



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**PENİSİLİNLE OLUŞTURULAN EPİLEPTİFORM
AKTİVİTEDE P2X7 RESEPTÖRLERİ İLE KANABİNOİD CB1
RESEPTÖRLERİNİN ETKİLEŞİMİ**

Doktora Tezi

Gökhan ARSLAN

Danışman
Prof. Dr. Erdal AĞAR

SAMSUN
2022

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**PENİSİLİNLE OLUŞTURULAN EPİLEPTİFORM
AKTİVİTEDE P2X7 RESEPTÖRLERİ İLE KANABİNOİD CB1
RESEPTÖRLERİNİN ETKİLEŞİMİ**

Doktora Tezi

Gökhan ARSLAN

Danışman

Prof. Dr. Erdal AĞAR

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 1001 kodlu (proje no: 115S361) proje ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Gökhan ARSLAN tarafından, **Prof. Dr. Erdal AĞAR** danışmanlığında hazırlanan “ **Penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitede P2X7 reseptörleri ile kanabinoid CB1 reseptörlerinin etkileşimi** ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 29.08.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Erdal AĞAR Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. İsmail SARI Kırklareli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet

Hayır

İmza

22 /08/ 2022

Gökhan ARSLAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitede P2X7 reseptörleri ile kanabinoid CB1 reseptörlerinin etkileşimi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 22.08.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 14

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

İmza

22 /08/ 2022

Prof. Dr. Erdal AĞAR

ÖZET

PENİSİLİNLE OLUŞTURULAN EPİLEPTİFORM AKTİVİTEDE P2X7 RESEPTÖRLERİ İLE KANABİNOİD CB1 RESEPTÖRLERİNİN ETKİLEŞİMİ

Gökhan ARSLAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Fizyoloji Ana Bilim Dalı
Doktora, Ağustos/2022
Danışman: Prof. Dr. Erdal AĞAR

Giriş-Amaç: P2X7 reseptörleri ve kanabinoid CB1 reseptörleri epilepsi fizyopatolojisinde rol oynamaktadırlar. Çalışmamızın amacı, penisilinle oluşturulmuş epileptiform aktivitede bu reseptörlerin olası etkileşimini araştırmaktır.

Yöntem: 84 adet yetişkin erkek Wistar albino sıçan 12 gruba ayrıldı. Üretan anestezisi altında stereotaksik cihaza sabitlenen sıçanların kafataslarına tripolar elektrotlar yerleştirildi. Penisilinle (i.k.) epileptiform aktivite oluşturulduktan yarım saat sonra P2X7 reseptör antagonisti A-438079 (20 µg), agonisti BzATP (100 µg) ve CB1 reseptör agonisti ACEA (7,5 µg), antagonisti AM251 (0,25 µg) tek başlarına ve kombine olarak i.s.v. yoldan uygulandı. 120 dakikalık interiktal spike aktivitesi kaydından sonra sıçanlar dekapite edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Sandviç ELISA metodu kullanılarak serebral AOPP, MDA, SOD, CAT ve GSH seviyeleri ölçüldü. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi yapıldıktan sonra gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda Tukey-Kramer post-hoc testi kullanıldı.

Bulgular: A-438079 60. dakikadan itibaren, ACEA ise 30. dakikadan itibaren spike frekansını azaltırken; BzATP 20. dakikadan itibaren ve AM251 20. dakikadan itibaren spike frekansını artırdı. A-438079+ACEA kombinasyonu 20. dakikadan itibaren spike frekansını azalttı. A-438079+ACEA kombinasyonu A-438079 grubuna göre 40-60. dakikalar arasında spike frekansını azaltırken, ACEA grubuna göre anlamlı değildi. A-438079+AM251 birlikte uygulandığında AM251, A-438079'un antikonvulzan etkisini blokladı. Yine, BzATP+ACEA uygulandığında, BzATP'nin prokonvulzan etkisi ACEA tarafından bloklandı. BzATP+AM251 (iki prokonvulzan ajan) birlikte uygulandığında ise kombinasyon grubu BzATP'ye göre sadece 110 ve 120. dakikalarda spike frekansını artırırken, AM251 grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. A-438079+ACEA kombinasyonu AOPP, MDA, SOD, CAT ve GSH seviyelerini penisilin+SF grubuna göre azalttı. Kombinasyon grubu ne A438079 ne de ACEA grubuna göre anlamlı bir değişim göstermedi. Diğer taraftan, BzATP+AM251 kombinasyonu AOPP, MDA ve GSH düzeylerini penisilin+SF grubuna göre artırırken ne BzATP ne de AM251 grubuna göre anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuçlar: P2X7 reseptörleri bloklandığında ortaya çıkan antiepileptik aktive CB1 reseptörlerinin bloklanmasıyla inhibe olmuştur. P2X7 reseptörlerinin aktivasyonu ile ortaya çıkan proepileptik aktivite ise CB1 reseptörlerinin aktivitesi ile birlikte inhibe edilmiştir. Bu bulgular, P2X7 ve CB1 reseptörleri arasında olası bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu iki reseptör arasındaki etkileşimin hücre içi yollar aracılığıyla mı yoksa reseptörler düzeyinde bir etkileşim nedeniyle mi gerçekleştiğini saptamak için ileri düzey moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Epilepsi, Penisilin modeli deneysel epilepsi, P2X7 reseptörleri, CB1 reseptörleri, MDA, SOD, CAT

ABSTRACT

INTERACTION BETWEEN P2X7 RECEPTORS WITH CANNABINOID CB1 RECEPTORS IN PENICILLIN-INDUCED EPILEPTIFORM ACTIVITY

Gökhan ARSLAN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Physiology

Ph.D., August/2022

Supervisor: Prof. Dr. Erdal AĞAR

Introduction-Aim: P2X7 receptors and cannabinoid CB1 receptors play a role in the pathophysiology of epilepsy. The aim of this study is to investigate the possible interaction of these receptors in penicillin-induced epileptiform activity.

Methods: Adult male Wistar albino rats (n=84) were divided into 12 groups. Under urethane anesthesia rats were fixed to the stereotaxic device and tripolar electrodes were placed on the skulls. Half an hour after induction of epileptiform activity with penicillin (i.c.), P2X7 receptor antagonist A-438079 (20 µg), agonist BzATP (100 µg) and CB1 receptor agonist ACEA (7.5 µg), antagonist AM251 (0.25 µg) administered intracerebroventricularly alone and in combination. After 120 minutes of recording of interictal spike activity, the rats were decapitated and brain tissues were extracted. Cerebral AOPP, MDA, SOD, CAT and GSH levels were measured using the sandwich ELISA method. For statistical analysis, One-way analysis of variance (ANOVA) test was performed and after Tukey-Kramer post-hoc test was used for multiple comparisons between groups.

Results: While A-438079 decreases the spike frequency from the 60th minute and ACEA from the 30th minute; BzATP increased the spike frequency from the 20th minute and AM251 from the 20th minute. The combination of A-438079+ACEA decreased the spike frequency from the 20th minute. While the combination of A-438079+ACEA decreased the spike frequency between 40-60 min compared to the A-438079 group, it was not significant compared to the ACEA group. When A-438079+AM251 was administered together, AM251 blocked the anticonvulsant effect of A-438079. On the other hand, when BzATP+ACEA was administered, the proconvulsant effect of BzATP was blocked by ACEA. When BzATP+AM251 (two proconvulsant agents) was applied together, the combination group increased the spike frequency only at 110 and 120 minutes compared to BzATP, but did not alter spike activity compared to the AM251 group. A-438079+ACEA combination decreased AOPP, MDA, SOD, CAT and GSH levels compared to penicillin+SF group. The combination group did not differ significantly from either the A438079 or ACEA group. On the other hand, while the combination of BzATP+AM251 increased AOPP, MDA and GSH levels compared to the penicillin+SF group, no significant difference was found compared to either BzATP or AM251 groups.

Conclusions: Antiepileptic activity by blocking P2X7 receptors was inhibited by blocking the CB1 receptors. Proepileptic activity by the activation of the P2X7 receptors was inhibited by the activation of CB1 receptors. These findings suggest a possible interaction between P2X7 and CB1 receptors. Further molecular studies are needed to determine whether the interaction between these two receptors occurs through intracellular pathways or due to an interaction at the receptor level.

Keywords: Epilepsy, Penicillin model experimental epilepsy, P2X7 receptors, CB1 receptors, MDA, SOD, CAT

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Üzerimde büyük emeği olan, eğitimim süresince yaptığım çalışmalarda, tezimde ve her türlü konuda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Erdal AĞAR'a öncelikle teşekkür ederim. Gönülden desteği ve teşvikiyle gelişimimde büyük katkısı olan, fikirlerine her zaman ihtiyaç duyduğum değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ'a, hoşgörüsünü, tecrübelerini, muhabbetini hiç esirgemeyen ve bilimsel bakış açımın gelişmesinde büyük emeği olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayhan BOZKURT'a, çalışmamdaki yardımlarından ve desteğinden dolayı çalışma arkadaşım Dr. Öğr. Görevlisi Süleyman Emre KOCACAN'a, biyokimyasal açıdan yardımları ve manevi desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Bahattin AVCI ve Uzman doktor Emil RZAYEV'e ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Başarımlarımın mimarları olan sevgili Annem ve Babam'a, bu süreçte her zaman yanımda olan ve hoşgörüsünü hiç esirgemeyen biricik Eşim'e ve sevgisiyle her daim beni motive eden Oğlum'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epilepsi	4
2.1.1. Epileptik nöbet	4
2.1.2. Epilepsi sınıflandırılması	5
2.1.2.1. Fokal (Parsiyel) nöbetler	5
2.1.2.2. Jeneralize nöbetler (Emil Tez)	6
2.1.2.3. Başlangıcı bilinmeyen nöbetler	6
2.1.3. Elektroensefalogram (EEG) ve Elektrokortikogram (ECoG)	7
2.1.3.1. Gama dalgaları	8
2.1.3.2. Beta dalgaları.....	9
2.1.3.3. Alfa dalgaları	9
2.1.3.4. Teta dalgaları	9
2.1.3.5. Delta dalgaları	9
2.1.4. Epilepside deneysel modeller.....	10
2.1.4.1. Penisilin modeli deneysel epilepsi	10
2.2. Pürinerjik reseptörler	11
2.2.1. P2X7 reseptörleri	12
2.2.1.1. P2X7 reseptörleri ve epilepsi	13
2.3. Kanabinoid Sistem	15
2.3.1. Fitokanabinoidler ve sentetik kanabinoidler	16
2.3.2. Kanabinoidlerin etkileri.....	18
2.3.3. CB1 reseptörleri	19
2.3.4. Kanabinoidler ve epilepsi	19
2.4. Oksidan ve antioksidan sistem	20

3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Deney Hayvanları	23
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	23
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Ajanlar	23
3.2. Metot.....	24
3.2.1. Deney grupları.....	24
3.2.2. Cerrahi işlem.....	26
3.2.3. İlaç Uygulamaları	27
3.2.4. Elektrofizyolojik Kayıtların Değerlendirilmesi.....	27
3.2.5. Biyokimyasal analizler	28
3.2.5.1. Doku örneklerinde protein miktarının belirlenmesi	28
3.2.5.2. Protein oksidasyonu (AOPP) düzeylerinin belirlenmesi.....	28
3.2.5.3. Lipid peroksidasyonu (MDA) düzeylerinin belirlenmesi	29
3.2.5.4. Süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerinin belirlenmesi	29
3.2.5.5. Katalaz (CAT) düzeylerinin belirlenmesi.....	29
3.2.5.6. Glutasyon (GSH) düzeylerinin belirlenmesi	29
3.3. İstatiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR	32
4.1. P2X7 reseptör antagonisti A-438079 ile kanabinoid CB1 reseptör agonisti ACEA etkileşimi.....	33
4.2. P2X7 reseptör antagonisti A-438079 ile kanabinoid CB1 reseptör antagonisti AM251 etkileşimi.....	36
4.3. P2X7 reseptör agonisti BzATP ile kanabinoid CB1 reseptör agonisti ACEA etkileşimi.....	39
4.4. P2X7 reseptör agonisti BzATP ile kanabinoid CB1 reseptör antagonisti AM251 etkileşimi.....	42
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ	52
KAYNAKLAR	53
ETİK KURUL KARARI	64
ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

P2X7R	: P2X pürinerjik reseptör 7
EEG	: Elektroensefalografi
ECoG	: Elektrokortikografi
GTC	: Jeneralize tonik-klonik
$\Delta 9$ -THC	: $\Delta 9$ -Tetrahidrokanabinol ya da THC
2-AG	: 2-araşidonil gliserol
ACEA	: Araşidonil-2-kloroetanamid, Selektif CB ₁ Reseptör Agonisti
AEA	: Araşidonil Etanolamid ya da Anandamid
AM 251	: Selektif CB ₁ Reseptör Antagonisti
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
ATP	: Adenozin Trifosfat
μV	: Mikrovolt
Ca ⁺²	: Kalsiyum iyonu
K ⁺	: Potasyum iyonu
Na ⁺	: Sodyum iyonu
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CB ₁ R	: Kanabinoid Tip 1 Reseptör
CB ₂ R	: Kanabinoid Tip 2 Reseptör
CB	: Kanabinoidler
CBD	: Kanabidiol
CBN	: Kanabinol
CBND	: Kanabinodiol
DAG	: Diaçilgliserol
i.p.	: İntraperitoneal
i.s.v.	: İntraserebroventriküler
i.v.	: İntravenöz
i.k.	: İntrakortikal
MAPK	: Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
NO	: Nitrik Oksit
PKA	: Protein Kinaz A
TRPV	: Vanilloid Tip Geçici Reseptör Potansiyel Kanalı
ILAE	: International League Against Epilepsy; Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nöbet tiplerinin genişletilmiş sınıflandırması: ILAE 2017.....	5
Şekil 2.2. EEG dalgaları ve frekansları.....	8
Şekil 2.3. Pürinerjik reseptörler sınıflandırılması.....	12
Şekil 2.4. P2X7 reseptörlerinin yapısı ve sinyalizasyonu.....	13
Şekil 2.5. Status epileptikus sırasında salınan ATP'nin potansiyel bağlanma noktaları.....	15
Şekil 2.6. CB1 reseptörünün intraselüler sinyal yolağı.....	17
Şekil 3.1. a) Stereotaksi cihazına sıçanın sabitleme işlemi b) Tripolar elektrot takılmış olan sıçana intrakortikal penisilin enjeksiyonu işlemi c) Serebrum, serebellum ve beyin sapının çıkarıldıktan sonra görüntüsü.....	26
Şekil 3.2. Verilerin LabChart programı yardımıyla analiz işleminden bir görüntü.....	27
Şekil 3.3. a) Kit yıkama işleminden bir görüntü, b) ELISA okuyucu ile 450 nm'de okuma işlemi.....	30
Şekil 3.4. ELISA okuyucudan elde edilen spektrofotometrik verilerin görünümü.....	30
Şekil 3.5. Spektrofotometrik verilerin Microsoft excele aktarılması.....	31
Şekil 4.1. Penisilin+SF, A-438079, ACEA ve A-438079+ACEA gruplarının 80. dakikasından kaydedilen örnek ECoG aktiviteleri.....	34
Şekil 4.2. A) Penisilin+SF, A-438079, ACEA ve A-438079+ACEA gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, B) Penisilin+SF, A-438079, ACEA ve A-438079+ACEA gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi.....	35
Şekil 4.3. Penisilin+SF, A-438079, AM251 ve A-438079+AM251 gruplarının 80. dakikasından kaydedilen örnek ECoG aktiviteleri.....	37
Şekil 4.4. A) Penisilin+SF, A-438079, AM251 ve A-438079+AM251 gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, B) Penisilin+SF, A-438079, AM251 ve A-438079+AM251 gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi.....	38
Şekil 4.5. Penisilin+SF, BzATP, ACEA ve BzATP+ACEA gruplarının 80. dakikasından kaydedilen örnek ECoG aktiviteleri.....	40
Şekil 4.6. A) Penisilin+SF, BzATP, ACEA ve BzATP+ACEA gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, B) Penisilin+SF, BzATP, ACEA ve BzATP+ACEA gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi.....	41
Şekil 4.7. Penisilin+SF, BzATP, AM251 ve BzATP+AM251 gruplarının 80. dakikasından kaydedilen örnek ECoG aktiviteleri.....	43
Şekil 4.8. A) Penisilin+SF, BzATP, AM251 ve BzATP+AM251 gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, B) Penisilin+SF, BzATP, AM251 ve BzATP+AM251 gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi.....	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Kontrol-1, Penisilin+SF, A-438079, ACEA ve A-438079+ACEA gruplarındaki sıçanların beyinlerinden ölçülen ileri düzey oksidasyon protein ürünleri.	36
Tablo 4.2. Kontrol-1, Penisilin+SF, A-438079, AM251 ve A-438079+AM251 gruplarındaki sıçanların beyinlerinden ölçülen ileri düzey oksidasyon protein ürünleri.	39
Tablo 4.3. Kontrol-1, Penisilin+SF, BzATP, ACEA ve BzATP+ACEA gruplarındaki sıçanların beyinlerinden ölçülen ileri düzey oksidasyon protein ürünleri.	42
Tablo 4.4. Kontrol-1, Penisilin+SF, BzATP, AM251 ve BzATP+AM251 gruplarındaki sıçanların beyinlerinden ölçülen ileri düzey oksidasyon protein ürünleri.....	45

1. GİRİŞ

Epilepsi, tekrarlayan nöbetler ile karakterize karmaşık bir kronik nörolojik hastalık grubunu kapsar ve dünya çapında 60 milyondan fazla insanın bu hastalıktan muzdariptir (Moshé et al., 2015). Her yaştan insanı etkileyebilen epilepsi özellikle çocuk ve yaşlılarda daha sık görülür (Bialer ve White, 2010). Epilepsili hastaların yaşam süresi genel popülasyona kıyasla %2-10 oranında azalmıştır, ölüm oranı normal popülasyona göre 2-3 kat daha fazladır ve kaliteyi etkileyen depresyon ve anksiyete gibi komorbiditelerin riski 4 kat daha fazladır (Moshé et al., 2015). Epilepsi, kafa travması, felç enfeksiyon gibi beyin hasarının bir sonucu olarak veya iyon kanalı fonksiyonundaki değişiklikleri içeren genetik polimorfizmlerden, ve de novo mutasyonlardan da kaynaklanabilir (Rees, 2010; Pitkänen and Lukasiuk, 2011). Epileptik nöbetler esnasında, bilinç kaybı, kaslarda klonik ve tonik kasılmalar, uyuşukluk, hantal davranışlar, garip tat ve kokular alma, zaman ve mekan duygusunda bozulma gibi semptomlar görülebilir (Fisher et al., 2017). Epilepsi tanısında en önemli tanı yöntemlerinden biri elektroensefalografi (EEG), nöbet tipi hakkında bilgi sağlayabilir ve aynı zamanda epilepsi sendromlarının tanısında ve prognoz tayinine katkıda bulunur (Russo et al., 2016). EEG'nin direkt olarak korteksten kaydedilmesi işlemi olan elektrokortikografi (ECoG) ise, tıbbi olarak dirençli epilepsiden muzdarip hastalarda fokal epilepsi başlangıcının belirli uzaysal bölgelerini teşhis etmek için klinik olarak kullanılan bir kayıt yöntemidir (Englot and Chang, 2014). Diğer taraftan, hayvan çalışmalarında EEG yerine genellikle ECoG tercih edilmektedir. Bunun nedeni ise hayvanlarda EEG aktivitesi kaydının zor oluşudur.

Epilepsinin elektrofizyolojik ve patolojik özelliklerini araştırmak ve etkili epileptik ajanlar geliştirmek için deneysel modeller üzerinde çalışılmaktadır (Marangoz, 1997). Penisilin kaynaklı deneysel epilepsi modeli, insanda görülen parsiyel nöbetleri taklit etmektedir. Kortekse penisilin uygulanması GABA_A reseptörleri bloklayarak normal diken dalga deşarjlarına neden olmaktadır. Bu deneysel tasarımda insanda gözlenen epileptik nöbetlerin özellikleriyle aynı olmamakla birlikte, temel mekanizma açısından benzerlikler taşımaktadır (Walden et al., 1992).

P2X7 reseptörü, beyindeki nöronlarda ve glialarda seçici olarak eksprese edilen, ATP kapılı seçici olmayan katyonlara geçirgen bir iyonotropik reseptördür. P2X7

reseptörünün aktivasyonunun, hipokampusta nöronal uyarılabilirliği modüle ettiği ve ayrıca mikroglia aktivasyonu ve nöroinflamatuvar yanıtlarla bağlantılı olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar, hem nöronlarda hem de glialarda uzun süreli nöbetlerden (status epilepticus) sonra beynin hasarlı bölgelerinde P2X7 reseptörünün ekspresyonunun yükseldiğini göstermektedir (Engel et al., 2012).. Diğer taraftan, P2X7 reseptöründen yoksun farelerin status epileptikusa karşı duyarlılığın değiştiğini ve P2X7 reseptörünü hedef alan ilaçların güçlü antikonvülzan etkileri olduğunu göstermektedir (Kim and Kang, 2011). P2X7R antagonisti A-438079 ve JNJ-47965567'nin sistemik enjeksiyonu, fare yavrularında hipoksik nöbetlerin EEG frekansını azaltmış ve ani yükselmenin yanı sıra elektrografik nöbet sayılarında azalma göstermiştir (Rodriguez-Alvarez et al., 2017). Kim ve Kang (2011), P2X7R delesyonunun ve blokajının, farelerde glutamaterjik olmayan ve GABAerjik olmayan iletim yoluyla pilokarpın kaynaklı nöbet duyarlılığında bir artışa neden olduğunu öne sürmüşlerdir. A-438079 uygulaması, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında epilepsili hastaların neokorteksinin sinir terminallerinde GABA ve glutamat alımını azaltarak P2X7R agonisti BzATP'nin prokonvulsan etkilerini inhibe etmektedir. Bununla birlikte, BzATP'nin epilepsili hastalarda neokorteksin izole sinir terminallerinde glutamat alımını inhibe etmekten daha etkili bir şekilde GABA alımını inhibe ettiği gösterilmiştir (Barros-Barbosa et al., 2016). Aynı zamanda, penisilin modeli deneysel epilepside P2X7 reseptör antagonisti A-438079, 20 ve 40µg dozlarında, 60 dakika içinde penisilin kaynaklı epileptiform aktivitenin ortalama frekansını azaltmıştır. Aynı çalışmada 100 ve 200µg dozlarında uygulanan BzATP 20 dakika içinde penisilin kaynaklı epileptiform aktivitenin ortalama frekansını artırmıştır (Arslan et al., 2019). Bu çalışmada da, 2019 yılında bulduğumuz A-438079 ve BzATP'nin etkin dozları kullanıldı.

Kanabinoidlerin antikonvulsan etkileriyle ilgili yapılan birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma kanabinoidlerin epilepsi patofizyolojisinde rol oynadığını göstermiştir (Wallace et al., 2003; Blair et al., 2006; Deshpande et al., 2007). Nakatsuka ve arkadaşları CB1 reseptör antagonisti AM-251 verildiğinde, CB1 reseptör agonisti WIN 55,212-2'in etkisinin tamamen blokladığını, spike frekans ve genliğinde herhangi bir azalma olmadığını kanıtlamışlardır (Nakatsuka et al., 2003). Hipokampal nöron kültürüyle oluşturulan epilepsi modelinde ise, epileptik nöronlara uygulanan AM-251, CB1 reseptörleri antagonizması üzerinden status epilepticus tarzı aktivite

ortaya çıkarmış ve bu aktivite yüksek doz CB1 reseptör agonisti WIN 55,212-2 geri dönmüştür (Deshpande et al., 2007). Maksimal elektroşok nöbet modelinde edilen CB1 reseptör potent agonisti araşidonil-2-kloroetilamid (ACEA) 5 ve 7,5 mg/kg dozlarında nöbet eşiğini yükseltmiştir (Luszczki et al., 2006). Bunların yanındai penisilinle oluşturulan deneysel epilepsi modelinde, i.s.v. olarak enjekte edilen ACEA'nın 7,5 µg dozunda spike frekansını anlamlı derecede azaltmış, yine i.s.v. olarak enjekte edilen AM251 en fazla 0,25 dozunda spike frekansını anlamlı ölçüde artırmıştır (Kozan et al., 2009).

Pürinerjik reseptörler ile kanabinoidlerin etkileşimini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Monositler üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada, monositlerin tetrahidrokanabinol (THC) veya kannabidiol (CBD)'ye maruz kalmasının P2X7 reseptörünün immünolojik tepkisini azalttığını göstermiştir (Boks et al., 2020). Perfüze sıçan mezenterik vasküler yatağında CB1 reseptör agonistleri anandamid ve WIN 55,212-2 sempatik nörotransmisyonun pürinerjik komponentini inhibe etmektedir (Pasdechote et al., 2007). Retina kültürlerinde WIN 55,212-2 aracılı floresan boya alımının P2X7R antagonisti A-438079 tarafından tamamen bloke edildiğini ve kanabinoid aracılı boya alımının P2X7R aktivasyonunu içerdiğini önermektedir (Freitas et al., 2019). Kalsiyuma yüksek oranda geçirgen olan P2X7 iyonotropik reseptörlerin aktivasyonunun, mikroglial hücrelerde bir endojen kanabinoid olan 2-AG üretimini artırmak için gerekli olduğu gösterilmiştir (Witting et al., 2004). Diğer taraftan, nöronlarda whole-cell patch clamp metodu kullanılarak yapılan bir çalışma, endojen (anandamid) ve sentetik (WIN55,212-2, metanandamid) kanabinoid uygulamasının P2X2 ve P2X2/3 reseptörlerinin ATP'ye verdiği yanıtı inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Krishtal et al., 2006). Çalışmamızda, P2X7 reseptörleri ile kanabinoid CB1 reseptörlerinin etkileşimini penisilinle enjeksiyonuyla epileptiform aktivite oluşturarak incelemeyi amaçladık. Aynı zamanda, bu etkileşimin oksidan ve antioksidan sistem üzerine etkisini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

En yaygın beyin rahatsızlıklarından biri olan epilepsi, dünya çapında 70 milyondan fazla insanı etkilemektedir (Fisher et al., 2014). Epilepsinin yaklaşık %75'i çocukluk döneminde başlar ve epilepsi hastalarının yaklaşık üçte biri dirençli nöbetlere (uygun şekilde seçilmiş iki veya daha fazla antiepileptik ilaç veya diğer tedaviler tarafından kontrol edilmeyen nöbetler) sahiptir (Stafstrom and Lionel, 2015). Epileptik nöbetler esnasında, bilinç kaybı, kaslarda klonik ve tonik kasılmalar, uyuşukluk, hantal davranışlar, garip tat ve kokular alma, zaman ve mekan duygusunda bozulma gibi semptomlar görülebilir. Epileptik nöbetler fokal (bir veya daha fazla lokalize beyin bölgesinde veya hemisferde anormal nöronal aktivite ortaya çıktığında), jeneralize (nöronal aktivite her iki hemisferde yaygın bir dağılımla başladığında) veya başlangıcı bilinmeyen (mevcut klinik ve laboratuvar verileri, başlangıcın fokal mı yoksa jeneralize mi olduğunu belirleyemiyorsa) şekilde gerçekleşebilir. Klinik özellikler, elektroensefalografi (EEG) ve beyin görüntüleme bulguları başlangıç odağını %80'den daha yüksek bir güven aralığında belirlenebilmektedir (Fisher et al., 2017).

