bağımlı L tip kanal blokeri
Mibefradil HCI	*Sigma*	Voltaj bağımlı T tip kanal blokeri
Dantrolen	*Sigma*	Endoplazmik retikulum ryanodin reseptör antagonisti
KCl	*Sigma*	Nöronal uyarılmayı indükleme
Glutamat	*Sigma*	Nöronal uyarılmayı indükleme
CNQX	*Sigma*	AMPA/Kainat glutamat reseptör antagonisti
AP-5	*Sigma*	NMDA glutamat reseptör antagonisti

3.3. Deney Dizaynı

Standardize *Ginkgo biloba* özütü EGb 761 ve etken bileşenlerinin nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkisi, P_{0-4} günlük sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültürü kullanılarak incelendi. Nöronun uyarılabilirlik düzeyi hücre içi kalsiyum seviyesindeki değişim üzerinden değerlendirildi. Kalsiyum seviyesi kalsiyum duyarlı fluo-4 boyası kullanılarak tespit edildi. Nöronları uyarmak için 30 mM KCl kullanıldı. Glutamaterjik sistemin EGb 761 ve etken bileşenleriyle etkileşiminin incelendiği deney dizaynında ise nöronlar 100 µM glutamat ile uyarıldı.

Doktora tez çalışmasının amacına uygun olacak şekilde aşağıdaki araştırma hedefleri belirlendi ve bunlara uygun deney dizaynları tasarlandı.

- Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761 dozlarının nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkilerinin incelenmesi.

- WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761 dozlarının nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkilerinin incelenmesi.

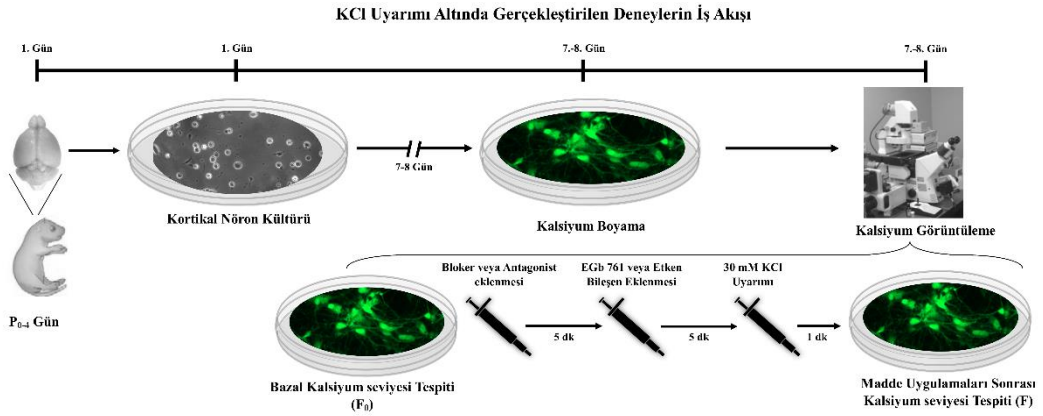
- Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761'in etken bileşenleri ve bunların dozlarının nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkilerinin incelenmesi.

- WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761'in etken bileşenleri ve bunların dozlarının nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkilerinin incelenmesi.

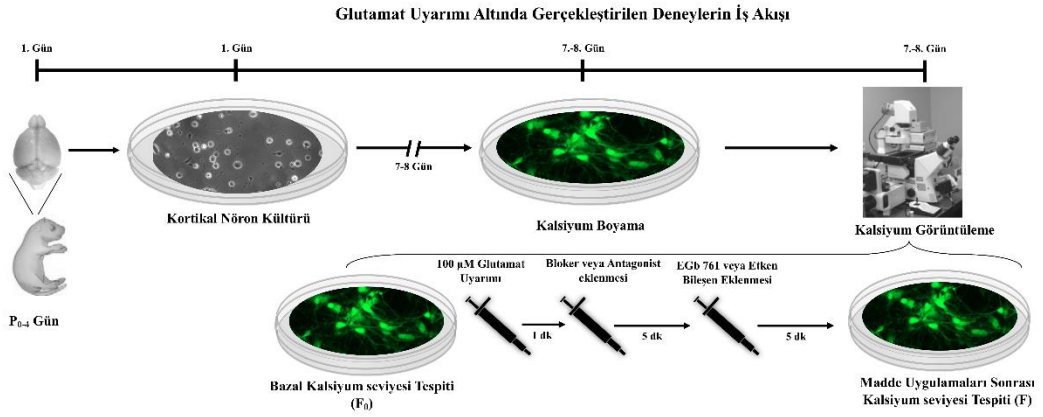
- WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe hücre içi kalsiyum seviyesi üzerinde en fazla etkili olan EGb 761 etken bileşeninin kalsiyum kanalları ile etkileşiminin incelenmesi.

- WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe hücre içi kalsiyum seviyesi üzerinde en fazla etkili olan EGb 761 etken bileşeninin glutamaterjik sistem ile etkileşiminin incelenmesi.

KCl ve glutamat uyarımlarına ilişkin deney dizaynı ve iş akış diyagramları şekil 3.1 ve 3.2'de gösterilmiştir. Nöron kültürü ve fluo-4 boyama süreçlerinin ardından nöronların bazal kalsiyum seviyeleri konfokal mikroskop (spinning disk) altında kaydedildi. Tablo 3.2 ve 3.3'de gösterilen ilgili deney gruplarına belirtilen madde uygulamaları yapıldıktan sonra farklı petri alanlarından görüntüler alınarak deney sonlandırıldı.



Şekil 3.1. KCI uyarımını kapsayan deney dizaynı ve iş akış diyagramı



Şekil 3.2. Glutamat uyarımını kapsayan deney dizaynı ve iş akış diyagramı

Tablo 3.2. Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe yapılan çalışmalar ve bu çalışmalarda kullanılan deney grupları

	Wistar Sıçanlardan Elde Edilen Kortikal Nöron Kültüründe Yapılan Çalışmalar			
	Deney Grupları	**Uyarım**	**EGb 761/Etken Bileşen**	**Bloker/Antagonist**
EGb 761 Dozları	*KCl Grubu*	*KCI*	-	-
	50 µg/ml EGb 761 Grubu	*KCI*	*50 µg/ml EGb 761*	-
	100 µg/ml EGb 761 Grubu	*KCI*	*100 µg/ml EGb 761*	-
	200 µg/ml EGb 761 Grubu	*KCI*	*200 µg/ml EGb 761*	-
	400 µg/ml EGb 761 Grubu	*KCI*	*400 µg/ml EGb 761*	-
EGb 761 Etken Bileşenleri ve Dozları	*1 µM Ginkgolid A Grubu*	*KCI*	*1 µM Ginkgolid A*	-
	10 µM Ginkgolid A Grubu	*KCI*	*10 µM Ginkgolid A*	-
	100 µM Ginkgolid A Grubu	*KCI*	*100 µM Ginkgolid A*	-
	1 µM Ginkgolid B Grubu	*KCI*	*1 µM Ginkgolid B*	-
	10 µM Ginkgolid B Grubu	*KCI*	*10 µM Ginkgolid B*	-
	100 µM Ginkgolid B Grubu	*KCI*	*100 µM Ginkgolid B*	-
	1 µM Ginkgolid C Grubu	*KCI*	*1 µM Ginkgolid C*	-
	10 µM Ginkgolid C Grubu	*KCI*	*10 µM Ginkgolid C*	-
	100 µM Ginkgolid C Grubu	*KCI*	*100 µM Ginkgolid C*	-
	1 µM Bilobalid Grubu	*KCI*	*1 µM Bilobalid*	-
	10 µM Bilobalid Grubu	*KCI*	*10 µM Bilobalid*	-
	100 µM Bilobalid Grubu	*KCI*	*100 µM Bilobalid*	-

Tablo 3.3. WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe yapılan çalışmalar ve bu çalışmalarda kullanılan deney grupları

WAG/Rij Kortikal Nöron Kültüründe Yapılan Çalışmalar				
	Deney Grupları	**Uyarım**	**EGb 761/Etken Bileşen**	**Bloker/Antagonist**
EGb 761 Dozları	*KCl Grubu*	*KCl*	-	-
	50 µg/ml EGb 761 Grubu	*KCl*	*50 µg/ml EGb 761*	-
	100 µg/ml EGb 761 Grubu	*KCl*	*100 µg/ml EGb 761*	-
	200 µg/ml EGb 761 Grubu	*KCl*	*200 µg/ml EGb 761*	-
	400 µg/ml EGb 761 Grubu	*KCl*	*400 µg/ml EGb 761*	-
EGb 761 Etken Bileşenleri ve Dozları	*1 µM Ginkgolid A Grubu*	*KCl*	*1 µM Ginkgolid A*	-
	10 µM Ginkgolid A Grubu	*KCl*	*10 µM Ginkgolid A*	-
	100 µM Ginkgolid A Grubu	*KCl*	*100 µM Ginkgolid A*	-
	1 µM Ginkgolid B Grubu	*KCl*	*1 µM Ginkgolid B*	-
	10 µM Ginkgolid B Grubu	*KCl*	*10 µM Ginkgolid B*	-
	100 µM Ginkgolid B Grubu	*KCl*	*100 µM Ginkgolid B*	-
	1 µM Ginkgolid C Grubu	*KCl*	*1 µM Ginkgolid C*	-
	10 µM Ginkgolid C Grubu	*KCl*	*10 µM Ginkgolid C*	-
	100 µM Ginkgolid C Grubu	*KCl*	*100 µM Ginkgolid C*	-
	1 µM Bilobalid Grubu	*KCl*	*1 µM Bilobalid*	-
	10 µM Bilobalid Grubu	*KCl*	*10 µM Bilobalid*	-
	100 µM Bilobalid Grubu	*KCl*	*100 µM Bilobalid*	-
EGb 761 Etken Bileşeni ve Kalsiyum Kanal Blokerleri	*10 µM Nikardipin Grubu*	*KCl*	-	*10 µM Nikardipin*
	10 µM Nikardipin + 10 µM Ginkgolid B Grubu	*KCl*	*10 µM Ginkgolid B*	*10 µM Nikardipin*
	10 µM Mibefradil Grubu	*KCl*	-	*10 µM Mibefradil*
	10 µM Mibefradil + 10 µM Ginkgolid B Grubu	*KCl*	*10 µM Ginkgolid B*	*10 µM Mibefradil*
	10 µM Dantrolen Grubu	*KCl*	-	*10 µM Dantrolen*
	10 µM Dantrolen + 10 µM Ginkgolid B Grubu	*KCl*	*10 µM Ginkgolid B*	*10 µM Dantrolen*
EGb 761 Etken Bileşeni ve Glutamaterjik Sistem	*Glutamat Grubu*	*Glutamat*	-	-
	Glutamat+ 200 µg/ml EGb 761Grubu	*Glutamat*	*200 µg/ml EGb 761*	-
	Glutamat + 10 µM Gink B Grubu	*Glutamat*	*10 µM Ginkgolid B*	-
	CNQX Grubu	*Glutamat*	-	*20 µM CNQX*
	CNQX + 200 µg/ml EGb 761Grubu	*Glutamat*	*200 µg/ml EGb 761*	*20 µM CNQX*
	CNQX + 10 µM Gink B Grubu	*Glutamat*	*10 µM Ginkgolid B*	*20 µM CNQX*
	AP-5 Grubu	*Glutamat*	-	*10 µM AP-5*
	AP-5 + 200 µg/ml EGb 761Grubu	*Glutamat*	*200 µg/ml EGb 761*	*10 µM AP-5*
	AP-5 + 10 µM Gink B Grubu	*Glutamat*	*10 µM Ginkgolid B*	*10 µM AP-5*

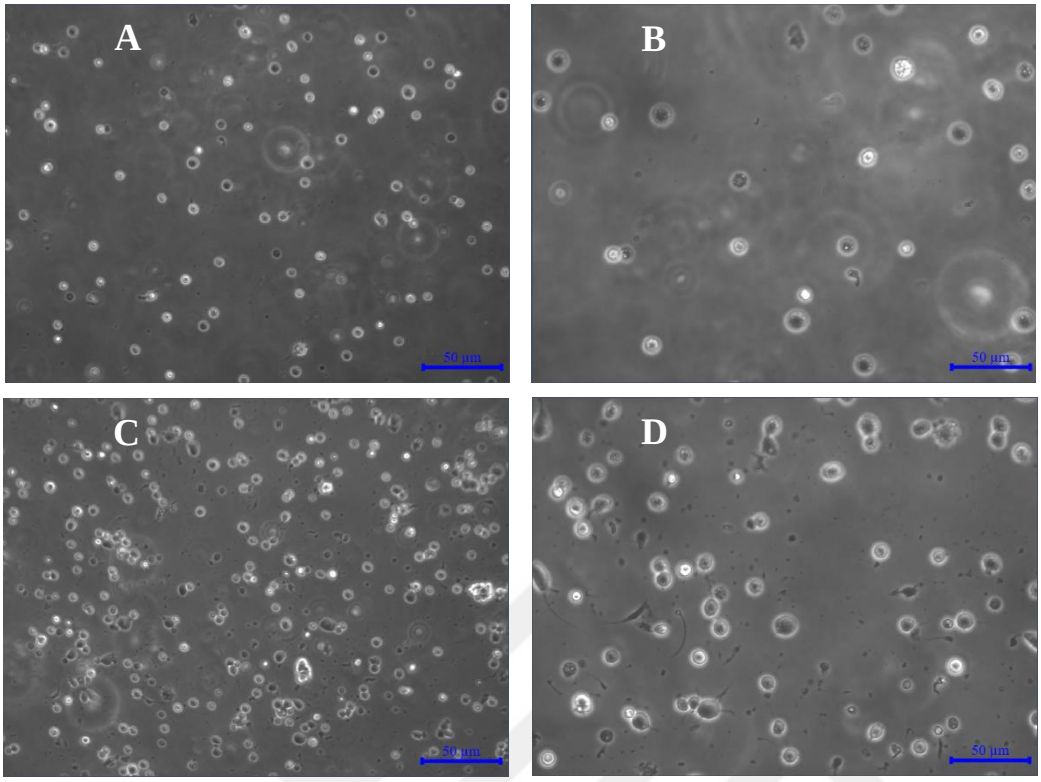
3.4. Kortikal Nöron Kültürü

Nöronların yapışmasını sağlamak amacıyla cam tabanlı petriler (FD-35, WPI, Germany) %10'luk poli-L-lizin (PLL) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2 defa distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Diseksiyon işlemleri esnasında kullanmak üzere hibernate A (HBA), kültür işlemleri için L-15 ve inkübasyon için ise neurobasal A (NBA) kullanıldı. Tüm besiyerlerine %1 antibiyotik-antimitotik solüsyon eklendi. L-15 ve NBA besiyerlerine ise ayrıca %1 glutamax ve

%2 B-27 ilave edildi. Diseksiyon işlemleri soğuk çelik plaka üzerinde yapıldı. Yavru sıçan dekapite edildikten sonra, kafatası açılarak beyni çıkartıldı ve korteks hemisferlerinden bir tanesi (hipokampus ayrılmış halde) alınarak %0,75 papain içeren L-15 içine konuldu. Doku enzimatik olarak parçalanması için +4 °C'de 45 dakika inkübe edildi. Enzimatik parçalanma sonrası 10 µl DNaz eklenerek hücrelerin ortamda bulunan nükleik asitler nedeniyle birbirlerine yapışmaları engellendi. Çalışmanın kalan kısmında kullanılacak L-15 besiyeri içerisine %10 fetal bovine serum (FBS) eklendi. Mekanik ayrışmanın sağlanması amacıyla pastör pipeti ile yaklaşık 30 saniye tritürasyon uygulandı. Tritürasyon sonrası çökmeye bırakılan numunenin üstünde kalan kısımdan 500 µl'lik hücre içeren solüsyon ayrı bir falkona alınarak üzerine alınan miktar kadar L-15 ilave edildi ve tekrar tritürasyon uygulandı. Toplamda yaklaşık 3 ml solüsyon elde ettikten sonra 1000 µl'lik pipet kullanılarak falkon içerisinde 30 saniye süreyle tritürasyon uygulamasına devam edildi. Hücrelerin tamamen ayrışması için son olarak solüsyon insülin enjektöründen geçirildi. Solüsyona 1 ml L-15 eklendikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Titreşimli bir plaka üzerinde gerçekleşen inkübasyonun ardından solüsyon 5 dakika +4°C sıcaklık ve 1000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatant çekilip atıldı ve pellet 3 ml L-15 ile çözüldü ve tekrar santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant çekilip atıldı ve pellete NBA eklendi. Hücre sayımının yapılmasının ardından petri başına 50 000 hücre gelecek oranda solüsyon NBA ile seyreltildikten sonra PLL ile kaplanmış petrilere 500'er µl ekim yapıldı ve hücreler 37°C'de %95 O_2 %5 CO_2 içeren nemli ortamda 2 saat inkübe edildi (Şekil 3.3). İki saatin ardından üzerine 1 ml daha NBA eklenerek kalsiyum görüntüleme yapılıncaya kadar inkübatörde 3-4 günde bir besiyeri değiştirilecek şekilde beklemeye bırakıldı.

3.5. Kalsiyum Boyama

EGb 761'in ve etken bileşenlerinin nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, hücre içi kalsiyum değişimine ilişkin görüntüleme çalışması yapıldı. Nöronlardaki hücre içi kalsiyum artışı nöronal uyarılabilirliğin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Hücre içi kalsiyum seviyesinin görüntülenebilmesi için kalsiyum duyarlı fluo-4 AM boyası kullanıldı. Kortikal nöron kültüründe kalsiyum boyama işlemleri için aşağıdaki solüsyonlar hazırlanarak sonrasında belirtilen adımlar takip edildi.



Şekil 3.3. Primer kortikal nöron kültürü. Kültür işlemleri sonrasındaki görüntüler A: 0. dk 20X, B: 0. dk 40X, C: 60. dk 20X, D:60. dk 40X

Boyama Solüsyonu: 497 µl Tyrode's solüsyonu +1,5 µl Fluo-4 + 1,5 µl pluronik asit.

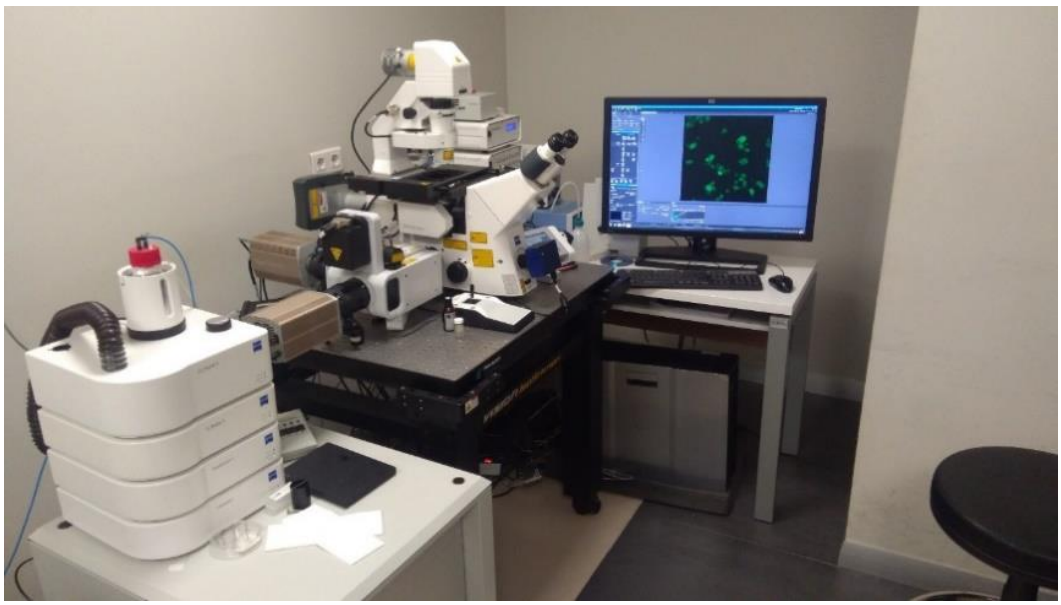
Tyrode's Solüsyonu: 140 mM NaCl, 5 mM KCl,5 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 10 mM glukoz (pH=7,4).

Boyama İşlemi:

- Petrideki besiyeri çekilerek bir ependorfa alındı ve inkübatörde saklandı.
- Hücreler 1 ml HBSS ile yıkandı.
- Sonrasında 1 ml Tyrode solüsyonu ile yıkandı.
- 0,5 ml boyama solüsyonu eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Boyama solüsyonu atıldıktan sonra 1 ml Tyrode solüsyonu ile yıkandı.
- 1 ml HBSS ile yıkandı.
- İnkübatördeki besiyeri petriye konularak etüvde 10 dakika inkübe edildi.

3.6. Hücrelerin Floresan Işıma Değerlerinin Tespiti

Kalsiyum boyama işlemi tamamlanan petrilerde ısı ve gaz kontrolü altında Spinning Disk (SD) konfokal mikroskop (Zeiss Cell Observer SD Time-Lapse) kullanılarak kalsiyum görüntüleme yapıldı (Şekil 3.4). Mikroskoba yerleştirilen petrilerde herhangi bir alanda 30 saniye süreyle kayıt alınarak hücrelerin bazal kalsiyum seviyelerine ilişkin görüntüler kaydedildi (F_0). Bazal kalsiyum seviyesinin kaydedilmesinin (F_0) ardından tablo 3.2 veya 3.3'de belirtilen deney gruplarına uygun madde uygulamaları yapıldı ve sonrasında petrideki diğer bir alandan 90 saniye daha görüntü alınarak (F) deney sonlandırıldı. Herbir deney grubu için iki farklı petride deneysel çalışma tekrarlandı. Nöronlardaki kalsiyum miktarına bağlı olarak oluşan floresan ışıma değerleri Image J programı (National Institutes of Health) kullanılarak RFU değeri şeklinde (Relative Floresan Unit) sayısal veriye dönüştürüldü. Her görüntü alanında ortalama 45 hücre rastgele işaretlenerek RFU değeri belirlendi. Işıma değerlerinin zamana bağlı değişimini minimalize etmek için veriler % olarak normalize edildi. Bazal dönemde nöronlardan elde edilen floresan ışıma değerlerinin ortalaması F_0 değeri olarak, madde uygulamaları sonrasında elde edilen her hücreye ait veriler ise F değeri olarak kabul edildi ve nispi floresan değişimi ($\Delta F/F_0 = (F-F_0)/F_0$) hesaplandı. Her grup için ortalama 90 nöronun verisi istatistiksel analizde kullanıldı.



Şekil 3.4. SD konfokal mikroskop (Zeiss Cell Observer SD Spinning Disk Time-Lapse) ve kalsiyum görüntüleme sisteminden bir kesit

3.7. İstatistiksel Analiz

Veriler yüzde olarak normalize edildikten sonra hesaplanan nisbi floresan değişime ($\Delta F/F_0 = (F-F_0)/F_0$) ilişkin değerler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler için SPSS v22 yazılımı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak belirlendi. Veriler çoğunlukla normal dağılıma uymadıkları için Kruskal Wallis varyans analizi sonrası ikili grup karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirildi. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamındaki Wistar ve WAG/Rij sıçanlarından elde edilen kortikal nöronların, kültür işlemlerinden ortalama 2 saat sonra aksonal uzantı oluşturdukları saptandı (Şekil 3.3). Petrilerin tamamında, kalsiyum boyama işlemlerinin ardından bazal aktivite kaydı sırasında nöronların spontan floresan ışıma yaptıkları gözlemlendi. Saniyede iki kareden fazla görüntü kaydı alınmasına olanak sağlayan SD konfokal mikroskop ile bu osilasyonlar rahatlıkla ayırt edildi.

