

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI EPİLEPSİ HASTALARINDA ERKEN
SENESENS BİYOBELİRTEÇLERİ VE KOMORBİD
BİLİŞSEL ETKİLENME İLE İLİŞKİSİ

Doç. Dr. Ceren GÜNBEY

Nöro-Elektrofizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI EPİLEPSİ HASTALARINDA ERKEN
SENESENS BİYOBELİRTEÇLERİ VE KOMORBİD BİLİŞSEL
ETKİLENME İLE İLİŞKİSİ

Doç. Dr. Ceren GÜNBEY

Nöro-Elektrofizyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Dilek YALNIZOĞLU

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Fahriye Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA

ANKARA

2024

ÇOCUKLUK ÇAĞI EPİLEPSİ HASTALARINDA ERKEN SENESENS BİYOBELİRTEÇLERİ VE KOMORBİD BİLİŞSEL ETKİLENME İLE İLİŞKİSİ

Ceren GÜNBEY

Danışman: Prof. Dr. Dilek YALNIZOĞLU

İkinci Danışman: Prof. Dr. Fahriye Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA

Bu tez çalışması 01.07.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Nöro-Elektrofizyoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Serap Saygı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	(imza)
Üye:	Prof. Dr. Bülent Ünay Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı/ Çocuk Nöroloji BD	(imza)
Üye:	Prof. Dr. Fadime İrsel Tezer Filik Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	(imza)
Üye:	Prof. Dr. Burçak Bilginer Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı	(imza)
Üye:	Prof. Dr. Tuğba Hirfanoğlu Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı/ Çocuk Nöroloji BD	(imza)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCI OZKAN
Enstitü Müdürü

01.07.2024

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

01/07/2024

Ceren Günbey

“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezele ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tez in erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tez in erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Dilek YALNIZOĞLU'nun danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Doç. Dr. Ceren GÜNBEY

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca ve doktora dönemimde tecrübesini, bilgisini benimle paylaşan, desteğini hep hissettiren, beni sürekli motive eden, öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli tez danışmanım Prof. Dr. Dilek Yalınzoğlu'na,

Tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Fahriye Duygu Uçkan Çetinkaya, Dr. Öğr. Üyesi Cansu Özdemir Saka ve Bihter Muratoğlu'na,

Yan dal eğitimim boyunca beraber çalışma fırsatı bulduğum Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nöroloji Bilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine ve yan dal uzmanlarına,

Manevi destekleriyle yanımda olan tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini yürekten hissettiğim, kızları olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Günbey, C. Pediatrik Epilepsi Hastalarında Erken Senesens Biyobelirteçleri ve Komorbid Bilişsel Etkilenme ile İlişkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nöro-Elektrofizyoloji Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2024. Karmaşık yollar tarafından tetiklenen proliferatif kapasitenin sürekli kaybı olarak tanımlanan senesens, nörodejeneratif hastalıklarda çalışılmış ancak epilepside yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, çocuklarda sık nöbet geçirmenin yarattığı kronik stresin hücrel senesensi tetikleyip tetiklemediğini ve eğer tetikliyorsa bunun komorbid bilişsel etkilenme ile potansiyel ilişkisini araştırmaktır. On iki yaşın altındaki çocuklardan alınan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH) senesensle ilişkili β -galaktosidaz (SA-BetaGal) aktivitesi, telomer uzunluğu, hücre döngüsü arrest genlerinin ifade değişiklikleri [p53, p16, p21 ve retinoblastoma (RB)], telomeraz ters transkriptaz (TERT) ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) genlerinin ifade düzeyleri analiz edilmiştir. Ayrıca interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-alfa) plazma düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu belirteçler kortikal gelişim malformasyonları (KGM) olan ilaca dirençli epilepsi hastaları, ilaca yanıt veren epilepsi hastaları ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılmıştır (her bir grupta n = 10). Bu çalışmada, tüm gruplardaki PKMH'lerde benzer seviyelerde SA-BetaGal aktivitesi ölçülmüştür. Lenfosit alt gruplarının ek analizleri, KGM'si olan ilaca dirençli epilepsisi grubundaki CD8+ T hücrelerin daha yüksek SA-BetaGal aktivitesi sergilediğini göstermiştir. İlaça dirençli epilepsi grubu en uzun telomerlere sahipken, ilaca yanıt veren epilepsi hastalarında da telomer uzunluğu sağlıklı çocuklara göre daha uzun ölçülmüştür. TERT ekspresyonu da ilaca dirençli epilepsi hastalarında belirgin şekilde daha yüksektir. p53 ve RB ekspresyonları ilaca dirençli epilepsi grubunda sağlıklı kontrollerle benzerlik gösterirken, p21 ve p16 ekspresyonları daha yüksektir. KGM'li ilaca dirençli epilepsisi olan çocuklarda, sağlıklı kontrollere veya ilaca yanıt veren epilepsisi olan çocuklara göre daha yüksek IL-6 ve TNF-alfa seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlarımız, KGM'li ilaca dirençli epilepsi hastalarında, telomer uzunluğu, hücre döngüsü gen ekspresyon profili ve SA-BetaGal aktivitesi seviyelerine dayanarak, stres kaynaklı erken veya replikatif senesens izlenmediğini göstermiştir. Bununla birlikte ilaca dirençli grupta görülen artmış proinflamatuvar sitokin düzeyleri ve yüksek p21/p16 ekspresyonu, devam eden nöbetlerin hücrel strese ve inflamatuvar bir mikroçevreye neden olduğunu ve bu durumun ilaca dirençli epilepsili çocuklarda zaman içinde senesense yatkınlığı artırabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: senesens, biyobelirteç, pediatrik epilepsi, telomer uzunluğu

ABSTRACT

Günbey, C. Premature Senescence Biomarkers in Pediatric Epilepsy Patients and Their Association with Comorbid Cognitive Impairment. Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Neuro-Electrophysiology Program, Doctora Thesis, Ankara, 2024. Senescence, a steady loss of proliferative capacity triggered by complex pathways, has been studied in neurodegenerative diseases but remains obscure in epilepsy. This study aims to investigate whether the chronic stress of frequent seizures in children induces cellular senescence and, if so, its potential association with comorbid cognitive impairment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from children under 12 years of age were analyzed for senescence-associated β -galactosidase (SA-BetaGal) activity, telomere length, expression alterations of cell cycle arrest genes [p53, p16, p21, and retinoblastoma (RB)] along with telomerase reverse transcriptase (TERT), insulin-like growth factors (IGF). Furthermore, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) plasma levels were assessed. We compared these senescence markers in drug-resistant epilepsy patients with malformations of cortical development (MCD) to those in drug-responsive epilepsy patients and healthy controls. (n = 10 each). Our study showed similar levels of SA-BetaGal activity in PBMCs across all groups. Additional analysis of lymphocyte subsets revealed that CD8⁺ T cells from the drug-resistant epilepsy with MCD group exhibited higher SA-BetaGal activity. Drug-resistant epilepsy group was associated with the longest telomeres, followed by the drug-responsive epilepsy patients, both higher than healthy children. Also, TERT expression was significantly higher in the drug-resistant epilepsy patients. p53 and RB expressions were similar to healthy controls in drug-resistant epilepsy group, whereas p21 and p16 expressions were higher. Children with drug-resistant epilepsy with MCD showed significantly higher levels of IL-6 and TNF-alpha than healthy controls or children with drug-responsive epilepsy. Our results showed that no stress-induced premature or replicative senescence was detected in drug-resistant epilepsy patients with MCD, based on telomere length, cell cycle gene expression profile and SA-BetaGal activity levels. However, elevated proinflammatory cytokines and high p21/p16 expressions in the drug-resistant group suggested that ongoing seizures cause cellular stress and an inflammatory microenvironment, which may increase the susceptibility to senescence over time in children with drug-resistant epilepsy.

Keywords: senescence, biomarker, pediatric epilepsy, telomere length

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Senesens	3
2.1.1. Senesensi Tetikleyen Mekanizmalar ve Senesens Alt Tipleri	3
2.1.2. Senesensde Görülen Hücresel Değişiklikler ve Biyobelirteçler	5
2.1.3. Hastalıkta Senesens	8
2.2. Epilepsi	11
2.2.1. Epilepside Altta Yatan Etiyolojiler	12
2.2.2. Epilepsi ve Komorbiditeleri	16
2.2.3. Epilepsinin Tedavisi	16
2.2.4. Epilepsi ve Senesens	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Hasta Seçim	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu	20
3.2.2. Mononükleer Hücrelerde Senesensle İlişkili β -galaktosidaz Tayini	21
3.2.3. Mononükleer Hücrelerde Senesens Belirteçlerinin Gen İfade Analizi	21
3.2.4. Mononükleer Hücrelerde Telomer Uzunluk Tayini	22
3.2.5. Plazma Örneklerinde IL-6 ve TNF-alfa Analizi	23
3.3. Verilerin Analizi	23

3.4. Etik Kurul Onayı	24
3.5. Bütçe	24
4. BULGULAR	25
4.2. Senesens Belirteçlerinin Verileri	26
4.2.1. Senesens-ilişkili β -galaktosidaz	26
4.2.2. Hücre Döngüsü Yolaklarındaki Belirteçler	27
4.4.3. Telomer Uzunluğu ve Telomeraz Ters Transkriptaz mRNA İfadesi	28
4.2.4. Senesens ile İlişkili Salgı Fenotipi Belirteçleri	29
4.2.5. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri	30
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
7. KAYNAKLAR	39
8. EKLER	50
EK-1. Etik Kurul Onayı	
EK-2. Turnitin Dijital Makbuz	
EK-2. Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
ALS	: Amiyotrofik lateral skleroz
CBZ	: Karbamazepin
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CLB	: Klobazam
CZP	: Klonazepam
DDR	: DNA hasar cevabı
E	: Erkek
EEG	: Elektroensefalogram
ESM	: Etosüksimid
GGG	: Global gelişimsel gerilik
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörleri
IL	: İnterlökin
ILAE	: Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneğinin
IVIG	: İntravenöz immünoglobulin
K	: Kadın
KD	: Ketojenik diyet
KGM	: Kortikal gelişim malformasyonları
LAC	: Lakozamid
LEV	: Levetirasetam
LTG	: Lamotrijin
LTL	: Lökosit telomer uzunluğu
MNC	: Mononükleer hücre

MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: mesajcı RNA
MS	: Multipl skleroz
MSS	: Merkezi sinir sisteminde
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NF-κB	: Nükleer faktör-kappaB
NÖİ	: Nöbet önleyici ilaç
OIS	: Onkogen ile tetiklenen senesens
OXC	: Okskarbazepin
PB	: Fenobarbital
PHT	: Fenitoin
PKMH	: Periferik kan mononükleer hücreleri
PMG	: Polimikrogri
RB	: Retinoblastoma
RFD	: Rufinamid
SA-BetaGal	: Senesensle ilişkili β-galaktosidaz
SASP	: Senesens ile ilişkili salgı fenotipi
TERT	: Telomeraz ters transkriptaz
TNF-alfa	: Tümör nekroz faktörü-alfa
TPM	: Topiramet
VGB	: Vigabatrin
VNS	: Vagus sinir stimülasyonu
VPA	: Valproik Asit
ZNS	: Zonisamid
ZY	: Zihinsel yetersizlik

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Senesensi tetikleyen ana mekanizmalar ve senesens sırasında görülen hücresel değişiklikler, etkilenen hücre döngüsü yolları ve senesens ile ilişkili salgı fenotipi	6
2.2. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneğinin 2017 yılında önerdiği güncel nöbet sınıflaması	12
2.3. Epilepsi sınıflaması ve etiyolojik alt gruplar	13
2.4. Epilepsi hastalarında ana etiyolojik gruplar	13
4.1. SA-BetaGal pozitif hücre yüzdesinin gruplar arası analizi	27
4.2. Hücre döngüsü yollarındaki belirteçlerin gen ifade analizi	28
4.3. Telomer uzunluklarının ve telomeraz ters transkriptaz (TERT) mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	29
4.4. İnterlökin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa) plazma seviyelerinin karşılaştırılması	30
4.5. İnsülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF), IGF1 ve IGF2'nin gen ifade analizi. IGF1 ve IGF2'nin mRNA ekspresyon seviyelerinin gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR analizi	30

TABLULAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kortikal gelişimsel malformasyonların sınıflandırması (özet)	14
4.1. İlaça dirençli epilepsi grubunun genel özellikleri.	25
4.2. İlaça yanıtli epilepsi grubunun genel özellikleri.	26

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hücreler ekzojen ve endojen kaynaklı stres ve hasar oluşturabilecek uyarılarla sürekli karşılaşır ve farklı yanıtlar oluştururlar. Bu yanıtlar hücrenin tipine, uyarının şiddetine, süresine ve diğer pek çok etkene bağlı olarak değişir (1). Hasar oluşturabilecek bir uyarıyla karşılaştıklarında tamir mekanizmalarını harekete geçirip ardından canlılıklarını korumaya devam edebilirler. Eğer hücre bütünlüğü ve iç dengesi sağlanamıyor ve adaptif değişiklikler yetersizse hücre ölümüne yol açan mekanizmalar tetiklenebilir. Hasarın ve hücrenin doğasına göre oluşan hücre ölüm mekanizmaları moleküler ve morfolojik olarak farklı alt tiplere ayrılır (2). Hücre ölümü üç ana başlıkta incelenmiştir: (i) hücrenin kendi iç genetik programı çerçevesinde veya dış uyarılar sonucunda veya büyüme faktörleri gibi uyarıcı faktörlerin eksikliğinde kaspazların aktive olması sonucu oluşan, hücrenin büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve membran tomurcuklanması gibi bir değişiklikte seyreden apoptoz; (ii) hatalı olarak katlanmış olan proteinlerin uzaklaştırılması, mitokondri, endoplazmik retikulum ve peroksizomlar gibi hasarlı organellerin temizlenmesi ve hücre içi patojenlerin ortadan kaldırılması amacıyla karmaşık yolların etkin olduğu hücrenin kendi kendini parçalama süreci, otofaji; (iii) hücrenin şişmesi, organellerin ve membranların parçalanması ile karakterize nekroz. Galuzzi ve arkadaşları 2018'de hücre ölümünü klasik morfolojik sınıflandırmadan öteye taşımış, güncel moleküler gelişmeler ışığında hücre ölümünün 12 alt grupta incelenmesini önermişlerdir (2).

Strese ve hasar oluşturabilecek uyarılara maruz kalan mitotik hücreler tamir, sessizlik ve ölüm gibi cevaplardan başka inflamatuvar bir profil ile karakterize kalıcı bir hücre döngüsü durdurma durumunu benimseyerek farklı bir yanıt başlatabilir (1, 3). Bu yanıt senesens denir. Senesens devam eden canlılık ve metabolik aktiviteye rağmen, pek çok karmaşık yolağın aktivasyonu sonucu görülen istikrarlı ve uzun vadeli bir proliferatif kapasite kaybına verilen verilen addır (4, 5).

Senesens Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi çeşitli nörolojik bozuklukların patolojisinde rol oynar, bu hastalıkların hepsi tipik olarak yaşlı bireylerde görülür (6). Çok az sayıda çalışma, ortak yolları paylaşan epilepsi ve senesens arasındaki ilişkiyi ele almıştır. Metabolik,

oksidatif ve inflamatuvar değişiklikler senesente görülür; bu değişiklikler aynı zamanda epilepsi patofizyolojisinde rol oynar, nöbetler de bu değişikliklere neden olabilir (7-10). Örneğin fokal kortikal displazisi olan epilepsi hastalarında beyin dokusunda hücre döngüsü yolaklarında değişiklik olduğu gösterilmiştir (11). Yetişkin epilepsi hastalarının akyuvarlarında kontrollere kıyasla telomer kısalması gösterilmiştir, bu da hücresel yaşlanmanın epilepsi hastalarında daha yüksek oranda olduğunu düşündürmektedir (12).

Bu tezin amacı, pediatrik epilepside devam eden nöbetlerin hücresel senesensi tetiklemedeki rolünü araştırmaktır. Senesensin tetiklendiği gösterilir ise bunun komorbid bilişsel etkilenme ilişkisi tartışılacaktır. Kortikal gelişim malformasyonu (KGM) olan ilaca dirençli epilepsili çocukların periferik kan mononükleer hücrelerinden analiz edilen senesens belirteçleri ilaca yanıt veren epilepsi hastaları ve sağlıklı kontrol denekleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Senesens

Senesens ekstraselüler veya intraselüler uyarılara karşı farklı yolların aktive olduğu, hücrede kalıcı morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere yol açan, devam eden canlılığa rağmen kalıcı olarak hücre bölünmesinin durmasına verilen addır (1, 5, 13). Yeterli metabolik ve çevresel desteğe rağmen hücre bölünmesinin geri dönüşümsüz olarak durması fakat hücrenin ölmemesi durumu 60 yıl önce Hayflick tarafından detaylı tartışılmıştır (14). Hayflick insan diploid hücrelerinin uygun çevresel desteğe rağmen sınırsız çoğalmadığını, belirli bir sayıda bölünmeden sonra canlılığın korunduğu ama hücrenin bölünemediğini göstermiştir (14). Hayflick ve Moorhead hücrelerin sınırlı bölünme kapasitelerinin yaşlanmayla ilişkili olduğunu öne sürmüş ve hücrel senesens terimini kullanmışlardır (15, 16). Daha sonraki yıllarda senesensin yaşlanmayla hatta yaşlılık döneminde görülen dejeneratif hastalıklarla yakın ilişkisi gösterilmiştir (16, 17). Hücrelerin bölünmesinin durması nedeniyle senesensin önemli bir tümör süpresör işlevi olduğu vurgulanmıştır (9). Ayrıca sadece yaşlanmada, dejeneratif hastalıklarda veya kanserde değil embriyogenez ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik olaylarda da rol aldığı görülmüştür (18, 19). Senesens süreci iki ana başlıkta incelenebilir (i) senesensi tetikleyen mekanizmalar (ii) senesensde görülen hücrel değişiklikler (16).

