



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**P2X7 RESEPTÖRÜNÜN BEYİN ELEKTRİKSEL AKTİVİTESİ
VE BEYİN KAN AKIMINA OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

EMRE TANCAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL – 2018

“Bu tez, epilepsiye maruz kalmış hastalara ve onlarla birlikte yaşamayı deneyimlemiş ailelere ithaf edilmiştir...”



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyen, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım, kıymetli danışmanım sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim laboratuvar sorumlumuz Ahmet Burak Çağlayan'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada konu, kaynak ve yöntem açısından bana yardımda bulunarak yol gösteren Taha Keleştemur'a, ufuk açıcı fikirleriyle kariyerimdeki önceliklerimin belirlenmesinde bana yardımcı olan ve rol model olarak benimsediğim öğretim görevlisi Mustafa Çağlar Beker'e, tez yazım sürecinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli meslektaşım Serdar Altunay'a teşekkür ederim.

Beyin Araştırma laboratuvarındaki ve sosyal hayattaki deneyimlerini benimle paylaşan ve ortak amaç için bir araya gelmiş değerli bilim insanları Berrak Çağlayan, Arman Dalay, Aysun Dilden, Zeynep Balçıkanlı ve Reyda Karaçay'a ayrı ayrı teşekkür ederim.

Deney hayvanlarıyla çalışmada beni motive eden, tecrübesinden faydalandığım Barış Cebeci'ye, MEDİTAM bünyesinde çalışan Ali Şenbahçe, Musa Ekrem Özdemir ve Caner BAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca hayatıma kattığı önemi asla unutamayacağım saygıdeğer ilkokul öğretmenim Cemile Başoğlu'na minnettarlarımı sunarım.

Son olarak sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde beni hayata hazırlayan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım Ailem'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| TEZ ONAYI FORMU | I |
| BEYAN | II |
| İTHAF | III |
| TEŞEKKÜR | IV |
| KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ | VII |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ | VIII |
| TABLoların LİSTESİ | IX |
| 1. ÖZET | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ | 3 |
| 4. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 4.1. Epilepsi..... | 4 |
| 4.1.1. Epilepsi tanısı..... | 5 |
| 4.1.2. Epilepsi ve beyin kan akımı | 6 |
| 4.1.3. Epilepsi patofizyolojisi | 7 |
| 4.1.4. Epilepsi tedavisi | 9 |
| 4.2. Purinerjik sinyal sistemi | 9 |
| 4.2.1. Purinerjik P1 reseptörleri | 12 |
| 4.2.2. Purinerjik P2X ve P2Y reseptörleri | 13 |
| 4.2.3. P2X7 reseptörü..... | 16 |
| 4.2.3.1. P2X7R ve enflamasyon | 17 |
| 4.2.3.2. P2X7R ve sitokin salınımı | 19 |
| 4.2.3.3. P2X7R ve proteaz aktivasyonu..... | 20 |
| 4.2.3.4. P2X7R ve transkripsiyon aktivasyonu..... | 20 |
| 4.2.3.5. P2X7R ve fagositoz | 21 |
| 4.2.3.6. Astroglial P2X7R | 21 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.2.3.7. | Mikroglial P2X7R | 22 |
| 4.2.3.8. | P2X7R ve pannexsin kompleksi | 23 |
| 4.2.3.9. | P2X7R ve hücrel enerji metabolizması | 23 |
| 4.2.3.10. | P2X7R ve epilepsi | 24 |
| 5. | MATERYAL VE METOT | 25 |
| 5.1. | Deney dizaynı ve deneysel grupları | 25 |
| 5.2. | Epilepsi modeli ve farmakolojik ajanların verilmesi | 27 |
| 5.3. | Beyin elektriksel aktivite kaydı | 28 |
| 5.4. | Lazer speckle görüntüleme sistemi | 29 |
| 5.5. | İstatistik | 30 |
| 6. | BULGULAR | 31 |
| 6.1. | Amplitüd ölçümü | 31 |
| 6.2. | Frekans ölçümü | 32 |
| 6.3. | Bölgesel beyin kan akımının ölçülmesi | 33 |
| 7. | TARTIŞMA | 34 |
| 8. | SONUÇ | 39 |
| 9. | KAYNAKLAR | 40 |
| 10. | ETİK KURUL ONAYI | 57 |
| 11. | ÖZGEÇMİŞ | 61 |

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

| | |
|----------------|---|
| ATP | Adenozin trifosfat |
| AEİ | Anti-epileptik ilaçlar |
| BBG | Brilliant blue G |
| BKA | Beyin kan akımı |
| BZATP | 2'(3)-O-(4-Benzoilbenzoil)adenozin-5'-trifosfat |
| cAMP | Siklik adenosin monofosfat |
| CX | Konneksin |
| DAMP | Damage-associated molecular patterns |
| EC50 | Etkin konsantrasyon |
| EEG | Elektroensefalografi |
| EGFP | Enhanced green florescent protein |
| GABA | γ -amino-butirik asit |
| HMGB1 | High mobility group box 1 |
| IL-1 β | İnterlökin-1 β |
| LPS | Lipopolisakkarit |
| MSS | Merkezi sinir sistemi |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NLRP3 | NOD-like receptor protein 3 |
| NO | Nitrik oksit |
| P2X7R | P2X7 reseptörü |
| PAMP | Pathogen-associated molecular patterns |
| PANX | Panneksin |
| SF | Serum fizyolojik |
| PSS | Periferik sinir sistemi |
| SG | Substantia gelatinosa |
| TLR4 | Toll-like receptor 4 |
| TNF | Tümör nekroz faktörü |

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 4.1.3.1. Epilepside enflamatuvar olayların kaskad serisi..... | 8 |
| Şekil 4.2.1. Purinerjik reseptör ailesi | 11 |
| Şekil 4.2.1.1. P1 reseptörlerinin genel yapısı..... | 12 |
| Şekil 4.2.3.1. P2X7R ve enflamasyon ilişkisi..... | 19 |
| Şekil 5.2.1. Beyin hemisferindeki elektrod alanlarının ve enjeksiyon noktasının gösterimi | 27 |
| Şekil 5.3.1. Beyin elektriksel aktivite kayıt alımı | 29 |
| Şekil 5.4.1. Bölgesel beyin kan akımı ölçümü..... | 30 |
| Şekil 6.1.1. Kontrol, BzATP ve BBG deney gruplarının zamana bağlı olarak genliklerinin gösterimi | 31 |
| Şekil 6.2.1. Kontrol, BzATP ve BBG deney gruplarının zamana bağlı olarak frekanslarının gösterimi. | 32 |
| Şekil 6.3.1. Kontrol, BzATP ve BBG deney gruplarının zamana bağlı olarak bölgesel beyin kan akımının gösterimi..... | 33 |

TABLULARIN LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 4.2.2.1 Glial hücrelerin ifade ettikleri P2 reseptörleri..... | 14 |
| Tablo 4.2.2.2 P2 reseptörlerinin dağılımı, işlevi ve ilişkili olduğu hastalıklar | 15 |
| Tablo 5.1.1. Deney dizaynı | 25 |



1. ÖZET

P2X7 RESEPTÖRÜNÜN BEYİN ELEKTRİKSEL AKTİVİTESİ VE BEYİN KAN AKIMINA OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Pürinerjik sinyal, normal ve patolojik sinir sisteminde sinaptik olmayan bir sinyalleşme mekanizmasıdır. Pürinerjik ligand kapılı iyon kanalı P2X7 reseptörünün ifadesi astrositler ve mikroglia gibi nöronal olmayan hücrelerde gerçekleşmektedir. Bu reseptörler sitokin üretimini düzenleyen ve mikroglıadan salınan ATP kapılı katyon kanallarıdır. Bununla birlikte interlökin-1 β ve tümör nekroz faktörü gibi nöroenflamatuvar yanıtlarla ilişkili olduğu bilinen bu reseptörün sinir sistemi bozukluklarındaki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Nörolojik bozukluklardan biri olan epilepside P2X7 reseptörünün ifadesinin, glial hücrelerde uzun süreli nöbetlerden sonra beyindeki hasar gören bölgelerde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca oluşan hasar nöronların ve glial hücrelerin aktivasyonuna neden olur ve dolayısıyla hücre ölümü ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerinde etkili olan P2X7 reseptörleriyle ilişkili benzer enflamatuvar araçlar salınır. Son yapılan çalışmalarda ise P2X7 reseptörünü hedef alan ilaçların potansiyel antikonvülzan etkilere sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenlerden ötürü, reseptörün işlevinin tam olarak bilinmesi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yardımcı olabilecek yeni yaklaşımları meydana getirecektir. Bu tez çalışmasında farmakolojik P2X7 reseptörü agonist maddesi 2'(3)-O-(4-Benzoilbenzoil)adenozin-5'-trifosfat (BzATP) ve antagonist maddesi Brilliant blue G (BBG) oluşturulan epilepsi modeliyle reseptörün beyin kan akımına ve beyin elektriksel aktivitesine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. BBG'nin epileptik nöbet şiddetini ve sıklığını azalttığı, beyin kan akımını ise arttırdığı, BzATP ise epileptik nöbet şiddetini ve sıklığını artırdığı, beyin kan akımını azalttığı gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: P2X7 Reseptörü, Epilepsi, BzATP, BBG

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THE P2X7 RECEPTOR ON BRAIN ELECTRICAL ACTIVITY AND BRAIN BLOOD FLOW

Purinergic signaling is a non-synaptic signaling mechanism in the normal and pathological nervous system. The expression of the purinergic ligand gated ion channel P2X7 receptor has occurred on non-neuronal cells, such as astrocytes and microglia. These are ATP-gated cation channels that regulate cytokine production and release from microglia. However, the mechanism of this receptor known to be linked to neuroinflammatory responses, such as interleukin-1 β and tumor necrosis factor has not been exactly explained in disorders of the nervous system. In epilepsy, one of the neurological disorders, has been observed to increase the expression of the P2X7 receptor in glial cells in damaged regions of brain after prolonged seizures. Furthermore, the resulting damage leads to the activation of neurons and glial cells and thus releasing similar inflammatory mediators associated with P2X7 receptors that are effective on the expression of genes involved in cell death. Recent studies have elicited that drugs targeting the P2X7 receptor have potential anticonvulsant effects. For these reasons, it will bring about new approaches that can help in the treatment of neurodegenerative diseases provided that the function of the receptor is completely known in epilepsy. In this thesis study, pharmacological P2X7 receptor agonist substance 2'(3)-O-(4-Benzoilbenzoil)adenozin-5'-trifosfat (BzATP) and antagonist substance Brilliant blue G (BBG) were aimed to investigate the effect of receptors on brain blood flow and brain electrical activity by model of epilepsy. It has been observed that BBG reduces epileptic seizure severity and frequency, increases brain blood flow, BzATP increases epileptic seizure severity and frequency, decreases brain blood flow.

Keywords: P2X7 Receptor, Epilepsy, BzATP, BBG

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi merkezi sinir sisteminde, kortikal veya subkortikal bölgelerde yer alan nöron gruplarının ani, anormal ve hipersenkron deşarjlar üretmeleri sonucu ortaya çıkan ve genellikle tekrarlayıcı nitelikte olan bir klinik tablodur (1). Dünyada en sık görülen nörolojik hastalıklardan biridir.

Epileptik nöbetleri indüklemek için yapısal olarak γ -amino-butirik asit (GABA) antagonisti bikukuline benzeyen, GABA inhibisyonunu ortadan kaldırma etkisi gösteren penisilin kullanılmaktadır. Kortekse yaygın olarak verilen penisilin, talamusa ulaşmadığı halde Elektroensefalografi (EEG)'de diken dalga modelinin belirmesini sağlar. Bu modeldeki deşarjlar korteksten kaynaklanmakta, fakat talamus ile korteks arasındaki nöronal devreler tarafından kuvvetlendirilip sürdürülmektedir.

P2X7 reseptörleri ATP-kanallı katyon kanallarıdır ve beyinde ve omurilikte pek çok bölgede hızlı uyarı iletiminde rol oynamaktadır. Bu reseptörlerden P2X7 alt tipi, uzun süreli Adenosin 3'-trifosfat (ATP) maruziyeti sırasında iyon seçiciliğini değiştirme özelliğine sahiptir (2). Aynı zamanda P2X7 reseptörleri interlökin-1 β 'yı düzenleyerek nöronal hücre ölümünde rol almakta ve bu sayede sinir sistemi ile bağışıklık sistemi arasındaki iletişimde kritik bir görev yapmaktadır (3).

Bu tez çalışmasında P2X7 reseptörü agonisti BzATP ve antagonisti BBG kullanılarak reseptörün epilepsi sonrasında beyin elektriksel aktivitesine ve beyin kan akımına olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. BzATP ve BBG'nin hasarlı dokuda beyin elektriksel aktivitesi ve beyin kan akımına olan etkilerinin açığa çıkarılması ile daha etkin tedavi seçenekleri oluşturulması ve hastaların fonksiyonel geri kazanımlarının arttırılması beklenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Epilepsi

Epilepsi, serebral nöronların normal olmayan, aşırı elektriksel deşarj nedeniyle tekrarlanan nöbetlerin meydana geldiği bir nörolojik hastalıktır (4). Dünya nüfusunun %1'ni etkileyen dördüncü en yaygın kronik nörolojik bozukluktur (5, 6). Avrupa'da epilepsi 6 milyon insanı etkilemekte ve tahmini sosyoekonomik maliyeti 15.5 Milyar € 'dur (7). Ülkemizde epilepsinin yaşam boyu birikmiş insidansı 6/1000 iken, aktif epilepsi prevalansı 5/1000 olarak görülmektedir (8).

Epilepsi ilk olarak 2500 yıl önce tanımlanmış ve bu bozukluğun altında yatan sebepler yeteri kadar bilinmemektedir. Ayrıca bu bozukluğu tamamen ortadan kaldıracak bir tedavi mevcut değildir (9). Bu nedenle epileptik popülasyonlar için acil keşfedilmesi gereken bir tedaviye gereksinim duyulmaktadır (10).

Epilepsi, kalıtsal bozukluklardan (genetik ve epigenetik anormallikler) veya travmatik beyin hasarı, beyin enfeksiyonları, inme gibi epileptojenik hasarlardan kaynaklanabilir (11, 12). Epileptojenik bir hasar sonrasında başlıca nörotransmitterler olan glutamat ve GABA arasındaki uyarı ve inhibisyon dengesinde değişiklik meydana gelir, bunun sonucu olarak homeostasi sağlanamaz ve beyin normal işlevini yerine getiremez. Bu epilepsi gelişim sürecine epileptojenezis adı verilir (4, 13). Epileptojenezis üç aşamaya ayrılır: Epileptojenik hasar sırasında ve sonrasında oluşan akut faz(I), latent faz(II) ve belirsiz nöbetlerin meydana geldiği kronik fazdır(III) (14, 15).

Latent fazda enflamasyon, nöronal kayıp ve yeni sinaptik ağların oluşumu gibi hem moleküler hem de yapısal değişiklikler söz konusudur. Bu değişiklik gösteren parametrelerden hangisinin epilepsinin gelişiminin nedeni veya sonucu olduğu bilinmemektedir Ayrıca bu süreç kendinden tekrarlanan nöbetlerin oluşumu ile başlar, fakat kronik evrede devam eder ve giderek durum kötüleşir (14-16).

Epileptik nöbetlerin gerçekleşmesinin birçok nedeni vardır. Bunlar doğum sırasında gerçekleşen beyin hasarı, metabolik bozukluklar (hipoglisemi, hipokalsemi, üremi, hipoksi), enfeksiyonlar, vasküler bozukluklar (kanama, hipotansiyon), toksinler (alkol, sakinleştiriciler) ve tümörlerdir (17). Bununla birlikte, epileptik nöbetlerin çoğunun açık bir nedeni yoktur. Beyindeki milyonlarca nöronun anormal, senkronize elektriksel deşarjları ile başlatılırlar. Deşarjlar nöronların iletim yolları üzerine sinir uyarıları göndermek için nöronları uyarır (18). Nöbet oluşumunun iki özelliği, nöronların aşırı uyarılması ve sinirsel devrelerin aşırı duyarlılığıdır (19). Bununla birlikte çok sayıda nöbet türü ve beynin nöbet oluşturduğu sayısız mekanizma vardır.

Nöbetler genellikle parsiyel (fokal) ve generalize nöbetler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Generalize nöbetler her iki serebral hemisferi etkiler. Ayrıca bu nöbetler, uzun süreli ya da geçici olarak bilinç kaybına neden olur ve genel tonik-klonik (büyük nöbet), miyoklonik (ani sızramalar), absans (donup kalma) ya da atonik (kas gerginliğinin ani kaybına bağlı düşme) olmak üzere alt tipleri mevcuttur (20). Parsiyel nöbetler, beynin bir serebral hemisferinde küçük bir odaktan başlayarak daha yumuşak semptomlar oluşturur ve epilepsi hastalarında yaşanan en sık tekrarlanan nöbet türüdür (20, 21). Parsiyel nöbetler bilincin korunduğu basit parsiyel nöbetler ve bilincin azaldığı veya kaybolduğu kompleks parsiyel nöbetler olmak üzere alt grublara ayrılır (22).

4.1.1. Epilepsi tanısı

Günümüzde epilepsi tanısının konulmasında en yaygın olarak EEG görüntüleme sistemi kullanılmaktadır. Epilepsi hastası olduğu düşünülen ve bilinç değişikliği yaşayan kişinin EEG kaydı alınır. Bu EEG kaydında odak noktası tespit edilirse parsiyel epilepsi tanısı konulurken, genel diken dalga modeli ile karşılaşırsa da generalize epilepsi tanısı konulur. Genellikle de nöbet sonrası ilk yirmi dört saatlik kayıt dikkate alınır (23).