4.1. Wistar ve WAG/Rij Sıçanlardan Elde Edilen Kortikal Nöronlarda Uyarılabilirlik Düzeylerinin Karşılaştırılması

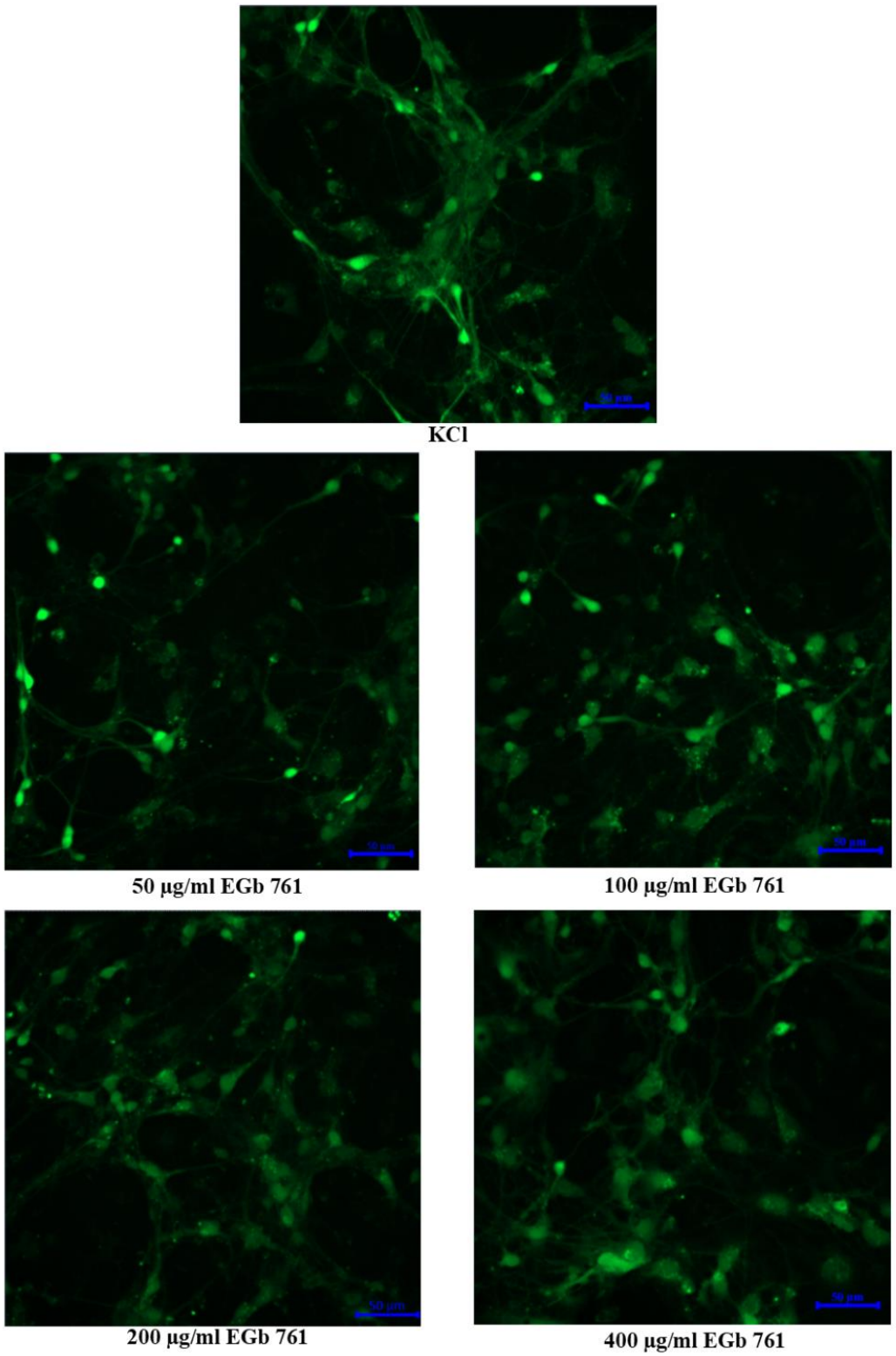
Genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanlar Wistar ırkı sıçanların inbred üretilmesi neticesinde elde edilmektedir. İki sıçan ırkının kortikal nöronlarının 30 mM KCl uyarımına verdiği yanıt karşılaştırıldığında, WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöronlardaki hücre içi kalsiyum seviyesinin Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöronlara göre bir miktar fazla olduğu fakat bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Wistar ve WAG/Rij sıçanların kortikal nöron kültürlerinde KCl uyarımına ilişkin hücre içi kalsiyum seviyeleri

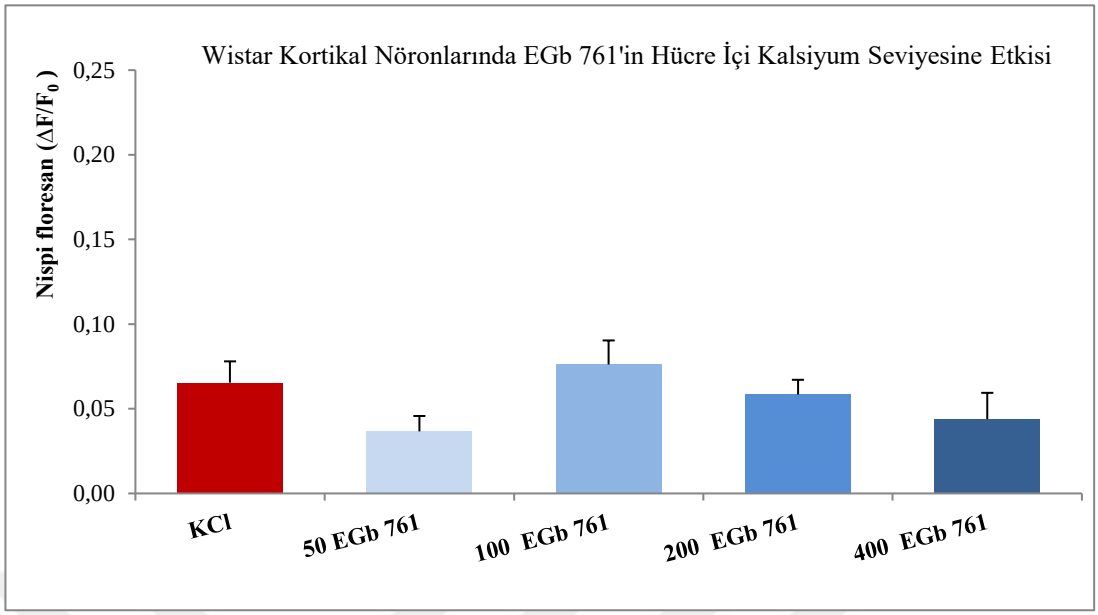
Gruplar	$\Delta F/F_0$ (Ortalama ± SE)
KCl (Wistar)	0,066 ± 0,01
KCl (WAG/Rij)	0,108 ± 0,01

4.2. Wistar Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 Dozlarının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi

Wistar sıçanlarından elde edilen kortikal nöron kültürlerine EGb 761'in 50, 100, 200 ve 400 µg/ml dozları ayrı ayrı uygulandı. Gruplardan elde edilen ortalama $\Delta F/F_0$ değeri karşılaştırıldığında, EGb 761 dozlarının Wistar sıçanların kortikal nöronlarının hücre içi kalsiyum seviyesinde anlamlı bir değişime neden olmadığı tespit edildi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Wistar sıçan kortikal nöron kültürüne uygulanan EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri

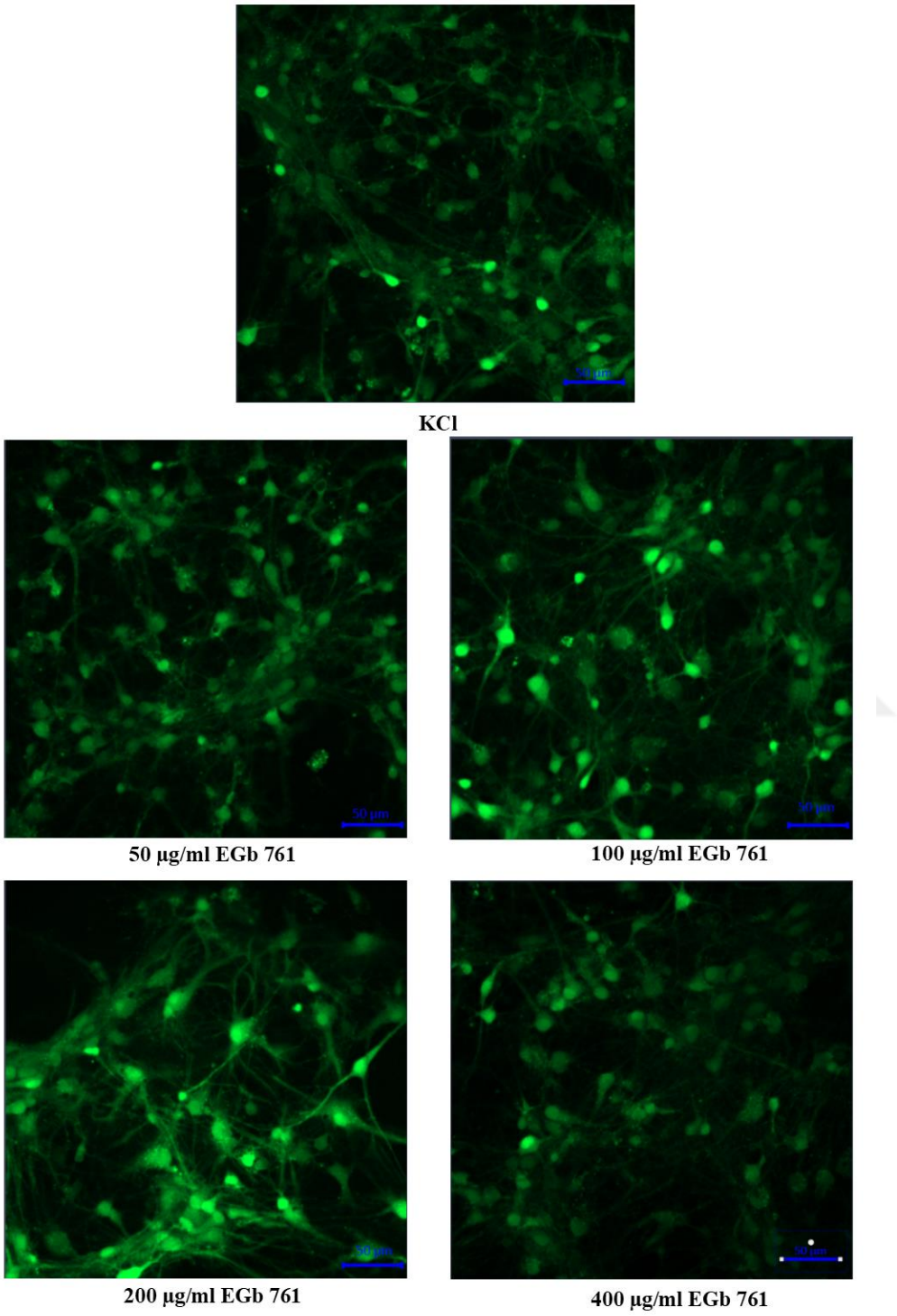


Şekil 4.2. Wistar sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri

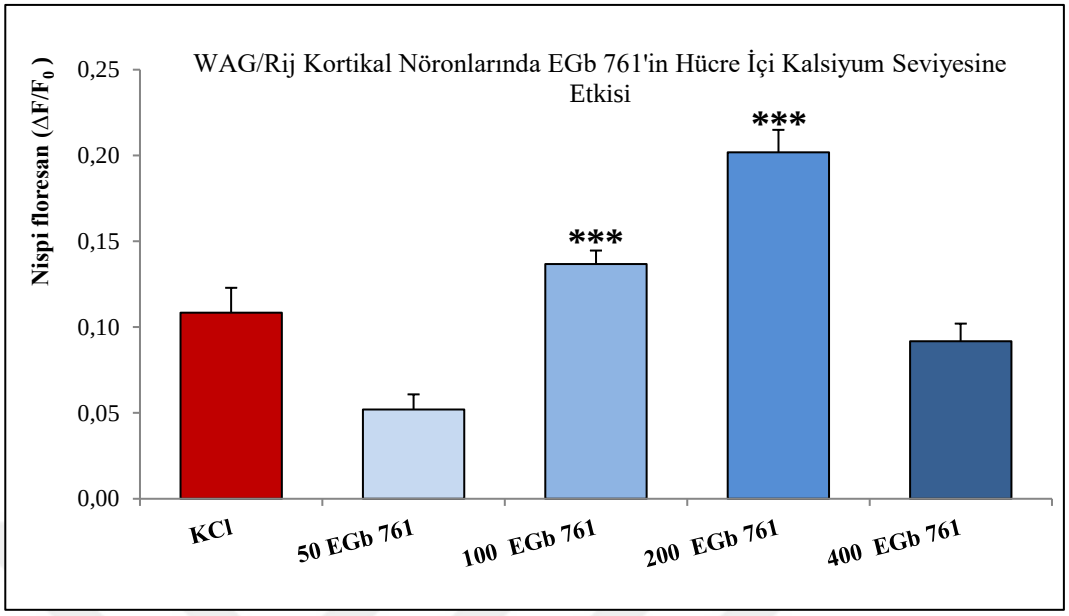
4.3. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 Dozlarının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi

WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültürlerine EGb 761'in 50, 100, 200 ve 400 µg/ml dozları ayrı ayrı uygulandı. Ortalama $\Delta F/F_0$ değeri KCI grubu için 0,108±0,014 iken, 100 ve 200 µg/ml EGb 761 doz gruplarında sırasıyla 0,137±0,008 ve 0,201±0,013 değerlerine yükseldiği saptandı. EGb 761 dozları uygulandıktan sonra oluşan floresan ışımalara ilişkin yapılan $\Delta F/F_0$ oranı hesaplamalarında 100 ve 200 µg/ml EGb 761 dozlarında hücre içi kalsiyum seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($p<0,001$; Şekil 4.3. ve 4.4.).

EGb 761 dozlarının WAG/Rij ve Wistar sıçanlarından elde edilen kortikal nöron kültürleri üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında, 50 µg/ml grubu haricindeki tüm dozlarda WAG/Rij kortikal nöronların hücre içi kalsiyum seviyesinin Wistar kortikal nöronlardan daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,001$).



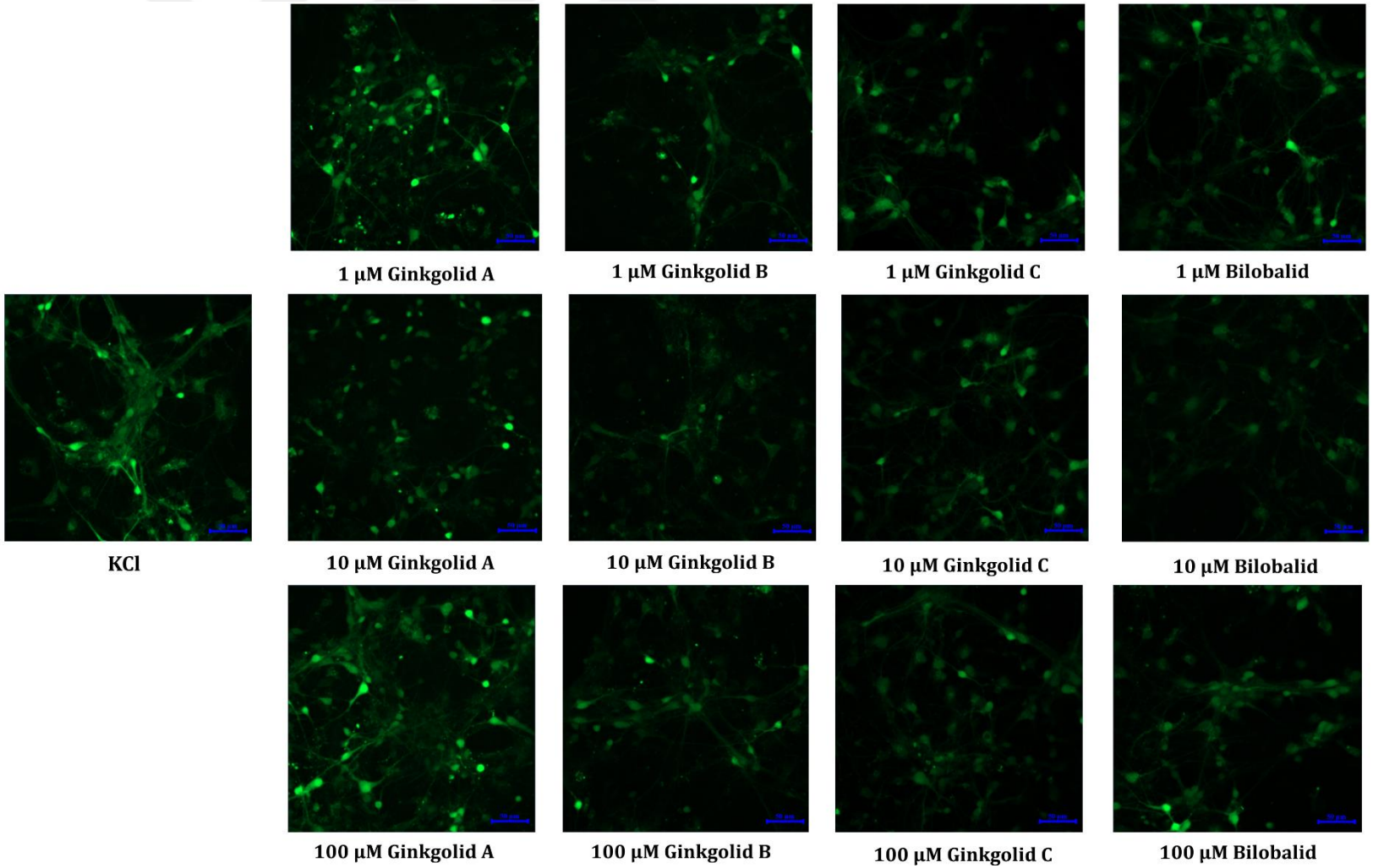
Şekil 4.3. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültürüne uygulanan EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri



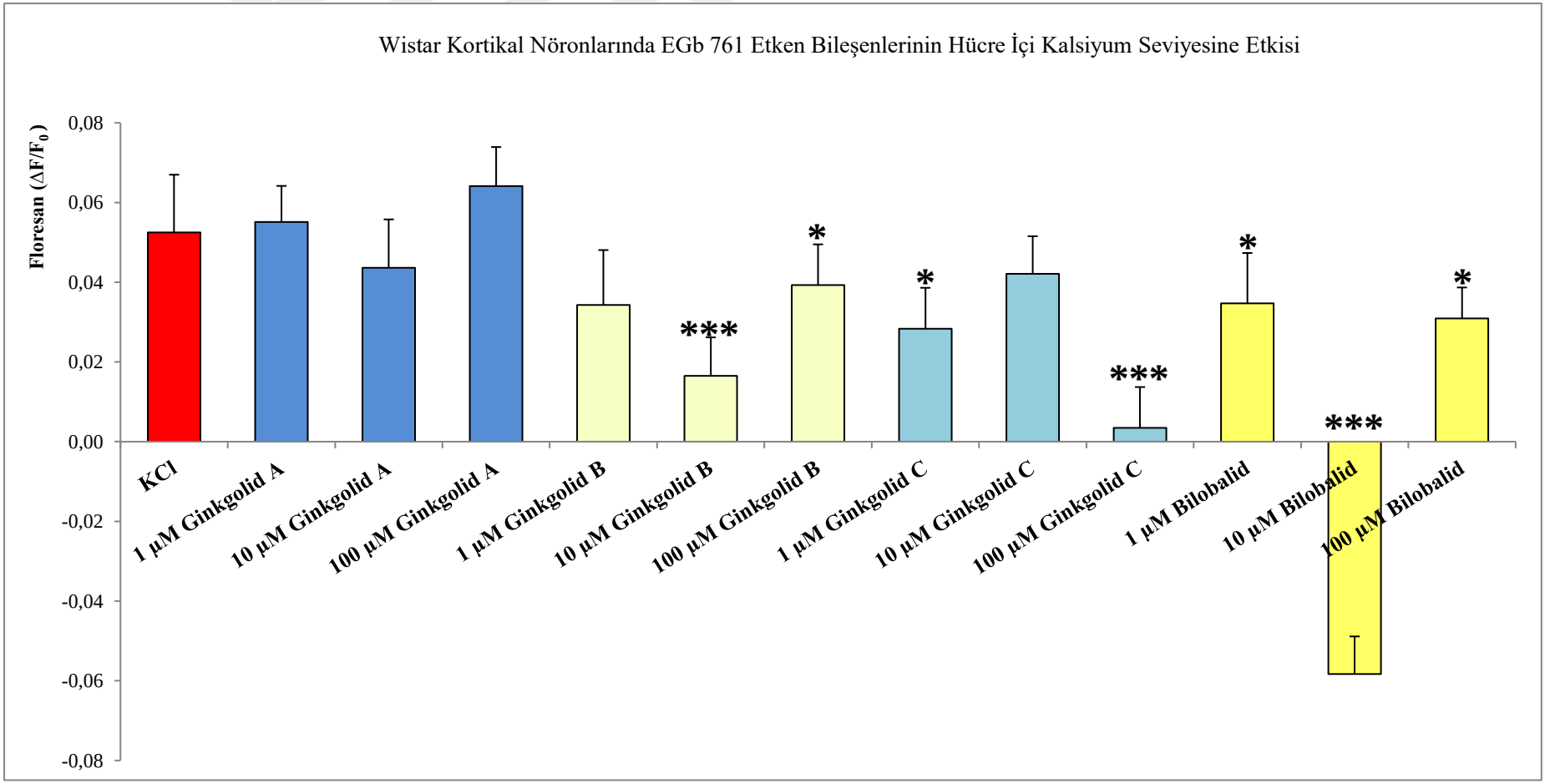
Şekil 4.4. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri (*** p<0,001; KCl grubuna göre)

4.4. Wistar Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 Etken Bileşenleri ve Bunların Dozlarının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi

Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761 etken bileşenlerinden ginkgolid A, B, C ve bilobalidin 1, 10 ve 100 µM dozları ayrı ayrı uygulandı. Ortalama $\Delta F/F_0$ değeri KCl grubu için 0,108±0,014 iken 100 µM ginkgolid B, 1 µM bilobalid, 100 µM bilobalid ve 1 µM ginkgolid C doz gruplarında sırasıyla 0,039±0,010, 0,035±0,013, 0,031±0,010 ve 0,028±0,007 değerinde olduğu tespit edildi. Bu bileşen ve dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı belirlendi ($p<0,05$). 10 µM ginkgolid B, 100 µM ginkgolid C ve 10 µM bilobalid gruplarında ise $\Delta F/F_0$ ortalaması 0,017±0,004, 0,003 ± 0,010 ve -0,059±0,018 değerlerinde olduğu ve bu etken bileşenler ve dozlarının KCl grubuna göre hücre içi kalsiyum seviyesinde daha fazla azalmaya neden olduğu saptandı ($p<0,001$; Şekil 4.5. ve 4.6.).



