

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**YENİ NESİL ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN AKUT UYGULAMA SONRASI  
SAĞLIKLI FARELERİN BEYİN DOKUSUNDA BDNF, NGF, NT3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA,  
GSH DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr.TUĞBA KUM**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**YENİ NESİL ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN AKUT UYGULAMA SONRASI  
SAĞLIKLI FARELERİN BEYİN DOKUSUNDA BDNF, NGF, NT3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA,  
GSH DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr.TUĞBA KUM**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Prof.Dr.HALE MARAL KIR**

**ETİK KURUL KARAR TARİHİ, NUMARASI: 09.07.2015, 7/11-2015**

**2017**

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TEŞEKKÜR.....	4
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	5
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	7
TABLOLAR DİZİNİ.....	8
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>9</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>11</b>
2.1. SİNİR SİSTEMİ.....	11
2.2. NÖROTROFİNLER.....	11
2.3. TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA .....	14
2.4. İNTERLÖKİN-6 .....	15
2.5. LAKOZAMİD .....	16
2.6. RUFİNAMİD .....	16
2.7. RETİGABİN .....	17
2.8. OKSİDATİF STRES, MALONDİALDEHİT, GLUTATYON .....	17
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>19</b>
3.1. DENEY HAYVANLARI .....	19
3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER .....	19
3.3. DENEY GRUPLARI .....	19
3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZLER .....	20
3.4.1. Dokuların alınması, ön hazırlık .....	20
3.4.2. Protein ölçümü .....	20
3.4.3. BDNF ölçümü .....	20
3.4.4. NGF ölçümü .....	20
3.4.5. NT3 ölçümü.....	20
3.4.6. TNF $\alpha$ ölçümü.....	20
3.4.7. IL-6 ölçümü .....	21
3.4.8. MDA ölçümü.....	21
3.4.9. GSH ölçümü .....	21
3.5. KULLANILAN CİHAZLAR.....	23
3.6. İSTATİKSEL ANALİZ.....	23
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>24</b>
<b>5.TARTIŞMA .....</b>	<b>34</b>
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>42</b>
<b>7.ÖZET.....</b>	<b>44</b>
<b>8. ABSTRACT.....</b>	<b>45</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>47</b>

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisinden ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerlerini örnek aldığım, göstermiş olduğu güleryüz, hoşgörü ve sabırdan dolayı kıymetli hocam, tez danışmanım Ana Bilim Dalı başkanım sayın Prof. Dr. Hale Maral Kır'a

Eğitimim süresince her alanda desteğini gördüğüm mesleğimde yetişmemi sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Sevinç Kuşkay, Prof. Dr. Meltem Özlen Dillioğlugil, Prof. Dr. Mustafa Baki Çekmen ve Yrd. Doç. Dr. Fatma Ceyla Eraldemir'e

Tezimin hazırlığında emeği geçen Doç. Dr. İpek Komsuoğlu'na, Doç. Dr. Canan Baydemir'e

Asistanlığım boyunca beraber çalıştığım, benden desteklerini esirgemeyen sevgili asistan arkadaşlarım Özgür Doğa Özsoy, Esra Acar, İrem Yavaş ve Fatih Hunc'a

Tanımış olmaktan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum merkez laboratuvarında görevli arkadaşlarıma

Eğitim hayatım boyunca varlıkları sayesinde güç bulduğum, üzerimde sonsuz emeği olan biricik aileme

Anlayışları ve gösterdikleri katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

**APP:** Amiloid öncü protein

**BDNF:** Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

**CYP:** Sitokrom P

**DMSO:** Dimetilsülfoksit

**DTNB:** Dithiobis nitrobenzoik asit

**EDTA:** Disodyum etilendiamin tetraasetik asit

**GABA:** Gama amino bütirik asit

**GSH:** Glutasyon

**IL-6:** İnterlökin-6

**IL-6R:** IL-6 reseptör

**MDA:** Malondialdehitler

**MPTP:** 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

**MPP+:** 1-metil-4 fenil-pyridinium

**MS:** Multiple skleroz

**NF-KB:** Nükleer faktör kappa B

**NF-AT:** Nükleer faktör aktive edici T cell

**NGF:** Sinir büyüme faktörü

**NPY:** Nöropeptid Y

**NT-3:** Nörotrofin-3

**NT4/5:** Nörotrofin-4/5

**s IL-6R:** Çözünen IL-6R

**PBS:** Fosfat buffer saline

**SF:** serum fizyolojik

**SH:** Sülfidril

**TACE:** TNF  $\alpha$  konverting enzim

**TBA:** Tiyobarbitürik asit

**TCA:** Trikloroasetik asit

**TEP:** Tetra etoksipropan

**Trk:** Tirozin kinaz reseptörü

**TNF:** Tümör nekroz faktör

**TNF  $\alpha$ :** Tümör nekroz faktör alfa

**TNFR1:** TNF reseptör 1

**TNFR2:** TNF reseptör 2

**6-OHDA:** 6-hydroxydopamine

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1.** Fare beyin dokusunda grupların ortalama BDNF düzeyleri

**Şekil 2.** Fare beyin dokusunda grupların ortalama NGF düzeyleri

**Şekil 3.** Fare beyin dokusunda grupların ortanca IL-6 düzeyleri

**Şekil 4.** Fare beyin dokusunda grupların ortanca MDA düzeyleri

**Şekil 5.** Fare beyin dokusunda grupların ortanca GSH düzeyleri



## TABLULAR DİZİNİ

**Tablo 1.** Grupların BDNF, NGF düzeylerinin ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri, NGF ortanca ile 25.-75.yüzelik değerleri ve verilerin istatistiksel karşılaştırması

**Tablo 2.** Grupların TNF  $\alpha$ , IL-6 düzeylerinin ortanca ile 25.-75.yüzelik değerleri ve verilerin istatistiksel karşılaştırması

**Tablo 3.** Grupların MDA, GSH düzeylerinin ortanca ile 25.-75.yüzelik değerleri ve verilerin istatistiksel karşılaştırması





## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Santral, periferik sinir sistemi hastalıkları ve sinir sisteminin öğrenme, hafıza gibi fizyolojik fonksiyonları ile nöronal sağkalımı düzenleyen, aksonal ve dendritik ağları muhafaza edip sinaptik plastisiteyi sağlayan nörotrofinler arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. Alzheimer, Parkinson, Multiple Skleroz, Huntington, Epilepsi gibi hastalıklar santral sinir sistemini hedef alan ve tedavisi daha çok semptomları kontrol altına almaya yönelik olan patolojilerdir. Nörotrofinlerin, inflamasyonun ve inflamatuvar sitokinlerin bu hastalıkların patogenezinde ve tedavisinde olumlu ya da olumsuz katkıları araştırmalara konu olmaktadır. Çalışmamızda kullanılan yeni nesil antiepileptik ilaçlardan lakozamid voltaj bağlı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonunu güçlendirir, bu durum; aşırı uyarılmış nöronal membranın stabilizasyonu ve tekrarlayan nöronal ateşlemenin inhibe olması ile sonuçlanır. Rufinamid, sodyum kanallarının aktivitesini düzenler, inaktif durumu uzatır. Retigabin, voltaj kapılı potasyum kanallarını açarak etki gösterir. Böylece epileptik nöbetler üzerine kontrol sağlanmaya çalışılır. Nörotrofinler ve reseptörleri birçok sinyal yolağını aktifleyerek nöronal sağ kalımı düzenler, sinaptik plastisite üzerine katkı sağlar. Bu özellikleri ile nörolojik hastalıkların tedavisinde potansiyeli olan bir konu başlığı olarak karşımıza çıkarlar. Nörotrofin ailesinde; nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT3), nörotrofin-4/5 (NT4/5) bulunmaktadır. İn vitro ve in vivo deneylerle; nörotrofinlerin nöronal dejenerasyonu önleyen ya da geri çeviren, nörit rejenerasyonunu teşvik eden ve sinaptik plastisite oluşumunu güçlendiren yetenekleri ile bir takım nörolojik hastalık grubunda primer ya da yardımcı tedavi açısından umut olabileceği düşünülmektedir. Oksidatif stres, prooksidan sistem ile antioksidan sistem arasındaki ilişkinin prooksidan lehine bozulması ile oluşur. Elektron alıcı maddelere serbest radikaller, bunların aktif oksijen türevlerine de oksidanlar denir. Oksidanların sahip olduğu elektron alma yetenekleri ile oksidanın hedefinde olan hücre zarı, DNA, RNA gibi yapıların bozulması, fonksiyonlarının değişmesi sonucu hücre hasarı gerçekleşir. Gerek organel membranları gerekse hücre zarında bulunan fosfolipitlerdeki doymamış yağ asitleri oksidanların saldırılarına duyarlıdır. Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), membran yapısını bozarak iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesi değişikliğine yol açar, DNA ile etkileşime girebilir. MDA tayini ile oksidatif hasar hakkında değerlendirme yapılabilirken, GSH tayini ile antioksidan savunma sistemi açısından bilgi sahibi olunabilir. İnflamasyon; organizmanın yabancı maddelere veya endojen patolojik bozukluklara karşı vermiş olduğu bir yanıttır. İnflamasyon

sürecinde sitokin diye adlandırılan çeşitli moleküller görev alır. Oksidatif stres ile inflamasyon arasında da ilişki olduğu düşünülmektedir ve bu konuda çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamızda yeni nesil anti epileptik ajanlardan lakozamid, rufinamid, retigabinin; sağlıklı farelerin beyin dokusunda sitokinlerden IL-6, TNF $\alpha$ , nörotrofinlerden BDNF, NGF, NT-3, oksidan-antioksidan sistemden MDA, GSH düzeyleri üzerine etkilerini araştırmak planlanmıştır. Tedavi de kullanılan bu ilaçların gerek inflamasyon gerekse oksidatif stres konusunda dengeyi nöron lehine değiştirip değiştirmediği incelenecektir. Çalışmamızın bir sonraki aşaması, kullandığımız ajanların epileptik hayvan modelinde etkilerinin araştırılması olabilir ve mevcut çalışmamız sonraki çalışmalarımız üzerine ışık tutabilir. Bu verilerin, beyin doku hasarı oluşturabilecek herhangi bir hastalıkta, hasar oluşmasını engelleyici ve/veya tedavi edici yöntemler bulabilecek daha ileri araştırmalara bir zemin oluşturması hedeflenmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi temel olarak, duysal uyarıları alıp onları kas veya bez gibi efektör organlara ileten özel hücrelerden oluşur. Vücudun içinden veya dışından gelen uyarılar ile efferent impulslar koordine edilir ve böylece efektör organların ahenk içinde çalışması sağlanır. Ayrıca üst düzeydeki canlıların sinir sistemi geçmiş deneyimlerinden edindiği duysal bilgileri depolar ve bu bilgileri başka sinir impulslarıyla entegre edip ortak efferent impulslar oluşturur. Sinir sistemi iki ana bölüme ayrılabilir. Merkezi sinir sistemi; beyin ve omurilikten, periferik sinir sistemi; kranial ve spinal sinirler ile bu yapıların ganglionlarından oluşur.<sup>1</sup> Santral sinir sisteminin temel hücresel bileşenleri nöronlar ve glial hücrelerdir. Nöronlar, sinir sisteminin fonksiyonel birimidir ve oldukça özelleşmiş uyarılabilir bir yapıya sahiptir. Nöronlar üç temel yapıdan oluşurlar; soma - hücre gövdesi, dendrit ve axon.<sup>2</sup> Glial hücre tiplerinden astrositler beyin kan damarlarına uzantılar göndererek kan-beyin bariyerini yaparlar. Bunun dışında astrositlerin sinapsları ve sinir hücrelerini saran uzantıları da vardır. Nöronların büyümesini uyaran maddeler üretilip, nörotransmitter konsantrasyonunun devam ettirilmesinde görev alırlar. Oligodendrositler ise merkezi sinir sisteminde aksonların çevresinde myelin kılıf yapımında rol alırlar.<sup>3</sup> Bir diğer glial hücre birincil işlevi fagositoz olan mikrogliyalardır. Bunlar beynin ve omuriliğin immun koruyucuları olarak düşünülür. Nöronlar ve astrositler ile ilişki kurar, ölü nöronların olduğu bölgeye yönelerek onları fagosite ederler.<sup>2</sup>

### 2.2. Nörotrofinler

Nörotrofinler sinir sisteminin hücreleri üzerine yoğun etkileri olan yapısal olarak birbirine yakınlık gösteren proteinlerdir. İnsanlarda ve farelerde dört adet nörotrofin geni tanımlanmıştır. Bu genler; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4/5 (NT4/5) olarak bilinen küçük, dimer yapan, sekretuar proteinleri kodlarlar.<sup>4</sup>

Nörotrofinlerin keşif süreci ilk olarak NGF'nin tanımlanmasıyla başlamıştır. M. Bothwell, Handbook of Experimental Pharmacology Neurotrophic Factors isimli kitapta V. Hamburger'in cerrahi olarak civciv embryosunda yaptığı çalışmalar ile R. Levi-Montalcini, S. Cohen'nin yaptığı çalışmalardan bahsetmiştir. M. Bothwell'in anlattığı çalışmalarda uzuv çıkartılması omuriliğin lateral motor kolonunda ki motor nöronların ve o segmentin duysunu alan arka kök gangliyonlarında ki duysal nöronların sayısının azalması veya tam

tersi bir durumda yani extra bir uzuv implante edildiğinde ilk duruma karşıt bir sonuç gözlenince periferik hedef alanın kendisiyle ilgili sinir dokusunu kontrol ettiği düşünülmüştür. Anlatılan başka bir çalışma ile sarkoma tümörünün sempatik ve duysal nöronların gelişimi üzerinde benzer etkileri gösterilmiş, bu etkilerin ortama diffüze olabilen faktörlerle oluşturulduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca kobra venomunun ve farenin tükürük bezininde benzer etkileri gösterdiği bulunmuş, bu kaynaklardan NGF saflaştırılmıştır.<sup>5-7</sup>86 Nöral krest kökenli duysal ganglionlarda bulunan nöronlar üzerine trofik faktör etkilerin gözlenmesinin ardından NGF dışında başka bir faktör olan BDNF bulunmuş, nükleotid sekans analizleriyle BDNF ve NGF'nin yapısal benzerliği ortaya konmuştur.<sup>8,9</sup> Bu aşamadan sonra ki çalışmalarla nörotrofin ailesinin diğer üyeleri NT-3 ve NT-4/5 proteinleri bulunup tanımlanmıştır.<sup>7,10-12</sup>

Bu proteinler öncelikle N terminal prodomain ve C terminal matür domain içeren prekürsör formlarında yani pronörotrofin olarak granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenirler. Pronörotrofinler 210 ile 270 aralığında amino asit içerirler.<sup>7,13,14</sup> Translasyonu takiben nonkovalent olarak bağlanan dimerik formlar oluştururlar.<sup>13</sup> Birçok sekrete edilen protein gibi pronörotrofinlerin sinyal peptidleri endoplazmik retikulumda proteinden ayrılır ve pronörotrofin homodimerleri golgi organına geçer. Bu organelde prodomain bölgesinden glikolizasyona uğrar ve trans golgi ağında veziküller içinde birikirler. Bu veziküllerde bulunan pronörotrofinler intraselüler proteazlardan furin ya da prokonvertaz ile proteolitik işleme uğrar ve sonuçta glikolize prodomain kısmı ayrıldığında matür domainleri içeren homodimerler yani matür nörotrofinler oluşur.<sup>15</sup> Bazen bu proteolitik işlem hücre içinde gerçekleşmez ve protein pronörotrofin olarak sekrete edilir. Böyle bir durumda hücre dışında da plasmin ve matrix metalloproteinazları pronörotrofinlerden matür formların oluşmasını sağlarlar. Matür nörotrofinler yaklaşık 120 amino asitlik residü içerirler.<sup>7,16</sup>