2.1.1. Epileptik nöbet

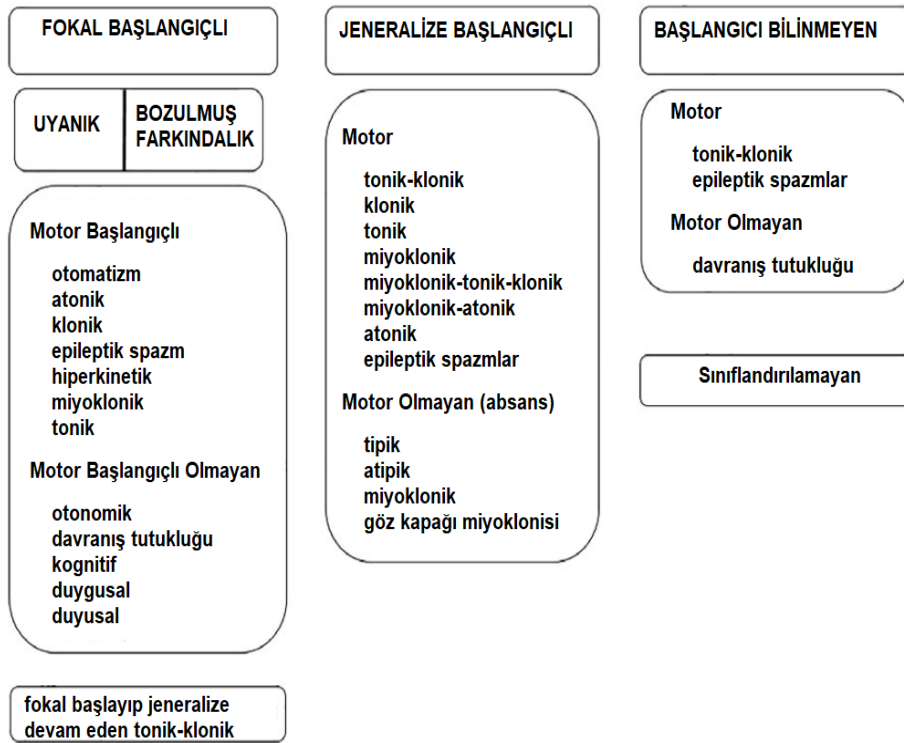
Nöronlardaki anormal ve aşırı elektriksel deşarj sonucu ortaya çıkan epileptik nöbetler ani başlar ve tekrarlayıcı olabilir (Willmore et al., 2000). Her ne kadar epilepsi ile nöbet aynı kavramlar gibi görünse de epilepsi tekrarlayan ve kendiliğinden oluşan nöbetlerle seyreden bir hastalık olarak nitelendirilmektedir. Nöbetler ise, ateş ve hipoglisemi gibi patolojiler ile de tetiklenebilmektedir. Hastanın hayatı boyunca tek nöbet görülebileceği gibi, tekrarlayan nöbetler de görülebilmektedir. Yani epilepsi, tekrarlayan, provoke edilmemiş nöbetlerin görülmesi durumudur (Shorvon et al., 2011). Aynı şekilde, epilepsi tanısının doğrulanabilmesi için epileptik nöbetlerin tekrarlayıcı karakterde olması ve bu özelliğini uzun süre devam ettirmesi gerekir. Kafa travmaları, inme, beyin hemorajileri, santral sinir sistemini etkileyen enfeksiyonlar (menenjit, ansefalit, abse), beyin damarlarındaki yapısal bozukluklar, genetik nedenler, doğum travmaları, ilaç reaksiyonları ve tümörler belli başlı epileptik nöbet nedenleri arasındadır. Epileptik nöbetlerin patogenezinde birçok neden olmasına

rağmen vakaların yaklaşık %70'inde herhangi bir patoloji saptanamamaktadır (Bruton, 1988; Engel et al., 1989; Ettinger, 1994).

2.1.2. Epilepsi sınıflandırılması

Nöbet etiyojisinin, semiyolojisinin ve tedaviye yanıtın farklılıklarına bağlı olarak, 40'ın üzerinde klinik epilepsi alt tipi tanımlanmıştır. Bu nedenle, farklı nöbet tiplerini ve çeşitli epileptik sendromları ayırt etmek amacıyla, ILAE (International League Against Epilepsy; Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği) tarafından bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur. 2017 yılında yayınlanan son sınıflandırmada ILAE, modern döneme uygun terminoloji ve kavramları kullanarak nöbetleri, fokal başlangıçlı, jeneralize başlangıçlı ve başlangıcı bilinmeyen olmak üzere üç ana gruba ayırmıştır (Fisher et al., 2017).

ILAE 2017 NÖBET TİPLERİ GELİŞMİŞ SINIFLANDIRMASI



Şekil 2.1. Nöbet tiplerinin genişletilmiş sınıflandırması: ILAE 2017 (Fisher et al., 2017)

2.1.2.1. Fokal (Parsiyel) nöbetler

Serebral hemisferin bir kısmına veya tamamına yayılan nöbetlerdir. Bu tip nöbetler tek bir odaktan başlar ve daha sonra yayılabilir. Bilincin açık veya bozulmuş

olmasına göre iki alt gruba ayrılır. Fokal uyanık nöbetler (eski adıyla basit parsiyel nöbet) esnasında bilinç kaybı olmaz. Kişi nöbet sırasında kendisinin ve çevrenin farkındadır. Farkındalığın bozulduğu fokal nöbetlerde (eski adıyla kompleks parsiyel) ise, hasta sözel veya dokunsal uyaranlara cevap veremez. Temporal lobdan kaynaklanan nöbetler genellikle bu sınıflamaya girer. Fokal nöbetler motor başlangıçlı ya da motor başlangıçlı olmayan tiplerde görülebilir. Motor başlangıçlı olmayan nöbetlerde otonom belirtiler, davranış tutukluğu, bilişsel, duygusal veya duyuşsal işlev bozuklukları görülebilir. Fokal nöbetler daha sonra global yayılım göstererek bilateral tonik-klonik nöbetlere dönüşebilir (Şekil 2.1) (Fisher et al., 2017).

2.1.2.2. Jeneralize nöbetler

Beynin hemen tüm bölgelerine yayılan, sıklıkla tonik-klonik konvulsiyonlarla karakterize nöbetlerdir. Jeneralize nöbetlerin büyük çoğunluğunda bilinç kaybı meydana gelmesine rağmen bu semptom jeneralize nöbetler için bir sınıflandırıcı olarak kullanılamaz. Jeneralize nöbetler motor ve motor olmayan nöbetler olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Fisher et al., 2017) (Şekil 2.1).

Motor jeneralize nöbetler: Jeneralize tonik-klonik (GTC) nöbetler (eski adıyla grand mal), bilinç bozukluğu ile birlikte tüm vücutta bilateral ve simetrik konvulsif hareketler (katılık ve sarsıntı; tonus ve klonus) görülür. Motor nöbetlerin alt tipi olan miyoklonik nöbetler, açık bir bilinç bozukluğu ile ilişkili değildir ve ani, kısa “yıldırım hızında” hareketlerden oluşur. Bu kısa ve istemsiz kas kasılmaları bir veya birkaç kas grubunu etkileyebilir. Atonik nöbetlerde ise vücudun genel tonusunda azalma nedeniyle düşmeler görülür (Fisher et al., 2017).

Motor olmayan (absans) nöbetler: Eski adıyla petit mal olarak adlandırılan bu nöbetler esnasında dış sözel uyaranlara tepkisizce bakma, göz kırpmaları ve baş sallama gibi hareketler gözlenir (Fisher et al., 2017).

2.1.2.3. Başlangıçlı bilinmeyen nöbetler

Bu sınıflandırmanın en önemli kullanımı, başlangıçlı belirsiz olan tonik-klonik nöbetler içindir. Bilinmeyen başlangıçlı nöbetler, motor veya motor olmayan şeklinde iki gruba ayrılır. Epileptik spazmlar ve davranış durması, bilinmeyen başlangıçlı diğer olası nöbet türleridir. Epileptik spazmlar, başlangıcın doğasını netleştirmek için ayrıntılı video-EEG izleme gerektirebilir, ancak fokal başlangıç, tedavi edilebilir bir

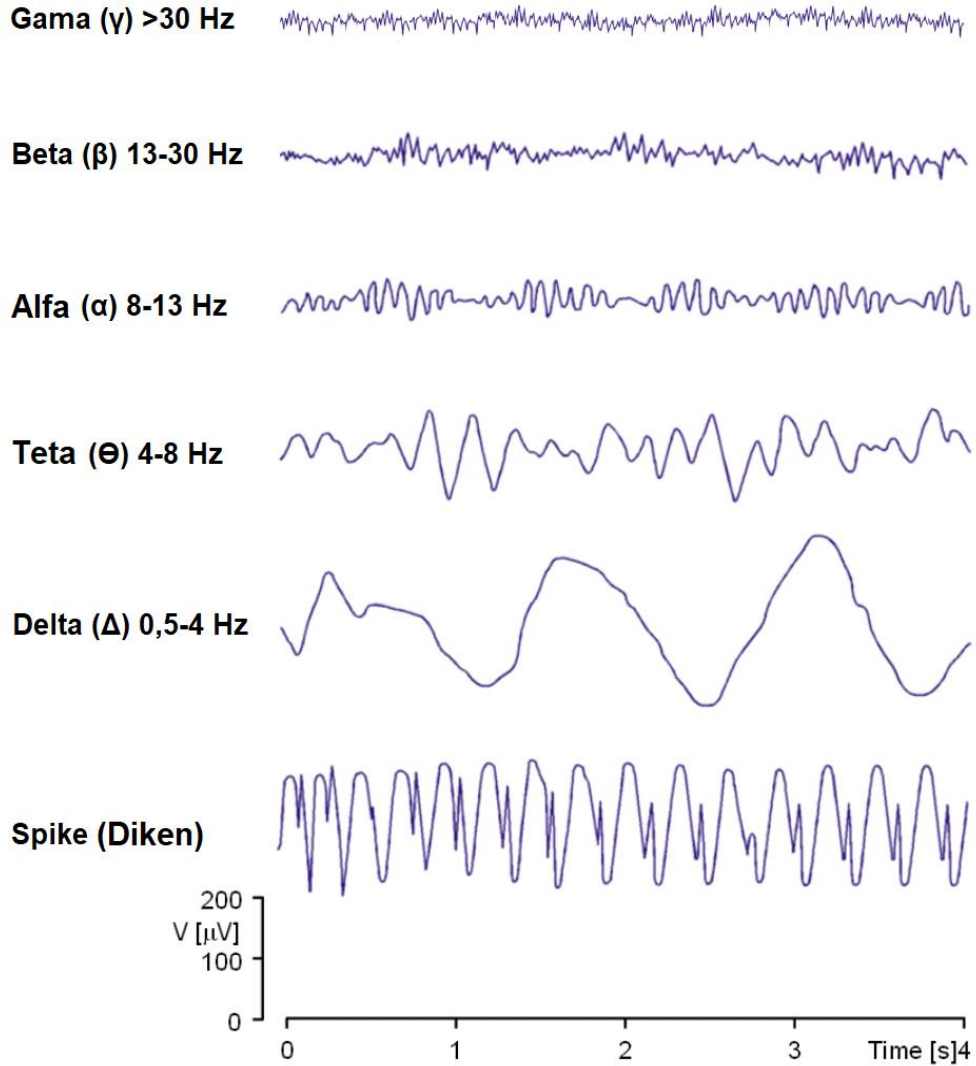
fokal patolojiye karşılık gelebilir. Bilinmeyen başlangıçlı bir davranış nöbeti, odak bozukluğu olan bir farkındalık davranışı durdurma nöbetini veya bir yokluk nöbetini temsil edebilir. Yetersiz bilgi veya nöbetin diğer kategorilere yerleştirilememesi nedeniyle bir nöbet sınıflandırılmamış olabilir. Bir olay açıkça bir nöbet değilse, o zaman sınıflandırılmamış bir nöbet olarak adlandırılmamalıdır; daha ziyade, bu sınıflandırma nöbet olması muhtemel olağandışı olaylar için geçerlidir, ancak başka türlü karakterize edilmemiştir (Fisher et al., 2017).

2.1.3. Elektroensefalogram (EEG) ve Elektrokortikogram (ECoG)

Beyin aktiviteleri ilk defe Caton tarafından 1875 yılında tavşan beyni zarından elde edilmiştir (Caton, 1875; Tudor et al., 2005). Hans Berger ise 1929 yılında hassas galvanometre kullanarak beynin ürettiği elektrik akımını insan saçlı derisinden kâğıt üzerine yazdırabilmeyi başarmış ve bu yönteme EEG adını vermiştir (Berger, 1929). O günden günümüze kadar EEG ile ilgili ciddi revizyonlar olmuş ve EEG'nin klinikte kullanımı yaygınlaşmıştır. EEG, epilepsili bir hastayı değerlendirmede çok önemli bir tanı testidir. Tek başına çekilen EEG tanı koymada yeterli olmasa da, nöbet tipi hakkında bilgi verebilir ve aynı zamanda epilepsi sendromlarının tanısında ve prognoz tayinine katkıda bulunabilir EEG çekimi esnasında beynin elektriksel aktivitesini kaydetmek amacıyla kafatası derisinin üzerine birden fazla elektrod yerleştirilir ve bu elektrodlar arasındaki potansiyel fark (dalgalarda) bir EEG cihazı aracılığıyla ölçülerek kağıda ya da bilgisayar ortamına aktarılır (Scicchitano et al., 2015; Russo et al., 2016). EEG'de kayıt edilen dalgalarda elektrot yerleştirilen alanlardaki eksitator ve inhibitör postsinaptik potansiyellerin cebirsel toplamını ifade eder (Fisher et al., 2017). Sağlıklı bir insanda saçlı deriden kaydedilen EEG dalgalardının frekansı genel olarak 1-30 Hz; amplitüdü ise 20-100 mikrovolt (μV) civarındadır (Plummer et al., 2019). EEG dalgalardarı frekanslarına göre temel olarak gama, beta, alfa, teta ve delta olmak üzere 5 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.2) (Timofeeva and Gordon, 2001).

EEG'nin direkt olarak korteksten kaydedilmesi işlemi olan elektrokortikografi (ECoG) ise, tıbbi olarak dirençli epilepsiden muzdarip hastalarda fokal epilepsi başlangıcının belirli uzaysal bölgelerini teşhis etmek için klinik olarak kullanılan bir kayıt yöntemidir. İnvaziv izleme kullanılarak, nöbetlerin odakları belirlenebilir ve daha sonra nöbet bölgesinin cerrahi olarak çıkarılması nöbetlerin sıklığını azaltabilir veya ortadan kaldırabilir. Cerrahi rezeksiyondan sonra, hastaların yaklaşık %50'si veya

daha fazlası, cerrahi tedaviyi takiben önemli ölçüde iyileştirilmiş nöbet kontrolü yaşar (Englot and Chang, 2014). Diğer taraftan, hayvan çalışmalarında EEG yerine genellikle ECoG tercih edilmektedir. Bunun nedeni ise hayvanlarda EEG aktivitesi kaydının zor oluşudur.



Şekil 2.2. EEG dalgaları ve frekansları (Malmivuo and Plonsey, 1995).

2.1.3.1. Gama dalgaları

30 Hz/saniye ve üzeri dalgalar gama ritmi olarak nitelendirilir. 40 Hz'lik aktivitenin bilişsel işlevlerde ve duyuşsal bilginin işlenmesinde önemli olduğu ortaya konmaktadır. Yüksek düzeylerdeki gama dalgalarının varlığı bellek ve geçmişteki olayları hatırlama yeteneği ile ilişkili olduğu söylenmektedir. 40 Hz gama frekansının

ise, iyi bir hafıza ile ilişkili olduğu düşünölmekle birlikte sağlıklı ve iyi düşünöen bir beyin için, 40 Hz Gamma beyin dalgaları gereklidir (Timofeeva and Gordon, 2001). Ferri et al. (2001) ise, deney hayvanlarında yaptıkları deneylerde gama dalgalarının dikkat, dikkate bağılı durağanlık, odaklı uyanıklık, duyuşsal algılama ve paradoksik uyku ile bağılantılı olduğı bulmuşlardır.

2.1.3.2. Beta dalgaları

13-30 Hz/saniye frekansında düşük voltajlı 2-20 μ V amplitüde sahip düzensiz dalgalardır. En iyi frontal bölgeden kaydedilir. Günlük hayatta çok sık meydana gelen bu dalgalar zihinsel aktivite esnasında belirgin hale gelirler. Beynin hasara uğramış bölgelerinde azalan veya kaybolan bu dalgaların çok fazla artışı stres ile ilişkilendirilmiştir (Timofeeva and Gordon, 2001; Tudor et al., 2005).

2.1.3.3. Alfa dalgaları

Berger ritmi de adlandırılan bu dalgalar 8-12 Hz/saniye frekansında, 20-60 μ V yüksekliğinde ritmik dalgalardır. Oksipital bölgeden en güçlü kaydedilmekle birlikte parietal ve frontal bölgelerde de görölmektedir. Uyku esnasında görölmeyen bu dalgalar sağlıklı bir bireyde, sessiz bir odada gözler kapalı iken, zihin ve beden tam istirahat halindeyken kaydedilir. Gözler açıldığında ise bu ritim kaybolmaktadır. Bu duruma alfa blokajı adı verilir (Timofeeva and Gordon, 2001; Tudor et al., 2005).

2.1.3.4. Teta dalgaları

4-7 Hz/saniye frekansında, yaklaşık 20-100 μ V amplitüdü olan dalgalardır Çocukların parietal ve temporal bölgelerinden kaydedilebilmekle birlikte erişkinlerde de duyuşsal streslerde ortaya çıkabilmektedir. Çok derin bir gevşeme halinde ortaya çıkan bu dalgalar, hipnozda veya REM uykusu esnasında da kaydedilir. Bunların dışında beynin dejeneratif durumlarında da gözlenmektedirler (Timofeeva ve Gordon, 2001).

2.1.3.5. Delta dalgaları

Uyku haricinde erişkinlerde çok fazla görölmeyen dalgalardır. Frekansı saniyede 4 Hz'nin altında olup, amplitüdü 20-200 μ V civarında olan dalgalar delta ritmi olarak isimlendirilir. Derin uykuda, çocuklarda ve ciddi organik beyin hasarı olan hastalarda görölmektedir. Deney hayvanlarında subkortikal kesi oluşturularak talamusla korteks

arasındaki bağlantı kesildiğinde de korteks yüzeyinden kaydedilebilirler Bu nedenle delta dalgalarının sadece kortekste olduğu düşünülmektedir (Timofeeva and Gordon, 2001).

2.1.4. Epilepside deneysel modeller

Epilepsinin elektrofizyolojik temelleri ve patofizyolojisi hakkındaki sorulara cevap aramak ve etkili antiepileptik ajanlar geliştirmek amacıyla deneysel hayvan modelleri üzerinde çalışılmaktadır. İnsan beyninde mikrokimyasal analizler, hücre içi kayıtlar ve anatomik çalışmalar yapmak tıbbi etik açısından mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, epilepsi hastalığının mekanizmasını çözmek ve yeni tedavi yöntemleri geliştirmek amacıyla bilim insanları tarafından epilepsi modelleri geliştirilmiştir (Marangoz, 1997). Epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçlar hastaların çoğunda nöbetleri engellemekle birlikte hastaların yaklaşık %20-30'unda nöbet kontrolü sağlanamamaktadır (Löscher et al., 2013). Kontrol edilemeyen bu nöbetler hastaların yaşam kalitesini olumsuz olarak etkilemekte, bunun yanında hafıza ve bilişsel işlevleri de baskılayabilmektedir (Serikawa et al., 2015).

Günümüzde yapılan epilepsi çalışmalarının çoğunda hayvanlar kullanılmaktadır (Galanopoulou and Moshe, 2009). Epilepside hayvan modelleri sıklıkla normal anormal beyin fonksiyonunun temel nöronal mekanizmalarını araştırmak amacıyla kullanılır (Engel and Schwartzkroin, 2006). Epilepsinin hücresel içeriğini araştıran çalışmalar hipersenkronizasyon mekanizmasının anlaşılmasına, nöronal ve sinaptik uyarılabilirliğin değerlendirilmesine odaklanır (Contreras, 2000). Günümüzde, çok sayıda nöbet modeli bulunmakla birlikte başlıca kullanılan nöbet modellerini; basit parsiyel nöbetler, kompleks parsiyel nöbetler, jeneralize tonik klonik nöbetler, jeneralize absans nöbetler ve status epileptikus modelleri olarak sınıflandırabilir (Fisher, 1989). İnsandaki farklı epilepsi tiplerine benzeyen, genetiği değiştirilmiş hayvanlar ve kimyasal ajanlar kullanılarak veya lezyon oluşturmak suretiyle çok sayıda farklı deneysel model geliştirilmiştir (Bambal et al., 2011).

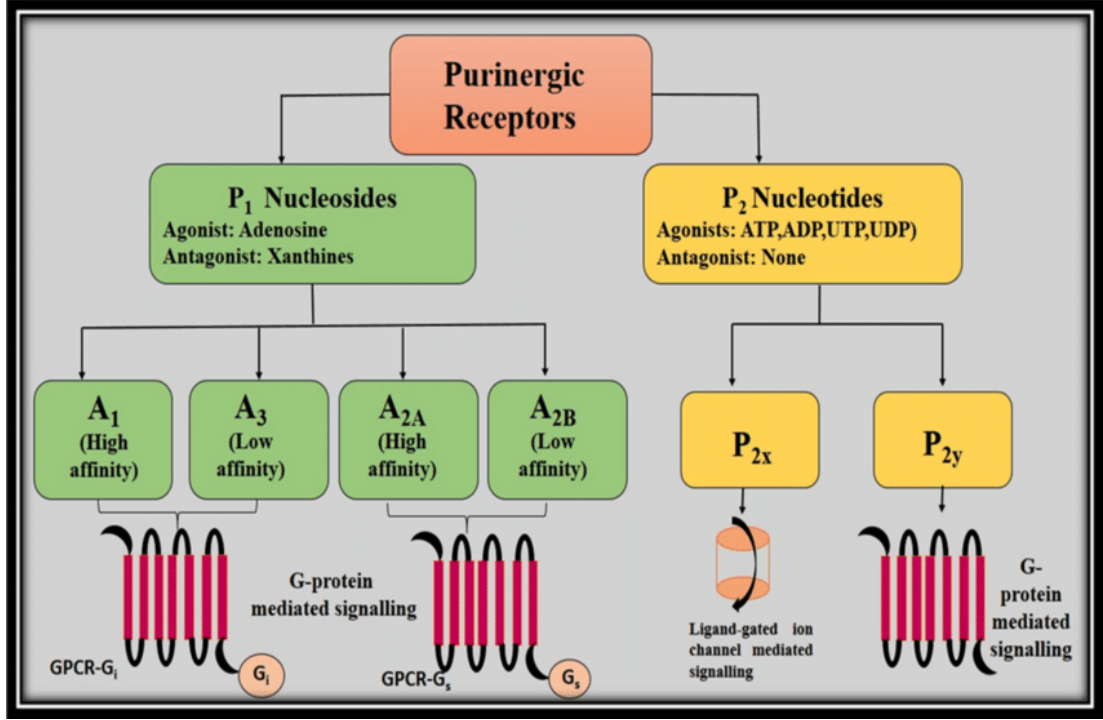
2.1.4.1. Penisilin modeli deneysel epilepsi

β -laktam antibiyotiklerin prokonvülsan etkisi ilk kez 1945'te Walker ve Jhonson intraventriküler penisilin nöbetlere neden olduğu gösterildi (Walker and Johnson, 1945). β -laktam antibiyotiklerin konvülzan etkisi, γ -aminobütirik asit (GABA) tip A reseptörlerinin (GABA_A reseptörleri) inhibisyonuna ve bunun sonucunda inhibitör

postsinaptik tepkilerin baskılanmasına bağlanmaktadır. GABAa inhibisyonu ile birlikte hücre içerisine klor girişi azalacağından depolarize hücre oluşumu ve bunun sonucunda uyarılabilirliğin artışı, aynı zamanda da spontan aksiyon potansiyelleri oluşmaktadır (Antoniadis et al., 1980; Sugimoto et al., 2002). Penisilinle oluşturulan deneysel epilepsi, çalışmalarda kullanılan en yaygın modellerden birisidir. Penisilinler, sistemik olarak yüksek dozda kullanıldığında veya serebral kortekse doğrudan uygulandıklarında konvülsiyonlara yol açmaktadırlar (Antoniadis et al., 1980).