Farklı senesens mekanizmalarının aktivasyonu sonucu hücrelerde ilgili yollar harekete geçer (5, 13, 20). Senesense uğramış olan hücrelerin morfolojisi değişir, tümör baskılayıcı genler aktive olur, hücre döngüsü durur, belirli transkripsiyon faktörleri devreye girer; ardından komşu hücrelerle iletişimi sağlayan senesens ile ilişkili salgı fenotipi (*senescence-associated secretory phenotype, SASP*) başlığında adlandırılan büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler ve daha birçok farklı protein salınır (3, 4, 20).

2.1.1. Senesensi Tetikleyen Mekanizmalar ve Senesens Alt Tipleri

Telomerlerin kısalması ve disfonksiyonu, onkojenik aktivasyon, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon, radyasyon ve kemoterapi senesensi tetikleyen

mekanizmaların başında gelir, bu tetikleyicilerin yol açtığı senesens farklı alt tiplerde isimlendirilir (13, 20, 21).

Telomerler kromozomların uç kısmında bulunan DNA'yı koruyan, tekrarlayan baz dizileri içeren özel DNA-protein yapılarıdır. Hücre bölünmesi sırasında DNA polimeraz bu heterokromatin yapıyı çoğaltamaz bu nedenle her bölünme sırasında telomer boyu kısalmır (22). Telomer uzunlukları, embriyonik kök hücreleri, germ hücreleri ve kanser hücreleri tarafından eksprese edilen telomeraz enzimi tarafından korunur. Hücrelerin telomerlerini stabilize etmelerinin en etkin yolu, telomerase, özellikle de katalitik bileşen telomeraz ters transkriptazın (TERT) eksprese edilmesidir. Normal hücrelerin çoğu bu enzimi ifade etmez ya da sadece geçici olarak veya çok düşük seviyelerde ifade eder, hemopoteik ve non-hemopoetik kök hücrelerde de bu enzimin aktivitesi kısıtlıdır (3, 23). Bu nedenle belirli sayıda hücre bölünmesi sonrasında telomerlerin boyu kritik bir seviyeye düşer, koruyucu etkileri bozulur ve DNA hasar cevabı (*DNA damage response*, DDR) tetiklenir, hücre bölünmesinin durmasına neden olan bu duruma replikatif senesens denir.

Radyasyon ve kemoterapide kullanılan ilaçlar gibi stresörler onarılamaz bir DNA hasarı yaratırsa telomerler boyutundan bağımsız replikasyonu durdurabilirler, bu duruma DNA hasarı kaynaklı senesens denir (13).

Onkogenler hücre çoğalmasını uyarırlar, pek çok kanser türünde tümör oluşumunu ve gelişimini destekler (24). Bununla beraber onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu stres yaratarak hücre bölünmesini durdurabilir, buna onkogen ile tetiklenen senesens (*oncogene-induced senescence*, OIS) adı verilir (25). *Ras*, *BRAF*, *AKT*, *E2F1*, *siklin E* onkogenlerinin aktivasyonu ve *PTEN*, *NF1* tümör süpresör genlerinin inaktivasyonu ile OIS tetiklenebilir (24).

Mitokondriler hücrenin ana enerji kaynağıdır ve hücre metabolizmasında rol oynar. Mitokondriyal disfonksiyon ile mitokondrilerin solunum kapasitesi ve mitokondriyal membran potansiyeli azalır, serbest oksijen radikallerinin artar, hücrelerin bu nedenle bölünmeyi durdurmasına mitokondriyal işlev bozukluğu ile ilişkili senesens adı verilir (26, 27). Yaşlanmış hücrelerde mitokondriyal disfonksiyon görülür, mitokondriyal disfonksiyon senesensi tetikleyebilir (28).

Literatürde telomer erozyonuna veya işlev bozukluğuna bağlı replikatif senesens dışındaki diğer alt tipleri stres kaynaklı erken senesens ana başlığında değerlendirip daha sonra alt tiplere ayıran yazarlar da vardır (29).

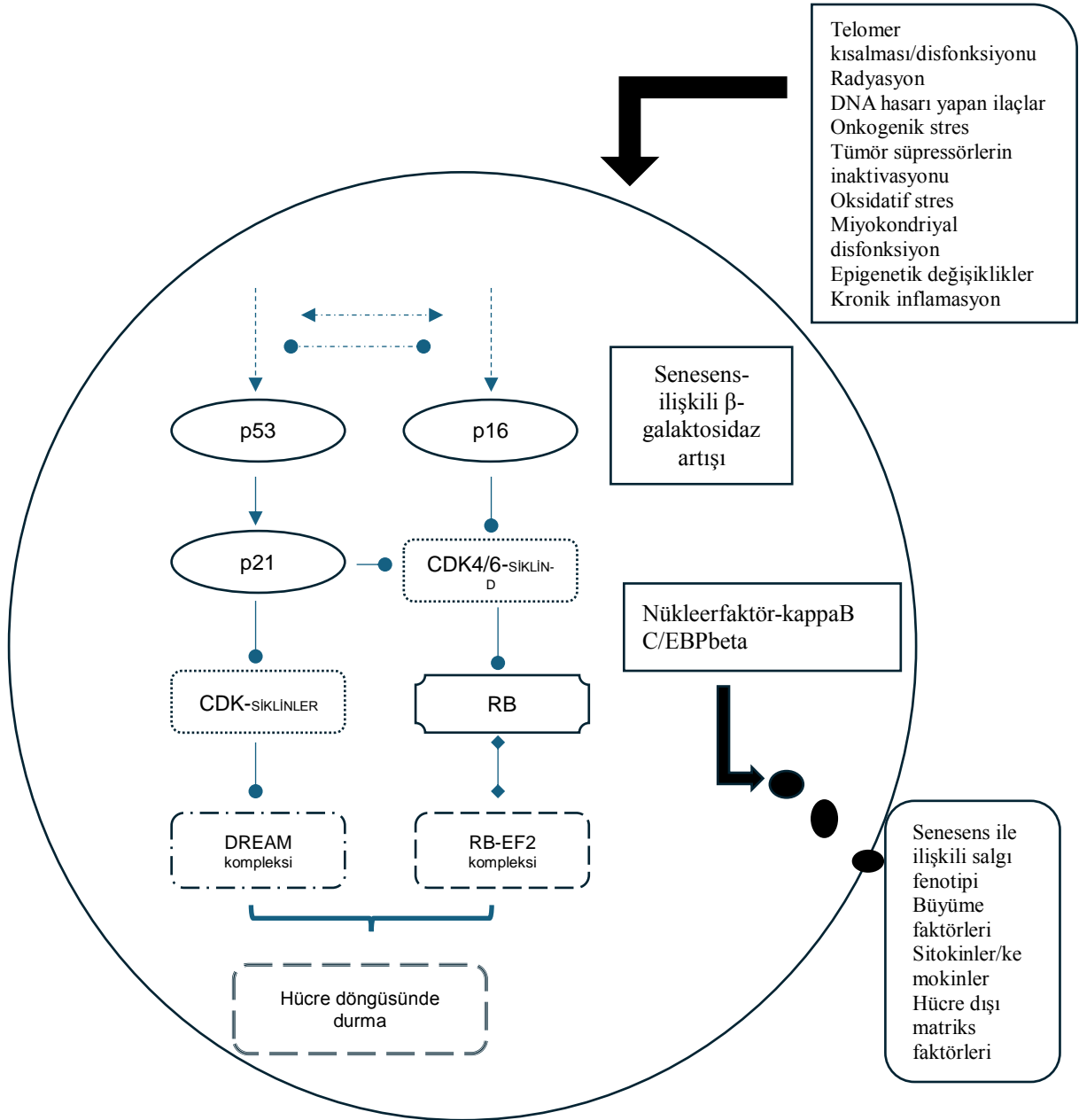
2.1.2. Seneseste Görülen Hücresel Değişiklikler ve Biyobelirteçler

Strese karşı senesens geliştiğinde hücreler genel olarak geri dönüşümsüz bir şekilde çoğalmayı durdurur, hücre ölümünü tetikleyen sinyallere dirençli hale gelirler (apoptoz direnci) ve hücrede morfolojik, genetik ve fonksiyonel bir dizi değişiklik meydana gelir (3). Aktive olan yollardaki bazı moleküller ve morfolojik farklılaşmalar hücresel sensensi gösteren biyobelirteçler olarak nitelendirilir (1). Bu değişiklikler dinamiktir, birbiri ile ilişkilidir ve sadece senesense özgü değildir. Bu nedenle senesensi tanımlamak için tek bir biyobelirteç yeterli değildir, senesensi tanımlamak için genellikle bir dizi belirteç beraber değerlendirilir (1, 16, 30). Senesensi tetikleyen mekanizmalardan başlıcaları ve senesens sırasında görülen hücresel değişikliklerde göre alan kritik yollar Şekil 2.1'de görsel olarak özetlenmiştir (1, 5, 20).

A. Yapısal Değişiklikler

Senesensin hücre bölünmesinin durduğu sessizlik döneminden ayırt edici özelliklerinden biri yapısal değişikliklerdir (31). Genel olarak senesesteki hücreler genişlemiş ve düzleşmiş bir görünümündedir, kromozom yoğunlaşması ve dağılımında değişiklikler olur, bazı kromozomlar heterokromatik odaklar oluşturur, sitoplazma içindeki flamanlar yeniden düzenlenir. Sitoplazmalarında vakuolizasyon artmıştır, çekirdekleri büyüktür, çekirdek membranında lamininB1 kaybı dikkat çekicidir, hücre membranında kaveolalar artmıştır; mitokondriler ve lizozomlar büyümüştür (13, 30). Yapısal değişikliklerden bir diğeri, senesens için görece sensitif fakat tamamen spesifik olmayan bir morfolojik biyobelirteç olarak nitelendirilen lizozomlardaki beta-galaktozidaz aktivitesindeki artıştır (32). Sağlıklı hücrelerdeki lizozomlarda da beta-galaktozidaz aktivitesi izlenebilir. Tüm hücrelerde bulunan ve pH 4.0'da tespit edilebilen asidik β -galaktosidaz aktivitesinden farklı olarak senesense uğramış hücrelerin pH 6.0'da tespit edilebilen bir β -galaktosidaz aktivitesi ifade ettiğini gösterilmiştir, bu aktivite senesens-ilişkili β -galaktosidaz (SA-BetaGal) olarak adlandırılmaktadır (33). SA-BetaGal'ın lizozomlardaki hasarlanmış

makromoleküllerin yol açtığı artmış metabolizmayı yansıttığı düşünülmektedir. Lizozomlarda artmış metabolizmayı ve senesensi yansıtan bir başka potansiyel biyobelirteç lipofussindir. Lipofussin, lizozomların içinde biriken oksitlenmiş proteinler, lipitler ve metallerden oluşan parçalanamayan bir agregattır (34).



Şekil 2.1. Senesensi tetikleyen ana mekanizmalar ve senesens sırasında görülen hüresel değişiklikler, etkilenen hücre döngüsü yolları ve senesens ile ilişkili salgı fenotipi (1, 5, 20). RB: retinoblastoma, CDK: Siklin bağımlı kinaz, C/EBP: CCAAT/ güçlendirici bağlayıcı protein, DREAM kompleksi: dimerizasyon partneri 1, retinoblastoma-benzeri, E2F ve MuvB içeren kompleks, EF2: Uzama faktörü-2.

B. Hücre İçi Değişiklikler

Senesensin en önemli özelliği hücre döngüsünün durmasıdır, bu sayede hasarlanmış ya da onkogenik uyarı ile karşılaşmış hücre çoğalamaz. Bu noktada sadece senesenste değil fizyolojik ve patolojik pek çok hücre içi uyarıda hayati rol oynayan anahtar moleküller ve yolaklar aktive olur. Senesenste hücre döngüsünün durması p53-p21 ve p16-retinoblastoma (RB) tümör baskılayıcı yolaklar tarafından sağlanır ve sürdürülür (3). Bu yolaklar birbiri ile iletişim halindedir. p53 esas olarak bir transkripsiyon faktörüdür, belirli hedef genlerin ekspresyonunu artırarak ya da azaltarak uyarılara yanıt verir (35). Senesenste telomerlerin kısalması ve DNA hasarı, ya da DNA hasarından bağımsız tetikleyiciler p53'ü aktive eder, hücre bölünmesinin durmasına neden olan kaskatlar aktive olur. Bunlar arasında en önemlisi p21'dir. p21 siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörüdür, bölünme sırasında G1/S veya G2/M kontrol noktalarında hücre döngüsünü durdurur. p53/p21 yolağı senesensin başlatılmasında kritik bir rol oynar. Senesensin devamı ve istikrarlı bir şekilde devam etmesinde ana yolağın p16-RB olduğu düşünülmektedir (36). p16 CDK'leri inhibe eder, RB hipofosforile halde kalır ve transkripsiyon faktörü E2F1 ile bağı kalır. Bağlı kaldığı dönemde E2F1 hedef genlerinin transkripsiyonu gerçekleşmez ve hücre bölünmesini durur.

C. Senesens ile İlişkili Salgı Fenotipi

Senesensteki hücreler kendilerinde ve çevredeki hücrelerde değişikliklere neden olabilecek, hücreden hücreye farklılık gösteren dinamik bir salgı fenotipi geliştirir. Nükleer faktör-kappaB (NF-κB) transkripsiyon faktörü aktive olur, NF-κB inflamasyonda anahtar moleküllerden biridir (9). Diğer genlerin de aktivasyonu ile gelişen bu inflamatuvar profil senesens ile ilişkili salgı fenotipi olarak (SASP) adlandırılır (37). İnterlökinler (IL) bu fenotipin ana yapı taşı oluşturur. Senesenste IL-6, IL-1 gibi interlökinlerin, kemokinlerin ve diğer pek çok proinflamatuvar molekülün, metalloproteinazların, büyüme faktörlerinin düzeyi artar (31, 37). SASP komşu hücreleri de etkiler (9). NF-κB transkripsiyon faktörü aktive olur ve NF-κB transkripsiyon faktörü lenfosit aktivasyonu, hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol oynayan pek çok diğer yolakta değişikliğe neden olur (9). Kısa vadede SASP doku

onarımını ve onkojenik aktivitenin durdurulmasını destekleyebilir, uzun vadede ise kronik enflamasyon kansere ve yaşlılıkla ilişkili pek çok hastalığın patogenezeine katkıda bulunur veya neden olabilir (5, 9).

2.1.3. Hastalıkta Senesens

Senesens, senesense uğramış hücrelerin uygun şekilde temizlenmesi durumunda doku homeostazı için faydalı olabilir veya bu hücrelerin dokularda birikmesi ve SASP aktivasyonunun yoğun olması durumunda organ disfonksiyonu ile sonuçlanabilir. Çalışmalar, senesens ve SASP'nin yaşa bağlı hastalıkları tetiklemede ve organizmadaki yaşlanmayı sürdürmede önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir (38).

Hüresel senesens, özellikle embriyonik gelişim ve yara iyileşmesi sırasında fizyolojik ve homeostatik süreçleri düzenler. Doğal yaşlanma sürecinde kademeli olarak senesense uğramış hücreler birikir, bu birikim ateroskleroz gibi kronik hastalıkların, tip 2 diabetes mellitus gibi metabolik bozuklukların patofizyolojisinde rol oynar (20, 39, 40). Ayrıca hücre döngüsünün durmasına neden olarak kanseri önleyebilse de, kanıtlar SASP ile uyarılan kronik inflamatuvar mikroçevrenin uzun dönemde tümör oluşumunu desteklediğini göstermektedir (41).

A. Erişkinlik Döneminde Nörodejeneratif Hastalıklar ve Senesens

Merkezi sinir sisteminde (MSS) astrositler, mikroglialar, oligodendrositler, nöronlar, nöral kök hücreler senesense uğrayabilir (6). Bu hücre tiplerinin senesense uğraması erişkin hastalarda görülen Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, ALS ve multipl skleroz (MS) gibi birçok hastalığın patolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir (42). Senesens kronik inflamasyonu artırarak, rejeneratif kapasitenin düşmesine yol açarak, kan-beyin bariyerini ve MSS vasküler yapısını etkileyerek nörodejeneratif hastalıkların tetiklenmesine, ilerlemesine ve şiddetine katkıda bulunabilir (38).

Alzheimer hastalığı yaşlılarda en sık görülen bilişsel bozukluklardan biridir. Doku düzeyinde, hücre dışı amiloid plaklarının oluşumu, hiperfosforile tau proteinlerinden oluşan hücre içi nörofibriler yumaklar, nöronal ve sinaptik kayıp

görülür (42). Alzheimer hastalığı ve senesens ortak kronik inflamasyon yollarını paylaşmaktadır, senescense uğramış hücreler insanların beyin dokularında ve fare modellerinde tespit edilmiştir ve bu hücrelerin patogeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir (38). Alzheimer hastalığında görülen amiloid-beta oligomerlerinin oligodendrosit progenitör hücrelerde ve yetişkin hipokampal nöral kök/progenitör hücrelerde senesensi indüklediği bulunmuştur, ayrıca mikrogliaların senesense ait çeşitli özellikleri sergilediği, mikroglialarda senesensin önlenmesinin amiloidoz ve sinaptik hasar şiddetinin azalmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (43).

Parkinson hastalığı orta beyindeki substantia nigra dopaminerjik nöronların ilerleyici kaybı ile karakterizedir, bu hastalığın tipik özelliği ilerleyici motor dejenerasyondur. Temel patolojik özellik, DNA hasarı onarımında rol oynayan bir protein olan α -sinüklein agregatlarından oluşan Lewy cisimciklerinin varlığıdır. Bir çalışmada, Parkinson hastalarında SASP ile ilişkili faktörlerin düzeyinin ve hücre döngüsü genlerinin ifadesinin, özellikle p16 mesajcı RNA (messenger RNA, mRNA) ifade seviyelerinin, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla beyin dokusunda arttığı bulunmuştur (42). Çinta ve arkadaşları, Parkinson hastalarından alınan astrosit örneklerinde kontrollere kıyasla artan sayıda senesense uğramış astrosit tespit etmiştir. Aynı çalışmada, sporadik Parkinson hastalığı gelişimi ile güçlü bir şekilde bağlantılı olan bir herbisit olan paraquat'ın insan astrositlerinde senesensi indükleyebildiği de bildirilmiştir (44).