Nöronlardan ve nöroendokrin hücrelerden protein salgısı iki şekilde olabilir. Bunlardan birisi sürekli ve düzensiz salgılama diğeri ise düzenlenen salgılamadır. Bu hücre tipleri dışında salgılama şekli sürekli ve düzensiz salgılamadır. Sonuç olarak dört nörotrofininde nöron dışı dokulardan salgılanması benzerdir. Nöronlarda ise nörotrofinin türüne göre salgılama yolları değişiklik gösterebilir. NGF, NT-3, NT-4 salgısında daha çok sürekli ve düzensiz yolak kullanılırken, BDNF salgısında seçici olarak düzenlenen yolak kullanılır.<sup>7,17-20</sup> Düzenlenen yolakta BDNF salınımının nöronal aktivite ile kontrol edilmesi, bu nörotrofinin öğrenme ve bellek üzerine etkileri konusunda önemli bir noktayı teşkil etmektedir. BDNF, nöropeptidler gibi veziküller ile axon uca taşınır.<sup>7,21</sup> Taşınma esnasında proBDNF'ye

bağlanarak ona yol gösteren iki protein bulunmuştur; sortrilin ve karboksipeptidaz E.<sup>22,23</sup> Yaygın bir allelik varyant ile BDNF’de valin yerine metiyonin gelmesi onun sortriline bağlanmasını etkiler, bu durum BDNF’nin düzenlenen yol ile olan salgılanmasına negatif bir etki sonucu hafıza becerilerinde zayıflamaya neden olabilir.<sup>7</sup>

İlk olarak yapılan çalışmalarda nörotrofinler hedef dokudan kaynaklanıp periferik sinir sisteminde nöronların yaşamasını ve farklılaşmasını düzenleyen büyüme faktörleri olarak tanımlanmış olsada daha sonra bu faktörlerin santral sinir sisteminde de sinaptik plastisite ve nöronal morfolojinin düzenlenmesi gibi bir çok etkiyi gösterdiği izlenmiştir.<sup>15,24</sup> Nörotrofinler kas ya da postsinaptik nöronlar gibi hedef doku kaynaklı olarak veya presinaptik nöronlar, astrositler, mikroglialar, schwann hücreleri, oligodendrositlerce salınarak parakrin ve otokrin etkiler gösterirler.<sup>15,25,26</sup>

Nörotrofinler matür veya pronörotrofin olarak salınır, etkilerini cevap verecek hücre üzerindeki bazı reseptörlere tutunarak gösterirler. Bu reseptörler tirozin kinaz reseptörlerinden (Trk), TrkA, TrkB, TrkC ve tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinden p75<sup>NTR</sup> ‘dir . p75<sup>NTR</sup> dört nörotrofine ve hatta nörotrofinlerin pronörotrofin formlarına da bağlanabilir. Fakat tirozin kinaz reseptörlerinden her biri belirli bir nörotrofine ilgi göstererek bağlanabilir. NGF ile TrkA, BDNF ve NT-4 ile TrkB, NT-3 ile TrkC reseptörleri aktive olurken bu bağlanma da nörotrofinin matür hali tercih edilir. Nörotrofinler bu iki grup reseptör ile gerek sinir sistemi içinde gerekse dışında reseptörleri exprese eden tüm hücrelerde etki gösterirler. Bu etkiler nörotrofinin matür olup olmamasına, hangi reseptöre hangi koreseptör (sortrilin gibi) varlığında bağlandığına göre hücreyi canlı tutmaktan apoptozise kadar götüren geniş bir aralıkta değişir.<sup>7,13</sup> Sinir sistemi için nörotrofinler ve reseptörleri nöronların farklılaşması, canlılığını sürdürmesi, sinapsların ve sinaptik plastisitenin gelişimi, nöronal uzantıların büyümesi, miyelinizasyon gibi faaliyetlerde rol alarak nöronal ağın gelişimini düzenlerler.<sup>7,13,15</sup> Sonuç olarak nörotrofinler gerek gelişen gerekse matür sinir sistemi için çok önemli görevler yerine getirirler.

BDNF anterograd yani aksona doğru salgılanmak üzere taşınırken, NGF de nöronun akson ucundaki reseptörüne tutunduktan sonra hücre içine alınarak retrograd yol ile axondan hücre gövdesine taşınır.<sup>3,7</sup> Böylece mesaj akson ucundan belli bir miktar mesafe kat ederek somaya ulaşır.

Nörotrofinler bu önemli özellikleri nedeniyle gerek sinir sistemi gerekse diğer sistemleri ilgilendiren bir takım hastalıkların araştırılmasına konu olmuştur.

### 2.3. Tümör nekroz faktör alfa (TNF $\alpha$ )

TNF  $\alpha$ ; inflamasyon, enfeksiyon, otoimmün hastalıklar ve malignitelerde görev alan pleotropik etkili bir mediyatördür. Enfeksiyon esnasında doğal bir cevap olarak konak tarafından üretilir. Böyle bir neden ile uyarıldığında konak için faydalı olsada üretiminin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Aksi takdirde zararlı etkilerinden konak etkilenmektedir. Multiple Skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kronik inflamatuvar artrit gibi otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıklarda TNF'ün fazla üretimi söz konusudur. Crohn, Ankilozan Spondilit, Romatoid Artrit gibi bazı hastalıklar için anti TNF ajanlar tedavide kullanılmaktadır.<sup>27-29</sup> Temelde TNF, immün sistemin hücreleri olan makrofaj, T ve B lenfositler gibi hücrelerce bakteriyal, inflamatuvar uyarılar sonucunda üretilir. Fakat başka dokularda bu mediyatörü üretebilir. Bunlara örnek olarak endotelial hücreler, nöronal dokular ve mast hücreleri sayılabilir.<sup>29</sup> Santral sinir sisteminde TNF  $\alpha$  büyük oranda mikrogliya, nöron ve astrositlerce sentezlenir.<sup>30</sup> TNF  $\alpha$  geninin ekspresyonu, nükleer faktör kappa B (NF-KB), nükleer faktör aktive edici T cell (NF-AT) gibi faktörlerle düzenlenir. İnsan TNF  $\alpha$ 'nın membranda bulunan formu, 27kDa ağırlığında ve 233 aminoasitten oluşur. Bu form proteolitik olarak yıkıma uğradığında 17kDa, 157 aminoasitlik membrandan ayrılan çözünebilir formu oluşur. Yıkım işlemi metalloproteaz TNF  $\alpha$  konverting enzim (TACE) tarafından gerçekleştirilir. Hem membrana bağlı olan hem de çözünen formlarının homotrimer yapılarının otokrin, parakrin ve endokrin düzeyde biyolojik cevaptan sorumlu olduğu düşünülmektedir.<sup>29,31</sup>

TNF  $\alpha$  iki reseptöre bağlanarak etkilerini gösterir. Bunlardan biri, p55 ya da p60 olarak bilinen TNF reseptör 1 (TNFR1)'dir. Diğer reseptör TNF reseptör 2 (TNFR2)'dir ve p75 ya da p80 olarak isimlendirilir.<sup>31</sup> Her iki reseptörde transmembran glikoproteindir. Özellikle extraselüler parçaları homoloji gösterir, bu kısımda sisteinden zengin tekrarlayan bölgeler vardır. Hem TNFR1 hem de TNFR2 trimerize formda bulunur. TNFR1 death domain olarak bilinen yaklaşık 80 amino asitlik bir motife sahiptir. Bu motifin hücre ölümü üzerinde kritik bir önemi vardır.<sup>32</sup> TNFR1 uyarılması sitotoksik, apoptotik, proinflamatuvar cevapların verilmesi ile ilişkilidir ve NF-KB ile mitojen aktivated protein kinaz yollarını aktive eder. TNFR2; TNFR1 reseptörü gibi ölüm domaini içermediğinden hücreyel aktivasyonu, proliferasyonu ve migrasyonu düzenleyen işlevlerden sorumludur.<sup>29</sup>

TNF  $\alpha$ 'nın çözünen formu TNFR 1 için yüksek ilgi gösterirken, membrana bağlı olan form TNFR 2 için yüksek ilgi gösterir. TNFR1 tüm hücre tiplerinde reseptör olarak bulunabilir, fakat TNFR2 daha çok nöronlarda, immün ve endotel hücrelerde eksprese edilir.<sup>30</sup>

Sinir sisteminde TNFR 1 ve TNFR 2 beyin sapı, korteks, talamus, serebellum, bazal ganglion bölgelerinde nöron ve glial hücrelerce sunulurlar. TNF  $\alpha$ , söz edilen iki reseptör türü ile nöronlar üzerinde hem nöroprotektif hem de nörotoksik olabilen geniş bir etki alanına sahiptir. Santral sinir sisteminde travma, iskemi ve Multiple Skleroz gibi bu bölgenin hastalıklarında, beyin TNF  $\alpha$  düzeyleri tipik olarak yüksek bulunmuştur.<sup>33</sup> Bununla birlikte TNF  $\alpha$ 'nın patogenezdaki rolü düşünülerek yapılan bir çalışmada Multiple Skleroz hastalığında TNF  $\alpha$  bloke edici ajanlar kullanıldığında yararlı etkilerden ziyade hastalığın ilerlemesini artırdığı gösterilmiştir.<sup>31</sup>

#### **2.4. İnterlökin-6**

İnterlökin-6 (IL-6) pleotropik etkili bir sitokindir. Belirgin fonksiyonları; karaciğerde akut faz cevabını indüklemesi ve B hücrelerinde çoğalma, farklılaşma ve immünglobulin üretimini desteklemesidir.<sup>34</sup> Ayrıca regülatuar T hücreleri arasındaki dengenin düzenlenmesinde gerekli olduğu, santral sinir sisteminde nöron ve glialar üzerine etki ettiği bilinmektedir. T hücresi, B hücresi, makrofaj, mikroglia gibi immün hücreler ile kas hücresi, adiposit, fibroblast, endotel hücre, nöron gibi immün olmayan hücreler bu sitokin kaynaklarıdır.<sup>35,36</sup> IL-6 mRNA'sı içinde 29 amino asit sinyal peptidide olan 212 asitlik bir protein kodlar. Proteinin sekrete edilen son hali 184 amino asit içerir. Farklı N-glikozidik bağlar nedeniyle birkaç izoformu bulunur ve ağırlıkları 21-28 kDa arasında değişir.<sup>37</sup>

Hedef hücrelerde IL-6, 80 kDa ağırlığındaki IL-6 reseptörüne (IL-6R) tutunur. Sinyalin hücreye iletilmesi için IL-6/IL-6R kompleksi gp130 olarak bilinen 130 kDa ağırlığındaki diğer reseptör protein ile etkileşir. gp 130 reseptörü dimerize olur ve JAK/ STAT ile ras/MAP kinaz yollarını harekete geçirerek hücre içi cevapları başlatır.<sup>38</sup> gp130 reseptörü tüm hücrelerce eksprese edilirken, IL-6R ekspresyonu kısıtlıdır. IL-6R hepatositlerin, nötrofillerin, monositlerin, CD4+T hücrelerinin ve mikrogliaların üzerinde bulunur.<sup>35,36</sup> Ayrıca hücre üzerinde eksprese edilmesine ek olarak IL-6'nün çözünen bir formunda vücut sıvılarında bulunabilir. Bu formun oluşumunda iki mekanizma tanımlanmıştır; bunlardan biri alternatif splicing, diğeri membrana bağlı olan IL-6'nün proteolizise uğramasıdır.<sup>37</sup> Çözünen IL-6R (s IL-6R) membrana bağlı olmasa dahi IL-6 onun için ligand olmaya devam eder ve bir hücre IL-6R'nü membranında sunmasa bile gp130 reseptörünü sunuyorsa sIL-6R ve IL-6 varlığında

sitokin cevabı oluşur. sIL-6R ile ilerleyen sinyale trans sinyalizasyon membrana bağlı IL-6R ile ilerleyene ise klasik sinyalizasyon adı verilmiştir.<sup>36</sup>

Beyinde IL-6 önemli etkilere sahiptir; hipotalamik – pitiüter - adrenal aksın aktivasyonu, yiyecek alımının azaltılması, ateşin indüklenmesi ve nöronal büyüme bunlar arasında sayılabilir.<sup>34</sup> IL-6 düzeyleri fizyolojik koşullarda düşük seviyelerde olmakla beraber Alzheimer, Parkinson, beyin kanseri, Multiple Skleroz ve beyin iskemisi gibi nörolojik hastalıklarda belirgin artış gösterir.<sup>35</sup>

## **2.5. Lakozamid**

Lakozamid üçüncü jenerasyon bir anti epileptik olarak parsiyel nöbetler için kullanımı onaylanmış kimyasal yapısı d-serin üzerine kurulu olan işlevselleştirilmiş bir amino asittir.<sup>39</sup> Amfipatik özellikler sergilediğinden oral biyoyararlanım ve kan beyin bariyeri penetrasyonu gösterecek kadar lipofilik, çözücü kullanılmadan aköz çözelti hazırlanabilecek kadar hidrofildir.<sup>40</sup> İlacın antiepileptik niteliğine birkaç mekanizma aracılık edebilir. Bunlardan ilki sodyum kanallarına olan etkisidir. Karbamazepin ya da fenitoin gibi antiepileptik ilaçlar voltaj kapılı sodyum kanallarının hızlı inaktivasyonunu sağlarken lakozamid ise bu kanalların yavaş inaktivasyonunu destekler. Ayrıca epileptogenezise muhtemel katılımı olabilecek Collapsin response mediatör protein-2'ye bağlandığı düşünülmektedir.<sup>41</sup> Epilepsi dışında diabetik nöropatiye bağlı ağrı içinde çalışmaları yapılmıştır fakat kullanımı henüz onaylanmamıştır.<sup>41,42</sup> İlacın eliminasyonu iki yol üzerinden olmaktadır. % 40 kadarı idrar ile değişime uğramadan atılır, kalanı ise demetilasyon, deasetilasyon, hidroksilasyon, glukuronidasyona uğrayarak metabolize edilir. Bu metabolik yıkımda birkaç sitokrom P450 izoenzimi (CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 ) ve CYP'den bağımsız mekanizmalar kullanılır . Metabolitler idrar ile atılır. İlacın yarılanma ömrü 12-16 saat arasında değişmektedir.<sup>39</sup>

## **2.6. Rufinamid**

Rufinamid, Lennox Gastaut sendromu için kullanımı onaylanmış triazolden türeyen üçüncü nesil bir antiepileptik ilaçtır.<sup>43,44</sup> Antiepileptik etkisini voltaj kapılı sodyum kanalları üzerinden gösterir. Kanalların inaktif durumdan aktif hale geçmesini engeller, inaktif süreyi uzattığı için nöronal aşırı uyarılmayı da inhibe eder.<sup>45</sup> Oral alımın ardından %85 kadar biyoyararlanımı vardır ve pik plazma konsantrasyonuna 5-6 saat içinde ulaşır. Yarı ömrü ise 8-12 saat arasındadır. % 2-4 kadarı idrar ve feçes ile değişmeden atılır. Metabolize edildiği organ karaciğerdir. Büyük kısmı karboksilamid grubunun karboksilesteraz aracılı enzimatik



hidrolizi ile parçalanır. Bu reaksiyonlar sitokromal P450 izoenzimlerinden bağımsız gerçekleşir. Metabolitleri idrar ile atılır.<sup>44</sup>

