



Absans Epilepsisi ile Temporal Lob Epilepsisi Arasındaki Karşılıklı Etkileşimde Substansiya Nigra'nın Rolü

Proje No: 111S209

Prof.Dr. Filiz ONAT
Doç.Dr. Serap Şirvancı
Uz.Dr.Medine İ. Gülçebi
Uz.Dr.Dilek Akakın
Dr.Özlem Akman
Ecz.Dr.Nihan Çarçak

EKİM 2013
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Epilepsi santral sinir sisteminde, kortikal veya subkortikal bölgelerdeki nöron gruplarının ani, anormal ve hipersenkron deşarjları sonucu ortaya çıkan, gelip geçici ve genellikle tekrarlayıcı nitelikte nöbetlerle karakterize klinik bir tablodur. Absans epilepsisi veya temporal lob (limbik) epilepsisi gibi farklı alttipleri vardır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar absans epilepsisi ile temporal lob epilepsisi arasında karşılıklı zıt yönde bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu projede absans epilepsisi ile temporal lob epilepsisi arasındaki zıt yönlü etkileşimde substansiya nigra bölgesinin rolünü ortaya koymayı amaçladık. Bu amaçla gerçekleştirilen proje TÜBİTAK tarafından desteklenerek hayata geçirilmiştir. Bu nedenle TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

İçindekiler

1.Giriş ve Literatür Özeti.....	1-8
1.1.Epilepsi	1-3
1.1.1.Absans Epilepsi.....	1
1.1.2 Temporal Lob Epilepsisi (Limbik Epilepsi)	2-3
1.2. Deneysel Epilepsi Modelleri	3-5
1.2.1. Genetik Absans Epilepsi Modeli	3-4
1.2.2. <i>Kindling</i>	4-5
1.3. Absans Epilepsinin Limbik Sistem ve Temporal Lob Epilepsisi ile Etkileşimi.....	5-7
1.4. Epilepsi ve Substansiya Nigra.....	7-8
2.Gereç ve Yöntem	9-17
3. Bulgular	18-37
3.1.GAERS’lerde SNR _{anterior} ve SNR _{posterior} bölgelerinin geçici olarak baskılanmasının <i>kindling</i> sürecine olan etkisinin değerlendirilmesi.....	18-20
3.2.GAERS ve Wistar sıçanlarda SNR _{posterior} bölgesinde dopaminerjik nöronların tirozin hidroksilaz immünohistokimyasal yöntemi ile değerlendirilmesi	20-22
3.3.GAERS ve Wistar sıçanlarda SNR _{anterior} ve SNR _{posterior} bölgelerinde GABAerjik aktivitenin GAD67 immünohistokimyasal yöntemi ile değerlendirilmesi	22-26
3.4.GAERS ve Wistar sıçanlarda SNR _{anterior} ve SNR _{posterior} bölgelerinde GABAerjik nöronların GABA immün-altın immünohistokimyası ve elektron mikroskopisi ile değerlendirilmesi.....	27-37
4.Tartışma ve Sonuç	38-41
5.Referanslar.....	42-49
6.Proje özet bilgi formu.....	50
7.ARDEB başarı öyküsü.....	51

Tablo ve Şekil Listesi

Resimler

1. Resim 1a.	13
2. Resim 1b.	14
3. Resim 2.	17
4. Resim 3.	18
5. Resim 4.	23
6. Resim 5.	26
7. Resim 6.	26
8. Resim 7.	28
9. Resim 8.	29
10. Resim 9.	30
11. Resim 10.	31
12. Resim 11.	32
13. Resim 12.	33
14. Resim 13.	34
15. Resim 14.	35
16. Resim 15.	36
17. Resim 16.	36

Şekiller

1. Şekil 1.	11
2. Şekil 2.	19
3. Şekil 3.	20
4. Şekil 4.	21
5. Şekil 5.	21
6. Şekil 6.	22
7. Şekil 7.	24
8. Şekil 8.	25
9. Şekil 9.	31
10. Şekil 10.	37
11. Şekil 11.	37

Özet

Strazburg kökenli genetik absans epilepsili sıçanlar (GAERS), temporal lob epilepsi modeli olan *kindling* ile tetiklenen evre 3-5 nöbetlerin gelişmesine direnç gösterirler. Bu çalışmanın amacı; (1) yetişkin GAERS'lerde temporal lob epilepsisine karşı olan direnç ile ilişkili olabilecek substansiya nigra pars reticulata anterior ($SNR_{anterior}$) ve posterior ($SNR_{posterior}$) bölgesinin rolünü ortaya koymak, (2) kontrol veya uyarı alan GAERS ve Wistar sıçanlar arasında SNR'de *kindling* direnciyle ilişkili olabilecek dopaminerjik ve GABAerjik nöronlardaki tirozin hidroksilaz (TH) ve GAD immünreaktivitelerinde farklılık olup olmadığını göstermek, ve (3) GABAerjik sinir terminallerindeki GABA yoğunluğunu elektron mikroskopik düzeyde incelemektir. Çalışmanın ilk bölümünde hayvanlar evre 5 nöbete veya maksimum 22 uyarıya ulaşıncaya kadar, $SNR_{anterior}$ veya $SNR_{posterior}$ bölgesine bilateral olarak, her *kindling* uyarısından önce lidokain veya serum fizyolojik verildi. İkinci bölümde, kontrol veya *kindling* uyarısı alan GAERS ve Wistar sıçanlarda avidin biotin horse-radish peroksidaz yöntemi ile TH veya GAD67 immünreaktivitesi belirlendi. Üçüncü bölümde, kontrol veya *kindling* uyarısı alan GAERS ve Wistar'larda, GABA immünreaktivitesi ince-yapısal düzeyde immün-altın yöntemiyle incelendi. $SNR_{posterior}$ bölgesine uyarı öncesinde lidokain verilen tüm GAERS'ler tekrarlayan *kindling* uyarıları sonrasında evre 5 nöbete ulaştılar. Buna karşın, $SNR_{anterior}$ bölgesine lidokain enjeksiyonu yapılan GAERS'ler tekrarlayan *kindling* uyarıları ile evre 3-5 nöbete ulaşamayıp, evre 2'de kaldılar. GAERS ve Wistar gruplarında, uygulanan *kindling* uyarıları ile $SNR_{posterior}$ bölgesindeki TH immünreaktivitesinde artış görüldü. *Kindling* uyarısı alan Wistar hayvanların $SNR_{posterior}$ bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesinde artış olduğu halde, uyarı alan GAERS'lerde aynı bölgede azalma izlendi. İnce-yapısal düzeyde sinir terminallerindeki GABA yoğunluğu açısından gruplar arasında fark görülmedi. Bu çalışmanın sonuçları GAERS'lerdeki *kindling* direnci açısından SNR'nin önemli bir bölge olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelime: epilepsi, genetik absans epilepsili sıçan (GAERS), nöbet, *kindling*, SNR, amigdala

Abstract

Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) show a failure to develop stage 3-5 seizures evoked by kindling, which serves as a model of temporal lobe epilepsy. The focus of the proposed project was (1) to define the role of the discrete substantia nigra pars reticulata anterior (SNR_{anterior}) and posterior (SNR_{posterior}) regions in mediating the resistance to temporal lobe epilepsy in adult GAERS, (2) to examine whether there is a difference, that may be related to resistance to *kindling*, in the tyrosine hydroxylase (TH) and GAD immunoreactivities (-ir) in dopaminergic and GABAergic neurons of SNRs between control or stimulated-GAERS and Wistar rats, and (3) to investigate GABA density in the GABAergic nerve terminals at the electron microscopic level. In the first part of the study, lidocaine or saline was given into SNR_{anterior} or SNR_{posterior} before each *kindling* stimulation until the animals reached stage 5 or the maximum number of 22 stimulations. In the second part, the immunoreactivity of TH or GAD67 was detected by avidin-biotin horse-radish peroxidase method in control or stimulated-GAERS and Wistar rats. In the third part, GABA-ir was investigated by immunogold method at the ultrastructural level in control or stimulated-GAERS and Wistar rats. All GAERS pretreated with lidocaine injections into the SNR_{posterior} reached stage 5 after repeated *kindling* stimulations, whereas of the animals pretreated with lidocaine into the SNR_{anterior} all failed to reach stages 3-5 and stayed at stage 2. *Kindling* stimulation increased TH-ir in the SNR_{posterior} of GAERS and Wistar groups. Although GAD67-ir increased in the SNR_{anterior} of Wistar stimulated rats, it was lower for GAERS after stimulation. There was no difference in GABA density in nerve terminals between groups at the ultrastructural level. The results of the present study suggest that the SNR is an important site of the kindling resistance in GAERS.

Key words: epilepsy, genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS), seizure, kindling, SNR, amygdala

1.Giriş ve Literatür Özeti

1.1.Epilepsi

Epilepsi santral sinir sisteminde, kortikal veya subkortikal bölgelerdeki nöron gruplarının ani, anormal ve hipersenkron deşarjları sonucu ortaya çıkan, gelip geçici ve genellikle tekrarlayıcı nitelikte nöbetlerle karakterize klinik bir tablodur (Fisher vd., 2005). Epileptik nöbet motor, duysal, duygusal, bilişsel, otonom; sıklıkla pozitif (fokal ve/veya jeneralize kasılmalar ve halüsinasyonlar gibi) bazen de negatif (çevreyle olan ilişkinin kesilmesi) belirtilerle ortaya çıkan bir semptomdur. Anormal epileptik deşarjın kaynaklandığı nöronlar, yayıldığı anatomik yollar veya bölgeler nöbetin klinik görünümünü belirler (Engel, 1989).

Uluslararası Epilepsi Ligi'nin (ILAE) sınıflandırma komisyonunun 1989 yılında yaptığı sınıflamaya göre epilepsiler, jeneralize, lokalizasyon ile ilişkili-parsiyel, tanımlanamayan epilepsiler ve özel sendromlar olarak dört gruba ayrılmıştır (ILAE Commission report, 1989). Bu gruplar da kendi içlerinde idiyopatik, semptomatik ve kriptojenik olmak üzere ayrılmışlardır. Primer ya da idiyopatik epilepsiler ve epileptik sendromlar, başka bir nörolojik bozukluğa bağlı olmadan ortaya çıkan, gelişimin normal olduğu, altta yatan herhangi bir patolojinin düşünülmediği, nöbetlerin göreceli olarak sınırlı olduğu ve tedaviye yanıt verdiği, elektroensefalogramda (EEG) interiktal ve temel aktivitenin normal olduğu nöbetlerdir. Bu nöbetler genellikle ailevidir. Semptomatik epilepsiler ve epileptik sendromlar altta yatan serebral bir hastalıkla ilişkilidir ve gelişme geriliği gibi nörolojik fonksiyonlarda bozukluklar vardır. EEG'de temel aktivite normal değildir, yavaşlamalar izlenir. Tedaviye yanıt çok değişkendir, kendiliğinden geçme olasılığı çok azdır. Bu grubun etiyolojisinde konjenital bozukluklar, kafa travmaları, enfeksiyonlar, kitle lezyonları, metabolik bozukluklar, toksik durumlar, vasküler lezyonlar, sistemik hastalıklar, dejeneratif ve demiyelinize hastalıklar gibi pek çok neden sayılabilir. Kriptojenik epilepsiler ise, bir nedeni olması gerektiği düşünülen ancak bu nedenin henüz bulunamadığı, elektroklinik özellikleri iyi tanımlanamamış olan epilepsilerdir (Dreifuss, 1990).

Günümüzde epilepsi tedavisi, olası yapısal bozukluğun değil ancak belirtilerin ortadan kaldırılması, yani nöbetlerin önlenmesi ile sınırlı kalmaktadır. Çeşitli antiepileptik ilaçlara rağmen epilepsi hastalarının %30'u tedaviye yanıt vermemekte ve yeterli derecede nöbet kontrolü sağlanamamaktadır.

1.1.1.Absans Epilepsi

Absans epilepsisi primer idiyopatik jeneralize epilepsiler içinde yer alır. Çocukluk çağı absans epilepsi, juvenil absans epilepsi, juvenil miyoklonik absans epilepsi ve absans nöbetlerle birlikte izlenen gözkapağı miyoklonisi olmak üzere farklı alt grupları vardır. Absans

epilepsi genellikle çocukluk çağında veya erken adolesan dönemde başlayan, bilinç kaybıyla beraber seyreden jeneralize konvulsif olmayan nöbetlerle karakterize bir epilepsi tipidir. Absans nöbetleri, genellikle 10 saniyeden daha kısa sürer ve bir gün içinde çok sayıda tekrarlayabilir. Nöbet aniden başlar ve aynı şekilde aniden sona erer, kişi aktivitesine bıraktığı yerden devam eder (Engel, 1989). Absans nöbetin EEG’de izlenen karakteristik özelliği saniyede 3 kez gerçekleşen (3 Hz) jeneralize diken-ve-yavaş dalga deşarjlarıdır (DDD). İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalar absans nöbetlere ait DDD'lere talamusun ve neokorteksin birlikte katıldığını göstermiştir (Gloor ve Fariello, 1988; Meeren vd., 2005). Absans nöbetlerinin farmakoterapisi de kendine özgüdür, diğer nöbet formlarının çoğunda etkisiz olan etosüksimid ve valproat tarafından baskılanır. Ayrıca konvulsif ve parsiyel nöbetlerde etkili olan karbamazepin, fenitoin ve bazı diğer anitepileptik ilaçlar, ya nöbetlere etkisizdir ya da nöbetleri kötüleştirir (Goren ve Onat, 2007).

1.1.2 Temporal Lob Epilepsisi (Limbik Epilepsi)

Temporal lob epilepsisi, en yaygın ve ilaç tedavisine dirençli olan lokalizasyonla ilişkili-fokal epilepsi türüdür. Epilepsi odağı çoğunlukla limbik yapılarda (hipokampusta, amigdalada, limbik kortekste) bulunmaktadır ve nöbetler, basit ve kompleks parsiyel olup davranışsal olarak hareketsizlik ve orolimenter otomatizmlerle karakterizedirler (Engel, 1996).

Epileptik aktivite sekonder jeneralize olduğu zaman odağın dışına çıkıp bütün beyine yayılmakta ve bu da davranışsal olarak kendini jeneralize tonik-klonik nöbetlerle göstermektedir. Etiyolojisi heterojenik olmakla birlikte temporal lob epilepsisi hastalarının hikâyesinde çoğu zaman uzun febril nöbetler veya *status epileptikus* yer almaktadır. Genellikle bir beyin hasarından (travma, beyin tümörü, inme, febril nöbetler, *status epileptikus* v.b.) sonra, süresi hastadan hastaya değişen (en az birkaç hafta, ama genellikle birkaç yıl) bir latent (sessiz) dönemi takiben temporal lob epilepsisi nöbetleri gelişmektedir. Bu latent dönem, epileptogenezin altında yatan patofizyolojik olayları kapsamaktadır (van Landingham vd., 1998; Cavazos vd., 1991). Temporal lob epilepsisi olgularının % 25'i antiepileptik ilaçlara dirençli olup cerrahi olarak temporal lobektomiyle (hipokampus, amigdala ve temporal neokorteksin çıkarılması) tedavi edilebilmektedir (Engel, 1992). Cerrahi ameliyat sonrası bile hastaların bir kısmında tekrar nöbetler görülebilmektedir (Özkara vd., 2008). Temporal lob epilepsisi hastalarının ameliyatla çıkarılan beyin dokularında hipokampal skleroz en sık rastlanılan patolojidir. Ayrıca kortikal displaziler, gelişimsel tümörler ve vasküler lezyonlar da görülebilir. Hipokampal skleroz, nöron kaybı, hipokampal gliosis, dentat girusta *mossy* liflerinin filizlenmesi ve reorganizasyonu ve granül hücrelerinin dispersiyonu ile karakterize bir patolojidir (Sutula vd., 1989; Houser vd., 1990;

Engel, 1992). Nörofizyolojik çalışmalarda, granül hücrelerinde ve hipokampal piramidal nöronlarda hücrel hipereksitabilite olduğu ve sadece bazı koşullarda inhibitör mekanizmaların bozulduğu gösterilmiştir (Schwartzkroin, 1986; Masukawa vd., 1989). Ayrıca, bu araştırmacılar tarafından, granül hücrelerindeki hipereksitabilitenin derecesi ve mossy lifleri yolağının sinaptik reorganizasyonunun derecesi arasında korelasyon olduğu da bildirmiştir. Böylece bu çalışmalar, temporal lob epilepsisi hastalarında nörofizyolojik bulguların, nöropatolojik değişikliklerle yakın ilişki içerisinde olduğunu desteklemektedir. Limbik yolakların sinaptik reorganizasyonu, parsiyel başlangıçlı nöbetlerin ortaya çıkması için gerekli bir önkoşul olmasa da, temporal lob epilepsisinin ilaç tedavisine gösterdiği direncin altında yatan hücrel mekanizmalardan biri olabilir (Cavazos ve Cross, 2006). Bütün bu soruları araştırmak için temporal lob epilepsisinin modelleri kullanılmaktadır.

1.2. Deneysel Epilepsi Modelleri

Epilepsi hastalığının altında yatan mekanizmaların açıklanması, yeni antiepileptiklerin test edilmesi, uygun diagnostik yaklaşımların ve tedavi modalitelerinin geliştirilmesi ya da epilepsinin yol açtığı sorunların giderilmesi amacıyla yeni yaklaşımların ortaya konmasında çeşitli deneysel modeller kullanılmaktadır. Tüm epilepsi tipleri için olmasa da, çok sayıda ve çeşitli deneysel epilepsi modeli bulunmaktadır. Kullanılan deneysel modeller, insandakine benzer şekilde, jeneralize ve parsiyel nöbet modelleri olarak sınıflandırılabilirler. Bu modeller, kısa süreli ve tek uyararla tetiklenen nöbetleri kapsayan akut nöbet (iktogene) modelleri ya da belli bir süreci kapsayan, örneğin *status epileptikus*un tetiklenmesi ile gelişen kronik epilepsi yani epileptogene modelleri şeklinde olabilir. Akut modeller, sistemik veya topikal olarak konvülsan maddelerin uygulanmasıyla ya da elektrik stimülasyonu veya metabolik değişiklikler sonucunda ortaya çıkan geçici epileptiform aktiviteleri içerir. Kronik modeller ise genellikle yapısal lezyonlar veya tekrarlayan elektrik stimülasyonları ile oluşturulurlar ya da spontan genetik epilepsi modellerini içerirler. Spontan nöbetlerin izlendiği epilepsi modellerinin, epilepsiye yol açan tetikleyici olayı takiben birçok genin aktive olduğu, akut ve gecikmiş nöronal hasarla beraber, plastisitenin gerçekleştiği bir sürece olanak tanınması nedeniyle, insanda görülen olayları iyi taklit ettikleri kabul edilir.

1.2.1. Genetik Absans Epilepsi Modeli

Absans tipi konvülsif olmayan nöbet kriterlerini taşıyan ve en çok kullanılan deneysel modeller arasında, spontan DDD'li genetik hayvan modelleri olan GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) ve WAG-Rij (Wistar albino Glaxo-Rijswijk) suşu sıçanlar vardır (Danover vd., 1998; Depaulis vd., 1989; van Luijckelaar ve Coenen, 1986; van Luijckelaar vd., 1991, 2002; Vergnes vd., 1982, 1987, 1990). GAERS'ler, kortikal EEG kayıtlarında

spontan, bilateral ve senkron DDD'ler gösteren Wistar sıçanlarının *inbred* üretilmesi ile elde edilmiş bir suştur. Bu hayvan modelleri insanda görülen tipik absans epilepsi nöbetleri ile elektrofizyolojik, farmakolojik ve bir çok klinik özellikler bakımından benzerdir (Depaulis ve van Luijtelaar, 2006). GAERS ve WAG/Rij sıçanların DDD'ler ile karakterize olan periyodik absans epilepsi nöbetleri dışında herhangi nörolojik defisitleri bulunmamaktadır.

Bu DDD'ler sırasında sıçanlar, aynen insanlarda izlenen absans epilepsisinde olduğu gibi sürdürdükleri aktiviteyi birden keserek hareketsiz kalmakta ve deşarjlar bitince aktivitelerini kaldıkları yerden devam ettirmektedirler. Nöbetler çoğunlukla hayvanlar sakinken ortaya çıkmakta, güçlü bir uyaran olduğunda, hareket ve dikkat gerektiren davranış deneyleri sırasında ya da hayvan ajite olduğunda izlenmemektedir (Marescaux vd., 1992). Uyku ile beraber DDD'ler azalmakta ve kaybolmaktadır (Lannes vd., 1988). *Inbred* üretilme elde edilen bütün yetişkin GAERS'lerin kortikal EEG'lerinde sıklığı $8\pm0,5$ Hz (6-10 Hz arası), şiddeti 300 ile 1000 μ V arası değişen, temel aktivitenin 3-10 katı kadar ve ortalama süresi 17 ± 10 saniye (0,5-75 saniye arası) olan DDD'leri oluşmaktadır. Bir dakika içerisinde izlenen toplam ortalama deşarj sayısı 1,3 ve ortalama toplam deşarj süresi ise 25 ± 8 saniye/dakikadır (Marescaux vd., 1992; Vergnes vd., 1982).

İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalar absans nöbetlere ait DDD'lere talamusun ve neokorteksin birlikte katıldığını göstermiştir (Gloor ve Fariello, 1988; Meeren vd., 2005).

