



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**EPİLEPTOGENEZ SÜRECİNDEKİ GENETİK ABSANS
EPİLEPSİLİ SIÇANLARDA MEYDANA GETİRİLEN NİGRO-
STRİATAL YOLAK LEZYONUNUN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL, DAVRANIŞSAL VE NÖBET
PARAMETRELERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ZEHRA NUR TURGAN AŞIK
UZMANLIK TEZİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. FİLİZ ONAT

2020-İSTANBUL

BİLGİLENDİRME

BU TEZ ÇALIŞMASI 218S653 NOLU “NİGRO-STRİATAL DOPAMİNERJİK
YOLAĞIN EPİLEPTOGENEZDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI” BAŞLIKLİ
TÜBİTAK ARAŞTIRMA PROJESİ TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.

TEŞEKKÜR

Benim için her zaman bir tez hocasından çok daha fazlası olan, hiçbir zaman desteğini ve bilgisini esirgemeyen, bana inanıp güvenen, yüreklendiren ve kendime olan inancımı yeniden kazandıran çok değerli hocam Prof. Dr. Filiz Onat'a;

Bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım birbirinden değerli hocalarım Prof. Dr. Zafer Gören'e, Prof. Dr. Atila Karaalp'e, Prof. Dr. Ahmet Akıcı'ya;

Kocaman yüreği ile beni hep sarıp sarmalayan, varlığından huzur duyduğum sevgili hocam Prof. Dr. Rezzan Gülhan'a;

Henüz istatistiği öğrenemesem de☺, her ihtiyaç duyduğumda bilgisini ve tecrübesini benimle sınırsızca paylaşan, kapısını hiç çekinmeden çalabildiğim sevgili hocam Doç. Dr. Hasan Yananlı'ya;

Bölüme başladığım ilk günden itibaren kendime çok yakın hissettiğim, abla yakınlığı gördüğüm ve bilgisini benimle cömertçe paylaşan sevgili hocam Doç. Dr. Medine Gülçebi İdriz Oğlu'ya;

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım ve her birinin bana çok şey kattığı sevgili arkadaşlarım Tuğba Eryiğit, Melis Yavuz, Songül Özkula, Nesrin Duman, Nurdan Tekin, Yekta Çulpan, Caner Vızdıklar, Aylin Toplu, Yasemin Selalmaz, Berne Özen ve Betül Esra İpek'e;

Ömrüm boyunca beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan maddi ve manevi desteğini hep hissettiğim, evlatları olmanın hakkını vermeye çalıştığım canım annem Sevim Turgan ve babam Yalçın Turgan'a;

Bana her zaman cesaret verip, destekleyen biricik eşim Murat Aşık'a ve;

Benimle oynamak için bir süredir sabırla bekleyen, tatlı kızlarım Nur Serra ve Rana Zehra'ya;

Çok çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
RESİM LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	xi
EKLER	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	5
3.1. Giriş	5
3.2. Amaç	6
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Epilepsi Hastalığı	7
4.1.1. Epilepsi hastalığının tarihsel süreci	9
4.1.2. Epilepsi hastalığının nörokimyasal özellikleri	10
4.2. Epileptogenez	13
4.3. Absans Epilepsisi	14
4.4. Deneysel Modeller	16
4.4.1. Absans epilepsi deneysel modelleri	17
4.5. Bazal Ganglia	18
4.5.1. Striatum	19
4.5.2. Subtalamik nükleus	20
4.5.3. Globus pallidus	20

4.5.4. Substansia nigra	21
4.5.5. Bazal ganglia ve korteksin epilepsi nöbetlerindeki rolü	21
4.6. Tez Çalışmasının Amacı	24
5. GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1. Hayvanlar ve Bakım Koşulları	25
5.2. Deney Protokolü	25
5.3. Deney Akışı	26
5.3.1. Medial ön beyin demeti bölgesine 6-OHDA uygulanarak nigro-striatal yolda kimyasal lezyon oluşturulması	26
5.3.2. GAERS suşu sıçanlarda, epileptogenez sürecinde nigro-striatal yolda tahribi sonrası, epilepsi nöbet parametrelerinin değerlendirilmesi	27
5.3.3. Epileptogenez döneminde kimyasal lezyon ile devre dışı bırakılan nigro-striatal yolda sonuçlarının striatum, SNpr ve SNpk bölgelerinde immünohistokimyasal parametreler ile değerlendirilmesi	27
5.4. 6-OHDA Hazırlığı	27
5.5. Stereotaksik Cerrahi: Medial Ön Beyin Demeti Bölgesinde Lezyon Yapmak Amacıyla (PN30 sıçanlara)	27
5.6. Davranış Deneyleri (silindir ve rotasyon testleri)	29
5.6.1. Silindir testi	29
5.6.2. Rotasyon testi	29
5.6.2.1. Apomorfîn hazırlığı	30
5.7. EEG Kaydı	30
5.7.1. Stereotaksik cerrahi: EEG kaydı almak amacıyla (PN90 sıçanlara)	31
5.7.2. EEG kaydı alınması	31
5.7.3. EEG kayıt analizi	32

5.8. Perfüzyon İşlemi ve Beyin Dondurma	32
5.9. Kesiti Alma	33
5.10. İmmünohistokimyasal Yöntemler	33
5.10.1. Tirozin hidroksilaz boyama yöntemi	34
5.10.2. Parvalbumin boyama yöntemi	39
5.11. Kesitlerin Değerlendirilmesi	41
5.11.1. Striatumda TH-immünoreaktivite değerlendirmesi	42
5.11.2. Substantia nigra pars kompaktada TH-immünoreaktivite değerlendirmesi	45
5.11.3. Striatumda PRV- immünoreaktivite değerlendirilmesi	49
5.11.4. Substantia nigra pars retikülatada PRV-immünoreaktivite değerlendirilmesi	51
5.12. İstatistiksel Analiz	53
6. BULGULAR	55
6.1. Davranış Deneyleri	55
6.1.1. Silindir testi	55
6.1.2. Rotasyon testi	56
6.2. EEG Bulguları	57
6.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	61
6.3.1. Tirozin hidroksilaz boyama bulguları	61
6.3.1.1. Striatumda TH-immünoreaktivite dansite bulguları	61
6.3.1.2. Substantia nigra pars kompaktada TH-immünoreaktivite dansite bulguları	63
6.3.1.3. Substantia nigra pars kompaktada TH-immünoreaktivite nöron sayım bulguları	65
6.3.2. Parvalbumin boyama bulguları	67

6.3.2.1. Striatumda PRV-immünoreaktivite dansite bulguları	67
6.3.2.2. Striatumda PRV-immünoreaktivite nöron sayım bulguları	69
6.3.2.3. Substansia nigra pars retikülatada PRV-immünoreaktivite dansite bulguları	71
6.3.2.4. Substansia nigra pars retikülatada PRV-immünoreaktivite nöron sayım bulguları	73
7. TARTIŞMA	76
7.1. Nigrostriatal Yolak Dejenerasyonunun Absans Epilepsisine Etkileri	77
7.2. Nigrostriatal Yolak Dejenerasyonunun Striatum ve SNpk Bölgelerindeki Dopaminerjik nöronlar üzerindeki etkisi	78
7.3. Nigrostriatal Yolak Dejenerasyonunun Striatum ve SNpr Bölgelerindeki GABAerjik nöronlar üzerindeki etkisi	79
7.4. Sonuç	81
8. KAYNAKLAR	82

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İyon kanalı bozukluğu ve kalıtsal epilepsi hastalıkları arasındaki ilişki.

Şekil 2. Sık kullanılan bazı antiepileptik ilaçların etki mekanizmaları.

Şekil 3. Talamokortikal döngü ve uyku, uyanıklık ve absans epilepsisi durumlarındaki EEG yansıması

Şekil 4. Bazal ganglia bölgelerinden striatum ve substansia nigranın (retikülate bölümü; SNr ve kompakta bölümü; SNc) şematik gösterimi.

Şekil 5. Bazal ganglia döngüsü. GPe: Globus pallidus eksterna; GPi: Globus pallidus interna; STN: Subtalamik nucleus; SNc: substansia nigra pars kompakta; SNr: substansia nigra pars retikulata.

Şekil 6. Deney tasarımı. PN: postnatal; MFB: Medial forebrain bundle (Medial ön beyin demeti).

Şekil 7. Wistar-6-OHDA, GAERS-6-OHDA, Wistar-Yalancı opere (Wistar-YO) ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında ipsilateral ve kontralateral ön ayakların kullanımının karşılaştırılması.

Şekil 8a. Wistar-6-OHDA, GAERS-6-OHDA, Wistar-Yalancı opere (Wistar-YO) ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında toplam rotasyon sayısının karşılaştırılması.

Şekil 8b. Wistar-6-OHDA, GAERS-6-OHDA, Wistar-Yalancı opere (Wistar-YO) ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında 10'ar dakikalık zaman dilimlerinde gerçekleşen rotasyon sayısının karşılaştırılması.

Şekil 9. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında DDD'ların toplam sürelerinin karşılaştırılması.

Şekil 10. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında DDD'ların toplam sayılarının karşılaştırılması.

Şekil 11. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında DDD sürelerinin ortalamalarının karşılaştırılması.

Şekil 12. Striatum bölgesindeki TH-ir'nin Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi.

Şekil 13. SNpk bölgesindeki TH-ir (+) nöronların Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi.

Şekil 14. SNpk bölgesindeki TH-ir (+) nöron sayısının Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi.

Şekil 15. Striatum bölgesindeki PARV-ir (+) nöronların Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi.

Şekil 16. Striatum bölgesindeki PARV-ir (+) nöron sayısının Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi.

Şekil 17. SNpr bölgesindeki PARV-ir (+) nöronların Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi.

Şekil 18. SNpr bölgesindeki PARV-ir (+) nöron sayısının Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Epilepsi genel sınıflandırması

Tablo 2. ILAE 2017 Nöbet Tipleri Basit Sınıflandırma

Tablo 3. ILAE 2017 Nöbet Tipleri Genişletilmiş Sınıflandırma

Tablo 4. % 1 H₂O₂ (PBS içinde) hazırlanışı

Tablo 5. Solüsyon A hazırlanışı

Tablo 6. % 10'luk NHS (solüsyon A içinde) hazırlanışı

Tablo 7. “Mouse anti-TH 1 / 1000 + solüsyon A ve % 1,5 NHS” solüsyonu hazırlanışı

Tablo 8. “1 / 200 sekonder antikor + solüsyon A + % 1,5 NHS” solüsyonu hazırlanışı

Tablo 9. ABC solüsyonu hazırlanışı

Tablo 10. NOVARED solüsyonu hazırlanışı

Tablo 11. % 10'luk NGS (solüsyon A içinde) hazırlanışı

Tablo 12. “1 / 3000 anti-Parvalbumin antibody + solüsyon A ve % 1,5 NGS” solüsyonu hazırlanışı

Tablo 13. “1 / 200 sekonder antikor + solüsyon A + % 1,5 NGS” solüsyonu hazırlanışı

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. GAERS ve Wistar sıçanların ipsilateral ve kontralateral striatum bölgesinin TH-ir açısından karşılaştırılması.

Resim 2. Striatum bölgesindeki TH-ir (+) alanların 20X büyütmede dansite ölçümü için işaretlenmiş halleri.

Resim 3. GAERS ve Wistar sıçanların ipsilateral ve kontralateral SNpk bölgesinin TH-ir açısından karşılaştırılması.

Resim 4. SNpk bölgesindeki TH-ir (+) nöronların 40X büyütmede dansite ölçümü için işaretlenmiş halleri.

Resim 5. SNpk bölgesindeki TH-ir (+) nöronların 40X büyütmede sayım için işaretlenmiş halleri.

Resim 6. GAERS ve Wistar sıçanların ipsilateral ve kontralateral striatum bölgesinin PRV-ir açısından karşılaştırılması.

Resim 7. GAERS ve Wistar sıçanların ipsilateral ve kontralateral SNpr bölgesinin PRV-ir açısından karşılaştırılması.

Resim 8. Tüm gruplarda striatum bölgesindeki TH-ir'nin örnek fotoğrafları.

Resim 9. Tüm gruplarda SNpk bölgesindeki TH-ir'nin örnek fotoğrafları.

Resim 10. GAERS 6-OHDA ve GAERS-Naif gruplarında ipsilateral ve kontralateral SNpk bölgesi TH-ir (+) nöronların sayımında kullanılan örnek fotoğraflar.

Resim 11. Tüm gruplarda SNpr bölgesindeki PARV-ir'nin örnek fotoğrafları.

Resim 12. Wistar-6-OHDA ve Wistar-Yalancı opere gruplarında ipsilateral ve kontralateral striatum bölgesi PARV-ir (+) nöronların sayımında kullanılan örnek fotoğraflar.

Resim 13. Tüm gruplarda SNpr bölgesindeki PARV-ir'nin örnek fotoğrafları.

Resim 14. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere gruplarının ipsilateral ve kontralateral striatum bölgesi PARV-ir (+) nöronların sayımında kullanılan örnek fotoğraflar.



KISALTMALAR

6-OHDA: 6-Hidroksidopamin

BSA: Bovine serum albumin

DDD: Diken-ve-dalga deşarj

EEG: Elektroensefalografi

GABA: Gama amino bütirik asit

GAERS: Strasbourg kökenli genetik absans epilepsili sıçanlar

GHB: Gama hidroksi-butirat

GP: Globus pallidus

GPe: Globus pallidus eksterna

GPI: Globus pallidus interna

ILAE: Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği

MFB: Medial ön beyin demeti

NGS: Normal goat serum

NHS: Normal Horse Serum

NMDA: N-metil-D-aspartat

PARV: Parvalbumin

PARV-ir: Parvalbumin immünoreaktivite

PBS: Fosfat buffer saline

PN: Post natal (doğum sonrası)

SN: Substansia nigra

SNpk: Substansia nigra pars kompakta

SNpr: Substansia nigra pars retikülata

SSS: Santral sinir sisteminde

STN: Subtalamik nukleus

TH: Tirozin hidroksilaz

TH-ir: Tirozin hidroksilaz immünoreaktivite

YO: Yalancı opere

WHO: Dünya Sağlık Örgütü



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi



Epileptogenez Sürecindeki Genetik Absans Epilepsili Sıçanlarda Meydana Getirilen Nigro-Striatal Yolak Lezyonunun İmmünohistokimyasal, Davranışsal ve Nöbet Parametreleri Açısından Değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı: Zehra Nur Turgan Aşık

Danışmanı: Prof. Dr. Filiz Onat

Anabilin Dalı: Tıbbi Farmakoloji

1.ÖZET

Amaç: Absans epilepsisi doğum sonrası epileptogenez adı verilen bir latent sürenin sonunda ortaya çıkan jeneralize nöbetlerle karakterize bir hastalıktır. Geçirilen bu epileptogenetik sürecin mekanizması henüz aydınlatılmamıştır. Genel olarak epileptik nöbet gelişimi açısından bazal gangliyanın önemi bilinmektedir. Buna bağlı olarak, çalışmamızda genetik absans epilepsili ve non-epileptik olan farklı iki sıçan suşunda nigrostriatal yolak dejenerasyonunun etkileri immünohistokimyasal yöntemler, elektroensefalografik (EEG) sonuçlar ve davranış deneyleri ile ortaya konmaya çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada Strasbourg kökenli genetik absans epilepsili sıçanlar (GAERS) ve Wistar erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar 30 günlük olduklarında stereotaksik cerrahi yöntem ile medial ön beyin demeti bölgesine, deney gruplarına 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) enjeksiyonu, yalancı opere gruplara ise temiz bir kanül ile sadece mekanik uygulama yapılmıştır. Cerrahi işlemin 21. gününde silindir ve apomorfın ile indüklenen rotasyon testleri uygulanmıştır. 90 günlük olduklarında GAERS gruplarından EEG kayıtları alınmıştır. Sonrasında immünohistokimya uygulanan tüm gruplara 90 günlük naif sıçanlar eklenip, hayvanların beyinleri perfüzyon yöntemi ile çıkarılmış, immünohistokimyasal yöntemler ile striatum ve substansia nigra (kompakta ve retikülata) bölgelerinde dopaminerjik ve GABAerjik immünoreaktiviteler değerlendirilmiştir.

Bulgular: Apomorfın ile indüklenen rotasyon testinde, GAERS-6-OHDA ve Wistar-6-OHDA gruplarında lezyona kontralateral rotasyon gözlenmiştir. EEG kayıtlarında GAERS-6-OHDA grubunda diken-ve-dalga deşarjların toplam süreleri ve sayılarında artış gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal deneylerin sonucunda ise 6-OHDA uygulanan grupların ipsilateral taraflarında daha belirgin olmak üzere her iki striatum

ve substantia nigra pars kompakta bölgelerinde dopaminerjik aktivite kaybı saptanmıştır. GABAerjik nöronlar açısından yapılan incelemeler sonucu, yalnızca GAERS-6-OHDA grubunda ipsilateral substantia nigra pars retikülata bölgesindeki nöronların yoğunluğunda bir azalma tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmamız, nigrostriatal yolak dejenerasyonunun epileptogenez dönemindeki absans epilepsili sıçan modelinde nöbet gelişimi üzerindeki etkisinin incelendiği ve bulguların farklı bir suşla karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği özgün bir çalışmadır. Çalışmamızdan çıkarılan tüm sonuçlar absans epilepsisinin epileptogenez sürecinin aydınlatılması için bir basamak oluşturmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Epilepsi, absans nöbet, 6-OHDA, bazal ganglia, immünohistokimya, EEG, davranış testleri

Evaluation of Nigro-Striatal Pathway Lesion In Rats With Genetic Absence Epilepsy During Epileptogenesis In Terms of Immunohistochemical, Behavioral and Seizure Parameters

Student's Name: Zehra Nur Turgan Aşık

Advisor: Prof. Filiz Onat

Main Discipline: Medical Pharmacology

2. SUMMARY

Objective: Absence epilepsy is characterized by generalized seizures that occur at the end of a latent period called epileptogenesis. The mechanism of this epileptogenic process has not been elucidated yet. Although the importance of the basal ganglia in the development of epileptic seizures is well known, the role of nigrostriatal pathway in absence epilepsy has not been characterized yet. Specifically there is no experimental findings for the role of nigrostriatal pathway in absence epilepsy and its seizures. Consequently, in our study, the effects of nigrostriatal pathway degeneration in genetic absence epilepsy rats and non-epileptic Wistar animals were examined by immunohistochemical methods, electroencephalographic (EEG) recordings and behavioral experiments.

Materials and Method: We used genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS) and Wistar male rats in this study. When the animals were 30 days old, 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) injection was applied to the medial forebrain region by the stereotaxic surgery to the experimental groups, and only mechanical application with a clean cannula to the sham-operated groups. Cylinder and apomorphine-induced rotation tests were performed on the 21st day of the surgical procedure. EEG recordings were taken from GAERS groups when they were 90 days old. Afterward, a 90-day-old naive animals was added as a control to all immunohistochemistry groups. The brains of the animals were removed by perfusion technique, and dopaminergic and GABAergic immunoreactivities in the striatum and substantia nigra (compact and reticulata) regions were evaluated by immunohistochemical methods.

Results: In the rotation test, the number of contralateral rotation to the lesion in the GAERS and Wistar-6-OHDA groups were significantly higher than the GAERS and

Wistar-sham-operated groups. As a result of the EEG, the cumulative duration and number of spike-and-wave discharges (SWDs) significantly increased in the GAERS-6-OHDA group when compared to the GAERS-sham-operative group. Also the result of the immunohistochemical experiments, a loss of dopaminergic activity was detected in both striatum and substantia nigra pars compacta, more prominent on the ipsilateral sides of the GAERS and Wistar-6-OHDA groups. Immunohistochemical examinations for GABAergic neurons, a decrease in the density of cells in the ipsilateral substantia nigra pars reticulata region was detected only in the GAERS-6-OHDA group.

Conclusion: Our study is an original study in which the effect of nigrostriatal pathway degeneration on the development of seizures in a rat model with absence epilepsy during epileptogenesis was examined and the findings were compared with Wistar strain. The results obtained from our study constitute a step to elucidate the epileptogenesis mechanisms involved in the development of absence epilepsy.

Keywords: Epilepsy, absence seizure, 6-OHDA, basal ganglia, immunohistochemistry, EEG, behavioral tests

3. GİRİŞ VE AMAÇ

3.1. Giriş

Epilepsi, santral sinir sisteminde (SSS), kortikal ya da subkortikal bölgelerde bulunan nöron gruplarının anormal, ani deşarjı sonucunda meydana gelen, geçici ve tekrarlayıcı özellikte nöbetlerle karakterize klinik bir tablodur. Bu nöbetlere bilinç kaybı ve duysal bozukluklar eşlik edebilmektedir. Epilepsi, özellikle gençleri azımsanamayacak (% 1) sıklıkla etkileyen bir hastalıktır. Klinik seyrine göre farklı türleri mevcuttur.

Etyolojisi genellikle bilinmemekle birlikte, bilinen nedenler arasında SSS tümörleri, kranial travma, genetik hastalıklar, metabolik disfonksiyonlar, enfeksiyonlar veya vasküler nedenler sayılmaktadır. İlk tetikleyen her ne olursa olsun, spontan nöbetlerin meydana gelmesi için tüm nöral mekanizmaları içine alan nörobiyolojik süreçler epileptogenez olarak adlandırılır.

Epilepsi hastalarında kullanılan mevcut tedavilerin çoğu nöbeti baskılamaya yöneliktir. Yapılan son çalışmalar, epileptogenez sürecinin aydınlatılmasıyla, geliştirilecek yeni tedavi modalitelerinin nöbetler üzerindeki etkinliğinin daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Etyopatogeneze göre uygulanacak tedavi, nöbeti baskılamak yerine nöbeti tetikleyen patolojik sürecin ortadan kaldırılmasını mümkün kılacaktır.

Epilepsinin patofizyolojisinde korteks, talamus ve limbik yapıların yanı sıra substansia nigra (SN), striatum gibi bazal ganglia yapılarının da önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Epilepsi hastalarında ve mevcut hayvan modellerinde yapılan araştırmalar sonucu bu beyin bölgelerindeki değişiklikler büyük oranda bilinmektedir. Ancak epilepsi hastalığında önemli rol oynadığı düşünülen bu beyin bölgelerinin epileptogenez sürecinde nasıl etkilendiğini araştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır. Epileptik nöbetlerin modülasyonunda görev alan SN ve striatum yapılarının arasındaki bağlantıyı sağlayan nigro-striatal dopaminerjik yolağın epileptogenezdeki rolü ise henüz bilinmemektedir.

Çalışmamız, genetik absans epilepsili bir suş olan Strasbourg kökenli genetik absans epilepsili sıçanlar (GAERS)'lerde, epileptogenez sürecinde nigro-striatal yolağın rolünün incelenmesi bakımından henüz yeterli bilgi birikimi olmayan bir alanda literatüre önemli bir katkı sağlamayı hedeflemiştir. Aynı zamanda sürecin epileptik olmayan farklı bir suş (Wistar) ile karşılaştırılmış olması açısından özgün bir çalışmadır.

3.2. Amaç

Bu tez çalışmasında, epileptogenez döneminde nigro-striatal yolağın tahrip edilmesinin epilepsi gelişimi üzerindeki etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla epileptogenetik süreç içerisindeki, 30 günlük hayvanların medial ön beyin demeti bölgesine 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) enjekte edilerek sonuçları, hem farklı iki suş arasında hem de her suşta kendi kontrol grupları ile değerlendirilmiştir. Nigrostriatal yolakta meydana gelen lezyonun epileptogenezdeki rolü, absans epilepsi nöbet parametresi olan diken-ve-dalga deşarjlar (DDD)'ın değerlendirilmesi, dopaminerjik ve gama amino bütirik asit (GABA)'erjik nörohistokimyasal parametreler ve davranış deneyleri ile ortaya konmaya çalışılmıştır. Elde edilen veriler ile absans epilepsisine yönelik tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacak ve sonraki çalışmalara alt yapı oluşturacak sonuçlara ulaşmak amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Epilepsi Hastalığı

Epilepsi hastalığı provoke edilmeksizin tekrarlayan nöbetler ile karakterize, nörobiyolojik, kognitif, psikolojik ve sosyal sonuçları da olan kronik nörolojik bir hastalıktır. SSS’nde, nöron gruplarının ani, anormal deşarjı sonucu ortaya çıkan, geçici ve tekrarlayıcı nöbetlerle karakterize bilinç kaybı ve duysal bozuklukların eşlik edebildiği klinik bir tablodur (Fisher ve ark., 2005). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO), ise epilepsi hastalığını, serebral nöronların aşırı deşarj olması sonucu meydana gelen, tekrarlayıcı nöbetlerin görüldüğü, farklı etiyojilere bağlı kronik bir beyin hastalığı olarak tanımlamıştır (Gastaut, 1969). Her yaş grubunda, cinsiyet farkı gözetmeksizin görülebilen bir hastalıktır. Hastaların hayat kalitesi önemli ölçüde bozulmakta ve tedavileri yıllarca sürebilmektedir.

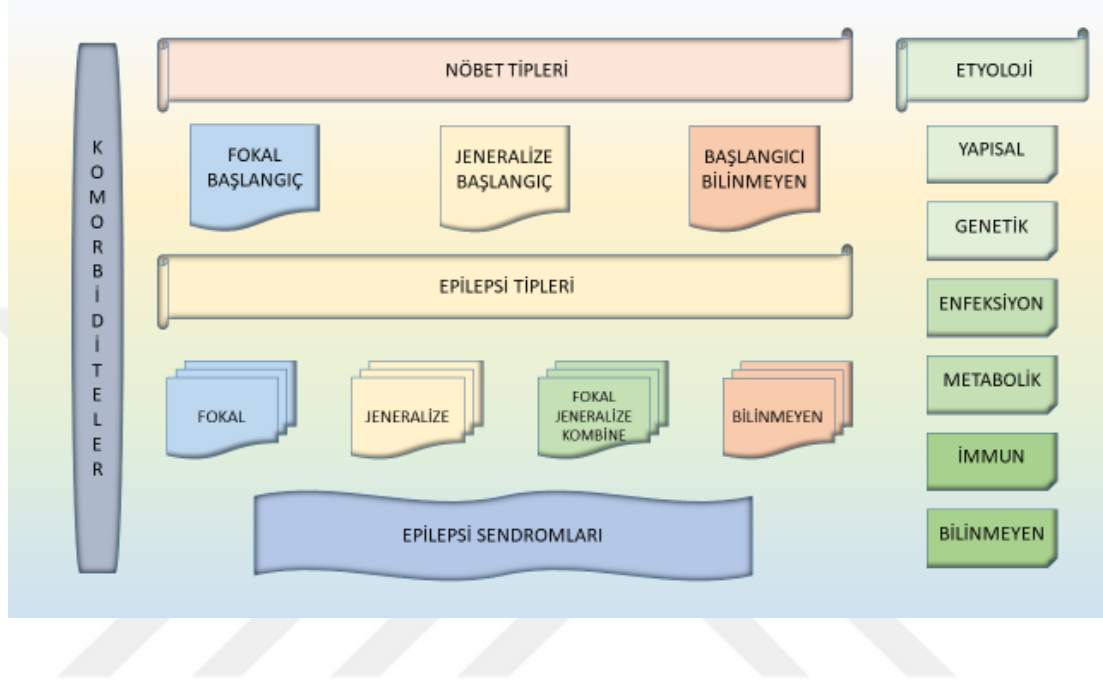
2014 yılında Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (International League Against Epilepsy, ILAE) tarafından yapılan son güncel klinik tanımlamaya göre; epilepsi hastalığı aşağıdaki koşullardan herhangi biri ile tanımlanmıştır:

1. 24 saatten fazla aralıklarla görülen en az iki uyaransız-spontan nöbet geçirilmesi,
2. Geçirilen iki uyaransız-spontan nöbetten sonraki 10 yıl içerisinde, bir uyaransız-spontan nöbet olması ya da rekürrens riskinin en az %60 olması,
3. Bir epilepsi sendromu teşhisi koyulması.

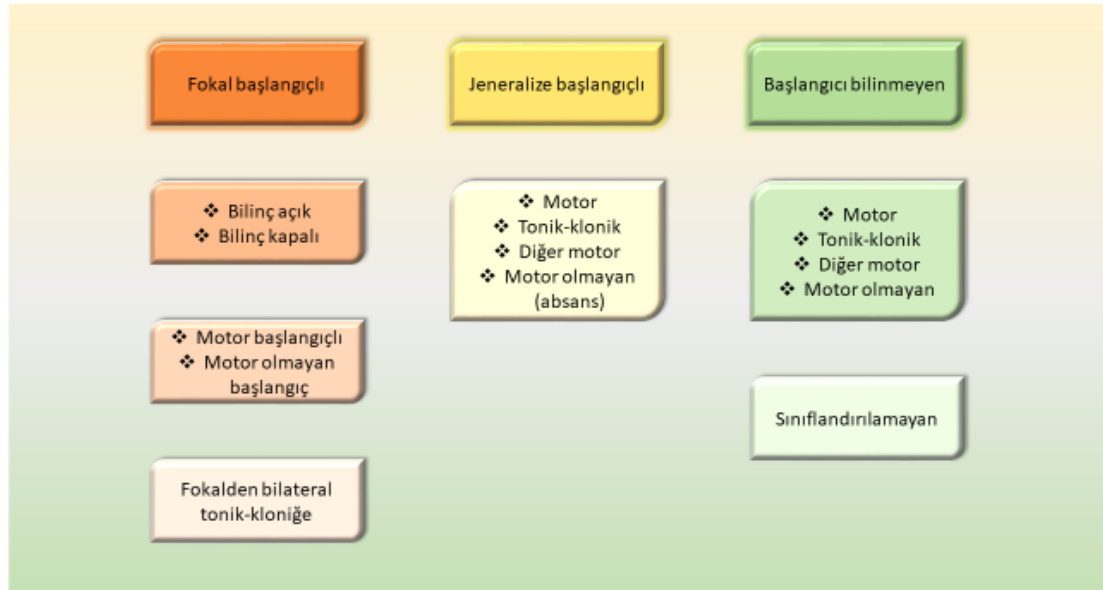
Epilepsi hastalığı ile ilgili kaynaklar milattan öncesine kadar dayanmaktadır. O zamanlarda bile hastalığın farklı tiplere sahip olduğu fark edilip, çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Gelişen teknoloji ile epilepsi hastalığı hakkında artan bilgi birikimine bağlı olarak bu sınıflandırmalar daha da detaylandırılmıştır. Sınıflandırmalar, daha çok klinik ve elektroensefalografik (EEG) verilere dayanarak yapılmıştır. Temel olarak fokal (lokalizasyonla ilişkili) ve jeneralize nöbet grupları olarak ayrılrsa da pek çok epilepsi alt tipi mevcuttur (Tablo 1). Epilepsinin sınıflandırılmasına dair ILAE tarafından yapılan ilk çalışma 1981 yılındadır.

Günümüzde kullanılan sınıflandırma ise 2017 yılında basit (Tablo 2) ve genişletilmiş (Tablo 3) şekilleri ile güncel halini almıştır.