EEG kaydı alınırken ek olarak aktivasyonun sağlanması için Aralıklı Işık Uyarı metodu kullanılır. Bu metod tanı ve tedavi sürecinin incelenmesinde değerli bilgiler sunmaktadır. Ayrıca epilepsinin başlangıcına sebep olan travma ve enfeksiyon sonrası tanı için farklı teknikler kullanılmaktadır. Herhangi bir patolojik bulgu, enflamasyon varsa Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) görüntüleme yöntemi ile tespit edilir, sonrasında Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) spektroskopisi sistemi ile nöronal göç anormallikleri ve sinyal yoğunluğundaki seri değişiklikler gösterilir. Fakat MRG'nin maliyeti kullanımını sınırlamaktadır (24-26).

Bu tekniklere ek olarak beyin omurilik sıvısı (BOS) numunelerinde çeşitli metabolitlerin (3-hidroksi-4-metoksifenilglikol, 5-hidroksiindolasetik asit v.b.) ve nörotransmitterlerin (Glutamat-GABA) konsantrasyonları yüksek performanslı sıvı kromatografisinde analiz edilerek epilepsi tanısı için değerlendirme yapılır (10, 27-31).

4.1.2. Epilepsi ve beyin kan akımı

Epileptik nöbetler sırasında (serebral) beyin kan akımı (BKA) ve metabolizmasındaki değişiklikler, tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisinde ve pozitron emisyon tomografisinde yapılan çalışmalarda iyi bilinmektedir. Genelarize nöbet sırasında BKA artar. Parsiyel nöbet sırasında ise bölgesel BKA artar (32). Epileptik nöbetler sırasında BKA'nın artmasının nedeni ise nöronal uyarılma ile birlikte artan enerji ihtiyacının hipoksi oluşturmasıdır (33). Bunu takiben nöbet sonrası erken dönemde özellikle hipokampus ve amigdala'daki kan akımının nöbet öncesi ve başlangıç dönemine göre arttığı yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (34).

Bölgesel kan akımını belirlemek için farklı tekniklerde kullanılmaktadır. Örneğin, kan beyin bariyerini geçebilen ve hücre zarlarına nüfuz edebilen bir lipofilik kompleks olan takipçiler kullanılmaktadır. Bunlar beyin tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi görüntülemesi için mevcut olan ^{99m}Tc ile etiketli heksametil propilen amin oksim ve benzer şekilde ^{99m}Tc ile etiketli etil sisteinat dimer takipçileridir (35).

Ayrıca transkraniyal doppler ultrasonografi, BKA hızını ölçen ve BKA'daki farklılıkları tahmin etmek için BKA hızındaki farklılıkları kullanan non invaziv bir tekniktir (36).

4.1.3. Epilepsi patofizyolojisi

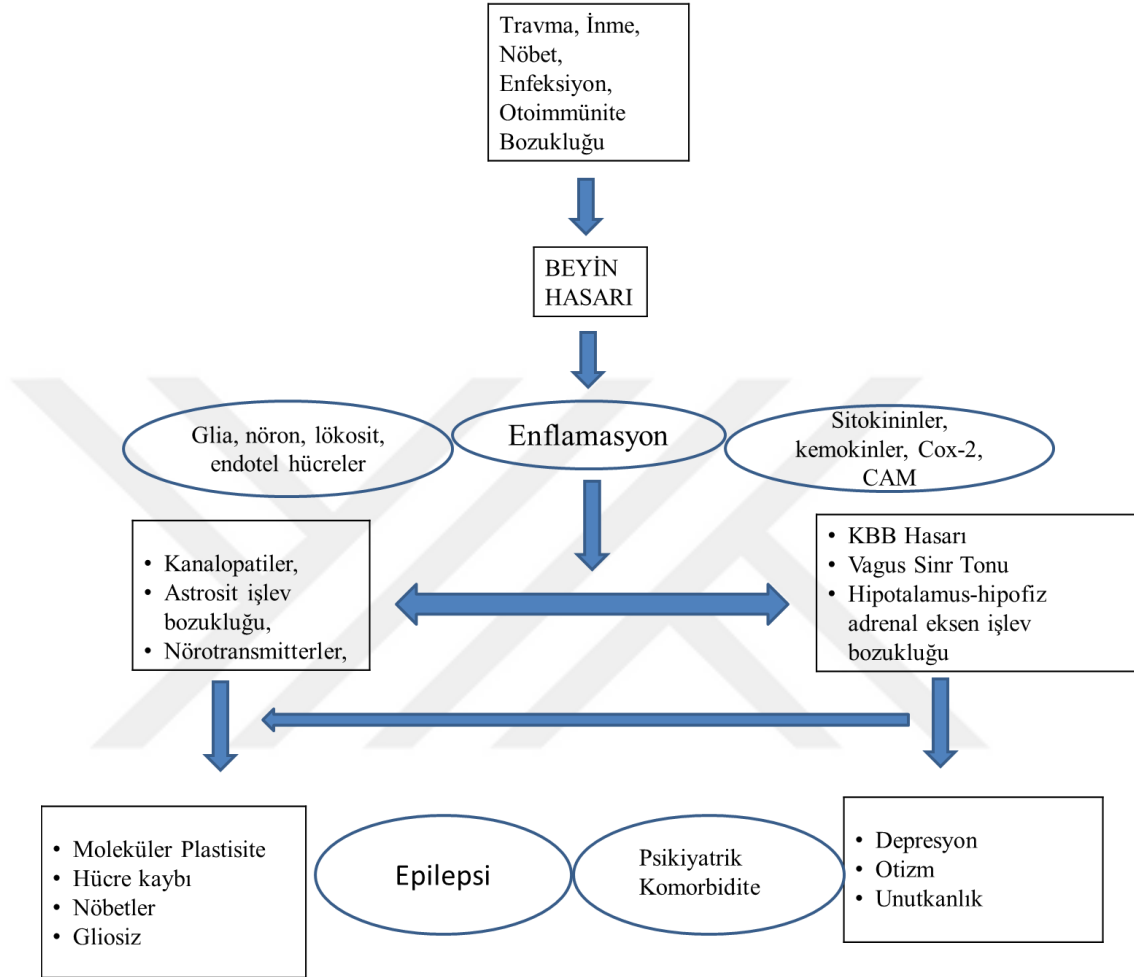
Merkezi sinir sistemindeki hasarlar, enfeksiyonlar ve otoimmün bozukluklar ile başlayan patolojik olaylar, beyin parenkimal hücrelerinin (mikroglia, astrositler, nöronlar), kan beyin bariyerinin (KBB) endotel hücreleri ve lökositlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu hücreler beyinde enflamatuvar araçlar üretir ve salgılar, böylece fizyopatolojik etkilere neden olan sinyal kaskad serisi meydana gelir (Şekil 4.1.3.1) (37). Fizyopatolojik mekanizmaların bazıları nöbetlerin tekrarlanmasına neden olabilirken bazıları epileptojenezis gelişiminde rol oynar (38).

Strese maruz kalmış ve zarar görmüş nöronlar tarafından üretilen *high mobility group box 1* (HMGB1) salındığı zaman *Toll-like receptor 4* (TLR4) ile etkileşime girerek nöbetleri teşvik eder. Böylece astrositlerden ve mikroglialardan daha fazla HMGB1 salınmasına neden olur. Salınımın devam etmesi enflamasyon ve nöbetler üzerinde pozitif anlamda geri bildirim etkilemiş olur (38).

Proenflamatuvar sitokin olan interlökin-1 β (IL-1 β) ve HMGB1 öncelikle IL-1 β reseptörü olan IL-1R1 ve sonra TLR4'e bağlanarak sinyal kaskadını harekete geçirir (39-41). Bu ligandlar alt yolları etkiler. Bu yollar tümör nekroz faktörü (TNF) yolağı ile kemokinlerin, sitokinlerin, enzimlerin (COX-2 gibi) ve reseptörlerin (TLR, IL-1R1, TNF, p55 ve p75) sentezini düzenleyen bir transkripsiyon faktörü ve proenflamatuvar olan *nuclear factor kappa B*'de (NF- κ B) bir araya gelirler (42). Bu transkripsiyonel yolk nörogenez, sinaptik molekülerin yeniden düzenlenmesi, plastisite, hücre ölümü ve hücre sağ kalımı ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerinde etkili olurlar (43).

NF- κ B aktivasyonu, gen ekspresyonu değişiklikleri, IL-1R1 veya TLR yollarının aktifliği aynı anda etkinlik kazanan seramid ile aktive olan Src tirozin kinaz ve mitojen aracılı ile aktive olan protein kinazı etkiler (41, 44-50). Etkilenen

kinaz yolları voltaj bağımlı iyon kanallarının ve iyon kanalları ile eşleşmiş reseptörlerin fosforlanmasına neden olur. Fosforlanma ise nöbeti ve nöronların uyarımını doğrudan etkiler (51).



Şekil 4.1.3.1. Epilepside enflamatuvar olayların kaskad serisi.

Ayrıca astrositlerden sitokin aracılı glutamat salınımı, glial hücrelerden glutamat geri alımının inhibisyonu ve glutamat-GABA reseptörlerinin sinirsel iletimde uyarıcı ve inhibe edici olması nöronların aşırı uyarılmasında etkili olan diğer mekanizmalardır (52-55).

4.1.4. Epilepsi tedavisi

Anti-epileptik ilaçlar (AEİ) normal sinirsel aktiviteyi bozmadan nöronların uyarılabilirliğini seçici olarak değiştirmek için farklı moleküllere etki ederler (56). Antikonvülsan aktivitelerini nörotransmitterler, iyon kanalları ve sinirsel uyarıda rol alan enzimler üzerinde gösterirler. Bu moleküller üzerinde antikonvülzan aktiviteyi voltaja bağlı iyon kanallarını düzenleyerek, sinaptik inhibisyonu artırarak veya sinaptik uyarıyı engelleyerek gerçekleştirmektedirler (57).

Epilepsi tedavisinde kullanılan anti-epileptik ilaçların yan etkileri bulunmaktadır. Bu ilaçlar kullanım kolaylığı, maliyeti ve doktor kontrolü göz önünde bulundurularak alınmalıdır. Epilepsi tanısı konmuş hastalar ilk olarak karbamazepin, fenobarbital, fenitoin veya valproik asit gibi anti-epileptik ilaçlar kullanılması sağlanarak tedaviye başlanır. Son zamanlarda topiramet, lamotrijin, gabapentin ve okskarbazepin gibi yeni anti-epileptik ilaçlarda kullanıldığı görülmektedir (58).

AEİ tedavisi alan bireylerin %70-80'i başarılı bir şekilde tedavi edilir. Bu ilaçların tedavide başarılı olma oranını ise nöbetlerin nedeni belirler. Bununla birlikte tedavide cevap alınamayan hastalar, kontrol edilemeyen nöbetler geçirmekte ve alınan ilaçların ciddi yan etkilerine maruz kalmaktadırlar.

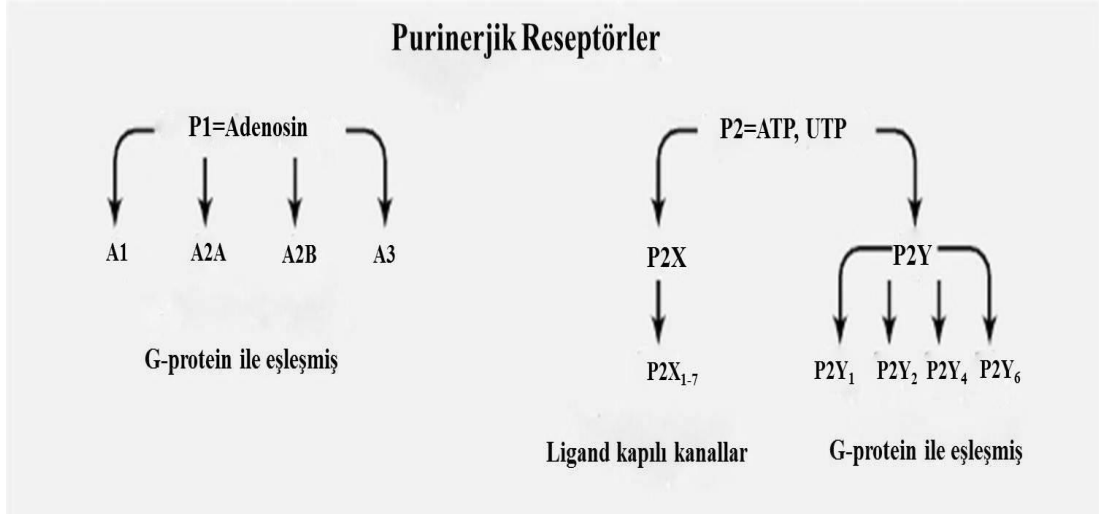
4.2. Purinerjik sinyal sistemi

G-proteinle eşleşmiş reseptörler nöronal gelişimde önemli bir rol oynamaktadır ve bunların arasında periferik sinir sisteminde duyu ve otonomik fonksiyonlarla ilgili purinerjik reseptörler bulunmaktadır (59-62). Purinerjik reseptörler, tüm hücre tiplerinde ve dokularda bulunur. Ayrıca bağırsakta, böbreklerde, kardiyovasküler ve solunum sistemlerinde, immünolojik sistemde, kan hücrelerinde, ciltte, kemiklerde ve kaslarda çok farklı fonksiyonların düzenlenmesinde yer alır (63, 64). Glial ve nöron hücreleri tarafından genellikle ekspresyonları yapılır ve akson gelişimi, akson olgunlaşması, nörogenez ve beyindeki birçok patolojik olayda rol alırlar (59).

Sinir sisteminde ATP, nöron-glia sinyal ağını içeren çeşitli fizyolojik işlevleri düzenler (59). Örneğin, ATP sinaptik sinyal iletimi ve sinir hücresi büyümesi ve gelişimi gibi çok sayıda trofik etkiyi modüle eder. Nöronlarda ATP, yalnızca presinaptik terminal tarafından serbest bırakılmakla kalmaz, post-sinaptik membran tarafından salınabilir (65, 66)

Gliyal hücrelerde birkaç çalışma, astrositlerin ve diğer glial hücrelerin ATP saldığı gösterilmiştir ve glial ATP salımının glia-glia ve nöron-glia iletişimde önem taşıdığına dair önemli bulgular mevcuttur (67, 68). Ayrıca, nöronlar ve glial hücreler tarafından salgılanan ATP hipoksi veya diğer beyin hasarı türleri gibi çeşitli patolojik bozukluklara neden olur (69). Bunun sonucu olarak astrositler hücre proliferasyonu ve sinir sisteminin yeniden şekillendirilmesi ile karakterize edilen beyin hasarına genel cevabı olan astrogliosisi başlatır (70, 71). ATP'nin bu çoklu etkileri sadece purinerjik reseptörler tarafından düzenlenmekle kalmaz aynı zamanda ekstrasellüler ATP, ADP, AMP ve adenosin konsantrasyonlarını düzenleyebilen ekstrasellüler ektonükleotidazlar tarafından da düzenlenir (72). Pürin konsantrasyonlarındaki bu düzenleme purinerjik sistemi ve sinir sistemi patolojileri için önemini göstermektedir (59).

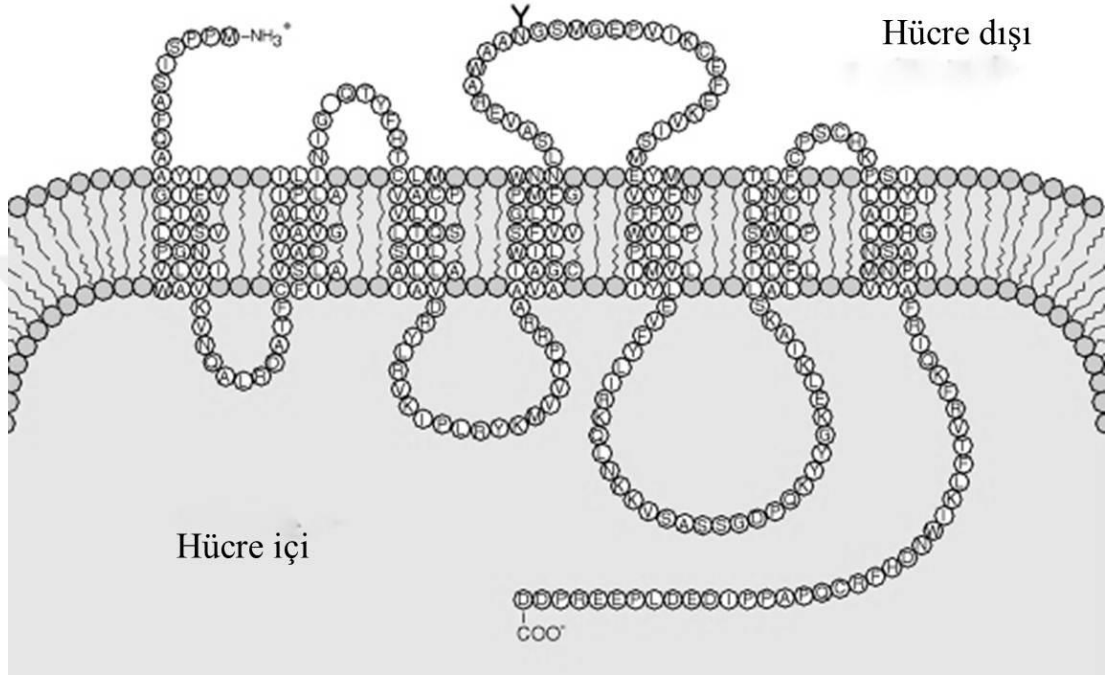
Ekstrasellüler nükleotitler, nükleotid reseptörleri üzerinden etkili olurlar. Bu nükleotid reseptörleri adenosin veya ATP/ADP nükleotidleri ile aktive olan P1 ve P2 reseptörler aileleridir (**Şekil 4.2.1**) (59).