1.2.2. Kindling

Kindling, düşük şiddetteki elektriksel ya da kimyasal uyarıların düzenli olarak tekrarlanmasıyla tetiklenen nöbetlerle karakterize epileptogenez sürecidir ve yaygın olarak sekonder jeneralize temporal lob epilepsisi modeli olarak kabul edilmektedir (Bertram, 2009; McIntyre vd., 2002). Merkezi sinir sisteminin özellikle limbik bölgeler gibi subkortikal yapılarına ard-deşarj oluşturacak eşiğe eşdeğer şiddetteki elektriksel ya da kimyasal uygulamalarla oluşturulan fokal nöbetlerin davranışsal süresinde ve EEG paterni olan ard-deşarj sürelerinde uygulamaların tekrarına bağlı olarak artış gözlenir ve sonunda konvulsif motor yanıtlar tetiklenir ve aynı uyarıya daha şiddetli ve uzun süren epileptik yanıt gelişmektedir (Goddard, 1967, 1969; McIntyre vd., 2002). Elektriksel *kindling*'in başlangıçta uyarının özelliklerini kuantifiye etme, lokalizasyonu belirleme ve kronik epileptogenez gelişimini, nöbet yayılımı ve jeneralizasyonu rahatlıkla izleyebilme gibi avantajları bulunduğu için kimyasal *kindling* modeline göre daha yaygın kullanıma sahiptir (Bertram, 2007). Elektriksel *kindling*, beynin değişik bölgelerine yerleştirilen elektrotlar aracılığıyla ard-deşarj eşiği ya da eşik üstü uyarıların tekrarlanmasıyla gerçekleştirilmektedir. Uyarıların tekrarıyla birlikte başlangıçta gözlenen kısa fokal ard-deşarjın süresinde, amplitüdünde ve

diken frekansında artış ve diken morfolojisinde değişiklikler gözlenir (Racine, 1972a; Morimoto vd., 2004). Tekrarlayan uyarılar interiktal deşarjların ortaya çıkmasına yol açarken davranışsal nöbetlerin ilerlemesine yol açar. *Kindling* uyarıları sonucunda gelişen davranış yanıtları Racine'in skalasına göre değerlendirilmektedir (Racine, 1972b). *Kindling* sürecinin erken dönemlerinde sıçanlarda donakalma (0. evre), yüz otomatizmleri (1. evre), kafa sallama hareketi (2. evre) izlenmekte, daha sonra tekrarlayan uyarılarla nöbet yanıtlarının limbik yapıların dışına yayılması sonucunda önce ünilateral klonik nöbetler (3. evre), sonra jeneralize olması ile birlikte bilateral klonik nöbetler ve şaha kalkma (4. evre) ve bunlara ilave olarak denge kaybı ile karakterize konvülsif nöbetler (5. evre) görülmektedir. Üst üste birkaç kez 5. evre nöbet geçiren hayvan *kindled* olmuş kabul edilmektedir. Bu etki uzun süreli olup birkaç ay hatta 1 yıl aradan sonra yapılacak uyarı sonrasında 5. evre nöbet ortaya çıkar (Wada vd., 1974). Uyarıları sayılarının artması nörogenez, aksonal filizlenme, sinaptogenez ve astrogliozise ve tüm geç süreçlerde eksitator ve inhibitör sistemlerin yeniden biçimlenmesine ve nöronal iletimde anormal paterne yol açmaktadır.

Kindling yapılan bölgeden, fokal nöbetin jeneralize olarak neokortekse yayılmasına dair yapılan çalışmalar 2 hipotez üzerinde durmaktadır. Bunlardan bir tanesi peririnal korteks ve bu komşu bölgeler aracılığı yayılımın gerçekleştiğini öne sürerken diğer hipotez jeneralizasyonun hem limbik hemde neokortekse karşılıklı bağlantılara sahip olan talamusun ortahat çekirdekleri aracılığı ile olabileceğini öne sürmektedir (McIntyre vd., 2002; Bertram, 2007).

1.3. Absans Epilepsinin Limbik Sistem ve Temporal Lob Epilepsisi ile Etkileşimi

Konvülsif olayların altında yatan mekanizmaların absans nöbetlerden farklı olduğu düşünülmektedir. Tipik absans epilepside inhibitör aktivitelerin baskın olduğu düşünülürken, jeneralize ve fokal nöbetlerde eksitator aktivitenin aşırılığı söz konusudur. Bu durum nöbetlerin tedavisinde farklı ilaçların kullanılması ile de desteklenmektedir. Karbamazepin, okskarbazepin ve fenitoin gibi parsiyel ve sekonder jeneralize nöbetlerin tedavisinde yıllardır başarıyla kullanılan ilaçların, absans nöbetleri kötüleştirdikleri bilinmektedir. Tersine, absans epilepsi kullanılan etosüksimid ve trimetadion gibi ilaçlar parsiyel jeneralize nöbetlerin tedavisinde etkisizdir. Birbirine zıt yönde hareket eden bu iki nöbet tipinin birlikte aynı hastada bulunması çok nadirdir (Koutroumanidis vd., 1999; Nicholson vd., 2004).

Absans nöbetlerin kortikal ve talamik bölgeler arasındaki nöronal şebeke tarafından oluşturulduğu, amigdala ve hipokampus gibi limbik yapıların ise DDD'ler sırasında sessiz oldukları, hem insanlarda hem de hayvan modellerinde DDD'lerin ortaya çıkmasına katkıda bulunmadıkları düşünülmektedir. Ancak, son yıllarda tipik absans epilepsisinin deneysel modellerinde yapılan çalışmaların bulguları, absans epilepsisi ile limbik yapıların önemli bir

bağlantısı olabileceğini vurgulamaktadırlar. Absans epilepsi modellerinde limbik yapıların da fonksiyonlarında değişiklik olduğu gösterilmiştir. Nehlig vd. (1992, 1998), yavru ve erişkin GAERS sıçanlarda hipokampusu da içine alan limbik yapılarda enerji metabolizmasının ve metabolik aktivitenin arttığını göstermiştir. Ayrıca, hipokampusda mikrodializ yöntemi ile ölçülen bazal ekstraselüler glutamat düzeylerinin GAERS’lerde epileptik olmayan kontrol sıçanlara göre anlamlı şekilde artmış olduğu gösterilmiştir (Richards vd., 2000). Grubumuz tarafından elektron mikroskopisi düzeyinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda da hipokampusun CA3 bölgesinde mossy lif terminallerinde glutamat dansitesinin GAERS’lerde anlamlı şekilde artmış olduğu, dentat alan hılar bölgede ise azalmış olduğu gösterilmiştir (Şirvancı vd., 2003, 2005). WAG/Rij sıçanlarda yapılan bir diğer çalışmada, tiagabin gibi GABA-mimetik ajanların hipokampusa enjeksiyonu ile elde edilen GABAerjik inhibisyonun artışı, EEG’de absans nöbetlerinin azalması ile sonuçlanmıştır (Tolmacheva ve van Luijtelea, 2007).

Tarafımızdan yetişkin GAERS ve WAG/Rij sıçanlarda yapılan amigdala *kindling* çalışmalarında, bu hayvanlarda fokal limbik nöbetlerin jeneralize olması ve konvülsif nöbetlerin gelişmesine karşı bir direnç olduğu, *kindling* süreci ile bazal absans aktivitesinin arasında bir negatif korelasyon olduğu, yani yüksek bazal absans aktivitesine sahip olan sıçanların *kindling* sürecine daha fazla direnç gösterdiği bulunmuştur (Eskazan vd., 2002; Onat vd., 2005; Aker vd., 2006; Onat vd., 2007; Çarçak vd., 2008; Onat vd., 2009). Ekibimizce yapılan diğer çalışmalar da genetik absans epilepsili hayvanlarda konvülsif nöbet gelişimine gözlenen bu direncin hipokampal *kindling* ve peririnal kortikal *kindling* gibi diğer modellerde de mevcut olduğu saptanmıştır (Akman vd., 2008, 2010). Ayrıca amigdala, hipokampus ve peririnal kortekse uygulanan elektriksel uyarılardan hemen sonra DDD’lerin sayısında değişiklikler tespit edilmiştir (Onat vd., 2007; Akman vd., 2008, 2010). Ayrıca absans epilepsisi ile limbik epilepsi arasındaki ters yönde karşılıklı etkileşmenin, ontogenezele ilişkisi (Çarçak vd., 2008) ve serebral kan akımına etkisi (Çarçak vd., 2009) gösterilmiştir. Diğer bir yeni çalışmada ise tipik absans epilepsisinin akut kimyasal modelinde, kortiko-talamo-kortikal döngüde DDD aktivitesi ortaya çıktığı zaman, iki hipokampus arasında senkronizasyon artışı olduğu gösterilmiştir (Velazquez vd., 2007). *Kindling* modeli ile izlenen direnç ve her iki nöbet tipi arasındaki etkileşim, GAERS’lerde intraamigdaloid kainik asit enjeksiyonu ile oluşturulan diğer bir temporal lob epilepsi modelinde de izlenmiştir. Kainik asit enjeksiyonundan sonra GAERS sıçanlarda, *kindling* sürecine benzer şekilde, ilk konvülsif nöbetin geciktiği gözlenmiştir. DDD’ler ve DDD’lere geçiş dönemindeki spektral değişiklikler kainik asit enjeksiyonundan sonra 1-3 gün boyunca silinmiş ve daha sonra basamaklı bir şekilde geri gelmiştir (Gurbanova vd., 2008).

Tüm bu bulgular, absans epilepsisi ile temporal lob epilepsisi arasında karşılıklı bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Absans epilepsisi altında yatan süreçler kendilerini, sessiz oldukları düşünülen limbik yapılarda da bir şekilde göstermekte, konvülsif olmayan jeneralize epilepsilerde altta yatan bu mekanizmalar nöbet oluşumuna yatkın limbik sistem yapılarını da içine almaktadır.

1.4. Epilepsi ve Substansiya Nigra

Epilepsi nöbetlerini kontrol eden mekanizmalardan biri de substansiya nigra pars reticulata (SNR) bölgesini içermektedir. SNR intrinsik ve ekstrinsik bölgelere olan eferent projeksiyonları ve basal ganglionlar ile olan aferent bağlantısı aracılığı ile epilepsi nöbetlerinin kontrolünde olduğu gibi kognisyon ve motor fonksiyonların koordinasyonunda da önemli bir rol oynamaktadır (Iadarola ve Gale, 1982; McNamara vd., 1984; Meurs vd., 2006; Velíšková ve Moshé, 2006). Gale (1990) substansiya nigranın (SN) senkronizasyon ve eksitabilite ile ilişkili olarak geniş alana yayılan serebral mekanizmaları etkilediğini bildirmiştir. SN, pars kompakta ve pars retikulata olmak üzere iki alt bölüme ayrılmaktadır. SNR büyük olan alt bölümüdür ve yüksek oranda GABA içermektedir (Bolam vd., 2000). Pars retikulatının üzerine konumlanmış olan pars kompakta (SNC) bölgesi ise büyük oranda striatuma projekte olan dopaminerjik nöronlar içermektedir. SNR'de yer alan GABA-sensitif nöronlar sıçanlarda çeşitli şekillerde indüklenen klonik nöbetlere karşı duyarlılığı düzenlemektedir (Bloms-Funke ve Löscher, 1996; Boda ve Szente, 1992; Bonhaus vd., 1986; Depaulis vd., 1994; Gale, 1985; McNamara vd., 1984; Meurs, 2006; Moshé ve Sperber, 1990; Velíšková vd., 1996; Zhang ve Rosenberg, 1989). Yetişkin sıçanda SNR'nin nöbetlerin yayılmasında ve kontrolünde farklı etkilere yol açabilen SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} adlı iki ayrı bölge içerdiğini gösteren deliller mevcuttur. Nöbetin başlamasından hemen önce SNR_{posterior} bölgesinde deoksiglukoz alımında artış olduğu ve bu nedenle bu bölgenin nöbet yayılımı için ana giriş olarak düşünülebileceği rapor edilmiştir (Velíšková vd., 2005). Klonik nöbet başladıktan sonra ise SNR_{anterior} bölgesinde deoksiglukoz alımının arttığı tespit edilmiş ve nöbetin sona ermesi ya da süresinin kısalması için bir girişim olabileceği yorumu yapılmıştır. En geçerli ve en yaygın olan teori, klonik nöbet süresince striatonigral terminallerden GABA salınımının artarak SNR nöronlarını baskılaması ve SNR'nin eferent bağlantıları üzerinde meydana gelen disinhibisyon ile devam eden nöbetin durmasıdır (Velíšková vd., 2005; Velíšková ve Moshé, 2006). Her iki SNR_{anterior} bölgesine musimol gibi GABA_A reseptör agonisti uygulanması (Velíšková vd., 1996) ya da nigral lezyon oluşturulması (Garant ve Gale, 1983) bu teori ile uyumlu sonuçlar vermiştir. SNR_{anterior}'da yer alan GABAerjik nöronların aktivitesinin azaltılması nöbetlerin hafiflemesine yol açmaktadır. Musimol gibi GABA_A reseptör agonistinin SNR'ye bilateral olarak uygulanması ile

antikonvülsan etki görülmüştür (Iadarola ve Gale, 1982). Tam tersi bikukulin gibi GABA_A reseptör antagonistinin lokalize olarak uygulanması ile prokonvülsan etkilerin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Sperber vd., 1989). Tüm bu sonuçlar ve lezyon çalışmaları antikonvülsan etkinin SNR_{anterior}'da yer alan GABA-erjik nöronların aktivitesinin azalması ve SNR hedef bölgeleri üzerinde bir disinhibisyon meydana gelmesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Deniau ve Chevalier, 1985). Hedef bölgeler üzerinde oluşan disinhibisyonun antikonvülsan etki için gerekli olduğu vurgulanmıştır (Dean ve Gale, 1989; Depaulis vd., 1990; Okada vd., 1989; Redgrave vd., 1992).

SNR'nin konvülsif nöbetlerin kontrolündeki rolü dışında nonkonvülsif nöbetlerin modülasyonunda da görev aldığı jeneralize absans epilepsi modeli olan GAERS sıçanlarda yapılan bir çok çalışma ile gösterilmiştir (Depaulis vd., 1989, 1994; Depaulis ve van Luijtelaar, 2006; Deransart vd., 1998). Direkt GABAerjik striatonigral yolakların SNR'nin GABAerjik ajanlar ile aktive ya da inhibe edilmesi aracılığı ile absans epilepsi nöbetlerini modüle edebileceğini gösteren deliller mevcuttur (Depaulis vd., 1988, 1989, 1994). GABA_A reseptör agonisti olan musimol hem genetik hem de farmakolojik absans epilepsi modellerinde absans nöbetlerini baskılamak, GABA_A reseptörlerinin SNR'ye uygulanan pikrotoksin ile bloke edilmesi absans nöbetlerinin oluşumunu arttırmıştır. Ayrıca SNR'ye NMDA antagonistlerinin (MK-801 and CGP 40116) uygulanması ile absans nöbetlerinin bloke edilmesi glutamaterjik nörotransmisyonun rolünü ortaya koymuştur (Deransart vd., 1996). Subtalamik çekirdeğin bilateral musimol enjeksiyonu ile inhibisyonu DDD'leri belirgin şekilde azaltmış, bu durum absans epilepsi nöbetlerinin kontrolünde indirekt striatonigral yolağın önemli olduğunu göstermiştir. Ayrıca SNR'nin eferent projeksiyonlarından biri olan ventromedial talamik çekirdek nöronlarının aktivitesinin DDD süresince arttığı bildirilmiştir (Paz, 2007). Bütün bu sonuçlar epilepsi nöbetlerinin kontrolünde SNR ile ilişkili endojen bir sistemin varlığını göstermiş ve 'epilepsilerin nigral kontrolü' kavramının ortaya çıkmasında etkili olmuştur (Depaulis vd., 1994; Deransart vd., 2001).

Bu projenin amacı, absans epilepsili hayvanlarda temporal lob epilepsisi gelişimine karşı oluşan dirençte, SNR bölgesinin rolünü ortaya koymaktır. Bu amaçla, (1) GAERS'lerde SNR_{anterior} veya SNR_{posterior} bölgelerinin geçici inhibisyonlarının, limbik epilepsi modeli olan *kindling* sürecine etkisinin gösterilmesi, (2) Wistar kontrol, GAERS kontrol ve *kindling* uyarısı alan Wistar veya GAERS gruplarındaki hayvanlarda SNR bölgesindeki GABAerjik ve dopaminerjik nöronların glutamik asit dekarboksilaz (GAD) ve tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimyası ile incelenmesi ve (3) Wistar kontrol, GAERS kontrol ve *kindling* uyarısı alan Wistar veya GAERS gruplarındaki hayvanlarda SNR bölgesindeki GABAerjik nöronların elektron mikroskopik yöntemle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

Çalışmada erkek, 6 aylık (250-350 gr) epileptik olmayan Wistar ve GAERS sıçanlar kullanıldı. Tüm hayvanlar standart laboratuvar koşullarında, 12/12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde, yiyecek ve içecek alımları serbest olacak şekilde barındırıldı. Hayvanlar, stereotaksik cerrahi işlemlerin ardından her kafeste bir hayvan olacak şekilde tutuldu. Deney grupları aşağıdaki şekilde gerçekleşti. Çalışmada kullanılan Wistar suşu sıçanlar Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Ünitesinden, GAERS suşu sıçanlar ise Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

1. GAERS'lerde $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgesinin geçici olarak baskılanmasının *kindling* sürecine olan etkisinin değerlendirildiği gruplar:

- $SNR_{anterior}$ bölgesinin lidokain ile geçici baskılanmasının *kindling* süreci üzerine etkisi (n=8)
- $SNR_{posterior}$ bölgesinin lidokain ile geçici baskılanmasının *kindling* süreci üzerine etkisi (n=7)
- $SNR_{anterior}$ bölgesine serum fizyolojik uygulamasının *kindling* süreci üzerine etkisi (kontrol grubu) (n=7)
- $SNR_{posterior}$ bölgesine serum fizyolojik uygulamasının *kindling* süreci üzerine etkisi (kontrol grubu) (n=9)

2. GAERS ve Wistar sıçanlarda $SNR_{posterior}$ bölgesinde dopaminerjik nöronların TH immünohistokimya yöntemi ile değerlendirildiği gruplar:

- Epileptik olmayan Wistar sıçanlar (kontrol grubu) (n=7)
- Absans epilepsili GAERS sıçanlar (kontrol grubu) (n=7)
- Kindling* uyarısı almış (6 elektriksel uyarı) Wistar sıçanlar (n=7)
- Kindling* uyarısı almış (6 elektriksel uyarı) GAERS sıçanlar (n=7)

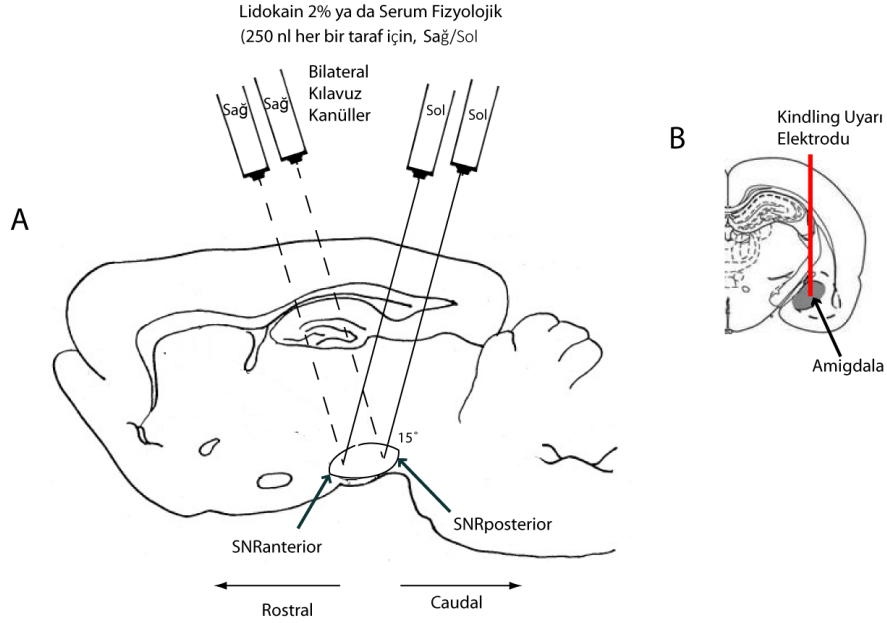
3. GAERS ve Wistar sıçanlarda $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinde GABAerjik aktivitenin GAD67 immünohistokimyasal yöntemi ile değerlendirildiği gruplar:

- Epileptik olmayan Wistar sıçanlar (kontrol grubu) (n=7)
- Absans epilepsili GAERS sıçanlar (kontrol grubu) (n=7)
- Kindling* uyarısı almış (6 elektriksel uyarı) Wistar sıçanlar (n=7)
- Kindling* uyarısı almış (6 elektriksel uyarı) GAERS sıçanlar (n=7)

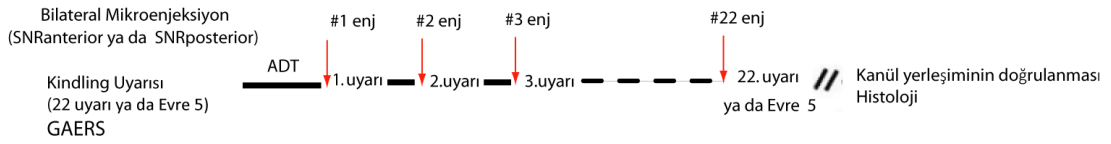
4. GAERS ve Wistar sıçanlarda $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinde GABAerjik nöronların GABA immün-altın immünositokimyası ve elektron mikroskopisi ile değerlendirildiği gruplar:

- a) Epileptik olmayan Wistar sıçanlar (kontrol grubu) (n=4)
- b) Absans epilepsili GAERS sıçanlar (kontrol grubu) (n=4)
- c) *Kindling* uyarısı almış (6 elektriksel uyarı) Wistar sıçanlar (n=4)
- d) *Kindling* uyarısı almış (6 elektriksel uyarı) GAERS sıçanlar (n=4)

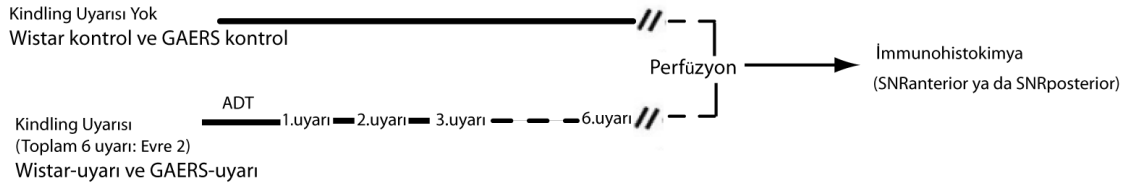
Deney grupları Şekil 1’de gösterilmektedir.