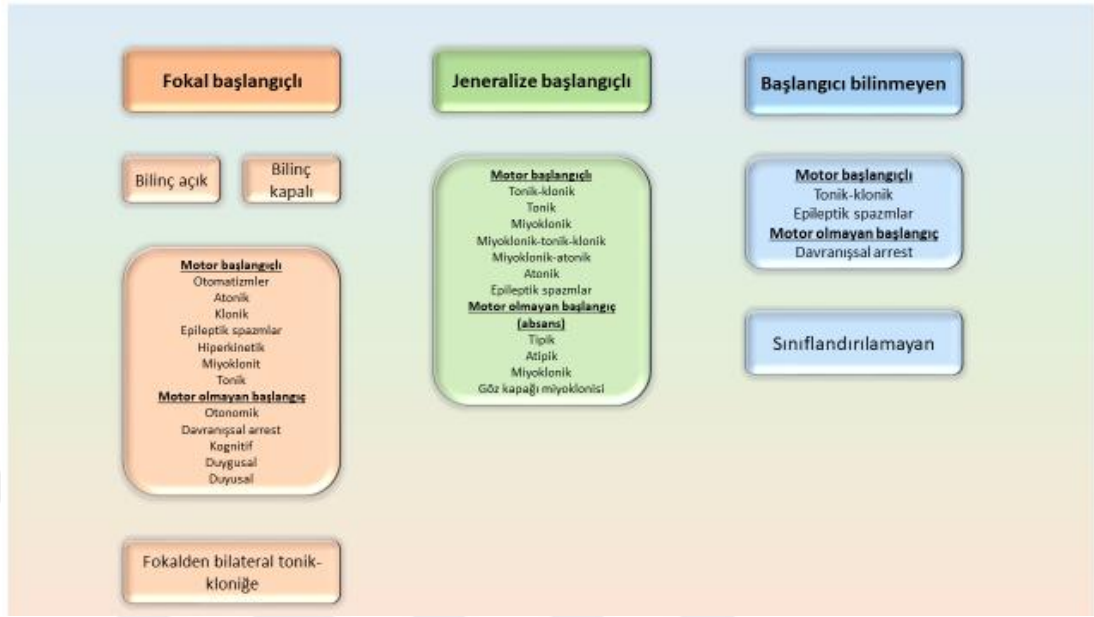
Tablo 1. Epilepsi genel sınıflandırması (Scheffer, 2017'den modifiye edilerek alınmıştır).



Tablo 2. ILAE 2017 Nöbet Tipleri Basit Sınıflandırma (Fisher, 2017'den modifiye edilerek alınmıştır).



Tablo 3. ILAE 2017 Nöbet Tipleri Genişletilmiş Sınıflandırma (Fisher, 2017'den modifiye edilerek alınmıştır).



4.1.1. Epilepsi hastalığının tarihsel süreci

Epilepsi kelimesi, yunanca “epilepsia” kelimesinden köken almış olup “yakalamak, tutmak” anlamlarına gelmektedir. Epilepsi hastalığını tanımlarken halk dilinde daha çok kullanılmakta olan “sara” kelimesi ise arapça kökenli olup “yere vurmak” anlamındadır. Epilepsi hastalığı, bazı bölgelerde “tutarık” diye de ifade edilmektedir.

Epilepsi hastalığının farklı medeniyetlerde yaygın olarak görülmesi, tarih boyunca birçok kaynakta geçmesine neden olmuştur. Epilepsi hastalığı, tarihte yazılı olarak ilk kez M.Ö. 2000 yıllarında Mezopotamya metinlerinde tanımlanmıştır. Eski Mezopotamya’da yaklaşık kırk tabletten oluşan “Sakikku kil” (tüm hastalıklar) tabletlerinin bir kısmında epilepsi hastalığından bahsedilmiştir.

British Museum’daki Babil koleksiyonunda sergilenen tabletlerde (M.Ö. 1.000), babilli hekimlerin epilepsi hastalığının sebebini iblis ve hayaletler olarak düşündükleri belirtilmektedir. Tabletlerde ayrıca nöbet tipleri tanımlanmaya çalışılmış ve az uyku, duygusal sorunlar gibi sebeplerin nöbetleri tetiklediğine ilişkin yaklaşımlarda bulunulmuştur. Epilepsi ile ilgili ilk kitabı (Mukaddes Hastalık) Hipokrat M.Ö. 400’de

yazmıştır. M.S. 4.yy Bizans döneminden bulunan tıbbi metinlerinde epilepsi hastalığından bahsedilmiş ve nöbet esnasında yapılması gerekenleri anlatmıştır. Türk-islam medeniyetinin önemli iki ünlü hekimi, İbni Sina (980-1037) ve Muhammed İbn Zekeriya-el Razi'nin de (865-925) epilepsi hastalığı ile ilgili önemli çalışmaları olmuştur. Tarih boyunca sayısız kişi tarafından epilepsi hastalığının nedeni, tedavisi ve hatta manevi önemi üzerine çok farklı bakış açıları sunulmuştur. Ancak, hastalığın nedeni ve etkili tedavisi adına en büyük gelişme son yarım yüzyıl içerisinde gerçekleşmiştir. Uzun yüzyıllar boyunca büyü veya dini yöntemler ile tedavi edilmeye çalışılan epilepsi hastalığının, Rönesans'tan sonra ahlaki ya da gizemli bir durumdan ziyade fiziksel bir hastalığın belirtisi olduğunu göstermek için girişimlerde bulunulmuştur. Ancak epilepsi hastalığı ile ilgili daha modern görüşlerin oluşması, anatomi, fizyoloji, patoloji gibi bilimlerin ilerleyip gelişmesi ile aydınlanma döneminde olmuştur (Gross,1992).

19. yüzyılın sonlarında yapılan klinik ve deneysel gözlemler sonucu fokal beyin hasarının nöbete neden olabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca (yatıştırıcı) bromürler ve barbitüratlar kullanılarak nöbetlerin başarılı bir şekilde kontrol edilebildiği gösterilmiştir. Epilepsi hastalığının tedavisinde fenitoinin de kullanılmaya başlanması ile sakinleştirici özelliği olmayan ilaçların da nöbet kontrolünde etkili olabileceği keşfedilmiştir. Tüm bu gelişmeler, *in vivo* epilepsi modellerinin geliştirilmesine ve epilepsi hastalığına karşı etkinliği test edilen farmasötik ajanların kapsamının genişlemesine yol açmıştır (Gross,1992). En büyük gelişmelerden birisi de 1930'larda EEG'nin kullanıma girmesi ile epilepsinin bir nöronal eksitabilite hastalığı olduğunun gösterilmesidir.

4.1.2. Epilepsi hastalığının nörokimyasal özellikleri

John Hughlings Jackson 19. yy'da epileptik nöbetlerin oluşum mekanizmasını “gri cevherden ender olarak ortaya çıkan ani, aşırı, hızlı ve lokal deşarjlar” olarak tanımlamıştır. Ayrıca Jackson nöbet aktivitesinin anormal bir odaktan başlayıp normal beyin dokusuna yayıldığı fikrini ortaya koymuştur (Brunton, 2009). Epilepsi hastalığının beyindeki nöronlar arası iletişimi sağlayan, sinaptik aktivite bozukluklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. İnhibitör aktivitedeki azalmanın ya

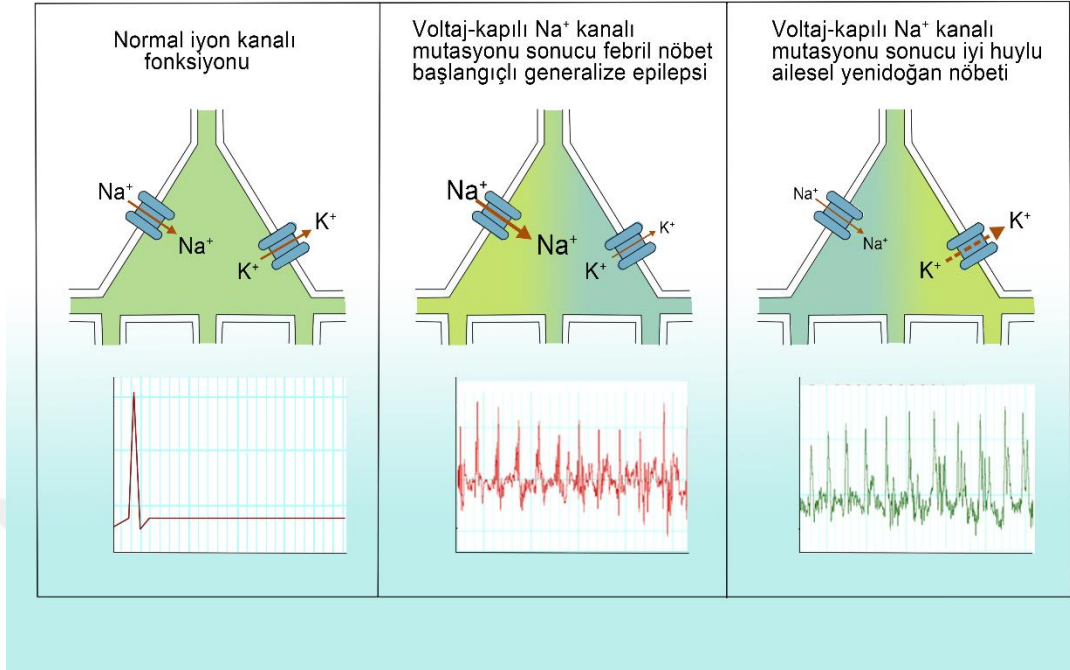
da eksitator aktivite artisinin nobete neden olduğu bilinmektedir. Yapılan farmakolojik çalışmlar da bu görüşü desteklemektedir.

Hücre eksitabilitesinin ayarlanmasında görevli üç ana nörotransmitter bilinmektedir. Bunlardan GABA ve adenosin inhibitör sistemi ve glutamat eksitator sistemi oluşturmaktadır. Beyinde nörotransmitter olarak bulunan dopamin, serotonin, noradrenalin ve asetilkolin de hücre eksitabilitesinin düzenlenmesinde yardımcı maddelerdendir (Engelborghs, 2000).

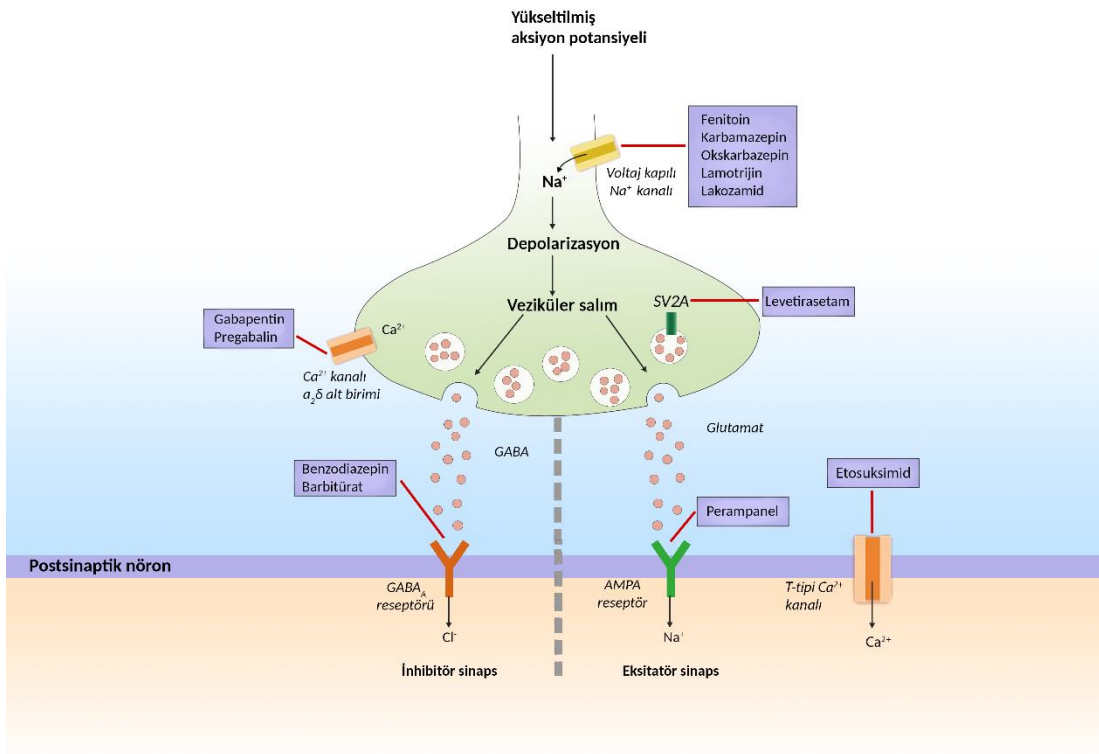
GABAA reseptör antagonistlerinin ve farklı tip glutamat reseptör agonistlerinin, nobeti tetiklediğı yapılan *in vivo* deneyler sonucu gösterilmiştir. Tersine GABA reseptör aracılı etki gösteren farmakolojik ajanların da nobeti baskıladığı bilinmektedir.

Nöronlarda eksitabilite artışıdaki temel olay hücrenin Na^+ 'a ve hipokampusun piramidal hücreleri gibi bazı nöronlarda Ca^{2+} 'a geçirgenliğinin artmasıdır. İnhibisyon artışı ise hücredeki K^+ ve Cl^- artışı ile ilgilidir.

Voltaj-kapılı Na^+ kanalları aksiyon potansiyeli için gereklidir ve mutasyonu sonucu febril nöbet başlangıçlı generalize epilepsiye ve iyi huylu ailesel yenidoğan nöbetine zemin hazırladığı bilinmektedir (Şekil 1). Sürekli gelişen bu bilgiler ışığında epilepsi hastalığının patofizyolojisi aydınlanmakta ve tedavi yöntemleri bu mekanizmalar üzerinden geliştirilmektedir. Örneğin antiepileptik ilaç olarak yaygın kullanılmakta olan karbamazepin, fenitoin ve lamotrijinin Na^+ kanalı inhibisyonu üzerinden etki göstermektedir (Engelborghs, 2000) (Şekil 2).



Şekil 1: İyon kanalı bozukluğu ve kalıtsal epilepsi hastalıkları arasındaki ilişki.



Şekil 2: Sık kullanılan bazı antiepileptik ilaçların etki mekanizmaları.

4.2. Epileptogenez

Epilepsi hastalığı, epileptogenez denilen ve spontan tekrarlayıcı nöbetler başlayana kadar devam eden latent dönemi içine alan nörobiyolojik olayları ve nöbetlerin başlamasını tetikleyen tüm nöral mekanizmaları içine alan bir süreç sonucunda meydana gelmektedir. Epileptogenez sürecinin sonunda spontan tekrarlayıcı nöbetlerle karakterize epilepsi hastalığı ortaya çıkmaktadır. Bugün bir epilepsi hastasının tanı alabilmesi ve sonrasında tedavisinin başlanması, klinik tablo ortaya çıktıktan sonra yani nöbet aktivitesi başlayınca mümkün olabilmektedir. Epileptogenetik dönemi tetiklediği düşünülen travmatik beyin hasarı ya da intrakranial enfeksiyon gibi olaylardan sonraki süreç, herkes için geçerli olmayıp, epileptogenez sürecinde tam olarak hangi mekanizmaların işlediği henüz aydınlatılmış değildir.

İnsan absans epilepsisinin doğumda gözlenmeyip belli bir latent dönemden sonra başlaması ve ayrıca absans epilepsisi için iyi bir model olarak bilinen immatür GAERS sıçanlarda da doğum sonrası 30. günden önce EEG bulgusunun olmaması, doğum sonrası 40. günde yavruların ancak % 30’unda tipik deşarjların izlenmesi ve bu oranın 3 aylık hayvanda % 100’e ulaşması (Vergnes ve ark, 1986), bir epileptogenez süreci kavramını kuvvetle desteklemektedir.

Sıçanlarda talamik ve kortikal bağlantıların postnatal dönemde matürasyona ulaştığı gösterilmiştir (Jones ve Yang, 1985). Fonksiyonel, ritmik ve senkronize talamokortikal osilasyonların oluşturulmasında etkili sinaptogenezin tamamlanması 4. postnatal haftaya kadar uzamaktadır (Daniels ve ark, 1978).

Epileptogenetik süreçte, sinir hücre gruplarında ve birbirleri ile bağlantılarında kayıplar, hücreler arası patolojik yeni bağlantılar (aksonal filizlenme) ve etkilenen dokunun gliosisine yol açan inflamasyon kaskadlarının aktivasyonu gibi olayların olabileceği düşünülmektedir (Goldberg, 2013).

Epileptogenez süreci ile ilgili birkaç alanda kaydedilen önemli çalışmalar mevcuttur. Bunlar, artan enflamasyon ve özellikle iyon kanallarını ilgilendiren nöronal kompartmanlardaki yapısal bozukluklar ile hipokampal skleroza bağlı gelişen temporal lob epilepsisi arasındaki ilişki ve esas olarak iyon kanallarını etkileyen

doğuştan genetik değişikliklerin neden olduğu idiyopatik epilepsilerin gelişimidir (Lerche, 2011).

Epilepsinin patofizyolojisinden sorumlu kalsiyum ve sodyum kanal akımlarındaki artış ve / veya potasyum kanal akımındaki inhibisyona yol açan durumların potansiyel epileptojenik olaylar olduğundan bahseden yayınlar mevcuttur (Ricard-Mousnier, 1993).

Epileptogenez döneminde yer alan süreçler ve buna dair belirtiler henüz tam olarak bilinmediği için hastalara nöbet öncesi tanı konulamamakta ve hastalığın progresyonu önlenememektedir. Bu nedenle epileptogenez dönemine katkıda bulunan nöral mekanizmaların tespiti ve ilgili biyobelirteçlerin bulunması büyük önem taşımaktadır. Mevcut olan antiepileptik ilaçlar semptomatik etki göstererek nöbetleri baskılamaya yönelik olup, epilepsi gelişimi üzerinde etkili değildir. Epileptogenez sürecini etkileyecek antiepileptogenik ilaçların ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, epilepsi hastaları için çok önemli bir adım olacaktır. Epileptogenik uyaran sonrası başlanan etkin bir antiepileptogenik tedavi ile hastalığın başlamasının, geciktirilmesinin ya da en azından nöbet sıklığının azalmasının mümkün olacağı düşünülmektedir (Pitkanen, 2010). Bu nedenle epileptogenez sürecine katkıda bulunan nöral mekanizmaların ve nörobiyolojik süreçlerin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Epileptogeneze katılan nörobiyolojik süreçleri veya nöroanatomik yapıları araştıran çalışmalar artmaktadır (Brandt ve ark, 2016; Ravizza ve ark, 2017). Epileptogenez sürecinin aydınlatılması, epileptogenik bir uyaran sonrası, belli kişilerde gelişen, epilepsi hastalığının erken teşhisi için ölçülebilen biyobelirteçlerin tanımlanmasına ve epilepsi hastalığının gelişimini önleyecek tedavi yöntemlerinin bulunmasına katkı sağlayacaktır (Vezzani ve ark, 2017).

4.3. Absans Epilepsisi

Non-konvülsif nöbetlerle karakterize absans epilepsisi, çocukluk veya adolesan dönemde başlayan, bir genetik jeneralize epilepsi tipini temsil etmektedir.

Absans epilepsisinde, nöbetlerin ani başlayıp sonlanması, kas tonusunun kaybolmaması ve nöbet sonrası, hastanın nöbetin farkında olmadan yaptığı işe kaldığı yerden devam etmesi gibi klinik özelliklerini içeren ilk tanım, Poupart tarafından

1705’de yapılmıştır. Bu klinik tablo Calmeil tarafından 1824’de, “absans” olarak adlandırılmış ve 1838’de de Esquirol ile ilk kez “petit mal” ismiyle anılmıştır (Kınay, 2018).

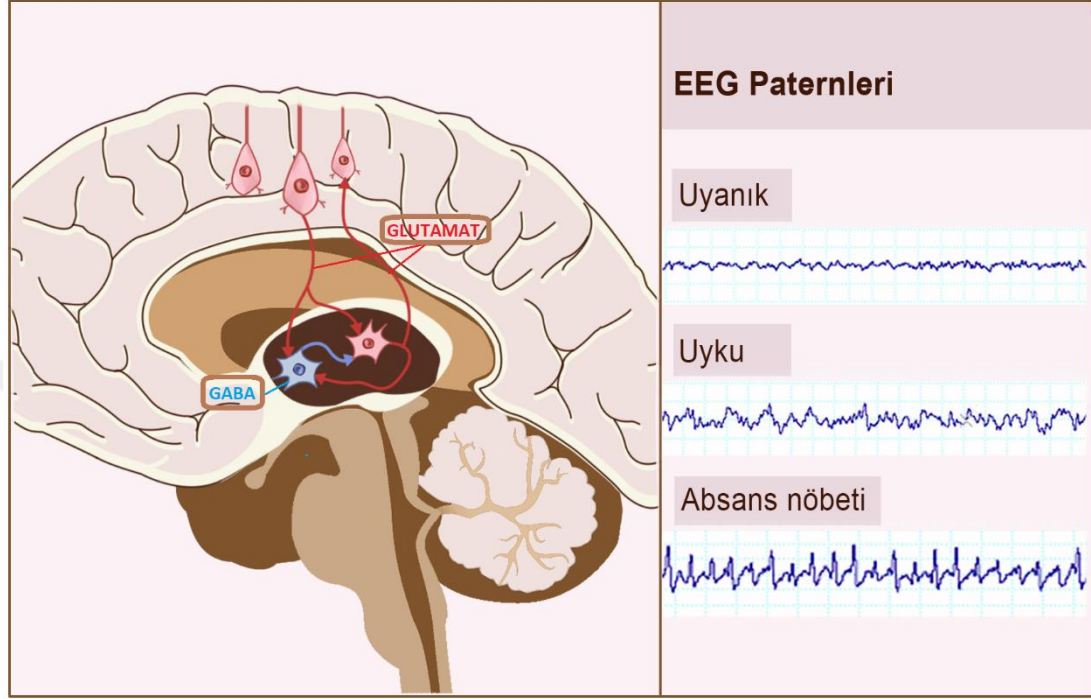
2017 yılında ILAE tarafından güncellenen nöbet tipleri sınıflandırmasına göre jeneralize nöbetler, motor nöbetler ve nonmotor nöbetler olmak üzere ayrılmıştır. Tipik absans nöbetleri, jeneralize nonmotor nöbetler arasında kabul görmüştür. Göz kapağı miyoklonilerinin eşlik ettiği absans epilepsi nöbetleri ise yeni jeneralize bir nöbet tipi olarak kabul edilmiştir. Böylece jeneralize nonmotor nöbetler, tipik, atipik, miyoklonik, gözkapığı miyoklonili absans nöbetleri alt başlıklarına ayrılmıştır (Kınay, 2018).

Absans epilepsisinde tipik EEG bulgusu olarak 3-4 Hz’lik DDD izlenmektedir (Huguenard 2000). Bu aktivite, yüksek voltajlı diken (eksitator postsinaptik potansiyeller) ve onu takip eden yavaş dalga (inhibitör postsinaptik potansiyeller) komponentlerinden oluşmaktadır (Gloor and Fariello 1988).

Absans epilepsisinin patogenezinde kortiko-talamo-kortikal döngünün önemli olduğu gösterilmiştir (Avoli ve Gloor, 1982). Talamokortikal döngünün mekanizması jeneralize DDD’ların oluşumunun anlaşılmasında yardımcı olmaktadır. Jeneralize DDD’ların oluşmasında, kortikal piramidal hücreler, talamokortikal ve talamik retiküler hücreler arasında meydana gelen anormal salınımlı ritimler ile oluştuğu düşünülen talamokortikal döngünün sorumlu olduğu düşünülmektedir. Normal bir talamokortikal döngüde, dorsal talamus kaynaklı eksitator glutamaterjik nöronlar korteksi uyarır. Korteks VI. katmanındaki piramidal hücrelerden kaynaklanan eksitator glutamaterjik nöronlar tekrar talamusa projekte olur. Devredeki inhibitör nöronlar ise talamik retiküler çekirdek tarafından yönetilir. Retiküler GABAerjik nöronlar korteks ve talamustan gelen eksitator uyarıları dengeler (Snead, 1995) (Şekil 3).

Retiküler nöronların kısa süreli ateşlenmesi EEG’de uyku iğlerine yol açan ve talamokortikal hücrelerde GABAA’ya bağlı bir hızlı hiperpolarizasyon tarafından oluşur. Retiküler nöronların güçlü ateşlenmesi ise talamokortikal hücrelerde, T-tipi Ca^{2+} kanallarını etkisiz hale getiren ve EEG’de diken dalga görüntüsüne neden olan paroksizmal bir akımı meydana getiren GABAB’ye bağlı yavaş hiperpolarizasyon

oluşumudur. Sonrasında EEG'deki dalga görüntüsünü üreten senkronize bir hiperpolarizasyon daha meydana gelir (Armijo, 2005).



Şekil 3: Talamokortikal döngü ve uyku, uyanıklık ve absans epilepsisi durumlarındaki EEG yansıması.

4.4. Deneysel Modeller

Hastalıkların patofizyolojisinin ortaya çıkarılması ve yeni tedavi seçeneklerinin denenmesinde, deneysel modeller ile yapılan çalışmalar çok önemli bir yer tutmaktadır. 1930'lu yıllarda Merrit ve Putnam tarafından antikonvülsan ilaç adayı moleküllerin etkinliğinin deneysel modeller kullanılarak test edilmeye başlanması epilepsi hastalığının tedavisi adına yapılan önemli uygulamalardan birisidir. 1940'lı yıllardan itibaren hayvan modelleri epilepsi araştırmalarının ana hedeflerinden birisi olmuştur. İnsanlarda görülenlere benzer şekilde, deneysel modellerde de nöbetler genel olarak jeneralize ve parsiyel olarak sınıflandırılabilir.

Hayvanlarda kısa süreli ve tek uyararla tetiklenen **akut nöbet (iktogenezi)** modelleri ya da belli bir süreç sonucu gelişen **kronik epilepsi (epileptogenezi)** modelleri, epilepsi hastalığı açısından önemli birçok konuyu araştırmak amacıyla

sıklıkla kullanılmaktadır. Akut modeller, konvülsan maddelerin uygulanması, elektrik stimülasyonu veya metabolik değişiklikler sonucunda oluşturulmakta ve geçici epileptiform aktiviteleri içermektedir. Kronik epilepsi modelleri ise yapısal lezyonlar veya tekrarlayan elektriksel stimülasyonlar ile oluşturulmakta ya da spontan genetik epilepsi modelleri kullanılmaktadır. Spontan nöbetlerin izlendiği genetik epilepsi modellerinin, insanda görülen patofizyolojik süreçleri daha iyi yansıttığı kabul edilmektedir.

Bir epilepsi modelinden beklenen özellikler; insanda gözlenen klinik durumu hem davranışsal ve EEG parametreleri açısından iyi teklit etmesi hem de farmakolojik tedaviye benzer şekilde cevap vermesidir. Ayrıca nöbetlerin tekrarlanabilir olması, ölçülebilir özelliklerinin olması, farklı laboratuvarlarda değişkenlik göstermemesi ideal bir epilepsi modelinden beklenen özelliklerdir.

4.4.1. Absans epilepsi deneysel modelleri

Absans epilepsi tipinin pek çok deneysel genetik ve farmakolojik modelleri bulunmaktadır. En yaygın kullanılan genetik modeller Strasbourg kökenli (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg; GAERS) ve Rijswijk kökenli (Wistar Albino Glaxo from Rijswijk; WAG/Rij) sıçanlardır (Akman ve ark, 2010). Bu modeller EEG'lerinde görülen spontan bilateral, frekansı 7-11 Hz ve süresi 1-30 saniye olan DDD ve eşlik eden spesifik davranış biçimleri (hareketsizlik, dalma, bıyık hareketleri) ile insanda görülen absans epilepsi nöbetini iyi taklit etmektedir. Deşarjların diken komponenti eksitator postsinaptik potansiyelleri, dalga komponenti ise inhibitör postsinaptik potansiyelleri yansıtmaktadır (Gloor ve ark., 1988). EEG'deki DDD aktivitesi boyunca sıçanlar, aynen insanlarda gözlenen nöbetler gibi, yapmakta oldukları aktiviteyi birden keserek hareketsiz kalmakta ve deşarjlar bittiğinde aktivitelerine kaldıkları yerden devam etmektedir. Her iki model, absans epilepsisinin elektrofizyolojik, morfolojik ve farmakolojik özelliklerini iyi yansıtmaktadır (Depaulis ve ark., 2006).

Kimyasal maddeler verilerek oluşturulan absans epilepsi nöbet modellerinden en yaygın olanlar penisilin, düşük doz PTZ (20 mg/kg ip), AY9944 (kolesterol sentez inhibitörü) ve gama hidroksi-bütrat (GHB) modelleridir. Bir GABA metaboliti olan

GHB ile EEG parametreleri ve davranışsal olarak insanda gözlenen jeneralize absans epilepsi nöbetine benzer nöbetler oluşturulabilmektedir (Onat ve ark., 2013).

Absans epilepsisinin voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarını etkileyen monojenik spontan mutasyonlar içeren genetik fare modelleri de bulunmaktadır. Bunlarda da EEG’de DDD’ı ile birlikte davranışsal değişiklikler gözlenmektedir (Burgess ve ark., 1999).

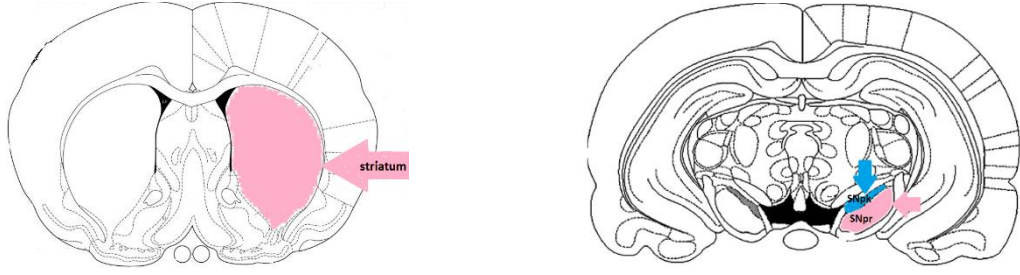
Çalışmamızda kullanmış olduğumuz genetik absans epilepsi modeli olan GAERS sıçanlarda doğum sonrası 30 günden önce DDD’ı görülmemekle birlikte, doğum sonrası 40. günde yavruların % 30’unda tipik deşarjlar izlenebilmektedir. Bu oran 3 aylık hayvanda % 100’e ulaşmaktadır (Vergnes ve ark, 1986).

Dolayısıyla immatür GAERS’lerde görülmeyen belirtilerin, belli bir süreç sonunda matürasyona uğrayıp progresif olarak ortaya çıkması, insan absans epilepsisinin de doğumda gözlenmeyip belli bir latent dönem sonucu başlaması açısından da benzerlik göstermektedir.