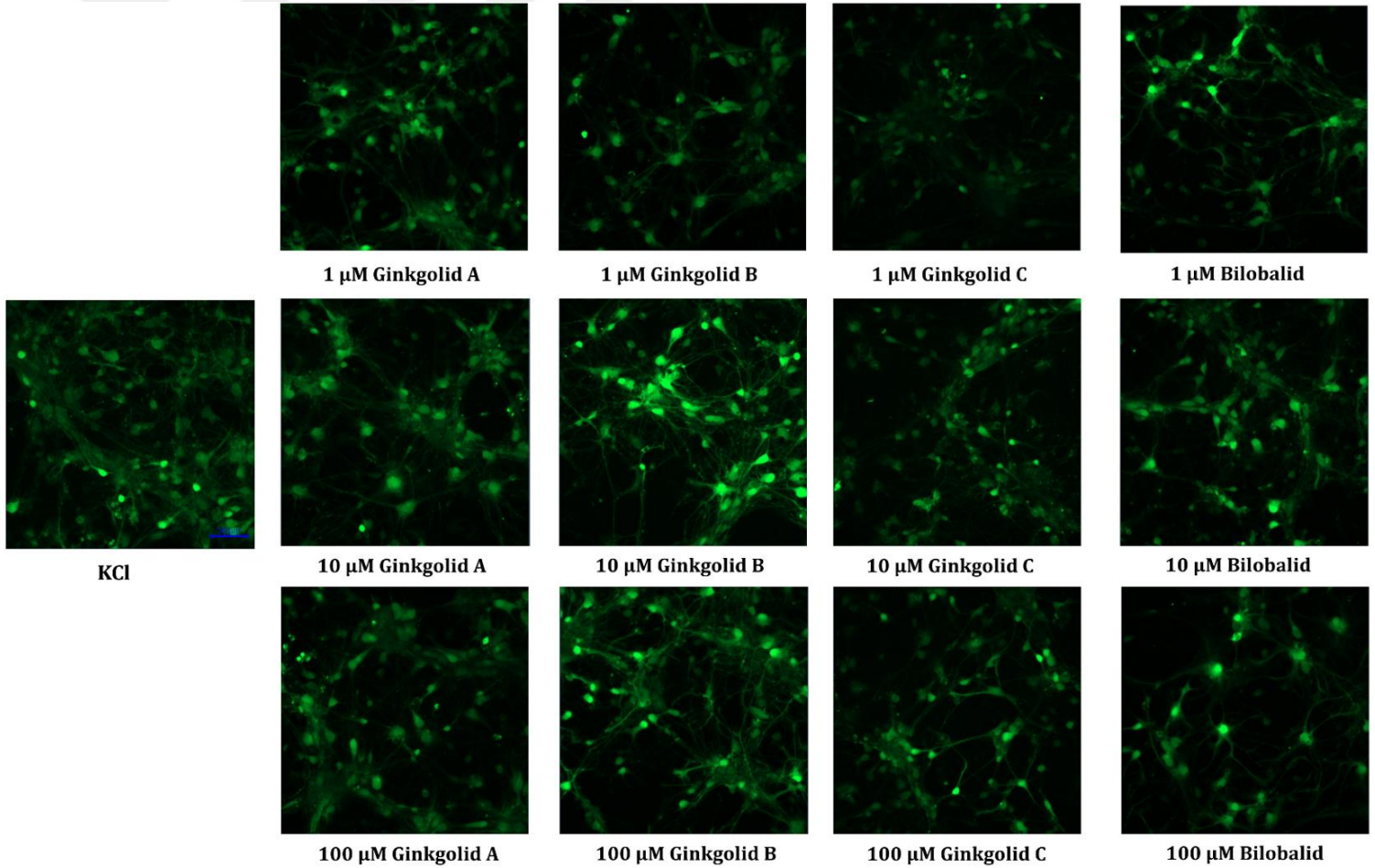
Şekil 4.5. Wistar sıçan kortikal nöron kültüründe uygulanan EGb 761 etken bileşenleri ve bunların dozlarının hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri



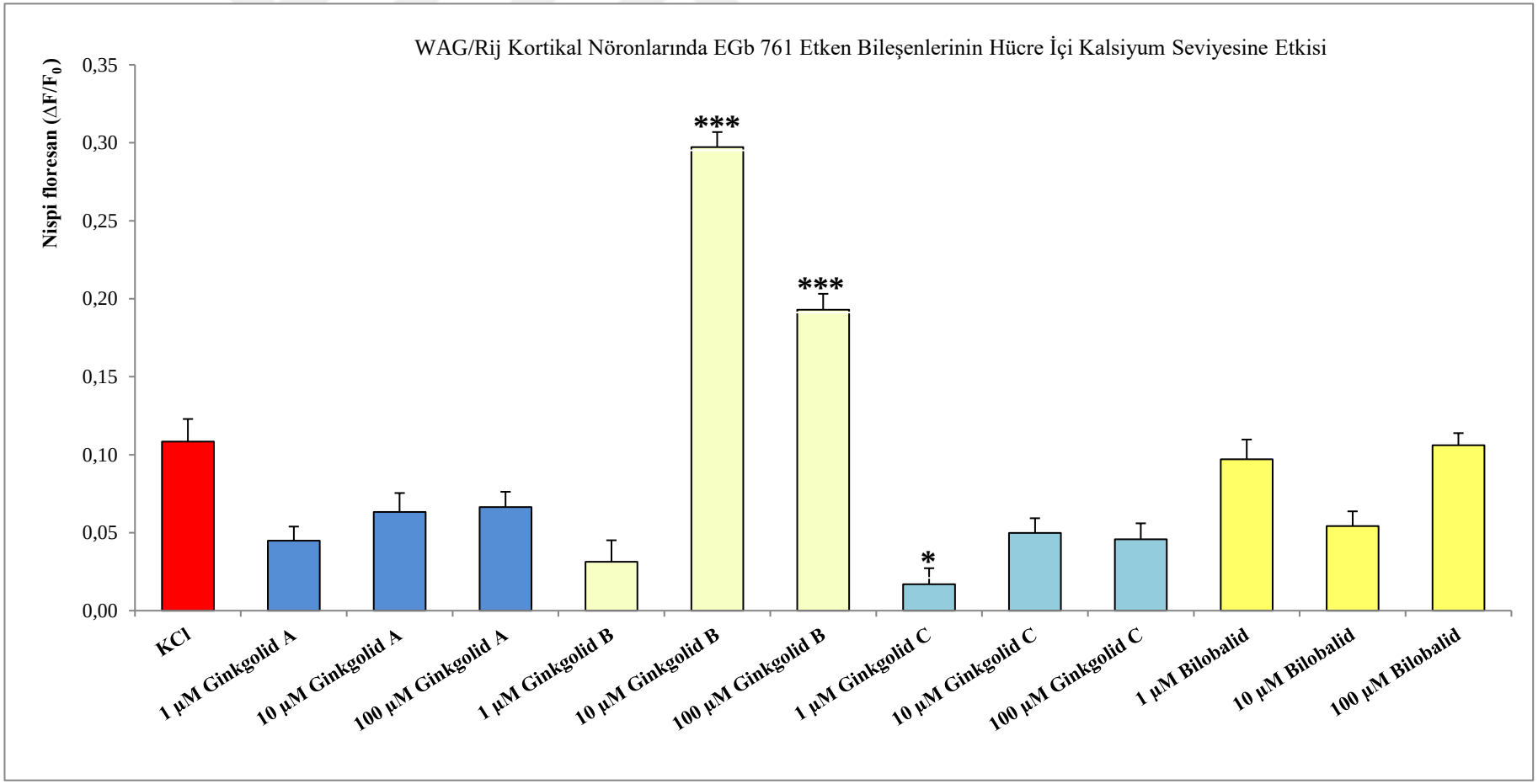
Şekil 4.6. Wistar sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761'in etken bileşenleri ve dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri (*: $p<0,05$; ***: $p<0,001$; KCl grubuna göre)

4.5. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 Etken Bileşenleri ve Bunların Dozlarının Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi

WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761 dozlarının nöronal uyarılabilirlikte artışa neden olduğu saptandıktan sonra bu artışı EGb 761'in hangi etken bileşen veya bileşenler üzerinden gerçekleştirdiğini belirlemek için ginkgolid A, B, C ve bilobalidin 1, 10 ve 100 µM dozları uygulanarak etkileri incelendi. Ortalama $\Delta F/F_0$ değeri KCI grubu için 0,108±0,014 olarak saptanırken, 10 ve 100 µM ginkgolid B doz gruplarında 0,297±0,010 ve 0,193±0,010, 1 µM ginkgolid C grubunda ise 0,017±0,010 olduğu görüldü. EGb 761 etken bileşen ve dozları ayrı ayrı uygulandıktan sonra oluşan floresan ışımalara ilişkin yapılan $\Delta F/F_0$ hesaplamalarında 10 ve 100 µM ginkgolid B etken bileşen ve dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesini KCl grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı ($p<0,001$) fakat 1 µM ginkgolid C'nin ise hücre içi kalsiyum seviyesinde anlamlı bir azalmaya yol açtığı tespit edildi ($p<0,05$; Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.7. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 etken bileşenlerinin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri



Şekil 4.8. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 etken bileşenlerinin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri (* $p<0,05$; *** $p<0,001$; KCl grubuna göre)

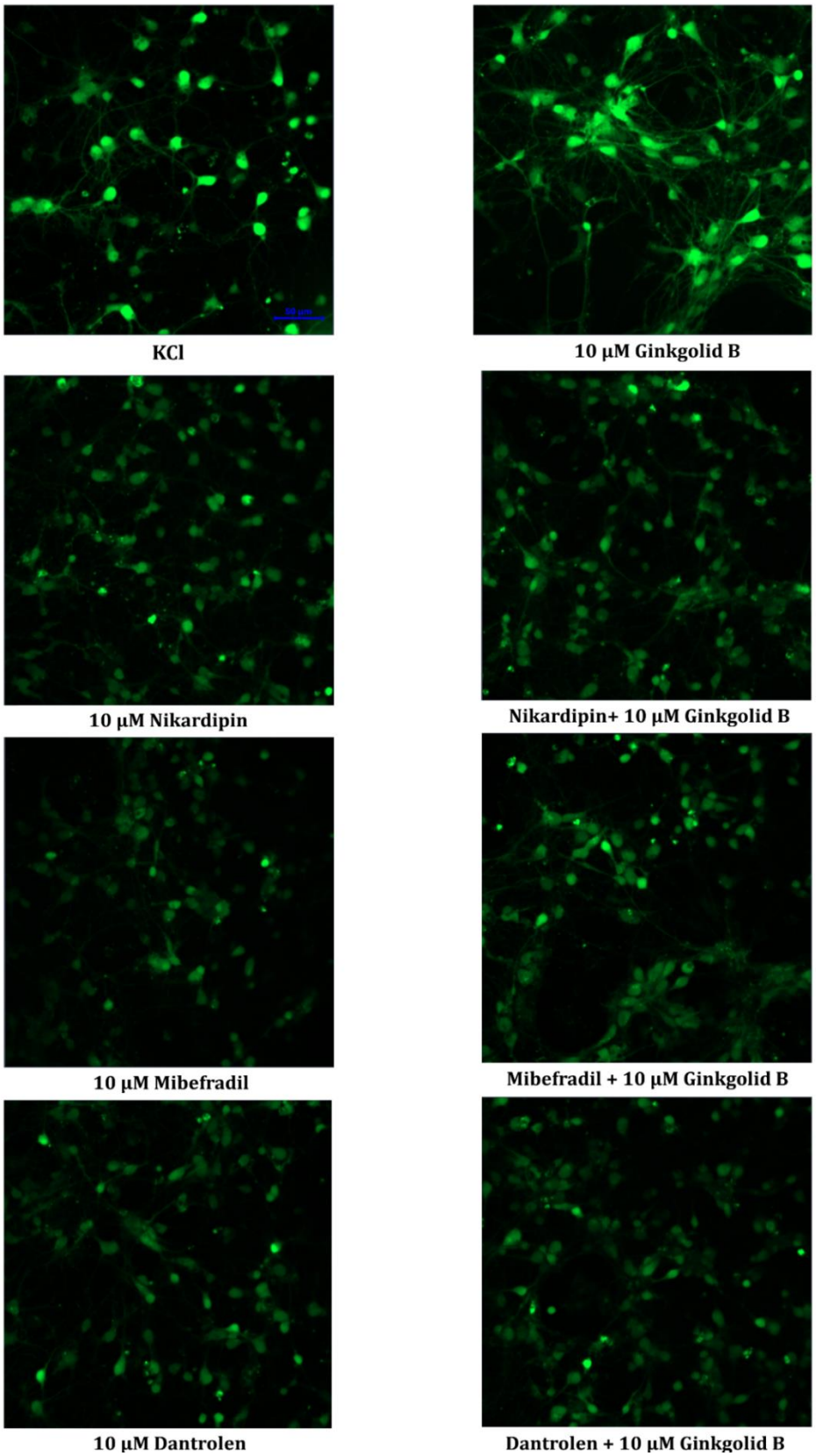
4.6. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe Ginkgolid B'nin Sebep Olduğu Hücre İçi Kalsiyum Artışına Aracılık Eden Kanal Tipinin Belirlenmesi

Doktora tez çalışmasının bu bölümünde WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 etken bileşenlerinden ginkgolid B'nin oluşturduğu hücre içi kalsiyum seviyesindeki artışa neden olan kalsiyum kaynağının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla voltaj-kapılı L-tipi kalsiyum kanallarını 10 µM nikardipin, voltaj-kapılı T-tipi kalsiyum kanalları 10 µM mibefradil ve riyonodin reseptörleri 10 µM dantrolen ile bloklandı. WAG/Rij nöron kültüründe etken bileşenlerden elde edilen bulgulara göre hücre içi kalsiyum seviyesinde en fazla değişime 10 µM ginkgolid B neden olduğu için etkileşim çalışmalarında kullanılmasına karar verildi.

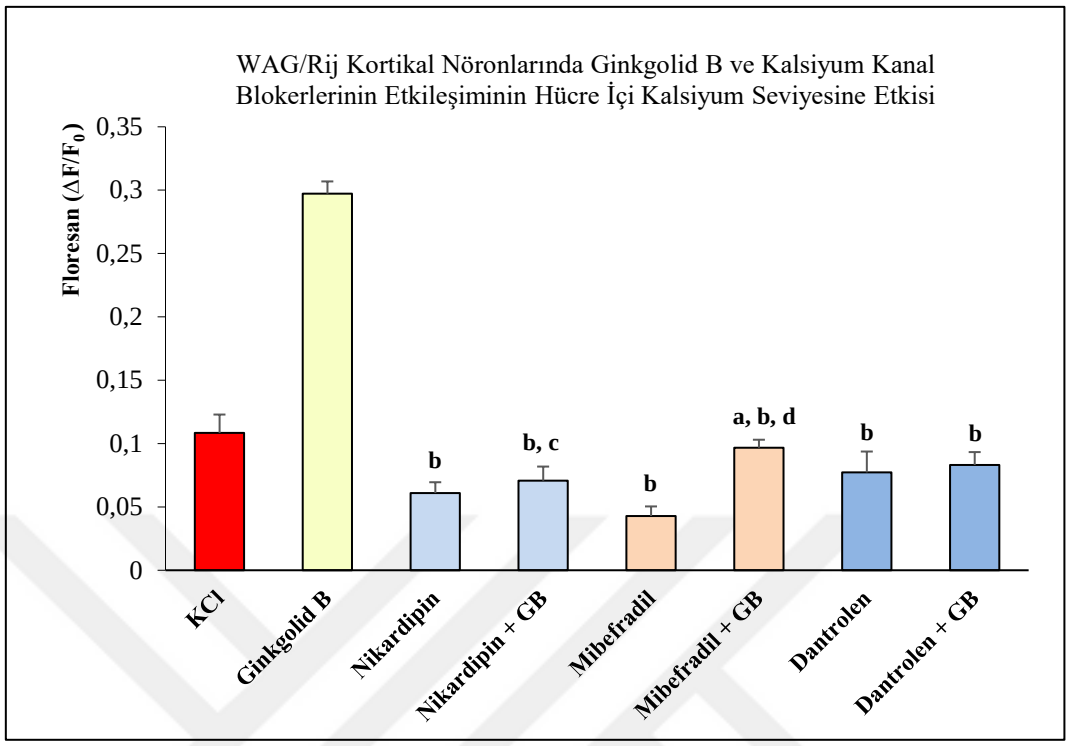
Yapılan deneylerde nikardipin, mibefradil ve dantrolen gruplarındaki hücre içi kalsiyum seviyesinin KCl grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim göstermediği tespit edildi. Etkileşim gruplarında ise sadece mibefradil + ginkgolid B grubu 0,097 ± 0,006 ortalama $\Delta F/F_0$ değeriyle KCl grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı ($p<0,05$).

Ortalama $\Delta F/F_0$ değeri ginkgolid B grubunda 0,297 ± 0,010 iken, nikardipin grubunda 0,061 ± 0,009, nikardipin + ginkgolid B grubunda ise 0,071 ± 0,011 olduğu tespit edildi. Nikardipin + ginkgolid B grubu nikardipin grubuna göre hücre içi kalsiyum seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olurken ($p<0,05$), ginkgolid B grubuna göre ise anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,001$). Voltaj-kapılı T-tipi kanalların etkinliğinin incelendiği deneylerde mibefradil grubunun ortalama $\Delta F/F_0$ değeri 0,043 ± 0,008 iken mibefradil + ginkgolid B grubunda 0,097 ± 0,006 olarak tespit edildi. Bu verilere göre mibefradil + ginkgolid B grubunun hücre içi kalsiyum seviyesinde mibefradil grubuna göre anlamlı bir artış ($p<0,001$), ginkgolid B grubuna göre ise azalma olduğu saptandı ($p<0,001$).

Ginkgolid B'nin hücre içi kalsiyum seviyesindeki artışa endoplazmik retikulumdaki riyanodin reseptörlerinin katkısının değerlendirildiği dantrolen ve dantrolen + ginkgolid B gruplarında ortalama $\Delta F/F_0$ değeri sırasıyla 0,077 ± 0,016 ve 0,083 ± 0,010 olarak tespit edildi. Dantrolen + ginkgolid B grubunda dantrolen grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmezken, ginkgolid B grubuna göre hücre içi kalsiyum seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya olduğu görüldü ($p<0,001$; Şekil 4.9 ve 4.10).



Şekil 4.9. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe 10 µM ginkgolid B ve bazı kalsiyum kanal blokerlerinin etkileşimlerinin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri



Şekil 4.10. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe 10 µM ginkgolid B ve kalsiyum kanal blokerlerinin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri

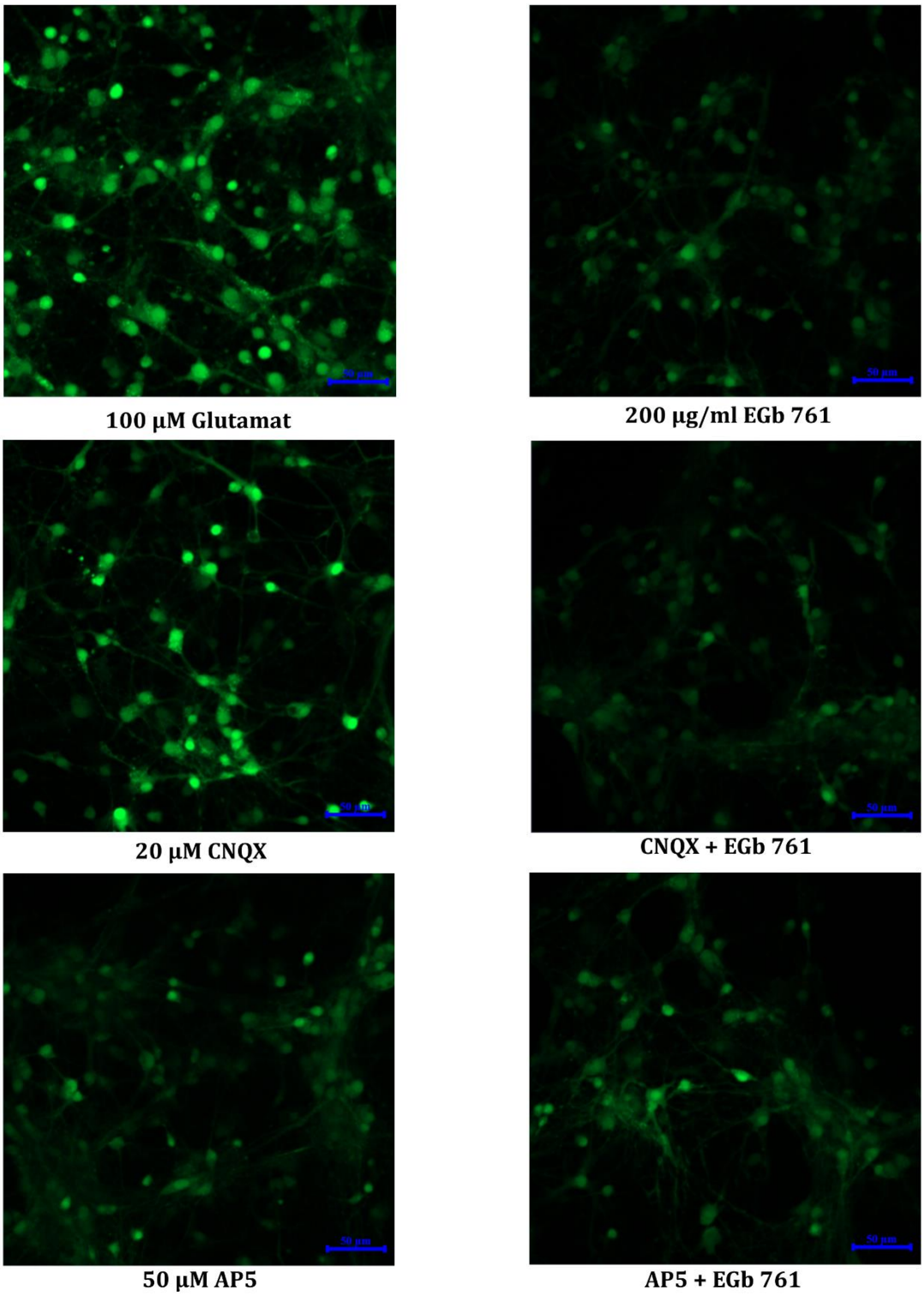
(a: $p<0,05$ KCl grubuna göre, b: $p<0,001$ ginkgolid B grubuna göre, c: $p<0,05$ nikardipin grubuna göre, d: $p<0,001$ mibefradil grubuna göre)

4.7. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe EGb 761 ve İyonotropik Glutamat Reseptörleriyle Etkileşiminin Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi

WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761'in iyonotropik glutamat reseptörleriyle etkileşiminin incelemesi amaçlandı. Bu doğrultuda nöronlar 100 µM glutamat ile uyarıldıktan sonra Tablo 3.3'de belirtildiği şekliyle deney grubuna göre madde uygulamaları yapıldı.

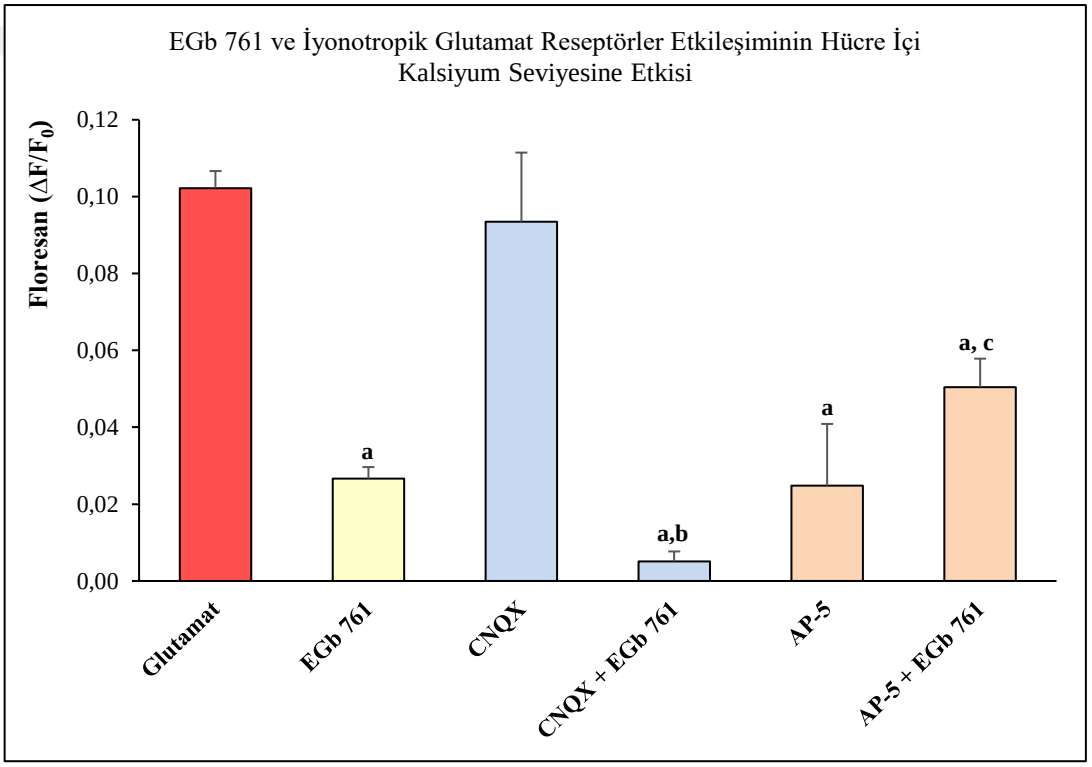
WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe glutamat, EGb 761, CNQX, CNQX+EGb 761, AP-5 ve AP-5 + EGb 761 gruplarına ait ortalama $\Delta F/F_0$ değerleri sırasıyla 0,102 ± 0,004, 0,027 ± 0,003, 0,093 ± 0,018, 0,005 ± 0,003, 0,025 ± 0,016 ve 0,050 ± 0,007 olarak tespit edildi.

Glutamat ile uyarılan WAG/Rij sıçan kortikal nöronlarına 200 µg/ml EGb 761 uygulandığında ortalama $\Delta F/F_0$ değeri glutamat grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ($p<0,001$).



Şekil 4.11. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761 ve Glutamaterjik sistem etkileşiminin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri

EGb 761 ile AMPA ve kainat reseptörlerinin ilişkisi olup-olmadığını belirlemek amacıyla bu reseptörlerin yarışmalı antagonisti CNQX (20 µM) kullanıldı. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe 20 µM CNQX grubundaki ortalama $\Delta F/F_0$ değeri glutamat grubuna göre anlamlı bir fark oluşturmadığı saptandı. 20 µM CNQX + 200 µg/ml EGb 761 grubunda ise hücre içi kalsiyum seviyesinin glutamat grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya sebep olduğu tespit edildi ($p<0,001$). 20 µM CNQX + 200 µg/ml EGb761 grubu 20 µM CNQX grubuyla karşılaştırıldığında da hücre içi kalsiyum seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptandı ($p<0,001$).