Şekil 4.2.1. Purinerjik reseptör ailesi. P1 (Adenosin) ve ATP (ya da UTP) bağlayan P2 reseptörleri olmak üzere ikiye ayrılır. P1 ve P2Y reseptörleri protein bağlı GTP ile eşleşirken, P2X reseptör ailesinin ligand kapılı kanalları vardır.

4.2.1. Purinerjik P1 reseptörleri

P1 reseptörleri hücre içinde ve dışında üç lobu bulunan, hücre dışında N terminali, hücre içinde C terminali olan yedi α sarmal domain yapısındadır (Şekil 4.2.1.1). (73).



Şekil 4.2.1.1. P1 reseptörlerinin genel yapısı.

Nöronlarda, astrositlerde, oligodendrositlerde ve mikroglia da yaygın olarak ifade edilen G-proteinle eşleşmiş adenosin reseptörlerinin dört farklı tipi vardır: A1, A2A, A2B ve A3 (74, 75). A1 ve A3 reseptörleri, adenilat siklazı inhibe etmek için Gi proteinine bağlanır ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) konsantrasyonlarında azalmaya neden olur (76-78). A2A ve A2B reseptörlerinde ise adenilat siklazı aktive etmek için Gs proteinine bağlanır ve bu durum cAMP konsantrasyonlarında bir artışa neden olur (76, 78).

4.2.2. Purinerjik P2X ve P2Y reseptörleri

P2 reseptörleri, iyonotropik P2X ve metabotropik P2Y reseptörleri olmak üzere iki farklı gruba ayrılmıştır (79, 80). P2X reseptörleri, uzunluğu 379 ila 595 amino asit arasında değişen ligand kapılı, seçici olmayan katyon kanallarıdır. P2X reseptörlerinin her bir alt birimi iki transmembran domain (TM1 ve TM2), geniş bir hücre dışı lop ve hücre içi N- ve C-terminallerinden oluşur. P2X reseptör alt birimleri, dokuya spesifik ekspresyon ve reseptör alt birimlerine bağlı olarak fonksiyonel homotrimerik veya heterotrimerik formlar oluşturmak üzere bir araya gelebilir. P2X reseptörleri hücre dışı ATP ile aktive edilir. P2X reseptörlerinin aktivasyonu, Ca^{2+} ve Na^+ içeri akışı ve K^+ dışarı akmasına neden olur (81). Yedi P2X reseptör alt tipi (P2X1-7), nöronlar ve astrositler tarafından ifade edilir ve bunların bazıları oligodendrositler, schwann hücreleri ve mikroglia da ifade edilir. Bunların her biri, hızlı sinaptik iletim, sinaptik plastisite ve hızlı nöronal-gliyal sinyalleşme gibi farklı süreçlere katılırlar (75, 82-87).

P2Y reseptörleri, hücre dışı bir N-terminusu, 7 transmembran domain ve bir hücre içi C-terminusu bulunduran klasik heterotrimerik G proteine bağlı reseptörlerdir (81). P2Y reseptörlerinin 8 alt tipi bulunmaktadır. Bu reseptörlerden P2Y1, P2Y12 ve P2Y13 genellikle ADP tarafından, P2Y2 ve P2Y4 ATP/UTP, P2Y6 UDP, P2Y11 ATP ve P2Y14 ise UDP-glikoz ligandı ile aktive olmaktadır. Dolayısıyla tipik olarak P2Y1, P2Y2, P2Y4 ve P2Y6, Gq proteinlerine bağlanır ve fosfolipaz C'yi aktive eder, P2Y12, P2Y13 ve P2Y14, Gi proteinlerine bağlanır ve adenil siklazı inhibe eder, hücre içi cAMP azalır (88).

Bu reseptörlerin çoğu, merkezi ve periferik sinir sistemindeki (MSS ve PSS) nöronlar ve glial hücreler de dahil olmak üzere sinir sisteminde ifade edilir (**Tablo 4.2.2.1**) ve genellikle proliferasyon, farklılaşma, göç ve apoptoz üzerine uzun vadeli etkiler bırakan iki yönlü nöronal-astroglial iletişime dahil oldukları düşünülmektedir (69, 89, 90).

PSS'deki glial hücreler ve nöronlar farklı purinerjik reseptörleri ifade eder. Bunların kombinasyonu nöronal ve glial hücre tipine ve fonksiyonuna bağlıdır (67).

Örneğin, miyelinsiz schwann hücreleri, A2A, A2B, P2X7, P2Y1 ve P2Y2 reseptörlerini ifade ederken bunlardan sadece P2X7 ve P2Y2 reseptörleri, miyelinli schwann hücrelerinde işlevseldir (59).

Tablo 4.2.2.1. Glial hücrelerin eksprese ettikleri P2 reseptörleri

| ASTROSİT | | MİKROGLİA | | OLİGODENTROSİT PROJENİTÖRLERİ | |
|----------|-------|-----------|--------|----------------------------------|-------|
| P2X | P2Y | P2X | P2Y | P2X | P2Y |
| P2X1 | P2Y1 | P2X4 | P2Y1 | P2X7 | P2Y1 |
| P2X2 | P2Y2 | P2X7 | P2Y2 | | P2Y2 |
| P2X3 | P2Y4 | | P2Y2/4 | | P2Y4 |
| P2X4 | P2Y6 | | P2Y6 | | P2Y6 |
| P2X5 | P2Y12 | | P2Y12 | | P2Y11 |
| P2X7 | P2Y14 | | | | P2Y13 |

P2X3 reseptörleri, sıçanlarda orta beyin sinaptik terminallerinde ve omuriliğin dorsal kök gangliyon nöronlarının merkez terminallerinde tanımlanmıştır (91, 92).

P2X2 ve P2X4 gibi diğer P2X reseptörleri, korteks, hipokampus, serebellum, omurilik ve farklı beyin çekirdeği gibi nöronal yapılarda yaygın olarak bulunurlar (93-95).

Tablo 4.2.2.2. P2X reseptörlerinin dağılımı, işlevi, ilişkili olduğu hastalıklar

| RESEPTÖR | DAĞILIM | İŞLEV | HASTALIK |
|----------|---|---|-----------------------------------|
| P2X1 | Düz kas, Platelet, Serebellum | Kas kasılması, Platelet, aktivasyonu | — |
| P2X2 | Düz kas, MSS, Otonomik ve Duysal ganglion | Duyu iletimi | — |
| P2X3 | Duyu nöronları, Bazı Sempatik nöronlar | MSS'de glutamat salınımı | Nöropatik ağrı, Taktıl Allodini |
| P2X4 | MSS, Testis | Nöropatik ağrı, Kronik enflamatuvar düzenleyici | Nöropatik ağrı |
| P2X5 | Omurilik, Mesane, Bağırsak | Profilasyonu inhibe etme, Farklılaşmayı artırma | — |
| P2X6 | Omurilikteki, nöronlar, MSS | P2X2 ve P2X4 kombinasyonunu sağlamak | — |
| P2X7 | Apoptotik hücreler | Apoptoz, Enflamasyon | Enflamatuvar ağrı, Nöropatik ağrı |

ATP, hem akut hem de kronik ağruların ana araçlarından biri olarak işlev görür. Bu nedenle purinerjik reseptörlerden P2X2 ve P2X4 reseptörleri hızlı ağrı algılamasına katılırken (Tablo 4.2.2.2), P2X4 ve P2Y12 reseptörleri nöropatik ağrının patojenezinde öncü bir rol oynamaktadır (99-102). Ayrıca purinerjik agonistler çeşitli dokulardaki bağışıklık tepkiyi düzenler. Özellikle, beyin ve omurilikte, temporal segmentte birkaç purinoreseptör tipinin (P2X4, P2X7, P2Y6 ve P2Y12) aktivasyonu, mikroglialının hareketliliğini ve aktivasyonunu kontrol eder, böylece beyinde immün yanıt sağlanmış olur (103, 104).

4.2.3. P2X7 reseptörü

P2X7 reseptörü (P2X7R), her biri 595 aminoasit uzunluğunda olan çok sayıda alt birimin bir araya gelmesiyle işlevsel formunu oluşturur. P2X7R'nin C-ucu (244 aa), diğer P2X reseptörlerinininkinden 120-200 amino asit daha uzundur. Fonksiyonunu düzenlemede çok önemli olduğu düşünüldüğü çoklu potansiyel protein ve lipid etkileşim motiflerini barındırır (105). C-terminal bölgesi post-translasyonel modifikasyon, hücresel lokalizasyon, oligomerizasyon, protein-protein etkileşimleri ve sinyal yolağı aktivasyonu için kritiktir (106, 107). Yüksek hücre dışı ATP konsantrasyonlarıyla uyarıldığı zaman moleküler ağırlığı 900 Da kadar olan anyon ve katyon moleküller (Na^+ , K^+ ve Ca^{2+}) için geçirgen olur. Aynı zamanda seçici olmayan farklı boyutlarda (3-5 nm) membran porlarını da meydana getirir (108-110).

Normal fizyolojik koşullar altında, P2X7R aktivitesi, düşük mikromolar hücre dışı ATP aralığı ve ATP bağlanma afinitesini allosterik bir biçimde değiştirebilen hücre dışı divalent katyonların konsantrasyonu ile düşük bir seviyede tutulur (111-113). Düşük mikromolar hücre dışı ATP aralığı P2X7R aktivasyonu için yeterli değildir, çünkü P2X7R, P2X reseptör ailesinin en az ATP hassasiyetine sahip üyesidir. P2X1-6 reseptör ailesinin ATP etkin konsantrasyonu (EC50) değeri 1-10 μM aralığı iken, P2X7R EC50 değeri 0,1-1 mM'dır (114-117).

Bu reseptörlerin makrofajlar, dendritik hücreler, monositler, lenfositler ve eritrositlerin yanı sıra osteoklastlar, mast hücreleri ve eozinofiller kapsayan hematopoietik hücre hatlarıyla sınırlı olduğu düşünülmekteydi. Ancak, P2X7R osteoblastlar, fibroblastlar, endotel hücreleri ve epitel hücreleri de dahil olmak üzere diğer soylardan gelen hücreler üzerinde mevcut olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte P2X7R merkezi ve periferik sinir sistemindeki mikroglia, astrositler, oligodendrositler ve schwann hücreleri üzerinde bulunur (118). Bunlara ek olarak omirilik, serebellum, hipotalamus ve substantia nigra'daki bazı nöron popülasyonlarında P2X7R varlığına dair raporlar vardır (119, 120).

P2X7R bir takım hücre tiplerinde tanımlanmış olmasına rağmen, P2X7R'nin tüm dokulardaki farklı hücre tipleri arasındaki dağılım ilişkisi daha az bilinmektedir. P2RX7 geni ile birlikte ifade edilen *Enhanced Green Florescent Protein* (EGFP) taşıyan transgenik fareler üretilmiştir (121-123). P2X7'nin in vivo dağılımına yönelik önemli bir adım olmuştur. Örneğin, bu fareler uzun süren nöbetler sonrası merkezi sinir sisteminde P2X7R'nin ekspresyonunu lokalize etmek için kullanılmıştır ve P2X7R'nin nöronlarda ifadesinin arttığı ancak hipokampus ve neokortekste mikroglia ve astrositler üzerinde ifadesinin artmadığı görülmüştür (121, 123). Bu çalışmalarda mikroglia ve astrositlerde P2X7R ekspresyonu zayıf olmakla rağmen, bu hücre tiplerinde P2X7R ekspresyonu immünohistokimyasal araştırmalarda daha iyi anlaşılmuştur (124).

4.2.3.1. P2X7R ve enflamasyon

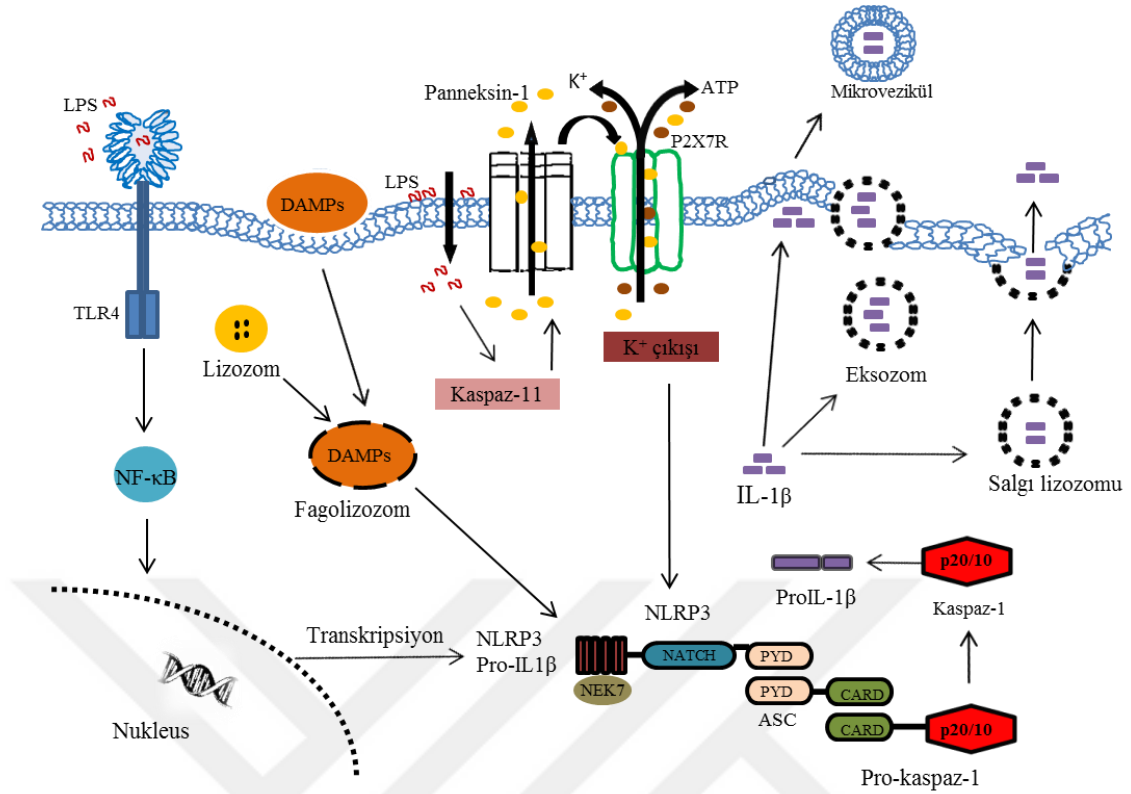
P2X7R memelilerde vücut boyunca yaygın olarak yer almaktadır. Mikroglia, makrofaj ve lenfositte yoğun olarak bulunmaktadır. Reseptörün bu immün hücrelerindeki yüksek ifadesi sitotoksik yanıtlara, sitokin salımına ve hücre füzyonuna aracılık etmesi nedeniyle immün sistemde önemli bir yere sahiptir (125). P2X7R, enflamasyon ile ilgili birçok süreçte de (sitokin salınımı, nitrik oksit (NO) üretme, hücre içi patojenleri öldürme, sitotoksosite) görev alır (126). P2X7R patolojik bir hasarın ardından mikrogliaların aktivasyonunda ve IL-1 β , IL-18 ve TNF gibi olgun proenflamatuvar sitokinlerin salgılanmasında önemli bir rolü vardır (127).

Endojen ATP'nin düşük afinitesi nedeniyle P2X7R aktivasyon seviyesi normal fizyolojik ve patolojik koşullarda farklıdır. Bu duruma örnek olarak P2X7R, serum ve hücre dışı ATP'nin yokluğunda bakteri ve apoptotik hücreler için yeni bir serbest oksijen yakalayıcı reseptörüdür (128). Metabolik stres, enflamasyon veya hücre ölümü gibi patolojik durumda ise hücre dışı ATP konsantrasyonu artmaktadır. Bu nedenle reseptör aktivitesinin artacağı düşünülmektedir (118, 129).

P2X7 reseptörleri bir apoptotik enzim olarak kaspaz-1'i aktive eder ve pro-IL-1 β 'nın IL-1 β 'ya ayrılmasını başlatır. Buna ek olarak, hücre iskeletinde değişiklikler meydana gelir ve zar yapısının zayıflamasına yol açar. İkincil mesajcılarla eşleşmiş

P2Y reseptörlerinin aktivasyonu P2X7R uyarır. Bunun sonucunda proliferasyon ve enflamasyon başlamış olur (130).

Bu bilgilere ek olarak LPS gibi *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP)'ler; IL-1 β 'yı kodlayan genlerin ve *NOD-like receptor protein 3* (NLRP3) gibi enflamazom bileşenlerinin transkripsiyonunu teşvik eder. Hem plazma membranında hem de sitoplazmada rol alan *damage-associated molecular patterns* (DAMP)'ler, örneğin katepsin B gibi ek faktörlerin salımına neden olarak NLRP3 enflamazom aktivasyonunu tetikler. Alternatif olarak sitoplazmik DAMP'ler ve PAMP'ler, panneksin-1 açılmasına neden olabilir, böylece ATP salınmasına izin verilir. Ekstrasellüler ATP, K⁺ çıkışını tetiklemek için P2X7R'ye bağlanır, böylece NEK7, NLRP3, ASC ve kaspaz-1 bir araya gelir. Aktive edilmiş NLRP3 enflamazomu, pro-IL-1 β 'yı katalize eder. Olgun IL-1 β daha sonra mikroveziküllerden türeyen sekresyonlu lizozomlar, eksozomlar veya plazma zarı aracılığıyla serbest duruma geçer. P2X7R porunun molekül taşınımı için açılması ATP molekülünün dışarı çıkışına izin verir (**Şekil 4.2.3.1**), böylece aktivasyon sinyali çoğalır. Son olarak, P2X7R'ye, (hücre dışı veya hücre dışı PAMP'ler veya DAMP'ler tarafından) uyarı yapılmadığında, hücre dışı ATP ile doğrudan aktive edilebilir (131).