## 2.7. Retigabin

Akut ve kronik ağrı tedavisinde kullanılan flupirtine isimli maddeden derive olan ezogabin olarakta bilinen parsiyel nöbetlerde kullanımı onaylanmış karbamik asit etil esteri üçüncü nesil antiepileptik bir ilaçtır.<sup>44,46,47</sup> Retigabin, antiepileptik ilaçlar arasında potasyum kanalları üzerinden etki gösterdiği düşünülen özgün bir ilaçtır. Kv7.2-5 olarak adlandırılan potasyum kanallarını seçerek onları aktive ettiği fakat kardiyak Kv7.1 potasyum kanalını etkilemediği düşünülmektedir.<sup>48-50</sup> Bu mekanizma ile hiperpolarizasyon oluşmakta ve uyarılabilirlik azalmaktadır.<sup>44</sup> Ayrıca Gama amino bütirik asit-A (GABA-A) reseptörü üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir.<sup>47,51</sup> Oral alımın ardından %50-60 kadar biyoyararlanım gösterir ve plazmada ki pik konsantrasyonuna uygulamanın sonrasında 1.5 saat içinde ulaşır. Eliminasyon yarı ömrü 8-11 saat arasındadır. N-asetilasyona ve N-glukuronidasyona uğrar. İlacın ve metabolitlerinin büyük bölümü renal yoldan atılır. Metabolizması mikrozomal p450 ile gerçekleşmemektedir.<sup>44</sup>

## 2.8. Oksidatif stres, Malondialdehit, Glutasyon

Oksidatif stres; oksidan üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin oksidan sistem lehine bozulması olarak tanımlanır. Oksidan sistemin ürünleri olarak süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, peroksi radikali, hidroperoksi radikali gibi bazı reaktif oksijen ürünleri olan serbest radikaller sayılabilir.<sup>52,53</sup> Serbest radikaller normal koşullar altında vücudumuzda oluşan ve çiftleşmeyen bir elektron sahibi olduğundan yüksek oranda reaktif moleküller olarak stabilitesini sağlamak üzere diğer moleküllerle reaksiyona giren kısa ömürlü moleküllerdir. Nükleik asitler, proteinler, hücre membranında bulunan lipidler ve plazma lipoproteinleri üzerinde hasara neden olurlar. Bu durum kansere, ateroskleroza, koroner arter hastalıklarına, otoimmün hastalıklara yol açabilir.<sup>54</sup> Ayrıca Alzheimer, Parkinson, Amyotrofik Lateral Sklerozis gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol aldıkları düşünülmektedir.<sup>55-57</sup>

Hücre membranları ve plazma lipoproteinlerindeki doymamış yağ asitleri üzerine olan radikal hasarı lipid peroksidlerinin oluşumuna yol açar.<sup>54</sup> Lipid hidroperoksitleri oldukça kararsızdır ve kolayca aldehitler ve malondialdehitler gibi ikincil ürünlere ayrışır. Malondialdehitler (MDA) oksidasyonun göstergesi olarak çeşitli biyolojik örneklerden

ölçülebilirler.<sup>53</sup> Bu madde reaktif özellikler taşıdığından nükleik asitler ya da proteinler gibi biyomoleküller ile etkileşerek onlara hasar verir, hücrenin fonksiyonlarını bozar.<sup>58</sup>

Serbest radikallerin tüm bu zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma sistemi mevcuttur. Süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzimatik antioksidan yapıların dışında glutatyon (GSH) enzimatik olmayan hücre içi redox homeostazının sağlanmasında görevli bir antioksidandır. Tripeptid olan yapısı  $\gamma$  – glutamilsisteinilglisin'den oluşur; büyük bölümü hücrede nükleusta, endoplazmik retikulumda ve mitokondride bulunur.<sup>59</sup>



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Uludağ Üniversitesi, Deney hayvanları yetiştirme, uygulama ve araştırma merkezinde üretilmiş olan BALB/c türü, albino, erkek farelerden ağırlıkları 35-40 gram arasında değişen 89 adet fare kullanılmıştır. Çalışmamız Kocaeli Üniversitesi hayvan araştırmaları etik kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay no:7/11-2015).

Fareler kafeslere konularak, istedikleri kadar yem ve su almaları sağlanıp, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyotlarda 21-24°C ısıda ve bağıl nemi %50-60 olan ortamda muhafaza edilmiştir.

#### 3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmamızda yeni nesil antiepileptik ilaçlardan, Retigabin (Sigma-Aldrich, 90221), Lakozamid (Sigma-Aldrich, L-029) ve Rufinamid (Sigma-Aldrich, R-8404) kullanıldı. Retigabin, lakozamid, rufinamid serum fizyolojik (SF) + dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Dozlar daha önceden incelenen ve lokomotor aktiviteyi etkilemediği belirtilen literatüre göre tespit edildi.<sup>60-62</sup> SF+DMSO, retigabin (1 ve 3 mg/kg), lakozamid (2 ve 4 mg/kg), rufinamide (2 ve 4 mg/kg) dozlarında farelere intraperitoneal yolla uygulanmıştır.

Bu araştırma için gerekli olan beyin doku örnekleri tek seferlik ilaç uygulamasından 24 saat sonra alınmıştır.

#### 3.3. Deney Grupları

Araştırmamızda kullanılan fareler sekiz gruba ayrılmıştır:

1. Grup (n=6) serum fizyolojik
2. Grup (n=12) serum fizyolojik+DMSO
3. Grup (n=12) lakozamid (2 mg/kg)
4. Grup (n=12) lakozamid (4 mg/kg)
5. Grup (n=11) rufinamid (2 mg/kg)
6. Grup (n=12) rufinamid (4 mg/kg)
7. Grup (n=12) retigabin (1 mg/kg)

8. Grup (n=12) retigabin (3 mg/kg)

### **3.4. Biyokimyasal Analizler**

#### **3.4.1. Dokuların alınması, ön hazırlık**

Bu araştırma için gerekli olan beyin doku örnekleri dekapitasyon işlemi uygulandıktan sonra alındı. Dokular tartılarak üzerine 1/10 (ağırlık/volüm) oranında fosfat tamponu (PBS) (0,1 M / pH 7,4) eklenip doku homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenatlar santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı ve eppendorflara alınarak analiz edilecek zamana kadar -40°C derin dondurucuda saklandı.

#### **3.4.2. Protein ölçümü**

Süpernatantlardan protein düzeyleri Roche Cobas 8000 cihazında türbidometrik yöntemle orijinal kiti ile ölçüldü. Analiz edilecek parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak verildi.

#### **3.4.3. BDNF ölçümü**

Mikro elisa yöntemi ile SUNRED (Shangai/China) marka mouse BDNF elisa kit kullanılarak, kit prospektüsüne uygun şekilde çalışıldı ve Alisei Quality System Seac Radim Company Analyser (Italy/Rome)-ELISA Reader ile okutuldu.

#### **3.4.4. NGF ölçümü**

Mikro elisa yöntemi ile SUNRED (Shangai/China) marka mouse NGF elisa kit kullanılarak, kit prospektüsüne uygun şekilde çalışıldı ve Alisei Quality System Seac Radim Company Analyser (Italy/Rome)-ELISA Reader ile okutuldu.

#### **3.4.5. NT3 ölçümü**

Mikro elisa yöntemi ile SUNRED (Shangai/China) marka mouse NT3 elisa kit kullanılarak, kit prospektüsüne uygun şekilde çalışıldı ve Alisei Quality System Seac Radim Company Analyser (Italy/Rome)-ELISA Reader ile okutuldu.

#### **3.4.6. TNF $\alpha$ ölçümü**

Mikro elisa yöntemi ile SUNRED (Shangai/China) marka mouse TNF  $\alpha$  elisa kit kullanılarak, kit prospektüsüne uygun şekilde çalışıldı ve Alisei Quality System Seac Radim Company Analyser (Italy/Rome)-ELISA Reader ile okutuldu.

### 3.4.7. IL-6 ölçümü

Mikro elisa yöntemi ile SUNRED (Shangai/China) marka mouse IL-6 elisa kit kullanılarak, kit prospektüsüne uygun şekilde çalışıldı ve Alisei Quality System Seac Radim Company Analyser (Italy/Rome)-ELISA Reader ile okutuldu.

### 3.4.8. MDA ölçümü

Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın ölçümü, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girdiğinde pembe renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan kompleks spektrofotometre ile 535 nm'de ölçülerek MDA düzeyleri tespit edilir.<sup>63</sup>

Ayırıcılar:

#### 1) Standart hazırlanması

Stok standart (10 mM): Standart çözeltisi 1,1,3,3 tetra etoksipropan (TEP) maddesinden hazırlandı. 10 mM'lık TEP stok standardından çalışma standartları oluşturuldu.

#### 2) Stok TBA-TCA-HCl ayırıcı

% 15 ağırlık/volum (w/v) Trikloroasetik asit (TCA), % 0,375 (w/v) Thiobarbitürik asit (TBA) ve 0,25 N HCl karışımı hazırlandı. % 100 (w/v)'lük TCA çözeltisinden 15 ml ve 0,375 g TBA alınarak 100 ml'lik balon jøjeye konuldu. 2,083 ml HCl eklendi. Bir miktar distile su eklenerek TBA çözününce toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Kararlılığı az olduğundan ayırıcılar çalışma öncesinde hazırlandı.

Çalışma yöntemi:

Tüplere 0,25 ml % 10'luk homojenat ile 0,75 ml KCl (0,15 M) konuldu. TBA-TCA-HCl ayırıcından 2 ml eklenerek tüpler karıştırıldı ve 15 dakika kaynar su banyosunda ısıtıldı. Su banyosundan sonra soğuması beklendi. Santrifüj edilerek partikülleri çöktürüldü. Süpernatantları 535 nm absorbanı ile okutuldu. Kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Grafikten homojenatların MDA konsantrasyonu elde edildi.

### 3.4.9. GSH ölçümü

GSH ölçümünde; 5,5'-2- dithiobis nitrobenzoik asitin (DTNB) ortamda var olan sülfidril (-SH) grubu içeren bileşiklerle kolayca redükte olarak koyu sarı renkli bir bileşik oluşturmasından yararlanır. Bu redükte kromojenin spektrofotometrede 412 nm'de ölçülen absorbanı ile GSH düzeyleri tespit edilmiştir.<sup>64</sup>

Ayır lar:

1)  kt rme solusyonu

1,67 gr glasiyel meta fosforik asit

0,20 gr disodyum etilendiamin tetraasetikasit (EDTA)

30 gr NaCl

Yukarıdaki maddeler 100 ml'lik balon joje içerisinde distile su ile eritilerek hazırlandı.

Stabilitesi 4 C'de 3 haftadır.

2) Disodyum fosfat solusyonu

Bir litrelik balon joje içerisinde 42,59 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> distile su ile eritilerek hazırlandı. 4 C'de saklanabilir.Eğer kristalize olursa, ısıtılarak üzülür.

3) Ellman renk ayıracı

100 ml'lik bir balon joje içerisinde 40 mg ditiyobis nitrobenzoik asit (DTNB)  zerine % 1'lik sodyum sitrat solusyonu eklenerek hazırlandı.

4) GSH Standartı (0,1 mg/ml)

1 mg glutatyon 10 ml distile su ile üzülerek hazırlandı. Stabil olmadığı için taze hazırlandı.

Çalışma yöntemi:

Tüpler aşağıdaki gibi hazırlandı

�zeltiler	K�r	Standart	�rnek
KCl (0,15 M)	2 ml	1,5 ml	1,5 ml
Homejenat (% 10)	-	-	0,5 ml
GSH kalibratör	-	0,5 ml	-
Proteinsizleřtirme �zeltisi	3 ml	3 ml	3 ml

Bütün tüpler santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı, bundan sonraki aşamalarda süpernatantlar kullanıldı.

Süpernatant	0,5 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> çözeltisi	2 ml
Ellman renk ayıracı	0,5 ml

Tüpler karıştırılıp 412 nm’de absorbansları okutuldu. Kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Grafikten homejenatların GSH konsantrasyonu elde edildi.

### 3.5. Kullanılan Cihazlar

1. IKA T18 Digital ULTRA TURRAX homojenizatör
2. Alisei Quality System Seac Radim Company Analyser (Italy/Rome)-ELISA Reader
3. UVmini-1240 UV-VIS Spectrophotometer- SHIMADZU
4. AND Company- Hassas terazi
5. Uğur derin dondurucu- Derin dondurucu (-40°C)
6. Eppendorf marka otomatik pipetler
7. Nüve NF 800 santrifüj

### 3.6. İstatiksel Analiz

Analizi yapılan parametrelerin normal dağılıma uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. Normal dağılıma uyan BDNF, NGF parametrelerinin karşılaştırılmasında One Way Anova testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

Normal dağılıma uymayan NT3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA ve GSH parametreleri Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sonuçlar medyan ve 25-75 persantil olarak ifade edildi. Her iki test için  $p < 0,05$  istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

BDNF düzeylerinde, rufinamid (4 mg/kg), retigabin (1 mg/kg) ve retigabin (3 mg/kg) gruplarında SF kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı (sırasıyla  $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ). Ayrıca retigabin (1 mg/kg) ve retigabin (3 mg/kg) gruplarının SF + DMSO kontrol grubuna göre de anlamlı olarak arttığı görüldü (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ). Retigabin (1 mg/kg) grubunda, lakozamid (4 mg/kg) ve rufinamid (2 mg/kg) gruplarına göre BDNF anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla  $p<0,05$ ;  $p<0,05$ ). Diğer grupların kendi içlerinde ya da kontrol gruplarıyla aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Tablo 1).

NGF düzeyleri için retigabin (3 mg/kg) grubunda, SF kontrol grubuna SF + DMSO kontrol grubuna ve rufinamid (2 mg/kg) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,05$ ). Lakozamid (2 mg/kg) grubu SF kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek izlendi ( $p<0,05$ ). Diğer grupların kendi içlerinde ya da kontrol gruplarıyla aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Tablo 1).

NT3 düzeylerine bakıldığında grupları birebir karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 1).

Sitokin düzeyleri açısından değerlendirildiğinde TNF  $\alpha$  için gruplar arasında fark izlenmezken, IL-6 düzeyleri rufinamid (4 mg/kg) grubunda hem SF kontrol grubuna hem de SF + DMSO kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,05$ ) (Tablo 2).

Oksidan-antioksidan sistem açısından MDA düzeyleri değerlendirildiğinde rufinamid (2 mg/kg), retigabin (3 mg/kg) ilaç gruplarında hem SF kontrol grubuna hem de SF + DMSO kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (sırasıyla  $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ). Lakozamid (4 mg/kg) ilaç grubunda, SF + DMSO kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ( $p<0,05$ ). Ayrıca retigabin (3 mg/kg) ilaç grubunda retigabin (1 mg/kg) ilaç grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi ( $p<0,05$ ). Diğer grupların kendi içlerinde ya da kontrol gruplarıyla aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Tablo 3).

GSH düzeylerine bakıldığında retigabin (3 mg/kg) ilaç grubunda SF kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ( $p<0,01$ ). Rufinamid (4 mg/kg), retigabin (1 mg/kg) ve retigabin (3 mg/kg) gruplarında hem SF + DMSO kontrol grubuna göre hem de lakozamid (2 mg/kg) ve lakozamid (4 mg/kg) ilaç gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı



düzeyde bir artış saptandı (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ). Ayrıca retigabin (3 mg/kg) ilaç grubunda rufinamid (2 mg/kg) ilaç grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış görüldü ( $p<0,05$ ) (Tablo 3).



Tablo 1. Grupların BDNF, NGF için ortalama  $\pm$  standart sapma deęerleri, NT3 median deęerleri ile 25-75. percentil deęerleri.

GRUP	BDNF (ng/mg protein)	NGF (pg/mg protein)	NT3 (ng/mg protein)
1	1,02 $\pm$ 0,14	261,44 $\pm$ 31,97	4,89 (4,68-5,39)
2	1,15 $\pm$ 0,15	299,04 $\pm$ 18,29	5,30 (5,06-5,30)
3	1,31 $\pm$ 0,30	347,67 $\pm$ 71,43	6,17 (5,25-6,92)
4	1,24 $\pm$ 0,16	339,17 $\pm$ 45,88	6,05 (5,61-6,65)
5	1,24 $\pm$ 0,18	311,66 $\pm$ 47,74	5,33 (4,56-5,83)
6	1,39 $\pm$ 0,20	345,37 $\pm$ 80,12	6,13 (5,36-7,09)
7	1,53 $\pm$ 0,20	346,13 $\pm$ 49,36	6,29 (5,12-6,58)
8	1,50 $\pm$ 0,30	391,67 $\pm$ 58,40	6,02 (5,31-6,65)
P	<0,001 <sup>C,D,E,K,L,R,Y</sup>	0,001 <sup>E,L,T,Z</sup>	0,005*

C : 1-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

D : 1-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

E : 1-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

K : 2-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

L : 2-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

R : 4-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

Y : 5-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

T : 5-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

Z : 1-3. Grup arasında anlamlı fark vardır.