2.2. Pürinerjik reseptörler

Adenin bileşiklerinin güçlü etkileri ilk olarak 1929'da Drury ve Szent-Györgyi tarafından tanımlanmıştır (Drury and Szent-Györgyi, 1929). Yıllar sonra, bağırsak ve mesanede adrenerjik olmayan, kolinerjik olmayan adenosin 5'-trifosfatın (ATP) iletimden sorumlu de sorumlu olduğu anlaşılmıştır. 'purinerjik' terimi 1972'de Burnstock tarafından ortaya atılmıştır (Burnstock, 1972). Bununla birlikte, hücre dışı ATP'nin parçalanmasında rol oynayan enzimler, 1990'ların ortalarında bulunmuştur (Yegutkin, 2008). Adenozin 5'-trifosfat (ATP), hem hücre dışı bir sinyal molekülü (purinerjik sinyal) hem de hücre içi bir enerji kaynağı olarak işlev görür. ATP reseptörleri klonlanmış ve sınıflara ayrılmıştır. P1 reseptörleri, ektonükleotidazlar tarafından ATP'nin parçalanma ürünü olan adenosin için seçicidir. A1, A2A, A2B ve A3 reseptörleri olmak üzere dört alt tipi vardır. P2 reseptörleri, pürin ve pirimidin nükleotidleri tarafından aktive edilir. P2X reseptörleri, hem homomultimer hem de heteromultimer olarak trimer oluşturan ligand kapılı iyon kanalı reseptörleridir. Bu reseptörlerin P2X1-7 olmak üzere yedi alt birime ayrılır. P2Y reseptörleri, G proteinine bağlı reseptörlerdir ve P2Y1/2/4/6/11/12/13/14 olmak üzere sekiz alt tipe ayrılır (Şekil 2.3). İlkel omurgasızlarda P2X benzeri reseptörlerin klonlanması, ATP'nin erken evrimsel hücre dışı bir sinyal molekülü olduğunu düşündürmektedir. Tromboz, felç, kuru göz, ateroskleroz, böbrek yetmezliği, osteoporoz, mesane inkontinansı, kolit, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklar için terapötik potansiyele sahip seçici purinoseptör agonistleri ve antagonistleri geliştirilmiştir (Burnstock, 2018).

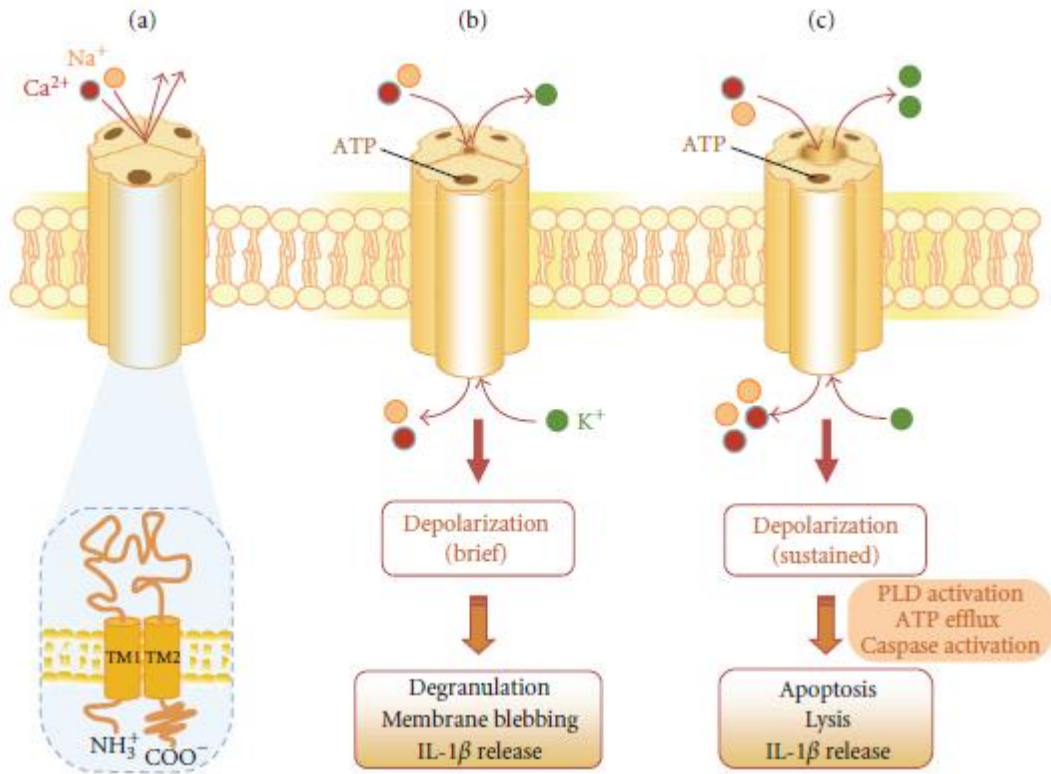


Şekil 2.3. Pürinerjik reseptörler sınıflandırılması (Malmivuo and Plonsey, 1995).

2.2.1. P2X7 reseptörleri

P2X7 reseptörleri, pürinerjik reseptörlerin 3 alt grubundan biri olan P2X reseptör ailesinin en son bulunan üyesidir. İlk olarak sıçan beyinde klonlanan (Surprenant et al., 1996) P2X7 reseptörünün daha sonraki çalışmalarda astrositlerde (Ballerini et al., 1996) ve mikroglialarda (Ferrari et al., 1996) varlığı tespit edilmiştir. Protein ve mRNA görüntüleme tekniklerinin gelişmesiyle birlikte P2X7 reseptörünün nöronlarda da bulunduğu gösterilmiştir (Deuchars et al., 2001; Diaz-Hernandez et al., 2008; Miras-Portugal et al., 2003). Serebral korteks (Diaz-Hernandez et al., 2009), serebellum (Hervas et al., 2005), hipokampus (Sperlagh et al., 2002), beyin sapı (Papp et al., 2004) başta olmak üzere hemen tüm santral sinir sistemi nöronlarında P2X7 reseptörleri bulunmaktadır. P2X7 reseptörü santral sinir sisteminde önemli bir role sahiptir. Akut ve kronik sinir sistemi hastalıklarında potansiyel bir ilaç hedefi olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar, spinal kord hasarı (Peng et al., 2009), nöropatik ağrı (Sperlagh et al., 2006; Chessell et al., 2005), beyin iskemisi (Melani et al., 2006; Arbeloa et al., 2012), travmatik beyin hasarı (Kimbler et al., 2012), Alzheimer hastalığı (Diaz-Hernandez et al., 2012), Huntington hastalığı (Diaz-Hernandez et al., 2009), depresyon (Skaper et al., 2009) ve epilepsi (Engel et al., 2012) gibi hastalıklarda P2X7 reseptörünün rol aldığını ortaya koymaktadır. P2X7 reseptörü, aktivasyonu durumunda potasyumun hücre dışına atılmasına, sodyum ve kalsiyumun ise hücre

içerisine girişine neden olmaktadır (Ferrari et al., 1999) (Şekil 2.4). Ca^{+2} iyonu epilepsi patogenezinde önemli role sahip bir iyondur. Hücre içi aşırı kalsiyum artışı depolarizasyona ve dolayısıyla anormal epileptik deşarjlara ve hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Uematsu et al., 1990; Surprenant and North, 2009). Buradan hareketle yapılan çalışmalar, P2X7 reseptörünün epileptik nöbetleri artırdığını işaret etmektedir. Kainik asitle (Engel et al., 2012) ve pilokarpınle (Kim et al., 2011) oluşturulan status epileptikus modellerinde P2X7 reseptör aktivasyonu nöbetleri ve hücre ölümünü artırmaktadır. Bunun yanında, P2X7 reseptör antagonisti A-438079 ve Brilliant blue G, epileptik aktiviteyi baskılamakta ve hücre ölümü azaltmaktadır (Henshall et al., 2013; Pacheco et al., 2013).



Şekil 2.4. P2X7 reseptörlerinin yapısı ve sinyalizasyonu (a) Kapalı, (b) Kısa süreli açık, (c) Uzun süre açık (Skaper et al., 2009).

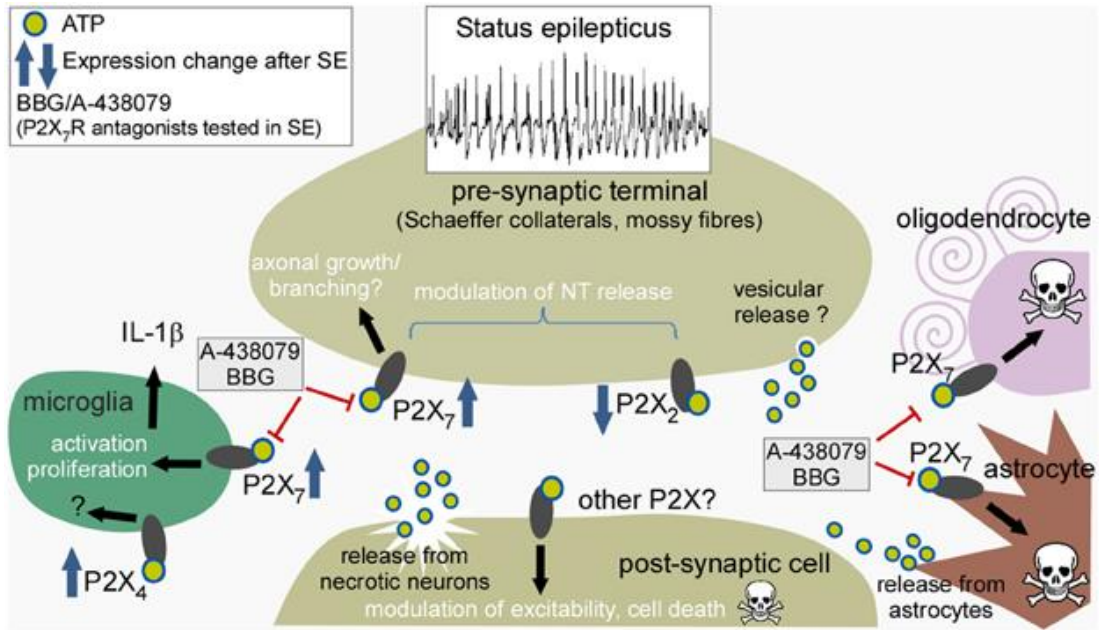
2.2.1.1. P2X7 reseptörleri ve epilepsi

P2X7'nin merkezi sinir sistemindeki yapısal ekspresyonu, büyük ölçüde mikroglia, endipimal hücreler ve oligodendrositlerle sınırlıdır (Skaper, 2011), ancak nöronlarda ve astrositlerde ekspresyon da rapor edilmiştir (Armstrong et al., 2002; Engel et al., 2012). Nöronal P2X7 ekspresyonu en fazla presinaptik terminallerdedir (Miras-Portugal et al., 2003). GABA ve glutamat dahil olmak üzere nörotransmitter

salınımının düzenlenmesine katkıda bulunabileceği söylenmektedir (Sperlágh et al., 2002). Son çalışmalar, hücresel ortamdaki ipuçlarına yanıt olarak P2X7 ekspresyonundaki hücre tipine özgü değişikliklere aracılık etmede transkripsiyon sonrası düzenlemenin bir rolü olduğunu göstermiştir. Jimenez-Mateos et al., (2015), hücre ölümüne neden olan nöbetlere yanıt olarak mikroRNA-22'nin P2rx7 mRNA'nın proteine çevrilmesini engellediğini bildirmiştir.

Nöbetler ve epilepsi sırasında purinerjik sinyallemenin önemine olan ilgi artarken, bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu iyonotropik P2X alt ailesinin, özellikle P2X7'nin katkısına odaklanmıştır (Engel et al., 2016; Rassendren and Audinat, 2016). P2X7'nin iktogenez ve epileptogenezdeki rolünü belirlemeye çalışan erken çalışmaların çoğu, Western blot ve immünohistokimya gibi teknikleri kullanarak nöbetler sırasında ve sonrasında reseptörün ekspresyonel değişiklikleri göstermektedir (Vianna et al., 2002; Rappold et al., 2006; Doná et al., 2009). Bununla birlikte, 2010'dan bu yana, SE sonrası ve epilepsi sırasında reseptörün ekspresyonel değişikliklerini inceleyen ve P2X7'nin nöbetlere fonksiyonel katkısını belirleyen veriler ortaya çıkmıştır (Engel et al., 2016). P2X7 blokajının nöbet şiddetini ve nöbet kaynaklı patolojiyi değiştirip değiştirmediğini belirlemek için kimyasal olarak uyarılan kainik asit (KA) veya pilokarpin ile fare status epilepticus modelleri kullanılmıştır (Engel et al., 2016). Daha yakın tarihli çalışmalarda, pentilentetrazol (PTZ) ve maksimal elektroşok (MES) nöbet eşiği testi gibi geleneksel nöbet modellerinde ve ayrıca sıçanlarda PTZ tutuşma modeli gibi P2X7 antagonistlerinin etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar yapılmıştır (Fischer et al., 2016). P2X7 antagonizmasının SE sırasında nöbet patolojisi üzerindeki etkisini gösteren bol miktarda veri mevcuttur (Henshall et al., 2013) (Şekil 2.5). Diğer taraftan, Jimenez-Pacheco et al., status epilepticus oluşturulan farelerin neokorteksinde P2X7 reseptör protein seviyelerinin arttığını belirledi. Ayrıca, neokortikal P2X7 reseptör seviyeleri status epileptikustan sonra epilepsi gelişen farelerde ve farmakolojik dirençli temporal lob epilepsili hastaların neokortekslerinde de yükseldiği tespit edildi. Farelerin spesifik P2X7R inhibitörü A-438079 ile ön tedavisi, status epilepticus sırasında elektrofizyolojik parametreleri ve klinik nöbet şiddetini azalttı ve neokortekste nöbet kaynaklı nöron ölümünü azalttığı bulundu (Jimenez-Pacheco et Al., 2013). Ek olarak, penisilinle indüklenen epilepside P2X7 reseptör antagonisti A-438079'ün epileptiform

aktiviteyi baskıladığı, P2X7 reseptör antagonisti BzATP'nin ise epileptiform aktiviteyi artırdığını bulunmuştur (Arslan et al., 2019).



Şekil 2.5. Status epileptikus sırasında salınan ATP'nin potansiyel bağlanma noktaları (Henshall et al., 2013).

2.3. Kanabinoid Sistem

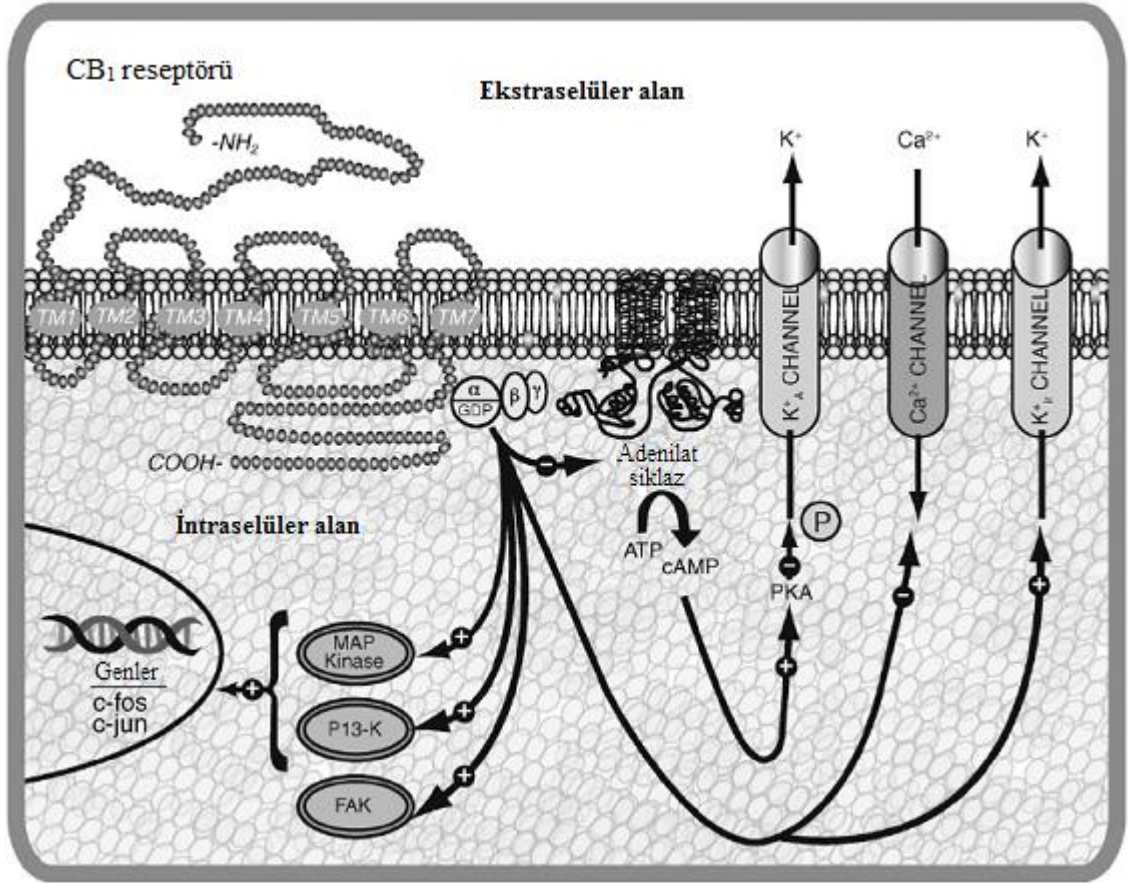
Hint keneviri (esrar) bitkisinden (*Cannabis sativa*) köken alan kanabinoidlerin (CB) tarihi milattan öncesine kadar uzanmaktadır. Eski zamanlarda kenevir “beş tahlı” ürünü arasında görülmekte olup tekstil, ip, kağıt, yağ üretiminde ve gıda kaynağı olarak kullanılmaktaydı (Hui-Lin, 1974; Touw, 1981). Tıpta kullanımına ilişkin ilk kanıtlar ise, milattan önce 2700 yıllarında dünyanın en eski ilaç kitabı olan Pen-ts'ao Ching'den gelmektedir (Zuardi, 2006). Çin cerrahisinin kurucusu olan Hua T'o milattan sonra 100'lü yıllarda, hint kenevirini analjezik bir madde olarak tanımlamıştır (Mikuriya, 1969) ve hastaları ameliyat öncesi uyuşturmak için esrar ve şarap karışımını kullanmıştır (Hui-Lin, 1974). Batı tıbbında ise esrarın tıpta kullanımı, 1839 yılında ilk kez İrlandalı bir doktorun yayınladığı çalışma yazısında görülmüştür. İlaç hayvanlar üzerinde denedikten sonra güvenli olduğuna karar vermiş ve hastalara esrar özütleri vererek esrarın analjezik ve yatıştırıcı özelliklere sahip olduğunu keşfetmiştir. Ayrıca da hint kenevirinin, kuduz ve tetanozun neden olduğu kas spazmlarını iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Fakat 1930'lu yıllarda, ABD'de eğlence amaçlı marihuana kullanımında kontrolsüz bir artış olmuş ve esrar kullanımına ilişkin

kısıtlayıcı yasalar getirilmiştir. 1941'de esrar Amerikan ilaç kitabından tamamen çıkarılmış ve 1970'li yıllara kadar esrarın tıbbi olarak yeniden kullanımı mümkün olmamıştır (Mikuriya, 1969).

Cannabis sativa bitkisinde bu zaman kadar 120'nin üzerinde bileşen tanımlanmıştır ve bu bileşenlerden en önemlilerinin $\Delta 9$ -tetrahidrokanabinol (THC), kanabiol ve kanabidiol olduğu ortaya konmuştur (Izzo et al., 2001). Esrarın ana etken maddelerinden olan Delta-9-THC'nin sıçan beyninde bir bağlanma bölgesinin bulunduğu keşfedilmiştir ve bu keşif beyindeki muhtemel bir reseptör varlığını işaret etmiştir (Mechoulam and Gaoni, 1965) ve 1988 yılında kanabinoid reseptör tip 1 (CB₁R) tanımlanmıştır (Devane et al., 1988). CB₁ reseptörlerinin keşfinin ardından vücutta endojen kanabinoidlerin de olabileceği ileri sürülmüş ve 1990'lı yıllarda iki önemli lipit türevi endojen kanabinoid olan anandamid ve 2-araşidonil gliserol bulunmuştur (Devane et al., 1992; Lee, 2012). Bu keşifleri, periferik sinir sisteminde ve bağışıklık hücrelerinde lokalize ikinci bir kanabinoid reseptörü olan kanabinoid reseptör tip 2'nin (CB₂R) tanımlanması takip etmiştir (Johnson et al., 1992).

2.3.1. Fitokanabinoidler ve sentetik kanabinoidler

Fitokanabinoidler, *Cannabis sativa* (esrar, marijuana) bitkisinden elde edilen, kanabinoid reseptörlerine bağlanan bitkisel bileşiklerdir ve sayıları yaklaşık 70 civarındadır. En çok bilinenleri, 1964 keşfedilmiş ilk kanabinoid bileşiği olan $\Delta 9$ -THC'dir. Daha sonra ise kanabiol ve kanabidiol keşfedilmiştir (ElSohly and Slade, 2005). $\Delta 9$ -THC, hem CB₁ reseptörlerine hem de CB₂ reseptörlerine bağlanabilmektedir. CB₁ reseptörlerinin parsiyel agonisti olan THC, sentetik agonistler (CP 55,940, WIN 55,212-2, ACEA) gibi reseptörde maksimum düzeyde bir etki ortaya çıkaramamaktadır. $\Delta 9$ -THC'nin reseptörüne bağlanmasıyla birlikte adenilat siklaz bloklanmakta, MAP-kinaz ise aktive olmaktadır. Diğer taraftan, Gi/o proteinleri aracılığıyla da P/Q-tipi ve N-tipi kalsiyum kanallarını bloklamakta, K⁺ kanallarını ise aktive etmektedir (Şekil 2.6). Bunun yanında, kalsiyum kanallarını inhibe ederken, glutamat, γ -amino-bütirik asit (GABA), asetilkolin ve norepinefrin gibi nörotransmitterlerin presinaptik terminallerden salınımını azaltmaktadır (Ameri et al., 1999; Kyrou et al., 2006).



Şekil 2.6. CB1 reseptörünün intraselüler sinyal yolağı (Kyrou et al., 2006).

Sentetik kanabinoidler, tıpkı fitokanabinoidler gibi uyuşturucu ve psikoaktif etkilere sahip laboratuvar ortamında sentezlenen yeni nesil kimyasallardır (Le Boisselier et al., 2017). Bu bileşikler kenevirde bulunan fitokanabinoidlere göre 2-800 kat daha güçlüdür ve metabolitleri daha uzun süre etki gösterir (Kong et al., 2018; Alipour et al., 2019). Sentetik kanabinoidler, ilk planda araştırma amaçlı üretildiğinden dolayı sentez metodu literatürde paylaşılmıştır, bu durum sonrasında illegal ortamlarda kanabinoid türevlerinin üretimlerinin artışına yol açmıştır (Mills et al., 2015). İlk sentetik kanabinoid sentezi Amerikalı organik kimya Profesörü Roger Adams'ın önderliğinde gerçekleşmiştir ve fitokanabinoidlere benzer olan tetrahidrokanabinol analogları sentezlenmiştir (Adams et al., 1945). Sentetik kanabinoidlerin etki mekanizması incelendiğinde, kanabinoid reseptörlerinin güçlü agonisti olarak davrandıkları ve hem CB₁ hem de CB₂ reseptörleri için tam agonist oldukları saptanmıştır. Yapılan çalışmalar, sentetik kanabinoidlerin özellikle CB₁ reseptörlerine güçlü bağlanmalarından dolayı THC'den daha yüksek bir aktiviteye sahip olduklarını gösterilmiştir (Freund and Banning, 2017).

2.3.2. Kanabinoidlerin etkileri

Kanabinoid bileşikleri genellikle sigara şeklinde içilse de buharlaştırma ve oral yolla da kullanıldıkları da bilinmektedir (Vandrey et al., 2012). İçildikten sonra akciğerlerden absorbe edilirler ve kısa süre içerisinde beyin gibi organlara dağılımın gerçekleşmesiyle kanabinoidlerin etkileri genelde birkaç dakika içinde başlamaktadır. Bunun yanında, oral kullanım durumunda, sindirim aktivitesine, gıda alımına ve ilk geçiş etkisine bağlı olarak etkinin başlamasında gecikme olabilir. Lipofilik olan bu moleküller, yüksek dağılım hacmine sahiptir ve kronik kullanım sonrasında vücudun yağ içeren kompartmanlarında depolanmaktadır (Thomas et al., 1990).

Akut dönemde CB1 reseptörlerinin uyarılmasıyla birlikte, kalp atım hızı artar, fiziksel güç azalır, konjunktival kızarıklık görülebilir, iştah ve besin alımı artmaktadır (Hollister, 1983). Bunların yanında, zaman ve mekân kavramlarının bozulması, heyecanlanma ve fikir uçuşması, duyuların azalması, duygudurum bozuklukları, illüzyonlar ve halüsinasyonlar gibi subjektif etkiler de ortaya çıkmaktadır. Bu etkiler alkol ile beraber esrar kullanıldığında daha da artmaktadır (Dewey, 1986).

Marihuana'nın bilinen tıp alanındaki en eski kullanım amacı ağrı kesici etkisidir. Hayvanlarda yapılan ağrı modellerinde endokanabinoidler ve sentetik CB1 reseptör agonistleri uygulanarak yapılan çalışmalarda, kanabinoidlerin mekanik, kimyasal ve termal ağrı uyaranları ile oluşturulmuş akut ağrıya karşı etkili ajanlar olduğu ortaya konmuştur (Guindon et al., 2006). Ayrıca, inflamasyon kaynaklı ve nöropatik ağrı gibi kronik ağrılarda da kanabinoidlerin etkili oldukları bulunmuştur (Guindon and Beaulieu, 2006; Li et al., 1999). Kanabinoidlerin bu ağrı kesici etkileri santral sinir sistemi, omurilik ve periferik sinir sisteminin katıldığı kompleks bir devre ile düzenlenmektedir (Hohmann et al., 1998; Hohmann ve Herkenham, 1999). Diğer taraftan, CB1 reseptörleri kalpte negatif inotropik etki gösterirken, CB1 reseptörleri uyarıldığında ise vasodilatör etkiler ortaya çıkmaktadır (Batkai et al., 2004; Gebremedhin et al., 1999). Birçok kanser çalışması CB1 reseptörlerinin uyarılmasının tümöral dokularda hücre bölünmesini, tümör büyümesini ve metastazı inhibe ederek ve ayrıca apoptozisi artırarak antitümöral etki gösterdiğini kanıtlamıştır bulunmuştur (Ligresti et al., 2006; Ramer et al., 2010). Bu etkilerinin yanında, CB1 reseptör aktivasyonu antidepresan benzeri etki göstermekte ve CB1 reseptörlerinin bloklanması ise anksiyojenik ve depresyon benzeri etkilere neden olmaktadır (Haller et al., 2002).