Şekil 4.12. WAG/Rij sıçan nöron kültüründe EGb 761 ve iyonotropik glutamat reseptör etkileşiminin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri (a: $p<0,001$ glutamat grubuna göre, b: $p<0,001$ CNQX grubuna göre, c: $p<0,05$ AP-5 grubuna göre)

EGb 761 ile NMDA glutamat reseptörleri arasındaki olası ilişkiyi belirlemek için seçici yarışmalı NMDA reseptör antagonisti AP-5 (50 µM) kullanıldı. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe 50 µM AP-5 grubundaki hücre içi kalsiyum seviyesinin glutamat grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p<0,001$). 50 µM AP-5 + 200 µg/ml EGb 761 grubunda da hücre içi kalsiyum seviyesinin glutamat grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ($p<0,001$).

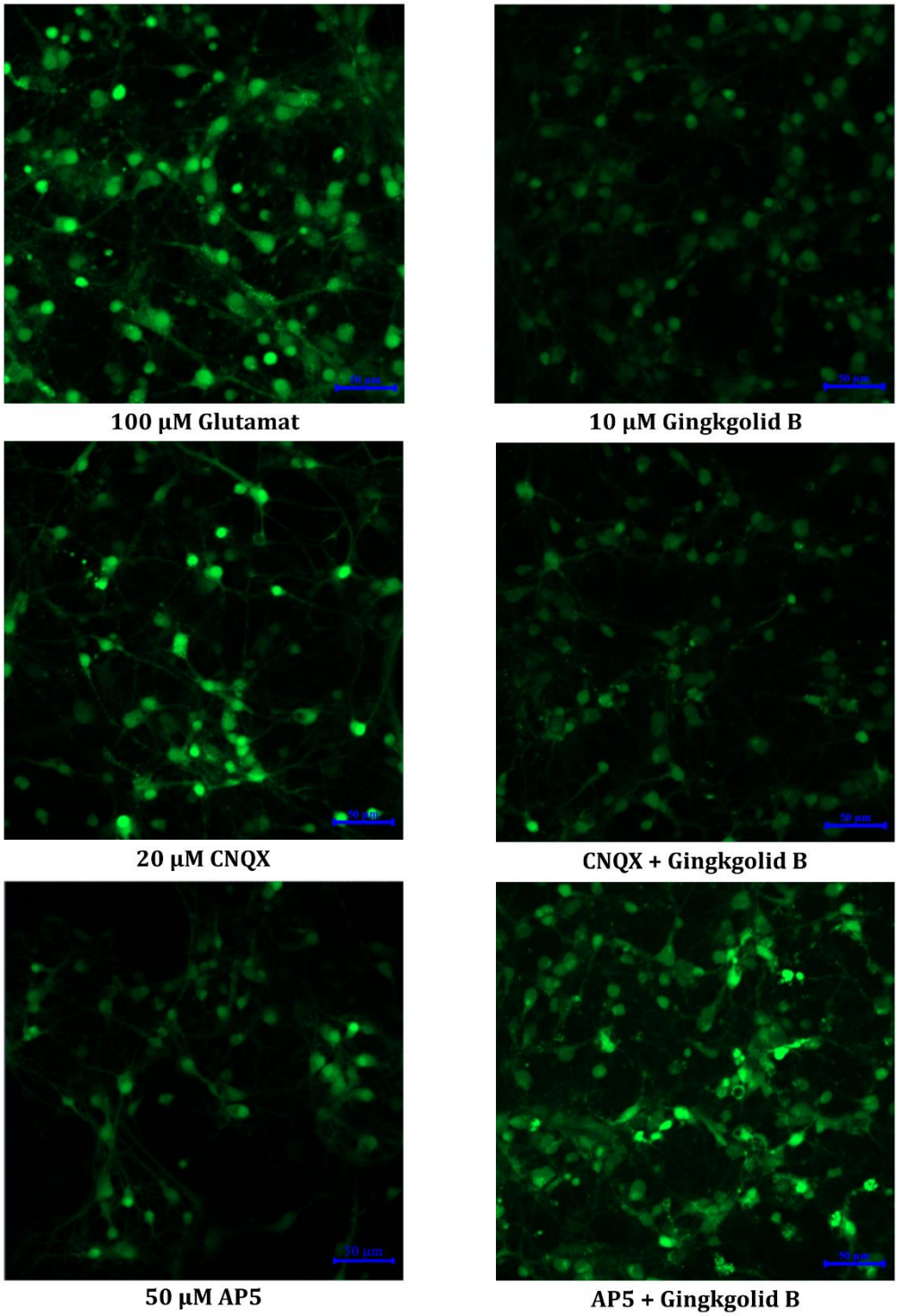
50 μM AP-5 grubu ile 50 μM AP-5 + 200 μg/ml EGb 761 grubu karşılaştırıldığında ise AP-5 ile birlikte uygulanan EGb 761'in hücre içi kalsiyum seviyesinde bir artışa yol açtığı görüldü ($p<0,05$; Şekil 4.11 ve 4.12).

4.8. WAG/Rij Sıçan Kortikal Nöron Kültüründe Ginkgolid B ve İyonotropik Glutamat Reseptörleriyle Etkileşiminin Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi

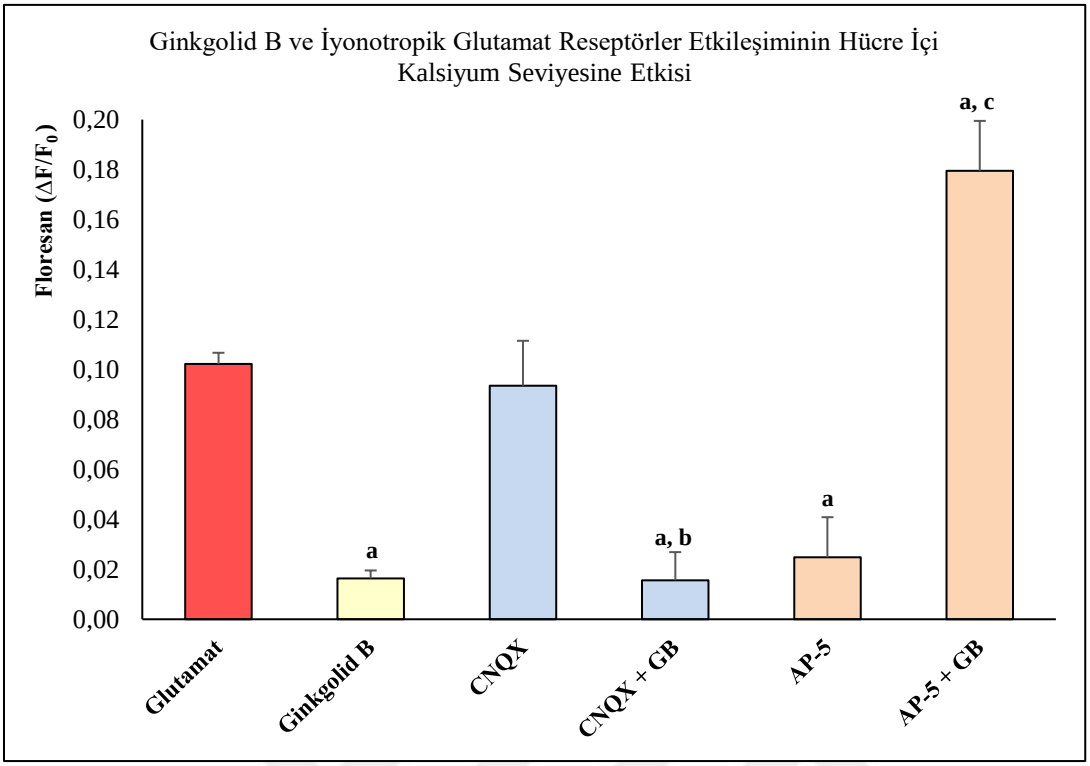
Doktora tez çalışmasının bu bölümünde WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe 10 μM ginkgolid B'nin iyonotropik glutamat reseptörleriyle etkileşiminin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisinin incelenmesi amaçlandı.

WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe glutamat, ginkgolid B, CNQX, CNQX + ginkgolid B, AP-5 ve AP-5 + ginkgolid B gruplarına ait ortalama $\Delta F/F_0$ değerlerinin sırasıyla 0,102 ± 0,004, 0,016 ± 0,003, 0,093± 0,018, 0,016 ± 0,011, 0,025 ± 0,016 ve 0,179 ± 0,020 olduğu tespit edildi. 10 μM ginkgolid B'nin hücre içi kalsiyum seviyesini glutamat grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı saptandı ($p<0,001$). AMPA ve kainat reseptörleri ile ginkgolid B arasındaki muhtemel etkileşimi belirlemek için 20 μM CNQX ile reseptörler bloklandıktan sonra nöronlar 10 μM ginkgolid B'ye maruz bırakıldı. 20 μM CNQX + 10 μM ginkgolid B grubundaki ortalama $\Delta F/F_0$ değeri hem glutamat hem de 20 μM CNQX gruplarıyla karşılaştırıldığında hücre içi kalsiyum seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ($p<0,001$).

Glutamatın NMDA reseptörleri ile ginkgolid B arasındaki muhtemel etkileşimi belirlemek için 50 μM AP-5 ile reseptörler bloklandıktan sonra nöronlar 10 μM ginkgolid B'ye maruz bırakıldı. 50 μM AP-5 + 10 μM ginkgolid B grubundaki ortalama $\Delta F/F_0$ değeri hem glutamat hem de AP-5 gruplarıyla karşılaştırıldığında hücre içi kalsiyum seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü ($p<0,001$; Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.13. WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe ginkgolid B ve glutamaterjik sistem etkileşiminin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkilerini gösteren floresan ışımalara ilişkin konfokal mikroskop görüntüleri



Şekil 4.14. WAG/Rij sıçan nöron kültüründe ginkgolid B ve iyonotropik glutamat reseptör etkileşiminin hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren nispi floresan ışıma değerleri
(a: $p<0,001$ glutamat grubuna göre, b: $p<0,001$ CNQX grubuna göre, c: $p<0,001$ AP-5 grubuna göre)

5. TARTIŞMA

Epilepsi dünya genelinde 65 milyondan fazla insanı etkilemekte ve her yıl bu sayıya ortalama 2,4 milyon kişi katılmaktadır (282). Yaygın nörolojik bir hastalık olan epilepsi, beyindeki nöronların senkron ve aşırı deşarjlarına bağlı olarak gelişen nöbetlerle karakterizedir (198). Son yıllarda tıp ve teknoloji alanlarında yaşanan büyük gelişmeler ve konuya ilişkin yapılan araştırmaların nitelik ve niceliğindeki artışa rağmen epileptik nöbetlerin oluşumu ve fizyopatolojisine ilişkin bazı ayrıntılar henüz aydınlatılamamıştır. Epilepsi tedavisinde başarıyla kullanılan 20'den fazla antiepileptik ilaç bulunmasına ve ilaç dışı diğer yöntemlerin (cerrahi, stimülasyon vb.) denenmesine rağmen hastaların ciddi bir bölümünde uygulanan mevcut tedavi stratejileri olumlu sonuç vermemektedir. Epilepsi hastalarında antiepileptik ilaçların monoterapi veya politerapi şeklinde kullanılmasına rağmen hastaların yaklaşık %36'sında nöbetler kontrol altına alınamamaktadır (283). Epileptogeneze ilişkin mekanizmaların anlaşılması, daha güvenilir ve etkili antiepileptik ilaçların geliştirilmesi için deneysel epilepsi modellerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Absans nöbetler özellikle çocukluk çağı absans epilepsisi, juvenil absans epilepsi ve juvenil miyoklonik epilepsi başta olmak üzere çok sayıda jeneralize epilepsi türünde gözlemlenen bir nöbet tipidir (262). Absans nöbetler bilinçte ani kayıp, hareketsiz kalma, göz kırpma ve el-yüz otomatizmaları gibi semptomlarla karakterizedir (11). Jeneralize bilateral 3-4,5 Hz diken-dalga deşarjlar görülen EEG bulgusu absans nöbetlerin en karakteristik özelliğidir. Deneysel epilepsi modeli olarak absans nöbetler, kimyasal prokonvülsan ajanlar kullanılarak (PTZ, penisilin gibi) başlatılabildiği gibi bazı sıçan ırklarında in-bred üretim yoluyla geliştirilen genetik modellerde de gözlemlenebilmektedir (284). Genetik absans modeli olarak GEARS ve WAG/Rij sıçanlar geçerliliği oldukça yüksek olan ve yaygın olarak kullanılan hayvan ırklarıdır. WAG/Rij sıçanlarda gözlemlenen absans nöbetlerin hem semptomatik hem de EEG bulguları açısından insandaki absans nöbetlerden bazı farkları (nöbetlerin oluştuğu yaş, diken-dalga kompleks frekansı gibi) bulunmakla birlikte genel olarak ilgili klinik durumu yansıtmaktadır. Bu hayvanlardaki nöbetlerin insandaki absans nöbetlere benzer mekanizmalarla oluşması, bu sıçanların kullanıldığı preklinik çalışmaların değerini ve önemini arttırmaktadır (285).

Ginkgo biloba özellikle uzak doğu ülkelerinde geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarında önemli düzeyde yeri olan bir bitkidir. Bu uygulamalar kapsamında *Ginkgo biloba* ürünleri kalp, astım, bronşit, işitme kaybı, vertigo ve hafıza problemleri başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Bunun yanısıra *Ginkgo biloba* yapraklarından elde edilen standardize özütler modern tıbbi uygulamalarda bir tedavi seçeneği veya tedaviyi destekleyici tamamlayıcı bir ürün olarak reçete edilmektedir. (72, 286, 287, 288). *Ginkgo biloba*'nın EGb 761 olarak adlandırılan standardize özütü %22-27 oranında flavonoid glikozitleri ve %5-7 oranında terpen trilaktonlarını (ginkgolid A, B, C ve bilobalid) içermektedir (54). Antioksidan özelliği, sinyal iletimindeki etkileri ve nöroprotektif özellikleri nedeniyle sinir sistemi rahatsızlıklarında da kullanılan *Ginkgo biloba*'nın epileptik nöbetler üzerindeki etkisine ilişkin literatürde yer alan mevcut çalışmalarda bir görüş birliği bulunmamaktadır (18, 21, 23, 24, 57). Bazı klinik vaka sunumlarında *Ginkgo biloba* bitkisine ait fındık tarzındaki kurutulmuş tohumların tüketilmesi veya EGb 761 içeren tabletlerin kullanımına bağlı olarak epileptik nöbetlerin oluştuğu bildirilmiştir (18, 21). Deneysel çalışmaların bir kısmında da klinik gözlemlerde olduğu gibi EGb 761'in prokonvulsan bir etki sergilediği ifade edilirken, bazı deneysel çalışmalarda antikonvulsan bir etkiden bahsedilmektedir (23, 24, 289).

Kalsiyum iyonu hücre içerisine girdiğinde veya hücre içi depolardan salındığında kas kasılması, nörotransmitter salınması, hücre bölünmesi ve gen regülasyonunda görev almanın yanısıra ikinci haberci olarak çok farklı fizyolojik sürecin düzenleyicisi ve aracısı olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle nöronlarda nörotransmitter salınımına ilişkin rolü, nöronal uyarılabilirlik düzeyinin değerlendirilmesinde bir parametre olarak kullanılabilmesi bakımından oldukça önemlidir. Hücre içi kalsiyum iyon seviyesinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi kalsiyum görüntüleme metodudur. Çeşitli türde geliştirilmiş ve kalsiyum için spesifik olan boyaların kullanımı ile gerçekleştirilen kalsiyum görüntüleme çalışmalarında hücre içerisinde oluşan floresan ışımanın miktarına bağlı olarak kalsiyum seviyesi değerlendirilmektedir.

Ginkgo biloba'nın nöronal uyarılabilirlik ve epilepsi üzerindeki etkisine ilişkin olarak literatürde yer alan sınırlı sayıdaki çalışmanın mekanizmayı izahtan uzak oluşu sunulan doktora tez çalışmasının planlanmasına temel teşkil etmiştir. Sunulan doktora

tezinde, P_{0-4} günlük WAG/Rij sıçanlar ve bu sıçanların izole edildiği Wistar ırkı sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültürü kullanılarak EGb 761 dozları ve bunun etken bileşenleri olan ginkgolid A, B, C ve bilobalidin farklı dozlarının nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkilerini belirlemek için floresan kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak, uyarılabilirliğin bir göstergesi olan hücre içi kalsiyum düzeyindeki değişim üzerinden bir inceleme yapılmıştır. Literatürde absans epilepside *Ginkgo biloba*'nın etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. WAG/Rij sıçanların köken aldığı Wistar ırkıyla karşılaştırmalı olarak sürecin değerlendiriliyor olması ve literatürdeki toksisitite çalışmaları dışında *Ginkgo biloba*'nın nöronlarda hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkisini inceleyen herhangi çalışmanın bulunmaması sunulan tez çalışmasının özgün değerini arttırmaktadır. Hücre içi kalsiyum seviyesindeki değişim nöronal uyarılabilirliğin bir göstergesi olarak değerlendirilerek *Ginkgo biloba*'nın epilepsi üzerindeki etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. Ayrıca EGb 761 ve etken bileşenlerinin hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkisine aracılık eden kanalların belirlenmesi ve glutamaterjik sistemle etkileşiminin incelenmesi çalışmayı daha da kapsamlı hale getirmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışma hedeflerine ulaşabilmek için WAG/Rij ve Wistar sıçanlarından elde edilen kortikal nöron kültürü kullanılarak nöronların 7-8 günlük adaptasyon ve inkübasyonundan sonra kalsiyum indikatörü olan fluo-4 ile nöronlar boyanarak SD konfokal mikroskop altında kalsiyum görüntülemesi yapılmıştır. Glutamaterjik sisteme ilişkin etkileşim deneyleri haricindeki çalışmalarda nöronları stimüle etmek için 30 mM KCl kullanılmıştır. Glutamaterjik sistem üzerindeki incelemeleri kapsayan deneylerde 100 µM glutamat ile nöronlar uyarılmıştır.

Sunulan doktora tezi kapsamındaki deneysel çalışmalar iki ayrı stimülan (KCl ve glutamat) yöntemi kullanılarak altı basamakta gerçekleştirildi (Tablo 3.2 ve 3.3). Bu basamaklara ilişkin çalışma dizaynlarından iki tanesinde Wistar sıçanlar, dört tanesinde ise WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültürü kullanılmıştır. Çalışma dizaynının ilk iki basamağında WAG/Rij ve Wistar sıçanlarından elde edilen kortikal nöron kültürü EGb 761'in 50, 100, 200 ve 400 µg/ml konsantrasyonlarına maruz bırakılarak kalsiyum görüntülemeleri yapılmıştır. Üçüncü ve dördüncü basamaklarda EGb 761 dozlarından elde edilen veriler ışığında her iki sıçan ırkında EGb 761 etken bileşenlerinden ginkgolid A, B, C ve bilobalidin 1, 10, 100 µM'lık

konsantrasyonlarının nöronal uyarılabilirlik üzerindeki etkileri hücre içi kalsiyum değişimi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın beşinci basamağında EGb 761'in aktif bileşenlerinden en etkilisi olan 10 μM ginkgolid B'nin WAG/Rij kortikal nöron kültüründe oluşturduğu kalsiyum değişimine hangi kalsiyum kaynağının aracılık ettiği belirlenmeye çalışılmıştır. Hücre dışı kalsiyum kaynağına yönelik inceleme için voltaj-kapılı L- ve T-tipi kalsiyum kanalları, hücre içi kalsiyum kaynağına ilişkin inceleme için riyanodin reseptörleri bloklanmıştır. Altıncı basamak çalışmalarda ise yine WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültürü kullanılarak EGb 761 ve ginkgolid B'nin glutamaterjik sistemle ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu aşamada EGb 761 ve ginkgolid B'nin oluşturduğu kalsiyum yanıtı ile AMPA reseptörlerinin ilişkisini belirlemek için CNQX, NMDA reseptörlerinin ilişkisini değerlendirmek için ise AP-5 kullanılarak ilgili glutamaterjik reseptörler bloklanmıştır.

5.1. EGb 761'in Wistar ve WAG/Rij Sıçanların Kortikal Nöronlarında Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi

Ginkgo biloba 'nın epilepsi ile ilişkisi ilk olarak ikinci dünya savaşı döneminde ginkgo tohumlarının tüketilmesiyle gelişen nöbetler ile ortaya çıkmıştır (17). Son dönemlerde bu ilişki farklı klinik çalışmalar ile literatürde yer almayı sürdürmüştür. Örneğin 21 aylık bir çocuk ve 36 yaşındaki bir kadının ginkgo tohumu tüketiminin ardından jeneralize nöbet geçirdikleri raporlanmıştır (18, 20). Ginkgo tohumu (fındığı) tüketimine bağlı olarak gerçekleşen bu nöbetlerden gingotoksin de denilen 4'-O-metilpiridoksinin sorumlu olduğu düşünülmüştür (290). Gingotoksin anti-B_6 vitamini olup, vücutta B_6 vitamini konsantrasyonunu azaltmaktadır. Bu etki, beyindeki en önemli inhibitör nörotransmitter olan GABA'nın azalmasına neden olmaktadır (288). Diğer bir çalışmada iki yaşındaki bir çocukta ginkgo tohumu tüketilmesi sonrasında oluşan nöbetlere serum 4'-O-metilpiridoksin konsantrasyonundaki artışın eşlik etmesi ve verilen diazepem ve piridoksal fosfataz sonrasında nöbetlerin sonlanması, ginkgotoksinin nöbetlerin ana sorumlusu olarak düşünülmesine neden olmuştur (20). Bununla birlikte bir vaka sunumunda, epilepsili iki yaşlı hastada demans nedeniyle kullanılan standardize *Ginkgo biloba* özütüne başlandıktan yaklaşık iki hafta sonra nöbetlerin görüldüğünün bildirilmesi ile birlikte ticari olarak satılan standardize özütlerde yer alan diğer etken bileşenlerin de araştırılması gerektiği ortaya çıkmıştır (21).

Klinik vaka sunumlarında *Ginkgo biloba*'nın özellikle prokonvulsan bir etkiye sahip olduğu bildirilmesine karşın deneysel çalışmalarda bu konuya ilişkin farklı bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmalardan bir kısmı klinik vaka sunumlarında *Ginkgo biloba* özüt ve ürünlerine ilişkin olarak belirtilen prokonvulsan etkiyi doğrularken diğer bir grup çalışmada antikonvulsan bir etkiden bahsedilmektedir (23, 291, 292). Örneğin Çinçilla tavşanlarında elektriksel stimülasyonla oluşturulan hipokampal tutuşma modelinde 20 mg/kg EGb 761'in akım şiddeti, afterdeşarj süresi, tutuşma için gerekli olan uyarım sayısı ve nöbet latensi gibi parametrelerin tamamında prokonvulsif bir etki sergilediği tespit edilmiştir (23). Sıçanlarda PTZ ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde kronik olarak uygulanan 200 mg/kg EGb 761'in nöbet şiddeti ve nöbete bağlı olarak gelişen mortalitede artışa neden olduğu bildirilmiştir (291). Pikrotoksin ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde EGb 761'in pikrotoksinin etkisini potansiyalize ettiği ve bu etkinin GABAerjik sistem üzerinden gerçekleştiği ifade edilmiştir (292). Aynı modelde elektrofizyolojik kayıt alınarak gerçekleştirilen diğer bir başka çalışmada 200 mg/kg EGb 761'in sıçanlarda epileptiform aktiviteye ilişkin spike frekansının artmasına ve epileptiform aktivitenin başlangıç latensinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (293). Deneysel çalışmaların bir kısmında da *Ginkgo biloba* özüt ve ürünlerinin antikonvulsan bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Örneğin sıçanlarda lityum-pilokarpin modeli ile oluşturulan temporal lob epilepsisinde 50 ve 100 mg/kg *Ginkgo biloba* özütünün spontan olarak tekrarlayan nöbetlerin şiddetini azaltarak antikonvulsan bir etki sergilediği saptanmıştır (24). Benzer sonuçlar farelerde PTZ ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde de gözlenmiş olup, EGb 761 uygulamasının PTZ'nin oluşturduğu oksidatif stresi anlamlı düzeyde azaltarak nöbete ilişkin parametrelerde iyileşme sağladığı ileri sürülmüştür (22).