Şekil 4.2.3.1 P2X7R ve enflamasyon ilişkisi. Sarı halkalar, ATP; küçük kahverengi daireler, K⁺.

4.2.3.2. P2X7R ve sitokin salınımı

P2X7 aktivasyonunun IL-1 α , IL-1 reseptör antagonisti ve IL-36 α salınımını indüklediği gösterilmiştir (132-136). Bu nedenle P2X7'yi sitokinlerin IL-1 ailesinin salgılanmasının majör bir fizyolojik düzenleyicisi olarak konumlandırmaktadır. P2X7'nin de dahil olduğu çeşitli uyarılar yapılarak NLRP3 inflamazom aktivasyonunun ve IL-1 β sekresyonunun altında yatan mekanizma araştırılmıştır. Araştırma K⁺ çıkışının NLRP3 kompleksini aktive eden yaygın bir sinyal olduğunu ortaya koymuştur (137). Ekstrasellüler ozmolarite ve hücre hacminin regülasyonu, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunda rol oynadığı, sitokin sekresyonunun başlaması için hücresel mikro ortamın çok önemli olduğu vurgulanmıştır (138).

4.2.3.3. P2X7R ve proteaz aktivasyonu

P2X7R aktivasyonu ayrıca, membran yapı stabilitesinin bozulması, mikropartikül ve ekzozom salınımı, çok nukleuslu hücre oluşumu, tersinir fosfatidilserin maruziyeti ve hücre yüzey moleküllerinin kaybına neden olan zar metalloproteazların aktivasyonu da dahil olmak üzere, bir takım membranla ilişkili değişikliklere yol açabilir (120, 139). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda P2X7'nin aktivasyonundan sonra salınan hücre yüzey molekülleri tanımlanmıştır. Bunlar kemokin CXCL16, adhezyon molekülü CD44, çözünebilir amiloid prekürsör proteini ve IL-6 reseptörü bunlara ek olarak CD62L (L-selektin), CD23'e (düşük afiniteli IgE reseptörü) ve CD27 hücre yüzey molekülleridir (140-145). Metalloproteinaz olan ADAM10 ve ADAM17, P2X7 aracılı membran yapı stabilitesinin bozulması olaylarıyla ilişkili ana efektör moleküllerdir (142, 143). Birçok fizyolojik olaylarla ilişkili substratlar bu proteazlar tarafından parçalanır.

P2X7R aktivasyonu ayrıca çeşitli enzimlerin salınmasına neden olabilir. Andrei ve arkadaşları (2004), ATP'nin insan monositlerinden lizozom ekzositozu indükleyebildiğini tanımladılar ve böylece katepsinlerin lizozom salgılaması, yüksek olasılıkla artan hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonları ile düzenlenen bir P2X7 aracılı bir yolak olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca katepsinler B, D, L, S monositlerden ve makrofajlardan bu şekilde salgılanır (146). P2X7R aktivasyonu metalloproteaz-9 salınımını uyarabilir (147). Bununla birlikte, spesifik salınım mekanizması henüz belirlenmemiştir. Dolayısıyla P2X7R, katepsinler ve matriks metalloproteinazların yanı sıra, kaspazlar gibi birkaç proteaz ailesini de düzenleyebilir (148).

4.2.3.4. P2X7R ve transkripsiyon aktivasyonu

P2X7R, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla gen ifadesini etkileyebilir. Birçok NF- κ B p65'in mikroglia ve astrositlerde P2X7 tarafından düzenlenen bir transkripsiyon faktörü olarak saptanmıştır (149, 150). Monositlerde, P2X7R aktivasyonu ayrıca cAMP yanıt element-bağlayıcı protein aktivasyonunu ve FosB/aktive edici protein-1'i indükleyebilir (151, 152). Bununla birlikte P2X7 aktivasyonu aktive olmuş T hücrelerinin nükleer faktörünün nukleusa translokasyonunu indükler (153). Bu nedenle P2X7R, stres zamanlarında hücrel

metabolizmayı yeniden programlamak veya enflamatuvar yanıt için gerekli genlerin aktivasyonu için hücre dışı ATP'ye yanıt olarak gen ifadesini düzenleyebilir.

4.2.3.5. P2X7R ve fagositoz

P2X7R'nin radikal oksijen yakalayıcı reseptörü olarak hareket ettiği çalışmalarda belirtilmiştir (128). CD36 gibi radikal oksijen tutucu reseptörler, genel olarak düşük yoğunluklu lipoproteinler gibi modifiye lipoproteinleri tanır ve ayrıca P2X7, CD36'ya benzer iki transmembran domain yapısına sahiptir (154-156). Ancak P2X7R'nin böyle lipoproteinleri tanıyıp tanımadığı henüz bilinmemektedir. P2X7R ifade eden hücrelerin partikülleri alabilme yeteneği, iyon kanalının hücre dışı ATP ile aktivasyonunu gerektirmez. Aslında, ATP ile kanalın uyarılması fagositik yolağı kapatır. Bu durum partikül alımında, iyon kanalı veya ikincil por yolağı boyunca normal sinyal verilmesinin gerekli olmadığını, fakat P2X7R'nin sitoskeleton ile birleşmesi nedeniyle yeni bir sinyal yolunun kullanılabileceğini göstermektedir (157, 158).

4.2.3.6. Astroglial P2X7R

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, küçük, hızlı ve lokalize Ca^{2+} yanıtların astrositlerin mikrodomanlerinde minimal sinaptik aktivite ile ortaya çıktığı belirtilmiştir. Bu veriler, astrositlerin, devamlı ve yoğun uyarılmaları üzerine daha geniş Ca^{2+} tepkileri üretmek için birkaç sinaps aktivitesini bütünleştirebileceğini göstermektedir. Buna karşılık transmitter molekülleri, Ca^{2+} 'ye bağımlı ekzositoz da dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla astrositlerden salgılanabilir (160).

P2X7R ya astrositlerden ekzositotik veya non-ekzositotik mekanizmalar yoluyla glutamat veya ATP salınmasını indükleyebilir. Bu reseptörler veziküler/lizozomal gliotransmitter salınımının tetikleyicisi olan Ca^{2+} 'yi artırabilir, ayrıca ilişkili panneksin kanalları yoluyla glutamat/ATP çıkışında da aracı olabilirler. P2X7R aracılı depolarizasyon, hücrenin içine büyük miktarda sodyum akışı meydana getirir, bu durum glutamat taşıyıcısının tersine çevrilmesine ve ardından hücre dışı boşlukta glutamat birikmesine neden olabilir. Nitekim BzATP, sıçan omuriliğın lumbar substantia gelatinosa'daki (SG) astrositlerde Ca^{2+} 'nin yükselmesini tetiklediği

ve sonra SG nöron yakınlarında yavaş ve düzensiz olarak içe doğru akıntıları (SIC) indüklediği görülmüştür. Ca^{2+} görüntüleme, astrositik glutamatın SG nöronları gruplarında N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) aracılı senkronize aktivite ataklarını uyandırdığını ortaya koymuştur. SG astrositlerinde meydana gelen daha uzun süreli bir glutamat salımı, P2X7R antagonisti A-438079 tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir, böylece P2X7R'nin bu tip glutamat salınımından sorumlu olduğu teyit edilmiştir. Dahası, biyosensör ölçümleri, reaktif oksijen türlerinin, glutamat ile birlikte astrositlerden korele edildiğini ve nöronal etkilerini güçlendirdiğini göstermiştir (160).

4.2.3.7. Mikroglial P2X7R

P2X7R klonlanmadan önce, başlangıçta P2Z olarak adlandırılan lenfositlerde ve makrofajlarda bulunan doğal bir reseptörün ATP ile indüklenen plazma zarının geçirgenliğine ve sitotoksositeye aracılık ettiği gösterilmiştir. Nitekim P2X7R'ler, lenfositlerde, monosit/makrofajlarda ve dendritik hücrelerde yaygın olarak bulunur. Aynı zamanda trombositlerde ve eritrositlerde de yaygın bir dağılım gösterir. MSS'de, P2X7R-mRNA ve proteinin ilk olarak, orta serebral arter tıkanmasına bağlı iskemi ile aktive edilen mikroglia ile sınırlandırıldığı düşünülmektedir (160).

P2X7R stimülasyonunun ani sonuçları ise, aşağıda belirtilen enflamatuvar medyatörlerin aracılığıyla gerçekleşir (160).

- Lipopolisakkarit (LPS) uyarımı üzerine interlökin- 1β 'nin post-translasyonel işleme uyarımının gerçekleşmesi,
- Mikrovesiküllerde yapı stabilitesinin bozulması ve böylece IL-1B'nin hücre dışı çevreye salınması,
- İndüklenebilir nitrik oksit sentazının ekspresyonu ve sonuç olarak artmış NO üretimi,
- Reaktif oksijen ara ürünlerinin, özellikle de süperoksitin üretilmesi,
- Endokannabinoid üretiminden sorumlu diaçilgliserol lipazın salgılanması ve endokannabinoid degradasyonundan sorumlu monoçilgliserol lipazın eş zamanlı inhibisyonu.

Membran porlarının açılması ve daha sonra hayati öneme sahip hücre içi proteinlerin kaybı yoluyla gerçekleşen nekroz ve kaspazın aktivasyonu P2X7R'nin glial hücrelerde apoptozu indüklemesini sağlar. P2X7R sadece mikrogial aktivasyonu değil, aynı zamanda proliferasyonunu da yönlendirir ve muhtemelen zararlı bir nöroenflamasyon ve nörodejenerasyon döngüsüne yol açar (161).

4.2.3.8. P2X7R ve panneksin kompleksi

Omurgalı hayvanlardaki gap junction, bitişik hücrelerin sitoplazmasını birbirine bağlayan iki sabitlenmiş konneksin (Cx) hemikanal içerirken, omurgasız hayvanlarda ilgili yapıdaki inneksinlerden oluşurlar. Ancak, inneksinlere homolog olan omurgalı panneksinler (Panx), gap junctionları oluşturmaz ve sadece kanallar olarak bulunurlar. Omurgalılarda, Cx-43 ve Panx-1 hemikanalları, ATP'yi hücre dışı boşluğa salan yolaklardır, bu yolak travmatik omurilik veya optik sinir hasarının yanı sıra iskemik beyin hasarı takiben ikincil enflamasyon reaksiyonlarında önemli rol oynar (160).

Fibroblast büyüme faktörü-1 (FGF-1) omurilik üzerine uygulanan mekanik travmalara yanıt olarak salgılanır (162). FGF-1, birkaç dakika içinde astrositlerden veziküler bir mekanizma ile ATP salınmasını indükler. Bu ATP daha sonra P2X7R ve panneksin kanallarını aktive eder ve sonuç olarak ATP'nin bir sonraki salımını tetikler. Bu nedenle FGF-1, ATP ve P2X7R fagositotik ve sitokin/kemokin salgılayan monosit/makrofajlar ile karakterize edilen erken bir enflamatuvar faza katkıda bulunur (163, 164). Ayrıca LPS enjekte edilerek doğum öncesi enflamatuvar koşullara maruz bırakılan hamile farelerin yavrularının astrositlerinde, panneksin olmayan kanallar yoluyla artmış bir ATP salınımı görülmüştür. Bu ATP daha sonra P2X7R aktivasyonu ile nöronal ölüme neden olmuştur (165).

4.2.3.9. P2X7R ve hücresel enerji metabolizması

P2X7R aktivasyonu, glikoliz ve oksidatif fosforilasyonu uyarır. Oksidatif fosforilasyonun uyarılması sitoplazmik Ca^{2+} 'nin hafif bir artışının sonucu olabilir, bunun sonucu olarak mitokondriyal matraste Ca^{2+} konsantrasyonunun orta seviyede yükselmesine neden olur. Mitokondriyal Ca^{2+} artışı, nikotinamid adenin dinükleotit

(NADH) dehidrogenazın ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyonun aktivitesini artırır. Maksimum P2X7R aktivasyonu mitokondride Ca^{2+} aşırı birikmesi sonucu kontrol edilemeyen Ca^{2+} 'nin hücre içerisine alınması, mitokondriyal geçirgenliğini sağlayan porların açılması ve mitokondrinin yıkımı gibi olaylarda rol alır (131).

4.2.3.10. P2X7R ve epilepsi

Epilepside P2X7R ekspresyonunu araştıran ilk çalışmalar kronik epileptik sıçanlardan alınan doku üzerinde yapılmıştır. P2X7R boyamasının, hipokampusta özellikle de mossy lifleri, dentat girusta ve glutamaterjik sinir terminallerinde arttığı görülmüştür. Ayrıca sıçanlarda epilepsinin akut ve kronik evresinde mikroglialda P2X7R immünreaktivitesinin arttığı gözlenmiştir. İlginç bir şekilde, P2X7R immünreaktivitesi, astrositler üzerinde genellikle görülmemiştir. Yakın zamanda P2X7 reseptörü raportör farelerini kullanan çalışmalarla da doğrulanmıştır (166).

Kainik asidin fare amigdalasına unilateral mikroenjeksiyonuyla indüklenen epileptik nöbetin sonrasında ipsilateral hipokampustaki P2X7R ifadesinin arttığı çalışmalarda doğrulanmıştır. Aslında, bu modelde P2X reseptör ailesinin çoğunun hipokampal ekspresyonunu araştırılmış ve sadece P2X7R düzeylerinde artış gözlenmiştir. P2X7R raportör fare kullanarak esas olarak dentat girusundaki granül nöronlarında ve bazı CA1 piramidal nöronlarda genin transkripsiyonun arttığı bulunmuştur. P2X7R promotörü aktivasyonu ile sinyal veren EGFP'nin mikroglial belirteci Iba-1 veya astrosit glial fibrilik asidik proteini (GFAP) pozitif hücrelerde artışı gerçekleşmemiştir (166). Bu çalışmalar P2X7R ekspresyonunun epilepsi nöbeti ve kronik epilepsiden sonra derinden değiştiğini ortaya koymaktadır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Deney dizaynı ve deneysel grupları

Bu tezdeki bütün deney aşamaları İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak yapılmıştır. Deney kapsamında kullanılan BALB/c fareleri İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi'ndeki barınma odalarında 12 saat aydınlık/karanlık olacak şekilde biyolojik saatleri düzenlenerek tutulmuştur. Çalışmalarda deney hayvanı olarak ortalama ağırlıkları 22-25 gram olan 8-12 haftalık BALB/c fareleri kullanıldı.

Her grup için 7 hayvan olacak şekilde deney grupları kontrol, P2X7 reseptörü agonist maddesi *2'(3)-O-(4-Benzoilbenzoil)adenozin-5'-trifosfat (BzATP) triethylammonium salt* (AB120444, Abcam) ve P2X7 reseptörü antagonist maddesi *Brilliant Blue G* (BBG) (SC-203733, Santa Cruz) olarak ayrıldı. Ayrıca bu ajanların bölgesel kan akımına olan etkilerini araştırmak için grup başına 7 hayvan olacak şekilde dağılım yapıldı. Deney gruplarının beyin elektriksel aktivite ve beyin kan akımı kayıtları alınırken yapılan prosedürler **Tablo 5.1.1**'de belirtilmiştir.