2.3.3. CB1 reseptörleri

CB₁ reseptörü keşfedildiği zaman sadece merkezi sinir sisteminde bulunduğu inanılmaktaydı ve bu nedenle de beyin kanabinoid reseptörü olarak kabul edildi. Ancak daha sonra periferik dokularda da varlığı ortaya konmuştur. CB₁ reseptörleri santral sinir sisteminde en fazla bulunan G protein kenetli reseptörlerdendir. Beyinde CB₁ reseptörlerinin en yüksek eksprese olduğu bölgeler hipokampus, serebellum, bazal gangliyonlar, substantia nigra ve globus pallidusdur (Herkenham et al., 1990; Tsou et al., 1998). İnsanlarda 472 amino asitten oluşan (sıçanlarda ve farelerde 473 amino asit) CB₁ reseptörü CNR1 geni tarafından kodlanmaktadır. İnsan ve kemirgenler arasındaki amino asit dizi özdeşliği ise %97-99 civarındadır (Zou and Kumar, 2018). Çoğunlukla presinaptik yerleşimli olan CB₁ reseptörleri presinaptik nöronlardan nörotransmitter salınımına etki etmektedir. CB₁R'leri, özellikle GABAerjik ve glutamaterjik nöronlarda bulunduğundan, GABA ve glutamat nörotransmisyonunda rol oynamaktadır. G_{i/o} proteinine kenetli olan CB₁ reseptörleri aktive olduğunda cAMP oluşumunda azalmaya ve dolayısıyla cAMP'ye bağlı protein kinaz A'nın (PKA) inhibisyonuna neden olur. Bunun yanında, CB₁R aktivasyonu mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) ve p38 yolaklarında da etkindir. Diğer taraftan, CB₁ reseptörlerinin aktivasyonu yine G proteinleri aracılığıyla Ca⁺² ve K⁺ kanallarına bağlanarak iyon geçişini etkilemektedir (Howlett et al., 2002).

2.3.4. Kanabinoidler ve epilepsi

Fare pilokarpin modelleri, *in vitro* hipokampal nöronal kültür modelleri, pentilentetrazol modeli ve penisilin ile indüklenen epileptiform modeli dahil olmak üzere çeşitli modellerde birçok kanabinoid analogu test edilmiştir (Kozan et al., 2007; de Curtis et al., 2012). THC'nin çoğu deneysel epilepsi modelinde nöbet sıklığını veya epileptik aktivitenin şiddetini azalttığını, ancak farklı tipte epilepsi modelleriyle yapılan diğer çalışmalarda epileptik aktivite üzerinde hiçbir etkisi olmadığı veya nöbetleri artırdığı bildirilmiştir (Wallace et al., 2003; Deshpante et al., 2007).

Sıçan, fare, kobaylarda yapılan deneysel epilepsi çalışmalarında, endokannabinoid sistemin modülasyonunun (FAAH veya anandamid geri alımının inhibisyonu yoluyla) çoğunlukla antikonvülsan etkileri olduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalar ise prokonvülzan ve etkisiz olduğunu öne sürmektedir. Manna et al.,

yaptıkları çalışmada, CB1R agonistlerinin düşük dozlarda CB1R'ler aracılığıyla antikonvülzan etkileri, ancak yüksek dozlarda TRPV1 kanalları yoluyla prokonvülsif bir etki üretebileceğini öne sürmüşlerdir (Manna et al., 2012). Diğer taraftan, CB1R agonistleri (WIN55, 212, ACEA), yaygın olarak kullanılan bazı antiepileptik ilaçların etkisini artırdığını göstermişlerdir (Luszczki et al., 2006; Andres-Mach et al., 2012; Florek-Luszczki et al., 2014). Fareler, sıçanlar ve kobaylarla yapılan 18 çalışmanın, %38,9'unda CB1R antagonistleri pro-konvülsan, %5,6'sında anti-konvülsan ve %55,6'sında etkisiz olarak bulunmuştur. Bu nedenle, endokannabinoid sistemin aktivasyonu, nöbetleri önleyebilirken, endojen koruyucu mekanizmaların inhibisyonu, nöbetlere önemli ölçüde katkıda bulunmayabilmektedir. Bu farklılıkların nedeni, çalışmanın yapıldığı türün özelliklerine, nöbet oluşturma şekline, zamanlamaya ve deneysel tasarıma bağlı olabilir (Rosenberg et al., 2015)

Hayvanlar üzerinde yapılan bu çalışmalardan sonra insanlar üzerinde faz çalışmalarını da tamamlanmış ve 25 Haziran 2018'de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), şiddetli nöbetlerle seyreden Dravet sendromu (DS) ve Lennox-Gastaut sendromu (LGS) tedavisi için yüksek oranda saflaştırılmış, bitki türevli kannabidiol (CBD) (Epidiolex®, GW Pharmaceuticals, Cambridge, UK) farmasötik bir preparatını onaylamıştır (U.S. Food and Drug Administration, 2018).

2.4. Oksidan ve antioksidan sistem

Aşırı serbest radikal salınımından kaynaklanan oksidatif stresin epilepsinin başlaması ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle epilepsi tedavisinde oksidatif stresi azaltmaya yönelik antioksidan tedaviler büyük ilgi görmüştür. Bununla birlikte, birçok kanıt, oksidatif stresin tüm nöbet modellerinde her zaman aynı ideal duruma sahip olmadığını göstermektedir (Shin et al., 2011). Süperoksit radikali ($\cdot O_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve tekli oksijen (O_2) dahil olmak üzere ROS (reaktif oksijen radikalleri), normal hücrel metabolizma sırasında üretilir (Kontos, 1989; Beit-Yannai et al., 1997). Fizyolojik ROS seviyeleri enzimatik [örn., süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve peroksiredoksinler (Prxs)] ve nonenzimatik [örn., C vitamini, E vitamini ve indirgenmiş glutatyon (GSH)] antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılır. Bununla birlikte, artan ROS üretimi, azalmış antioksidan savunma yeteneği veya her ikisi nedeniyle aşırı ROS seviyeleri oksidatif strese yol açar (Winyard et al., 2005). Ek olarak, fazla ROS ayrıca peroksinitrit gibi reaktif nitrojen

türleri (RNS) oluşturmak için nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girer (Brown and Borutaite, 2001).

Hipokloröz asitle oksitlenmiş proteinler, özellikle albümin, disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlama yoluyla protein agregatları dahil olmak üzere gelişmiş oksidasyon protein ürünleri (AOPP'ler) üretir. AOPP'ler, oksidatif hasarın yeni protein biyobelirteçleri ve yeni bir inflamatuvar mediatör sınıfıdır. AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanır ve protein oksidasyonunun derecesini tahmin etmek için güvenilir belirteç olarak kabul edilir (Korkmaz et al., 2013). Literatürdeki çalışmalarda bazı nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasında oksidatif stresin rolü olduğu bildirilmiştir (Migliore et al., 2005; Perry et al., 2002), 17). Epileptik ensefalopatisi olan ve antiepileptik ilaç kullanan hastalarla yapılan çalışmada ise AOPP düzeylerinde (kontrol grubuna göre) anlamlı artış bildirilmiştir (Grosso et al., 2011).

Lipid peroksidasyon ürünü, malondialdehit (MDA) hücrelerdeki oksidatif stresin bir ölçüsü olarak yaygın olarak kullanılır. Lipitler, hücre zarının önemli bileşenleridir. Lipid peroksidasyon, diyabet, yetişkin solunum sıkıntısı sendromu, Alzheimer hastalığı, iskemi, epilepsi gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynar. Serbest radikaller nöronal dejenerasyona neden olabilir ve bu da lipid peroksidasyonunu artırmaktadır (Yagi et al., 1987). Beyindeki çoklu doymamış yağ asit yüksek içeriği nedeniyle lipid peroksidasyonuna çok duyarlıdır. Bu nedenle beyindeki hücresel ölümler nedeniyle MDA düzeylerinde yükselme görülmesi normaldir (Coyle and Puttfarcken, 1993).

Diğer taraftan, antioksidan enzimler de epilepsi patogenezinde rol oynamaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Bakır-çinko SOD (CuZnSOD) sitoplazma ve peroksizomlarda etki gösterirken, manganez mitokondride (MnSOD) oluşur. Hücre dışı etkili ECSOD ayrıca bakır ve çinko içermektedir (Halliwell et al., 2006). SOD1 geninin mutasyonları beyin, beyin sapı ve omurilikteki nöronal yaralanmalara ve oksitleyici reaksiyonun artmasına ve dolayısıyla yanlış katlanmış proteinlere katkıda bulunur (Niizuma et al., 2009; Meldrum, 2002). Ek olarak, SOD nitrik oksit dahil apoptoza da katılır. Bu nedenle, SOD1 nöronal apoptozda önemli bir faktördür. Apoptoz ve oksidatif stresin epilepsi gelişiminde önemli patofizyolojik süreçler olduğu iyi bilinmektedir ve azalmış SOD1'in çeşitli transkripsiyonel yollar

yoluyla anti-oksidatif ve anti-apoptotik aktivitelerin zayıflaması anlamına geldiği ve epilepsi gelişimine katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir (Peternel et al., 2009; Miao and Clair, 2009). Katalaz, pH ve sıcaklık değişikliklerinin yanı sıra proteolize karşı nispeten hücrenin daha dirençli olmasını sağlayan kararlı bir yapıya sahip olması bakımından benzersiz bir antioksidan enzimdir. İnsan vücudundaki işlevi, H₂O₂'yi su ve oksijene ayrıştırmaktır. Katalaz olmadan, süperoksitten SOD tarafından dönüştürülen aşırı H₂O₂, metal iyonları ile reaksiyona girerek son derece zararlı hidroksil radikalini oluşturabilir (Chelikani et al., 2004). Yapılan epilepsi çalışmaları çelişkili sonuçlar içerse de, çoğunlukla epileptik nöbet esnasında katalaz seviyelerinin düştüğu gösterilmiştir (Menon et al., 2014)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

DeneySEL prosedürler, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 2014/28 nolu kararla onaylandıktan sonra TÜBİTAK (1001; proje no: 115S361) tarafından desteklendi.

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda, 224±16 gr ağırlığında 84 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilerek bu merkeze bağlı olarak akredite olan Fizyoloji-Farmakoloji AD ortak hayvan prosedür odasına (sıcaklığı 24±2 °C, nem oranı %60) getirildi. Hayvanlar su ve yem kısıtlaması olmaksızın doğal 12 saat aydınlık/karanlık siklusu döngüsünde bekletildi. 1 haftalık alışma periyodundan sonra sıçanlar deneye alındı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Sunulan çalışmada, elektrokortikogram (ECoG) Kayıtları kayıtlarının eldesi için 16 kanallı veri kazanım ünitesi (PowerLab, 16/SP, AD Instruments, Australia) kullanıldı. ECoG kayıtlarının eldesi için tripolar elektrotlar hazırlandı. Kimyasal ajanlar hassas terazi ile tartıldıktan sonra 1000 µl ve 100 µl'lik mikropipetler vasıtasıyla çözündürülerek ependorflar içerisinde -20°C'lik buzdolabında deney gününe kadar muhafaza edildi. İntrakortikal (i.k.) ve İntraserebroventriküler (i.s.v.) madde uygulamaları için Hamilton mikroenjektör (type 701N, 10 µl) kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Ajanlar

a. Penisilin G Potasyum

Moleküler formülü: C₁₆H₁₇KN₂O₄S (İ.E. Ulagay, Türkiye)

Moleküler ağırlığı: 372.48 g/mol

Çözücü: Steril fizyolojik tuzlu su (SF)

b. A-438079 hydrochloride hydrate

Selektif P2X7 pürinerjik reseptör antagonisti

Moleküler formülü: C₁₃H₉Cl₂N₅·HCl · xH₂O (A9736, Sigma)

Moleküler ağırlığı: 342.61 g/mol

Çözücü: Steril fizyolojik tuzlu su (SF)

c. BzATP [2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt]

Potent P2X7 pürinerjik reseptör agonisti

Moleküler formülü: C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃ · xC₆H₁₅N × yH₂O (B6396, Sigma)

Moleküler ağırlığı: 715.39 g/mol

Çözücü: Steril fizyolojik tuzlu su (SF)

d. ACEA (Araşidonil-2-kloroetanolamid)

Spesifik kanabinoid-1 reseptör agonisti

Moleküler formülü: C₁₃₉H₂₃₁N₄₅O₄₁ (A9719, Sigma)

Moleküler ağırlığı: 3188.63 g/mol

Çözücü: DMSO/SF: 3/7

e. AM251 (1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1Hpyrazole-3-carboxamide)

Spesifik kanabinoid-1 reseptör antagonisti

Moleküler formülü: C₂₂H₂₁N₄OCl₂I (A6226, Sigma)

Moleküler ağırlığı: 555.24 g/mol

Çözücü: DMSO/SF: 3/7

3.2. Metot

3.2.1. Deney grupları

Her bir grupta 7 hayvan olmak üzere çalışma gruplarımız aşağıdaki gibidir;

1- Kontrol-1 (SF + SF) grubu: Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra penisilinin çözücüsü SF (2,5 µl, i.k.) ve yarım saat sonrasında A-438079 ve BzATP'nin çözücüsü SF (2 µl, i.s.v.) uygulandı.

2- Kontrol-2 (SF + DMSO/SF) grubu: Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra penisilinin çözücüsü SF (2,5 µl, i.k.) ve yarım saat sonrasında ACEA ve AM251'in çözücüsü DMSO/SF: 3/7 (1 µl, i.s.v.) uygulandı.

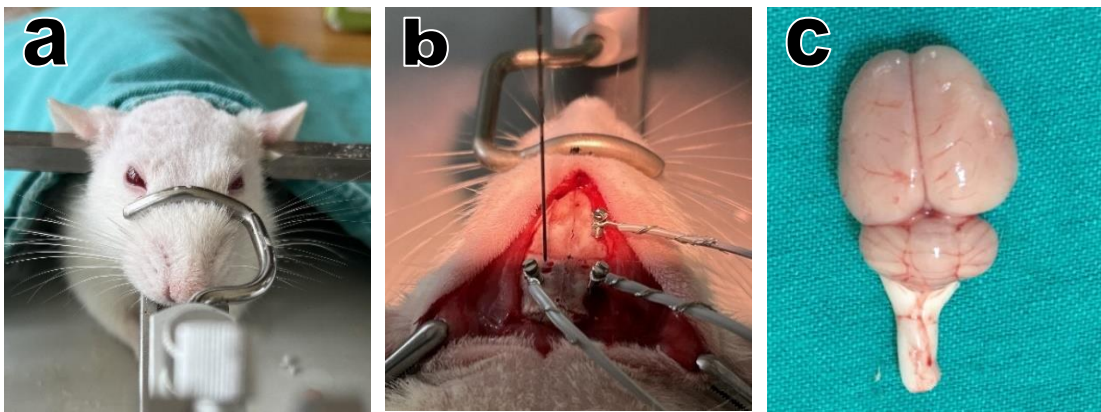
- 3- Penisilin + SF grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.) ve yarım saat sonrasında A-438079 ve BzATP'nin çözücüsü SF (2 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 4- Penisilin + DMSO/SF grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.) ve yarım saat sonrasında ACEA ve AM251'in çözücüsü DMSO/SF: 3/7 (1 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 5- Penisilin + A-438079 grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.) ve yarım saat sonrasında 20 µg A-438079 (2 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 6- Penisilin + BzATP grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.) ve yarım saat sonrasında 100 µg BzATP (2 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 7- Penisilin + ACEA grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.) ve yarım saat sonrasında 7,5 µg ACEA (1 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 8- Penisilin + AM251 grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.) ve yarım saat sonrasında 0,25 µg AM251 (1 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 9- Penisilin + A-438079 + ACEA grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.), yarım saat sonrasında 20 µg A-438079 (2 µl, i.s.v.) ve A-438079 uygulamasından 10 dakika sonra 7,5 µg ACEA (1 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 10- Penisilin + A-438079 + AM251 grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.), yarım saat sonrasında 20 µg A-438079 (2 µl, i.s.v.) ve A-438079 uygulamasından 10 dakika sonra 0,25 µg AM251 (1 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 11- Penisilin + BzATP + ACEA grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.), yarım saat sonrasında 100 µg BzATP (2 µl, i.s.v.) ve BzATP uygulamasından 10 dakika sonra 7,5 µg ACEA (1 µl, i.s.v.) uygulandı.
- 12- Penisilin + BzATP + AM251 grubu:** Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandıktan sonra 500 IU penisilin (2,5 µl, i.k.), yarım saat sonrasında 100 µg BzATP (2 µl, i.s.v.) ve BzATP uygulamasından 10 dakika sonra 0,25 µg AM251 (1 µl, i.s.v.) uygulandı.

3.2.2. Cerrahi işlem

Operasyondan 1 gün önce aç bırakılan sıçanlar 1,25 gr/kg üretan (i.p.) ile anesteziye alındı. Kafaları traş edilen sıçanlar stereotaksik cihaza sabitlendi (Şekil 3.1a). Spontan solunuma bırakılan hayvanların kafa derisi rostro-kaudal doğrultuda ortalama 4 cm uzunluğunda bir kesiyle açıldı. Somatomotor korteks üzerindeki yumuşak doku uzaklaştırıldıktan sonra varsa küçük kanamalar kemik mumu (bonewax) (W810, Ethicon) yardımıyla durduruldu. Stereotaksik cihaz ile bregma (referans noktası) saptandıktan sonra bregma noktası referans alınarak yaklaşık 1 mm çapında 6 adet delik bir elektrikli drill (OmniDrill 35, WPI inc, Kore) yardımıyla açıldı. 6 adet deliğin 3 tanesine özel yapım paslanmaz çelik vidalar kafatasına sabitlendi. Daha sonra bu vidalara stereo jaktan yapılmış olan dişi tripolar elektrot kablo aracılığıyla sarıldı ve erkek yakın takılmasıyla birlikte elektrotlar Powerlab veri kazanım sistemine bağlandı. Vidalar aşağıdaki koordinatlara göre sabitlendi:

1. Bregmanın 4.0 mm anterioru, orta çizginin 3.0 mm sol laterali (pozitif elektrot)
2. Bregmanın 4.0 mm posterioru, orta çizginin 3.0 mm sol laterali (negatif elektrot)
3. Bregmanın 4.0 mm posterioru, orta çizginin 3.0 mm sağ laterali (toprak elektrot)

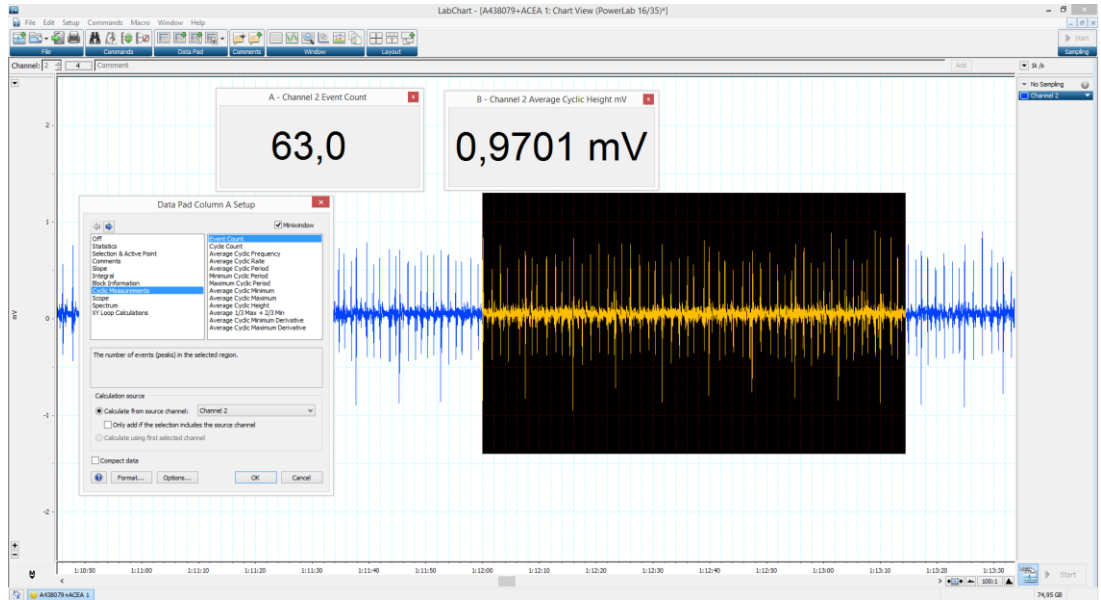
Kalan 3 deliğin 1 tanesi penisilin enjeksiyonu (bregmaya göre koordinatlar: 2.0 mm posterior, 2.0 mm sol lateral, 1.0 mm vertikal) için, diğer 2 tanesi ise i.s.v. enjeksiyonlar (bregmaya göre koordinatlar: 1.1 mm posterior, 1.5 mm sol ve sağ lateral, 4.2 mm vertikal) için kullanıldı (Şekil 3.1b) .



Şekil 3.1. a) Stereotaksi cihazına sıçanın sabitlenme işlemi b) Tripolar elektrot takılmış olan sıçana intrakortikal penisilin enjeksiyonu işlemi c) Serebrum, serebellum ve beyin sapının çıkarıldıktan sonra görüntüsü

3.2.3. İlaç Uygulamaları

Elektrot takma işleminden sonra ECoG kayıtları LabChart 7 Pro (ADInstruments, Avustralya) programı aracılığıyla bilgisayar ortamında başlatıldı. 5 dakikalık bazal aktivite kaydından sonra 500 IU penisilin 2,5 µl hacimde i.k. olarak uygulandı. Penisilin enjeksiyonundan en fazla 2 dk sonra interiktal spike aktiviteleri gözlemlendi. Penisilin enjeksiyonundan 30 dakika sonra spike aktiviteleri stabil duruma ulaştığından A-438079 ve BzATP bu dakikada 2 µl hacimde i.s.v. olarak uygulandı. Yine, penisilin enjeksiyonundan 30 dakika sonra ACEA ve AM251 1 µl hacimde i.s.v. olarak uygulandı. Kombinasyon gruplarında ise, A-438079 veya BzATP sol ventriküle enjeksiyonlarından 10 dakika sonra ACEA veya AM251 sağ ventriküle enjekte edildi. Alınan ECoG kayıtları bilgisayara kaydedildi ve depolandı.



Şekil 3.2. Verilerin LabChart-7 programı yardımıyla analiz işleminden bir görüntü

3.2.4. Elektrofizyolojik Kayıtların Değerlendirilmesi

Deneyler sonucunda elde edilen epileptiform aktivite offline olarak spike frekansı ve amplitüdü açısından analiz edildi. Elde edilen interiktal spike aktivitelerinin frekansları, LabChart 7 Pro yazılımındaki Cyclic Measurements - Event Count - Spikey shape basamakları kullanılarak analiz edildi (Şekil 3.2). Amplitüd ise, yazılımın Average A Cyclic Height özelliği sayesinde hesaplandı (Arslan et al., 2019). Programın Multiple Add to Datapad özelliği ile penisilin enjeksiyonundan sonraki 150 dakika, 10 dakikalık dilimlere bölünerek hesaplandı ve veriler Microsoft Excel programına aktarıldı. Penisilin enjeksiyonundan önceki 10 dakikalık spike aktivitesi

yüzde yüz olarak kabul edilerek (yüzde değişim) penisilin enjeksiyonundan sonraki 120 dakika boyunca kaydedilen spike aktiviteleri aşağıdaki formül ile penisilin öncesi 10 dakika ile kıyaslandı:

$$\text{Frekans (Amplitüd) Değeri \%} = \frac{\text{Kimyasal verildikten sonra frekans (amplitüd) ortalaması}}{\text{Kimyasal verilmeden önce frekans (amplitüd) ortalaması}} \times 100$$

3.2.5. Biyokimyasal analizler

ECoG kayıtlarının bitiminde anestezi altında olan hayvanlar dekapite edilerek sürekli oksijenlenen yapay beyin solüsyonu [(aCSF), içeriği (mM): NaCl, 124; KCl, 5; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂, 2.4; MgSO₄, 1.3; NaHCO₃, 26; glucose, 10; HEPES, 10; pH 7.4, 95% O₂ ve 5% CO₂ tabii tutularak] içerisinde hayvanların beyinleri (hemisferler, serebellum, beyin sapı bir bütün halinde) çıkarıldı (Şekil 3.1c). Serebellum ve beyin sapı ayrıldıktan sonra çıkarılan beyin hemisferleri sıvı azot tankına daldırılarak hızlı bir biçimde donduruldu. Numuneler doku parçalayıcı ile homojenize edildi ve fosfat tampon solüsyonu (PBS, 10 mM, pH 7.2) içerisine konuldu. Doku örnekleri +4 °C' ve 220V da 1 dk boyunca sonikasyona (METU Electromechanical, Germany) tabi tutulduktan sonra -80 derece derin dondurucuda saklandı. Analiz gününde oda ısısında eritilen homojenatlar +4 °C' de 15000 x g' de 5 dak santrifüj edildi (Sigma 3K30, Germany) ve süpernatantlar biyokimyasal analizler için kullanıldı.

3.2.5.1. Doku örneklerinde protein miktarının belirlenmesi

Doku homojenatlarındaki her bir numunenin protein miktarı Lowry et al., (1951)'nin metodu ile tespit edildi. Lowry metodunun prensibi, alkali şartlar altında peptid nitrojenlerin bakır iyonları (Cu²⁺) ile reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin bakır katalizli oksidasyonu ile ortama eklenen Folin-Ciocalteu fosfomolibdik fosfotungstik asit reaktifinin heteropolimolibden mavisine indirgenmesi esasına dayanmaktadır.

3.2.5.2. Protein oksidasyonu (AOPP) düzeylerinin belirlenmesi

Protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı yeni bir marker olan Advanced oxidation protein products (AOPP), ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Yıkama işleminden sonra (Şekil 3.3a) AOPP

düzeleleri ticari kit kullanılarak (Sun-Red Bio Company, Cat. No.201-11-2673, Shanghai, China) 450 nm’de çalışıldı (Şekil 3.3b).