Epilepsi özellikle kortikal nöronlarda meydana gelen senkron ve aşırı elektriksel deşarjlardan kaynaklanmaktadır. Dolasıyla *in vitro* koşullardaki kortikal nöronların uyarılabilirliği üzerinden epilepsiye ilişkin bir çıkarım yapmak mümkündür. Epileptik deşarj süresince, nöronal iletide görev yapan nörotransmitterler nöronal sitoplazmaya geçen aşırı miktardaki kalsiyuma bağımlı olarak salınmaktadır (294). Epileptik nöbetler esnasında hücre içi kalsiyum seviyesinin arttığı, hücre dışı kalsiyum seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir (295). Sunulan doktora tez çalışmasında, kortikal nöron kültüründeki hücresel uyarılabilirlik hücre içi kalsiyum

seviyesindeki değişim aracılığıyla değerlendirilmiştir. Çalışmada genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanlar ile bu sıçanların üretiminde kullanılan ve epileptik olmayan Wistar ırkı sıçanlar kullanılmıştır. İki sıçan ırkından elde edilen kortikal nöronların KCl uyarımına bağlı nisbi floresan değişimleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$). Elde edilen bu veriler, dorsal kök gangliyonlarında yapılan kalsiyum görüntüleme çalışmasında WAG/Rij ve Wistar ırkları arasında bir fark bulunmadığına yönelik tespit ile uyumlu görünmektedir (296).

WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültürüne uygulanan 100 ve 200 µg/ml EGb 761'in KCl grubuna göre hücre içi kalsiyum seviyesinde anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Ayrıca spontan olarak gerçekleşen kalsiyum osilasyonlarına ilişkin parlama frekansında da bir artış olduğu nitel olarak gözlemlendi. İlgili veriler ışığında WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal hücrelerde EGb 761'in nöronal uyarılabilirliği arttırdığı ve bu etkinin 200 µg/ml EGb 761 dozunda daha kuvvetli olduğu tespit edildi. Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöronlarında ise uygulanan EGb 761 dozlarının hücre içi kalsiyum seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı görüldü. EGb 761 dozlarının WAG/Rij ve Wistar sıçanlarından elde edilen kortikal nöron kültürleri üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında, 50 µg/ml grubu haricindeki tüm dozlarda WAG/Rij kortikal nöronların hücre içi kalsiyum seviyelerinin daha yüksek olduğu tespit edildi. ($p<0,001$). Bu durum, EGb 761 uygulamasına bağlı olarak gelişen uyarılabilirlikteki bu artışın WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöronların epileptik yatkınlığından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Elde edilen bu veriler EGb 761 ile ilgili yapılan toksisitite çalışmaları dışında, nöronlarda EGb 761'in hücre içi kalsiyum seviyesine etkisini gösteren ilk bulgu olma niteliğindedir. Diğer taraftan *in vivo* bir elektrofizyolojik çalışmada, 28 gün süreyle uygulanan 400 mg/kg EGb 761'in WAG/Rij sıçanlarda absans nöbetlere ilişkin diken-dalga deşarjlarının frekans ve süresini arttırdığı gösterilmiştir (297). EGb 761'in WAG/Rij sıçanlarda oluşturduğu etkilere ilişkin olarak *in vivo* ve *in vitro* bu iki çalışmadan elde edilen veriler birbirleri ile uyumlu görünmektedir.

EGb 761'in hücre içi kalsiyum seviyesi üzerindeki etkisi farklı hücre tiplerinde çalışılmıştır (298, 299). Wistar sıçanların aort endotel hücrelerinde *Ginkgo biloba* ekstraktı ve kuarsetinin hücre içi kalsiyum seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (300).

Ginkgo biloba içerikli diyetle beslenen hipertansif sıçanların aort endotel hücrelerinde de asetilkolinin oluşturduğu kalsiyum artışının potansiyelize olduğu, kontrol olarak kullanılan Wistar Kyoto ırkı sıçanlarda ise benzer bir etkinin görülmediği bildirilmiştir (298). INS-1 sıçanların beta hücrelerinde EGb 761'in hücre içi kalsiyum seviyesini yükselterek insülin sekresyonunu doza bağımlı arttırdığı bulunmuştur (299). Diğer taraftan EGb 761'in hücre içi kalsiyum seviyesini azalttığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (301, 302). Sıçan kardiyomiyosit kültüründe yaşlılıkla bağlantılı diyastolik kalp yetmezliği modelinde EGb 761, D-galaktoz ile artan kalsiyum seviyesini düşürerek yaşlanma karşıtı bir etki göstermiştir (301). İnsan vasküler endotel hücrelerinde *Ginkgo biloba* özütünün (Ginaton) hipoksi ve anjiyotensin II ile indüklenen hücre içi kalsiyum seviyesindeki aşırı artışı ve mitokondriyal membran potansiyelindeki düşüşü engelleyerek hücre hasarına karşı koruyucu etki sergilediği bildirilmiştir (302). Yukarıda özetlenen kalsiyum görüntüleme çalışmalarında *Ginkgo biloba*'nın hücre içi kalsiyum seviyesine etkisi hücre tipine ve deneysel modele göre farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır. *Ginkgo biloba* özütü genel olarak hücre hasarına yol açacak derecede artan kalsiyum seviyesinde düşüş sağlarken, aşırı uyarılmanın olmadığı hücrelerde kalsiyum seviyesinin yükselmesine neden olmaktadır. Bu sonuçların nöronlarda yapılan kalsiyum görüntüleme çalışmaları için de büyük ölçüde geçerli olduğu görülmektedir. Sıçan serebellar granül hücrelerinde kainat ile indüklenen hücre içi kalsiyum seviyesindeki artışın *Ginkgo biloba* yaprak özütünün 3-30 µg/ml arası dozları ile önlendiği bulunmuştur. *Ginkgo biloba*'nın bu nöroprotektif etkisini hücre içi kalsiyumdaki aşırı artışı engelleyerek sergilediği bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada 50 mM KCl ile uyarılan granüler nöronların *Ginkgo biloba* yaprak özütüne anlamlı bir yanıt vermediği saptanmıştır (303). Sunulan doktora tez çalışmasında Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761'in hücre içi kalsiyum seviyesinde belirgin bir değişikliğe yol açmaması Kanada ve arkadaşlarının (2005) bulguları ile uyumlu görünmektedir (303).

Sonuç olarak sunulan tez çalışmasında EGb 761, WAG/Rij kortikal nöronların hücre içi kalsiyum seviyesini yükselterek nöronal uyarılabilirlikte artışa neden olmuştur. *Ginkgo biloba* yaprak özütlerinin prokonvulsan etkisini gösteren çalışmalar ile sunulan tez çalışmasında WAG/Rij kortikal nöron kültüründe EGb 761'in yol açtığı etkiler benzer yönde ve uyumlu iken Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöronların

uyarılabilirliğinde bir artışın olmaması, EGb 761'in özellikle epileptik yatkınlığı bulunan sıçanların kortikal nöronlarında prokonvulsan etkiye neden olabileceğine yönelik güçlü kanıtlar sunmaktadır.

5.2. EGb 761 Etken Bileşenlerinin Wistar ve WAG/Rij Sıçanların Kortikal Nöronlarında Hücre İçi Kalsiyum Seviyesine Etkisi

EGb 761'de farmakolojik etkinliğe sahip flavonoid glikozitleri ve terpen trilaktonlar bulunmaktadır. EGb 761'in nöronal uyarılabilirlikte oluşturduğu artışın hangi etken bileşen veya bileşenlerden kaynaklandığını belirlemek amacıyla sunulan doktora tez çalışmasında terpen trilaktonlarından ginkgolid A, B, C ve bilobalidin farklı dozları kortikal nöron kültürüne uygulanmıştır. Terpen trilaktonlarının epilepsi üzerindeki etkisini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (304-306). İzoniazid, PTZ, 4'-O metilpiridoksin ve elektroşok ile oluşturulan epilepsi modellerinde EGb 761'in etken bileşenlerinden bilobalidin 30 mg/kg dozda dört gün süreyle uygulanmasının nöbet şiddetini azalttığı ancak bikukulin ve sitriktin ile oluşturulan epilepsi modellerinde nöbetler üzerinde bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (289). Bilobalidin 30 mg/kg dozda kronik olarak uygulanması durumunda ise hipokampusda GABA miktarı, glutamik asit dekarboksilaz aktivitesi ve glutamik asit karboksilaz protein miktarında kontrol grubuna göre artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada GABAerjik sistemin bilobalidin antikonvulsan etkisine aracılık ettiği de ileri sürülmüştür (304). 21-25 günlük odyojenik epilepsili farelerde, ses uyaranından bir saat önce uygulanan 20 mg/kg bilobalidin nöbetler üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı ancak nöbete bağlı gelişen mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (305). *Ginkgo biloba* etken bileşenlerinden ginkgolid B'nin epilepsi üzerindeki etkisini doğrudan inceleyen bir çalışma bulunmamasına karşın bu bileşenin PAF antagonisti olması nedeniyle antikonvulsan etki yapacağı öngörülebilir (306). Bu ön görünün gerekçesi PAF'ın beyinde eksitatör postsinaptik iletiyi arttırmasına dayandırılmaktadır (307). Ayrıca nöron kültüründe presinaptik glutamat sentez ve salınımı PAF tarafından arttırılmaktadır (308). Son zamanlarda kemogenomik veritabanları kullanılarak yapılan bir moleküler kenetlenme ve molekül etkileşim çalışmasında terpen trilaktonlarının epilepsi tedavisinde destekleyici özelliklerinin olduğu öne sürülmüştür. Özellikle status epileptikusta oluşan nöronal hasara bağlı bilişsel fonksiyon bozukluklarını terpen trilaktonlarının

engellediğini gösteren çalışmada, lityum-pilokarpin ile oluşturulan epilepsi modelinde sıçanlara terpen trilaktonların (40-160 mg/kg) uygulanması durumunda doza bağlı olarak BDNF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda EEG bulgularına göre terpen trilaktonlarının epileptiform deşarjları ve spike dalgalarını azalttığı ortaya konulmuştur. İlgili çalışmada kemogenomik analizler neticesinde ginkgolid A, B, C ve bilobalidin monoamin oksidaz A, monoamin oksidaz B, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, sitokrom P4502D6, sukraz-izomaltaz ve Ras ilişkili C3 botulinum toksin substratı 1 (RAC1) molekülleri ile etkileşime girme potansiyelinin yüksek olduğu ifade edilmiştir (309). İlgili çalışma bulgularına göre *Ginkgo biloba* etken maddelerinin nörofizyolojik etkileri araştırılırken, hedef moleküllerin ve etkileşime girme potansiyellerinin de dikkate alınmasının faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

Sunulan tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültürüne uygulanan ginkgolid A, B, C ve bilobalidin 1, 10 ve 100 µM dozlarından yalnızca ginkgolid B'nin 10 ve 100 µM dozlarında hücre içi kalsiyum seviyesinin anlamlı düzeyde arttığı ($p<0,001$), 1 µM ginkgolid C dozunda ise azaldığı ($p<0,05$) tespit edildi (Şekil 4.6). Bu veriler, WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761'in neden olduğu hücre içi kalsiyum seviyesindeki artıştan ginkgolid B'nin sorumlu olduğuna işaret etmektedir. Ginkgolid B dozları arasında ise 10 µM dozunun oluşturduğu kalsiyum artışnın 100 µM'a göre daha fazla olması nedeniyle etkileşim çalışmalarında ginkgolid B'nin 10 µM dozu tercih edilmiştir. İlginç bir şekilde Wistar sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761 dozları hücre içi kalsiyum seviyesinde anlamlı bir değişim oluşturmazken, uygulanan etken bileşenlerden bazıları hücre içi kalsiyum seviyesinde azalma sağlamıştır. Bilobalidin 1, 10 ve 100 µM dozlarında, ginkgolid B'nin 10 ve 100 µM dozlarında ve ginkgolid C'nin 1 ve 100 µM dozunda Wistar sıçanların kortikal nöronlarında hücre içi kalsiyum seviyesinde anlamlı azalma olduğu da tespit edilmiştir (10 µM ginkgolid B, 10 µM bilobalid ve 100 µM ginkgolid C için $p<0,001$; diğer gruplarda $p<0,05$; şekil 4.7).

Literatürde WAG/Rij sıçanlar ve absans epilepsi üzerine EGb 761 etken bileşenlerinin etkilerini gösteren herhangi bir çalışmanın bulunmaması ve ilgili etken bileşenlerin ortaya koydukları potansiyellerin kendi aralarında karşılaştırılıyor olması nedeniyle sunulan doktora tez çalışmasının bu alanda geniş kapsamlı veriye sahip

olduğu düşünülmektedir. EGb 761'in etken bileşenlerinin hücre içi kalsiyum seviyesi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışma bulguları, sadece EGb 761'in etkilerini konu alan literatürdeki bazı çalışma bulgularıyla benzerlik göstermektedir (310-312). Bununla birlikte ginkgolid B'nin hücre içi kalsiyum seviyesi üzerindeki etkileri hücre tipine ve deney protokolüne bağlı olarak farklılık göstermektedir (310-312). Lenoir ve arkadaşları (2005), insan polimorfonüklear lökositlerinde ginkgolid B'nin 0,6, 1,2 ve 2,4 μM dozlarında hücre içi kalsiyum seviyesinde artışa neden olduğunu ifade etmişlerdir (310). Diğer bir çalışmada hipokampal nöron terminallerinde 50 μM ginkgolid B'nin hücre içi kalsiyum seviyesini arttırarak glutamat salınımında artışa yol açtığı bulunmuştur. Ayrıca 4-aminopiridin ve 15 mM KCl ile indüklenen glutamat salınımının ginkdolid B dozuna bağlı olarak (10, 50 ve 100 μM) potansiyelize olduğu, ginkgolid B'nin neden olduğu glutamat salınımındaki artışın PKA inhibitörleri tarafından bloklandığı fakat PKC inhibitörlerinin herhangi bir etki göstermediği tespit edilmiştir. İlgili çalışmada sunulan bulgular ginkgolid B'nin hipokampal nöron terminallerinde oluşturduğu hücre içi kalsiyum seviyesindeki artışın PKA yolağı üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca ginkgolid B'nin membran potansiyelindeki değişimden bağımsız olarak doğrudan intrasinaptozomal kalsiyum miktarını arttırarak transmitter veziküllerinin ekzositozunu arttırdığı tespit edilmiştir (311). İlgili çalışmada yer alan ginkgolid B'nin KCl uyarımı altında hücre içi kalsiyum seviyesini arttırdığına yönelik bulgular ile sunulan doktora tezinde yer alan WAG/Rij nöron kültüründen elde edilen bulgular uyumlu görünmektedir. Parkinson hastalığının *in vitro* modellemesinde kullanılan PC12 hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada, 6-OHDA ile indüklenen apoptozis hücre içi kalsiyum seviyesini 2,3 kat arttırırken, 100 μM ginkgolid B hücre içi kalsiyum artışını engelleyerek apoptotik göstergelerin azalmasına ve dolayısıyla nöroprotektif bir etkinin oluşmasına neden olmuştur (312).

Sunulan doktora tez çalışmasında WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe ginkgolid B'nin hücre içi kalsiyum seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir. EGb 761'in etken bileşenlerinin *in vivo* koşullarda WAG/Rij sıçanların diken-dalga deşarjları üzerindeki etkilerini inceleyen diğer bir doktora tez çalışmasında ginkgolid A, C ve bilobalidin 6 mg/kg (i.p.) dozda 7 gün boyunca uygulanmasının absans nöbetleri arttırarak epileptojenik bir etki sergilediği bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada ginkgolid B'nin (6 mg/kg) benzer bir etkiye sahip

olmadığı ifade edilmiştir (297). Sunulan doktora tez çalışması ile belirtilen çalışmada yer alan ginkgolid B'ye ilişkin bulgular arasındaki bu farkın, planlanacak yeni deney dizaynları ile farklı deney koşullarında konunun yeniden incelenmesi ve elde edilecek yeni bulgular ışığında yorumlanması gerektiği düşünülmektedir.

5.3. WAG/Rij Sıçanlardan Elde Edilen Kortikal Nöron Kültüründe Ginkgolid B'nin Neden Olduğu Hücre İçi Kalsiyum Seviyesindeki Artışa Aracılık Eden Kalsiyum Kaynağının Belirlenmesi

Hücre içi kalsiyum artışı pek çok fizyolojik sürecin başlatılmasında temel bir rol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu etkileyebilecek iki ana kaynak bulunmaktadır. Bunlardan ilki hücre membranında bulunan kanallar aracılığıyla hücreye alınan hücre dışı kalsiyum, diğeri ise hücre içindeki endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi hücre içi organellerdeki kalsiyumdur. Hücre membranından hücre içerisine kalsiyum girişi ligant-kapılı ve voltaj-kapılı kalsiyum kanalları aracılığıyla gerçekleşir. Sunulan doktora tez çalışmasında, WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe ginkgolid B'nin oluşturduğu hücre içi kalsiyum seviyesindeki artışta hücre dışı kalsiyum kaynağının etkisini incelemek için L- ve T-tipi VKKK'nın rolü, hücre içi kalsiyum kaynağının etkisini incelemek için ise endoplazmik retikulumda yer alan riyanodin reseptörlerinin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla L-tipi VKKK blokeri nikardipin (10 μM), T-tipi VKKK blokeri mibefradil (10 μM) ve riyanodin reseptör antagonisti dantrolen (10 μM) kullanılmıştır. İlgili kanal blokerleri, KCI grubu ile karşılaştırıldığında hücre içi kalsiyum değişimi bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte nikardipin, mibefradil ve dantrolen uygulanan gruplarla ginkgolid B grubu karşılaştırıldığında ginkgolid B grubunda hücre içi kalsiyum düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). İlgili bloker ve antagonistler ginkgolid B ile birlikte kullanıldıklarında sadece mibefradil+ginkgolid B grubunda KCI grubuna göre anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Diğer taraftan nikardipin grubuna göre nikardipin+ginkgolid B grubunda hücre içi kalsiyum seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p<0,05$). Benzer şekilde mibefradil grubuna göre de mibefradil+ginkgolid B grubunda bir artış olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Etkileşim grupları ginkgolid B grubu ile karşılaştırıldığında her üç etkileşim grubunda da (nikardipin+ginkgolid B, mibefradil+ginkgolid B ve dantrolen+ginkgolid B) hücre içi

kalsiyum düzeyinin daha az olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Elde edilen bulgulara göre ginkgolid B'ye bağlı olarak gelişen hücre içi kalsiyum artışının her üç tip kanal yani L-tipi, T-tipi VKKK ve riyonodin kanalları aracılığıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Epilepsi tedavisinde kullanılan antiepileptik ilaçlardan bir kısmı (fenitoin, karbamazepin gibi) etkisini nöronlara kalsiyum girişini engelleyerek göstermektedirler. Spesifik L-tipi VKKK blokeri olan verapamil antiepileptik ilaç olarak kullanılmaktadır (313, 314). Kalsiyum kanal blokerlerinin ilgili kanalların aktivasyonlarını ve hücre içerisine kalsiyum girişini engelleyerek antikonvulsan etki sergilediği bildirilmiştir (314, 315). Kalsiyum kanal blokerleri genellikle antikonvulsan etkinliğe sahip maddeler olarak kabul edilmelerine rağmen voltaj-kapılı T-tipi kalsiyum kanal blokerlerinin konvulsif olmayan epilepsilerde farklı yönde etki sağladığı da bilinmektedir (316). Voltaj kapılı L-tipi kalsiyum kanal blokeri nimodipin konvulsif tipteki epilepsilerde antiepileptik özelliğe sahipken, 12 aylık WAG/Rij sıçanlarda 17,2 mg/kg (i.p.) dozda uygulanan nimodipinin diken-dalga deşarj frekansında ve süresinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (313). Birçok epilepsi modelinde prokonvulsan olarak kabul edilen L-tipi kanal agonisti (±)-Bay K8644, WAG/Rij sıçanlarda 60 µg/2 ml (i.c.v.) dozda diken-dalga deşarjlarını azaltırken, L-tipi kanal blokeri nifedipin 60 µg/2 ml (i.c.v.) dozda diken-dalga deşarjlarında artışa neden olmuştur (317). Absans epilepsinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan etosüksimid bir T-tipi kanal blokeri olmasına rağmen diken-dalga deşarjlarını azaltmaktadır (318). Ancak Leresche ve arkadaşları (1998) kedi talamik nöronlarında yaptıkları iyon akımı çalışmalarında, 0,75-1 mM etosüksimidin düşük veya yüksek voltaja bağlı kalsiyum akımını etkilemek yerine sodyum akımı ve kalsiyumla indüklenen potasyum akımını etkileyerek anti-absans bir etki sergilediği ileri sürülmüştür (319). Absans nöbetlerin elektrofizyolojik karakteristiği olan diken-dalga deşarjları, talamokortikal devrede oluşan osilasyonlar sonucunda meydana gelmektedir. Diken-dalga deşarjlarının oluşumunda özellikle talamusta düşük voltajda aktive olan T-tipi VKKK'nın tekrarlayan kalsiyum akımları büyük öneme sahiptir (320). Diken-dalga deşarjlarının oluşumunda L-tipi kanallar da T-tipi kanallar da rol oynamaktadır (316, 321). WAG/Rij sıçanlarda 1 µM/5 ml mibefradil (T-tipi VKKK blokeri) ve 0,2 µg/ 5 ml omega-konotoksin MVIIA'nın (N-tipi VKKK blokeri) diken-

dalga deşarjlarının frekans ve süresinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Mibefradilin anti-absans etkisinin omega-konotoksin MVIIA uygulanan gruba göre daha kuvvetli olduğu, ayrıca her iki kanalın eş zamanlı bloklanmasının bu etkiyi arttırdığı gösterilmiştir. İlgili çalışmada sonuç olarak diken-dalga deşarjlarının oluşumunda T- ve N- tipi kanalların etkili olduğu ifade edilmiştir (322). Sunulan doktora tez çalışmasında yer alan bulgulara göre L-tipi ve T-tipi kalsiyum kanal blokerlerinin WAG/Rij kortikal nöronlarında ginkgolid B'ye bağlı gelişen uyarılabilirlikteki artışı engellediği bulunmuştur. Ancak absans nöbetlerdeki diken-dalga deşarjlarının oluşumunda kortikal nöronlar ile birlikte talamusta yer olan nöronların sürecin ayrılmaz bir parçası olması nedeniyle ginkgolid B ve ilgili kanal blokerlerinin etkileşiminin *in vivo* koşullarda kaydedilen diken-dalga deşarjlarının oluşumu üzerindeki etkilerini mevcut veriler ışığında yorumlamak uygun bir yaklaşım olmayacaktır.

Ginkgo biloba'nın kalsiyum kanalları üzerindeki etkisini, sinir sistemi dışındaki bazı hücre tipleri üzerinde yapılan sınırlı sayıdaki çalışma bulguları ile karşılaştırmak mümkündür. Bu çalışmalardan bir tanesinde *Ginkgo biloba* yaprak özütünün 2 hafta süreyle oral olarak uygulanmasının Wistar sıçanlarda hipotansif ajan olarak kullanılan nikardipinin terapötik potansiyelini azalttığı öne sürülmüştür (323). Kardiyomiyositlerdeki iyon akımını patch-clamp tekniğiyle değerlendiren bir çalışmada % 0,01 ve % 0,1'lik konsantrasyonlarda *Ginkgo biloba* yaprak özütünün L-tipi kalsiyum akımını azalttığı ancak 0,1 mM dozda uygulanan ginkgolid A, B ve bilobalidin katyon akımları üzerinde etkisiz olduğu bildirilmiştir (324). Diğer bir çalışmada kardiyomiyositlerde ginkgolid B'nin 0,1, 1 ve 10 µmol/L dozlarında L-tipi kalsiyum akımında anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı saptanmıştır (325). Nikardipinin etkisinin *Ginkgo biloba* tarafından azaltıldığını bildiren çalışmalar, L tipi kanalların *Ginkgo biloba*'nın fizyolojik etkilerinin ortaya çıkmasında ortak bir yol olduğuna işaret etmektedir. Sunulan doktora tez çalışmasından elde edilen bulgular da ginkgolid B'nin etkinliğinde nikardipin ile bloklanan L-tipi VKKK'ların bir rolünün olduğunu ve ilgili kanalın nikardipin ile bloklanması durumunda ginkgolid B'ye bağlı hücre içi kalsiyum artışının kısıtlandığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte bu aşamaya kadar elde edilen çalışma bulguları bir bütün olarak değerlendirildiğinde ginkgolid

B'ye bağlı hücre içi kalsiyum artışında L-tipi VKKK dışında T-tipi VKKK ve riyanodin reseptörünün de etkileri var görünmektedir.