Artan sayıda çalışma, beyinde hücre senesens varlığı ile nörodejenerasyon arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir ve bu ilişki hayvan modellerinde yapılan fonksiyonel çalışmalarla desteklenmektedir (38). Senesense uğramış hücreleri seçici olarak ortadan kaldıran "senolitik" tedaviler veya senesens yollarını etkileyen ilaçlar nörodejeneratif hastalıklarda ileriki dönemlerde tedavi seçeneği olarak umut vadetmektedir (45).

B. Çocukluk Çağı Hastalıkları ve Senesens

Werner sendromu, Cockayne sendromu, ataksi telenjektazi ve Down sendromu dahil olmak üzere bir dizi insan progeria sendromunda çocukluk çağında ve erken erişkinlik döneminde senesensin rolü gösterilmiştir (46). Ayrıca kısıtlı sayıda çalışmada çocukluk çağı MS ve kronik böbrek yetmezliği hastalarında senesensin tetiklendiği tartışılmıştır (47, 48). Çocukluk çağında senesens kanser tedavisi sonrası sağ kalan çocuklarda ve Down sendromunda ise daha yoğun çalışılmıştır.

Down sendromu genetik kökenli zihinsel yetersizliğin sık bir nedenidir. Down sendromlu bireyler, hücrel senesens de dahil olmak üzere çeşitli hücrel mekanizmaların etkilenmesiyle fenotipik olarak hızlanmış bir yaşlanma profili çizerler (49). Down sendromunda fibroblastlarda, lenfositlerde hücre içi oksidan aktivitenin arttığı ve senesensin tetiklendiği gösterilmiştir (6). Trizomi 21'in nükleer mimari üzerine etkili olduğu, DNA hasar/onarım sinyal yollarındaki değişikliklerin erken hücrel senesense yol açtığı ve bu hastalarda Alzheimer hastalarındakine benzer şekilde bilişsel etkilenmede senesensin görüldüğü düşünülmektedir. Bu hastalarda hücrel senesens nörodejenerasyon süreçlerinde etkilidir. Down sendromunda bireyin tüm yaşam süresi boyunca ve doğum öncesi aşamalarda senesense uğramış hücreler görülür. Down sendromunda amniyositlerde telomerlerin daha kısa olduğu ve Down sendromlu fetüslerin plasentalarında senesense uğramış trofoblast hücrelerinin yüzdesinde artış görülmüştür (50, 51). Down sendromlu 0-45 yaş arası bireylerin periferik kan hücrelerinin incelendiğinde, telomer kaybı belirgindir (52).

Çocukluk çağı kanserlerinde kemoterapi ve radyoterapi sonrası dönemde hücrel senesensin hızlandığı düşünülmektedir. Çocukluk çağı kanserlerinde sağ kalan bireylerde hücrel senesens, yapısal kromozomal değişikliklerini indükleyebilen kemoterapi ve/veya tek ve çift iplikli DNA kırıkları oluşturan iyonize radyasyondan kaynaklanabilir (53). Çocuk ve genç erişkin kanser hastalarını içeren bir çalışmada periferik kanda p16 ifadesine ve hastaların tedavi sonrası kırılğanlık (*frailty*) durumlarına bakılmış, kırılğan sağ kalan hastalarda p16 ifadesinin daha yüksek olduğu görülmüştür, hücrel senesensin bu hastalarda kırılğanlığa ve erken yaşlanmaya sebep olan etmenlerden biri olabileceği tartışılmıştır (54).

2.2. Epilepsi

Nöronların anormal, aşırı ve senkron uyarılmasına bağlı olarak ortaya çıkan paroksizmal duyuşal, motor, otonomik veya deneyimsel belirti ve/veya bulgulara nöbet denir (55). Epilepsi, 24 saatten uzun sürede tekrarlayan en az iki tetiklenmemiş nöbet olması olarak tanımlanmıştır. Bu tanım Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneğinin (*International League Against Epilepsy-ILAE*) önerileriyle birlikte genişletilmiş, detaylı değerlendirme sonrasında tek nöbet sonrası nöbetin tekrarlama riski, iki nöbet sonrasındaki tekrarlama riski ile benzer ise veya tek nöbet sonrası hasta özgün bir epilepsi sendromu tanısı almışsa bu koşullarda da epilepsi tanımı kullanılır (55).

Epilepsi çocukluk çağının en sık kronik nörolojik hastalıklarından biridir. Ülkemizde çocukluk çağında epilepsi prevalansı %0.8 olarak bildirilmiştir (56). Epilepsi klinik bir tanıdır, elektroensefalogram (EEG), nörogörüntüleme incelemeleri ve diğer tetkikler bu tanıyı desteklemek ve altta yatan nedeni araştırmak için planlanır. Tanıda ilk aşama atağın epilepsiyi taklit eden durumlardan ayrılması, ikinci aşama nöbetin sınıflamasının yapılmasıdır. Bu noktada güncel sınıflama 2017 yılında ILAE'nin önerdiği sınıflamadır. Bu sınıflamada nöbetler temel olarak fokal başlangıçlı, jeneralize başlangıçlı ve başlangıcı bilinmeyen olarak gruplanmış daha sonra alt başlıklarda incelenmiştir (Şekil 2.2) (57). Üçüncü aşamada bu bilgiler ışığında epilepsiyi sınıflamaktır, hasta fokal epilepsi, jeneralize epilepsi, jeneralize ve fokal epilepsi (birlikte) ve bilinmeyen epilepsi gruplarından birinde değerlendirilir. Altta yatan etioloji aydınlatılmaya çalışılır.

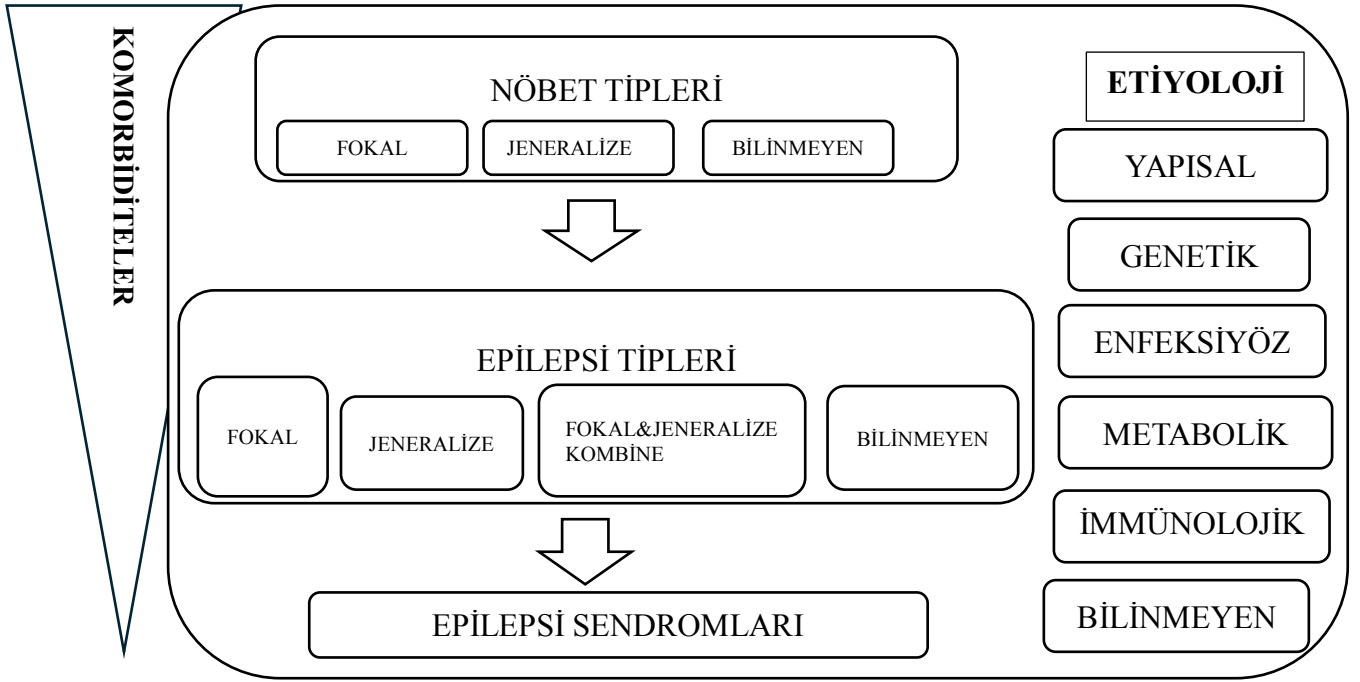
Son aşamada ise hastaya uygun özgün spesifik bir sendromik tanı konabiliyor ise, hasta bu tanı çerçevesinde değerlendirilir. 2022 yılında ise epilepsi sendromlarını başlangıç yaşına göre i) yenidoğan/süt çocukluğu döneminde, ii) çocukluk çağında, iii) değişken yaşta başlangıçlı olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır (58-60) .

Fokal Başlangıç		Jeneralize Başlangıç	Bilinmeyen
Farkındalığın korunduğu	Farkındalığın bozulduğu	Motor Tonik-klonik Klonik Tonik Myoklonik Myoklonik-Tonik-Klonik Myoklonik-Atonik Atonik Epileptik spazmlar Non Motor(absans) Tipik Atipik Myoklonik Göz kapağı myoklonisi	Motor Tonik-Klonik Epileptik Spazmlar Non Motor Davranış Durması
Motor Başlangıçlı Otomatizmalar Atonik Klonik Epileptik Spazmlar Hiperkinetik Myoklonik Tonik Motor Başlangıçlı Olmayan Otonomik Davranış Durması Kognitif Emosyonel Sensoriyel			Sınıflandırılmayan
Fokalden bilateral tonik klonik			

Şekil 2.2. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneğinin 2017 yılında önerdiği güncel nöbet sınıflaması (57).

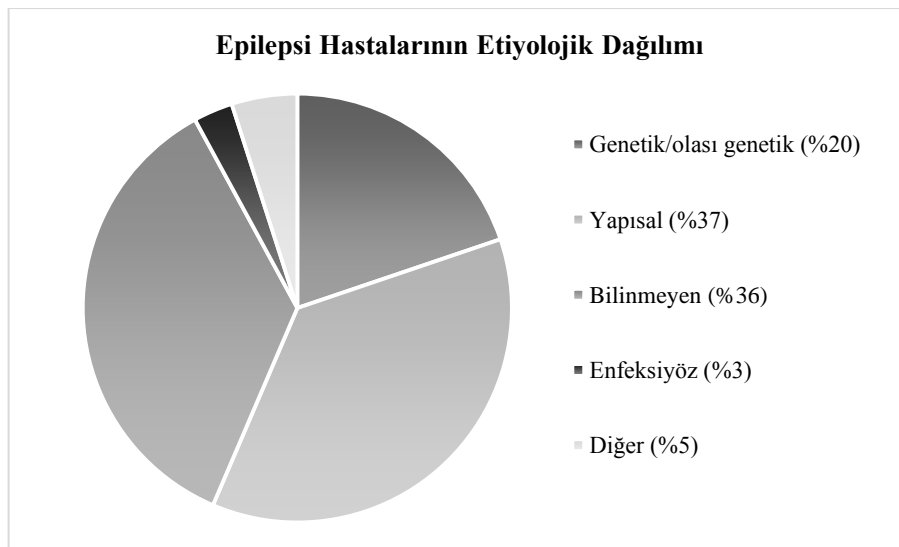
2.2.1. Epilepside Altta Yatan Etiyolojiler

Epilepsi hastalarının tanı ve takibinde her basamakta altta yatan etiyojinin değerlendirilmesi önerilmektedir. 2017 sınıflamasında etiyojik açıdan epilepsi alt başlıklara ayrılmıştır yapısal, genetik, enfeksiyöz, metabolik, immün ve bilinmeyen etiyojiler alt sınıflaması yapılmıştır (61) (Şekil 2.3). Epilepsisi birden fazla etiyojik kategoride sınıflandırılabilir, örneğin tüberosklerozlu bir çocuk hem yapısal hem de genetik grupta yer alabilir.



Şekil 2.3. Epilepsi sınıflaması ve etiyolojik alt gruplar (61).

(i)Yapısal: Yapısal grup inme, travma ve enfeksiyon, hipokampal skleroz veya kortikal gelişimsel malformasyonlar gibi etiyolojileri içerir. Santral sinir sistemi gelişim anomalileri bu grupta çocuklarda en sık görülen etiyolojilerden biridir (Şekil 2.4) (62). 2012 yılında gelişim anomalileri **görüntüleme**deki ve genetik alanındaki gelişmeler çerçevesinde yeniden sınıflandırılmıştır, bu sınıflamanın ana başlıkları tablo 1'de özetlenmiştir (63).



Şekil 2.4. Epilepsi hastalarında ana etiyolojik gruplar (62).

Tablo 2.1. Kortikal gelişimsel malformasyonların sınıflandırması (özet)(63).

(i) Anormal nöronal ve gliyal proliferasyon veya apoptoza sekonder malformasyonlar
(a) şiddetli konjenital mikrosefali, migrasyon öncesi azalmış proliferasyon veya aşırı apoptoz
(b) hem konjenital hem de erken postnatal dönemleri içeren megalansefali
(c) anormal hücre çoğalması ile birlikte ancak neoplazi olmaksızın kortikal disgenezi
(d) anormal hücre çoğalması ve neoplazi ile birlikte kortikal displaziler
(ii) Anormal nöronal migrasyona bağlı malformasyonlar
(a) nöroependimal anormallikler içeren malformasyonlar: periventriküler heterotopi
(b) jeneralize anormal transmental migrasyona bağlı malformasyonlar
(c) geç radyal veya tanjansiyel transmental migrasyona bağlı malformasyonlar
(d) anormal terminal migrasyonu ve pial defektlere bağlı malformasyonlar
(iii) Anormal post migrasyonel gelişime bağlı malformasyonlar
(a) polimikrogrili (PMG) malformasyonlar veya PMG'ye benzeyen kortikal malformasyonlar
(b) doğuştan metabolizma bozukluklarına bağlı kortikal disgenezis
(c) geç gelişimsel bozukluklara bağlı fokal kortikal displaziler (dismorfik nöronlar olmaksızın)
(d) migrasyon sonrası gelişimsel mikrosefali

(ii) Genetik: Kromozomal bozukluklar, tek gen mutasyonları ve mitokondriyal DNA'daki mutasyonlar epilepsiye neden olan genetik sebeplerin başında gelir. Genetik epilepsilerin tanı oranı gelişen teknoloji ile gittikçe artmaktadır. Özellikle sporadik epilepsi formlarında bir dizi yeni epilepsi geni tanımlanmıştır. Ayrıca özellikle genetik epilepsilerde birden fazla genin etiyolojide rol oynadığı gösterilmiştir. Epilepsinin genetiği karmaşıktır; fentotip/gentotip korelasyonunun yapılması SCN1A gibi bazı genlerde zordur, kesin patojenik olmayan varyantların yorumlanması da güçlük yaratabilir (61).

(iii) Enfeksiyöz: Nöbetler bir enfeksiyondan doğrudan kaynaklanıyorsa enfeksiyöz etiyoloji başlığında incelenir. Pek çok enfeksiyöz ajan akut semptomatik nöbete neden olabilir ya da haftalar/aylar sonra epilepsiye neden olabilir (64). Hastalarda uzun dönemde epilepsi görülme riski enfeksiyöz ajanın tipine ve

korteksteki tutulumunun şiddetine, hastanın immün yanıtına, enfeksiyonun tedavi edilip edilmediğine göre değişir (65).

Enfeksiyöz etiyolojiler arasında sıklıkla tüberküloz, insan bağışıklık yetmezliği virüsü, serebral sıtma, nörosistiserkoz, subakut sklerozan panensefalit, serebral toksoplazmoz yer alır. Herpes simpleks virüs, sitomegalovirüs, Batı Nil virüsü gibi virüsler ise epilepsi açısından risk oluştururlar (66). MSS'de en sık görülen parazit enfeksiyonları sistiserkoz, toksoplazmozdur, daha seyrek görülen enfeksiyonlar ise sıtma, toksokariasis ve onkoserkiyazdır, bu etkenler sıklıkla sosyoekonomik olarak geri ülkelerde önemli bir epilepsi nedenidir.

(iv) Metabolik: Metabolik epilepsi, nöbetlerin hastalığın temel semptomlarından biri olduğu kalıtsal bir metabolik bozukluktan doğrudan kaynaklanan epilepsi olarak tanımlanır (61). 600'e yakın metabolik hastalık ile epilepsi birlikteliği gösterilmiştir (67). Epilepsi etiyolojisinde metabolik epilepsileri tanımak çok önemlidir, özellikle hastalığa özgü tedavisi olanlarda erken tedaviye başlamak epilepsinin seyrini olumlu etkiler. Özgün tedavisi olan biyotinidaz ve holokarboksilaz sentaz eksikliği, serebral folat eksikliği, kreatin bozuklukları, folinik aside duyarlı nöbetler, glukoz taşıyıcı tip 1 eksikliği, mitokondriyal bozukluklar ve piridoksin bağımlı epilepsi çocukluk çağı epilepsilerinde akılda tutulması gereken metabolik etiyolojilerin başında gelir.