Tablo 5.1.1. Deney dizaynı.

| | Deney Prosedürü |
|---------|---|
| Kontrol | <ul style="list-style-type: none">• 0. dakikada 2 dakika süreyle 2 µl hacimde SF (i.s.v.) verildi,• 30. dakikada 1µl olacak şekilde penisilin indüklenmesi (i.s.v.) yapıldı. |

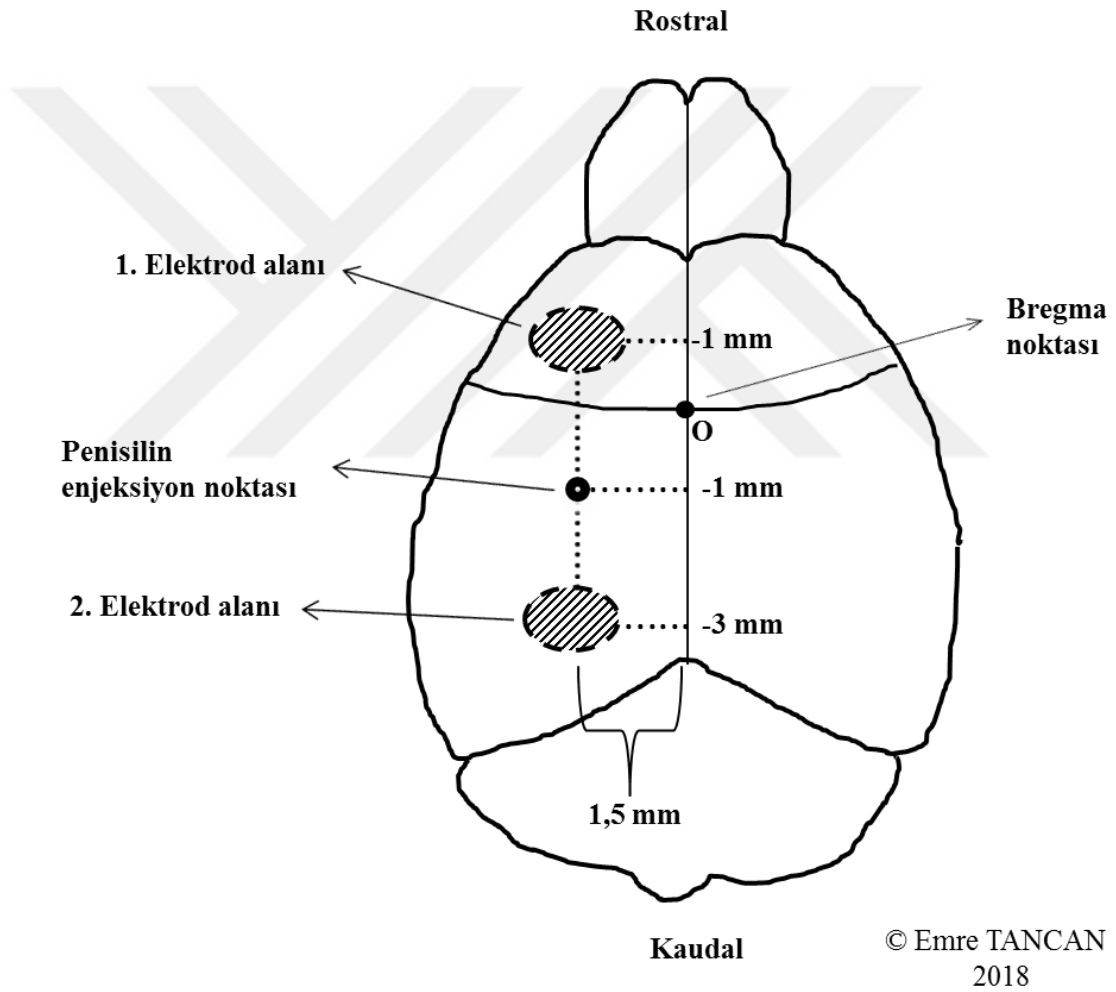
| | |
|---------------------------|---|
| BzATP | <ul style="list-style-type: none">• 0. dakikada 2 dakika süreyle 2 µl hacimde BzATP (i.s.v.) verildi,• 30. dakikada 1 µl penisilin indüklenmesi (i.s.v.) yapıldı. |
| BBG | <ul style="list-style-type: none">• 0. dakikada 2 dakika süreyle 2 µl hacimde BBG (i.s.v.) verildi,• 30. dakikada 1 µl penisilin indüklenmesi (i.s.v.) yapıldı. |
| Bölgesel kan akımı ölçümü | <p>Kontrol, BBG ve BzATP deney gruplarının</p> <ul style="list-style-type: none">• Sol hemisferi açılarak 30 dakika bazal kayıt alındı.• 30. dakikada 1 µl penisilin indüklemesi (i.s.v.) yapıldı ve lazer speckle görüntüleme sistemi ile 2,5 saat kan akım kaydı alındı. |

Bölgesel kan akımı ölçümünde;

- Kontrol deney grubuna, 0. dakikada 2 µl hacimde SF (i.s.v.) verildi, 30. dakikada ise 1µl olacak şekilde penisilin indüklenmesi (i.s.v.) yapıldı.
- BzATP deney grubuna, 0. dakikada 2 µl hacimde BzATP (i.s.v.) verildi, 30. dakikada ise 1µl olacak şekilde penisilin indüklenmesi (i.s.v.) yapıldı.
- BBG deney grubuna, 0. dakikada 2 µl hacimde BBG (i.s.v.) verildi, 30. dakikada 1µl olacak şekilde penisilin indüklenmesi (i.s.v.) yapıldı.

5.2. Epilepsi modeli ve farmakolojik ajanların verilmesi

Deneye başlamadan önce 8-12 haftalık BALB/c farelerine 1,75 g/kg olacak şekilde %0,9 izotonik serum fizyolojik (SF)'te çözdürülen ürean (U2500-250G, Sigma, Çin) anestezi ajanı periton içi olarak verildi. Anestezi altına alınan fareler stereotaktik çerçeveye (World Precision Instruments, Berlin, Almanya) yerleştirildi. Deney boyunca farelerin vücut sıcaklığı ısıtıcı battaniye sistemi (507221F, Harvard Apparatus, ABD) ile düzenli olarak ölçüldü.



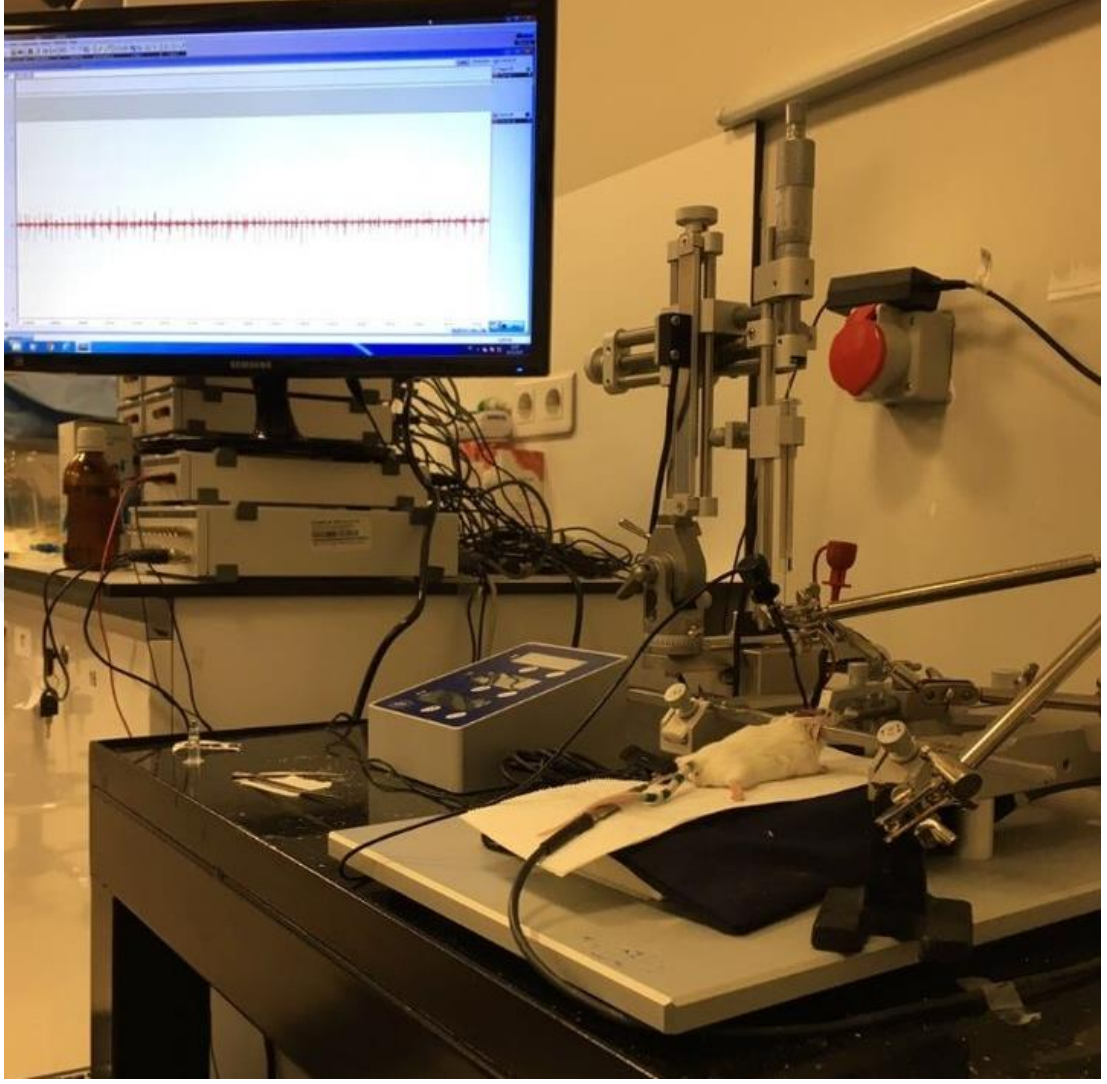
Şekil 5.2.1. Beyin hemisferindeki elektrod alanlarının ve enjeksiyon noktasının gösterimi.

Farelerin sol korteksi yüksek hızlı tur aleti (Marathon-3, Güney Kore) kullanılarak kaldırıldı. Bregma noktası merkez kabul edilerek iki tane Ag-AgCl

elektrodu korteks üzerine yerleştirildi. AP: 1 mm, L: 1,5 mm bölgesine ilk elektrod (FE136 Animal Bio Amp: MLA1212 Micro-Hook Electrodes, AD Instruments, Avustralya), AP: -3 mm, L: -1,5 mm bölgesine ikinci elektrod (**Şekil 5.2.1**) yerleştirildi. Hamilton enjektörü (type 701 N, Hamilton Company, Reno, NV, ABD) kullanılarak AP: -1 mm, L: -1,5 mm bölgesine ve korteks yüzeyinin 1 mm derinine 1 µl'de 100 IU olacak şekilde SF içerisinde çözdürülüp kırık buzda bekletilen penisilin (611007, Penicillin G, İ.E. Ulugay Türkiye) indüklemesi yapıldı. BBG 2 µl hacimde 10 µg, BzATP 2 µl hacimde 5 µg olacak şekilde SF içerisinde çözündürülerek hazırlandı. BzATP ve BBG deney gruplarında AP: 0 L: 0,75 mm bölgesine ve korteks yüzeyinden 1,5 mm derinliğe 0. dakika itibariyle i.s.v. ile enjeksiyon, 30. dakikada penisilin indüklenmesi yapıldı. Kırık buz içerisinde tutulan BBG ve BzATP kimyasalları beyin içi enjeksiyonla verildi.

5.3. Beyin elektriksel aktivite kaydı

Deney süresi boyunca deney gruplarının gerçek zamanlı bölgesel EEG kaydı (PowerLab 16/30, AD Instruments, Castle Hill, Avustralya) (**Şekil 5.3.1**) alındı. Elektrotlardan gelen biyolojik sinyaller, BioAmp amplifikatörleri (AD Instruments, Castle Hill, Avustralya) kullanılarak amplifiye edildi ve bant geçirimi 0,03-60 Hz ve genliği 10 mV olacak şekilde sınırlandırıldı. Epileptik EEG aktivitesinin frekansı ve genliği çevrim dışı olarak analiz edildi [37]. Labchart (PowerLab Software, AD Instruments, Castle Hill, Avustralya) yazılımı kullanılarak her hayvan için diken dalga frekansları ve amplitüdüleri hesaplandı ve ölçüldü. Fareler kayıt tamamlandıktan sonra fareler sakrifiye edildi.

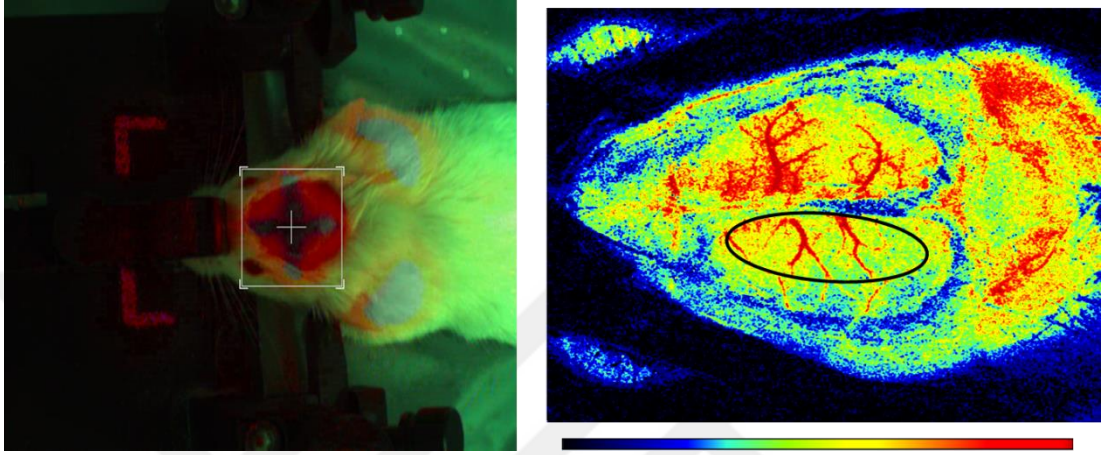


Şekil 5.3.1. Beyin elektriksel aktivite kayıt alımı.

5.4. Lazer speckle görüntüleme sistemi

Deneyin bu aşamasında yukarıdaki Şekil 5.1.1.'de gösterildiği gibi her grup için benzer işlemler yapıldı, farklı olarak EEG kaydı yerine lazer speckle görüntüleme sistemi ile 2,5 saat BKA kaydı alındı. Bölgesel kan akımı görüntüle yapılmadan önce denekler yukarıda bahsedildiği gibi anestezi altına alındı, stereotaktik çerçeveye yerleştirildi. Deney süresince farelerin vücut sıcaklığı ısıtıcı battaniye sistemi (507221F, Harvard Apparatus, ABD) ile düzenli olarak ölçüldü. Farelerin sol korteksi dura mater korunacak şekilde yüksek hızlı tur aleti (Marathon-3, Güney Kore) kullanılarak kaldırıldı. Pericam PSI Sistemi (Perimed) kullanılarak

beynin yaklaşık 10 cm üzerine yerleştirilen bir CCD kamera aracılığıyla gerçek zamanlı BKA değışiklikleri (Şekil 5.4.1) iki saat boyunca kaydedildi. Lazerin penetrasyon derinliği (785 nm), beyin yüzeyinin yaklaşık 500 µm altındadır. BKA parametreleri bir kan perfüzyon görüntüleme yazılımı (PIMSoft Perimed) kullanılarak hesaplandı. Kayıt tamamlandıktan sonra fareler sakrifiye edildi.



Şekil 5.4.1. Bölgesel beyin kan akımı ölçümü: (Kırmızı renk barı kanlanmanın arttığı bölgeleri ifade ederken mavi renk barı ise kanlanmanın olmadığı bölgeleri ifade eder).

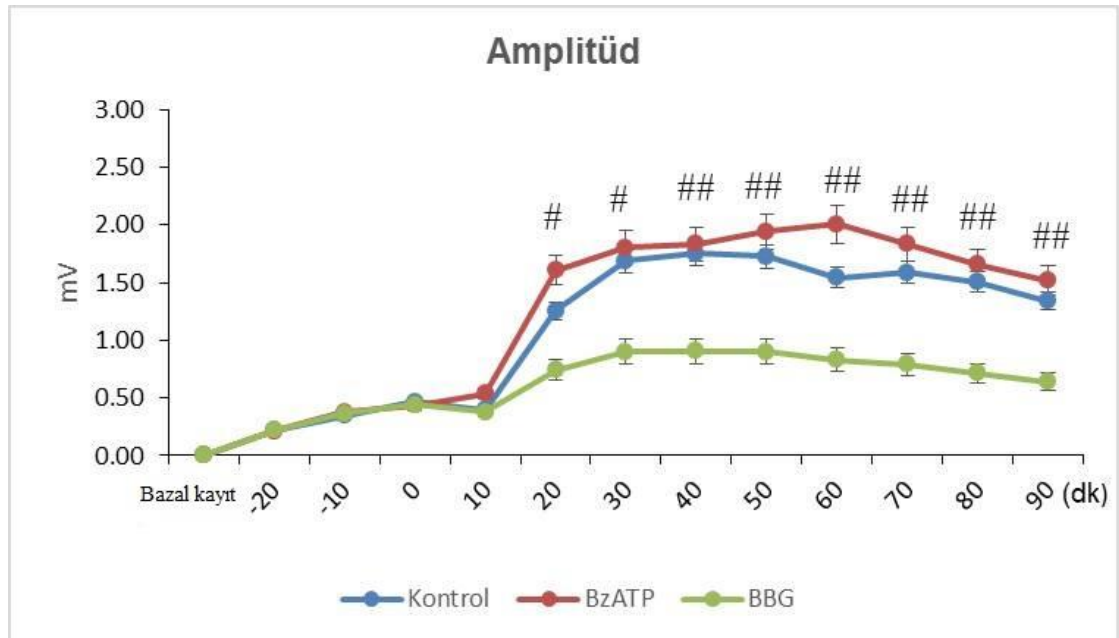
5.5. İstatistik

Elde edilen datalar SPSS istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farklar *One Way Anova* kullanılarak, en düşük anlamlı farklılık testiyle analiz edilmiştir. Bütün değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiş, * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Amplitüd ölçümü

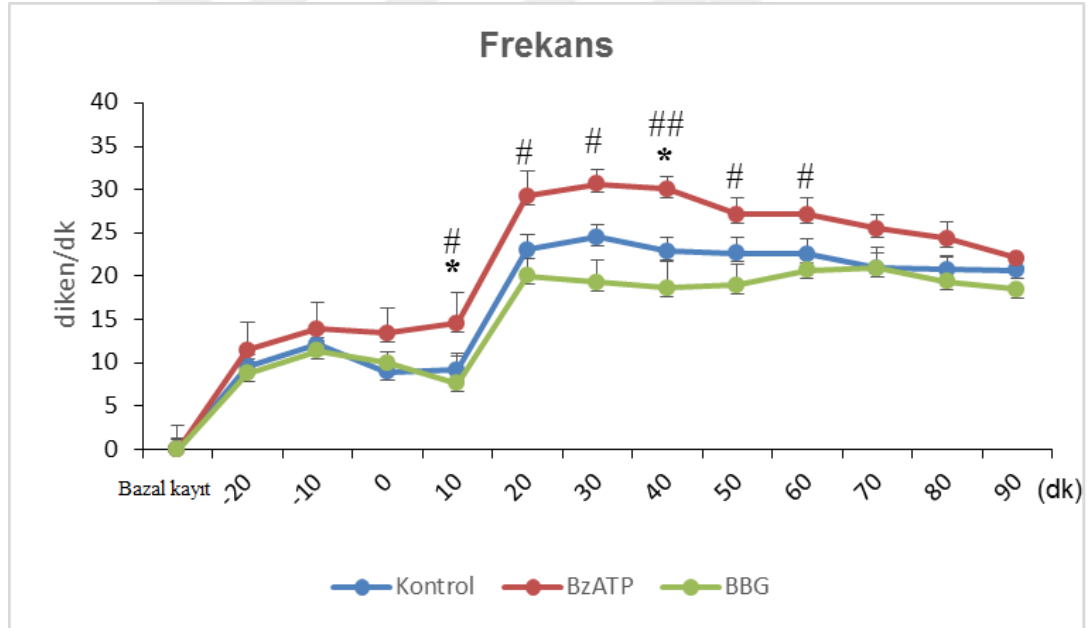
Deney gruplarının gerçek zamanlı epileptik aktivite kaydını almak için kullanılan EEG’de ilk olarak bazal değerleri alındı ve sonra ilgili ajan verildi. Her üç grup penisilin ile indüklenmeden önce benzer elektriksel aktivite göstererek giderek genlikleri artmıştır. Epileptik aktiviteyi tetiklemek için 30. dakikada verilen penisilin indüklenmesiyle birlikte gruplar arasında genlik farklılıkları gözlenildi. İndüklenme sonrası deney süresi boyunca kontrol grubu BzATP ve BBG gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel bir anlamlılık gözlemlenmemiştir. BBG ve BzATP grupları ise penisilin indüklenmesi sonrası genlikleri benzer eğilim göstererek artmış ve deney bitimine yakın benzer şekilde genliklerinde azalma gözlenmiştir. Özellikle EEG kaydının 30. dakikasından itibaren her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık artmış, bu anlamlılık deney sonuna doğru değerini korumuştur. (## $p < 0.01$ / # $p < 0.05$, “#” BzATP grubuna göre BBG grubunun anlamlılığını ifade etmektedir.)