4.5. Bazal Ganglia

Striatum, subtalamik nukleus (STN), globus pallidus (GP), ve SN’yi içeren subkortikal yapılara bazal ganglia denmektedir. Sıçanlarda striatum olarak geçen bölge insan beyinde, kaudat nucleus ve putamen olarak iki bölümde incelenir (Şekil 4). Globus pallidus insan beyinde eksterna (GPe) ve interna (GPi) olarak iki alt gruba ayrılmış olup, sıçan beyinde, bu yapılar sırasıyla globus pallidus ve entopedünküler nucleus olarak isimlendirilmektedir. SN ise, badem şeklinde koyu renkte gözükür ve sıçan beyni için, üst medialde kalan bölümü pars kompakta ve alt lateralde kalan bölümü ise pars retikulata olarak adlandırılır (Şekil 4).

Bazal ganglia olarak bilinen bu yapılar ekstrapramidal sistemin bir parçası olup beynin motor, kognitif ve limbik fonksiyonlarında görevlidir.



Şekil 4: Bazal ganglia bölgelerinden striatum ve substantia nigra'nın (pars retikülata; SNpr ve pars kompakta; SNpc) şematik gösterimi.

4.5.1. Striatum

Striatum bazal gangliaların ana girişi olup çevreden gelen uyarılara bağlı ortaya çıkan bilişsel ve motor yanıt dizilerinin öğrenilmesinde etkilidir (Fino ve ark, 2008).

Striatumda büyük ölçüde, D1 veya D2 dopamin reseptörlerini eksprese eden projeksiyon nöronları bulunmaktadır (Petryszyn ve ark, 2017). Ayrıca başlıca parvalbümin, kalretinin olmak üzere farklı nörokimyasal alttipleri olan GABAerjik internöronlar ve kolinerjik internöronlar vardır (Petryszyn ve ark, 2017). Striatal projeksiyon nöronları, iki ana interneuron sınıfı olan GABAerjik ve kolinerjik interneuronlar ile kortikal aktiviteyi bütünleştirir ve kortikostriatal bilgi transferini düzenler (Fino ve ark, 2008). Bazal ganglia döngüsünde striatal internöronlar ve kortikal hücreler arasında glutamaterjik monosinaptik bağlantılar (Fino ve ark, 2008) ve substantia nigra pars kompaktadan gelen düzenleyici dopaminergik uyarılar bulunmaktadır. Kortikal ve substantia nigraya ait projeksiyonlar striatal inhibitör GABAerjik nöronlarla sinaps yapmaktadır.

Konvülsif epilepsili mutant fare modelinde, geçirilen nöbetlere bağlı gelişen striatal hasarı sınırlayıcı bir mekanizma olarak düşünülen, striatal GABAerjik internöron sayılarında artış gözlenmiştir (Ghiglieri ve ark, 2009). Mevcut literatürde epilepsi nöbetlerinin motor döngüler üzerindeki etkilerinin striatum üzerinden modüle edebileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur (Ghiglieri ve ark, 2011). GAERS'lerde yapılan çalışmalar, bazal ganglianın striato-nigral yolaktaki aktivitesinin modülasyonu ile absans nöbetlerin kontrolünün sağlanabileceğini düşündürmektedir (Slaght ve ark 2004; Deransart ve ark, 2001).

GAERS’lerde nöbet aktivitesi sırasında striatal projeksiyon nöronlarının yüksek amplitüdlü ritmik sinaptik depolarizasyon göstermesi, bu nöronların da absans nöbet oluşum mekanizmasına katıldığını düşündürmektedir. Ayrıca absans epilepsi modelinde intrastriatal uygulanan N-metil-D-aspartat (NMDA) ve dopaminerjik agonistlerin, striatal GABAerjik internöronlar aracılığıyla nöbetleri azalttığı gösterilmiştir (Deransart ve ark, 1998; Slaght ve ark, 2004). Buna karşın, striatal dopamin reseptör blokajına bağlı olarak da nöbetlerin arttığı gözlenmiştir (Deransart ve ark, 2000; 2001). Bununla birlikte limbik epileptogenez sırasında dopaminerjik D1 reseptör aktivitesi proepileptogenik rol oynarken, D2 reseptör aktivitesine bağlı olarak gelişen anti-epileptogenik etkiler tespit edilmiştir (Bozzi ve Borelli, 2013).

Striatal sinapsların konfigürasyonu ile dopamin striatal spinal nöronların düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Buna bağlı olarak öğrenme ve diğer davranışsal plastisite ile ilişkili olan kortikostriyal sinapslarda uzun süreli değişikliklerin indüklenmesi dopamin ile düzenlenebilir (Moratalla ve ark., 2016).

4.5.2. Subtalamik nükleus

Stratejik konumu, spesifik elektrofizyolojik ve sinaptik özellikleri nedeniyle STN, bazal gangliya fonksiyonlarında önemli bir yere sahiptir (Charpier ve ark., 2010).

STN, bazal gangliyanın ikinci girişi olup bazal ganglia döngüsünde sadece glutamaterjik nöron içeren tek çekirdektir (Charpier ve ark., 2010).

STN bölgesine yapılan derin beyin stimulasyonları sonucu gözlemlenen bilişsel ve duygusal istenmeyen yan etkiler sonucu STN’un non-motor fonksiyonlarına dikkat çekilmiştir (David B. Weintraub, 2013). Yapılan stimulasyonlara bağlı gelişen bilişsel yan etkinin pallidal stimülasyondan daha yaygın olduğunu bildirmiştir. (Rodriguez-Oroz ve ark., 2005).

4.5.3. Globus pallidus

GP, bazal gangliyanın bileşenlerinden biri olup globus pallidus internus (GPi) ve globus pallidus eksternus (GPe) olmak üzere 2 alt bölümden oluşur. Globus pallidus, aynı zamanda kaudat nükleus ve putamen ile birlikte korpus striatumun yapısına katılır. Globus pallidusun temel işlevi bilinçli ve propriyoseptif hareketleri kontrol etmektir.

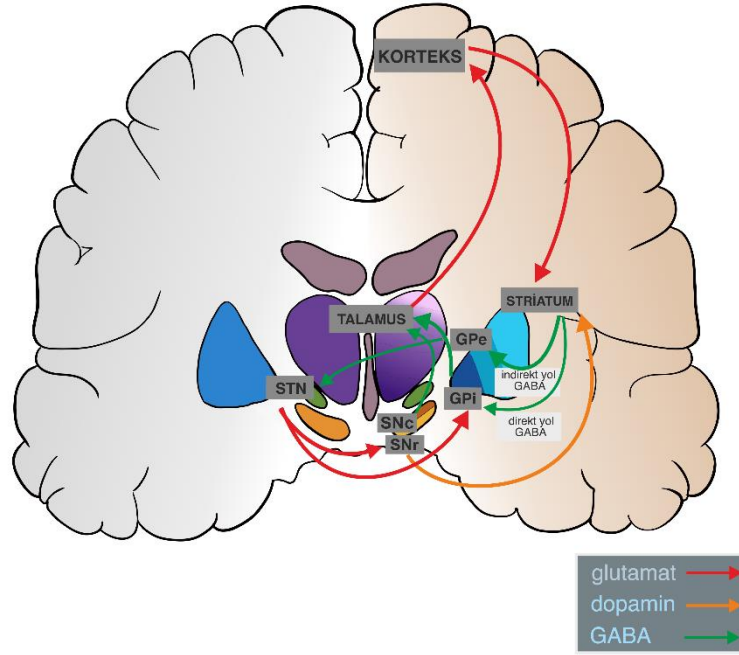
4.5.4. Substansia nigra

SN, bazal ganglia döngüsünün bir parçası olup motor hareketlerin ve ödül fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik bir role sahip olan orta beyin bölgesinde bulunan dopaminerjik nöronlardan oluşan bir çekirdektir. Nigrostriatal yol adı verilen ve SN'den putamene uzanan projeksiyonlar, Parkinson hastalığında gözlenen motor bozukluklarda kritik rol oynamaktadır (Hodge, 1980). Bu dopaminerjik sinir projeksiyonları, SN'yi medial ön beyin demeti yoluyla terk eder ve özellikle putamen olmak üzere bazal ganglia da çeşitli nöronal popülasyonlar ile sinapslar yapar.

SN fonksiyonel ve morfolojik olarak iki bölgeye ayrılır. Bunlar dopaminerjik nöronlar içeren pars kompakta (SNpk) ve inhibitör GABA'erjik nöronlar içeren pars retikulata (SNpr) bölgeleridir. SNpk yoğun şekilde paketlenmiş bir nükleer bölgedir. Anatomik diseksiyonlarda, dopamin sentezinde L-DOPA öncülünden oluşan nöromelanin içeriği nedeniyle koyu renkte görünür (Fabbri, 2017).

4.5.5. Bazal ganglia ve korteksin epilepsi nöbetlerindeki rolü:

Beyinde glutamaterjik ve GABAerjik aktiviteler arasındaki dengenin bozulması sonucu epilepsi nöbetlerinin gelişmesinde bazal ganglianın rol oynadığı gösterilmiştir (Depaulis ve ark., 1994; Gale, 1985). Yukarıda kısaca bahsedilen, bazal gangliayı oluşturan yapılar arasında, özellikle GABA, glutamat ve dopamin aracılığı ile gerçekleşen ve bazal ganglia döngüsü adı verilen bir iletişim ağı bulunmaktadır. Serebral korteksten gelen glutamaterjik (eksitatör) ve substansia nigra pars kompaktadan projekte olan düzenleyici dopaminerjik inputlar striatal GABAerjik (inhibitör) nöronlarla sinaps yapar. Bu nöronlar, direk yolak ile GPi'ya projekte olur, ya da indirekt yolak ile GPe'ya aracılığıyla subtalamik nükleusa projekte olurlar. Subtalamik nükleusdaki glutamaterjik nöronlar da substansia nigra pars retikulata ve GPi'ya projekte olur. GPi ve SNpr'daki GABAerjik nöronların talamusa projekte olmasıyla bazal ganglia döngüsü tamamlanmış olur (Şekil 5).



Şekil 5. Bazal ganglia döngüsü. GPe: Globus pallidus eksterna; GPi: Globus pallidus interna; STN: Subtalamik nucleus; SNc: substansia nigra pars kompakta; SNr: substansia nigra pars retikulata.

SNpr'nın konvülsif ve non-konvülsif epilepsi nöbetleri üzerindeki düzenleyici rolü gösterilmiştir (Bloms-Funke ve Löscher, 1996; Bonhaus ve ark, 1986). SNpr'ya uygulanan GABA_A reseptör agonisti ile (Velíšková ve ark., 1996) ya da nigrall lezyon oluşturularak (Garant ve Gale, 1983) antikonvülsan etki oluşturulabilmektedir. Diğer taraftan bir GABA_A reseptör antagonistinin lokalize olarak uygulanması ile prokonvülsan etkinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (Sperber ve ark., 1989). SNpr'nın non-konvülsif nöbetlerin modülasyonundaki yeri jeneralize absans epilepsi modeli olan GAERS sıçanlarla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Depaulis ve ark., 1994; Depaulis ve van Luijtelaar, 2006; Deransart ve ark., 1998). SNpr'nın GABAerjik ajanlar ile uyarılmasının direkt striato-nigral yollar aracılığı ile absans epilepsi nöbetlerini modüle edebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Depaulis ve ark., 1988; 1989; 1994). Bu sonuçlar ışığında epilepsi nöbetlerinin kontrolünde SNpr ile ilişkili endojen bir sistemin varlığı düşünülmektedir (Depaulis ve ark., 1994; Deransart ve ark., 2001; Paz ve ark., 2007).

Aynı doğrultuda WAG/Rij sıçanlarla yapılan incelemeler sonucu EEG'deki epileptik aktivite ile SN bölgesindeki dopaminerjik nöron yoğunluğu arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak beyindeki dopaminerjik nöron kaybının ve azalmış nigro-striatal dopaminerjik innervasyonun absans epilepsi gelişimini önleyebileceği düşünülmektedir (Birjouova ve ark., 2016).

Kimyasal lezyon sonucu striatumdaki dopamin seviyesindeki azalma bazal ganglia döngüsünü olumsuz etkilemektedir (Ehringer ve Hornykiewicz, 1960; Obeso, 2000). 6-OHDA verilerek nigro-striatal lezyon oluşturulan bir çalışmada, striatuma kalretinin pozitif internöron hücre sayısında kalıcı bir azalma olduğu gösterilmiştir (Petryszyn ve ark., 2017; Ma ve ark., 2014). Aynı zamanda nigro-striatal yolda meydana getirilen lezyona bağlı kalretinin içeren striatal nöronlarda geçici bir artış gözlenen çalışmalar da mevcuttur (Petryszyn ve ark., 2017; Mura ve ark., 2000). Bu durumun striatal nöronların dopaminerjik duyarlılığı ve serebral korteksten gelen artmış eksitator inputlar sonucu kalretinin ekspresyonundaki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir (Petryszyn ve ark., 2017; Mura ve ark., 2000).

Konvülsif ve non-konvülsif epilepsi nöbetlerinde korteksin primer rol oynadığı gösterilmiştir (Engel 1995; 2001; Fisher ve ark., 2005; Fisher ve ark., 2014; Trevelyan ve ark., 2015). Kortikal alanlara yayılan deşarjlar fokal veya jeneralize olabilen konvülsif ve non-konvülsif nöbetlere neden olmaktadır (Engel, 2001). GAERS'lerde somatosensoriyel korteksi içine alan kortiko-talamo-kortikal döngüdeki artmış senkronizasyon ve GABA'erjik inhibisyon non-konvülsif absans epilepsi nöbeti ile ilişkili bilateral DDD'nin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Meeren ve ark., 2002). Absans epilepsili sıçanlarda yapılan moleküler çalışmalara göre somatosensoriyel kortekte sodyum kanal ekspresyonunda artış (Klein ve ark., 2004), hiperpolarizasyon-kapılı HCN1 kanal ekspresyonunda azalma (Strauss ve ark., 2004) gösterilmiştir. DDD'nin ortaya çıkışından sorumlu tutulan artmış kortikal uyarılabilirliğin ise korteksin derin tabakalarında artmış NMDA aracılı eksitasyon (Pumain ve ark., 1992) ya da II. ve III. tabakalarda azalmış GABA aracılı inhibisyon olabileceği düşünülmektedir (Luhman ve ark., 1995).

Kortiko-striato-talamo-kortikal döngünün hafıza ve motor fonksiyonlarda da önemli bir yere sahip olduğu ve dopaminin kortikal şebeke üzerinde düzenleyici

olduğunu bilinmektedir. Nigro-striatal projeksiyonlar, motor kortekse uzanan talamik projeksiyonlar aracılığıyla indirekt olarak motor fonksiyonu etkilemektedir. Ayrıca prefrontal kortekse uzanan projeksiyonlarıyla mezokortikal dopaminerjik sistemin de hafıza üzerinde direkt etkili olduğu gösterilmiştir (Mattay ve ark., 2002).

4.6. Tez Çalışmasının Amacı

Günümüz şartlarında absans epilepsisinde nöbetler başlamadan önce hastalık öngörülememekte ve herhangi bir tanısal metot ile tespit edilememektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ve insanlarda gözlenen klinik tablo, nöbetlerin başlangıcından önce süregelen bir epileptogenez sürecini kuvvetle düşündürmektedir. Bu çalışmanın birincil amacı nigrostriatal yolak dejenerasyonunun, epileptogenez dönemindeki absans epilepsili sıçan modelinde nöbet gelişimi ve beyindeki GABAerjik ve dopaminerjik immünoreaktivite üzerindeki etkisini araştırmaktır. Ayrıca ikincil olarak nigrostriatal yolak dejenerasyonunun, epileptik nöbet gözlenmeyen Wistar suşu sıçanlarla kıyaslanması hedeflenmiştir. Böylece iki suş arasındaki farklılıklar gözlenerek, epileptogenez sürecine dair bilgi birikimine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Bu amaçla medial ön beyin demetine 6-OHDA verilerek yapılan kimyasal dejenerasyonun etkilerinin, GAERS suşu sıçanlarda Wistar'lara göre farkı, davranış deneyleri ve immünohistokimyasal yöntemler ile ortaya konmaya çalışılmıştır. Ayrıca yapılan dejenerasyonun, GAERS sıçanlarda spontan geçirilen absans nöbetlerinin parametresi olan DDD'lar üzerindeki etkileri incelenmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Hayvanlar ve Bakım Koşulları

Çalışmamızda 30 günlük GAERS ve 30 günlük Wistar suşu, yavru erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Hayvanlar 12 saat karanlık-12 saat aydınlık döngüsü olan, ısısı sabit ($22\pm3^{\circ}\text{C}$) tutulan bir odada, ihtiyaçları kadar standart sıçan yemi ve suya ulaşabilecekleri, 3-4 hayvanın rahatlıkla kalabileceği kafeslerde barındırılmıştır. Cerrahi sonrası her hayvan ayrı kafeslere alınıp, beslenmeleri her gün kilo takibi ile kontrol edilmiştir. Hayvanların bakımları, takipleri ve deneysel uygulamalar Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Hayvan Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Deneyler için Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onay alınmıştır (103.2019.mar).

5.2. Deney Protokolü

Çalışmamızda; epileptogenez dönemi içerisinde olan henüz absans epilepsi nöbetleri başlamamış, 30 günlük “genetik absans epilepsi modeli olan” GAERS sıçanların ve 30 günlük epileptik olmayan Wistar sıçanların, medial ön beyin demetine 6-OHDA uygulanarak nigro-striatal yolaktaki kimyasal lezyonun epileptogenez sürecindeki rolü değerlendirilmiştir. Uygulanan 6-OHDA sonrası nigro-striatal yolakta meydana getirilmeye çalışılan lezyonu doğrulamak için 6-OHDA enjeksiyonundan 21 gün sonra subkutan apomorfin verilerek rotasyon ve silindir testleri ile motor yanıt değerlendirilmiştir. Yetişkinlik döneminde yani postnatal 90. günde (PN90) EEG kaydı alınarak epilepsi nöbet parametreleri ve beyin kesitlerinde nörohistokimyasal açıdan GABAerjik (parvalbumin) ve dopaminerjik (tirozin hidroksilaz) nöron aktiviteleri incelenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Deney tasarımı. PN: postnatal; MFB: Medial forebrain bundle (Medial ön beyin demeti).

Deney grupları;

- ❖ Wistar-Naif
- ❖ Wistar-Yalancı Opere
- ❖ Wistar-6-OHDA
- ❖ GAERS-Naif
- ❖ GAERS-Yalancı Opere
- ❖ GAERS-6-OHDA

Şeklinde oluşturulmuştur.

5.3. Deney Akışı

5.3.1. Medial ön beyin demeti bölgesine 6-OHDA uygulanarak nigro-striatal yolakta kimyasal lezyon oluşturulması

Stereotaksik cerrahi yöntemle PN30 günlük erkek sıçanlardan rastgele seçilen deney grubunun medial ön beyin demetine 6-OHDA uygulanmıştır. Yalancı opere kontrol grubu da PN30 erkek sıçanlardan rastgele seçilmiş olup aynı koordinatlar kullanılarak medial ön beyin demetine temiz bir kanül ile girilmiş ve madde

verilmeden aynı süre boyunca kanül içeride tutulup çıkarılmıştır. İkinci bir kontrol grubu olan naif gruba ise hiçbir uygulama yapılmamıştır.

Nigro-striatal yolda oluşturulmaya çalışılan kimyasal lezyonun doğruluğu enjeksiyon sonrası 21. günde davranış deneyleri ile test edilmiştir.

5.3.2. GAERS suşu sıçanlarda, epileptogenez sürecinde nigro-striatal yolağın tahribi sonrası, epilepsi nöbet parametrelerinin değerlendirilmesi

Nigro-striatal yolağın lezyonu, davranış deneyleri ile gösterilen GAERS deney ve yalancı opere kontrol grubundan PN90. günde EEG kaydı alınmıştır. Kayıtlardaki nöbet süreleri ve sayıları analiz edilerek ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

5.3.3. Epileptogenez döneminde kimyasal lezyon ile devre dışı bırakılan nigro-striatal yolağın sonuçlarının striatum, SNpr ve SNpk bölgelerinde immünohistokimyasal parametreler ile değerlendirilmesi

Davranış deneyleri ve EEG kaydı tamamlanan tüm grupların beyinleri perfüzyon yöntemi ile çıkarılmış. 40 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak immünohistokimyasal yöntem ile tirozin hidroksilaz boyama ile dopaminerjik ve parvalbumin boyama ile de GABAerjik nöronlar değerlendirilmiştir.

5.4. 6-OHDA Hazırlığı

Hızlı bozulan bir madde olduğundan, 6-OHDA hazırlığı, uygulamanın hemen öncesinde yapılmıştır. Bu amaçla, 5 mg 6-OHDA (Sigma H116), % 0,2 askorbik asit içeren 2,5 ml steril, süzölmüş SF içerisinde çözölmüş ve 2 mg / ml'lik solösyon hazırlanmıştır. Alöminyum folyo ile ışıktan korunması sağlanarak enjeksiyona kadar buz dolu bir strafor köpük içinde bekletilmiştir. Daha sonra stereotaksik cerrahi yöntem ile deney grubu sıçanların medial ön beyin demeti bölgesine 1 µl / dk hızda gidecek şekilde toplam 8 µg / 4 µl 6-OHDA infüzyon pompası yardımı ile verilmiştir.

5.5. Stereotaksik Cerrahi: Medial Ön Beyin Demeti Bölgesine Lezyon Yapmak Amacıyla (PN30 sıçanlara)

Cerrahi işlemler öncesi hayvanlara intraperitoneal (i.p.) olarak 112,5 mg/kg ketamin (Alfamine; Alfasan) ve 7,5 mg/kg ksilazin (Alfazyne; Alfasan) anestezisi uygulanmış, anestezisi derinliği kornea ve pençe refleksleri ile kontrol edilmiştir.

Anestezi altındaki hayvanların kafa bölgesindeki tüyleri göz arkası ile kulak hizasını içerecek şekilde kesilmiştir. Kafaları önce kulak barları sonra burun barı yardımı ile stereotaksi cihazına (Stoelting Model 51600, A.B.D.) sabit şekilde yerleştirilmiştir. Kafa derisi antiseptik solüsyonla temizlendikten sonra her iki göz arkası orta noktasından başlayarak, yaklaşık 1,5 cm.lik longitudinal bir kesi ile kafa derisi ve periost kenara itilmiş, kafatası ortaya çıkarılmıştır.

Koordinat belirlerken, sıçan beyin atlasından (Paxinos ve Watson, 1997) alınan referans değerler, 30 günlük sıçanlara göre modifiye edilmiştir. Uygun koordinatın tespit edilebilmesi için ön deneyler yapılmıştır. Bu amaçla metilen mavisi ile yapılan işaretlemeler sonrası, girilen koordinat, beyin kesitlerinde tiyonin boyama yöntemi ile histolojik olarak doğrulanmıştır.

Cerrahi sırasında bregma noktası referans alınarak, 30 günlük yavru sıçanlar için tespit edilen koordinata göre, GAERS ve Wistar suşu deney grubu sıçanların sağ medial ön beyin demeti bölgesine (AP:-1,4 mm, ML: 1,6 mm, V: 7,1 mm) kanül yardımı ile girilmiştir. Öncesinde hayvanın kafatasında, elektrikli dril (Strong 204 Model Korea) yardımı ile kanülün rahat ve doğrusal çizgisi bozulmadan geçebileceği büyüklükte (yaklaşık 1mm çapında) bir delik açılmıştır.

Bir ucu kılavuz kanüle bağlı olan polietilen tüpün, diğer serbest ucu 10 µl hacmindeki mikroenjektöre (Hamilton enjektörü) bağlanarak bir infüzyon pompası yardımıyla, 4 dakikada 4 µl verilecek şekilde 6-OHDA enjeksiyonu yapılmıştır. Maddenin dokuya difüzyonunun tam olması için enjeksiyon işlemi sonrasında 1 dakika beklendikten sonra kanül çıkartılmıştır. İşlem sonrası hayvanlar, kafa derisi cerrahi dikiş ile kapatılarak, yavru sıçanlar için uygun şartlar sağlanan kafeslere alınmıştır. Hayvanların kilo alımları ve davranışları kontrol edilerek, gelişimleri gözetim altında tutulmuştur.

Kontrol grubu olarak seçilen hayvanlara da aynı cerrahi işlem uygulanmıştır. Temiz bir kanül ile belirlenen koordinata girilip, 5 dk bekleme süresinden sonra kafa derisi cerrahi dikiş ile kapatılarak hayvan, kafesine alınmıştır.

5.6. Davranış Deneyleri (silindir ve rotasyon testleri)

Nigro-striatal yolakta oluşturulan lezyonu değerlendirmek için deney ve yalancı opere grubu GAERS ve Wistar suşu sıçanlara rotasyon ve silindir testleri uygulanmıştır. Stereotaksik cerrahi işlem sonrası dinlenmeye alınan sıçanlara, üçüncü haftanın sonunda (21. gün) silindir ve apomorfin enjeksiyonu sonrası rotasyon testleri uygulanmıştır.

5.6.1. Silindir testi

Sağ medial ön beyin demetine uygulanan 6-OHDA sonrası hayvanda oluşan dopaminerjik lezyonu göstermek için yapılmıştır. Lezyon oluşan hayvanlarda kontralateral ön ayak kullanımında azalma beklenmektedir. Bu amaçla hayvan, içinde serbest hareket edebileceği 20 cm derinliğinde, 30 cm çapında silindir bir pleksiglas kafese yerleştirilerek, sağ ve sol her iki ön ayağının kafesin duvarına değme sayısı gözlenmiştir. Test, hayvan kafese yerleştirildikten hemen sonra başlatılan ve 5 dakika sürdürülen video kamera kaydından değerlendirilmiştir (Rattka ve ark., 2016). Test sırasında hayvanın davranışlarını etkileyebilecek ses, yabancı kişi gibi dış faktörler engellenmeye çalışılmıştır. Test aynı kişiler tarafından ve yaklaşık aynı saatlerde yapılmıştır. Testin değerlendirilmesi, lezyona kontralateral ön ayakların kafes duvarına değme sayısının, ipsilateral ön ayakların değme sayısına oranı olarak ifade edilmiştir.

5.6.2. Rotasyon testi

Tek taraflı 6-OHDA uygulaması sonrası lezyon oluşan hayvanlarda, bir dopamin agonisti olan apomorfin (0,05 mg/kg, subkütan) verilmesi post sinaptik dopamin reseptörlerini aktive etmektedir (Pessoa ve ark., 2018). Yapılan dejenerasyona bağlı lezyon tarafında dopamin azalması/yokluğu nedeni ile dopaminerjik reseptör sayısındaki artış bağlı olarak ve pramidal çaprazlama sonucunda hayvanlarda lezyonun kontralateral yönüne dönme hareketi oluşmaktadır (Hamzehloei ve ark., 2019; Liu ve ark., 2019).

Apomorfin enjeksiyonu sonrası hayvanlar, 20 cm yükseklik ve 30 cm çapta bir pleksiglas silindir kafes içerisine alınmıştır. Hayvanın sol tarafa yaptığı her 360°'lik ritmik rotasyon hareketi onar dakikalık dilimlerde 30 dakika boyunca sayılmıştır. Her

deney grubu için onar dakikalık dilimlerde sol tarafa rotasyon sayıları ve toplam rotasyon sayıları ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

5.6.2.1. Apomorfin hazırlığı

Her rotasyon testi öncesi, deney günü taze hazırlanacak şekilde, 2 ml'lik eppendorf tüp içerisine, 5 mg apomorfin, 1 mg askorbik asit ve 1 ml distile su eklenerek stok solüsyon oluşturulmuştur. Işıktan ve ısıdan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile sarılıp, buz dolu strafor kutuda tutulmuştur.

Enjekte edilecek solüsyon hazırlığı için, 10 ml'lik kapaklı cam deney tüp kullanılarak stok solüsyondan 50 µl alınıp, 4950 µl SF ile seyreltilmiştir. Deney tüpü de alüminyum folyoya sarılıp buz içerisinde muhafaza edilmiştir. Rotasyon testi öncesi hayvanın ense bölgesine 0,05 mg/kg dozda subkutan olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası hayvan hemen silindir kafese alınıp süre başlatılmıştır.

5.7. EEG Kaydı

Epileptogenez sürecindeki non-konvülsif epilepsi nöbetleriyle karakterize absans epilepsi modeli olan GAERS-6-OHDA grubu ve GAERS-yalancı opere kontrol grubu sıçanlarda, nigro-striatal yolağın devre dışı bırakılmasının epilepsi nöbet parametreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Absans epilepsinin tipik EEG bulgusu olan DDD'ı incelenmiştir. Otuz günden küçük GAERS'lerde DDD'ı görülmemektedir. Normal şartlarda deşarjlar doğum sonrası 40. günde, yavruların % 30'unda tespit edilebilmektedir. DDD'ı epileptogenez sürecinin ilerlemesiyle artmakta ve 3 aylık hayvanlarda % 100'e ulaşmaktadır (Vergnes ve ark. 1986).

Nigro-striatal yolakta kimyasal lezyon oluşturulan 30 günlük GAERS'lerin EEG parametreleri 90 günlük olduklarında değerlendirilmiştir. 6-OHDA ile kimyasal lezyon yapılmış olan deney grubu GAERS'lere ve aynı bölgeye sadece mekanik cerrahi işlem uygulanmış yalancı opere kontrol grubu GAERS'lere, 90 günlük olduklarında stereotaksik cerrahi yöntem ile EEG kayıt elektrodları takılmış ve EEG kaydı alınmıştır.

5.7.1. Stereotaksik cerrahi: EEG kaydı almak amacıyla (PN90 sıçanlara)

Deney grubu olarak 6-OHDA uygulanan ve yalancı opere kontrol grubu GAERS sıçanlara, ketamin (100 mg/kg; Alfamine; Alfasan, i.p) ve ksilazin (10 mg/kg; Alfazyne; Alfasan, i.p) anestezisi altında, anestezi derinliği kornea ve pençe refleksleriyle kontrol edilerek, stereotaksik cerrahi işlem uygulanmıştır. Hayvanların kafa derisi traşlanıp, stereotaksi aletine (Stoelting, Model 51600, Wood-Dale; A.B.D.), önce kulak deliklerinden kulak barları yerleştirilerek, sonra ön dişleri burun barına kafatası oynamayacak şekilde yerleştirilerek sabitlenmiştir. Kafa derisi antiseptik solüsyon ile silindikten sonra göz arkası orta noktasından kulak hizasına doğru yaklaşık 2 cm'lik longitudinal bir kesi atılmış ve kafa derisi periost ile birlikte bulldog klampları yardımı ile kenara çekilmiştir.

Vida şeklindeki (bir ucu açıkta kalacak şekilde bakır tel lehimlenmiş küçük vidalar) elektrodlar el drili yardımı ile yaklaşık 1 mm çapında bilateral olarak frontal ve parietal kemiklere açılan deliklere, takılmıştır. İki adet sabitleme vidası (telsiz) kafatası üzerine yerleştirilmiştir. Vida elektrotlar bakır tel aracılığı ile mini konnektöre lehimlenmiştir. Hayvanın kafasına yerleştirilen kayıt elektrodları ve sabitleme vidaları soğuk dental akrilik ile kafatasına sabitlenmiştir. Cerrahi alan, açıkta vida ve kablo gözükmeyecek şekilde akrilik ile tamamen kapatılmıştır.