(v) İmmün etiyoloji: 2017 sınıflamasında potansiyel terapötik sonuçları nedeniyle immün etiyolojiler ilk kez ayrı bir etiyolojik grup olarak değerlendirilmiştir. İmmün sistem bozukluğuna bağlı ortaya çıkan hastalığın ana bulgularından biri epilepsi ise tabloya "immün epilepsi" adı verilir. Otoimmün ensefalitler, Hashimoto ensefaliti, Rasmussen ensefaliti bu grup içerisinde değerlendirilir. İmmün epilepsili hastalar rutin nöbet önleyici ilaç tedavilerine dirençli nöbetlerle seyrederek, erken tanı ve immünomodulator tedavilerin erken başlanması nöbetler üzerine olumlu etki yaratır. Nöbet semiyolojisi genellikle akut/subakut fokal nöbetleri içerir, status epileptikus sık görülür, hareket bozuklukları ve davranışsal/bilişsel etkilenme eşlik edebilir (68). Otoimmün ensefalitler arasında en iyi tanımlanmış grup otoantikorlarla ilişkili olanlardır (69). Limbik ensefalitler, Anti-NMDA reseptör ensefaliti ve paraneoplastik sendromlarda görülen epilepsiler bu gruba girer. Rasmussen ensefaliti klasik olarak

çocukluk ve adolesan dönemde başlayan fokal nöbetler, ilerleyici hemipleji ve tek hemisferi içeren diffüz beyin atrofisi ile seyreden ilerleyici bir immün epilepsi alt tipidir (70). Bu klasik seyir dışında daha yavaş ilerleyen, küçük yaşlarda ve ileri erişkin yaşlarda başlangıç gösteren hastalar da vardır. Altta yatan immün mekanizma net aydınlatılmamıştır; antikör aracılı immün tetiklemeden çok sitotoksik T hücrelerin aktivasyonunun patolojide aktif rol oynadığı düşünülmektedir (70).

2.2.2. Epilepsi ve Komorbiditeleri

Epilepsi hastalarına epilepsi tanısı öncesinde, sırasında veya sonrasında ortaya çıkabilen, kimi zaman nöbet yükü kadar hastanın hayat kalitesini etkileyen pek çok komorbidite eşlik edebilir (71). Psikiyatrik, bilişsel ve diğer medikal komorbidite sıklığı sağlıklı bireylere göre epilepsili bireylerde artmıştır (72).

Epilepsili hastalarında bilişsel etkilenmenin nedenleri çok faktörlüdür. Çalışmalar epilepsinin başlangıç aşamasında bile bilişsel etkilenmenin olabileceğine işaret etmektedir. Etiyoloji, nöbetlerin başlangıç yaşı, nöbet sıklığı, ilaçlar ve interiktal deşarjlar çocuk hastalarda bilişsel etkilenmenin şiddetini belirleyen ana faktörlerdir (73). Epilepsili çocuklarda zihinsel yetersizlik ve öğrenme güçlüğü prevalansı artmıştır. Erişkinlerde ise demans, Alzheimer hastalığı görülme oranı artmıştır.

2.2.3. Epilepsinin Tedavisi

Epilepside tedavi seçiminde hastanın nöbet semiyolojisi, epilepsi sınıflaması, yaşı, cinsiyeti, eşlik eden komorbid durumlar ve kullandığı diğer ilaçlar ile etkileşim riskleri değerlendirilerek yapılır. İlk tedavi seçeneği farmakolojik tedavidir. Öncelikle tek nöbet önleyici ilaç (NÖİ) başlanır, nöbet kontrolü sağlanamaz ise farklı bir NÖİ'ye geçilir. Nöbet tipine, epilepsi sendromuna ve hastanın yaşına uygun olarak seçilen iki NÖİ'nin monoterapi veya ikili kombinasyon şeklinde kullanımına rağmen nöbeti devam eden hastaların epilepsisi ilaca dirençli epilepsi olarak sınıflandırılır (74). Altta yatan etiyoloji, status epileptikus öyküsü, EEG bulguları, komorbid durumlar ve ilk NÖİ'ye yanıt ilaç direnci için risk faktörleri arasındadır (75). Uygun ilaç seçimine rağmen hastaların üçte birinden fazlasının nöbetleri devam eder, son yıllarda kullanım onayı alan yeni NÖİ'ler ilaca dirençli epilepside nöbet kontrolünde oldukça kısıtlı bir

iyileşmeye neden olmuştur (76, 77). İlaça dirençli epilepsili hastalarda gündeme farmakolojik olmayan tedavi seçenekleri gelir. Bu hastalarda kontraendikasyon yoksa ilk olarak diyet tedavileri denenir. Klasik ketojenik diyet ve modifiye Atkins diyeti, düşük glisemik indeks diyeti ve orta zincirli trigliserit diyeti epilepsi tedavisinde etkin seçeneklerdir (78). Bir diğer tedavi seçeneği nörostimülasyondur. Nörostimülasyon beyne elektriksel veya manyetik akımlar ileterek nöronal aktiviteyi modüle etmeyi amaçlayan farklı seçenekleri içerir. Bu seçeneklerden vagal sinir stimülasyonu çocuklarda ve erişkinlerde ilaca dirençli epilepsi hastalarında ek bir tedavi olarak onaylanmıştır (79). Derin beyin stimülasyonu, ve duyarlı nörostimülasyon ise erişkinlerde onaylıdır (80). Farmakolojik tedaviler, özel diyetler ve nörostimülasyon nöbetleri kontrol altına almada etkilidir fakat seçilmiş hastalarda en etkin tedavi seçeneği epilepsi cerrahisidir. Nöbetlerden sorumlu beyin bölgesinin rezeksiyonu, ablasyonu ya da diskonneksiyonuna yönelik işlemler küratif epilepsi cerrahisi olarak adlandırılır. Yeni gelişen teknikler sayesinde ısı ve radyasyon terapileri ile nöbetlerden sorumlu alanın ablasyonu sağlanabilir (81). Küratif cerrahi tekniklere ek olarak, bazı hastalarda nöbet sıklığını azaltmak amacıyla korpus kallosotomi ve multipl subpial rezeksiyonlardır gibi palyatif cerrahi seçenekleri gündeme gelir.

2.2.4. Epilepsi ve Senesens

Anormal nöronal aktiviteye ve sonuç olarak tekrarlayan nöbetlere yol açan morfolojik, moleküler ve işlevsel değişiklikler sürecine epileptogenez denir; ilk nöbet meydana geldikten sonraki ilerleyen süreçler de bu tanımın içinde yer alır (82). Anormal nöronal tetiklenmeye neden olan hasar ve bu hasar sonrası tetiklenmemiş nöbetlerin arasında geçen epileptogenez dönemi latent dönem olarak da adlandırılır (7). Bu dönemdeki değişiklikleri aydınlatmayı amaçlayan, bu dönemde ve sonrasında epileptogenez üzerine etkili moleküller geliştirmeye yönelik prelinik ve klinik çalışmalar devam etmektedir (82-84). Klinik çalışmalar status epileptikus, travmatik beyin hasarı ve febril nöbet gibi sık görülen ve potansiyel olarak epileptogenezi tetikleyen hasarlanmalar sonrasında epileptogenez süreci ve çeşitli biyobelirteçlerin epilepsiyi öngörmedeki rollerine odaklanmıştır ancak geçerliliği kesinleşmiş bir belirteç ya da anti-epileptogenez etkisi olan ve yaygın kullanıma giren yeni bir molekül henüz bulunamamıştır (85-87). Tüberosklerozlu çocuklarda halihazırda kullanımda

olan vigabatrin ve mTOR (*mamalian target of rapamycin*, rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) inhibitörlerinin klinik nöbet öncesi kullanımının olası anti-epileptogenetik etkileri olduğunu vurgulayan araştırmalar vardır (88, 89).

Nörodejenerasyon, akson, dentirit ve miyelin hasarı, glial disfonksiyon ve gliozis, aksonal filizlenme, sinaptik reorganizasyon, kan-beyin bariyeri hasarı, metabolik değişiklikler nörotransmitter dengesinde eksitasyon lehine bozulma, başta iyon kanallarını etkileyen değişiklikler olmak üzere farklı genetik modifikasyonlar ve inflamasyon epileptogeneizde rol oynar (7, 90, 91). Epileptogeneizde etkilenen yolların bir kısmı hücrenel senesense de etkindir. Metabolik, oksidatif ve inflamatuvar değişiklikler hem epileptogeneizde hem de senesense rol oynar (7-10). Ayrıca, tekrarlayan nöbetler oksidatif strese yol açar. IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler senesensin ekstrinsik yolunda rol oynar ve senesense kronik inflamasyon görülür (9). İnflamasyon epilepsi patofizyolojisinde yer alır, nöbetler de inflamasyonu indükler (10).

Epilepside senesensin tetiklenip tetiklenmediğine dair klinik çalışmalar kısıtlıdır. Thom ve arkadaşları fokal kortikal displazisi olan epilepsi hastalarında serebral dokuda hücre döngüsü yollarında değişiklik olduğunu göstermiştir (11). Yetişkin epilepsi hastalarının akyuvarlarında kontrollere kıyasla telomer kısalması gösterilmiştir, bu da hücrenel yaşlanmanın epilepsi hastalarında daha yüksek oranda olduğunu düşündürmektedir (12). Georgetown Üniversitesi'nde fare modelinde senesense uğramış hücrelerin ablasyonunun epileptenez üzerine etkisini araştıran bir prelinik çalışma devam etmektedir (proje no: 1R21NS125552-01)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçim

Çalışma, 5 Ocak- 5 Eylül 2023 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nörolojisi Bilim Dalında değerlendirilen 1 ay- 12 yaş arası 30 çocuktan oluşmaktadır. Pubertal gelişim sırasındaki hormonal değişikliklerin ve hızlı büyümenin telomer uzunluğunu etkileyebileceği göz önünde bulundurularak ergenlik öncesi çocuklar çalışmaya dahil edilmiştir (92). Çalışma üç gruptan oluşmaktadır:

1) İlaça dirençli epilepsisi olan hastalar

2) İlaç tedavisine cevap veren çocukluk çağı fokal veya jeneralize epilepsisi olan hastalar

3) Kontrol grubu

Epilepsi gruplarındaki hastaların nöbet başlangıç yaşı, çalışma sırasındaki yaşı, nöbet sıklığı, nöbet tipi, EEG bulguları, geçmiş ve güncel ilaç tedavileri, beyin manyetik rezonans görüntüleme bulguları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Klinik olarak ve/veya gelişimsel testler/zekâ testleri ile motor ve bilişsel gelişimleri değerlendirilmiştir. Epileptik nöbet sınıflaması ILAE 2017 sınıflamasına göre yapılmıştır (57).

İlaça dirençli epilepsi grubunda etiyolojik olarak homojen bir grup sağlamak amacıyla kortikal gelişim bozukluğu (KGB) olan çocuklar yer almıştır. Bu hastaların iktal ve interiktal EEG değerlendirmeleri ve nöbet tipleri video-EEG ünitesinde yatışları sırasında elde edilen verilere göre sınıflandırılmıştır. Hasta 3'ün nöbetleri yatışı sırasında kaydedilmemiştir; bu nedenle, semiyoloji ev videoları incelenerek sınıflandırılmıştır. Bu gruptaki hastalarda altta yatan etiyoloji ve ilaç tedavisine dirençli epilepsi tanısından beklendiği gibi bilişsel alanlarda gelişme geriliği görülmüştür.

İlaça yanıt veren epilepsi grubunun interiktal EEG'leri poliklinik kontrolleri sırasında istenen EEG'lere göre sınıflandırılmıştır. Nöbet tipi poliklinik kontrollerinde

aileden alınan öykü ve/veya ev videolarına göre sınıflandırılmıştır. Bu gruptaki hastalar yaşlarına uygun bilişsel gelişim gösteren çocuklardan oluşmuştur.

Sağlıklı kontrol grubu, nöroloji polikliniğinde selim bir nedenle değerlendirilen (hipnik jerk, boş bakma/dalma atakları, epileptik olmayan diğer paroksizmal olaylar, vb) ancak epilepsi tanısı olmayan ve herhangi bir ilaç kullanmayan, yaşlarına uygun motor ve bilişsel gelişim gösteren çocuklardan oluşmuştur.

3.2. Yöntem

Bu çalışma için kan örnekleri epileptik hastalardan ve kontrol grubundaki sağlıklı çocuklardan ilk başvuruları sırasında veya diğer rutin kan testleri yapıldığında takip sırasında toplanmıştır.

3.2.1. Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

EDTA içeren tüplerde kan örneği (3-5 ml) laboratuvara getirilmiş olup ve etrafi alkolle silinip hücre kültürü kabine alınmıştır. Kanın tüm hacmi 15 ml'lik tüp içerisine aktarılmış olup ve tüp 2000 rpm 10 dakika frenli koşullarında santrifüj edilmiştir. Ardından plazma kısmı 750 ul'şer olarak 1,5 mL tüplere alikotlanmış olup, bir diğer iş paketi olan IL-6 ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa) tayini için ELISA testi gerçekleştirilene kadar -80 0C buzdolaplarında saklanmıştır. Plazma ayrıldıktan sonra kalan sıvının 2 katı kadar (1:2) oda sıcaklığına getirilmiş 1X PBS eklenip kan seyreltilmiştir. Daha sonra yeni bir 15 ml tüpe kanın başlangıç hacmi kadar Lymphosep (Biowest) (1:1) eklenmiş olup, üzerine 1X PBS ile seyreltilmiş kan örneği yayılmıştır. Örnek tüpü, 1800 rpm 30 dakika frensiz koşullarında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan faz ayırımına dikkat edilerek mononükleer hücreleri (MNC) içeren bulutsu faz pastör pipeti yardımıyla yeni bir tüpe aktarılmıştır. MNC fazının üzeri 1X PBS ile 15 ml hacme tamamlanıp, 1500 rpm 5 dakika frenli koşullarında 2 kez yıkama gerçekleştirilmiştir. Supernatan uzaklaştırılıp, pellet 2 ml DMF10 besiyeri ile çözülmüş olup, Turk's boyası ile hemasitometre kullanılarak (20:1 dilüsyon) hücre sayımı yapılmıştır.

3.2.2. Mononükleer Hücrelerde Senesensle İlişkili β -galaktosidaz Tayini

Hücrelerde stres etkenlerine ya da doğal sürece bağlı olarak gelişen senesens yanıtının incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Mononükleer hücreler kültüre edilme özelliğine sahip olmayan süspanse özellikte hücreler olduğu için beta-galaktozidaz analizinde, akım sitometri ölçüm temeline dayanan beta-galaktozidaz kiti (AB228562, Abcam) kullanılmıştır. Bu yöntem ile toplam populasyon içinde yüzde olarak ne kadar SA-BetaGal pozitif hücre olduğu belirlenmiştir. İlgili analizler Navios EX Flow Cytometer, Beckman Coulter akım sitometri sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Kitin protokolüne bağlı kalınarak, ufak değişiklikler ile deney protokolü izlenmiştir. Turk's boyası ile hücre sayımının ardından 500 ul'de 250.000 süspanse hücreler 24-kuyucuklu plakanın bir kuyusuna ekilmiş ve 0.75 ul senesens boyası eklendikten sonra 37 oC %5 CO2 koşulları olan bir inkübatörde 1.5 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde hücre süspanسیونun üzerine 1 ul yıkama solüsyonu eklenerek tüm karışım yeni bir 1.5 ml tüpe aktarılmış ve 350 xg 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatan uzaklaştırıldıktan sonra, 2.5 ul CD3-Pacific Blue (Ref. B49204, Beckman Coulter), 2.5 ul CD16-PE (Ref. A07766, Beckman Coulter), 2.5 ul CD56-PE (Ref. A07788, Beckman Coulter), 2.5 ul CD8-PC5 (Ref. A07758, Beckman Coulter), 1 ul CD4-APC (Ref. IM2468, Beckman Coulter), 1 ul CD19-APC-A700 (Ref. B49212, Beckman Coulter), 1 ul CD45-APC-A750 (Ref. A079392, Beckman Coulter) antikorları eklenerek subset boyamaları yapılmıştır. Kapıda 10000 hücre olacak şekilde hücre toplanmış olup, Kaluza Analysis v2.1 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Kapı stratejisi bir sağlıklı kontrol üzerinden gösterilmiş olup tüm örneklem bu stratejiye bağlı kalınarak tamamlanmıştır.

