T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL STATUS EPİLEPTİKUS MODELİNDE MİDAZOLAM VE KLONAZEPAM UYGULANMASI SONRASI BİYOMARKIR OLARAK ÖNE ÇIKAN MUHTEMEL miRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

HAVA YILDIRIM

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ENDER M. COŞKUNPINAR

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
EYLÜL/2022

İTHAF

"Kızlarım Merve ve Bilge ile oğlum Batuhan'a ithaf ediyorum"

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji doktora eğitimim sürecinde gerek teorik bilgi düzeyinde gerekse laboratuvar çalışmalarımda katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ender M. COŞKUNPINAR'a teşekkür ederim. SBÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ülkan KILIÇ'a, çalışma arkadaşlarım M.Sc. Kübra GÜNDÜZ, B.Sc. Şeyma TUR, M.Sc. Halime YILDIRIM, M.Sc. Tuğba KÖSE ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimini sürdüren diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamda kullanmış olduğum dokuların temin edildiği *in vivo* deneysel çalışmaları yürüten Dr. Cumaali DEMİRTAŞ ve Fizyoloji Anabilim Dalı çalışma ekibine teşekkür ederim.

Doktora eğitimime ilişkin fedakârlık ve destekleri için eşim Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM'a, çocuklarım Merve, Bilge ve Batuhan YILDIRIM'a, Sevgili Anneme, Babama, Kardeşlerime ve Kayınvalideme teşekkür eder, yakın zamanda kaybettiğimiz Kayınpederimi rahmetle anarım.

Tez çalışmamı "Doktora Tez Projeleri" kapsamında destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 2021/113) teşekkür ederim.

Hava YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. EPİLEPSİ 4
2.1.1. Epilepsinin Tanımı 4
2.1.2. Epilepsinin Tarihçesi 5
2.1.3. Epilepsi ve Nöbetlerin Sınıflandırılması 7
2.1.4. Epilepsinin Epidemiyolojisi 11
2.1.5. Epilepsinin Patofizyolojisi 11
2.1.6. Satus Epileptikus 12
2.1.7. Antiepileptik İlaçların Etki Mekanizmaları 15
2.1.8. Status Epileptikusta Antiepileptik İlaç Kullanımı 18
2.1.9. Epilepsi Genetiği 19
2.1.9.1. Genetik temelli epilepsilerin karmaşıklığı 21
2.1.9.2. Epilepside genetik testler 23
2.1.9.3. Genetik epilepsiye ilişkin tedavi stratejileri 23
2.1.9.4. Epilepside gen terapisi 24
2.2. miRNA 26
2.2.1. miRNA'ların Tanımı ve Tarihçesi 26
2.2.2. miRNA Biyogenezi 27
2.2.3. miRNA'ların Fonksiyonları 31
2.2.4. Epigenetikte miRNA'ların Rolü 32
2.2.5. miRNA'ların Hastalıklarla İlişkisi ve Klinik Önemi 34
2.2.5.1. miRNA'ların kanserle ilişkisi 34
2.2.5.2. miRNA'ların nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi 34

2.2.5.3. miRNA'ların metabolik bozukluklarla ilişkisi 34
2.2.5.4. miRNA'ların kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi 35
2.2.6. miRNA'ların Biyobelirteç Olarak Kullanımı 35
2.2.6.1. miRNA'ların biyobelirteç olarak kanserle ilişkisi 35
2.2.6.2. miRNA'ların biyobelirteç olarak nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi.....36
2.2.6.3. miRNA'ların biyobelirteç olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi 36
2.2.7. miRNA'ların Tedavide Kullanımı 36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....38
3.1. GEREÇLER.....38
3.1.1. İn vivo Çalışma Dizaynı ve Deney Grupları.....38
3.1.2. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması 40
3.1.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar.....41
3.1.4. Deneylerde Kullanılan Kitler 42
3.1.5. Deneylerde Kullanılan Tampon, Solüsyon ve Çözeltiler.....42
3.1.6. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....42
3.2. YÖNTEMLER.....44
3.2.1. miRNA İzolasyonu 44
3.2.1.1. Plazmadan miRNA İzolasyonu.....44
3.2.1.2. Dokudan miRNA İzolasyonu.....46
3.2.2. cDNA Eldesi 48
3.2.3. qRT- PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyonu Analizi.....48
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....51
4. BULGULAR 52
4.1. KAT DEĞİŞİM DEĞERLERİNE GÖRE UP- DOWNREGÜLE miRNA'LAR 52
4.2. miRNA RT PCR AMPLİFİKASYON EĞRİSİ, MELTING PİKİ VEYA MELTING EĞRİSİ 65
5. TARTIŞMA.....70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 82
KAYNAKLAR.....83
EK.....94

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: İn vivo çalışmalara ilişkin deney grupları ……40

Tablo 3.2: Deneylerde kullanılan kimyasalların adı ve kullanım amaçları ……41

Tablo 3.3: Deneylerde kitler ve kullanım amaçları ……42

Tablo 3.4: Deneylerde kullanılan tampon, solüsyon ve çözeltiler ……42

Tablo 3.5: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları ……..43

Tablo 3.6: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri ……48

Tablo 3.7: RT-PCR termal döngü değerleri ……...48

Tablo 3.8: cDNA kontrol PCR'ı reaksiyon bileşenleri ve hacimleri ……..49

Tablo 3.9: cDNA kontrol PCR'ı döngü koşulları ……..49

Tablo 3.10: qRT-PCR sentez reaksiyon bileşenleri ve hacimleri ……...50

Tablo 3.11: qRT-PCR döngü koşulları ……...50

Tablo 3.12: miRNA primer listesi ……...51

Tablo 4.1. Status epileptikus grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri ……..53

Tablo 4.2. Midazolam grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri ……55

Tablo 4.3. Midazolam ve valproik asit etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri……..56

Tablo 4.4. Midazolam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri……..57

Tablo 4.5. Midazolam ve fosfenitoin etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri ……58

Tablo 4.6. Klonazepam grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri ……..59

Tablo 4.7. Klonazepam ve valproik asit etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri ……...60

Tablo 4.8. Klonazepam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri …….....61

Tablo 4.9. Klonazepam ve fosfonitoin etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri …….....61

Tablo 4.10: MDZ ve MDZ etkileşim gruplarına ait fold regulation ve p değerleri ….....62

Tablo 4.11: CLZ ve CLZ etkileşim gruplarına ait fold regulation ve p değerleri ….....63

Tablo 4.12: SE modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında antiepileptik ilaç uygulaması sonrası regülasyonu değişen genler ….....64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Epilepsi tarihindeki önemli olaylara ilişkin zaman çizelgesi……....7

Şekil 2.2: ILAE 2017'ye göre nöbet tiplerinin genişletilmiş sınıflandırması……....9

Şekil 2.3: Epilepsilerin sınıflandırılması için çerçeve……10

Şekil 2.4: Tek bir nöbetin, status epileptikusa geçişinde rol oynayan mekanizmalar dizisi …….…….14

Şekil 2.5: Antiepileptik ilaçların keşfi ve incelenmesinde kullanılan hayvan modellerinin geliştirilmesine ilişkin kilometre taşları……...15

Şekil 2.6: Antiepileptik ilaçların eksitatör ve inhibitör sinapslardaki etki mekanizmaları..16

Şekil 2.7: Konvülsif status epileptikus için farklı evrelerde tedavi seçenekleri……..19

Şekil 2.8: Genetik epilepsilerde fenotipik çeşitliliğin kaynakları……21

Şekil 2.9: Epigenetik mekanizmaların gen ekspresyon sürecine etkisi ve epilepside terapötik hedeflemeye yönelik potansiyel yaklaşımlar……24

Şekil 2.10: miRNA'ların adlandırılması……..28

Şekil 2.11: miRNA biyogenezi ve epilepsi hayvan modellerinde kullanılan miRNA manipülasyonu……...……...30

Şekil 3.1: İn vivo deneysel çalışma aşamasına ilişkin video-EEG kaydı……...39

Şekil 3.2: Plazmadan miRNA izolasyon prosedürü…….44

Şekil 3.3: Doku miRNA izolasyon prosedürü…….46

Şekil 4.1: Status epileptikus grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği.53

Şekil 4.2: Midazolam grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği ……..54

Şekil 4.3: Midazolam ve valproik asit etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği …….55

Şekil 4.4: Midazolam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği ……...……...56

Şekil 4.5: Midazolam ve fosfenitoin etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği ……...……..57

Şekil 4.6: Klonazepam grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ……....58

Şekil 4.7: Klonazepam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği …….59

Şekil 4.8: Klonazepam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri …….60

Şekil 4.9: Klonazepam ve fosfenitoin etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği ……....61

Şekil 4.10: A) miR22 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR22 RT PCR melting piki ….65

Şekil 4.11: A) miR34 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR34 RT PCR melting piki ….65

Şekil 4.12: A) miR124 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR124 RT PCR melting piki..66

Şekil 4.13: A) miR128 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR128 RT PCR melting eğrisi ……..66

Şekil 4.14: A) miR134 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR134 RT PCR melting piki..67

Şekil 4.15: A) miR139 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR139 RT PCR melting piki..67

Şekil 4.16: A) miR184 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR184 RT PCR melting eğrisi ……..68

Şekil 4.17: A) miR199 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR199 RT PCR melting eğrisi ……..68

Şekil 4.18: A) miR203 RT PCR Amplifikasyon eğrisi B) miR203 RT PCR melting eğrisi ……..69

Şekil 4.19: A) miR324 RT PCR Amplifikasyon eğrisi B) miR324 RT PCR melting piki ……...69

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAV : Adeno-ilişkili virüsler
ABD : Amerika Birleşik Devletleri
AGO : Argonaute
Ago2 : Argonaute 2
AMPA : Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat
BOS : Beyin-omurilik sıvısı
ccRCC : Berrak hücreli renal hücreli karsinom
ChIP-seq : Kromatin immünopresipitasyon ve ardından dizileme
DGCR8 : DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8
DZP : Diazepam
EEG : Elektroensefalogram
fPHT : Fosfenitoin
GABA : Gama aminobütirik asit
GWAS : Genom çapında ilişkilendirme çalışmasını
HCI : Hidroklorür
HDAC : Histon deasetilaz
HMT : Histon metiltransferaz
HSV : Herpes simpleks virüsleri
IBE : Uluslararası Epilepsi Bürosu
ILAE : Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği
İP : İntraperitoneal
KBB : Kan-beyin bariyeri
LCM : Lakosamid
LEV : Levetirasetam
LNA : Kilitli nükleik asit
LZP : Lorazepam
MBr : Metil bromür
MDZ : Midazolam
miRNA : MikroRNA
miRBase : miRNA veri tabanı
M.Ö. : Milattan önce
MRI : Manyetik rezonans görüntüleme

MSS : Merkezi sinir sistemi
mTOR : Rapamisinin memeli hedefi
NMDA : N-metil-D-aspartat
NRSF : Nöron kısıtlayıcı susturma faktörü
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
PRC2 : Policomb baskılayıcı kompleks 2
Pol II : Polimeraz II
PB : Fenobarbital
PPF : Propofol
PTB : Pentobarbital
PHT : Fenitoin
RAN : Ras ile ilişkili nükleer protein
RISC : RNA kaynaklı susturma kompleksi
rRNA : Ribozomal RNA
SBÜ : Sağlık Bilimleri Üniversitesi
SC : Subkutan
SMA : Spinal musküler atrofi
SMN1 : Survival motor nöron-1
snoRNA : Küçük nükleolar RNA
SV2A : Sinaptik vezikül proteini 2A
TLE : Temporal lob epilepsisinde
THP : Tiyopental
TRBP : Transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein
tRNA : Transfer RNA
VPA : Valproat
WES : Tüm ekzom dizileme
WGS : Tüm genom dizileme

DENEYSEL STATUS EPİLEPTİKUS MODELİNDE MİDAZOLAM VE KLONAZEPAM UYGULANMASI SONRASI BİYOMARKIR OLARAK ÖNE ÇIKAN MUHTEMEL miRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: MikroRNA'lar (miRNAs) posttranskripsiyonel seviyede negatif gen düzenleyiciler olarak rol oynayan kısa RNA dizileridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ekspresyonu değişen miRNA'ların epileptik nöbetlerin oluşumu ve nöbet kaynaklı nöronal ölümde önemli bir etken olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada deneysel status epileptikus (SE) modelinde politerapi şeklinde kullanılan antiepileptik ilaçların, epilepsi ile ilişkilendirilen 10 miRNA (hsa-miR-22-5p,rno-miR-34a-3p,hsa-miR-124-5p,rno-miR-128-2-5p,rno-miR-134-3p,mmu-miR-139-5p,hsa-miR-184,hsa-miR-199a-5p,rnomiR-203a-5p,rno-miR-324-3p)'nın ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkilerinin ve biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sprague-Dawley sıçanlarda lityum-pilokarpin ile SE modeli oluşturulan gruplara midazolam (MDZ) ve klonazepam (CLZ)'ın ikinci basamak tedavide kullanılan levetirasetam (LEV), lakosamid (LCM), valproik asit (VPA) veya fosfenitoin (fPHT) ile kombinasyonları uygulandı. Tek ve çoklu ilaç uygulaması yapılan, her birinde 7 örnek olan toplam 10 gruptaki 70 örnek ile çalışma tamamlandı. Moleküler genetik deneyler PCR Array yöntemi ile yapıldı.

Bulgular: miRNA ekspresyon seviyeleri 3 tekrar ile belirlendi. rno-miR-324-3p'nin MDZ grubunda downregüle (p=0,0473); rno-miR-34a-3p'nin CLZ+VPA ve CLZ+fPHT gruplarında upregüle olduğu (p=0,0074, p=0,0228) bulundu. hsa-miR-124-5p'nin, sırasıyla MDZ+fPHT, CLZ+VPA, CLZ+LCM ve CLZ+fPHT gruplarında upregüle olduğu (p=0,0495, p=0,0215, p=0,0160, p=0,0041) bulundu. rno-miR-128-2-5p CLZ+fPHT grubunda upregüleyken (p=0,0013), rno-miR-134-3p'nin CLZ+VPA grubunda upregüle olduğu (p=0,0215) bulundu. mmu-miR-139-5p'nin MLZ+fPHT ve CLZ+fPHT gruplarında upregüle (p=0,0181, p=0,0174); hsa-miR-199a-5p'nin MDZ+fPHT grubunda (p=0,0470), rno-miR-324-3p'nin CLZ+LCM grubunda (p=0,0459) upregüle oldukları bulundu.

Sonuç: Ekspresyon değişikliği tespit edilen miRNA'ların SE'ta midazolam ve klonazepam uygulanması ile biyobelirteç olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

MDZ+fPHT, CLZ+VPA, CLZ+LCM ve CLZ+fPHT gruplarında upregüle olduğu tespit edilen miR-124-5p tedaviye yanıtın en iyi göstergesi olarak öne çıkmaktadır. Deregülasyonu ortaya konan genlerin biyobelirteç olarak kullanımı ile bu genlerin çoklu ilaç tedavileri ile SE hastalarında kişiye özgü tedavilerin düzenlenebilmesi mümkün olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Antiepileptik, Benzodiazepin, Biyomarkır, miRNA, Status epileptikus

INVESTIGATION OF POSSIBLE miRNAs FEATURED AS BIOMARKERS AFTER MIDAZOLAM AND CLONAZEPAM APPLICATION IN EXPERIMENTAL STATUS EPILEPTICUS MODEL

ABSTRACT

Aim: MicroRNAs (miRNAs) are short RNA sequences that act as negative gene regulators at the post-transcriptional level. In recent studies, it has been reported that altered miRNAs are an important factor in the formation of epileptic seizures and in seizure-induced neuronal death. In this study, it was aimed to determine the effects of antiepileptic drugs used as polytherapy in the experimental status epilepticus (SE) model on the expression levels of 10 miRNAs (hsa-miR-22-5p,rno-miR-34a-3p,hsa-miR-124-5p,rno-miR-128-2-5p,rno-miR-134-3p,mmu-miR-139-5p,hsa-miR-184,hsa-miR-199a-5p,rnomiR-203a-5p,rno-miR-324-3p) associated with epilepsy and their potential to be used as a biomarker.

Materials and Methods: Combinations of midazolam (MDZ) and clonazepam (CLZ) with levetiracetam (LEV), lacosamide (LCM), valproic acid (VPA) or fosphenytoin (fPHT) used in second-line therapy in Sprague-Dawley rats in the groups in which the SE model was created with lithium-pilocarpine. The study was completed with 70 samples in 10 groups, 7 samples in each, with single and multiple drug administration. Molecular genetic experiments were performed by PCR Array method.

Results: miRNA expression levels were determined with 3 replicates. Downregulated in group MDZ of rno-miR-324-3p (p=0.0473); rno-miR-34a-3p was found to be upregulated in the CLZ+VPA and CLZ+fPHT groups (p=0.0074, p=0.0228). hsa-miR-124-5p was found to be upregulated in MDZ+fPHT, CLZ+VPA, CLZ+LCM and CLZ+f PHT groups, respectively (p=0.0495, p=0.0215, p=0.0160, p=0.0041). While rno-miR-128-2-5p was upregulated in the CLZ+fPHT group (p=0.0013), rno-miR-134-3p was found to be upregulated in the CLZ+VPA group (p=0.0215). Upregulated in MLZ+fPHT and CLZ+fPHT groups of mmu-miR-139-5p (p=0.0181, 0.0174); it was found that hsa-miR-199a-5p was upregulated in the MLZ+fPHT group (p=0.0470), and rno-miR-324-3p in the CLZ+LCM group (p=0.0459).

Conclusion: It has been demonstrated that miRNAs with expression changes can be used as biomarkers in SE with the administration of midazolam and clonazepam. hsa-miR-124-5p, which was found to be upregulated in MDZ+fPHT CLZ+VPA, CLZ+LCM and CLZ+fPHT groups, stands out as the best indicator of response to treatment. With the use of deregulated genes as biomarkers, it will be possible to organize personalized treatments in SE patients with multi-drug treatments of these genes.

Key Words: Antiepileptic, Benzodiazepine, Biomarker, miRNA, Status epilepticus

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, popülasyonun yaklaşık %1'ini etkileyen nörolojik bir hastalıktır. Bu nedenle tüm dünyada 70 milyondan fazla insanı etkileyen en yaygın ve ciddi beyin hastalıklarından birisidir (1). Günümüzde epilepsi tedavisinde kullanılan 20'den fazla antiepileptik ilaç olmasına rağmen epileptik nöbetlerin yaklaşık %30'luk bölümü mevcut ilaçlarla kontrol altına alınamamaktadır. Epileptik nöbetler ile ilgili en ağır tablo status epileptikus tablosudur. Konvulziv status epileptikus, beş dakika veya daha uzun süre klinik ve/veya elektrografik nöbet aktivitesinin devam etmesi veya iki nöbet arasında bilincin açılmaması olarak tanımlanmıştır (2). Status epileptikusun tıbbi yönetimi; hava yolu, solunum ve dolaşımın değerlendirilmesi, periferik intravenöz erişimin sağlanması ve epileptik aktiviteyi durdurmak için hızlı bir tedavi gerektiren, kapsamlı ve acil nörolojik yaşam desteğinin bir parçasıdır (3).

Ortalama 10-30/100.000 düzeyinde bir insidansa sahip olan status epileptikus, yoğun bakım ünitelerine yapılan başvuruların en az %1'lik bölümünü oluşturmaktadır (4). Status epileptikus yaşa, tıbbi komorbiditeye, nonkonvulsif status epileptikusun varlığına ve nöbetlerin nedenine bağlı olarak %8-65 düzeyinde bir mortalite göstermektedir (2). Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE)'nin 2015 yılı sınıflandırmasına göre konvulsif status epileptikus, 5 dakikadan daha uzun süren, bilateral tonik-klonik nöbet aktivitesiyle karakterize yaşamı tehdit eden nörolojik bir acil durum olarak tanımlanmıştır (5). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl acil servislere ortalama bir milyon nöbetle ilgili başvuru yapılmaktadır. Bu durum nörolojik sorunlara yönelik acil servis ziyaretlerinin yaklaşık %20'sini ve tüm acil servis başvurularının %1'ini oluşturmaktadır (6,7). Nöbetle ilgili gerçekleşen yıllık ortalama 1.000.000 başvurunun 200.000'i status epileptikusun tanımlayıcı özelliği olan 5 dakikadan daha uzun süren veya hızla tekrarlayan nöbet vakalarına ilişkindir (8). Uzun süreli nöbetler daha yüksek mortalite ve daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (9). Bu kapsamda ABD'de sinir sitemini etkileyen zehirlenmelere bağlı olarak gelişen status epileptikustan yılda 22.000-42.000 aralığında değişebilen oranlarda insanın öldüğü ve status epileptikusun henüz çözülmemiş bir terapötik zorluk olmaya devam ettiği bildirilmiştir (10,11).

Status epileptikusun tedavisine yönelik farmakolojik yaklaşımlar, gama aminobütirik asit (GABA) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin rollerinin daha iyi anlaşılmasıyla mümkün olabilecektir. Status epileptikusun patofizyolojisi bu nörotransmitter reseptörlerinin yeri ve alt birim kompozisyonundaki değişiklikleri kapsamaktadır. Bu değişiklikler spontan olarak devam eden nöbetleri desteklemekte ve status epileptikus devam ettikçe, status epileptikusun erken evrelerini tedavi etmek için kullanılan ilaçların etkinliğinin azalmasıyla sonuçlanmaktadır (12). GABA'nın veziküler salınımına yanıt olarak fazik inhibitör akımlar üreten $GABA_A$ reseptörleri, benzodiazepinler ve diğer bazı antiepileptik ilaçların hedefidir (13,14). Diğer taraftan glutamat reseptörleri (özellikle NMDA) status epileptikus sırasında sinaptik zarda birikerek eksitasyonu artırmaktadır (15,16). Hem GABA hem de glutamat reseptörlerinin alt birim kompozisyonu bu reseptörlerin sinapstaki lokalizasyonlarını ve bağlanma özelliklerini düzenlemektedir (17). Gelişmekte olan bir beyinin tekrarlayan nöbetlere maruziyeti $GABA_A$, NMDA ve alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat (AMPA) reseptörlerinin bileşiminde değişime ve bu sayede uyarılabilirlikte artışa yol açmakta ve spontan olarak tekrarlayan nöbetleri teşvik etmektedir (18,19,20).

MikroRNA (miRNA)'lar posttranskripsiyonel seviyede negatif gen düzenleyiciler olarak rol oynayan, yaklaşık olarak 18-25 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, endojen, protein kodlaması yapmayan kısa RNA dizileridir (21). RNA polimeraz II enzimi tarafından pri-miRNA'lar (1 kb uzunluğunda) adı verilen daha uzun moleküller şeklinde transkribe edilirler. Drosha ve Dicer adı verilen RNAaz'lar tarafından olgun-miRNA'lara dönüşürler ve aktif RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC)'ne entegre olduktan sonra argonaute 2 (Ago2) yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar. miRNA'lar hücresel differansiyasyon, proliferasyon, apoptozis, eritropoez, fibrozis, angiogenez, immunite gibi birçok hücresel ve biyolojik olaylarda rol oynamaktadır. Genomda yer alan tüm genlerin yaklaşık %60'ının bu düzenleyiciler tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (22).

Son yıllardaki epilepsi çalışmalarında, ekspresyonu değişen miRNA'ların önemli gen düzenleyicileri oldukları ifade edilmiştir (23). Epileptogenezi önlemeye yönelik olarak, epilepsi gelişiminde etkili olan proteinlere ilişkin genleri hedefleyen

preklinik denemelerin başarısızlıkla sonuçlanması, miRNA'ların ön plana çıkmasında etkili olmuştur (24). Nöronal ölüm, gliozis, inflamasyon ve nöronal ağların yeniden düzenlenmesi gibi epiloptogenezde anahtar rol oynayan süreçlerin miRNA'ların kontrolü altında olması, beyinde miRNA'ların gen ekspresyonunun meta-denetleyicileri olmasını sağlamaktadır (25). Ekspresyonu değişen miRNA'ların epileptik nöbetlerin oluşumu ve nöbet kaynaklı nöronal ölümde önemli bir etken olduğu tespit edilmiştir (26). Bu nedenle araştırmacılar epilepside rol oynayan miRNA'ların fonksiyonunu anlamak için *İn vivo* koşullarda miRNA'ları manipüle ederek biyomarkır olma potansiyelini belirlemeye çalışmaktadırlar. Temporal lop epilepsi hastalarından rezeke edilen hipokampus miRNA profil tarama çalışmalarında ekspresyon seviyesi değişen yaklaşık 100 miRNA tespit edilmiştir (27,28).

Sunulan doktora tezinde, Sprague-Dawley sıçanlarda lityum-pilokarpin ile oluşturulan status epileptikus modelinde, status epileptikusun klinik pratiğinde birinci basamak tedavi aşamasında kullanılan benzodiazepinler olan midazolam (MDZ) ve klonazepam (CLZ)'ın ikinci basamak tedavide kullanılan levetirasetam (LEV), lakosamid (LCM), valproik asit (VPA) veya fosfenitoin (fPHT) ile etkileşimlerinin, literatürde epilepsi ilişkili olabileceği bildirilen 10 adet miRNA (hsa-miR-22-5p,rno-miR-34a-3p,hsa-miR-124-5p,rno-miR-128-2-5p,rno-miR-134-3p,mmu-miR-139-5p,hsa-miR-184,hsa-miR-199a-5p,rnomiR-203a-5p,rno-miR-324-3p)'nin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilgili miRNA'ların status epileptikus durumunda ve status epileptikusun birinci (MDZ, CLZ) ve ikinci basamak antiepileptik (LEV, LCM, VPA ve fPHT) ilaçlar ile politerapik tedavisinde biyomarkır olarak kullanılabilme potansiyellerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca biyomarkır olarak öne çıkan miRNA'ların, status epileptikusun tedavisine ilişkin terapötik potansiyellerinin belirlenmesine yönelik yeni bilgilerin elde edilmesi ve miRNA'ları hedefleyen yeni çalışmalara zemin hazırlanması beklenmektedir. Literatürde sunulan deney dizaynında ilgili miRNA'ların incelenmesine yönelik herhangi bir deneysel çalışmanın bulunmaması, bu doktora tezinin özgün değerini ortaya koymaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EPİLEPSİ

2.1.1. Epilepsinin Tanımı

Dünya çapında 70 milyondan fazla insanı etkileyen epilepsi, spontan epileptik nöbetler oluşturmaya yönelik kalıcı bir yatkınlık ile karakterize, yaygın nörolojik bir hastalıktır (1). Epilepsinin en güncel tanımı 2014 yılında ILAE' tarafından yapılmıştır. ILAE'ya göre epilepsi 3 koşuldan en az birisi ile tanımlanmaktadır: 1) 24 saatten fazla arayla meydana gelen en az iki provoke edilmemiş nöbet (veya refleks); 2) provoke edilmemiş bir nöbet (veya refleks) ve sonraki on yıl içinde meydana gelen iki provoke edilmemiş nöbetten sonra genel tekrarlama riskine sahip başka nöbet olasılığı (en az %60); 3) epilepsi sendromu tanısı. Epilepsi çok sayıda nörobiyolojik, bilişsel ve psikososyal sonuçlara sahiptir (29).

Hipokrat'ın epilepsiyi diğer hastalıklar gibi fizyolojik ilkelere dayandırmasına rağmen, oldukça güçlü olan toplumsal kabuller nedeni ile epilepsi için 16. yüzyıla kadar bilimsel ve tıbbi yeni bir tanımlama yapılamamıştır. Bohemyalı Dr. Marcus Marci (1595-1667) klinik gözlemlere dayanarak epilepsiyi, kişinin zihninde bozukluğa neden olan ve vücut kısımlarının tamamı, bir kısmı ya da sadece bir tanesinde kendi istekleri dışında harekete yol açan bir hastalık olarak tanımlamıştır (30,31). İskoçyalı Dr. Willam Cullen (1710-1790), aydınlanma döneminde epilepsinin tanımını yine klinik gözlemlere dayanarak daha da geliştirmiş ve epilepsiyi *"istemli harekete ilişkin kaslarının büyük bir bölümünün konvülsiyonlarından oluşan, duyu kaybıyla birlikte görülen ve bir duyarsızlık ve uyku hali ile biten"* ve aynı zamanda *"daha kısmi ..... kasılmalarını da içerebilen: yani, vücudun yalnızca belirli kısımlarını etkileyen ve bu kasılmalara duyu kaybının eşlik etmediği veya epilepsinin her zaman olduğu gibi bir koma ile sonlanmadığı"* durum olarak tanımlamıştır (32). İngiliz nörolog John Hughlings Jackson (1835-1911) tarafından yapılan çalışmalar, epilepsinin bir nöbetin patofizyolojik nedenleri ile tanımlanmasını sağlamıştır (31).

Elektroensefalogram (EEG)'ın kullanılması ile birlikte epilepsi, belirli bir nöbet tipinden veya çok sayıda farklı nöbet tipinden oluşan bir hastalık olarak tanımlanmaya

başlandı. Fransız nörolog ve epileptolog Henri Gastaut (1915-1995), başlıca insan EEG modellerini tanımladı ve spesifik epilepsi sendromlarının tanımlanmasına odaklanmıştır. Çalışmaları, fotoparoksismal epilepsi, irkilme epilepsisi, hemikonvülsif-hemiplejik epilepsi, epilepsili çocukların şiddetli ensefalopatisi (Lennox-Gastaut sendromu) ve çocukluk çağının iyi huylu oksipital epilepsisi dahil olmak üzere birçok önemli sendromun tanımlanmasını sağlamıştır (31,33,34).

Epilepsiye ilişkin yeni keşifler, epilepsinin bir *"hastalık"* ve nöbetlerin ise *"semptom"* olarak kabul edilmesini, dolayısıyla nöbet ve epilepsi arasındaki ayrım ve sınırların daha da netleştirilmesini sağlamıştır. Bu ayrım ayrıca Gastaut'un hem nöbetleri hem de epilepsileri sınıflandırmasıyla daha da netleşmiştir (35). *Epileptik sendrom* kavramı 1981 yılında yayımlanan sınıflandırmada, tipik olarak birlikte ortaya çıkan, klinik veya yardımcı çalışmalarla saptanabilen, bir dizi belirti ve semptomla karakterize epileptik bir bozukluk olarak tanımlanmıştır (36). 2001 yılında "ILAE Sınıflandırma ve Terminoloji Görev Gücü" tarafından tanıtılan "İktal Semiyoloji için Tanımlayıcı Terminoloji Sözlüğü""nde *"epilepsi"* terimi için *"tekrarlayan epileptik nöbetlerle karakterize kronik nörolojik bir bozukluk"* tanımı yapılmıştır (37). 2005 yılında ILAE ve Uluslararası Epilepsi Bürosu (IBE) epilepsiyi, *"epileptik nöbetler oluşturmaya yönelik kalıcı bir yatkınlık ve bu durumun nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçları ile karakterize olan bir beyin bozukluğu"* olarak tanımlanma noktasında fikir birliğine varmıştır. Bu tanım, en az bir epileptik nöbet oluşumunu ve nöbetin *"provokasyonsuz"* olmasını gerektirmemektedir (38). 2014 yılında önerilen en güncel tanım, *"bozukluk"* terimini *"hastalık"* ile değiştirmenin yanı sıra, provoke edilmiş ve provoke edilmemiş nöbetlerin kesin olmayan sınırlarını da kabul ederek, tedaviyi yapan hekime belirli bir durumda tekrarlama riskini belirleme konusunda herhangi bir yük getirmemiştir (29).

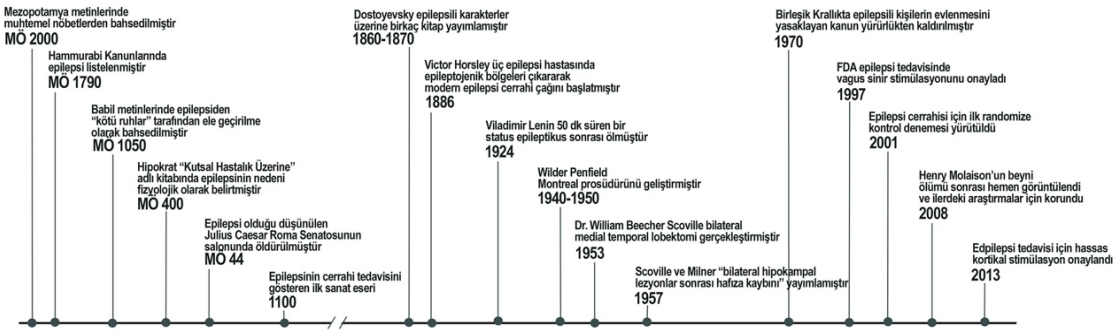
2.1.2. Epilepsinin Tarihçesi

Epilepsi *"yakalanmak"* anlamına gelen Yunanca *"epilambanein"* kelimesinden türetilmiştir. Bu terim hem hastalığı hem de tek bir saldırıyı ifade etmek için kullanılmıştır (30). Geçmiş dönemlerde bazı toplumlarca pilepsili kişiler kirli veya kötü olarak kabul edilmekle kalmayıp damgalanmaya maruz kalmıştır (31). Tarihsel yazıtlarda epilepsi hastalarına karşı bakışın ve bu hastalara ilişkin ilk tasvirlerin oldukça tatsız olduğu dikkate alındığında, insanlığın epilepsiye ilişkin görüşü zaman içerisinde

önemli ölçüde gelişmiştir (39). Bu duruma ilişkin ilk bilgilerden biri, Milattan Önce (M.Ö.) 2000 yılında Akadca yazılmış bir Mezopotamya metninden gelmektedir. Metnin yazarı muhtemelen epileptik nöbet geçiren bir hastayı tanımlarken; *"hastanın gözlerinin sonuna kadar açık, el ve ayaklarının gergin ve bilincinin kapalı olduğunu"* belirttikten sonra yazar, bu durumu basit bir nedene bağlayarak *"günahın eli"* olarak tanımlamıştır (40). Epilepsinin etiyolojisinin günah veya kötülükle eşanlamlı olduğuna ilişkin tarihsel algı**,** uzun süre devam etmiştir. M.Ö. 1790 tarihli Hammurabi Kanunlarında satın alınan ve daha sonra epileptik nöbet geçirdiği tespit edilen köleler için bir *"iade maddesinin"* olduğu, yine M.Ö. 1090'lara ait bir Babil metninde *"kötü ruhlar"* tarafından ele geçirildiği söylenen epilepsi hastaları için manevi bir çözümün ana hatlarını çizdiği görülmektedir (40,41). Epilepsinin etiyolojisinin ilahi bir nedenden dolayı değil, fizyolojik olduğuna dair şu andaki modern tıbbi görüşün kökeni büyük ölçüde batı tıbbının babası olarak kabul edilen Koslu Hipokrat'ın M.Ö. 400 yılında yazdığı *"Kutsal Hastalık Üzerine"* adlı esere dayanmaktadır. Hipokrat, epilepsinin nedenini, o dönemde yaygın olarak kabul edilen ruhani olduğu yönündeki inanca karşı çıkarak diğer hastalıklar gibi fizyolojik ilkelere dayandırmıştır (39,40). Bununla birlikte epilepsinin nedeninin ruhani olduğuna ilişkin güçlü inanış, Avrupa'daki tıp camiasının kutsal müdahalenin epilepsiyle herhangi bir ilgisinin olmadığına yönelik fikir birliği geliştirdiği 18. yüzyılın aydınlanma dönemine kadar 2000 yıl daha devam etmiştir (42,43).

Epilepsi, bazı tarihi şahsiyetlerin hayatlarını da etkilemiştir. Tarihsel sürece bakıldığında epilepsi ile anılan belki de en ünlü siyasi lider Gaius Julius Caesar (Jül Sezar)'dır. Sezar, M.Ö. 15 Mart 44'te Gaius Cassius Longinus ve Marcus Junius Brutus tarafından planlanan ve Roma Senatosu'nda bir grup soylu tarafından desteklenen suikast sonucu öldürülmüştür. Sezarın ilerleyen yaşlarda açıklanamayan yere düşmelerden giderek daha fazla muzdarip olması, geç başlangıçlı bir epilepsiye sahip olduğunu düşündüren yorumlara neden olmuştur. Mevcut bilgilere göre, bu epileptik durumun olası nedenleri arasında iyi huylu bir tümör, serebral tüberküloz, sıtma veya nörosistiserkoz yer almaktadır. Genellikle depresyonun da epilepsi ile ilişkili olması nedeni ile Sezar'ın karar verme yeteneğinin suikasttan önce bozulmuş olabileceği ifade edilmiştir (Şekil 2.1; 39,44,45).

Epilepsinin damgalanmaya yol açan ve olumsuz algı oluşturan bir hastalık olarak değerlendirildiği geçmiş dönemlerde, özellikle kamu görevlilerinin hastalığını saklanmasına neden oluyordu (39). 1640 yılında, dönemin Danimarka- Norveç Kralının oğlu Han Ulrik Gyldenlove, İspanya'ya yapılan resmi bir devlet ziyareti sırasında nöbet geçirdiği için babası tarafından, utanç duyulduğu için erkenden eve geri göndermiştir (46). İsveç Prensi Erik ve Birleşik Krallık Prensi John, 1900'lü yılların başlarında epileptik nöbetleri nedeniyle kamuoyundan uzaklaştırılmış ve hayatlarının büyük bir bölümünü özel konutlarda geçirmişlerdir (47). Epilepsinin siyasi liderlerin karar verme yetisini doğrudan etkilediği durumlarda yol açtığı sonuçlar, tüm toplumu da etkileyecek tarzda çok daha büyük ve yıkıcı olmaktaydı. I. Napolyon olarak da bilinen ve 1804-1814 yılları arasında Fransa İmparatorluğu yapan Napoléon Bonaparte (Napolyon Bonapart)'ın bir gonore enfeksiyonu nedeniyle ileri düzeyde epileptik nöbetler geçirdiği tahmin edilmektedir (48). Epilepsi hastası olan Sovyetler Birliği'nin ilk Başbakanı Vladimir Lenin'in 1924'te 50 dakika süren bir status epileptikus sonrasında ölmesi Sovyetler Birliği'ni siyasi bir kaosa sürüklemiştir (Şekil 2.1; 49).