3.2.5.3. Lipid peroksidasyonu (MDA) düzeylerinin belirlenmesi

Doku ve serum örneklerinde malondialdehid (MDA) düzeyleri ticari kit (Sun-Red Bio Company, Cat. No.201-11-0157, Shanghai, China) ile çalışıldı. Deneyin prensibi N-methyl-2-phenylindole ile total MDA’ nın reaksiyonu sonucu oluşan ürünün 450 nm’de spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

3.2.5.4. Süperoksid dismutaz (SOD) düzeylerinin belirlenmesi

Süperoksit radikalının ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksida dönüşümünü katalizleyen süperoksid dismutaz, ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle üretilen süper oksit radikalının nitro blue tetrazolium (NBT)’yi indirgeyip formazon oluşturmaktadır. Süperoksid dismutaz enzim düzeyleri ticari kit indirgenme sonucunda NBT mavi-mor renge dönüşmektedir ve bu renklerin absorbanısı 450 nm’de ölçüldü. (Sun-Red Bio Company, Cat. No.201-11-0169, Shanghai, China) kullanılarak çalışıldı.

3.2.5.5. Katalaz (CAT) düzeylerinin belirlenmesi

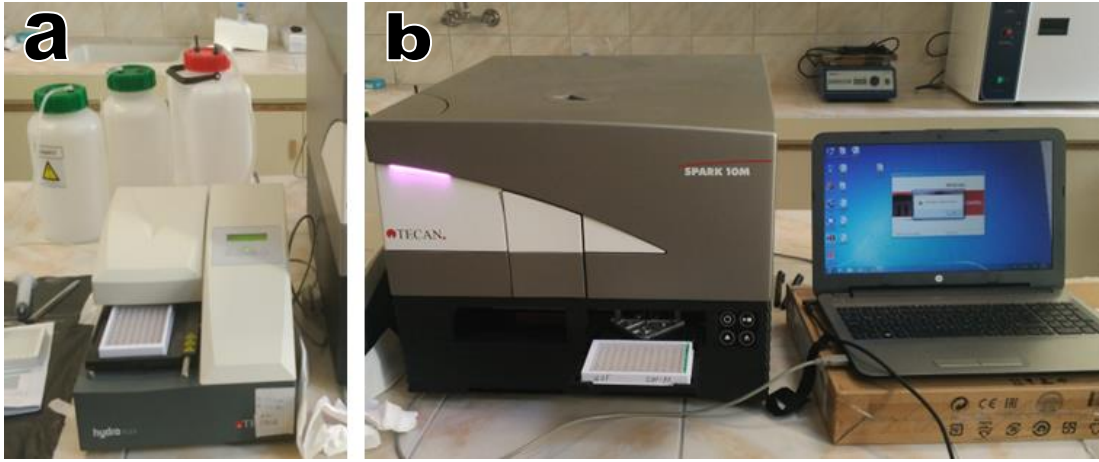
Katalaz, hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda görevli bir antioksidan enzimdir. Methodun prensibi, optimal konsantrasyonda enzimin hidrojen peroksit ile metanol reaksiyonuna dayanmaktadır. Oluşan formaldehitin kromojen olan 4-amino-3-hidrazino-5-merkaptio-1,2,4-triazol (Purpald) ile oluşturduğu rengin absorbanısı spektrofotometrik olarak okunur. Katalaz düzeyleri ticari kit (Sun-Red Bio Company, Cat. No.201-11-5106, Shanghai, China) kullanılarak çalışıldı.

3.2.5.6. Glutasyon (GSH) düzeylerinin belirlenmesi

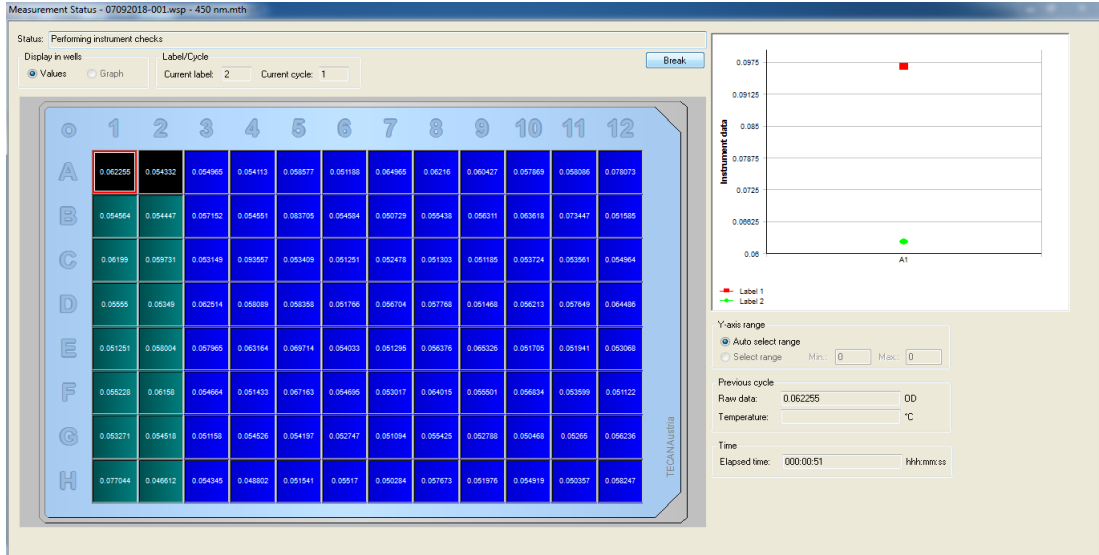
Glutasyon düzeylerinin belirlenmesi, proteinler perklorik asit ile çöktürüldükten sonra kromojenik disülfid 5-5’-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB, Ellman’s reagent) ile SH gruplarının arasındaki exchange oranının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Glutasyon düzeyleri ticari kit (Sun-Red Bio Company, Cat. No.201-11-7122, Shanghai, China) kullanılarak çalışıldı.

ELISA okuma (Tecan Spark 10M, Tecan Group Ltd., Switzerland) işleminden sonra elde edilen spektrofotometrik veriler (Şekil 3.4) Microsoft excele aktarıldı (Şekil 3.5). Standartlar kullanılarak formüller oluşturuldu. Spektrofotometrik veriler bu formüllere göre analiz edildi ve en sonunda Lowry methodunda bulunan protein

miktarına göre mg. protein cinsinden son veriler elde edildi. Her grup için elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.



Şekil 3.3. a) Kit yıkama işleminden bir görüntü, b) ELISA okuyucu ile 450 nm’de okuma işlemi



Şekil 3.4. ELISA okuyucudan elde edilen spektrofotometrik verilerin programda görünümü

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
1	<>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							
2	A	0.096609	0.059753	0.058138	0.059658	0.077615	0.054213	0.066984	0.067877	0.074669	0.062659	0.061319	0.079736								
3	B	0.058544	0.057588	0.064048	0.060715	0.1017	0.058276	0.052832	0.059436	0.061146	0.064296	0.079328	0.054217								
4	C	0.067439	0.061716	0.056	0.1007	0.055829	0.053271	0.055261	0.053282	0.053784	0.057079	0.055285	0.065432								
5	D	0.05959	0.056102	0.067248	0.064598	0.06277	0.054846	0.061866	0.059846	0.054292	0.059088	0.060456	0.065461								
6	E	0.053584	0.062359	0.064405	0.063036	0.070881	0.058542	0.054779	0.059732	0.068291	0.053715	0.054132	0.054713								
7	F	0.060521	0.065518	0.057538	0.05386	0.073792	0.057719	0.055548	0.073674	0.065524	0.063494	0.057086	0.053054								
8	G	0.055518	0.058448	0.052824	0.066753	0.057705	0.055524	0.053016	0.061173	0.056307	0.05248	0.055087	0.057165								
9	H	0.080796	0.048351	0.056783	0.050653	0.054931	0.059499	0.052099	0.064557	0.054956	0.065592	0.052286	0.062079								
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					

Şekil 3.5. Spektrofotometrik verilerin Microsoft excele aktarılması

3.3. İstatiksel Analiz

Elde edilen ECoG kayıtların istatistiksel analizinde GraphPad InStat (v3.06) yazılımı kullanıldı (San Diego, CA, USA). Deney gruplarındaki elektrofizyolojik ve biyokimyasal verilerin normal dağılıma uyduğu Shapiro–Wilk testi ile tespit edildikten sonra tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) testi kullanıldı ve sonrasında gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar için post-hoc Tukey-Kramer testi uygulandı. Grafik, tablo ve metin içerisinde kullanılan deney gruplarına ait değerler, ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Elde edilen sonuçlara göre $p < 0,05$ 'in altında olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

500 IU i.k. penisilin verildikten sonra ortaya çıkan interiktal dikensi dalgalar yaklaşık 3-4 saat devam etmektedir. Ancak, daha önce yaptığımız çalışmaya dayanarak (Arslan et al., 2019) kullandığımız kimyasalların (özellikle BzATP) etkisinin 120. dakikadan sonra azalması nedeniyle ve fazla hayvan kullanımının önüne geçmek amacıyla deneyimizi 120. dakikada sonlandırarak biyokimyasal analizleri gerçekleştirdik.

Penisilin+SF ile penisilin+DMSO/SF grupları karşılaştırıldığında epileptik aktivitenin frekansında ve amplitüdünde anlamlı bir değişiklik yoktu. Bu gruplarda, epileptiform aktivitenin 80. dakikasında hesaplanan frekans ortalamaları sırasıyla $35,4 \pm 2,3$ ve $37,1 \pm 4,0$ spike/dk ve amplitüd ortalamaları sırasıyla 852 ± 41 μ V ve 870 ± 59 olarak hesaplandı.

Penisilin+SF ile penisilin+DMSO/SF grupları biyokimyasal parametreler açısından karşılaştırıldığında hiçbir parametrede anlamlı bir değişiklik yoktu. Bu gruplarda, AOPP düzeyleri sırasıyla $7,98 \pm 0,63$ ve $7,71 \pm 0,77$; MDA düzeyleri sırasıyla $6,70 \pm 0,93$ ve $7,01 \pm 0,64$; SOD düzeyleri sırasıyla $6,68 \pm 0,65$ ve $7,13 \pm 0,50$; CAT düzeyleri sırasıyla $9,37 \pm 1,01$ ve $9,62 \pm 0,83$; GSH düzeyleri sırasıyla $71,37 \pm 5,91$ ve $75,09 \pm 7,19$ olarak ölçüldü.

Diğer taraftan, kontrol-1 (SF+SF) ile kontrol-2 (SF+DMSO/SF) grupları biyokimyasal parametreler açısından karşılaştırıldığında, DMSO uygulanması AOPP, MDA, SOD, CAT ve GSH seviyelerini değiştirmede. Bu gruplarda, AOPP düzeyleri sırasıyla $4,26 \pm 0,46$ ve $3,97 \pm 0,37$; MDA düzeyleri sırasıyla $2,77 \pm 0,35$ ve $3,01 \pm 0,40$; SOD düzeyleri sırasıyla $7,76 \pm 0,67$ ve $7,68 \pm 0,49$; CAT düzeyleri sırasıyla $12,76 \pm 0,81$ ve $13,22 \pm 1,04$; GSH düzeyleri sırasıyla $76,07 \pm 7,48$ ve $72,17 \pm 5,68$ olarak ölçüldü.

Yukarıdaki bulgular çerçevesinde, DMSO/SF uygulanması ile sadece SF uygulanması arasında elektrofizyolojik ve biyokimyasal analizler açısından anlamlı bir fark olmadığından ve elde edilen değerlerin yakın olması nedeniyle karşılaştırmalar için kontrol-1 ve penisilin+SF gruplarının verileri kullanıldı.

Penisilin+SF grubu ile SF grubu biyokimyasal parametreler açısından kıyaslandığında, penisilin ile oluşturulan epileptiform aktivite AOPP ve MDA düzeylerinde artışa neden olurken (sırasıyla $p < 0,05$; $p < 0,05$), katalaz düzeylerinde azalmaya neden oldu ($p < 0,05$). SOD ve GSH düzeyleri açısından iki grup arasında anlamlı fark yoktu (Tablo 4.1).

4.1. P2X7 reseptör antagonisti A-438079 ile kanabinoid CB1 reseptör agonisti ACEA etkileşimi

Tek başına uygulanan A-438079, penisilin+SF grubuna göre 60. dakikadan itibaren spike frekansında anlamlı bir azalma oluştururken ($p<0,05$), tek başına uygulanan ACEA, penisilin+SF grubuna göre 30. dakikadan itibaren spike frekansını anlamlı düzeyde azalttı ($p<0,01$). A-438079+ACEA kombinasyonu ise, spike frekansını penisilin+SF grubuna göre 20. dakikadan itibaren azalttı. Kombinasyon grubu ile tek başına uygulanan A-438079 karşılaştırıldığında sadece 40, 50 ve 60. dakikalarda anlamlı düşüş gözlemlendi (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,05$). Diğer taraftan kombinasyon grubu ile ACEA grubu arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.2A). Spike amplitüdüleri açısından hiçbir grupta anlamlı bir değişim bulunmadı (Şekil 4.2B).

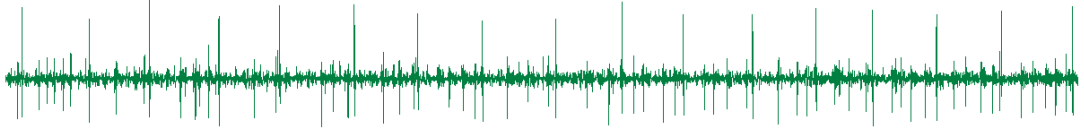
A-438079, ACEA ve A-438079+ACEA gruplarında 80. dakikada hesaplanan frekans ortalamaları sırasıyla $25,3\pm 2,9$; $23,3\pm 3,5$; $18,6\pm 4,4$ spike/dk ve amplitüd ortalamaları sırasıyla 832 ± 76 μ V; 844 ± 69 ; 799 ± 53 olarak hesaplandı (Şekil 4.1).

A-438079 grubu penisilin+SF grubu ile karşılaştırıldığında, A-438079 uygulanması AOPP ve MDA düzeylerini artırırken ($p<0,05$), SOD, CAT ve GSH düzeylerini azalttı ($p<0,05$). Tek başına ACEA uygulanması, AOPP ve MDA düzeylerini artırırken ($p<0,05$), SOD ve GSH seviyelerini azalttı ($p<0,05$). Kombinasyon grubu ise, yine AOPP ve MDA düzeylerini artırırken ($p<0,05$), SOD, CAT ve GSH düzeylerini azalttı ($p<0,05$). Kombinasyon grubu ile tek başına uygulanan ACEA arasında fark yoktu (Tablo 4.1).

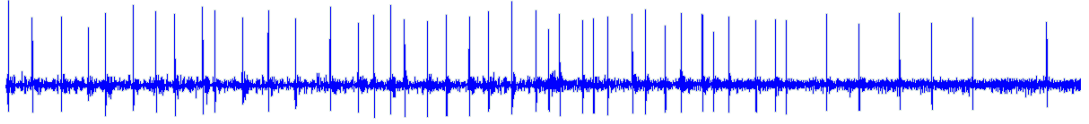
A) Penisilin + SF



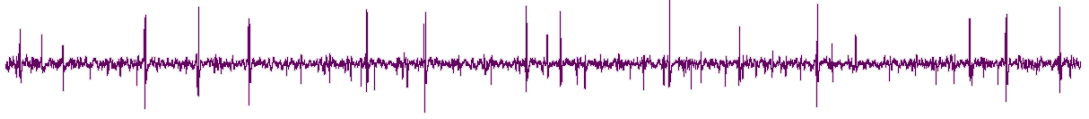
B) Penisilin + A-438079



C) Penisilin + ACEA



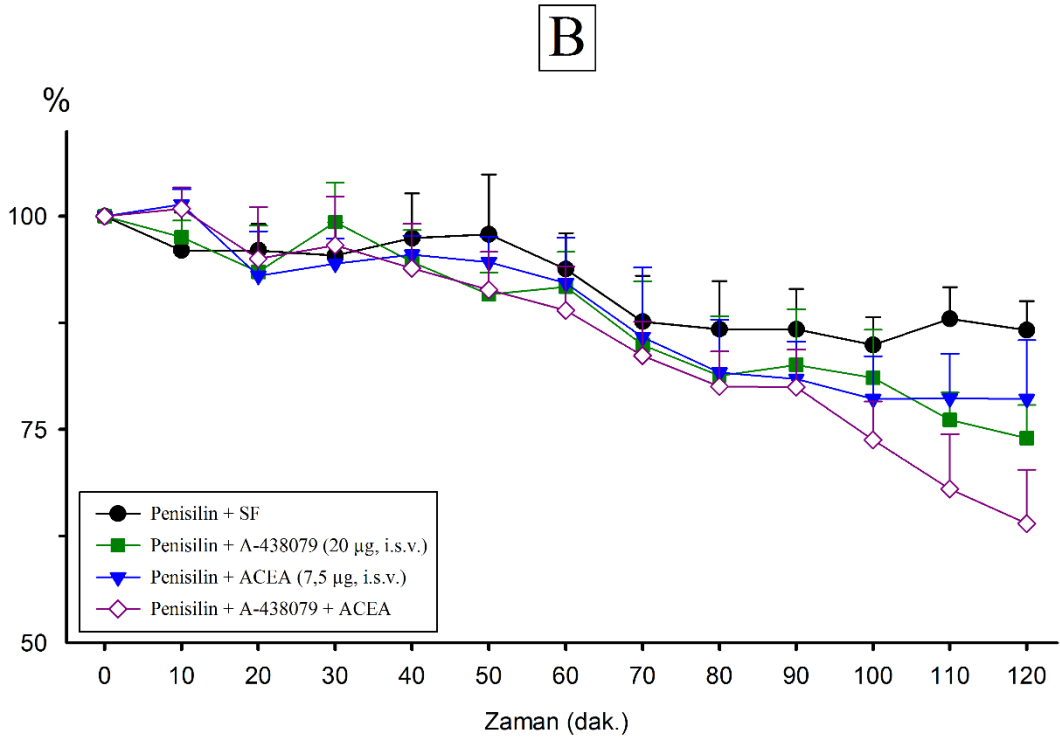
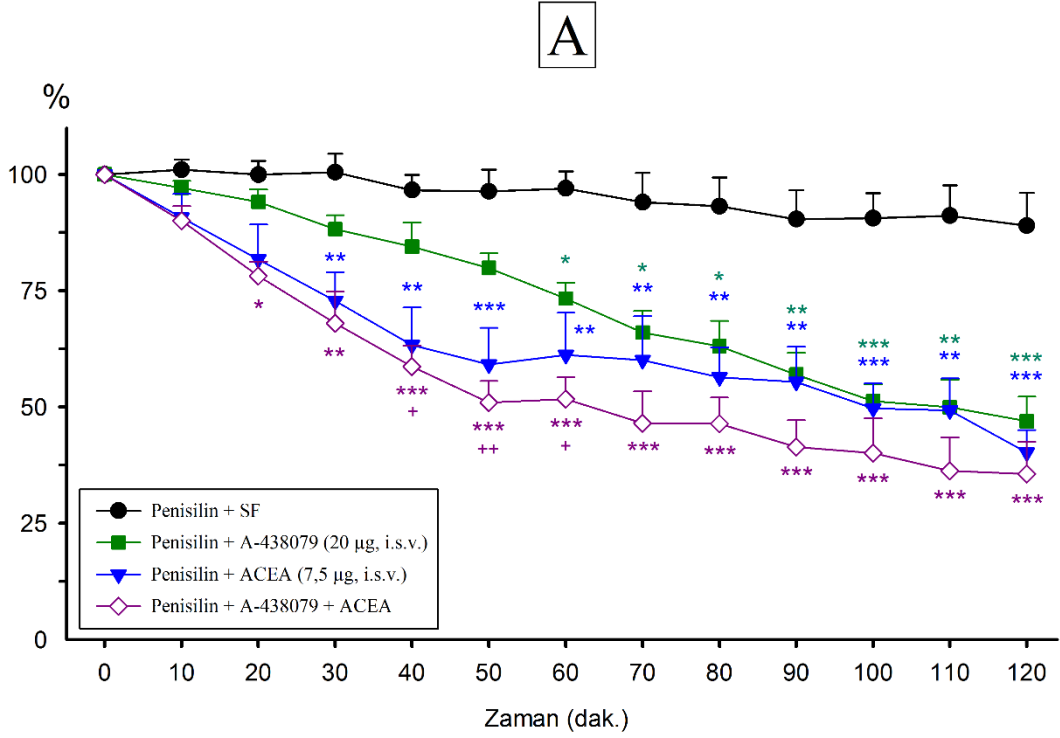
D) Penisilin + A-438079 + ACEA



E) Bazal Aktivite



Şekil 4.1. Penisilin+SF, A-438079 (20 µg), ACEA (7,5 µg) ve A-438079 (20 µg) +ACEA (7,5 µg) gruplarının 80. dakikasından kaydedilen örnek ECoG aktiviteleri



Şekil 4.2. A) Penisilin+SF, A-438079 (20 µg), ACEA (7,5 µg) ve A-438079 (20 µg) + ACEA (7,5 µg) gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, B) Penisilin+SF, A-438079, ACEA ve A-438079+ACEA gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ penisilin+SF grubuyla karşılaştırıldığında, + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ penisilin+A-438079 grubuyla karşılaştırıldığında.

	AOPP (nmol/mL .protein)	MDA (nmol/mL .protein)	SOD (ng/mL .protein)	CAT (ng/mL .protein)	GSH (ng/mL .protein)
Kontrol-1 (SF + SF)	4,26 ± 0,46	2,77 ± 0,35	7,76 ± 0,67	12,76 ± 0,81	76,07 ± 7,48
Pen + SF	7,98 ± 0,63 #	6,70 ± 0,93 #	6,68 ± 0,65	9,37 ± 1,01 #	71,37 ± 5,91
Pen + A438079	5,73 ± 0,30 *	3,69 ± 0,63 *	4,27 ± 0,42 *	6,03 ± 0,44 *	42,37 ± 7,06 *
Pen + ACEA	4,96 ± 0,45 *	3,47 ± 0,43 *	4,71 ± 0,39 *	8,09 ± 0,68	40,55 ± 6,31 *
Pen + A438079 + ACEA	5,43 ± 0,64 *	3,19 ± 0,56 *	3,57 ± 0,27 *	4,98 ± 0,77 *	35,41 ± 5,42 *

Tablo 4.1. Kontrol-1, Penisilin+SF, A-438079 (20 µg), ACEA (7,5 µg) ve A-438079 (20 µg) + ACEA (7,5 µg) gruplarındaki sıçanların beyinlerinden ölçülen ileri düzey oksidasyon protein ürünleri. #p<0,05 kontrol-1 grubuyla karşılaştırıldığında, *p<0,05 penisilin+SF grubuyla karşılaştırıldığında.

4.2. P2X7 reseptör antagonisti A-438079 ile kanabinoid CB1 reseptör antagonisti AM251 etkileşimi

AM251 uygulanması, 20. dakikadan itibaren spike frekansını penisilin+SF grubuna göre anlamlı düzeyde azalttı (p<0,01). A-438079+AM251 uygulanması ise, spike frekansını penisilin+SF grubuna göre 40-70. dakikalar arasında artırdı (p<0,05). Kombinasyon grubu ile A-438079 grubu karşılaştırıldığında, 30. dakikadan deney sonuna kadar spike frekasında anlamlı bir artış gözlemlendi (p<0,05) (Şekil 4.4A). Spike amplitüdüleri açısından hiçbir grupta anlamlı bir değişim bulunmadı (Şekil 4.4B).

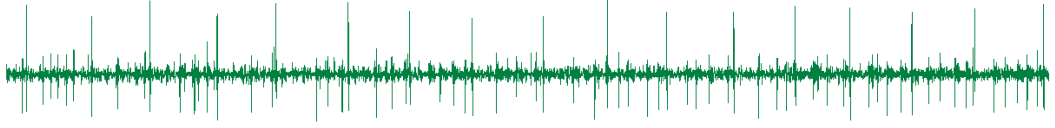
A-438079, AM251 ve A-438079+AM251 gruplarında 80. dakikada hesaplanan frekans ortalamaları sırasıyla 25,3±2,9; 70,6±5,5; 48,6±4,1 spike/dk ve amplitüd ortalamaları sırasıyla 832±76 µV; 1104±65; 933±57 olarak hesaplandı. Spike amplitüdüleri açısından hiçbir grupta anlamlı bir değişim bulunmadı (Şekil 4.3).

Tek başına AM251 uygulanması, penisilin+SF grubuna göre AOPP ve MDA düzeylerini artırdı (p<0,05). A-438079+AM251 grubu ile penisilin+SF grupları karşılaştırıldığında, hiçbir biyokimyasal parametrede anlamlı düzeyde bir değişim yoktu. A-438079+AM251 grubu ile A-438079 grupları karşılaştırıldığında ise, MDA ve SOD düzeylerinde A-438079' e göre artış tespit edildi (p<0,05) (Tablo 4.2).