3.2.3. Mononükleer Hücrelerde Senesens Belirteçlerinin Gen İfade Analizi

İzole edilen mononükleer hücrelerin bir kısmı RNA izolasyonu için ayrılmıştır. Bu amaçla ayrılan mononükleer hücreler 350xg 5 dk santrifüj edilerek hücre peleti elde edilmiştir. Pelet'e 500 ul Trizol eklenerek pipetaj ile hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Deney örneklemini tamamlanana kadar -80°C'de saklanmıştır. RNA

izolasyonu için Trizol:Kloroform ve etanol presipitasyon yöntemi (manuel RNA izolasyonu) uygulanmıştır. RNA kalitesi ve konsantrasyonu Nanodrop 2000 ile analiz edilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinden kit ile cDNA sentezi (Promega, A3800) gerçekleştirilmiştir. Senesens ile ilişkili genlerin ifade analizleri için SYBR Green qPCR kiti (Promega, A6001) kullanılmıştır. SYBR Green temelli ölçüm metodolojisine uygun olarak tasarlanmış primerler kullanılmıştır. Proje kapsamında hücre döngüsü arrest genlerinin ifade düzeyleri (p53, p16, p21 ve RB), TERT ve insülin benzeri büyüme faktörleri 1 ve 2 (IGF) genlerinin ifade düzeyleri incelenmiştir. Tüm reaksiyonlar 3 teknik tekrar ile gerçekleştirilmiş olup sonuçlar göreceli kantifikasyon ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metoduyla değerlendirilmiştir. Gen ifadesi analizi için; Roche LightCycler 480 cihazı kullanılmış olup, RT-qPCR koşulları; 95°C'de 10s denatürasyon, 60°C'de 20s annealing ve 72°C'de 30s elongasyon, olmak üzere 40 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Mononükleer Hücrelerde Telomer Uzunluk Tayini

Telomer uzunluğu tayininde kontrol örneği için çalışmaya kontrol grubu olarak dahil edilen DNA örneklerinin havuzu ve çalışma konusu dışında kalan ve telomer uzunluğu bilinen bir hücre hattı olarak A172 glioblastoma DNA örneği kullanılarak iki farklı yöntem ile valide edilmesi amaçlanmıştır. Telomer uzunluk analizi için kandan DNA izolasyonu kit (Promega, A2360) ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon basamakları için kit teknik uygulama klavuzundaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir. DNA kalitesi ve konsantrasyon ölçümü Nanodrop 2000 cihazı ile ölçülmüştür. DNA örnekleri için gerekli konsantrasyonun optimizasyonu amacıyla çeşitli dilüsyon oranları (100 ng/ μ l ile 10 ng/ μ l aralığında) nükleaz içermeyen su ile oluşturulmuş olup, telomer uzunluk ölçümü qPCR-temelli metot ile telomer uzunluğunun tek kopya gene rölatif kantifikasyonu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesabı ile RTL (telomere length relative to a control sample) oranı) hesaplanarak gerçekleştirilmiştir (93). Son yıllarda literatürde telomer uzunluğu ölçümü için en çok tercih edilen genlerden biri olan genomda tek kopya bulunan insan β -globin (hbg) geni tekrarlanabilir olduğundan ve laboratuvarlar arası oluşan analiz varyasyonları da en aza indirmek amacıyla bu projede çalışılmak üzere seçilmiş ve Cawthon metodu optimize edilmiş şekliyle uygulanmıştır (94). NCBI Primer-BLAST programı kullanılarak telomer ve tek kopya gen dizilerine göre primer çiftleri

tasarlanmış olup, tasarlanan her bir primerin çalışan konsantrasyonunun optimizasyonu için nükleaz içermeyen su ile seri dilüsyonlar (100nM ile 1 µM aralığında) oluşturulmuştur. Belirlenen konsantrasyonlar sonrası SYBR Green ve taq/hot-start DNA polimeraz temelli deney kurulmuş olup, Roche LightCycler 480 cihazı kullanılarak, qPCR koşulları; 95°C'de 15s denatürasyon, 56°C'de 1 dk annealing, olmak üzere 40 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Plazma Örneklerinde IL-6 ve TNF-alfa Analizi

Mononükleer hücre izolasyonu öncesi kan 2000 rpm 10 dk santrifüj edilerek plazma izolasyonu da gerçekleştirilmiştir. Örneklemin tamamlanmasını takiben ELISA yöntemi ile senesens ile ilişkilendirilmiş iki önemli faktör olan IL-6 (Elabscience, E-EL-H6156) ve TNF-alfa (Elabscience, E-EL-H0109) düzeyleri kit protokolüne bağ kalınarak uygulanmış olup, 450 nm de Tecan ELISA okuyucu ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu değerler ile regresyon analizi gerçekleştirilmiş (Second order polynomial (quadratic)) ve standart eğri grafiği %95 güven aralığında oluşturulmuştur. Senesens ilişkili tüm analizlerde ise 2-yönlü varyans testi ve deneysel güç analizi için de çoklu karşılaştırma testi kapsamında Tukey post-hoc testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar için $p < 0,05$ değeri kabul edilmiştir. Tüm veriler dikkate alındığında gruplar arası fark olup olmadığı ortalama \pm standart hata ile gösterilmiştir. Analizler için GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) programı kullanılmıştır.

3.3. Verilerin Analizi

Senesensle ilgili tüm analizlerde, deneysel güç analizi için iki yönlü ANOVA testi ve çoklu karşılaştırma testi çerçevesinde Tukey post-hoc testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar için $< 0,05$ p-değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar arasında farklılık olup olmadığını göstermek için tüm veriler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. Analizler için GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc., San Diego, ABD) kullanılmıştır.

3.4. Etik Kurul Onayı

Tez, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 04.01.2022 tarihinde yapılan değerlendirme sonrasında tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur. (karar no: 2022/01-45).

3.5. Bütçe

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (THD-2022-19883).

4. BULGULAR

4.1. Demografik veriler

Çalışmada üç grup katılımcı yer almıştır. Sağlıklı kontroller, ortalanca yaşları 3.5 yıl (12 ay-10.7 yıl) olan beş erkek ve beş kızdan oluşmuştur. İlaça yanıt veren epilepsi grubunda ortalanca yaşları 6.8 yıl (7 ay-12 yıl) olan altı erkek ve dört kız yer almıştır. İlaça dirençli epilepsi grubu ortalanca yaşları 5.5 yıl (29 ay-10.7 yıl) olan dört erkek ve altı kızdan oluşmuştur. İlaça dirençli epilepsi grubunun klinik özellikleri Tablo 4.1.'de; ilaca yanıt veren epilepsi grubunun klinik özellikleri Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. İlaça dirençli epilepsi grubunun genel özellikleri.

Hasta No	Nöbet Başlangıç yaşı	Değerlendirme yaşı	Nöbet Sıklığı	Nöbet Tipi	İnteriktal EEG/ İktal EEG	Daha Önceki İlaçlar	Güncel İlaçlar	Beyin MRG	Bilişsel
1 (k)	1 gün	29 ay	50</gün	Fokal motor (miyoklonik, klonik, spazm)	Sol hemisferde burst-supresyon / sol hemisfer	TPM, ACTH, IVIG	VGB, LEV, PHT, RUF, CLB(+KD)	Sol hemimegaloensefali, sağ serebral atrofi, displastik korpus kallozum ve beyin sapı	ağır GGG
2 (e)	41 gün	39 ay	10</gün	Fokal motor (tonik, spazm), fokal non-motor (davranış duraksaması)	Sol hemisferde multifokal dikenler, sağ hemisferde nadir dikenler/ sol parietal bölge	VGB, TPM, ACTH, CZP (+KD)	FB, CBZ, LEV, CLB, PHT	Sol hemimegaloensefali, multipl periventriküler subependimal nodüller	ağır GGG
3 (e)	19 ay	3 yaş 9 ay	3-4/ hafta	Jeneralize motor (miyoklonik)	Sol parasagittal ve sağ frontosantral dikenler/-	OXC	LEV, VPA, CLB	Bilateral parietal bölgeden perisilviyan alana uzanan pakigiri; sağ serebral hemisferde daha yaygın olarak gözlenmiştir.	hafif ZY
4 (k)	8 ay	3 yaş 10 ay	3-4/ gün	Fokal motor (otomatizma)	Sağ temporal keskin dalgalar/sağ temporal	LEV, CBZ	VPA, CZP, OXC, LTG	Sağ temporal lobda fokal kortikal displazi tip 2	hafif ZY
5 (e)	4 yaş	4 yaş 10 ay	1-2/ gün	Fokal motor (tonik)	Sağ frontosentral dikenler/sağ frontal	LEV, OXC	VPA, CBZ, CLB	Sağ frontal kortikal displazi	hafif ZY
6 (k)	11 ay	6 yaş 3 ay	1-2/ hafta	Fokal motor (tonik)	Sağ sentrot temporal dikenler, jeneralize dikenler /jeneralize	ACTH	VPA, TPM	Sağ insuladan Sylvain fissürünün arka kısmına uzanan kortikal displazi ve aynı taraflı periventriküler heterotopi	orta ZY
7 (k)	18 ay	6 yaş 9 ay	15</gün	Fokal motor (tonik)	Sol frontal/ jeneralize, sol frontal	PB, CBZ, ACTH, CLB, PHT	OXC, VPA, LEV, LAC, ZNS	Sol superior frontal sulkusta fokal kortikal displazi	hafif ZY
8 (e)	18 ay	8 yaş 7 ay	5-10/ gün	Jeneralize non-motor (atipik absans)	Jeneralize, multifokal/jeneralize	TPM, CLB, VPA, RFD, ESM	LEV, CZP, LAC(+KD, VNS)	Sağ serebral hemisferde yaygın polimikrogiri	orta ZY
9 (k)	20 ay	10 yaş 3 ay	5-10/ gün	Fokal motor (otomatizma), fokal non-motor (davranış duraksaması)	Sol anterior temporal/sol temporal	TPM, CLB, VPA, CBZ	LEV, LAC (+VNS)	Sol temporal lobda fokal kortikal displazi	hafif ZY
10 (k)	5 ay	10 yaş 8 ay	10-15/ gün	Jeneralize motor (tonik, spazm)	Jeneralize/jeneralize	VPA, VGB, CBZ, TPM, ZNS, RFD, LEV, PHT	LAC, LTG, CLB (+KD)	Bilateral double korteks	ağır ZY

K: kadın, E: erkek, EEG: elektroensefalogram, MRG: manyetik rezonans görüntüleme. ACTH, Adrenokortikotropik hormon; CBZ, karbamazepin; CLB, klobazam; CZP, klonazepam; ESM, etosüksimid; IVIG, intravenöz immünglobulin; LAC, lakozamid; LEV, levetirasetam; LTG, lamotrijin; OXC, okskarbazepin; PB, fenobarbital; PHT, fenitoin; RFD, rufinamid; TPM, topiramet; VGB, vigabatrin; VPA, valproik asit; ZNS, zonisamid KD: ketojenik diyet; VNS: vagus sinir stimülasyonu; ZY: zihinsel yetersizlik; GGG: global gelişimsel gerilik

Tablo 4.2. İlaça yanıtlı epilepsi grubunun genel özellikleri.

Hasta No	Nöbet Başlangıç Yaşı	Son Nöbet Yaşı	Değerlendirme Yaşı	Nöbet Tipi	İnteriktal EEG	İlaç	Beyin MRG
1 (E)	2 ay	2 ay	7 ay	jeneralize motor (tonik)	N	PB, LEV	ince korpus kallosum
2 (E)	4 ay	5 ay	8 ay	fokal motor (klonik)	N	LEV	N
3 (K)	18 ay	18 ay	25 ay	jeneralize motor (tonik-klonik)	N	LEV	N
4 (K)	19 ay	19 ay	40 ay	jeneralize motor (tonik-klonik)	N	LEV	N
5 (K)	15 ay	15 ay	6 yaş 8 ay	jeneralize motor (tonik-klonik)	N	LEV	N
6 (E)	4 yaş	4 yaş	7 yaş	jeneralize motor (tonik-klonik)	jeneralize dikenler	VPA	N
7 (K)	6 yaş 6 ay	6 yaş 6 ay	7 yaş 8 ay	jeneralize motor (tonik-klonik)	N	LEV	N
8 (E)	5 yaş	7 yaş	9 yaş 2 ay	fokal motor (klonik)	sol sentrotemporal dikenler	LEV, CLB	sol superior frontal girusta spesifik olmayan T2 hiperintensitesi
9 (E)	10 yaş	10 yaş 10 ay	12 yaş	jeneralize motor (tonik-klonik)	multifokal dikenler	CBZ	N
10 (E)	5 yaş 3 ay	5 yaş 3 ay	12 yaş	jeneralize motor (tonik-klonik)	sağ temporal aralıklı yavaşlama ve sentroparietal keskin dalgalılar	LEV	sağ hipokampal skleroz

K: kadın, M: erkek, EEG: elektroensefalogram, N: normal, MRG: manyetik rezonans görüntüleme, ASM: nöbet önleyici ilaç; CBZ, karbamazepin; CLB, klobazam; LEV, levitirasetam; PB, fenobarbital; VPA, valproik asit

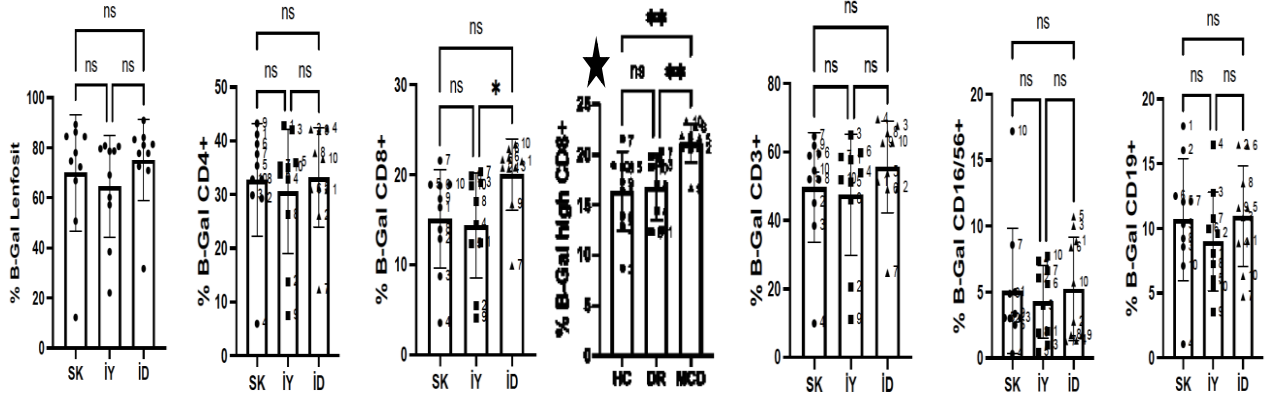
4.2. Senesens Belirteçlerinin Verileri

4.2.1. Senesens-ilişkili β -galaktosidaz

Akım sitometri ölçümü ile her üç gruptaki örneklerde toplam populasyon içinde SA-BetaGal pozitif hücre yüzdesi belirlenmiştir ve yüzdeler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Sağlıklı kontrol gurubu, ilaca yanıtlı epilepsi grubu ve ilaca dirençli epilepsi grubunun SA-BetaGal pozitif hücre yüzdesi karşılaştırıldığında genel olarak lenfositlerde ve CD8+ T hücreleri dışındaki lenfosit alt gruplarında üç grup arasında fark izlenmedi. İlaça dirençli epilepsi grubunda CD8+ T hücrelerde SA-BetaGal

pozitif hücre yüzdesi sağlıklı kontrol grubuna ve nöbet önleyici ilaca yanıtı epilepsi grubuna göre daha yüksekti (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. SA-BetaGal pozitif hücre yüzdesinin gruplar arası analizi. SK: sağlıklı kontrol, İY: ilaca yanıtı epilepsi, İD: ilaca dirençli epilepsi (SK: sağlıklı kontrol, İY: ilaca yanıtı epilepsi, İD: ilaca dirençli epilepsi (tek yönlü ANOVA analizi, Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$). Üç grubun düşük değerleri çıkarıldıktan sonra CD8+ T hücrelerinin istatistik sonuçları.★

4.2.2. Hücre Döngüsü Yolaklarındaki Belirteçler

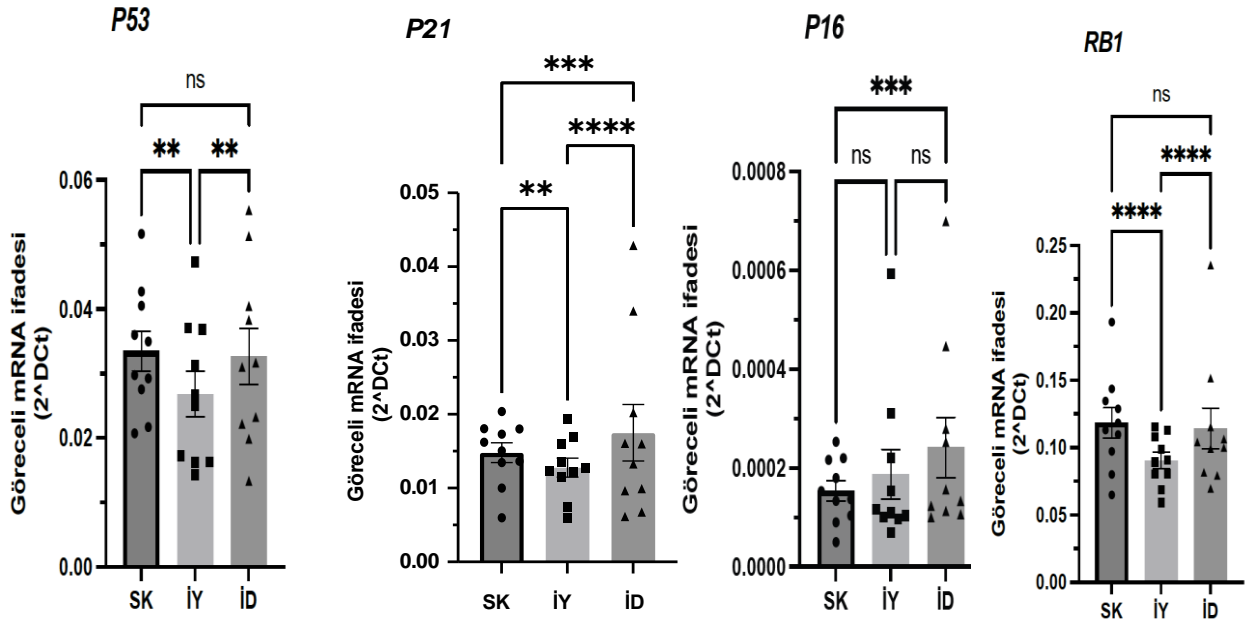
Sağlıklı kontrol grubu, ilaca yanıtı epilepsi grubu ve ilaca dirençli epilepsi grubunda hücre döngüsü yolaklarındaki belirteçlerin mRNA ifadeleri karşılaştırıldı (Şekli 4.2.).

(i) p16 transkripsiyonel düzeyleri ilaca dirençli epilepsi grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu. Sağlıklı kontrol grubu ve ilaca yanıtı epilepsi grubu, ilaca yanıtı epilepsi grubu ve ilaca dirençli epilepsi grupları arasında fark izlenmedi.

(ii) p21 transkripsiyonel düzeyleri ilaca dirençli epilepsi grubunda sağlıklı kontrol grubu ve nöbet önleyici ilaca yanıtı epilepsi grubuna kıyasla önemli ölçüde yükseldiği görüldü. Sağlıklı kontrol grubunda ise ilaca yanıtı epilepsi grubuna göre daha yüksek düzeyler ölçüldü.

(iii) p53 transkripsiyonel düzeyleri sağlıklı kontrol grubu ve ilaca dirençli epilepsi grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. İlaça yanıtı epilepsili hastalarında ise düşüktü.

(iv) RB transkripsiyonel düzeyleri sağlıklı kontrol gurubu ve nöbet önleyici ilaca dirençli epilepsi grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Nöbet önleyici ilaca yanıtli epilepsili hastalarında ise düşüktü.