Şekil 2.1: Epilepsi tarihindeki önemli olaylara ilişkin zaman çizelgesi *(Ali vd., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır (39))*

2.1.3. Epilepsi ve Nöbetlerin Sınıflandırılması

20. yüzyılın başlarında henüz ILAE kurulmadan önce, epilepsi ve nöbetleri sınıflandırmak için tek tip bir sistem bulunmamaktaydı. 19. yüzyılın başlarında, Paris hastanelerinde çok veya daha az şiddetli atakları ayırt etmek için *"grand mal"* ve *"petit mal"* terimleri kullanılmış ve sonunda bu terimler standart hale gelmiştir (50). Bununla birlikte bu terimler belirsizdi ve hangi nöbetlerin *"grand mal"* veya *"petit mal"* olarak

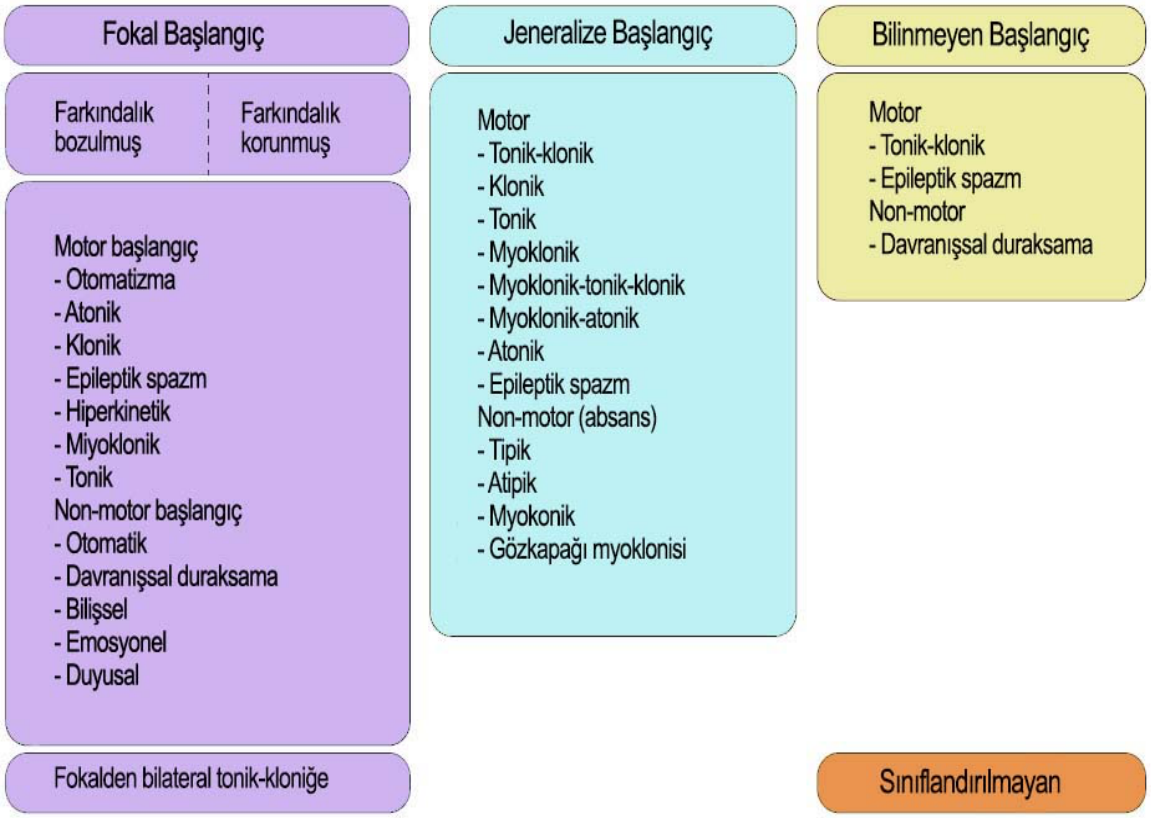
değerlendirilmesi gerektiğine ilişkin herhangi bir kılavuz bulunmamaktaydı. Epilepsinin klinik araştırmaları genişledikçe ve yeni tedaviler ortaya çıkmaya başladıkça, tek tip terminoloji ve sınıflandırmanın bir zorunluluk olduğu anlaşılmıştır (51).

Nöbetlere ilişkin ilk sınıflandırma kılavuzu ILAE tarafından 1969 yılında oluşturulmuş ve nöbetler *"parsiyel"* ve *"jeneralize"* şeklinde iki ana gruba, parsiyel nöbetler de daha sonra *"basit parsiyel"* ve *"kompleks parsiyel"* şeklinde iki alt gruba ayrılmıştır. 1981 ve 2001 yıllarındaki revizyonlarda, bu olayların sadece bir nöbetin *"parçası"* olarak kabul edilmesinin yanlış anlaşılabileceğinden dolayı *"parsiyel"* yerine *"fokal"* terimi tartışılmıştır (52). Terimler, *"bilinç bozukluğu olmayan"*, *"bilişsel özellikleri olmayan"* ve *"bilateral hale gelen"* şeklindeki alt kategorilerin, *"basit parsiyel"* ve *"kompleks parsiyel"* şeklindeki alt kategorilere dönüşümünü kapsayan *"parsiyel nöbetler"* şeklindeki adlandırmanın *"fokal nöbetler"* şeklinde yeniden adlandırıldığı 2010 yılındaki kurumsal revizyona kadar birbiri yerine kullanılmıştır (53). Farklı epilepsi tipleri için ilk kılavuz 1985'te ILAE tarafından oluşturulmuştur. Bu sınıflandırmada *"lokalizasyonla ilişkili"* (fokal veya parsiyel ile benzer) ve *"jeneralize"* epilepsiler şeklindeki iki ana grup altında *"idiyopatik"*, *"semptomatik"* veya *"kriptojenik"* etiyolojisine göre alt sınıflandırmalar yapılmıştır (36). Bu terimler, etiyoloji veya epileptik sendromlara dayalı bireysel tanı lehine 2010 yılında yapılan revizyona kadar kullanılmıştır (51,53).

Nöbet geçiren bir hastaya tanı konma sürecinde birkaç kritik adım üzerinden ilerlenmektedir. Bir nöbeti sınıflandırmaya çalışmadan önce, paroksismal olayın gerçekten bir epileptik nöbet olup-olmadığı ve ayırıcı tanının mümkün olup-olmadığının belirlenmesi gerekir. Bunlara konvülsif senkop, parasomniler, hareket bozuklukları ve diğer epileptik olmayan olaylar dahildir. Bu konuya ilişkin olarak, ILEA'nın epilepsilerin en yeni çevrimiçi tanı kılavuzunu içeren web sitesinin https://www.epilepsydiagnosis.org/epilepsy-imitators.html adresinden epilepsiyi taklit eden durumlara ulaşılabilmektedir (54).

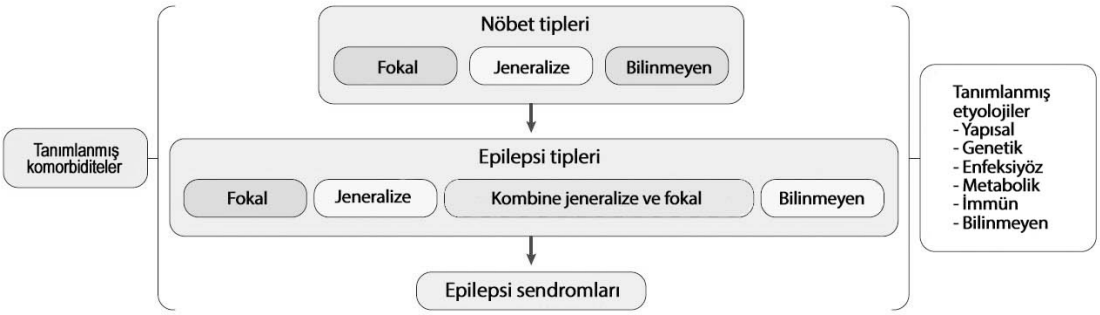
"Nöbet tipinin" teşhisi, epilepsi sınıflandırma çerçevesinin başlangıç noktasını oluşturmaktadır. Burada klinisyenin epileptik nöbet için kesin bir tanı koyduğu varsayıldığı için epileptik durumu epileptik olmayan olaylardan ayırt etmek için bir tanı algoritması öngörülmemiştir (54). *"Nöbet tipi sınıflandırmasında"* nöbetler, fokal

başlangıç, jeneralize başlangıç ve belirlenemeyen şeklinde 3 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.2; Şekil 2.3; 55).



Şekil 2.2: ILAE 2017'ye göre nöbet tiplerinin genişletilmiş sınıflandırması *(Fisher vd., 2017'den değiştirilerek alınmıştır (55))*

Epilepsilerin sınıflandırılmasına ilişkin olarak en son sınıflandırma yine ILEA tarafından 2017 yılında yapılmıştır. Bu yeni *"epilepsi sınıflandırması"*, epilepsiyi farklı klinik ortamlarda sınıflandırmak için tasarlanmış çok seviyeli bir sınıflandırma sistemidir. Bu yeni sistemde mümkünse, bireyin epilepsisinin etiyolojisi ile birlikte her 3 düzeyde de bir tanı aranması gerekmektedir. Bahsedilen bu çok seviyeli sınıflandırma sistemini oluşturan 3 ayrı düzey: *nöbet tipi, epilepsi tipi* ve *epilepsi sendromudur* (Şekil 2.3; 54).



Şekil 2.3: Epilepsilerin sınıflandırılması için çerçeve *(Scheffer vd., 2017'den değiştirilerek alınmıştır (54))*

"Epilepsi tipinin" teşhisi epilepsi sınıflandırmasının ikinci düzeyini oluşturmaktadır. 2014 tanımına göre hastanın epilepsi tanısı aldığı varsayılmaktadır (29). *"Epilepsi tipi"* düzeyi, iyi bilinen *"jeneralize epilepsi"* ve *"fokal epilepsiye"* ilave olarak yeni bir *"kombine fokal ve jeneralize epilepsi"* kategorisini de içermektedir. Ayrıca *"bilinmeyen"* şeklinde bir kategori bulunmaktadır. Birçok epilepsi, birden fazla nöbet tipini kapsayabilmektedir (54). *Jeneralize epilepsi* teşhisi için, hasta EEG'de tipik olarak yavaş jeneralize spike-dalga aktivitesi gösterecektir. Jeneralize epilepsili bireyler, absans, miyoklonik, atonik, tonik ve tonik-klonik nöbetler dahil olmak üzere bir dizi nöbet tipine sahip olabilir. Jeneralize epilepsi tanısı, tipik interiktal EEG deşarj bulgusu ile desteklenen klinik gerekçelerle konulmaktadır (54). *Fokal epilepsiler*, tek odaklı ve çok odaklı bozuklukların yanı sıra bir hemisferi kapsayan nöbetler ile ilgilidir. Bilincin korunduğu fokal nöbetler, bilincin bozulduğu fokal nöbetler, fokal motor nöbetler ve fokal non-motor nöbetler gibi bir dizi nöbet tipi görülebilmektedir (54). *"Bilinmeyen"* terimi, hastanın epilepsi olduğunun anlaşıldığı, ancak yeterli bilgi olmadığı için klinisyenin epilepsi tipinin fokal mi yoksa jeneralize mi olduğunu belirleyemediği durumları belirtmek için kullanılır. Bu durum EEG'ye erişimin olmaması gibi çeşitli nedenlere bağlı olabilir (Şekil 2.3; 54).

"Epilepsi sendromunun" teşhisi epilepsi sınıflandırmasının üçüncü düzeyini oluşturmaktadır. Genellikle başlangıç yaşı ve remisyon (varsa), nöbet tetikleyicileri, günlük değişkenlik ve bazen prognoz gibi yaşa bağlı özelliklere sahiptir (36,56). Çocukluk çağı absans epilepsisi, West sendromu ve Dravet sendromu gibi iyi bilinen birçok sendrom vardır, ancak ILAE tarafından hiçbir zaman resmi bir sendrom sınıflandırması yapılmadığına dikkat edilmelidir (Şekil 2.3; 57).

2.1.4. Epilepsinin Epidemiyolojisi

Epilepsi, nörolojik bozukluklar arasında üçüncü en yaygın hastalıktır (58). Epilepsi dışında, insanların yaklaşık %10'u hayatları boyunca en az bir nöbet geçirmektedir (59). Düşük ve orta gelirli ülkelerde epilepsinin hem prevalans hem de insidansı yüksek gelirli ülkelere göre daha yüksek bir eğilim göstermekle birlikte, dünya genelinde ortalama epilepsi prevalansının 1.000 kişide 6.4 vaka ve yıllık insidansının ise 100.000 kişide 67.8 vaka olduğu tespit edilmiştir (60). Düşük ve orta gelirli ülkelerdeki epilepsi prevalans ve insidansındaki yüksekliğin trafik kazaları, doğum yaralanmaları ve nöroenfeksiyöz bozuklukların bu ülkelerde daha sık görülmesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (61).

Epilepsiye ilişkin risk faktörleri yaş grubuna göre değişmektedir. Beyinin gelişimsel malformasyonları genellikle erişkinlik öncesi gelişen epilepsi ile ilişkili iken, kafa travması, enfeksiyonlar ve tümörlerle ilişkili epilepsi her yaşta ortaya çıkabilmektedir. Serebrovasküler hastalık yaşlılarda en sık görülen risk faktörüdür. *Plasmodium falciparum* nedenli sıtma, nörosistiserkoz ve onkoserkiazis gibi paraziter durumlar dünya genelinde epilepsi için en yaygın risk faktörleri arasında olduğu için coğrafi konumda risk faktörleri bakımından önemli görünmektedir (1,62). Yüksek gelirli ülkelerde, epilepsi hastalarının 2/3'ten fazlası genellikle antiepileptik ilaçlarının yaygın kullanımına bağlı iyi bir prognoz ile tanıdan hemen sonra uzun süreli remisyona ulaşmaktadır. Düşük gelirli ülkelerdeki birçok insanın ilaçsız uzun süreli remisyona girmesi bazı hastalardaki prognozun ilaçtan bağımsız olduğu fikrini desteklemektedir (63,64). Epilepsi hastalarının 1/3'ünde nöbetler ilaca dirençlidir. Antiepileptik ilaç sayısındaki artışın insanları nöbetlerden arındırma bakımından yalnızca küçük bir fayda sağladığı düşünülmektedir (62). İlaca dirençli epilepsili hastaların gerçek sayısının öngörülenden daha fazla olduğu tahmin edilmektedir.

2.1.5. Epilepsinin Patofizyolojisi

Epileptogenez sürecine ilişkin mekanizmalar, nöronal devrelerde işlev bozukluğuna yol açan moleküler ve yapısal değişiklikleri kapsamaktadır (58). Çoğu mekanizma spontan nöbetlerin başlamasından önce belirli bir zaman sürecince meydana gelirken, bazı mekanizmalar hastalığın ilerlemesi sırasında devam etmektedir. Nörolojik fonksiyon bozukluğu çoğunlukla spontan nöbetlerin ortaya çıkmasından önce meydana

gelmektedir ve epilepsi ile komorbidit bazı problemlerin altında bazı ortak mekanizmalar yatabilmektedir (65).

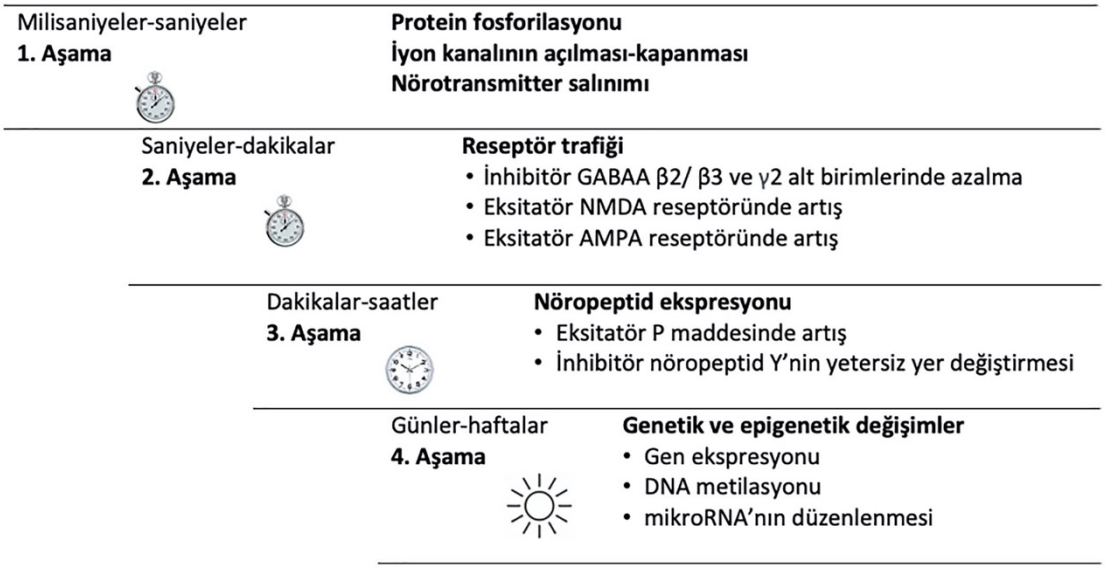
Epilepsi nedeniyle ameliyat edilen hastalar ile genetik ve travma kaynaklı epilepsi modellerinde beyin dokusundaki epileptojenik bölgede reaktif gliozis oluşmaktadır (66). Glial hücre fenotipindeki değişiklikler nedensel olarak epileptogenez ile bağlantılı bulunmuştur (67). Aktive olmuş astrositler, gap junction (geçit bağlantısı) konneksinlerinin, glutamat taşıyıcılarının, potasyum kanallarının (örn., Kir4.1) ve aquaporin-4 kanallarının (66) down regülasyonu dahil olmak üzere nöronal ağın hipereksitabilitesini artırabilmekte ve katyonun-klor birlikte taşıyıcılarının (kotransporter) nöronal ekspresyonunda değişime neden olabilmektedir (67). Astrositlerde azalmış glutamin sentetaz (glutamatı glutamine dönüştüren enzim) aktivitesi ile beyindeki glutamaterjik ve GABAerjik nöronlarda glutamat ve GABA dengesinin bozulması ve astrositlerde artan adenosin kinaz aktivitesinin (pürin ribonükleosit adenosini 5′-AMP'ye dönüştürerek adenosin seviyelerini düzenleyen enzim) sinapsların çevresindeki inhibitör adenozini azaltması spontan nöbetlere neden olabilmektedir (68). Status epileptikusun başlangıcından birkaç dakika sonra tespit edilebilen mikroglia aktivasyonu, epileptogenez sırasında meydana gelen en erken hücresel olaylardan birisidir (69). Mikroglialar nöbet kaynaklı nörodejenerasyonla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte lezyon gelişmeyen nöbet modellerinde gösterildiği gibi mikroglial aktivasyon için nöronal hücre kaybının gerekli olmadığı ifade edilmiştir (70).

2.1.6. Satus Epileptikus

ILAE status epileptikusu, nöbetin kendi kendini sınırlamasından sorumlu mekanizmaların başarısızlığından veya atipik olarak uzun süreli nöbetlere yol açan mekanizmaların başlamasından kaynaklanan bir durum olarak tanımlamıştır. Status epileptikus, nöbet tipine ve süresine bağlı olarak nöronal hasara veya ölüme neden olabilen veya nöronal ağlarının değişmesine yol açabilecek uzun vadeli sonuçlar oluşturabilen bir durumdur (71,72). Status epileptikusun tıbbi yönetimi kapsamında, hava yolu, solunum ve dolaşımın değerlendirilmesi, periferik intravenöz erişimin sağlanması ve epileptik nöbetleri durdurmak için hızlı bir antiepileptik ilaç tedavisinin başlanmasını kapsayan acil nörolojik yaşam desteği yer almaktadır (3).

Status epileptikus 10-30/100.000 düzeyinde bir insidansa sahiptir ve yoğun bakım ünitelerine yapılan başvuruların en az %1'lik bölümünü oluşturmaktadır (4). Tıbbi komorbiditeye, nonkonvulsif status epileptikusun varlığına ve nöbetlerin nedenine bağlı olarak yaklaşık %8-65 düzeyinde bir mortalite oranı sergileyebilmektedir (2). Status epileptikusa ilişkin yıllık doğrudan yatan hasta maliyetlerinin Almanya'da 83 milyon eurodan fazla, ABD'de ise 4 milyar dolarından fazla olduğu tahmin edilmektedir (73,74).

Status epileptikusun patofizyolojisinin büyük bir bölümü halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, status epileptikusun altında yatan temel mekanizmaların aydınlatılmasına önemli katkılar sunmuştur. Status epileptikus gelişiminde çok sayıda moleküler ve hücresel süreç yer almakla birlikte temel sorun endojen mekanizmaların bir nöbeti sonlandırmadaki yetersizliğidir. Bu yetersizlik bir nöbet sırasındaki aşırı düzeydeki anormal uyarılmadan veya endojen inhibitör mekanizmaların kaybından kaynaklanabilmektedir (75). Nöbetin başlamasından sonraki ilk milisaniye veya saniyeler içerisinde nörotransmitter salınımı, iyon kanallarının açılıp-kapanması ve protein fosforilasyonu uzayan bir nöbet için zemin hazırlamaktadır (76). Bu moleküler olayları inhibitör $GABA_A$ reseptörünün β2/β3 ve γ2 alt birimlerinde endositoz aracılı azalma ve uyarıcı NMDA reseptörlerinde artış dahil olmak üzere reseptör düzeyinde değişiklikler izlemektedir (16,77). $GABA_A$ reseptör modülasyonundaki bu değişimin status epileptikus devam ettikçe daha belirgin hale gelen benzodiazepin farmako-direncine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (78). Status epileptikustan sonraki günler ve haftalarda meydana gelen genetik ve epigenetik değişikliklere yönelik analizler, status epileptikus sonrası epileptogenez sürecine katkıda bulunabilecek çok sayıda genin ekspresyonunda hem artış hem de azalma olduğunu ortaya koymuştur (79). Örneğin status epileptikusun fare modelinde hipokampal hücre DNA metilasyonunda, genomik boyuttaki değişimleri kapsayan epigenetik değişiklikler gösterilmiştir (Şekil 2.4; 80). Bu bağlamda transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'nın değişen regülasyonunun da epileptogenezde ve status epileptikus kaynaklı nöronal hasarda rol oynadığı ifade edilmiştir (81).



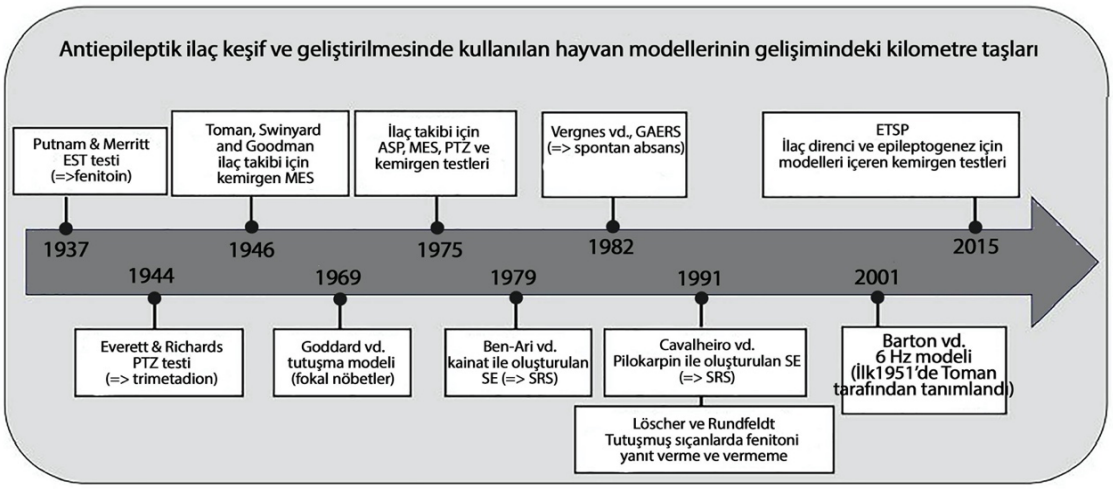
Şekil 2.4: Tek bir nöbetin, status epileptikusa geçişinde rol oynayan mekanizmalar dizisi *(Betjemann ve Lowenstein, 2015'ten değiştirilerek alınmıştır (75))*

Status epileptikus konvülsif, nonkonvülsif ve elektrografik tiplerde ortaya çıkabilmektedir. Konvülsif status epileptikus ekstremitelerin tonik, klonik veya tonik-klonik hareketleri ile karakterizedir. Nonkonvülsif status epileptikus kesin olarak tanımlanmamakla birlikte EEG'de epileptiform deşarjlarla karakterize uzun süreli nöbet aktivitesidir. Hem fokal hem de jeneralize formları mevcut olan nonkonvülsif status epileptikus, bazı hastalarda bariz motor belirtiler olmaksızın davranış veya bilinç değişikliği ile ortaya çıkmaktadır (82).

Konvülsif status epileptikusun nöronal hasara neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Babunlarda indüklenen konvülsif nöbetlerin hipertermi, hipotansiyon ve hipoksiye yol açtığı ve bu durumların da talamus, hipokampus ve neokorteksteki nöronal hasara neden olduğu bildirilmiştir (83). Status epileptikusa ilişkin farklı hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda eksitotoksisite, nekroz, apoptoz ve mitokondriyal disfonksiyon dahil olmak üzere nöronal hücre ölümü ve hasarına katkıda bulunabilecek çok sayıda potansiyel mekanizma tanımlanmıştır (84,85,86). Status epileptikus sonrası insanlarda da nöronal hasar ve hücre ölümünün gerçekleştiğini kanıtlayacak deliller artmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda nöronal hasarın bir belirteci olan nörona özgü serum enolaz düzeyinin hem konvülsif hem de nonkonvülsif status epileptikustan sonra yükseldiği bildirilmiştir (87,88).

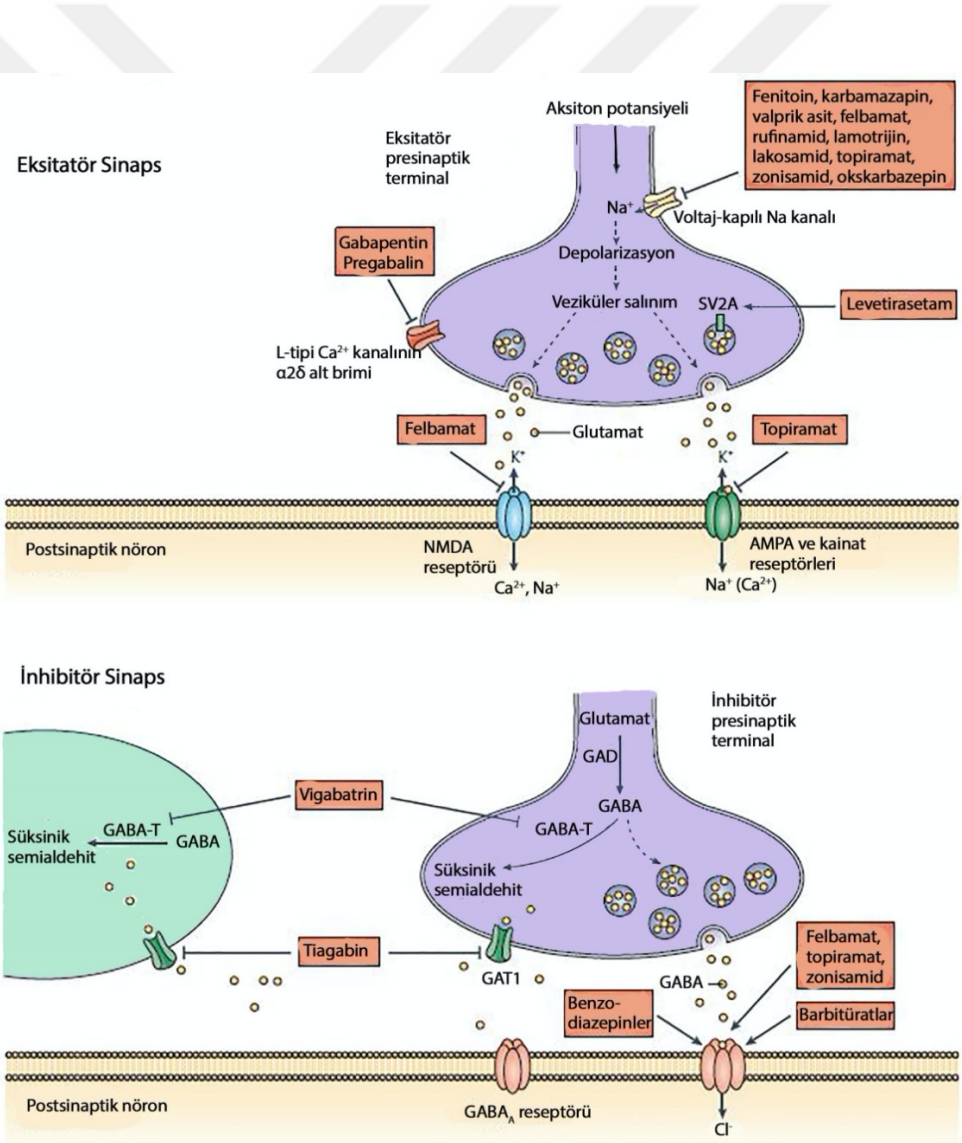
2.1.7. Antiepileptik İlaçların Etki Mekanizmaları

Epileptik nöbetlere ilişkin temel tedavi yaklaşımı antiepileptik ilaç kullanımına dayanmaktadır. Antiepileptik ilaçların geliştirilmesinde deneysel epilepsi modellerinden faydalanılmaktadır (Şekil 2.5). Uygun şekilde seçilen antiepileptik ilaçların hastaların %60-70'inde yeterli nöbet kontrolü sağladığı bildirilmiştir (89). Epilepside terapötik bir yaklaşım tasarlanırken, daha az yan etki nedeniyle tek bir ilacın (monoterapi) kullanılması tercih edilmesine rağmen hastaların yaklaşık %30'u kontrolsüz nöbetler geçirmeye devam etmekte ve çoğu zaman birden fazla antiepileptik ilaç aynı anda kullanılmaktadır. İki veya daha fazla uygun tipte antiepileptik ilaç kullanımına rağmen nöbet kontrolü sağlanamayan kişilerin ilaca dirençli epilepsi hastası olduğu kabul edilmektedir (90,91). Antiepileptik ilaçlar yaklaşık 40 yıldan fazla bir süre önce klinik uygulamaya girmiştir. Monoterapi olarak karbamazepin ve valproat gibi daha eski antiepileptik ilaçlar ile tedavi edilen kişilerin %30-40'ında tedavi başarısızlığına katkıda bulunabilecek yan etkilerin geliştiği bildirilmiştir (92). İlk kullanılan antiepileptik ilaçlardaki kısıtlı ve yan etkiler dikkate alınarak son 30 yılda farklı moleküler mekanizmalara ve farmakokinetiğe sahip ikinci ve üçüncü kuşak yaklaşık 20 yeni antiepileptik ilaç kullanıma girmiştir (91,93).



Şekil 2.5: Antiepileptik ilaçların keşfi ve incelenmesinde kullanılan hayvan modellerinin geliştirilmesine ilişkin kilometre taşları *(Löscher, 2017'den değiştirilerek alınmıştır (95))*

Antiepileptik ilaçlar, daha eski olan birinci kuşak, daha yeni olan ikinci ve üçüncü kuşak ilaçlar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Birinci kuşak antiepileptik ilaçlardan 40 yılı aşkın bir süre önce klinik uygulamaya girenler arasında fenobarbital, fenitoin, primidon, etosüksimit, valproat, karbamazepin, klonazepam ve klobazam yer almaktadır. İkinci kuşak antiepileptik ilaçlar 1980'lerin sonundan itibaren kronolojik sırayla vigabatrin, okskarbazepin, lamotrijin, gabapentin, felbamat, topiramat, tiagabin, levetirasetam ve zonisamid şeklinde kullanıma girmiştir. Üçüncü kuşak antiepileptik ilaçlar arasında pregabalin, fosfenitoin, lakozamid, rufinamid, eslikarbazepin, retigabin (veya ezogabin), perampanel, brivarasetam, kannabidiol, stiripentol, senobamat ve fenfluramin bulunmaktadır (91,94).



Şekil 2.6: Antiepileptik ilaçların eksitatör ve inhibitör sinapslardaki etki mekanizmaları
(Bialer ve White, 2010'dan değiştirilerek alınmıştır (96))

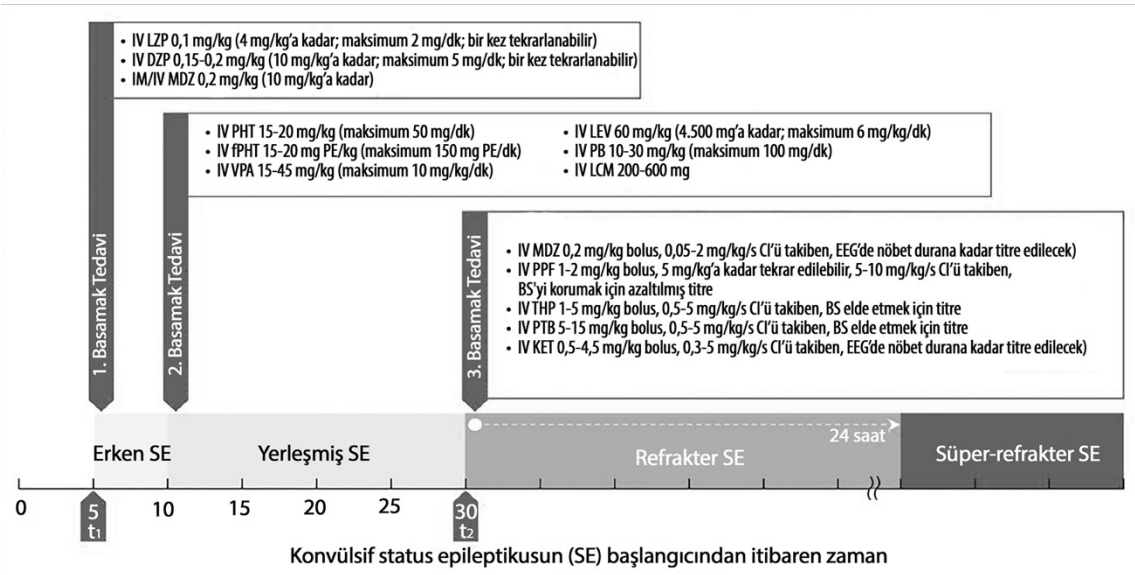
Antiepileptik ilaçların temel etki mekanizması eksitasyonun azaltılması veya inhibisyonun güçlendirilmesine yöneliktir. Bazı antiepileptik ilaçlar ise bu iki etki yolağının her ikisini de aktive etmektedir. Eksitasyonun azaltılması veya baskılanması, sodyum ve kalsiyum kanalları gibi intrensek uyarılabilirlik mekanizmaları üzerinden veya glutamatın AMPA ve NMDA reseptörleri ile sinaptik vezikül proteini 2A (SV2A) gibi uyarıcı sinaptik iletim mekanizmaları üzerinden sağlanabilir. İnhibisyonun güçlendirilmesi ise GABA'nın kullanılabilirliği veya $GABA_A$ reseptörlerinin aktivasyonundaki artış ile gerçekleştirilebilir. Bu bağlamda antiepileptik ilaçların hedefleri arasında voltaj-kapılı sodyum kanallarının blokajı, kalsiyum kanallarının blokajı, GABA ile ilgili hedeflerin güçlendirilmesi, glutamaterjik iletinin zayıflatılması ve diğer bazı spesifik mekanizmalar yer almaktadır (Şekil 2.6; 91).

Antiepileptik ilaçlardan karbamazepin, senobamat, lakozamid, lamotrijin, fenitoin ve zonisamid eksitatör ve inhibitör sinaptik iletileri doğrudan etkilemek yerine nöronal membranlarda voltaj-kapılı sodyum kanallarını bloklayarak aksiyon potansiyeli oluşumunu azaltmaktadır. Topiramat da kısmen bu mekanizma ile etki ederken fenobarbital ve valproat ise yüksek dozlarda sodyum kanallarını etkilemektedir (97). Etosüksimid, talamokortikal nöronlarda düşük voltajla aktiflenen voltaj-kapılı T-tipi kalsiyum kanallarını inhibe etmektedir. Valproat da benzer etki gösterebilmektedir. Gabapentin ve pregabalin, voltaj-kapılı kalsiyum kanalının α2δ alt birimine bağlanarak uyarıcı sinapslarda glutamat salınımını azaltmaktadır (91). Benzodiazepinler $GABA_A$ reseptörlerini açarak GABA'nın yaptığı gibi hücre içeresine klorür iyon akımına neden olmaktadır. Fenobarbital ve diğer barbitüratlar GABA aracılı klorür iyon kanalının açık kalma süresini uzatırken, bir GABA analoğu olan vigabatrin, GABA'nın etkisini sonlandıran GABA transaminaz enzimini geri dönüşümsüz olarak inaktive etmektedir. Ayrıca valproat da yüksek dozlarda GABA transaminazı inhibe edebilmektedir. Tiagabin, GABA taşıyıcısı GAT-1'i seçici olarak inhibe ederek GABA aracılı inhibitör sinaptik iletinin uzamasına neden olmaktadır. Felbamat ve topiramat, GABA'nın inhibitör etkilerini kolaylaştıran antiepileptik ilaçlar arasında yer almaktadır. Gabapentin ve pregabalin, GABA'nın yapısal analogları olmakla birlikte GABA aracılı nöronal mekanizmaları etkilemek yerine daha önce ifade edildiği gibi voltaj-kapılı kalsiyum kanalının α2δ alt birimine bağlanarak glutamat salınımını azaltırlar (97). Levetirasetam veziküller üzerindeki SV2A reseptörlerine bağlanarak gulutamatın ekzositozunu engellemektedir. Retigabin ise presinaptik sinir terminallerinde KCNQ2-5

(Kv7.2-Kv7.5) voltaj-kapılı potasyum kanalını açarak böylece glutamat salınımını inhibe etmektedir. Daha önce sıralanan etkilerine ilaveten valproat, voltaj-kapılı potasyum kanal geçirgenliğini artırarak hiperpolarizasyona neden olmaktadır. Perampanel, AMPA reseptör antagonisti olarak işlev görmektedir (Şekil 2.6; 91,97).