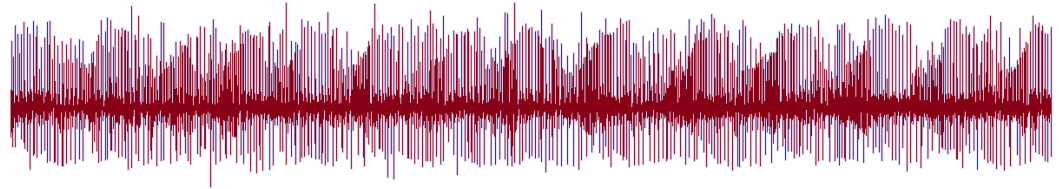
A) Penisilin + SF



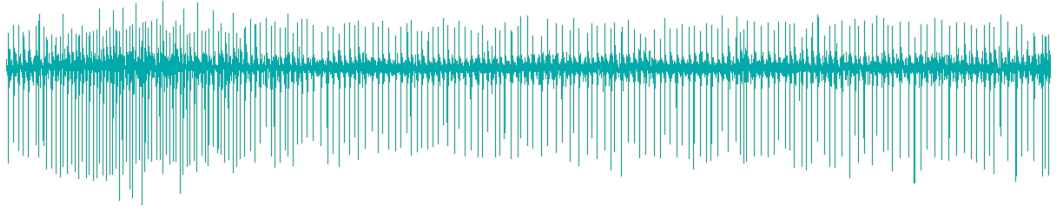
B) Penisilin + A-438079



C) Penisilin + AM251



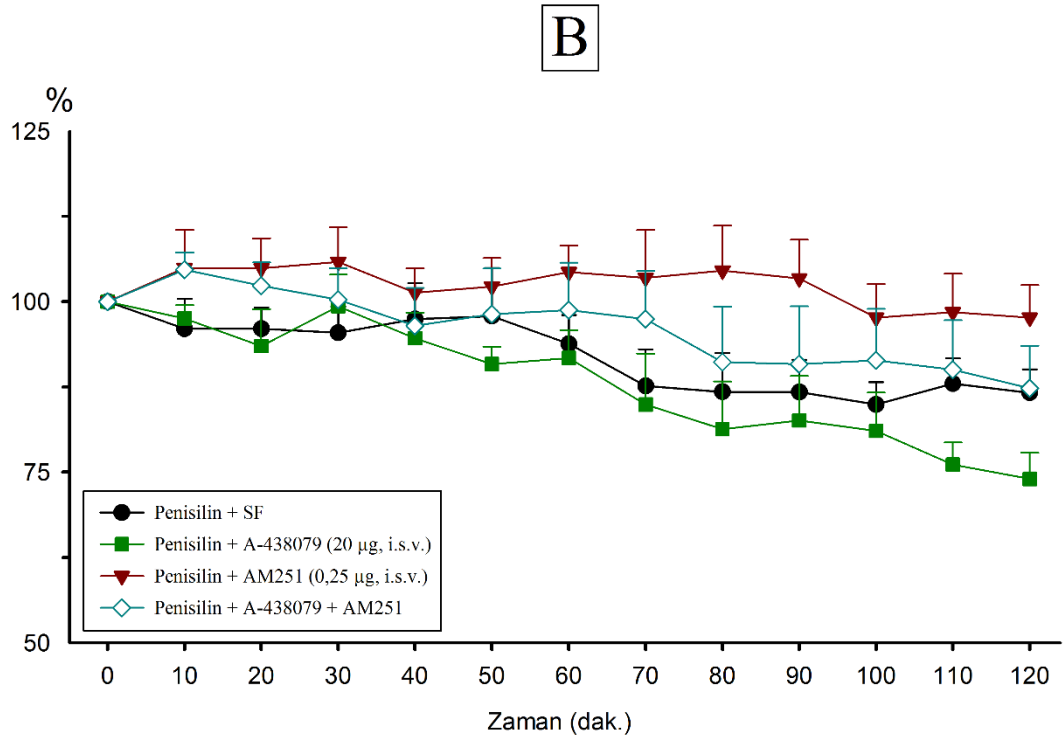
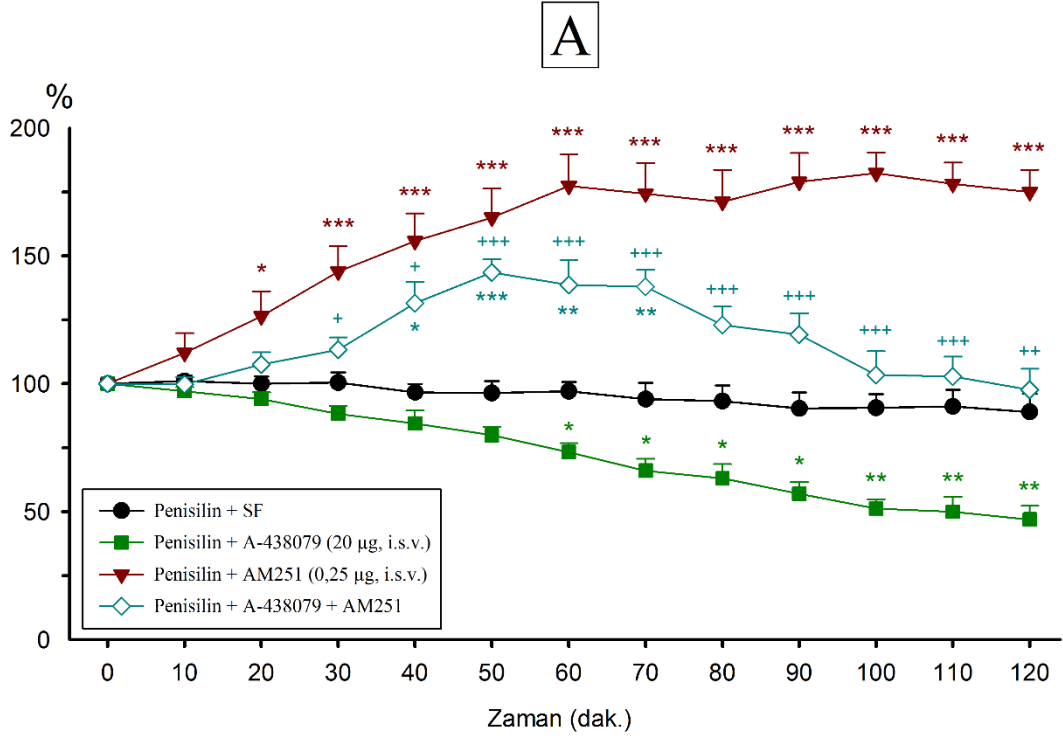
D) Penisilin + A-438079 + AM251



E) Bazal Aktivite



Şekil 4.3. Penisilin+SF, A-438079 (20 µg), AM251 (0,25 µg) ve A-438079 (20 µg) + AM251 (0,25 µg) gruplarının 80. dakikasından kaydedilen örnek ECoG aktiviteleri.



Şekil 4.4. A) Penisilin+SF, A-438079 (20 µg), AM251 (0,25 µg) ve A-438079 (20 µg) + AM251 (0,25 µg) gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, B) Penisilin+SF, A-438079, AM251 ve A-438079+AM251 gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ penisilin+SF grubuyla karşılaştırıldığında, + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ penisilin+A-438079 grubuyla karşılaştırıldığında.

	AOPP (nmol/mL .protein)	MDA (nmol/mL .protein)	SOD (ng/mL .protein)	CAT (ng/mL .protein)	GSH (ng/mL .protein)
Kontrol-1 (SF + SF)	4,26 ± 0,46	2,77 ± 0,35	7,76 ± 0,67	12,76 ± 0,81	76,07 ± 7,48
Pen + SF	7,98 ± 0,63 #	6,70 ± 0,93 #	6,68 ± 0,65	9,37 ± 1,01 #	71,37 ± 5,91
Pen + A438079	5,73 ± 0,30 *	3,69 ± 0,63 *	4,27 ± 0,42 *	6,03 ± 0,44 *	42,37 ± 7,06 *
Pen + AM251	11,80 ± 1,01 *	11,09 ± 0,78 *	9,19 ± 1,22	11,05 ± 1,39	82,79 ± 6,61
Pen + A438079 + AM251	6,59 ± 0,56	7,52 ± 0,64 +	7,61 ± 0,82 +	8,14 ± 0,66	57,83 ± 4,66

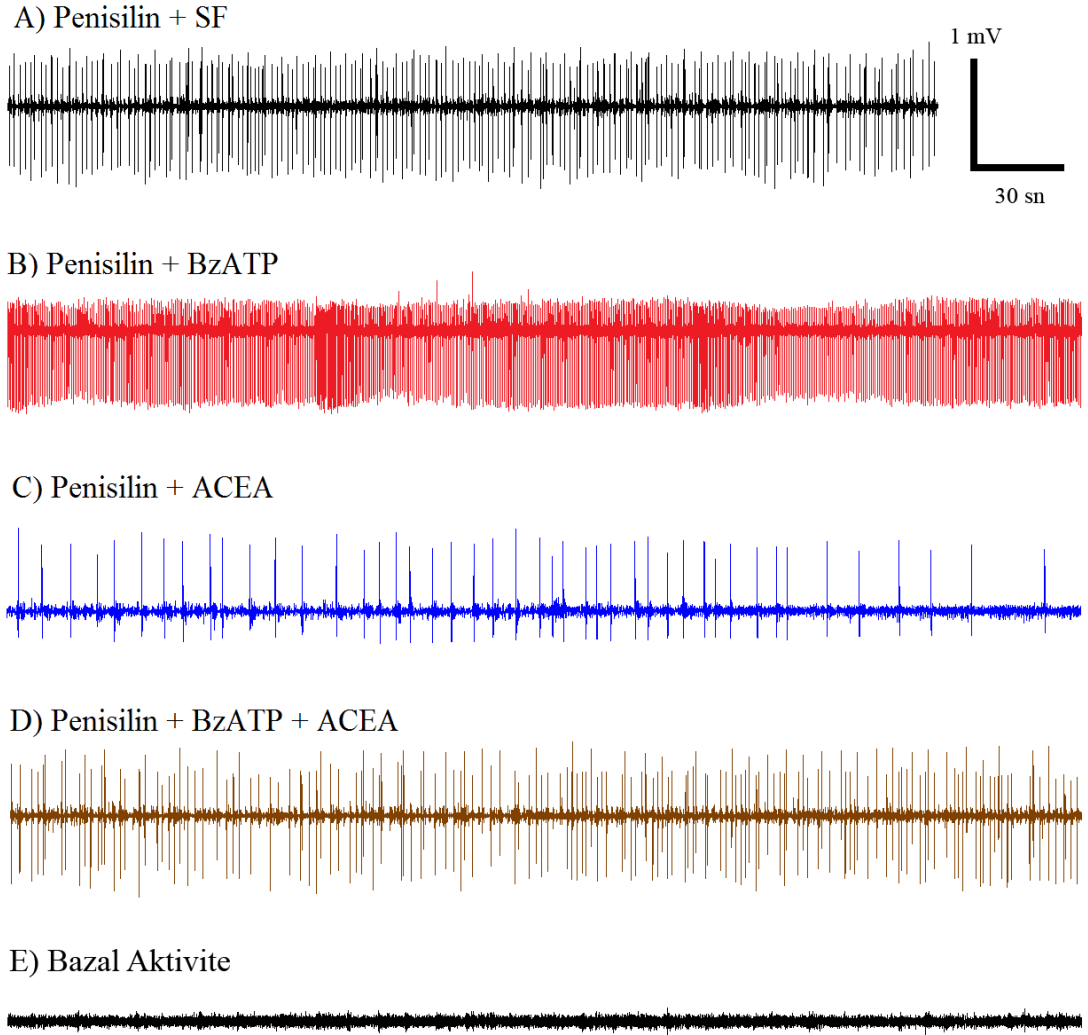
Tablo 4.2. Kontrol-1, Penisilin+SF, A-438079 (20 µg), AM251 (0,25 µg) ve A-438079 (20 µg) + AM251 (0,25 µg) gruplarındaki sıçanların beyinlerinden ölçülen ileri düzey oksidasyon protein ürünleri. #p<0,05 kontrol-1 grubuyla karşılaştırıldığında, *p<0,05 penisilin+SF grubuyla karşılaştırıldığında, +p<0,05 penisilin+A-438079 grubuyla karşılaştırıldığında.

4.3. P2X7 reseptör agonisti BzATP ile kanabinoid CB1 reseptör agonisti ACEA etkileşimi

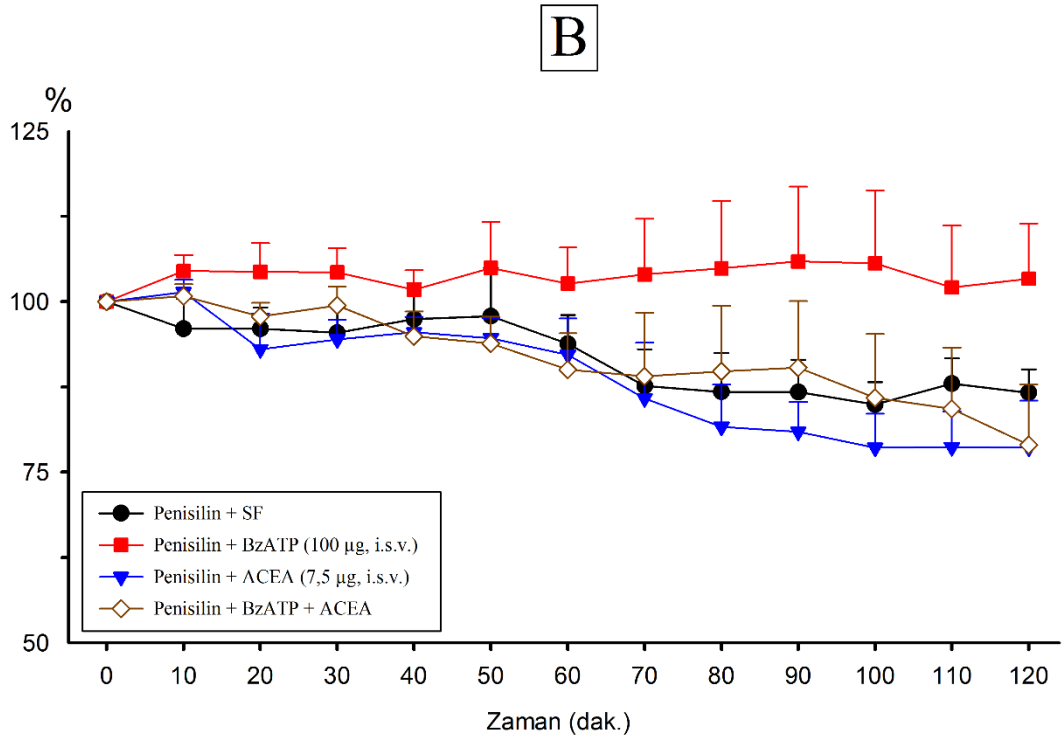
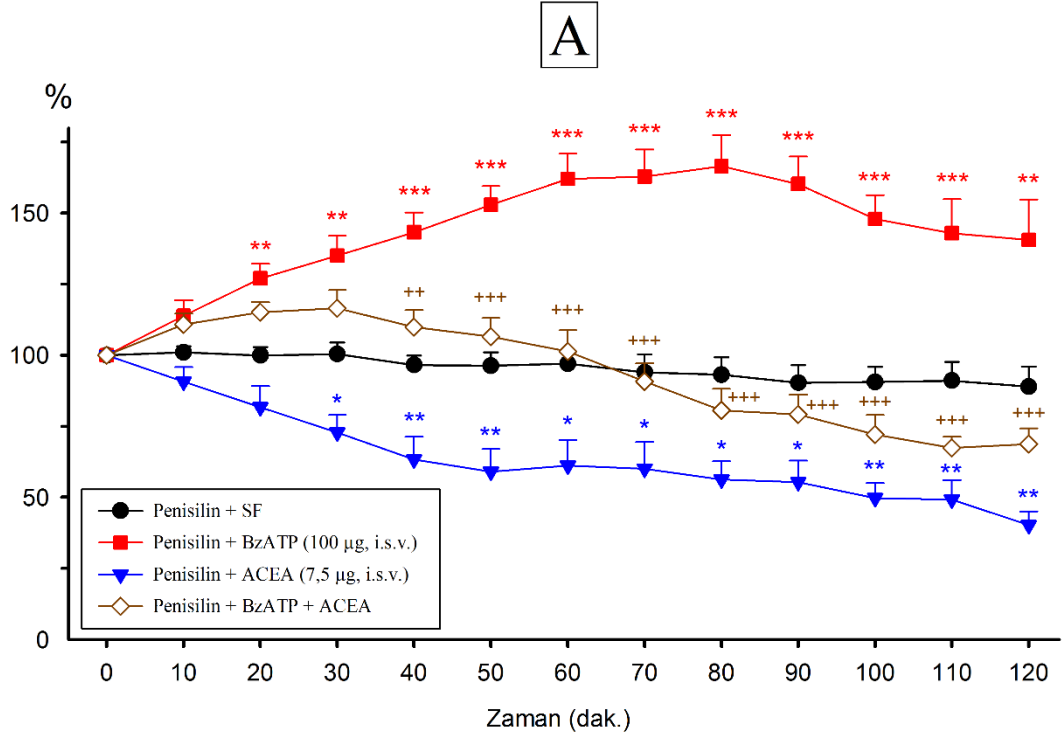
Tek başına uygulanan BzATP, penisilin+SF grubuna göre 20. dakikadan itibaren spike frekansında anlamlı bir artış oluşturdu (p<0,05). BzATP+ACEA kombinasyonu ise, spike frekansını penisilin+SF grubuna göre deney süresi boyunca değiştirmedir. BzATP ile birlikte ACEA uygulanması BzATP'nin epileptiform aktiviteyi artırıcı etkisini 40. dakikadan itibaren azalttı (p<0,05) (Şekil 4.6A). Spike amplitüdü açısından hiçbir grupta anlamlı bir değişim bulunmadı (Şekil 4.6B).

BzATP, ACEA ve BzATP+ACEA gruplarında 80. dakikada hesaplanan frekans ortalamaları sırasıyla 62,7±4,1; 23,3±3,5; 30,4±3,5 spike/dk ve amplitüd ortalamaları sırasıyla 997±112 µV; 844±69; 896±85 olarak hesaplandı (Şekil 4.5).

BzATP grubu penisilin+SF grubu ile karşılaştırıldığında, BzATP enjeksiyonu MDA ve GSH düzeylerini artırdı (p<0,05). BzATP'den sonra ACEA uygulanması AOPP, MDA, CAT ve GSH düzeylerine anlamlı bir düşüşe neden oldu (p<0,05) (Tablo 4.3).



Şekil 4.5. Penisilin+SF, BzATP (100 µg), ACEA (7,5 µg) ve BzATP (100 µg) + ACEA (7,5 µg) gruplarının 80. dakikasından kaydedilen örnek ECoG aktiviteleri.



Şekil 4.6. A) Penisilin+SF, BzATP (100 µg), ACEA (7,5 µg) ve BzATP (100 µg) + ACEA (7,5 µg) gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, B) Penisilin+SF, BzATP, ACEA ve BzATP+ACEA gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ penisilin+SF grubuyla karşılaştırıldığında, ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ penisilin+BzATP grubuyla karşılaştırıldığında.

	AOPP (nmol/mL .protein)	MDA (nmol/mL .protein)	SOD (ng/mL .protein)	CAT (ng/mL .protein)	GSH (ng/mL .protein)
Kontrol-1 (SF + SF)	4,26 ± 0,46	2,77 ± 0,35	7,76 ± 0,67	12,76 ± 0,81	76,07 ± 7,48
Pen + SF	7,98 ± 0,63 #	6,70 ± 0,93 #	6,68 ± 0,65	9,37 ± 1,01 #	71,37 ± 5,91
Pen + BzATP	9,96 ± 0,86	9,53 ± 0,59 *	9,37 ± 0,63	12,29 ± 1,33	93,07 ± 6,84 *
Pen + ACEA	4,96 ± 0,45 *	3,47 ± 0,43 *	4,71 ± 0,39 *	8,09 ± 0,68	40,55 ± 6,31 *
Pen + BzATP + ACEA	5,68 ± 0,67 +	6,51 ± 0,75 +	7,28 ± 0,80	8,27 ± 0,81 +	58,34 ± 5,97 +

Tablo 4.3. Kontrol-1, Penisilin+SF, BzATP (100 µg), ACEA (7,5 µg) ve BzATP (100 µg) + ACEA (7,5 µg) gruplarındaki sıçanların beyinlerinden ölçülen ileri düzey oksidasyon protein ürünleri. #p<0,05 kontrol-1 grubuyla karşılaştırıldığında, *p<0,05 penisilin+SF grubuyla karşılaştırıldığında, +p<0,05 penisilin+BzATP grubuyla karşılaştırıldığında.

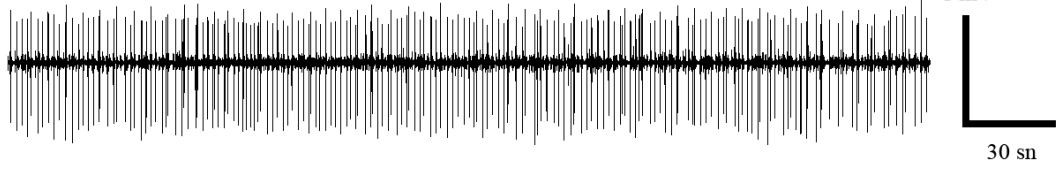
4.4. P2X7 reseptör agonisti BzATP ile kanabinoid CB1 reseptör antagonisti AM251 etkileşimi

BzATP+AM251 kombinasyonu ise, spike frekansını penisilin+SF grubuna 20. dakikadan itibaren artırdı (p<0,05). BzATP ile birlikte AM251 uygulanması BzATP grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 4.8A). Spike amplitüdü açısından hiçbir grupta anlamlı bir değişim bulunmadı (Şekil 4.8B).

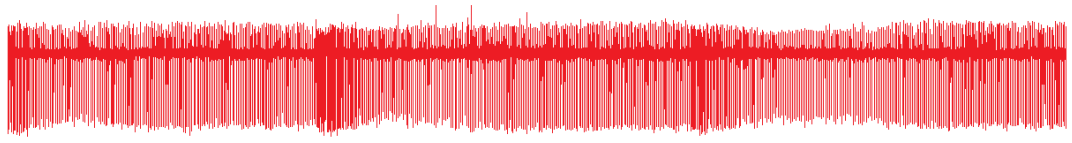
BzATP, AM251 ve BzATP+AM251 gruplarında 80. dakikada hesaplanan frekans ortalamaları sırasıyla 62,7±4,1; 70,6±5,5; 75,5±5,7 spike/dk ve amplitüd ortalamaları sırasıyla 997±112 µV; 1104±65; 1153±73 olarak hesaplandı (Şekil 4.7).

BzATP grubu penisilin+SF grubu ile karşılaştırıldığında, BzATP enjeksiyonu AOPP, MDA ve GSH düzeylerini artırdı (p<0,05). BzATP'den sonra AM251 uygulanması ise BzATP grubuna göre anlamlı değildi (Tablo 4.4).

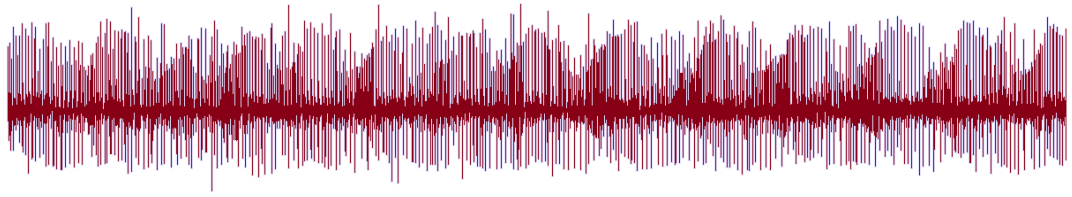
A) Penisilin + SF



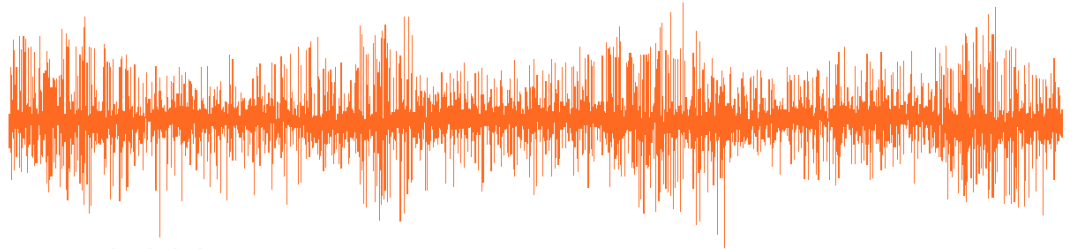
B) Penisilin + BzATP



C) Penisilin + AM251



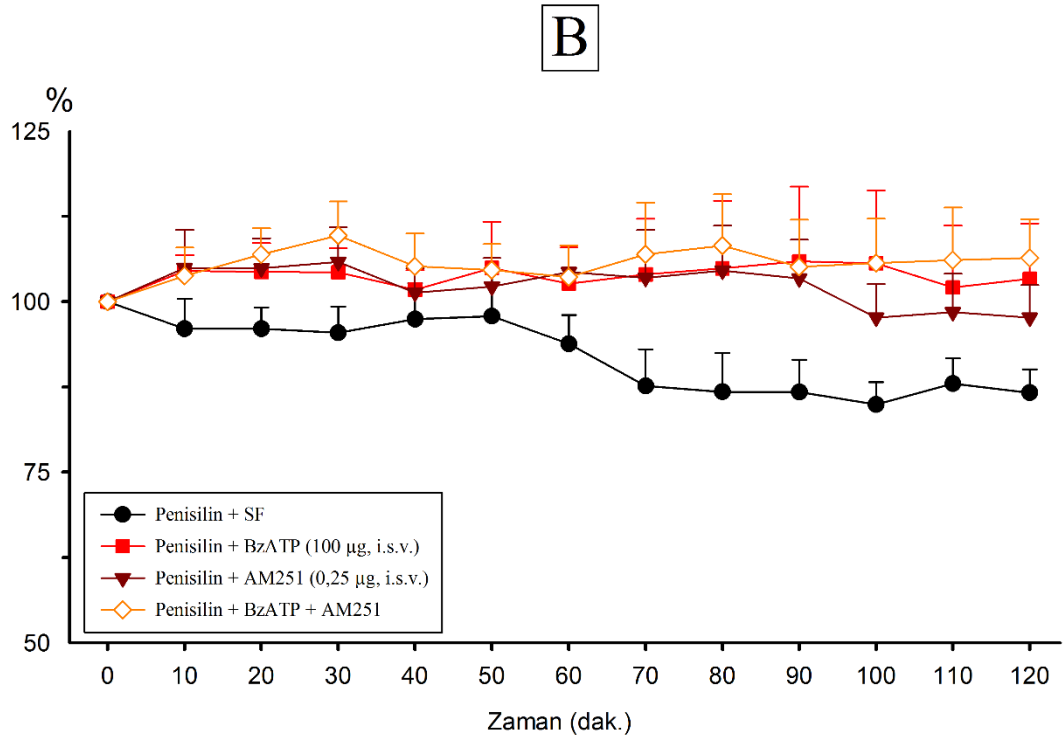
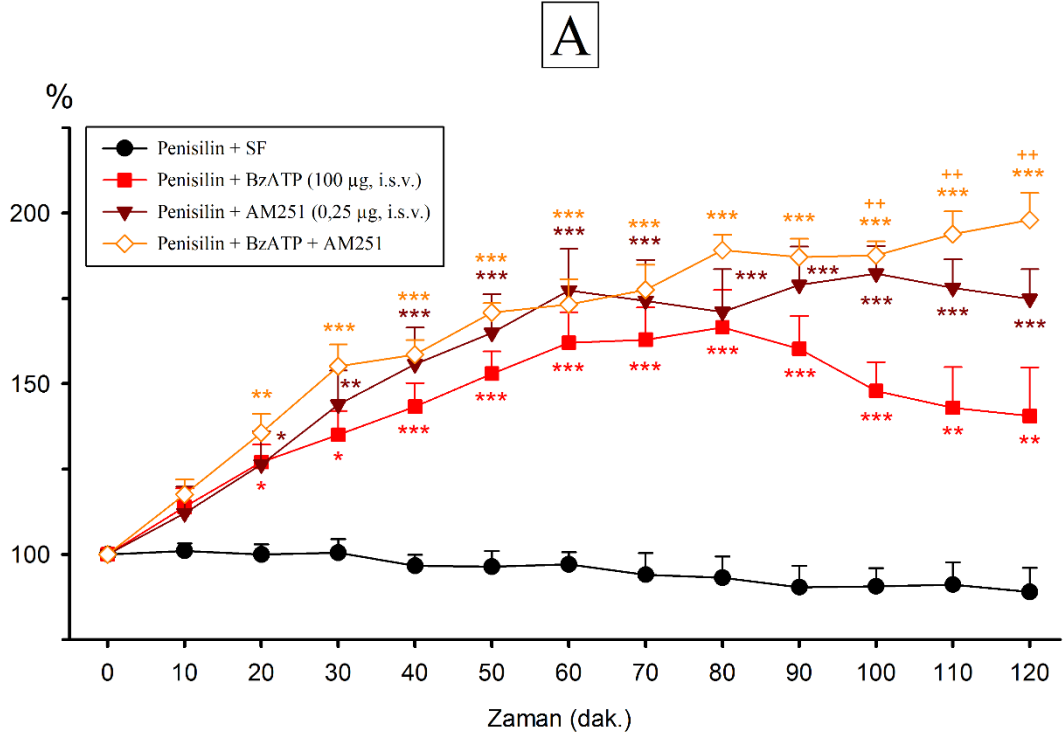
D) Penisilin + BzATP + AM251



E) Bazal Aktivite



Şekil 4.7. Penisilin+SF, BzATP (100 µg), AM251 (0,25 µg) ve BzATP (100 µg) + AM251 (0,25 µg) gruplarının 80. dakikasından kaydedilen örnek ECoG aktiviteleri



Şekil 4.8. A) Penisilin+SF, BzATP (100 µg), AM251 (0,25 µg) ve BzATP (100 µg) + AM251 (0,25 µg) gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, B) Penisilin+SF, BzATP, AM251 ve BzATP+AM251 gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ penisilin+SF grubuyla karşılaştırıldığında.