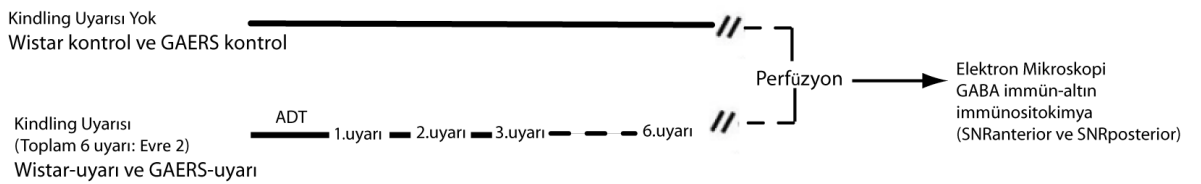
Deney 1: Lidokain-SNRanterior/SNRposterior-Kindling



Deney 2: Kindling-Tirozin hidroksilaz ve GAD67 İmmunohistokimya



Deney 3: Kindling-GABA immün-altın immünohistokimya-elektron mikroskopi



Şekil 1. Deney gruplarının ve deney planının şematik olarak gösterilmesi. **A.** SNRanterior ya da SNRposterior bölgesine çift taraflı enjeksiyonun *sagittal* planda gösterilmesi. **B.** Amigdalaya yerleştirilen *kindling* uyarı elektrodunun *coronal* planda gösterilmesi.

Stereotaksik Cerrahi:

Kindling gruplarındaki tüm hayvanlara ketamin (100 mg/kg-i.p.) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg-i.p.) anestezisi uygulandıktan sonra, stereotaksi aleti yardımıyla kortekse kayıt

elektrotları, bazolateral amigdalaya uyarı/kayıt elektrodu ve $SNR_{anterior}$ ya da $SNR_{posterior}$ bölgesine çift taraflı kılavuz kanül yerleştirildi (Şekil 1A ve B). Elektrot ve kanül koordinatları aşağıdaki şekildedir;

Kortikal EEG kaydı için; AP 2.0 mm, L 3.5 mm (frontal bölge), AP -6.0, L 2.0 mm (parieto-okspital bölge) ve referans elektrodu serebellum üzerinde olacak şekilde tripolar kayıt elektrodu yerleştirildi.

Kindling için; bipolar uyarı/kayıt elektrotları bazolateral amigdalaya (AP -2.6 mm, L 4.8 mm, V -8.5 mm) yerleştirildi.

Lidokain ya da serum fizyolojik infüzyonları için;

$SNR_{anterior}$ (AP -5.2 mm, L 4.4 mm, V -7.2 mm) bölgesine çift taraflı olarak kılavuz kanül yerleştirildi ve deneylerin bitişini müteakip histolojik doğrulaması yapıldı.

$SNR_{posterior}$ (AP -5.8 mm, L 4.6 mm, V -7.4 mm) bölgesine çift taraflı olarak kılavuz kanül yerleştirildi.

Kanül ve elektrot yerleştirilen *kindling* grubundaki hayvanlar 10 gün süre ile iyileşme döneminde bırakıldılar. İyileşme dönemi boyunca hayvanların vücut ağırlıkları kontrol edildi. 10 günlük iyileşme döneminin ardından bazal DDD'lerin sayı ve sürelerini belirlemek amacıyla *kindling* grubundaki hayvanlardan 3 saatlik bazal EEG kayıtları alındı. EEG kayıtları boyunca hayvanlar şeffaf pleksi kafesler içerisinde serbestçe hareket eder şekilde tutuldular.

Kindling:

Bazal EEG kayıtlarının ardından, bazolateral amigdala da ard-deşarj eşiğini tespit etmek amacıyla başlangıçta 50 μA (80 Hz, 1 msn kare dalgalar, toplam süre 2 sn) olarak uyarı verildi ve ilk ard-deşarj görülene dek 25 μA 'lık arttırmalarla devam edildi. Her hayvan için tespit edilen ard-deşarj eşiğindeki uyarı şiddetiyle, sabah ve akşam üzeri olmak üzere günde 2 kez (saat 10.00 ve 17.00) uyarı verildi ve *kindling* uyarıları ile tetiklenen nöbetler Racine'in (1972a,b) standart 5 evreli nöbet skalası ile değerlendirildi (Şekil 1). GAERS'lerde SNR 'nin 2 farklı bölgesinin geçici olarak baskılanmasının *kindling* sürecine olan etkisinin değerlendirildiği gruplarda elektriksel uyarılar evre 5 nöbet görülene dek ya da bu çalışma için belirlenen en fazla uyarı sayısına (maksimum 25 uyarı) ulaşılana dek devam edildi (Şekil 1: Deney 1). Diğer gruplarda ise tüm hayvanların evre 2 nöbette kalmasını sağlamak amacı ile ard-deşarj eşiğindeki uyarı şiddetiyle toplam 6 kez elektriksel uyarı verildi (Şekil 1: Deney 2 ve 3).

Intranigral Madde İnfüzyonu

Lidokain ve serum fizyolojik enjeksiyonları her *kindling* uyarısından 30 dakika önce çift taraflı olarak ve tek bir taraf için 250 nl/2 dakika hızında yapıldı. Lidokain ve serum

fizyolojik enjeksiyonlarının 30 dakika öncesinden başlanarak *kindling* uyarılarının 30 dakika sonrasına kadar kesintisiz EEG kaydı alındı, *kindling* uyarısı sonucunda gözlenen nöbet evresi ve ard-deşarj süreleri analiz edildi.

EEG Analizi:

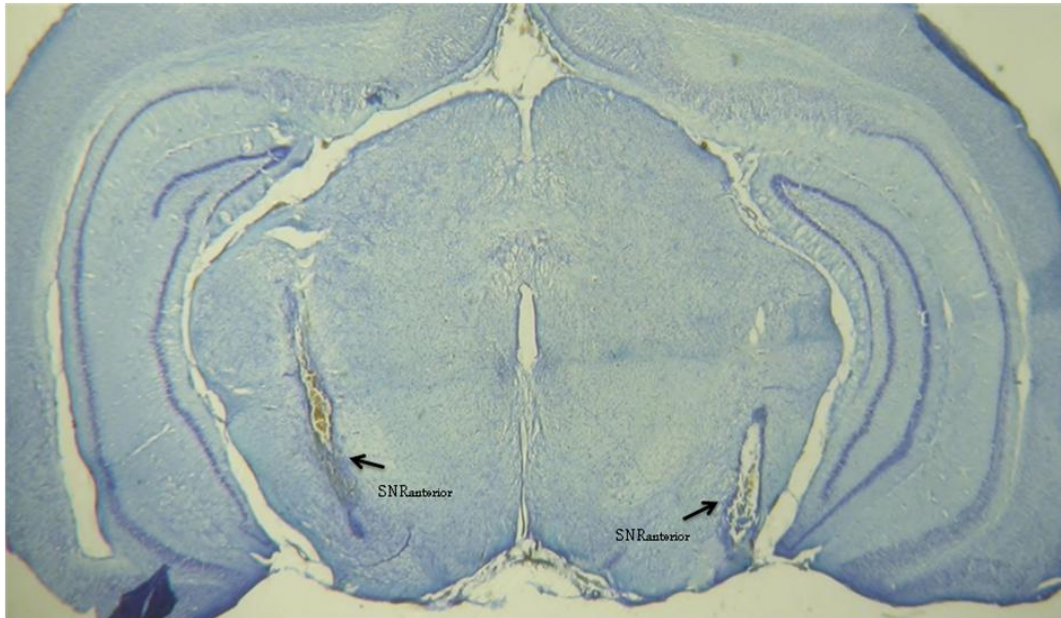
Powerlab 8S EEG kayıt sistemi ile kaydedilen EEG kayıtları “Chart 7.0 for Windows” programı ile analiz edildi. Bazal, lidokain ve serum fizyolojik enjeksiyonları öncesi ve sonrası ve *kindling* uyarıları sonrası kaydedilen kortikal EEG’de GAERS’lerde gözlenen ard-deşarjların süresi kaydedildi ve analiz edildi.

Histolojik Doğrulama:

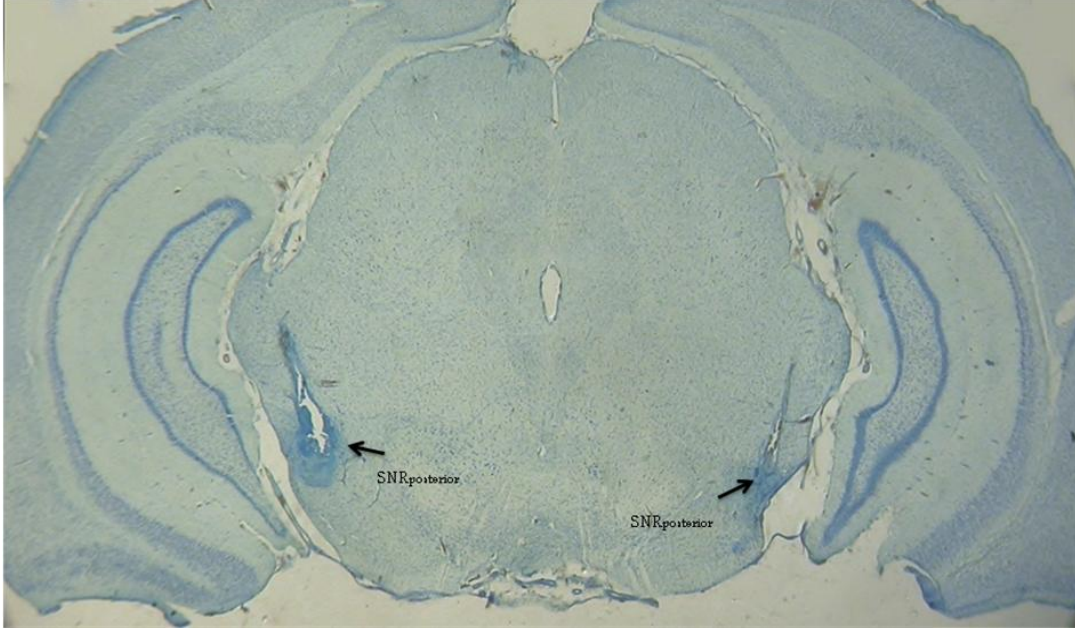
Bazolateral amigdala elektrot ve SNR_{anterior} ya da SNR_{posterior} bölgesine çift taraflı kanül yerleşiminin doğrulanması amacıyla deneylerin bitiminde, perfüzyon fiksasyonu ve dekapitasyon işlemi için sıçanlara i.p. ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (30 mg/kg) ile derin anestezi uygulandı. Hayvanlar nötral buffer formalin perfüze edildi ve ardından dekapite edilerek beyinleri çıkartıldı. Beyinler 1 gece boyunca +4 0C’ de formalinde tutuldu ve ardından %30 süzkroz (PBS içinde) solüsyonu içine alındı.

SNR_{anterior} ya da SNR_{posterior} bölgesine çift taraflı enjeksiyon yapılan hayvanların beyinlerinden, soğutmalı mikrotom ile 40 µm kalınlığında kesit alındıktan sonra tiyonin boyası uygulanarak kanül ve elektrot yerleşiminin doğruluğu test edildi. İmmünohistokimyasal boyamaların gerçekleştiği gruplarda ise histolojik doğrulama, beyin kesitlerinin bir setine tiyonin boyaması yapılarak sağlandı. Kanül ve/veya elektrot yerleşimi doğru olan hayvanlar çalışmaya dahil edildi.

SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} bölgelerine çift taraflı kanül yerleşimine ait örnek fotoğraflar ekte görülmektedir (Resim 1a ve 1b).



Resim 1a. SNR_{anterior} bölgesine çift taraflı kanül yerleşimine dair bir örnek (bregma 5.3 mm).



Resim 1b. SNR_{posterior} bölgesine çift taraflı kanül yerleşimine dair bir örnek (Bregma 5.7 mm).

Geçirimli Elektron Mikroskopi

Geçirimli elektron mikroskopi çalışmaları için Wistar ve GAERS kontrol grupları ile 6 *kindling* uyarısı alan Wistar ve GAERS (bu gruplar Wistar-uyarı ve GAERS-uyarı olarak adlandırıldı) hayvanlar kullanıldı. Wistar-uyarı ve GAERS-uyarı gruplarında hayvanlara, evre 2 nöbette kalmasını sağlamak için ard-deşarj eşliğindeki uyarı şiddetiyle toplam 6 kez elektriksel uyarı verildi. Son uyarıdan 1 saat sonra hayvanlara derin anestezi altında perfüzyon işlemi uygulandı. Perfüzyon fiksasyonu ve dekapitasyon işlemi için sıçanlarda i.p. ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) ile derin anestezi sağlandı. Derin anestezi durumu kornea ve pençe refleksleriyle doğrulandıktan sonra hayvanların göğüs kafesi açılarak aortadan perfüzyon pompası yardımıyla 50 ml/dk hızında perfüzyon işlemi yapıldı. Hayvanlar önce heparin ve daha sonra da pH 7.3, 0.1 M HEPES tamponu içinde %2.5 glutaraldehit, %0.5 paraformaldehit, %0.1 pikrik asit içeren fiksatif ile perfüze edildi. Perfüzyonu tamamlanan sıçanlar dekapite edildi. Beyinler çıkarıldıktan sonra aynı fiksatif içinde 4°C'de gece boyunca tutularak post-fiksasyon işlemi yapıldı.

Fiksasyondan 24 saat sonra beyinler 0.1 M HEPES tamponunda (pH 7.3) yıkanarak vibratomda (Leica VT1000S) 300 µm kalınlığında sagittal kesitler alındı. SNR_{anterior} ve

SNR_{posterior} bölgeleri stereomikroskop altında çıkarılarak %1 osmium tetroksit/%1.5 potasyum ferrisiyanid içinde post-fiksasyona alındı. Kesitler %0.5 uranil asetat ile oda ısısında ve karanlıkta boyama işlemine alındı ve daha sonra yükselen alkol serileri ve propilen oksit ile dehidrate edildi. Gece boyunca propilen oksit/epon karışımında bekletilen dokular ertesi gün 3 saat saf eponda tutulduktan sonra Epon 812'ye gömüldü. 24 saat boyunca 60°C'lik etüvde polimerizasyon işlemi yapıldı. Doku bloklarından Leica Ultracut R ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı-ince kesitler alındı. Toluidin mavisi ile boyanan yarı-ince kesitlerde uygun alan belirlendikten sonra bu alandan alınan 100 nm kalınlığındaki ince kesitler Coat-Quick 'G' pen ile kaplanmış 200 mesh nikel gridler üzerine alındı ve 3-4 saat kurumaya bırakıldı. Kesitler anti-GABA antikoruyla inkübe edildi.

GABA İmmün-altın İmmünsitokimyası

İnce kesitleri içeren gridler TBST (%0.1 Triton X-100, %0.9 sodyum klorür, 0.05 M Tris tamponu, pH 7.6) tamponunda yıkandıktan sonra oda ısısında ve nemli ortamda primer antikor (anti-GABA, Sigma A2052) ile inkübe edildi. Anti-GABA antikoru TBST pH 7.6'da 1:20.000 oranında sulandırılarak kullanıldı. Daha sonra kesitler sırasıyla pH 7.6 ve pH 8.2 TBST tamponunda yıkandı ve 10 nm altın partiküllerine bağlı keçi anti-tavşan IgG antikorunda (Sigma G7402) inkübe edildi. TBST pH 7.6 ve sonrasında distile suda yıkanan kesitler kurumaya bırakıldı. Uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama yapıldıktan sonra geçirimli elektron mikroskobu (JEOL 1200 EXII) ile inceleme yapıldı. SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} bölgeleri GABA immün-altın yoğunlukları açısından niceliksel olarak değerlendirildi.

GABA İmmün-altın İmmünsitokimyası Analiz Yöntemi

Her hayvandan 10 adet akson terminali mikrografı çekildi. Mikrograflar GABA immün-altın yoğunlukları açısından NIH Image Analysis (Image J) programı ile niceliksel olarak değerlendirildi. İmmünsitokimyasal niceliksel değerlendirme için terminal alanı hesaplandı ve presinaptik terminallerdeki 10 nm büyüklüğündeki altın partikülleri sayıldı. Sayıma mitokondriler üzerindeki GABA işaretlenmesi dahil edilmedi. Altın partikül sayısının akson terminali alanına bölünmesiyle GABA yoğunluğu hesaplandı. Arka-plan işaretlenmeleri devre dışı bırakmak için her gridde 3 adet damar lümeninin içindeki altın partikülleri sayılarak GABA yoğunluğu hesaplandı. Damar GABA yoğunluğu her bir sinir terminali GABA yoğunluğundan çıkartılarak net GABA yoğunluğu elde edildi. Veriler Kruskal Wallis ve Dunn çoklu karşılaştırma testleri ile değerlendirilip karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama±S.E.M. olarak ifade edildi ve anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

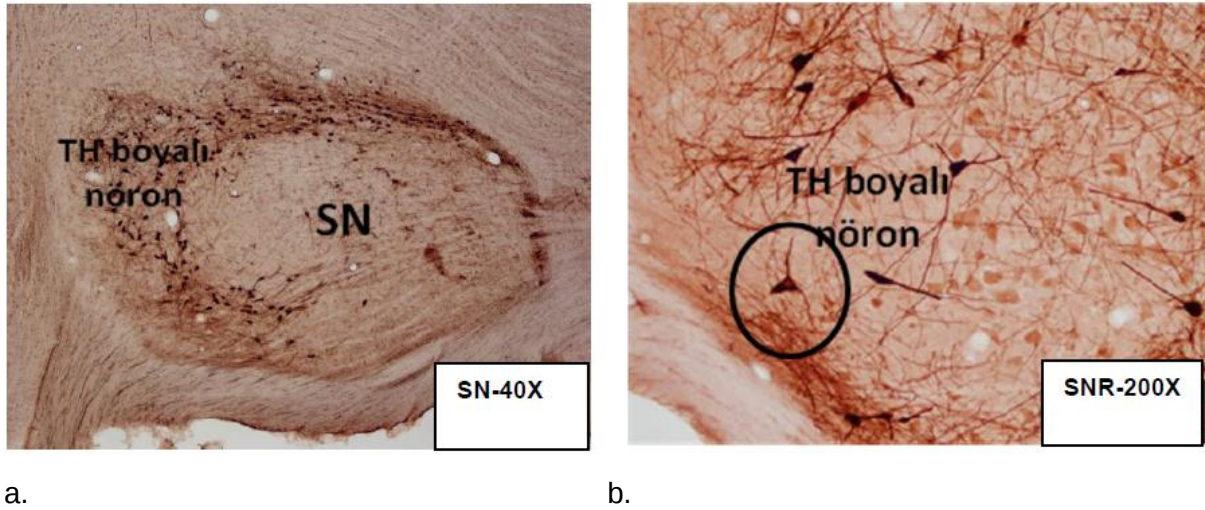
TH ve GAD67 İmmünohistokimyasal Boyamaları:

İmmünohistokimya boyamaları setler halinde yapıldı. Elektriksel uyarı alan GAERS (GAERS-uyarı), elektriksel uyarı alan Wistar (Wistar-uyarı) ve kontrol grubu olarak da yalancı-opere GAERS ve yalancı-opere Wistar hayvanlar bir seti oluşturdu. Hayvanların BLA bölgesine ard-deşarj eşiğinde günde 2 kez olmak üzere 3 gün boyunca elektriksel uyarı uygulandı ve hayvanlar son uyarıdan 1 saat sonra serum fizyolojik (SF) ve % 4 nötral buffer formalin kullanılarak perfüze edildi. Standardizasyonu sağlamak amacıyla immünohistokimya boyaması yapılacak olan seti oluşturan kontrol grubu hayvanlar da elektriksel uyarı alan hayvanlarla aynı günde perfüze edildi. Çıkarılan beyinler 24 saat boyunca fiksatifte bekletildi. Formolinde bekleme işleminden sonra beyinler % 30'luk sukroza (20 ml, 1 M PBS içinde çözünmüş) alındı ve 4-5 gün boyunca beyinler sukroz solüsyonunda çökene kadar bekletildi. Çöken beyinler -25 derecede 3 dakika boyunca metilbütanda donduruldu. Dondurulan her bir beyin immünohistokimya boyama işlemi yapılana kadar -80 derecede saklandı. İmmünohistokimya boyaması için 40 mikrometre kalınlığında serbest yüzen sagittal kesitler kullanıldı. Kesit alma işlemi doku yapıştırıcısı (tissue TEK) kullanılarak kriyostatta yapıldı. Bu çalışmada beyin sağ hemisferinden alınan kesitler kullanıldı. Seri olarak alınan kesitler içinde 0,1 M fosfat tamponu (PBS) olan 24 kuyudan oluşan tabağa kondu. İmmünohistokimya boyamasına geçmeden önce her bir hayvan için 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ve 24. kuyudan alınan kesitler Nissl boyama yöntemi ile tiyonin ile boyanarak SN sınırları belirlendi. İmmünohistokimya boyama için belirlenen SN kuyularından her bir hayvan için 6'şar SN kesiti seçildi ve yine 24 kuyulu bir tabağa seti oluşturan 4 hayvanın SN kesitleri yerleştirildi. Tirozin hidroksilaz ya da GAD67 immünohistokimya boyaması için 2 gün süren bir boyama protokolü uygulandı. İşlemler bir çalkalayıcı üzerinde ve tabağın kapağı kapalı bir şekilde gerçekleştirildi. Birinci gün kesitler ilk olarak % 1 H₂O₂ (30 dakika) ile muamele edildi. Üç kez 5'er dakikalık 0,1 M PBS ile yıkama işleminin ardından, kuyulara % 10 normal at serum (NHS) (PBS içinde % 0.1 TritonX-100, % 1 bovine serum albumin) konularak kesitler normal at serumu ile 1 saat bloklandı. Son olarak +4 derecede 24 saatlik primer antikör inkübasyonu gerçekleştirildi. Bu nedenle kesitler 1:1000 konsantrasyonunda anti-GAD 67 ya da anti-TH antikoru içeren PBS (% 0.3 TritonX-100, % 1 bovine serum albumin ile) solüsyonu ile 1 gece +4°C' de bekletildi. İkinci gün kesitlerin 5'er dakikalık 0,1 M PBS ile yıkama işlemi ile başladı. Kesitler 90 dakikalık anti-fare sekonder antikoru ile inkübasyonun ardından yine 3 kez 0,1 M PBS ile yıkandı. Avidin-biyotin kompleksi ile işaretleme (1 saat) yapılarak kesitlere bir kez daha yıkama işlemi (3X5 dakika, 0,1 M fosfat tamponu) uygulandı. Boyanmanın görüntülenmesinde NOVARED substrat kit kullanıldı. Boyama protokolü 3 kez 5'er dakikalık 0,1 M PBS ile yıkama işlemi ile sonlandırıldı. Kesitler jelatinli lamlara alındı ve lam kurutucu