5.7.2. EEG kaydı alınması

Cerrahi sonrası bir haftalık iyileşme sürecine alınan hayvanlardan 2 ardışık gün üçer saat (09:00 - 12:00) bazal EEG kaydı alınmıştır.

Hayvanlar 30 cm çapında ve 20 cm yüksekliğindeki pleksiglas silindir kafeslerde serbest hareket halinde iken, kablolar aracılığıyla EEG sistemine (PowerLab / 8SP, ADInstruments, Oxford, Birleşik Krallık) bağlanmıştır. Kayıtlar Labchart 8 (ADInstruments, Oxford, Birleşik Krallık) programı ile bilgisayar ortamına geçirilmiştir. Deney ve yalancı opere her hayvan için aynı şekilde bilateral fronto-parietal EEG kaydı alınmıştır.

5.7.3. EEG kayıt analizi

Absans epilepsisinin tipik EEG bulgusu olan, DDD'ı EEG'deki diğer paroksizmal aktivitelerden spektral özellikleri ile ayrılmaktadır (Akman ve ark, 2010).

6-OHDA uygulanan deney grubu ve yalancı opere kontrol grubu GAERS sıçanların EEG kayıtları, DDD aktivitelerinin süreleri ve sayıları açısından analiz edilmiştir.

5.8. Perfüzyon İşlemi ve Beyin Dondurma

Perfüzyon işleminin tam olabilmesi için hayvanlarda derin anestezi sağlanmış (ketamin 100 mg / kg, ksilazin 10 mg / kg), anestezi derinliği pençe ve kornea refleksleri ile kontrol edilmiştir. Derin anestezi altındaki hayvan, perfüzyon işlemi için özel olarak ayarlanmış düzenek üzerine, özellikle karotis arterlerinde herhangi bir açılma olmayacak şekilde, kardiyak sirkülasyon bozulmadan ön ve arka ayakları zemine enjektör iğnesi yardımı ile sabitlenerek sırt üstü yatırılmıştır. Keskin, künt uçlu bir makas ve dişli penset yardımı ile önce ksifoid bölgesinden, toraks derisi kesilmiş ve göğüs kafesi sağlı sollu ufak adımlarla kalbe zarar vermeden kaldırılmıştır. Kalp açık şekilde ortaya çıkarıldıktan sonra düz bir penset yardımı ile tutulup, perfüzyon pompasına (Variable Flow Peristaltic Pumps, Stoelting, 536039) bağlı gri anjiokat (16G 1,75mm) iğnesi ile, kalbin apeksinden girilip, aorta ulaşılmıştır. İğne, aort içerisinde iken bir klemp yardımı ile sabitlenip daha önce içerisinde serum fizyolojik solüsyon (SF) geçirilmiş olan perfüzyon pompası açılarak, vasküler sistemden önce SF (hayvanın ağırlığının gram değerinin en az yarısı kadar ml ölçüsünde), hemen ardından formalin solüsyonunun (formalin solution, neutral buffered, 10 %, Sigma HT5012) (hayvanın ağırlığının gram değeri kadar ml ölçüsünde) dolaşımı sağlanmıştır. Her hayvanın perfüzyon işlemi öncesinde perfüzyon pompa sisteminin içerisinde hava olmadığı kontrol edilmiş, SF çıkışı görüldükten sonra işleme başlanmıştır. Ayrıca SF'den formalin solüsyonuna geçiş yapılırken pompa durdurulup vasküler sisteme hava kaçıışı önlenmiştir. Perfüzyon işlemi bittikten sonra beyin dokusu, ronjur (kemik makası) yardımı ile çıkarılarak 15 ml formalin solüsyonu bulunan, hayvanın protokol numarasının yazılı olduğu falkon tüpe alınmıştır. Beyin dokusunun içerisinde bulunduğu solüsyon 24 saat sonra 0,1 M PBS ile hazırlanan, % 30'luk sükröz solüsyonu ile değiştirilmiş ve bu solüsyon içerisinde beyin dokusunun

4-5 gün içerisinde çökmesi beklenmiştir. Bekleme aşamaları 4 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Çöken beyinler kuru buz yardımı ile -25 °C'ye soğutulmuş metilbütan içerisinde 3 dk tutularak dondurulmuş ve protokol numarası yazılı olan alüminyum folyoya sarılıp -80 °C derin dondurucuya (New Brunswick Ultra-Low Temperature Freezer, U570) koyulmuştur.

5.9. Kesit Alma

Beyinler kriyostat cihazında (Leica CM1950) dokuyu sabit tutmak amacı ile bulunan diskler üzerine, koronal kesit almak üzere serebellum bölgesinden, tissutek yardımıyla yapıştırılmış ve beyin dokusunun üzeri tamamen tissutek ile kaplanmıştır. Kriyostat -20 °C ayarlanmıştır. Kesit almaya başlanmadan önce beyinler yarım saat kadar kriyostat cihazı içerisinde bekletilerek dokunun kesime hazır hale gelmesi sağlanmıştır. Her bir beyin için kesitler, lateral ventriküllerin görüldüğü seviyeden itibaren, 40 µm'lik kalınlıkta, içerisinde önceden hazırlanmış antifriz (% 30 gliserol ve % 30 etilen glikol içeren fosfat solüsyonu) solüsyonu bulunan, üzerine protokol numaraları yazılmış, 1'den 6'ya kadar numaralandırılmış numune kaplarına ardışık şekilde alınmıştır. Böylece bütün beyin bölgelerini içeren 6 farklı numune kabı hazırlanmıştır. Bunlardan iki tanesi immünohistokimyasal yöntem kullanılarak 2 farklı boyamaya yapılmış, geri kalan kesitler ise gerektiğinde farklı boyama yöntemleri uygulanarak araştırılmak üzere saklanmıştır.

5.10. İmmünohistokimyasal Yöntemler

Epileptogenez süreci açısından, absans epilepsi hayvan modeli olan GAERS sıçanlarda ve epileptik olmayan bir suş olan Wistar sıçanlarda kimyasal lezyon ile devre dışı bırakılan nigro-striatal yolağın etkisi immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Striatum ve substansia nigra pars kompka ve pars retikülata bölgelerindeki; GABAerjik ve dopaminerjik immünoreaktivite incelenmiştir. Bu amaçla GABAerjik internöronal aktivite için parvalbumin, dopaminerjik nöron aktivitesi için tirozin hidroksilaz immünohistokimyasal boyama protokolleri uygulanmıştır. 6-OHDA verilerek kimyasal lezyon yapılmış olan hayvanlarla, aynı bölgeye (medial ön beyin demetine) sadece mekanik lezyon yapılmış

olan yalancı opere kontrol grubu ve hiç bir müdehalede bulunulmayan naif kontrol grubu hayvanların, striatum ve substansia nigra bölgeleri; GABAerjik ve dopaminerjik immünoreaktivite açısından karşılaştırılmıştır.

İmmunhistokimyasal boyama işlemi GAERS ve Wistar her iki suşu da içeren 6-OHDA ve kontrol gruplarından (naif ve yalancı opere) oluşturulan setler halinde yapılmıştır. Boyanması planlanan setteki hayvanların perfüzyon ve beyin dondurma işlemleri tamamlandığında beyinler -80 °C derin dondurucudan alınıp kriyostat yardımı ile kesitlere ayrılmıştır.

Her bir set:

- ❖ Wistar-Naif
- ❖ Wistar-Yalancı Opere
- ❖ Wistar-6-OHDA
- ❖ GAERS-Naif
- ❖ GAERS-Yalancı Opere
- ❖ GAERS-6-OHDA

şeklinde ayarlanmıştır.

5.10.1. Tirozin hidroksilaz boyama yöntemi

Kullanılan yöntemde immünohistokimyasal boyama işlemi 2 gün sürmektedir. Birinci gün ilk olarak seri halde alınmış olan kesitlerin bulunduğu numune kabından, incelemeyi planladığımız bölgeleri (striatum, SNpk) içeren kesitler seçilmiştir. Her hayvan için 3 adet striatum bölgesini ve 3 adet SNpk bölgesini içeren toplam 6 kesit seçilmiştir. Kesit seçme işlemi, içerisinde PBS (phosphate buffered saline) bulunan bir petri kabında yapılmıştır. Seçilen kesitler her kuyucukta bir kesit olacak şekilde 24 (6X4) kuyucuk içeren özel boyama kabına alınmıştır. Boyamalar 1 Wistar-naif, 1 Wistar-yalancı opere, 1 Wistar-6-OHDA, 1 GAERS-naif, 1 GAERS-yalancı opere, 1 GAERS-6-OHDA olacak şekilde 6 hayvanı içeren setler halinde gerçekleştirilmiştir. Her set kendi içinde değerlendirilmiştir.

Boyama işlemine bir pipet yardımı ile kuyucukların içerisindeki PBS'in çekilip, yerine % 1'lik H₂O₂ solüsyonu (% 30'luk H₂O₂ stok solüsyonu ve PBS ile hazırlanan) koyulması ile başlanmıştır.* Kesitler 30 dakika boyunca % 1'lik H₂O₂ solüsyonu içerisinde bekletilmiştir.

Otuz dakika % 1'lik H₂O₂ solüsyonunda bekleme aşaması sonrası kesitler beşer dakikalık aralıklarla (5 dk'lık zaman tüm kesitlerin yıkama işlemi bittikten sonra başlatılmıştır) üç kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Üçüncü yıkamanın ardından kuyucuklardaki solüsyon, önceden hazırlanmış olan stok solüsyon A ile karıştırılarak elde edilen % 10'luk Normal Horse Serum (NHS) ile değiştirilmiş ve bir saat bekleme aşamasına geçilmiştir.

Tablo 4: % 1 H₂O₂ (PBS içinde) hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 10 ml için
% 30 H ₂ O ₂ stok	% 1 (ml / 100 ml)	333 µl (mikrolitre)
PBS (0,1 x PBS)		9,67 ml
Toplam		10 ml

*Pipetleme işlemi mikrolitrelik bir pipet yardımı ile kesite zarar vermeden kuyucuklardaki solüsyonun çekilmesi ve sıradaki solüsyonun eklenmesi işlemidir. Pipetleme işlemi her seferinde aynı sıra gözetilerek ve her hayvanın aynı bölgesi ardışık olacak şekilde yapılmıştır. Tüm pipetleme aşamaları 400 µl'ye ayarlanmış bir mikropipetle gerçekleştirilmiştir. Yapılan tüm işlemler ve sonrasındaki bekleme aşamaları oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde (Janke&Kunkel VX2 V) olmuştur.

Tablo 5: Solüsyon A hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 100 ml için
Triton X-100	% 0,1 (ml / 100 ml)	100 µl (mikrolitre)
BSA (bovine serum albumin)	% 0,1 (g / 100 ml)	100 mg
PBS (0,1 x PBS)		100 ml
Toplam		100 ml

Tablo 6: % 10'luk NHS (solüsyon A içinde) hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 10 ml için
Normal horse serum (Vector Labs, S2000)	% 10 (ml / 100 ml)	1 ml
Solüsyon A		9 ml
Toplam		10 ml

NHS içerisinde bir saatlik beklemenin sonunda kesitler yıkama işlemi yapılmaksızın, primer antikör (mouse anti-TH antibody) içeren solüsyona alınmıştır. Bu aşama ile 1. gün tamamlanmış olup kesitler, 4 °C buzdolabında (LabAlt Equipment) bulunan bir çalkalayıcıda (IKA HS260) 24 saat inkübasyona alınmıştır.

Tablo 7: “Mouse anti-TH 1 / 1000 + solüsyon A ve % 1,5 NHS” solüsyonu hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 10 ml için
Normal horse serum (Vector Labs, S2000)	% 1,5 (ml / 100 ml)	0,15 ml
Solüsyon A		9,85 ml
Mouse anti-Tyrosine hydroxylase antibody (Millipore, MAB5280)	1 / 1000	10 µl (mikrolitre)
Toplam		10 ml

İkinci gün ilk olarak kesitler yukarıda belirtildiği gibi PBS ile 3 kez yıkanmış, sonrasında, 1 / 200 sekonder antikor (anti-mouse IgG (H+L), biotinylated) içeren solüsyona alınarak 90 dakika beklenmiştir.

Tablo 8: “1 / 200 sekonder antikor + solüsyon A + % 1,5 NHS” solüsyonu hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 10 ml için
Anti-mouse IgG (H+L), biotinylated. (Vector Labs, BA-2001)	1 / 200	50 µl (mikrolitre)
Solüsyon A		9,8 ml
Normal horse serum (Vector Labs, S2000)	% 1,5 (ml/100 ml)	150 µl (mikrolitre)
Toplam		10 ml

Bir sonraki aşama için hazırlanması gereken ABC solüsyonunun, pipetleme işlemi öncesi oda sıcaklığında 30 dakika beklemesi gerektiğinden, kesitler sekonder antikor

içerisinde iken 75. dakikada (+15 dakika da yıkama süresi) ABC solüsyonu hazırlığına geçilmiştir.

Sekonder antikor içerisindeki 90 dakikalık bekleme sonrası kesitler PBS ile üç kez yıkanmış, ardından kuyucuklara ABC solüsyonu koyulmuş ve 1 saatlik inkübasyona alınmıştır.

Tablo 9: ABC solüsyonu hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 10 ml için
PBS		10 ml
Tween-20 (Applichem A)	% 0,1 (ml / 100 ml)	10 µl (mikrolitre)
Solution A (Vectastain Elite, Vector Labs, PK-6100)		4 damla
Solution B (Vectastain Elite, Vector Labs, PK-6100)		4 damla
Toplam		10 ml

Bir saatin sonunda kesitler aynı şekilde PBS ile yıkanmış, üçüncü yıkamanın ardından kuyucuklara NOVARED solüsyonu pipetlenmiştir. Bu son aşama olup renk değişikliği bu aşamada gerçekleşmektedir. Bekleme süresi renk değişimine bağlı olarak 3-20 dakika arasında değişmektedir.

Tablo 10: NOVARED solüsyonu hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 5 ml için
Distile Su		5 ml
Reagent 1 (Vector Labs, SK4800)		3 damla
Reagent 2 (Vector Labs, SK4800)		2 damla
Reagent 3 (Vector Labs, SK4800)		2 damla
H ₂ O ₂		2 damla
Toplam		5 ml

Renk değişimi gözlemlendikten (yaklaşık 7-8 dakika) sonra, kesitler tekrar 3 kez PBS ile yıkanmış, sonrasında lam üzerine PBS damlacığı ve fırça yardımı ile alınmıştır. Lamalar hızlı kurutma tablası (Adamas Instrumenten SW85) üzerinde kurutulduktan sonra üzerindeki PBS kalıntılarını uzaklaştırmak için piset yardımıyla distile su kullanılarak yıkanmış ve tekrar hızlı kurutmaya bırakılmıştır. Son olarak kuruyan lamalar yapıştırıcı madde (Vecta Mount Permanent Mounting Medium H-5000) ve lamel kullanılarak hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kapatılmıştır.

5.10.2. Parvalbumin boyama yöntemi

Parvalbumin immünohistokimyasal boyama için de tirozin hidroksilaz yöntemiyle aynı protokol kullanılmıştır. Tüm boyama aşamaları aynı olup, farklı olarak kullanılan normal goat serum (NGS), primer ve seconder antikorlar ile ilgili tablolar ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir.

Bu boyama için kullanılacak olan beyin kesitleri, farklı bir numune kabından seçilmiştir. Yine her hayvan için, striatum bölgesini içeren 3 kesit, SNpr bölgesini içeren 3 kesit olmak üzere toplam 6 kesit seçilmiştir. Oluşturulan her bir sette mTH boyama ile aynı şekilde, 1 Wistar-naif, 1 Wistar-yalancı opere, 1 Wistar-6-OHDA, 1

GAERS-naif, 1 GAERS-yalancı opere, 1 GAERS-6-OHDA olmak üzere 6 hayvan bulunmaktadır. Her set kendi içinde değerlendirilmiştir.

Tablo 11: % 10'luk NGS (solüsyon A içinde) hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 10 ml için
Normal goat serum (Vector Labs, S1000)	% 10 (ml / 100 ml)	1 ml
Solüsyon A		9 ml
Toplam		10 ml

Tablo 12: “1 / 3000 anti-Parvalbumin antibody + solüsyon A ve % 1,5 NGS” solüsyonu hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 10 ml için
Normal goat serum (Vector Labs, S1000)	% 1,5 (ml / 100 ml)	0,15 ml
Solüsyon A		9,85 ml
Monoclonal Anti-Parvalbumin antibody (Sigma P3088)	1 / 3000	3,33 µl (mikrolitre)
Toplam		10 ml

Tablo 13: “1 / 200 sekonder antikor + solüsyon A + % 1,5 NGS” solüsyonu hazırlanışı

Stoklar	Final konsantrasyon	Her 10 ml için
Anti-rabbit IgG (H+L), biotinylated. (Vector Labs, BA- 1000)	1 / 200	50 µl (mikrolitre)
Solüsyon A		9,8 ml
Normal goat serum (Vector Labs, S1000)	% 1,5 (ml/100 ml)	150 µl (mikrolitre)
Toplam		10 ml

5.11. Kesitlerin Değerlendirilmesi

Tüm kesitler kamera sistemine bağlı bir mikroskop (Zeiss Axio Zoom. V16, Zeiss, Germany) yardımı ile setler halinde fotoğraflanmıştır. MTH boyamada striatum bölgesinde dopaminerjik hücre gövdesi olmadığı için doku dansitesi ölçülerek, SNpk bölgesinde ise dopaminerjik nöronlar dansite ve sayı bakımından değerlendirilmiştir. PRV boyamada ise hem striatum, hem de SNpr bölgelerindeki GABAerjik nöronların sayımı yapılarak ve dansitesi ölçülerek değerlendirilmiştir. Fotoğraf çekimleri sırasında mTH ile boyanan striatum bölgesi 20X, hücresel değerlendirme yapılan diğer tüm bölgeler 40X büyütmede fotoğraflanmıştır.

Dansite ölçümü için fotoğraf çekimine başlamadan önce standardizasyonu sağlamak için ‘white balance’ ayarı yapılmış ve tüm set ayarlarda değişiklik olmayacak şekilde bitirilmiştir. Kesitlerdeki immünoreaktivite her bir fotoğraf üzerinden ImageJ yazılım programında (version 1.50i, NIH, USA) analiz edilmiştir. ‘Back round’ (arka plan) olarak immünoreaktivitenin olmadığı alanlar seçilmiştir. Dansitometrik açıdan immünoreaktivite yoğunluğu arka plana göre hesaplanmıştır. Değerlendirilen her bölge tüm gruplarda, ipsilateral (lezyon tarafı) ve kontralateral taraflar ayrı olacak şekilde incelenmiştir. Set içi değerlendirmeler Wistar naif grubunun aynı taraf ölçüm değerlerine göre yapılmıştır.

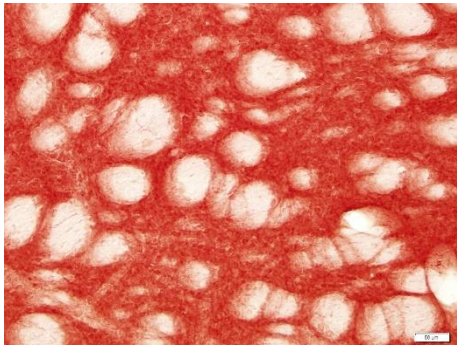
Nöron sayımı için striatum ve SN bölgelerinin ipsilateral ve kontralateral taraflarının 5 farklı alanından fotoğraf çekilmiştir. ImageJ programı yardımı ile nöronlar işaretlenip numaralandırılarak sayılmıştır. Her bölge dansite ölçümünde olduğu gibi tüm gruplarda, ipsilateral taraf ve kontralateral taraf ayrı şekilde değerlendirilmiştir. Set içi değerlendirmeler Wistar naif grubun aynı taraf ölçüm değerlerine göre yapılmıştır.

5.11.1. Striatumda TH-immünoreaktivite değerlendirmesi

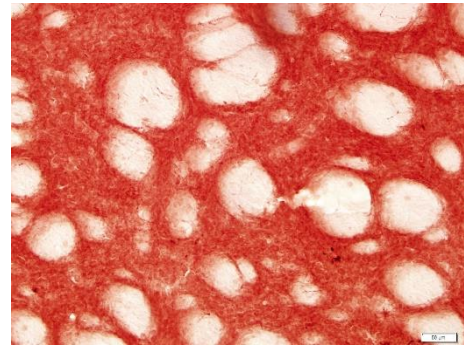
Striatum bölgesindeki TH immünoreaktivite pozitifliği (TH-ir (+)), kesitlerden 20X büyütmede alınan görüntülerdeki liflerin optik yoğunluğuna göre değerlendirilmiştir. Yama (patch) şeklinde bir görüntüye sahip olan striatum bölgesinde, TH-ir (+)'liği, arka plan olarak kabul edilen yama bölgelerine (immünoreaktif negatif) göre hesaplanmıştır. Her bir hayvan için üçer adet striatum bölgesi içeren kesitler, ipsilateral ve kontralateral taraf ayrı değerlendirilmiştir (Resim 1).

STRİATUM

Wistar-NAİF (20X)

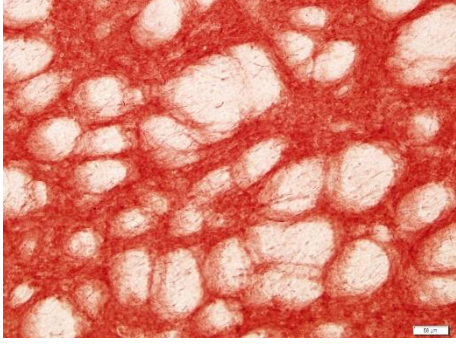


Sağlam taraf (kontralateral)

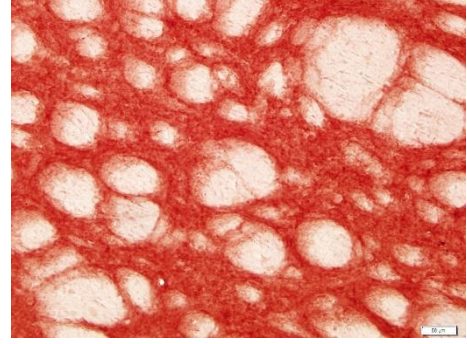


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Wistar-YALANCI OPERE (20X)

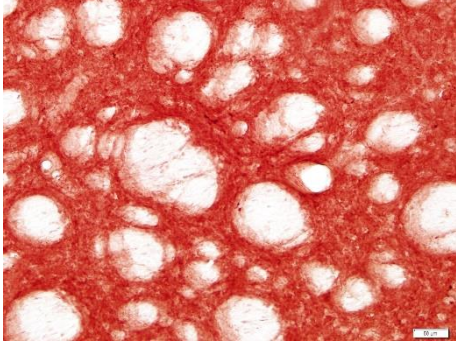


Sağlam taraf (kontralateral)

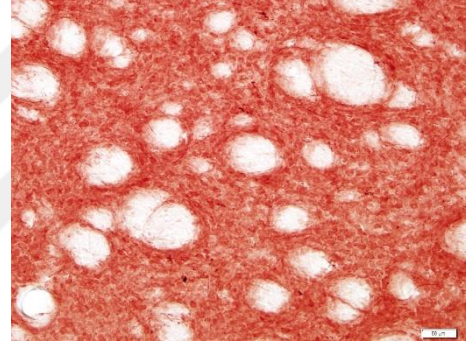


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Wistar-6-OHDA (20X)

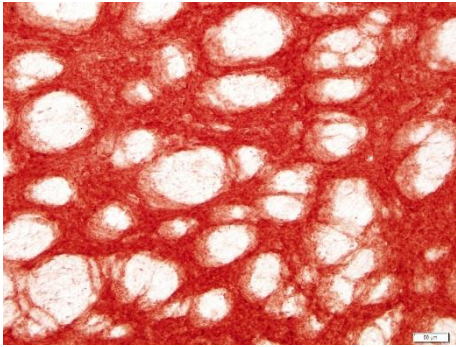


Sağlam taraf (kontralateral)

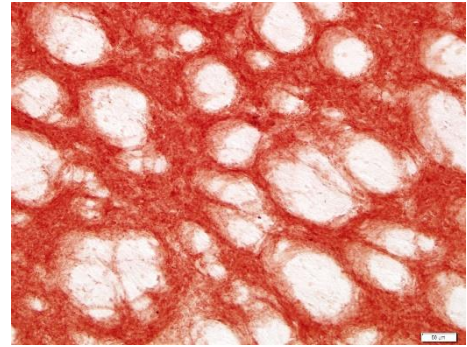


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-NAİF (20X)

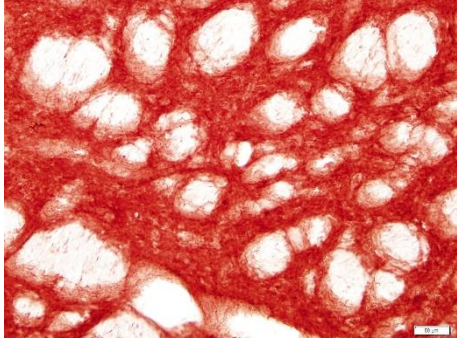


Sağlam taraf (kontralateral)

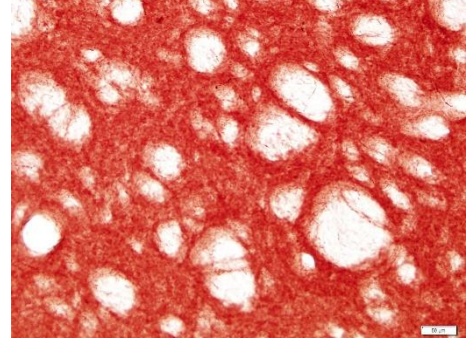


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-YALANCI OPERE (20X)

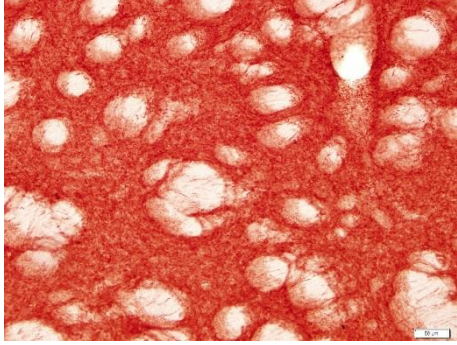


Sağlam taraf (kontralateral)

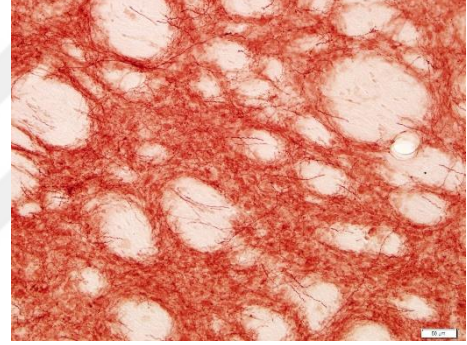


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-6-OHDA (20X)



Sağlam taraf (kontralateral)



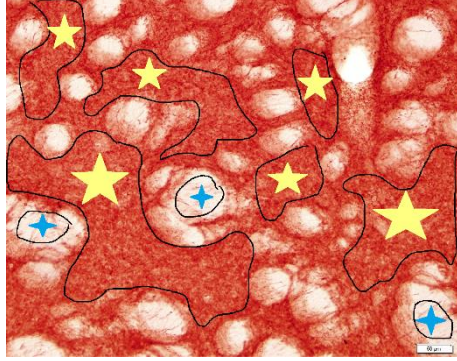
Lezyon tarafı (ipsilateral)

Resim 1. GAERS ve Wistar sıçanların ipsilateral ve kontralateral striatum bölgesinin TH-ir açısından karşılaştırılması (ölçekte belirtilen uzunluk 50µm'dir).

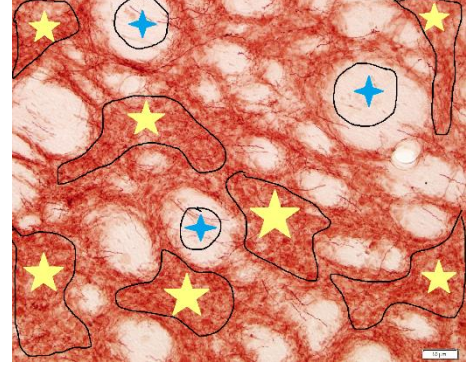
Striatum bölgesinde deney grubu ve kontrol grupları arasında mTH yöntem ile gösterdiğimiz liflerdeki optik yoğunluk farkı ImageJ yazılım programında yapılan serbest işaretleme yolu ile dansite oranları hesaplanarak bulunmuştur. Dansite oranları hesaplanırken immünoreaktivitenin pozitif olduğu, liflerin boyandığı bölgeler ve immünoreaktivitenin negatif olduğu yama tarzı bölgeler fotoğrafın her alanından serbest işaretleme yöntemi ile seçilmiş ve otomatik olarak hesaplanan dansite ortalamalarının farkı alınmıştır (Resim 2). İncelenen her bölge için her gruptan üçer kesitte işaretleme yapılmıştır. İpsilateral ve kontralateral taraflar her grup için kendi tarafının Wistar naif grubuna göre değerlendirilmiştir.

STRİATUM

GAERS-6-OHDA 20X



Sağlam taraf (kontralateral)



Lezyon tarafı (ipsilateral)

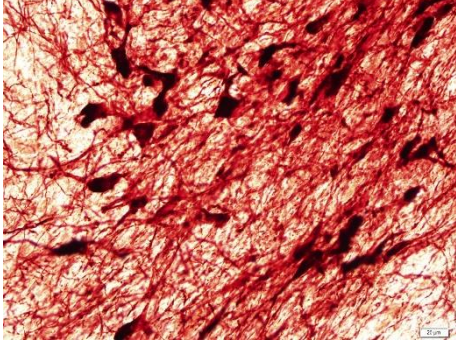
Resim 2. Striatum bölgesindeki TH-ir (+) alanların 20X büyütmede dansite ölçümü için işaretlenmiş halleri. Beş köşeli sarı yıldız TH-ir (+) lifleri, dört köşeli mavi yıldız ise yama tarzı, TH-ir (-) bölgeleri göstermektedir (ölçekte belirtilen uzunluk 50µm'dir).

5.11.2. Substantia nigra pars kompaktada TH-immünoreaktivite değerlendirmesi

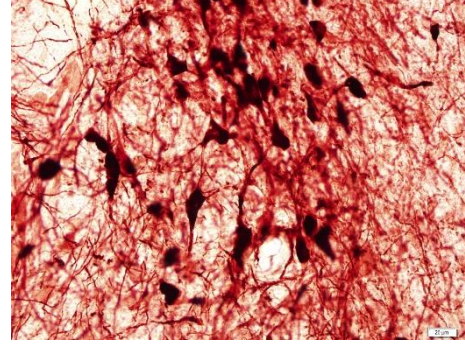
SNpk bölgesindeki TH-ir (+)'liği, dopaminerjik nöronların dansitesi ve TH-ir (+) nöron sayısı ile değerlendirilmiştir (Resim 3). Dansite hesaplanırken her bir SNpk bölgesinden, 40X büyütmede çekilen bir adet fotoğraf kullanılmıştır. Standardizasyonu sağlamak amacı ile fotoğraflar yaklaşık aynı bölgeden çekilmeye çalışılmıştır. Çekilen fotoğraflar üzerinden değerlendirme ImageJ yazılım programı kullanılarak, öne çıkan nöronlar serbest işaretleme yolu ile seçilip, görüntü arka planına göre dansite farkı hesaplanmıştır (Resim 4). Ayrıca her bir SNpk bölgesi nöron sayısı açısından değerlendirilmiştir. Bunun için 40X büyütmede 5 farklı bölgeden fotoğraf çekilmiş, çekilen fotoğraflar üzerinden TH-ir (+) dopaminerjik tüm nöronlar numaralandırılarak sayılmıştır (Resim 5). 6-OHDA uygulanmış olan hemisfer (ipsilateral) ve intakt olan hemisferdeki (kontralateral) SNpk nöron sayıları kendi içinde, Wistar-naif grubun aynı taraf değerleri ile karşılaştırılmıştır.