\*:düzeltilmiş anlamlılık (adjusted sig.) ile fark görülemedi.

**Tablo 2.** Grupların TNF  $\alpha$ , IL-6 median deęerleri ile 25-75. percentil deęerleri

GRUP	TNF $\alpha$ (ng/mg protein)	IL-6 (ng/mg protein)
1	0,040 (0,035-0,043)	0,057 (0,051-0,06)
2	0,047 (0,045-0,051)	0,062 (0,059-0,064)
3	0,05 (0,041-0,069)	0,072 (0,049-0,084)
4	0,048 (0,044-0,05)	0,078 (0,063-0,085)
5	0,041 (0,038-0,049)	0,063 (0,054-0,072)
6	0,047 (0,036-0,054)	0,084 (0,068-0,091)
7	0,044 (0,04-0,05)	0,07 (0,063-0,081)
8	0,045 (0,039-0,049)	0,067 (0,059-0,089)
p	0,098	0,003 <sup>C,H</sup>

C : 1-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

H : 2-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

**Tablo 3.** Grupların MDA, GSH median deęerleri ile 25-75. percentil deęerleri

GRUP	MDA (micromol/mg protein)	GSH (mg/mg protein)
1	0,0036 (0,0031-0,0062)	0,0103 (0,0083-0,0153)
2	0,0045 (0,0038-0,0050)	0,0108 (0,0094-0,0117)
3	0,0056 (0,0043-0,0088)	0,0097 (0,0086-0,0101)
4	0,0071 (0,0061-0,0090)	0,0103 (0,0084-0,0113)
5	0,0084 (0,0067-0,0091)	0,0128 (0,0108-0,0143)
6	0,0063 (0,0051-0,0083)	0,0169 (0,0148-0,0200)
7	0,0050 (0,0040-0,0059)	0,0168 (0,0138-0,0188)
8	0,0080 (0,0072-0,0090)	0,0184 (0,0172-0,0205)
p	<0,001 <sup>B,E,F,G,L,V</sup>	<0,001 <sup>E,H,K,L,M,N,O,P,R,S,T</sup>

B : 1-5. Grup arasında anlamlı fark vardır.

E : 1-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

F : 2-4. Grup arasında anlamlı fark vardır.

G : 2-5. Grup arasında anlamlı fark vardır.

H : 2-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

K : 2-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

L : 2-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

M : 3-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

N : 3-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

O : 3-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

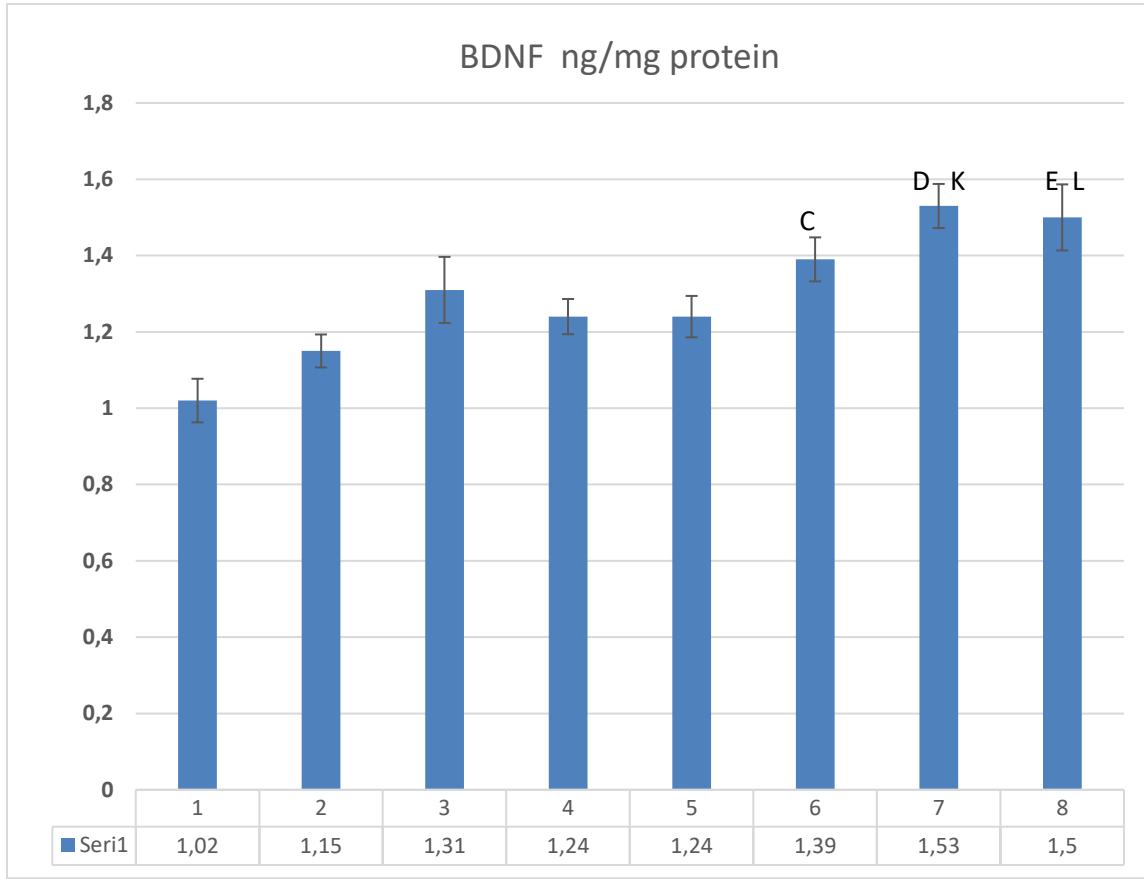
P : 4-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

R : 4-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

S : 4-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

T : 5-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

V : 7-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.



**Şekil 1.** Fare beyin dokusunda grupların ortalama BDNF düzeyi

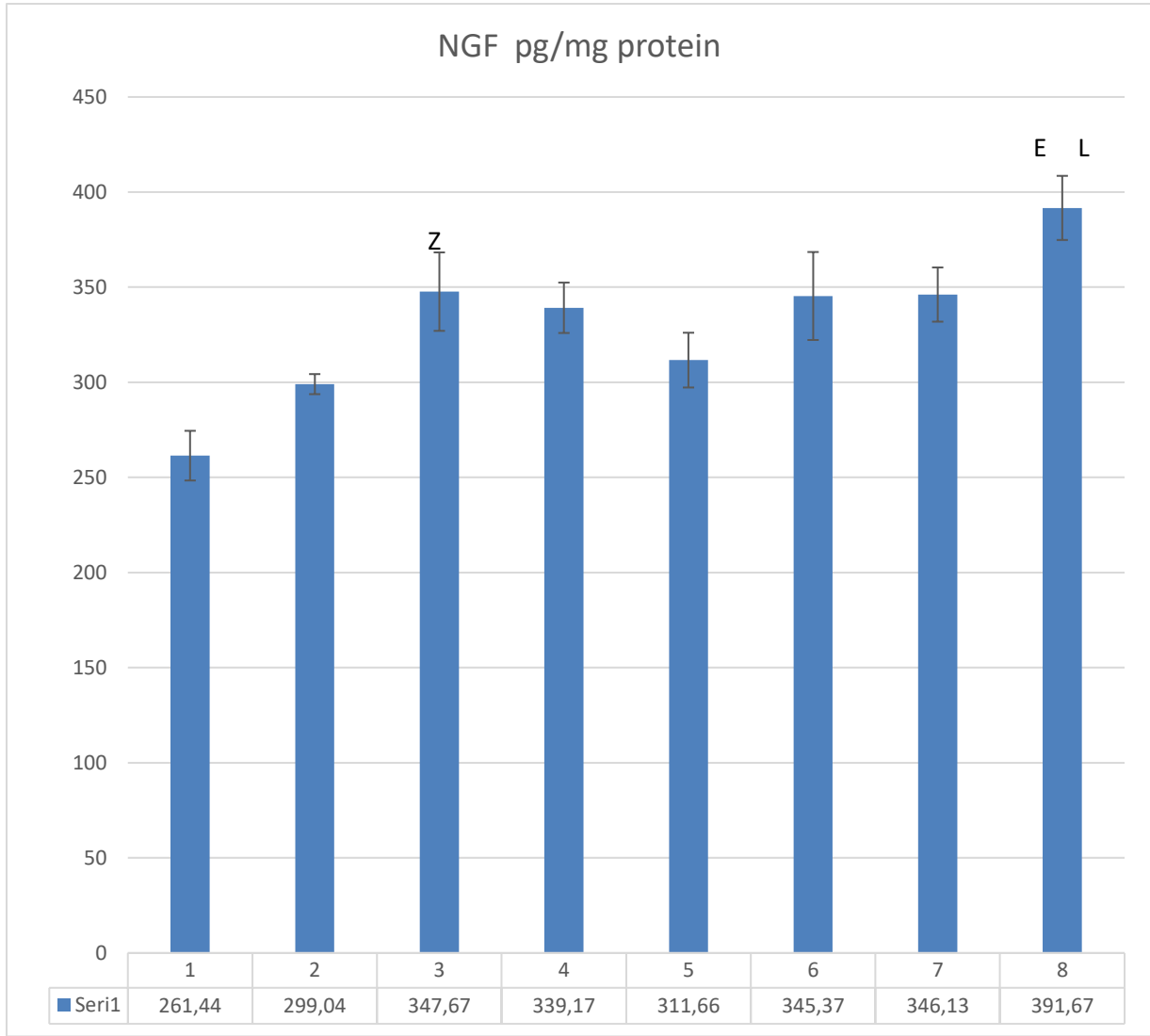
C : 1-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

D : 1-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

E : 1-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

K : 2-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

L : 2-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

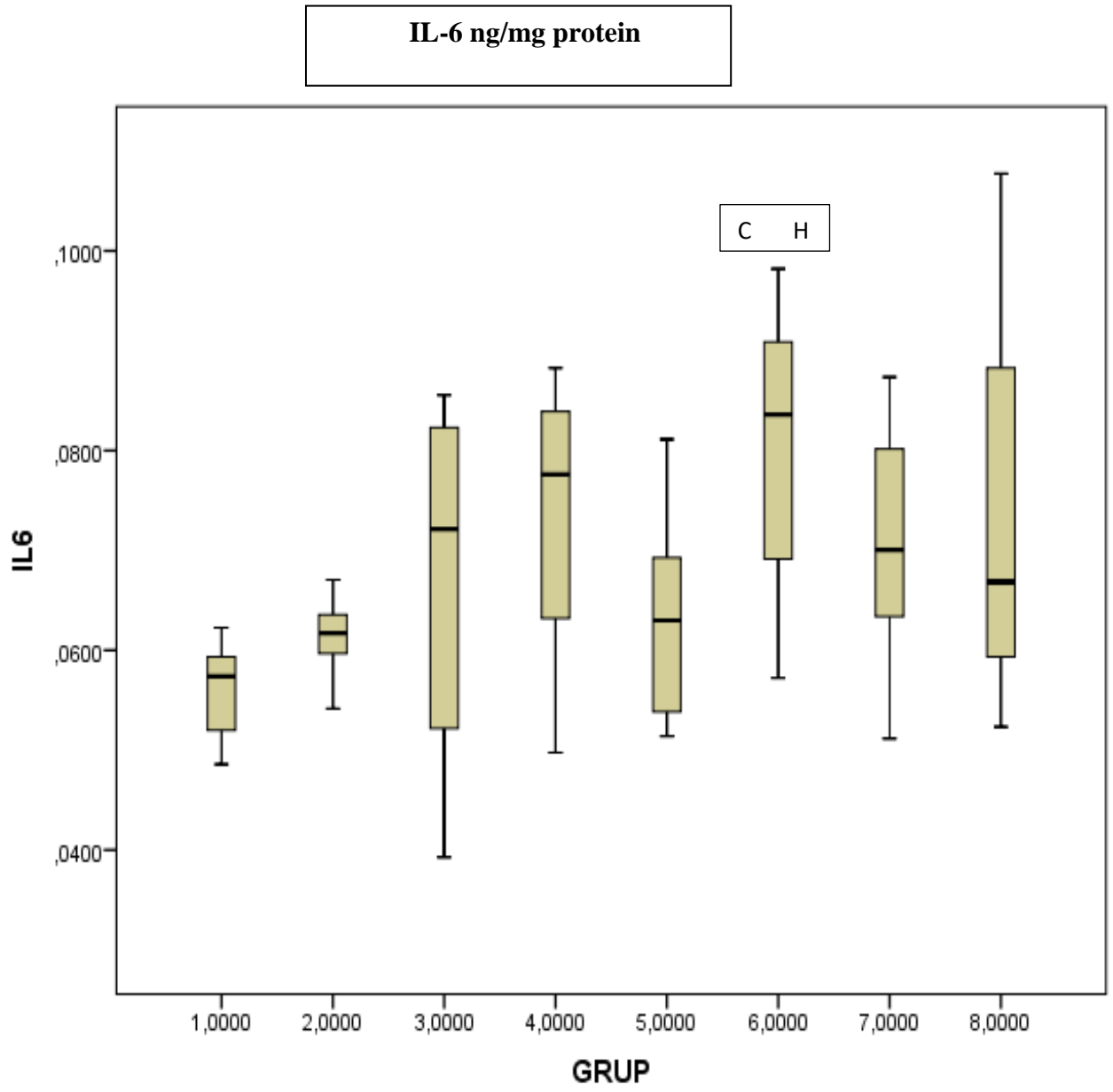


**Şekil 2.** Fare beyin dokusunda grupların ortalama NGF düzeyi

E : 1-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

L : 2-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

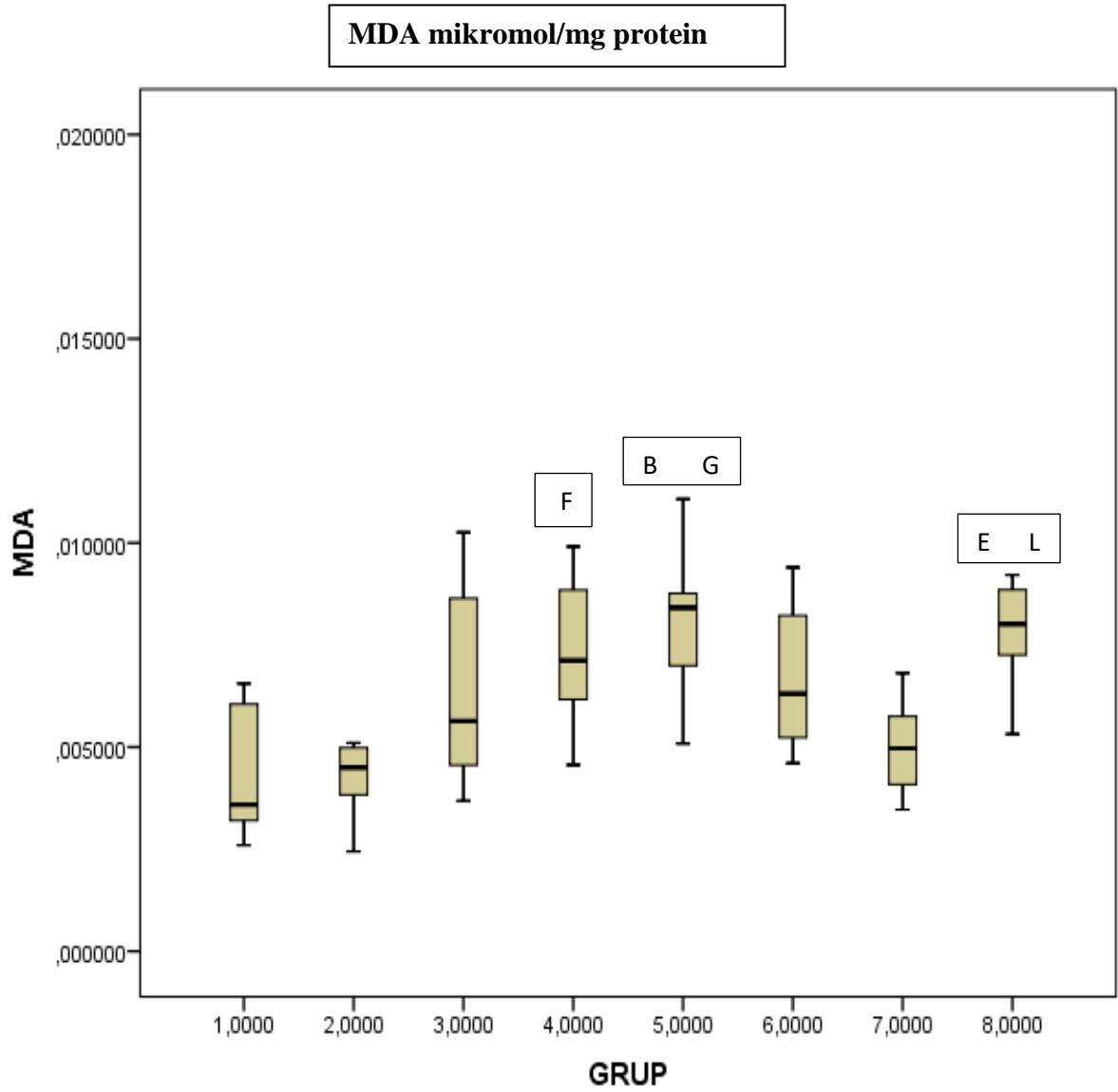
Z : 1-3. Grup arasında anlamlı fark vardır.