	AOPP (nmol/mL .protein)	MDA (nmol/mL .protein)	SOD (ng/mL .protein)	CAT (ng/mL .protein)	GSH (ng/mL .protein)
Kontrol-1 (SF + SF)	4,26 ± 0,46	2,77 ± 0,35	7,76 ± 0,67	12,76 ± 0,81	76,07 ± 7,48
Pen + SF	7,98 ± 0,63 #	6,70 ± 0,93 #	6,68 ± 0,65	9,37 ± 1,01 #	71,37 ± 5,91
Pen + BzATP	9,96 ± 0,86	9,53 ± 0,59 *	9,37 ± 0,63	12,29 ± 1,33	93,07 ± 6,84 *
Pen + AM251	11,80 ± 1,01 *	11,09 ± 0,78 *	9,19 ± 1,22	11,05 ± 1,39	82,79 ± 6,61
Pen + BzATP + AM251	13,12 ± 1,19 *	13,07 ± 0,96 *	10,74 ± 1,03	13,27 ± 1,50	88,73 ± 5,03 *

Tablo 4.4. Kontrol-1, Penisilin+SF, BzATP (100 µg), AM251 (0,25 µg) ve BzATP (100 µg) + AM251 (0,25 µg) gruplarındaki sıçanların beyinlerinden ölçülen ileri düzey oksidasyon protein ürünleri. #p<0,05 kontrol-1 grubuyla karşılaştırıldığında, *p<0,05 penisilin+SF grubuyla karşılaştırıldığında.

5. TARTIŞMA

Epilepsi tanısında en önemli tanı yöntemlerinden biri olan EEG, nöbet tipi hakkında bilgi sağlayabilir ve aynı zamanda epilepsi sendromlarının tanısında ve prognoz tayinine katkıda bulunur (Russo et al., 2016). EEG'nin direkt olarak korteksten kaydedilmesi işlemi olan elektrokortikografi (ECoG) ise, tıbbi olarak dirençli epilepsiden muzdarip hastalarda fokal epilepsi başlangıcının belirli uzaysal bölgelerini teşhis etmek için klinik olarak kullanılan bir kayıt yöntemidir (Englot and Chang, 2014). Diğer taraftan, hayvan çalışmalarında EEG yerine genellikle ECoG tercih edilmektedir. Bunun nedeni ise hayvanlarda EEG aktivitesi kaydının zor oluşudur. Epilepsinin elektrofizyolojik ve patolojik özelliklerini araştırmak ve daha etkili antiepileptik ajanlar geliştirmek amacıyla deneysel hayvan modelleri üzerinde çalışılmaktadır (Marangoz, 1997). Penisilin kaynaklı deneysel epilepsi modeli, insanda görülen parsiyel nöbetleri taklit etmektedir. Kortekse penisilin uygulanması GABA_A reseptörleri bloklayarak anormal diken dalga deşarjlarına neden olmaktadır. Bu deneysel model insanda gözlenen epileptik nöbetlerin bulgularıyla aynı olmamakla birlikte, temel mekanizma açısından benzerlikler taşımaktadır (Walden et al., 1992). Yaptığımız çalışmada, penisilin modeli deneysel epilepside P2X7 reseptörleri ile CB1 kanabinoid reseptörleri arasındaki etkileşimi inceledik.

Yapılan çalışmalar, hem nöronlarda hem de glialarda uzun süreli nöbetlerden (status epilepticus) sonra beyin hasarlı bölgelerinde P2X7 reseptörünün ekspresyonunun yükseldiğini göstermektedir (Engel et al., 2012). Diğer taraftan, P2X7 reseptöründen yoksun farelerin status epileptikusa karşı duyarlılığın değiştiğini ve P2X7 reseptörünü hedef alan ilaçların güçlü antikonvülzan etkileri olduğunu göstermektedir (Kim and Kang, 2011). P2X7R antagonisti A-438079 ve JNJ-47965567'nin sistemik enjeksiyonu, fare yavrularında hipoksik nöbetlerin EEG frekansını azaltmış ve ani yükselmenin yanı sıra nöbet sayılarında azalma göstermiştir (Rodriguez-Alvarez et al., 2017). Kim ve Kang (2011), P2X7R delesyonunun ve blokajının, farelerde glutamaterjik olmayan ve GABAerjik olmayan iletim yoluyla pilokarpin kaynaklı nöbet duyarlılığında bir artışa neden olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca, A-438079 uygulanması, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında epilepsili hastaların neokorteksinin sinir terminallerinde GABA ve glutamat alımını azaltarak P2X7R agonisti BzATP'nin prokonvülzan etkilerini inhibe etmektedir. Bununla birlikte, BzATP'nin epilepsili hastalarda neokorteksin izole sinir terminallerinde

glutamat alımını inhibe etmekten daha etkili bir şekilde GABA alımını inhibe ettiği gösterilmiştir (Barros-Barbosa et al., 2016). Aynı zamanda yaptığımız başka bir çalışmada, penisilin modeli deneysel epilepsi oluşturulan sıçanlarda P2X7 reseptör antagonisti A-438079, 20 ve 40 µg dozlarında, 60 dakika içinde penisilin kaynaklı epileptiform aktivitenin ortalama frekansını azalttı. Aynı çalışmada 100 ve 200 µg dozlarında uygulanan BzATP ise, 20 dakika içinde penisilin kaynaklı epileptiform aktivitenin ortalama frekansını artırdı (Arslan et al., 2019). Çalışmamızda kullandığımız 20 µg A-438079 epileptiform aktiviteyi yine 60. dakikadan itibaren baskıarken, BzATP 20. dakikadan itibaren epileptiform aktiviteyi artırdı. Bu bulgular, epileptik nöbetlerin tedavisinde P2X7 reseptör blokajının nöbetlerin baskılanmasında rol oynadığını göstermekte ve P2X7 reseptörünü bloklayan ilaçların insanlarda görülen epileptik nöbetlerin tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Esrarın tıbbi kullanımına ilişkin kayıtlar, milattan önce Çin, Mısır ve Yunanistan'da (Herodot) ve daha sonra Roma imparatorluğunda (Yaşlı Pliny, Dioscorides, Galen) ortaya çıkmıştır. Günümüze kadar 100'den fazla kannabinoid esrardan izole edilmiştir. Esrarın içerisinde bulunan iki önemli bileşik kannabidiol (CBD) ve THC'dir. 1940'ta esrardan ilk olarak CBD izole edildi ve yapısı 1963'te rapor edildi (Crocq, 2020). Bu tarihten sonra kanabinoid çalışmaları hız kazanmış ve endokanabinoid sistemin keşfiyle birlikte kanabinoidlerin birçok fizyolojik ve patolojik etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Rosenberg et al., 2017). Kanabinoidlerin nöbetlerin kontrolünde anti-konvülzan etkileri olduğu 1970'ler ve 1980'lerde yapılan ilk çalışmalarda ortaya konmuştur (Izquierdo et al., 1973; Chesher et al., 1975; Karler and Turkanis, 1980). Bu aşamadan sonra hayvanlar ile yapılan çalışmalar hız kazanmış ve sentetik kanabinoid agonist ve antagonistlerinin de keşfedilmesiyle birlikte kanabinoid sistemin epileptik nöbetler üzerine etkileri araştırılmıştır. Kanabinoidlerin, sinaptik terminallerden serebellumdaki Purkinje hücrelerine nörotransmitter salınımını ve hipokampustaki piramidal nöronlar üzerindeki inhibitör terminalleri azalttığı gösterilmiştir (Llano et al., 1991; Pitler and Alger, 1992). Maksimal elektroşok nöbet modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada CB1 reseptör potent agonisti arşidonil-2-kloroetilamid (ACEA) 5 ve 7,5 mg/kg dozlarında uygulanması nöbet eşiğini yükseltmiştir (Luszczki et al., 2006). Bunun yanında, laboratuvarımızda yapılan penisilin deneysel epilepsi modelinde, i.s.v. olarak enjekte edilen ACEA spike frekansını en fazla 7,5 µg dozunda azaltmış, yine i.s.v. olarak enjekte edilen AM251

en fazla 0,25 µg dozunda spike frekansını anlamlı ölçüde artırmıştır (Kozan et al., 2009). Bu çalışmayı referans alarak yaptığımız çalışmamızda bu dozlardaki ACEA (7,5 µg) ve AM251 (0,25 µg) dozlarını uyguladığımızda benzer sonuçlar elde edildi. Kozan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, ACEA 60. dakikadan itibaren spike frekansını anlamlı düzeyde azaltırken, sunulan çalışmada 30. dakikadan itibaren spike frekansını anlamlı bir biçimde azalttı. Yine Kozan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, AM251 30. dakikadan itibaren spike frekansını anlamlı düzeyde artırırken, sunulan çalışmada 20. dakikadan itibaren spike frekansını anlamlı bir biçimde artırdı. Bu farklılıkların nedeni, deneylerin farklı kişiler tarafından gerçekleştirilmesi, uygulanan deney tekniklerinde küçük değişiklikler olması ve/veya sıçan suşunun ve doğal olarak beyin dirençlerinin zaman içerisinde değişime uğraması olabilir. Zamansal açıdan fark olsa da sonuç olarak, CB1 reseptör agonisti ACEA penisilinle oluşturulan epileptiform aktiviteyi azaltırken, CB1 reseptör antagonisti AM251 epileptiform aktiviteyi artırdı.

Pürinerjik reseptörler ile kanabinoid CB1 reseptörlerinin etkileşimini gösteren çalışmalar son derece sınırlıdır. Witting ve arkadaşlarının mikroglial hücrelerde yaptıkları çalışmada, kalsiyuma yüksek oranda geçirgen olan P2X7 iyonotropik reseptörlerinin aktivasyonu ile birlikte, bir endojen kanabinoid olan 2-AG üretiminin arttığını göstermişlerdir (Witting et al., 2004). Bu sonuç, P2X7 reseptörlerinin aktivasyonunun kanabinoid reseptörlerinin de uyarılmasıyla sonuçlandığını düşündürmektedir. Diğer taraftan, perfüze sıçan mezenterik vasküler yatağında CB1 reseptör agonistleri anandamid ve WIN 55,212-2 sempatik nörotransmisyonun pürinerjik komponentini inhibe etmektedir (Pasdechote et al., 2007). Yine, monositler üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada, monositlerin tetrahidrokanabinol (THC) veya kannabidiol (CBD)'ye maruz kalmasının P2X7 reseptörünün immünolojik tepkisini azalttığını göstermiştir (Boks et al., 2020). Bu çalışmalardan hareketle, CB1 reseptörleri ile P2X7 reseptörleri arasında bir etkileşim olma ihtimali çok yüksektir. Yaptığımız çalışmada ilk planda, A-438079 ile meydana gelen antiepileptik aktiviteye ACEA'nın etkisini araştırdık. A-438079 ile birlikte ACEA uygulandığında sadece 40-60. dakikalar arasında A-438079'a göre anlamlı bir azalma vardı; ACEA grubuna göre ise, hiçbir dakikada anlamlı bir fark bulunmadı. Bu durum, A-438079 ve ACEA'nın birlikte daha fazla antiepileptik aktive oluşturmadığını ve ACEA'ya benzer etki gösteren kombinasyon grubunun daha fazla antiepileptik aktivite göstermediğini

kanıtlamaktadır. Diğer taraftan, A-438079 ile birlikte AM251 uygulandığında AM251'in proepileptik etkisi 80. dakikadan itibaren A-438079 tarafından bloklanarak kontrol grubuna yaklaştı. Aynı zamanda, BzATP ile birlikte ACEA uygulanmasıyla birlikte ACEA, BzATP'nin prokonvulzan aktivitesini baskılayarak kontrol grubuna yaklaştırdı. Ek olarak, BzATP+AM251 kombinasyonu 100 dakika boyunca ne BzATP grubuna ne de AM251 grubuna göre anlamlı bir fark oluşmadı. Sadece deneyin son 20 dakikasında kombinasyon grubu BzATP grubuna göre daha yüksek bir epileptik aktiviteye sahipti. Bunun muhtemel nedeninin BzATP'nin yarı ömrünün kısa olması nedeniyle etkisinin 100. dakikadan itibaren azalması olduğunu düşünmekteyiz. Diğer taraftan, retina kültürlerinde WIN 55,212-2 aracılı floresan boya alımının P2X7R antagonisti A-438079 tarafından tamamen bloke edildiğini ve kanabinoid aracılı boya alımının P2X7R aktivasyonunu içerdiğini önermektedir (Freitas et al., 2019). Bu bulgu ise, çalışmamızın verilerine zıt bir bulgu içermektedir. Çalışmamız verileri, kanabinoid reseptör aktivasyonunun P2X7 reseptörlerini muhtemelen hücre içi yolaklar aracılığıyla blokladığını göstermektedir.

Hem CB1 reseptörleri hem de P2X7 reseptörleri çoğunlukla presinaptik yerleşimli olup, sıklıkla kalsiyum iyonu üzerinden etkilerini ortaya koymaktadırlar (Ferreira et al., 2012; Deuchars et al., 2001). P2X7 reseptörü bir iyon kanalı olduğundan kalsiyumu direkt olarak hücre içerisine alırken (Witting et al., 2004), G proteinine kenetli olan CB1 reseptörü aktivasyonu halinde N ve P/Q tipi kalsiyum kanallarını inhibe ederek hücre içi kalsiyum miktarı azaltmaktadır (Twitchell et al., 1997; Wilson et al., 2001). Kalsiyum hücre içerisinde birçok yolak üzerinden etkilerini gerçekleştiren bir iyondur. En önemli özelliklerinden biri ise nörotransmitter salınımına etki etmesidir (Schlicker and Kathmann, 2001). Kalsiyum doğrudan veya dolaylı olarak (kalmodulin [CaM], CaM bağlayıcı proteinler, protein kinaz C [PKC] veya Gβγ alt birimleri yoluyla) cAMP sentezini de düzenleyebilir (Halls and Cooper, 2011). Kristhal ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada, adenilil siklaz aktivitesindeki değişiklikler yüksek seviyede hücre içi cAMP tarafından tamponlandığında CB1 reseptörlerinin özellikle P2X reseptörleri aktivitesini inhibe etmede etkili olduğunu bulmuşlardır. Bu, cAMP'nin, CB1 ve P2X reseptörleri arasında, hala belirtilmemiş bir mekanizmanın aracılık ettiği operasyonel bağlantıyı desteklediğini göstermektedir. Ayrıca, P2X reseptörünün hücre içi karboksil terminali, cAMP'ye bağımlı protein kinaz ve protein kinaz C için birkaç fosforilasyon

bölgesi içerir, bu da P2X purinoseptörünün fonksiyonunun protein fosforilasyonu ile düzenlenebileceğini düşündürmektedir (Krishtal et al., 2006). Bu bulgular ışığında, P2X reseptörlerinin alt tipi olan P2X7 reseptörlerinin CB1 reseptörlerinin aktivasyonu ile birlikte bloklanabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır. CB1 reseptör agonisti ACEA'nın P2X7 reseptör agonisti BzATP'nin proepileptik aktivitesini engellemesi ve yine CB1 reseptör agonisti ACEA ile birlikte uygulanan P2X7 reseptör antagonisti A438079'in ACEA'nın etkisine benzer bir aktivite ortaya koyması, CB1 reseptörlerinin hücre içi sinyalizasyon aracılığıyla P2X7 reseptörlerinin aktivasyonunu etkilediğini kanıtlar niteliktedir.

Diğer taraftan, oksidatif sistem elemanlarından elde edilen bulgular da elektrofizyolojik sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Aşırı serbest radikal salınımından kaynaklanan oksidatif stresin epilepsinin başlaması ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle epilepsi tedavisinde oksidatif stresi azaltmaya yönelik antioksidan tedaviler büyük ilgi görmüştür. Bununla birlikte, birçok kanıt, oksidatif stresin tüm nöbet modellerinde her zaman aynı ideal duruma sahip olmadığını göstermektedir (Shin et al., 2011). Çalışmamızda, P2X7 reseptörlerinin aktivasyonu AOPP ve MDA düzeylerini artırırken, inhibisyonu pen+SF grubuna göre AOPP ve MDA düzeylerini azaltmıştır. Kombinasyon gruplarında ise P2X7 reseptör agonist ve antagonistlerine, CB1 reseptör agonist ve antagonistlerine benzer düzeyde AOPP ve MDA düzeyleri tespit edilmiştir. Buradan hareketle, P2X7 reseptörlerinin ve CB1 reseptörlerinin aynı mekanizma üzerinden protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu üzerine etki ettikleri düşünülmektedir. Yapılan epilepsi çalışmaları çelişkili sonuçlar içerse de, çoğunlukla epileptik nöbet esnasında katalaz seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir (Menon et al., 2014). P2X7 reseptörlerini aktivasyonu antioksidan enzimleri azaltırken, P2X7 reseptörlerinin blokajı bu enzimlerin düzeyine etki etmemektedir. Kombinasyon grupları ise P2X7 ve CB1 reseptörlerinin etkisiyle benzer etkilere sahiptir. Bu bulgular, P2X7 reseptörlerinin ve CB1 reseptörlerinin antioksidan enzim sistemi açısından da benzer etkilere sahip olduklarını göstermektedir.

Bu çalışmanın sınırlılıkları; 1) Etkisiz dozlarda P2X7 reseptör agonist ve antagonistleri ile etkisiz dozlarda CB1 reseptör agonist ve antagonistlerinin kullanılması iki reseptör arasındaki olası etkileşimin değerlendirilmesine katkı sağlayabilirdi. 2) Laboratuvarımızda bulunmayan bir metod olan kalsiyum görüntüleme tekniklerinin

uygulanması bu iki reseptör arasındaki etkileşimin kalsiyum üzerinden olup olmadığını gösterebilirdi. 3) CB1 reseptörlerinin uyarılmasıyla meydana gelebilecek olası P2X7 reseptör ekspresyon değişimleri bulunduğu kanabinoid reseptörlerinin aktivasyonunun P2X7 reseptörlerini bloklayıp bloklamadığı Western blot gibi bir metod kullanılarak değerlendirilebilir ve bu sonuç etkileşimin varlığını güçlendirebilirdi.

Yaptığımız çalışmada, P2X7 reseptörleri ile CB1 reseptörleri arasında bir etkileşim olduğunu düşünmekteyiz. Bu etkileşim hücre içi sinyal yollarından veya bu reseptörlerden hücreye gerçekleşen iyon akımlarının farklı tipte kanalları uyarması nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Zayıf bir olasılık olarak, bu reseptörler arasında direkt bir etkileşim de olabilir. Bu bulgularımızı desteklemek için sınırlılıklarda da belirtildiği gibi ileri düzey moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda, P2X7 reseptörleri ile CB1 reseptörlerinin etkileşimi hem elektrofizyolojik hem de biyokimyasal analizler ile gösterilmiştir.

- ✓ İntraserebroventriküler olarak uygulanan P2X7 reseptör antagonisti A-438079 spike frekansını azaltırken, P2X7 reseptör agonisti BzATP spike frekansını artırmıştır.
- ✓ İntraserebroventriküler olarak uygulanan CB1 reseptör agonisti ACEA spike frekansını azaltırken, CB1 reseptör antagonisti AM251 spike frekansını artırmıştır.
- ✓ A-438079+ACEA kombinasyonu ACEA grubuna göre anlamlı değildi.
- ✓ A-438079+AM251 birlikte uygulandığında AM251, A-438079'un antikonvulzan etkisini blokladı.
- ✓ BzATP+ACEA uygulandığında, BzATP'nin prokonvulzan etkisi ACEA tarafından bloklandı.
- ✓ BzATP+AM251 (iki prokonvulzan ajan) birlikte uygulandığında ise kombinasyon grubu BzATP'ye göre sadece 110 ve 120. dakikalarda spike frekansını artırırken, AM251 grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadı.
- ✓ A-438079+ACEA kombinasyonu AOPP, MDA, SOD, CAT ve GSH seviyelerini penisilin+SF grubuna göre azalttı. Kombinasyon grubu ne A438079 ne de ACEA grubuna göre anlamlı bir değişim göstermedi.
- ✓ Diğer taraftan, BzATP+AM251 kombinasyonu AOPP, MDA ve GSH düzeylerini penisilin+SF grubuna göre artırırken ne BzATP ne de AM251 grubuna göre anlamlı bir fark bulunmadı.