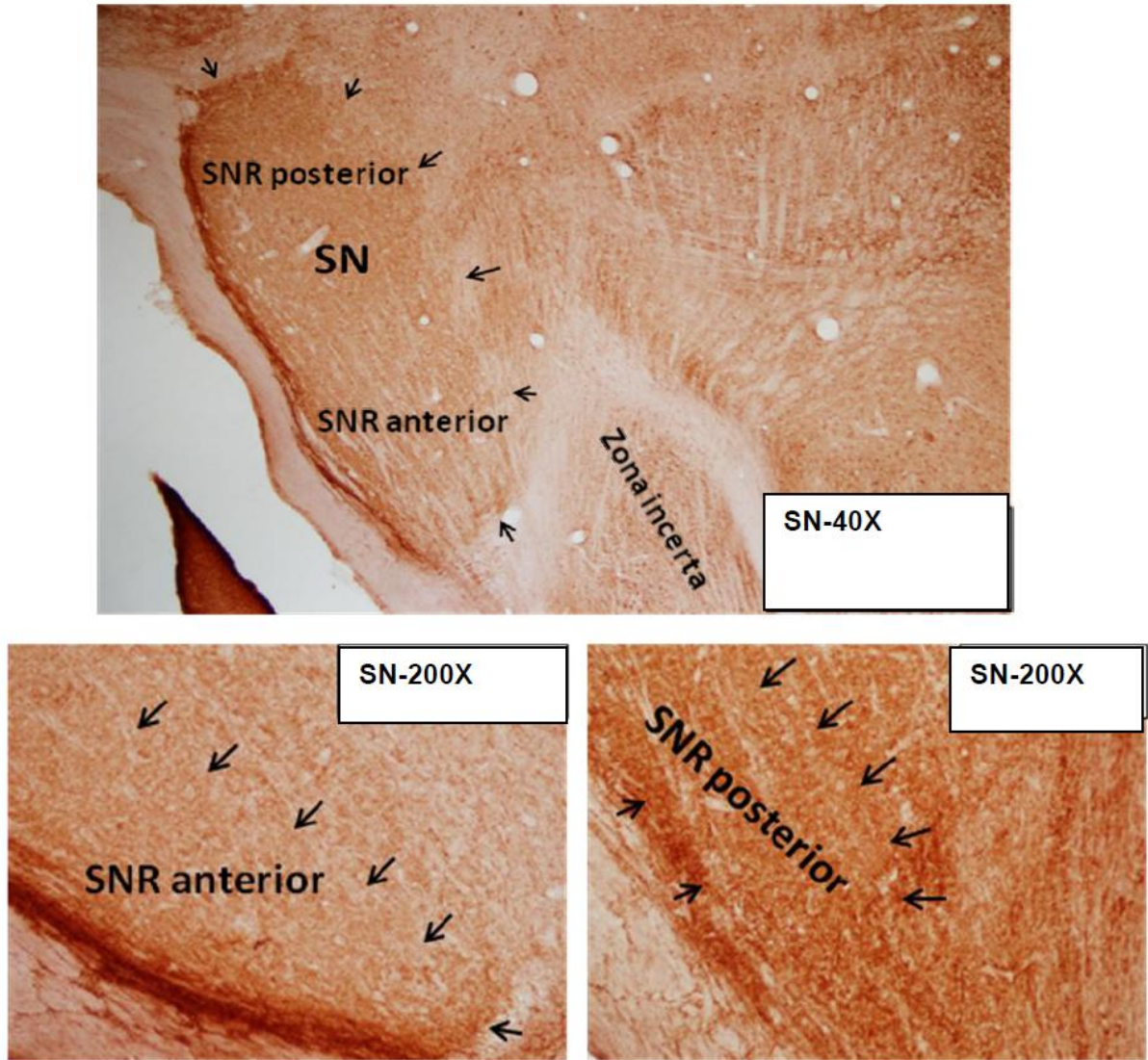
tablada hızlı kurutma yapıldı (37 derecede, 15-30 dakika). Vectomount ile kapatılan lamlar en az 1 gece açık şekilde oda ısısında kurumaya bırakıldı.

TH ve GAD67 İmmünohistokimyası Analiz Yöntemi:

TH immünreaktivitesi dopaminerjik nöronlar SNR'nin yalnızca kaudovertralinde yer aldığı için (González-Hernández ve Rodríguez, 2000) SNR_{posterior} bölgesinde araştırılmıştır. GAD67 aktivitesi ise her iki SNR bölgesinde de değerlendirilmiştir. Her iki gruptan elde edilen boyanmış kesitlerde SNR_{anterior} (GAD67 için) ve SNR_{posterior} (TH ve GAD67 için) ışık mikroskobuna bağlı dijital kamera aracılığı ile fotoğraflandı ve dijital olarak kaydedildi. Fotoğraflar üzerinden Image J programı aracılığı ile densitometrik analiz yapıldı. TH boyaması için her bir lamin her bir kesiti için Tiff formatında tüm SN'yi içeren (40X), daha sonra sadece SNR_{posterior} (200X) bölgesini içeren (Resim 2a-b), GAD67 boyaması için ise yine tüm SN'yi ve ayrıca sadece SNR_{anterior} (200X) ya da SNR_{posterior} (200X) (Resim 3) bölgelerini içeren fotoğraflar çekildi. TH ve GAD67 immünreaktif nöronların sinyal yoğunlukları "Image-J" yazılımı ile ölçüldü. Her bir setin analizi sırasında kontrol hayvanı olan yalancı-opere Wistar sıçan referans olarak alındı ve setteki diğer hayvanların analiz sonuçları referans hayvanın analiz sonuçlarına göre yüzde artış veya azalış olarak ifade edildi..



Resim 2. İmmünohistokimya boyama yöntemi ile a. tüm SN'de ve b. SNR_{posterior} bölgesinde TH reaksiyonunun görüntülenmesi. TH: Tirozin hidroksilaz



Resim 3. İmmünohistokimya boyama yöntemi ile tüm SN'de, SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} bölgelerinde GAD67 reaksiyonunun görüntülenmesi.

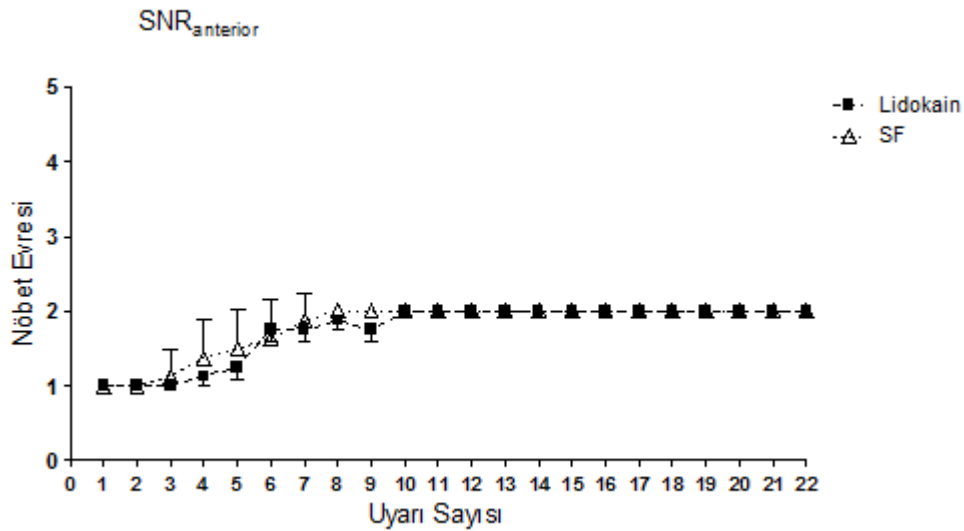
Data Analizi

Çalışmada elde edilen bütün veriler ortalama±ortalamanın standard hatası olarak verilmiştir. Nöbet evreleri ve ard-deşarj sürelerine ait veriler iki yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir. Diğer verilerin istatistiksel analizinde tek yönlü ANOVA ve Bonferroni posthoc testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık derecesi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

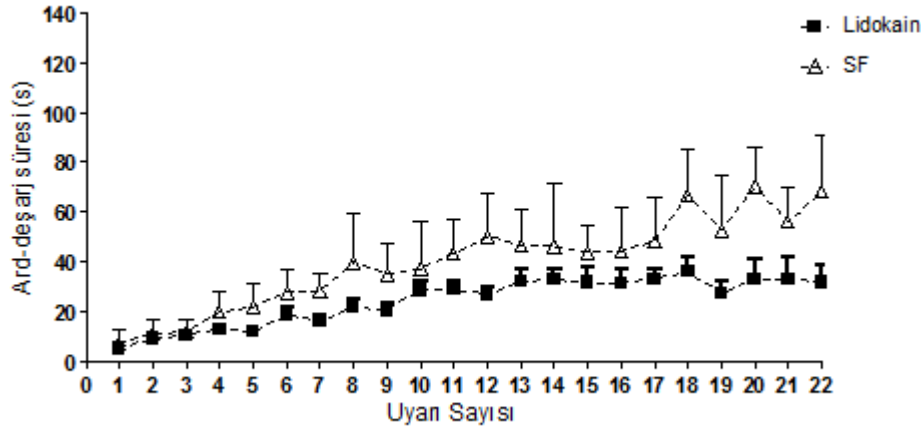
3. Bulgular

3.1. GAERS’lerde $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinin geçici olarak baskılanmasının *kindling* sürecine olan etkisinin değerlendirilmesi

$SNR_{anterior}$ bölgesine çift taraflı olarak lidokain ya da serum fizyolojik enjeksiyonunu takiben 30 dakika sonra *kindling* uyarısı verildi ve maksimum uyarı sayısı olan 22 uyarı sonunda tüm hayvanlar evre 2’de kaldılar (Şekil 2). Her 2 grupta da hiçbir hayvan evre 3-5 nöbete ulaşmadı. Her 2 grupta da ard-deşarj açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 3).

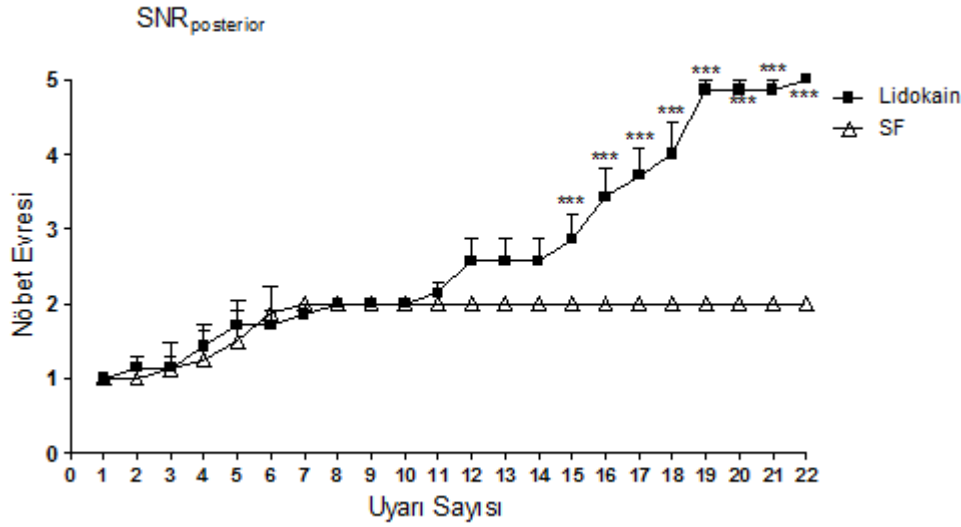


Şekil 2. $SNR_{anterior}$ çift taraflı lidokain ya da serum fizyolojik (SF) enjeksiyonunun elektriksel uyarı ile tetiklenen nöbet evreleri üzerindeki etkisi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.

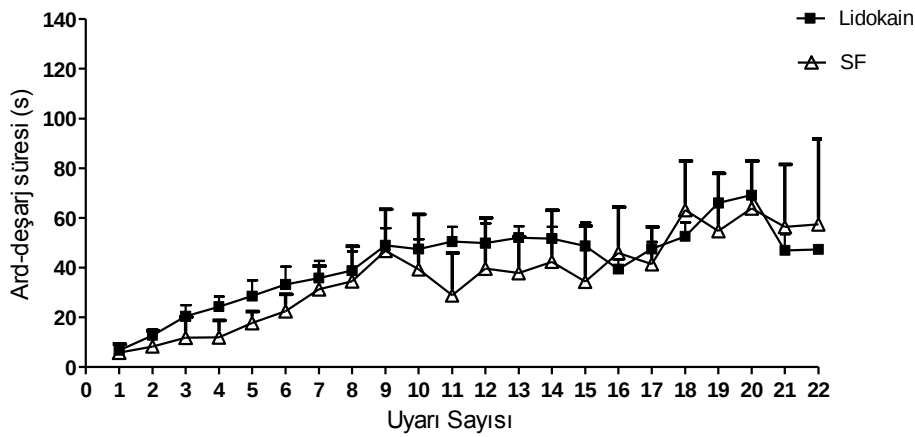


Şekil 3. $SNR_{anterior}$ çift taraflı lidokain ya da serum fizyolojik (SF) enjeksiyonunun elektriksel uyarı ile tetiklenen nöbetlerde ard-deşarj üzerindeki etkisi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.

$SNR_{posterior}$ bölgesine çift taraflı olarak lidokain enjeksiyonunu takiben 30 dakika sonra *kindling* uyarısı verilen hayvanlar 10. uyarıdan sonra evre 3'e ilerlediler ve müteakip uyarılarda yani maksimum uyarı sayısı olan 22 uyarı sonunda tüm hayvanlar evre 5'e ulaştılar (Şekil 4). Buna karşın $SNR_{posterior}$ bölgesine çift taraflı olarak serum fizyolojik enjeksiyonundan sonra *kindling* uyarısı verilen hayvanlar, maksimum uyarı sayısına rağmen evre 2'de kaldılar (Şekil 4). Lidokain ve serum fizyolojik gruplarında ard-deşarj açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 5).



Şekil 4. $SNR_{posterior}$ çift taraflı lidokain ya da serum fizyolojik (SF) enjeksiyonunun elektriksel uyarı ile tetiklenen nöbet evreleri üzerindeki etkisi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar iki yönlü ANOVA uygulandı *, $p<0.05$; ***, $p<0.001$,



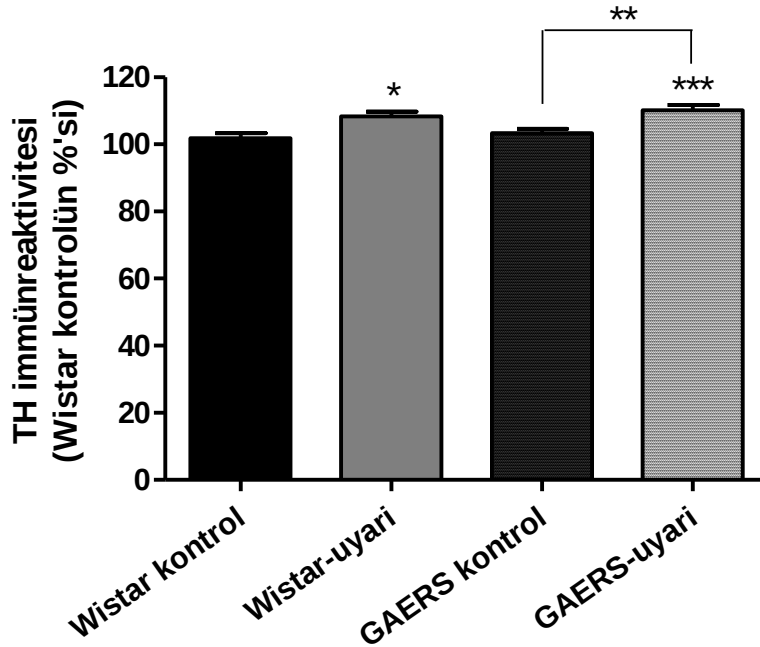
Şekil 5. $SNR_{posterior}$ çift taraflı lidokain ya da serum fizyolojik (SF) enjeksiyonunun elektriksel uyarı ile tetiklenen nöbetlerde ard-deşarj üzerindeki etkisi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.

3.2. GAERS ve Wistar sıçanlarda $SNR_{posterior}$ bölgesinde dopaminerjik nöronların TH immünhistokimyasal yöntemi ile değerlendirilmesi:

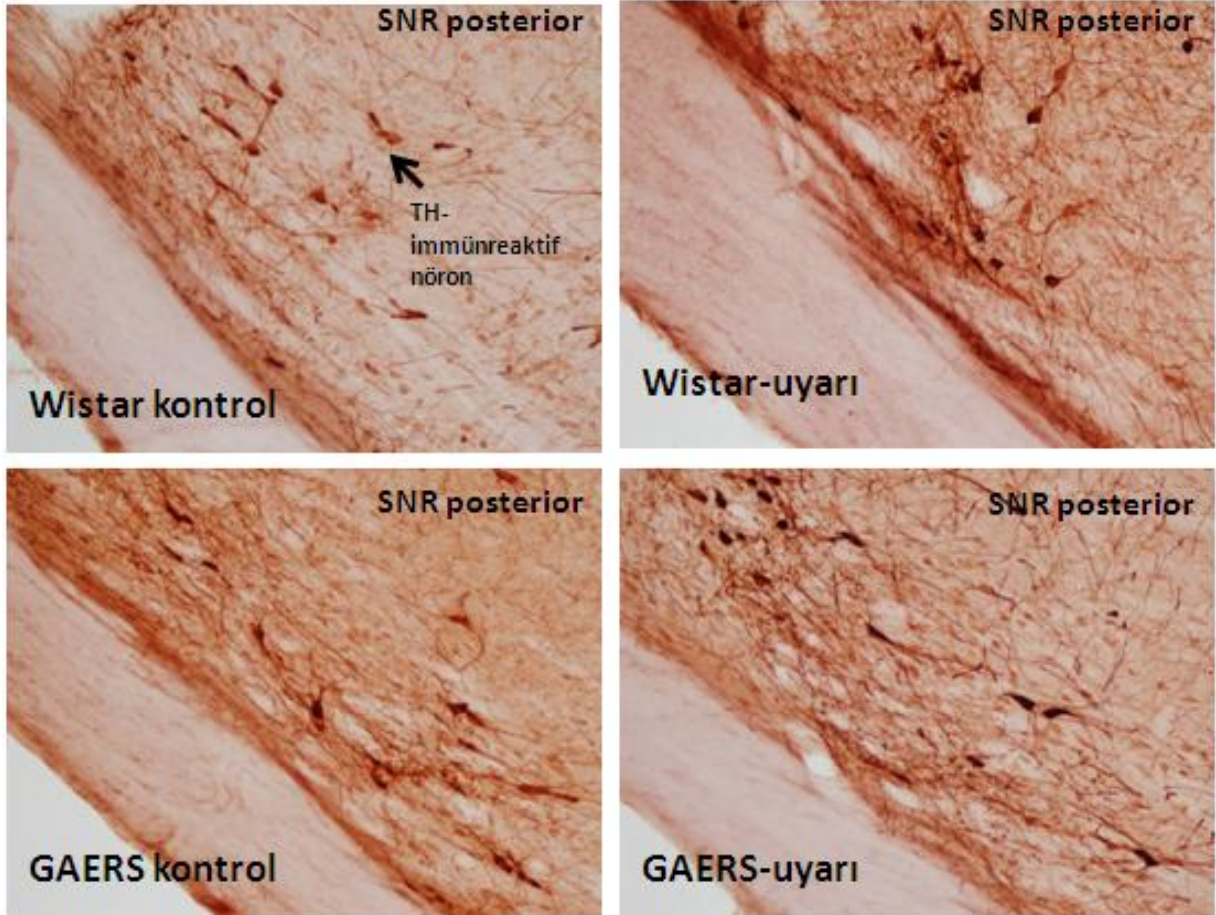
$SNR_{posterior}$ bölgesinde yer alan dopaminerjik nöronlardaki TH immünreaktivitesinin GAERS ve Wistar sıçanlarda hem bazal aktivite açısından karşılaştırılması hem de elektriksel uyarı sonrasında karşılaştırılması için toplam 7 set immünhistokimya yapıldı ve

her bir boyama setinde her bir gruptan 4 hayvan olacak şekilde toplam 28 sıçan kullanıldı. Genetik olarak absans epilepsili sıçanlar olan ve *kindling* direnci gösteren GAERS'ler ile epileptik olmayan Wistar sıçanların kontrol hayvanlarının karşılaştırılması sonucunda SNR_{posterior} bölgesinde yer alan dopaminerjik nöronlardaki TH immünreaktivitesinin her iki grupta benzer olduğu görüldü. Wistar ve GAERS kontrol hayvanları arasında TH immünreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterildi (Şekil 6, Resim 4).