SUBSTANSİA NİGRA PARS KOMPAKTA

Wistar-NAİF 40X

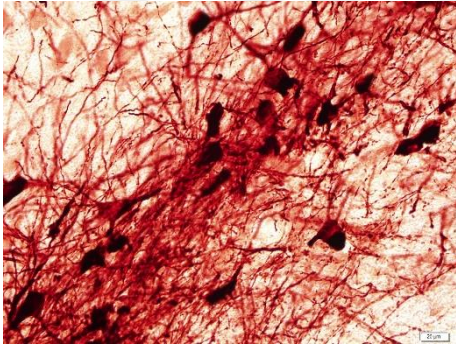


Sağlam taraf (kontralateral)

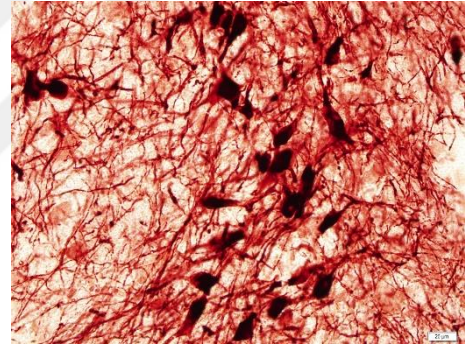


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Wistar-YALANCI OPERE (40X)

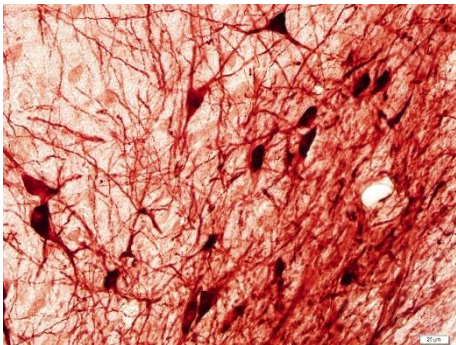


Sağlam taraf (kontralateral)

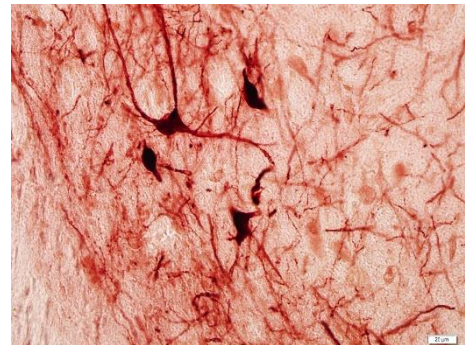


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Wistar-6-OHDA (40X)

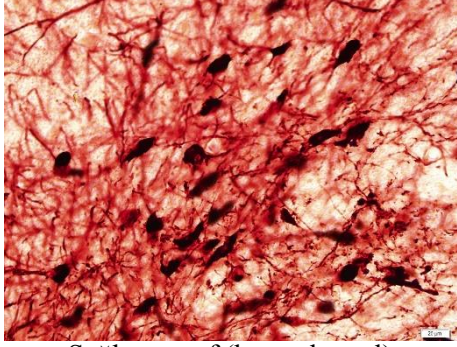


Sağlam taraf (kontralateral)

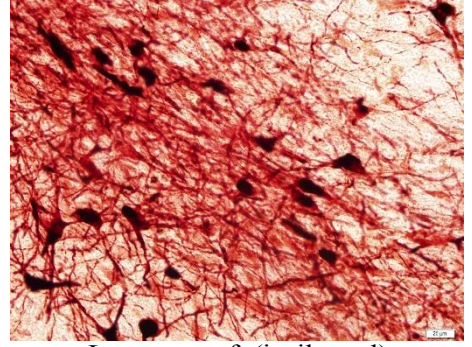


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-NAİF (40X)

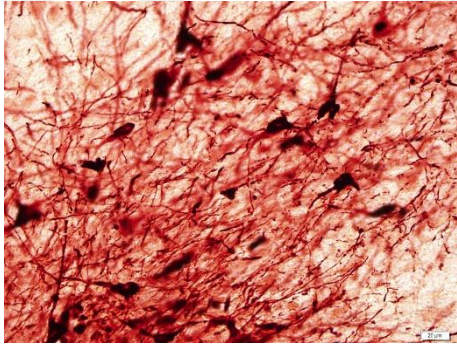


Sağlam taraf (kontralateral)

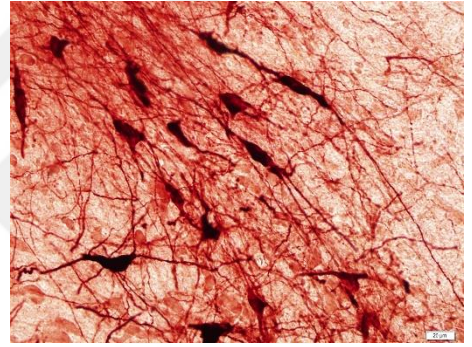


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-YALANCI OPERE (40X)

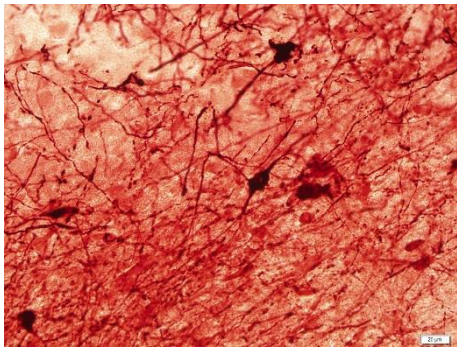


Sağlam taraf (kontralateral)

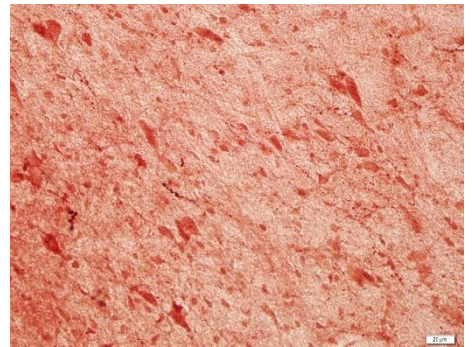


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-6-OHDA (40X)



Sağlam taraf (kontralateral)

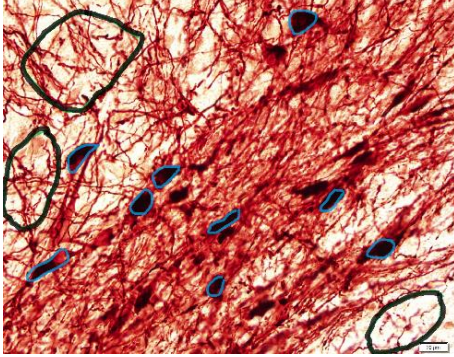


Lezyon tarafı (ipsilateral)

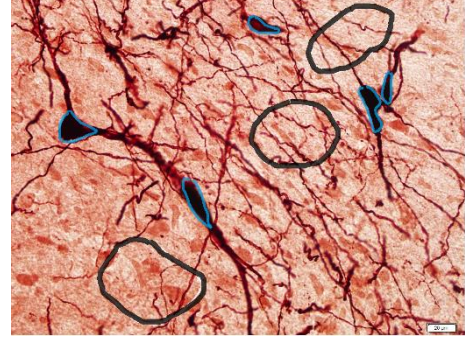
Resim 3. GAERS ve Wistar sıçanların ipsilateral ve kontralateral SNpk bölgesinin TH-ir açısından karşılaştırılması (ölçekte belirtilen uzunluk 20µm'dir).

SUBSTANSİA NİGRA PARS KOMPAKTA

GAERS-6-OHDA 40X



Sağlam taraf (kontralateral)

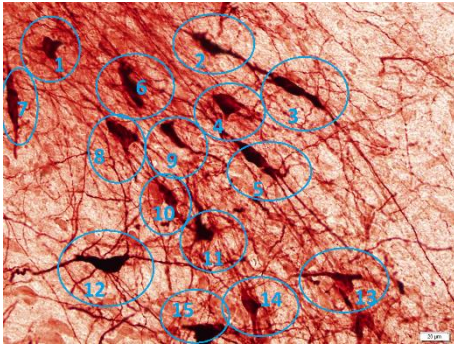


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Resim 4. SNpk bölgesindeki TH-ir (+) nöronların 40X büyütmede dansite ölçümü için işaretlenmiş halleri. Mavi renkli işaretliler nöron gövdelerini, siyah renkle işaretlenen alanlar ise arka plan olarak kullanılan hüresiz alanları göstermektedir (ölçekte belirtilen uzunluk 20μm'dir).

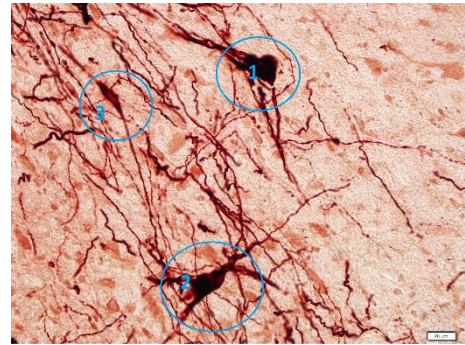
SUBSTANSİA NİGRA PARS KOMPAKTA

GAERS-6-OHDA 40X



Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-YALANCI OPERE 40X



Lezyon tarafı (ipsilateral)

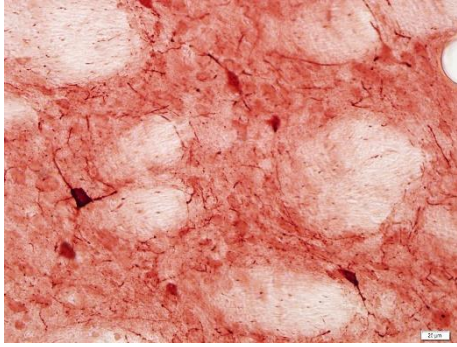
Resim 5. SNpk bölgesindeki TH-ir (+) nöronların 40X büyütmede sayım için işaretlenmiş halleri (ölçekte belirtilen uzunluk 20μm'dir).

5.11.3. Striatumda PRV immünoreaktivite değerlendirilmesi

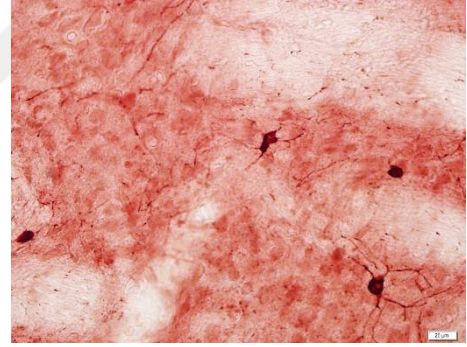
Striatum bölgesi PRV-ir (+) nöron sayısına ve nöronların dansitesine göre değerlendirilmiştir. Her bir hemisferin striatum bölgesi nöron sayısı açısından, 40X büyütmede, 5 farklı alanından çekilen fotoğraflardan Image j yazılım programı yardımı ile PRV-ir (+) nöronlar sayılarak, aynı taraf Wistar-naif grubuna göre değerlendirilmiştir. Nöron dansitesi ise yaklaşık aynı bölgelerden çekilen 1 fotoğraf üzerinden Image J programı ile serbest işaretleme yapılarak seçilen nöronların arka plana göre yoğunlukları hesaplanarak bulunmuştur. Tüm gruplar ipsilateral ve kontralateral kendi taraflarına ait Wistar-naif grubuna göre değerlendirilmiştir (Resim 6).

STRİATUM

Wistar-NAİF 40X

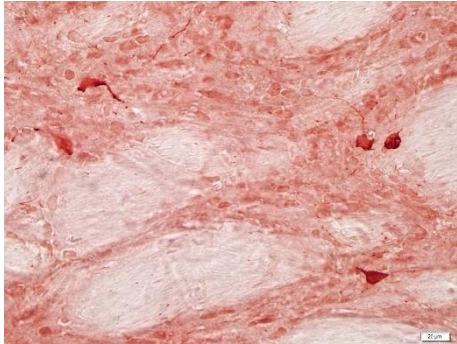


Sağlam taraf (kontralateral)

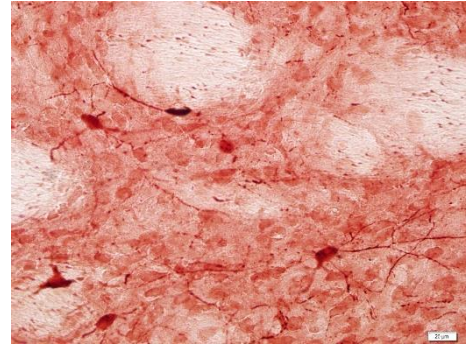


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Wistar-YALANCI OPERE 40X

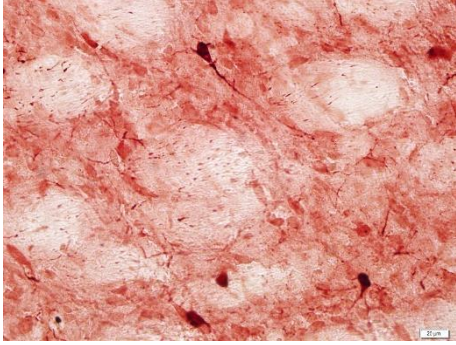


Sağlam taraf (kontralateral)

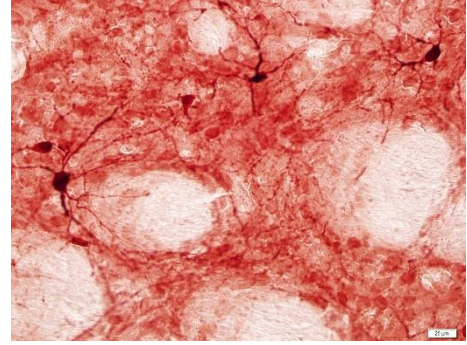


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Wistar-6-OHDA 40X

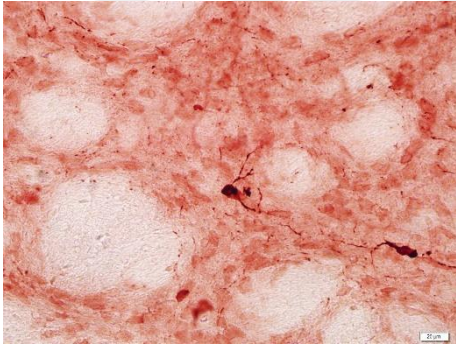


Sağlam taraf (kontralateral)

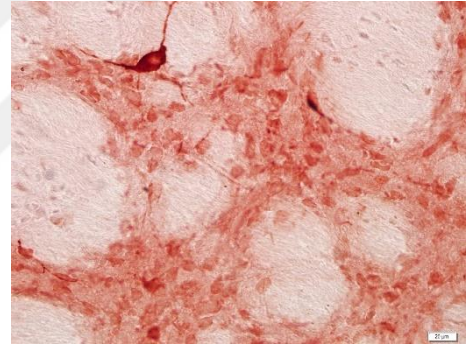


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-NAİF 40X

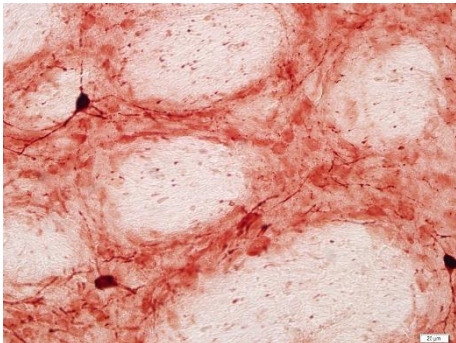


Sağlam taraf (kontralateral)

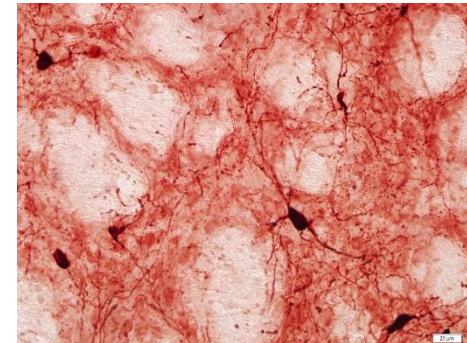


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-YALANCI OPERE 40X

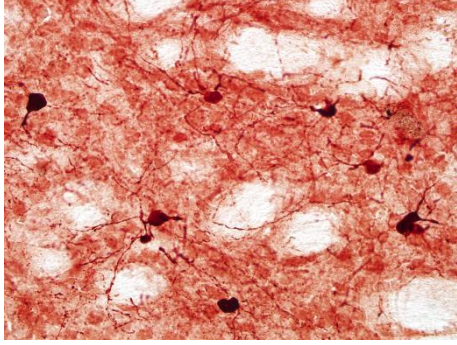


Sağlam taraf (kontralateral)

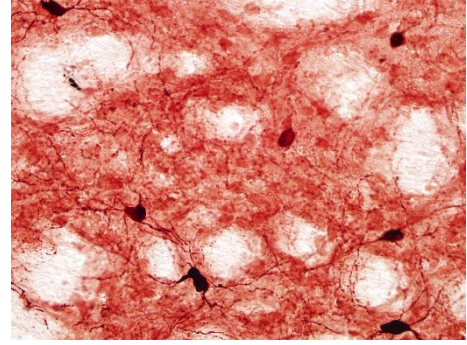


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-6-OHDA 40X



Sağlam taraf (kontralateral)



Lezyon tarafı (ipsilateral)

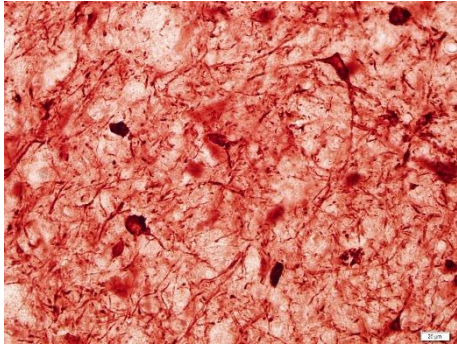
Resim 6. GAERS ve Wistar sıçanların ipsilateral ve kontralateral striatum bölgesinin PRV-ir açısından karşılaştırılması (ölçekte belirtilen uzunluk 20µm'dir).

5.11.4. Substansia nigra pars retikülata PRV immünoreaktivite değerlendirilmesi

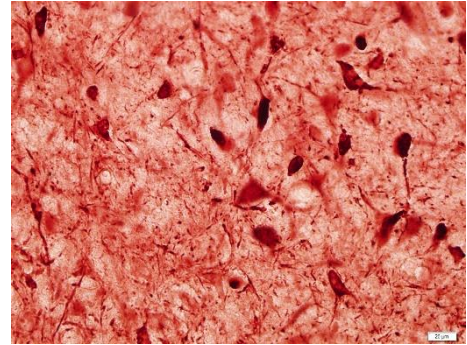
SNpr bölgesi, PRV-ir (+) boyanan nöronların sayısına ve dansitesine göre değerlendirilmiştir. 40X büyütmede aynı şekilde çekilen fotoğraflardan PRV-ir (+) nöronlar sayılarak aynı taraf Wistar-naif grubuna göre değerlendirilmiştir (Resim 7). Nöron sayımı da aynı şekilde 5 farklı bölgeden çekilen fotoğraflardan işaretlenerek yapılmıştır.

SUBSTANSİA NİGRA PARS RETİKÜLATA

Wistar-NAİF 40X

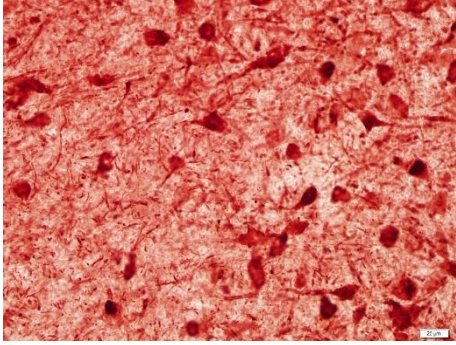


Sağlam taraf (kontralateral)

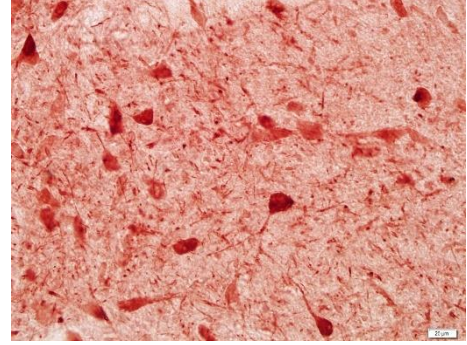


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Wistar-YALANCI OPERE 40X

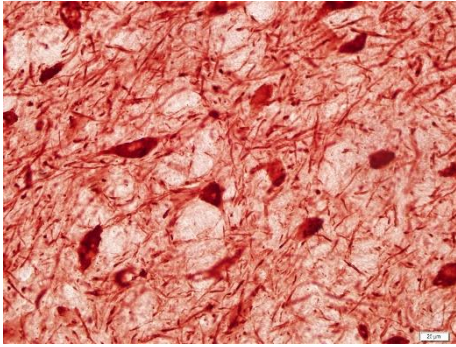


Sağlam taraf (kontralateral)

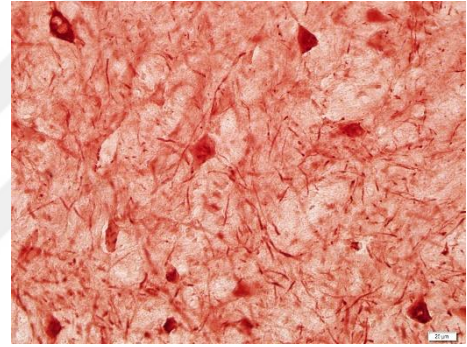


Lezyon tarafı (ipsilateral)

Wistar-6-OHDA 40X

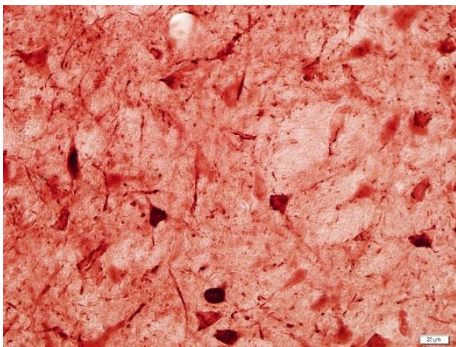


Sağlam taraf (kontralateral)

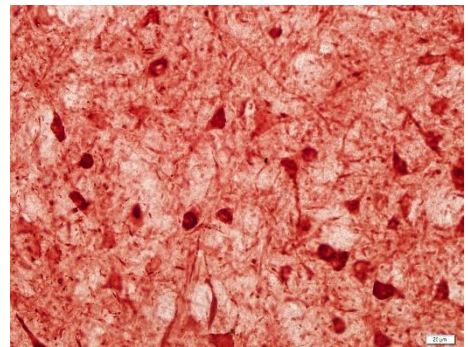


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-NAİF 40X

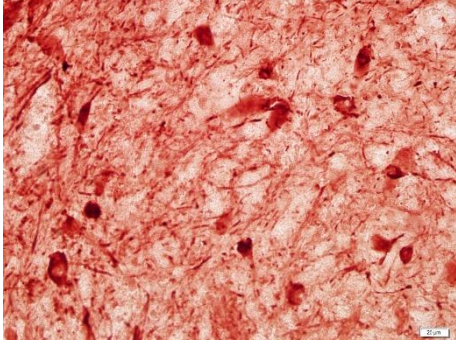


Sağlam taraf (kontralateral)

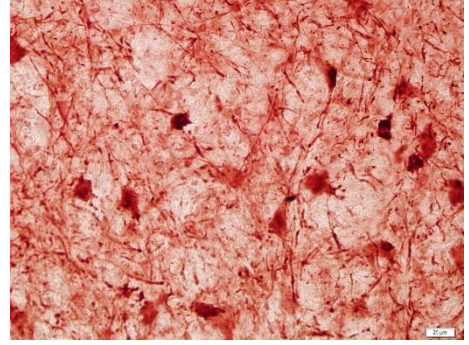


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-YALANCI OPERE 40X

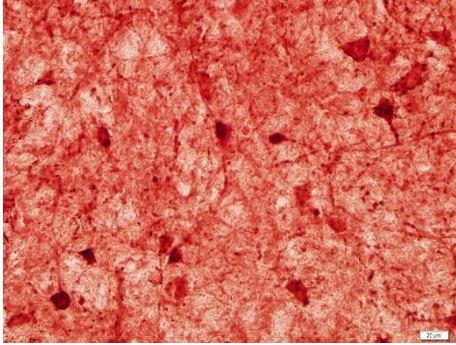


Sağlam taraf (kontralateral)

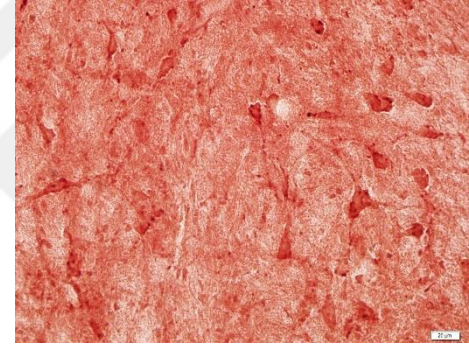


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-6-OHDA 40X



Sağlam taraf (kontralateral)



Lezyon tarafı (ipsilateral)

Resim 7: GAERS ve Wistar sıçanların ipsilateral ve kontralateral SNpr bölgesinin PRV-ir açısından karşılaştırılması (ölçekte belirtilen uzunluk 20µm'dir).

5.12. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism v8 (GraphPad Software, San Diego, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Silindir testinde çift yönlü ANOVA ve Sidak posthoc testi kullanılmıştır.

Rotasyon testi analizinde toplam rotasyon sayılarını gösterirken tek yönlü ANOVA ve Newman Keuls posthoc testi kullanılmıştır. Rotasyon sayılarını onar

dakikalık dilimlerde analiz ederken çift yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi kullanılmıştır.

DDD'ın 1'er saatlik dilimlerde değerlendirilen toplam süreleri, toplam sayıları ve ortalama değerleri çift yönlü ANOVA ve Bonferroni posthoc testi ile analiz edilmiştir. DDD'ın 3 saatlik toplam süreleri, toplam sayıları ve ortalama değerlerinin analizi Student's t test ile yapılmıştır.

İmmunohistokimyasal yöntemler sonucu elde edilen tüm veriler tek yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir.



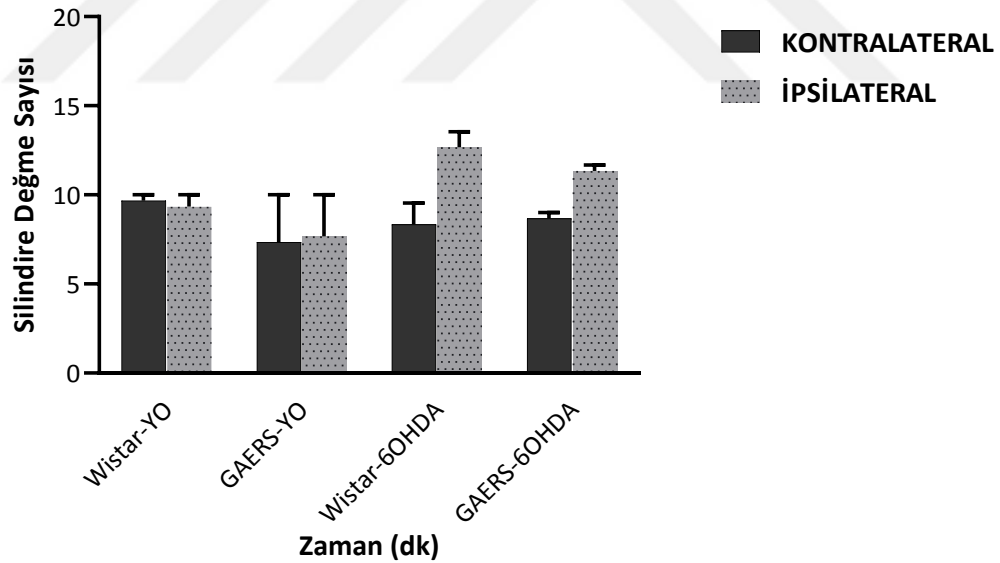
6. BULGULAR

6.1. Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri, PN 30. günde stereotaksik cerrahi yöntem uygulanan GAERS-6-OHDA (n=5), GAERS-Yalancı opere (n=5), Wistar-6-OHDA (n=5) ve Wistar-Yalancı opere (n=5) gruplarına yapılmıştır. Tüm davranış deneyleri stereotaksik cerrahi sonrası 21. günde gerçekleştirilmiştir.

6.1.1. Silindir testi

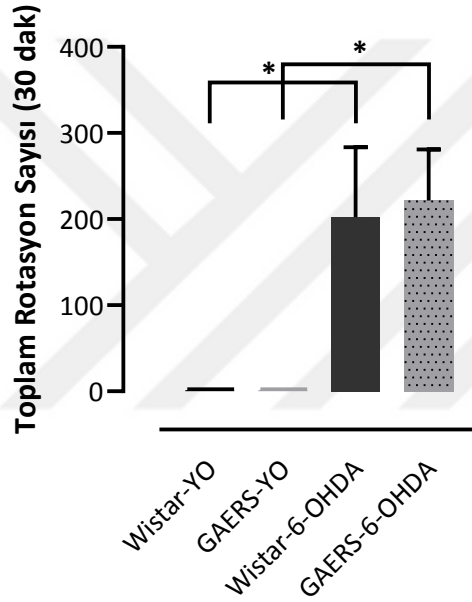
Bu test ile hayvanların ipsilateral ve kontralateral ön ayaklarını kullanma oranları incelenmiştir. GAERS-Yalancı opere ve Wistar-Yalancı opere gruplarında hayvanlarda ön ayaklarının silindire değme sayılarında ipsilateral ve kontralateral farkı gözlenmezken, GAERS-6-OHDA ve Wistar-6-OHDA gruplarında kontralateral ön ayak kullanımında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7).