Şekil 6.1.1. Kontrol, BzATP ve BBG deney gruplarının zamana bağlı olarak genliklerinin gösterimi.

6.2. Frekans ölçümü

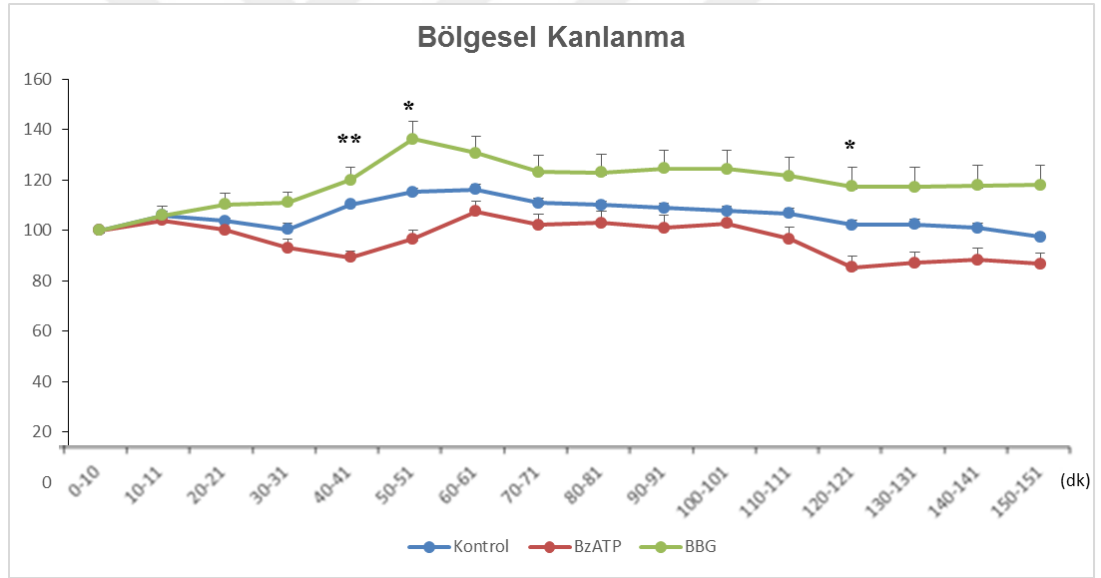
Gerçek zamanlı olarak frekansları ölçülen deney grupları 30. dakikada penisilin ile indüklenmesiyle farklı frekans değerleri ortaya koymuşlardır. BBG deney grubu, deney süresi boyunca kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamda herhangi bir anlamlılık gözlemlenmemiştir. Penisilin indüklenmesinden sonraki ilk 70 dakika içerisinde BBG deney grubu BzATP ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılık ortaya koymuştur. Deney süresi boyunca BzATP deney grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ise sadece 0-10. dakikaları arası ile 30-40. dakikaları arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmiştir. Genel anlamda her bir grubun frekansı deney başlangıç değerine göre artmıştır. (* $p < 0.05$, “ * “ kontrol grubunu göre BzATP grubunun anlamlılığını, ## $p < 0.01$ / # $p < 0.05$, “ # “ BzATP grubuna göre BBG grubunun anlamlılığını ifade etmektedir.)



Şekil 6.2.1. Kontrol, BzATP ve BBG deney gruplarının zamana bağlı olarak frekanslarının gösterimi.

6.3. Bölgesel beyin kan akımı ölçümü

Her bir deney grubunun sol korteksi kaldırıldı ve bölgesel beyin akımları 2,5 saat boyunca lazer speckle görüntüleme sistemiyle takip edildi. Deneyin 30. dakikasında verilen penisilin ile indüklenen deney grupları benzer bölgesel kanlanma eğilimleri gösterdikleri gözlemlendi. Deneyin 40-60. dakikaları ile 120-130. dakikaları arasından BzATP deney grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında bölgesel kanlanma istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmiştir. BBG deney grubunun başlangıç durumuna göre bölgesel kanlanmasında artış olurken BzATP deney grubunda ise azalma görülmüştür. BBG deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık gözlemlenmemiştir. (** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$, “ * “ kontrol grubuna göre BzATP grubunun anlamlılığını ifade etmektedir.)



Şekil 6.3.1. Kontrol, BzATP ve BBG deney gruplarının zamana bağlı olarak bölgesel beyin kan akımının gösterimi.

7. TARTIŞMA

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında farmakolojik P2X7 reseptörü agonisti BzATP ve antagonisti BBG kullanılarak reseptörün epilepsi sonrasında beyin elektriksel aktivitesine ve beyin kan akımına olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Epilepsi patofizyolojisi tam olarak olarak bilinmemekte ve verilen antikonvülsan ilaçlar nöbetleri tamamen ortadan kaldırmamaktadır. Bu nedenle GABA inhibisyonunu ortadan kaldırma etkisi ortaya koyarak epileptik nöbetleri tetikleyen penisilin konvülsan maddesi kullanılarak epilepsi deney modeli oluşturulmuştur (167).

Literatürdeki araştırmalarda BzATP ve BBG ajanlarının ise hücre sağ kalım üzerine etkisi ile ilgili tamamen ortak bir görüş hakim değildir. Fakat, beyin hasarı sonrası hücre dışında konsantrasyonu artan ATP, P2X7 reseptörünü aktive ederek glutamat salınımına ve immün hücrelerinde yüksek ekspresyonuna neden olduğu bilinmektedir (118, 129). Bu durum beyinde iyon dengesinin bozulmasına, eksitotoksositeye ve hücre dışı potasyum seviyelerinde artışa sebep olmaktadır (159). P2X7 reseptörünün tüm bu süreçteki rolünü daha iyi anlayabilmek için agonist maddesi BzATP ve antagonist maddesi BBG epilepsi deney modelinde uygulandı. Ayrıca BzATP, BBG ve kontrol deney gruplarının bölgesel kan akımına olan etkilerini incelemek için lazer speckle görüntüleme sistemi kan akımı kaydı alındı.

P2X7 reseptörü agonisti BzATP ve antagonisti BBG'nin epileptik aktiviteye olan etkilerini incelemek için gerçek zamanlı olarak EEG kaydı alındı. Epileptik aktiviteyi tetiklemek için 30. dakikada verilen penisilin indüklenmesiyle birlikte gruplar arasında genlik farklılıkları gözlenildi. İndüklenme sonrası deney süresi boyunca kontrol grubu; BzATP ve BBG gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel bir anlamlılık gözlemlenmemiştir. BBG ve BzATP grupları ise penisilin indüklenmesi sonrası genlikleri benzer eğilim göstererek artmış ve deney bitimine yakın benzer şekilde genliklerinde azalma gözlenmiştir. Özellikle EEG kaydının 30. dakikasından itibaren her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık artmış, bu anlamlılık deney sonuna doğru değerini korumuştur (**Şekil 6.1.1**). BBG maddesi her ne kadar nöbet

şiddetini azaltmış olarak bir antikonvülzan etkisi gösterse de epileptik aktiviteyi tamamen ortadan kaldırmamıştır. BBG'nin bu etkisi başka çalışmalarda gözlenmiştir. Örneğin, Fischer ve arkadaşlarının fareler üzerinde yapmış olduğu çalışmada BBG, epilepsi nöbetini aktive edecek dozda verilen pentilenetetrazol grubunda antikonvülzan aktivite gösterirken, maksimum elektroşok, akut penilenetetrazol, subkronik tedavi gruplarında bu etkiyi göstermemiştir. Antikonvülzan etki göstermesinin nedeni olarak sodyum kanallarını bloklamak için yeterli BBG mikromolar konsantrasyonu beyinde bulunmaması gösterilmiştir (168). Ayrıca kainik asit ile indüklenen fareler ile pilokarpin ile indüklenen sıçanlarda P2X7 reseptörü antagonistleri BBG ve OxATP'nin dental girus ve frontopariyetal korteksin moleküler tabakasında astrositlerin apoptotik kaybını önlediği görülmüştür (169). Literatürdeki bu farklı deneysel sonuçlar, kullanılan anestezi ajanların ve kemokonvülsanların etki mekanizmaları, epilepsi nöbet şiddeti ve süresi, farklı hayvan türlerinin kullanılmasından kaynaklanmış olabilir.

BBG antagonistinin nöbet sıklığını ve şiddetini azaltmasının bir nedeni olarak P2X7 reseptörü aracılığıyla tetiklenen enflamasyonu engellediği düşünülebilir. Örneğin, epilepsi modeli dışında yapılan beyin felci modelinde BBG ajanının aktif mikroglia hücre sayısını anlamlı olarak azalttığı belirtilmiştir. Bu nöroprotektif etkinin, sağ kalım kinaz yollarının aktivasyonu üzerinden değil, daha çok hücre içi Ca^{2+} aşırı birikimini durdurarak gerçekleştiği düşünülmüştür (110). Bilindiği üzere P2X7 reseptörü aktivasyonu hücre dışı Ca^{2+} konsantrasyonunu artırır. Yapılan in vitro oksijen ve glikoz yoksunluğu deneyinde BBG'nin Ca^{2+} yanıtlarını, IL-1 β , p-38 fosforilasyonunu ve glial aktivasyonun ekspresyonunu azalttığı benzer şekilde gösterilmiştir (170). BBG deney grubunda epileptik aktivitenin düşük olması, BBG'nin hücreler arası Ca^{2+} birikimini durdurarak endoplazmik retikulum stresini, organel hasarını ve apoptozu azaltması nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Yüksek hücre dışı ATP ile uyarılan P2X7 reseptörü Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} için geçirgen olduğu ve böylece Panx1 ile por oluşturduğu düşünülmüştür (171). Bu nedenle yapılan bir çalışmada BBG'nin göstermiş olduğu bu nöroprotektif etki P2X7 ve Panx1 knock-out deney çalışmalarında da gözlenmiştir (170).

P2X7 reseptörü antagonist maddesi BBG ve agonist maddesi BzATP'nin epileptik nöbet sıklığına olan etkisini anlamak için deney hayvanlarının frekans kayıtları alındı. BBG deney grubu, deney süresi boyunca kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamda herhangi bir anlamlılık gözlemlenmemiştir. Penisilin indüklenmesinden sonraki ilk 70 dakika içerisinde BBG deney grubu BzATP ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılık ortaya koymuştur. Deney süresi boyunca BzATP deney grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ise sadece 30-40. dakikaları arası ile 40-50. dakikaları arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmiştir. Genel anlamda her bir grubun frekansı deney başlangıç değerine göre artmıştır (**Şekil 6.2.1**). Kontrol ve BBG deney gruplarında penisilin indüklenmesinden sonraki ilk 10 dakika içerisinde epileptik aktivitenin şiddeti ve sıklığı düşüş göstermiştir. Bunun nedeni olarak P2X7 reseptörü aracılı beyin enflamasyonunun başlangıçta koruyucu etki göstermesi sonucu olabilir (172). BBG deney grubunun epileptik aktivite sıklığı penisilin ile indüklenmeden önceki değere düşürememesinin nedeni hücre dışı ATP'nin sadece P2X7 reseptörü üzerinden değil aynı zamanda P2X ve P2Y reseptörleri üzerinden de etki gösteriyor olmasından kaynaklanabilir.

Aurora Barros ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada BzATP'nin, epilepsi ve kontrol grubunda neokorteksin sinir terminallerindeki glutamat ve GABA alınımını azalttığı, fakat epileptik dokuda GABA alınımının daha etkili bir şekilde inhibe edildiğini göstermişlerdir (173). Bu nedenle yapmış olduğumuz frekans kaydında, BzATP ile kontrol grubundaki epileptik aktivitenin sıklığı bakımından farklılığı GABA'nın aşırı inhibe edilmiş olmasından kaynaklanmış olabilir (**Şekil 6.2.1**). BzATP deney grubu, kontrol grubuna göre nöbet şiddetini daha fazla artıramadığı düşünülse de, bu durum epilepsi nedeniyle ortamdaki aşırı bir şekilde bulunan ATP'nin reseptörü aktive etmek için yeterli olduğu için gerçekleşmiş olabilir (**Şekil 6.1.1**). Ayrıca reseptörün C-terminal bölgesi reseptörün otokontrol mekanizmasını aktive ederek fosforilasyonu engellemeye çalışması ve böylece enflamasyonun daha fazla şiddetlenmemesine yardımcı olabilir. Bu bilgilerin yanı sıra BzATP deney grubunda Ca^{2+} 'ye yanıt verebilen mikrodomanlere sahip olan astrositlerin devamlı ve yoğun uyarılarla eksitotoksisteyi arttırmış ve P2X7

reseptörünün Panx1 kanalı ile por oluşturarak Ca^{2+} hücre içi akışını arttırmış olabilir. Beyin felci modeli uygulanmış farelerde P2X7 reseptörünün BzATP ile aktivasyonunda iskemik striatum bölgesinde mikroglia hücresi sayısında artış gözlemleyerek, BzATP aracılı reseptör aktivasyonunun enflamatuvar yanıtları tetiklediği düşünülmüştür. Çünkü BzATP, kaspaz-1 ve IL-1 β proteinlerini arttırmıştır. Aynı şekilde BzATP'nin iskemik hasar şiddetini kontrole göre çok arttırmadığı görülmüştür. Yapılan in vitro çalışmada ise BzATP'nin Ca^{2+} hücre içi alınımını arttırdığı gözlenmiştir (110). Bu bulgulardan farklı olarak yüksek frekanslı epileptik aktivite koşullarında hücre dışı Ca^{2+} konsantrasyonu P2X7 reseptör aktivasyonuna izin vererek düştüğü ve bu düşüşün salınan ATP'nin miktarındaki artışa paralel olarak gerçekleştiği belirtilmiş, Ca^{2+} , P2X7 reseptörünün bir negatif modülatörü olarak işlev gördüğü tanımlanmıştır (123, 174, 175).

BzATP, BBG ve kontrol deney gurublarının bölgesel beyin akımları 2,5 saat boyunca lazer speckle görüntüleme sistemiyle takip edildi. Deneyin 30. dakikasında verilen penisilin ile indüklenen deney grupları benzer bölgesel kanlanma eğilimleri gösterdikleri gözlemlendi. Deneyin 40-60. dakikaları ile 120-130. dakikaları arasında BzATP deney grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında bölgesel kanlanma istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmiştir. BBG deney grubunun başlangıç durumuna göre bölgesel kanlanmasında artış olurken BzATP deney grubunda ise azalma görülmüştür. BBG deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık gözlemlenmemiştir.

Genel olarak nöral aktivite artışının beyin kan akımı artışına neden olduğu bilinir, fakat nasıl meydana geldiği hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Fareler üzerinde yapılan bazı çalışmalarda beyin kan akımı artışının astrositlerdeki Ca^{2+} ile ilişkili olduğu düşünülürken bazı kanıtlar ise öncelikle astrosit aracılı kan akış artışının Cox-1 metabolitine bağlı olduğu belirtilmiştir. Astrositlerdeki Ca^{2+} 'nin, araşidonik asit metabolit ürünleri tarafından aracılık edilen yolak üzerinden kan akımını arttırdığı gösterilmiştir. Cox-1 inhibitörünün kullanıldığı bir deneyde kısmen de olsa kan akımının baskılandığı görülmüştür (176). Ayrıca bu bilgilerin dışında nöronal aktiviteye yanıt olarak, astrositik Ca^{2+} arttırmak için nöronal olarak

salgılanan glutamatın astrositlerdeki glutamat reseptörleri üzerinde bir rolü olduğu düşünülmektedir. Böylece salınan Ca^{2+} 'nin, araşidonik asidin aşağı yolaklarının aktivitesini vazoaaktif maddelerin oluşumunu ve salınımını başlatacağı düşünülmüştür (176-179)

Bu bilgiler ışığında deney gruplarımızı değerlendirecek olursak, BBG deney grubunun bölgesel kan akımının diğer her iki deney grubundan fazla olması anlamlı değildir (**Şekil 6.3.1**). BBG, P2X7 reseptörünün aktivasyonunu inhibe ederek ATP'nin bu reseptör üzerinden hücre içerisine Ca^{2+} alınımını engellediği düşünülmektedir. Fakat hücre içerisindeki Ca^{2+} konsantrasyonunun düşük olması bölgesel kan akımını tek başına düşürmede etkili olmadığı görülmüştür.