Hem GAERS hem de Wistar hayvanlarda BLA'ya uygulanan elektriksel uyarının SNR_{posterior} bölgesindeki TH aktivitesini arttırdığı saptandı. Tek yönlü ANOVA yönteminin ardından uygulanan Bonferroni testi ile Wistar kontrol ile Wistar-uyarı, Wistar kontrol ile GAERS-uyarı, ayrıca GAERS kontrol ve GAERS-uyarı grupları arasında TH immünreaktif nöronların sinyal yoğunluklarında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi (Şekil 6, Resim 4). Uygulanan elektriksel uyarı ile hem Wistar-uyarı grubundaki hem de GAERS-uyarı grubunun SNR_{posterior} bölgesindeki TH immünreaktivitesinin referans alınan Wistar kontrol grubundaki TH immünreaktivitesine göre anlamlı derecede arttığı gösterildi. Ayrıca elektriksel stimülasyon ile GAERS'lerin SNR_{posterior} bölgesinde yer alan dopaminerjik nöronlardaki TH aktivitesinin de artış gösterdiği saptandı.



Şekil 6. SNR_{posterior} bölgesindeki TH immünreaktivitesinin değerlendirilmesi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplara tek yönlü ANOVA ve Bonferroni posthoc testi uygulandı, *, p<0.05; **, p<0.01;***, p<0.001.



Resim 4. SNR_{posterior} bölgesindeki TH immunreaktif nöronların kontrol ve uyarı gruplarında gösterilmesi (200X). TH: tirozin hidroksilaz

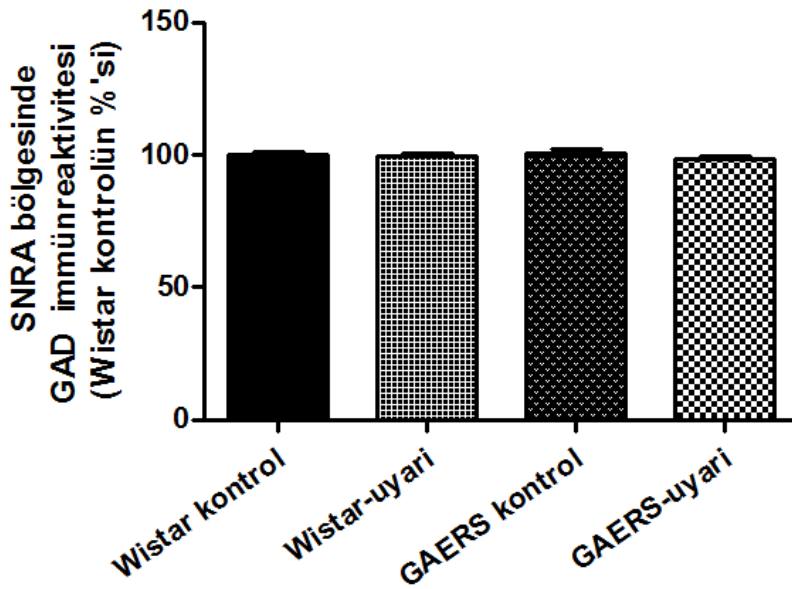
3.3. GAERS ve Wistar sıçanlarda SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} bölgelerinde GABA_Aerjik aktivitenin GAD67 immünhistokimyasal yöntemi ile değerlendirilmesi:

GAD67 immünhistokimya boyamaları için ard-deşarj eşiğinde günde 2 kez olmak üzere 3 gün boyunca elektriksel uyarı alan GAERS ve Wistar hayvanlar ile yalancı-opere GAERS ve Wistar hayvanlardan oluşan setler kullanıldı. GAD67 immünhistokimyasal boyaması 7 set hayvanda yapıldı ve sonuçlar densitometrik olarak analiz edildi. Her bir setteki kontrol hayvanı olan yalancı-opere Wistar sıçan referans olarak alındı ve setteki diğer hayvanların analiz sonuçları referans hayvanın analiz sonuçlarına göre doğrulandı.

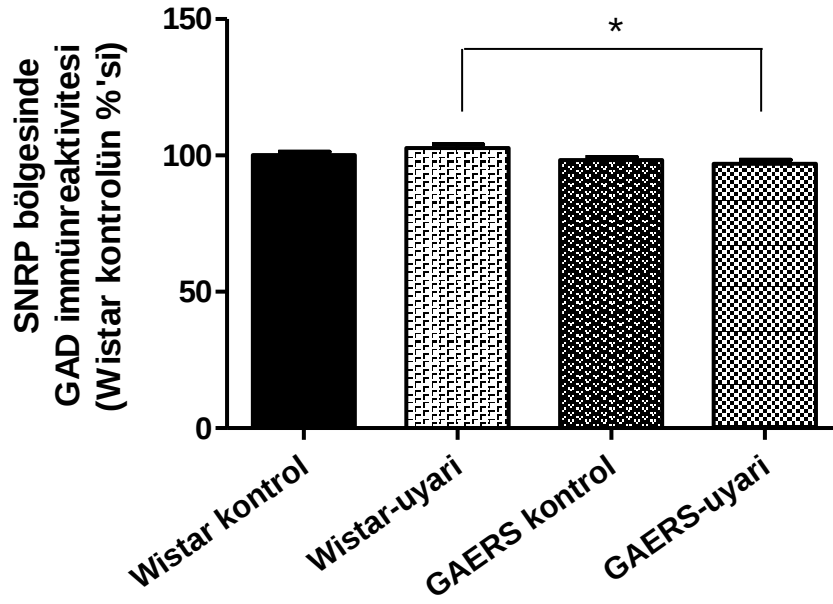
Genetik olarak absans epilepsili sıçanlar olan ve *kindling* direnci gösteren GAERS'ler ile epileptik olmayan Wistar sıçanların kontrol hayvanlarının karşılaştırılması sonucunda

Wistar ve GAERS kontrol hayvanları arasında $SNR_{anterior}$ ya da $SNR_{posterior}$ bölgelerindeki GAD67 immünreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterildi (Şekil 7-8, Resim 5-6).

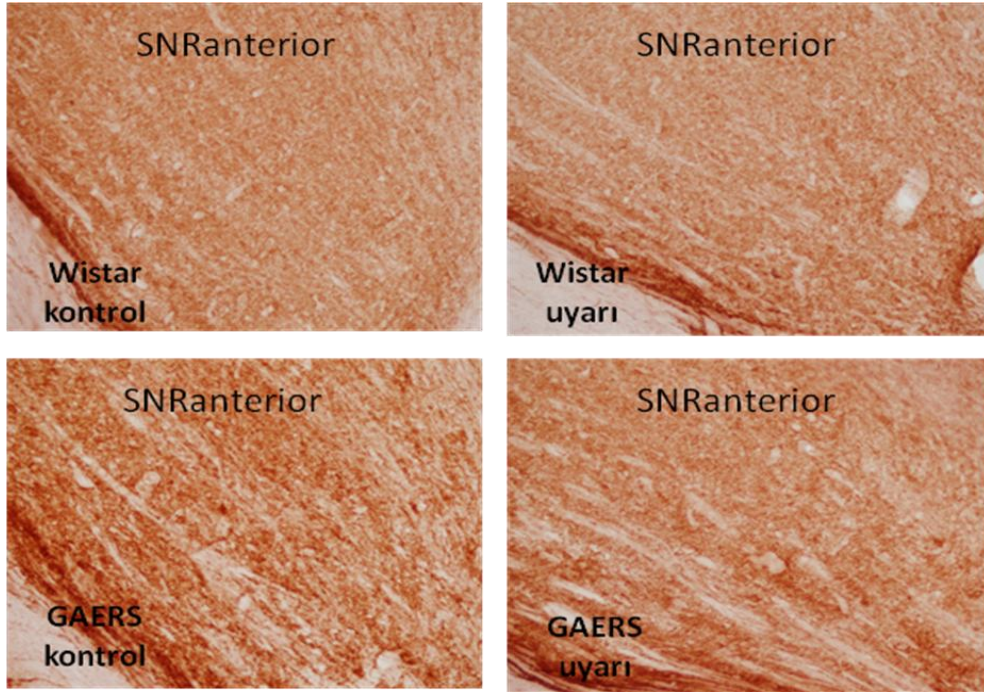
GAERS ya da Wistar hayvanlarda BLA'ya uygulanan elektriksel uyarının $SNR_{anterior}$ bölgesindeki GAD67 immünoreaktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 7). GAERS ya da Wistar hayvanlarda BLA'ya uygulanan elektriksel uyarının $SNR_{posterior}$ bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında ise Wistar-uyarı grubu ile GAERS-uyarı grubu arasında GAD67 immünreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (Şekil 8).



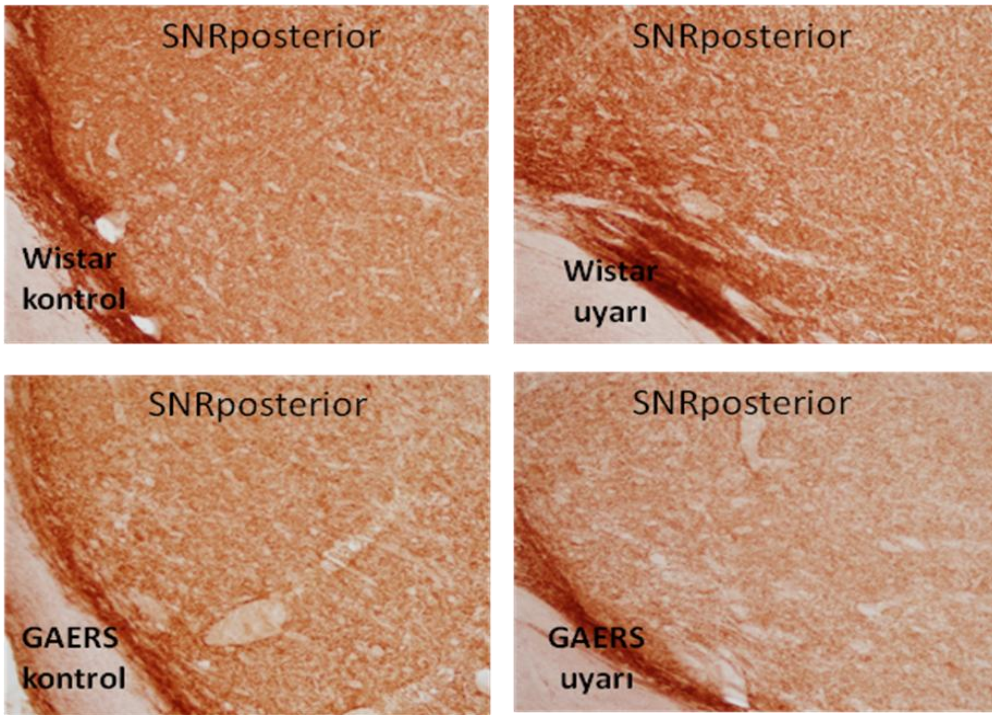
Şekil 7. $SNR_{anterior}$ bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi. SNRA: $SNR_{anterior}$ Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplara tek yönlü ANOVA uygulandı.



Şekil 8. SNR_{posterior} bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi. SNRP: SNR_{posterior}. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplara tek yönlü ANOVA ve Bonferroni posthoc testi uygulandı, *, $p<0.05$.



Resim 5. SNR_{anterior} bölgesindeki GAD67 immunreaktivitesinin kontrol ve uyarı gruplarında gösterilmesi (200X).



Resim 6. SNR_{posterior} bölgesindeki GAD67 immunreaktivitesinin kontrol ve uyarı gruplarında gösterilmesi (200X).

3.4. GAERS ve Wistar sıçanlarda $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinde GABAerjik nöronların GABA immün-altın immünositokimyası ve elektron mikroskopisi ile değerlendirilmesi

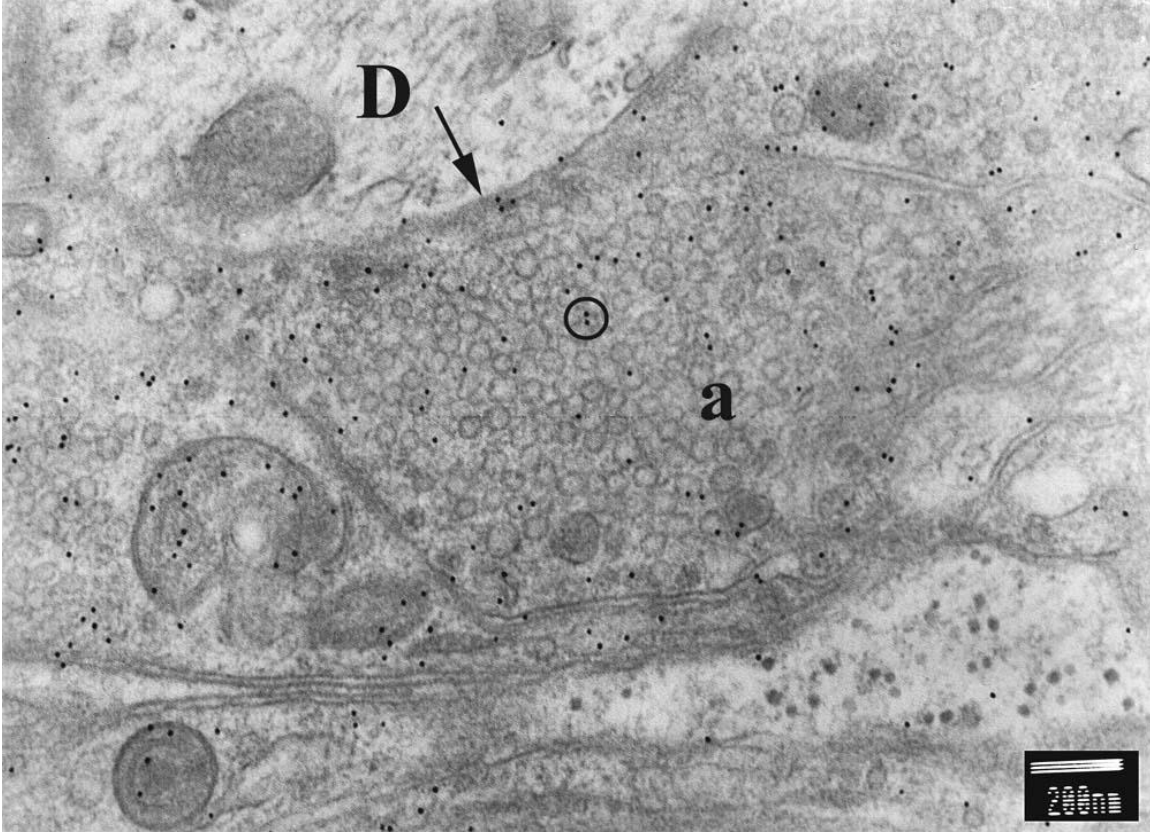
Elektron mikroskopik düzeydeki gözlemler Wistar ve GAERS $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinin izole edilerek GABA immünositokimya tekniğinin kullanımına ve niceliksel analizine dayanmaktadır.

Wistar kontrol grubu

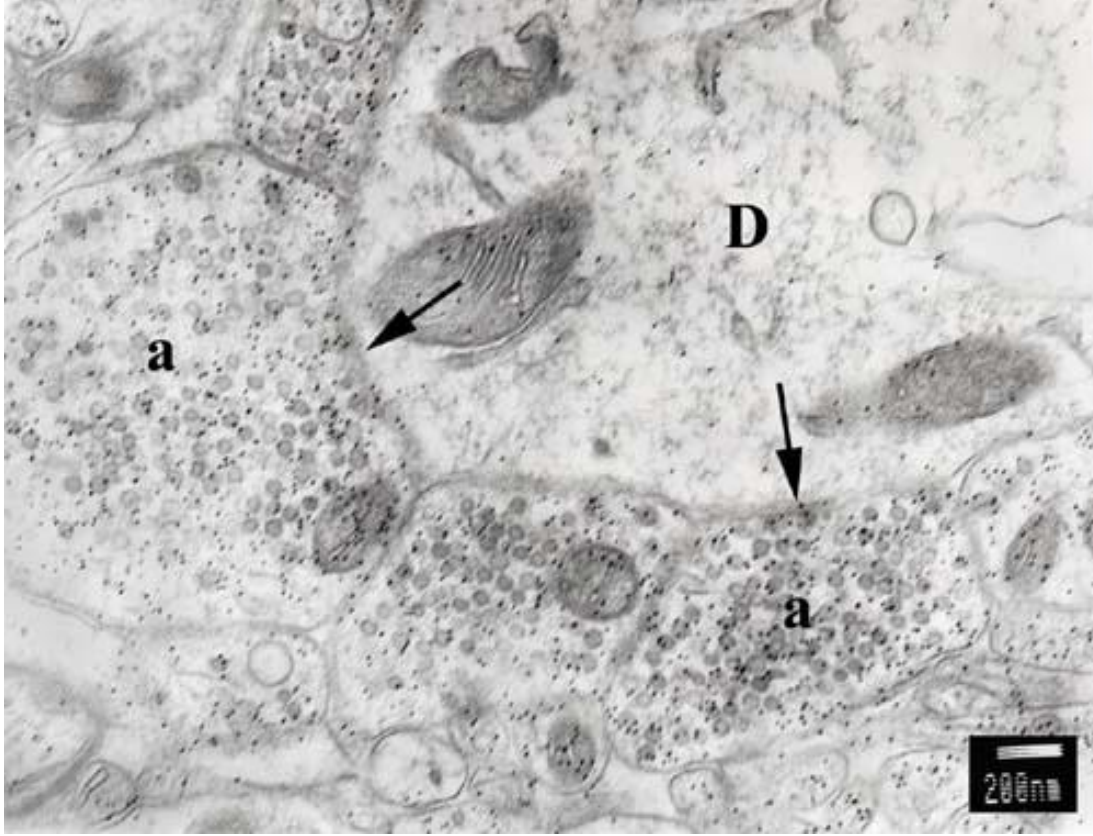
$SNR_{anterior}$ (Resim 7) ve $SNR_{posterior}$ (Resim 8) bölgelerindeki GABAerjik terminaller 10 nm çaplı altın partikülleri içermeleriyle diğer nonGABAerjik terminallerden ayırt edildi. GABAerjik akson terminallerinin dendrit gövdeleriyle sinaps yaptığı gözlemlendi. GABA immün-işaretlenmesi terminal içerisinde bulunan vezikül zarlarında, vezikül içinde, terminal sitoplazmasında ve mitokondrilerde görüldü. GABA ayrıca dendritler üzerinde de izlendi.

Wistar kontrol grubunda $SNR_{anterior}$ bölgesindeki akson terminali ortalama alanı $1,1 \pm 0,1 \mu m^2$ olarak ve ortalama net GABA yoğunluğu $119,7 \pm 27,0$ partikül/ μm^2 olarak bulundu. Net GABA yoğunluğu terminal GABA yoğunluğundan kapiller GABA yoğunluğu çıkarılarak elde edildi.

Wistar kontrol grubunda $SNR_{posterior}$ bölgesindeki akson terminali ortalama alanı $0,9 \pm 0,1 \mu m^2$ olarak ve ortalama net GABA yoğunluğu $142,2 \pm 47,0$ partikül/ μm^2 olarak bulundu.



Resim 7. Wistar kontrol grubu SNR_{anterior} bölgesinde normal yapıda GABA pozitif (o) akson terminali (a). D: dendrit, ok: aksodendritik sinaps.



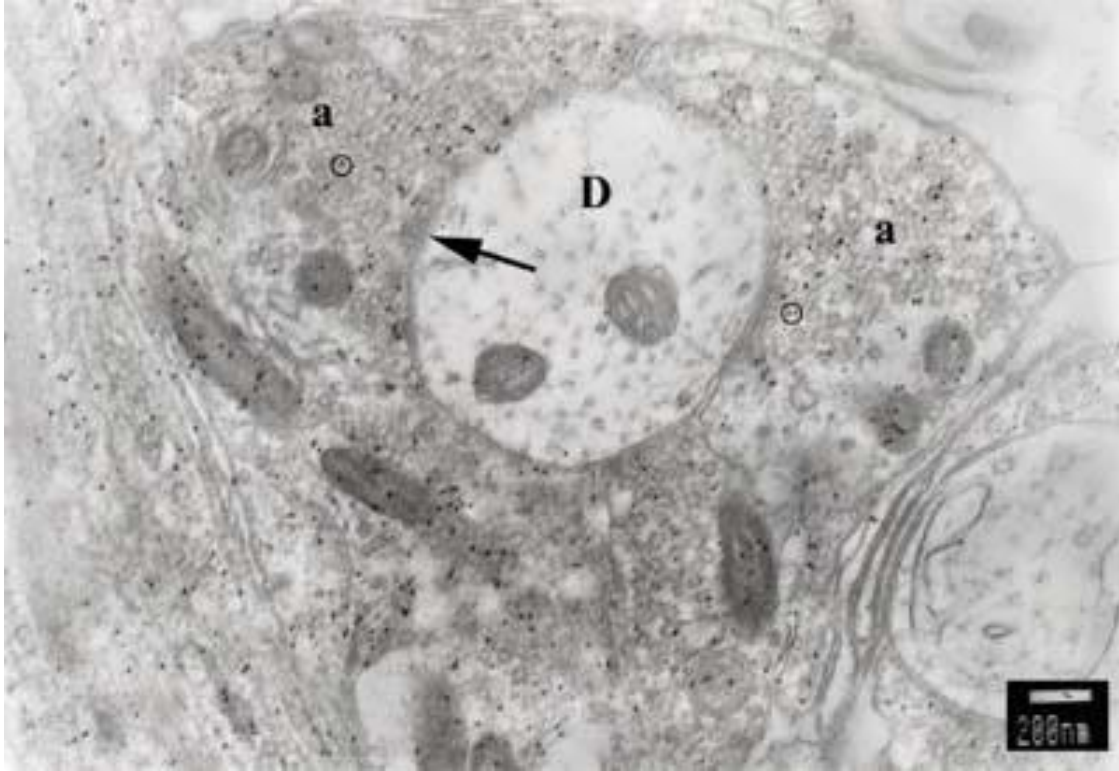
Resim 8. Wistar kontrol grubu $SNR_{posterior}$ bölgesinde normal yapıda GABA pozitif (o) akson terminalleri (a). D: dendrit, a: akson terminali, ok: aksodendritik sinaps.