2.1.8. Status Epileptikusta Antiepileptik İlaç Kullanımı

Klinik uygulamada, 5 dakikadan daha uzun süren jeneralize tonik-klonik nöbetlerin ve 10 dakikadan uzun süren bilinç bozukluğu olan veya olmayan fokal nöbetlerin status epileptikus olarak tedavi edilmesi gerektiği genel kabul görmektedir. 2016 yılında Amerikan Epilepsi Derneği tarafından çocuklar ve yetişkinlerde görülen konvülsif status epileptikusun tedavisine yönelik hazırlanan kılavuza göre, status epileptikusun birinci basamak tedavisinde intravenöz lorazepam (LZP) veya diazepam (DZP) veya intramüsküler midazolam (MDZ) şeklinde bir benzodiazepin kullanımı öngörülmektedir. Bu seçenekler mevcut değilse, alternatif olarak rektal DZP, intranazal MDZ, bukkal MDZ veya intravenöz fenobarbital (PB) önerilmektedir (98). Nöbet devam ederse ikinci basamak tedavi için fenitoin (PHT), fosfenitoin (fPHT), valproat (VPA), levetirasetam (LEV) ve PB gibi uygun bir antiepileptik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu antiepilepik ilaçlardan PHT kardiyotoksisiteye neden olabileceği için intravenöz fPHT tercih edilmektedir. Kardiyotoksisitenin yansıra PHT'nin intravenöz uygulamasında, enjeksiyon bölgesinin distalinde ödem ve ağrının eşlik ettiği morumsu-siyah bir renk değişikliğinin meydana geldiği potansiyel olarak ciddi *"mor eldiven sendromu"* riski de bulunmaktadır. Oysa fPHT daha düşük bir mor eldiven sendromu insidansına sahiptir. İkinci basamak tedavide ayrıca intravenöz VPA veya intravenöz LEV veya alternatif olarak intravenöz PB (önceden verilmemişse) uygulanabilmektedir. Bununla birlikte PB uzun bir yarı ömre sahip olmasının yansıra şiddetli sedasyon, solunum depresyonu ve hipotansiyon gibi kalıcı yan etkilere neden olabilmektedir (99). İkinci basamak tedavi nöbetleri durduramazsa, genellikle diğer bir ikinci basamak ajan denenmektedir. Birinci ve ikinci basamak tedavilere rağmen en az 30 dakika daha nöbetler devam ederse veya nöbetler tekrarlanması durumunda tedaviye dirençli status epileptikustan söz edilebilmektedir ki bu durumda anestezik dozlarda PB, propofol (PPF), MDZ veya tiyopental (THP) kullanımı gerekmektedir (Şekil 2.7; 98).



Şekil 2.7: Konvülsif status epileptikus için farklı evrelerde tedavi seçenekleri *(Kim vd., 2021'den değiştirilerek alınmıştır (100)*)

(t1: anormal derecede uzamış nöbetin başlangıcı, t2: uzun vadeli sonuçların başlangıcı. BS: börst-baskılama paterni, CI: sürekli infüzyon, DZP: diazepam, EEG: elektroensefalografi, fPHT: fosfenitoin, IM: intramüsküler, IV: intravenöz, KET: ketamin, LCM: lakozamid, LEV: levetirasetam, LZP: lorazepam, MD: midazolam, PB: fenobarbital, PE: fenitoin sodyum eşdeğeri, PHT: fenitoin, PPF: propofol, PTB: pentobarbital, SE: status epileptikus, THP: tiyopental, VPA: valproat)

2.1.9. Epilepsi Genetiği

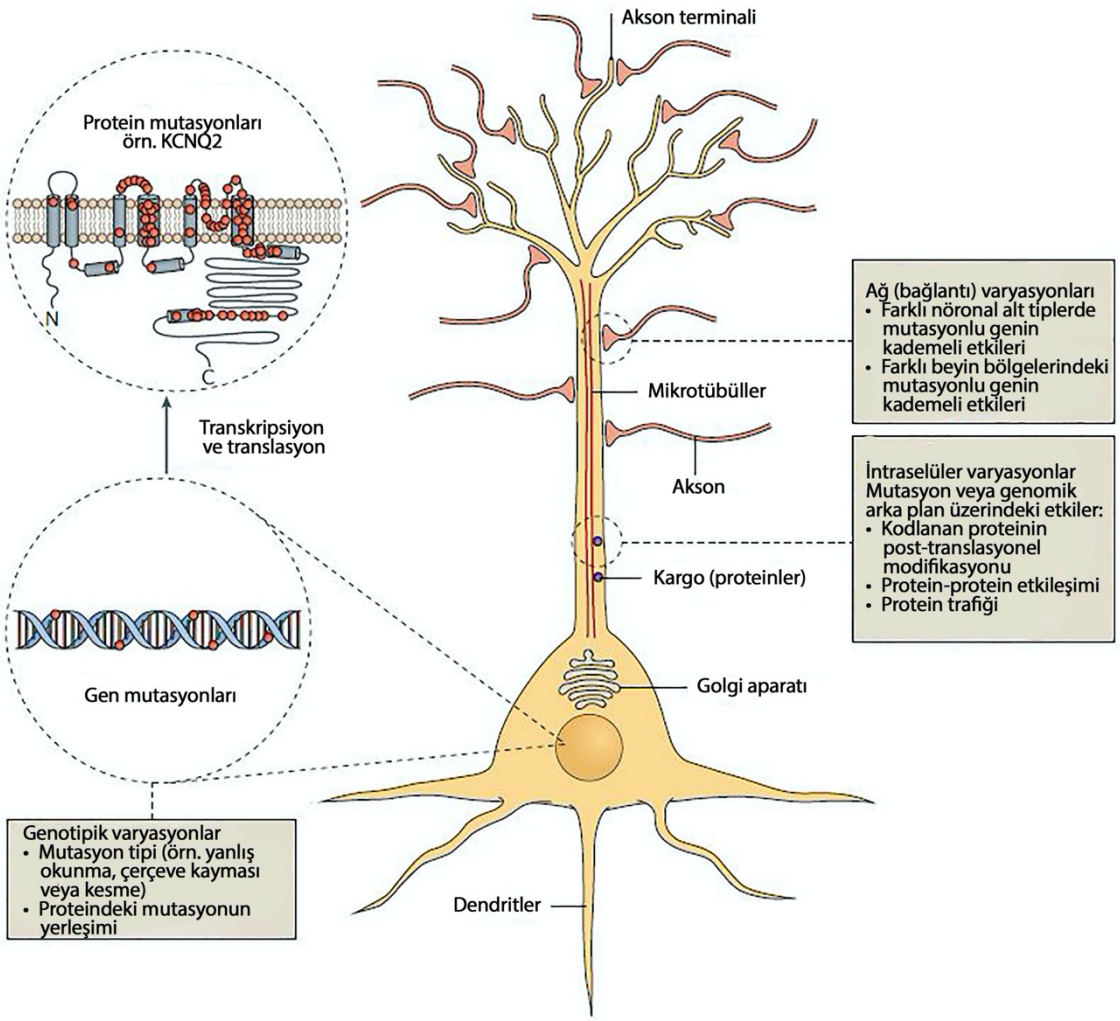
Son yirmi yılda gerçekleşen genomik devrim, epilepsi ile ilişkili olduğu bilinen yaklaşık 1.000 genin tanımlanmasına yol açmıştır. Yeni nesil dizilemedeki hızlı teknolojik gelişmeler, gen ilişkilerinin şaşırtıcı bir hızla keşfedilmesini sağlamıştır. Bu gelişmeler araştırmaları ve klinik paradigmaları çarpıcı biçimde değiştirmiş olsa da gen ilişkilerinin keşfedilme hızı, gen mutasyonlarının patofizyolojisini ve bunların hastalık fenotipleriyle ilişkisini değerlendirme yeteneğimizi geride bırakmıştır (101). *"İnsan Genom Projesi"* döneminde, teknolojik yenilikler *"bin dolarlık genomu"* mümkün kıldığında gerçek kişiselleştirilmiş tıbbın ortaya çıkacağı tahmin ediliyordu (102). Bugün, tüm genom dizilimi araştırma laboratuvarlarında 1.000 ABD dolarından daha az maliyetler ile elde edilebilmesine rağmen insan genomunun ilk tekrarının bir araya getirilmesinden bu yana geçen 16 yıl içinde DNA dizileme sürecinin, yolculuğun sadece başlangıcı olduğu fark edilmiştir (101).

Klasik epidemiyolojik çalışmalar, epilepsi vakalarının yaklaşık 1/4'ünün altında yatan kazanılmış nedenlerin olduğunu göstermiştir. Yaygın nedenler arasında felç,

beyin tümörleri, kafa travmaları, beyin enfeksiyonları ve dejeneratif bozukluklar bulunmaktadır. Vakaların geri kalan 3/4'ünün altında yatan etiyoloji bilinmemektedir (103,104). Son yıllarda, giderek daha fazla hassaslaşan manyetik rezonans görüntüleme (MRI), otoimmün nedenler ve Mendelian epilepsilerin vakaların bir kısmından sorumlu olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, çoğu epilepsi hastasında altta yatan etiyoloji açık değildir. Gen dizileme teknolojisindeki son gelişmelerin rehberliği ile elde edilen veriler, bu vakalarda genetiğin önemli bir rol oynadığı hipotezini oldukça güçlendirmiştir (104). Hedeflenmiş dizileme, tüm ekzom dizileme (WES) ve tüm genom dizileme (WGS) gibi yeni dizileme yaklaşımları, epilepside oldukça başarılı olmuş ve yeni gen keşfini hızlandırmanın yanı sıra birçok hastada nedensel varyantların tespitini sağlamıştır (105). Dizileme, en yaygın olarak patojenik germ hattı varyantlarını aramak için lenfosit türevli DNA'ya uygulanmaktadır (104). Beyin hastalığına neden olan somatik mutasyonlar bazen beyin dışında düşük miktarda bulunabilmekte ve bu mutasyonlar derin ekzom dizileme, derin hedefli dizileme veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanarak bukkal hücre veya lenfosit türevli DNA'da veya plazmadaki hücresiz DNA'da tespit edilebilmektedir (106,107).

2018 yılında *"ILAE Kompleks Epilepsi Konsorsiyumu"* 15.212 vaka ile birlikte 29.677 kontrolünü kapsayan ve epilepsi alanında bugüne kadarki en büyük *"genom çapında ilişkilendirme çalışmasını (GWAS)"* yayımlamıştır. Bu çalışma epilepsi için 11'i yeni olmak üzere toplam 16 tane genom çapında anlamlı lokus ortaya çıkarmıştır (108). SCN1A, SCN2A ve PNPO gibi bu lokuslara karşılık gelen genlerin bazıları, geleneksel bağlantı ve dizileme analizleri ile tanımlanan yerleşik epilepsi genleriyle örtüşmüştür (104). Mevcut anlayışımız, epilepsilerin çok sayıda nadir Mendelian alt tipini içerdiği ve daha yaygın formların hem ortak hem de nadir varyant katkıları olan olası bir oligo veya poligenik mimariye sahip olduğu yönündedir (105). Şiddetli kafa travması veya felçten kaynaklanan durumlar gibi edinilmiş epilepsilerde bile, gerçek varyantlar tespit edilememiş olmasına rağmen, aile öyküsü verilerinin gösterdiği gibi genetik faktörler rol oynamaktadır (109). Epilepsinin özel genetik mimarisi, epilepsi genetiğine ilişkin mevcut bilgilerin diğer nörolojik durumlara ve ayrıca yaygın nörolojik olmayan bozukluklara hem yaygın hem de nadir varyantların katkıları açısından karşılaştırılması veya kıyaslanmasıyla gösterilebilecektir (104). Karmaşık hastalıkların araştırılması 1) uygun analitik yöntemlerin eksikliği, 2) örneklem boyutunun büyüklüğü

ve 3) metilasyon, histon modifikasyonları, transkriptomlar vb. verileri oluşturulmasına yönelik multi-omik yaklaşımlar gibi faktörlere bağlıdır. (Şekil 2.8; Şekil 2.9; 104).



Şekil 2.8: Genetik epilepsilerde fenotipik çeşitliliğin kaynakları *(Demarest ve Brooks-Kayal, 2018'den değiştirilerek alınmıştır (101))*

2.1.9.1. Genetik temelli epilepsilerin karmaşıklığı: Monojenik bir nedeni olan epilepsi etiyolojileri, yeni nesil dizileme yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla benzeri görülmemiş bir hızla keşfedilmiştir. Bununla birlikte, bu etiyolojilerin tutarlı bir genotip-fenotip korelasyonu büyük ölçüde belirsizliğini korumakta ve klinisyenlerin genetik etiyolojileri mevcut klinik epilepsi sendromlarıyla bütünleştirme çabalarını boşa çıkarmaktadır. Çoğu zaman, yeni genetik etiyolojiler, mevcut birkaç epilepsi sendromuyla örtüşebilen hastalık fenotiplerinin yaygın spektrumuna sahiptir (101).

Epilepsinin genetik nedenlerine dayanan açık ve tutarlı bir genotip-fenotip korelasyonu nadirdir ve bu koşulların patofizyolojisine ilişkin sınırlı anlayışımızla daha da kötüleşen bir sorundur. Görünüşte monogenik etiyolojilerden poligenik etiyolojilere ve hastalığa katkıda bulunan çoklu risk faktörü genlerden kaynaklanan etiyolojilere kadar geniş bir spektrum mevcuttur. Bir genetik mutasyonun bir fenotip olarak ortaya çıkışına aracılık eden süreçler inanılmaz derecede karmaşıktır ve çeşitli fenotipik varyasyon kaynağını içermektedir (101).

Yeni nesil dizileme, özellikle epileptik ensefalopatilerdeki baskın kalıtım modellerine sahip *de novo* mutasyonlar için, epilepside Mendelian genetik etiyolojilerin keşfi için güçlü bir araç olmuştur. Bununla birlikte, biyoinformatik teknikler genellikle bir gen mutasyonunun hastalığa neden olmak için yeterli olduğunu belirleyebilse de bu teknikler hastalığın ciddiyetini doğru bir şekilde tahmine yetmemektedir (101). Muhtemelen, epilepsilerin hiçbiri gerçekten monogenik değildir, ancak belirli genler *"yüksek etkili"*, yani tek gen değişikliklerinin tutarlı bir şekilde bir hastalık fenotipi ile sonuçlanması için yeterli görünmektedir. Bu genler normal popülasyonda birkaç patojenik olmayan varyantın birikmesiyle yüksek oranda korunmaktadır. (110,111).

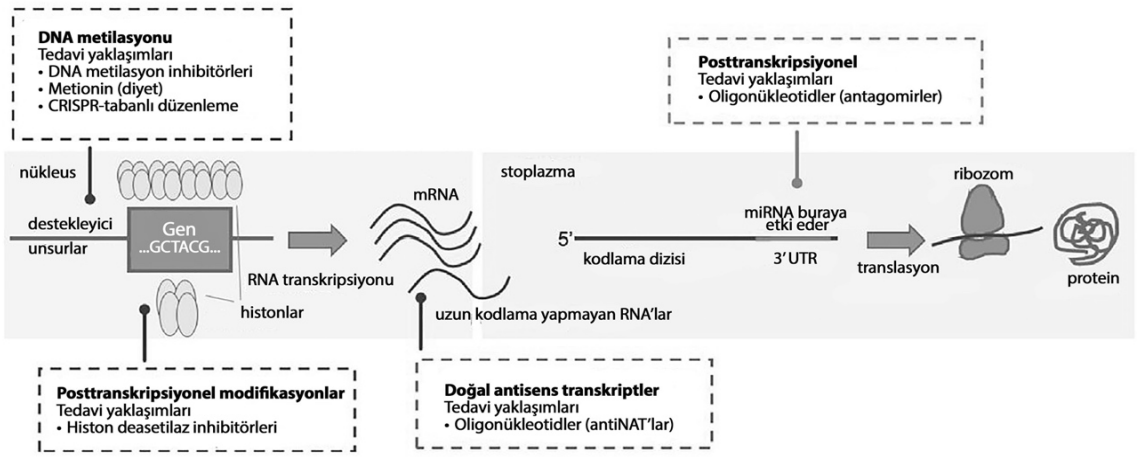
Genetik epilepsilerdeki çalışmaların çoğu, kısmen fizyolojik özelliklerinin geleneksel elektrofizyolojik tekniklerle incelenebilmesi nedeniyle kanalopatiler üzerinde gerçekleştirilmiş ve bu nedenle bu kanallar sıklıkla kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir (101). Örneğin, *KCNQ2* (potasyumun voltaj-kapılı kanal alt ailesi KQT üye 2'yi kodlar) ile ilgili epilepsi en iyi karakterize edilmiş kanalopatilerden birisidir. Bu kapsamda *KCNQ2*-bağlantılı epilepsili yaklaşık 200 hastadan sistematik bir şekilde fenotipik ve fonksiyonel verilerin bir kombinasyonunun toplanması sağlamıştır (112). *KCNQ2* mutasyonları, kendi kendini sınırlayan yenidoğan nöbetlerinden ciddi gelişimsel ve epileptik ensefalopatiye (karakteristik olarak Ohtahara sendromu olarak ortaya çıkan) kadar değişen çeşitli fenotiplere yol açabilmektedir. Hafif bir fenotipin genellikle gen boyunca ara sıra hatalı değişiklikler veya kesilmeler ya da çerçeve kayması mutasyonları ile ilişkili olduğu, ağır bir fenotipin ise genellikle fonksiyonel hassas noktalardaki patojenik varyantlar ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (101). Bu mutasyonların etkisinin, ortaya çıkan amino asit değişikliğinin özellikleriyle olduğu kadar lokasyonla da ilgili olduğu rapor edilmiştir (113).

2.1.9.2. Epilepside genetik testler: Epilepsilerin genetik ve fenotipik heterojenliği ve ayrıca dizilemenin azalan maliyetleri, geniş bir test stratejisi için dikkate alınmaktadır. Çoğu hasta için bu durum, ya bilinen epilepsi genlerinin bir panelini ya da yeni genler keşfedildikçe potansiyel bir yeniden analiz avantajına sahip olan tüm ekzom dizilimini içerecektir. Kodlamayan bölgeleri ve bazı kodlama bölgelerinin daha iyi kapsanmasını içeren tüm genom dizilimi, muhtemelen yakın gelecekte klinik uygulamaya girecektir fakat bu testler de epilepsinin tüm olası genetik nedenlerini tespit etmede yetersiz kalacak ve ilave testlere ihtiyaç duyulacak gibi görünmektedir (105). Kromozomal mikrodiziler, özellikle zihinsel engelli veya konjenital anomalileri olan epilepsi hastalarında, kopya sayısı değişikliklerinin saptanması için önemini korumaktadır (114). Her ikisi de epilepsinin bilinen nedenleri olan duplikasyonlar ve halka kromozom (Ring kromozomu) oluşumu, şu ana kadar bahsedilen teknolojilerle hızlı ve tam olarak tespit edilemeyebilmekte ve bazı klinik özel testler gerektirmektedir (115,116). Klinik zorluk, testlerin istenmesinde değil, sonuçları ve özellikle belirsiz anlamlı varyantların yorumlanmasına ilişkindir. Hastalar ve aileleri genellikle belirsiz öneme sahip varyantlar hakkında bilgilendirilmek istemekte ve klinisyenler varyantın daha kesin bir sınıflandırmasına yönelik ilave adımlar atabilmektedir (117). Hastanın fenotipi, genin rapor edilen fenotipik spektrumu ile karşılaştırılmalıdır. Varyant düzeyinde bilgi dikkate alınmalı ve bir genin işlev kaybı veya işlev kazanımı yoluyla veya belirli bir işlevsel alandaki varyantlar yoluyla epilepsiye neden olup-olmadığı hesaba katılmalıdır (118). Herhangi bir nörogelişimsel bozukluk da dahil olmak üzere dikkatli bir aile öyküsü rehberliğinde diğer aile üyelerinin de dahil edildiği bağlantı çalışmaları bu sürece yardımcı olabilmektedir (105,119).

2.1.9.3. Genetik epilepsiye ilişkin tedavi stratejileri: Spesifik genetik mekanizmaları hedefleyen mevcut ilaçların yeniden kullanılması, genetik epilepsilere ilişkin umut verici bir tedavi stratejisidir (105). Bu yöndeki klinik çalışmalardan birisi rapamisinin memeli hedefi (mTOR) inhibitörü olan everolimus için etkinin büyüklüğü, geleneksel nöbet önleyici ilaçlar için tipik olarak görülen etkilerle karşılaştırılabilir olmasına rağmen tüberosklerozlu hastalarda nöbetleri azaltmıştır (120). PCDH19 epilepsili hastaların nörosteroid ekspresyonunun azaldığı yönündeki gözleme dayanılarak, bu hastaları tedavi etmek için bir klinik ganaksolon klinik denemesi (NCT03865732) sürdürülmektedir (121). Dravet sendromunun tedavisine yönelik

olumlu klinik denemeler arasında kannabidiol ve fenfluramin tedavisi yer almaktadır. Spesifik bir genetik mekanizmayı hedeflemekten ziyade ampirik olarak tanımlanan bu ilaçların Dravet sendromunun ötesinde diğer epilepsi türleri için faydalı olabileceği düşünülmektedir (105,122,123).

Genetik epilepsiye ilişkin olarak moleküler genetik tanıları hedefleyen yeni tedaviler de geliştirilmektedir. Örneğin, *SCN1A* mutasyonlarından etkilenen NaV1.1 kanalını, seçici olarak aktive eden örümcek zehirinden türetilen bir peptit, Dravet sendromunun bir fare modelinde etkili olmuştur (124). Antisens oligonükleotitler, miRNA'lar ve viral vektörlerce uygulanan gen terapisi gibi nükleotit bazlı tedaviler de geliştirilmektedir (125,126). Yeni genetik keşifleri etkili tedavilere dönüştürmek karmaşık ve zorlu bir süreçtir (Şekil 2.9; 105).



Şekil 2.9: Epigenetik mekanizmaların gen ekspresyon sürecine etkisi ve epilepside terapötik hedeflemeye yönelik potansiyel yaklaşımlar *(Henshall, 2020'den değiştirilerek alınmıştır (127))*

2.1.9.4. Epilepside gen terapisi: Genetik düzeyde protein ekspresyonlarını veya moleküler değişiklikleri düzenleyen herhangi bir terapötik strateji gen terapisi olarak tanımlanmaktadır (128). Geleneksel farmakoterapiye göre en önemli avantajlarından bir tanesi tedavi edilemeyen hedeflerin manipüle edilmesine imkân tanımasıdır (129). Gen terapisinde, ekzojen genetik materyalleri konakçılara taşımak ve protein ürünlerinin ekspresyonunu düzenlemek için uygun *İn vivo* ve etkili gen manipülasyon yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Klasik gen terapi

süreci, hedeflenen bölgeye vektör enjeksiyonları ile başlamakta ve ardından vektörün veya promotörün tropizmine bağlı olarak spesifik hücre tiplerinde transgen ekspresyonu ile devam etmektedir. Vektör aracılı gen terapisine yönelik deneysel uygulamalardan bazıları klinik deneylerde test edilirken, optogenetik ve kemogenetik gibi diğer yeni teknikler klinik uygulamalara nadiren çevrilebilmiştir (128). Diğer taraftan epilepsi dahil nörolojik hastalıklarda gen terapisine ilişkin preklinik araştırmalarda belirli bir mesafe kat edilmekle birlikte epilepsi ile ilgili olarak bunların hiçbiri henüz klinik uygulamaya dönüştürülmemiştir (130).

Genel olarak viral ve viral olmayanlar şeklinde sınıflandırılan gen taşıma araçları kullanılarak gerçekleştirilen vektör-aracılı gen transferi, terapötik hedefleri rasyonel olarak tamamlama veya değiştirme şansı sağlamaktadır. Beyinde en sık kullanılan virüs vektörler, adeno-ilişkili virüsler (AAV), lentivirüs ve herpes simpleks virüsleri (HSV)'dir. AAV'ler nöron ve astrosit gibi postmitotik hücrelerde uzun süreli gen ekspresyonunun desteklenmesi, viral serotiplere bağlı olarak geniş dağılımın elde edebilmesi ve spesifik hücre tiplerini hedeflenebilmesi nedeni ile kişiselleştirilmiş terapide vektör olarak en önemli araç olarak kabul edilmektedirler (131,132,133). Örneğin spinal musküler atrofi (SMA) tip-1 hastalarını için "survival motor nöron-1" (SMN1) genini taşıyan kan-beyin bariyeri (KBB) geçebilen ve nörotropik özellikte AAV9 vektörleri kullanılarak gerçekleştirilen gen tedavisinde umut verici bir ilerleme sağlanmıştır (128,134). Lentivirüsler, çoğu viral araç gibi sistematik olarak hedefe ulaşamaması ve boyutundan dolayı hücre dışı boşluktan yeterince geçememesi nedeni ile AVV'lere göre viral vektör olarak daha az tercih edilmektedir. Diğer taraftan AAV'lerden daha büyük kapasiteye (DNA'nın yaklaşık 9 kb) sahip olmaları lentivirüsler için bir avantaj olarak görülmektedir. HSV'lere lentivirüslerden daha büyük transgen (150 kb'ye kadar) yüklenebilmekte fakat karakteristik nörotropizm (nörotropik olma niteliği veya durumu) özelliği transfekte olmuş nöronlarda nörotoksisite veya immünojenik reaksiyonlar başlatabilmesinden dolayı viral vektör olarak ciddi bir kısıtlama oluşturmaktadır (128,135).

Gen terapisinde yaygın kullanılmasına ve yoğun bir şekilde geliştirilmiş olmasına rağmen üretimden-uygulamaya kadar geçen süreçte saklama koşulları, uygulanma yolu ve konağın MSS (Merkezi Sinir Sistemi) ortamı gibi birçok faktörden etkilenebilmesi, ekzojen viral proteinlerin immünojeniteyi uyandırma potansiyeli,

nötralize edici antikorları gen transdüksiyonunun güvenliğini ve etkinliğini azaltabilmesi gibi faktörlerden dolayı viral vektörlerin gen terapisinde kullanımlarına ilişkin ciddi belirsizlikler bulunmaktadır. Daha kontrol edilebilir durumdaki viral olmayan vektörlerin gen transfer stratejilerinin bu tür komplikasyonları önleyebileceği düşünülmektedir (136,137). Viral olmayan vektörler, ilaç veya gen yükleme kapasitesine sahip sentetik partiküllerdir. Yaygın olarak kullanılan viral olmayan vektörler, lipidler ve polimer bazlı vektörler olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Periferik uygulamalarda özel ligandlar bağlanmış nanopartiküller ile KBB'den (Kan-Beyin Bariyeri) rahat geçilebilmesi, daha büyük gen paketleme kapasitesi ve büyük ölçekli üretim kolaylığı nedeni ile viral olmayan vektörlerin çok daha fazla kullanım kolaylıkları olduğu bildirilmiştir (138). Diğer taraftan düşük dağılım verimliliği, biyolojik özellik olarak ekzojen genleri konakçı genomuna verimli bir şekilde entegre edebilen viral vektörlerin aksine periferik kandan hedeflenen nöronların çekirdeğine *in vivo* teslim işlemi sırasında çeşitli engellerin olması gibi, viral olmayan vektörler için iyileştirilmesi gereken belirli faktörler bulunmaktadır (128).

2.2. miRNA

2.2.1. miRNA'ların Tanımı ve Tarihçesi

Mikro RNA'lar (miRNA), 18-25 nükleotid uzunluğunda, küçük, tek sarmallı, DNA'dan kopyalanan ve proteine çevrilmek yerine diğer genlerin protein sentezine ilişkin işlevlerini düzenleyen bir RNA formudur. Transfer RNA (tRNA)'ları, ribozomal RNA (rRNA)'ları ve küçük nükleolar RNA (snoRNA)'ları kodlayan genlerin yanı sıra insan genom dizilemesinde tanımlanan binlerce yeni varsayılan gen düşünüldükten sonra bile, türden türe değişmekle birlikte insan genomun yaklaşık %95'i kodlamayan DNA bölümünü oluşturmaktadır. Önemli bir açık okuma çerçevesi olmayan ve RNA'yı nihai ürün olarak kodluyor gibi görünen RNA'lara karşılık gelen ve potansiyel olarak önemli bir gen sınıfı olan miRNA'lar gelişim, protein sekresyonu ve gen düzenlemesinde kritik roller üstlenebilmektedir (139).

miRNA'lar, 3' çevrilmemiş bölgelere (UTR) bağlanarak transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen, hedef haberci RNA (mRNA)'ların dizilerini veya 5′UTR'sini kodlayan ve translasyon veya mRNA bozulmasını inhibe eden kodlama

yapmayan küçük RNA (ncRNA)'lardır. miRNA'ların insanda protein kodlayan genomun yaklaşık %30'unu düzenlediği tahmin edilmektedir (21). Yaklaşık 30 yıl öncesine kadar miRNA'ların hem varlığı hem de önemi yeterince bilinmiyordu. O zamana kadarki bilimsel çalışmalar tüm protein kodlamayan dizilerin incelenmesi yerine, DNA'nın RNA'ya kopyalandığı ve daha sonra proteine çevrildiği klasik dogmaya, yani protein kodlayan genlere odaklanmıştı (140). Bununla birlikte 1993 yılında Ambros ve Ruvkun laboratuvarlarının iş birliği ile ilk miRNA keşfi *Caenorhabditis elegans* nematodunda yapılmıştır (141). *Caenorhabditis elegans*'ta tüm larva evrelerinin zamansal gelişim modelini kontrol eden heterokronik genlerden birisi olan lin-4, daha önceki yıllarda boş (null) bir mutasyonun izolasyonu ile keşfedilmiş ve nematodun zamansal gelişim sürecinde yetersizliğe neden olduğu bulunmuştur (142). Lin-4 fonksiyon kaybı mutasyonlarına sahip hayvanlarda bazı yetişkin yapıları eksiktir ve yumurta bırakamazlar, ayrıca uygun olmayan geç larva evrelerinde erken gelişim programlarını yinelerler (140,143).

İlk miRNA'nın bulunmasından 7 yıl sonra, 2000 yılında keşfedilen ikinci miRNA olan let-7, lin-4 gibi *Caenorhabditis elegans*'ın heterokronik bir genidir. Let-7 aktivitesinin kaybı, gelişimin yetişkin aşamasında larvaya ilişkin hücresel sürecin yeniden ortaya çıkmasına neden olurken, artan let-7 aktivitesi ise yetişkin hücresel sürecin erken ifade edilmesine neden olmaktadır (144). Let-7'nin türler arasında korunduğunun keşfi, miRNA'lar adı verilen yeni bir küçük ncRNA sınıfının araştırılmasında bir dönüm noktası olmuştur. Günümüzde insan ve diğer türlerde ikibinin üzerinde miRNA tanımlanmış ve miRNA veri tabanı (miRBase) gibi çevrimiçi miRNA dizi depoları oluşturulmuştur (145). Bununla birlikte miRNA hedef tahminine yönelik geliştirilen mevcut araçlar ve yazılımlar, miRNA'ların işlevsel ağına ilişkin çalışmaları kolaylaştırmaktadır (140,146).

2.2.2. miRNA Biyogenezi

miRNA genleri RNA polimeraz II (Pol II) enzimi tarafından kopyalanır, uzun primer transkript, miRNA dizilerinin gömülü olduğu yerel bir saç tokası (hairpin) yapısına sahiptir (147). Hayvanlar, bitkiler, protistler ve virüslerde yaygın olarak bulunan miRNA genleri, en geniş gen ailelerinden birini oluşturmaktadır (145). miRBase 2014 yılı verilere göre *Caenorhabditis elegans*'ta 434, *Drosophila*

melanogaster'da 466 ve insanda 2.588 miRNA kataloglandığı fakat bu miRNA'ların çoğunun işlevsel önemine ilişkin henüz bilgi olmadığı ifade edilmiştir (148).

miRNA genlerinin adlandırılması biraz değişkendir. Bu yöndeki ilk genetik çalışmalarda bulunan genler fenotiplerine göre adlandırılırken (örn. lin-4, let-7 ve lsy-6), klonlama veya dizileme yoluyla bulunan miRNA'ların çoğuna rakamsal adlar (örn. diğer türlerdeki lin-4 homologları mir-125 olarak) verilmiştir. Kardeş miRNA'ları kodlayan genler harfli son eklerle (örn. mir-125a ve mir-125b) ifade edilmiştir. Aynı olgun miRNA birden fazla ayrı lokustan üretilmiş ise miRNA lokuslarının adlarının sonuna rakamsal ekler (örn. mir-125b-1 ve mir-125b-2) ilave edilmektedir. Her lokus biri prekürsörün 5' zincirinden ve diğeri ise 3' zincirinden (örn. miR-125a-5p ve miR-125a-3p) olmak üzere iki olgun miRNA üretmektedir. Bununla birlikte, "kılavuz" zincir olarak adlandırılan kol toplamın ortalama %96-99'unu oluşturduğu için çok daha yaygındır ve diğer koldan (miRNA* olarak bilinen "yolcu" zinciri) biyolojik olarak daha aktiftir (Şekil 2.10; 147).



Şekil 2.10: miRNA'ların adlandırılması *(Brennan ve Henshall, 2020'den değiştirilerek alınmıştır (149))*

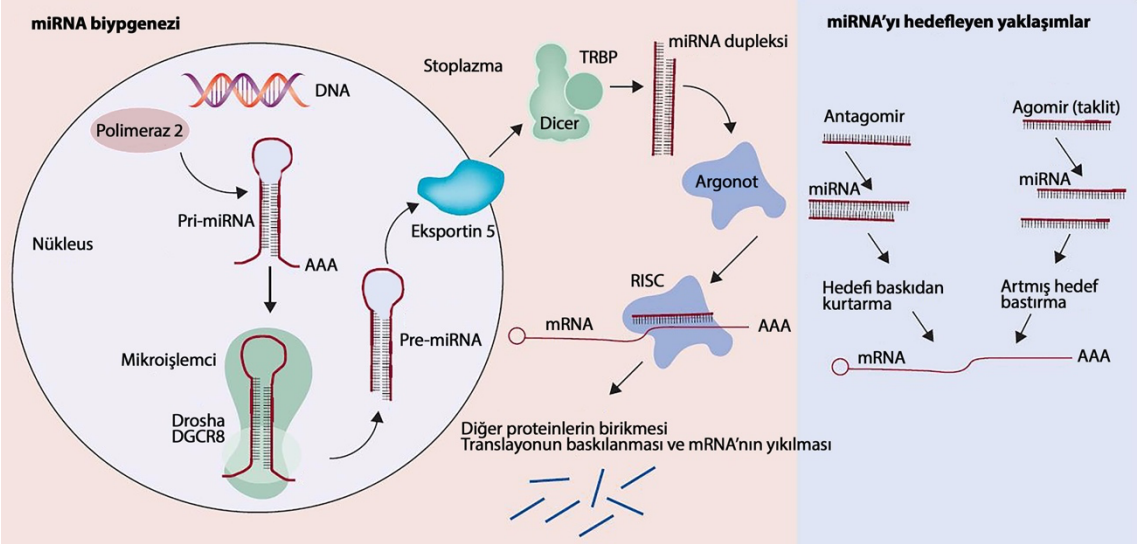
(Her miRNA bir tür kodu (1) ile tanımlanır (örn., insanlar için hsa, fareler için mmu ve sıçanlar için rno). Bir miRNA molekülünün gelişim durumu, öncü miRNA için "mir" ve olgun miRNA için 'miR' ile gösterilir (2). Birkaç istisna dışında (let-7 ailesi) miRNA'ların keşif sırasını gösteren bir tanımlayıcı numara (3) vardır (örn., miR-100, miR-101'den önce keşfedilmiştir). İki miRNA'nın neredeyse aynı olgun dizileri varsa, onları ayırt etmek için "a" ve "b" harfleri kullanılır (örn., miR-146a-5p ve miR-146b-5p). Aynı olgun miRNA dizileri farklı genomik konumlardan ortaya çıkıyorsa, bunları ayırt etmek için bir "1" ve "2" rakamları kullanılır (4) (örn., miR-124-1-3p ve miR-124-2-3p). Orijinal saç tokası (hairpin) öncüsünden kaynaklanan bölge, miRNA'nın 3p veya 5p kolundan kaynaklanıp-kaynaklanmadığına bağlı olarak "3p" veya "5p" (5) olarak belirtilir)

İnsanlarda, kanonik miRNA'ların çoğu, kodlamayan veya kodlayan transkriptlerin intronları tarafından kodlanırken, bazı miRNA'lar ekzonik bölgeler tarafından kodlanmaktadır. Çoğunlukla birkaç miRNA lokusu birbirine çok yakındır ve

bir polisistronik transkripsiyon ünitesi oluşturmaktadır (150). Aynı kümedeki miRNA'lar genellikle birlikte kopyalanmakta fakat bireysel miRNA'lar ayrıca post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenebilmektedir. Oldukça iyi düzeyde korunan kümelerden biri, bilateryan hayvanların (bilateral simetrili hayvanları kapsayan bir hayvanlar alt alemi) gelişiminde önemli bir role sahip olan mir-100~let-7~mir-125 kümesidir. Let-7 miRNA (diğer miRNA'lar hariç) embriyonik kök hücrelerde ve memelilerdeki bazı kanser hücrelerinde transkripsiyon sonrası baskılanmaktadır (147,151). miRNA promotörlerinin kesin konumları, çoğu miRNA geni için henüz haritalanmamıştır, ancak CpG adalarının toplu analizinden, RNA dizileme verilerinden ve ChIP-seq (kromatin immünopresipitasyon ve ardından dizileme) verilerinden çıkarılabilmektedir (152). Bazı miRNA genleri, protein kodlayan genlerin intronlarında bulunmakta ve bu nedenle konakçı genin promotörünü paylaşmaktadır. Bununla birlikte, miRNA genlerinin sıklıkla çoklu transkripsiyon başlangıç bölgelerine sahip olduğu ve intronik miRNA'ların promotörlerinin bazen konakçı genlerinin promotörlerinden farklı olduğu ifade edilmiştir (147,153).

Kanonik biyogenez yolağında, miRNA genlerinin çoğu Pol II tarafından en az bir saç tokası (hairpin) yapısı içeren pri-miRNA'lar olarak adlandırılan büyük RNA olarak kopyalanır. Tüm kanonik pri-miRNA'lar 5'-başlığa sahiptir ancak 3' ucunda poliadenilasyon sinyali olmayabilirler (154). Çekirdekte, pri-miRNA'lar, pre-miRNA'lar olarak adlandırılan yaklaşık 70 nükleotid kök-ilmek yapısına bölünür (155). Bu işlem, Drosha (ilk olarak Drosophila'da keşfedilmiştir) ve bir ardışık gen sendromu olarak bilinen DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8'den (DGCR8) oluşan bir mikroişlemci kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir (156). Drosha, bir tür çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz olan RNase III enzimlerinin bir üyesidir. DGCR8, mikroişlemci kompleksinin katalitik olmayan alt birimi olarak işlev gören çift sarmallı bir RNA bağlayıcı proteindir (157). Pre-miRNA'lar daha sonra XPO5 ve küçük bir GTP bağlayıcı protein olan Ras ile ilişkili nükleer protein (RAN) tarafından sitoplazmaya çıkarılmaktadır (158). Sitoplazmada, pre-miRNA'lar halkanın yakınında, 3' ucunda 2-3 nükleotid çıkıntısı ile karakterize küçük dsRNA'lara (biri kılavuz, diğeri yolcu zinciridir) bölünür. Bu bölünmeye, bir çift sarmallı RNA bağlayıcı protein olan transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein (TRBP) ile ilişkili bir RNase III enzimi, Dicer aracılık eder (147). RNA susturmadaki merkezi rolü argonaute (AGO) ailesi proteinleri üstlenmektedir. miRNA dupleksi, ATP'ye bağımlı şaperon proteinlerinin

yardımıyla AGO proteinine yüklenir. AGO orijinal konformasyonuna döndürüldükten sonra, tek zincirli olgun miRNA üretmek için miRNA dupleksinin yolcu zinciri çıkarılmaktadır (154). Yüklemeden sonra AGO, hedeflenen mRNA'nın tanınmasına aracılık eden ve RISC olarak adlandırılan bir ribonükleoprotein kompleksinin montajını destekler. Olgun miRNA'lar, baz eşleştirme yoluyla spesifik mRNA hedeflerine yönlendirilir. İnsanlarda mRNA ile kesin eşleşme gerekli değildir (Şekil 2.11; 156,159).