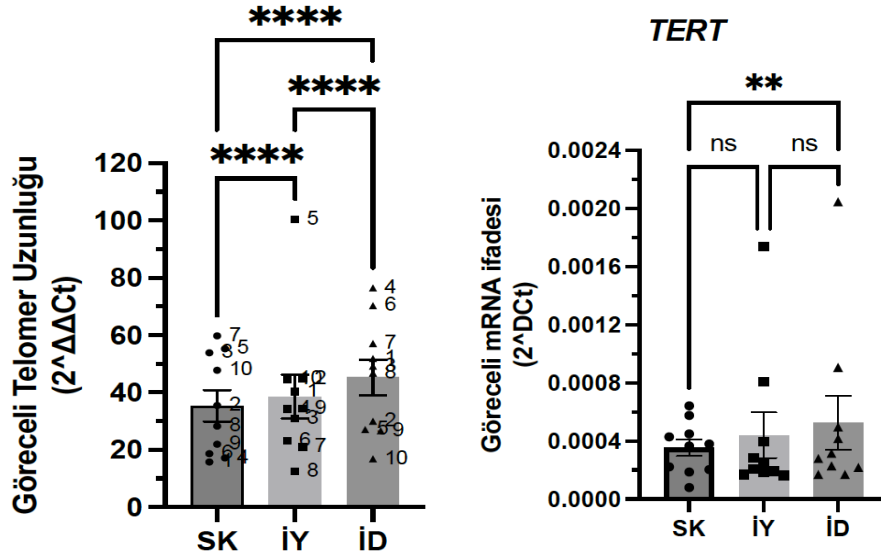


Şekil 4.2. Hücre döngüsü yolaklarındaki belirteçlerin gen ifade analizi: p16, p21, p53, retinoblastoma (RB1) mRNA ekspresyon seviyelerinin gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR analizi. SK: sağlıklı kontrol, İY: ilaca yanıtli epilepsi, İD: ilaca dirençli epilepsi (tek yönlü ANOVA analizi, Tukey, ** p < 0.01, *** p < 0.005, **** p < 0.0001).

4.4.3. Telomer Uzunluğu ve Telomeraz Ters Transkriptaz mRNA İfadesi

(i) Periferik kan mononükleer hücrelerinin telomer uzunlukları, KGM'li ilaca dirençli epilepsi hastaları, ilaca yanıt veren epilepsi hastaları ve sağlıklı hastalar arasında karşılaştırıldı. İlaca dirençli epilepsi grubunun, sağlıklı kontrol grubundan ve ilaca yanıt veren epilepsi grubundan önemli ölçüde daha uzun telomerlere sahipti olduğu görüldü. İlaca yanıt veren epilepsi grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla telomer uzunluğunun daha uzun olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.).

(ii) Telomeraz ters transkriptaz (TERT) mRNA ifadesi, ilaca dirençli KGM'li epilepsi grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksekti. İlaca yanıt veren epilepsi hastaları ile sağlıklı kontrol grubu ve ilaca dirençli epilepsi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.3.).



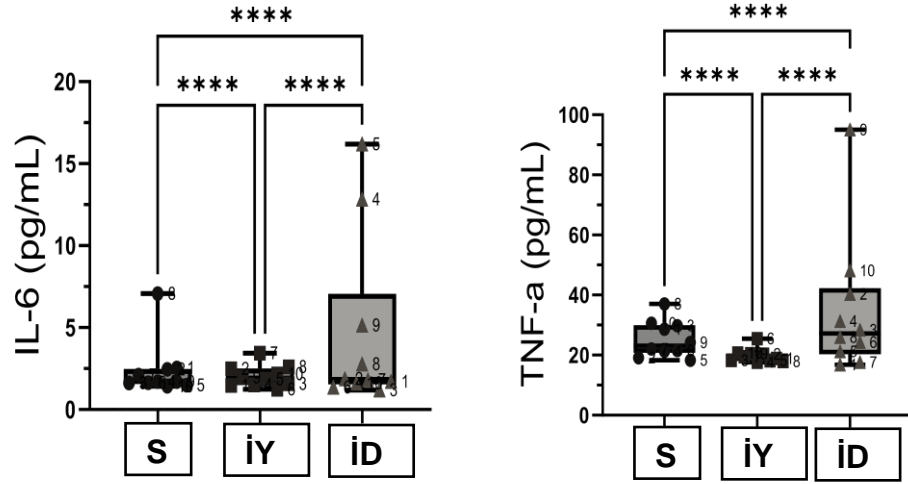
Şekil 4.3. Telomer uzunluklarının ve telomeraz ters transkriptaz (TERT) mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması. SK: sağlıklı kontrol, İY: ilaca yanıtı epilepsi, İD: ilaca dirençli epilepsi (tek yönlü ANOVA analizi, Tukey, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

4.2.4. Senesens ile İlişkili Salgı Fenotipi Belirteçleri

İnflamatuar belirteçlerin plazma seviyeleri ELISA ile ölçüldü ve gruplar arasında karşılaştırıldı (Şekil 4.4.).

(i) IL-6 plazma seviyeleri ilaca dirençli epilepsi grubunda sağlıklı kontrol gurubu ve ilaca yanıtı epilepsi grubuna kıyasla yüksek tespit edildi. İlaça yanıtı epilepsi grubunda ise sağlıklı kontrol gurubunda ise göre daha yüksek düzeyler ölçüldü.

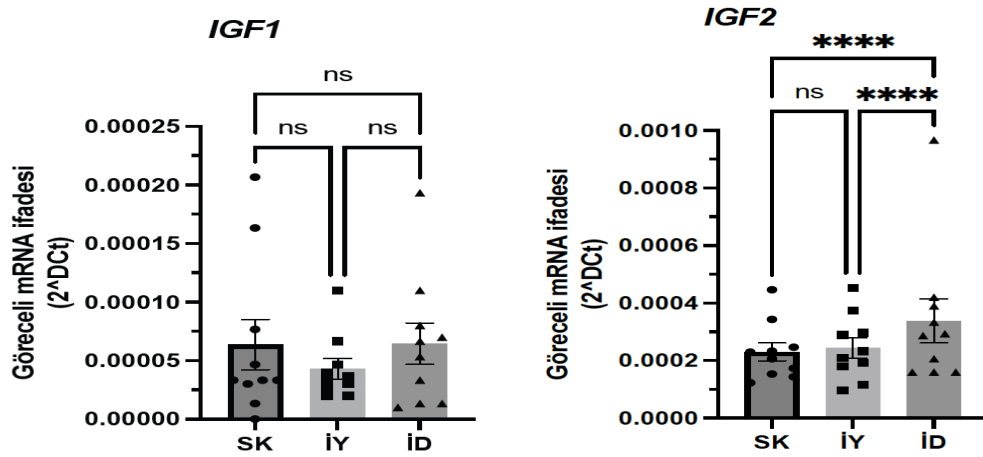
(ii) TNF-alfa plazma seviyeleri ilaca dirençli epilepsi grubunda sağlıklı kontrol gurubu ve ilaca yanıtı epilepsi grubuna kıyasla yüksekti. Sağlıklı kontrol gurubunda ise ilaca yanıtı epilepsi grubuna göre daha yüksek düzeyler ölçüldü.



Şekil 4.4. İnterlökin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa) plazma seviyelerinin karşılaştırılması. SK: sağlıklı kontrol, İY: ilaca yanıtlı epilepsi, İD: ilaca dirençli epilepsi (tek yönlü ANOVA analizi, Tukey, **** p < 0.0001).

4.2.5. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) 1 ve 2'nin mRNA ekspresyon seviyeleri, KGM'li ilaca dirençli epilepsi hastaları, ilaca yanıt veren epilepsi hastaları ve sağlıklı hastalar arasında karşılaştırıldı (Şekil 4.5.). IGF1 transkripsiyonel seviyeleri gruplar arasında benzerdi. İlaca dirençli epilepsi grubu hem sağlıklı kontrol hem de ilaca yanıt veren epilepsi hastalarından e daha yüksek IGF2 transkripsiyon seviyelerine sahipti. Son iki grup arasında fark yoktu.



Şekil 4.5. İnsülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF), IGF1 ve IGF2'nin gen ifade analizi. IGF1 ve IGF2'nin mRNA ekspresyon seviyelerinin gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR analizi. SK: sağlıklı kontrol, İY: ilaca yanıtlı epilepsi, İD: ilaca dirençli epilepsi (tek yönlü ANOVA analizi, Tukey, **** p < 0.0001).

5. TARTIŞMA

Hücresel senesens, belirli stresörlerin etkisiyle veya fizyolojik süreçlerin bir parçası olarak ortaya çıkan, hücre döngüsünde durma, morfolojik değişiklikler, metabolizmada etkilenme ve sonrasında hücre dışına salınan proinflamatuvar proteinler ve diğer moleküller ile karakterize, devam eden canlılık ve metabolik aktiviteye rağmen, istikrarlı ve uzun vadeli bir proliferatif kapasite kaybına verilen addır (1, 4, 9). Senesens embriyolojik gelişimde, doku rejenerasyonunda, plastisitede rol oynadığı gibi yaşlanmada, kanserde ve dejenerasyonda rol oynar (5, 95). Hücrelerde senesensi göstermede standart bir belirteç veya belirteçler grubu yoktur, bir hücre/doku grubunun senesense uğrayıp uğramadığına birçok belirteçe bakarak karar verilmesi önerilir (3). Bu biyobelirteçlerden bazıları, senesens sürecine katkıda bulunan mekanizmaların aktivasyonunu gösterirken (örneğin tümör baskılayıcı yollar), diğerleri ise senesens programının işleyişine eşlik eden değişiklikleri yansıtır (örneğin: senesensle ilişkili beta galaktosidaz aktivitesindeki artış) (31). Ayrıca fizyolojik ya da patolojik süreçlerde dokunun tipi, hasarın çeşidi, şiddeti, süresi ve zamanlamasına göre senesense uğrayan hücrelerdeki yapısal değişiklikler, gen ifadeleri ve salınan moleküller de farklılık göstermektedir (1). Bu bilgiler ışığında pediatrik epilepsi hastalarında, senesens belirteçlerinin çocukların periferik kan mononükleer hücrelerinde yüksek olabileceğini düşündük ve beta galaktozidaz aktivitesini, telomer uzunluğunu, hücre döngüsü yollarındaki genlerin mRNA düzeylerini ve senesens ile ilişkili salgı fenotipi belirteçlerini sağlıklı kontrollerle karşılaştırdık.

Senesens-ilişkili β -galaktosidaz aktivitesinin ölçümü senesense uğramış hücreleri tanımlamak için yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Senesense uğramış hücrelerde bozulmuş metabolizmayı gösteren belirteçlerden biridir (32, 96). Bununla birlikte spesifik değildir, senesense uğramamış hücrelerde de pozitif bulunmuş ve senesense uğramış her hücrede gösterilememiştir (5). Alzheimer hastalarını ve hafif zihinsel etkilenmesi olan erişkin bireyleri inceleyen bir çalışmada periferik kan mononükleer hücrelerinde senesens-ilişkili β -galaktosidaz Alzheimer grubunda hafif zihinsel etkilenmesi olan çocuklara göre daha düşük bulunmuş, yazarlar senesens

belirteçlerinin farklı evrelerde zamansal bir değişim gösterebileceğini vurgulamıştır (97). Periferik kan mononükleer hücreleri inceleyen başka bir erişkin hastaları içeren çalışmada T lenfositlerinin, yaşla birlikte artan oranda yüksek SA-BetaGal aktivitesi gösterdikleri, alt grup incelemelerinde özellikle de CD8+ T hücrelerinde bu oranın yüksek olduğu vurgulanmışlardır. SA-BetaGal aktivitesi yüksek olan CD8+ T hücrelerin çoğalma yeteneklerinde bozulma görüldüğünü, telomer disfonksiyonu ve senesense beklenen gen ifadesi değişikliklerin izlendiğini belirtmişlerdir. Bağışıklık hücreleri de ilerleyen yaşla birlikte yaşlanır; timik involüsyonu takiben daha az naif T hücresi üretir ve enfeksiyona, otoimmüniteye karşı duyarlılığı artıran yüksek oranda farklılaşmış hafıza CD8+ T hücreleri biriktirirler; bu durum immüno-senesens olarak bilinir (20, 98). Bu erişkin hastaların sonuçları immüno-senesense CD8+ T hücrelerinin önemli bir rolü olabileceğini desteklemiştir (20, 99). Çalışmamızda periferik kan mononükleer hücrelerinde genel olarak SA-BetaGal aktivitesi tüm gruplarda benzer yüzdelerde bulduk. SA-BetaGal aktivitesi senesens için önemli bir belirteç olduğu için bulgularımız bu hücrelerin senesense uğramadığını destekler. Bununla birlikte alt grup incelemelerinde CD8+ T hücrelerinin SA-BetaGal aktivitesini daha yüksek saptamamız ilaca dirençli epilepsi grubunda immüno-senesensin tetiklenmiş olabileceğini düşündürmüştür. Epilepsi hastalarında sistemik otoimmün hastalıkların daha sık görülmesi göz önünde bulundurulduğunda, tekrarlayan nöbetlerin CD8+ T hücrelerinde immüno-senesense yol açarak otoimmüniteye katkıda bulunmuş olabileceğini akla getirmektedir (100).

Telomerin fonksiyonel durumu hücre canlılığı için önemlidir, hücreler, özellikle telomeraz eksprese edenler, fonksiyon bozukluğu olan telomerleri onarmaya çalışabilirler (22). Telomerler DNA'yı hasara karşı korur. Her mitotik döngüde kısaltıldıkları için periferik kanda lökosit telomer uzunluğu (LTL) nun ölçülmesi bu mitotik saatin durumunu göstermede pratik bir yöntemdir (101). Çevresel etkenler ve genetik LTL'Yİ etkiler. Birleşik Krallık'tan 472.432 erişkin bireyi içeren uzun süreli bir takip çalışmasında LTL'nin azalması genel olarak mortalitede hafif risk artışı ile ilişkilendirilmiştir ancak belirli hastalıkların riski daha anlamlıdır (101). Kohortun bir kısmında beyin MRG bulguları ve ileriki yaşlarda görülen nörolojik hastalıklar incelenmiştir, uzun LTL'nin demans insidansında azalma ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (102). Telomer uzunluğu ile ilişkili genlerdeki tek nükleotid

polimorfizmleri LTL'yi etkiler ve genetik olarak LTL uzunluğu öngörülebilir (103). Tek nükleotid polimorfizm çalışmaları genetik olarak öngörülen daha uzun telomer uzunluğunun çeşitli kanserler için artan risk yarattığını ortaya koyarken, genetik olarak öngörülen daha kısa telomer uzunluğu kardiyovasküler hastalık, diyabet, kronik obstruktif akciğer hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi dejeneratif hastalık oranlarında artışla ilişkilendirilmiştir (104). Hem kısa hem de uzun telomerlerin getirdiği riskler olduğu düşünülmektedir. Hücrelerin telomerlerini stabilize etmelerinin en yaygın yolu, telomerase, özellikle de katalitik bileşen TERT'in eksprese edilmesidir (22). Periferik kan lenfositlerinde telomerase düşük seviyede ölçülür, antijen uyarısı ile artar, lenfositlerin çoğalma kapasitelerini korumaları daha önce karşılaşılan antijenlere karşı immunreaktiviteyi sürdürmek için gereklidir (105). Bu tür hücrelerin telomerlerini stabilize etmelerinin en yaygın yolu, telomerase, özellikle de katalitik bileşen TERT'in eksprese edilmesidir.(22) TERT esas olarak antijenle uyarılmış lenfositler, germ hücreleri ve kanserin çoğunluğu gibi işlevleri için proliferasyonun sürdürülmesinin gerekli olduğu hücrelerde eksprese edilir (106). Çalışmamızın sonuçlarında sağlıklı çocuklarla karşılaştırıldığında ilaca yanıtı ve ilaca dirençli epilepsi hastalarında telomerler daha uzun bulundu, ayrıca ilaca dirençli epilepsi hastalarında ilaca yanıtı epilepsili çocuklardan daha uzun ölçüldü. TERT transkripsiyonel düzeyleri nöbet önleyici ilaca dirençli epilepsi grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde yükseldiği bulundu. Sağlıklı çocuklar ile ilaca yanıtı epilepsili çocuklar arasında fark yoktu. Sonuçlarımız iki noktaya işaret edebilir. İlki epilepsinin telomer hasarlanması için bir risk faktörü olmadığıdır. Fakat çalışmamızda ilaca dirençli epilepsi grubunda TERT'in transkripsiyonel düzeyleri de yüksek bulunmuştur. Bu nedenle sonuçlarımız epilepsinin, özellikle ilaca dirençli epilepsinin daha aktif şekilde telomer hasarlanmasına yol açtığı fakat çocukların genç organizmalar olması nedeniyle tamir mekanizmalarının iyi çalıştığı ve hücrelerin canlılığını koruması lehine telomerase daha aktif, telomerlerin de daha uzun olduğu lehinedir. Bulgularımız çocuklarda nöbetlerin oluşturduğu hücresel strese karşı hızlanmış telomer hasarlanmasına aktif bir yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir. Hücrelerin uğradığı stres, özellikle oksidatif stress telomer disfonksiyonu için risk oluşturmaktadır (107). LTL ilk 20 yıl boyunca hızlı kısalır ve daha sonra yavaş kısalır (108). Sonuçlarımız, preadolesan hastalarımızda bu ilk yıllardaki azalmanın daha hızlı

olmasını engellemek adına hastalarımızda ilerideki geri dönüşümü olmayacak kısılamalardan nöroprotektif amaçla adaptif bir yüksekliğin meydana geldiğini düşündürmüştür. Telomer disfonksiyonu yaşlılarda nörodejeneratif hastalıklardata çalışılmıştır (109, 110). Yüksek telomerazın aktivitesi ve uzun telomerlerin nöroprotektif olabileceği ALS'de araştırılmıştır. Kısa telomerlerin, azalmış telomeraz aktivitesinin ve TERT transkripsiyonel düzeylerinin düşüklüğünün yaşlılarda nöronal ölüme katkıda bulunduğuna dair çalışmalar vardır (110-112). Roberts ve arkadaşları ise yaşlı hastalarda uzun telomerlerin de nörodejenarasyonla ilişkili olabileceğini belirtmiş hem kısa hem de uzun telomerlerin kognitif yıkım riskini arttırdığını, telomer uzunluğunun kognitif etkilenme için risk belirleme açısından tek başına yeterli olmayacağını vurgulamıştır (113). Telomer nörodejeneratif hastalık ilişkisi sıkça çalışılmış iken epilepsi telomer ilişkisi konusunda çalışma kısıtlıdır. Espinosa ve arkadaşlarının prelinik çalışmalarında, nöbet yükünün fazla olduğu farelerin dokuları incelendiğinde daha kısa telomerlere sahip olduklarını bulunmuştur (114). Miranda ve arkadaşları erişkin temporal lob epilepsili hastalarda sağlıklı kontrollere göre periferik hücre lökositlerinde anlamlı bir telomer kısalması olduğunu bildirmişlerdir (12). Binlerce pediatrik ve yetişkin epilepsi hastası üzerinde yapılan yeni bir genom boyu ilişkilendirme çalışmasında, telomer uzunluğu ile ilişkili genlerdeki tek nükleotid polimorfizmleri incelenmiş ve epilepsi ile telomer uzunluğu arasında nedensel bir ilişki olmadığı belirlenmiştir (115).