GAERS kontrol grubu

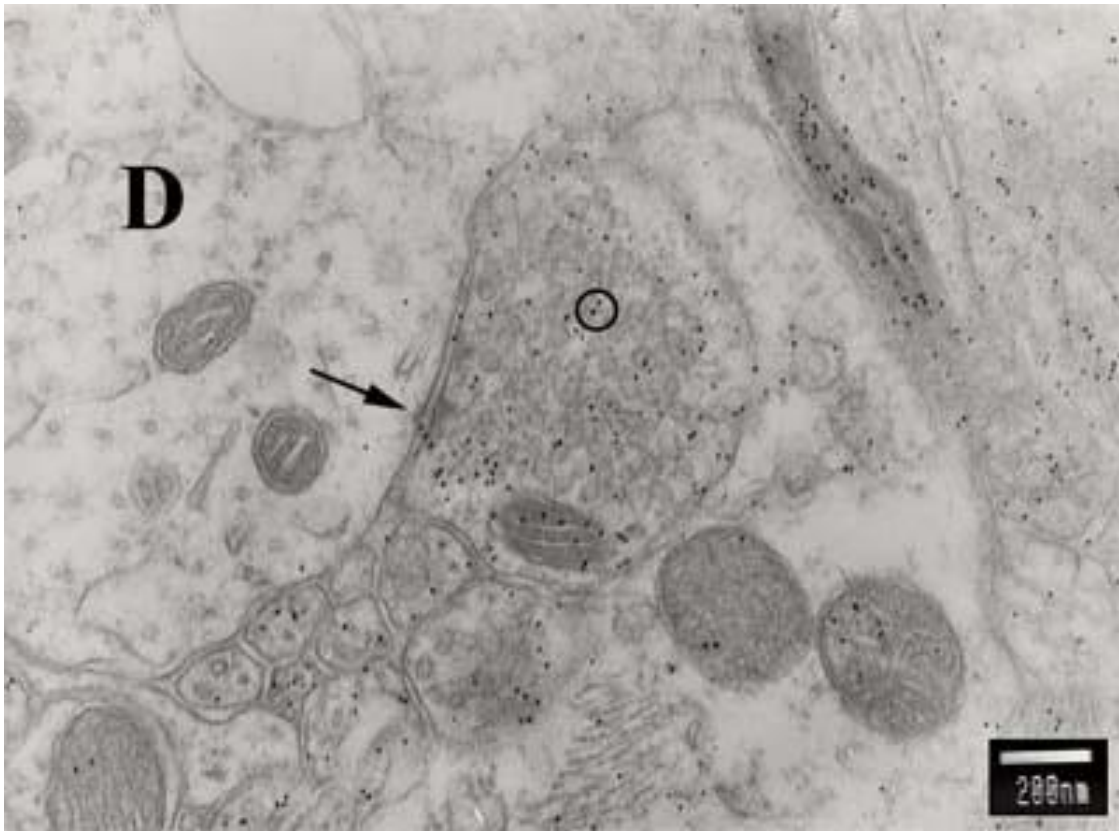
Wistar kontrol grubunda olduğu gibi, GAERS kontrol grubunda da $SNR_{anterior}$ (Resim 9) ve $SNR_{posterior}$ (Resim 10) bölgelerindeki GABAerjik terminaller 10 nm çaplı altın partikülleri içermeleriyle diğer nonGABAerjik terminallerden ayırt edildi. GABAerjik akson terminallerinin dendrit gövdeleriyle sinaps yaptığı gözlemlendi. GABA immün-işaretlenmesi terminal içerisinde bulunan vezikül zarlarında, vezikül içinde, terminal sitoplazmasında ve mitokondrilerde görüldü. GABA ayrıca dendritler üzerinde de izlendi.

GAERS kontrol grubunda $SNR_{anterior}$ bölgesindeki akson terminali ortalama alanı $0,9 \pm 0,1 \mu m^2$ olarak ve ortalama net GABA yoğunluğu $149,8 \pm 36,8$ partikül/ μm^2 olarak bulundu. Net GABA yoğunluğu terminal GABA yoğunluğundan kapiller GABA yoğunluğu çıkarılarak elde edildi.

GAERS kontrol grubunda $SNR_{posterior}$ bölgesindeki akson terminali ortalama alanı $0,8 \pm 0,1 \mu m^2$ olarak ve ortalama net GABA yoğunluğu $164,5 \pm 22,7$ partikül/ μm^2 olarak bulundu.

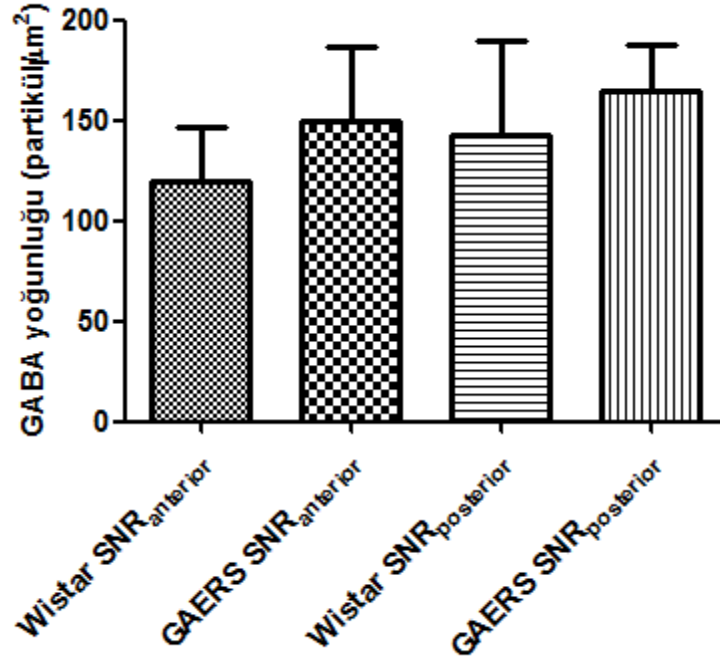


Resim 9. GAERS kontrol grubu $SNR_{anterior}$ bölgesinde normal yapıda GABA pozitif (o) akson terminalleri. D: dendrit, ok: aksodendritik sinaps.



Resim 10. GAERS kontrol grubu $SNR_{posterior}$ bölgesinde normal yapıda GABA pozitif (o) akson terminali. D: dendrit, ok: aksodendritik sinaps.

GAERS kontrol grubunda bazal GABA değerlerinin hem $SNR_{anterior}$ hem de $SNR_{posterior}$ bölgelerinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılık tespit edilmedi (Şekil 9).



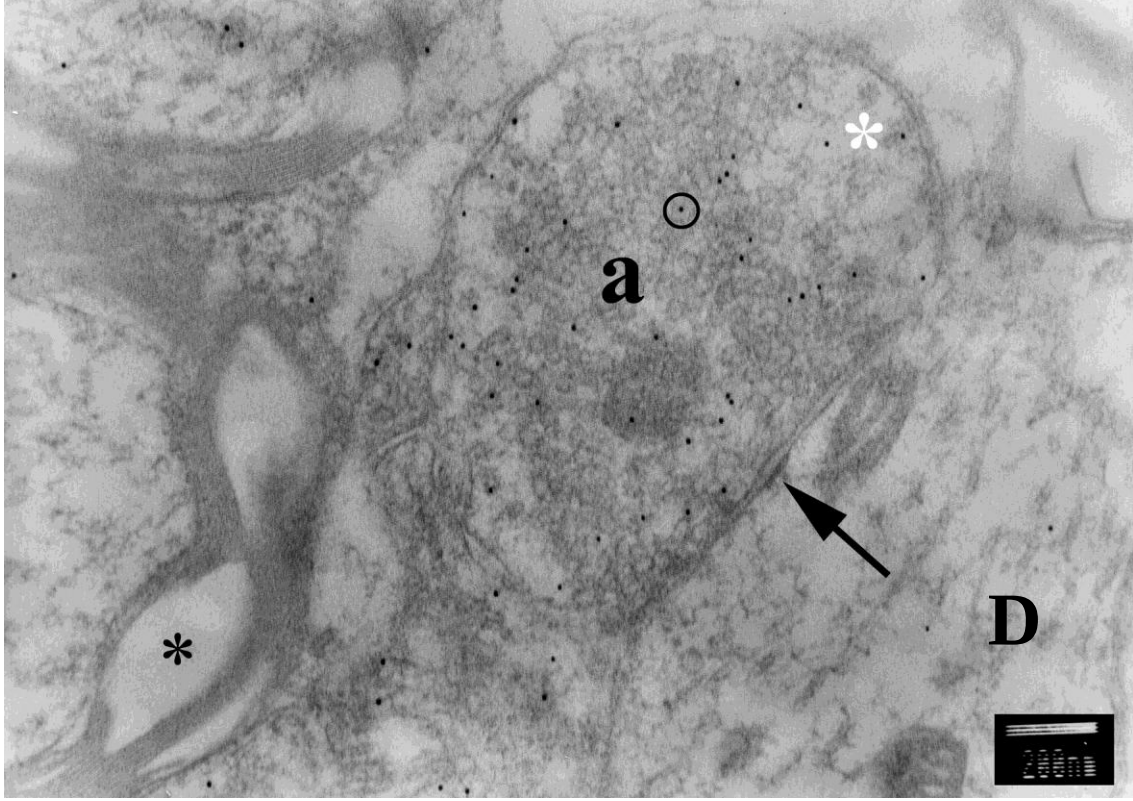
Şekil 9. Wistar ve GAERS kontrol gruplarında $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgeleri GABAerjik akson terminallerindeki GABA yoğunluğunun karşılaştırılması. ($p>0,05$).

Wistar-uyarı grubu

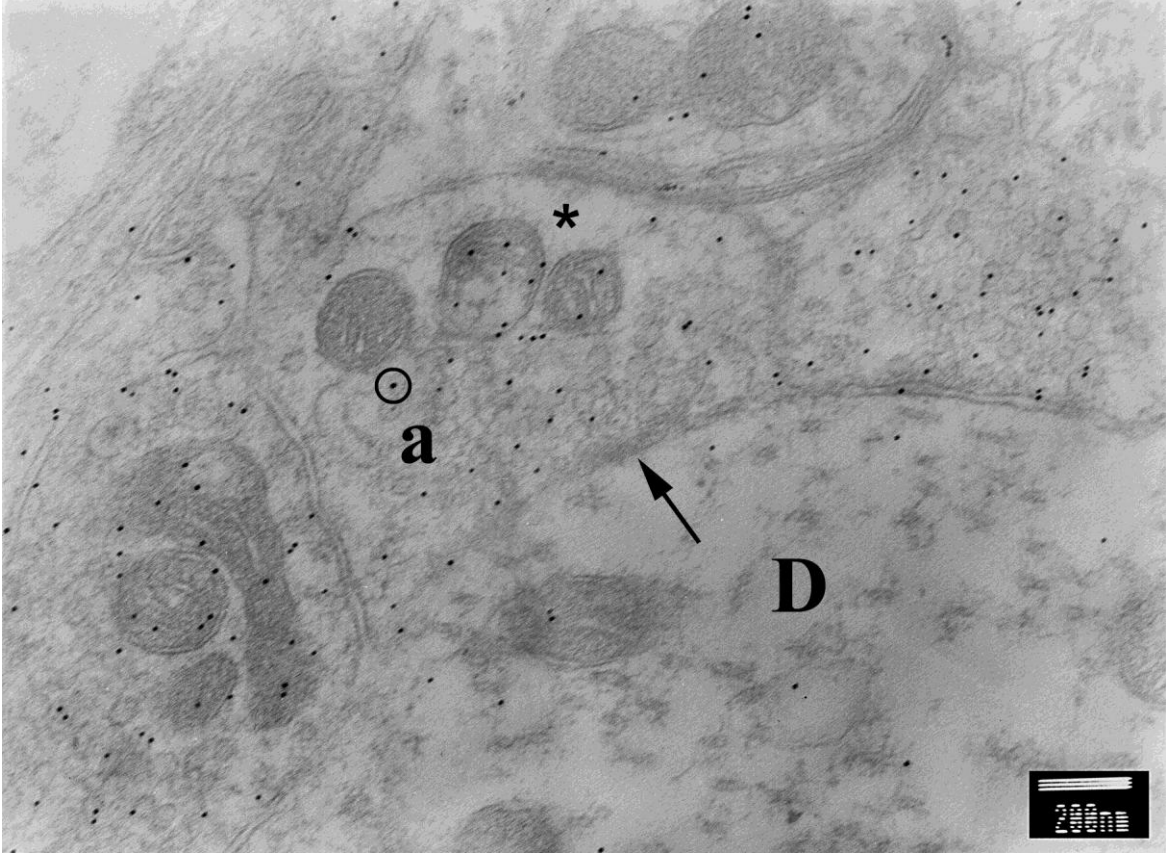
Kindling uygulanan Wistar sıçanlarda da Wistar kontrol sıçanlardakine benzer şekilde $SNR_{anterior}$ (Resim 11) ve $SNR_{posterior}$ (Resim 12) bölgelerindeki GABAerjik terminaller 10 nm çaplı altın partikülleri içermeleriyle diğer nonGABAerjik terminallerden ayırt edildi. GABAerjik akson terminallerinin dendrit gövdeleriyle sinaps yaptığı gözlemlendi. GABA immün-ışaretleme terminali içerisinde bulunan vezikül zarlarında, vezikül içinde, terminal sitoplazmasında ve mitokondrilerde görüldü. GABA ayrıca dendritler üzerinde de izlendi. Akson terminalleri içerisinde vezikül kaybı olduğu izlendi (Resim 11, 12).

Wistar-uyarı grubunda $SNR_{anterior}$ bölgesindeki akson terminali ortalama alanı $0,9\pm0,1 \mu m^2$ olarak ve ortalama net GABA yoğunluğu $133,9\pm43,7$ partikül/ μm^2 olarak hesaplandı. Net GABA yoğunluğu terminal GABA yoğunluğundan kapiller GABA yoğunluğu (Resim 13) çıkarılarak elde edildi.

Wistar-uyarı grubunda $SNR_{\text{posterior}}$ bölgesindeki akson terminali ortalama alanı $0,9 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ olarak ve ortalama net GABA yoğunluğu $147,5 \pm 27,2$ partikül/ μm^2 olarak hesaplandı.

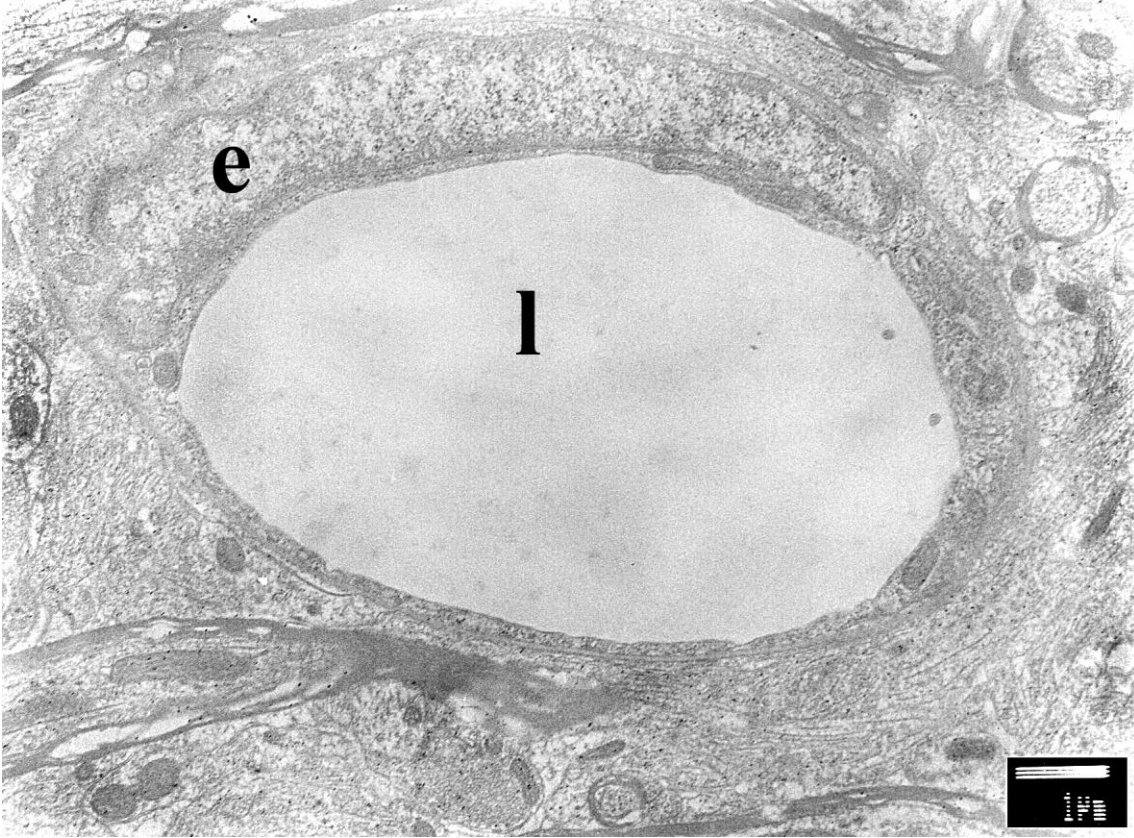


Resim 11. Wistar-uyarı grubu SNR_{anterior} bölgesinde dendrit (D) ile sinaps (ok) yapan GABA immün-reaktif (o) akson terminali (a). Siyah asterisk: Myelin kılıfında ayrılma, beyaz asterisk: terminal içinde vezikül kaybı.



Resim 12. Wistar-uyarı grubunda SNR_{posterior} bölgesinde dendrit (D) ile sinaps (ok) yapan GABA immün-reaktif (o) akson terminali (a). Asterisk: terminal içinde vezikül

kaybı.



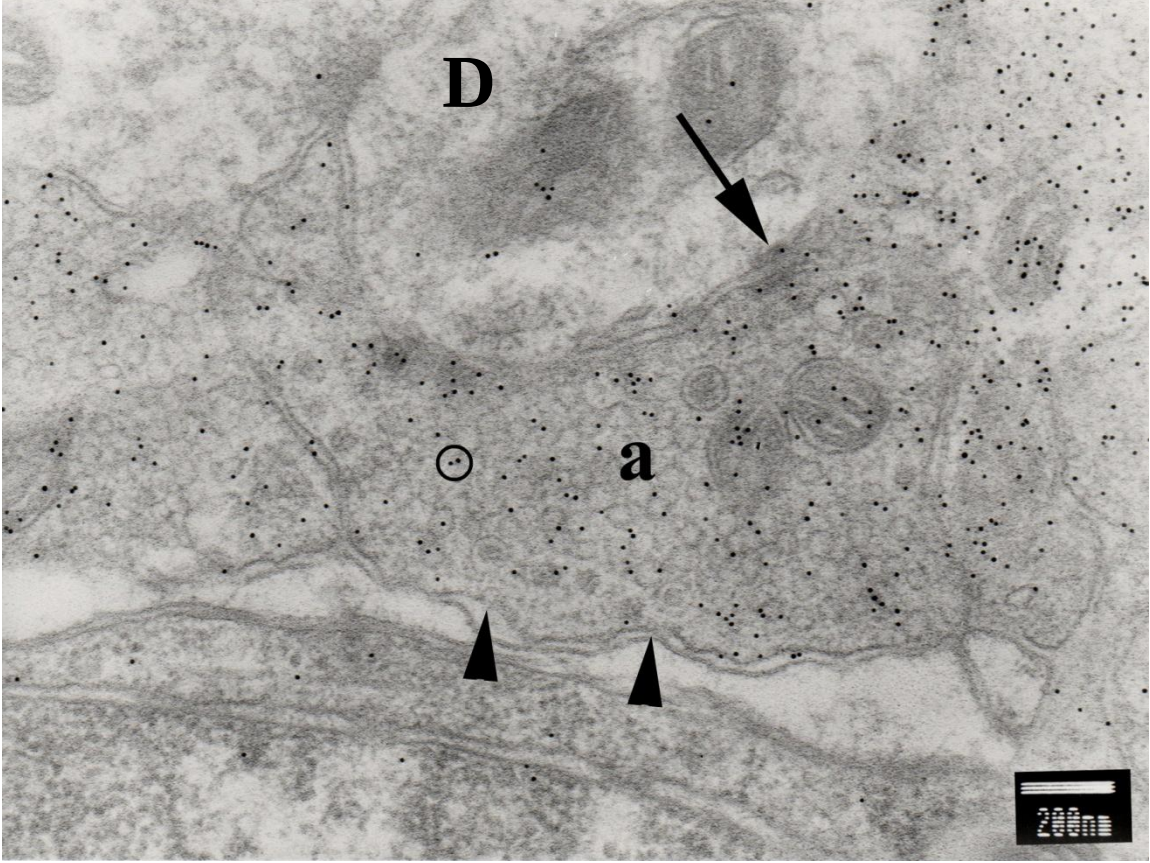
Resim 13. Wistar-uyarı grubunda $SNR_{anterior}$ bölgesinde arka plan immün-boyanmayı hesaplamak için kullanılan bir kapiller. E: Endotel hücresi nükleusu, l: kapiller lümeni.