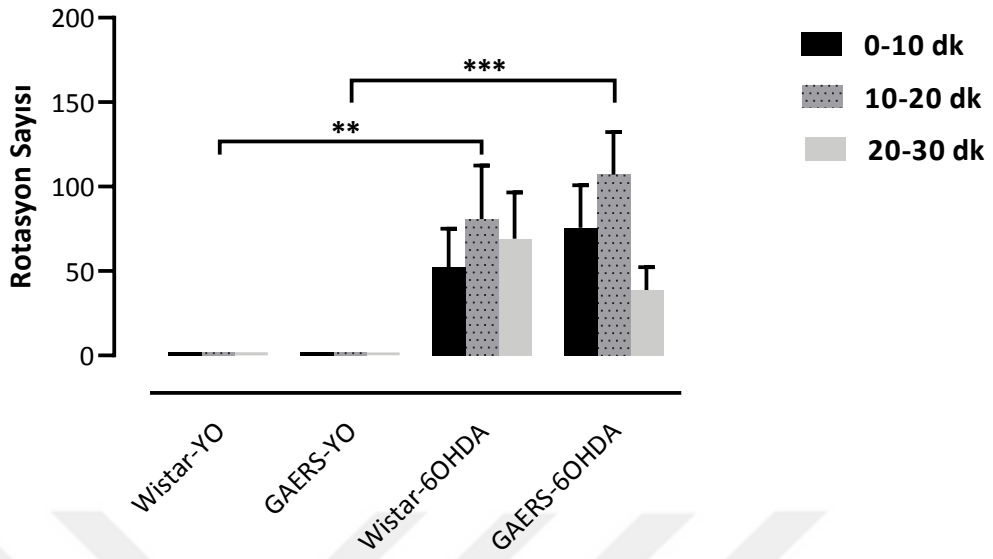
Şekil 7. Wistar-6-OHDA, GAERS-6-OHDA, Wistar-Yalancı opere (Wistar-YO) ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında ipsilateral ve kontralateral ön ayakların kullanımının karşılaştırılması. Çift yönlü ANOVA ve Sidak posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.

6.1.2. Rotasyon testi

Cerrahi sonrası 21. Günde apomorfin enjeksiyonu ile indüklenen rotasyon testinde GAERS-Yalancı opere ve Wistar-Yalancı opere gruplarında dönme hareketi gözlenmezken, GAERS-6-OHDA grubunda daha fazla olmak üzere deney gruplarında sol tarafa dönme hareketi olmuştur (Şekil 8a). Onar dakikalık zaman dilimlerinde bakıldığında özellikle 0-10 ve 10-20. dakikalarda GAERS-6-OHDA grubunda Wistar-6-OHDA grubuna göre sola (lezyona kontralateral) rotasyon sayısının daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8b).



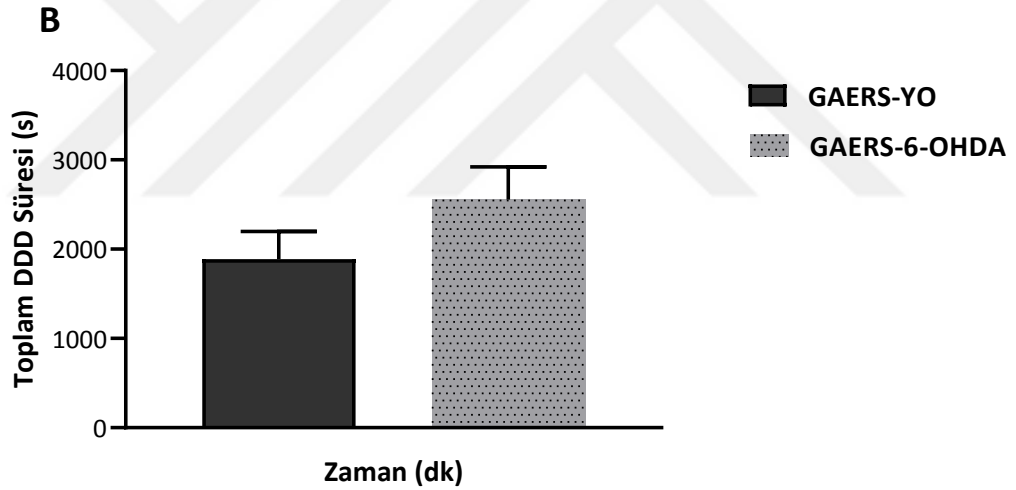
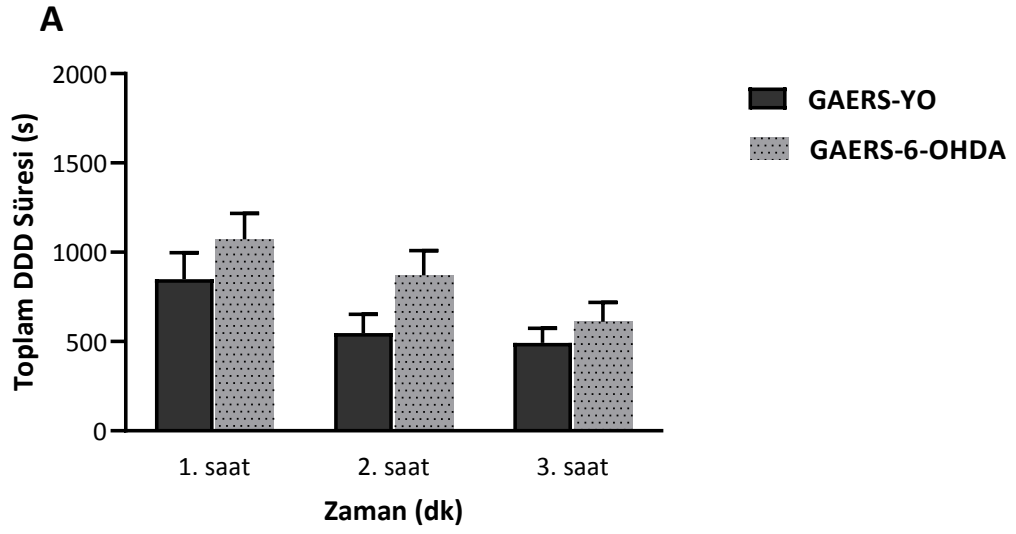
Şekil 8a. Wistar-6-OHDA, GAERS-6-OHDA, Wistar-Yalancı opere (Wistar-YO) ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında toplam rotasyon sayısının karşılaştırılması. Tek yönlü ANOVA ve Newman Keuls posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir (*, $p < 0,05$).



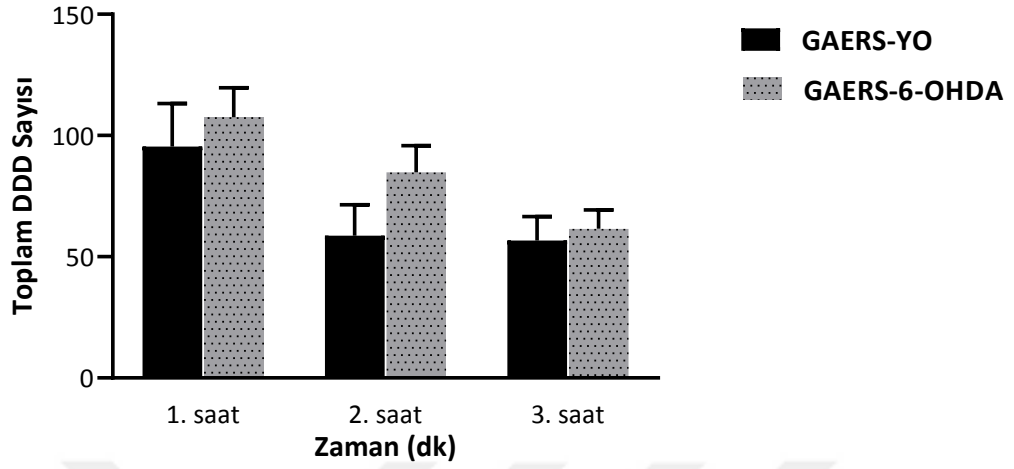
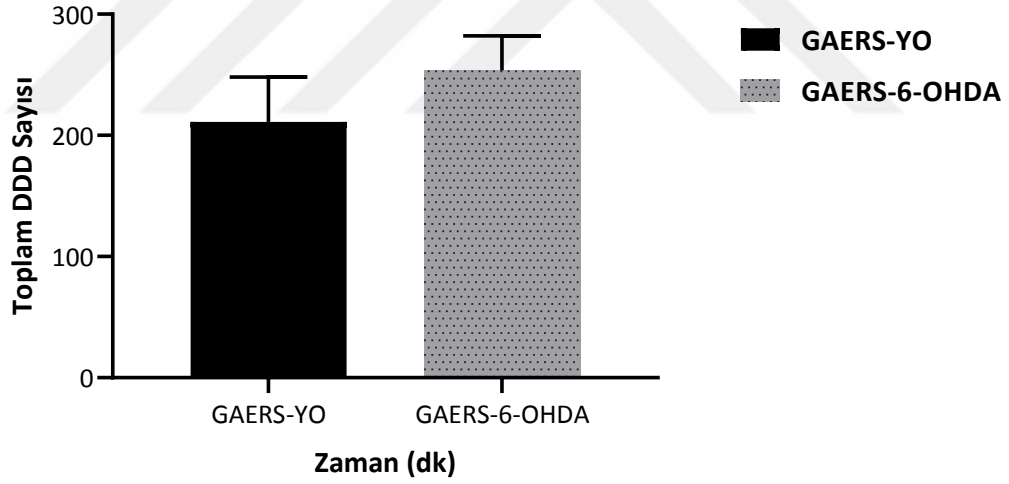
Şekil 8b. Wistar-6-OHDA, GAERS-6-OHDA, Wistar-Yalancı opere (Wistar-YO) ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında 10’ar dakikalık zaman dilimlerinde gerçekleşen rotasyon sayısının karşılaştırılması. Çift yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

6.2. EEG Bulguları

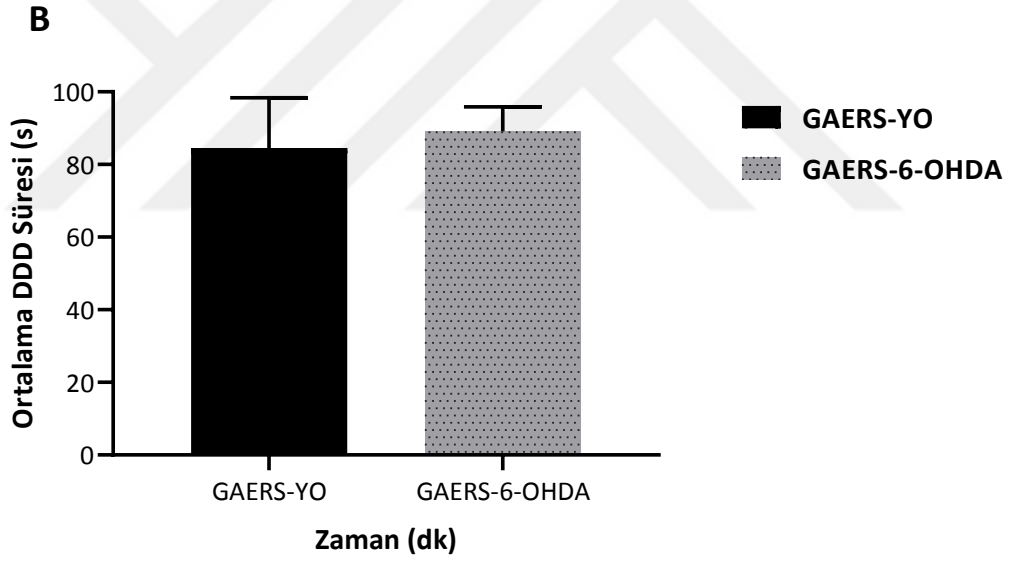
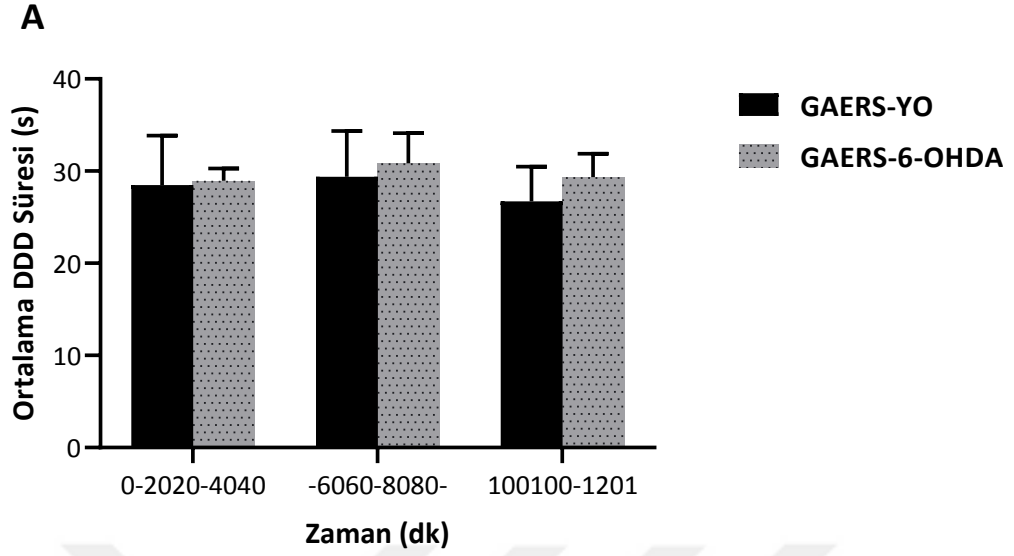
GAERS-6-OHDA ($n=5$) ve GAERS-Yalancı opere ($n=5$) grubu hayvanlardan, epileptogenez sürecinin tamamlanmış kabul edildiği DDD’ların tamamen ortaya çıktığı dönem olan 3 aylık yetişkinlik dönemlerinde EEG kaydı alınmıştır. Alınan kayıtların ortalamaları 20’şer dakikalık zaman dilimlerinde DDD’nin toplam süresi, sayısı ve ortalaması olarak değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucu DDD’ların toplam süreleri ve sayısı, GAERS-6-OHDA grubunda, GAERS-Yalancı opere grubuna göre özellikle 40-60, 60-80, 80-100 dakikalık zaman dilimlerinde belirgin olmak üzere, daha fazla bulunmuştur (Şekil 9 ve Şekil 10). Aynı zaman dilimi içerisinde bulunan DDD’ların süreleri DDD sayısına bölünerek elde edilen ortalama değerler karşılaştırıldığında ise belirgin bir fark gözlenmemiştir (Şekil 11).



Şekil 9. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında DDD'ların toplam sürelerinin karşılaştırılması. A. Bir saatlik zaman dilimlerine bölünmüş halde EEG verilerinden elde edilen DDD'ların toplam sürelerinin saniye cinsinden karşılaştırılmıştır. Çift yönlü ANOVA ve Bonferroni posthoc testi kullanılmıştır. B. Üç saatlik EEG verilerinin toplam DDD sürelerinin saniye cinsinden karşılaştırılmıştır. Student t test ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.

A**B**

Şekil 10. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında DDD'ların toplam sayılarının karşılaştırılması. A. Bir saatlik zaman dilimlerine bölünmüş halde EEG verilerinden elde edilen DDD'ların toplam sayıları karşılaştırılmıştır. Çift yönlü ANOVA ve Bonferroni posthoc testi kullanılmıştır. B. Üç saatlik EEG verilerinin toplam DDD sayılarının karşılaştırılmıştır. Student t test ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.



Şekil 11. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere (GAERS-YO) gruplarında DDD sürelerinin ortalamalarının karşılaştırılması. A. Bir saatlik zaman dilimlerine bölünmüş halde EEG verilerinden elde edilen DDD'ların ortalama sürelerinin saniye cinsinden karşılaştırılmıştır. Çift yönlü ANOVA ve Bonferroni posthoc testi kullanılmıştır. B. Üç saatlik EEG verilerinin ortalama DDD sürelerinin saniye cinsinden karşılaştırılmıştır. Student t test ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.

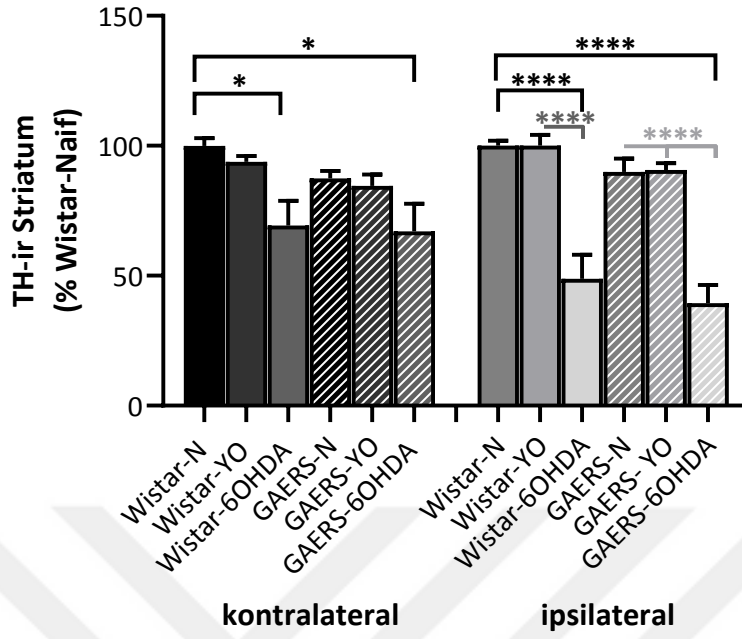
6.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal deneyler, hayvanlar 3 aylık (PN 90 günlük) olup EEG kayıtları tamamlandıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Boyamalar GAERS-6-OHDA (n=5), GAERS-Yalancı opere (n=5), GAERS-Naif (n=5), Wistar-6-OHDA (n=5), Wistar-Yalancı opere (n=5) ve Wistar-Naif (n=5) grubu hayvanlardan oluşan setler halinde yapılmıştır. Her bölge incelenen set içerisinde Wistar-Naif grubu aynı taraf bulgularına göre değerlendirilmiştir. Daha sonra incelenen her bölge için tüm setlerin ortalaması alınmıştır.

6.3.1. Tirozin hidroksilaz boyama bulguları

6.3.1.1. Striatumda TH-immünoreaktivite dansite bulguları

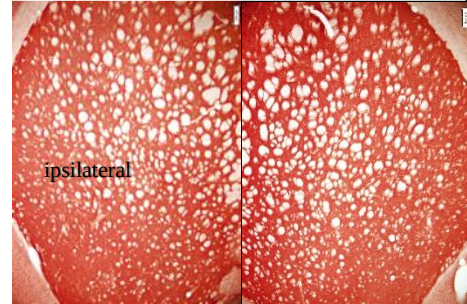
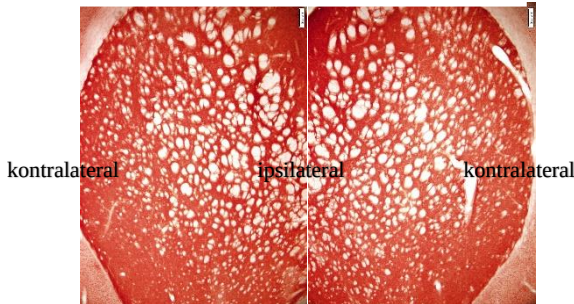
Striatum bölgesindeki TH-immünoreaktivite (TH-ir)'yi gösteren dopaminerjik liflerin yoğunluğu ölçülerek değerlendirilmiştir. Sağ medial ön beyin demeti bölgesine 6-OHDA enjeksiyonu yapılmış olan GAERS ve Wistar deney grubu hayvanların ipsilateral striatumunda daha belirgin olmak üzere kontralateral striatumda da dopaminerjik aktivitenin azaldığı tesit edilmiştir (Şekil 12). Tüm deney ve kontrol gruplarının bilateral striatum bölgelerinin TH-immünoreaktivitesine ait örnek fotoğraflar gösterilmiştir (Resim 8).

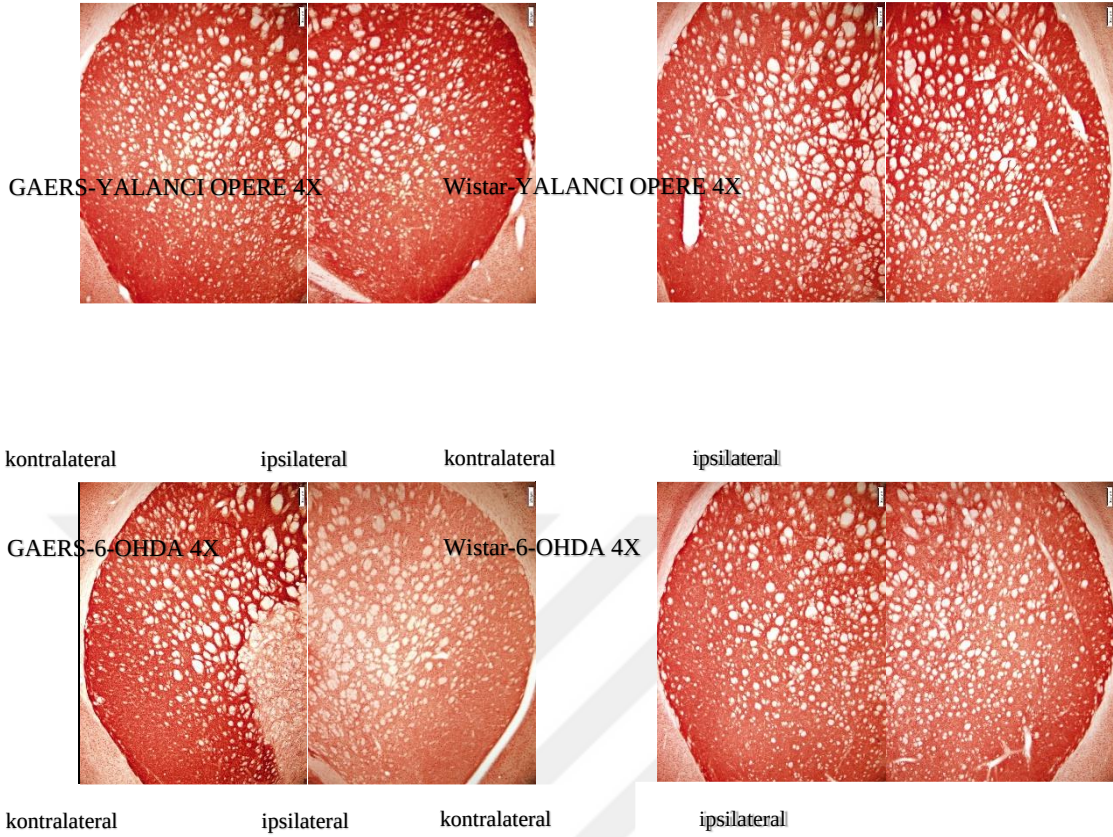


Şekil 12. Striatum bölgesindeki TH-ir'nin Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

STRIATUM
GAERS-NAİF 4X

Wistar-NAİF 4X

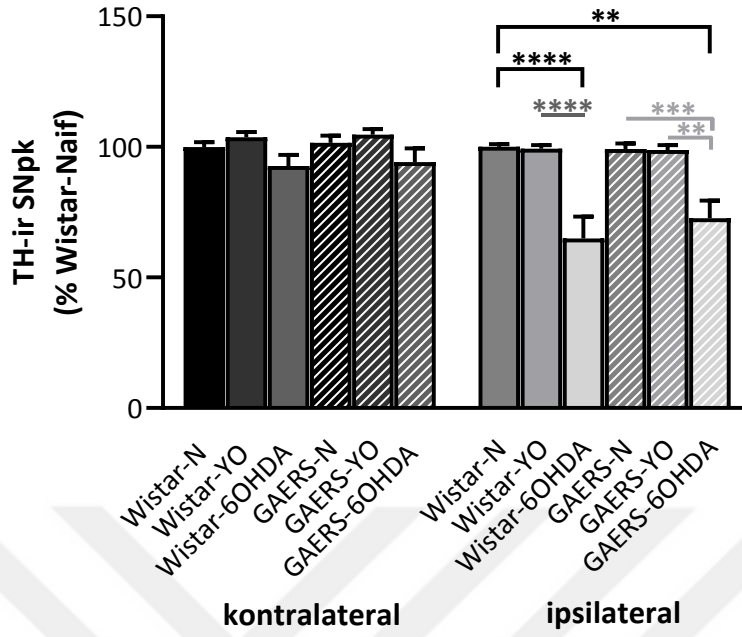




Resim 8. Tüm gruplarda striatum bölgesindeki TH-ir'nin örnek fotoğrafları (ölçekte belirtilen uzunluk 200µm'dir).

6.3.1.2. Substantia nigra pars kompaktada TH-immünoreaktivite dansite bulguları

SNpk bölgesindeki TH-ir'yi gösteren dopaminerjik nöronların yoğunluğu ölçülerek değerlendirilmiştir. Sağ medial ön beyin demeti bölgesine 6-OHDA enjeksiyonu yapılmış olan GAERS ve Wistar deney gruplarının ipsilateral SNpk bölgesinde belirgin olarak dopaminerjik aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 13). Tüm deney ve kontrol gruplarının bilateral SNpk bölgelerinin TH-immünoreaktivitesine ait örnek fotoğraflar gösterilmiştir (Resim 9).

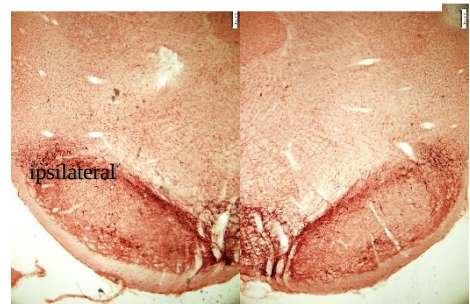


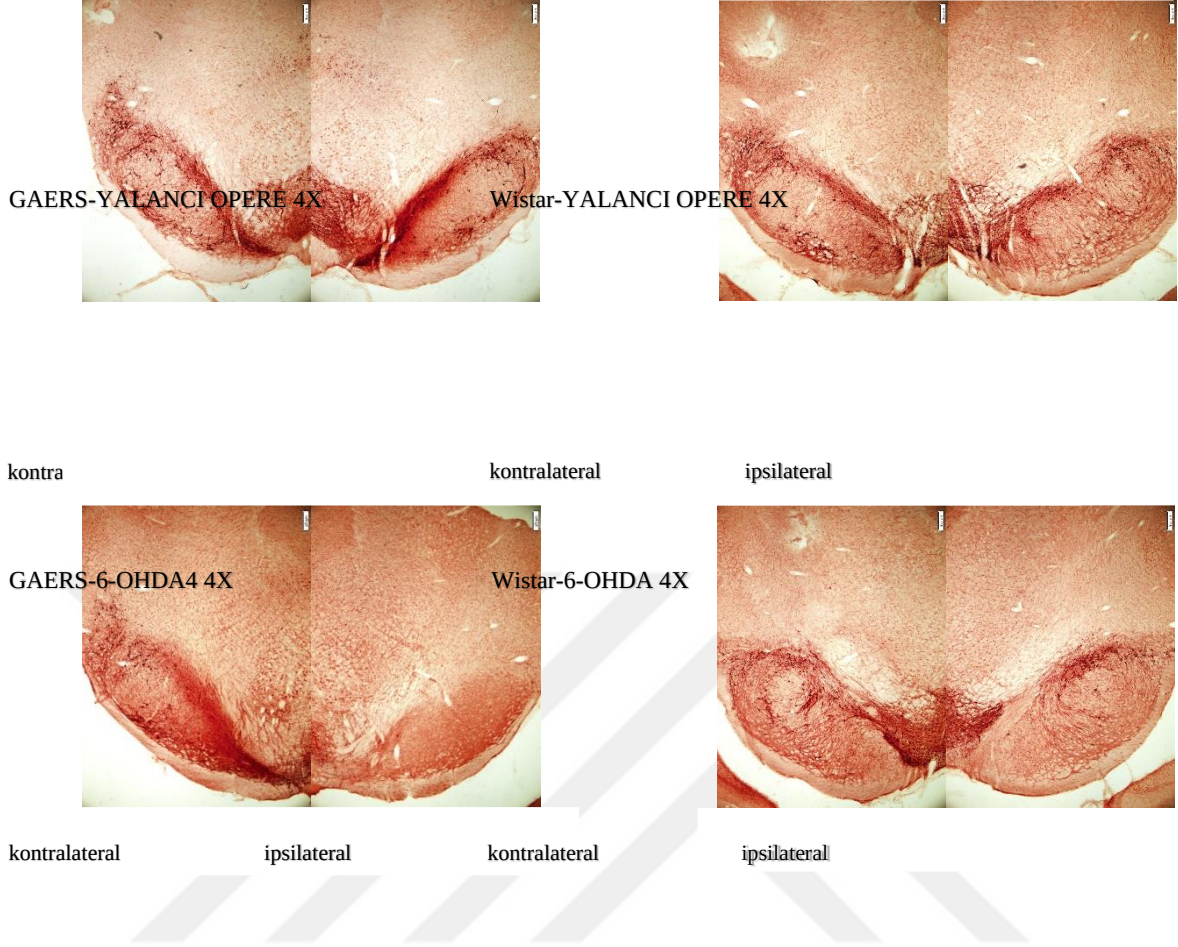
Şekil 13. SNpk bölgesindeki TH-ir (+) nöronların Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).

SUBSTANSİA NİGRA PARS KOMPAKTA

GAERS-NAIF 4X

Wistar-NAIF 4X

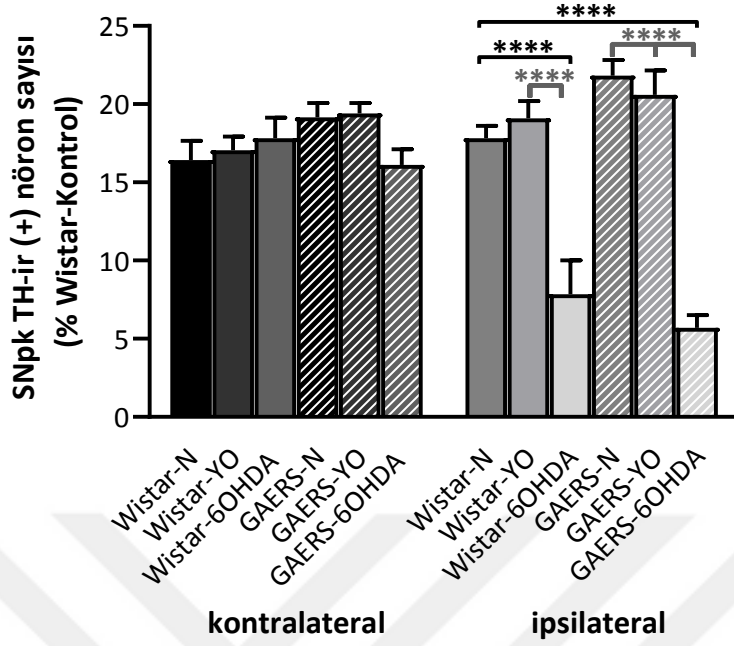




Resim 9. Tüm gruplarda SNpk bölgesindeki TH-ir'nin örnek fotoğrafları (ölçekte belirtilen uzunluk 200µm'dir).