Şekil 2.11: miRNA biyogenezi ve epilepsi hayvan modellerinde kullanılan miRNA manipülasyonu *(Henshall vd., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır (126))*

(miRNA biyogenezi, esas olarak RNA polimeraz 2 tarafından, protein kodlayan genlerin ve spesifik lokusların intronlarından bir primer miRNA (pri-miRNA)'nın transkripsiyonu ile başlar. Çekirdekteki mikroişlemci kompleksi RNaz Drosha ve DGCR8 içerir ve bunlar pri-miRNA'yı yaklaşık 60-70 nükleotidlik bir saç tokası (hairpin) yapısını (pre-miRNA) üretmek üzere böler. Pre-miRNA daha sonra, exportin 5 ile sitoplazmaya nakledilir ve ayrıca, TRBP ile yaklaşık 22 nükleotidli dupleks miRNA'yı üretmek üzere başka bir RNaz olan Dicer tarafından işlenir. miRNA'nın bir ipliği (kılavuz) bir argonaut proteinine bağlanır ve miRNA ile indüklenen RISC oluşturulur. Yüklendikten sonra, RISC yeterli tamamlayıcı bağlanma mevcut olana kadar hedef mRNA'lar boyunca hareket eder. Hedef seçimi, miRNA ve mRNA arasındaki tohum etkileşimi olarak adlandırılan 7-8 nükleotidlik tamamlayıcı dizi eşleşmesi ile belirlenir. miRNA'yı tamamlayıcı bir antisens oligonükleotit dizisinin eklenmesi, miRNA işlevini bloke edebilir. Bir miRNA agomirinin (taklit eden) tanıtılması, hedeflerin miRNA'ya bağlı susturulmasını kolaylaştıracaktır.)

Son zamanlarda, miRNA biyogenezi için kanonik olmayan birkaç alternatif yol ifade edilmiştir. Birkaç farklı RNA sınıfı, yapısal ve işlevsel olarak miRNA'lara benzemekle birlikte, kanonik biyogenez yolundaki bir veya daha fazla adımı atlamaktadırlar. Drosha ve DGCR8, kanonik miRNA'ları işlemek için gerekli iken,

bunların yokluğunda kanonik olmayan miRNA'lar oluşturulabilmektedir (160). Kanonik olmayan miRNA'ların biyogenezinde, Drosha'dan bağımsız ve Dicer'den bağımsız yollar dahil olmak üzere birkaç yol bulunmaktadır. İyi bilinen kanonik olmayan bir yolda (mirtron), bazı dalları ayrılmış intronlar pre-miRNA saç tokaları olarak işlev görebilir. Drosha/DGCR8'den bağımsız olan mirtron yolunda, intronlar spliceosome tarafından kement intronlarına işlenir ve daha sonra kement ayırma enzimi tarafından dalları ayrılır, ardından pre-miRNA saç tokalarına katlanırlar. Daha sonra bu pre-miRNA benzeri form, kanonik yollara devam etmek için XPO5 tarafından sitoplazmaya aktarılır (156,161).

miRNA biyogenez yolunun temelleri belirlenmiş olmasına rağmen, halen netleştirilmemiş ve çözüme kavuşturulmamış alanlar bulunmaktadır. Örneğin miRNA olgunlaşmasına ilişkin anlayışımızı büyük ölçüde geliştirecek olan Drosha'nın yapısı henüz yeterince çözülmemiştir. İnsan Dicer-TRBP kompleksinin kristal yapısının aydınlatılması, miRNA öncesi işleme ve yükleme adımları sırasında Dicer'ın substratları ve ürünleri ile nasıl etkileşime girdiğine ilişkin birçok soruyu yanıtlayacaktır (147). miRNA bozunması için korunmuş bir yolun var olup-olmadığının belirlenmesi ve bu sürece hangi nükleazların dahil olduğunu ortaya çıkarmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Diğer taraftan kanonik olmayan miRNA'ların keşfi nedeniyle miRNA'lar ve diğer küçük RNA'lar arasındaki sınırlar giderek belirsizleşmektedir. İleride alternatif biyogenez yolları tanımlanabilir ve bu alternatif yolların kullanımının çeşitli hücresel koşullar altında farklı şekilde düzenlenip-düzenlenmediğinin tespiti ilginç bilgiler sağlayacaktır (147).

2.2.3. miRNA'ların Fonksiyonları

miRNA'ların biyolojik işlevlerinin tespiti genellikle hayvan nakavt modelleri ve transgenik aşırı ekspresyon deneyleri ile gerçekleştirilmektedir (162). Bir fenotipik etkiyi tespit etmek için bir miRNA ailesinin birkaç üyesinin inaktive edilmesi gerektiği görülmektedir (163). Farelerde, miRNA aile üyelerinin bolluğu genellikle fenotiplerin belirgin hale gelmeden önce birden fazla aile üyesinin bozulmasını gerektirirken, Drosophila'da ise korunmuş bir miRNA ailesinin yalnızca bir üyesinin silinmesi anormal fenotiplerle sonuçlanmaktadır. En dikkate değer istisnalar, her birinin yalnızca bir kopyasının silinmesinin hem farelerde hem de insanlarda haploin yetersiz anormalliklere neden olan miR-96 ve miR-17~92

lokuslarıdır. miR-96'nın bir kopyasının kaybı sağırlığa neden olurken, miR-17~92 kümesinin bir kopyasının silinmesi ise iskelet anomalilerine, büyüme kusurlarına ve öğrenme problemlerine neden olmaktadır (154, 156). Genel olarak, tek tek dokuların belirlenmesi ve gelişimi için miRNA'lar gerekli değildir. Farelerde kardiyak spesifik miR-208'in silinmesine rağmen, yine de bir kalp gelişmektedir. Bireysel miRNA'ların doku homeostazını koruduğu düşünülmektedir. Örneğin, miR-208 eksikliği olan hayvanlarda stres yanıtında kayıp ve kalp hipertrofisi görülmektedir. Dokuya özgü miRNA'nın çoğunun hastalıklarda azalması nedeniyle, doku farklılaşma sürecini devam ettirmek için miRNA'ların gerekli olabileceği öne sürülmüştür (156,162). Transgenik aşırı ekspresyon çalışmaları, bireysel miRNA'ların biyolojik rollerinin tanımlanması için kullanılsa da verilerin yanlış yorumlanmasına yol açabilecek aşırı ekspresyon artefaktı dezavantajına sahiptir (162). Örneğin memelilerde, miR-34 ailesi üyelerinin aşırı ekspresyonunun p53'ün yolağında güçlü bir tümör baskılayıcı olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, farelerde tüm miR-34 üyelerinin silinmesine rağmen, çeşitli hücresel hasara karşı normal p53 yanıtları sergilenmiştir (156,163).

2.2.4. Epigenetikte miRNA'ların Rolü

Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerin eşlik etmediği, gen ekspresyonunda mitotik ve/veya mayotik kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır (164). Epigenetik kalıtım, farklılaşma, dişi memelilerin X kromozomu (Xi) gibi kromozomal alanların susturulması, kök hücre plastisitesi, yaşlanma ve genomik baskılanma gibi birçok fizyolojik süreçte önemlidir (165). Patolojik epigenetik değişiklikler, gen fonksiyonunu bozan mutasyonlara ve kromozomal değişikliklere alternatif olarak kabul edilmektedir. Kanser sürecinde DNA'nın global hipometilasyonunu, tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki CpG adalarının hipermetilasyonunu, kromatin değişikliklerini ve baskılanma kaybını kapsamaktadır (166). Epigenetik düzenlenme, aralarında sıkı iş birliği olan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları şeklinde iki kategoride gerçekleşmektedir (164,167).

DNA metilasyonu ağırlıklı olarak CpG adalarının dinükleotid dizisinin sitozininde bulunur. miRNA genlerinin promotörü içindeki CpG adalarının hipermetilasyonu, gen susturma potansiyeli ve tümör baskılama özelliklerinden

sorumludur (168). Tipik olarak, miRNA promotörleri içindeki CpG adacıklarının metilasyonu, metilasyon bağlayıcı proteinin DNA'ya bağlanmasını sağlayarak ve transkripsiyon faktörleri ile RNA polimerazın DNA'ya bağlanmasını önleyerek miRNA gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olmaktadır. Tersine, CpG adacıklarının hipometilasyonu gen ekspresyonunu aktive etmekte ve kanser oluşumunu desteklemektedir (169). Örneğin miR-424'ün promotör CpG adalarının gliomada hipermetilasyonu, hücre istilası ve göçü ile ilişkili miR-424 ekspresyonunu azaltmakta ve hücre apoptozunu arttırmaktadır (170). miR-10b promotörünün hipermetilasyonu ise berrak hücreli renal hücreli karsinom (ccRCC)'da tümör baskılayıcı bir rol üstlendiği gösterilen miR-10b'nin ekspresyonunu baskılamakta ve ccRCC'nin ilerlemesini desteklemektedir (171). miRNA genlerinin kapsamlı analizinde bu genlerin yaklaşık yarısının CpG adaları ile ilişkili olduğunu ve bu durumunda onların DNA metilasyonunun düzenlenmesine tabi tutulabileceklerini düşündürmektedir (168, 172).

Kromatinin protein omurgasını oluşturan histonlar, lizin asetilasyonu, lizin ve arginin metilasyonu, serin treonin ve tirozin fosforilasyonu, glutamik asit ADP-ribosilasyonu, lizin ubikitinasyonu ve sumolasyonu dahil çok sayıda modifikasyona uğrayabilirler (173). Bu tür kovalent modifikasyonlar, kromatinin erişilebilir formda mı (ökromatin) yoksa erişilemeyen formda mı (heterokromatin) olduğunu belirleyerek kromatin lifinin fiziksel özelliklerini doğrudan değiştirebilmektedir (174). Kromatin durumundan sorumlu olan bu histon modifikasyonları, "histon kodu"nu oluşturmaktadır. Örneğin, ökromatinde H3 ve H4 histonlarının asetilasyonu ve histon H3'te (H3K4me) lizin 4'ün metilasyonu transkripsiyonel aktivasyona yol açarken, heterokromatinin karakteristik bir işareti olan histon H3 lizin 9 (H3K9me)'un di- veya trimetilasyonu transkripsiyonel baskılanmaya aracılık etmektedir (175). Bu histon modifikasyonları, birkaç histon deasetilaz (HDAC) ve histon metiltransferaz (HMT) tarafından katalizlenebilir. Son olarak, policomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2), heterokromatinin karakteristik bir işareti olan histon H3 lizin 27 (H3K27me3)'yi trimetile ederek epigenetik gen susturulmasına aracılık edebilmektedir (164, 176).

2.2.5. miRNA’ların Hastalıklarla İlişkisi ve Klinik Önemi

2.2.5.1. miRNA’ların kanserle ilişkisi: Protein kodlayan genler gibi miRNA'lar da onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak işlev görmekte ve çeşitli hedef genleri düzenleme kapasiteleri nedeniyle yeni terapötik hedefler ve fenotipik belirteçler olarak ortaya çıkmaktadırlar (177). miRNA'ların kanserle ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışma, miR-15 ve miR-16'nın B-hücreli kronik lenfositik lösemilerin (B-CLL) %68'inde silindiği veya downregüle olduğuna yöneliktir (178). Akciğer kanserinde, hsa-mir-155'in yüksek ekspresyon düzeyi çok değişkenli analizin yanı sıra tek değişkenli analizde de düşük sağkalım ile ilişkili olduğu ve ayrıca belirli ekspresyon profillerinin tümörü normal dokulardan ayırabildiği ifade edilmiştir (179,180).

2.2.5.2. miRNA’ların nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi: Alzheimer hastalığı ile ilişkili olarak miR-29a, miR-29b ve miR-29c şeklindeki miR-29 aile üyelerinin farelerde ikinci haftadan itibaren ekspresyon seviyesinin zamanla arttığı, bu durumun da nöronal homeostaz ile yaşlanma sürecinde nöronların korunması bakımından kritik olduğunu göstermiştir (181). miR-15'in deneysel Alzheimer modellerinde ve Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvısı (BOS)'nda down regüle olduğu ve bu durumun da ERK1 seviyelerini yükselterek NFT'lerin ana bileşeni olan Tau'nun hiperfosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (182,183). Parkinson hastalığı ile ilişkili olarak, embriyonik kök hücre kültürlerinde Dicer'in silinmesinin dopaminerjik nöron kaybına yol açtığı, Dicer içermeyen fare modelinde de benzer sonuçların elde edildiği ve mezensefalon dopaminerjik nöronları ve onların nigrostriatal aksonal projeksiyonlarında ilerleyici bir kayıp olduğu tespit edilmiştir. Bu süreç ile bağlantılı miR-133b’nin iki farklı Parkinson fare modelinde (Aphakia fareleri ve 6-OHDA modeli) kontrol grubuna göre azaldığı bulunmuştur (184). Ayrıca, MiR-133b'nin aşırı ekspresyonu MiR-133b'nin Parkinson hastalığının patogenezinde nedensel bir rol oynadığı belirtilmiştir (183,184). Huntington hastalarına ilişkin olarak kortekste eksprese edilen 380 miRNA'dan miR-100, miR-106b, miR-148b, miR-151, miR-222, miR-382 ve miR-383’ün önemli ölçüde bozulduğu ifade edilmiştir (185).

2.2.5.3. miRNA'ların metabolik bozukluklarla ilişkisi: Glukoz metabolizması ile insülin sekresyon ve duyarlılığında düzenleyici olarak işlev gören

miRNA'lar, dünya çapında en yaygın metabolik bozukluk olan diabetes mellitusta önemli görünmektedir (186). Dicer1 enziminin koşullu delesyonu uygulanan hayvanların insülin üreten pankreas hücrelerinde ciddi bir azalma olduğu için, normal pankreas gelişiminde özgün bir miRNA ekspresyon profilinin gerekli olduğu düşünülmektedir (187). Diğer taraftan yetişkin β-hücrelerinde miR-24, miR-26, miR-182 ve miR-148'i içeren yeni bir miRNA ağının, Bhlhe22 ve Sox6 gibi insülin transkripsiyonel baskılayıcılarını hedefleyerek insülin içeriğini düzenlediği bildirilmiştir. Dicer1 silindiğinde, önceki transkripsiyonel baskılayıcılar up regüle olurken, β-hücreleri insülin protein içeriğinde ve mRNA seviyelerinde bir azalma gözlenmiştir (188). Diğer taraftan karaciğerde miR-122'nin lipid ve kolesterol homeostazına katkıda bulunduğu hem normal hem de diyete bağlı obez farelerde miR-122 inhibisyonunun plazma kolesterol seviyesini düşürdüğü ifade edilmiştir (180,189).

2.2.5.4. miRNA'ların kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi: Kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği ile doğrudan bağlantılı benzersiz miRNA ifade kalıpları tanımlanmıştır. Her ikisi de şiddetli hipertrofi ile sonuçlanan torasik aort bağlamasına tabi tutulan veya aktive edilmiş kalsinörin eksprese eden farelerde up regüle veya down regüle olan yaklaşık 12 miRNA'lık bir panel saptanmıştır. Özellikle bu panelde bulunan miR-195'in aşırı ekspresyonunun transgenik farelerde kalp hipertrofisi ve kalp yetmezliğini başlatmada önemli olduğu bulunmuştur (190). Koroner arter hastalığı olan hastalarda ve miyokard enfarktüsü geçirmiş sıçan kalbinde miR-1 yüksek ekspresyon seviyeleri göstermektedir (180). miRNA'ların ayrıca iskemi sonrası anjiyogenik süreçlere de katkı sağladığı, gelişim sırasında anjiyogenez için çok önemli bir molekül olan miR-126'nın inhibisyonunun iskemiye maruz kaldıktan sonra *İn vivo* olarak sorunlu bir anjiyogenik tepkiye neden olduğu ifade edilmiştir (191).

2.2.6. miRNA'ların Biyobelirteç Olarak Kullanımı

2.2.6.1. miRNA'ların biyobelirteç olarak kanserle ilişkisi: Son yıllarda serum, plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunan miRNA'ların tanı, prognoz ve tedavi lehine yeni ve noninvaziv biyobelirteçler olarak kullanılabileceğine yönelik kanıtlar artmıştır. İnsan prostat kanseri ksenograftlarında, tümör gelişiminden

kaynaklanan miR-144'ün plazma seviyesinin arttığı saptanmıştır (192). Diğer bir çalışmada, küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda miR-486, miR-30d, miR-1 ve miR-499'un sağkalıma ilişkin biyobelirteç olarak potansiyellerinin olduğu ifade edilmiştir (180,193).

2.2.6.2. miRNA'ların biyobelirteç olarak nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi: Nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olarak 48 Alzheimer hastası ve 22 kontrolden alınan kan örneklerinde miR-26b-3p, miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-148b-5p, miR-151a-3p ve miR-186-5p dahil olmak üzere 13 miRNA'nın up regüle olduğu, miR-15a-5p, miR-17-3p, miR-29b-3p ve miR-144-5p dahil olmak üzere 14 miRNA'nın ise down regüle olduğu tespit edilmiştir (194). Diğer bir çalışmada 158 Alzheimer hastası ve 155 eşleştirilmiş kontrolde miR-483-3p, miR-342-3p, miR-98-5p, miR-191-5p, miR-855-5p ve miR-342-3p ile birlikte let-7d-5p'nin yüksek tanısal doğruluğu olduğu ifade edilmiştir (195). Yine eşleştirilmiş kontrolleri ile birlikte mikrodizi yapılan 6 Alzheimer hastasının BOS'unda miR-9, miR-125b, miR-146a ve miR-155 aşırı eksprese olduğu görülmüştür (196). Parkinson hastaları ile ilgili olarak miR-1, miR-22 ve miR-29a'nın sağlıklı kontrollere kıyasla plazma düzeylerinin azaldığı, miR-16-2, miR-26a-2 ve miR-30a düzeylerinin ise arttığı tespit edilmiştir (197). Huntington hastalığı ile ilgili olarak, hastalığın başlangıç yaşını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada 26 Huntington hastasında 8 sağlıklı gönüllüye göre miR-10b-5p ve miR-486-5p'nin up regüle olduğu ve plazma düzeylerinin arttığı ve ayrıca miR-10b-5p seviyesinin hastalık başlangıç yaşı ile korele olduğu bulunmuştur (198).

2.2.6.3. miRNA'ların biyobelirteç olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi: Kardiyovasküler hastalıklar ile ilgili olarak, miR-208b ve miR-499'ün özellikle akut miyokard enfarktüslü hastalarda troponin T seviyeleri ile korele olarak yüksek oranda up regüle olduğu bulunmuştur (199). Bu moleküllerin yanı sıra miR-1 ve miR-133a'nın insan miyokard enfarktüsünde down regüle olmaları nedeni ile potansiyel biyobelirteçler olabilecekleri ifade edilmiştir (180,200).

2.2.7. miRNA'ların Tedavide Kullanımı

miRNA'ların tedavide kullanımlarına yönelik olarak miRNA inhibitörleri veya miRNA'ları taklit eden ajanların geliştirilmesine odaklanılmıştır. miRNA'ları inhibe etmek için antisens oligonükleotitler geliştirilmiştir. Antisens

oligonükleotitlerin kullanımı gen tedavisi metodlarına muadil olarak öne çıkmaktadır. Özellikle antimiR'ler olarak adlandırılan miRNA'ların bu rekabetçi inhibitörlerinin etkinlikleri ve biyoyararlanımlarını geliştirmek için çeşitli kimyasal modifikasyonlar uygulanmaktadır (201). Bunlardan bir tanesi, bisiklik RNA analogları sınıfını oluşturan kilitli nükleik asitin (LNA) modifikasyonuna ilişkin olup, bunlar sadece miRNA tanısında bir saptama aracı olarak değil, aynı zamanda umut verici bir LNA aracılı miRNA susturma yolu olarak da test edilmiştir (202). Minik LNA'lar olarak adlandırılan konjuge olmayan LNA ile modifiye edilmiş fosforotioat oligonükleotitlerin, tek veya tüm miRNA ailelerini inhibe ettiği, farelerin normal dokuları ve meme tümörleri tarafından artan bir alım sergilediği, doğrudan hedefleri up regüle ettiği ve çok az hedef dışı etkilerinin olduğu öne sürülmüştür (203). Farklı bir antimiR türü ise karaciğerde miR-122'ye karşı etkili olan ve antagomir olarak adlandırılan antisens, kolesterole bağlı, 20-O-metil (20-OMe) oligonükleotittir. Bu antagomir ile tedavi edilen hayvanların miR-122 ile ilişkili kolesterol biyosentez genlerinin down regüle olduğu ve plazma kolesterol seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (204). Diğer taraftan down regüle olmuş/tümör baskılayıcı miRNA'ların eski haline getirilmesi için miRNA taklitlerinin sistemik uygulanmasına yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin hepatoselüler karsinomun bir fare modelinde, adeno-ilişkili virüs tümör büyümesinin inhibisyonuna yol açan miR-26a uygulamasının etkili bir yoludur (205). Pankreas kanseri hücre hattı Mia-PaCa-2 ile enjekte edilen ksenograftlarda, miR-34a veya miR-143/145'ün tümör büyümesini oldukça etkili bir şekilde baskılandığını ifade eden çalışmada miRNA taklitlerinin uygulanması, belirgin bir toksisitesi olmayan lipid bazlı nanoparçacık (nanovektör) tarafından oluşturulan yeni sentezlenen mikroRNA ekspresyon vektörleri aracılığıyla gerçekleştirilmiştir (180,206).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. İn vivo Çalışma Dizaynı ve Deney Grupları

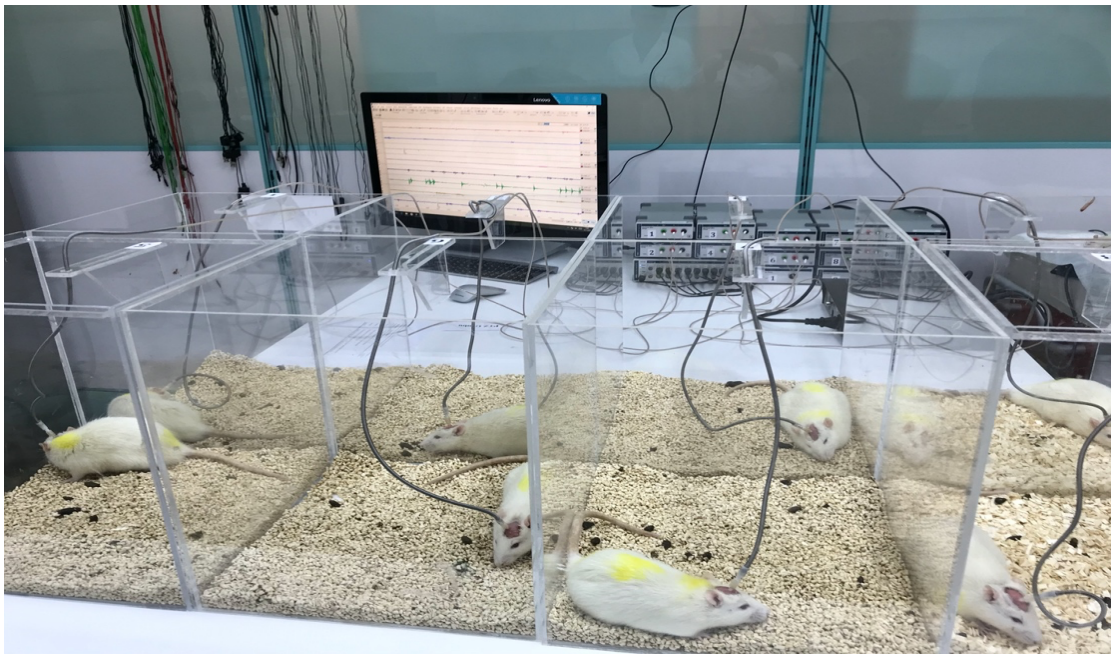
Bu doktora tez çalışması, *İn vivo* olarak dizayn edilen deneysel status epileptikus modeli oluşturulmuş ve farklı antiepileptik ilaç tedavi kombinasyonları uygulanmış deney hayvanlarından elde edilen kan ve beyin dokuları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dokuların alındığı ilgili *İn vivo* deneysel çalışma, satus epileptikus modeli oluşturulan deney hayvanlarında uygulanan antiepileptik ilaç kombinasyonlarının etkinliğini elektrofizyolojik ve davranış çalışmaları ile incelemeyi amaçlayan bir deney dizaynı olup, Sağlık Bilimleri Üniversitesi (SBÜ) Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan onay ile (Karar no: 2020-03/15) ile SBÜ Hamidiye Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir (207). Sunulan doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* moleküler çalışmaların anlaşılabilmesi için yöntem bölümünde öncelikle miRNA için incelenen dokulara kaynaklık eden *İn vivo* deney dizaynı hakkında bilgi verilecektir.

İn vivo deneysel çalışmalarda 270±30 g aralığında toplam 96 adet erişkin erkek Sprague-Dawley sıçan her grupta 8 denek olacak şekilde 12 gruba ayrılarak kullanıldı. Deneylerde kullanılan hayvanlar SBÜ Hamidiye Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiş olup, deney öncesinde hayvanlar alabildikleri kadar yem ve su temini ile standart bakım koşulları (21 ^{o}C ortam sıcaklığı, %65-70 nem ve 12-12 saat aydınlık-karanlık döngüsü) uygulanmıştır (207). Sunulan doktora tez çalışması kapsamındaki kan ve beyin dokularında miRNA analizlerine yönelik olarak SBÜ Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan ayrı bir etik kurul onayı (Karar no: 2020-06/01) alınmıştır.

İn vivo deneysel çalışmalarda sıçanlar intraperitoneal (ip) olarak enjekte edilen ketamin hidroklorür (HCI; 90 mg/kg) ve ksilazin HCI (10 mg/kg) kombinasyonu ile anasteziye alındıktan sonra, rostrokaudal eksende kafa derisi insize edilerek uçları epidural olarak yerleştirilen tripolar EEG elektrodu (MS333/2A, P1 Technologies,

Roanoke, VA) çelik vidalar ve dental akrilik yardımı ile kraniyuma sabitlendi. Tripolar EEG elektrodunun pozitif ve negatif uçları sırası ile Bregma'ya göre AP +2.0 mm / L 3.5 mm ve AP -6.0 mm / L 4.0 mm, referans elektrot ise Lambda'ya göre orta hatta -2 mm koordinatlara yerleştirildi (207,208,209).

Hayvanlara elektrot yerleştirildikten 7 gün sonra subkutan (sc) lityum klorür (5 mEq/kg) ve 16 saat sonra ip olarak pilokarpin HCI (320 mg/kg) enjekte edilerek status epileptikus başlatıldı. Pilokarpin HCI ile birlikte periferik kolinerjik yan etkileri (bronşiyal sekresyon vb.) hafifletmek için skopolamin metil bromür (MBr; 1 mg/kg, ip) uygulandı. Pilokarpin HCI enjeksiyonunun ardından yaklaşık 5-10 dk'lık bir zaman diliminde status epileptikus başladığı, gerek yapılan video-EEG kaydı gerekse de Racine skorlaması ile doğrulandıktan 30 dk sonra pilokarpin HCI'nın fazlalığını ortamdan süpüren fakat nöbetleri etkilemeyen skopolamin HCI (10 mg/kg) ip olarak uygulandı. Skopolamin HCI' enjeksiyonunun hemen ardından antiepileptik ilaç kombinasyonları ip yolla uygulanarak 3 saat daha video-EEG kaydına devam edildi (Şekil 3.1). *İn vivo* deney dizaynı kapsamında oluşturulan deney grupları ve ip olarak uygulanan antiepileptik ilaçlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır (Tablo 3.1; 207).



Şekil 3.1: İn vivo deneysel çalışma aşamasına ilişkin video-EEG kaydı

Tablo 3.1: İn vivo çalışmalara ilişkin deney grupları

Deney Grupları	Uygulanan Antiepileptik İlaçlar
Kontrol grubu	Serum fizyolojik (2 ml/kg)
Status epileptikus (SE) grubu	Li-pilokarpin (320 mg/kg)
SE+MDZ grubu	SE sonrası (MDZ 9 mg/kg)
SE+MDZ+fPHT grubu	SE sonrası MDZ (9 mg/kg) + (fPHT 100 mg/kg)
SE+MDZ+VPA grubu	SE sonrası MDZ (9 mg/kg) + (VPA 300 mg/kg)
SE+MDZ+LEV grubu	SE sonrası MDZ (9 mg/kg) + (LEV 200 mg/kg)
SE+MDZ+LCM grubu	SE sonrası MDZ (9 mg/kg) + (LCM 50 mg/kg)
SE+CLZ grubu	SE sonrası CLZ (1 mg/kg)
SE+CLZ+fPHT grubu	SE sonrası CLZ (1 mg/kg) + (fPHT 100 mg/kg)
SE+CLZ+VPA grubu	SE sonrası CLZ (1 mg/kg) + (VPA 300 mg/kg)
SE+CLZ+LEV grubu	SE sonrası CLZ (1 mg/kg) + (LEV 200 mg/kg)
SE+CLZ+LCM grubu	SE sonrası CLZ (1 mg/kg) + (LCM 50 mg/kg)

3.1.2. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Sunulan doktora tez çalışmasında kullanılan kan ve doku örnekleri SBÜ Hamidiye Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülen *"Deneysel Status Epileptikusta Midazolam ve Klonazepamın İkinci Basamak Tedavide Kullanılan Antiepileptik İlaçlarla Etkileşimi"* başlıklı doktora tez çalışmasının 12 ayrı deney grubunda yer alan 96 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçandan elde edildi (207). *İn vivo* çalışmalar kapsamında status epileptikus oluşturulduktan ve antiepileptik ilaçlar ile politerapi uygulandıktan sonra 18 gün boyunca elektrofizyolojik ve davranış deneyleri yapıldı. *İn vivo* deneysel çalışmaların tamamlandığı status epileptikus sonrası 18. günde status sonrası sağ kalan hayvanlara servikal dislokasyon uygulanarak diseksiyon ile beyin dokusu ve intrakardiyak kan dokusu alındı. Sunulan çalışmada kullanılan dokuların büyük bir kısmı 18. gündeki diseksiyon elde edilmiş olup, bir kısım örnek ise status epileptikusa bağlı yüksek mortaliteye nedeni ile 18. günden daha önce hayvanlar statusa bağlı hayatını kaybettikten hemen sonra, kardiyak arrest gerçekleşmeden önce servikal dislokasyon uygulanarak elde edildi. Bu süreçte 12 deney grubundan toplam 70 kan ve 70 beyin dokusu örneği elde edilmiştir. *İn vivo* deney dizaynındaki 12 deney grubu ve toplam 96 hayvan dikkate alındığında, status epileptikusa bağlı olarak gerçekleşen mortalite nedeni ile gözlem

saatleri dışında ve gece saatlerinde gerçekleşen kayıplardan dolayı 26 hayvandan doku elde edilememiştir.

Dokuların elde edilme sürecinde, servikal dislokasyon uygulandıktan hemen sonra diseksiyon ile hayvanların göğüs kafesi hızlı bir şekilde açılarak intrakardiyak olarak 1 ml kan örneği alındı. Kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak 4.000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri çalışma yapılıncaya kadar -80 °C'de saklandı. Kan örneği alındıktan hemen sonra diseksiyon ile beyin total olarak çıkarıldı ve beyin hemisferleri korpus kallozum seviyesinden kesilerek birbirinden ayrıldı. Sağ hemisfere ilişkin kortikal ve hipokampal beyin dokuları eppendorf tüplere alınarak çalışma yapılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3.2: Deneylerde kullanılan kimyasalların adı ve kullanım amaçları

Kimyasalın Adı (Üretici Firma)	Kullanım Amacı
Beta-merkapto-etanol (M7522, Sigma, St. Louis, USA)	Hücrelerin parçalanması (lizis)
Etil alkol (%99, Merck)	RNA'nın çöktürülmesi (Presipitasyon)
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (9884, Sigma, St. Louis, USA)	Kan örneklerinin toplanması
Hidrojen peroksit (349887, Sigma, St. Louis, USA)	Labaratuvar sterilizasyonu
İzopropanol (19516, Sigma, St. Louis, USA)	RNA'nın çöktürülmesi (Presipitasyon)
Kloroform	RNA pürifikasyonu
Lityum klorür (LiCl) (203637, Sigma, St. Louis, USA)	Status epileptikusun oluşturulması
Pilokarpin HCI (P6503, Sigma, St. Louis, USA)	Status epileptikusun oluşturulması
Skopolamin metil bromür (Sc MBr) (S8502, Sigma, St. Louis, USA)	Periferik sekresyonun azaltılması
Skopolamin hidroklorür (Sc HCl) (sc-253544, ChemCruz, Dallas, USA)	Status epileptikus oluştuktan sonra mevcut pilokarpinin süpürülmesi
Midazolam (MDZ) (Sedever, Haver Ecza, İstanbul, Türkiye)	Status epileptikusun tedavisi
Klonazepam (CLZ) (Rivotril, Deva İlaç, Tekirdağ, Türkiye)	Status epileptikusun tedavisi
Fosfenitoin (fPHT) (sc-357360, ChemCruz, Dallas, USA)	Status epileptikusun tedavisi
Valproik asit (VPA) (Depakin, Sanofi Ltd.Ş., İstanbul, Türkiye)	Status epileptikusun tedavisi
Levetirasetam (LEV) (Levetam, Polifarma İlaç A.Ş., Tekirdağ, Türkiye)	Status epileptikusun tedavisi
Lakosamid (LCM)	Status epileptikusun tedavisi

İn vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda kullanılan ilaç ve kimyasalların adı, üretici firması ve deneylerdeki kullanım amaçları tablo 3.2'de yer almaktadır.

3.1.4. Deneylerde Kullanılan Kitler

İn vitro deneysel çalışmalarda kullanılan kitlerin adı, üretici firması ve kullanım amaçları tablo 3.3'de yer almaktadır.

Tablo 3.3: Deneylerde kitler ve kullanım amaçları

Kitin Adı	Kullanım Amacı
miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen Cat. No: 217184)	Plazmadan miRNA izolasyonu
miRNeasy Tissue/Cells Advenced Mini Kit (Qiagen-50 Cat. No: 217604)	Beyin dokusundan miRNA izolasyonu
miRCURY LNA RT Kit (Qiagen Cat No: 339340)	cDNA sentezi
miRCURY LNA SYBR Green Master Mix (Qiagen Cat No: 339347)	qRT-PCR'ın gerçekleştirilmesi

3.1.5. Deneylerde Kullanılan Tampon, Solüsyon ve Çözeltiler

İn vitro deneysel çalışmalarda kullanılan tampon, solüsyon ve çözeltilerin adı ve kullanım amaçları tablo 3.4'de yer almaktadır.

Tablo 3.4: Deneylerde kullanılan tampon, solüsyon ve çözeltiler

Tampon, Solüsyon veya Çözeltinin Adı	Kullanım Amacı
RLT Buffer (1ml RLT Buffer için 10µl β-merkaptoetanol eklendi)	Hücre ve dokunun lizis edilmesi
QIAzol lizis reaktifi	Yağ dokusunun lizis edilmesi
Spike-in Control (1.6x108 copies/ µl)	Ölçümlerin kalibre edilmesi
RWT Buffer	RNA pürifikasyonu
RPE Buffer	Yıkama yapılması
AL Buffer	Hücre ve çekirdeğin parçalanması (lizis)

3.1.6. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

İn vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların adı, marka ve modeli ile kullanım amacı tablo 3.5'de yer almaktadır.