Ekzojen ve endojen kaynakların neden olduğu stres ve hasarlanmalar sonucunda senesense uğramış hücrelerde hücre döngüsü durur. Bu noktada pek çok yolak aktive olur. Hücre döngüsü düzenlenmesinde kritik rol oynayan p53-p21 ve p16-RB yolaklarının senesens sırasında aktive olduğu gösterilmiştir (1, 3, 20, 31). p53 tümör baskılayıcı protein, tümör süpresör yolakların ana yapıtaşıdır, genomun koruyucusu olarak da adlandırılır. Stresörler p53'ü aktive ettiğinde hücre döngüsü tamir için geçici olarak durabilir ya da bu aktivasyon hücre ölümünü veya hücre senesensi tetikler (116). p53 tetiklendiğinde p21 aktive olur ve p21 siklin bağımlı kinaz inhibitörü görevi görür, hücre bölünme döngüsü durur. p53-p21 yolağı DNA hasarlanması ve telomer kısalması gibi tetikleyicilerin sonucunda ortaya çıkan replikatif senesensde daha aktif yolak p53-p21 yolağıdır (16, 20). p16 siklin bağımlı kinaz inhibitörü olarak RB'nin hiperfosforilasyonunu baskılar, proliferatif genlerin E2F

transkripsiyon faktörü aracılı ekspresyonunu inhibe eder ve hücre döngüsü durur (3, 117). p16-p21 yolağı reaktif oksijen radikallerinin tetiklediği senesende daha aktif olan yolaktır (20). Bu iki yolak birbirleri ile iletişim halindedir ve tetikleyicilere cevap olarak beraber veya bağımsız çalışabilir (3). Ayrıca p21 p53 den bağımsız, RB de p16 dan bağımsız tetiklenebilir (16, 118). Çalışmamızda p53-p21 yolağının transkripsiyonel düzeyleri değerlendirildiğinde nöbet önleyici ilaca dirençli KGM'li epilepsi grubunda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında p53'de benzer düzeyler ölçüldü, p21 ise daha yüksek bulundu. p16-RB yolağında ise kontrol grubuna kıyasla p16 transkripsiyonel düzeyleri nöbet önleyici ilaca dirençli epilepsi grubunda yüksekti. RB'de ise benzer bir yükseklik izlendi. Bu bulgular sağlıklı kontrollerin de ekstrinsik veya intrinsik pek çok stres ve uyarıya maruz kalması ve sonucunda tamir mekanizmalarına fırsat verecek şekilde hücre döngüsünde duraksamanın olduğunu düşündürmüştür. Yukarıda bahsedildiği gibi ve SA-BetaGal seviyeleri sağlıklı hastalar ve dirençli epilepsi gruplarında benzerdir, epilepsi hastalarında telomer uzunluğu ölçüldüğünde kısa bulunmamıştır, bu nedenle epilepsi hastalarında bu duraksamanın hücre döngüsünde kalıcı bir durmaya yani senesense neden olmadığı ve ilaca dirençli epilepsi hastalarında kognitif etkilenme ile ilişkili olmadığı düşünülmüştür. İlaça dirençli epilepsi grubundaki yüksek p16 ve p21 ifadeleri göz önüne alındığında, bulgularımız devam eden nöbetlerin yarattığı stresin bu belirteçlerde artışı tetikleyebileceğini veya buna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Sensense uğramış hücrelerden otokrin ve parakrin etkisi olan inflamatuvar sitokin ve kemokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinazları ve proteazlar salınır, bu sektertuvar profil senesensele ilişkili salgı fenotipi olarak (senescence-associated secretory phenotype, SASP) adlandırılır (1, 4, 31). SASP'ye kısa süreli maruz kalma organizma için yararlı olabilirken, uzun süreli maruz kalma senesensin dejeneratif etkisine katkıda bulunur (119). SASP'nin baskın proinflamatuvar sitokinlerinden biri IL-6'dır (9). SASP'yi oluşturan onlarca sitokinin arasında TNF-alfa da yer alır (120). SASP senesense salınırken, inflamatuvar sitokinlerin kendileri de süre ve yoğunluğa bağlı olarak sensensi tetikleyebilmektedir (121).

Çalışmamızda, ilaca dirençli epilepsisi olan KGM'li çocukların IL-6 ve TNF-alfa seviyeleri, ilaca yanıt veren epilepsisi olanlara veya sağlıklı kontrollere göre

anlamli derecede yuksekti ve bu da epilepsinin şiddetiyle orantılı bir inflamasyon olduğunu düşündürmektedir. Giderek artan sayıda araştırma, epilepsi ve inflamasyon arasında çift yönlü bir ilişki olduğunu desteklemektedir. Çalışmalar, uzun süreli nöbetlerin ve status epileptikusun inflamasyon gelişimi ile ilişkili olduğunu, inflamasyonun kendisinin ise epileptogeneze katkıda bulunabileceğini göstermiştir. İnsan çalışmaları sıklıkla epileptik hastalarda proinflamatuvar mediyatörlerin yüksek seviyelerde olduğunu göstermektedir. Bu inflamasyon sadece serumda değil, beyin omurilik sıvısı ve epileptik doku örneklerinde de kendini göstermektedir (122). İlaça dirençli epilepsi kronik inflamatuvar stresi temsil etse ve hücre senesensi tetiklemesi beklense de muhtemelen senesensi hızlandırmak için inflamasyona uzun süre maruz kalmak gerektiğinden, sonuçlarımız bunu desteklememiştir. Kronik inflamatuvar stres, ilaca dirençli epilepsisi olan çocukları zaman içinde sağlıklı çocuklara kıyasla yaşlanmaya daha duyarlı hale getirebilir.

İlaça dirençli epilepsisi olan hastalarımızda insülin benzeri büyüme faktörü 2 ekspresyonu belirgin şekilde yüksek. IGF1 ekspresyonu tüm gruplarda benzerdi. IGF 1 ve 2 somatik büyümeyi, nörogenezi ve hücre proliferasyonunu uyarır. IGF1'in deneysel epilepside nöroprotektif ve onarıcı bir rolü vardır veya aksine, IGF-1/PI3K/mTOR yolağının aktivasyonu ile epileptogenezi hızlandırabilir (123-126). Uyku sorunları açısından değerlendirilen epilepsi hastası olan ve olmayan çocuklarda IGF-1'in serum konsantrasyonu farklılık göstermemiştir (127). IGF2'nin embriyonik büyüme üzerinde önemli bir etkisi vardır. İlginç bir şekilde, IGF2 eksikliği deneysel çalışmalarda olgun beyinde nöroprotektiftir (128). Çalışmamızda daha yüksek nöbet yükü daha yüksek IGF2 transkripsiyon seviyeleri ile ilişkili olduğundan, bulgumuz bu gözlemlerle kısmen uyumludur. Bu nedenle, IGF çalışmalarının sonuçları deneklerin yaşı ve gelişimsel evresi göz önünde bulundurularak yorumlanmalıdır. Şu anda IGF'ler ve yaşlanma arasındaki ilişki hakkındaki bilgiler belirsizdir: bazı çalışmalar proliferatif etkilerine dayanarak yaşlanmayı önleyici bir rol oynadıklarını gösterirken, diğerleri yaşlanmaya yol açabileceklerini öne sürmektedir (129-131). Araştırmalarda dikkate alınması gereken bir diğer nokta da serum ve dokulardaki IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP-1 ve IGFBP -2) ve IGF reseptörlerinin (IGF-1R ve IGF-2R) plazma seviyeleri kadar önemli olmasıdır: örneğin, deneysel nöbetlerden sonra belirli beyin bölgelerinde IGF-1R ve IGF-2R bağlanması azalır (132). Bu konuda insan dokusu ve fare

deneylerini inceleyen infantil spazm ile ilgili bir çalışma ise farklı bir pencere açmıştır. Infantil spazm hastalarından cerrahi olarak rezeke edilen neokortekste değişmiş IGF1 ekspresyonunun etkilendiğini, benzer bulguların hayvan modelinde de gözlemlendiğini, IGF1 ile tedavi edilen hayvanların çoğunda spazmların ve hipsaritmi benzeri aktivitenin yatıştığını ve IGF'in spazmın tedavisinde potansiyel bir ilaç olabileceğini vurgulamıştır (133).

Analizlerimize dahil etmediğimiz bir faktör, epigenetik ve enflamatuar süreçler gibi senesensle ilgili belirli yolları potansiyel olarak hedef alabilecek nöbet önleyici ilaçların etkisidir (134, 135). Bu durum, çalışmamızın nispeten küçük örneklem boyutundan ve katılımcılar tarafından kullanılan ilaç kombinasyonlarının heterojenliğinden kaynaklanmaktadır. İlaçların senesens üzerindeki etkisi, kapsamı ve mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır ve bildirilen etkileri sınırlı ve çelişkilidir. Örneğin, hayvan çalışmaları valproik asidin hücrel senesensi hem tetikleyebildiğini hem de hafifletebildiğini göstermiştir (136, 137). Daha önce yapılan çalışmalarda NÖİ'ler ile telomer uzunluğu arasındaki neden-sonuç ilişkisi doğrudan araştırılmamıştır. Miranda ve arkadaşları, ilaca dirençli hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla daha kısa telomerler gözlemlemiş, bu farktan nöbetlerin kendisinin mi yoksa NÖİ'lerin mi sorumlu olduğu konusunda daha ayrıntılı yorum yapamamışlardır (12). Nöbet önleyici ilaçların epilepsinin kendisinden bağımsız olarak senesens belirteçleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamız belirli kısıtlılıkları vardır. Bu çalışmada klinik olarak uygulanabilir senesens belirteçlerinin tanımlanması amacıyla periferik kan örnekleri kullanılmış olsa da, beyin dokusu analizi epilepsinin altında yatan patogenetik süreçlerin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlayacaktır. Örneklem büyüklüğümüz küçüktür. Diğе kısıtlılığımız DNA hasarı ve apoptoz belirteçleri, reaktif oksijen ürünleri ve SASP'nin IL6 ve TNF-alfa dışındaki bileşenleri gibi senesensin diğеr birçok parametresini ölçmemesidir. p16, p21, p53 ve RB'nin aktivasyonunu düzenleyen fosforilasyon mekanizmaları ve bunların fosforilasyon durumu da değerlendirilmemiştir. Telomer uzunluğu ve p53, RB, TERT, p16, p21, IGF1 ve IGF2 ekspresyonu periferik kan mononükleer hücrelerinde ölçülmüş ancak lenfosit alt gruplarında ayrı ayrı ölçülmemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Hücre döngüsü belirteçleri, telomer uzunluğu ve SA-BetaGal aktivitesi analizlerimiz, KGM'si olan ilaca dirençli epilepsi grubunda stres kaynaklı erken veya replikatif yaşlanmaya dair herhangi bir kanıt sunmamıştır. Bu hastalarda bilişsel komorbidite üzerine senesensin bir etkisi olmadığı düşünülmüştür.

2. İlaça dirençli grupta lenfosit alt grup incelemelerinde CD8+ T hücrelerinin SA-BetaGal aktivitesini daha yüksek saptamamız bu grupta immüsenesensin tetiklendiğine dair şüphe uyandırmıştır.

3. İnflamatuar belirteçler ve p16-p21 mRNA ifadesinin yüksek olması, ilaca dirençli epilepsili çocukların nöbetler nedeniyle hücrel strese maruz kaldıklarını ve zaman içinde senesense duyarlı hale gelebileceklerini düşündürmüştür.

4. Daha geniş bir biyobelirteç profili ile periferik kanda incelemeler yapmak, her bir lenfosit alt grubunu, özellikle CD8+ lenfositleri ayrı ayrı analiz etmek ve epilepsi cerrahisi geçirmiş ilaca dirençli epilepsili çocuklarda epileptojenik dokuda senesensi araştırmak, epilepsi patogenezinde senesens ile ilgili bilgilerimize katkıda bulunacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019;179(4):813-27.
2. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541.
3. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):729-40.
4. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev*. 2014;28(2):99-114.
5. Rhinn M, Ritschka B, Keyes WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development*. 2019;146(20).
6. Martinez-Cue C, Rueda N. Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:16.
7. Pitkanen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol*. 2011;10(2):173-86.
8. Pearson-Smith JN, Patel M. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11).
9. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99-118.
10. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(1):31-40.
11. Thom M, Martinian L, Sen A, Squier W, Harding BN, Cross JH, et al. An investigation of the expression of G1-phase cell cycle proteins in focal cortical dysplasia type IIB. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(11):1045-55.
12. Miranda DM, Rosa DV, Costa BS, Nicolau NF, Magno LAV, de Paula JJ, et al. Telomere shortening in patients with drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Res*. 2020;166:106427.
13. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
14. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.

15. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585-621.
16. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2014;15(7):482-96.
17. Wissler Gerdes EO, Zhu Y, Weigand BM, Tripathi U, Burns TC, Tchkonina T, et al. Cellular senescence in aging and age-related diseases: Implications for neurodegenerative diseases. *Int Rev Neurobiol.* 2020;155:203-34.
18. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell.* 2013;155(5):1104-18.
19. Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol.* 2010;12(7):676-85.
20. Huang W, Hickson LJ, Eirin A, Kirkland JL, Lerman LO. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat Rev Nephrol.* 2022;18(10):611-27.
21. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:645593.
22. Kim SH, Kaminker P, Campisi J. Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene.* 2002;21(4):503-11.
23. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer.* 2007;96(7):1020-4.
24. Liu X-l, Ding J, Meng L-h. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2018;39(10):1553-8.
25. Rattanavirotkul N, Kirschner K, Chandra T. Induction and transmission of oncogene-induced senescence. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(3):843-52.
26. Miwa S, Kashyap S, Chini E, von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *J Clin Invest.* 2022;132(13).
27. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* 2016;23(2):303-14.
28. Chapman J, Fielder E, Passos JF. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett.* 2019;593(13):1566-79.
29. Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev.* 2011;10(1):146-52.

30. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *Febs j.* 2021;288(1):56-80.
31. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010;24(22):2463-79.
32. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1798-806.
33. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9363-7.
34. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell.* 2012;23(11):2066-75.
35. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene.* 2013;32(43):5129-43.
36. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer.* 2012;130(8):1715-25.
37. Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N, Hara E. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci.* 2017;108(4):563-9.
38. Carreno G, Guiho R, Martinez-Barbera JP. Cell senescence in neuropathology: A focus on neurodegeneration and tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2021;47(3):359-78.
39. Honda S, Ikeda K, Urata R, Yamazaki E, Emoto N, Matoba S. Cellular senescence promotes endothelial activation through epigenetic alteration, and consequently accelerates atherosclerosis. *Scientific Reports.* 2021;11(1):14608.
40. Iwasaki K, Abarca C, Aguayo-Mazzucato C. Regulation of Cellular Senescence in Type 2 Diabetes Mellitus: From Mechanisms to Clinical Applications. *Diabetes Metab J.* 2023;47(4):441-53.
41. Yasuda T, Baba H, Ishimoto T. Cellular senescence in the tumor microenvironment and context-specific cancer treatment strategies. *FEBS J.* 2023;290(5):1290-302.
42. Kritsilis M, S VR, Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10).

43. Li Y, Lu J, Hou Y, Huang S, Pei G. Alzheimer's Amyloid- β Accelerates Human Neuronal Cell Senescence Which Could Be Rescued by Sirtuin-1 and Aspirin. *Front Cell Neurosci.* 2022;16:906270.
44. Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, McQuade A, et al. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep.* 2018;22(4):930-40.
45. Lee S, Wang EY, Steinberg AB, Walton CC, Chinta SJ, Andersen JK. A guide to senolytic intervention in neurodegenerative disease. *Mech Ageing Dev.* 2021;200:111585.
46. Baker DJ, Petersen RC. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1208-16.
47. Jacobi C, Hömme M, Melk A. Is cellular senescence important in pediatric kidney disease? *Pediatr Nephrol.* 2011;26(12):2121-31.
48. Bar-Or A, Muraro PA. Premature immune senescence in children with MS: Too young to go steady. *Neurology.* 2013;81(9):778-9.
49. Peng L, Baradar AA, Aguado J, Wolvetang E. Cellular senescence and premature aging in Down Syndrome. *Mechanisms of ageing and development.* 2023;212:111824.
50. Sukenik-Halevy R, Biron-Shental T, Sharony R, Fejgin MD, Amiel A. Telomeres in trisomy 21 amniocytes. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(1):12-8.
51. Amiel A, Fejgin MD, Liberman M, Sharon Y, Kidron D, Biron-Shental T. Senescence in amniocytes and placentas from trisomy 21 pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(11):1086-9.
52. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet.* 1993;52(4):661-7.
53. Kruseova J, Zichova A, Eckschlager T. Premature aging in childhood cancer survivors. *Oncol Lett.* 2023;25(2):43.
54. Smitherman AB, Wood WA, Mitin N, Ayer Miller VL, Deal AM, Davis IJ, et al. Accelerated aging among childhood, adolescent, and young adult cancer survivors is evidenced by increased expression of p16INK4a and frailty. *Cancer.* 2020;126(22):4975-83.
55. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005;46(4):470-2.