GAERS-uyarı grubu

Kindling uygulanan GAERS sıçanlarda da GAERS kontrol sıçanlarda olduğu gibi, $SNR_{anterior}$ (Resim 14) ve $SNR_{posterior}$ (Resim 15) bölgelerindeki GABAerjik terminaller 10 nm çaplı altın partikülleri içermeleriyle diğer nonGABAerjik terminallerden ayırt edildi. GABAerjik akson terminallerinin dendrit gövdeleriyle sinaps yaptığı görüldü. Diğer gruplarda olduğu gibi, GABA immün-işaretlenmesi terminal içerisinde bulunan vezikül zarlarında, vezikül içinde, terminal sitoplazmasında ve mitokondrilerde görüldü. GABA ayrıca dendritler üzerinde de izlendi. Bazı akson terminallerinde zar yapısında bozulma (Resim 14) görüldü ve vezikül kaybı (Resim 15) izlendi.

GAERS-uyarı grubunda $SNR_{anterior}$ bölgesindeki akson terminali ortalama alanı $0,9 \pm 0,1 \mu m^2$ olarak ve ortalama net GABA yoğunluğu $132,7 \pm 38,1$ partikül/ μm^2 olarak bulundu. Net GABA yoğunluğu terminal GABA yoğunluğundan kapiller GABA yoğunluğu (Resim 16) çıkarılarak elde edildi.

GAERS-uyarı grubunda $SNR_{\text{posterior}}$ bölgesindeki akson terminali ortalama alanı $0,9 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ olarak ve ortalama net GABA yoğunluğu $158,5 \pm 44,2$ partikül/ μm^2 olarak bulundu.



Resim 14. GAERS-uyarı grubu SNR_{anterior} bölgesinde dendrit (D) ile sinaps (ok) yapan GABA immün-reaktif (o) akson terminali (a). Ok başı: Terminal zarında düzensizlikler.

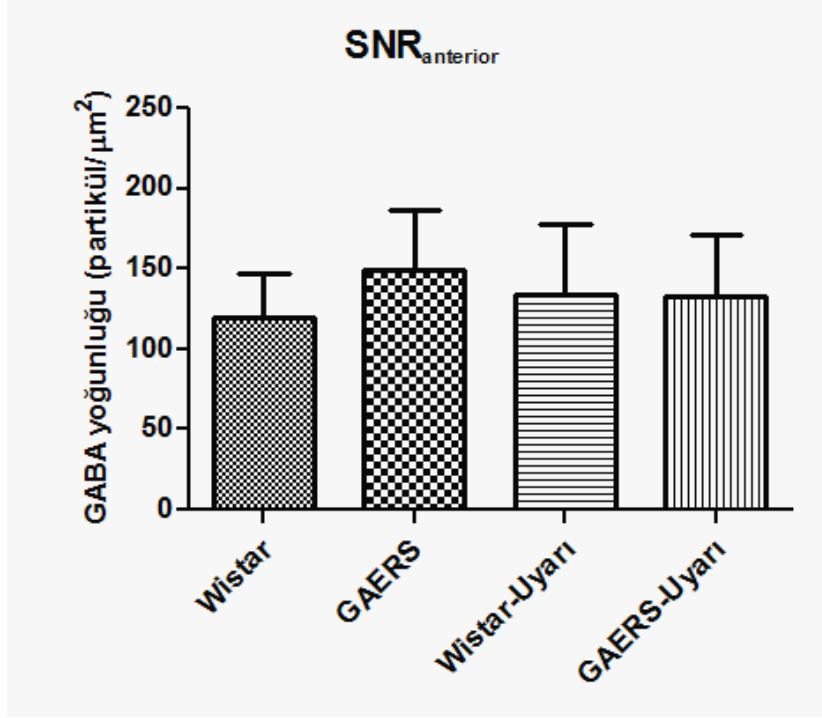


Resim 15. GAERS-uyarı grubu $SNR_{posterior}$ bölgesinde dendrit (D) ile sinaps (ok) yapan GABA immün-reaktif akson terminali. Asterisk: Terminal içinde vezikül kaybı. V: Terminal ortasında toplanmış sinaptik veziküller.

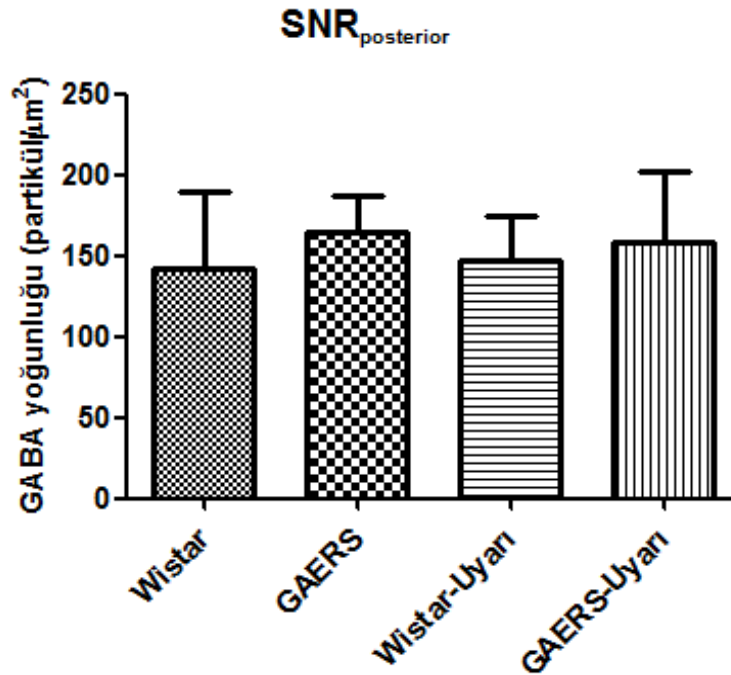


Resim 16. GAERS-uyarı grubunda $SNR_{anterior}$ bölgesinde arka plan immün-boyanmayı hesaplamak için kullanılan bir kapiller. E: Endotel hücresi nükleusu, l: kapiller lümeni.

$SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinde gruplar arasında akson terminali net GABA yoğunluğu karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görüldü (Şekil 10,11). Benzer şekilde, $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinde Wistar-uyarı ve GAERS-uyarı gruplarında GABA yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.



Şekil 10. $SNR_{anterior}$ bölgesinde GABAerjik akson terminallerindeki GABA yoğunluğunun karşılaştırılması ($p>0,05$).



Şekil 11.

$SNR_{posterior}$

bölgesinde GABAerjik akson terminallerindeki GABA yoğunluğunun karşılaştırılması ($p>0,05$).

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmanın ana sonuçları şunlardır; (1) $SNR_{posterior}$ bölgesinin çift taraflı olarak lidokain enjeksiyonu ile baskılanmasını takiben verilen uyarılarla GAERS'ler evre 3'e ve müteakiben 22 uyarı sonunda evre 5'e ulaştılar. Buna karşın, $SNR_{anterior}$ bölgesinin çift taraflı olarak lidokain enjeksiyonu ile baskılanmasını takiben GAERS'lere *kindling* uyarısı verildi ve 22 uyarı sonunda tüm hayvanlar evre 2'de kaldılar. (2) Wistar ve GAERS kontrol (yalancı-opere) hayvanları arasında $SNR_{posterior}$ bölgesinde TH immünreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. (3) GAERS ve Wistar hayvanlarda BLA'ya uygulanan elektriksel uyarının $SNR_{posterior}$ bölgesindeki TH aktivitesini kontrol gruplarına göre anlamlı derecede arttırdığı saptandı. (4) Wistar ve GAERS kontrol (yalancı-opere) hayvanları arasında $SNR_{anterior}$ ya da $SNR_{posterior}$ bölgelerinde GAD67 immünreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterildi. (5) BLA bölgesine elektriksel uyarı verilen GAERS-uyarı ve Wistar-uyarı grupları arasında $SNR_{posterior}$ bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edildi. (6) Elektron mikroskopik düzeyde Wistar ve GAERS hayvanlardan oluşan tüm gruplar arasında $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinde GABA immünreaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

SNR'nin epilepsi nöbetleri üzerindeki düzenleyici etkisi için SNR'de yer alan GABA-sensitif nöronlar önemli bir role sahiptir. Bu nöronların sıçanlarda çeşitli şekillerde indüklenen klonik nöbetlere karşı duyarlılığı düzenlediği bir çok çalışma tarafından raporlanmıştır (Bloms-Funke ve Löscher, 1996; Boda ve Szente, 1992; Bonhaus vd., 1986; Depaulis vd., 1994; Gale, 1985; McNamara vd., 1984; Meurs, 2006; Moshé ve Sperber, 1990; Velíšková vd., 1996; Zhang ve Rosenberg, 1989). SNR aktivasyonu ile epileptik nöbetlerin ortaya çıkışının kolaylaştığı bildirilmiştir (Redgrave vd., 1992a;1992b). SNR bölgesindeki dopamin aktivitesini araştıran bir çalışmada striato-nigral ya da pallido-nigral afrenetlerden serbestleşen dopaminin SNR nöronlarını tonik GABAerjik inhibisyondan çıkardığı vurgulanmıştır (Windels ve Kiyatkin, 2006). Böylece SNR'nin hedef bölgeleri üzerindeki inhibe edici etkisinin azaldığı düşünülebilir. Elektrokonvulsif nöbet geçiren sıçanlarda yapılan bir diğer çalışmada ise amigdala, nükleus kaudatus, anterior korteks, ventral tegmental alan ve SN'deki TH aktivitesi son nöbetten bir gün sonra değerlendirilmiş ve anterior korteks haricindeki alanlarda TH aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Leviel vd., 1990).

Bizim çalışmamızda BLA'ya uygulanan elektriksel uyarı sonucu indüklenen epilepsi nöbetleri ile hem $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinde ortaya çıkan dopaminerjik ve

GABAerjik aktivite değişiklikleri, hem de *kindling* direnci olduğu daha önceki çalışmalarımızda gösterilmiş olan GAERS'lerin SNR bölgelerindeki dopaminerjik ve GABAerjik aktivitenin non epileptik sıçanlar olan Wistar'lardan farklı olup olmadığı araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre non epileptik Wistar sıçanlar ile GAERS'ler arasında bazal TH ya da bazal GAD67 immünreaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Elektriksel uyarı alan tüm gruplarda ise SNR_{posterior} bölgesinde yer alan dopaminerjik nöronlardaki aktivitede bir artış olduğu tespit edilmiştir. SNR_{posterior} bölgesinin prokonvülsan özellik gösterdiği dikkate alındığında bu bölgedeki dopaminerjik aktivitede artma olması, SNR'nin aktivitesinin artmasına ve dolayısıyla nöbetlerin ortaya çıkmasına yol açıyor olabilir. O nedenle elektriksel uyarı ile indüklenen limbik nöbet sonucu TH aktivitesinde saptanan artış, hayvanların limbik nöbet davranışı göstermesi ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Yetişkin sıçanda SNR'nin nöbetlerin yayılmasında ve kontrolünde farklı etkilere yol açabilen SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} adlı iki ayrı bölge içerdiğini gösteren deliller mevcuttur. Nöbetin başlamasında ve yayılmasında SNR_{posterior} bölgesinin (Velíšková vd., 2005), nöbetin sona ermesinde ise SNR_{anterior} bölgesinin önemli olduğu düşünülmektedir. En geçerli ve en yaygın olan teori, klonik nöbet süresince striatonigral terminallerden GABA salınımının artarak SNR nöronlarını baskılaması ve SNR'nin eferent bağlantıları üzerinde meydana gelen disinhibisyon ile devam eden nöbetin durmasıdır (Velíšková vd., 2005; Velíšková ve Moshé, 2006). SNR_{anterior}'da yer alan GABAerjik nöronların aktivitesinin azaltılması nöbetlerin hafiflemesine yol açmaktadır. Freichel ve arkadaşlarının *kindling* sırasında SNR'deki GABA düzeyini araştırdığı bir çalışmada son uyarıdan 6 hafta sonra sayım yapılarak ölçülen SNR GABA nöron yoğunluğunun *kindling* öncesine göre farklı olmadığı gösterilmiştir. Ekibin daha önceki çalışmalarında saptanan GAD ve GABA düzeylerindeki azalmanın *kindling*'in SNR'deki GABAerjik nöronlardan daha çok striatumdan ya da globus pallidusdan SNR'ye uzanan GABAerjik projeksiyonları etkileyerek ortaya çıktığına dikkat çekilmiştir (2004).

Bizim sonuçlarımızda ise GAERS ya da Wistar hayvanlarda BLA'ya uygulanan elektriksel uyarının SNR_{anterior} bölgesindeki GAD67 immünoreaktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında, Wistar kontrol grubu ile Wistar-uyarı grubu ya da Wistar kontrol grubu ile GAERS-uyarı grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Ancak analizi yapılan GAD67 immünreaktivitesinin SNR'nin GABAerjik nöronlarından mı yoksa projeksiyonlarından mı kaynaklandığı araştırılmamıştır. Aynı zamanda GAERS kontrol ve Wistar kontrol grupları arasında da SNR_{anterior} bölgesindeki GAD67 immünoreaktivitesi bakımından bir farklılık olmadığı görülmüştür. SNR_{posterior} bölgesi ise GAD67 immünreaktivitesi analizinde elektriksel uyarı alan GAERS ve Wistar sıçanlar arasında farklılık göstermiştir. GAERS-uyarı grubu ile Wistar-uyarı grubu arasında SNR_{posterior}

bölgesindeki GAD67 aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu, Wistar-uyarı grubunda elektriksel uyarı ile SNR_{posterior} bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesinde bir artış olurken, GAERS-uyarı grubunun SNR_{posterior} bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesinde bir azalma olduğu belirlenmiştir. GAERS'lerde görülen *kindling* rezistansı prokonvülsif olarak düşünülen SNR_{posterior} bölgesinde GAERS-uyarı grubunda görülen GABAerjik aktivite farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Wistar sıçanlarda BLA'ya uygulanan elektriksel uyarı ile SNR_{posterior} bölgesindeki GABAerjik aktivitenin artmış olması SNR'nin hedef bölgeler üzerindeki inhibe edici etkisinin artmasına ve dolayısıyla konvülsan nöbetlerin ortaya çıkmasının kolaylaşmasına neden oluyor olabilir. GAERS'lerde ise BLA'ya uygulanan elektriksel uyarı ile SNR_{posterior} bölgesindeki GABAerjik aktivitenin azalması ile SNR'nin konvülsan epilepsi nöbetleri üzerindeki koruyucu etkisi sonucunda ortaya çıkıyor olabilir. GAERS'lerde Wistar sıçanlardan farklı olarak SNR'nin epilepsi nöbetleri üzerindeki baskılayıcı mekanizması BLA'ya uygulanan elektriksel uyarı ile GAERS'lerin SNR_{posterior} bölgesindeki GAD67 aktivitesinde ortaya çıkan farklılıktan ötürü daha ön planda yer alıyor olabilir. Ayrıca elektriksel uyarı alan GAERS'lerde SNR_{posterior} bölgesindeki GABAerjik aktivitenin azalması ile SNR'nin hedef bölgeleri üzerindeki inhibe edici etkisinin ortadan kalkması ve disinhibisyon ile talamik nükleusların ya da superior kollikulusun aktive olması GAERS'lerde konvülsif epilepsi nöbetlerinin ortaya çıkmasını engellemede rol alıyor olabilir.

Daha önce yapılan bir çalışmada 1-10 aylık WAG/Rij sıçanlarda SN bölgesinin hücresel içeriği araştırılmıştır (Sitnikova vd., 2012). Bu bölgede daha az sayıda nöron içeren hayvanların daha az, daha fazla nöron içeren hayvanların ise daha fazla absans nöbeti geçirdiği saptanmıştır. SN bölgesindeki nöronların azalmasının absans nöbeti gelişimini önlemek için adaptif bir süreç olduğu sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızda da ise genetik absans epilepsili GAERS suşu hayvanlar kullanılmış ve GAERS kontrol grubunda bazal GABA'nın hem SNR_{anterior} hem de SNR_{posterior} bölgelerinde istatistiksel farklılık bulunmamıştır. Yukarıdaki çalışmanın bulguları ışığında düşünüldüğünde, her 2 genetik absans epilepsi modelinde farklı sonuçların bulunması farklı poligenik özelliklerinin sonucu olabilir (Jones vd., 2011; Rudolf vd., 2000).

Castillo vd. (2006) yaptıkları çalışmalarında sıçanların SN bölgesine GABAerjik hücre transplante etmişler ve kainik asit uygulamışlardır (Claudia vd., 2008). Transplantasyon grubunda 5. derece nöbete ulaşmak için daha fazla zaman ve daha fazla dozda kainik asit ihtiyacı doğduğu ve bu hayvanlarda daha az 5. derece nöbet görüldüğünü izlemişlerdir. Araştırmacılar GABA üreten hücrelerin intranigral transplantasyonunun kainik asit ile indüklenen nöbetlerin azalmasını sağlayabileceği sonucuna varmışlardır. Castillo vd. (2010) genetik absans epilepsi modelinde yaptıkları bir çalışmada GABA üreten hücrelerin intranigral transplantasyonunun absans nöbetlerini azaltıp azaltmadığını incelemişler, ancak

transplantasyonun absans nöbetlerini azaltmada etkisiz kaldığını gözlemişlerdir. Diğer çalışmalarda fetal GABAerjik hücrelerin veya immortalize GABAerjik hücrelerin intranigral transplantının *kindling* veya pilokarpin modellerinde epileptik nöbetlerin şiddetini azalttığı gösterilmiştir (Loscher vd., 1998; Thompson vd., 2004). Bizim çalışmamızda da GAERS kontrol grubunda SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} bölgelerinde bazal GABA'da farklılık bulmadık ve ancak biz çalışmamızda intranigral transplantasyon gerçekleştirmedik. GAERS'lerde görülen *kindling* direncinde GABA üreten hücrelerin nigral transplantasyonunun etkisinin saptanmasının ileri bir hedef olabileceğini düşünmekteyiz.

Nöbet başlangıcında hemen önce SNR_{posterior} bölgesinde deoksiglukoz alımında artış olduğu bildirilmiş ve bu bölge nöbet yayılımı için ana giriş olarak düşünülmüştür (Velíšková vd., 2005). Çalışmamızda SNR_{posterior} bölgesinde hem GAERS kontrol, hem de Wistar kontrol gruplarında terminallerdeki bazal GABA değerleri açısından farklılık saptamadık. Ancak SNR_{posterior} bölgesindeki GAD67 aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu, Wistar-uyarı grubunda elektriksel uyarı ile SNR_{posterior} bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesinde bir artış olurken, GAERS-uyarı grubunun SNR_{posterior} bölgesindeki GAD67 immünreaktivitesinde bir azalma olduğu belirlenmiştir. GAERS'lerde görülen *kindling* rezistansı prokonvülsif olarak düşünülen SNR_{posterior} bölgesinde GAERS-uyarı grubunda görülen GABAerjik aktivite farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışmanın tüm sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} bölgelerinin absans epilepsisi ile temporal lob epilepsisi arasındaki karşılıklı etkileşimde önemli bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu proje, adigeçen 2 tip epilepsi arasındaki karşılıklı zıt yönlü etkileşimde hangi beyin bölgelerinin önemli olduğuna dair ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır ve ileride yapılacak olan araştırmalar bu bulguların ışığı altında tasarlanacaktır. Uluslararası dergilerde yayımlanacak olan bu sonuçlar epilepsinin mekanizmaları ve antiepileptogenez konusundaki bilgi birikimine önemli bir katkı sağlayacaktır. İleride tasarlanacak olan çalışmalarda, SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} bölgelerinin diğer absans epilepsi modellerinde de *kindling* direncinde önemli bir yapı olup olmadığının ortaya konması bilgi birikimini ileriye taşıyacaktır. Ayrıca hem GAERS'lerde hem de diğer absans epilepsi modellerinde *kindling* nöbet aktivitesi sırasında SNR_{anterior} ve SNR_{posterior} bölgelerinin elektrofizyolojik özelliklerinin incelenmesi uygun olacak ve epilepsinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması açısından önem taşıyacaktır.

5. Referanslar

- Akakin, D., Sirvanci, S., Gurbanova, A., Aker, R., Onat, F., San T. 2011. "Ultrastructural GABA immunocytochemistry in the mossy fiber terminals of Wistar and genetic absence epileptic rats receiving amygdaloid kindling stimulations", *Brain Res.*, 4,1377, 101-8.
- Aker, R.G., Yananli, H.R., Gurbanova, A.A., Ergun, A.O., Ates, N., van Luijtelaa, G., Onat, F.Y. 2006. "Amygdala kindling in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy", *Epilepsia*, 47(1), 33-40.
- Akman, O., Karson, A., Aker, R.G., Ates, N., Onat, F.Y. 2008. "Hippocampal kindling in rats with absence epilepsy resembles amygdaloid kindling", *Epilepsy Research*, 81, 211-19.
- Akman, O., Karson, A., Aker, R.G., Ates, N., Onat, F.Y. 2010. "Perirhinal cortical kindling in rats with genetic absence epilepsy", *Neuroscience Letters*, 479, 74-78.
- Bertram, E. 2007. "The relevance of kindling for human epilepsy", *Epilepsia*, 48(Suppl 2), 65-74.
- Bertram, E.H. 2009. "Temporal lobe epilepsy: Where do the seizures really begin?", *Epilepsy & Behav.*, 14, 32-37.
- Bloms-Funke., Loscher, W.1996. "The anticonvulsant gabapentin decreases firing rates of substantia nigra pars reticulata neurons", *European Journal of Pharmacology*, 316, 211-18.
- Boda, B., Szente, M.B. 1992. "Stimulation of substantia nigra pars reticulata suppresses neocortical seizures", *Brain Research*, 574, 237-43.
- Bonhaus, D.W., Walters, J.R., McNamara, J.O. 1986. "Activation of substantia nigra neurons: Role in the propagation of seizures in kindled rats", *Journal of neuroscience*, 6, 3024-30.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D.2000. "Synaptic organisation of the basal ganglia", *Journal of Anatomy*, 196, 527-42.
- Çarçak, N., Aker, R.G., Özdemir, O., Demiralp, T., Onat, F.Y. 2008. "The relationship between age-related development of spike- and-wave discharges and the resistance to amygdaloid kindling in rats with genetic absence epilepsy", *Neurobiology of Disease*, 32, 355-63.
- Çarçak, N., Ferrandon, A., Koning, E., Aker, G.A., Özdemir, O., Onat, F.Y., Nehlig, A. 2009. "Effect of stage 2 kindling on local cerebral blood flow rates in rats with genetic absence epilepsy", *Epilepsia*, 50(1), 33-43.