Fergus ve arkadaşları (1997) nöronal aktivite süresince salınan glutamatın, nöronal NMDA reseptörü üzerinden nNOS'u aktive ederek NO salınımına neden olduğu ve böylece salgılanan NO, düz kaslar üzerinde etkili olur cGMP yolağı üzerinden kan akışını artırır (180). BzATP deney grubunu kan akımının kontrol grubuna göre kan akımının yüksek olması aşırı uyarılma sonucu ortamda yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutamatın çok fazla NO salınımına neden olduğunu gösterebilir. Çünkü BzATP, P2X7 reseptörünün daha fazla uyarılmasını sağlayarak astrositlerden daha fazla glutamat salgılanmasına neden olduğu düşünülmektedir.

8. SONUÇ

Yapılan bu tez çalışmasında P2X7 reseptörü agonisti BzATP ve antagonisti BBG kullanılarak reseptörün epilepsi sonrasında beyin elektriksel aktivitesine ve beyin kan akımına olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. BBG epilepsi nöbet şiddetini ve sıklığını azaltarak bir antikonvülzan rol aldığını ancak tek başına yeterli olamayacağını, BzATP ise epilepsi nöbet şiddetini ve sıklığını artırdığı gözlemlenmiştir. BBG, bölgesel kan akımını arttırdığı fakat BzATP tam tersine azalttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu bilgiler klinik çalışmalarda, gerektiğinde var olan tedavilerle kombine edilerek daha etkin tedavi seçenekleri oluşturması ve hastaların fonksiyonel geri kazanımlarının artırılması düşünülmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Pitkänen, A, and Lukasiuk, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy & Behavior* **14**, 16-25. (2009).
2. Domercq, M, Perez-Samartin, A, Aparicio, D, Alberdi, E, Pampliega, O, and Matute, C. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia* **58**, 730-740. (2010).
3. Kilic, E, Spudich, A, Kilic, U, Rentsch, KM, Vig, R, Matter, CM, et al. ABCC1: a gateway for pharmacological compounds to the ischaemic brain. *Brain* **131**, 2679-2689. (2008).
4. Chang, BS, and Lowenstein, DH. Epilepsy. *N Engl J Med* **349**, 1257-1266. (2003).
5. Hirtz, D, Thurman, DJ, Gwinn-Hardy, K, Mohamed, M, Chaudhuri, AR, and Zalutsky, R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* **68**, 326-337. (2007).
6. Forsgren, L, Beghi, E, Oun, A, and Sillanpaa, M. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. *Eur J Neurol* **12**, 245-253. (2005).
7. Pugliatti, M, Beghi, E, Forsgren, L, Ekman, M, and Sobocki, P. Estimating the cost of epilepsy in Europe: a review with economic modeling. *Epilepsia* **48**, 2224-2233. (2007).
8. Velioglu, SK, Bakirdemir, M, Can, G, and Topbas, M. Prevalence of epilepsy in northeast Turkey. *Epileptic Disord* **12**, 22-37. (2010).
9. Laxer, KD, Trinkka, E, Hirsch, LJ, Cendes, F, Langfitt, J, Delanty, N, et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav* **37**, 59-70. (2014).
10. Loscher, W. Relationship between GABA concentrations in cerebrospinal fluid and seizure excitability. *J Neurochem* **38**, 293-295. (1982).
11. Tatum, WOt. Mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol* **29**, 356-365. (2012).
12. Aquilino, MS, Whyte-Fagundes, P, Zoidl, G, and Carlen, PL. Pannexin-1 channels in epilepsy. *Neurosci Lett* (2017).

13. Wang, J, Lin, ZJ, Liu, L, Xu, HQ, Shi, YW, Yi, YH, et al. Epilepsy-associated genes. *Seizure* **44**, 11-20. (2017).
14. Buckmaster, PS. Does mossy fiber sprouting give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol* **813**, 161-168. (2014).
15. Vezzani, A, Lang, B, and Aronica, E. Immunity and Inflammation in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, a022699. (2015).
16. Dudek, FE, and Staley, KJ. The Time Course and Circuit Mechanisms of Acquired Epileptogenesis. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (Noebels, J. L., Avoli, M., Rogawski, M. A., Olsen, R. W., and Delgado-Escueta, A. V., eds), Bethesda (MD). (2012).
17. Tortora, G, and Grabowski, S. Nervous tissue: disorders: homeostatic imbalances. Principles of Anatomy and Physiology. John Wiley and Sons, New York(2003).
18. Straub, H, Hohling, JM, Kohling, R, Lucke, A, Tuxhorn, I, Ebner, A, et al. Effects of nifedipine on rhythmic synchronous activity of human neocortical slices. *Neuroscience* **100**, 445-452. (2000).
19. Stafstrom, CE. Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 983-1004. (2006).
20. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* **30**, 389-399. (1989).
21. Fisher, RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Brain Res Rev* **14**, 245-278. (1989).
22. Schachter, SC. Seizure disorders. *Med Clin North Am* **93**, 343-351, viii. (2009).
23. Luders, H, Acharya, J, Baumgartner, C, Benbadis, S, Bleasel, A, Burgess, R, et al. A new epileptic seizure classification based exclusively on ictal semiology. *Acta Neurol Scand* **99**, 137-141. (1999).
24. Schweitzer, ME, and Fort, J. Cost-effectiveness of MR imaging in evaluating polymyositis. *AJR Am J Roentgenol* **165**, 1469-1471. (1995).

25. Jonas, R, Nguyen, S, Hu, B, Asarnow, RF, LoPresti, C, Curtiss, S, et al. Cerebral hemispherectomy: hospital course, seizure, developmental, language, and motor outcomes. *Neurology* **62**, 1712-1721. (2004).
26. Vezzani, A, French, J, Bartfai, T, and Baram, TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* **7**, 31-40. (2011).
27. Szabo, CA, Patel, M, and Uteshev, VV. Cerebrospinal Fluid Levels of Monoamine Metabolites in the Epileptic Baboon. *J Primatol* **4**(2015).
28. Podell, M, and Hadjiconstantinou, M. Cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid and glutamate values in dogs with epilepsy. *Am J Vet Res* **58**, 451-456. (1997).
29. Morita, T, Shimada, A, Takeuchi, T, Hikasa, Y, Sawada, M, Ohiwa, S, et al. Cliniconeuropathologic findings of familial frontal lobe epilepsy in Shetland sheepdogs. *Can J Vet Res* **66**, 35-41. (2002).
30. van Gelder, NM, Edmonds, HL, Jr., Hegreberg, GA, Chatburn, CC, Clemmons, RM, and Sylvester, DM. Amino acid changes in a genetic strain of epileptic beagle dogs. *J Neurochem* **35**, 1087-1091. (1980).
31. Morita, T, Takahashi, M, Takeuchi, T, Hikasa, Y, Ikeda, S, Sawada, M, et al. Changes in extracellular neurotransmitters in the cerebrum of familial idiopathic epileptic shetland sheepdogs using an intracerebral microdialysis technique and immunohistochemical study for glutamate metabolism. *J Vet Med Sci* **67**, 1119-1126. (2005).
32. Bode, H. Intracranial blood flow velocities during seizures and generalized epileptic discharges. *Eur J Pediatr* **151**, 706-709. (1992).
33. Lourenco, CF, Ledo, A, Barbosa, RM, and Laranjinha, J. Neurovascular-neuroenergetic coupling axis in the brain: master regulation by nitric oxide and consequences in aging and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* **108**, 668-682. (2017).
34. Hamamoto, Y, Hasegawa, D, Mizoguchi, S, Yu, Y, Wada, M, Kuwabara, T, et al. Changes in the interictal and early postictal diffusion and perfusion magnetic resonance parameters in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res* **133**, 76-82. (2017).

35. Mountz, JM, Patterson, CM, and Tamber, MS. Pediatric Epilepsy: Neurology, Functional Imaging, and Neurosurgery. *Semin Nucl Med* **47**, 170-187. (2017).
36. Vella, MA, Crandall, ML, and Patel, MB. Acute Management of Traumatic Brain Injury. *Surg Clin North Am* **97**, 1015-1030. (2017).
37. Vezzani, A, Aronica, E, Mazarati, A, and Pittman, QJ. Epilepsy and brain inflammation. *Exp Neurol* **244**, 11-21. (2013).
38. Vezzani, A, and Baram, TZ. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr* **7**, 45-50. (2007).
39. Akira, S, Takeda, K, and Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-680. (2001).
40. Perkins, ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 49-62. (2007).
41. Hoebe, K, and Beutler, B. Forward genetic analysis of TLR-signaling pathways: an evaluation. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 824-829. (2008).
42. Gilmore, TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684. (2006).
43. O'Neill, LA, and Kaltschmidt, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* **20**, 252-258. (1997).
44. Balosso, S, Maroso, M, Sanchez-Alavez, M, Ravizza, T, Frasca, A, Bartfai, T, et al. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. *Brain* **131**, 3256-3265. (2008).
45. Viviani, B, Bartesaghi, S, Gardoni, F, Vezzani, A, Behrens, MM, Bartfai, T, et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* **23**, 8692-8700. (2003).
46. Davis, CN, Tabarean, I, Gaidarova, S, Behrens, MM, and Bartfai, T. IL-1beta induces a MyD88-dependent and ceramide-mediated activation of Src in anterior hypothalamic neurons. *J Neurochem* **98**, 1379-1389. (2006).
47. Sanchez-Alavez, M, Tabarean, IV, Behrens, MM, and Bartfai, T. Ceramide mediates the rapid phase of febrile response to IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2904-2908. (2006).

48. Tabarean, IV, Korn, H, and Bartfai, T. Interleukin-1beta induces hyperpolarization and modulates synaptic inhibition in preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Neuroscience* **141**, 1685-1695. (2006).
49. Dinarello, CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519-550. (2009).
50. Zhang, R, Sun, L, Hayashi, Y, Liu, X, Koyama, S, Wu, Z, et al. Acute p38-mediated inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal CA1 neurons by interleukin-1beta. *Neurobiol Dis* **38**, 68-77. (2010).
51. Viviani, B, Gardoni, F, and Marinovich, M. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *Int Rev Neurobiol* **82**, 247-263. (2007).
52. Bezzi, P, Domercq, M, Brambilla, L, Galli, R, Schols, D, De Clercq, E, et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* **4**, 702-710. (2001).
53. Hu, S, Sheng, WS, Ehrlich, LC, Peterson, PK, and Chao, CC. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation* **7**, 153-159. (2000).
54. Stellwagen, D, Beattie, EC, Seo, JY, and Malenka, RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* **25**, 3219-3228. (2005).
55. Ferguson, AR, Christensen, RN, Gensel, JC, Miller, BA, Sun, F, Beattie, EC, et al. Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane. *J Neurosci* **28**, 11391-11400. (2008).
56. Biton, V, Montouris, GD, Ritter, F, Riviello, JJ, Reife, R, Lim, P, et al. A randomized, placebo-controlled study of topiramate in primary generalized tonic-clonic seizures. Topiramate YTC Study Group. *Neurology* **52**, 1330-1337. (1999).
57. Stefan, H, and Feuerstein, TJ. Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacol Ther* **113**, 165-183. (2007).
58. French, JA, Kanner, AM, Bautista, J, Abou-Khalil, B, Browne, T, Harden, CL, et al. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: treatment of refractory epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment

- Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology* **62**, 1261-1273. (2004).
59. Del Puerto, A, Wandosell, F, and Garrido, JJ. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. *Front Cell Neurosci* **7**, 197. (2013).
 60. Burnstock, G. Purines and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*, 333-392. (2009).
 61. Burnstock, G. Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* **15**, 1717-1735. (2009).
 62. Gourine, AV, Wood, JD, and Burnstock, G. Purinergic signalling in autonomic control. *Trends Neurosci* **32**, 241-248. (2009).
 63. Burnstock, G, and Verkhatsky, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf)* **195**, 415-447. (2009).
 64. Burnstock, G, and Knight, GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* **240**, 31-304. (2004).
 65. Vizi, ES, Sperlagh, B, and Baranyi, M. Evidence that ATP released from the postsynaptic site by noradrenaline, is involved in mechanical responses of guinea-pig vas deferens: cascade transmission. *Neuroscience* **50**, 455-465. (1992).
 66. Sawynok, J, Downie, JW, Reid, AR, Cahill, CM, and White, TD. ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res* **610**, 32-38. (1993).
 67. Fields, RD, and Stevens, B. ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci* **23**, 625-633. (2000).
 68. Koles, L, Leichsenring, A, Rubini, P, and Illes, P. P2 receptor signaling in neurons and glial cells of the central nervous system. *Adv Pharmacol* **61**, 441-493. (2011).
 69. Burnstock, G, Krugel, U, Abbracchio, MP, and Illes, P. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Progress in neurobiology* **95**, 229-274. (2011).

70. Giaume, C, Kirchhoff, F, Matute, C, Reichenbach, A, and Verkhratsky, A. Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* **14**, 1324-1335. (2007).
71. Li, L, Lundkvist, A, Andersson, D, Wilhelmsson, U, Nagai, N, Pardo, AC, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 468-481. (2008).
72. Zimmermann, H, Zebisch, M, and Strater, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* **8**, 437-502. (2012).
73. Fredriksson, R, Lagerstrom, MC, Lundin, LG, and Schioth, HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272. (2003).
74. Dare, E, Schulte, G, Karovic, O, Hammarberg, C, and Fredholm, BB. Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol Behav* **92**, 15-20. (2007).
75. Burnstock, G, Fredholm, BB, and Verkhratsky, A. Adenosine and ATP receptors in the brain. *Curr Top Med Chem* **11**, 973-1011. (2011).
76. Abbracchio, MP, and Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **64**, 445-475. (1994).
77. Olah, ME, and Stiles, GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**, 581-606. (1995).
78. Jacobson, KA, Balasubramanian, R, Deflorian, F, and Gao, ZG. G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic Signal* **8**, 419-436. (2012).
79. North, RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**, 1013-1067. (2002).
80. Roberts, JA, Vial, C, Digby, HR, Agboh, KC, Wen, H, Atterbury-Thomas, A, et al. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch* **452**, 486-500. (2006).
81. Yang, D, and Chen, J. The P2X7 receptor in AMD. *Austin J Clin Ophthalmol* **1**, 1012. (2014).
82. Edwards, FA, Gibb, AJ, and Colquhoun, D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* **359**, 144-147. (1992).

83. Silinsky, EM, Gerzanich, V, and Vanner, SM. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br J Pharmacol* **106**, 762-763. (1992).
84. Pankratov, Y, Castro, E, Miras-Portugal, MT, and Krishtal, O. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **10**, 3898-3902. (1998).
85. Pankratov, Y, Lalo, U, Krishtal, O, and Verkhratsky, A. Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J Physiol* **542**, 529-536. (2002).
86. Pankratov, Y, Lalo, U, Krishtal, OA, and Verkhratsky, A. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* **158**, 137-148. (2009).
87. Lalo, U, Pankratov, Y, Parpura, V, and Verkhratsky, A. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of "excitable" molecules in non-excitable cells. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 992-1002. (2011).
88. Abbracchio, MP, Burnstock, G, Boeynaems, JM, Barnard, EA, Boyer, JL, Kennedy, C, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* **58**, 281-341. (2006).
89. Neary, JT, and Zimmermann, H. Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. *Trends Neurosci* **32**, 189-198. (2009).
90. Verkhratsky, A, Krishtal, OA, and Burnstock, G. Purinoreceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol* **39**, 190-208. (2009).
91. Diaz-Hernandez, M, Pintor, J, Castro, E, and Miras-Portugal, MT. Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *Eur J Neurosci* **14**, 918-926. (2001).
92. Vulchanova, L, Riedl, MS, Shuster, SJ, Buell, G, Surprenant, A, North, RA, et al. Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* **36**, 1229-1242. (1997).
93. Kanjhan, R, Housley, GD, Burton, LD, Christie, DL, Kippenberger, A, Thorne, PR, et al. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated

- ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **407**, 11-32. (1999).
94. Norenberg, W, and Illes, P. Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 324-339. (2000).
 95. Bo, X, Kim, M, Nori, SL, Schoepfer, R, Burnstock, G, and North, RA. Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res* **313**, 159-165. (2003).
 96. Atkinson, L, Batten, TF, Moores, TS, Varoqui, H, Erickson, JD, and Deuchars, J. Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience* **123**, 761-768. (2004).
 97. Diaz-Hernandez, M, del Puerto, A, Diaz-Hernandez, JI, Diez-Zaera, M, Lucas, JJ, Garrido, JJ, et al. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* **121**, 3717-3728. (2008).
 98. del Puerto, A, Diaz-Hernandez, JI, Tapia, M, Gomez-Villafuertes, R, Benitez, MJ, Zhang, J, et al. Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *J Cell Sci* **125**, 176-188. (2012).
 99. Burnstock, G. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet* **347**, 1604-1605. (1996).
 100. Inoue, K. ATP receptors of microglia involved in pain. *Novartis Found Symp* **276**, 263-272; discussion 273-281. (2006).
 101. Inoue, K, and Tsuda, M. Microglia and neuropathic pain. *Glia* **57**, 1469-1479. (2009).
 102. Inoue, K, Tsuda, M, and Koizumi, S. ATP receptors in pain sensation: Involvement of spinal microglia and P2X(4) receptors. *Purinergic Signal* **1**, 95-100. (2005).
 103. Hanisch, UK, and Kettenmann, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**, 1387-1394. (2007).