**Şekil 3.** Fare beyin dokusunda grupların ortanca IL-6 düzeyleri

C : 1-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

H : 2-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.



**Şekil 4.** Fare beyin dokusunda grupların ortanca MDA düzeyleri

B : 1-5. Grup arasında anlamlı fark vardır.

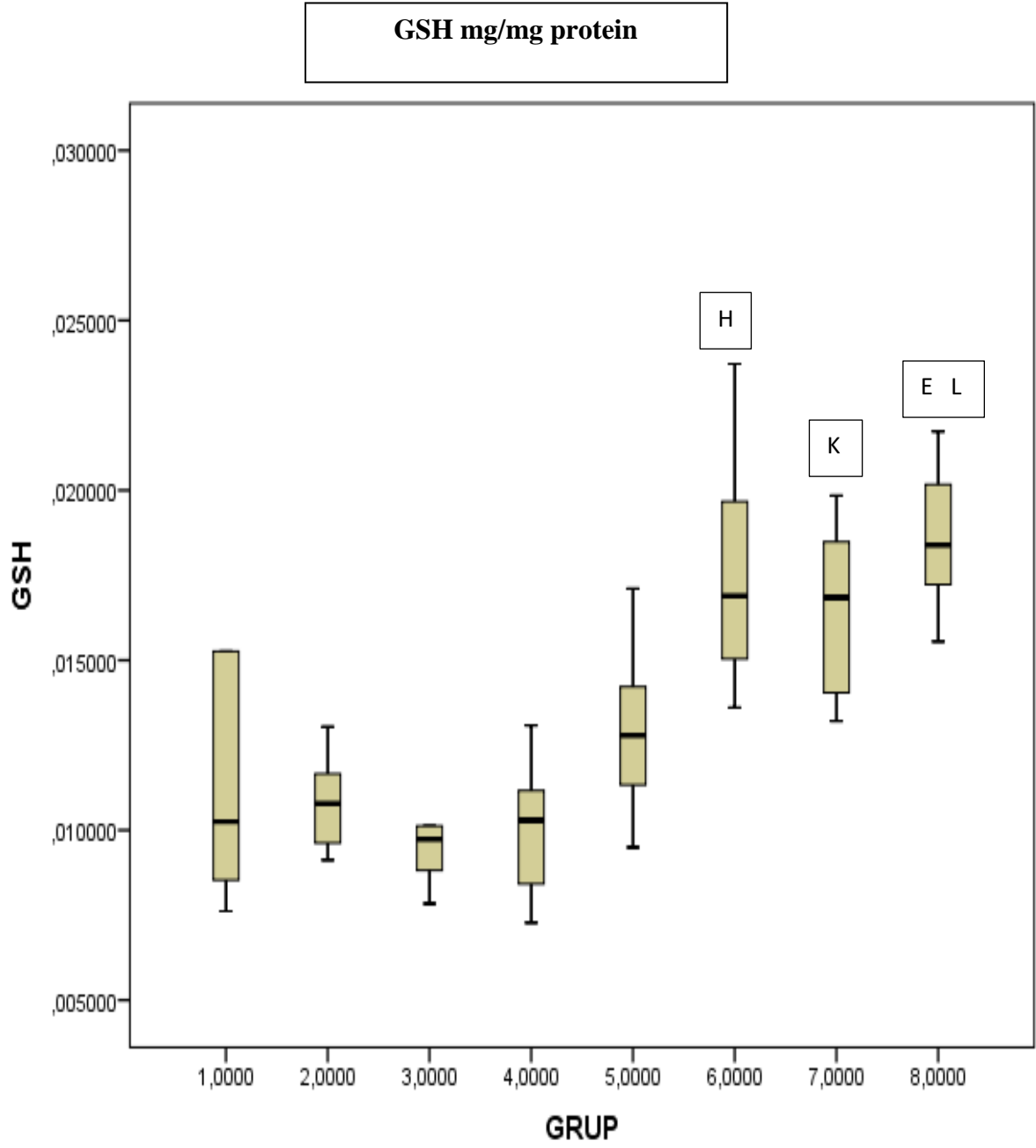
E : 1-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

F : 2-4. Grup arasında anlamlı fark vardır.

G : 2-5. Grup arasında anlamlı fark vardır.

L : 2-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.





Şekil 5. Fare beyin dokusunda grupların ortanca GSH düzeyleri

E : 1-8. Grup arasında anlamlı fark vardır.

H : 2-6. Grup arasında anlamlı fark vardır.

K : 2-7. Grup arasında anlamlı fark vardır.

L : 2-8. Grup arasında anlamlı fark vardır

## 5.TARTIŞMA

### **Naif farelerde antiepileptik etkilere sahip lakozamid, retigabin ve rufinamid kullanımının beyin nörotrofin üzerine etkileri, BDNF;**

Retigabin parsiyel nöbetlerde kullanımı onaylanmış karbamik asit etil esteri olan potasyum kanalları üzerinden etki gösterdiği düşünülen üçüncü nesil antiepileptik bir ilaçtır.<sup>44,46,47</sup> Bu mekanizma ile hiperpolarizasyon oluşmakta ve uyarılabilirlik azalmaktadır.<sup>44</sup> Rufinamid, Lennox Gastaut sendromu için kullanımı onaylanmış triazolden türeyen üçüncü nesil bir antiepileptik ilaçtır.<sup>43,44</sup> Antiepileptik etkisini voltaj kapılı sodyum kanalları üzerinden gösterir. Kanalların inaktif durumdan aktif hale geçmesini engeller, inaktif süreyi uzattığı için nöronal aşırı uyarılmayı da inhibe eder.<sup>45</sup> Lakozamid voltaj kapılı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonunu destekleyen üçüncü jenerasyon bir anti epileptiktir ve parsiyel nöbetler için kullanımı onaylanmıştır.<sup>39,41</sup> Epilepsi dışında diabetik nöropatiye bağlı ağrı içinde çalışmaları yapılmıştır fakat kullanımı henüz onaylanmamıştır.<sup>41,42</sup> Çalışmamızda, farelerin beyin dokularında nörotrofinlerden BDNF düzeyi; retigabin ilacının her iki dozunda (1-3 mg/kg) SF kontrol ile SF+DMSO kontrole göre ve rufinamid ilacının 4 mg/kg dozunda SF kontrole göre artmış olarak tespit edildi. Bir nörotrofin olarak BDNF genellikle santral sinir sisteminde eksprese edilir bu nedenle, temel merkezi nörotrofik faktör olarak kabul edilir ve nöronal fonksiyonları çeşitli açılardan etkiler. Yetişkinlerde hipokampal plastisiteye, yenidoğan nöronlarda hayatta kalma ve hipokampal integrasyona aracılık eder. Erken ve uzun dönem potensiyalizasyon fazlarını destekler, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında rol alır.<sup>65</sup> Nörotrofinler belirli reseptörler üzerinden etkilerini gösterirler, reseptörler üzerinden aktiflenen karmaşık sinyal yolları dikkate alındığında hücre fizyolojisinde pek çok rol alırlar. Nöronal farklılaşma, hayatta kalma, ölme, axonal büyüme, sinaps oluşumu, plastisite gibi süreçler nörotrofin reseptörleri üzerinden düzenlenirler ve bu süreçler özellikle çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda incelenmektedir. Ayrıca epilepsi, ağrı, psikiyatrik hastalıklar gibi diğer nöral hastalıklar ile kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve bazı kanser türlerinin patogeneğinde etkileri gösterilmiştir.<sup>66</sup> Nörodejeneratif bir patoloji olan Alzheimer hastalığı ile ilgili çalışmalarda nöron kültüründe beta amiloid maruziyetinin BDNF ile indüklenen sinyal yollarında zayıflamaya neden olduğu bulunmuş<sup>67</sup>, amiloid öncü protein (APP)-transgenik farelerde, yaşlı maymunlarda egzogen BDNF 'nin nöroprotektif olduğu, öğrenme ve hafıza performansında iyileşme sağladığı gösterilmiş bu nedenle BDNF'nin Alzheimer tedavisinde bir potansiyel taşıyabileceği düşünülmüştür.<sup>68</sup> Başka bir çalışmada BDNF'ye

bağlı sinyal yollarının beta amiloid oligomerleri varlığında gösterdiği zayıflığın olası nedenlerinden biri olarak BDNF- TrkB endositozunun bu oligomerlerin etkisiyle bozulması gösterilmiş endositoz gerçekleşemediğinde hücresel cevabında oluşmadığı düşünülmüştür.<sup>69</sup> Ayrıca yaşlı bireylerle yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalarının kognitif durumu değerlendirildiğinde iyi olanların postmortem ölçülen BDNF ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Sonuçta artan BDNF ekspresyonu ile Alzheimer hastalığının yaşlı bireyler üzerine olan negatif etkilerinin oluşmasında yavaşlama olabileceği öne sürülmüştür.<sup>70</sup> Başka bir nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığı, nigral dopaminerjik nöronların etkilendiği, tremorun, hareketlerde yavaşlamanın, ilerleyici kognitif bozukluğun görüldüğü bir patolojidir ve 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 6-hydroxydopamine (6-OHDA) kimyasalları ile indüklenebilir.<sup>66</sup> Bu hastalıktada BDNF ve reseptörü üzerinden sinyal yolları araştırılmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada post mortem beyin dokularının incelenmesiyle Parkinson hastalığında insan beyninde özellikle nigrostriatal dopamin bölgesinde BDNF miktarı anlamlı olarak düşük tespit edilmiştir.<sup>71</sup> Ratlarda 6-OHDA modeli ile oluşturulan Parkinson modelinde BDNF üreten fibroblastların intrastriatal olarak verilmesi sinir uçlarının kaybına engel olmuş ve dopaminerjik yoldaki nigrostriatal hücre gövdelerinin kaybını önlemiştir.<sup>72</sup> BDNF reseptörü olan Trk-B üzerinden yapılan araştırmalarda mevcuttur. Farelerde Trk-B reseptörüne sahip dopaminerjik nöronlar MPTP ile oluşturulan bir modelde daha dayanıklı bulunmuş, sonuçlar BDNF-Trk B sinyal yolağının dopaminerjik nöronların korunmasında önemli bir rol alabileceğini, Parkinson hastalığının tedavisi için bir potansiyel taşıyabileceğini düşündürmüştür.<sup>73</sup> Yine farelerde yapılan bir çalışmada bir Trk-B agonisti kullanılarak MPTP ve 6-OHDA ile indüklenen Parkinson modelinde nöroprotektif etkiler gözlenmiştir.<sup>74</sup> BDNF'nin değerlendirildiği başka bir örnek ise migrendir ve kronik migren hastalarında serum BDNF düzeyleri düşük bulunmuştur.<sup>75</sup> Hipoksik iskemik beyin hasarında BDNF ve NGF cevabı izlenmiş, hasar sonrası görülen apoptoz ile nörotrofin artışı arasında ters ilişki görülmüş. Düzeylerindeki artışın nöronal ölümü önlemede ya da hasarı tamir etmede rol oynadığı bu nedenle nörotrofin ekspresyonunu düzenleyebilecek ilaçlardan, hipoksik iskemik beyin hasarının tedavisinde yararlanılabileceği düşünülmüştür.<sup>76</sup> İncelenen başka bir hastalık ise epilepsidir. Epilepsi belirlenemeyen zamanlarda ortaya çıkan nöbetler ile karakterize oldukça sık görülen kronik bir sinir sistemi hastalığıdır.<sup>77</sup> Epilepsi için altta yatan patofizyolojik mekanizmaları anlamaya yönelik araştırmalar devam etmektedir. Sonuç olarak epilepsi tedavisi semptomatiktir ve nöbetlerin sadece bir kısmı ilaçlar ile kontrol altına alınabilir.<sup>77</sup> Epileptogenezin hücresel ve moleküler mekanizmalarının açığa çıkarılması hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde özgün yaklaşımların gelişimini sağlayabilir. Bu

kapsamda BDNF'nin sağlıklı bir beyinde parçası olduğu süreçler düşünüldüğünde bu nörotrofinde bir fazlalık epileptogenezde kritik bir rol oynayabilir. Yapılan araştırmalarda iki yönlü çok çeşitli sonuçlar ortaya konmuştur. Örneğin fare modelinde Kainat ile indüklenen nöbetlerde eş zamanlı olarak BDNF artışı görülmüş ayrıca TrkB sinyali incelenerek bu yolakta artışın epileptogenez sürecini kolaylaştırdığı gözlenmiştir.<sup>78</sup> Öte yandan yetişkin epilepsi hastalarının serumunda azalmış BDNF seviyeleri izlenmiştir.<sup>79</sup> Başka bir çalışma ile ratlarda intrahipokampal BDNF infüzyonunun nöbet oluşumunu tetiklediği tespit edilmiştir.<sup>80</sup> Buna karşın BDNF sekrete eden hücreler ratlarda kainik asitle indüklenen nöbetler için iyileştirici etkiler oluşturmuş, kainik asit toksisitesinden hücreleri korumuştur. Bu durumun BDNF dozu ile ilgili olduğu düşünülmüş, önceki çalışmalardan daha düşük doz infüzyonun uygulandığı ifade edilmiştir.<sup>81</sup> BDNF'nin etkileri incelenirken Nöropeptid Y (NPY) düzeylerinin, intrahipokampal olarak BDNF kronik infüzyonuna maruz bırakılan ratlarda arttığı tespit edilmiş, NPY için de yapılan çalışmalarda NPY'nin antiepileptik etkileri görülmüştür.<sup>82,83</sup> Dışardan BDNF sağlanmasıyla oluşan etkilerin yanı sıra endojen BDNF düzeyleri üzerine etki gösteren koşullar da incelenmiştir. Huntington hastalığına sahip fare modelinde ampakin ilacı BDNF düzeylerini artırarak hafıza üzerine olumlu etkiler göstermiştir.<sup>84</sup> Amitriptilin ve venlafaxin gibi antidepresan ilaçlarla yapılan bir çalışmada ratlarda BDNF düzeyinin arttığı gözlenmiş, Alzheimer hastalığına sahip insanlarda cerebrolysin kullanımı ile BDNF düzeyi arasında ilişki saptanmıştır.<sup>85,86</sup>

Bu çalışmalar bize BDNF'nin; hastalığın patolojisine, hedef aldığı reseptöre göre farklı tablolar oluşturabildiğini ek olarak hastalığın klinik izleminde tedavide sağlayabileceği faydalar adına potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda naif farelerde uyguladığımız retigabin ve rufinamid ilaçlarının neden olduğu yüksek BDNF düzeyleri, bize bu ilaçların BDNF'nin nöroprotektif etkileri nedeniyle nöronal hastalıkların seyrinde oluşan nöron hasarına karşı koruyucu olabileceğini nöron hasarı ile oluşan fonksiyonel kayıpların önüne geçebileceğini ve iyileşme sürecine katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür.