5.4. EGb 761 ve Ginkgolid B'nin Hücre İçi Kalsiyum Artışında İyonotropik Glutamat Reseptörleri ile İlişkisi

Epilepsi genel olarak beyin korteksindeki inhibitör ve eksitatör sistemler arasındaki dengenin eksitasyon lehine bozulmasıyla gelişen nörolojik bir bozukluktur (326). Beyindeki temel eksitatör transmitter olan glutamat metabotropik ve iyonotropik reseptörler üzerinden fizyolojik etkilerini gerçekleştirmektedir. Sunulan doktora tez çalışması kapsamında WAG/Rij kortikal nöron kültüründe EGb 761 ve etken bileşenlerinden ginkgolid B'nin glutamatın iyonotropik NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri ile ilişkisi de incelenmiştir. Deneylerin bu aşamaya kadar olan dizaynından farklı olarak nöronal stimülasyon için KCl yerine 100 µM glutamat kullanılmıştır. Glutamat ile uyarılan kortikal nöronlara uygulanan 200 µg/ml EGb 761 ve 10 µM ginkgolid B hücre içi kalsiyum seviyesini glutamat grubuna göre anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe uyaran olarak KCI kullanılan deneylerde EGb 761 ve ginkgolid B'nin hücre içi kalsiyum seviyesini arttırmasına karşın glutamat uyarımı ile birlikte bir azalma görülmesi ilginç ve literatür ışığında izaha muhtaç bir bulgudur. Literatürde EGb 761 ve ginkgolid B'nin farklı uyarımlar ile apoptosize neden olacak düzeyde kalsiyum artışının olduğu durumlarda koruyucu bir etki sergileyerek kalsiyum seviyesini düşürdüğünü bildiren çalışmalar bulunmaktadır (301, 312). Wang ve arkadaşları (2005) hipokampus nöron terminalinde 15 mM KCl uyarımı altında ginkgolid B'nin hücre içi kalsiyum seviyesini arttırdığını, Huang ve arkadaşları (2016) ise 100 µM glutamat ile uyarılan SH-SY5Y hücrelerinde EGb 761'in 20 µg/ml dozda hücre içi kalsiyum seviyesini azalttığını bildirmişlerdir (311, 327).

Sunulan doktora tez çalışmasında iyonotropik glutamat reseptörlerinin etkisini incelemeye yönelik olarak kullanılan maddelerden AP-5 NMDA reseptörlerini bloklamak amacıyla 50 µM dozda uygulanmıştır. WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe glutamat uyarımı altında NMDA reseptörlerinin 50 µM AP-5 ile bloklanması glutamat grubu ile karşılaştırıldığında hücre içi kalsiyum seviyesinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur ($p<0,001$). NMDA reseptörleri, membran potansiyelinin artmasıyla mevcut magnezyum blokajından kurtularak sodyum ve

kalsiyum iyonlarına geçirgen hale gelirler (328). NMDA reseptörünün AP-5 ile bloklanmasıyla birlikte glutamat uyarımı altında nöronlara bu kanallardan kalsiyum girişinin engellenmesi ve hücre içi kalsiyum seviyesinde kontrole göre bir azalmanın olması beklenen bir durumdur. Bu kapsamda 50 µM AP-5 + 200 µg/ml EGb 761 uygulanan gruptan elde edilen veriler AP-5 grubuna ilişkin veriler ile kıyaslandığında hücre içi kalsiyum seviyesinin arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu artış EGb 761'in NMDA reseptörleri dışında da varolan farklı bir mekanizma ile nöronda kalsiyum artışına neden olabileceğini göstermektedir. SH-SY5Y hücrelerinde yapılan bir kalsiyum görüntüleme çalışmasında hücreler 100 µM glutamat ile uyarılarak sonrasında 20 µg/ml EGb 761 ve NMDA reseptör antagonisti MK-801'in 10 µM dozuna bir saat süreyle maruz bırakıldıklarında, EGb 761 ve MK-801 gruplarında hücre içi kalsiyum seviyesinin glutamat grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (327). Bir diğer çalışmada ise WAG/Rij sıçan beyin dilimlerinde talamus ve korteks bölgelerine NMDA reseptör antagonistlerinin uygulanması yerel alan potansiyellerini azaltmıştır (329). İlgili çalışmada yer alan WAG/Rij sıçan beyin dilimlerinde NMDA blokajının uyarılabilirlikte bir azalmaya neden olduğuna ilişkin bulgular, sunulan doktora tez çalışmasında yer alan AP-5'e bağlı hücre içi kalsiyum seviyesindeki azalma bulguları ile uyumlu görünmektedir. Diğer taraftan AP-5 + EGb 761 uygulamasının glutamat grubuna göre de hücre içi kalsiyum seviyesinde anlamlı bir azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). AP-5 + ginkgolid B grubu ile glutamat grubu karşılaştırıldığında ise ginkgolid B'nin KCl uyarım modelinde olduğu gibi kalsiyum seviyesini arttırarak güçlü bir uyarılmaya neden olduğu görülmüştür ($p<0,001$). EGb 761'in yol açtığı bu farklı etki, EGb 761'in bileşimindeki diğer etken maddelerden kaynaklanıyor olabilir.

Sunulan doktora tez çalışmasında, AMPA ve kainat reseptörleri ile *Ginkgo biloba* etkileşimini incelemek için AMPA/kainat reseptör antagonisti CNQX kullanılmıştır. 20 µM CNQX uygulanan grupta hücre içi kalsiyum seviyesinde glutamat grubuna göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. AMPA/kainat reseptörlerinin blokajı sonrası kültür ortamına EGb 761 veya ginkgolid B uygulandığında ise hücre içi kalsiyum seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Literatür incelendiğinde EGb 761 ve ginkgolid B'nin glutamaterjik reseptörlerle etkileşimini intakt hayvanlarda elektrofizyolojik yöntem ile inceleyen bir doktora tez çalışması dışında herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Sunulan doktora tez çalışması, *in vitro* deney dizaynı ve floresan kasiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak EGb 761 ve etken bileşenlerinin epilepsi üzerindeki etkisini inceleyen ilk deneysel çalışma olma niteliğini taşımaktadır. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre, WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761'in nöronal uyarılabilirlikte bir artışa neden olduğu ve bu artıştan ginkgolid B'nin sorumlu olduğu saptanmıştır. Ginkgolid B'nin voltaj-kapılı L- ve T-tipi kalsiyum kanalları ve riyanodin reseptörlerini kullanarak bu artışı sağladığı tespit edilmiştir.

6. SONUÇLAR

Sunulan doktora tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre aşağıdaki sonuç ve önerilere ulaşılmıştır:

- WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültürüne 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda uygulanan EGb 761 hücre içi kalsiyum seviyesinde bir artışa neden olmaktadır.

- WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe EGb 761'e bağlı gelişen hücre içi kalsiyum artışından EGb 761'in etken bileşenlerinden ginkgolid B'nin sorumlu olduğu tespit edilmiştir.

- Ginkgolid B'nin WAG/Rij sıçan kortikal nöron kültüründe hücre içi kalsiyum seviyesini L- ve T-tipi voltaj-kapılı kalsiyum kanalları ve riyanodin reseptörleri aracılığıyla yükselttiği saptanmıştır.

- *Ginkgo biloba*'nın hücre içi kalsiyum değişimi üzerindeki etkisinin daha fazla aydınlatılabilmesi için, planlanacak benzer tarzdaki *in vitro* kalsiyum görüntüleme çalışmalarında konunun P/Q, N, R tipi voltaj-kapılı kalsiyum kanalları ve metabotropik glutamat reseptörler açısından da incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak sunulan doktora tez çalışmasında, WAG/Rij sıçanlardan elde edilen kortikal nöron kültüründe EGb 761'in nöronal uyarılabilirlikte bir artışa neden olduğu ve bu artıştan ginkgolid B'nin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Ginkgolid B'nin ise voltaj-kapılı L- ve T-tipi kalsiyum kanalları ve riyanodin reseptörleri aracılığıyla bu artışı sağladığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Chan, P.C., Xia, Q., Fu, P.P. (2007). Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 25(3), 211-244.
2. Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. (2003). Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 1779-1792.
3. Smith, J.V., Luo, Y. (2004). Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 465-472.
4. Ommaty, R. 2014. Vademecum
5. Modern İlaç Rehberi 2014 (23. Basım). Ankara: Pelikan Yayıncılık
6. Roberts, E. (1994). GABA-related phenomena, models of nervous system functin, and seizures. *Annals of Neurology*, 16, 77-89.
7. Hauser, W.A., Annegers, J.F., Rocca, W.A. (1996). Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clinic Proceedings*, 71, 578-586.
8. Annegers, J.F. (1994). Epidemiology and genetics of epilepsy. *Neurologic Clinics*, 12, 15-29.
9. Marangoz, C. (1997). Deneysel epilepsi modelleri. *OMÜ Tıp Dergisi*, 14(3), 147-186.
10. Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I.E., Zuberi, S.M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522-530.
11. Penry, J.K., Dreifuss, F.E. (1969). Automatisms associated with the absence of petit mal epilepsy. *Archives of Neurology*, 21, 142–149.
12. Holmes, G.L., McKeever, M., Adamson, M. (1987). Absence seizures in children: Clinical and electroencephalographic features. *Annals of Neurology*, 12, 268-273.
13. Frank, L.M., Enlow, T., Holmes, G.L., Manasco, P., Concannon, S., Chen, C., Womble, G., Casale, E.J. (1999). Lamictal (lamotrigine) monotherapy for typical absence seizures in children. *Epilepsia*, 40, 973-979.
14. Onat, F.Y., Van Luijtelaar, G., Nehlig, A., Snead, O.C. (2013). The involvement of limbic structures in typical and atypical absence epilepsy. *Epilepsy Research*, 103(2-3),111-23.
15. Löscher, W. (1984). Genetic animal models of epilepsy as a unique resource for the evaluation of anticonvulsant drugs: A review. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 6,531-547.
16. Velioglu, S.K., Gedikli, O., Yıldırım, M., Ayar, A. (2018). Does pain sensitivity increase during ictal period? Evidence from absence epileptic WAG/Rij rats. *Epilepsy & Behavior*, 87, 14-17.
17. Wada, K., Ishigaki, K., Ueda, M. (1985). An antivitamin B6, 4'-methylpyridoxine, from the seed of Ginkgo biloba. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 3555-3557.
18. Miwa, H., Iijima, M., Tanaka, S., Mizuno, Y. (2001). Generalized convulsions after consuming a large amount of gingko nuts. *Epilepsia*, 42(2), 280-281.
19. Kajiyama, Y., Fujii, K., Takeuchi, H., Manabe, Y. (2002). Ginkgo seed poisoning. *Pediatrics*, 109, 325–327.
20. Hasegawa, S., Oda, Y., Ichiyama, T., Hori, Y., Furukawa, S. (2006). Ginkgo nut intoxication in a 2-year-old male. *Pediatric Neurology*, 35(4), 275-276.
21. Granger, A.S. (2001). Ginkgo biloba precipitating epileptic seizures. *Age Ageing*. 30(6), 523-5.
22. Ilhan, A., Iraz, M., Kamisli, S., Yigitoglu, R. (2006). Pentylenetetrazol-induced kindling seizure attenuated by Ginkgo biloba extract (EGb 761) in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatr,y* 30, 1504-1510.
23. Ivetic, V., Popovic, M., Naumovic, N., Radenkovic, M., Vasic, V. (2008). The effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on epileptic activity in rabbits. *Molecules*, 13(10), 2509-20.
24. Mazumder, A.G., Sharma, P., Patial, V., Singh, D. (2017). Ginkgo biloba L. attenuates spontaneous recurrent seizures and associated neurological conditions in lithium-pilocarpine rat model of temporal lobe epilepsy through inhibition of mammalian target of rapamycin pathway hyperactivation. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(204), 8-17.

25. Steinlein, O.K. (2014). Calcium signaling and epilepsy. *Cell and Tissue Research*, 357(2), 385-93
26. Hirschberg, B., Maylie, J., Adelman, J.P., Marrion, N.V. (1999). Gating properties of single SK channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophysical Journal*, 77(4), 1905-13.
27. Berkefeld, H., Sailer, C.A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J.O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., Knaus, H.G., Schulte, U., Fakler, B. (2006). BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca2+-activated K+ signaling. *Science*, 27, 615-20.
28. Shalin, S.C., Hernandez, C.M., Dougherty, M.K., Morrison, D.K., Sweatt, J.D. (2006). Kinase suppressor of Ras1 compartmentalizes hippocampal signal transduction and subserves synaptic plasticity and memory formation. *Neuron*, 50, 765–779.
29. Tostevin, F., ten Wolde, P.R., Howard, M. (2007). Fundamental limits to position determination by concentration gradients. *PLOS Computational Biology*, 3, 763–771.
30. Thomas, E., Grisar, T. (2000). Increased synchrony with increase of a lowthreshold calcium conductance in a model thalamic network: a phase-shift mechanism. *Neural Computation*, 12, 1553-71.
31. Khosravani, H., Zamponi, G.W. (2006). Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiological Reviews*, 86, 941–966.
32. Perlin, J.B., DeLorenzo, R.J. (1992). Calcium and epilepsy. Recent advances in epilepsy. Editörler: Pedley, T.A., Meldrum, B.S. Edinburgh: Churchill Livingstone.
33. DeLorenzo, R.J., Pal, S., Sombati, S. (1998). Prolonged activation of the N-methyl-d-aspartate receptor-Ca2+ transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 14482-14487.
34. Choi, D.W. (1994). Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Progress in Brain Research*, 100, 47-51.
35. Stasheff, S.F., Anderson, W.W., Clark, S., Wilson, W.A. (1989). NMDA antagonists differentiate epileptogenesis from seizure expression in an in vitro model. *Science*, 245, 648-51.
36. Rice, A.C., DeLorenzo, R.J. (1998). NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Research*, 782, 240-7.
37. Croucher, M.J., Bradford, H.F. (1990). NMDA receptor blockade inhibits glutamate-induced kindling of the rat amygdale. *Brain Research*, 506, 349-52.
38. Dichter, M.A. (1978). Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Research*, 149, 279-293.
39. Delorenzo, R.J., Sun, D.A., Deshpande, L.S. (2005). Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintainance of epilepsy. *Pharmacology & Therapeutics*, 105(3), 229-266.
40. Zhou, Z., Zheng, S. (2003). The missing link in Ginkgo evolution. *Nature*, 423, 821-2.
41. Singh, B., Kaur, P., Gopichand Singh, R.D., Ahuja, P.S. (2008). Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia*, 79, 401-18.
42. Earle, C.J. (2004). onward. The Gymnosperm Database. (on-line)
43. Hadfield, M. (1960). Some notes on the Ginkgo. *Quarterly Journal of Forestry*, 54, 331–7.
44. Ponder, H.G., Shumack, R.L., Gilliam, C.H. (1981). Liners the first step in shade tree production. *American Nurseryman* 153:10-11.
45. DEL Tredici, P. (1991). The architecture of Ginkgo biloba İçinde C. Edelin (Ed.), L'Arbre: Biologie et développement. Montpellier: Naturalia; 155–168.,
46. Hatano, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Tanokura, M. (2011). Antifungal and lipid transfer proteins from Ginkgo (Ginkgo biloba) Seeds. İçinde V.R. Reedy, R.R. Watson, V.B. Patel (Ed.) *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention.* United Kingdom: Elsevier ; 528–34.
47. Salvador, R.L. (1995). Herbal medicine—Ginkgo. *Canadian Pharmacists Journal*, 52,39-41.

48. Hilton, M. P., Zimmermann, E. F., Hunt, W. T. (2013). Ginkgo biloba for tinnitus. *The Cochrane database of systematic reviews*, (3), CD003852.
49. DeFeudis, F.V. (1998). *Ginkgo Biloba Extract (EGb 761): From Chemistry to the Clinic*. Weisbaden: Ulistein Medical; p. 119–33.
50. McKenna, D.J., Jones, K., Hughes, K. (2001). Efficacy, safety, and use of Ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 7, 70-86.
51. Cassileth, B. author. Ginkgo (Ginkgo biloba). *Oncology* 2011, 25-971
52. Balz, J.P., Courtois, D., Drieu, J., Drieu, K., Reynoird, J.P., Sohier, C. (1999). Production of Ginkgolides and bilobalide by Ginkgo biloba plants and tissue cultures. *Planta Medica*, 65,620-6.
53. Smith, J.V., Luo, Y. (2004). Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 465-72.
54. Juretzek, W. Recent Advances in Ginkgo biloba Extract (Egb 761). İçinde Hori, T., Ridge R.W., Tulecke, W., Tredici, P.D., Guiller, J.T., Tobe, H. (Ed.) *Ginkgo Biloba A Global Treasure*.Tokyo: Springer- Verlag; 341–358.
55. Jaggy, H., Koch, E. (1997). Chemistry and biology of alkylphenols from Ginkgo biloba L. *Pharmazie* 52(10), 735-738.
56. Kleijnen, J., Knipschild, P. (1992). Ginkgo biloba. *Lancet*, 340, 1136–1139.
57. Chan, P.C., Xia, Q., Fu, P.P. (2007). Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 25(3), 211-44.
58. van Beek, T.A. (1998). Ginkgo biloba L. *Fitoterapia*, 69, 195-244.
59. van Beek, T.A. (2005). Ginkgolides and bilobalide: their physical, chromatographic and spectroscopic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5001-5012.
60. Winter, E. (1991). Effects of an extract of Ginkgo biloba on learning and memory in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 38(1), 109-114.
61. Cohen-Salmon, C., Venault, P., Martin, B., Raffalli-Sebille, M.J., Barkats, M., Clostre, F., Pardon, M.C., Christen, Y., Chapouthier, G. (1997). Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on learning and possible actions on aging. *The Journal of Physiology*, 91(6), 291-300.
62. Gong, Q.H., Wu, Q., Huang, X.N., Sun, A.S., Nie, J., Shi, J.S. (2006). Protective effect of Ginkgo biloba leaf extract on learning and memory deficit induced by aluminum in model rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 12(1), 37-41.
63. Balz, J.P., Courtois, D., Drieu, J., Drieu, K., Reynoird, J.P., Sohier, C. (1999). Production of Ginkgolides and bilobalide by Ginkgo biloba plants and tissue cultures. *Planta Medica*, 65,620-6.
64. Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. (2003). Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry*, 36, S8-14.
65. Eckert, A., Keil, U., Kressmann, S. (2003). Effects of EGb 761 Ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry*, 36, S15–23.
66. Dos Santos-Neto, L.L., de Vilhena Toledo, M.A., Medeiros-Souza, P., de Souza, G.A. (2006). The use of herbal medicine in Alzheimer's disease-a systematic review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 3(4), 441-445.
67. Fitzpatrick, A.L., Fried, L.P., Williamson, J., Crowley, P., Posey, D., Kwong, L., Bonk, J., Moyer, R., Chabot, J., Kidoguchi, L., Furberg, C.D., De Kosky, S.T. (2006). Recruitment of the elderly into a pharmacologic prevention trial: the Ginkgo Evaluation of Memory Study experience. *Contemporary Clinical Trials*, 27(6), 541-553.
68. Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545(1), 51-64.

69. Bastianetto, S., Ramassamy, C., Dore, S., Christen, Y., Poirier, J., Quirion, R. (2000). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *European Journal of Neuroscience*, 12(6), 1882-1890.
70. Luo, Y. (2006). Alzheimer's disease, the nematode Caenorhabditis elegans, and Ginkgo biloba leaf extract. *Life Sciences*, 78(18), 2066–2072.
71. Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 621S–629S.
72. Luo, Y., Smith, J.V., Paramasivam, V., Burdick, A., Curry, K.J., Buford, J.P., Khan, I., Netzer, W.J., Xu, H., Butko, P. (2002). Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12197-12202.
73. Kanowski, S., Herrmann, W.M., Stephan, K., Wierich, W., Horr, R. (1996). Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry*, 129(2), 47–56.
74. Dubey, A.K., Shankar, P.R., Upadhyaya, D., Deshpande, V.Y. (2004). Ginkgo biloba–an appraisal *Kathmandu University Medical Journal*, 2(3), 225-229.
75. Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy-Lefaix, M.T., Packer, L. (1994). The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201(2), 748-755.
76. Bastianetto, S., Zheng, W.H., Quirion, R. (2000). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *Journal of Neurochemistry*, 74(6), 2268-2277.
77. Braquet, P. (1987). The Ginkgolides: Potent platelet-activating factor antagonists isolated from Ginkgo biloba L.: Chemistry, pharmacology and clinical applications. *Drugs of the Future*, 12(7), 643-699.
78. Braquet ,P., Hosford, D. (1991). Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapeutic agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 32(1-3),135-139.
79. Houghton, P. (1994). Herbal products. 2. Ginkgo. *The Pharmaceutical Journal*, 253, 122-124.
80. Lee, S.J., Choi, J.H., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P. (1995). Suppression of Mouse lymphocyte proliferation in vitro by naturally-occuring biflavonoids. *Life Sciences*, 57, 551-8.
81. Oliver, C., Guillaume, V., Hery, F., Bourhim, N., Boiteau, K., Drieu, K. (1994). Effect of Ginkgo biloba extract on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and plasma catecholamine levels in stress. *European Journal of Endocrinology*,130, 207
82. Marcilhac , A., Dakine, N., Bourhim, N., Guillaume, V., Grino, M., Drieu, K., et al. (1998). Effect of chronic administration of Ginkgo biloba extract or Ginkgolide on the hypothalamicpituitary- adrenal axis in the rat. *Life Sciences*. 62(25), 2329-2340.
83. Satyan, K.S., Jaiswal, A.K., Ghosal, S., Bhattacharya, S.K. (1998). Anxiolytic activity of ginkgolic acid conjugates from Indian Ginkgo biloba. *Psychopharmacology*, 136(2),148-152.
84. White, H.L., Scates, P.W., Cooper, B.R. (1996). Extracts of Ginkgo biloba leaves inhibit monoamine oxidase. *Life Sciences*, 58,1315-1321.
85. Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R., Mortier, F. (1995). Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Medica*, 61(2), 126-129.
86. Packer, L., Saliou, C., Droy-Lefaix, M.T., Christen, Y. (1998). Ginkgo biloba Extract Egb 761: Biological Actions, Antioxidant Activity, and Regulation of Nitric Oxide Synthase. İçinde C. A. Rice-Evans, L. Packer (Ed.), *Flovonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker; 303–341.

87. Scholtyssek, H., Damerau, W., Wessel, R., Schimke, I. (1997). Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. *Chemico-Biological Interactions*, 106(3),183-190.
88. Gardes-Albert, M., Abdelhafid, S., Ferradini, C., Droy-Lefaix, M. (1990). Egb 761 scavenger effect against OH and O2- radicals. A gamma pulse radiolysis study. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 190.
89. Emerit, I., Oganesian, N., Sarkisian, T., Arutyunyan, R., Pogosian, A., Asrian, K., Levy, A., Cernjavski, L. (1995). Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. *Radiation Research*, 144(2), 198-205.
90. Lin, S.Y., Chang, H.P. (1997). Induction of superoxide dismutase and catalase activity in different rat tissues and protection from UVB irradiation after topical applicationvof Ginkgo biloba extracts. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*,19(6), 367-37.
91. Vasseur, M., Jean, T., DeFeudis, F.V., Drieu, K. (1994). Effects of repeated treatments with an extract of Ginkgo biloba (EGb 761), bilobalide and ginkgolide B on the electrical activity of pancreatic beta cells of normal or alloxan-diabetic mice: an ex vivo study with intracellular microelectrodes. *General Pharmacology*, 25(1), 31-46.
92. Brown, D.J. (1996). Phytotherapy-Herbal medicine meets clinical science. *NARD Journal* 1996: 41-52.
93. Arenz, A., Klein, M., Fiehe, K., Gross, J., Drewke, C., Hemscheidt, T., Leistner, E. (1996). Occurrence of Neurotoxic 4'-O-Methylpyridoxine in Ginkgo biloba Leaves, Ginkgo Medications and Japanese Ginkgo Food. *Planta Medica*, 62(6), 548-551.
94. Bent, S., Goldberg, H., Padula, A., Avins, A.L. (2005). Spontaneous bleeding associated with ginkgo biloba: a case report and systematic review of the literature: a case report and systematic review of the literature. *Journal of General Internal Medicine*, 20(7), 657-661.
95. Rowin, J., Lewis, S.L. (1996). Spontaneous bilateral subdural hematomas associated with chronic Ginkgo biloba ingestion. *Neurology*, 46(6):1775-1776.
96. Gilbert, G.J. (1997). Ginkgo biloba. *Neurology*, 48(4), 1137.
97. Wojcicki, J., Gawronska-Szklarz, B., Bieganowski, W., Patalan, M., Smulski, H.K., Samochowiec, L., Zakrzewski, J. (1995). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of flavonoid glycosides of Ginkgo biloba after a single oral administration of three formulations to healthy volunteers. *Materia medica Polona. Polish journal of medicine and pharmacy*, 27(4), 141-146.
98. Li, C.L., Wong, Y.Y. (1997). The bioavailability of ginkgolides in Ginkgo biloba extracts. *Planta Medica*, 63(6), 563-565.
99. Moreau, J.P., Eck, C.R., McCabe, J., Skinner, S. (1986). Absorption, distribution and elimination of a labelled extract of Ginkgo biloba leaves in the rat. *La Presse médicale*, 15(31), 1458-1461.
100. Abdel-Kader, R., Hauptmann, S., Keil, U. (2007). Stabilization of mitochondrial function by Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Pharmacological Research*, 56(6), 493-502.
101. Mancuso, M., Coppede, F., Murri, L. (2007). Mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer's disease: myth or reality? *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(10), 1631-46.
102. Müller, W.E., Abdel-Kader, R., Fehske, C.J. (2009). Grundlagen der therapeutischen Anwendung von EGb 761: Wirkung auf die Kraftwerke der Zellen. *Pharmazie in unserer Zeit*. 38(5), 408-16.
103. Chatterjee, S.S., Kondratskaya, E.L., Krishtal, O.A. (2003). Structure-activity studies with Ginkgo biloba extract constituents as receptor-gated chloride channel blockers and modulators. *Pharmacopsychiatry*, 36, S68-77.