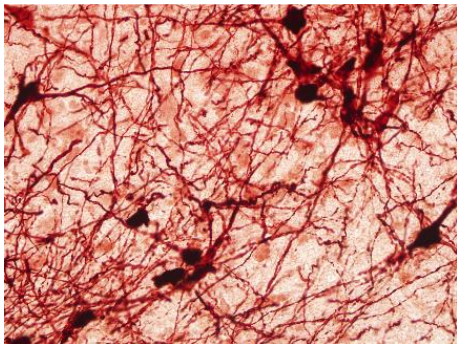
6.3.1.3. Substansia nigra pars kompaktada TH-immünoreaktivite nöron sayım bulguları

SNpk bölgesindeki TH-ir'yi gösteren dopaminerjik nöronlar beş farklı bölgeden çekilen fotoğraflarda sayılarak değerlendirilmiştir. 6-OHDA enjeksiyonu yapılmış GAERS ve Wistar deney grubu hayvanların ipsilateral SNpr bölgelerinde dopaminerjik aktiviteyi gösteren nöron sayılarında belirgin bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 14). GAERS-6-OHDA ve GAERS-Naif gruplarının ipsilateral ve kontralateral SNpk bölgelerine ait, nöron sayımında kullanılan, 40X büyütmedeki fotoğraflardan örnekler gösterilmiştir (Resim 10).

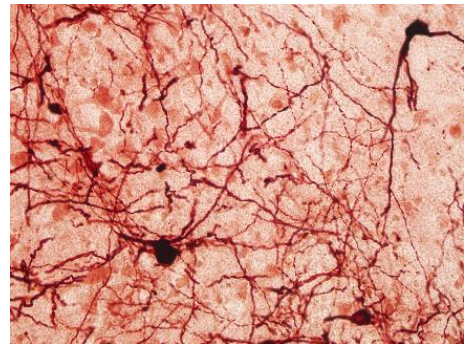


Şekil 14. SNpk bölgesindeki TH-ir (+) nöron sayısının Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir (** $p<0,01$; **** $p<0,0001$).

SUBSTANSİA NIGRA PARS KOMPAKTA

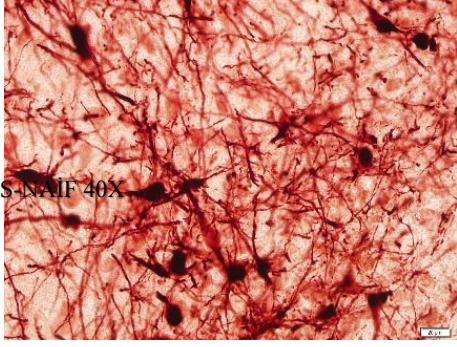


Sağlam taraf (kontralateral)

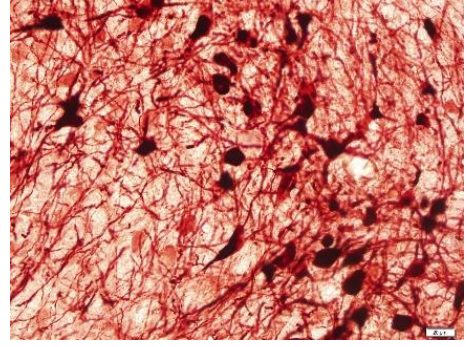


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-NAIF 40X



Sağlam taraf (kontralateral)



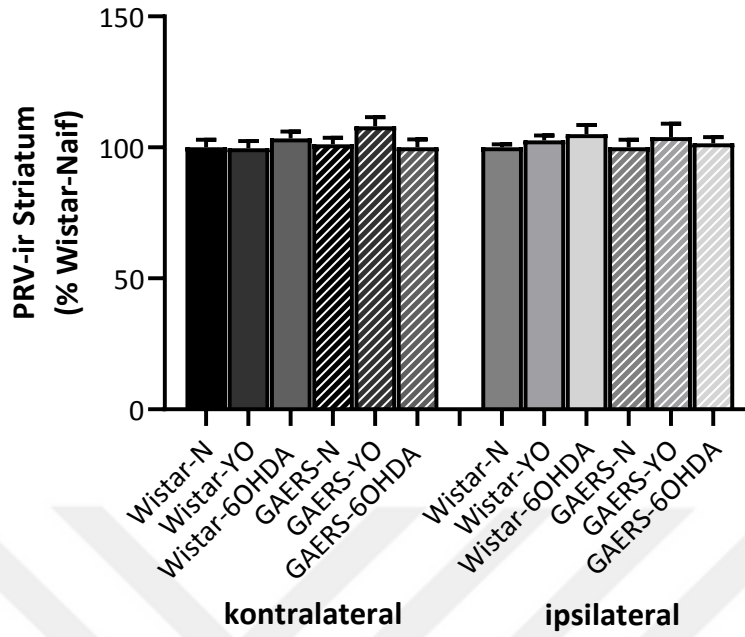
Lezyon tarafı (ipsilateral)

Resim 10. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Naif gruplarında ipsilateral ve kontralateral SNpk bölgesi TH-ir (+) nöronların sayımında kullanılan örnek fotoğraflar (ölçekte belirtilen uzunluk 20µm dir).

6.3.2. Parvalbumin boyama bulguları

6.3.2.1. Striatumda PRV-immünoreaktivite dansite bulguları

Striatum bölgesindeki PRV-immünoreaktiviteyi gösteren GABAerjik nöronların yoğunluğu ölçülerek değerlendirilmiştir. GAERS ve Wistar suşlarında deney ve kontrol grupları arasında GABAerjik nöron yoğunluğu açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 15). Tüm deney ve kontrol gruplarının bilateral striatum bölgesinin PRV-immünoreaktivitesine ait örnek fotoğraflar gösterilmiştir (Resim 11).



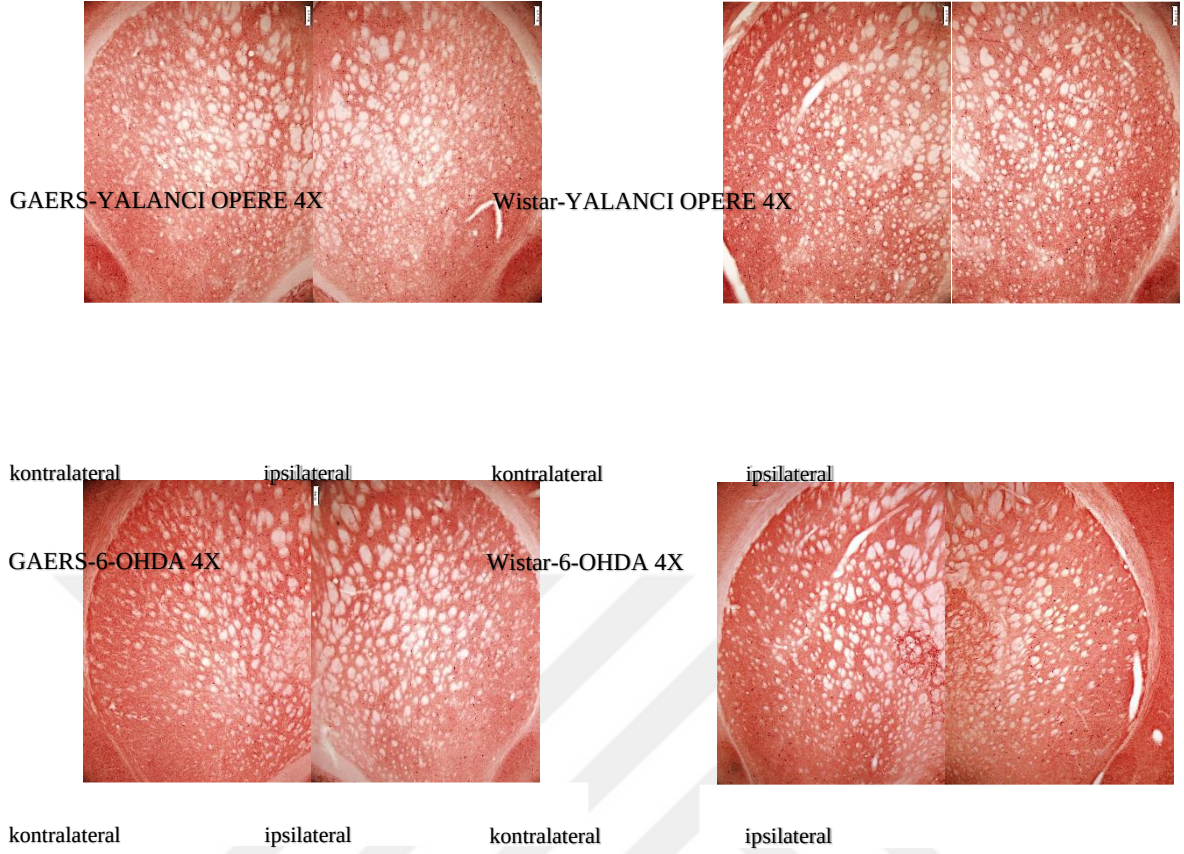
Şekil 15. Striatum bölgesindeki PRV-ir (+) nöronların Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.

STRİATUM

GAERS-NAİF 4X

Wistar-NAİF 4X

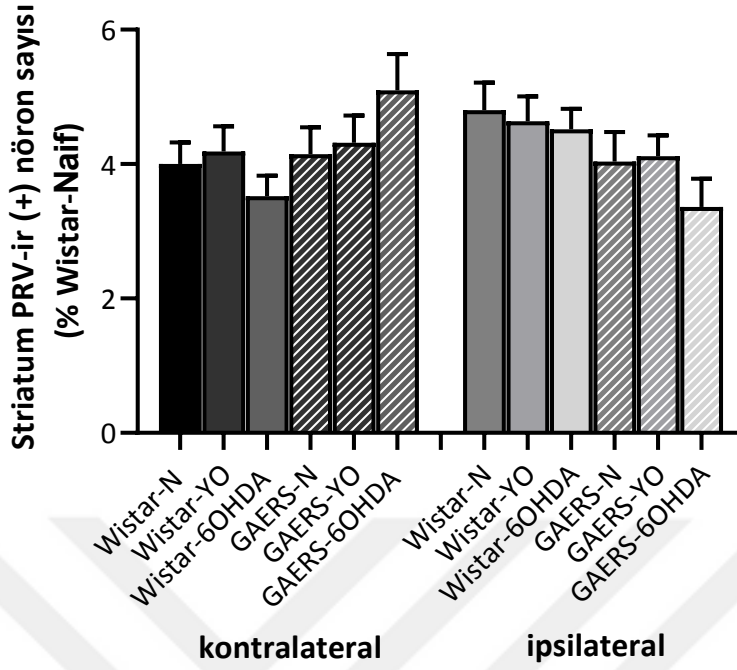




Resim 11. Tümü gruplarda SNpr bölgesindeki PARV-ir'nin örnek fotoğrafları (ölçekte belirtilen uzunluk 200µm dir).

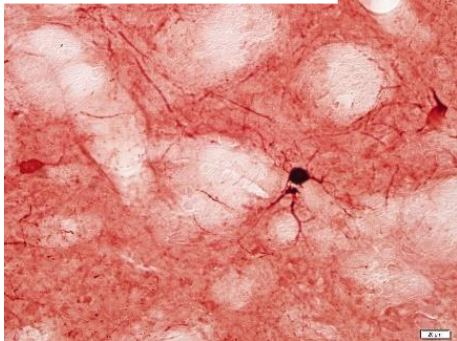
6.3.2.2. Striatumda PRV-immünoreaktivite nöron sayım bulguları

Striatum bölgesindeki PRV-ir'yi gösteren GABAerjik nöronlar bilateral striatum bölgesinin beş farklı alanından çekilen fotoğraflar üzerinden sayılmıştır. GAERS ve Wistar suşlarında deney ve kontrol grupları arasında GABAerjik nöron sayısı açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 16). Wistar-6-OHDA ve Wistar-Yalancı opere gruplarının ipsilateral ve kontralateral striatum bölgelerine ait, nöron sayımında kullanılan, 40X büyütmedeki fotoğraflardan örnekler gösterilmiştir (Resim 12).

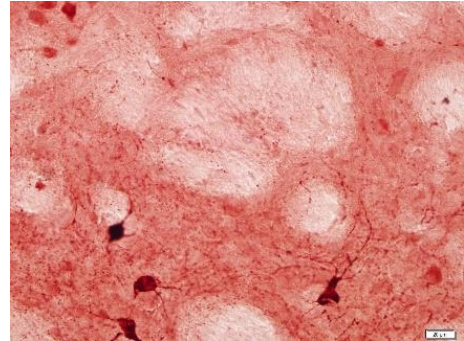


Şekil 16. Striatum bölgesindeki PRV-ir (+) nöron sayısının Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.

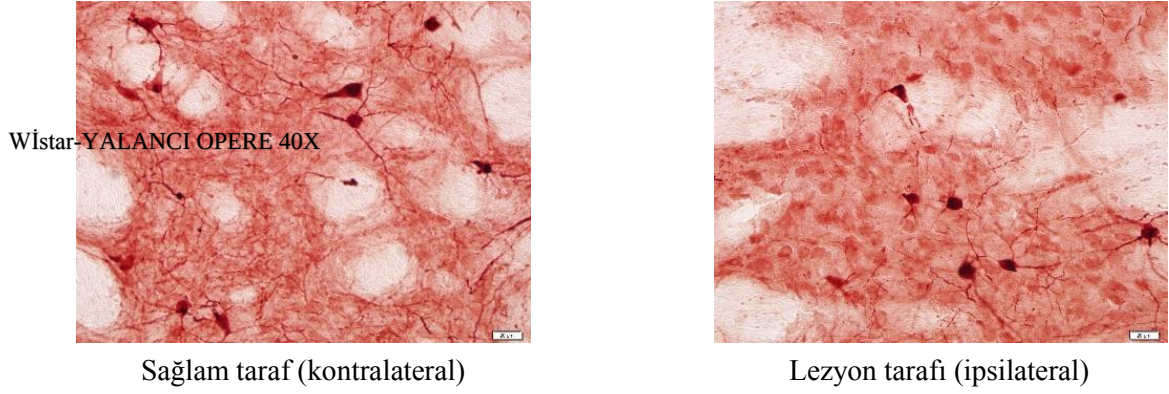
Wistar-6-OHDA 40X



Sağlam taraf (kontralateral)



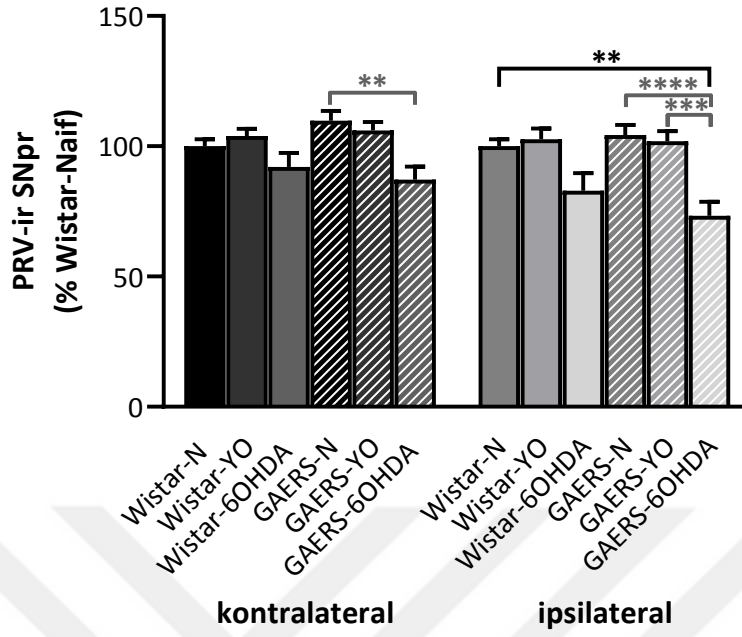
Lezyon tarafı (ipsilateral)



Resim 12. Wistar-6-OHDA ve Wistar-Yalancı opere gruplarında ipsilateral ve kontralateral striatum bölgesi PARV-ir (+) nöronların sayımında kullanılan örnek fotoğraflar (ölçekte belirtilen uzunluk 20µm'dir).

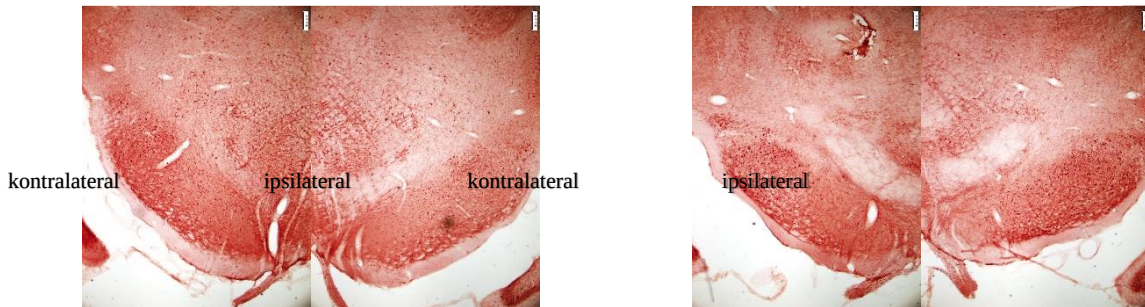
6.3.2.3. Substansia nigra pars retikülatada PRV-immünoreaktivite dansite bulguları

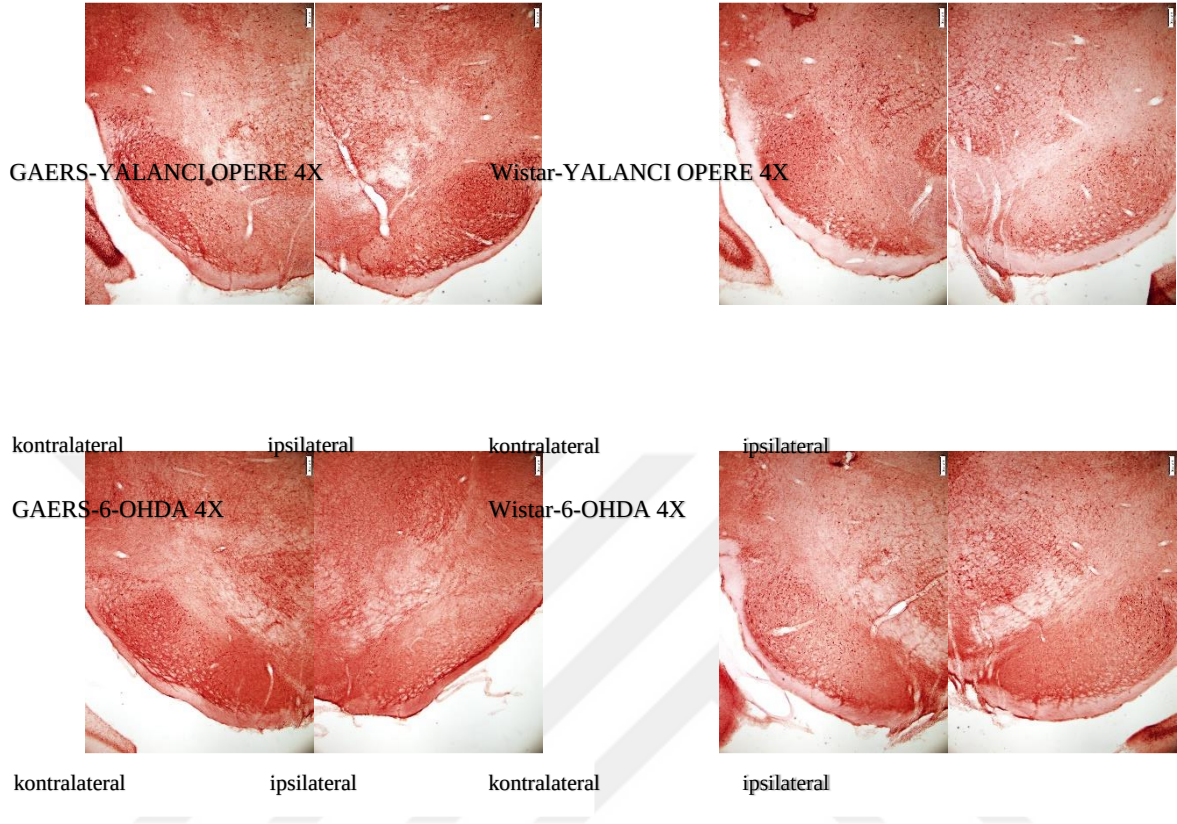
SNpr bölgesindeki PRV-ir'yi gösteren GABAerjik nöronların yoğunluğu ölçülerek değerlendirilmiştir. GAERS ve Wistar suşlarında deney ve kontrol grupları arasında GABAerjik nöron yoğunluğu açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 17). Tüm deney ve kontrol gruplarının bilateral SNpr bölgesinin PRV-immünreaktivitesine ait örnek fotoğraflar gösterilmiştir (Resim 13).



Şekil 17. SNpr bölgesindeki PRV-ir (+) nöronların Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir (** $p < 0,01$).

SUBSTANSİA NİGRA PARS-RETİKÜLATA

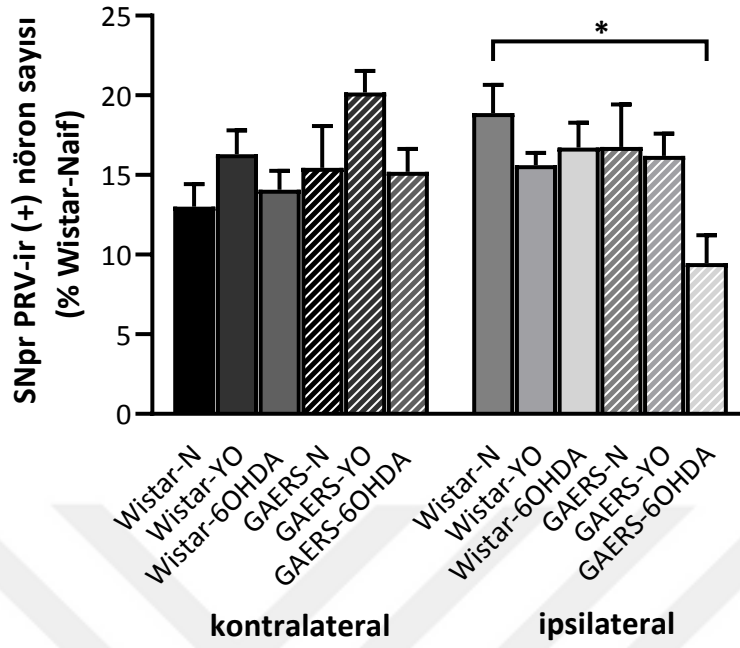




Resim 13. Tüm gruplarda SNpr bölgesindeki PARV-ir'nin örnek fotoğrafları (ölçekte belirtilen uzunluk 200µm'dir).

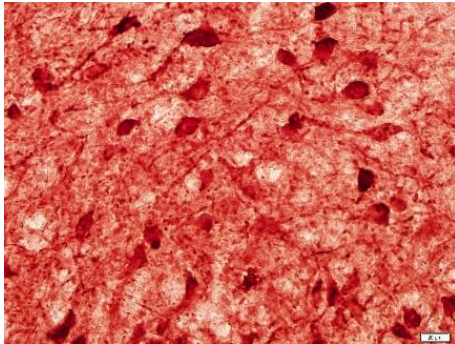
6.3.2.4. Substansia nigra pars retikülatada PRV-immünoreaktivite nöron sayım bulguları

SNpr bölgesindeki PRV-ir'yi gösteren GABAerjik nöronlar bilateral SNpr bölgesinin beş farklı alanından çekilen fotoğraflar üzerinden sayılmıştır. GAERS ve Wistar suşlarında deney ve kontrol grupları arasında GABAerjik nöron sayısı açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 18). GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere gruplarının ipsilateral ve kontralateral SNpr bölgelerine ait, nöron sayımında kullanılan, 40X büyütmedeki fotoğraflardan örnekler gösterilmiştir (Resim 14).

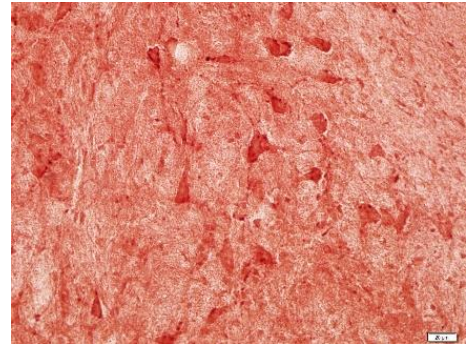


Şekil 18. SNpr bölgesindeki PRV-ir (+) nöron sayısının Wistar-Naif grubu ipsilateral ve kontralateral taraflara göre değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA ve Tukey posthoc testi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.

SUBSTANSİA NİGRA PARS RETİKÜLATA GAERS-6-OHDA 40X

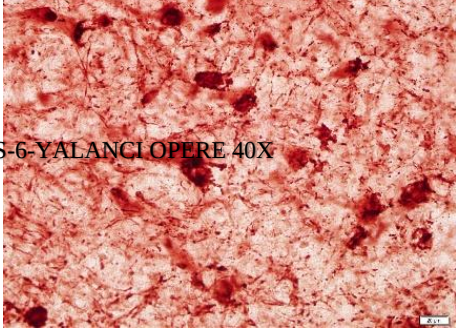


Sağlam taraf (kontralateral)

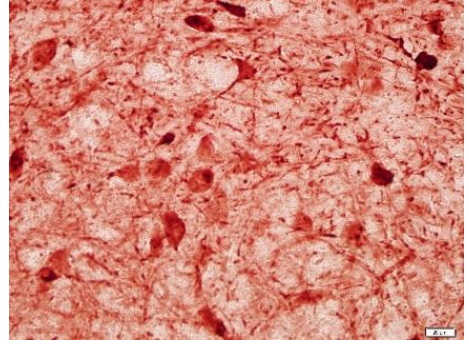


Lezyon tarafı (ipsilateral)

GAERS-6-YALANCI OPERE 40X



Sağlam taraf (kontralateral)



Lezyon tarafı (ipsilateral)

Resim 14. GAERS-6-OHDA ve GAERS-Yalancı opere gruplarının ipsilateral ve kontralateral striatum bölgesi PARV-ir (+) nöronların sayımında kullanılan örnek fotoğraflar (ölçekte belirtilen uzunluk 20µm'dir).

7. TARTIŞMA

Nigrostriatal yolak dejenerasyonunun epileptogenez dönemindeki absans epilepsili sıçan modelinde nöbet gelişimi üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışmadan çıkan bulgular şu şekilde özetlenebilir:

1. Sağ medial ön beyin demeti bölgesine uygulanan 6-OHDA sonucu meydana getirilen nigrostriatal yolak lezyonuna ait immünohistokimyasal bulgular, özellikle dopaminerjik aktivite açısından değerlendirildiğinde, GAERS’lerde Wistar’lara oranla daha belirgin olduğu gösterilmiştir.

2. Ayrıca sağ medial ön beyin demeti bölgesine uygulanmış olan 6-OHDA’nin kontralateral hemisferde de dejenerasyona neden olduğu immünohistokimyasal boyamalar sonucu en belirgin şekilde, striatum’da dopaminerjik aktiviteyi gösteren liflerin, SNpk’da dopaminerjik nöronların ve SNpr’da GABAerjik nöronların dansitometrik incelemelerinde ortaya koyulmuştur.

3. EEG sonuçları yetişkinlik döneminde (PN90) değerlendirilen GAERS’lerde denek sayısının azlığına (n=5) bağlı olarak istatistiksel anlamlılık bulunamasa da, GAERS-6-OHDA grubunda GAERS-Yalancı opere grubuna göre nöbetlerin süresinde ve sayısında artış tespit edilmiştir.

4. Henüz epileptogenetik süreç içerisinde olan PN30 günlük genetik absans epilepsili sıçanlarda medial ön beyin demeti bölgesine uygulanan 6-OHDA sonucunda nigro-striatal yolakta oluşturulan lezyon, davranışsal testler ve immünohistokimyasal sonuçlar ile ortaya koyulmuştur.

5. Epileptik olmayan bir sıçan suşu olan Wistar’larda da aynı şekilde PN30 günlükken medial ön beyin demeti bölgesine uygulanan 6-OHDA sonucunda oluşan nigro-striatal yolak dejenerasyonu, davranışsal testleri ve immünohistokimyasal sonuçlar ile doğrulanmıştır.

Genetik absans epilepsi modeli olan GAERS’lerde epileptogenez döneminde (PN30) ve aynı dönemdeki (PN30) Wistar suşu sıçanlarda, medial ön beyin demetine 6-OHDA verilerek oluşturulan nigro-striatal yolak lezyonunun, absans epilepsi nöbetlerinin gelişimi üzerindeki etkisi karşılaştırmalı olarak, davranış deneyleri, EEG

bulguları ve nöroimmünohistokimyasal parametrelerle değerlendirilmiş ve önemli sonuçlar elde edilmiştir.

6-OHDA verilerek oluşturulan dopaminerjik nöron dejenerasyonu ile indüklenen motor asimetritlerinin striatal dopamin azalması ile ilişkili olduğu sıçan çalışmalarında gösterilmiştir (Kırık ve ark, 1998). Striatumun epilepsi nöbetlerinin jeneralizasyonunda bir ara basamak olabileceği düşünülmektedir (Brodovskaya ve Kapur 2019). Ayrıca striatuma meydana gelen dopaminerjik nöron kaybının, apomorfin ile indüklenen ve kontralateral tarafa gerçekleşen rotasyon sayısı ile orantılı olduğu yapılan bir fare çalışmasında belirtilmiştir (Björklund ve ark, 2019). Bu modelde lezyon sonrası meydana gelen kilo kaybı veya kilo alımında azalma gibi durumlar, Parkinson hastalarında görülen motor bozukluk, disfaji, hiposmi gibi semptomların sıçanlarda iyi modellenebildiğini düşündürmektedir (Miyanishi ve ark, 2019).

Nigro-striatal yolakta oluşturulan harabiyeti doğrulamak için yapmış olduğumuz rotaston testi sonucunda, GAERS ve Wistar 6-OHDA gruplarında, GAERS ve Wistar yalancı opere kontrol gruplarına göre, apomorfin ile indüklenen ve kontralateral tarafa gerçekleşen rotasyon sayıları istatistiksel anlamlılık ifade etmektedir. Aynı amaç için yapmış olduğumuz bir başka test olan silindir testinde ise, GAERS ve Wistar 6-OHDA gruplarında silindire değme sayısında, lezyona kontralateral tarafta anlamlı bir azalma saptanamamıştır. Bu sonuç denek grubunun sayısının az olmasına (n=5) bağlanmıştır.

Tüm bu sonuçlar ışığında, absans epilepsi gelişiminde yer alan epileptogenez mekanizmalarının aydınlatılmasına bir basamak oluşturmak amacı ile, farklı beyin bölgelerinde meydana gelen dopaminerjik ve GABAerjik aktivitelerdeki değişiklikler farklı yöntemler ile ortaya konmaya çalışılmıştır.

7.1. Nigrostriatal Yolak Dejenerasyonunun Absans Epilepsisine Etkileri

Bu çalışmada epileptogenetik sürecini tamamlamamış (PN30) olan yavru sıçanların, medial ön beyin demetine yapılan 6-OHDA enjeksiyonu ile meydana getirilen dopaminerjik dejenerasyonun, yetişkinlik (PN90) döneminde nöbetler üzerindeki etkisi GAERS sıçanlarda elektrofizyolojik parametreler açısından incelenmiştir. İncelenen kortikal EEG kayıtları sonucu dopaminerjik nöron kaybı

bulunan GAERS-6-OHDA grubu hayvanlarda, kontrol grubu olan GAERS-YO hayvanlara göre DDD'nın toplam süreleri ve sayılarında artış tespit edilmiştir. Sonuçlarda istatistiksel anlamlılık bulunamamış olması, hem GAERS-6-OHDA hem de GAERS-YO gruplarında denek sayılarının (n=5) az olmasına bağlanmıştır.