### **Naif farelerde antiepileptik etkilere sahip lakozamid, retigabin ve rufinamid kullanımının beyin nörotrofin üzerine etkileri, NGF;**

Çalışmamızda retigabin 3 mg/kg kullanılan grupta SF kontrol ve SF+DMSO kontrole göre lakosamid (2 mg/kg) kullanılan grupta SF kontrol grubuna göre anlamlı bir artış izlendi. NGF santral ve periferik sinir sisteminde belirli nöron türlerinin hayatta kalması, büyümesi ve korunmasında önemli yeri olan, BDNF gibi nörotrofinler içinde yer alan bir proteindir.

Beyinde NGF, kolinerjik bazal ön beyin ve bazı striatal ve hipokampal nöronlardan gelen projeksiyon nöronlarının hedefleri olan korteks ve hipokampüste üretilir.<sup>87</sup> NGF üzerine yapılan bir çalışmada hipokampüste azalmış NGF protein düzeyine sahip farelerde hafıza sorunu görülmüş ve hipokampüste azalmış kolinerjik innervasyon izlenmiştir. Lateral ventrikül içine NGF infüzyonu hipokampüste kolinerjik innervasyon üzerine olumlu etkiler sağlamış, bu durum NGF'nin kolinerjik sistem ile hipokampal etkileşimde olgunlaşmayı sağladığını düşündürmüştür.<sup>88</sup> Birçok hastalıkta, BDNF gibi NGF'de araştırma konusu olmuştur. Örneğin ratlarda, travmatik beyin hasarındaki etkileri incelenmek üzere NGF üretimi için geni yapılandırılan pseudolentivirüs hipokampüse enjekte edilmiş ve kognitif fonksiyonların iyileşmesinde hızlanma görülmüştür.<sup>89</sup> NGF kolinerjik nöronlar üzerine etkili olduğundan ve Alzheimer hastalığında bu nöronlar hasar gördüğünden dolayı Alzheimer hastalığında NGF sıklıkla incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada insan NGF'si kodlayan bir vektör ratlara enjekte edildiğinde nöroprotektif ve nöronları yeniden yapılandırıcı etkileri izlenmiştir.<sup>90</sup> Huntington hastalığına sahip bireylerde plazma NGF düzeyleri incelenmiş ve sağlıklı gruba göre düşük tespit edilmiştir.<sup>91</sup> Retinitis pigmentozalı ratların retinal hücreleri ile yapılan bir çalışmada NGF'nin fotoreseptörler üzerinde sağkalım ve dejenerasyon önleyici etkileri gözlenmiştir.<sup>92</sup> Bu olumlu etkilerin yanısıra epilepsi üzerine olan araştırmalarda fare ve ratlarda limbik nöbet sonrası artan NGF messenger RNA düzeyleri görülmüş, ratlarda intraventriküler anti NGF verilmesi nöbet oluşumu için gerekli olan ateşlemeyi geciktirmiş ve nöbet sonrası gelişen epileptogenezde görülen morfolojik değişiklikleri inhibe etmiş, NGF verilmesi ise nöbet oluşumunu güçlendirmiş ve nöbetlere neden olduğu düşünülen morfolojik değişiklikleri arttırmış.<sup>93-95</sup> İlaçların NGF üzerine olan etkisiyle ilgili olarak oubain ile mani oluşturulan rat modelinde oubainin azalttığı NGF düzeyinin valproik asit, lityum ve sodyum bütirat ile artması bipolar bozukluklarda nörotrofinlerin önemli olabileceğini düşündürmüştür.<sup>96</sup> Çok yönlü etkileri düşünüldüğünde çalışmamız sonucu retigabin (3 mg/kg) ve lakozamid (2 mg/kg) gruplarında elde edilen yüksek NGF düzeyleri, bu ilaçların kullanım amacı olan epilepside kontrol altına alınmış nöbetleri olan hastalarda epileptik alan dışında nöronlar için koruyucu olabilir ve bu hastalıkla görülen fonksiyonel bozukluklar için umut sağlayabilir. NGF'nin epileptogenez ile ilişkisi olduğuna yönelik çalışmalar mevcut olduğundan ve sonuçlarımız sağlıklı hayvan gruplarında elde edilmiş olduğundan epileptik modellerde ileri araştırmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Bunun dışında dejeneratif sinir sistemi hastalıklarında artan nörotrofik faktör düzeyleri hastalığın seyrinde hastaya olumlu katkılar sağlayabileceğinden, tedaviye eklenebileceğini düşünmekteyiz. Fakat bulduğumuz sonuçlar ilaçların akut uygulamaları ile elde edildiğinden ve bu hastalıkların

tedavileri kronik olduğundan, kronik kullanımlı hayvan deneyleri ve hasta modelleri üzerinde daha kapsamlı araştırmalar yapılmalı, ilaçların hastalıklar üzerine etkileri ortaya konmalıdır.

### **Naif farelerde antiepileptik etkilere sahip lakozamid, retigabin ve rufinamid kullanımında beyin IL-6, MDA, GSH düzeyleri üzerine etkileri**

IL-6 pleotropik etkili bir sitokindir. Belirgin fonksiyonları; karaciğerde akut faz cevabını indüklemesi ve B hücrelerinde çoğalma, farklılaşma ve immünglobulin üretimini desteklemesidir.<sup>34</sup> Beyinde IL-6 önemli etkilere sahiptir; hipotalamik – pitiüter - adrenal aksın aktivasyonu, yiyecek alımının azaltılması, ateşin indüklenmesi ve nöronal büyüme bunlar arasında sayılabilir.<sup>34</sup> Santral sinir sisteminin nöron homeostazı, astrogliogenezis, nöronal farklılaşma gibi birçok fizyolojik sürece katkısı olmaktadır. İnflamatuar süreçlerdeki IL-6 rolü nöroinflamatuvar katılımı olan nörodejeneratif hastalıklarda, hipoksi, iskemi, enfeksiyon, epileptik nöbetler, travmatik beyin hasarı gibi patolojilerde onu araştırma konusu yapmıştır.<sup>97</sup> IL-6 düzeyleri fizyolojik koşullarda düşük seviyelerde olmakla beraber Alzheimer, Parkinson, beyin kanseri, Multiple Skleroz ve beyin iskemisi gibi nörolojik hastalıklarda belirgin artış gösterir.<sup>35</sup> Spinal kord hasarını konu alan bir incelemede in vitro IL-6 eklenmesi nörit uzanımlarının oluşumunu desteklemiş, ratlarda in vivo olarak intratekal verilmesi sinapsların yeniden düzenlenmesinde etki göstermiş ve fonksiyonel iyileşme sağlamış.<sup>98</sup> Ayrıca IL-6'nın nörotrofin ekspresyonu üzerinde santral sinir sisteminin belirli bölgelerinde belirli nörotrofinler lehine artış sağladığı bulunmuş.<sup>99</sup> Santral sinir sisteminde nöro-inflamasyonun rol aldığı Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda IL-6 düzeyi genellikle değişerek artar.<sup>100,101</sup> Beta amiloidin glial hücreleri etkileyerek IL-6 dahil çeşitli inflamatuvar sitokinlerin üretimini tetiklediği bulunmuştur.<sup>102</sup> Ek olarak hücre kültüründe IL-6'nın çözünebilir reseptörleri üzerinden amiloid öncü protein üretiminde artışa neden olduğunda görülmüştür.<sup>103</sup> Başka bir çalışma ile kortikal nöron kültüründe beta amiloid ve IL-6'nın beraberliğinin nöronal hasarı artırdığı tespit edilmiştir.<sup>104</sup> Diğer yandan IL-6 için, beta amiloid plaklarının ortamdaki temizlenmesi ile ilgili olumlu etkiler gösterdiğide ortaya konmuştur.<sup>105</sup> Parkinson ve IL-6 arasında ki ilişkiye yönelik çalışmalarda ise IL-6'nın dopaminerjik nöron kültüründe Parkinson modeli oluşturmak için kullanılan 1-metil-4 fenil-pyridinium (MPP+) tarafından indüklenen nörotoksik etkilere karşı koruyucu olduğu, rapamisin isimli bir etkenin Parkinson hayvan modelinde IL-6 artışı sağladığı ve nöroprotektif olduğu gösterilmiştir.<sup>106,107</sup> Parkinson hastalarıyla yapılan bir çalışmada ise bu hastalıkla beraber görülen güçsüzlük kliniğine sahip hastalarda IL-6 yükselmiş olarak bulunmuştur.<sup>108</sup> Multiple Skleroz ( MS ) sinir sisteminin inflamatuvar demyelinizan hastalığıdır. MS ile IL-6 arasındaki ilişkiyi anlamak ve

tedavi hedefleri belirlemek adına bir çok çalışma mevcuttur. İnsanlardaki MS ile patolojik ve histolojik karakterleri paylaşan deneysel otoimmün ensefalomyelit murin modeli kullanılarak IL-6 defisiti olan farelerin deneysel otoimmün ensefalomyelit gelişimine dirençli olduğu, IL-6R monoklonal antikor tedavisi uygulanmış ratlarda IgG ile yapılan tedaviye göre hastalığın başlamasının geciktiği, insidansın azaldığı, hastalığın ciddi seyrinin baskılandığı bulunmuştur.<sup>109,110</sup> Epilepsi ile IL-6 ilişkisine yönelik araştırmalarda ise epileptik hastalarda nöbet sonrası anlamlı derecede IL-6 artışı saptanmış<sup>111</sup>, izlenen bu artış epileptik hastalarda kronik inflamatuvar varlığı desteklemiştir.<sup>112</sup> Jeneralize nöbet tanısı alan hastalardan tedavi öncesi ve 4-6 ay valproik asitle tedavi sonrası bakılan serum IL-6 düzeyi tedavi ile anlamlı olarak düşük bulunmuştur.<sup>113</sup> Bu sonuçlar birçok hastalıkta inflamatuvar olayların sürece dahil olduğunu ve tedavi adına potansiyel taşıdıklarını göstermesi açısından oldukça önemlidir. Çalışma sonucu rufinamid (4 mg/kg) kullanımı ile elde ettiğimiz yüksek IL-6 düzeyi bir yandan inflamatuvar aktivasyonun negatif etkileri düşünüldüğünde olumsuz bir özellik olarak algılanabilir. Ancak IL-6 farklı reseptörler üzerinden farklı etkiler gösterebilir ve daha önce bahsedildiği gibi nöron yaşamını destekleyen nörotrofin üretiminde artış sağlayabilir ya da biriken plakların elimine edilmesine katkıda bulunabilir. Bu verilerin ışığında sağlıklı farelerle yaptığımız çalışmaların ileri bir aşaması olarak belirli hasta gruplarında uzun dönemli değerlendirilmesiyle hem ilaçların IL-6 üzerine olan etkileri hemde IL-6 üzerinden hastalıklara olan etkileri aydınlatılabilir.

Normal hücre sel solunum esnasında ya da stresli koşullar altında hücrelerde çiftleşmemiş elektronlar taşıyan ürünler açığa çıkar. Bu prooksidan moleküller oldukça kararsızdır ve çevresinde bulunan hücre sel makromolekülleri oksidize edebilir. Normal koşullar altında bu ürünler patojenlerin ve antijenlerin temizlenmesinde kullanıldığından hücre için önem arz ederler. Bununla beraber bu maddelerin yoğun üretimi ve birikimiyle prooksidan moleküller; proteinlere, lipidlere, karbonhidratlara ve nükleik asitlere zarar verebilmektedir. Zamanla artan oksidatif stresin kanser, diyabet, makuler dejenerasyon, Alzheimer, Parkinson gibi yaşlanmayla ilişkili dejeneratif hastalıklara katkı sağladığı düşünülmektedir.<sup>114,115</sup>

Aşırı oksidatif stresin santral sinir sisteminde nöronal apoptoza neden olabileceği düşünülmüştür.<sup>116</sup> Oksidan-antioksidan sistem ve nörolojik hastalıklar arasında ki ilişkiyi anlamaya yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin Alzheimer hastalarından elde edilen lenfoblastların azalmış GSH içeriği gösterilmiş, başka bir çalışmada ise Alzheimer hastalarının lenfoblast ve fibroblastlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek MDA tespit edilmiştir.<sup>117,118</sup> Rotenon ile indüklenerek Parkinson modeli oluşturulan ratlarda yapılan

bir incelemede striatum ve midbrainde MDA'nın arttığı, GSH düzeylerinin azaldığı bulunmuş ayrıca bu çalışmada kafeinin etkileri incelenerek lipid peroksidasyonunda azalma GSH seviyelerinde artış izlenmiştir.<sup>119</sup> Son yıllarda giderek artan sayıda çalışma ile oksidatif stresin epilepsinin başlangıcı ve gelişimi için katkıda bulunan bir faktör ve geri dönüşsüz nöronal hasarın bir endeksi olduğu düşünülmektedir.<sup>120</sup> Epileptik aktivitenin olası mekanizmalarından birinin oksidatif stres olduğu ileri sürülmüştür.<sup>121</sup> Ayrıca epileptiform aktivitenin de, hücre ölümüne ve nöronal dejenerasyona yol açan mekanizmaya katkıda bulunduğu düşünülen reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimine neden olduğu bilinmektedir.<sup>122</sup> Epilepsi modelleri üzerinde ki çalışmalarda Theiler's murin ensefalomyelit virüs ile temporal lob epilepsi oluşturulan farelerde oksidatif stresin varlığı araştırılmış ve nöbet gelişen enfekte farelerde GSH düzeyi düşük bulunmuştur. Bu modelde oksidatif stresin epilepsi gelişimine katkı sağladığı düşünülmüştür. Bu durum oksidatif stresi hedef alan tedavilerin bir potansiyel taşıyabileceğini göstermiştir.<sup>123</sup> Penisilin ile epilepsi oluşturulan ratlarda resveratrolün antikonvulsan aktivite ile oksidan-antioksidan parametreler üzerine etkileri bakılmış, epilepsi olup resveratrol verilmeyen grupta MDA yüksek GSH düşük bulunurken resveratrol verilen gruplarda MDA düşmüş GSH yükselmiş olarak bulunmuş ve epileptik nöbetlerin baskılanması için etkili olabileceği düşünülmüştür.<sup>124</sup> Çalışmamız ile elde ettiğimiz sonuçlar retigabin (3 mg/kg), rufinamid (2 mg/kg) gruplarının SF kontrol ve SF+DMSO kontrole göre; lakozamid (4 mg/kg) grubunun SF+DMSO kontrole göre yüksek MDA düzeylerine sahip olduğunu gösterdi. Oksidan sistemin hücresel elemanlara zarar verdiği ve bunlar üzerinden fonksiyonel bozulma sağladığı göz önüne alındığında, ilaçların kullanımı sonucu oluşan MDA düzeylerindeki artışın hücreye zarar verebileceği akla gelmektedir. Bu ilaçların kullanımında antioksidan sistemin desteklenmesi benimsenirse ilaç kullanımıyla oluşabilecek yan etkilere karşı bir savunma sağlanabileceğini düşünmekteyiz. Diğer yandan GSH düzeyleri incelendiğinde retigabin (3 mg/kg) grubunda artmış MDA düzeyleri ile beraber SF kontrol ve SF+DMSO kontrole göre artmış GSH düzeyleride izlenmiştir. Bu durumun artmış oksidatif strese karşı hayvanların antioksidan düzeylerini (GSH) artırmasıyla açıklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca retigabin (1 mg/kg) ve rufinamid (4 mg/kg) gruplarında da SF+DMSO kontrole göre artmış GSH düzeyleride izlenmiştir. Artmış GSH düzeyleri hastalıklar ile beraber hücrenin içinde bulunduğu stresli koşullar göz önüne alındığında tedavi sırasında avantaj sağlayabilir. Diğer yandan bu ilaçların birer kimyasal olduğu ve sonuçların sağlıklı farelerden akut uygulama ile elde edildiği düşünüldüğünde bir hastalık sürecinde kronik tedavi ile gerek MDA gerekse GSH üzerine etkileri değişebilir ve aradaki denge tamamıyla oksidan veya antioksidan sistemin lehine dönebilir ya da değişmeyebilir. Bu verilerin ışığında



sağlıklı farelerle yaptığımız çalışmaların ileri bir aşaması olarak belirli hasta gruplarında hayvan ve insan çalışmalarıyla ilaçların uzun dönemli etkisinin değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.



## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Lakozamid (2 mg/kg) dozu ile akut uygulamada NGF düzeyi SF kontrol grubuna göre artmıştır. NGF'nin nöroprotektif etkileri düşünüldüğünde, ilacın bu dozuyla hayvanlarda gerek nörodejeneratif gerekse epilepsi gibi hastalık modellerinde nöronal kayıpla birlikte oluşabilecek fonksiyon bozukluklarının tedavisinin sağlanabileceğini düşünmekteyiz. Lakozamid (4 mg/kg) grubunda ise MDA düzeyi SF + DMSO kontrol grubuna göre artmış olarak ölçüldü. MDA seviyesinde ki artış lakozamidin 4 mg/kg dozlarında oksidan yükü artırıp hastalıklarda hücrelere ek olarak bir oksidatif stres yükü getirebilir. Akut uygulama ile ulaşılan bu sonucun kronik uygulamalarla test edilmesi gerekmektedir. Ayrıca kronik kullanımın etkilerini tam olarak belirleyebilmek için, bu çalışmada incelenenlerin yanısıra diğer nörotrofinler, oksidan-antioksidan parametreler ve sitokin çalışmalarının yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Bu deneylerin hastalardaki tedavi edici dozlarda parametrelerin serum düzeylerine bakılarak veya post mortem doku düzeyleri değerlendirilerek tekrarlanması gerektiğini ve kapsamlı çalışmaların konuya ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Rufinamid (2 mg/kg) kullanımında MDA düzeyi SF + DMSO kontrol grubuna göre artmış olarak ölçüldü. Rufinamid (4 mg/kg) dozu ile akut uygulamada BDNF düzeyi SF kontrol grubuna göre artmış ve IL-6 düzeyi SF kontrol grubu ve SF+ DMSO kontrol grubuna göre artmış olarak ölçüldü. Rufinamidin 4 mg/kg dozuyla BDNF üzerine olumlu etkileri görülmesine rağmen 2 mg/kg dozu kullanıldığında MDA yüksekliği de olduğundan akut uygulama ile elde edilmiş bu verilerin kronik kullanımla değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca IL-6 artışı nedeniyle ve IL-6'nın çok yönlü etkileri dikkate alındığında spesifik hastalık bazında kronik kullanımda ilaçların tüm bu parametreler üzerine etkileri gerek hayvan gerekse insan çalışmalarıyla incelenmelidir.

Retigabin (1 mg/kg) dozu ile akut uygulamada BDNF düzeyi SF kontrol, SF + DMSO kontrol gruplarına göre artmış olarak ölçüldü. GSH, SF + DMSO kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Retigabin (3 mg/kg) dozu ile akut uygulamada BDNF, MDA ve GSH düzeyleri SF kontrol, SF + DMSO kontrol gruplarına göre yüksek bulundu. Retigabinin farklı dozlarıyla gördüğümüz BDNF yüksekliği, epileptogenez ile ilişkisi düşünüldüğünde kontrol altında tutulan epilepside ve nöroprotektif etkilerinden fayda sağlayabileceğimizi düşündüğümüz bir çok hastalık grubunda faydalı olabilir. İlacın MDA üzerine artış sağlayıcı bir etkisi olmasına rağmen GSH düzeylerinin de artırıyor olması hücre lehine bir duruma neden

olup, oksidatif stresi baskılayabilir. Akut uygulama ile ulaşılan bu sonucun kronik uygulamalarla test edilmesi nöronların yaşamını destekleyen nörotrofinlerin üzerine etkileri olup olmadığını ortaya koyabilir ve kronik ilaç kullanımıyla oksidan yükün artıp artmadığı artıyorsa bu artışın hücrelere verebileceği zararlar belirlenebilir diye düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonuçları ile epilepsi için kullanımda olan incelediğimiz ilaçların, etki mekanizmalarının iyon kanalları gibi yapılar üzerinden olması dışında, hücrenin bulunduğu yaşam ortamını çeşitli trofik faktörler, sitokinler, oksidan - anti oksidan parametreler üzerinden etkileyebileceğini düşünmekteyiz. İlaçlar ile değişen bu biyokimyasal parametreler tedavi ile görülen klinik etkinin oluşumunda katkı sağlıyor olabilir. Tüm sonuçlar dikkate alındığında; ilaçların akut kullanımıyla ulaşılan bu sonuçların uzun süreli kullanım ve spesifik hastalık bazında geniş kapsamlı çalışmalar ile değerlendirilmesi gerektiğini ve santral sinir sistemini ilgilendiren bir çok hastalıkta etkilerinin incelenmesinin faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

## 7.ÖZET

Yeni Nesil Antiepileptik İlaçların Akut Uygulama Sonrası Sağlıklı Farelerin Beyin Dokusunda BDNF, NGF, NT3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA, GSH Düzeyleri Üzerine Etkisi

**Amaç:** Bu çalışmada amacımız; sağlıklı farelerde yeni nesil antiepileptik ilaçlardan lakozamid, rufinamid ve retigabinin, akut uygulama sonrası beyin dokusunda BDNF, NGF, NT3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA, GSH düzeyleri üzerine etkisini incelemektir.

**Gereç ve Yöntem:** 89 adet BALB/c türü, albino, erkek fare, altısı ilaç ve ikisi kontrol grubu olmak üzere toplamda sekiz gruba ayrıldı. Farelere intraperitoneal yolla lakozamid, rufinamid ve retigabin ilaçlarını uyguladıktan 24 saat sonra farelerin beyin dokuları BDNF, NGF, NT-3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA, GSH çalışılmak üzere alındı. Bu parametrelerden BDNF, NGF, NT-3, TNF $\alpha$ , IL-6 ELİSA metoduyla ölçüldü. MDA, GSH düzeyleri ise spektrofotometrik olarak tayin edildi.

**Bulgular:** Lakozamid (2 mg/kg) dozu ile akut uygulamada NGF düzeyi SF kontrol grubuna göre artmıştır. Lakozamid (4 mg/kg) grubunda ise MDA düzeyi SF + DMSO kontrol grubuna göre artmış olarak ölçüldü. Rufinamid (2 mg/kg) kullanımında MDA düzeyi SF + DMSO kontrol grubuna göre artmış olarak ölçüldü. Rufinamid (4 mg/kg) dozu ile akut uygulamada BDNF düzeyi SF kontrol grubuna ve IL-6 düzeyi SF kontrol grubu ve SF + DMSO kontrol grubuna göre artmış olarak ölçüldü. Retigabin (1 mg/kg) dozu ile akut uygulamada BDNF düzeyi SF kontrol, SF + DMSO kontrol gruplarına göre artmış olarak ölçüldü. GSH, Retigabin (1 mg/kg) dozu ile SF + DMSO kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Retigabin (3 mg/kg) dozu ile akut uygulamada BDNF, MDA ve GSH düzeyleri SF kontrol, SF + DMSO kontrol gruplarına göre yüksek bulundu.

**Sonuç:** Çalışmamızın sonuçları dikkate alındığında, yeni nesil antiepileptik ilaçlardan retigabin, rufinamid ve lakozamidin bazı dozlarının, incelediğimiz nörotrofinler, sitokinler ve oksidan-antioksidan parametrelerden birkaçı üzerine etki ettiğini gözlemledik. Bu bulgular bize, her üç ilaçta epilepsi tedavisindeki mekanizmaları dışında, hücrenin bulunduğu yaşam ortamını çeşitli trofik faktörler, sitokinler, oksidan, anti oksidan parametreler üzerinden etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak ilaçların nörotrofinler, sitokinler ve oksidan antioksidan sistem üzerine kronik etkilerinin değerlendirilmesini sağlayacak insan ve hayvan çalışmalarının yapılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz

## 8. ABSTRACT

Effect of new generation antiepileptic drugs on NGF, NT3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA, GSH levels in the brain of healthy mice, after acute administration

**Background:** Our purpose in this study is to investigate the effects of lacosamide, rufinamide, and retigabine, new generation antiepileptic drugs, on NGF, NT3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA, GSH levels in the brain after acute administration of these drugs in healthy mice.

**Materials and Methods:** 89 BALB / c, albino, male mice were divided into eight groups totally, six groups of them are drug groups and two groups of them are control groups [Saline control (SF), Saline+ Dimethyl sulfoxide control (SF+DMSO)]. After administering lacosamide, rufinamide and retigabine drugs via the intraperitoneal route, the brain tissues of the mice were taken to measure BDNF, NGF, NT-3, TNF $\alpha$ , IL-6, MDA, and GSH after 24 hours. BDNF, NGF, NT-3, TNF $\alpha$ , IL-6 were measured by ELISA method. MDA and GSH levels were determined by spectrophotometrically.

**Results:** In acute treatment with lacosamide (2 mg/kg) NGF levels increased compared to SF control group. Lacosamide (4 mg /kg) and rufinamide (2 mg/kg) groups exhibited raising MDA levels compared to SF + DMSO control group. In acute treatment with rufinamide (4 mg/kg), BDNF levels increased compared to the SF control group, and IL-6 levels increased compared to the SF control group and the SF + DMSO control group. In acute treatment with retigabine (1 mg/kg) group, the levels of BDNF was measured as increased compared to SF control and SF + DMSO control groups. GSH levels were found higher in retigabine (1 mg/kg) group than that of the SF + DMSO control group. In acute treatment with retigabine (3 mg/kg); BDNF, MDA and GSH levels were found increased compared to SF control, SF + DMSO control groups.

**Conclusion:** With respect to our findings, we observed that retigabine, rufinamide and lacosamide, new generation of antiepileptic drugs, at different doses affected the some of the neurotrophins, cytokines, and oxidant-antioxidant parameters, we investigated. These data suggest that all three drugs, apart from their mechanisms of epilepsy treatment, might influence the cell environment by various trophic factors, cytokines, oxidants, and antioxidant parameters.

As a result, we think that it will be appropriate to do human and animal studies which will provide evaluation of the drugs chronic effects on neurotrophins, cytokines and oxidant-antioxidant system.



## 9. KAYNAKLAR

1. Snell R.S. Sinir sistemine giriş ve organizasyon (çeviri: Yıldırım M., Marur T.). Klinik Nöroanatomi (Çeviri editörü: Yıldırım M.).2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2015:1-33 [Snell R.S. Introduction and organization of the nervous system. Clinical Neuroanatomy. 7.ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2010:1-33]
2. Kierszenbaum Abraham L. Nervous Tissue. *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*. 2.basım. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007:221-250.
3. Barrett K.E., Barman S.M., Boitano S., Brooks H.L. Uyarılabilir doku: sinir (çeviri: Yeğen B. Ç.) Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi (Çeviri editörü: Gökbel H.) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2015:83-96 [Barrett K.E., Barman S.M., Boitano S., Brooks H.L. Ganong's Review of Medical Physiology,24.ed. Mc Graw Hill]
4. Barde Y-A. Biological roles of neurotrophins. In: Hefti F, ed. *Neurotrophic Factors*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1999:1-32.
5. Cohen S, Levi-Montalcini R. A Nerve Growth-Stimulating Factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1956;42(9):571-574. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16589907>.
6. Cohen S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1960;46(3):302-311. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16578483>.
7. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. In: R.Lewin G, Carter BD, eds. *Neurotrophic Factors*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014:3-15.
8. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549-553. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7188352>.
9. Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A ve ark. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. 1989;341(6238):149-152. doi:10.1038/341149a0.
10. Jones KR, Reichardt LF. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(20):8060-8064. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2236018>.
11. Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*. 1990;344(6264):339-341. doi:10.1038/344339a0.
12. Ip NY, Ibáñez CF, Nye SH ve ark. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(7):3060-3064. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313578>.
13. Hempstead BL. Deciphering proneurotrophin actions. In: Lewin G, Carter BD, eds. *Neurotrophic Factors*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014:17-32.
14. Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chrétien M, Murphy RA. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett*. 1996;379(3):247-250. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603699>.

15. Bronfman FC, Lazo OM, Flores C, Escudero CA. Spatiotemporal intracellular dynamics of neurotrophin and its receptors. Implications for neurotrophin signaling and neuronal function. In: Lewin G, Carter BD, eds. *Neurotrophic Factors*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014:33-65.
16. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001;294(5548):1945-1948. doi:10.1126/science.1065057.
17. Hibbert AP, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Neurotrophin-4, alone or heterodimerized with brain-derived neurotrophic factor, is sorted to the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*. 2003;278(48):48129-48136. doi:10.1074/jbc.M300961200.
18. Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 2000;20(11):4059-4068. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818141>.
19. Griesbeck O, Canossa M, Campana G ve ark. Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech*. 1999;45(4-5):262-275. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19990515/01)45:4/5<262::AID-JEMT10>3.0.CO;2-K.
20. Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF ve ark. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1999;19(6):2069-2080. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066260>.
21. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M ve ark. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol*. 2012;196(6):775-788. doi:10.1083/jcb.201201038.
22. Lou H, Kim S-K, Zaitsev E, Snell CR, Lu B, Loh YP. Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron*. 2005;45(2):245-255. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.037.
23. Chen Z-Y, Ieraci A, Teng H ve ark. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci*. 2005;25(26):6156-6166. doi:10.1523/JNEUROSCI.1017-05.2005.
24. Levi-Montalcini R. The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. *EMBO J*. 1987;6(9):2856. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453797>.
25. Bagayogo IP, Dreyfus CF. Regulated release of BDNF by cortical oligodendrocytes is mediated through metabotropic glutamate receptors and the PLC pathway. *ASN Neuro*. 2009;1(1):AN20090006. doi:10.1042/AN20090006.
26. Yune TY, Lee JY, Jung GY ve ark. Minocycline alleviates death of oligodendrocytes by inhibiting pro-nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2007;27(29):7751-7761. doi:10.1523/JNEUROSCI.1661-07.2007.



27. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJH ve ark. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med*. 1997;337(15):1029-1035. doi:10.1056/NEJM199710093371502.
28. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M ve ark. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum*. 1993;36(12):1681-1690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8250987>.
29. Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, Kollias G. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. In: Kollias G, Sfrikakis PP, eds. *TNF Pathophysiology Molecular and Cellular Mechanisms (Current Directions in Autoimmunity editor:A.N. Theofilopoulos vol.11)*. Basel: Karger; 2010:1-26.
30. Kemanetzoglou E, Andreadou E. CNS demyelination with TNF- $\alpha$  blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17(4):36. doi:10.1007/s11910-017-0742-1.
31. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):87-103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21133840>.
32. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol*. 2002;135(4):855-875. doi:10.1038/sj.bjp.0704549.
33. Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol*. 2005;90(5):663-670. doi:10.1113/expphysiol.2005.030734.
34. Wong M-L, Al-Shekhlee A, Gold PW, Licinio J. Cytokines in the brain. In: Rothwell NJ, ed. *Cytokines in the Nervous System*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg,R.G. Landes Company; 1996:3-20.
35. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(6 Pt A):1218-1227. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.03.018.
36. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):475-487. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.004.
37. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014;70(1):11-20. doi:10.1016/j.cyto.2014.05.024.
38. Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor and related proteins. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(5):787-797. doi:10.1016/j.beem.2015.07.001.
39. Cawello W. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of lacosamide. *Clin Pharmacokinet*. 2015;54(9):901-914. doi:10.1007/s40262-015-0276-0.
40. Rogawski MA, Tofighy A, White HS, Matagne A, Wolff C. Current understanding of the mechanism of action of the antiepileptic drug lacosamide. *Epilepsy Res*. 2015;110:189-205. doi:10.1016/j.epilepsyres.2014.11.021.

41. Jose L. A Practitioner's guide to prescribing lacosamide for adults with intellectual disabilities. In: Leon J de, ed. *A Practitioner's Guide to Prescribing Antiepileptics and Mood Stabilizers for Adults with Intellectual Disabilities*. Springer-Verlag New York; 2012:139-140.
42. Beyreuther B, Callizot N, Stöhr T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol*. 2006;539(1-2):64-70. doi:10.1016/j.ejphar.2006.04.009.
43. Hakimian S, Cheng-Hakimian A, Anderson GD, Miller JW. Rufinamide: a new anti-epileptic medication. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8(12):1931-1940. doi:10.1517/14656566.8.12.1931.
44. Luszczki JJ. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep*. 2009;61(2):197-216. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443931>.
45. White HS, Franklin MR, Kupferberg HJ, Schmutz M, Stables JP, Wolf HH. The anticonvulsant profile of rufinamide (CGP 33101) in rodent seizure models. *Epilepsia*. 2008;49(7):1213-1220. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01552.x.
46. Chawan V, Phatak A, Gawand K, Badwane S, Panchal S. Antiepileptic drugs: newer targets and new drugs. *Int J Basic Clin Pharmacol*. 2016;587-592. doi:10.18203/2319-2003.ijbcp20161495.
47. Maljevic S, Lerche H. Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy. In: ; 2014:17-53. doi:10.1016/B978-0-444-63326-2.00002-8.
48. Rundfeldt C. The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K<sup>+</sup> channels in neuronal cells. *Eur J Pharmacol*. 1997;336(2-3):243-249. doi:10.1016/S0014-2999(97)01249-1.
49. Tatulian L, Delmas P, Abogadie FC, Brown DA. Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J Neurosci*. 2001;21(15):5535-5545. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466425>.
50. Wickenden AD, Zou A, Wagoner PK, Jegla T. Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells. *Br J Pharmacol*. 2001;132(2):381-384. doi:10.1038/sj.bjp.0703861.
51. Otto JF, Kimball MM, Wilcox KS. Effects of the anticonvulsant retigabine on cultured cortical neurons: changes in electroresponsive properties and synaptic transmission. *Mol Pharmacol*. 2002;61(4):921-927. doi:10.1124/mol.61.4.921.
52. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49(2 Suppl 1):3-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693912>.
53. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.
54. Bender DA. Free Radicals and Antioxidant Nutrients. In: Weitz M, Kearns B, eds. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29th ed. McGraw Hill; 2012:543-547.

55. Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2005;26(5):587-595. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.10.002.
56. Perry G, Nunomura A, Hirai K ve ark. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radic Biol Med*. 2002;33(11):1475-1479. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446204>.
57. Markesbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA, Morrow JD. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol*. 2005;58(5):730-735. doi:10.1002/ana.20629.
58. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15(4):316-328. doi:10.1016/j.numecd.2005.05.003.
59. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005;16(10):577-586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
60. Hüseynova L, Çelikyurt I. Yeni Nesil Antiepileptiklerin Farelerde Öğrenme ve Bellek Üzerine Etkilerinin Araştırılması. 2015.
61. Çelikyurt I, Hüseynova L, Mutlu O, Ulak G, Akar F, Erden F. Seventh european congress of pharmacology. In: *Effects of Rufinamide on Spatial and Avoidance Memory in Morris Water Maze, Elevated plus Maze and Passive Avoidance Tests in Mice*. ; 2016:399.
62. Dencker D, Husum H. Antimanic efficacy of retigabine in a proposed mouse model of bipolar disorder. *Behav Brain Res*. 2010;207(1):78-83. doi:10.1016/j.bbr.2009.09.040.
63. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633>.
64. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13650640>.
65. Sampaio TB, Savall AS, Gutierrez MEZ, Pinton S. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neural Regen Res*. 2017;12(4):549-557. doi:10.4103/1673-5374.205084.
66. Meldolesi J. Neurotrophin receptors in the pathogenesis, diagnosis and therapy of neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res*. 2017;121:129-137. doi:10.1016/j.phrs.2017.04.024.
67. Tong L, Balazs R, Thornton PL, Cotman CW. Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. *J Neurosci*. 2004;24(30):6799-6809. doi:10.1523/JNEUROSCI.5463-03.2004.

68. Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G ve ark. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2009;15(3):331-337. doi:10.1038/nm.1912.
69. Liu X-H, Geng Z, Yan J ve ark. Blocking GSK3 $\beta$ -mediated dynamin1 phosphorylation enhances BDNF-dependent TrkB endocytosis and the protective effects of BDNF in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2015;74:377-391. doi:10.1016/j.nbd.2014.11.020.
70. Buchman AS, Yu L, Boyle PA, Schneider JA, De Jager PL, Bennett DA. Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults. *Neurology.* 2016;86(8):735-741. doi:10.1212/WNL.0000000000002387.
71. Mogi M, Togari A, Kondo T ve ark. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 1999;270(1):45-48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454142>.
72. Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ. Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 1995;15(12):7810-7820. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613721>.
73. Ding Y-X, Xia Y, Jiao X-Y ve ark. The TrkB-positive dopaminergic neurons are less sensitive to MPTP insult in the substantia nigra of adult C57/BL mice. *Neurochem Res.* 2011;36(10):1759-1766. doi:10.1007/s11064-011-0491-5.
74. Nie S, Xu Y, Chen G ve ark. Small molecule TrkB agonist deoxygedunin protects nigrostriatal dopaminergic neurons from 6-OHDA and MPTP induced neurotoxicity in rodents. *Neuropharmacology.* 2015;99:448-458. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.08.016.
75. Martins LB, Duarte H, Ferreira AVM, Rocha NP, Teixeira AL, Domingues RB. Migraine is associated with altered levels of neurotrophins. *Neurosci Lett.* 2015;587:6-10. doi:10.1016/j.neulet.2014.12.022.
76. Wang Y, Cao M, Liu A ve ark. Changes of inflammatory cytokines and neurotrophins emphasized their roles in hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Neurosci.* 2013;123(3):191-195. doi:10.3109/00207454.2012.744755.
77. Soysal H, Doğan Z, Kamlı Ö. Effects of phenytoin and lamotrigine treatment on serum BDNF levels in offsprings of epileptic rats. *Neuropeptides.* 2016;56:1-8. doi:10.1016/j.npep.2015.12.001.
78. Heinrich C, Lähteinen S, Suzuki F ve ark. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2011;42(1):35-47. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.001.
79. LaFrance WC, Leaver K, Stopa EG, Papandonatos GD, Blum AS. Decreased serum BDNF levels in patients with epileptic and psychogenic nonepileptic seizures. *Neurology.* 2010;75(14):1285-1291. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f612bb.
80. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, Croll SD. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol.* 2002;174(2):201-214. doi:10.1006/exnr.2002.7869.

81. Kuramoto S, Yasuhara T, Agari T ve ark. BDNF-secreting capsule exerts neuroprotective effects on epilepsy model of rats. *Brain Res.* 2011;1368:281-289. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.054.
82. Richichi C, Lin E-JD, Stefanin D ve ark. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects mediated by adeno-associated virus vector neuropeptide Y expression in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 2004;24(12):3051-3059. doi:10.1523/JNEUROSCI.4056-03.2004.
83. Reibel S, Vivien-Roels B, Lê BT ve ark. Overexpression of neuropeptide Y induced by brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus is long lasting. *Eur J Neurosci.* 2000;12(2):595-605. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712639>.
84. Simmons DA, Rex CS, Palmer L ve ark. Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(12):4906-4911. doi:10.1073/pnas.0811228106.
85. Xu H, Steven Richardson J, Li X-M. Dose-related effects of chronic antidepressants on neuroprotective proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(1):53-62. doi:10.1038/sj.npp.1300009.
86. Alvarez XA, Alvarez I, Iglesias O ve ark. Synergistic increase of serum BDNF in Alzheimer Patients treated with Cerebrolysin and Donepezil: association with cognitive improvement in ApoE4 cases. *Int J Neuropsychopharmacol.* April 2016:pyw024. doi:10.1093/ijnp/pyw024.
87. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2013;138(2):155-175. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.004.
88. Chen KS, Nishimura MC, Armanini MP, Crowley C, Spencer SD, Phillips HS. Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits. *J Neurosci.* 1997;17(19):7288-7296. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9295375>.
89. Lin Y, Wan J, Gao G ve ark. Direct hippocampal injection of pseudo lentivirus-delivered nerve growth factor gene rescues the damaged cognitive function after traumatic brain injury in the rat. *Biomaterials.* 2015;69:148-157. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.08.010.
90. Bishop KM, Hofer EK, Mehta A ve ark. Therapeutic potential of CERE-110 (AAV2-NGF): targeted, stable, and sustained NGF delivery and trophic activity on rodent basal forebrain cholinergic neurons. *Exp Neurol.* 2008;211(2):574-584. doi:10.1016/j.expneurol.2008.03.004.
91. Tasset I, Sánchez-López F, Agüera E ve ark. NGF and nitrosative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurol Sci.* 2012;315(1-2):133-136. doi:10.1016/j.jns.2011.12.014.
92. Rocco ML, Balzamino BO, Petrocchi Passeri P, Micera A, Aloe L. Effect of purified murine NGF on isolated photoreceptors of a rodent developing retinitis pigmentosa. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124810. doi:10.1371/journal.pone.0124810.

93. Gall CM, Isackson PJ. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science*. 1989;245(4919):758-761. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549634>.
94. Van der Zee CE, Rashid K, Le K ve ark. Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. *J Neurosci*. 1995;15(7 Pt 2):5316-5323. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7623154>.
95. Adams B, Sazgar M, Osehobo P ve ark. Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci*. 1997;17(14):5288-5296. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9204913>.
96. Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J ve ark. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *J Psychiatr Res*. 2015;61:114-121. doi:10.1016/j.jpsychires.2014.11.003.
97. Spooren A, Kolmus K, Laureys G ve ark. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res Rev*. 2011;67(1-2):157-183. doi:10.1016/j.brainresrev.2011.01.002.
98. Yang P, Wen H, Ou S, Cui J, Fan D. IL-6 promotes regeneration and functional recovery after cortical spinal tract injury by reactivating intrinsic growth program of neurons and enhancing synapse formation. *Exp Neurol*. 2012;236(1):19-27. doi:10.1016/j.expneurol.2012.03.019.
99. März P, Heese K, Dimitriadis-Schmutz B, Rose-John S, Otten U. Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia*. 1999;26(3):191-200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340760>.
100. Hüll M, Berger M, Volk B, Bauer J. Occurrence of interleukin-6 in cortical plaques of Alzheimer's disease patients may precede transformation of diffuse into neuritic plaques. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;777:205-212. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624085>.
101. Sawada M, Imamura K, Nagatsu T. Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2006;(70):373-381. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017556>.
102. Sondag CM, Dhawan G, Combs CK. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation*. 2009;6(1):1. doi:10.1186/1742-2094-6-1.
103. Ringheim GE, Szczepanik AM, Petko W, Burgher KL, Zhu SZ, Chao CC. Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;55(1):35-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645958>.
104. Qiu Z, Gruol DL. Interleukin-6, beta-amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *J Neuroimmunol*. 2003;139(1-2):51-57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12799020>.

105. Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A ve ark. Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J.* 2010;24(2):548-559. doi:10.1096/fj.09-141754.
106. Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H. Interleukin-1 beta enhances survival and interleukin-6 protects against MPP+ neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons. *Exp Neurol.* 1995;136(1):44-52. doi:10.1006/exnr.1995.1082.
107. Zhang Y, He X, Wu X ve ark. Rapamycin upregulates glutamate transporter and IL-6 expression in astrocytes in a mouse model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 2017;8(2):e2611. doi:10.1038/cddis.2016.491.
108. Pereira JR, Santos LV Dos, Santos RMS ve ark. IL-6 serum levels are elevated in Parkinson's disease patients with fatigue compared to patients without fatigue. *J Neurol Sci.* 2016;370:153-156. doi:10.1016/j.jns.2016.09.030.
109. Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol.* 1998;161(12):6480-6486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862671>.
110. Serada S, Fujimoto M, Mihara M ve ark. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(26):9041-9046. doi:10.1073/pnas.0802218105.
111. Yu N, Di Q, Hu Y ve ark. A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in the plasma of epileptic patients with recent seizure. *Neurosci Lett.* 2012;514(1):110-115. doi:10.1016/j.neulet.2012.02.070.
112. Uludag IF, Duksal T, Tiftikcioglu BI, Zorlu Y, Ozkaya F, Kirkali G. IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL1Ra levels in temporal lobe epilepsy. *Seizure.* 2015;26:22-25. doi:10.1016/j.seizure.2015.01.009.
113. Steinborn B, Zarowski M, Winczewska-Wiktor A, Wójcicka M, Młodzikowska-Albrecht J, Losy J. Concentration of Il-1 $\beta$ , Il-2, Il-6, TNF $\alpha$  in the blood serum in children with generalized epilepsy treated by valproate. *Pharmacol Rep.* 2014;66(6):972-975. doi:10.1016/j.pharep.2014.06.005.
114. Thapa A, Carroll NJ. Dietary modulation of oxidative stress in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7). doi:10.3390/ijms18071583.
115. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
116. Wang S, Irving G, Jiang L ve ark. Oxidative stress mediated hippocampal neuron apoptosis participated in carbon disulfide-induced rats cognitive dysfunction. *Neurochem Res.* 2017;42(2):583-594. doi:10.1007/s11064-016-2113-8.
117. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S ve ark. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(10):1372-1379. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419469>.

118. Cecchi C, Latorraca S, Sorbi S ve ark. Glutathione level is altered in lymphoblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1999;275(2):152-154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10568522>.
119. Khadrawy YA, Salem AM, El-Shamy KA, Ahmed EK, Fadl NN, Hosny EN. Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of Parkinson's Disease induced by Rotenone. *J Diet Suppl.* 2017;14(5):553-572. doi:10.1080/19390211.2016.1275916.
120. Rowley S, Patel M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radic Biol Med.* 2013;62:121-131. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.002.
121. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM ve ark. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 2000;291(3):179-182. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984636>.
122. Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintainance of epilepsy. *Pharmacol Ther.* 2005;105(3):229-266. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.10.004.
123. Bhuyan P, Patel DC, Wilcox KS, Patel M. Oxidative stress in murine Theiler's virus-induced temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol.* 2015;271:329-334. doi:10.1016/j.expneurol.2015.06.012.
124. Ethemoglu MS, Seker FB, Akkaya H ve ark. Anticonvulsant activity of resveratrol-loaded liposomes in vivo. *Neuroscience.* 2017;357:12-19. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.05.026.