104. Belayev, L., Khoutorova, L., Atkins, K. (2008). LAU-0901, a novel platelet-activating factor antagonist, is highly neuroprotective in cerebral ischemia. *Experimental Neurology*, 214(2), 253-8.
105. Nakanishi, K. (2005). Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from ancient times to the 21st century. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 4987-5000.
106. Ramassamy, C., Longpre, F., Christen, Y. (2007). Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence? *Current Alzheimer Research*, 4(3), 253-62.
107. Kondratskaya, E.L., Betz, H., Krishtal, O.A., Laube, B. (2005). The beta subunit increases the ginkgolide B sensitivity of inhibitory glycine receptors. *Neuropharmacology*. 49(6), 945-51.
108. Amri, H., Li, W., Drieu, K., Papadopoulos, V. (2004). Identification of the adrenocorticotropin and ginkgolide B-regulated 90-kilodalton protein (p90) in adrenocortical cells as a serotransferrin precursor protein homolog (adrenotransferrin). *Endocrinology*, 145(4), 1802-9.
109. Amri, H., Drieu, K., Papadopoulos, V. (2003). Transcriptional suppression of the adrenal cortical peripheral-type benzodiazepine receptor gene and inhibition of steroid synthesis by ginkgolide B. *Biochemical Pharmacology*, 65(5), 717-29.
110. Tchantchou, F., Xu, Y., Wu, Y., Christen, Y., Luo, Y. (2007). EGb 761 enhances adult hippocampal neurogenesis and phosphorylation of CREB in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 21(10), 2400-8.
111. Tchantchou, F., Lacor, P.N., Cao, Z., Lao, L., Hou, Y, Cui, C, Klein, W.L., Luo, Y. (2009). Stimulation of neurogenesis and synaptogenesis by bilobalide and quercetin via common final pathway in hippocampal neurons. *Journal of Alzheimer's Disease,* 18(4), 787-98.
112. Campbell, A.K. (2015). *Intracellular Calcium*. UK, John Wiley & Sons, 313.
113. Baudry, M., Bi, X. (2009). Calcium and Signal Transduction. İçinde LR. Squire (Ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press 521-526.
114. Schwaller, B. (2010). Cytosolic Ca2+ buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a004051.
115. Blaustein, M.P., Juhaszova, M., Golovina, V.A., Church, P.J., Stanley, E.F. (2002). Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 976, 356-366.
116. Brini, M., Carafoli, E. (2011). The plasma membrane Ca(2)+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), a004168.
117. Annunziato, L., Pignataro, G., Di Renzo, G.F. (2004). Pharmacology of brain Na+/Ca2+ excahnger: from molacular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacological Reviews*, 56(4), 633-54.
118. Bano, D., Young, K.W., Guerin, C.J., Lefeuvre, R., Rothwell, N.J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., Nicotera, P. (2005). Cleavage of the plasma membrane Na+/Ca2+ exchanger in excitotoxicity. *Cell*, 120(2), 275-285.
119. Déliot, N., Constantin, B. (2015). Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848, 2512-22.
120. Simms, B.A., Zamponi, G.W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24-45.
121. Glauner, K.S., Mannuzzu, L.M., Gandhi, C.S., Isacoff, E.Y. (1999). Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature*, 402, 813-817.
122. Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947.
123. Lacinova, L., Klugbauer, N., Hofmann, F. (2000). Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *General Physiology and Biophysics*, 19, 121-136.

124. Hobom, M., Dai, S., Marais, E., Lacinova, L., Hofmann, F., Klugbauer, N. (2000). Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *European Journal of Neuroscience*, 12, 1217-1226.
125. Bosse, E., Regulla, S., Biel, M., Ruth, P., Meyer, H.E., Flockerzi, V., Hofmann, F. (1990). The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit ofthe L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Letters*, 267, 153-156.
126. Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca2+ channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 521-555.
127. Reuter, H. (1979). Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annual Review of Physiology*, 41, 413-424.
128. Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R., Fox, A.P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosciences*, 11, 431-438.
129. Flavell, S.W., Greenberg, M.E. (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annual Review of Physiology*, 31, 563-90.
130. Hagiwara, S., Ozawa, S., Sand, O. (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *The Journal of General Physiology*, 65, 617-44.
131. Carbone, E., Lux, H.D. (1984). A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*, 310, 501-502.
132. Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316, 440-443.
133. Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J., Adams, M.E. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 823-867.
134. Llina´s, R., Yarom, Y. (1981). Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *The Journal of Physiology*, 315, 569-584.
135. Mintz, I.M., Adams, M.E., Bean, B.P. (1992). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*, 9, 85-95.
136. Randall, A., Tsien, R.W. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of calcium channel currents in rat cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience*, 15, 2995-3012.
137. Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X.H., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K. (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula Hysterocrates gigas. *Biochemistry*, 37, 15353-15362.
138. Miyashita, T., Oda, Y., Horiuchi, J., Yin, J.C., Morimoto, T., Saitoe, M. (2012). Mg(2+) block of Drosophila NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression. *Neuron*, 74(5), 887-898.
139. Higuchi, M., Maas, S., Single, F.N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R., Seeburg, P.H. (2000). Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* 406(6791), 78-81.
140. Greger, I.H., Khatri, L., Kong, X., Ziff, E.B. (2003). AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* 40(4), 763-774.
141. Bloodgood, B.L., Sabatini, B.L. (2007). Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Current Opinion* in *Neurobiology*, 17, 345-351.
142. Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383-400.
143. Barco, A., Alarcon, J.M., Kandel, E.R. (2002). Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell*, 108(5), 689-703.

144. Corlew, R., Brasier, D.J., Feldman, D.E., Philpot, B.D. (2008). Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist*, 14(6), 609-25.
145. Colleen, M. Niswender, P., Jeffrey C. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 295-322.
146. Putney, J.W. (2012). Calcium signaling: deciphering the calcium- NFAT pathway. *Current Biology*, 22(3), R87-R89.
147. Venkiteswaran, G., Hasan, G. (2009). Intracellular Ca2+ signaling and store-operated Ca2+ entry are required in Drosophila neurons for flight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10326-10331.
148. Berna-Erro, A., Braun, A., Kraft, R., Kleinschnitz, C., Schuhmann, M.K., Stegner, D., Wultsch, T., Eilers, J., Meuth, S.G., Stoll, G., Nieswandt, B. (2009). STIM2 regulates capacitive Ca2+ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Science Signaling*, 2(93), ra67.
149. Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21, 13-26.
150. Taylor, C.W., Tovey, S.C. (2010). IP(3) receptors: toward understanding their activation. Cold Spring Harb Perspect Biol 2(12):a004010.
151. Taylor, C.W., Laude, A.J. (2002). IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca2+. *Cell Calcium*, 32(5-6), 321-334.
152. Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), a003996.
153. Fill, M., Copello, J.A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. Physiological Reviews, 82, 893-922.
154. Denton, R.M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(11),1309-1316.
155. Hajnoczky, G., Hager, R., Thomas, A.P. (1999). Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca2+. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 14157-14162.
156. Bernardi, P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers in Physiology*, 4, 95.
157. Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 107-260.
158. van Rooij, E., Olson, E.N. (2007). MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 2369-2376.
159. Eisner, D. (2014). Calcium in the heart: from physiology to disease. *Experimental Physiology*, 99, 1273-1282.
160. Sakariassen, K.S., Bolhuis, P.A., Sixma, J.J. (1980). Platelet adherence to subendothelium of human arteries in pulsatile and steady flow. *Thrombosis Research*, 19, 547-59.
161. Crawford, N., Scrutton, M.C. (1987). Hemostasis and thrombosis. İçinde Bloom AL, Thomas DP (Ed.) *Biochemistry of the blood platelet:* Eddinburgh: Churchill and Livingstone; 47-77.
162. Nelsestuen, G.L., Broderius, M., Martin, G. (1976). Role of y-carboxyglutamic acid. An unusual transition required for calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, 251, 5648-56.
163. McCulloh, D.H., Chambers, E.L. (1992). Fusion of membranes during fertilization. Increases of the sea urchin egg's membrane capacitance and membrane conductance at the site of contact with the sperm. *The Journal of General Physiology*, 99, 137-175.
164. Thomas, P., Wong, J.G., Lee, A.K., Almers, W.A. (1993). A low affinity Ca2+ receptor controls the final steps in peptide secretion from pituitary melanotrophs. *Neuron*, 11, 93-104.
165. Smith, C., Moser, T., Xu, T., Neher, E. (1998). Cytosolic Ca2+ acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron*, 20, 1243-53.

166. Fisher, S.A., Fischer, T. M., Carew, T. J. (1997). Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement. *Trends Neurosciences*, 20, 170-177.
167. White, B.A. (1985). Evidence for a role of calmodulin in the regulation of prolactin gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 1213-1217.
168. Swulius, M.T., Waxham, M.N. (2008). Ca2+/Calmodulin-dependent Protein Kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(17), 2637-2657.
169. Lisman, J.E. (1994). The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neuroscience*, 17, 406-412.
170. Sacktor, T.C., Osten, P., Valsamis, H., Jiang, X., Naik, M.U., Sublette, E. (1993). Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), 8342-6.
171. Trump, B.F., Berezesky, I.K., Cowley, R.A. (1982). The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. İçinde Cowley, R.A. and Trump, B.F. (Ed.) *Pathophysiology of Shock, Anoxia and Ischemi.* London: Williams and Wilkins; 6–46.
172. Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephen, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G., Tschopp, J. (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *The EMBO Journal*, 12, 371-377.
173. Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 517-529.
174. Roderick, H.L., Lechleiter, J.D., Camacho, P.J. (2000). Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *Journal of Cell Biology*, 149, 1235-48.
175. Li, Y., Camacho, P. (2004). Ca2+-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *Journal of Cell Biology*, 164, 35-46.
176. Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223-239.
177. Brown, J.E., Cohen, L.B., De Weer, P., Pinto, L.H., Ross, W.N., Salzberg, B.M. (1975). Rapid changes in intracellular free calcium concentration. Detection by metallochromic indicator dyes in squid giant axon. *Biophysical Journal*, 15, 1155-1160.
178. Hallett, M., Carbone, E. (1972). Studies of calcium influx into squid giant axons with aequorin. *Journal of Cellular Physiology*, 80, 219-226.
179. Stinnakre, J., Tauc, L. (1973). Calcium influx in active Aplysia neurones detected by injected aequorin. *Nature: New biology*, 242, 113-115.
180. Tsien, R.Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396-2404.
181. Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J. (1982). Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *Journal of Cell Biology*, 94, 325-334.
182. Tsien, R.Y. (1989). Fluorescent probes of cell signaling. *Annual Review* of *Neuroscience*, 12, 227-253.
183. Neher, E. (1995). The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacology*, 34, 1423-1442.
184. Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., Zheng, W., Lechleiter, J.D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods*, 46, 143–151

185. Gee, K.R., Brown, K.A., Chen, W.N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27, 97-106.
186. Rochefort, N.L., Jia, H., Konnerth, A. (2008). Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 14, 389-399.
187. Jares-Erijman, E.A., Jovin, T.M. (2003). FRET imaging. *Nature Biotechnology*, 21, 1387-95.
188. Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., Miyawaki, A. (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 10554-10559.
189. Lasser-Ross, N., Miyakawa, H., Lev-Ram, V., Young, S.R., Ross, W.N. (1991). High time resolution fluorescence imaging with a CCD camera. *Journal of Neuroscience Methods*, 36, 253-261.
190. Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248, 73-76.
191. Yuste, R., Denk, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature*, 375, 682-684.
192. Carlson, G.C., Coulter, D.A. (2008). In vitro functional imaging in brain slices using fast voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell patch recording. *Nature Protocols*, 3, 249-255.
193. Segal, M. (1995). Fast imaging of [Ca]i reveals presence of voltage-gated calcium channels in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 74, 484-48.
194. Lichtman, J.W., Conchello, J.A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2, 910-919.
195. Wilson, T. (2010). Spinning-disk microscopy systems. *Cold Spring Harbor Protocols*, pdb.top88
196. Hauser, W.A. (1992). Seizure disorders: the chances with age. *Epilepsia*, 33, 6-14.
197. Begley, C.E., Famulari, M., Annegers, J.F., Lairson, D.R., Reynolds, T.F., Coan, S., Dubinsky, S., Newmark, M.E., Leibson, C., So E.L., Rocca, W.A. (2000). The cost of epilepsy in the United States: an estimate from population-based clinical and survey data. *Epilepsia*, 41, 342-51.
198. Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46, 470-472.
199. Hitiris, N., Mohanraj, R., Norrie, J., Brodie, M.J. (2007). Mortality in epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 10, 363-376.
200. Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., de Curtis, M., Perucca, P. (2018). Epilepsy. *Nature reviews Disease primers*, 4, 18024.
201. Shackleton, D.P., Kasteleijn-Nolst Trenité, D.G., de Craen, A.J., Vandenbroucke, J.P., Westendorp, R.G. (2003). Living with epilepsy: long-term prognosis and psychosocial outcomes. *Neurology*, 61, 64-70.
202. Perry, M.S., Duchowny, M. (2013). Surgical versus medical treatment for refractory epilepsy: outcomes beyond seizure control. *Epilepsia* 54, 2060-2070.
203. Ngugi, A. K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J. W., Newton, C. R. (2010). Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*, 51, 883-90.
204. Fiest, K.M., Sauro, K.M., Wiebe, S., Patten, S.B., Kwon, C.S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D.L., Jetté, N. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, 88, 296-303.
205. Singh, A., Trevick, S. (2016). The epidemiology of global epilepsy. *Neurologic Clinics*, 34, 837-847.

206. Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D.R., Perucca ,E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.H., Zuberi, S.M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521.
207. Bharucha, N. E., Bharucha, E. P., Bharucha, A. E., Bhise, A.V., Schoenberg, B.S. (1988). Prevalence of epilepsy in the Parsi community of Bombay. *Epilepsia*, 29, 111-115.
208. Gastaut, H., Caveness, W.F., Landolt, W., Lorentz DeHass, A.M., McNaughton, F.L. (1964). A proposed international classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 5, 297-306.
209. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia 1985;26:268–278.
210. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia 1989;30:389–399.
211. Blumenfeld, H. (2014). What is a seizure network? Long-range network consequences of focal seizures. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 813, 63-70.
212. Centeno, M., Carmichael, D.W. (2014). Network connectivity in epilepsy: resting state fMRI and EEG-fMRI contributions. *Frontiers in Neurology*, 5, 93.
213. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia 1981;22:489–501
214. Kelley, S.A., Kossoff, E.H. (2010). Doose syndrome (myoclonic-astatic epilepsy): 40 years of progress. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 52, 988-993.
215. Wolf, P., Yacubian, E.M., Avanzini, G., Sander, T., Schmitz, B., Wandschneider, B., Koepp, M., (2015). Juvenile myoclonic epilepsy: a system disorder of the brain. *Epilepsy Research*, 114, 2-12.
216. Verrotti A, Greco R, Chiarelli F, Domizio, S., Sabatino, G., Morgese, G.(1999). Epilepsy with myoclonic absences with early onset: a follow-up study. *Journal of Child Neurology*,14,746-9.
217. Striano, S., Capovilla, G., Sofia, V., Romeo, A., Rubboli, G., Striano, P., Kasteleijn-Nolst Trenité, D., (2009). Eyelid myoclonia with absences (Jeavons syndrome): a well-defined idiopathic generalized epilepsy syndrome or a spectrum of photosensitive conditions? *Epilepsia*, 50, 15-19.
218. Gaillard, W.D., Chiron, C., Cross, J.H., Harvey, A.S., Kuzniecky R., Hertz-Pannier L., Vezina L.G. (2009). Guidelines for imaging infants and children with recent-onset epilepsy. *Epilepsia* 50, 2147-2153.
219. Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. Epilepsia 2010;51:676–685
220. Guerrini, R., Dobyns, W.B. (2014). Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *Lancet Neurology*, 13, 710-726.
221. Grinton, B.E., Heron, S.E., Pelekanos, J.T., Zuberi, S.M., Kivity, S., Afawi, Z. ve ark. (2015). Familial neonatal seizures in 36 families: clinical and genetic features correlate with outcome. *Epilepsia*, 56, 1071-1080.
222. Lennox, W.G. (1947). The genetics of epilepsy. *American Journal of Psychiatry*, 103, 457-62.
223. Brunklaus, A., Dorris, L., Ellis, R., Reavey, E., Lee, E., Forbes, G. ve ark. (2013). The clinical utility of an SCN1A genetic diagnosis in infantile-onset epilepsy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 55, 154-161.
224. Arsov, T., Mullen, S.A., Rogers, S., Phillips, A.M., Lawrence, K.M., Damiano, J.A. ve ark. (2012). Glucose transporter 1 deficiency in the idiopathic generalized epilepsies. *Annals of Neurology*, 72, 807-815.

225. Carvill, G.L., Heavin, S.B., Yendle, S.C., McMahon, J.M., O'Roak, B.J., Cook, J. ve ark (2013). Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature Genetics*, 45, 825-830.
226. Depienne, C., Trouillard, O., Gourfinkel-An, I. Saint-Martin, C., Bouteiller, D., Graber, D. ve ark. (2010). Mechanisms for variable expressivity of inherited SCN1A mutations causing Dravet syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 47, 404-410.
227. Vezzani, A., Fujinami, R.S. (2016). White HS, et al. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathologica*, 131, 211-234.
228. Hesdorffer, D.C., Benn, E.K.T., Cascino, G.D., Hauser, W.A. (2009). Is a first acute symptomatic seizure epilepsy? Mortality and risk for recurrent seizure. *Epilepsia*, 50,1102-08.
229. Pohlmann-Eden, B. (2006). The first seizure and its management in adults and children. *British Medical Journal*, 332, 339-342.
230. Pitkänen, A. (2010). Therapeutic approaches to epileptogenesis hope on the horizon. *Epilepsia*, 51, 2-17.
231. Löscher, W., Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, 52, 657-678 .
232. Chen, Z., Brodie, M. J., Liew, D., Kwan, P. (2018). Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs. *JAMA Neurology*, 75, 279.
233. Davies, J.A. (1995). Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Seizure*, 4(4), 267-71.
234. Yaari, Y., Selzer, M.E., Pincus, J.H. (1986). Phenytoin: mechanisms of its anticonvulsant action. *Annals of Neurology*, 20, 171-184.
235. McNamara, J.O. (2010). Drugs effective in the therapy of the epilepsies. İçinde Hardman, J.G., Limbard, L.E., Goodman, A. (Ed.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill; 521-547.
236. Kuo, C.C. (1998). A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na+ channels. *Molecular Pharmacology*, 54, 712-721.
237. Perucca, E., Cloyd, J., Critchley, D., Fuseau, E. (2008). Rufinamide: clinical pharmacokinetics and concentration–response relationships in patients with epilepsy. *Epilepsia*, 49(7), 1123-41.
238. Czapinski, P., Blaszczyk, B., Czuczwar, S.J. (2005). Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5, 3-14.
239. Maryanoff, B.E. (2009). Sugar sulfamates for seizure control: Discovery and development of topiramate, a structurally unique antiepileptic drug. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9, 1049-62.
240. Quilichini, P.P., Chiron, C., Ben-Ari, Y., Gozlan, H. (2006). Stiripentol, a putative antiepileptic drug, enhances the duration of opening of GABA-A receptor channels. *Epilepsia*, 47(4), 704-716.
241. Kassaï, B., Chiron, C., Augier, S. Cucherat, M., Rey, E., Gueyffier, F., Guerrini, R., Vincent, J., Dulac, O., Pons, G. (2008). Severe myoclonic epilepsy in infancy: a systematic review and a meta-analysis of individual patient data. *Epilepsia* 49(2), 343-348.
242. Lynch, B.A., Lambeng, N., Nocka, K. Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A., Fuks, B. (2004). The synaptic vesicle protein SVA is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 9861-9866.
243. Landmark, C.J., Johannessen, S.I. (2008). Pharmacological management of epilepsy. *Drugs*, 68(14), 1925-1939.
244. Niespodziany, I. (2009). Brivaracetam modulates Na+ currents expressed in a neuroblastoma cell line compared with carbamazepine. *Epilepsia*, 50, 107.
245. Benarroch, E.E. (2008). Metabotropic glutamate receptors. *Neurology*, 70, 964-968..

246. Rundfeldrt, C., Netzer, R. (2000). The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in chinese hamster ovary cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neuroscience Letters*, 281, 73-76.
247. Errington, A.C., Stöhr, T., Heers, C., Lees, G. (2008). The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *Molecular Pharmacology*, 73(1), 157-169.
248. Curia, G., Biagini, G., Perucca, E., Avoli, M. (2009). Lacosamide: a new approach to target voltagegated sodium currents in epileptic disorders. *CNS Drugs*, 23(7), 555-568.
249. Spencer, S.S., Berg, A.T., Vickrey, B.G., Sperling, M.R., Bazil, C.W., Shinnar, S., Langfitt, J.T., Walczak, T.S., Pacia, S.V., Ebrahimi, N., Frobish, D. (2003). Initial outcomes in the Multicenter Study of Epilepsy Surgery. *Neurology*, 61, 1680-1685.
250. Shneker, B.F., Fountain, N.B. (2003). Epilepsy. *Disease a Month*, 49, 426-478.
251. Cascino, G.D. (2011). From the American Epilepsy Society 2009 Annual Course. Non-substrate-directed epilepsy and surgery: PRO and CON. *Epilepsy & Behavior*, 20, 190-193.
252. Noe, K., Sulc, V., Wong-Kisiel, L., Wirrell, E., Van Gompel, J.J., Wetjen, N. ve ark. (2013). Longterm outcomes after nonlesional extratemporal lobe epilepsy surgery. *JAMA Neurology*, 70, 1003-1008.
253. Milby, A. H., Halpern, C. H., Baltuch, G. H. (2009). Vagus nerve stimulation in the treatment of refractory epilepsy. *Neurotherapeutics*, 6, 228–237.
254. Ryvlin, P. So, E.L., Gordon, C.M., Hesdorffer, D.C., Sperling, M.R., Devinsky, O., Bunker, M.T., Olin, B., Friedman, D. (2018). Long-term surveillance of SUDEP in drug-resistant epilepsy patients treated with VNS therapy. *Epilepsia*, 59, 562-572.
255. Lefevre, F., Aronson, N. (2000). Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy in children: a systematic review of efficacy. *Pediatrics*, 105, e46–e46.
256. Cervenka, M. C. Hocker, S., Koenig, M., Bar, B., Henry-Barron, B., Kossoff, E.H. ve ark. (2017). Phase I/II multicenter ketogenic diet study for adult superrefractory status epilepticus. *Neurology*, 88, 938-943.
257. Kang, H.C., Chung, D. E., Kim, D. W., Kim, H. D. (2004). Early- and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia*, 45, 1116-1123.
258. Putnam, T.J., Merritt, H.H. (1937). Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. *Science*, 85, 525-6.
259. Sarkisian, M.R. (2001). Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders. *Epilepsy & Behavior*, 2, 201–216.
260. Raol, Y.H., Brooks-Kayal, A.R. (2012). Experimental Models of Seizures and Epilepsies. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 105, 57-82.
261. Kandratavicius, L., Balista, P.A., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R.N., Umeoka, E.H., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L.S., Leite, J.P. (2014). Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 1693-705.
262. Unterberger, I., Trinka, E., Kaplan, P.W., Walser, G., Luef, G., Bauer, G. (2018). Generalized nonmotor (absence) seizures-What do absence, generalized, and nonmotor mean? *Epilepsia*, 59(3), 523-529.
263. Adie, W.J. (1924). Pyknolepsy: A form of epilepsy in children, with a good prognosis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 17, 19-25.
264. Sadleir, L.G., Farrell, K., Smith, S., Connolly, M.B., Scheffer, I.E. (2006). Electroclinical features of absence seizures in childhood absence epilepsy. *Neurology*, 67, 413-418.
265. Loiseau, P., Duche, B., Pedespan, J.M. (1995). Absence epilepsies. *Epilepsia*, 36, 1182-1186.
266. Epstein, M.A., Duchowny, M., Jayakar, P., Resnick, T.J., Alvarez, L.A. (1994). Altered responsiveness during hyperventilation-induced EEG slowing: A nonepileptic phenomenon in normal children. *Epilepsia*, 35, 1204-120.