56. Serdaroglu A, Ozkan S, Aydin K, Gücüyener K, Tezcan S, Aycan S. Prevalence of Epilepsy in Turkish Children Between the Ages of 0 and 16 Years. *Journal of Child Neurology*. 2004;19(4):271-4.
57. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):522-30.
58. Zuberi SM, Wirrell E, Yozawitz E, Wilmschurst JM, Specchio N, Riney K, et al. ILAE classification and definition of epilepsy syndromes with onset in neonates and infants: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022;63(6):1349-97.
59. Specchio N, Wirrell EC, Scheffer IE, Nabbout R, Riney K, Samia P, et al. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022;63(6):1398-442.
60. Riney K, Bogacz A, Somerville E, Hirsch E, Nabbout R, Scheffer IE, et al. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset at a variable age: position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022;63(6):1443-74.
61. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-21.
62. Balestrini S, Arzimanoglou A, Blümcke I, Scheffer IE, Wiebe S, Zelano J, et al. The aetiologies of epilepsy. *Epileptic Disord*. 2021;23(1):1-16.
63. Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain*. 2012;135(Pt 5):1348-69.
64. Vezzani A, Fujinami RS, White HS, Preux PM, Blümcke I, Sander JW, et al. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol*. 2016;131(2):211-34.
65. Bonello M, Michael BD, Solomon T. Infective Causes of Epilepsy. *Semin Neurol*. 2015;35(3):235-44.
66. Yacubian EMT, Kakooza-Mwesige A, Singh G, Carpio A, de Figueiredo NV, Lutzky Saute R, et al. Common infectious and parasitic diseases as a cause of seizures: geographic distribution and contribution to the burden of epilepsy. *Epileptic Disord*. 2022;24(6):994-1019.
67. Tumiene B, Ferreira CR, van Karnebeek CDM. 2022 Overview of Metabolic Epilepsies. *Genes (Basel)*. 2022;13(3).

68. Jang Y, Kim DW, Yang KI, Byun JI, Seo JG, No YJ, et al. Clinical Approach to Autoimmune Epilepsy. *J Clin Neurol*. 2020;16(4):519-29.
69. Uy CE, Binks S, Irani SR. Autoimmune encephalitis: clinical spectrum and management. *Pract Neurol*. 2021;21(5):412-23.
70. Varadkar S, Bien CG, Kruse CA, Jensen FE, Bauer J, Pardo CA, et al. Rasmussen's encephalitis: clinical features, pathobiology, and treatment advances. *Lancet Neurol*. 2014;13(2):195-205.
71. Hamiwka LD, Wirrell EC. Comorbidities in Pediatric Epilepsy: Beyond "Just" Treating the Seizures. *Journal of Child Neurology*. 2009;24(6):734-42.
72. Seidenberg M, Pulsipher DT, Hermann B. Association of epilepsy and comorbid conditions. *Future Neurol*. 2009;4(5):663-8.
73. Nickels KC, Zaccariello MJ, Hamiwka LD, Wirrell EC. Cognitive and neurodevelopmental comorbidities in paediatric epilepsy. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(8):465-76.
74. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010;51(6):1069-77.
75. Xue-Ping W, Hai-Jiao W, Li-Na Z, Xu D, Ling L. Risk factors for drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(30):e16402.
76. Brodie MJ, Barry SJ, Bamagous GA, Norrie JD, Kwan P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*. 2012;78(20):1548-54.
77. Chen Z, Brodie MJ, Liew D, Kwan P. Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs: A 30-Year Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurol*. 2018;75(3):279-86.
78. Verrotti A, Iapadre G, Di Francesco L, Zagaroli L, Farello G. Diet in the Treatment of Epilepsy: What We Know So Far. *Nutrients*. 2020;12(9).
79. Toffa DH, Touma L, El Mesquine T, Bouthillier A, Nguyen DK. Learnings from 30 years of reported efficacy and safety of vagus nerve stimulation (VNS) for epilepsy treatment: A critical review. *Seizure*. 2020;83:104-23.
80. Foutz TJ, Wong M. Brain stimulation treatments in epilepsy: Basic mechanisms and clinical advances. *Biomed J*. 2022;45(1):27-37.
81. Quigg M, Harden C. Minimally invasive techniques for epilepsy surgery: stereotactic radiosurgery and other technologies. *J Neurosurg*. 2014;121 Suppl:232-40.

82. Pitkanen A. Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. *Epilepsia*. 2010;51 Suppl 3(Suppl 3):2-17.
83. Trinka E, Brigo F. Antiepileptogenesis in humans: disappointing clinical evidence and ways to move forward. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(2):227-35.
84. Pawlik MJ, Miziak B, Walczak A, Konarzewska A, Chroscinska-Krawczyk M, Albrecht J, et al. Selected Molecular Targets for Antiepileptogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18).
85. Golub VM, Reddy DS. Post-Traumatic Epilepsy and Comorbidities: Advanced Models, Molecular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapeutic Interventions. *Pharmacol Rev*. 2022;74(2):387-438.
86. Dichter MA. Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch Neurol*. 2009;66(4):443-7.
87. Lewis DV, Shinnar S, Hesdorffer DC, Bagiella E, Bello JA, Chan S, et al. Hippocampal sclerosis after febrile status epilepticus: the FEBSTAT study. *Ann Neurol*. 2014;75(2):178-85.
88. Kotulska K, Kwiatkowski DJ, Curatolo P, Weschke B, Riney K, Jansen F, et al. Prevention of Epilepsy in Infants with Tuberous Sclerosis Complex in the EPISTOP Trial. *Ann Neurol*. 2021;89(2):304-14.
89. Shen YW, Wang YY, Zhang MN, Xu Y, Lu Q, He W, et al. Sirolimus treatment for tuberous sclerosis complex prior to epilepsy: Evidence from a registry-based real-world study. *Seizure*. 2022;97:23-31.
90. Shen Y, Gong Y, Ruan Y, Chen Z, Xu C. Secondary Epileptogenesis: Common to See, but Possible to Treat? *Front Neurol*. 2021;12:747372.
91. Pitkanen A, Engel J, Jr. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics*. 2014;11(2):231-41.
92. Gaydos L, Mitchell C, Notterman D, Schneper L, Brooks-Gunn J, Wagner B, et al. Demographic and developmental patterns in telomere length across adolescence. *Biodemography Soc Biol*. 2020;66(3-4):208-19.
93. Joglekar MV, Satoor SN, Wong WKM, Cheng F, Ma RCW, Hardikar AA. An Optimised Step-by-Step Protocol for Measuring Relative Telomere Length. *Methods Protoc*. 2020;3(2).
94. Martin-Ruiz CM, Baird D, Roger L, Boukamp P, Krunic D, Cawthon R, et al. Reproducibility of telomere length assessment: an international collaborative study. *Int J Epidemiol*. 2015;44(5):1673-83.
95. Holmannova D, Borsky P, Parova H, Stverakova T, Vosmik M, Hruska L, et al. Non-Genomic Hallmarks of Aging-The Review. *Int J Mol Sci*. 2023;24(20).

96. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5(2):187-95.
97. Salech F, SanMartin CD, Concha-Cerda J, Romero-Hernandez E, Ponce DP, Liabeuf G, et al. Senescence Markers in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16).
98. Tavenier J, Langkilde A, Haupt TH, Henriksen JH, Jensen FK, Petersen J, et al. Immunosenescence of the CD8⁺ T cell compartment is associated with HIV-infection, but only weakly reflects age-related processes of adipose tissue, metabolism, and muscle in antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients and controls. *BMC Immunology*. 2015;16(1):72.
99. Martinez-Zamudio RI, Dewald HK, Vasilopoulos T, Gittens-Williams L, Fitzgerald-Bocarsly P, Herbig U. Senescence-associated beta-galactosidase reveals the abundance of senescent CD8⁺ T cells in aging humans. *Aging Cell*. 2021;20(5):e13344.
100. Steriade C, Titulaer MJ, Vezzani A, Sander JW, Thijs RD. The association between systemic autoimmune disorders and epilepsy and its clinical implications. *Brain*. 2021;144(2):372-90.
101. Schneider CV, Schneider KM, Teumer A, Rudolph KL, Hartmann D, Rader DJ, et al. Association of Telomere Length With Risk of Disease and Mortality. *JAMA Intern Med*. 2022;182(3):291-300.
102. Topiwala A, Nichols TE, Williams LZJ, Robinson EC, Alfaro-Almagro F, Taschler B, et al. Telomere length and brain imaging phenotypes in UK Biobank. *PLoS One*. 2023;18(3):e0282363.
103. Giaccherini M, Macaudo A, Sgherza N, Sainz J, Gemignani F, Maldonado JMS, et al. Genetic polymorphisms associated with telomere length and risk of developing myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J*. 2020;10(8):89.
104. Protsenko E, Rehkopf D, Prather AA, Epel E, Lin J. Are long telomeres better than short? Relative contributions of genetically predicted telomere length to neoplastic and non-neoplastic disease risk and population health burden. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240185.
105. Katayama Y, Kohriyama K. Telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells of systemic connective tissue diseases. *J Rheumatol*. 2001;28(2):288-91.
106. Tichon A, Gowda BK, Slavin S, Gazit A, Priel E. Telomerase activity and expression in adult human mesenchymal stem cells derived from amyotrophic lateral sclerosis individuals. *Cytotherapy*. 2009;11(7):837-48.

107. Victorelli S, Passos JF. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine*. 2017;21:14-20.
108. Sidorov I, Kimura M, Yashin A, Aviv A. Leukocyte telomere dynamics and human hematopoietic stem cell kinetics during somatic growth. *Exp Hematol*. 2009;37(4):514-24.
109. Kume K, Kikukawa M, Hanyu H, Takata Y, Umahara T, Sakurai H, et al. Telomere length shortening in patients with dementia with Lewy bodies. *Eur J Neurol*. 2012;19(6):905-10.
110. Xia K, Zhang L, Zhang G, Wang Y, Huang T, Fan D. Leukocyte telomere length and amyotrophic lateral sclerosis: a Mendelian randomization study. *Orphanet J Rare Dis*. 2021;16(1):508.
111. De Felice B, Annunziata A, Fiorentino G, Manfellotto F, D'Alessandro R, Marino R, et al. Telomerase expression in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *J Hum Genet*. 2014;59(10):555-61.
112. Linkus B, Wiesner D, Messner M, Karabatsiakakis A, Scheffold A, Rudolph KL, et al. Telomere shortening leads to earlier age of onset in ALS mice. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(2):382-93.
113. Roberts RO, Boardman LA, Cha RH, Pankratz VS, Johnson RA, Druliner BR, et al. Short and long telomeres increase risk of amnesic mild cognitive impairment. *Mech Ageing Dev*. 2014;141-142:64-9.
114. Casillas-Espinosa PM, Anderson A, Harutyunyan A, Li C, Lee J, Braine EL, et al. Disease-modifying effects of sodium selenate in a model of drug-resistant, temporal lobe epilepsy. *Elife*. 2023;12.
115. Luo X, Ruan Z, Liu L. Causal relationship between telomere length and epilepsy: A bidirectional Mendelian randomization study. *Epilepsia Open*. 2023;8(4):1432-9.
116. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7475-84.
117. Buj R, Leon KE, Anguelov MA, Aird KM. Suppression of p16 alleviates the senescence-associated secretory phenotype. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(3):3290-312.
118. Aliouat-Denis CM, Dendouga N, Van den Wyngaert I, Goehlmann H, Steller U, van de Weyer I, et al. p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res*. 2005;3(11):627-34.
119. Wan R, Srikaram P, Guntupalli V, Hu C, Chen Q, Gao P. Cellular senescence in asthma: from pathogenesis to therapeutic challenges. *EBioMedicine*. 2023;94:104717.

120. Tyciakova S, Valova V, Svitkova B, Matuskova M. Overexpression of TNF α induces senescence, autophagy and mitochondrial dysfunctions in melanoma cells. *BMC Cancer*. 2021;21(1):507.
121. Li P, Gan Y, Xu Y, Song L, Wang L, Ouyang B, et al. The inflammatory cytokine TNF- α promotes the premature senescence of rat nucleus pulposus cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *Scientific Reports*. 2017;7(1):42938.
122. de Vries EE, van den Munckhof B, Braun KPJ, van Royen-Kerkhof A, de Jager W, Jansen FE. Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2016;63:177-90.
123. Theilhaber J, Rakhade SN, Sudhalter J, Kothari N, Klein P, Pollard J, et al. Gene expression profiling of a hypoxic seizure model of epilepsy suggests a role for mTOR and Wnt signaling in epileptogenesis. *PLoS One*. 2013;8(9):e74428.
124. Song Y, Pimentel C, Walters K, Boller L, Ghiasvand S, Liu J, et al. Neuroprotective levels of IGF-1 exacerbate epileptogenesis after brain injury. *Sci Rep*. 2016;6:32095.
125. Wu L, Qin Y, Yuan H, Zhu Y, Hu A. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of insulin-like growth factor-1 overexpression in pentylenetetrazole (PTZ)-induced mouse model of chronic epilepsy. *Brain Res*. 2022;1785:147881.
126. Miltiadous P, Stamatakis A, Koutsoudaki PN, Tiniakos DG, Stylianopoulou F. IGF-I ameliorates hippocampal neurodegeneration and protects against cognitive deficits in an animal model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*. 2011;231(2):223-35.
127. Kacinski M, Budziszewska B, Lason W, Zajac A, Skowronek-Bala B, Leskiewicz M, et al. Level of S100B protein, neuron specific enolase, orexin A, adiponectin and insulin-like growth factor in serum of pediatric patients suffering from sleep disorders with or without epilepsy. *Pharmacol Rep*. 2012;64(6):1427-33.
128. Dikkes P, D BJ, Guo WH, Chao C, Hemond P, Yoon K, et al. IGF2 knockout mice are resistant to kainic acid-induced seizures and neurodegeneration. *Brain Res*. 2007;1175:85-95.
129. Handayaningsih AE, Takahashi M, Fukuoka H, Iguchi G, Nishizawa H, Yamamoto M, et al. IGF-I enhances cellular senescence via the reactive oxygen species-p53 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(2):478-84.
130. Zhao LD, Bie LY, Hu L, Zhu ZH, Meng XH, Cong LL, et al. IGF-1 induces cellular senescence in rat articular chondrocytes via Akt pathway activation. *Exp Ther Med*. 2020;20(5):49.
131. Ashraf S, Cha BH, Kim JS, Ahn J, Han I, Park H, et al. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(2):196-205.

132. Kar S, Seto D, Dore S, Chabot JG, Quirion R. Systemic administration of kainic acid induces selective time dependent decrease in [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II and [125I]insulin receptor binding sites in adult rat hippocampal formation. *Neuroscience*. 1997;80(4):1041-55.
133. Ballester-Rosado CJ, Le JT, Lam TT, Mohila CA, Lam S, Anderson AE, et al. A Role for Insulin-like Growth Factor 1 in the Generation of Epileptic Spasms in a murine model. *Ann Neurol*. 2022;92(1):45-60.
134. Navarrete-Modesto V, Orozco-Suárez S, Feria-Romero IA, Rocha L. The molecular hallmarks of epigenetic effects mediated by antiepileptic drugs. *Epilepsy Res*. 2019;149:53-65.
135. Beghi E, Shorvon S. Antiepileptic drugs and the immune system. *Epilepsia*. 2011;52 Suppl 3:40-4.
136. Rhinn M, Zapata-Bodalo I, Klein A, Plassat JL, Knauer-Meyer T, Keyes WM. Aberrant induction of p19Arf-mediated cellular senescence contributes to neurodevelopmental defects. *PLoS Biol*. 2022;20(6):e3001664.
137. Coughlan MT, Ziemann M, Laskowski A, Woodruff TM, Tan SM. Valproic acid attenuates cellular senescence in diabetic kidney disease through the inhibition of complement C5a receptors. *Scientific Reports*. 2022;12(1):20278.

8. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-66

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 04 OCAK 2022 SALI
Toplantı No : 2022/01
Proje No : GO 22/44 (Değerlendirme Tarihi: 04.01.2022)
Karar No : 2022/01-45

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Dilek YALNIZOĞLU'nun sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA, Bihter MURATOĞLU, Dr. Öğr. Gör. Cansu Özdemir SAKA ile birlikte çalışacakları ve Dr. Öğr. Gör. Ceren GÜNBEY'in doktora tezi olan, GO 22/44 kayıt numaralı "*Pediyatrik Epilepside Erken Senesens Biyobelirteçlerinin Değerlendirilmesi, Gelişimsel ve Bilişsel Fonksiyonlar Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 05 Ocak 2022 – 05 Ocak 2024 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. G. Burçay AYDIN	(Başkan)	8. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(Üye)
2. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	9. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM	(Üye)
3. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	10. Doç. Dr. Merve BATUK	(Üye)
4. Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN	(Üye)	11. Doç. Dr. Gülten KOÇ	(Üye)
5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)	12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
6. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYRAK	(Üye)	13. Av. Buket ÇINAR	(Üye)
7. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK	(Üye)		

EK-2. Turnitin Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Ceren Günbey
Ödev başlığı:	Quick Submit
Gönderi Başlığı:	Çocukluk Çağı Epilepsi Hastalarında Erken Senesens Biyobel...
Dosya adı:	LERI_VE_KOMORBI_D_BI_LI_S_SEL_ETKI_LENME_I_LE_I_LI_S_KI...
Dosya boyutu:	2.25M
Sayfa sayısı:	42
Kelime sayısı:	9,125
Karakter sayısı:	65,287
Gönderim Tarihi:	05-Tem-2024 02:28ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2412782190



EK 3. Turnitin Raporu

Çocukluk Çağı Epilepsi Hastalarında Erken Senesens Biyobelirteçleri ve Komorbid Bilişsel Etkilenme İle İlişkisi

ORIJİNALLIK RAPORU

%**5**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	books.akademisyen.net İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<% 1

repositorio.ufmg.br

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyad : Ceren Günbey
Doğum Tarihi :
Doğum Yeri :
Adres :
Cep telefonu :
E-posta :

LİSANS VE LİSANSÜSTÜ EĞİTİM

2002-2008

2009-2013

2014-2017

HİZMET

2017-2019

2019-HALEN

YAYINLAR (SON BİR YIL)