KAYNAKLAR

- Adams, R., Chen, K. H., & Loewe, S. (1945). Tetrahydrocannabinol Homologs with a s-Alkyl Group in the 3-Position. XVII. *Journal of the American Chemical Society*, 67(9), 1534-1537.
- Alipour, A., Patel, P. B., Shabbir, Z., & Gabrielson, S. (2019). Review of the many faces of synthetic cannabinoid toxicities. *Mental Health Clinician*, 9(2), 93-99.
- Andres-Mach, M., Zolkowska, D., Barcicka-Klosowska, B., Haratym-Maj, A., Florek-Luszczki, M., & Luszczki, J. J. (2012). Effect of ACEA—a selective cannabinoid CB1 receptor agonist on the protective action of different antiepileptic drugs in the mouse pentylenetetrazole-induced seizure model. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 301-309.
- Antoniadis, A., Müller, W. E., & Wollert, U. (1980). Inhibition of GABA and benzodiazepine receptor binding by penicillins. *Neuroscience letters*, 18(3), 309–312.
- Arbeloa, J., Pérez-Samartín, A., Gottlieb, M., & Matute, C. (2012). P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiology of disease*, 45(3), 954–961.
- Arbeloa, J., Pérez-Samartín, A., Gottlieb, M., & Matute, C. (2012). P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiology of disease*, 45(3), 954–961.
- Armstrong, J. N., Brust, T. B., Lewis, R. G., & MacVicar, B. A. (2002). Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber–CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neuroscience*, 22(14), 5938-5945.
- Arslan, G., Ayyildiz, M., & Agar, E. (2014). The interaction between ghrelin and cannabinoid systems in penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Neuropeptides*, 48(6), 345–352.
- Arslan, G., Avci, B., Kocacan, S. E., Rzayev, E., Ayyildiz, M., & Agar, E. (2019). The interaction between P2X7Rs and T-type calcium ion channels in penicillin-induced epileptiform activity. *Neuropharmacology*, 149, 1–12.
- Ballerini, P., Rathbone, M. P., Di Iorio, P., Renzetti, A., Giuliani, P., D'Alimonte, I., Trubiani, O., Caciagli, F., & Ciccarelli, R. (1996). Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport*, 7(15-17), 2533–2537.
- Ballerini, P., Rathbone, M. P., Di Iorio, P., Renzetti, A., Giuliani, P., D'Alimonte, I., Trubiani, O., Caciagli, F., & Ciccarelli, R. (1996). Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport*, 7(15-17), 2533–2537.
- Bambal, G., Çakıl, D., & Ekici, F. (2011). Deneysel epilepsi modelleri. *J Clin Exp Invest*, 2(1), 118-123.
- Barros-Barbosa, A. R., Fonseca, A. L., Guerra-Gomes, S., Ferreirinha, F., Santos, A., Rangel, R., Lobo, M. G., Correia-de-Sá, P., & Cordeiro, J. M. (2016). Up-regulation of P2X7 receptor-mediated inhibition of GABA uptake by nerve terminals of the human epileptic neocortex. *Epilepsia*, 57(1), 99–110.
- Bátkai, S., Pacher, P., Osei-Hyiaman, D., Radaeva, S., Liu, J., Harvey-White, J., Offertáler, L., Mackie, K., Rudd, M. A., Bukoski, R. D., & Kunos, G. (2004). Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation*, 110(14), 1996–2002.
- Beit-Yannai, E., Kohen, R., Horowitz, M., Trembovler, V., & Shohami, E. (1997). Changes of biological reducing activity in rat brain following closed head injury: a cyclic

- voltammetry study in normal and heat-acclimated rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 17(3), 273-279.
- Berger, H. (1929). Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv f. Psychiatrie* 87, 527–570.
- 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.
- Blair, R. E., Deshpande, L. S., Sombati, S., Falenski, K. W., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2006). Activation of the cannabinoid type-1 receptor mediates the anticonvulsant properties of cannabinoids in the hippocampal neuronal culture models of acquired epilepsy and status epilepticus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 317(3), 1072–1078.
- Boks, M. P., He, Y., Schubart, C. D., Gastel, W. V., Elkrief, L., Huguet, G., Eijk, K. V., Vinkers, C. H., Kahn, R. S., Paus, T., Conrod, P., Hol, E. M., & de Witte, L. D. (2020). Cannabinoids and psychotic symptoms: A potential role for a genetic variant in the P2X purinoceptor 7 (P2RX7) gene. *Brain, behavior, and immunity*, 88, 573–581.
- Brown, G. C., & Borutaite, V. (2001). Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB life*, 52(3-5), 189-195.
- Bruton, C. J. (1988). The neuropathology of temporal lobe epilepsy. *Maudsley monographs*, 31.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological reviews*, 24(3), 509–581.
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and neuroscience advances*, 2, 2398212818817494.
- Caton, R. (1875). Electrical currents of the brain. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 2(4), 610.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
- Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W. L., Grahames, C., Casula, M. A., Yiangou, Y., Birch, R., Anand, P., & Buell, G. N. (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 114(3), 386–396.
- Chesher, G. B., Jackson, D. M., & Malor, R. M. (1975). Interaction of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol with phenobarbitone in protecting mice from electrically induced convulsions. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 27(8), 608–609.
- Contreras, D. (2000). Modelos experimentales en epilepsia [Experimental models in epilepsy]. *Revista de neurologia*, 30(4), 370–376.
- Crocq M. A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system . *Dialogues in clinical neuroscience*, 22(3), 223–228.
- D Skaper, S. (2011). Ion channels on microglia: therapeutic targets for neuroprotection. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 10(1), 44-56.
- de Curtis, M., & Avanzini, G. (2001). Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Progress in neurobiology*, 63(5), 541–567.
- de Curtis, M., Jefferys, J. G., & Avoli, M. (2012). Interictal epileptiform discharges in partial epilepsy. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition.*

- Deshpande, L. S., Sombati, S., Blair, R. E., Carter, D. S., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2007). Cannabinoid CB1 receptor antagonists cause status epilepticus-like activity in the hippocampal neuronal culture model of acquired epilepsy. *Neuroscience letters*, *411*(1), 11–16.
- Deuchars, S. A., Atkinson, L., Brooke, R. E., Musa, H., Milligan, C. J., Batten, T. F., Buckley, N. J., Parson, S. H., & Deuchars, J. (2001). Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *21*(18), 7143–7152.
- Devane, W. A., Dysarz, F. 3., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*, *34*(5), 605-613.
- Devane, W. A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., ... & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, *258*(5090), 1946-1949.
- Dewey, W. L. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological reviews*, *38*(2), 151-178.
- Díaz-Hernandez, J. I., Gomez-Villafuertes, R., León-Otegui, M., Hontecillas-Prieto, L., Del Puerto, A., Trejo, J. L., Lucas, J. J., Garrido, J. J., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T., & Diaz-Hernandez, M. (2012). In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiology of aging*, *33*(8), 1816–1828.
- Díaz-Hernandez, M., del Puerto, A., Díaz-Hernandez, J. I., Díez-Zaera, M., Lucas, J. J., Garrido, J. J., & Miras-Portugal, M. T. (2008). Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *Journal of cell science*, *121*(Pt 22), 3717–3728.
- Díaz-Hernández, M., Díez-Zaera, M., Sánchez-Nogueiro, J., Gómez-Villafuertes, R., Canals, J. M., Alberch, J., Miras-Portugal, M. T., & Lucas, J. J. (2009). Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(6), 1893–1906
- Drury, A. N., & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology*, *68*(3), 213–237.
- ElSohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life sciences*, *78*(5), 539-548.
- Engel J, Plum F, Gilman S, Martin JB. (1989). Causes of human epilepsy. Seizures and Epilepsy. 112-134.
- Engel, J. J., Schwartzkroin, P. A. (2006) What Should Be Modeled? In: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL, (eds): Models of Seizures and Epilepsy. San Diego, Elsevier Academic Press, 1-14.
- Engel, T., Gomez-Villafuertes, R., Tanaka, K., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Garcia-Huerta, P., Miras-Portugal, M. T., Henshall, D. C., & Diaz-Hernandez, M. (2012). Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(4), 1616–1628
- Engel, T., Jimenez-Pacheco, A., Miras-Portugal, M. T., Diaz-Hernandez, M., & Henshall, D. C. (2012). P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, *4*(4), 174–187.

- Englot, D. J., & Chang, E. F. (2014). Rates and predictors of seizure freedom in resective epilepsy surgery: an update. *Neurosurgical review*, 37(3), 389–405.
- Estévez, A. G., Crow, J. P., Sampson, J. B., Reiter, C., Zhuang, Y., Richardson, G. J., ... & Beckman, J. S. (1999). Induction of Nitric Oxide--Dependent Apoptosis in Motor Neurons by Zinc-Deficient Superoxide Dismutase. *Science*, 286(5449), 2498-2500.
- Ettinger, A. B. (1994). Structural causes of epilepsy: tumors, cysts, stroke, and vascular malformations. *Neurologic clinics*, 12(1), 41-56.
- Ferreira, S. G., Teixeira, F. M., Garção, P., Agostinho, P., Ledent, C., Cortes, L., Mackie, K., & Köfalvi, A. (2012). Presynaptic CB(1) cannabinoid receptors control frontocortical serotonin and glutamate release--species differences. *Neurochemistry international*, 61(2), 219–226.
- Ferrari, D., Los, M., Bauer, M. K., Vandenabeele, P., Wesselborg, S., & Schulze-Osthoff, K. (1999). P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS letters*, 447(1), 71-75.
- Ferrari, D., Villalba, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ricciardi-Castagnoli, P., & Di Virgilio, F. (1996). Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(4), 1531–1539.
- Ferri, R., Cosentino, F. I., Elia, M., Musumeci, S. A., Marinig, R., & Bergonzi, P. (2001). Relationship between Delta, Sigma, Beta, and Gamma EEG bands at REM sleep onset and REM sleep end. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 112(11), 2046–2052.
- Fisher R. S. (1989). Animal models of the epilepsies. *Brain research. Brain research reviews*, 14(3), 245–278.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr, Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482
- Fisher, R. S., Cross, J. H., D'Souza, C., French, J. A., Haut, S. R., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., Schulze-Bonhage, A., Somerville, E., Sperling, M., Yacubian, E. M., & Zuberi, S. M. (2017). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, 58(4), 531–542.
- Florek-Luszczki, M., Wlaz, A., Kondrat-Wrobel, M. W., Tutka, P., & Luszczki, J. J. (2014). Effects of WIN 55,212-2 (a non-selective cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonist) on the protective action of various classical antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model. *Journal of Neural Transmission*, 121(7), 707-715.
- Freitas, H. R., Isaac, A. R., Silva, T. M., Diniz, G., Dos Santos Dabdab, Y., Bockmann, E. C., Guimarães, M., da Costa Calaza, K., de Mello, F. G., Ventura, A., de Melo Reis, R. A., & França, G. R. (2019). Cannabinoids Induce Cell Death and Promote P2X7 Receptor Signaling in Retinal Glial Progenitors in Culture. *Molecular neurobiology*, 56(9), 6472–6486.
- Freund, S. A., & Banning, A. S. (2017). Synthetic cannabinoids: A review of the clinical implications of a new drug of choice. *Journal of the American Academy of PAs*, 30(11), 1-4.
- Galanopoulou, A. S., & Moshé, S. L. (2009). The epileptic hypothesis: developmentally related arguments based on animal models. *Epilepsia*, 50 Suppl 7(Suppl 7), 37–42.

- Gebremedhin, D., Lange, A. R., Campbell, W. B., Hillard, C. J., & Harder, D. R. (1999). Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *The American journal of physiology*, 276(6), H2085–H2093.
- Grosso, S., Longini, M., Rodriguez, A., Proietti, F., Piccini, B., Balestri, P., & Buonocore, G. (2011). Oxidative stress in children affected by epileptic encephalopathies. *Journal of the neurological sciences*, 300(1-2), 103-106.
- Guindon, J., & Beaulieu, P. (2006). Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 50(7), 814-823.
- Guindon, J., De Léan, A., & Beaulieu, P. (2006). Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain*, 121(1-2), 85-93.
- Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., & Freund, T. F. (2002). The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *The European journal of neuroscience*, 16(7), 1395–1398.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.
- Halls, M. L., & Cooper, D. M. (2011). Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004143.
- Henshall, D. C., Diaz-Hernandez, M., Miras-Portugal, M. T., & Engel, T. (2013). P2X receptors as targets for the treatment of status epilepticus. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 237.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5), 1932–1936.
- Hervás, C., Pérez-Sen, R., & Miras-Portugal, M. T. (2005). Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochemical pharmacology*, 70(5), 770–785.
- Heymann, D. L., Chen, L., Takemi, K., Fidler, D. P., Tappero, J. W., Thomas, M. J., ... & Rannan-Eliya, R. P. (2015). Global health security: the wider lessons from the west African Ebola virus disease epidemic. *The Lancet*, 385(9980), 1884-1901.
- Hohmann, A. G., & Herkenham, M. (1999). Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*, 92(4), 1171-1175.
- Hohmann, A. G., Tsou, K., & Walker, J. M. (1998). Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55, 212-2. *Neuroscience letters*, 257(3), 119-122.
- Hollister L. E. (1986). Health aspects of cannabis. *Pharmacological reviews*, 38(1), 1–20.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, 54(2), 161–202.
- Izquierdo, I., Orsingher, O. A., & Berardi, A. C. (1973). Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. *Psychopharmacologia*, 28(1), 95–102.
- Izzo, A. A., Mascolo, N., & Capasso, F. (2001). The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Current opinion in pharmacology*, 1(6), 597-603.

- Jamwal, S., Mittal, A., Kumar, P., Alhayani, D. M., & Al-Aboudi, A. (2019). Therapeutic Potential of Agonists and Antagonists of A1, A2a, A2b and A3 Adenosine Receptors. *Current pharmaceutical design*, 25(26), 2892–2905.
- Jimenez-Mateos, E. M., Arribas-Blazquez, M., Sanz-Rodriguez, A., Concannon, C., Olivos-Ore, L. A., Reschke, C. R., ... & Engel, T. (2015). microRNA targeting of the P2X7 purinoceptor opposes a contralateral epileptogenic focus in the hippocampus. *Scientific reports*, 5(1), 1-17.
- Jimenez-Pacheco, A., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Tanaka, K., Mooney, C., Conroy, R., Miras-Portugal, M. T., Diaz-Hernandez, M., Henshall, D. C., & Engel, T. (2013). Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079. *Epilepsia*, 54(9), 1551–1561.
- Johnson, M. R., Rice, K. C., Howlett, A., Melvin, L. S., & Herkenham, M. (1992). The cannabinoid receptor-pharmacologic identification, anatomical localization and cloning. *NIDA Res Monogr*, 119, 86-90.
- Karler, R., & Turkanis, S. A. (1980). Subacute cannabinoid treatment: anticonvulsant activity and withdrawal excitability in mice. *British journal of pharmacology*, 68(3), 479–484.
- Kim, J. E., & Kang, T. C. (2011). The P2X7 receptor-pannexin-1 complex decreases muscarinic acetylcholine receptor-mediated seizure susceptibility in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(5), 2037–2047.
- Kim, J. E., Ryu, H. J., Yeo, S. I., & Kang, T. C. (2011). P2X7 receptor differentially modulates astroglial apoptosis and caspase-3 activation in the rat brain following status epilepticus. *Hippocampus*, 21(12), 1318-1333.
- Kimble, D. E., Shields, J., Yanasak, N., Vender, J. R., & Dhandapani, K. M. (2012). Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice. *PloS one*, 7(7), e41229.
- Kong, T. Y., Kim, J. H., Kim, D. K., & Lee, H. S. (2018). Synthetic cannabinoids are substrates and inhibitors of multiple drug-metabolizing enzymes. *Archives of pharmacal research*, 41(7), 691-710.
- Kontos, H. A. (1989). Oxygen radicals in CNS damage. *Chemico-biological interactions*, 72(3), 229-255.
- Korkmaz, G. G., Altınoglu, E., Civelek, S., Sozer, V., Erdenen, F., Tabak, O., & Uzun, H. (2013). The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metabolism*, 62(6), 828-835.
- Kozan, R., Ayyildiz, M., Yildirim, M., & Agar, E. (2006). The effects of ethanol intake and withdrawal on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain research bulletin*, 71(1-3), 111–115.
- Kozan, R., Ayyildiz, M., Yildirim, M., & Agar, E. (2007). The influence of ethanol intake and its withdrawal on the anticonvulsant effect of alpha-tocopherol in the penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Neurotoxicology*, 28(3), 463–470.
- Kozan, R., Ayyildiz, M., & Agar, E. (2009). The effects of intracerebroventricular AM-251, a CB1-receptor antagonist, and ACEA, a CB1-receptor agonist, on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsia*, 50(7), 1760–1767.
- Krishtal, O., Lozovaya, N., Fedorenko, A., Savelyev, I., & Chizhnikov, I. (2006). The agonists for nociceptors are ubiquitous, but the modulators are specific: P2X receptors in the sensory neurons are modulated by cannabinoids. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 453(3), 353–360.

- Kyrou, I., Valsamakis, G., & Tsigos, C. (2006). The endocannabinoid system as a target for the treatment of visceral obesity and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1083(1), 270-305.
- Li, H. L. (1974). An archaeological and historical account of cannabis in China. *Economic Botany*, 28(4), 437-448.
- Li, J., Daughters, R. S., Bullis, C., Bengiamin, R., Stucky, M. W., Brennan, J., & Simone, D. A. (1999). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain*, 81(1-2), 25-33.
- Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*. 318(3): 1375-1387.
- Llano, I., Marty, A., Armstrong, C. M., & Konnerth, A. (1991). Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *The Journal of physiology*, 434, 183-213.
- Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R. E., & Schmidt, D. (2013). New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(10), 757-776.
- Luszczki, J. J., Czuczwar, P., Cioczek-Czuczwar, A., & Czuczwar, S. J. (2006). Arachidonyl-2'-chloroethylamide, a highly selective cannabinoid CB1 receptor agonist, enhances the anticonvulsant action of valproate in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *European journal of pharmacology*, 547(1-3), 65-74.
- Malmivuo, J., & Plonsey, R. (1995). *Bioelectromagnetism: principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields*. Oxford University Press, USA.
- Manna, S. S., & Umathe, S. N. (2012). Involvement of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the pro-convulsant effect of anandamide in pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy research*, 100(1-2), 113-124.
- Marangoz, C. (1997). Deneysel epilepsi modelleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 14(3), 147-186.
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1965). A total synthesis of dl- Δ^1 -tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish1. *Journal of the American Chemical Society*, 87(14), 3273-3275.
- Melani, A., Amadio, S., Gianfriddo, M., Vannucchi, M. G., Volontè, C., Bernardi, G., Pedata, F., & Sancesario, G. (2006). P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(7), 974-982.
- Meldrum, B. S. (2002). Concept of activity-induced cell death in epilepsy: historical and contemporary perspectives. *Progress in brain research*, 135, 3-11.
- Menon, B., Ramalingam, K., & Kumar, R. V. (2014). Low plasma antioxidant status in patients with epilepsy and the role of antiepileptic drugs on oxidative stress. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 17(4), 398.
- Miao, L., & Clair, D. K. S. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 344-356.
- Migliore, L., Fontana, I., Colognato, R., Coppede, F., Siciliano, G., & Murri, L. (2005). Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging*, 26(5), 587-595.

- Mikuriya, T. H. (1969). Marijuana in medicine: past, present and future. *California medicine*, 110(1), 34.
- Miras-Portugal, M. T., Díaz-Hernández, M., Giráldez, L., Hervás, C., Gómez-Villafuertes, R., Sen, R. P., Gualix, J., & Pintor, J. (2003). P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochemical research*, 28(10), 1597–1605.
- Nakatsuka, T., Chen, H. X., Roper, S. N., & Gu, J. G. (2003). Cannabinoid receptor-1 activation suppresses inhibitory synaptic activity in human dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 45(1), 116–121.
- Niizuma, K., Endo, H., & Chan, P. H. (2009). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *Journal of neurochemistry*, 109, 133-138.
- Pakdeechote, P., Dunn, W. R., & Ralevic, V. (2007). Cannabinoids inhibit noradrenergic and purinergic sympathetic cotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed. *British journal of pharmacology*, 152(5), 725–733.
- Papp, L., Balázs, T., Köfalvi, A., Erdélyi, F., Szabó, G., Vizi, E. S., & Sperlágh, B. (2004). P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310(3), 973–980
- Peng, W., Cotrina, M. L., Han, X., Yu, H., Bekar, L., Blum, L., Takano, T., Tian, G. F., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(30), 12489–12493.
- Perry, G., Cash, A. D., & Smith, M. A. (2002). Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2(3), 120–123.
- Peternel, S., Pilipović, K., & Župan, G. (2009). Seizure susceptibility and the brain regional sensitivity to oxidative stress in male and female rats in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(3), 456-462.
- Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*, 10(2), 173-186.
- Pitler, T. A., & Alger, B. E. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(10), 4122–4132.
- Plummer, G. S., Ibala, R., Hahm, E., An, J., Gitlin, J., Deng, H., Shelton, K. T., Solt, K., Qu, J. Z., & Akeju, O. (2019). Electroencephalogram dynamics during general anesthesia predict the later incidence and duration of burst-suppression during cardiopulmonary bypass. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 130(1), 55–60.
- Ramer, R., Merkord, J., Rohde, H., & Hinz, B. (2010). Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochemical pharmacology*, 79(7), 955–966.
- Rees, M. I. (2010). The genetics of epilepsy-the past, the present and future. *Seizure*, 19(10), 680-683.
- Rodriguez-Alvarez, N., Jimenez-Mateos, E. M., Engel, T., Quinlan, S., Reschke, C. R., Conroy, R. M., Bhattacharya, A., Boylan, G. B., & Henshall, D. C. (2017). Effects of P2X7 receptor antagonists on hypoxia-induced neonatal seizures in mice. *Neuropharmacology*, 116, 351–363.

- Rosenberg, E. C., Tsien, R. W., Whalley, B. J., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids and epilepsy. *Neurotherapeutics*, 12(4), 747-768.
- Rosenberg, E. C., Patra, P. H., & Whalley, B. J. (2017). Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. *Epilepsy & behavior : E&B*, 70(Pt B), 319-327.
- Rossokhin, A. V., Sharonova, I. N., Bukanova, J. V., Kolbaev, S. N., & Skrebitsky, V. G. (2014). Block of GABA(A) receptor ion channel by penicillin: electrophysiological and modeling insights toward the mechanism. *Molecular and cellular neurosciences*, 63, 72-82.
- Russo, E., Citraro, R., Constanti, A., Leo, A., Lüttjohann, A., van Luijtelaar, G., & De Sarro, G. (2016). Upholding WAG/Rij rats as a model of absence epileptogenesis: Hidden mechanisms and a new theory on seizure development. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 71, 388-408
- Saxena, S., & Li, S. (2017). Defeating epilepsy: A global public health commitment. *Epilepsia open*, 2(2), 153-155.
- Schlicker, E., & Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 22(11), 565-572.
- Scicchitano, F., van Rijn, C. M., & van Luijtelaar, G. (2015). Unilateral and Bilateral Cortical Resection: Effects on Spike-Wave Discharges in a Genetic Absence Epilepsy Model. *PloS one*, 10(8), e0133594.
- Serikawa, T., Mashimo, T., Kuramoro, T., Voigt, B., Ohno, Y., & Sasa, M. (2015). Advances on genetic rat models of epilepsy. *Experimental animals*, 64(1), 1-7.
- Shin, E. J., Jeong, J. H., Chung, Y. H., Kim, W. K., Ko, K. H., Bach, J. H., ... & Kim, H. C. (2011). Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochemistry international*, 59(2), 122-137.
- Shorvon S. D. (2011). The causes of epilepsy: changing concepts of etiology of epilepsy over the past 150 years. *Epilepsia*, 52(6), 1033-1044.
- Skaper, S. D., Debetto, P., & Giusti, P. (2010). The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(2), 337-345.
- Sperlágh, B., Köfalvi, A., Deuchars, J., Atkinson, L., Milligan, C. J., Buckley, N. J., & Vizi, E. S. (2002). Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 81(6), 1196-1211.
- Sperlágh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K., & Illes, P. (2006). P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in neurobiology*, 78(6), 327-346.
- Sugimoto, M., Fukami, S., Kayakiri, H., Yamazaki, S., Matsuoka, N., Uchida, I., & Mashimo, T. (2002). The beta-lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of action at GABA(A) receptors. *British journal of pharmacology*, 135(2), 427-432.
- Surprenant, A., & North, R. A. (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual review of physiology*, 71, 333-359
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science (New York, N.Y.)*, 272(5262), 735-738.
- Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *Lancet (London, England)*, 393(10172), 689-701.

- Thomas, B. F., Compton, D. R., & Martin, B. R. (1990). Characterization of the lipophilicity of natural and synthetic analogs of delta 9-tetrahydrocannabinol and its relationship to pharmacological potency. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 255(2), 624-630.
- Timofeeva, O. A., & Gordon, C. J. (2001). Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine. *Brain research*, 893(1-2), 165-177.
- Touw, M. (1981). The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of psychoactive drugs*, 13(1), 23-34.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2), 393-411.
- Tudor, M., Tudor, L., & Tudor, K. I. (2005). Hans Berger (1873-1941)--povijest elektroencefalografije [Hans Berger (1873-1941)--the history of electroencephalography]. *Acta medica Croatica : casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, 59(4), 307-313.
- Twitchell, W., Brown, S., & Mackie, K. (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology*, 78(1), 43-50.
- Uematsu, D., Araki, N., Greenberg, J. H., & Reivich, M. (1990). Alterations in cytosolic free calcium in the cat cortex during bicuculline-induced epilepsy. *Brain research bulletin*, 24(2), 285-288.
- U.S. Food and Drug Administration [website]. FDA approves first drug comprised of an active ingredient derived from marijuana to treat rare, severe forms of epilepsy. Accessed June25, 2018.
- Vandrey, R., Dunn, K. E., Fry, J. A., & Girling, E. R. (2012). A survey study to characterize use of Spice products (synthetic cannabinoids). *Drug and alcohol dependence*, 120(1-3), 238-241.
- Walden, J., Straub, H., & Speckmann, E. J. (1992). Epileptogenesis: contributions of calcium ions and antiepileptic calcium antagonists. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 140, 41-46.
- Walker, A. E., Johnson, H. C., & Funderburk, W. H. (1945). Convulsive factor in commercial penicillin. *Archives of Surgery*, 50(2), 69-73.
- Wallace, M. J., Blair, R. E., Falenski, K. W., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2003). The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 307(1), 129-137.
- Wilson, R. I., Kunos, G., & Nicoll, R. A. (2001). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*, 31(3), 453-462.
- Winyard, P. G., Moody, C. J., & Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends in biochemical sciences*, 30(8), 453-461.
- Witting, A., Walter, L., Wacker, J., Möller, T., & Stella, N. (2004). P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3214-3219.
- Yagi, K. (1987). Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and physics of lipids*, 45(2-4), 337-351.

- Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(5), 673–694.
- Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 833.
- Zuardi A. W. (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, 28(2), 153–157.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : B.30.2.ODM.0.20.09.00-050.04 -51
Konu : Araştırma Projeniz hk.

24/07/2014

Prof. Dr. Erdal AÇAR
OMÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

2014/28 numaralı “Penisilinle Oluşturulan Epileptiform Aktiviteye Pürinerjik P2X7 Reseptörünün Etkisi ve Bu Etkide Kanabinoid, NMDA ve T- tipi Kalsiyum İyon Kanallarının Rolü” konu başlıklı Projeniz; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 23.07.2014 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılar a ait olmak kaydıyla ve 6 aylık dönemler halinde Çalışma Raporu verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.

Prof. Dr. R. Cankon GERMİYANOĞLU
HADYEK Başkanı

Alınan kararlar Kurul kararıdır. Kararla ilgili Kurul üyelerinin aranması etik değildir. İtirazlarınızı yazılı olarak Etik Kurul sekreterliğine başvurmanız gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Gökhan ARSLAN, Samsun Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesinden 2008 yılında mezun oldu. Temel ilgi alanları, nörofizyoloji, deneysel epilepsi modelleri, ağrı fizyolojisidir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-4186-2478
E-mail : gokhan.arslan@omu.edu.tr
Tel : 0543 569 56 94
Medeni hali : Evli
Yabancı dil : İngilizce

Yayınlar:

1. Arslan, G., Alici, S. K., Ayyildiz, M., & Agar, E. (2013). The role of CB1-receptors in the proconvulsant effect of leptin on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *CNS neuroscience & therapeutics*, 19(4), 222–228.
2. Tutkun, E., Arslan, G., Soslu, R., Ayyildiz, M., & Agar, E. (2015). Long-term ascorbic acid administration causes anticonvulsant activity during moderate and long-duration swimming exercise in experimental epilepsy. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 75(2), 192–199.
3. Gunes, H., Ozdemir, E., & Arslan, G. (2019). Coenzyme Q10 increases absence seizures in WAG/Rij rats: The role of the nitric oxide pathway. *Epilepsy research*, 154, 69–73.
4. Arslan, G., Ayyildiz, M., & Agar, E. (2014). The interaction between ghrelin and cannabinoid systems in penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Neuropeptides*, 48(6), 345–352.
5. Avci, B., Bilge, S. S., Arslan, G., Alici, O., Darakci, O., Baratzada, T., Ciftcioglu, E., Yardan, T., & Bozkurt, A. (2018). Protective effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on organophosphate poisoning. *Toxicology and industrial health*, 34(2), 69–82.
6. Arslan, G., Avci, B., Kocacan, S. E., Rzayev, E., Ayyildiz, M., & Agar, E. (2019). The interaction between P2X7Rs and T-type calcium ion channels in penicillin-induced epileptiform activity. *Neuropharmacology*, 149, 1–12.