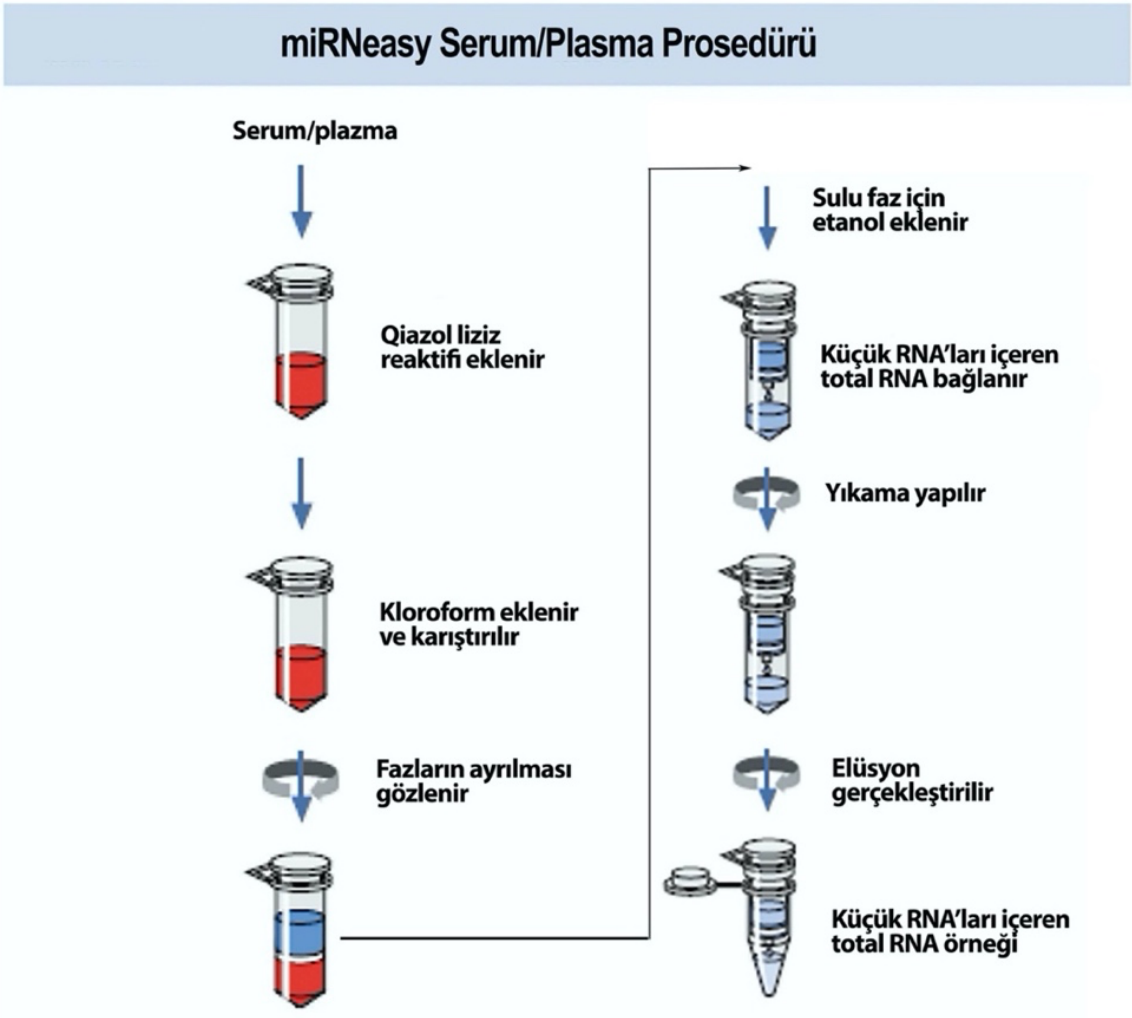
Tablo 3.5: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Kullanılan Cihazlar Mevcut (Marka ve Model)	Bulunduğu Kurum/Kuruluş	Kullanım Amacı
PCR Cihazı (Thermal Cycler) (Blue-Ray/tcst-9620)	Tıbbi Biyoloji ABD	PCR işlemi
Derin Dondurucu (-80ºC) (DAIHAN/Duo Freez U500)	Tıbbi Biyoloji ABD	Örneklerin muhafazası
Derin Dondurucu (-20ºC) (BOSCH/GSN36AI31)	Tıbbi Biyoloji ABD	Örneklerin muhafazası
Mikrodalga fırın (BEKO/MD2610)	Tıbbi Biyoloji ABD	Elektroforez işlemi
Hassas Terazi,0.1mg hassasiyet (SHIMADZU/ATX224, SEG)	Tıbbi Biyoloji ABD	Solüsyon hazırlanması
Otomatik pipet seti (Eppendorf)	Tıbbi Biyoloji ABD	Moleküler çalışmalarda
Isıtıcı Blok Stuart (SBH130D)	Tıbbi Biyoloji ABD	Moleküler Çalışmalarda
Mikroskop (Leica/LEICADM1000LED)	Tıbbi Biyoloji ABD	Doku örneklerinin incelen.
Elektroforez (Hoefer)	Tıbbi Biyoloji ABD	Gen ekspresyon çalışmasında
Jel Görüntüleme Sistemi (CCD kameralı) (Syngene/G:BoxF3)	Tıbbi Biyoloji ABD	Agaroz jel sonrası sonuçların incelenmesinde
UV Transluminatör (Yatay) (DAIHAN-Wisd/WUV-L20)	Tıbbi Biyoloji ABD	Moleküler genetik çalışmalarında
Spektrofotometre ve Florometre (DENOVIX/DS-11FX)	Tıbbi Biyoloji ABD	DNA/RNA/miRNA/protein miktar tayini
Masaüstü soğutmalı ultrasantrifüj	Tıbbi Biyoloji ABD	Genel kullanım
Horizontal Elektroforezler (Hoefer)	Tıbbi Biyoloji ABD	Agaroz jel yürütme
Güç Kaynağı (Hoefer/PS300B)	Tıbbi Biyoloji ABD	Elektroforez işleminde
İnkübator (DAIHAN/ IG-50)	Tıbbi Biyoloji ABD	İmmünhistokimyasal ve inkübasyon çalışmalarında
Vorteks 4S (DAIHAN- Wisd/ VM-10)	Tıbbi Biyoloji ABD	Genel kullanım
Distile su cihazı	Tıbbi Biyoloji ABD	Genel kullanım
Kar buz makinesi	Tıbbi Biyoloji ABD	Genel kullanım
Real-time PCR (Roche, LightCycler 480 II)	Tıbbi Biyoloji ABD	PCR işlemi
Buzdolabı (+4, Arçelik)	Tıbbi Biyoloji ABD	Genel kullanım
Elektrofizyolojik Veri Kazanım Sistemi (Power Lab 16 Kanal, ADInstrument)	Tıbbi Fizyoloji ABD	Elektrofizyolojik kayıttta
Animal Biyoamplifikatör (8 adet; ADInstrument)	Tıbbi Fizyoloji ABD	Elektrofizyolojik kayıt alın.
Cerrahi Mikroskop (WPI)	Tıbbi Fizyoloji ABD	Cerrahi işlemlerde
Homoetermik Battaniye Sistemi (Harward Instrument)	Tıbbi Fizyoloji ABD	Anestezideki hayvanların vücut ısılarının korunması
Mikromotor	Tıbbi Fizyoloji ABD	Cerrahi işlemle elektrotların yerleştirilmesi
Soğuk Işık Kaynağı (WPI)	Tıbbi Fizyoloji ABD	Cerrahi işlemlerde
Stereotaksi Cihazı (Stoelting)	Tıbbi Fizyoloji ABD	Cerrahi işlemlerde
Hassas Terazi	Tıbbi Fizyoloji ABD	Kimyasalların tartılması

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. miRNA İzolasyonu

3.2.1.1. Plazmadan miRNA İzolasyonu: Plazmadan miRNA izolasyonu için miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Germany Cat. No: 217184) kullanıldı.



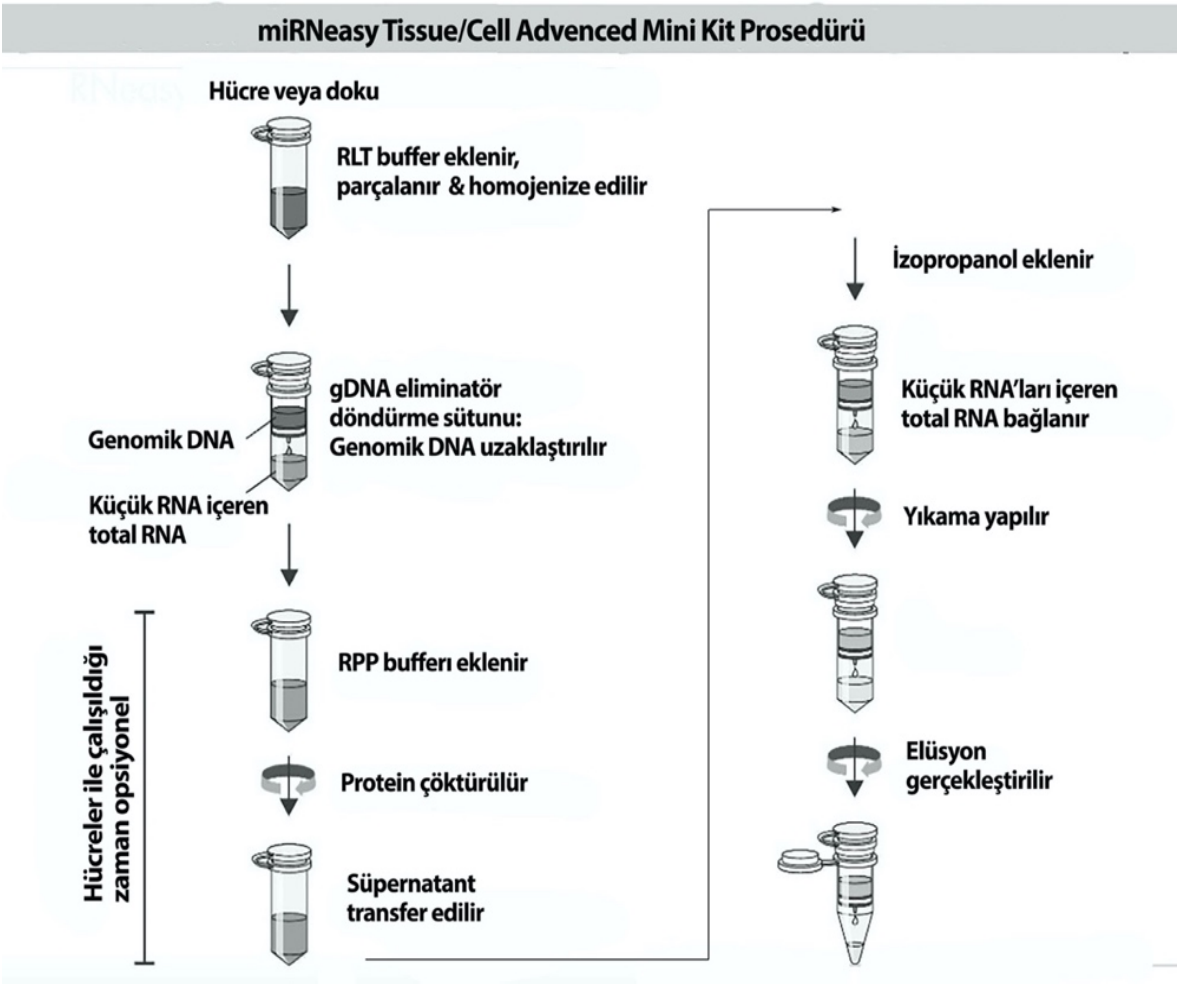
Şekil 3.2: Plazmadan miRNA izolasyon prosedürü

Kit protokolüne göre plazmadan miRNA izolasyonu aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi:

- Plazmalar -80’ den çıkarılıp buz içerisinde çözünmeye bırakıldı.
- Her bir plazma örneğinden 200 µl alınarak 2 ml’lik ependorflara aktarıldı, üzerine 1 ml QIAzol Lizis reaktifi eklendi ve vortekslenerek homojenatta partikül kalmaması sağlandı.
- Homojenat oda sıcaklığında (15-25°C) 5 dakika inkübe edildi.
- Her bir örnek için 3,5 µl miRNeasy Serum/Plazma Spike-in Control eklendi ($1.6x10^8$ copies/ µl).
- Üzerine 200 µl kloroform eklenerek ependorflar 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalandı.
- Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi.
- +4°C’ de 12.000 rcf hızla 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni bir toplama tüpüne aktarılarak miktarı kaydedildi. Üzerine 1,5 katı hacimde %100’lük etanol eklendi (600 µl süpernatant için 900 µl etanol).
- Efendorfdaki bu karışımdan 700 µl alınarak 2 ml’lik toplama tüpü içinde yer alan RNeasy MinElute döndürme kolonuna aktarıldı, +18°C’de 8.000 rcf hızla 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki içerik dökülerek yeniden kullanıldı.
- RNeasy MinElute döndürme kolonuna 700 µl RWT Buffer eklendi, +18°C’de, 8.000 rcf hızla 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki içerik dökülerek yeniden kullanıldı.
- RNeasy MinElute döndürme kolonuna 500 µl RPE Buffer eklendi, +18°C’de, 8.000 rcf hızla 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki içerik dökülerek yeniden kullanıldı.
- RNeasy MinElute döndürme kolonuna 500 µl %80’ lik etanol eklendi, +18°C’de 8.000 rcf hızla 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
- RNeasy MinElute döndürme kolonu 2 ml’lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirldi. Kurutma amacıyla döndürme kolunun kapağı açık şekilde, 14.000 rcf ‘de 5 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.

- RNeasy MinElute döndürme kolonu yeni bir (1,5ml' lik) toplama tüpüne yerleştirildi. Döndürme kolonuna 10 µl RNase Free Water eklendi, 14.000 rcf'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA'nın membrandan ependorfa geçmesi sağlandı.
- RNA kalitesinin belirlenmesi için NanoDrop spektrofotometre ile konsantrasyon ölçümleri yapıldı.
- Elde edilen miRNA -80 °C'de saklandı.

3.2.1.2. Dokudan miRNA İzolasyonu: Beyin dokusundan miRNA izolasyonu için miRNeasy Tissue/Cell Advenced Mini Kit (Qiagen, Germany Cat. No: 217604) kullanıldı.



Şekil 3.3: Doku miRNA izolasyon prosedürü

Kit protokolüne göre beyin dokusundan miRNA izolasyonu aşağıdaki basamaklarada gerçekleştirildi:

- Dokular -80'den çıkarılıp buz içerisinde çözünmeye bırakıldı.
- 20 mg doku için 260 µl RLT Buffer eklendi (1 ml RLT Buffer için 10 µl β-merkaptoetanol eklendi).
- Dokular homojenizatöre yerleştirilerek 50 rpm'de 3 dakika lizis edildi.
- Lizis sürecinde oluşan köpüğün azalması için örnekler -20°C'de 10 dakika bekletildi.
- Homojenize lizat köpüksüz şekilde yeni bir ependorfa aktarıldı.
- Üzerine 80 µl AL Buffer eklendi ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Tüp içeriğinin tamamı 2 ml'lik toplama tüpü içerisinde bulunan gDNA Eliminator döndürme kolonuna aktarıldı. 8.000 rcf'de 30 saniye sentrifüj edildi. gDNA Eliminator döndürme kolonu atıldı.
- Toplama tüpündeki içeriğin üzerine 1.000 µl izopropanol eklendi.
- Örneğin tamamı RNeasy mini döndürme kolonuna aktarıldı (Örneğin 700 µl'den fazla olması halinde bu işlem iki aşamada gerçekleştirildi). 8.000 rcf'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü dökülerek tekrar kullanıldı.
- RNeasy mini döndürme kolonuna 700 µl RWT Buffer eklendi. 8.000 rcf'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü dökülerek tekrar kullanıldı.
- RNeasy mini döndürme kolonuna 500 µl RPE Buffer eklendi. 8.000 rcf'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü dökülerek tekrar kullanıldı.
- RNeasy mini döndürme kolonuna 500 µl %80'lik etanol eklendi. 8.000 rcf'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
- RNeasy mini döndürme kolonu yeni bir 2 µl'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Membranı kurutmak için 14.000 rcf'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
- RNeasy mini döndürme kolonu yeni bir 1,5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve kolon membranına 20 µl RNase-free water gezdirilerek eklendi.
- 14.000 rcf'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA izolasyonu tamamlandı.
- RNA kalitesinin belirlenmesi için NanoDrop spektrofotometre ile konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Elde edilen miRNA -80°C' de saklandı.

3.2.2. cDNA Eldesi

cDNA (complementary DNA) sentezi için miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Germany Cat.No. 339340) kullanıldı.

Kit bileşenleri çalışma yapılıncaya kadar -20°C'de, plazma ve dokuya ait RNA örnekleri ise -80°C'de saklandı. Çalışmaya başlamadan önce kit bileşenlerinin ve RNA örneklerinin buz üzerinde çözünmesi sağlandı. RNA konsantrasyonları 50 ng/µl olarak normalize edildi.

Tablo 3.6: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
5xmiRCURY RT Reaction Buffer	2 µl
RNase free water (dH2O)	5 µl
10x miRCURY RT Enzym Mix	1 µl
Template RNA(5ng/µl)	2 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	***10 µl***

Tablo 3.7: RT-PCR termal döngü değerleri

Adım	Zaman	Sıcaklık
Ters transkripsiyon adımı	60 dakika	42°C
Reaksiyonun inaktivasyonu	5 dakika	95°C
Saklama	Sonsuza kadar	4°C

cDNA sentezi için tablo 3.6'da belirtilen miktarlarda reaksiyon bileşenleri kullanıldı. Reaksiyon tablo 3.7'de verilen PCR termal döngü değerleri ile gerçekleştirildi.

3.2.3. qRT- PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyonu Analizi

RT-PCR süreci miRCURY LNA SYBR Green PCR kit (Qiagen, Germany Cat.No. 339347) kullanılarak gerçekleştirildi.

qRT-PCR sentez reaksiyonu öncesinde cDNA'ların dilüsyon oranlarını belirlemek amacıyla kontrol PCR'ı gerçekleştirildi. Kontrol PCR'ına ait reaksiyon bileşenleri ve hacimleri tablo 3.8'de, döngü koşulları ise tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.8: cDNA kontrol PCR'ı reaksiyon bileşenleri ve hacimleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
2x miRCURY LNA SYBR green Master Mix	5 µl
RNase free water (dH2O)	2 µl
PCR miRCURY LNA miRNA Primer Assay	1 µl
cDNA	2 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	***10 µl***

Tablo 3.9: cDNA kontrol PCR'ı döngü koşulları

Adım	Sıcaklık	Zaman	Ramp Rate (°C/s)	Döngü Sayısı
Pre-Incubation	95 °C	2dk	4.4	
Amplification	95 °C	10 sn	4.4	45 Cycle
	56 °C	1dk	2.2	
	Single			
Melting Curve	95 °C	10 sn		
	60 °C	1 dk		
	97 °C	Continuous		
Cooling	40 °C	30 sn		

cDNA kontrol PCR'ı için tüm örnekler: undilüe, 1/5, 1/10, 1/25 ve 1/125 oranlarında olacak şekilde dilüe edilerek çalışıldı. cDNA kontrol PCR'ı sonrasında plazma cDNA örneklerinin 1:10, doku cDNA örneklerinin ise 1:5 oranında RNase free water ile dilüe edilmesi kararlaştırıldı. Gen ekspresyon analizi amacıyla qRT-PCR

sentez reaksiyonuna başlamadan önce cDNA örnekleri -80°C derin dondurucudan çıkarılarak buz bloklar üzerinde 15-20 dakika çözülmesi sağlandı. Tablo 3.10'da verilen oranlarda, primer sayısı kadar mix hazırlandı ve bu mixler 384'lük plate'in ilgili kuyucuğuna 5 µl olcak şekilde dağıtıldı, ardından her bir kuyucuğa 1 µl cDNA örneği eklendi. Total hacimi 6 µl olarak ayarlanan plate +4°c'de 4.000 rpm'de 1 dakika spin sonrası tablo 3.11'da verilen döngü koşullarına ayarlanarak Light Cycler 480 II PCR (Roche, Germany) cihazına yerleştirildi. miRCURY LNA SYBR Green PCR kiti (Qiagen, Cat.No. 339347) kullanılarak, aşağıdaki protokole göre qRT-PCR gerçekleştirildi.

Tablo 3.10: qRT-PCR sentez reaksiyon bileşenleri ve hacimleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
2x miRCURY LNA SYBR green Master Mix	3 µl
RNase free water (dH2O)	1 µl
PCR miRCURY LNA miRNA Primer Assay	1 µl
cDNA	1 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	***6 µl***

Tablo 3.11: qRT-PCR döngü koşulları

Adım	Sıcaklık	Zaman	Ramp Rate (°C/s)	Döngü Sayısı
Pre-Incubation	95 °C	2dk	4.8	
Amplification	95 °C	10 sn	4.8	50 Cycle
	56 °C	1dk		
	Single			
Melting Curve	95 °C	10 sn		
	60 °C	1 dk		
	97 °C	Continuous		
Cooling	40 °C	30 sn		

Ekspresyon hesaplamaları 2-ΔΔCT metodu ile yapıldı. Bulgular "Free PCR Array Data Analysis Software" programına yüklenerek analiz edildi.

Tablo 3.12: miRNA primer listesi

miRNA	Nükleotit Dizisi	Kromozom	Strand
hsa-miR-22-5p	19-AGU UCU UCA GUG GCA AGC UUU A-40	10	Forward
rno-miR-34a -3p	20-UGG CAG UGU CUU AGC UGG UUG U-41	5	Forward
hsa-miR-124-5p	14-CGUGUUCACAGCGGACCUUGAU-35	15	Forward
rno-miR-128-2-5p	15-CGGGGCCGUAGCACUGUCUGA-35	13	Forward
rno-miR-134-3p	8-UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG-29	6	Forward
mmu-miR-139-5p	7-UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG-28	1	Forward
hsa-miR-184	47-UGG ACG GAG AAC UGA UAA GGG U-68	8	Reverse
hsa-miR-199a-5p	31-CCC AGU GUU CAG ACU ACC UGU UC-53	13	Forward
rno-miR-203-a-5p	14-AGU GGU UCU UAA CAG UUC AAC-34	6	Forward
rno-miR-324-3p	16-CGC AUC CCC UAG GGC AUU GGU GU-38	10	Forward

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmaya 12 deney grubunda 96 Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan dahil edildi. Uygun olmayan ya da miRNA elde edilemeyen 26 örnek çalışmadan çıkarıldıktan sonra tek ve çoklu ilaç uygulaması yapılan, her birinde 7 örnek olan toplam 10 gruptaki (SE, SE+MDZ, SE+CLZ, SE+MDZ+fPHT, SE+MDZ+VPA, SE+MDZ+LEV, SE+MDZ+LCM, SE+CLZ+fPHT, SE+CLZ+VPA, SE+CLZ+LEV, SE+CLZ+LCM) 70 örnek ile çalışma tamamlandı. Moleküler genetik deneyler PCR Array yöntemi ile yapıldı. Elde edilen veriler 3 tekrar ile normalize edildikten sonra ekspresyon hesaplamaları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile yapıldı. Bulgular "Free PCR Array Data Analysis Software" programına yüklenerek analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. KAT DEĞİŞİM DEĞERLERİNE GÖRE UP- DOWNREGÜLE miRNA'LAR

Deneysel çalışmalarda 10-12 haftalık ortalama 270±30 g ağırlığında erkek Sprague Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar 12 gruba (n=8) ayrılarak kontrol grubu dışındaki hayvanlarda staus epileptikus modeli oluşturulmuş ve sonrasında antiepileptik ilaç uygulanmıştır. Status epileptikusa ve ilaç etkinliğine bağlı olarak gelişen mortalite nedeniyle miRNA analizi için toplamda 70 denekten doku örneği alınabilmiştir. MDZ+LEV ve CLZ+LEV gruplarındaki hayvanlardan mortalite nedeniyle örnek alınamamıştır.

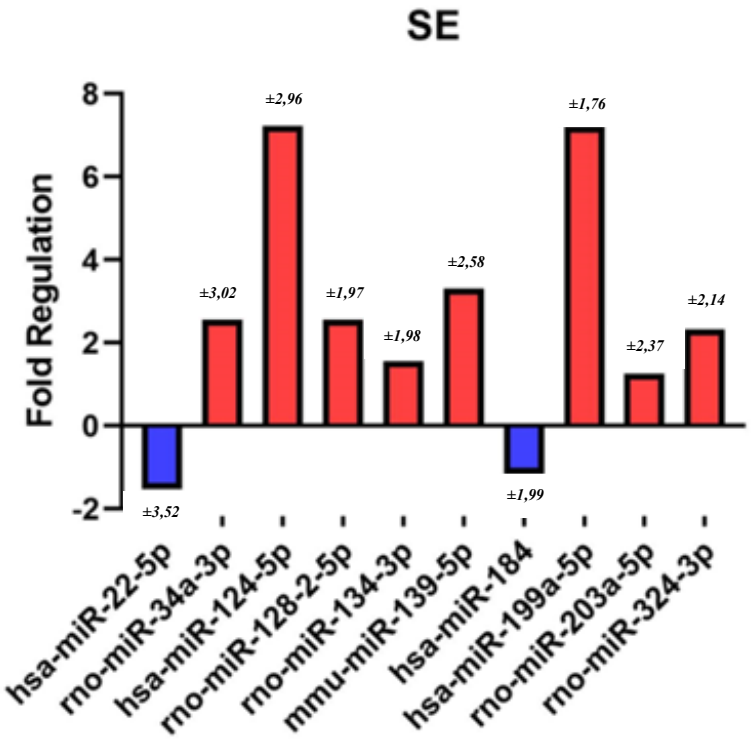
Elde edilen dokulardan PCR Array yöntemi ile Ct değerleri kullanılarak her bir miRNA'nın ekspresyon seviyesi üç tekrar yapılarak belirlendi. U6snRNA housekeeping geni kullanılarak kontrol grubu ile status epileptikus ve antiepileptik ilaç uygulanan gruplar arasındaki kat değişiklikleri hesaplandı. Deney gruplarına ait kat değişim grafikleri ve değerleri elde edildi.

miRNA ekspresyon düzeyleri açısından rno-miR-324-3p'nin MDZ grubunda downregüle (p=0,0473); rno-miR-34a-3p'nin CLZ+VPA ve CLZ+fPHT gruplarında upregüle olduğu (p=0,0074, 0,0228) tespit edildi. hsa-miR-124-5p'nin, sırasıyla MDZ+fPHT, CLZ+VPA, CLZ+LCM ve CLZ+fPHT gruplarında upregüle olduğu (p=0,0495, 0,0215, 0,0160, 0,0041) bulundu. rno-miR-128-2-5p CLZ+fPHT grubunda upregüleyken (p=0,0013), rno-miR-134-3p'nin de CLZ+VPA grubunda upregüle olduğu (p=0,0215) saptandı. mmu-miR-139-5p'nin MLZ+fPHT ve CLZ+fPHT gruplarında upregüle (p=0,0181, 0,0174); hsa-miR-199a-5p'nin MDZ+fPHT grubunda (p=0,0470), rno-miR-324-3p'nin CLZ+LCM grubunda (p=0.0459) upregüle oldukları bulundu.

Aşağıda her bir deney grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafikleri (kat değişimi ve standart sapma değerleri) ile miRNA'ların kat değişim ve p değerlerini gösteren tablolar yer almaktadır. Her bir deney grubuna ilişkin kat değişimi ve p değerlerini gösteren grafik ve tablolar sunulduktan sonra, MDZ ve MDZ etkileşim gruplarına ilişkin kat değişimi ve p değerlerinin yer aldığı tablo, CLZ ve CLZ etkileşim

gruplarına ilişkin kat değişimi ve p değerlerinin yer aldığı tablo ve incelenen tüm gruplara ilişkin regülasyonu değişen genlerin yer aldığı tablo verilmiştir.

Status epileptikus grubu, serum fizyolojik dışında herhangi bir ilaç uygulaması yapılmayan ve status epileptikus modeli oluşturulmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, incelenen 10 farklı miRNA'nın (hsa-miR-22-5p,rno-miR-34a-3p,hsa-miR-124-5p,rno-miR-128-2-5p,rno-miR-134-3p,mmu-miR-139-5p,hsa-miR-184,hsa-miR-199a-5p,rnomiR-203a-5p,rno-miR-324-3p) ekspresyon düzeyleri bakımından anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.1 ve Tablo 4.1).

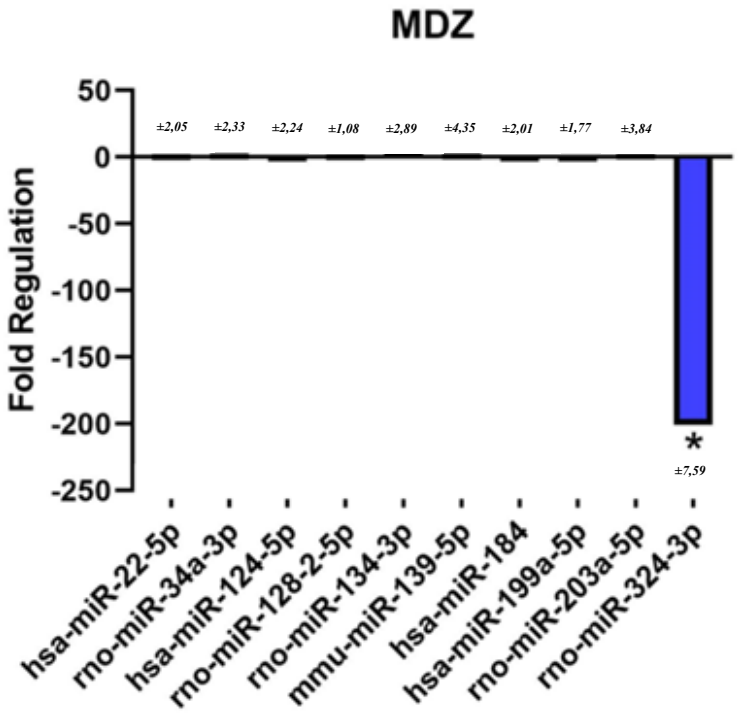


Şekil 4.1: Status epileptikus grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Tablo 4.1. Status epileptikus grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Status Epileptikus (SE) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	-1,53	**2,55**	**7,22**	**2,55**	1,56	**3,30**	-1,16	**7,21**	1,26	2,33
p-değeri	0,591802	0,118889	0,158008	0,941236	0,883870	0.247047	0,835389	0,222021	0,759677	0,284913

Status epileptikus gubunda lityum-pilokarpin ile epileptik nöbetler başlatıldıktan 30 dk sonra sadece serum fizyolojik uygulanmış ve EEG kaydının yanısıra davranış skorlaması ile nöbetler mönitörize edilmiştir. Deneylerin sonunda yapılan mortalite değerlendirmesinde status epileptikus grubunda ortalama 24 saat içinde hayvanların tamamının öldüğü tespit edilmiştir. Buna karşın status epileptikus başlatıldıktan 30 dk sonra benzodiazepin ile antiepileptik ilaç kombinasyonu uygulanan gruplardan CLZ, CLZ+LEV ve MDZ+LEV haricindeki deney gruplarında hayvanların tamamaen veya büyük oranda diseksiyonun gerçekleştirildiği status epileptikus sonrası 18. güne kadar hayatta kaldıkları belirlendi. Oysaki CLZ, CLZ+LEV ve MDZ+LEV gruplarında mortalite latensinin kısa ve mortalite oranının yüksek olduğu tespit edildi. CLZ grubunda 24 saat içerisinde 6 hayvanın, CLZ+LEV grubunda 24 saat içerisinde 3 hayvanın ve MDZ+LEV grubunda 24 saat içerisinde 5 hayvanın öldüğü saptandı. CLZ+LEV ve MDZ+LEV gruplarında mortalite nedeni ile yeterli sayıda denekten doku örneği alınamadığı için miRNA expresyon düzeyleri incelenememiştir fakat CLZ grubunda yüksek mortalite oranına rağmen hayvanların gözlem saatleri içerisinde ölmeleri nedeni ile inceleme yapılacak sayıda denekten doku alınabilmiştir.



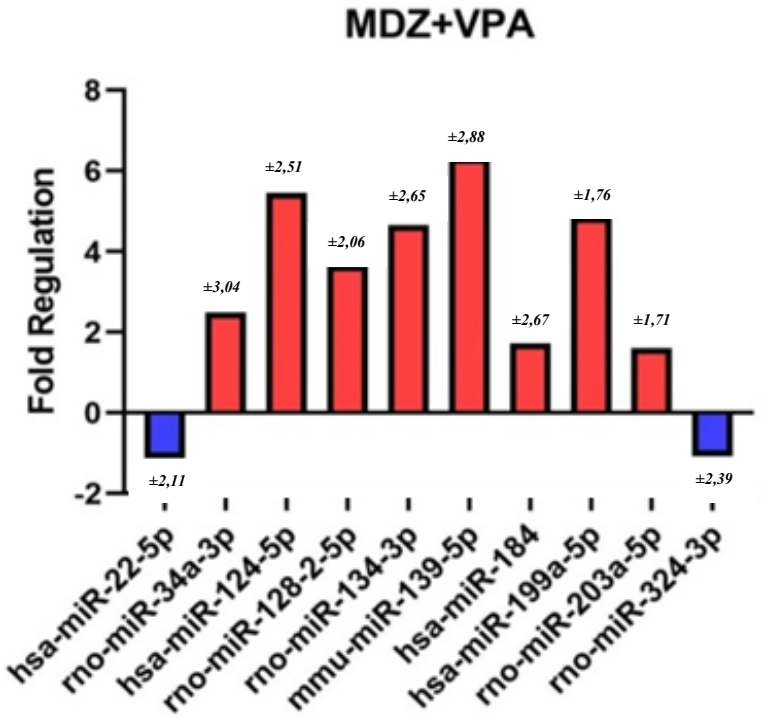
Şekil 4.2: Midazolam grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Status epileptikus grubunda hayvanların tamamının 24 saat içerisnde ve genellikle erken saatlerde ölmeleri dolayısıyla dokuların tedavi gruplarına göre daha erken alınmak durumunda olması, status epileptikus grubunda miRNA ekspresyon düzeyinin tartışılma aşamasında dikkate alınması gereken bir durumdur.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, midazolam grubunda miR-324-3p geninin downregüle olduğu ve bu azalmanın istatiksel açıdan anlamlı olduğu (p=0,0473) tespit edilmiştir (Şekil 4.2 ve Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Midazolam grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Midazolam (MDZ) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	**-2,18**	-1,94	1,29	**2,11**	**4,27**	-1,61	1,06	1,07	-1,58	**-200,95**
p-değeri	0,250533	0,211191	0,835669	0,270866	0,217116	0,501791	0,968407	0,200471	0,417912	**0,047320**



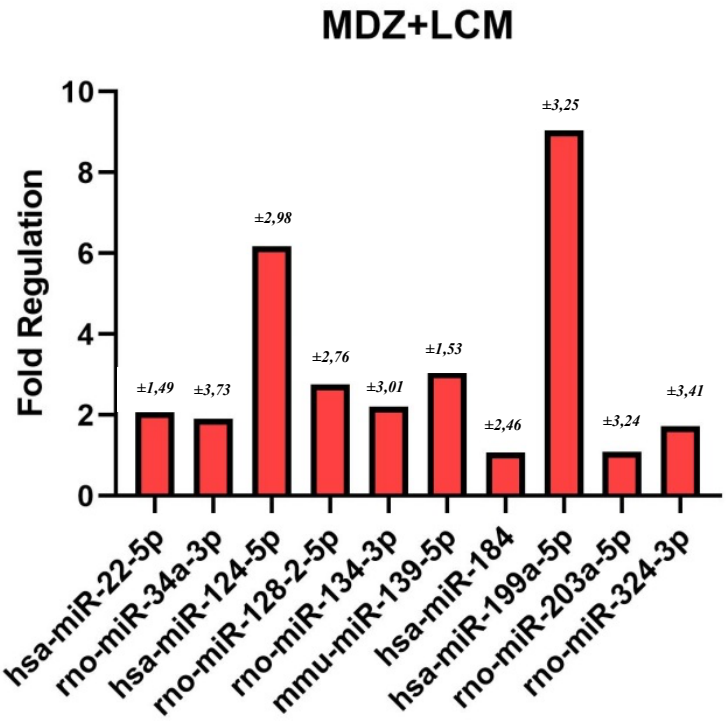
Şekil 4.3: Midazolam ve valproik asit etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Kontrol grubu karşılaştırıldığında, midazolam ve valproik asit etkileşim grubunda incelenen 10 farklı miRNA'nın (hsa-miR-22-5p,rno-miR-34a-3p,hsa-miR-124-5p,rno-miR-128-2-5p,rno-miR-134-3p,mmu-miR-139-5p,hsa-miR-184,hsa-miR-199a-5p,rnomiR-203a-5p,rno-miR-324-3p) ekspresyon düzeyleri bakımından anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.3 ve Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Midazolam ve valproik asit etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Midazolam+Valproik Asit (MDZ+VPA) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	-1,13	**2,49**	**5,45**	**3,65**	**4,66**	**6,32**	1,73	**4,85**	1,60	-1,08
p-değeri	0,388570	0,136894	0,137480	0,650574	0,201381	0,148115	0,370254	0,563960	0,898089	0,768894

Kontrol grubu karşılaştırıldığında, midazolam ve lakosamid etkileşim grubunda incelenen 10 farklı miRNA'nın (miR- 22-5p, miR-34a-3p, miR- 124-5p, miR- 128-2-5p, miR- 134-3p, miR- 139-5p, miR- 184, miR-199a-5p, miR-203a-5p ve miR- 324-3p) ekspresyon düzeyleri bakımından anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.4, tablo 4.4).

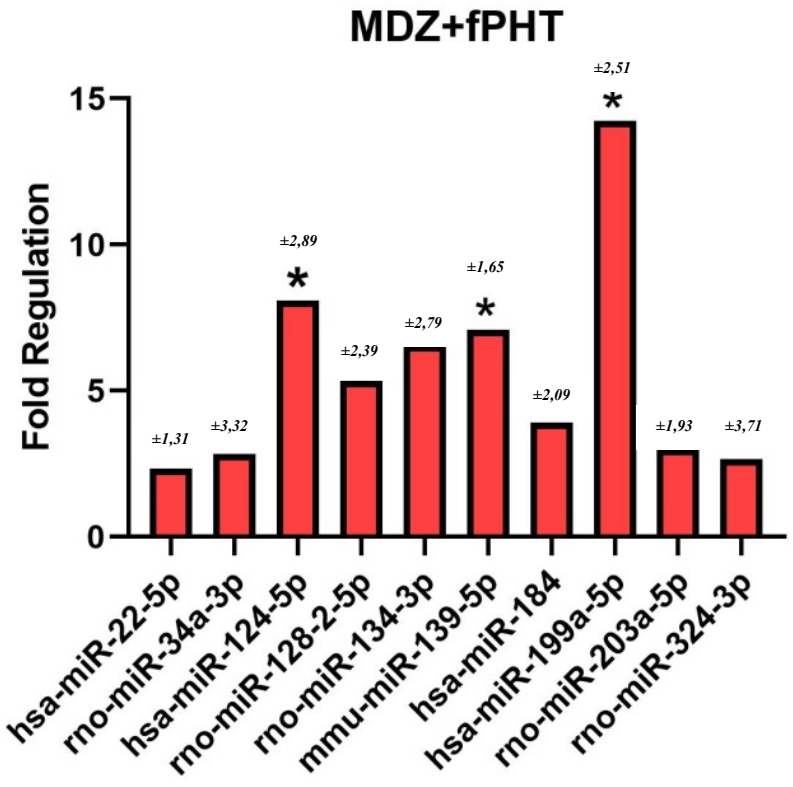


Şekil 4.4: Midazolam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Tablo 4.4. Midazolam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Midozolam+Lakosamid (MDZ+LCM) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	**2,08**	1,91	**6,18**	**2,76**	**2,21**	**3,05**	1,08	**9,04**	1,09	1,73
p-değeri	0,816805	0,310323	0,244492	0,983894	0,363194	0,237127	0,863187	0,124610	0,502915	0,265106

Kontrol grubu karşılaştırıldığında, midazolam ve fosfenitoin etkileşim grubunda miR-124-5p (p=0,0494), miR-139-5p (p=0,0180) ve miR-199a-5p (p=0,0470) genlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde upregüle olduğu belirlendi (Şekil 4.5 ve Tablo 4.5).