- Castillo, C.G., Mendoza, S., Saavedra, J., Giordano, M. 2010. "Lack of effect of intranigral transplants of a GABAergic cell line on absence seizures", *Epilepsy Behav.*, 18(4), 358-65.
- Castillo, C.G., Mendoza, S., Freed, W.J. 2006. "Giordano M. Intranigral transplants of immortalized GABAergic cells decrease the expression of kainic acid-induced seizures in the rat", *Behav Brain Res.*, 171, 109–15.
- Cavazos, J.E., Golarai, G., Sutula, T.P. 1991. "Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence", *Journal of Neuroscience*, 11, 2795-803.
- Cavazos, J., Cross, D. 2006. "The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy", *Epilepsy & Behaviour*, 8, 483–93.
- Claudia, G., Castillo, S.M., William, J.F., Magda, G. 2008. "Behavioural Brain Research, 193, 17–27.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. 1989. "Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes", *Epilepsia*, 30(4), 389-99.
- Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M. and Marescaux, C. 1998. "Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat", *Progress in Neurobiology*, 55, 27-57.
- Dean, P., Gale, K. 1989. "Anticonvulsant action of GABA receptor blockade in the nigroreticular target region", *Brain research*, 477, 391-95.
- Deniau, J.M., Chevalier, G. 1985. "Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigra influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus", *Brain Research*, 334, 227-33.
- Depaulis, A., Vergnes, M., Marescaux, A., Lannes, B., Warter, J. 1988. "Evidence that activators of GABA receptors in the substantia nigra suppresses spontaneous spike-and-wave discharges in the rat", *Brain research*, 448, 20-29.
- Depaulis, A., Snead, O.I., Marescaux, C., Vergnes, M. 1989. "Suppressive effects of intranigral injections of muscimol in three models of generalized non-convulsive epilepsy induced by chemical agents", *Brain Research*, 498, 64-72.
- Depaulis, A., Liu, Z., Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Warter, J.M. 1990. "Suppression of spontaneous generalized non-convulsive seizures in the rat by microinjection of GABA antagonists into the superior colliculus", *Epilepsy research*, 5, 192-98.
- Depaulis, A., Vergnes, M., Marescaux, C. 1994. "Endogenous control of epilepsy: the nigral inhibitory system", *Progress in neurobiology*, 42, 33-52.

- Depaulis, A., van Luijckelaar, G. 2006. "Genetic models of absence epilepsy in the rat, Models of Seizures and Epilepsy", ed: Pitkanen A., Schwartzkroin P.A., Moshe, S.L, Elsevier, New York, 233-48.
- Deransart, C., Marescaux, C., Depaulis, A. 1996. "Involvement of nigral glutamatergic inputs in the control of seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat", *Neuroscience*, 71, 721-28.
- Deransart, C., Vercueil, L., Marescaux, C., Depaulis, A. 1998. "The role of basal ganglia in the control of generalized absence seizures", *Epilepsy research*, 32, 213-23.
- Deransart, C., Le-Pham, B.T., Hirsch, E., Marescaux, C.H., Depaulis, A. 2001. "Inhibition of the substantia nigra suppresses absences and clonic seizures in audiogenic rats, but not tonic seizures: evidence for seizure specificity of the nigral control", *Neuroscience*, 105, 203-11.
- Dreifuss, F. 1990. "The epilepsies: clinical implications of the international classification", *Epilepsia*, 31(Suppl 3), 3-10.
- Engel, Jr.J. 1989. "Seizures and epilepsy", F.A. Davis Company, Philadelphia, 85-87.
- Engel, Jr.J.1992. "Update on surgical treatment of the epilepsies", *Clinical and experimental Neurology*, 29, 32-48.
- Engel, Jr.J. 1996. "Introduction to temporal lobe epilepsy", *Epilepsy Research*, 26, 141-50.
- Eskazan, E., Onat, F.Y., Aker, R., Öner, G. 2002. "Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy", *Epilepsia*, 43(10), 1115-19.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J.Jr. 2005. "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and International Bureau for Epilepsy (IBE)", *Epilepsia*, 46, 470-72.
- Freichel, C, Ebert, U, Potschka, H, Löscher, W. 2004. "Amygdala-kindling does not induce a persistent loss of GABA neurons in the substantia nigra pars reticulata of rats", *Brain Res.*, 29;1025(1-2):203-9.
- Galanopoulou, A.S. 2006. "Sex- and cell-type-specific patterns of GABA_A receptor and estradiol-mediated signaling in the immature rat substantia nigra". *Eur J Neurosci.* 23:2423-30.
- Gale, K. 1985. "Mechanisms of seizure control mediated by gamma-aminobutyric acid: role of the substantia nigra", *Federation proceedings*, 44(8), 2414-24.
- Gale, K.1990. "Animal models of generalized convulsive seizures: Some neuroanatomical differentiation of seizure types, Generalized epilepsy: Neurobiological approaches", ed: Avoli M., Gloor, P., Kostopoulos, G., Naquet R., Birkhäuser, Boston, 329-43.
- Garant, D., Gale, K. 1983. "Lesions of substantia nigra protect against experimentally induced seizures", *Brain Research*, 273, 156-61.

- Gloor, P., Fariello, R.G. 1988. "Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy", *Trends in Neuroscience*, 11(2), 63-8.
- Goddard, G.V. 1967. "Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity", *Nature*, 214, 1020-21.
- Goddard, G.V., McIntyre, D.C., Leech, C.K. 1969. "A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation", *Experimental Neurology*, 25, 295-330.
- Goren, M.Z., Onat, F.Y. 2007. "Ethosuximide: from bench to bed-side", *CNS Drug Reviews*, 13(2), 224-39.
- González-Hernández, T., Rodríguez, M. 2000. "Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat", *J Comp Neurol.*, 22;421(1):107-35.
- Gurbanova, A.A., Aker, R.G., Sirvanci, S., Demiralp, T., Onat, F.Y. 2008. "Intra-amygdaloid injection of kainic acid in rats with genetic absence epilepsy: the relationship of typical absence epilepsy and temporal lobe epilepsy", *Journal of Neuroscience*, 28, 7828-36.
- Gulhan, A.R., Tezcan, K., Carçak, N., Sakallı, E., Akin, D., Onat, F.Y. 2010. "Localized cortical injections of ethosuximide suppress spike-and-wave activity and reduce the resistance to kindling in genetic absence epilepsy rats (GAERS)", *Epilepsy Res.* 89(1): 7-16.
- Houser, C., Miyashiro, J., Swartz, B., Walsh, G., Rich, J., Delgado-Escueta, A. 1990. "Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy", *Journal of Neuroscience*, 10, 267-82.
- Iadarola, M.J., Gale, K. 1982. "Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by γ aminobutyric acid", *Science*, 218, 1237-40.
- Jones, N.C., O'Brien, T.J., Powell, K.L. 2011. "Morphometric changes and molecular mechanisms in rat models of idiopathic generalized epilepsy with absence seizures", *Neurosci Lett*, 497(3), 185-93.
- Lannes, B., Micheletti, G., Vergnes, M., Marescaux, C., Depaulis, A., Warter, J.M. 1988. "Relationship between spike wave discharges and vigilance levels in rats with spontaneous petit-mal like epilepsy in rats", *Neuroscience Letters*, 94, 187-91.
- Koutroumanidis, M., Hennessy, M.J., Elwes, R.D., Binnie, C.D., Polkey, C.E. 1999. "Coexistence of temporal lobe and idiopathic generalized epilepsies", *Neurology* 53, 490-495.
- Leviel, V., Fayada, C., Guibert, B., Chaminade, M., Machek, G., Mallet, J., Biguet, N.F. 1990. "Short- and long-term alterations of gene expression in limbic structures by repeated electroconvulsive-induced seizures", *J Neurochem.*, 54(3), 899-904.

- Loscher, W., Ebert, U., Lehmann, H., Rosenthal, C., Nikkhah, G. 1998."Seizure suppression in kindling epilepsy by grafts of fetal GABAergic neurons in rat substantia nigra", *J Neurosci Res.*, 51, 196–209.
- Marescaux, C., Vergnes, M., Depaulis, A. 1992."Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg- a Review", *Journal of Neural Transmission*, 35 (Suppl), 37-70.
- Masukawa, L.M., Higashima, M., Kim, J.H., Spencer, D.D. 1989."Epileptiform discharges evoked in hippocampal brain slices from epileptic patients", *Brain Research*, 493, 168–74.
- Mcintyre, D.C., Poulter, M.O., Gilby, K. 2002."Kindling: some old and some new", *Epilepsy Research*, 50, 79–92.
- Mcnamara, J.O., Galloway, M.T., Rigsbee, L.C. and Shin, C. 1984."Evidence implicating substantia nigra in regulation of kindled seizure threshold", *Journal of Neuroscience*, 4, 2410-17.
- Meeren, H., Van Luijckelaar, G., Lopes da Silva, F., Coenen, A. 2005."Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory", *Archives of Neurology*, 62(3), 371-6.
- Meurs, A., Clinckers, R., Ebinger, G., Michotte, Y., Smolders, I. 2006."Substantia nigra is an anticonvulsant site of action of topiramate in the focal pilocarpine model of limbic seizures", *Epilepsia*, 47, 1519-35.
- Moshe, S.L., Sperber, E.F. 1990."Substantia nigra-mediated control of generalized seizures, Generalized epilepsy: cellular, molecular and pharmacological approaches", ed: Gloor G., Kostopoulos R., Naquet M., Avoli P., Birkhauser Inc., Boston, 355-67.
- Morimoto, K., Fahnstock, M., Racine, R. 2004."Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain", *Progress in Neurobiology*, 73, 1-60.
- Nehlig, A., Vergnes, M., Marescaux, C., Boyet, S. 1992."Mapping of cerebral energy metabolism in rats with genetic generalized nonconvulsive epilepsy", *Journal of neural transmission*, 35 (Suppl), 141- 53.
- Nehlig, A., Vergnes, M., Boyet, S., Marescaux, C. 1998."Local cerebral glucose utilization in adult and immature GAERS", *Epilepsy Research*, 32, 206–12.
- Nicholson, A., Chadwick, D.W., Smith, D.F."The coexistence of idiopathic generalized epilepsy and partial epilepsy", *Epilepsia* 45, 682—685.
- Okadar, R., Nagishi, N., Nagaya, H. 1989."The role of the nigrosegmental GABAergic pathway in the propagation of pentylenetetrazol induced seizures", *Brain research*, 480, 383-87.

- Onat, F.Y., Eşkazan, E., Aker, R. 2005. "Experimental absence versus amygdaloid kindling", "Advances in Behavioral Biology"; Kindling 6. Editörler: M. Corcoran, SL Moshe, Springer, p. 37-48.
- Onat, F.Y., Aker, R.G., Gurbanova, A.A., Ateş, N., van Luijtelaar, G. 2007. "The effect of generalized absence seizures on the progression of kindling in the rat", *Epilepsia*, 48(Suppl 5), 150-56.
- Onat, F.Y., Eşkazan, E., Aker, R. 2009. "Interactions between Cortico-Thalamo-Cortical and Limbic Seizures" In: Philip A. Schwartzkroin, editor *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*, Vol 2. Oxford: Academic Press; 825-830.
- Özkara, Ç., Uzan, M., Benbir, G., Yeni, N., Oz, B., Hanoğlu, L., Karaağac, N., Ozyurt, E. 2008. "Surgical outcome of patients with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis", *Epilepsia* 49(4), 696-9.
- Paxinos, G., Watson, C. 1998. "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates", fourth ed. Academic Press, San Diego.
- Paz, J.T., Chavez, M., Saillet, S., Deniau, J.M., Charpier, S. 2007. "Activity of ventral medial thalamic neurons during absence seizures and modulation of cortical paroxysms by the nigrothalamic pathway", *The Journal of Neuroscience*, 24, 27(4), 929-41.
- Racine, R.J. 1972a. "Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold", *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 32, 269–79.
- Racine, R.J. 1972b. "Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure", *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 32, 281–94.
- Redgrave, P., Simkins, M., Overton, P., Dean, P. 1992a. "Anticonvulsant role of nigrotectal projection in the maximal electroshock model of epilepsy--I. Mapping of dorsal midbrain with bicuculline", *Neuroscience*, 46(2), 379-90.
- Redgrave, P., Marrow, L.P., Dean, P. 1992b. "Anticonvulsant role of nigrotectal projection in the maximal electroshock model of epilepsy--II. Pathways from substantia nigra pars lateralis and adjacent peripeduncular area to the dorsal midbrain", *Neuroscience*, 46(2), 391-406.
- Richards, D.A., Morrone, L.A., Bowery, N.G. 2000. "Hippocampal extracellular amino acids and EEG spectral analysis in a genetic rat model of absence epilepsy", *Neuropharmacology*, 9(12), 2433-41.
- Rudolf, G., Bihoreau, M.T., Godfrey, R.F., Wilder, S.P., Cox, R.D., Lathrop, M., Marescaux, C., Gauguier, D. 2000. "Polygenic control of idiopathic generalized epilepsy phenotypes in the genetic absence rats from Strasbourg (GAERS)", *Epilepsia*, 45(4), 301-8.

- Schwartzkroin, P.A. 1986."Hippocampal slices in experimental and human epilepsy", *Advances in Neurology*, 44, 991–1010.
- Sitnikova, E., Egorova, T.N., Raevskii, V.V. 2012."Reduction of the number of neurons in substantia nigra (Pars compacta) positively correlates with a reduction of seizure activity in WAG/Rij rats", *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 62(5), 619-28.
- Sutula, T., Cascino, G., Cavazos, J., Parada, I., Ramirez, L. 1989."Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe", *Annals of Neurology*, 26, 321–30.
- Sirvanci, S., Meshul, C.K., Onat, F., San, T. 2005."Glutamate and GABA immunocytochemical electron microscopy in the hippocampal dentate gyrus of normal and genetic absence epilepsy rats", *Brain Research*, 16, 1053(1-2), 108-15.
- Sirvanci, S., Meshul, C.K., Onat, F., San, T. 2003."Immunocytochemical analysis of glutamate and GABA in hippocampus of genetic absence epilepsy rats (GAERS)", *Brain research*, 988, 180-88.
- Sperber, E.F., Worpel, J.N.D., Zhao, D.Y., Moshe, S.L. 1989."Evidence for the involvement of nigral GABA receptors in seizures of adult rats", *Brain research*, 480, 378-82.
- Thompson, K.W. 2004."Suchomelova LM. Transplants of cells engineered to produce GABA suppress spontaneous seizures", *Epilepsia*, 45, 4–12.
- Tolmacheva, E.A., van Luijtelaar, G. 2007."Absence seizures are reduced by the enhancement of GABA-ergic inhibition in the hippocampus in WAG/Rij rats", *Neuroscience letters*, 6, 416(1), 17- 21.
- van Landingham, K.E., Heinz, E.R., Cavazos, J.E., Lewis, D.V. 1998."Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions", *Annals of Neurology*, 43, 413–26.
- van Luijtelaar, E.L., Coenen, A.M. 1986."Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats", *Neuroscience Letters*, 70, 393-97.
- van Luijtelaar, E.L., van der Werf, S.J., Vossen, J.M., Coenen, A.M. 1991."Arousal, performance and absence seizures in rats", *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 79, 430-34.
- van Luijtelaar, E.L., Drinkenburg, W.H., van Rijn, C.M. and Coenen, A.M. 2002."Rat models of genetic absence epilepsy: What do EEG spike-wave discharges tell us about drug effects?", *Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology*, 24, 65-70.
- Velazquez, J.L., Huo, J.Z., Dominguez, L.G., Leshchenko, Y., Snead, O.C. 3rd. 2007. "Typical versus atypical absence seizures: network mechanisms of the spread of paroxysms", *Epilepsia*, 48(8), 1585-93.

- Veliskova, J., Velíšek, L., Nunes, M.L., Moshé S.L. 1996. "Developmental regulation of regional functionality of substantia nigra GABAA receptors involved in seizures", *European journal of pharmacology*, 309, 167-73.
- Veliskova, J., Miller, A.M., Nunes, M.L., Brown, L.L. 2005. "Regional neural activity within the substantia nigra during peri-ictal flurothyl generalized seizure stages", *Neurobiology of Disease*, 20, 752-59.
- Veliskova, J., Moshé, S.L. 2006. "Update on the role of substantia nigra pars reticulata in the regulation of seizures", *Epilepsy Currents*, 6, 83-87.
- Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, L. and Warter, J.M. 1982. "Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalised non-convulsive epilepsy", *Neuroscience Letters*, 33, 97-101.
- Vergnes, M., Marescaux, C., Depaulis, A., Micheletti, G. and Warter, J.M. 1987. "Spontaneous spike and wave discharges in thalamus and cortex in arat model of genetic petit mal-like seizures", *Experimental Neurology*, 96, 127-136.
- Vergnes, M., Marescaux, C., Boehrer, A., Depaulis, A. 1990. "Mapping of spontaneous spike and wave discharges in Wistar rats with genetic generalized non-convulsive epilepsy", *Brain Research*, 523, 87-91.
- Wada, J.A., Sato, M., Corcoran, M.E. 1974. "Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats", *Epilepsia*, 15(4), 465-78.
- Waszzak, B., Eng, N., Walters, J.R. 1980. "Effects of muscimol and picrotoxin on single unit activity of substantia nigra neurons", *Brain Research*, 188, 185-97.
- Windels, F., Kiyatkin, E.A. 2006. "Dopamine action in the substantia nigra pars reticulata: iontophoretic studies in awake, unrestrained rats", *Eur J Neurosci.*, 24(5), 1385-94.
- Zhang, H., Rosenberg, H. 1989. "Injection of benzodiazepines but not GABA or muscimol into pars reticulata substantia nigra suppresses pentylenetetrazol seizures", *Brain research*, 488, 73-79.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 111S209
Proje Başlığı: Absans Epilepsisi ile Temporal Lob Epilepsisi Arasındaki Karşılıklı Etkileşimde Substansiya Nigra'nın Rolü
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr. Filiz ONAT Doç.Dr. Serap Şirvancı, Uz.Dr.Medine İ. Gülçebi, Uz.Dr.Dilek Akakın, Dr.Özlem Akman Ecz.Dr.Nihan Çarçak
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AbD., Haydarpaşa, İstanbul
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15-10-2011 ve 15-10-2013
Öz (en çok 70 kelime) Bugüne kadar yapılan çalışmalar absans epilepsisi ile temporal lob epilepsisi arasında karşılıklı zıt yönde bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu proje, absans epilepsisi ile temporal lob epilepsisi arasındaki zıt yönlü etkileşimde substansiya nigra bölgesinin rolünü ortaya koydu.
Anahtar Kelimeler: epilepsi, genetik absans epilepsili sıçan (GAERS), nöbet, kindling, SNR, amigdala
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet ☐ Gerekli Değil ☒ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar:
Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşıdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.

ARDEB BAŞARI ÖYKÜSÜ

Proje Adı Absans Epilepsisi ile Temporal Lob Epilepsisi Arasındaki Karşılıklı Etkileşimde Substansiya Nigra'nın Rolü	Proje Yürütücüsü: Prof Dr Filiz Onat
(PROJE ŞEKİL/GRAFIK/ FOTOĞRAF) (En fazla 4 tane – jpg formatında, 35 x 35 cm (300 dpi)): İsimleriyle ve şekil altı açıklamalarıyla birlikte sıralanmış olarak formda belirtilmesi ve 300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyaları halinde formun ekleri olarak gönderilmesi gerekmektedir.	Proje No: 111S209
	Destek Miktarı (TL)
	Proje Başlama-Bitiş Tarihi
	Yürütücü Kuruluş
	(PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ FOTOĞRAF) 300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyası olarak forma eklenmelidir.
Projenin Amacı ve Önemi (En fazla 150 kelime) (Maddeler halinde sıralayınız) Absans epilepsisi ile temporal lob epilepsisi arasındaki karşılıklı etkileşimde $SNR_{anterior}$ ve $SNR_{posterior}$ bölgelerinin önemli olduğuna dair ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır ve ileride yapılacak olan araştırmalar bu bulguların ışığı altında tasarlanacaktır. Uluslararası dergilerde yayımlanacak olan bu sonuçlar epilepsinin mekanizmaları ve antiepileptogenez konusundaki bilgi birikimine önemli bir katkı sağlayacaktır.	
Proje ile Elde Edilen veya Beklenen Bilimsel, Teknolojik, Ekonomik ve Sosyal Kazanımlar (En fazla 200 kelime) • 30. Uluslararası Epilepsi Kongresi, Montreal, Poster ödülü (ekte sunulmuştur) • Projeden uluslararası, etki faktörü yüksek dergilerde yayın olacaktır • Proje bursiyerlere desteği ile teknolojik araştırma gücüne destek sağlamıştır. Ayrıca bilim insanı yetiştirilmesi ve yeni yetenekler kazanılmasına katkı sağlamıştır	
Proje için TÜBİTAK Desteğinin Önemi TÜBİTAK tarafından desteklenen bu proje, NIH veya FP6 gibi uluslararası proje başvurularına olarak sağlayacak altyapı oluşturulmasına katkı sağlamıştır. Böylece kullanılan yöntemlerle deneyimin artmasına yol açmıştır. Ayrıca bir araştırma projesinin çeşitli aşamalarıyla ilgili bilgilerin derinleşmesini sağlamıştır.	