SNpr'nın bir kontrol mekanizması ile inhibisyonu sonucu, nöbetlerin baskılanmasında rol oynadığına dair yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Gale, 1985). Striatumun dorsal ve ventral bölgesine ait nöronlarından çıkan projeksiyonların SNpr aracılığıyla absans nöbet kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir (Deransart, 2000).

Dorsal striatum bölgesinden çıkan uyarılar direkt yolak ile D1 reseptörlerine ve indirekt yolak ile D2 reseptörlerine ulaşır (Moine ve ark, 1995). D1 ve D2 reseptörleri nukleus akumbens bölgesindeki nöronal projeksiyonlar tarafından da uyarılmaktadır (Curran ve ark, 1995).

Nukleus akumbens, striatumun ventral kısmında bulunur. Limbik ve motor etkileşimler için önemli bir bölge olduğu düşünülmektedir (Mogenson ve ark, 1980). Nukleus akumbensin absans nöbetlerinin modülasyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Deransart, 1998). Nukleus akumbens bölgesine uygulanan düşük doz dopaminerjik agonistlerin, GAERS'lerde DDD'larını baskıladığı gösterilmiştir (Deransart ve ark, 2000). Ayrıca, farklı bazal ganglia bölgelerine yapılan müdahaleler ile SNpr inhibisyonu sonucu nöbetlerin baskılandığı gösterilmiştir (Veliskova ve ark, 1998; Dybdal ve Gale, 2000).

Tüm bu bulgular ışığında, dopaminerjik nöron kaybı sonucu artış tespit ettiğimiz, DDD süre ve sayılarının literatürle ve bölümümüzde daha önce "Epilepsi ve Parkinson Hastalığı Birlikteliğine Deneysel Yaklaşımlar" başlığıyla hazırlanan Tuğba Eryiğit'in doktora tezi ile uyumlu olduğu gözükmektedir (Eryiğit T., 2018).

7.2. Nigrostriatal Yolak Dejenerasyonunun Striatum ve SNpk Bölgelerindeki Dopaminerjik nöronlar üzerindeki etkisi

Nigrostriatal yolak dejenerasyonu epilepsi ve/veya Parkinson hastalıklarının mekanizmasının anlaşılması için sık olarak kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızda medial ön beyin demetine 6-OHDA verilerek yapılan dejenerasyon farklı çalışmalarda dorsal striatum bölgesine uygulanarak da sağlanmış, SNpk ve striatum bölgelerinde

dopaminerjik nöron kaybı gösterilmiştir (Perlberg ve ark., 2018). 6-OHDA ile yapılan nigrostriatal yolak dejenerasyonuna bağlı striatum ve SNpk bölgelerinde meydana gelen dopaminerjik aktivite kaybının zamanla arttığını gösteren bir çalışmada, operasyon sonrası % 30 dopaminerjik kayba ulaşma süreleri striatum bölgesinde 3. gün iken SNpk bölgesinde 14. günü bulmuştur. Operasyon sonrası 28. gün ise , striatal ve SNpk bölgelerindeki dopaminerjik kaybının sırası ile % 60 ve % 50'ye yükseldiği tespit edilmiştir (Ambrosi ve ark., 2017). Domuzlarla yapılan bir çalışma da ise tek taraflı yapılan nigrostriatal yolak lezyonu sonucunda gerçekleştirilen TH boyamada, hayvanların % 60'ında, lezyon tarafı striatum ve SNpk bölgelerinde, kontralateral tarafa göre belirgin bir asimetri tespit edilmiştir (Christensen ve ark., 2018).

Yapılan başka bir çalışmada da bu tez çalışmasında olduğu gibi medial ön beyin demeti bölgesine 6-OHDA verilerek gerçekleştirilen lezyon sonucu 3. haftada kontralateral taraf striatum bölgesindeki dopaminerjik aktivite kaybının % 99'a ulaştığı gösterilmiştir (Oestreicher ve ark., 1994) .

Çalışmamızda PN30 günlükken medial ön beyin demetine yapılan 6-OHDA sonucu meydana getirilen nigrostriatal lezyonun immünohistokimyasal sonuçları yetişkinlik (PN90) döneminde değerlendirilmiştir. Yapılan lezyona ipsilateral striatum ve SNpk bölgelerinde belirgin olarak tespit edilen dopaminerjik aktivite kaybı sonuçları, literatür ile uyumlu gözükmektedir.

7.3. Nigrostriatal Yolak Dejenerasyonunun Striatum ve SNpr Bölgelerindeki GABAerjik nöronlar üzerindeki etkisi

Nigrostriatal yolak lezyonu sonucu bazal ganglia bölgesinde meydana gelen farklı nöranal değişikliklerle ilgili yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle striatum ve SNpr bölgeleri ile ilgili yapılan ve GABAerjik nöronların incelendiği bazı çalışmalar burada tartışılmıştır. Sprague Dawley cinsi yetişkin sıçanlarla yapılan bir çalışmada, normal koşullarda, nigrostriatal nöronların % 5-8'ini oluşturan, glutamik asit dekarboksilaz ve parvalbümin gibi işaretleyici yöntemler ile tespit edilen GABAerjik nöronların oranında, 6-OHDA enjeksiyonundan sonra % 81-84'lere varan artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Elektrofizyolojik olarak nigral GABAerjik hücrelerde meydana gelen değişikliklerin, nondopaminerjik nigrostriatal nöronlar ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca mevcut veriler sonucunda küçük bir GABAerjik

nigrostriatal yolağın varlığını düşündüren bulguların olduğundan söz edilmiştir (Rodríguez ve González-Hernández, 1999).

Tek taraflı striatal dopamin denervasyonu sonrası, ipsilateral striatumda GABA'nın %20 oranında arttığı ancak bilateral substansia nigra bölgesinde değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Dopamin denervasyonu yapılan ipsilateral striatum bölgesindeki artan GABA salımı, GABAerjik nöronlar üzerindeki dopamin aracılı inhibisyonunun azalmasına bağlanmıştır (Lindfors ve ark., 1989).

6-OHDA enjeksiyonu ile tek taraflı medial ön beyin bölgesinde lezyon oluşturulan yetişkin Sprague Dawley sıçanların beyinlerinde GABAA reseptör alt birimlerinin (α 1, α 2 ve β 2/3) dağılımını ve miktarını araştıran bir çalışmada, operasyondan 3 ve 7 gün sonra yapılan ölçümler sonucu, α 2-alt birimi miktarı, kontralateral striatuma göre ipsilateral striatumda önemli ölçüde daha fazla bulunmuştur. Ancak, operasyon sonrası 4. hafta da yapılan değerlendirmede, striatum bölgesinde tespit edilen bu farkın ortadan kalktığı belirtilmiştir. Ayrıca β 2/3 alt birimleri için kontralateral ve ipsilateral striatum bölgeleri arası önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir. 6-OHDA uygulanan deney grubunda tespit edilen kontralateral ve ipsilateral taraflar arasındaki farklılık ve kontrol grubunda gözlenmemiştir. Ayrıca özellikle α 2 alt biriminde olan bu değişikliklerin 4 hafta sonra artık belirgin olmaması, sadece lezyonlu taraftaki değişikliklerin kısmen geri dönmesine değil, aynı zamanda lezyona kontralateral taraftaki kompensasyon mekanizmalarına da bağlı olabileceği belirtilmiştir (Caruncho ve ark., 1997)

Başka bir çalışmada ise, aynı şekilde tek taraflı medial ön beyin bölgesinde lezyon oluşturulan yetişkin Sprague Dawley sıçanlarda nigrostriatal yolak lezyonu sonucu GABAB(1a) ekspresyonunun farklı bölgelerde arttığı belirtilmiştir. Bahsedilen artış SNpr'da (% 33), entopedunkular nükleus (% 26) ve subtalamik çekirdekte (% 16) olarak özetlenmiştir. Tüm bu artan hücre ekspresyonlarının nigrostriatal yolak lezyonunu takiben azalmış GABAerjik innervasyonu telafi etmeye yönelik gerçekleşmesi mümkün gözükmektedir. Bu veriler ışığında, nigrostriatal lezyona bağlı olarak GABAB reseptör genlerinde, bölgesel ve alt birimlerine özgü moleküler düzeyde, plastisite sergilendiği düşünülmektedir (Johnston ve Duty, 2003). Ayrıca nigrostriatal yolak lezyonu sonucunda GABAA reseptörü alt birimlerine özgü gen

ekspresyonunda da düzenlenmenin gerçekleştiğini düşündüren farklı çalışmalar da mevcuttur (Chadha ve ark., 2000).

GAERS ve Wistar suşu sıçanların medial ön beyin bölgesine tek taraflı 6-OHDA verilerek meydana getirilen nigrosriatal yolak lezyonu sonucunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda striatum bölgesindeki GABAerjik nöronlar, yoğunluğu ve sayısı bakımından incelendiğinde kontralateral ve ipsilateral taraflar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. SNpr gölgesinde ise nöron yoğunluğu bakımından Wistar-Naif kontralateral tarafa göre, GAERS-6-OHDA ipsilateral tarafta anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,01$). Elde ettiğimiz sonuçlar literatüre göre biraz farklılık göstermektedir. Bunun nedenin deneylerde kullanılmış olan sıçan suşlarının farklılığından ve ayrıca çalışmamızda her bir grup için kullanmış olduğumuz denek sayılarının ($n=4$) az olmasından, kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

7.4. Sonuç

Çalışmamız henüz epileptogenetik sürecini tamamlamamış PN30 günlük GAERS sıçanlarda, medial ön beyin demeti bölgesine 6-OHDA uygulanarak yapılan nigrostriatal lezyonun sonuçlarının, PN90 günlük dönemde, EEG parametreleri ve immünohistokimyasal yöntemler ile incelendiği ilk çalışmadır. Ayrıca tüm süreç ve incelenen parametrelerin spontan absans epilepsisi gözlenmeyen bir sıçan suşu olan Wistar'larla karşılaştırılması yönünden özgün bir çalışmadır. Elde edilen bulgular nigrostriatal yolak dejenerasyonu sonucu absans epilepsi parametresi olan DDD'ların sürelerinde ve sayılarında artış tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan immünohistokimyasal sonuçlara göre 6-OHDA lezyonuna ipsilateral tarafda çok daha belirgin olmak üzere, genetik absans epilepsi modeli olan GAERS'lerde Wistar'lara göre dopaminerjik nöron harabiyetinin daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda her iki suşta da 6-OHDA deney grubu kontralateral striatum ve SNpk bölgelerinde yalancı opere ve naif kontrol gruplarına kıyasla dopaminerjik aktivitede azalma gözlenmiştir. Parvalbumin boyama sonucu SNpr bölgesinde sadece GAERS-6OHDA deney grubu ipsilateral tarafta GABAerjik nöron yoğunluğu ve sayısında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Striatum bölgesinde değerlendirilen GABAerjik nöron aktivitesi ve sayısında iki suş arasında ya da ipsilateral-kontralateral taraflar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

KAYNAKLAR

Akman O, Demiralp T, Ates N, Onat FY. Electroencephalographic differences between WAG/Rij and GAERS rat models of absence epilepsy. *Epilepsy Res.* 89(2-3): 185-93, 2010.

Akman, O., Gulcebi, M.I., Carcak, N., Ketenci, S.O., Eryigit, T., Moshé, S.L., Galanopoulou, A.S., Yilmaz Onat, F. 2015. The role of the substantia nigra pars reticulata in kindling resistance in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia* 56(11):1793-802.

Ambrosi G, Kustrimovic N, Siani F, et al. Complex Changes in the Innate and Adaptive Immunity Accompany Progressive Degeneration of the Nigrostriatal Pathway Induced by Intrastriatal Injection of 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Neurotox Res.* 2017;32(1):71-81. doi:10.1007/s12640-017-9712-2.

Armijo JA, Shushtarian M, Valdizan EM, Cuadrado A, de las Cuevas I, Adín J. Ion channels and epilepsy. *Curr Pharm Des.* 2005;11(15):1975-2003. doi:10.2174/1381612054021006.

Avoli, M., Gloor, P. 1982. Interaction of Cortex and Thalamus in Spike and Wave Discharges of Feline Generalized Penicillin Epilepsy. *Experimental Neurology* 76 (1): 196–217.

Birioukova LM, Sitnikova EY, Kulikov MA, Raevsky VV. Compensatory Changes in the Brain Dopaminergic System of WAG/Rij Rats Genetically Predisposed to Absence Epilepsy. *Bull Exp Biol Med.* 2016 Sep;161(5):662-665.

Björklund A, Dunnett SB. The Amphetamine Induced Rotation Test: A Re-Assessment of Its Use as a Tool to Monitor Motor Impairment and Functional Recovery in Rodent Models of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2019;9(1):17-29. doi:10.3233/JPD-181525.

Bloms-Funke, P., Löscher, W. 1996. The Anticonvulsant Gabapentin Decreases Firing Rates of Substantia Nigra Pars Reticulata Neurons. *European Journal of Pharmacology* 316 (2–3): 211–18.

Bonhaus, D.W., Walters J.R., McNamara, J.O. 1986. Activation of Substantia Nigra Neurons: Role in the Propagation of Seizures in Kindled Rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 6 (10): 3024–30.

Bozzi Y, Borrelli E. The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:157. Published 2013 Sep 17. doi:10.3389/fncel.2013.00157.

Brandt C, Rankovic V, Töllner K, Klee R, Bröer S, Löscher W. Refinement of a model of acquired epilepsy for identification and validation of biomarkers of epileptogenesis in rats. *Epilepsy Behav.* 2016 Aug;61:120- 131.

Brodovskaya A, Kapur J. Circuits generating secondarily generalized seizures. *Epilepsy Behav.* 2019;101(Pt B):106474. doi:10.1016/j.yebeh.2019.106474.

Brunton L. On being tired. 1909. *Practitioner.* 2009;253(1724):34.

Burgess DL, Noebels JL. Single gene defects in mice: the role of voltage-dependent calcium channels in absence models. *Epilepsy Res.* 1999;36(2-3):111-122. doi:10.1016/s0920-1211(99)00045-5.

Caruncho HJ, Liste I, Rozas G, López-Martín E, Guerra MJ, Labandeira-García JL. Time course of striatal, pallidal and thalamic alpha 1, alpha 2 and beta 2/3 GABAA receptor subunit changes induced by unilateral 6-OHDA lesion of the nigrostriatal pathway. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997;48(2):243-250. doi:10.1016/s0169-328x(97)00097-1.

Chadha A, Dawson LG, Jenner PG, Duty S. Effect of unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway on GABA(A) receptor subunit gene expression in the rodent basal ganglia and thalamus. *Neuroscience*. 2000;95(1):119-126. doi:10.1016/s0306-4522(99)00413-3.

Charpier Stephane, CorinneBeurrier, Jeanne T.Paz, Chapter 15 - The Subthalamic Nucleus: From In Vitro to In Vivo Mechanisms. *Handbook of Behavioral Neuroscience* 2010, Pages 259-273.

Christensen AB, Sørensen JCH, Ettrup KS, Orlowski D, Bjarkam CR. Pirouetting pigs: A large non-primate animal model based on unilateral 6-hydroxydopamine lesioning of the nigrostriatal pathway. *Brain Res Bull*. 2018;139:167-173. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.02.010.

Curran EJ, Watson SJ Jr. Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 1995;361(1):57-76. doi:10.1002/cne.903610106.

Daniels JD, Pettigrew JD, Norman JL. Development of single-neuron responses in kitten's lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol*. 1978 Nov;41(6):1373-93. PubMed PMID: 731284.

Depaulis, A., Snead, O.C., Marescaux, C., Vergnes M. 1989. Suppressive Effects of Intranigral Injection of Muscimol in Three Models of Generalized Non-Convulsive Epilepsy Induced by Chemical Agents. *Brain Research* 498 (1): 64–72.

Depaulis, A., Vergnes, M., Marescaux, C., Lannes, B., Warter, J.M. 1988. Evidence That Activation of GABA Receptors in the Substantia Nigra Suppresses Spontaneous Spike-and-Wave Discharges in the Rat. *Brain Research* 448 (1): 20–29.

Depaulis, A., Vergnes, M., Marescaux, C. 1994. Endogenous Control of Epilepsy: The Nigral Inhibitory System. *Progress in Neurobiology*. 42(1):33-52.

Depaulis, A., van Luijtelaar, G. 2006. Genetic models of Absence epilepsy, in Models of Seizures and Epilepsy Editörler: Pitkanen A., Schwartzkroin P. A., Moshe S. L. San Diego, CA: Elsevier Academic Press 233–248.

Deransart, C., Thuy Lê B., Marescaux C., Depaulis, A. 1998. Role of the Subthalamo-Nigral Input in the Control of Amygdala-Kindled Seizures in the Rat. *Brain Research* 807 (1–2): 78–83.

Deransart, C., Riban, V., Lê, B.T., Marescaux, C., Depaulis, A. 2000. Dopamine in the Striatum Modulates Seizures in a Genetic Model of Absence Epilepsy in the Rat. *Neuroscience* 100 (2): 335–44.

Deransart, C., Lê-Pham, B.T., Hirsch, E., Marescaux, C., 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 (1): 203–11.

Deransart, C., Depaulis, A. 2002. The Control of Seizures by the Basal Ganglia? A Review of Experimental Data. In *Epileptic Disorders*. Suppl 3:S61-72.

Dybdal D, Gale K. Postural and anticonvulsant effects of inhibition of the rat subthalamic nucleus. *J Neurosci.* 2000;20(17):6728-6733. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-17-06728.2000.

Ehringer, H., Hornykiewicz, O. 1960. Verteilung Von Noradrenalin Und Dopamin (3-Hydroxytyramin) Im Gehirn Des Menschen Und Ihr Verhalten Bei Erkrankungen Des Extrapiramidalen Systems. *Klinische Wochenschrift* 38 (24): 1236–39.

Engel, J. 1995. Concepts of Epilepsy. *Epilepsia* 36: 23–29.

Engel, J. 2001. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? *The Neuroscientist* 7 (4): 340–52.

Engelborghs S, D'Hooge R, De Deyn PP. Pathophysiology of epilepsy. *Acta Neurol Belg*. 2000;100(4):201-213.

Eryiğit T. (2018), Epilepsi ve Parkinson Hastalığı Birlikteliğine Deneysel Yaklaşımlar, Doktora Tezi, İstanbul, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Fabbri M, Reimão S, Carvalho M, et al. Substantia Nigra Neuromelanin as an Imaging Biomarker of Disease Progression in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2017;7(3):491-501. doi:10.3233/JPD-171135.

Fino, E., Deniau, J.M., Venance L. 2008. Cell-specific spike-timing-dependent plasticity in GABAergic and cholinergic interneurons in corticostriatal rat brain slices. *J Physiol*. 586(1):265-82.

Fisher, R.S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J. 2005. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* (4):470-2.

Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J. 2014. ILAE Official Report: A Practical Clinical Definition of Epilepsy. *Epilepsia* 55 (4): 475–82.

Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):522-530. doi: 10.1111/epi.13670. Epub 2017 Mar 8. PubMed PMID: 28276060.

Gale, K. 1985. Mechanisms of Seizure Control Mediated by Gamma-Aminobutyric Acid: Role of the Substantia Nigra. *Fed Proc* 44 (8): 2414–24.

Garant, D.S., Gale, K. 1983. Lesions of Substantia Nigra Protect against Experimentally Induced Seizures. *Brain Research* 273 (1): 156–61.

Gastaut H. Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia*. 1969;10:14-21.

Ghiglieri, V., Picconi, B., Sgobio, C., Bagetta, V., Barone, I., Paillè, V., Di Filippo, M. 2009. Epilepsy- Induced Abnormal Striatal Plasticity in Bassoon Mutant Mice. *European Journal of Neuroscience* 29 (10): 1979–93.

Ghiglieri, V., Sgobio, C., Costa, C., Picconi, B., Calabresi, P. 2011. Striatum-Hippocampus Balance: From Physiological Behavior to Interneuronal Pathology. *Progress in Neurobiology*. 94(2):102-14.

Gloor P, Fariello RG. Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. *Trends Neurosci*. 1988;11(2):63-8. Review. PubMed PMID: 2465601.

Goldberg EM, Coulter DA. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(5):337-349. doi:10.1038/nrn3482.

Gross RA. A brief history of epilepsy and its therapy in the Western Hemisphere. *Epilepsy Res*. 1992;12(2):65-74. doi:10.1016/0920-1211(92)90028-r.

Hamzehloei L, Rezvani ME, Rajaei Z. Effects of carvacrol and physical exercise on motor and memory impairments associated with Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019;77(7):493-500. Published 2019 Jul 29. doi:10.1590/0004-282X20190079.

Hodge GK, Butcher LL. Pars compacta of the substantia nigra modulates motor activity but is not involved importantly in regulating food and water intake. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1980;313(1):51-67. doi:10.1007/BF00505805.

Huguenard JR. Circuit mechanisms of spike-wave discharge: are there similar underpinnings for centrotemporal spikes?. *Epilepsia*. 2000;41(8):1076-1077. doi:10.1111/j.1528-1157.2000.tb00306.x

Johnston T, Duty S. Changes in GABA(B) receptor mRNA expression in the rodent basal ganglia and thalamus following lesion of the nigrostriatal pathway. *Neuroscience*. 2003;120(4):1027-1035. doi:10.1016/s0306-4522(03)00418-4.

Jones BE, Yang TZ. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol*. 1985 Dec 1;242(1):56-92. PubMed PMID: 2416786.

Kinay D, Oliver KL, Tüzün E, et al. Evidence of linkage to chromosome 5p13.2-q11.1 in a large inbred family with genetic generalized epilepsy. *Epilepsia*. 2018;59(8):e125-e129. doi:10.1111/epi.14506.

Kirik, D., Rosenblad, C., Björklund, A. 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*. 152(2):259-77.

Klein, J.P., Khera, S.D., Nersesyan, H., Kimchi, E.Y., Waxman, S.G., Blumenfeld, H. 2004. Dysregulation of Sodium Channel Expression in Cortical Neurons in a Rodent Model of Absence Epilepsy. *Brain Research* 1000 (1–2): 102–9.

Lerche H, Vezzani A, Beck H, Blümcke I, Weber Y, Elger C. Neue Entwicklungen der Epileptogenese und therapeutische Perspektiven [New developments in epileptogenesis and therapeutic perspectives] .*Nervenarzt*. 2011;82(8):978-985. doi:10.1007/s00115-011-3260-4.

Lindfors N, Brodin E, Tossman U, Segovia J, Ungerstedt U. Tissue levels and in vivo release of tachykinins and GABA in striatum and substantia nigra of rat brain after unilateral striatal dopamine denervation. *Exp Brain Res*. 1989;74(3):527-534. doi:10.1007/BF00247354.

Liu CT, Kao LT, Shih JH, et al. The effect of dextromethorphan use in Parkinson's disease: A 6-hydroxydopamine rat model and population-based study. *Eur J Pharmacol.* 2019;862:172639. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172639.

Luhmann, H.J., Mittmann, T., Luijtelaar, G.V., Heinemann, U. 1995. Impairment of Intracortical GABAergic Inhibition in a Rat Model of Absence Epilepsy. *Epilepsy Res* 22 (1): 43–51.

Ma Y, Feng Q, Ouyang L, et al. Morphological diversity of GABAergic and cholinergic interneurons in the striatal dorsolateral and ventromedial regions of rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2014;34(3):351-359. doi:10.1007/s10571-013-0019-4.

Mattay, V.S., Tessitore, A., Callicott, J.H., Bertolino, A., Goldberg, E.T., Chase, T.N., Hyde, T.M., Weinberger, D.R. 2002. Dopaminergic Modulation of Cortical Function in Patients with Parkinson's Disease. *Annals of Neurology* 51 (2): 156–64.

Meeren, H.K., Pijn, J.P., van Luijtelaar, E.L., Coenen, A.M., Silva, F.H. 2002. Cortical Focus Drives Widespread Corticothalamic Networks during Spontaneous Absence Seizures in Rats. *The Journal of Neuroscience* 22 (4): 1480–95.

Miyanishi K, Choudhury ME, Watanabe M, et al. Behavioral tests predicting striatal dopamine level in a rat hemi-Parkinson's disease model. *Neurochem Int.* 2019;122:38-46. doi:10.1016/j.neuint.2018.11.005.

Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol.* 1980;14(2-3):69-97. doi:10.1016/0301-0082(80)90018-0.

Moine C, Bloch B. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol.* 1995;355(3):418-426. doi:10.1002/cne.903550308.

Moratalla, O.Solís, L.M.Suárez. Chapter 37 - Morphological Plasticity in the Striatum Associated With Dopamine Dysfunction. In: Heinz Steiner, Kuei Y. Tseng. Handbook of Basal Ganglia Structure and Function, Second Edition. 2016, p: 755-770.

Mura, A., Feldon, J., Mintz, M. 2000. The expression of the calcium binding protein calretinin in the rat striatum: effects of dopamine depletion and L-DOPA treatment. *Exp Neurol*. 164(2):322-32.

Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Rodriguez, M., Lanciego, J.L., Artieda, J., Gonzalo, N., Olanow, C.W. 2000. Pathophysiology of the Basal Ganglia in Parkinson's Disease. *Trends Neurosciences* 23 (10 Suppl):S8-19. Review.

Oestreicher E, Sengstock GJ, Riederer P, Olanow CW, Dunn AJ, Arendash GW. Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study. *Brain Res*. 1994;660(1):8-18. doi:10.1016/0006-8993(94)90833-8.

Onat FY, van Luijckelaar G, Nehlig A, Snead OC 3rd. The involvement of limbic structures in typical and atypical absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 2013;103(2-3):111-123. doi:10.1016/j.eplepsyres.2012.08.008.

Paxinos G., Watson C. 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (3. Basim). San Diego: Academic Press.

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 : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (4): 929–41.

Perlberg V, Lambert J, Butler B, et al. Alterations of the nigrostriatal pathway in a 6-OHDA rat model of Parkinson's disease evaluated with multimodal MRI. *PLoS One*. 2018;13(9):e0202597. Published 2018 Sep 6. doi:10.1371/journal.pone.0202597.

Pessoa RR, Moro A, Munhoz RP, Teive HAG, Lees AJ. Apomorphine in the treatment of Parkinson's disease: a review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2018;76(12):840-848. doi:10.1590/0004-282X20180140.

Petryszyn, S., Sánchez, M.G., Gagnon, D., Beaulieu, J.M., Parent, A., Parent, M. 2017. A dense cluster of D1 + cells in the mouse nucleus accumbens. *Synapse* 71(1):51-54.

Petryszyn, S., Parent, A., Parent, M. 2017. The calretinin interneurons of the striatum: comparisons between rodents and primates under normal and pathological conditions. *J Neural Transm (Vienna)*. doi: 10.1007/s00702-017-1687-x.

Pitkänen A. Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. *Epilepsia*. 2010 Jul;51 Suppl 3:2-17. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02602.x. Review. PubMed PMID: 20618393; PubMed Central PMCID: PMC2923397.

Pumain, R., Louvel, J., Gastard, M., Kurcewicz, I., Vergnes, M. 1992. Responses to N-Methyl-D-Aspartate Are Enhanced in Rats with Petit Mal-like Seizures. *J Neural Transm Suppl* 35: 97–108.

Rattka M, Fluri F, Krstić M, Asan E, Volkmann J. A Novel Approach to Assess Motor Outcome of Deep Brain Stimulation Effects in the Hemiparkinsonian Rat: Staircase and Cylinder Test. *J Vis Exp*. 2016;(111):53951. Published 2016 May 31. doi:10.3791/53951.

Ravizza T, Onat FY, Brooks-Kayal AR, Depaulis A, Galanopoulou AS, Mazarati A, Numis AL, Sankar R, Friedman A. WONOEP appraisal: Biomarkers of epilepsy-associated comorbidities. *Epilepsia*. 2017 Mar;58(3):331-342.

Ricard-Mousnier B, Couraud F. Rôle des canaux ioniques potentiel-dépendants dans l'épileptogenèse [Role of voltage-dependent ion channels in epileptogenesis]. *Neurophysiol Clin*. 1993;23(5):395-421. doi:10.1016/s0987-7053(05)80391-0.

Rodriguez-Oroz MC, Obeso JA, Lang AE, et al. Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain*. 2005;128(Pt 10):2240-2249. doi:10.1093/brain/awh571.

Rodríguez M, González-Hernández T. Electrophysiological and morphological evidence for a GABAergic nigrostriatal pathway. *J Neurosci*. 1999;19(11):4682-4694. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-11-04682.1999.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-521. doi: 10.1111/epi.13709. Epub 2017 Mar 8. PubMed PMID: 28276062; PubMed Central PMCID: PMC5386840.

Slaght, S.J., Paz, T., Chavez, M., Deniau, J.M., Mahon, S., Charpier, S. 2004. On the activity of the corticostriatal networks during spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy. *J Neurosci*. 24(30):6816-25.

Snead OC 3rd. Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann Neurol*. 1995;37(2):146-157. doi:10.1002/ana.410370204.

Sperber, E.F., Wurpel, J.N.D., Zhao, D.Y., Moshé, S.L. 1989. Evidence for the Involvement of Nigral GABAA Receptors in Seizures of Adult Rats. *Brain Research* 480 (1-2): 378-82.

Strauss, U., Kole, M.H.P., Bräuer, A.U., Pahnke, J., Bajorat, R., Rolfs, A., Nitsch, R. 2004. An Impaired Neocortical Ih Is Associated with Enhanced Excitability and Absence Epilepsy. *The European Journal of Neuroscience* 19: 3048-58.

Trevelyan, A.J., Muldoon, S.F., Merricks, E.M., Racca, C., Staley, K.J. 2015. The Role of Inhibition in Epileptic Networks. *Journal of Clinical Neurophysiology : Official Publication of the American Electroencephalographic Society* 32 (3): 227-34.

Weintraub DB, Zaghloul KA. The role of the subthalamic nucleus in cognition. *Rev Neurosci*. 2013;24(2):125-138. doi:10.1515/revneuro-2012-0075.

Veliskova, J., Velisek, L., Nunes, M.L., Moshe, S.L. 1996. Developmental Regulation of Regional Functionality of Substantial Nigra GABAA Receptors Involved in Seizures. *European Journal of Pharmacology* 309: 167–73.

Velísková J, Kubová H, Friedman LK, et al. The expression of GABA(A) receptor subunits in the substantia nigra is developmentally regulated and region-specific. *Ital J Neurol Sci*. 1998;19(4):205-210. doi:10.1007/BF02427602.

Vergnes, M., Marescaux, C., Depaulis, A., Micheletti, G., ve Warter, J.M. (1986). Ontogeny of spontaneous petit-mal-like seizures in Wistar rats. *Developmental Brain Research*, 30,85-87.

Vezzani A, Pascente R, Ravizza T. Biomarkers of Epileptogenesis: The Focus on Glia and Cognitive Dysfunctions. *Neurochem Res*. 2017 Jul;42(7):2089-2098.