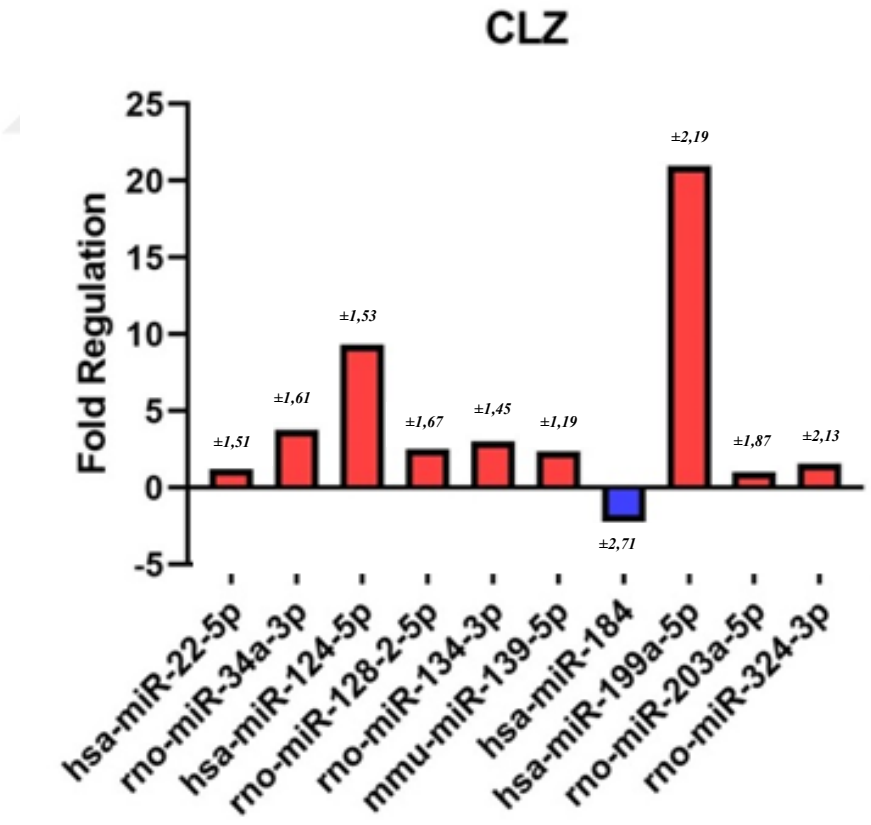


Şekil 4.5: Midazolam ve fosfenitoin etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Tablo 4.5. Midazolam ve fosfenitoin etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Midozolam+Fosfenitoin (MDZ+fPHT) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	**2,33**	**2,83**	**8,10**	**5,34**	**6,57**	**7.09**	**3,91**	**14,23**	**3,01**	**2,66**
p-değeri	0,751645	0,152627	**0,049488**	0,238076	0.138293	**0,018073**	0,075068	**0,047012**	0,239501	0,272863

Kontrol grubu karşılaştırıldığında, klonozepam grubunda incelenen 10 farklı miRNA'nın (hsa-miR-22-5p, rno-miR-34a-3p, hsa-miR-124-5p, rno-miR-128-2-5p, rno-miR-134-3p, mmu-miR-139-5p, hsa-miR-184, hsa-miR-199a-5p, rnomiR-203a-5p, rno-miR-324-3p) ekspresyon düzeyleri bakımından anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.6 ve Tablo 4.6).

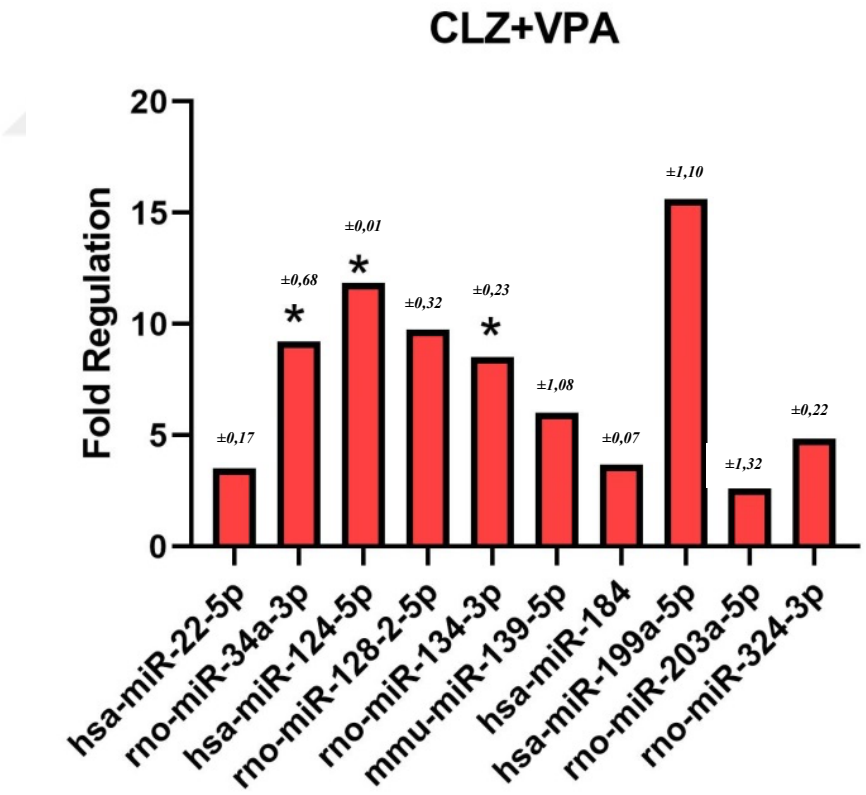


Şekil 4.6: Klonazepam grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Tablo 4.6. Klonazepam grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Klonazepam (CLZ) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	1,24	**3,77**	**9,31**	**2,52**	**3,00**	**2,39**	**-2,22**	**20,95**	1,02	1,60
p-değeri	0,380169	0,142466	0,091188	0,719293	0,440495	0,377259	0,970716	0,233036	0,774343	0,536067

Kontrol grubu karşılaştırıldığında, klonazepam ve valproik asit etkileşim grubunda rno-miR-34a-3p (p=0,0073), hsa-miR-124-5p (p=0,0214) ve rno-miR-134-3p (p=0,0214) genlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde upregüle olduğu saptandı (Şekil 4.7 ve Tablo 4.7).

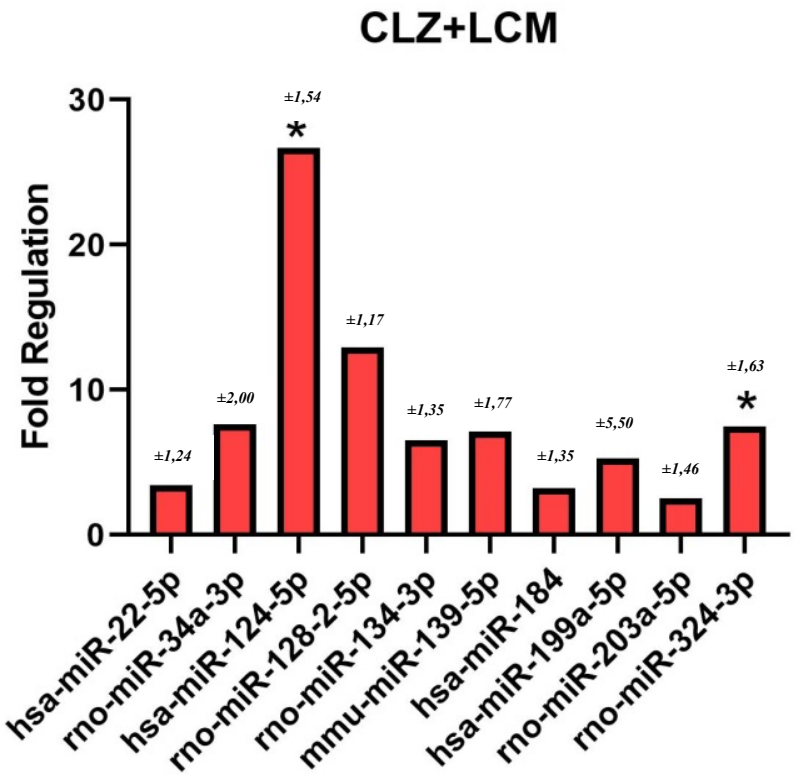


Şekil 4.7: Klonazepam ve valproik asit etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Tablo 4.7. Klonazepam ve valproik asit etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Klonazepam+Valproik Asit (CLZ+VPA) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	**3,53**	**9,22**	**11,85**	**9,74**	**8,50**	**6,01**	**3,67**	**15,63**	**2,60**	**4,84**
p-değeri	0,989672	**0,007358**	**0,021450**	0,241984	**0,021494**	0,053882	0,370261	0,075324	0,678171	0,054366

Kontrol grubu karşılaştırıldığında, klonazepam ve lakosamid etkileşim grubunda hsa-miR-124-5p (p=0,0159) ve rno-miR-324-3p (p=0,0459) genlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde upregüle olduğu tespit edildi (Şekil 4.8 ve Tablo 4.8).

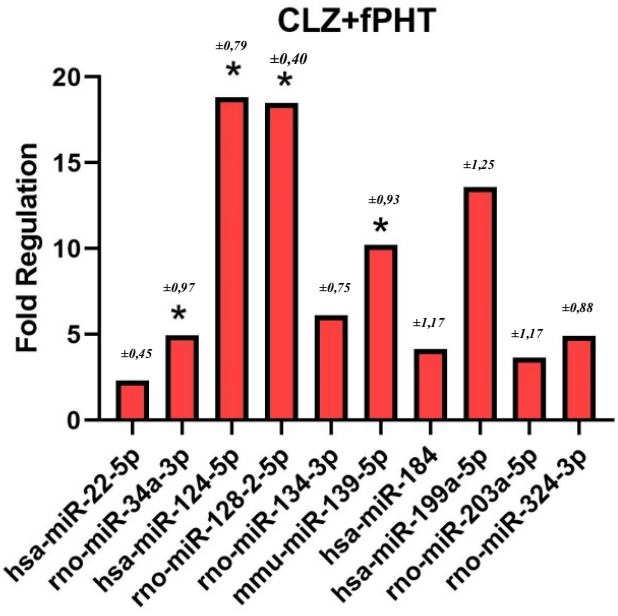


Şekil 4.8: Klonazepam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Tablo 4.8. Klonazepam ve lakosamid etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Klonazepam+Lakosamid (CLZ+LCM) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	**3,40**	**7,64**	**26,67**	**12,95**	**6,50**	**7,13**	**3,23**	**5,28**	**2,51**	**7,46**
p-değeri	0,703596	0,056781	**0,015976**	0,090140	0,111057	0,086052	0,259587	0,095381	0,562066	**0,045946**

Kontrol grubu karşılaştırıldığında, klonazepam ve fosfonitoin etkileşim grubunda rno-miR-34a-3p (p=0,0227), hsa-miR-124-5p (p=0,0040), rno-miR-128-2-5p (p=0,0013) ve mmu-miR-139-5p (p=0,0173) genlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde upregüle olduğu tespit edildi (Şekil 4.9 ve Tablo 4.9).



Şekil 4.9: Klonazepam ve fosfenitoin etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim grafiği

Tablo 4.9. Klonazepam ve fosfonitoin etkileşim grubuna ilişkin incelenen miRNA'ların kat değişim ve p değerleri

Klonazepam+Fosfenitoin (CLZ+fPHT) Grubu										
	miR-22-5p	**miR-34a-3p**	**miR-124-5p**	**miR-128-2-5p**	**miR-134-3p**	**miR-139-5p**	**miR-184**	**miR-199a-5p**	**miR-203a-5p**	**miR-324-3p**
Kat değişimi	**2,32**	**4,96**	**18,83**	**18,49**	**6,11**	**10,23**	**4,14**	**13,58**	**3,65**	**4,93**
p-değeri	0,573692	**0,022753**	**0,004082**	**0,001336**	0,059893	**0,017394**	0,119768	0,087144	0,265567	0,062120

Tablo 4.10: MDZ ve MDZ etkileşim gruplarına ait fold regulation ve p değerleri

miRNA	DENEY GRUPLARI									
	SE		MDZ		MDZ+VPA		MDZ+LCM		MDZ+fPHT	
	Fold Regulation	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*
hsa-miR-22-5p	-1,53	0,591802	**-2,18**	0,250533	-1,13	0,388570	**2,08**	0,816805	**2,33**	0,751645
rno-miR-34a-3p	**2,55**	0,118889	-1,94	0,211191	**2,49**	0,136894	1,91	0,310323	**2,83**	0,152627
hsa-miR-124-5p	**7,22**	0,158008	1,29	0,835669	**5,45**	0,137480	**6,18**	0,244492	**8,10**	**0,049488**
rno-miR-128-2-5p	**2,55**	0,941236	**2,11**	0,270866	**3,65**	0,650574	**2,76**	0,983894	**5,34**	0,238076
rno-miR-134-3p	1,56	0,883870	**4,27**	0,217116	**4,66**	0,201381	**2,21**	0,363194	**6,57**	0,138293
mmu-miR-139-5p	**3,30**	0,247047	-1,61	0,501791	**6,32**	0,148115	**3,05**	0,237127	**7,09**	**0,018073**
hsa-miR-184	-1,16	0,835389	1,06	0,968407	1,73	0,370254	1,08	0,863187	**3,91**	0,075068
hsa-miR-199a-5p	**7,21**	0,222021	1,07	0,200471	**4,85**	0,563960	**9,04**	0,124610	**14,23**	**0,047012**
rno-miR-203a-5p	1,26	0,759677	-1,58	0,417912	1,60	0,898089	1,09	0,502915	**3,01**	0,239501
rno-miR-324-3p	**2,33**	0,284913	**-200,95**	**0,047320**	-1,08	0,768894	1,73	0,265106	**2,66**	0,272863

Tablo 4.11: CLZ ve CLZ etkileşim gruplarına ait fold regulation ve p değerleri

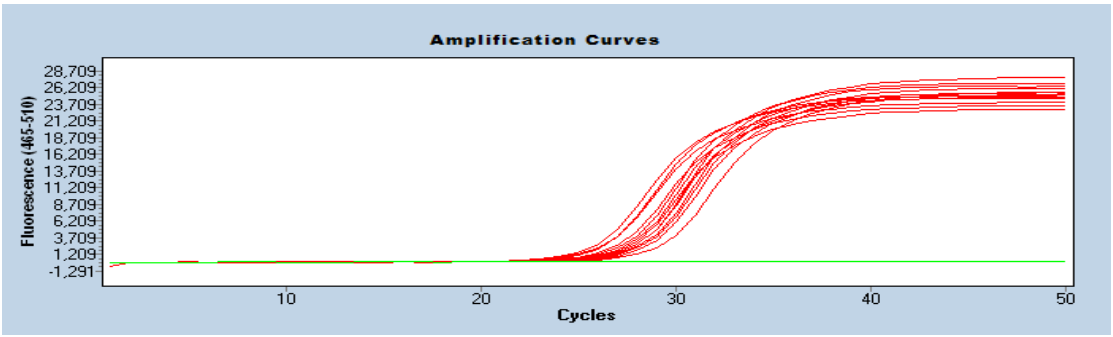
miRNA	DENEY GRUPLARI							
	CLZ		CLZ+VPA		CLZ+LCM		CLZ+fPHT	
	Fold Regulation	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*
hsa-miR-22-5p	1,24	0,380169	**3,53**	0,989672	**3,40**	0,703596	**2,32**	0,573692
rno-miR-34a-3p	**3,77**	0,142466	**9,22**	**0,007358**	**7,64**	0,056781	**4,96**	**0,022753**
hsa-miR-124-5p	**9,31**	0,091188	**11,85**	**0,021450**	**26,67**	**0,015976**	**18,83**	**0,004082**
rno-miR-128-2-5p	**2,52**	0,719293	**9,74**	0,241984	**12,95**	0,090140	**18,49**	**0,001336**
rno-miR-134-3p	**3,00**	0,440495	**8,50**	**0,021494**	**6,50**	0,111057	**6,11**	0,059893
mmu-miR-139-5p	**2,39**	0,377259	**6,01**	0,053882	**7,13**	0,086052	**10,23**	**0,017394**
hsa-miR-184	**-2,22**	0,970716	**3,67**	0,370261	**3,23**	0,259587	**4,14**	0,119768
hsa-miR-199a-5p	**20,95**	0,233036	**15,63**	0,075324	**5,28**	0,095381	**13,58**	0,087144
rno-miR-203a-5p	1,02	0,774343	**2,60**	0,678171	**2,51**	0,562066	**3,65**	0,265567
rno-miR-324-3p	1,60	0,536067	**4,84**	0,054366	**7,46**	**0,045946**	**4,93**	0,062120

Tablo 4.12: SE modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında antiepileptik ilaç uygulaması sonrası regülasyonu değişen genler

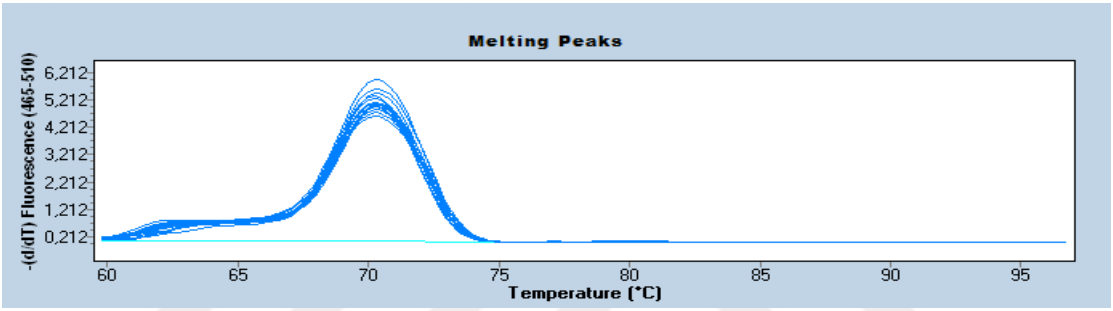
miRNA	DENEY GRUPLARI							
	MDZ+fPHT		CLZ+VPA		CLZ+LCM		CLZ+fPHT	
	Fold Regulation	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*	*Fold Regulation*	*P Değeri*
rno-miR-34a-3p			**9,22**	**0,007358**			**4,96**	**0,022753**
hsa-miR-124-5p	**8,10**	**0,049488**	**11,85**	**0,021450**	**26,67**	**0,015976**	**18,83**	**0,004082**
rno-miR-128-2-5p							**18,49**	**0,001336**
rno-miR-134-3p			**8,50**	**0,021494**				
mmu-miR-139-5p	**7,09**	**0,018073**					**10,23**	**0,017394**
hsa-miR-184								
hsa-miR-199a-5p	**14,23**	**0,047012**						
rno-miR-203a-5p								
rno-miR-324-3p					**7,46**	**0,045946**		

4.2. miRNA RT PCR AMPLİFİKASYON EĞRİSİ, MELTING PİKİ VEYA MELTING EĞRİSİ

A

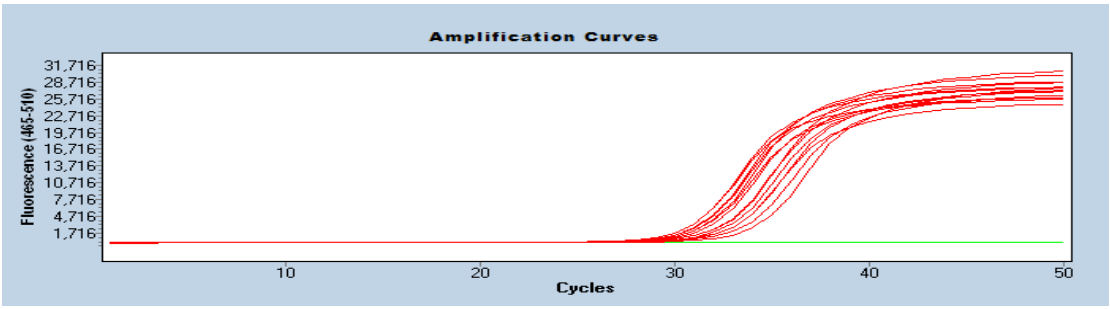


B

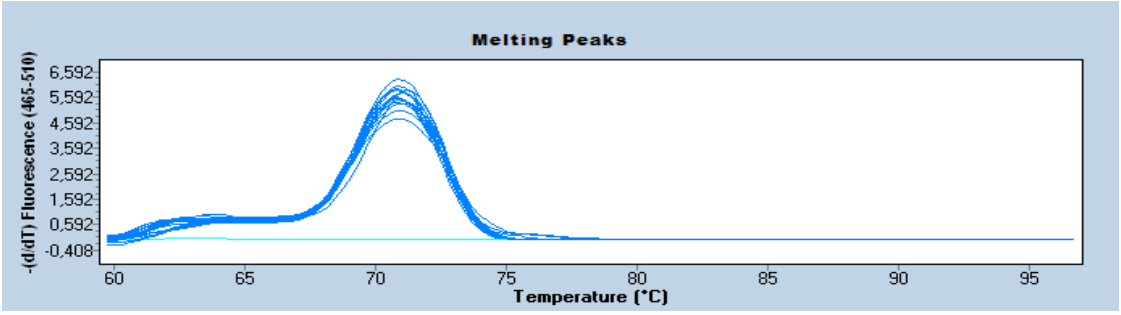


Şekil 4.10: A) miR-22 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR-22 RT PCR Melting piki

A

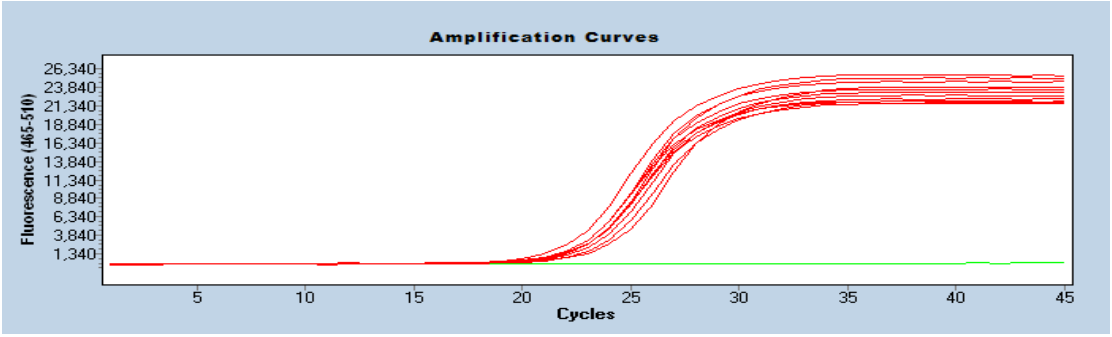


B

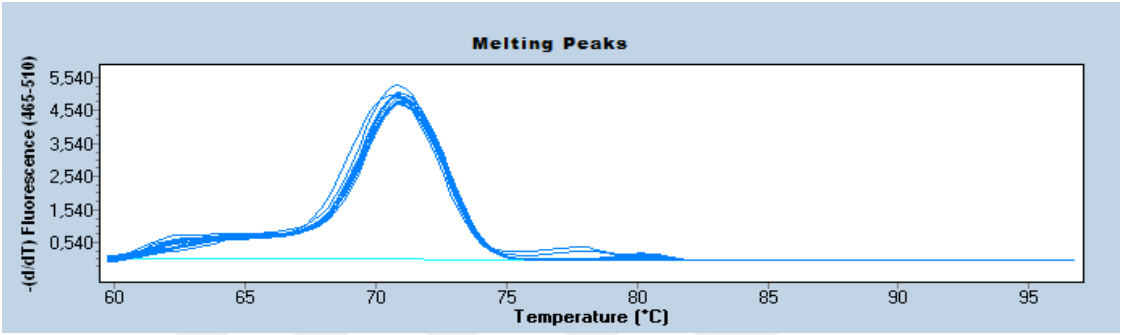


Şekil 4.11: A) miR-34 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR-34 RT PCR Melting piki

A

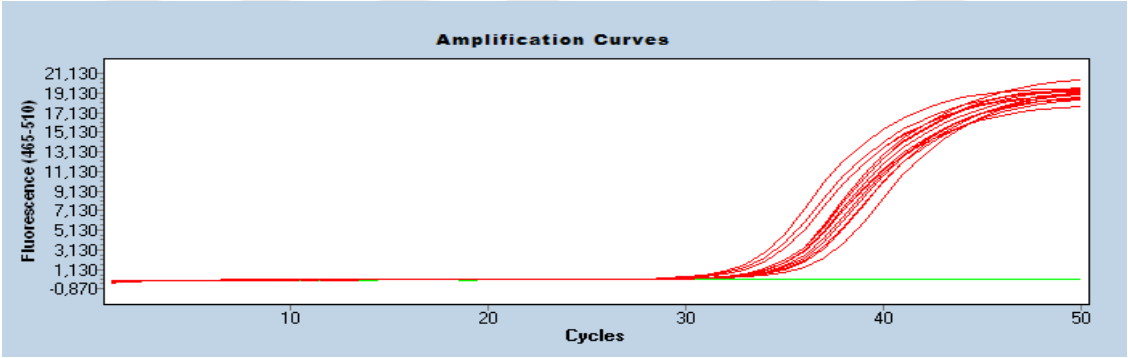


B

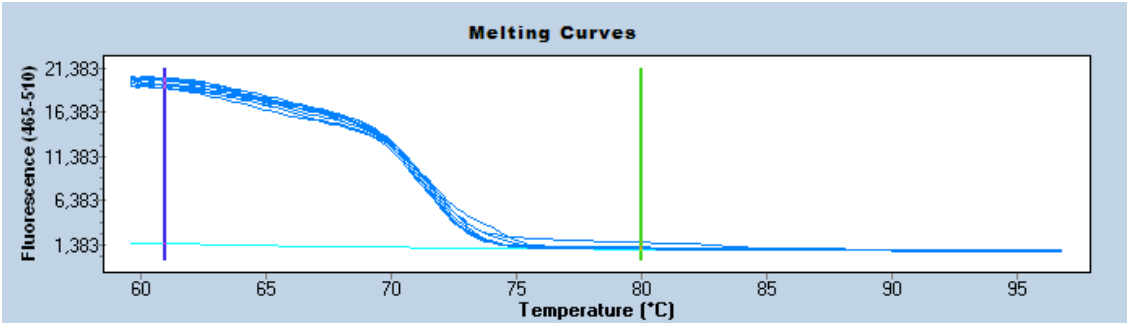


Şekil 4.12: A) miR-124 RT PCR amplifikasyon eğrisi B)miR-124 RT PCR melting piki

A

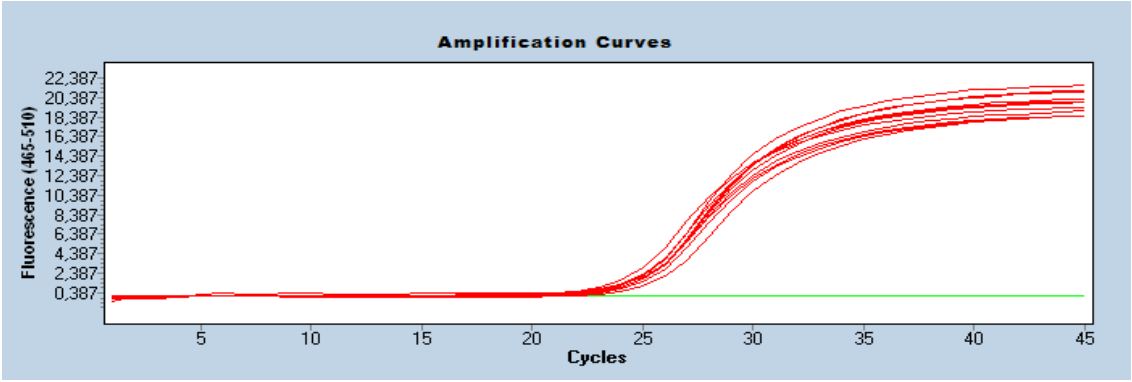


B

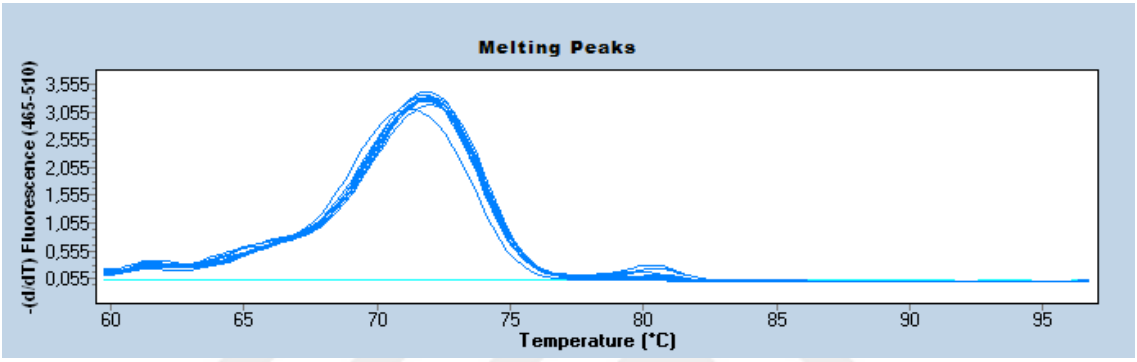


Şekil 4.13: A) miR-128 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR-128 RT PCR melting eğrisi

A

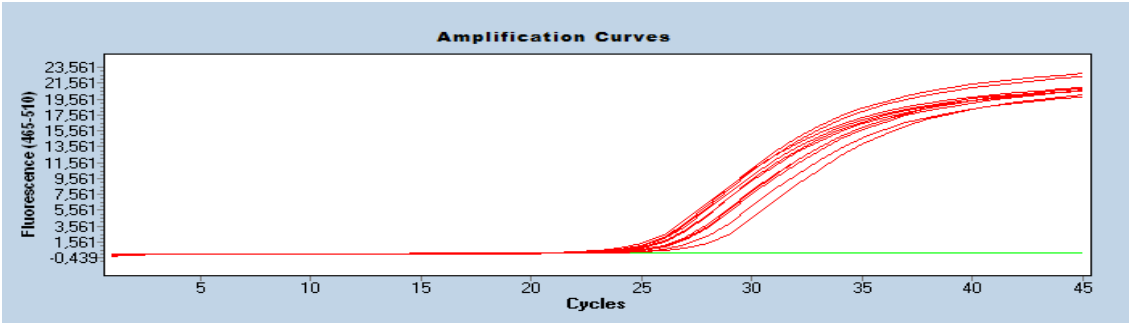


B

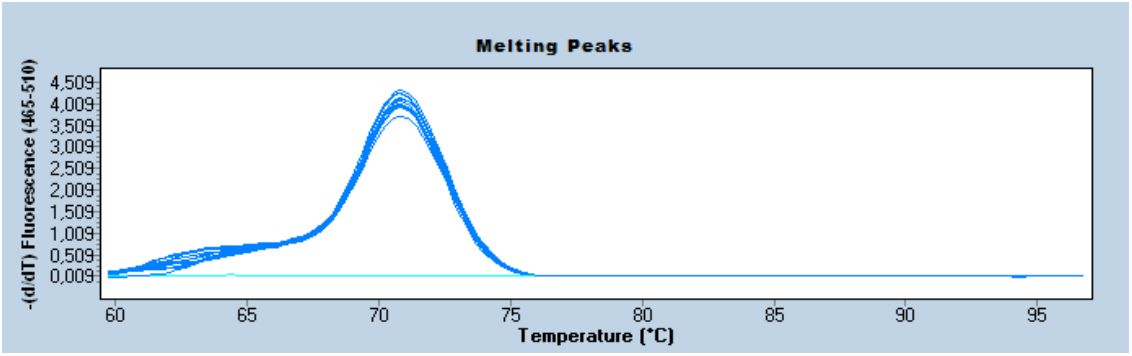


Şekil 4.14: A) miR-134 RT PCR amplifikasyon eğrisi B)miR-134 RT PCR melting piki

A

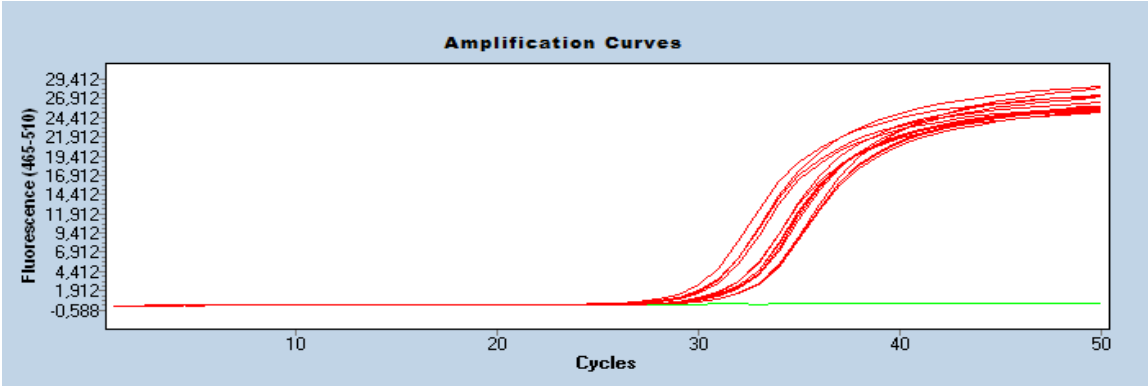


B

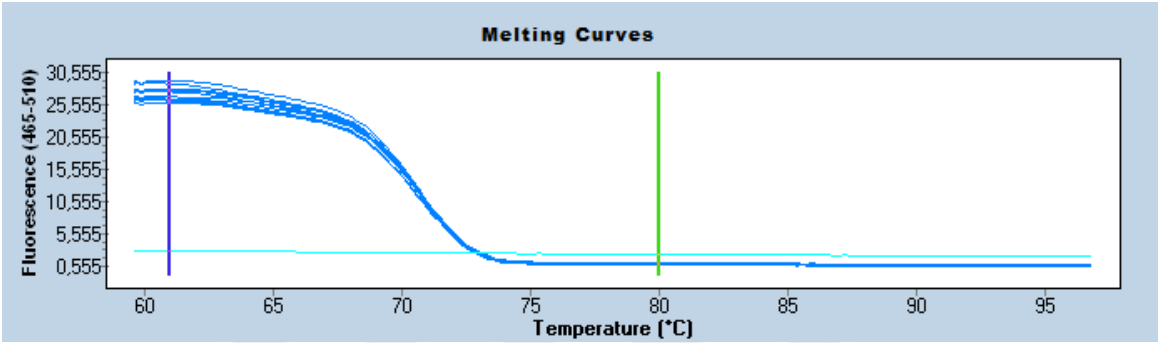


Şekil 4.15: A) miR-139 RT PCR amplifikasyon eğrisi B)miR-139 RT PCR melting piki

A

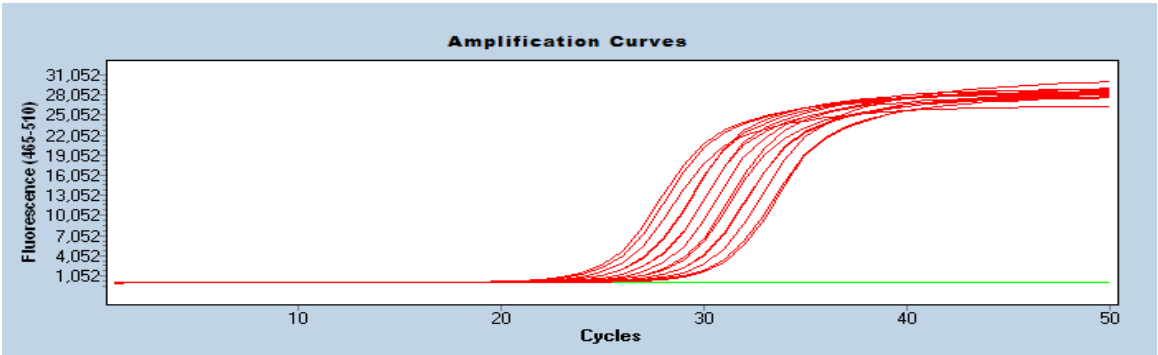


B

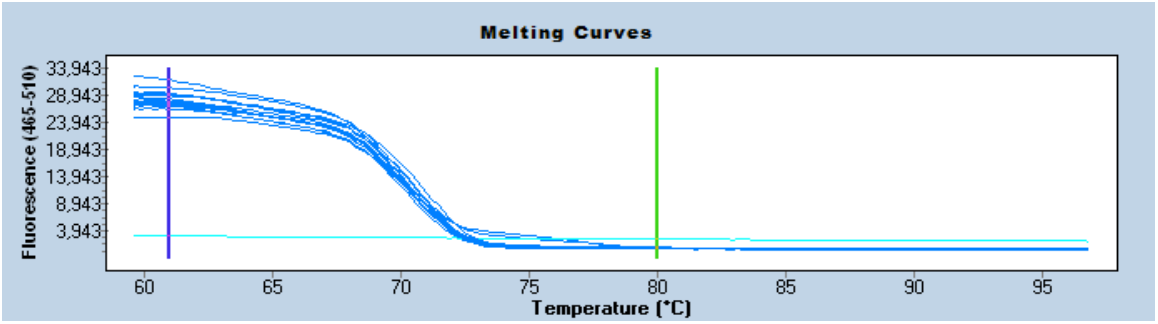


Şekil 4.16: A) miR-184 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR-184 RT PCR melting eğrisi

A

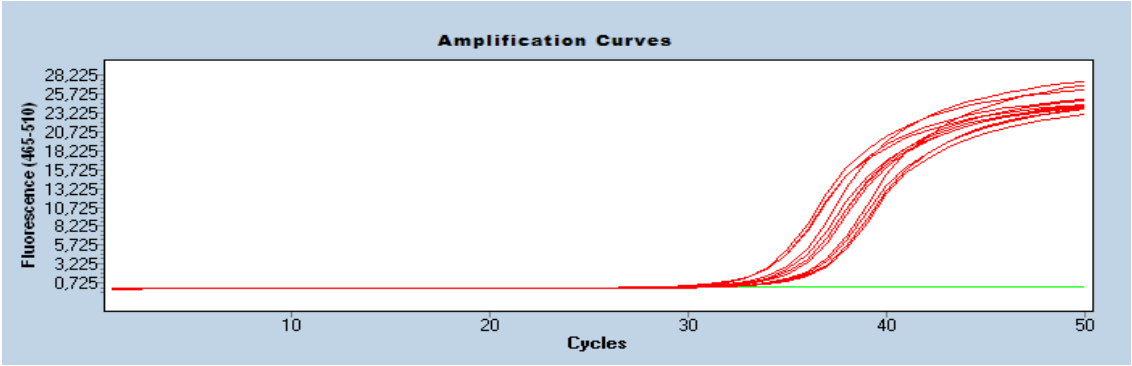


B

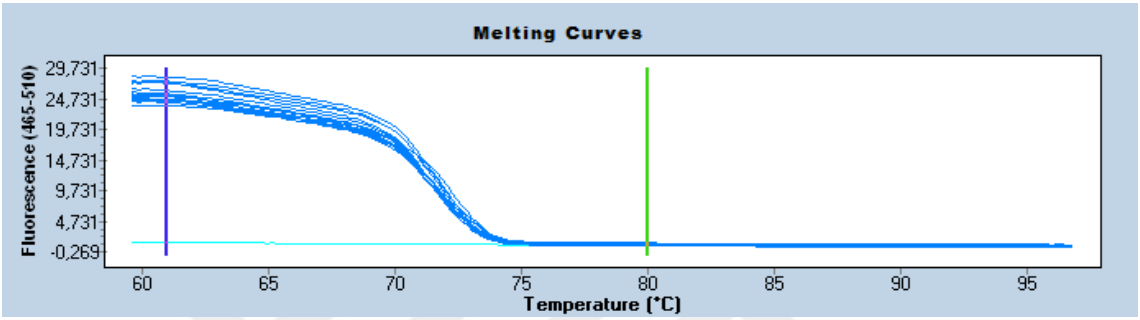


Şekil 4.17: A) miR-199 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR-199 RT PCR melting eğrisi

A

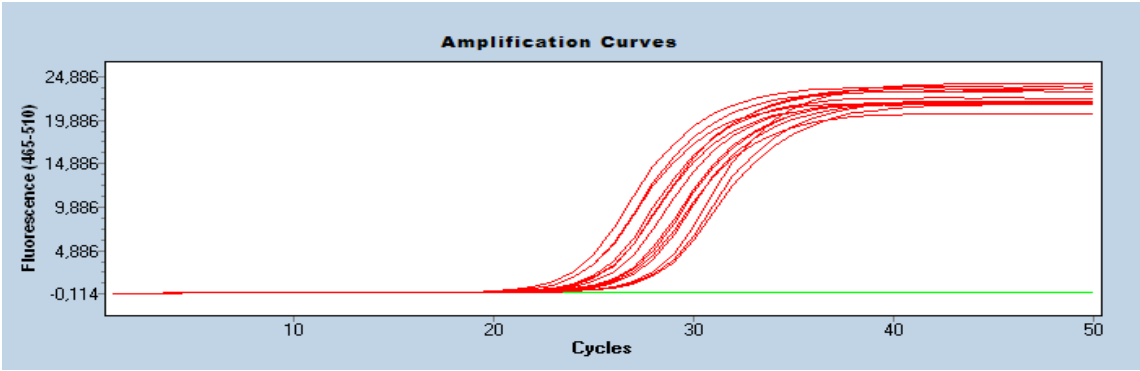


B

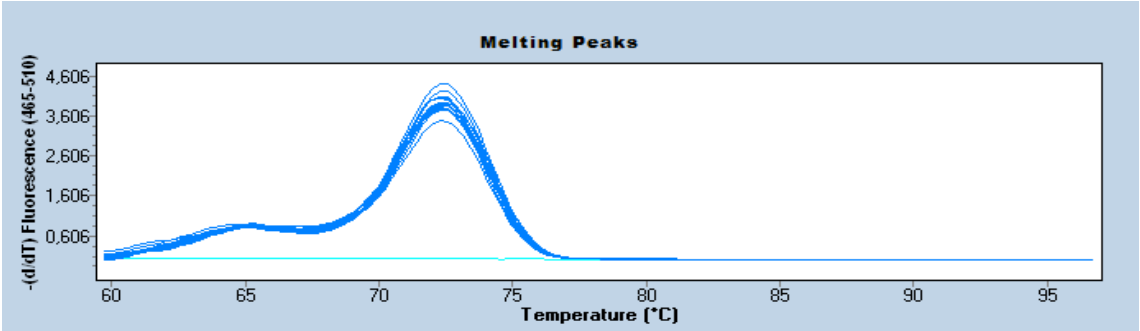


Şekil 4.18: A) miR-203 RT PCR amplifikasyon eğrisi B) miR-203 RT PCR melting eğrisi

A



B



Şekil 4.19: A) miR-324 RT PCR amplifikasyon eğrisi B)miR-324 RT PCR melting piki

5. TARTIŞMA

Gelişiminde çok sayıda moleküler ve hücresel süreçlerin yer aldığı status epileptikusun patofizyolojisi halen tam olarak anlaşılamamıştır. Klinik uygulamada, beş dakikadan daha uzun süren jeneralize tonik-klonik nöbetlerin ve 10 dakikadan uzun süren bilinç bozukluğu olan veya olmayan fokal nöbetlerin status epileptikus olarak tedavi edilmesi gerektiği genel kabul görmektedir (98). Hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, status epileptikus oluşumunda endojen mekanizmaların bir nöbeti sonlandırmadaki yetersizliği olduğunu düşündürmektedir (75). Buna bağlı olarak da günümüzde epileptik nöbetlere ilişkin temel tedavi yaklaşımı antiepileptik ilaç kullanımına dayanmaktadır.