267. Lennox, W.G. (1951). The heredity of epilepsy as told by relatives and twins. *Journal of the American Medical Association*, 146, 529-536.
268. Doose, H., Gerken, H., Horstmann, T., Volzke, E. (1973). Genetic factors in spike-wave absences, *Epilepsia*, 14, 57-75.
269. Kang, J.Q., Macdonald, R.L. (2016). Molecular Pathogenic Basis for GABRG2 Mutations Associated With a Spectrum of Epilepsy Syndromes, From Generalized Absence Epilepsy to Dravet Syndrome. *JAMA Neurology*, 73(8), 1009-16.
270. Guilhoto, L.M. (2017). Absence epilepsy: Continuum of clinical presentation and epigenetics? *Seizure*, 44, 53-57.
271. Pearl, P.L. (2018). Epilepsy Syndromes in Childhood. Continuum (Minneap Minn). *Child Neurology*, 24, 186-209.
272. Snead, O.C. (1992). Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents. *Journal of Neural Transmission*, 35,7-19.
273. Avoli, M. (1995). Feline generalized penicillin epilepsy. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, 16, 79-82.
274. Coenen, A.M.L., Drinkenburg, W.H.I.M., Inoue, M.,van Luijtelaar, E.L.J.M. (1992b). Genetic models of absence epilepsy, with emphasis on the WAG/Rij strain of rats. *Epilepsy Research*, 12, 75-86.
275. Marescaux, C., Vergnes, M., Depauli, A. (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg-a review. *Journal of Neural Transmission*, 35, 37-69.
276. Semba, K., Komisaruk, B.R. (1984). Neural substrates of two different rhythmical vibrissal movements in the rat. *Neuroscience*, 12, 761-774.
277. Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, I., Warter, J.M. (1982). Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized nonconvulsive epilepsy. *Neuroscience Letters*, 33, 97-101.
278. Willoughby, J.O., Mackenzie, L. (1992). Nonconvulsive lectrocorticographic paroxysms (absence epilepsy) in rat strains. *Laboratory animal science*, 42, 551-553.
279. Coenen, A.M.L., Luijtelaar, E.L.J.M. (2003). Genetic Animal Models for Absance Epilepsy: A Review of the WAG/Rij Strain of Rats. *Bahavior Genetics*, 33(6), 635-55.
280. Coenen, A.M.L., van Luijtelaar, E.L.J.M. (1987). The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: Age and sex factors. *Epilepsy Research*, 1, 297-301.
281. Drinkenburg, W.H.I.M., van Luijtelaar, E.L.J.M., van Schaijk, W.J., Coenen, A.M.L. (1993). Aberrant transients in the EEG of epileptic rats: A spectral analytical approach. *Physiology & Behavior*, 54, 779-783.
282. WHO. Fact sheets: Epilepsy June 2019. Erişim:23.08.2020; https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy
283. Kwan, P., Brodie, M. J. (2000). Early identification of refractory epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, 342, 314-319.
284. Coppola, A., Moshe, S.L. (2012). Animal Models. *Handbook of Clinical Neurology*, 107, 63-98.
285. Luijtelaar, G.V., Zobeiri, M. (2014). Progress and outlooks in a genetic absence epilepsy model (wag/rij). *Current Medicinal Chemistry*, 21(6), 704-21.
286. Augustin, S., Rimbach, G., Augustin, K., Schliebs, R., Wolffram, S., Cermak, R. (2009). Effect of a short-and long-term treatment with Ginkgo biloba extract on amyloid precursor protein levels in a transgenic mouse model relevant to Alzheimer's disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 481, 177−182.
287. Yin, Y., Ren, Y., Wu, W., Wang, Y., Cao, M., Zhu, Z., Wang, M., Li, W. (2013). Protective effects of bilobalide on Aβ25−35 induced learning and memory impairments in male rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 106, 77−84.
288. Leistner, E., Drewke, C. (2010). Ginkgo biloba and ginkgotoxin. *Journal of Natural Products*, 73, 86-92.
289. Sasaki, K., Hatta, S., Wada, K., Ohshika, H., Haga, M. (1995). Anticonvulsant activity of bilobalide, a sesquiterpine in Ginkgobiloba L. leaves, against chemical-induced and

electroshock- induced convulsions in mice. *Research Communications in Biological Psychology and Psychiatry*, 20, 145-156.
290. Kobayashi, D., Yoshimura, T., Johno, A., Sasaki, K., Wada, K. (2011). Toxicity of 4′-O-methylpyridoxine-5'-glucoside in Ginkgo biloba seeds. *Food Chemistry*, 126, 1198-202.
291. Yıldırım, H. (2014). Pentilentetrazol ile oluşturulan nöbet modelinde Ginkgo biloba'nın ağrı duyarlılığı ve nöbetlere etkisi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
292. Manocha, A. Pillai, K.K., Husain, S.Z. (1997). Effect of Ginkgo biloba on chemoshock in mice. *Indian Journal of Pharmacology, 29*, 198-200
293. Şekerci, E. (2016). Sıçanlarda *Ginkgo biloba*'nın epileptiform aktivite ve davranışa etkileri. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
294. Macallıster, V.V.S., Schaffer, S.G. (2007). Neuropsychological deficits in childhood epilepsy syndromes. *Neuropsychology Review*, 17, 427-444.
295. Pelletıer, M.R., Wadıa, J.S., Mılls, L.R., Carlen, P.L., Coulter, D.A., Huguenard, J.R., Prınce, D.A. (1999). Seizure-induced cell death produced by repeated tetanic stimulation in vitro: possible role of endoplasmic reticulum calcium stores. *Journal of Neurophysiology*, 81,3054-64.
296. Velioğlu, S. (2016). Epilepside Ağrı Duyarlılığının Genetik Absans Epilepsili Sıçanlarkullanılarak İn-Vivo Ve İn-Vitro İncelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
297. Gedikli, Ö. (2018). Genetik absans epilepsili sıçanlarda ginkgo biloba'nın dikendalga deşarjlar üzerindeki etkilerinin elektroensefalografik olarak incelenmesi. Doktora tezi, Trabzon
298. Kubota, Y., Tanaka, N., Kagota, S., Nakamura, K., Kunitomo, M., Umegaki, K., Shinozuka, K. (2006). Effects of Ginkgo Biloba Extract on Blood Pressure and Vascular Endothelial Response by Acetylcholine in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(2), 243-9.
299. Choi, S. E., Shin, H. C., Kim, H. E., Lee, S. J., Jang, H. J., Lee, K. W., Kang, Y. (2007). Involvement of Ca2+, CaMK II and PKA in EGb 761-induced insulin secretion in INS-1 cells. *Journal of ethnopharmacology*, 110(1), 49-55.
300. Kubota, Y., Tanaka, N., Umegaki, K., Takenaka, H., Mizuno, H., Nakamura, K., Shinozuka, K., Kunitomo, M. (2001). Ginkgo Biloba Extract-Induced Relaxation of Rat Aorta Is Associated With Increase in Endothelial Intracellular Calcium Level. *Life Sciences*, 69(20):2327-36.
301. Liu, J., Wang, J., Chen, X., Guo, C., Guo, Y., Wang, H. (2012). Ginkgo biloba extract EGB761 protects against aging-associated diastolic dysfunction in cardiomyocytes of D-galactose-induced aging rat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 418748.
302. Han, L., Li, M. (2013). Protection of vascular endothelial cells injured by angiotensin II and hypoxia in vitro by Ginkgo biloba (Ginaton). *Vascular and Endovascular Surgery*, 47(7), 546-550.
303. Kanada, A., Nishimura, Y., Yamaguchi, J. Y., Kobayashi, M., Mishima, K., Horimoto, K., Kanemaru, K., Oyama, Y. (2005). Extract of Ginkgo biloba leaves attenuates kainate-induced increase in intracellular Ca2+ concentration of rat cerebellar granule neurons. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(5), 934-936.
304. Sasaki, K., Hatta, S., Haga, M., Ohshika, H. (1999). Effects of bilobalide on gamma-aminobutyric acid levels and glutamic acid decarboxylase in mouse brain. *European Journal of Pharmacology*, 367(2-3), 165-173.
305. Davies, J. A., Johns, L., Jones, F. A. (2003). Effects of bilobalide on cerebral amino acid neurotransmission. *Pharmacopsychiatry*, 1, S84-S88.
306. Xu, Y., Tao, Y. X. (2004). Involvement of the NMDA receptor/nitric oxide signal pathway in platelet-activating factor-induced neurotoxicity. *Neuroreport*, 15(2), 263-266.
307. Clark, G.D., Happel, L.T., Zorumski, C.F., Bazan, N.G. (1992). Enhancement of hippocampal excitatory synaptic transmission by platelet-activating factor. *Neuron*, 9, 1211-1216.
308. Kato, K., Clark, G.D., Bazan, N.G., Zorumski, C.F. (1994). Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. *Nature*, 367, 175-179.
309. Chen, Y., Feng, Z., Shen, M. ve ark. (2020). Insight into Ginkgo biloba L. Extract on the Improved Spatial Learning and Memory by Chemogenomics Knowledgebase, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation, and Bioassay Validations. *ACS Omega*, 5,2428-39.

310. Lenoir, M., Muntaner, O., Pedruzzi, E., Roch-Arveiller, M., Tissot, M., Drieu, K., Périanin, A. (2005). Ginkgolide B stimulates signaling events in neutrophils and primes defense activities. *Biochemical and biophysical research communications*, 335(4), 1149-1154.
311. Wang, S. J., Chen, H. H. (2005). Ginkgolide B, a constituent of Ginkgo biloba, facilitates glutamate exocytosis from rat hippocampal nerve terminals. *European journal of pharmacology*, 514 (2-3), 141-149.
312. Meng, H., Li, C., Feng, L., Cheng, B., Wu, F., Wang, X., Li, Z., Liu, S. (2007). Effects of Ginkgolide B on 6-OHDA-induced apoptosis and calcium over load in cultured PC12. International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental *Neuroscience*, 25(8), 509-514.
313. Gılles, V.L., Wiaderna, D., Elants, C., Scheenen, W. (2000). Opposite effects of T- and L-type Ca2+ channels blockers in generalized absence epilepsy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 406, 381-389.
314. Czapi Ski, P., Blaszczyk, B., Czuczwar, S.J. (2005). Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5, 3-14.
315. Fletcher, C.F., Lutz, C.M., O'sullivan, T.N., Shaughnessy, J.D., Hawkes, R., Frankel, W.N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. (1996). Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell*, 15, 607-617.
316. Van Luijtelaar, E.L., Ates, N., Coenen, A.M. (1995). Role of L-type calcium channel modulation in nonconvulsive epilepsy in rats. *Epilepsia*, 36, 86-92.
317. Durmus, N., Kaya, T., Gültürk, S., Demir, T., Parlak, M., Altun, A. (2013). The effects of L type calcium channels on the electroencephalogram recordings in WAG/RIJ rat model of absence epilepsy. *European review for medical and pharmacological sciences*, 17(9),1149-54.
318. Varadi, G., Mori, Y., Mikala, G., Schwartz, A. (1995). Molecular determinants of Ca2+channel function and drug action. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16, 43-9.
319. Leresche, N., Parri, H.R., Erdemli, G., Guyon, A., Turner, J.P., Williams, S.R. ve ark. (1998). On the action of the anti-absence drug ethosuximide in the rat and cat thalamus. *Journal of Neuroscience*, 18, 4842-53.
320. Carbone, E., Lux, H.D. (1986). Low and high voltage activated Ca2q channels in vertebrate cultured neurons: Properties and functions. *Experimental Brain Research*, 14, 1-8.
321. Van Luijtelaar, G., Wiaderna, D., Elants, C., Scheenen, W. (2000). Opposite effects of T- and L-type Ca (2+) channels blockers in generalized absence epilepsy. *The European Journal of Pharmacology*, 406, 381-9.
322. Durmus, N., Gültürk, S., Kaya, T., Demir, T., Parlak, M., Altun, A. (2015). Evaluation of effects of T and N type calcium channel blockers on the electroencephalogram recordings in Wistar Albino Glaxo/Rij rats, an absence epilepsy model. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(1), 34-38.
323. Kubota, Y., Kobayashi, K., Tanaka, N., Nakamura, K., Kunitomo, M., Umegaki, K., Shinozuka, K. (2003). Interaction of Ginkgo biloba extract (GBE) with hypotensive agent, nicardipine, in rats. *In vivo (Athens, Greece)*, 17(5), 409-412.
324. Chen, B., Cai, J., Song, L. S., Wang, X., Chen, Z. (2005). Effects of ginkgo biloba extract on cation currents in rat ventricular myocytes. *Life sciences*, 76(10), 1111-1121.
325. Morimoto, K., Sato, M. (1992). NMDA receptor complex and kindling mechanisms. *Epilepsy Research*, 9, 297-305.
326. Qi, X. Y., Zhang, Z. X., Xu, Y. Q. (2004). Effects of Ginkgolide B on action potential and calcium, potassium current in guinea pig ventricular myocytes. *Acta pharmacologica Sinica*, *25*(2), 203–207.
327. Huang, D. S., Lin, H. Y., Lee-Chen, G. J., Hsieh-Li, H. M., Wu, C. H., Lin, J. Y. (2016). Treatment with a Ginkgo biloba extract, EGb 761, inhibits excitotoxicity in an animal model of spinocerebellar ataxia type 17. *Drug design, development and therapy*, *10*, 723-731.
328. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462-465.
329. D'Arcangelo, G., D'Antuono, M., Biagini, G., Warren, R., Tancredi, V., Avoli, M. (2002). Thalamocortical oscillations in a genetic model of absence seizures. *European Journal of Neuroscience* 16, 2383–2393.

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
12/07/2017	35		Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM

"WAG/Rij Sıçanlarda Ginkgo biloba'nın Nöronal Eksitabilite Üzerindeki Etkilerinin in vitro Kalsiyum Görüntüleme Yöntemi ile İncelenmesi" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna **"Oybirliği"** ile karar verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 6 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Metehan AKÇA
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul - 28.05.1988
Uyruğu : Türk
Medeni Durumu : Evli
İletişim : metehanakca57@gmail.com
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Bilgileri:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Edebiyat/Biyoloji	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2005-2009
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri Ens./ Fizyoloji	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2009-2012
Doktora	Sağlık Bilimleri Ens./ Fizyoloji	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2012-2016
Doktora (Yatay Geçiş)	Sağlık Bilimleri Ens./ Fizyoloji	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2016-…

Akademik Unvanlar

Araştırma Görevlisi (2011-2016): Karadeniz Teknik Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Ens./b Fizyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Görevlisi (2016-Halen): Sağlık Bilimleri Üniversitesi / Hamidiye SHMYO/ Elektronörofizyoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi: Sıçanlarda epileptik nöbetlerin neden olduğu kognitif değişimlere melatoninin etkisi (2012)
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM

Projeler

- Absans Epilepsinin Wag Rij Sıçan Modelinde Ginkgo Bilobanın Nöronal Eksitabiliteye Etkileri Üzerine Karşılaştırmalı Bir Araştırma Bir In Vivo Elektrofizyolojik Ve In Vitro Kalsiyum Görüntüleme Çalışması, -Tübitak 1001, Bursiyer, 15/10/2015 - 24/09/2018

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Abidin I, Yildirim M, Aydin-Abidin S, Kalay E, Cansu A, **Akca M**, Mittman T (2011). Penicillin induced epileptiform activity and EEG spectrum analysis of BDNF heterozygous mice: An in vivo electrophysiological study. Brain Res Bull 86: 159- 164.
2. Aydin-Abidin S, Yildirim M, Abidin I, **Akca M**, Cansu A (2011). Comparison of focally induced epileptiform activities in C57BL/6 and BALB/c mice by using in vivo EEG recording. Neurosci Lett 504: 165-169.
3. Gündüz A, Aydın M, **Akça M**, Türkmen S, Türedi S, Eryiğit U, Cansu A, Yıldırım M (2012). Is grayanotoxin directly responsible for mad honey poisoning- associated seizures. Turk J Med Sci 42: 1201-1214.
4. Okuyan M, **Akça M**, Yıldırım M (2013). Electrophysiological evidence for the anticonvulsant effect of alpha-lipoic acid via indirect antioxidant properties in BALB/c mice. Neurol Res 35: 726-733.
5. Yıldırım M, Aydın-Abidin S, Abidin I, **Akça M**, Canpolat S, Cansu A (2013). Evaluation Of The Role Of Chronic Daily Melatonin Administration And Pinealectomy On Penicilin- İnduced Focal Epileptiform Activity And Spectral Analysis Of Ecog İn Rats: An İn Vivo Electrophysiological Study. Neurochem Res, 38: 1672-1685.

6. Türkmen S, Karagöz Ü, Gündüz A, Türedi S, **Akça M**, Yıldırım M (2013).The dose-dependent effect of grayanotoxin on the cardiovascular system. Turk J Med Sci 43: 700-705.
7. İkinci A, Odacı E, Yıldırım M, Kaya H, **Akça M**, Hancı H, Aslan A, Sönmez OF, Baş O (2013). The effects of prenatal exposure to a 900 megahertz electromagnetic field on hippocampus morphology and learning behavior in rat pups. NeuroQuantology 11:582-590.
8. Odacı E, İkinci A, Yıldırım M, Kaya H, **Akça M**, Hancı H, Sönmez OF, Aslan A, Okuyan M, Baş O (2013). The effects of 900 megahertz electromagnetic field applied in the prenatal period on spinal cord morphology and motor behavior in female rat pups. NeuroQuantology 11:573-581.
9. Baş O, Sönmez OF, Aslan A, İkinci A, Hancı H, Yıldırım M, Kaya H, **Akça M**, Odacı E (2013). Pyramidal Cell Loss in the Cornu Ammonis of 32-day-old Female Rats Following Exposure to a 900 Megahertz Electromagnetic Field During Prenatal Days 13-21. NeuroQuantology 11:591-599.
10. Er K, Yıldırım M, Taşdemir T, **Akça M**, Abidin İ (2013). Electrophysiological evidence on epileptiform activity enhanced by electrical stimulation of teeth in rats. Neurological Research 36: 673-678.
11. Yılmaz T, **Akça M**, Turan Y, Ocak H, Kamaşak K, Yıldırım M (2014). Efficacy of dexamethasone on penicillin-induced epileptiform activity in rats: An electrophysiological study. Brain research 1554: 67-72.
12. Türedi, S., Şahin, A., **Akça, M**., Demir, S., Reis Köse, G. D., Çekiç, A. B., Yıldırım, M., Yuluğ, E., Menteşe, A., Türkmen, S., & Acar, S. (2020). Ischemia-modified albumin and the IMA/albumin ratio in the diagnosis and staging of hemorrhagic shock: A randomized controlled experimental study. Hemorajik şok tanısında ve evrelemesinde iskemi modifiye albümin ve IMA/albümin oranı: Randomize kontrollü deneysel çalışma. Turkish journal of trauma & emergency surgery. 26(2), 153–162.
13. Efendioglu, M., Basaran, R., **Akca, M**., Ceman, D., Demirtas, C., & Yildirim, M. (2020). Combination Therapy of Gabapentin and N-Acetylcysteine Against Posttraumatic Epilepsy in Rats. *Neurochemical research*, *45*(8), 1802–1812.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler.

1. **Akca M**, Yildirim M. Effect of pinealectomy and exogenous melatonin on passive avoidance learning in rats. Turkish-FEPS Physiology Congress. 05.09.2011/İstanbul **.**
2. Gunduz A, Aydin M, Yildirim M, Türkmen S, Türedi S, **Akca M**, Cansu A. Is grayanotoxin directly responsible for mad honey poisoning-associated seizures? 6. Mediterranean emergency medicine congress. 12.09.2011/Greece
3. Tuğ Kılkış B, Er K, Tasdemir T, Yıldırım M, Taşkesen F, **Akça M**, Abidin İ, Tümkaya L, Kalkan Y, Aydın Abidin S, Serper A. Neurotoxic effects of root-canal-sealers with different compounds on rat-sciatic-nerves. CED-IADR 2013 46th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research with the Scandinavian Division (NOF), 04-07 September 2013, Florence, Italy.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Abidin İ, Yıldırım M, Aydın-Abidin S, Kalay E, Cansu A, **Akça M**, Eysel UT, Mittmann T. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) heterozigot fare korteksinde GABAerjik salınım özellikleri ve EEG analizi. 10. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi. Özet Kitabı, (S 26) , İstanbul Üniversitesi, 9-12 Nisan 2011/İstanbul.
2. Yıldırım M, Abidin İ, Canpolat S, Aydın-Abidin S, **Akça M**, Cansu A. Sıçanlarda epileptiform aktivite üzerine pinealektomi ve ekzojen melatoninin etkisi. 10. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi. Özet Kitabı, (S 26) , İstanbul Üniversitesi, 9-12 Nisan 2011/İstanbul.
3. Gündüz A, Karagöz U, Türkmen S, Yıldırım, **Akça M**, Türedi S, Durmuş İ. Deli bal zehirlenmelerinde, grayonotoksinin kardiovasküler ve solunum sistemlerine etkileri. 7. Türkiye acil tıp kongresi TATKON 2011. 13.10.2011/ Trabzon.
4. Er K, Yıldırım M, Taşdemir T, **Akça M**, Abidin İ. Epileptiform aktivite oluşturulmuş ratlarda dişin elektrik stimülasyonunun olası etkileri. Türk Endodonti Derneği 11. Uluslararası Kongresi. 27-28 Nisan 2012/ İstanbul.

5. Okuyan M, **Akça M**, Yıldırım M. BALB/c Farelerde Alfa Lipoik Asitin Dolaylı Antioksidan Özelliğiyle İlişkili Antiepileptik Etkisi İçin Elektrofizyolojik Kanıtlar. TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi. 25-29 Eylül 2012/ Trabzon.
6. **Akça M**, Okuyan M, Yıldırım M. Kronik melatonin uygulamasının sıçanlarda pentilentetrazol ile oluşturulan nöbetlere etkisi. TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi. 25-29 Eylül 2012/ Trabzon.
7. **Akça M**, Şahan R, Okuyan M, Yıldırım M. Epileptik nöbet oluşturulan sıçanların kognitif ve motor performanslarına melatoninin etkisi. TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi. 25-29 Eylül 2012/ Trabzon.
8. Kılıçkaya H,,Çağlar SE, Demirtaş C, **Akça M**, Saraçoğlu KT,Yıldırım M (2018). The Effect of N-Acetylcysteine on Locomotor Activity in a Genetic Model of Absence Epilepsy. Acta Physiologica.
9. Çağlar SE, Kılıçkaya H, Demirtaş C, **Akça M**, Saraçoğlu KT,Yıldırım M (2018). Effects of N-Acetylcycteine on Pain Sensitivity in Experimental Epilepsy Models. Acta Physiologica
10. Demirtaş C, Kılıçkaya H, Çağlar SE, **Akça M**, Saraçoğlu KT,Yıldırım M (2018). Effect of N-Acetylcysteine on Spike Wave Discharges in Absence Epilepsy Model. Acta Physiologica
11. **Akça M,** Bay S, Baydaş G, Altuncu N, Öztürk G, Yıldırım M. (2019). Effects of Ginkgo Biloba Components and Calcium Channel Blockers on Cortical Neuron Excitability inWAG/Rij Rats with Absence Epilepsy: In Vitro Calcium Imaging Study. Turkish Society of Physiological Sciences 45th National Physiology Congress (Oral Communications). Acta Physiologica 227(722); 44.
12. **Akça M,** Baydaş G, Bay S, Altuncu N, Öztürk G, Yıldırım M. (2019). Effect of Ginkgo biloba Extract EGb 761 on Intracellular Calcium Level and Excitability in WAG/Rij Rat Cortical Neuron Culture. Turkish Society of Physiological Sciences 45th National Physiology Congress (Poster Communications). Acta Physiologica 227(722); 76.

Ödüller

- 2012 TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi En İyi Poster Ödülü (üçünlük)