104. Di Virgilio, F, Ceruti, S, Bramanti, P, and Abbracchio, MP. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci* **32**, 79-87. (2009).
105. Denlinger, LC, Fisette, PL, Sommer, JA, Watters, JJ, Prabhu, U, Dubyak, GR, et al. Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**, 1871-1876. (2001).
106. Costa-Junior, HM, Sarmiento Vieira, F, and Coutinho-Silva, R. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signal* **7**, 7-19. (2011).
107. Wickert, LE, Blanchette, JB, Waldschmidt, NV, Bertics, PJ, Denu, JM, Denlinger, LC, et al. The C-terminus of human nucleotide receptor P2X7 is critical for receptor oligomerization and N-linked glycosylation. *PLoS One* **8**, e63789. (2013).
108. Khakh, BS, Burnstock, G, Kennedy, C, King, BF, North, RA, Seguela, P, et al. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* **53**, 107-118. (2001).
109. Rassendren, F, Buell, GN, Virginio, C, Collo, G, North, RA, and Surprenant, A. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* **272**, 5482-5486. (1997).
110. Caglayan, B, Caglayan, AB, Beker, MC, Yalcin, E, Beker, M, Kelestemur, T, et al. Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* **296**, 23-31. (2017).
111. Gudipaty, L, Humphreys, BD, Buell, G, and Dubyak, GR. Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C943-953. (2001).
112. Jiang, LH. Inhibition of P2X(7) receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J* **38**, 339-346. (2009).
113. Stojilkovic, SS, Leiva-Salcedo, E, Rokic, MB, and Coddou, C. Regulation of ATP-gated P2X channels: from redox signaling to interactions with other proteins. *Antioxid Redox Signal* **21**, 953-970. (2014).

114. Yang, D, Elner, SG, Clark, AJ, Hughes, BA, Petty, HR, and Elner, VM. Activation of P2X receptors induces apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 1522-1530. (2011).
115. Nihei, OK, Savino, W, and Alves, LA. Procedures to characterize and study P2Z/P2X7 purinoceptor: flow cytometry as a promising practical, reliable tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**, 415-428. (2000).
116. Coddou, C, Yan, Z, Obsil, T, Huidobro-Toro, JP, and Stojilkovic, SS. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* **63**, 641-683. (2011).
117. Khakh, BS, and North, RA. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* **76**, 51-69. (2012).
118. Sperlagh, B, Vizi, ES, Wirkner, K, and Illes, P. P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in neurobiology* **78**, 327-346. (2006).
119. Lenertz, LY, Gavala, ML, Zhu, Y, and Bertics, PJ. Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. *Immunol Res* **50**, 22-38. (2011).
120. Wiley, JS, Sluyter, R, Gu, BJ, Stokes, L, and Fuller, SJ. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens* **78**, 321-332. (2011).
121. Engel, T, Gomez-Villafuertes, R, Tanaka, K, Mesuret, G, Sanz-Rodriguez, A, Garcia-Huerta, P, et al. Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J* **26**, 1616-1628. (2012).
122. Garcia-Huerta, P, Diaz-Hernandez, M, Delicado, EG, Pimentel-Santillana, M, Miras-Portugal, MT, and Gomez-Villafuertes, R. The specificity protein factor Sp1 mediates transcriptional regulation of P2X7 receptors in the nervous system. *J Biol Chem* **287**, 44628-44644. (2012).
123. Jimenez-Pacheco, A, Mesuret, G, Sanz-Rodriguez, A, Tanaka, K, Mooney, C, Conroy, R, et al. Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079. *Epilepsia* **54**, 1551-1561. (2013).

124. Verkhatsky, A, Pankratov, Y, Lalo, U, and Nedergaard, M. P2X receptors in neuroglia. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* **1**(2012).
125. Ferrari, D, La Sala, A, Chiozzi, P, Morelli, A, Falzoni, S, Girolomoni, G, et al. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J* **14**, 2466-2476. (2000).
126. Baraldi, PG, Romagnoli, R, Tabrizi, MA, Bovero, A, Preti, D, Fruttarolo, F, et al. New heterocyclic ligands for the adenosine receptors P1 and for the ATP receptors P2. *Farmaco* **60**, 185-202. (2005).
127. Sperlagh, B, and Illes, P. Purinergic modulation of microglial cell activation. *Purinergic Signal* **3**, 117-127. (2007).
128. Wiley, JS, and Gu, BJ. A new role for the P2X7 receptor: a scavenger receptor for bacteria and apoptotic cells in the absence of serum and extracellular ATP. *Purinergic Signal* **8**, 579-586. (2012).
129. Cotrina, ML, and Nedergaard, M. Physiological and pathological functions of P2X7 receptor in the spinal cord. *Purinergic Signal* **5**, 223-232. (2009).
130. Illes, P, Verkhatsky, A, Burnstock, G, and Franke, H. P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system. *Neuroscientist* **18**, 422-438. (2012).
131. Di Virgilio, F, Dal Ben, D, Sarti, AC, Giuliani, AL, and Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **47**, 15-31. (2017).
132. Pelegrin, P, Barroso-Gutierrez, C, and Surprenant, A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* **180**, 7147-7157. (2008).
133. Wilson, HL, Francis, SE, Dower, SK, and Crossman, DC. Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation. *J Immunol* **173**, 1202-1208. (2004).
134. Wilson, HL, Varcoe, RW, Stokes, L, Holland, KL, Francis, SE, Dower, SK, et al. P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. *Br J Pharmacol* **151**, 115-127. (2007).
135. Glas, R, Sauter, NS, Schulthess, FT, Shu, L, Oberholzer, J, and Maedler, K. Purinergic P2X7 receptors regulate secretion of interleukin-1 receptor

- antagonist and beta cell function and survival. *Diabetologia* **52**, 1579-1588. (2009).
136. Martin, U, Scholler, J, Gurgel, J, Renshaw, B, Sims, JE, and Gabel, CA. Externalization of the leaderless cytokine IL-1F6 occurs in response to lipopolysaccharide/ATP activation of transduced bone marrow macrophages. *J Immunol* **183**, 4021-4030. (2009).
 137. Munoz-Planillo, R, Kuffa, P, Martinez-Colon, G, Smith, BL, Rajendiran, TM, and Nunez, G. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* **38**, 1142-1153. (2013).
 138. Compan, V, Baroja-Mazo, A, Lopez-Castejon, G, Gomez, AI, Martinez, CM, Angosto, D, et al. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* **37**, 487-500. (2012).
 139. Qu, Y, and Dubyak, GR. P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal* **5**, 163-173. (2009).
 140. Lin, C, Ren, S, Zhang, L, Jin, H, Sun, J, and Zuo, Y. Extracellular ATP induces CD44 shedding from macrophage-like P388D1 cells via the P2X7 receptor. *Hematol Oncol* **30**, 70-75. (2012).
 141. Delarasse, C, Auger, R, Gonnord, P, Fontaine, B, and Kanellopoulos, JM. The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **286**, 2596-2606. (2011).
 142. Garbers, C, Janner, N, Chalaris, A, Moss, ML, Floss, DM, Meyer, D, et al. Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem* **286**, 14804-14811. (2011).
 143. Pupovac, A, Foster, CM, and Sluyter, R. Human P2X7 receptor activation induces the rapid shedding of CXCL16. *Biochem Biophys Res Commun* **432**, 626-631. (2013).
 144. Gu, B, Bendall, LJ, and Wiley, JS. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* **92**, 946-951. (1998).

145. Moon, H, Na, HY, Chong, KH, and Kim, TJ. P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol Lett* **102**, 98-105. (2006).
146. Lopez-Castejon, G, Theaker, J, Pelegrin, P, Clifton, AD, Braddock, M, and Surprenant, A. P2X(7) receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases. *J Immunol* **185**, 2611-2619. (2010).
147. Gu, BJ, and Wiley, JS. Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor. *Blood* **107**, 4946-4953. (2006).
148. Ferrari, D, Los, M, Bauer, MK, Vandenameele, P, Wesselborg, S, and Schulze-Osthoff, K. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* **447**, 71-75. (1999).
149. Ferrari, D, Wesselborg, S, Bauer, MK, and Schulze-Osthoff, K. Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol* **139**, 1635-1643. (1997).
150. Korcok, J, Raimundo, LN, Ke, HZ, Sims, SM, and Dixon, SJ. Extracellular nucleotides act through P2X7 receptors to activate NF-kappaB in osteoclasts. *J Bone Miner Res* **19**, 642-651. (2004).
151. Gavala, ML, Pfeiffer, ZA, and Bertics, PJ. The nucleotide receptor P2RX7 mediates ATP-induced CREB activation in human and murine monocytic cells. *J Leukoc Biol* **84**, 1159-1171. (2008).
152. Gavala, ML, Hill, LM, Lenertz, LY, Karta, MR, and Bertics, PJ. Activation of the transcription factor FosB/activating protein-1 (AP-1) is a prominent downstream signal of the extracellular nucleotide receptor P2RX7 in monocytic and osteoblastic cells. *J Biol Chem* **285**, 34288-34298. (2010).
153. Yip, L, Woehrle, T, Corriden, R, Hirsh, M, Chen, Y, Inoue, Y, et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* **23**, 1685-1693. (2009).

154. Endemann, G, Stanton, LW, Madden, KS, Bryant, CM, White, RT, and Protter, AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* **268**, 11811-11816. (1993).
155. Gu, BJ, Saunders, BM, Petrou, S, and Wiley, JS. P2X(7) is a scavenger receptor for apoptotic cells in the absence of its ligand, extracellular ATP. *J Immunol* **187**, 2365-2375. (2011).
156. Gu, BJ, Duce, JA, Valova, VA, Wong, B, Bush, AI, Petrou, S, et al. P2X7 receptor-mediated scavenger activity of mononuclear phagocytes toward non-opsinized particles and apoptotic cells is inhibited by serum glycoproteins but remains active in cerebrospinal fluid. *J Biol Chem* **287**, 17318-17330. (2012).
157. Gu, BJ, Rathsam, C, Stokes, L, McGeachie, AB, and Wiley, JS. Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X(7) pore formation. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C430-439. (2009).
158. Gu, BJ, Saunders, BM, Jursik, C, and Wiley, JS. The P2X7-nonmuscle myosin membrane complex regulates phagocytosis of nonopsinized particles and bacteria by a pathway attenuated by extracellular ATP. *Blood* **115**, 1621-1631. (2010).
159. Deuchars, SA, Atkinson, L, Brooke, RE, Musa, H, Milligan, CJ, Batten, TF, et al. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* **21**, 7143-7152. (2001).
160. Illes, P, Khan, TM, and Rubini, P. Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist? *J Neurosci* **37**, 7049-7062. (2017).
161. Monif, M, Burnstock, G, and Williams, DA. Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1753-1756. (2010).
162. Koshinaga, M, Sanon, HR, and Whittemore, SR. Altered acidic and basic fibroblast growth factor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol* **120**, 32-48. (1993).
163. Garre, JM, Retamal, MA, Cassina, P, Barbeito, L, Bukauskas, FF, Saez, JC, et al. FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens

- pannexin and connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22659-22664. (2010).
164. Garre, JM, Yang, G, Bukauskas, FF, and Bennett, MV. FGF-1 Triggers Pannexin-1 Hemichannel Opening in Spinal Astrocytes of Rodents and Promotes Inflammatory Responses in Acute Spinal Cord Slices. *J Neurosci* **36**, 4785-4801. (2016).
 165. Avendano, BC, Montero, TD, Chavez, CE, von Bernhardt, R, and Orellana, JA. Prenatal exposure to inflammatory conditions increases Cx43 and Panx1 unopposed channel opening and activation of astrocytes in the offspring effect on neuronal survival. *Glia* (2015).
 166. Engel, T, Jimenez-Pacheco, A, Miras-Portugal, MT, Diaz-Hernandez, M, and Henshall, DC. P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **4**, 174-187. (2012).
 167. Aydin-Abidin, S, Yildirim, M, Abidin, I, Akca, M, and Cansu, A. Comparison of focally induced epileptiform activities in C57BL/6 and BALB/c mice by using in vivo EEG recording. *Neurosci Lett* **504**, 165-169. (2011).
 168. Fischer, W, Franke, H, Krugel, U, Muller, H, Dinkel, K, Lord, B, et al. Critical Evaluation of P2X7 Receptor Antagonists in Selected Seizure Models. *PLoS One* **11**, e0156468. (2016).
 169. Kim, JE, Ryu, HJ, Yeo, SI, and Kang, TC. P2X7 receptor differentially modulates astroglial apoptosis and clasmatodendrosis in the rat brain following status epilepticus. *Hippocampus* **21**, 1318-1333. (2011).
 170. de Freitas, PHM, da Silva Ferreira, NC, Fioravante-Rezende, JG, de Menezes Santos, L, Alves, LA, and Rozental, R. Dispelling myths about connexins, pannexins and P2X7 in hypoxic-ischemic central nervous system. *Neurosci Lett* (2017).
 171. Pelegrin, P, and Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal* **25**, 5071-5082. (2006).

172. Sperlagh, B, and Illes, P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends in pharmacological sciences* **35**, 537-547. (2014).
173. Barros-Barbosa, AR, Fonseca, AL, Guerra-Gomes, S, Ferreira, F, Santos, A, Rangel, R, et al. Up-regulation of P2X7 receptor-mediated inhibition of GABA uptake by nerve terminals of the human epileptic neocortex. *Epilepsia* **57**, 99-110. (2016).
174. Virginio, C, Church, D, North, RA, and Surprenant, A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* **36**, 1285-1294. (1997).
175. Yan, Z, Khadra, A, Sherman, A, and Stojilkovic, SS. Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric. *The Journal of general physiology* **138**, 437-452. (2011).
176. Takano, T, Tian, GF, Peng, W, Lou, N, Libionka, W, Han, X, et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* **9**, 260-267. (2006).
177. Zonta, M, Angulo, MC, Gobbo, S, Rosengarten, B, Hossmann, KA, Pozzan, T, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* **6**, 43-50. (2003).
178. Mulligan, SJ, and MacVicar, BA. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* **431**, 195-199. (2004).
179. Petzold, GC, Albeanu, DF, Sato, TF, and Murthy, VN. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* **58**, 897-910. (2008).
180. Howarth, C. The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Front Neurosci* **8**, 103. (2014).

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-953.09.09-E.28527
Konu : Etik Kurulu Hk.

21/08/2017

Sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 20/02/2014 tarihli 13 karar no ile onay verilen "P2X7 Reseptörü Agonisti ve Antagonistinin Epilepsi Sonrası Hücre Sağ Kalımına Olan Etkilerinin Araştırılması" isimli çalışmanın Etik Onay Süresinin 21.08.2017 tarihinden itibaren "üç yıl" uzatılması isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 21.08.2017 tarihinde e-İmzalanmıştır.
Evrakınuzun <https://obys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 224A8AD4XC kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

Sayı : 38328770 -18
Konu: Etik Kurulu Kararı

20/02/2014

Sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ


Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "P2X7 Reseptörlü Agonisti ve Antagonistinin Epilepsi Sonrası Hücre Sağ Kalımına Olan Etkilerinin Araştırılması" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.



Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

20/02/2014-İ.FİL. 

Tel: (0216)681 53 00
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: iknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19.34810
Kavacık/BEYKOZ



T.C.

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI**

| Toplantı Tarihi | Karar No | İlgi | Proje Yürütücüsü |
|-----------------|----------|------|--------------------------|
| 20/02/2014 | 13 | | Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ |

"P2X7 Reseptörü Agonisti ve Antagonistinin Epilepsi Sonrası Hücre Sağ Kalımına Olan Etkilerinin Araştırılması" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 3 ay

| GÖREVİ | ADI SOYADI | İMZA |
|-------------------|-----------------------------------|------|
| Başkan | Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK | |
| Başkan Yardımcısı | Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ | |
| Üye | Doç. Dr. Mustafa ÖZTÜRK | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL | |
| Üye | Taha KELEŞTEMUR | |
| Üye | Özge Şeyda DURGUT | |
| Üye | Ekrem Musa ÖZDEMİR | |



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.28328
Konu : Etik Kurulu Kararı

20/07/2018

Sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 21.08.2017 tarihli 38828770-953.09.09-E.28327 no ile onay verilen "P2X7 reseptörü antagonist ve agonistinin epilepsi sonrası hücre sağ kalımına olan etkilerinin araştırılması" isimli çalışmanın başlığını "P2X7 reseptörünün beyin elektriksel aktivitesi ve beyin kan akımına olan etkilerinin araştırılması" olarak değiştirilmesi istediğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(DMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 20.07.2018 tarihinde e-İmzalanmıştır.
Evrakın adresi: <https://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 3F02A013XC kodlu ilçe doğrultusunda alınmıştır.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinçler Cad. No.19 Kavacak Karyesi - Beşiktaş
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin: bilgi@medipol.edu.tr

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

| | | | |
|------------|--|--------------|------------|
| Adı | Emre | Soyadı | TANCAN |
| Doğum Yeri | Üsküdar/İstanbul | Doğum Tarihi | 01.01.1992 |
| Uyruğu | Türkiye Cumhuriyeti | TC Kimlik No | |
| E-mail | tancanemre@gmail.com | Tel | |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet Yılı |
|------------------|-------------------------------|----------------|
| Doktora/Uzmanlık | | - |
| Yüksek Lisans | İstanbul Medipol Üniversitesi | - |
| Lisans | İstanbul Üniversitesi | 2015 |
| Lise | Şehit Koray Akoğuz Lisesi | 2010 |

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| | Görevi | Kurum | Süre (Yıl – Yıl) |
|----|--------|-------|------------------|
| 1. | | | |
| 2. | | | |
| 3. | | | |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama | Konuşma | Yazma |
|-----------------|------------------|---------|-------|
| İngilizce | İyi | İyi | İyi |
| | | | |

Yabancı Dil Sınavı Notu

| KPDS | YDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
|------|-----|-------|--------------|--------------|--------------|-----|-----|-----|
| | 65 | | | | | | | |

| | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|---------------|---------|--------------|-------|
| ALES Puanı | 80.69 | 75.53 | 59.87 |
| (Diğer) Puanı | | | |

Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanım becerisi |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Microsoft Word, Excel, Powerpoint | İyi |
| | |
| | |

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikalari/Ödülleri/Diğer

Sertifikalar

1. Deney hayvanları kullanım sertifikası