2016 yılında Amerikan Epilepsi Derneği tarafından çocuklar ve yetişkinlerde görülen konvülsif status epileptikusun tedavisine yönelik hazırlanan kılavuza göre, status epileptikusun birinci basamak tedavisinde intravenöz LZP veya DZP veya intramüsküler MDZ şeklinde bir benzodiazepin kullanımı öngörülmektedir. Bu seçenekler mevcut değilse, alternatif olarak rektal DZP, intranazal MDZ, bukkal MDZ veya intravenöz PTB önerilmektedir. Nöbet devam ederse ikinci basamak tedavi için PHT, fPHT, VPA, LEV ve PB gibi uygun bir antiepileptik ilaçlar kullanılmaktadır (98,99). Uygun şekilde seçilen antiepileptik ilaçların hastaların sadece %60-70'inde yeterli nöbet kontrolü sağladığı bildirilmiştir (89). Antiepileptik ilaç sayısındaki artışın da bu anlamda çok da yararının olmadığı ve hastaları nöbetlerden arındırma bakımından sınırlı bir fayda sağladığı düşünülmektedir (62). Status epileptikusun tedavisine yönelik farmakolojik yaklaşımlar, GABA ve NMDA reseptörlerinin rollerinin olduğu yönündedir (12). Epilepside terapötik bir yaklaşım tasarlanırken, daha az yan etki sebebiyle tek bir ilacın kullanılması (monoterapi) tercih edilmesine rağmen hastaların yaklaşık %30'u kontrolsüz nöbetler geçirmeye devam etmektedir. İki veya daha fazla uygun tipte antiepileptik ilaç (politerapi) kullanımına rağmen nöbet kontrolü sağlanamayan kişilerin ilaca dirençli epilepsi hastası olduğu kabul edilmekte ve ilaca dirençli epilepsili hastaların sayısının (hastalarının ~1/3) öngörülenden daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (90,91).

Son 30 yılda farklı moleküler mekanizmalara ve farmakokinetiğe sahip ikinci ve üçüncü kuşak yaklaşık 20 yeni antiepileptik ilaç kullanıma girmiştir (91,93). Antiepileptik ilaçlardan karbamazepin, senobamat, lakozamid, lamotrijin, fenitoin ve

zonisamid eksitatör ve inhibitör sinaptik iletileri doğrudan etkilemek yerine nöronal membranlarda voltaj-kapılı sodyum kanallarını bloklayarak aksiyon potansiyeli oluşumunu azaltmaktadır. Topiramat da kısmen bu mekanizma ile etki ederken fenobarbital ve valproat ise yüksek dozlarda sodyum kanallarını etkilemektedir (97).

Son yıllarda serum, plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunan miRNA'ların tanı, prognoz ve tedavi lehine yeni ve noninvaziv biyobelirteçler olarak kullanılabileceğine yönelik kanıtlar artmıştır. Protein kodlayan genler gibi miRNA'lar da onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak işlev görmekte ve çeşitli hedef genleri düzenleme kapasiteleri nedeniyle yeni terapötik hedefler ve fenotipik belirteçler olarak ortaya çıkmaktadır. miRNA'ların tedavide kullanımlarına yönelik olarak miRNA inhibitörleri veya miRNA'ları taklit eden ajanların geliştirilmesine yönelik antisens oligonükleotitler (ASO) geliştirilmiştir (201). Özellikle antimiR'ler olarak adlandırılan miRNA'ların bu rekabetçi inhibitörlerinin etkinlikleri ve biyoyararlanımlarını geliştirmek için çeşitli kimyasal modifikasyonlar uygulanmaktadır. LNA ile modifiye edilmiş fosforotioat oligonükleotitlerin, tek veya tüm miRNA ailelerini inhibe ettiği, farelerin normal dokuları tarafından artan bir alım sergilediği, doğrudan hedefleri upregüle ettiği ve çok az hedef dışı etkilerinin olduğu bilinmektedir (203). Biz de bu noktadan hareketle, daha önce yapılan çalışmalar, etkileşim içerisindeki genlerin bulunduğu yolaklardaki reseptörler ve bunların, tedavide kullanılan ilaç etken maddeleri ile ilişkilerini dikkate alarak 10 ayrı miRNA'nın status epileptikus modeli oluşturulduktan sonra tek ve kombine tedavi süreçlerindeki ekspresyon seviyelerini inceledik.

Bugüne dek yapılan araştırmalarda miR-324-3p'nin çeşitli kanser tipleriyle bağlantısının yanı sıra Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, serebral iskeminin gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Ancak bu ilişkinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak açıklanamamıştır. Çalışma başında yapmış olduğumuz in silico analizi, miR-324-3p'nin strese hücresel yanıtta ve metabolik yollarda, özellikle nükleotid metabolizmasında rol oynadığını göstermiştir. KEGG pathway ve Gene Ontology yolak analizlerinde miR-324-3p'nin yer aldığı patofizyolojik yolağın, nükleotid metabolizması ve hücresel yanıt stres yolağı ile ilişkili olduğu, ayrıca TargetScan ve PROMO veritabanlarında yapılan incelemede miR-324-3p'nin GATA2 transkripsiyon faktörünü düzenlediği de

görülmüştür. Literatürde yer alan bazı çalışmalar (210,211,212,213) miR-324-3p'nin beyin tümörü hücrelerinde downregüle edildiğini ve bir tümör baskılayıcı gen rolü üstlendiğini göstermiştir. Liu ve arkadaşları da 2013 yılında yayımladıkları makalede, oluşturdukları embolik inme modeli ile beyinde miR-324-3p'nin downregüle edildiğini ve ifadesinin bir iyileşme göstergesi olabileceğini göstermiştir (214). Bizim çalışmamız da bu tespitleri destekler niteliktedir. Özellikle status epileptikus oluşturulmuş ve tekli ilaç tedavisi olarak MDZ uygulanan gruptaki miR-324-3p'ye ilişkin downregülasyonun, politerapi gruplarında (özellikle de CLZ+LCM grubunda) upregüle çıkması Liu ve arkadaşlarının sonuçları ile aynı yöndedir. Bu durumun özellikle CLZ+LCM politerapisi alan grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunması (p=0,0459) kullanılan ilaçların miR-324-3p ekspresyonunu yukarı yönde değiştirdiğini göstermektedir. Bunun yanında Stappert ve arkadaşları miR-324-3p'nin insan embriyonik kök hücrelerine kıyasla nöral hücrelerde upregüle edildiğini ve farklılaşma üzerine daha da arttığını bildirmiştir (212). Çalışmamızda; status epileptikus modeli oluşturulmuş hayvanlarda MDZ'nin tek başına uygulandığı grupta miR-324-3p'nin downregüle olduğu ve bu aşağı regülasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu; bununla birlikte CLZ+VPA uygulanan grupta bu downregülasyonun yukarı doğru regüle edildiği, bu yukarı doğru regülasyonun politerapi uygulanan diğer gruplarımızda da artarak sürdüğü ve en yüksek ve anlamlı seviyesine CLZ+LCM uygulanan grupta çıkıldığı gösterilmiştir. Bu durum çoklu ilaç uygulamalarının tek ilaç uygulamasına üstünlüğünü açıkça ortaya koymaktadır.

Son yıllarda yapılan genom boyu analizlerde miR-22'nin Hashimoto hastalığından myokard infarktüsüne, osteoartritten mutiple sklerozise, travmatik beyin hasarlarından sigaraya bağlı KOAH oluşumuna kadar çok geniş bir spektrumda araştırıldığı ve etkilerinin ortaya konduğu bilinmektedir. Elbetteki bu durum bir miRNA'nın genomdaki çok sayıda genin translasyonunu inhibe etme yeteneğini ve buna bağlı olarak da çok sayıda hastalık ve anomali ile ilişkilendirmesi sonucunu doğurur. Almedia Silva ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yayımlanan bir makalede miR-22'nin nöroinflamatuar sinyallemenin baskılanması yoluyla epileptojenik beyin ağlarının gelişimine karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (215). Yapılan bu çalışmada mir-22 geni susturulmuş fareler normal davranış ve beyin yapısı sergilerken, intraamigdala kainik asit uygulaması sonrasında status epileptikus gelişimi görüldüğü rapor edilmiştir. Bununla birlikte, status epileptikustan sonra devam eden EEG izlemesi,

miR-22 eksikliği olan farelerin hipokampüsünde inflamatuar sinyallemenin spesifik olarak baskılandığını ve spontan nöbetlerin daha erken başladığı, daha sık meydana geldiği ve daha uzun sürdüğü, hızlanmış ve alevlenmiş bir epilepsi fenotipinin ortaya çıktığını rapor edilmiştir (215). Bizim de araştırmamıza bu geni dahil etmemizin sebeplerinden biri budur. Bu veriler miR-22'nin status epileptikusta erken inflamatuar yanıtlar oluşturmada bir rolü olduğunu ve status epileptikus tedavisi için anti-inflamatuar müdahalelerin önemini göstermektedir. miR-22-3p beyin de dahil olmak üzere tüm vücutta eksprese edilen korunmuş bir miRNAdır (216,217). Jimenez-Mateos ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yayımlanan çalışmada, miR-22-3p'nin daha önce status epileptikusun intraamigdala kainik asit modelinde epileptojenik bölgenin kontralateralindeki fare hipokampusunda eksprese olduğu ve upregüle miRNA'lar arasında yer aldığı ve miR-22'nin inhibe edilmesi durumunda spontan nöbetlerin sıklığının arttığı bildirilmiştir. Ayrıca bu inhibisyonun artan astrogliosis ile ilişkili olduğu ve buna bağlı olarak da P2X7 reseptörü miR-22'nin hedefi olarak tanımlanmıştır (216). P2X7 reseptör antagonistinin birlikte enjeksiyonunun miR-22'nin antisens oligonükleotit inhibitörü verilen farelerde epilepsi fenotipini hafiflettiği rapor edilmiştir (218,219). Almedio Silva ve arkadaşlarının (2020) çalışmasında mir-22'nin genetik ablasyonunun status epileptikus fare modelinde geçici olarak kısıtlanmış, hızlandırılmış ve alevlenmiş bir epilepsi fenotipi ile sonuçlandığı bildirilmektedir (215). Ancak bu çalışmada miR-22 kaybı sonucunda transkripsiyonel olarak inflamatuvar sinyal yollarının kapsamlı bir şekilde downregüle olduğu ifade edilmiştir. Bu durum miR-22'nin nöroinflamasyonu baskılamasının yanı sıra aktive edebileceğini de düşündürür. İşte tam da bu noktada status epileptikus tedavisinde kullanılan antiepileptik ilaçların tekli ve birlikte kullanımındaki farklılıkların bu ikilemi değerlendirme açısında çok isabetli bir yaklaşım olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü, bizim çalışmamızda da her ne kadar istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmamakla birlikte, status epileptikus sonrası MDZ uygulanan grupta mir-22-5p'nin yaklaşık iki kat downregüle olduğu, bunu takip eden MDZ+VPA tedavisinde bu downregülasyonun yarı yarıya azaldığı, MDZ+LCM tedavisinde 2,08 katlık, MDZ+fPHT tedavisinde 2,3 katlık, CLZ+fPHT tedavisinde 2,3 katlık, CLZ+LCM tedavisinde 3,4 katlık, CLZ+VPA tedavisinde 3,5 katlık bir upregülasyon olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuç hem çalışmamızın amaçlarından biri olan status epileptikus tedavisinde politerapilerin monoterapiye göre avantajını hem de literatürde yer alan sonuçlarla (hem aşağı hem de yukarı yöndeki) örtüştüğünü açıkça

göstermektedir. Status epileptikus sonrası olası epileptogenezin önlenmesi için antiepileptik ilaç kullanımı oldukça önemlidir. Bununla birlikte bu şekilde farklı ilaç uygulamaları yapılarak miRNA'lar hem tedavi hem de miRNA ekspresyonlarının ele alınması bakımından değerlendirildiğinde (ki literatürde bu şekilde dizayn edilmiş bir deneysel model bulunmamaktadır) sonuçlarımızın politerapinin yararı yönünde açık ve net bir belirleyiciliği olduğunu düşünmekteyiz. miR-22'nin ilaca dirençli epilepsili hastaların hipokampusunda eksprese edildiği de düşünüldüğünde elde ettiğimiz sonuçlar terapötik olarak çok anlamlıdır.

Diğer taraftan Guerra Leal ve arkadaşlarının 2022 yılında yayımladıkları makalede P2X7 reseptörünün epilepsi ve diğer nörolojik bozukluklarda aktif olarak yer aldığı ifade edilmiştir (220). Bu çalışmada P2X7R'nin aşırı ekspresyonunun, nöbetler sırasında ATP sinyallerini güçlendirerek glial hücre aktivasyonu, sitokin üretimi ve yoğun glutamaterjik uyarı ile GABAerjik yıkımı tetiklediği bunun sonucu olarak da miR-22'nin aşağı regüle olduğu bildirilmektedir. Guerra Leal ve arkadaşları miR-22/P2X7R eksenini hedeflemenin yeni anti epileptik ilaçların geliştirilmesinde izlenmesi gereken bir strateji olduğunu rapor etmişlerdir (220). PX7R'nin ana kaynağı monosit hücreleridir. Bununla birlikte epileptik hastalarda beyindeki aşırı üretimi de göz ardı edilmemelidir. Bu durumda P2X7R ve miR-22 arasındaki antagonist etkileşim bu biyobelirteçlerin ikisinin de epileptik hastalarda aynı nöronal kaynaktan köken aldığını düşündürür. Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar da Guerra Leal ve arkadaşlarının sonuçlarını destekler niteliktedir. Nöbetler açısında değerlendirildiğinde status epileptikus hastalarında, özellikle jeneralize tonik-klonik nöbetlerin tedavisi ya da önlenmesinde mir-22 ekspresyon seviyelerinin ölçümü tedavide biyomarker olarak kullanılabilir. Çünkü mir-22 downregülasyonunun sürekli hücre dışı ATP birikimi, kontrolsüz nöroinflamatuar reaksiyon ve sinaptik iletim düzensizliği ile pozitif bir ileri beslemeli zararlı döngü olarak hareket edebileceği unutulmamalıdır. Ayrıca, P2X7R'nin bellek ve daha yüksek beyin işlevleri üzerindeki fizyolojik rolü göz önüne alındığında, purinerjik düzensizliğin aynı zamanda bir komorbid klinik durum olarak da değerlendirilerek yatkınlığı olan bireylerde daha şiddetli hasarlara (daha ileri düzeyde bellek kaybı vb) yol açabileceği savıyla mir-22 mutasyonlarının da ayrıca ele alınarak toplumdaki sıklığının ortaya konması kişiye özgü tedavi protokollerinin geliştirilerek hedefe yönelik antiepileptik ilaçların üretilmesinde öngördürücü olabileceği de diğer savımızdır.

Status epileptikus hastalarında görülen süresi artmış nöbetlerin beyinde özellikle hipokampusa zarar verdiği ve buna bağlı olarak bilişsel bozukluklara ve epilepsi patogenezine sebep olabildiği bilinmektedir. Literatürde epilepsiye ilişkin hayvan modelleri oluşturularak yapılan çalışmalarda miR-34a geni status epileptikus ile de ilişkilendirilmiştir. Status epileptikus modellerinde, görev alan miRNA'lar nöroinflamasyon, gliosis, nöronal fonksiyonlar ve apoptozis ile ilgili çok sayıda proteinin ekspresyon seviyelerini etkilemektedir. Hermeking ve arkadaşlarının 2010 yılında yayımladıkları makalede mir-34a'nın proapoptotik etkilere aracılık ettiği (221), yine Chang ve arkadaşlarının 2007 yılında yayımladıkları makalede mir-34a upregülasyonunun nöronal olmayan hücrelerde apoptozu tetiklediği rapor edilmiştir (222). Antagomirlerin beyinde ekprese olan miRNA'lar üzerindeki güçlü ve uzun süreli etkilere sahip oldukları bilinmektedir. Hu ve arkadaşları tarafından 2011'de ve Sano ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yayımlanan makalelerde de pilokarpin ile oluşturulan status epileptikustan 24 saat sonra sıçan hipokampusunda miR-34a'nın upregüle olduğu ve bu durumun epileptik nöbet dönemine kadar sürdüğü saptanmıştır (223,224). Bununla aynı doğrultuda sonuçlanan Henshall tarafından 2013 yılında yayımlanan çalışmada, miR-34a'nın nöbet kaynaklı nöronal ölümü değiştirdiği ve status epileptikus sırasında nöbet şiddetini ve daha sonra tekrarlayan spontan nöbetlerin ortaya çıkmasını azalttığı rapor edilmiştir (225). Sano ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada deneysel status epileptikus modeli oluşturulmadan önce antagomir uygulanmış ve miR-34a inhibisyonunun aktive kaspaz-3'te küçük bir azalma sağlamasına rağmen nöbet kaynaklı nöron ölümü üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı ifade edilmiştir (224). Diğer bir çalışmada ise miR-34a inhibisyonunun kaspaz-3 sinyalini blokladığı ve nöbet kaynaklı nöronal ölüme karşı koruyucu olduğu bulunmuştur (223). Sano ve Hu arasındaki bu farklılık Jimenez-Mateos ve Henshall (2013) tarafından kullanılan status epileptikus modellerinin farklılığı, dozlar ve infüzyon programının da dahil olduğu çeşitli faktörlerin etkisi ile açıklanmaya çalışılmıştır (81). Bizim çalışmamıza göre, MDZ ve CLZ'nin tek ilaç olarak kullanıldıkları durumunda miR-34-3p ekspresyonunu anlamlı olarak değiştirmedikleri bulunmuştur. Fakat, özellikle CLZ+VPA ve CLZ+fPHT kombinasyonlarının sırasıyla 9,2 kat ve 4,9 kat upregülasyon sağlayarak (sırasıyla p=0,0074, p=0,0228) istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya konmuştur. Ayrıca CLZ+LCM kombine tedavisinin de istatistiksel olarak anlamlılık sınırında

(p=0,056) olduğu ve 7,6 katlık bir upregülasyon sağladığı tespit edilmiştir. Aslında sadece bu sonuç bile kombine ilaç tedavilerinin status epileptikus tedavisinde ne kadar etkin ve önemli olduğunu ifade etmek için yeterlidir. miRNA'lar status spileptikus patofizyolojisinde oldukça önemlidir. Status epileptikusta hem tedavi süreçlerinde hem de prognostik olarak mir-34a-3p bir biyomarker adayıdır. miRNA'ların kullanımı nöbet oluşumunda ya da nöbet sürelerinin kısaltılabilmesi amacıyla kullanılabilir. miR-34a-3p'nin klinikte, önümüzdeki yıllarda özellikle status epileptikus hastalarında nöbet sürelerinin azaltılmasına yönelik bir biyomarker olarak kullanım portansiyeli oldukça güçlüdür.

mir-124 tüm hipokampusta pro-epileptojenik nöron kısıtlayıcı susturma faktörünü (NRSF) düzenler ve inflamatuar yanıtları modüle eder. Ancak spontan tekrarlayan nöbetleri etkilemez. Epilepsi gelişimi sırasında miR-124, NRSF'nin upregülasyonunu önleyerek epileptogenezi geciktirirken, proinflamatuar faktörleri artırarak epileptogenezi teşvik etmekte ve neticede kainik asit kaynaklı sıçan epilepsi modelinin kronik fazı sırasında epileptogenezi değiştirmemektedir (226,227). Literatürde mir-124 düzeylerinin hem upregüle hem de downregüle olduğu ile ilgili makaleler bulunmaktadır. Bizim, bu çalışmada, miR-124-5p ekspresyon seviyesini incelememizin sebeplerinden biri epileptogenezi geciktirdiğine yönelik makalelerin varlığı bir diğeri ise sıçanlarda status epileptikus sonrasında miR-124 expresyonunu downregüle olduğunu ifade eden makalelerin olmasıdır. Peng ve arkadaşları 2013 yılında yayımladıkları makalelerinde sıçanlarda status epileptikus sonrasında miR-124 düzeylerinin arttığını (228), Risbud ve Porter ise aynı yıl yayımladıkları makalede azaldığını belirtmişlerdir (229). Risbud ve Porter literatürdeki birçok yayının aksine buldukları sonucu; status epileptikus oluşturduktan 4 saat ve 48 saat sonra hipokampusun subsellüler fraksiyonlaması ve sinaptoneurozom/nüklear oranını kullanarak ölçtüklerini ve kontrol hipokampusunun nükleer fraksiyonuna kıyasla sinaptonörozom fraksiyonunda miR-124-5p'yi diğer birçok genle birlikte upregüle bulduklarını ancak 48. saatten sonra neredeyse hiç sinaptonörozomla zenginleştirilmiş mikroRNA bulamadıklarını ifade etmişlerdir. Ancak bu sonucun aslında kendi içerisinde de pek tutarlı olmadığını belirtmişlerdir (229). Gitaí ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yayımlanan makalede miR-124-5p'nin upregüle olduğu rapor edilmiştir (230). Bizim çalışmamız hem Peng ve arkadaşlarının hem de Gitaí ve arkadaşlarının çalışmasını destekler niteliktedir (228,230). Çalışmamızda

özellikle CLZ'nin hem VPA, hem LCM hem de fPHT ile kombine kullanımı miR-124-5p'nin upregülasyonu yönünde oldukça anlamlı sonuçlar vermiştir. Tek başına MDZ ya da CLZ'nin miR-124-5p üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği bulunmuştur. Ancak, sırasıyla CLZ+VPA tedavisinin 11,8 katlık (p=0,0215), CLZ+fPHT tedavisinin 18,8 katlık (p=0,0041), CLZ+LCM tedavisinin ise 26,6 katlık (p=0,016) fold regülasyon değerleri ile oldukça anlamlı sonuçlar verdikleri ortaya konmuştur. Bunun yanında MDZ+fPHT tedavisinin de 8,1 katlık upregülasyon ile (p=0,0495) anlamlı olduğunu da eklememiz gerekir. Ancak CLZ'nin tek başına, MDZ'nin ise hem tek başına hem de VPA ve LCM ile kombine kullanımlarında kat değişimleri tespit edilmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. miR-124-5p ile ilgili elde etmiş olduğumuz bu sonuçlar çalışmamızda çoklu ilaç tedavisinin kullanımı adına en güçlü biyobelirteç adayının miR-124-5p olduğunu göstermektedir.

miR-184 ve miR-203a-5p ekspresyon seviyelerinin ölçümlerinde 1,06 ile 3,91 katlık değişimler tespit edilmiş olmakla birlikte her iki gen içinde ne tek ne de kombine ilaç uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon değişimi bulunamamıştır. Esasen literatürde miR-184'ü hedefleyen sadece bir makalede miR-184'ün ekspresyon seviyesini değiştirerek nöbet kaynaklı nöronal ölümü değiştirdiği, status epileptikus sırasında nöbet şiddetini azalttığı ve daha sonra tekrarlayan spontan nöbetlerin ortaya çıkmasını azalttığı bildirilmiştir. Ancak kısa ve zararlı olmayan nöbetlerin koruyucu bir bölümü tarafından upregüle edilen bir miRNA olan miR-184'ün hedeflenmesinin, farelerde nöbet kaynaklı nöronal ölüme karşı artan duyarlılıkla sonuçlanırken nöbet şiddetinin etkilenmediği ve bu miRNA'nın hiçbir aday hedefinin bu eylemi açıklamak için yeterli olmadığı ifade edilmiştir (28). miR-203a-5p ile ilgili olarak ise literatürde bu genin ekspresyonunun upregülasyon gösterdiğine dair sadece bir makale vardır (231). Zhang ve arkadaşları (2018) bu makalelerinde deneysel değil de biyoinformatik analize dayalı bir metot uygulayarak ve farklı veritabanlarındaki verileri eşleştirmek suretiyle farelerde ilaca bağlı bir epilepsi modelinde anahtar genleri ve ilişkili sinyallemeyle düzenlenen yolakları tanımlamayı amaçlamışlardır (231). Bu iki genle ilgili, sonuç olarak literatürde deneysel olarak oluşturulmuş ve valide edilmiş veriler bulunmamaktadır. Dolayısıyla projemizin kurgusunda hiç çalışılmamış olan bu iki genin status epileptikus modeli oluşturulan ratlarda ilaç tedavisi ile ekspresyon seviyelerinin değişip-değişmeyeceği noktasındaki

hipotezimizin hala doğrulanmaya gereksinimi vardır. Ancak bizim her iki geni birlikte aynı deney grubunda oluşturulmuş status epileptikus modelinde kullanmış olmamızın da literatüre katkı anlamında faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Nöronal miRNA'ların kilit bir işlevi, nöronal aktiviteye yanıt olarak sinaptik plastisiteyi düzenlemektir (232,233). Dendritik spinler, beyindeki başlıca uyarıcı iletişim bölgeleridir. Aynı zamanda omurga boyutunu düzenleyen moleküler mekanizmalar, öğrenme, hafıza ve nöbet eşiklerinin önemli belirleyicileridir (234). Daha çok dendritleri etkileyen miR-134'ün ilaca dirençli temporal lob epilepsi hastalarından alınan rezeke hipokampus ve neokortekste ve birden fazla deneysel epilepsi modelinde ekspresyon seviyesinin arttığı ve oligonükleotid hedefleme yaklaşımlarıyla miR-134'ün inhibisyonunun temporal lob epilepsi modellerinde nöbetleri önemli ölçüde azalttığı ifade edilmiştir (26,235). Henshall'da 2013 yılında yayımlanan derlemesinde Jimenez-Mateos ve arkadaşları (2012) ile aynı şekilde miR-134'ün hedeflenmesin nöroprotektif olduğunu ve status epileptikus sırasında nöbet şiddetini ve daha sonra tekrarlayan spontan nöbetlerin ortaya çıkmasını azalttığını rapor etmiştir (225). Bizim çalışmamız da literatürdeki bu çalışmaları destekler niteliktedir. Hatta miR-134-3p, oluşturulan status epileptikus modeline uygulanan tek ve kombine tedavilerde 2,21 ile 6,57 kat upregülasyon göstermekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir. Ancak CLZ+VPA tedavisi uygulanan hayvanlarda 8,5 katlık bir kat değişimi göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,0215$). Bu durum miR-134-3p genini CLZ+VPA tedavisinde direkt olarak aday biyomarker göstermek için yeterlidir. Kaldı ki çalışmamızın hipotezine uygun olarak kombine tedavilerdeki kat değişim değerleri yine tek ilaç uygulandığında görülen kat değişim değerlerinden daha yüksektir. Bu durum da yine çalışmamızın kendi içerisindeki tutarlılığının önemli bir göstergesidir.

MSS'de çok miktarda bulunan bir miRNA olan miR-128, gelişen neokortekste nöronal proliferasyonu ve farklılaşmayı ve *in vitro* nöronal uyarılabilirliği düzenlemektedir (227,236). miR-128, miR-128-1 ve miR-128-2 şeklinde iki ayrı gen tarafından kodlanmakta ve ön beynin dopamin-1 reseptörünü eksprese eden nöronlarında miR-128-2 geni eksik olan farelerin uyarılabilirliğinde artış olduğu ve nöbet geliştiği ve ayrıca nörotransmitterler ile bağlantılı nöronal uyarılabilirliğe ve motor aktiviteye katkıda bulunan iyon kanalları ve taşıyıcı genlerdeki etkilenmeler nedeni ile bu farelerin 2-3 aylıkken öldükleri tespit

edilmiştir. Farelerdeki miR-128 eksikliğinin bu ölümcül etkisinin antiepileptik bir ilaç olan valproikasit ile tedavi edilerek önlenebildiği rapor edilmiştir (237). Bizim çalışmamızda ise miR-128-2-5p genine ait ekspresyon seviyeleri, Status epileptikus grubunda, tek CLZ ve MDZ uygulanan gruplarda (kat değişimleri sırasıyla 2,55, 2,52 ve 2,11) hemen hemen aynı çıkmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Ancak CLZ+VPA tedavisi uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamakla beraber (p=0,24), hem literatüre yakın hem de hipotezimize yönelik anlamlı bir kat değişim değeri elde edilmiştir (9,74 kat). Bu kat değişimindeki upregülasyon CLZ+LCM tedavisi uygulanan grupta artmış (12,95 kat) ve CLZ+fPHT tedavisi uygulanan grupta pik yaparak (18,49 kat) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (p=0,0013). Bu durum bir taraftan kombine ilaç tedavisinin tek ilaç uygulamasına göre daha etkin olduğunu göstermesi bakımından diğer taraftan da sadece CLZ+fPHT tedavisi uygulanan grupta anlamlı bir ekspresyon farklılığını ortaya koyması bakımından hem miR-128-2-5p'yi bir aday biyomarker haline getirmekte hem de bu anlamda literatüre önemli katkı sunmaktadır.

miR-139-5p diğer hücrelere kıyasla sinaps ve dendritlerde yüksek oranda eksprese edilir ve nöronal farklılaşma, olgunlaşma ve sağkalımın düzenlenmesinde oldukça önemli rol oynar (238,239). Son dekatta, miR-139-5p ekspresyonunun TLE (240), glioblastoma (241) ve Alzheimer hastalığı (242) dahil olmak üzere birçok nörolojik bozuklukta önemli ölçüde aşağı regüle olduğu bulundu. Ancak miRNA'ların TLE'deki kritik rolü göz önüne alındığında, miR-139-5p ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonu beklenir. Alsharafi ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada pilokarpin modeli ile oluşturulmuş ratlarda status epileptikustan 1 ve 7 gün sonra miR-139-5p gen ekspresyon seviyesinin downregüle olduğunu ve 60 gün sonra TLE belirlediklerini rapor etmişlerdir. Ancak aynı çalışmada pilokarpin ile tedavi öncesi ve 7 gün sonrasında tedavi alan ve almayan ratlarda miR-139-5p ekspresyon seviyelerinde bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir (243). Wang ve arkadaşları 2020 yılında yayımladıkları bir makalede elektriksel olarak amigdala tutuşturma metodu ile 196 Sprague Dawley sıçanda refrakter epilepsi modeli oluşturdukları ve PB ilaç uygulaması sonrasında refrakter epilepsi sıçan modellerinin çoğunun beyin dokularında miR-139-5p'nin azaldığını ifade etmişlerdir. Ancak klinik değerleri sınırlayan, nöronların hücre aktivitelerini ve

miR-139-5p'nin farmakodirenç üzerindeki etkisini açıkça ifade edememişlerdir (244). Diğer bir çalışmada Zhao ve arkadaşları (2021) epilepsi oluşumunda miR-139-5p upregülasyonu ve Notch sinyal iletim yolunun rol oynadığını ancak, etkileşimlerin henüz belirlenemediğini ifade etmektedir. Sıçan primer hipokampal nöronlarını izole ederek yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçların miR-139-5p yukarı regülasyonunun, miRNA'nın epilepsi oluşumu ve gelişimindeki rolüne dair yeni bilgiler sağlayan Notch yolunu düzenleyerek spontan tekrarlayan epileptiform deşarjların neden olduğu oksidatif stresi ve hücre apoptozunu hafiflettiğini belirtmişlerdir (245). Ghafouri-Fard ve arkadaşları da (2022) oluşturdukları dirençli epilepsi modelinde miR-139-5p'nin downregüle olduğunu rapor etmişlerdir (246). Burada tek tek ele aldığımız bu makaleler çeşitli epilepsi modelleri ile çalışılmış ve mir-139-5p'nin ekspresyon seviyesini araştıran yayınların tamamıdır. Bizim sonuçlarımız bu sınırlı sayıdaki yayında ifade edilen ancak, tümü status epileptikus modelini yansıtmayan sonuçlardır. Bizim çalışmamızda status epileptikus modeli oluşturulmuş ratlarda miR-139-5p ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark ifade etmemekle birlikte upregülasyon yönünde 3 katlık bir değişim ölçülmüştür. Tek ilaç tedavisi olarak MDZ uygulanan grupta -1,61'lik bir kat değişimi ile downregülasyon olduğu, CLZ tedavisi alan grupta ise 2,39 katlık bir upregülasyon olduğu, ancak bunlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği bulunmuştur. Literatürde olmayan ve bu çalışmada ortaya konulan diğer bir bulgumuza göre, MDZ+fPHT tedavisi alan grupta miR-139-5p ekspresyonunun 7 kat ($p=0,0181$), CLZ+fPHT tedavisi alan grupta ise 10 kat ($p=0,0174$) artarak istatistiksel olarak anlamlı bir farkın oluştuğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu yöndeki bulgunun daha fazla sayıda örnek kullanılarak ya da farklı deneysel eklemeler yapılarak doğrulanmaya ihtiyacı bulunmaktadır.

miR-199a-5p hipokampus gibi nöral dokularda spesifik olarak eksprese edilir (247). Memelilerde mTOR sinyal iletim yolağını hedefleyen ve hasarlı nöronlarda nöronal süreç büyümesi, rejenerasyon ve sinaptik plastisite ile ilişkili olduğu gösterilmiş bir gendir (248). Ayrıca birçok hastalıkta da apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (249,250). Ancak miR-199a-5p'nin epilepsi ve epileptik nöronal apoptozdaki rolü henüz belirlenmemiştir. Wang ve arkadaşları 2016 yılında yayımladıkları makalede, oluşturdukları epileptik modelde miR-199a-5p'nin upregüle olduğunu rapor etmişlerdir. Wang ve arkadaşları ayrıca bu yayınlarında miR-199a-5p'nin *in vivo* yıkılmasının bir sıçan epilepsi modelinde nöbetleri,

normalleştirilmiş EEG kayıtlarını ve epileptik hasarı azalttığını da tespit etmişler ve sonuçta pilokarpin ile indüklenen bir epilepsi modelinde nöronal hasarın modülasyonuna ilişkin yeni bilgiler sağlayarak miR-199a-5p/SIRT1 ekseninin modülasyonunun epilepsi tedavisi için yeni bir terapötik hedefi temsil edebileceğini öne sürmüşlerdir. Status epileptikus modeli oluşturduktan sonraki 1,3,7 ve 14. günlerde miR-199a-5p ekspresyon seviyesinin upregüle olduğunu ve 60. günde de bunun devam ederek TLE oluştuğunu rapor etmişlerdir (251). Diğer bir çalışmada Jimenez-Mateos, E. M ve arkadaşları da status epileptikus modelinde miR-199a-5p ekspresyon seviyesinin upregüle olduğunu ifade etmişlerdir (252). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular da literatürdeki tüm bu bulguları destekler niteliktedir. Çalışmamızın sonucunda tek ve kombine tedavi uygulanan tüm gruplarda miR-199a-5p'nin yukarı doğru regüle olduğu tepit edildi. Ancak bunlardan sadece MDZ+fPHT tedavisi uygulanan grupta 14 kat ($p=0,047$) artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koydu.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Literatürde status epileptikus sonrası epileptogenez sürecine katkıda bulunabilecek çok sayıda genin ekspresyonunda artış ya da azalmaların olduğu bildirilmektedir. Ancak çalışmamızda sunulan deney dizaynında, ilgili miRNA'ların incelenmesine yönelik herhangi bir deneysel çalışma bulunmamaktadır. Farklı zaman ve ilaç uygulamaları ile expresyon değişikliklerini tespit etmiş olduğumuz miRNA'ların status epileptikusta biyobelirteç olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur. Özellikle politerapi uygulanan gruplarda upregüle olduğu tespit edilen genlerin tedaviye yanıtın en iyi göstergesi olarak öne çıktığını ve yakın gelecekte ele aldığımız bu miRNA'ların özellikle antiepileptik ilaca dirençli nöbetleri olan status epileptikus olgularında terapötik biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., et al. (2019). Epilepsy in adults. *Lancet (London, England)*, 393(10172), 689–701.
2. Brophy, G. M., Bell, R., Claassen, J., et al. (2012). Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. *Neurocritical Care*, 17(1), 3–23.
3. Claassen, J., Riviello, J. J., Jr, & Silbergleit, R. (2015). Emergency Neurological Life Support: Status Epilepticus. *Neurocritical Care*, 23 Suppl 2, S136–S142.
4. Sanchez, S., & Rincon, F. (2016). Status Epilepticus: Epidemiology and Public Health Needs. *Journal of Clinical Medicine,* 5(8), 71.
5. Lu, M., Faure, M., Bergamasco, A., Spalding, W., Benitez, A., Moride, Y., & Fournier, M. (2020). Epidemiology of status epilepticus in the United States: A systematic review. *Epilepsy & behavior: E&B,* 112, 107459.
6. Pallin, D. J., Goldstein, J. N., Moussally, J. S., Pelletier, A. J., Green, A. R., & Camargo, C. A., Jr (2008). Seizure visits in US emergency departments: epidemiology and potential disparities in care. *International journal of emergency medicine,* 1(2), 97–105.
7. Farhidvash, F., Singh, P., Abou-Khalil, B., Arain, A. (2009). Patients visiting the emergency room for seizures: insurance status and clinic follow-up. *Seizure,* 18:644–7.
8. Claassen, J., & Goldstein, J. N. (2017). Emergency Neurological Life Support: Status Epilepticus. *Neurocritical care,* 27(Suppl 1), 152–158.
9. Scholtes, F. B., Renier, W. O., & Meinardi, H. (1994). Generalized convulsive status epilepticus: causes, therapy, and outcome in 346 patients. *Epilepsia,* 35(5), 1104–1112.
10. DeLorenzo, R. J., Hauser, W. A., Towne, A. R., Boggs, J. G., Pellock, J. M., Penberthy, L., Garnett, L., Fortner, C. A., & Ko, D. (1996). A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology,* 46(4), 1029–1035.
11. Chen, J.W., Wasterlain, C.G. (2006). Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurology,* 5:246–256.
12. Amengual-Gual, M., Sánchez Fernández, I., & Wainwright, M. S. (2019). Novel drugs and early polypharmacotherapy in status epilepticus. *Seizure,* 68, 79–88.
13. Goodkin, H. P., Yeh, J. L., & Kapur, J. (2005). Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(23), 5511–5520.
14. Naylor, D.E., Liu H., Wasterlain, C.G. (2005). Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *Journal of Neuroscience,* 25:7724-33.
15. Wasterlain, C. G., Liu, H., Naylor, D. E., Thompson, K. W., Suchomelova, L., Niquet, J., Mazarati, A. M., & Baldwin, R. A. (2009). Molecular basis of self-sustaining seizures and pharmacoresistance during status epilepticus: The receptor trafficking hypothesis revisited. *Epilepsia,* 50 Suppl 12, 16–18.
16. Naylor, D. E., Liu, H., Niquet, J., & Wasterlain, C. G. (2013). Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiology of Disease,* 54, 225–238.
17. Naylor D. E. (2010). Glutamate and GABA in the balance: convergent pathways sustain seizures during status epilepticus. *Epilepsia,* 51 Suppl 3, 106–109.
18. Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., & Sakmann, B. (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron,* 8(1), 189–198.
19. Brooks-Kayal, A. R., Jin, H., Price, M., & Dichter, M. A. (1998). Developmental expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs in individual hippocampal neurons in vitro and in vivo. *Journal of neurochemistry,* 70(3), 1017–1028.
20. Wong, R. K., Chuang, S. C., & Bianchi, R. (2002). Metabotropic Glutamate Receptors and Epileptogenesis. *Epilepsy currents,* 2(3), 81–85.
21. Ambros V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature,* 431(7006), 350–355.
22. Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell,* 123(4), 631–640.
23. Mooney, C., Becker, B. A., Raoof, R., & Henshall, D. C. (2016). EpimiRBase: a comprehensive database of microRNA-epilepsy associations. *Bioinformatics (Oxford, England),* 32(9), 1436–1438.

24. Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet. Neurology,* 10(2), 173–186.
25. Dogini, D. B., Avansini, S. H., Vieira, A. S., & Lopes-Cendes, I. (2013). MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 172.
26. Jimenez-Mateos, E. M., Engel, T., Merino-Serrais, P., et al. (2012). Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nature Medicine,* 18(7), 1087–1094.
27. Kan, A. A., van Erp, S., Derijck, A. A., et al. (2012). Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. *Cellular and molecular life sciences: CMLS,* 69(18), 3127–3145.
28. McKiernan, R. C., Jimenez-Mateos, E. M., Sano, T., Bray, I., Stallings, R. L., Simon, R. P., & Henshall, D. C. (2012). Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. Experimental neurology, 237(2), 346–354.
29. Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., et al., (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.
30. Temkin, O. (1971). *The falling sickness*, (2nd ed) Baltimore: Johns Hopkins.
31. Patel, P., & Moshé, S. L. (2020). The evolution of the concepts of seizures and epilepsy: What's in a name? *Epilepsia Open*, 5(1), 22–35.
32. Eadie, M.J., Bladin, P.F. (2001). *A disease once sacred: a history of the medical understanding of epilepsy*. Eastleigh: John Libbey.
33. Millett, D. (2010). Chapter 26: a history of seizures and epilepsies: from the falling disease to dysrhythmias of the brain. *Handbook of Clinical Neurology*, 95, 387–400.
34. Panteliadis, C. P., Vassilyadi, P., Fehlert, J., & Hagel, C. (2017). Historical documents on epilepsy: From antiquity through the 20th century. *Brain & Development*, 39(6), 457–463.
35. Gastaut, H. (1969). Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia*, 10, 14–21.
36. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1985). Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 26(3), 268–278.
37. Blume, W. T., Lüders, H. O., Mizrahi, et al. (2001). Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia,* 42(9), 1212–1218.
38. Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., et al. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472.
39. Ali, R., Connolly, I. D., Feroze, A. H., et al., (2016). Epilepsy: A Disruptive Force in History. *World Neurosurgery*, 90, 685-690.
40. Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K., & Diamantis, A. (2010). Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy & Behavior*, 17(1), 103-108.
41. Wilson, J. V., & Reynolds, E. H. (1990). Texts and documents. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. *Medical History*, 34(2), 185–198.
42. Cawthorne, T. (1958). Julius Caesar and the falling sickness. *Proceedings of the Royal Society of Medicine,* 51(1), 27–30.
43. Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4466), 207–210.
44. Kanner, A. M., & Nieto, J. C. (1999). Depressive disorders in epilepsy. *Neurology,* 53(5 Suppl 2), S26–S32.
45. Bruschi F. (2011). Was Julius Caesar's epilepsy due to neurocysticercosis? *Trends in Parasitology,* 27(9), 373–374.
46. Bredsdorff, A. (2009). *The Trials and Travels of Willem Leyel: An Account of the Danish East India Company in Tranquebar, 1639–1648.* Museum Tusculanum Press: University of Copenhagen.
47. Reynolds E. (2003). Sudden death in the shadows of epilepsy. *BMJ (Clinical Research ed.),* 326(7385), 349–350.
48. Hughes J. R. (2003). Emperor Napoleon Bonaparte: did he have seizures? Psychogenic or epileptic or both? *Epilepsy & Behavior: E&B,* 4(6), 793–796.
49. Lerner, V., Finkelstein, Y., & Witztum, E. (2004). The enigma of Lenin's (1870-1924) malady. *European Journal of Neurology*, 11(6), 371–376.

50. Temkin, O. (1994). *The falling sickness: A history of epilepsy from the Greeks to the beginnings of modern neurology* (2nd ed.). Baltimore: Johns Hopkins.
51. Varnado, S., & Price, D. (2020). Basics of modern epilepsy classification and terminology. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care,* 50(11), 100891.
52. Engel, J., Jr, & International League Against Epilepsy (ILAE) (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia,* 42(6), 796–803.
53. Berg, A. T., & Millichap, J. J. (2013). The 2010 revised classification of seizures and epilepsy. *Continuum (Minneapolis, Minn.),* 19(3 Epilepsy), 571–597.
54. Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., et al. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia,* 58(4), 512–521.
55. Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., et al. (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.
56. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. (1989). *Epilepsia,* 30(4), 389–399.
57. Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., et al. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia,* 51(4), 676–685.
58. Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., et al. (2018). Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18024.
59. Hauser, W. A., & Beghi, E. (2008). First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia*, 49 Suppl 1, 8–12.
60. Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., et al. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, 88(3), 296–303.
61. Singh, A., & Trevick, S. (2016). The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurologic Clinics*, 34(4), 837–847.
62. Chen, Z., Brodie, M. J., Liew, D., et al. (2018). Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs: A 30-Year Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurology*, 75(3), 279–286.
63. Kwan, P., & Sander, J. W. (2004). The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry,* 75(10), 1376–1381.
64. Bell, G. S., Neligan, A., Giavasi, C., et al. (2016). Outcome of seizures in the general population after 25 years: a prospective follow-up, observational cohort study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 87(8), 843–850.
65. Ravizza, T., Onat, F. Y., Brooks-Kayal, A. R., et al. (2017). WONOEP appraisal: Biomarkers of epilepsy-associated comorbidities. *Epilepsia,* 58(3), 331–342.
66. Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N. C., & Rogawski, M. A. (2013). Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences,* 36(3), 174–184.
67. Robel, S., Buckingham, S. C., Boni, J. L., et al. (2015). Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 35(8), 3330–3345.
68. Boison D. (2016). Adenosinergic signaling in epilepsy. *Neuropharmacology,* 104, 131–139.
69. Eyo, U. B., Murugan, M., & Wu, L. J. (2017). Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia,* 65(1), 5–18.
70. Dubé, C. M., Ravizza, T., Hamamura, M., et al. (2010). Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 30(22), 7484–7494.
71. Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A. O., Scheffer, I. E., Shinnar, S., Shorvon, S., & Lowenstein, D. H. (2015). A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia,* 56(10), 1515–1523.
72. Ascoli, M., Ferlazzo, E., Gasparini, S., Mastroianni, G., Citraro, R., Roberti, R., & Russo, E. (2021). Epidemiology and Outcomes of Status Epilepticus. *International journal of General Medicine,* 14, 2965–2973.
73. Penberthy, L. T., Towne, A., Garnett, L. K., Perlin, J. B., & DeLorenzo, R. J. (2005). Estimating the economic burden of status epilepticus to the health care system. *Seizure,* 14(1), 46–51.

74. Strzelczyk, A., Knake, S., Oertel, W. H., Rosenow, F., & Hamer, H. M. (2013). Inpatient treatment costs of status epilepticus in adults in Germany. *Seizure,* 22(10), 882–885.
75. Betjemann, J. P., & Lowenstein, D. H. (2015). Status epilepticus in adults. *The Lancet. Neurology,* 14(6), 615–624.
76. Chen, J. W., Naylor, D. E., & Wasterlain, C. G. (2007). Advances in the pathophysiology of status epilepticus. *Acta Neurologica Scandinavica,* 115(4 Suppl), 7–15.
77. Goodkin, H. P., Sun, C., Yeh, J. L., Mangan, P. S., & Kapur, J. (2007). GABA(A) receptor internalization during seizures. *Epilepsia,* 48 Suppl 5, 109–113.
78. Jones, D. M., Esmaeil, N., Maren, S., & Macdonald, R. L. (2002). Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Research,* 50(3), 301–312.
79. Roopra, A., Dingledine, R., & Hsieh, J. (2012). Epigenetics and epilepsy. *Epilepsia,* 53 Suppl 9(Suppl 9), 2–10.
80. Miller-Delaney, S. F., Das, S., Sano, T., Jimenez-Mateos, E. M., Bryan, K., Buckley, P. G., Stallings, R. L., & Henshall, D. C. (2012). Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience,* 32(5), 1577–1588.
81. Jimenez-Mateos, E. M., & Henshall, D. C. (2013). Epilepsy and microRNA. *Neuroscience,* 238, 218–229.
82. Meierkord, H., & Holtkamp, M. (2007). Non-convulsive status epilepticus in adults: clinical forms and treatment. *The Lancet. Neurology,* 6(4), 329–339.
83. Meldrum, B. S., & Horton, R. W. (1973). Physiology of status epilepticus in primates. Archives of Neurology, 28(1), 1–9.
84. Sankar, R., Shin, D. H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A., & Wasterlain, C. G. (1998). Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience,* 18(20), 8382–8393.
85. Chuang, Y. C., Chang, A. Y., Lin, J. W., Hsu, S. P., & Chan, S. H. (2004). Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia,* 45(10), 1202–1209.
86. Lopez-Meraz, M. L., Niquet, J., & Wasterlain, C. G. (2010). Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus. *Epilepsia,* 51 Suppl 3(Suppl 3), 56–60.
87. DeGiorgio, C. M., Correale, J. D., Gott, P. S., Ginsburg, D. L., Bracht, K. A., Smith, T., Boutros, R., Loskota, W. J., & Rabinowicz, A. L. (1995). Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology,* 45(6), 1134–1137.
88. DeGiorgio, C. M., Gott, P. S., Rabinowicz, A. L., Heck, C. N., Smith, T. D., & Correale, J. D. (1996). Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia,* 37(7), 606–609.
89. Kwan, P., & Brodie, M. J. (2000). Early identification of refractory epilepsy. *The New England Journal of Medicine,* 342(5), 314–319.
90. Kwan, P., & Brodie, M. J. (2004). Drug treatment of epilepsy: when does it fail and how to optimize its use? *CNS Spectrums,* 9(2), 110–119.
91. Hakami T. (2021). Neuropharmacology of Antiseizure Drugs. *Neuropsychopharmacology Reports,* 41(3), 336–351.
92. Mattson, R. H., Cramer, J. A., Collins, J. F., et al. (1985). Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures. *The New England Journal of Medicine,* 313(3), 145–151.
93. Stephen, L. J., & Brodie, M. J. (2011). Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents. *CNS Drugs*, 25(2), 89–107.
94. Marson, A. G., Kadir, Z. A., Hutton, J. L., & Chadwick, D. W. (1997). The new antiepileptic drugs: a systematic review of their efficacy and tolerability. *Epilepsia,* 38(8), 859–880.
95. Löscher W. (2017). Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research,* 42(7), 1873–1888.
96. Bialer, M., & White, H. S. (2010). Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Nature reviews. *Drug Discovery,* 9(1), 68–82.
97. Sills, G. J., & Rogawski, M. A. (2020). Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology,* 168, 107966.

98. Glauser, T., Shinnar, S., Gloss, D., et al. (2016). Evidence-Based Guideline: Treatment of Convulsive Status Epilepticus in Children and Adults: Report of the Guideline Committee of the American Epilepsy Society. *Epilepsy Currents,* 16(1), 48–61.
99. Brigo, F., Del Giovane, C., Nardone, R., et al. (2019). Intravenous antiepileptic drugs in adults with benzodiazepine-resistant convulsive status epilepticus: A systematic review and network meta-analysis. *Epilepsy & Behavior: E&B,* 101(Pt B), 106466.
100. Kim, D., Kim, J. M., Cho, Y. W., et al. (2021). Antiepileptic Drug Therapy for Status Epilepticus. *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea),* 17(1), 11–19.
101. Demarest, S. T., & Brooks-Kayal, A. (2018). From molecules to medicines: the dawn of targeted therapies for genetic epilepsies. *Nature Reviews. Neurology,* 14(12), 735–745.
102. Hutchison C. A., 3rd (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research,* 35(18), 6227–6237.
103. Hauser, W. A., Annegers, J. F., & Kurland, L. T. (1993). Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia,* 34(3), 453–468.
104. Perucca, P., Bahlo, M., & Berkovic, S. F. (2020). The Genetics of Epilepsy. Annual review of genomics and human genetics, 21, 205–230.
105. Ellis, C. A., Petrovski, S., & Berkovic, S. F. (2020). Epilepsy genetics: clinical impacts and biological insights. *The Lancet. Neurology,* 19(1), 93–100.
106. Hildebrand, M. S., Harvey, A. S., Malone, S., et al. (2018). Somatic GNAQ mutation in the forme fruste of Sturge-Weber syndrome. *Neurology. Genetics,* 4(3), e236.
107. Sim, N. S., Ko, A., Kim, W. K., et al. (2019). Precise detection of low-level somatic mutation in resected epilepsy brain tissue. *Acta Neuropathologica,* 138(6), 901–912.
108. International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies (2018). Genome-wide mega-analysis identifies 16 loci and highlights diverse biological mechanisms in the common epilepsies. *Nature Communications,* 9(1), 5269.
109. Eriksson, H., Wirdefeldt, K., Åsberg, S., & Zelano, J. (2019). Family history increases the risk of late seizures after stroke. *Neurology,* 93(21), e1964–e1970.
110. Petrovski, S., Wang, Q., Heinzen, E. L., Allen, A. S., & Goldstein, D. B. (2013). Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genetics,* 9(8), e1003709.
111. Gussow, A. B., Petrovski, S., Wang, Q., Allen, A. S., & Goldstein, D. B. (2016). The intolerance to functional genetic variation of protein domains predicts the localization of pathogenic mutations within genes. *Genome Biology,* 17, 9.
112. Millichap, J. J., Park, K. L., Tsuchida, T., et al. (2016). KCNQ2 encephalopathy: Features, mutational hot spots, and ezogabine treatment of 11 patients. *Neurology. Genetics,* 2(5), e96.
113. Miceli, F., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., et al. (2013). Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K(v)7.2 potassium channel subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 110(11), 4386–4391.
114. Coppola, A., Cellini, E., Stamberger, H., et al. (2019). Diagnostic implications of genetic copy number variation in epilepsy plus. Epilepsia, 60(4), 689–706.
115. Conlin, L. K., Kramer, W., Hutchinson, A. L., et al. (2011). Molecular analysis of ring chromosome 20 syndrome reveals two distinct groups of patients. *Journal of Medical Genetics,* 48(1), 1–9.
116. Bahlo, M., Bennett, M. F., Degorski, P., et al. (2018). Recent advances in the detection of repeat expansions with short-read next-generation sequencing. *F1000Research, 7*, F1000 Faculty Rev-736.
117. Turbitt, E., Halliday, J. L., Amor, D. J., & Metcalfe, S. A. (2015). Preferences for results from genomic microarrays: comparing parents and health care providers. *Clinical Genetics,* 87(1), 21–29.
118. Oyrer, J., Maljevic, S., Scheffer, I. E., et al. (2018). Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacological Reviews,* 70(1), 142–173.
119. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics,* 17(5), 405–424.
120. French, J. A., Lawson, J. A., Yapici, Z., et al. (2016). Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet (London, England),* 388(10056), 2153–2163.

121. Tan, C., Shard, C., Ranieri, E., et al. (2015). Mutations of protocadherin 19 in female epilepsy (PCDH19-FE) lead to allopregnanolone deficiency. *Human Molecular Genetics,* 24(18), 5250–5259.
122. Devinsky, O., Cross, J. H., Laux, L., et al. (2017). Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *The New England Journal of Medicine,* 376(21), 2011–2020.
123. Lagae, L., Sullivan, J., Knupp, K., et al. (2019). Fenfluramine hydrochloride for the treatment of seizures in Dravet syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England),* 394(10216), 2243–2254.
124. Richards, K. L., Milligan, C. J., Richardson, R. J., et al. (2018). Selective NaV1.1 activation rescues Dravet syndrome mice from seizures and premature death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(34), E8077–E8085.
125. Kullmann, D. M., Schorge, S., Walker, M. C., & Wykes, R. C. (2014). Gene therapy in epilepsy-is it time for clinical trials? *Nature Reviews. Neurology,* 10(5), 300–304.
126. Henshall, D. C., Hamer, H. M., Pasterkamp, R. J., et al. (2016). MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *The Lancet. Neurology,* 15(13), 1368–1376.
127. Henshall D. C. (2020). Epigenetics and noncoding RNA: Recent developments and future therapeutic opportunities. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society,* 24, 30–34.
128. Zhang, L., & Wang, Y. (2021). Gene therapy in epilepsy. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 143, 112075.
129. Simonato M. (2014). Gene therapy for epilepsy. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 38, 125–130.
130. Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., et al. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The Journal of Gene Medicine*, 20(5), e3015.
131. Cearley, C. N., Vandenberghe, L. H., Parente, M. K., et al. (2008). Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. Molecular therapy: *The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(10), 1710–1718.
132. Young, D., Fong, D. M., Lawlor, P. A., et al. (2014). Adenosine kinase, glutamine synthetase and EAAT2 as gene therapy targets for temporal lobe epilepsy. *Gene Therapy*, 21(12), 1029–1040.
133. Hocquemiller, M., Giersch, L., Audrain, M., et al. (2016). Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Human Gene Therapy*, 27(7), 478–496.
134. Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *The New England Journal of Medicine,* 377(18), 1713–1722.
135. Ingusci, S., Verlengia, G., Soukupova, M., et al. (2019). Gene Therapy Tools for Brain Diseases. *Frontiers in Pharmacology,* 10, 724.
136. Bouard, D., Alazard-Dany, D., & Cosset, F. L. (2009). Viral vectors: from virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology,* 157(2), 153–165.
137. Vandamme, C., Adjali, O., & Mingozzi, F. (2017). Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial. *Human Gene Therapy,* 28(11), 1061–1074.
138. Jayant, R. D., Sosa, D., Kaushik, A., Atluri, V., Vashist, A., Tomitaka, A., & Nair, M. (2016). Current status of non-viral gene therapy for CNS disorders. *Expert Opinion on Drug Delivery,* 13(10), 1433–1445.
139. Ying, SY., Chang, D.C., Lin, SL. (2018). *The MicroRNA.* In: Ying, SY. (eds) MicroRNA Protocols . Methods in Molecular Biology, vol 1733. Humana Press, New York, NY.
140. Almeida, M. I., Reis, R. M., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research,* 717(1-2), 1–8.
141. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell,* 75(5), 843–854.
142. Chalfie, M., Horvitz, H. R., & Sulston, J. E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of C. elegans. *Cell,* 24(1), 59–69.
143. Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. *Cell,* 116(2 Suppl), S89–S96.
144. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., et al. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature,* 403(6772), 901–906.
145. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research,* 36 (Database issue), D154–D158.
146. Huang, d., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols,* 4(1), 44–57.
147. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. Nature reviews. *Molecular Cell Biology,* 15(8), 509–524.

148. Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research,* 42(Database issue), D68–D73.
149. Brennan, G. P., & Henshall, D. C. (2020). MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. Nature reviews. *Neurology,* 16(9), 506–519.
150. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., et al. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. The EMBO Journal, 21(17), 4663–4670.
151. Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology,* 18(10), 505–516.
152. Ozsolak, F., Poling, L. L., Wang, Z., et al. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & Development,* 22(22), 3172–3183.
153. Monteys, A. M., Spengler, R. M., Wan, J., et al. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* (New York, N.Y.), 16(3), 495–505.
154. Bartel D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. Cell, 173(1), 20–51.
155. García-López, J., Brieño-Enríquez, M. A., & Del Mazo, J. (2013). MicroRNA biogenesis and variability. *Biomolecular Concepts,* 4(4), 367–380.
156. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology,* 234(5), 5451–5465.
157. Nguyen, T. A., Park, J., Dang, T. L., et al. (2018). Microprocessor depends on hemin to recognize the apical loop of primary microRNA. *Nucleic Acids Research,* 46(11), 5726–5736.
158. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., et al. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science, 303(5654), 95–98.*
159. Zealy, R. W., Wrenn, S. P., Davila, S., Min, K. W., & Yoon, J. H. (2017). MicroRNA-binding proteins: Specificity and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA,* 8, 5.
160. Abdelfattah, A. M., Park, C., & Choi, M. Y. (2014). Update on non-canonical microRNAs. Biomolecular concepts, 5(4), 275–287.
161. Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. Biochimie, 93(11), 1897–1904.
162. Hammond S. M. (2015). An overview of microRNAs. Advanced drug delivery reviews, 87, 3–14.
163. Vidigal, J. A., & Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. Trends in cell biology, 25(3), 137–147.
164. Moutinho, C., & Esteller, M. (2017). MicroRNAs and Epigenetics. *Advances in Cancer Research,* 135, 189–220.
165. Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell,* 128(4), 683–692.
166. Hatziapostolou, M., & Iliopoulos, D. (2011). Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS,* 68(10), 1681–1702.
167. Malumbres M. (2013). miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Molecular Aspects of Medicine,* 34(4), 863–874.
168. Yao, Q., Chen, Y., & Zhou, X. (2019). The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology,* 51, 11–17.
169. Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics,* 33 Suppl, 245–254.
170. Jin, C., Li, M., Ouyang, Y., Tan, Z., & Jiang, Y. (2017). MiR-424 functions as a tumor suppressor in glioma cells and is down-regulated by DNA methylation. *Journal of Neuro-oncology*, 133(2), 247–255.
171. He, C., Zhao, X., Jiang, H., Zhong, Z., & Xu, R. (2015). Demethylation of miR-10b plays a suppressive role in ccRCC cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 10595–10604.
172. Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., & Lyko, F. (2007). Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.),* 6(9), 1001–1005.
173. Ting, A. H., McGarvey, K. M., & Baylin, S. B. (2006). The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes & Development,* 20(23), 3215–3231.
174. Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128(4), 635–638.
175. Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell,* 128(4), 669–681.
176. Wang, Z., Yao, H., Lin, S., et al. (2013). Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer Letters,* 331(1), 1–10.

177. Lujambio, A., & Lowe, S. W. (2012). The microcosmos of cancer. *Nature,* 482(7385), 347–355.
178. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. P*roceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 99(24), 15524–15529.
179. Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell,* 9(3), 189–198.
180. Gargalionis, A. N., & Basdra, E. K. (2013). Insights in microRNAs biology. *Current Topics in Medicinal Chemistry,* 13(13), 1493–1502.
181. Hébert, S. S., Horré, K., Nicolaï, L., et al. (2009). MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiology of Disease,* 33(3), 422–428.
182. Hébert, S. S., Papadopoulou, A. S., Smith, P., et al. (2010). Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics,* 19(20), 3959–3969.
183. Quinlan, S., Kenny, A., Medina, M., et al. (2017). MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases. *International Review of Cell and Molecular Biology,* 334, 309–343.
184. Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., et al. (2007). A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science (New York, N.Y.),* 317(5842), 1220–1224.
185. Martí, E., Pantano, L., Bañez-Coronel, M., et al. (2010). A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Research,* 38(20), 7219–7235.
186. Fernández-Hernando, C., Ramírez, C. M., Goedeke, L., & Suárez, Y. (2013). MicroRNAs in metabolic disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,* 33(2), 178–185.
187. Lynn, F. C., Skewes-Cox, P., Kosaka, Y., et al. (2007). MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes,* 56(12), 2938–2945.
188. Melkman-Zehavi, T., Oren, R., Kredo-Russo, S., et al. (2011). miRNAs control insulin content in pancreatic β-cells via downregulation of transcriptional repressors. *The EMBO Journal,* 30(5), 835–845.
189. Rotllan, N., & Fernández-Hernando, C. (2012). MicroRNA Regulation of Cholesterol Metabolism. *Cholesterol,* 2012, 847849.
190. van Rooij, E., Sutherland, L. B., Liu, N., et al. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 103(48), 18255–18260.
191. van Solingen, C., Seghers, L., Bijkerk, R., et al. (2009). Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 13(8A), 1577–1585.
192. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 105(30), 10513–10518.
193. Hu, Z., Chen, X., Zhao, Y., et al. (2010). Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology,* 28(10), 1721–1726.
194. Satoh, J., Kino, Y., & Niida, S. (2015). MicroRNA-Seq Data Analysis Pipeline to Identify Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease from Public Data. *Biomarker Insights,* 10, 21–31.
195. Kumar, P., Dezso, Z., MacKenzie, C., et al. (2013). Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PloS One,* 8(7), e69807.
196. Alexandrov, P. N., Dua, P., Hill, J. M., et al. (2012). microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology,* 3(4), 365–373.
197. Margis, R., Margis, R., & Rieder, C. R. (2011). Identification of blood microRNAs associated to Parkinsonĭs disease. *Journal of Biotechnology,* 152(3), 96–101.
198. Hoss, A. G., Lagomarsino, V. N., Frank, S., et al. (2015). Study of plasma-derived miRNAs mimic differences in Huntington's disease brain. *Movement Disorders: official journal of the Movement Disorder Society,* 30(14), 1961–1964.
199. Corsten, M. F., Dennert, R., Jochems, S., et al. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. Circulation. *Cardiovascular Genetics,* 3(6), 499–506.
200. Bostjancic, E., Zidar, N., Stajer, D., & Glavac, D. (2010). MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology,* 115(3), 163–169.

201. Mendell, J. T., & Olson, E. N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell,* 148(6), 1172–1187.
202. Stenvang, J., Silahtaroglu, A. N., Lindow, M., et al. (2008). The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Seminars in Cancer Biology,* 18(2), 89–102.
203. Obad, S., dos Santos, C. O., Petri, A., et al. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics,* 43(4), 371–378.
204. Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., et al. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature,* 438(7068), 685–689.
205. Kota, J., Chivukula, R. R., O'Donnell, K. A., et al. (2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell,* 137(6), 1005–1017.
206. Pramanik, D., Campbell, N. R., Karikari, C., et al. (2011). Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Molecular Cancer Therapeutics,* 10(8), 1470–1480.
207. Demirtaş, C. (2022). *Deneysel status epileptikusta midazolam ve klonazepamin ikinci basamak tedavide kullanılan antiepileptik ilaçlarla etkileşimi.* Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
208. Paxinos, G., Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* San Diego: Academic Press.
209. Gedikli, Ö., Akca, M., & Yildirim, M. (2021). Electroencephalographic investigation of the effects of Ginkgo biloba on spike-wave discharges in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsy & Behavior: E&B,* 122, 108165.
210. Smirnova, L., Gräfe, A., Seiler, A., et al. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *The European journal of neuroscience,* 21(6), 1469–1477.
211. Ferretti, E., De Smaele, E., Miele, E., et al. (2008). Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *The EMBO journal,* 27(19), 2616–2627.
212. Stappert, L., Borghese, L., Roese-Koerner, B., et al. O. (2013). MicroRNA-based promotion of human neuronal differentiation and subtype specification. *PloS one,* 8(3), e59011.
213. Heydari, M., Hojati, Z., & Dehbashi, M. (2021). Identification of Circulating hsa-miR-324-3p and hsa-miR-331-3p Exchanges in The Serum of Alzheimer's Patients and Insights into The Pathophysiological Pathways. *Cell journal,* 23(2), 211–217.
214. Liu, F. J., Lim, K. Y., Kaur, P., et al. (2013). microRNAs Involved in Regulating Spontaneous Recovery in Embolic Stroke Model. *PloS one,* 8(6), e66393.
215. Almeida Silva, L. F., Reschke, C. R., Nguyen, N. T., et al. (2020). Genetic deletion of microRNA-22 blunts the inflammatory transcriptional response to status epilepticus and exacerbates epilepsy in mice. *Molecular brain,* 13(1), 114.
216. Jimenez-Mateos, E. M., Arribas-Blazquez, M., Sanz-Rodriguez, A., et al. (2015). microRNA targeting of the P2X7 purinoceptor opposes a contralateral epileptogenic focus in the hippocampus. *Scientific reports,* 5, 17486.
217. Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., et al. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic acids research,* 44(8), 3865–3877.
218. Jovicic, A., Zaldivar Jolissaint, J. F., Moser, R., et al. (2013). MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms. *PloS one,* 8(1), e54222.
219. Yu, H., Wu, M., Zhao, P., et al. (2015). Neuroprotective effects of viral overexpression of microRNA-22 in rat and cell models of cerebral ischemia-reperfusion injury. *Journal of cellular biochemistry,* 116(2), 233–241.
220. Guerra Leal, B., Barros-Barbosa, A., Ferreirinha, F., et al. (2022). Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE) Drug-Refractoriness Is Associated With P2X7 Receptors Overexpression in the Human Hippocampus and Temporal Neocortex and May Be Predicted by Low Circulating Levels of miR-22. *Frontiers in cellular neuroscience,* 16, 910662.
221. Hermeking H. (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death and Differentiation,* 17(2), 193–199.
222. Chang, T. C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., et al. (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell,* 26(5), 745–752.
223. Hu, K., Xie, Y. Y., Zhang, C., et al. (2012). MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neuroscience,* 13, 115.
224. Sano, T., Reynolds, J. P., Jimenez-Mateos, E. M., et al. (2012). MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. *Cell Death & Disease,* 3(3), e287.

225. Henshall D. C. (2013). MicroRNAs in the pathophysiology and treatment of status epilepticus. *Frontiers in molecular neuroscience,* 6, 37.
226. McClelland, S., Brennan, G. P., Dubé, C., et al. (2014). The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. *eLife,* 3, e01267.
227. Feng, Y., Yang, H., Yue, Y., & Tian, F. (2020). MicroRNAs and target genes in epileptogenesis. *Epilepsia,* 61(10), 2086–2096.
228. Peng, J., Omran, A., Ashhab, M. U., et al. (2013). Expression patterns of miR-124, miR-134, miR-132, and miR-21 in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of molecular neuroscience: MN,* 50(2), 291–297.
229. Risbud, R. M., & Porter, B. E. (2013). Changes in microRNA expression in the whole hippocampus and hippocampal synaptoneurosome fraction following pilocarpine induced status epilepticus. *PloS one*, 8(1), e53464.
230. Gitaí, D., Dos Santos, Y., Upadhya, R., et al. (2020). Extracellular Vesicles in the Forebrain Display Reduced miR-346 and miR-331-3p in a Rat Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy. *Molecular neurobiology,* 57(3), 1674–1687.
231. Zhang, L., Li, Y., Ye, X., & Bian, L. (2018). Bioinformatics Analysis of Microarray Profiling Identifies That the miR-203-3p Target Ppp2ca Aggravates Seizure Activity in Mice. *Journal of molecular neuroscience: MN,* 66(1), 146–154.
232. Schratt G. (2009). microRNAs at the synapse. Nature reviews. *Neuroscience*, 10(12), 842–849.
233. McNeill, E., & Van Vactor, D. (2012). MicroRNAs shape the neuronal landscape. *Neuron,* 75(3), 363–379.
234. Rochefort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO reports,* 13(8), 699–708.
235. Jimenez-Mateos, E. M., Engel, T., Merino-Serrais, P., et al. (2015). Antagomirs targeting microRNA-134 increase hippocampal pyramidal neuron spine volume in vivo and protect against pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Structure & Function,* 220(4), 2387–2399.
236. Zhang, W., Kim, P. J., Chen, Z., et al. (2016). MiRNA-128 regulates the proliferation and neurogenesis of neural precursors by targeting PCM1 in the developing cortex. *eLife,* 5, e11324.
237. Tan, C. L., Plotkin, J. L., Venø, M. T., et al. (2013). MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science (New York, N.Y.),* 342(6163), 1254–1258.
238. Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., et al. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology,* 5(3), R13.
239. Pichardo-Casas, I., Goff, L. A., Swerdel, M. R., et al. (2012). Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain research,* 1436, 20–33.
240. Gorter, J. A., Iyer, A., White, I., et al. (2014). Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease,* 62, 508–520.
241. Skalsky, R. L., & Cullen, B. R. (2011). Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PloS one,* 6(9), e24248.
242. Noh, H., Park, C., Park, S., Lee, Y. S., Cho, S. Y., & Seo, H. (2014). Prediction of miRNA-mRNA associations in Alzheimer's disease mice using network topology. *BMC genomics,* 15(1), 644.
243. Alsharafi, W. A., Xiao, B., & Li, J. (2016). MicroRNA-139-5p negatively regulates NR2A-containing NMDA receptor in the rat pilocarpine model and patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia,* 57(11), 1931–1940.
244. Wang, L., Song, L., Chen, X., Suo, J., Ma, Y., Shi, J., Liu, K., & Chen, G. (2020). microRNA-139-5p confers sensitivity to antiepileptic drugs in refractory epilepsy by inhibition of MRP1. *CNS neuroscience & therapeutics,* 26(4), 465–474.
245. Zhao, C., Yang, F., Wei, X., & Zhang, J. (2021). miR-139-5p upregulation alleviated spontaneous recurrent epileptiform discharge-induced oxidative stress and apoptosis in rat hippocampal neurons via regulating the Notch pathway. *Cell biology international,* 45(2), 463–476.
246. Ghafouri-Fard, S., Hussen, B. M., Abak, A., et al. (2022). Aberrant expression of miRNAs in epilepsy. *Molecular biology reports,* 49(6), 5057–5074.
247. Hua, Y. J., Tang, Z. Y., Tu, K., et al. (2009). Identification and target prediction of miRNAs specifically expressed in rat neural tissue. *BMC genomics*, 10, 214.
248. Liu, G., Detloff, M. R., Miller, K. N., et al. (2012). Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury. *Experimental neurology,* 233(1), 447–456.

249. Shatseva, T., Lee, D. Y., Deng, Z., & Yang, B. B. (2011). MicroRNA miR-199a-3p regulates cell proliferation and survival by targeting caveolin-2. *Journal of cell science,* 124(Pt 16), 2826–2836.
250. Zhang, J., Wu, G. Q., Zhang, Y., et al. (2013). Propofol induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulation of microRNA-199a expression. *Cell biology international,* 37(3), 227–232.
251. Wang, D., Li, Z., Zhang, Y., et al. (2016). Targeting of microRNA-199a-5p protects against pilocarpine-induced status epilepticus and seizure damage via SIRT1-p53 cascade. *Epilepsia,* 57(5), 706–716.
252. Jimenez-Mateos, E. M., Bray, I., Sanz-Rodriguez, A., et al. (2011). miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. *The American journal of pathology,* 179(5), 2519–2532.

EK

Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 24/11/2020-E.41028

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 20/11/2020
Toplantı Sayısı : 06
Karar Sayısı : 01

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi **Doç. Dr. Ender Mehmet COŞKUNPINAR**'ın yürütücüsü olduğu **"Deneysel Status Epileptikus Modelinde Midazolam ve Klonazepam Uygulanması Sonrası Biyomarkır Olarak Öne Çıkan Muhtemel miRNA'ların Araştırılması"** başlıklı bilimsel çalışma önerisi 20.11.2020 tarihli 06 sayılı toplantıda Etik Kurulumuz tarafından görüşülmüş olup, etik açıdan **uygun** olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Aslı Gibidir
e-imzalıdır
Prof. Dr. Ülkan KILIÇ
HADYEK Başkanı

Evrakı Doğrulamak İçin : http://ebys.sbu.edu.tr/enVision/Validate_Doc.aspx?V=BE8A4KYJV

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.