T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KİNDLİNG UYARISI ALAN GENETİK ABSANS EPİLEPSİLİ SIÇANLARDA HİPOKAMPAL MOSSY TERMİNALLERİNDE ELEKTRON MİKROSKOPİK GABA DEĞERLENDİRMESİ

Dr. N. NÜKHET DAĞBAŞI

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. SERAP ŞİRVANCI

İSTANBUL 2013

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KİNDLİNG UYARISI ALAN GENETİK ABSANS EPİLEPSİLİ SIÇANLARDA HİPOKAMPAL MOSSY TERMİNALLERİNDE ELEKTRON MİKROSKOPİK GABA DEĞERLENDİRMESİ

Dr. N. NÜKHET DAĞBAŞI

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. SERAP ŞİRVANCI

İSTANBUL 2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfalar
ÖNSÖZ (TEŞEKKÜR)	i
ÖZET	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hipokampus	3
2.1.1. Hipokampal yolaklar	5
2.1.1a. Afferent yolaklar	5
2.1.1b Efferent yolaklar	6
2.1.2. Papez devresi	7
2.1.3. Fizyolojisi ve kimyası	8
2.1.4. Fonksiyonları	8
2.1.5. Lezyonları	9
2.2. Sinaptik özellikler	10
2.3. GABA	11
2.4. Mossy Lifleri	12
2.5. Dendritik Uzantılar	14
2.6. Epilepsi	15
2.6.1. Epilepsi fizyopatolojisi	17
2.6.2. Absans epilepsi	20
2.6.3. Genetik absans epilepsili sıçanlar (GAERS)	21
2.6.4. GAERS ve hipokampus	22
2.6.5. GAERS ve konvülzif nöbetler	22
2.6.6. Kindling	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Stereotaksik Cerrahi	25
3.2. Kindling	26
3.3. Geçirimli Elektron Mikroskopi	26
3.4. GABA İmmün-altın İmmünsitokimyası	27
3.5. Analiz Yöntemi	28
4. BULGULAR	29
4.1. Işık Mikroskopi Bulguları	29
4.1.1. Yalancı-opere Wistar ve GAERS grupları	29
4.1.2. Kindling Wistar ve GAERS grupları	30
4.2. Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları	32
4.2.1. Yalancı-opere Wistar grubu	32
4.2.2 Yalancı-opere GAERS grubu	34
4.2.3. Kindling Wistar grubu	35
4.2.4. Kindling GAERS grubu	37
4.3. İstatistiksel Analiz	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
6. KAYNAKLAR	52

TEŞEKKÜR

İhtisas eğitimim boyunca ve bu tezin hazırlanmasının tüm aşamalarında bana yardımcı olan, bilgi ve desteğini hiç esirgemeyen çok değerli danışman hocam ***Doç. Dr. Serap Şirvancı****'ya,*

bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım ***Prof. Dr. Feriha Ercan ve Prof. Dr. Şule Çetinel****'e,*

tezimin hem kaynağı olarak hem de engin bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan değerli hocam ***Prof. Dr. Filiz Onat****'a,*

tez çalışmamın ve eğitimimin her aşamasında yardımlarını gördüğüm sevgili hocam ve meslektaşım ***Öğr. Gör. Dr. Dilek Akakın****'a,*

tezimin elektron mikroskopi teknik aşamalarını büyük bir sabır ve yetkinlikle gerçekleştirirken manevi desteğini de benden hiç esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşım ***Yük. Kim. Müh. Necati Yurdakul****'a,*

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tüm çalışma arkadaşlarıma,

fotoğraflamadaki katkılarından dolayı ***Yücel Öztürk****'e,*

ışık mikroskopik preparasyondaki yardımlarından dolayı ***Ünal Devrim****'e,*

hayatımın her döneminde olduğu gibi bu döneminde de maddi ve manevi en büyük desteğim çok sevgili eşim ***Nezih Dağbaşı****'na*

sonsuz teşekkürlerimi bildiririm.

ÖZET

Epilepsinin altında yatan mekanizmalara ilişkin hipotezler merkezi sinir sistemindeki eksitasyon-inhibisyon dengesizliği üzerinde yoğunlaşmıştır. Tipik absans epilepsinin bir modeli olan GAERS (Genetik Absans Epilepsili Sıçanlar-Strasbourg) epilepsi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada GAERS hipokampusunda elektriksel kindling uygulamasından sonraki olası morfolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Tüm hayvanlara toplam 6 uyarı verildi. Son uyarıdan 1 saat sonra hayvanlar dekapite edildi. İnce-yapısal düzeyde hipokampal CA3 bölgesi mossy terminallerindeki (MT) GABA yoğunluğu değerlendirildi. Kindling gruplarında kendi kontrollerine, GAERS'lerde Wistar gruplarına göre GABA yoğunluğunun daha az olduğu; mitokondriyal ve dendritik alan oranlarının GAERS'lerde Wistar kontrollere göre daha fazla olduğu, ancak tüm değerlendirmelerde istatistiksel anlamlılık olmadığı görüldü. Kindling gruplarında MT'de ileri derecede vezikül kaybı gözlendi. Çalışmamızda kindling gruplarındaki GABA yoğunluğunun azalma eğiliminde olmasının nedeni son uyarıdan 1 saat sonrası gibi çok erken dönemde GABA'nın sinaptik havuzdan kompansasyon amaçlı hızla salınıp havuzdaki GABA'yı azaltması olabilir. Kindling gruplarında gözlenen vezikül kaybı, yalnızca 6 uyarının bile hipokampustaki trisinaptik döngüde yapısal değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir. GAERS'lerde saptadığımız mitokondri alanındaki artış eğilimi, bu suştaki artmış mitokondriyal aktivite ile uyumlu bir bulgudur. Dendritik uzantı alanındaki artma eğilimi ise bu suşun öğrenme performansında gösterdiği artışla ilişkilendirilebilir. Temporal lob ve absans epilepsinin farklı epileptogenez mekanizmalarına sahip olduklarına işaret eden bulgularımız ileri deneysel çalışmalar için temel oluşturma niteliğindedir.

Anahtar sözcükler: Absans epilepsi, GAERS, kindling, hipokampus, GABA, immünsitokimya

ABSTRACT

Electron microscopic GABA evaluation in hippocampal mossy terminals of genetic absence epileptic rats receiving kindling stimulations

The hypotheses related to the fact of epileptic mechanisms are mainly based on excitation-inhibition imbalance in central nervous system. GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) is a well-known animal model of absence epilepsy, frequently used in experimental studies. In the present study, we aimed to examine possible morphological changes in GAERS hippocampus after electrical kindling stimulations. All control and test group rats received 6 kindling stimulations. Rats were decapitated 1 hour after the last stimulation. Ultrastructural GABA immunocytochemistry was used to evaluate GABA density quantitatively in mossy terminals of hippocampal CA3 region. Results were as follows: GABA levels were less in kindling groups compared to their controls, and in GAERS groups compared to Wistar groups; mitochondrial and dendritic spine area ratios were greater in GAERS groups compared to Wistar groups, although all these evaluations were statistically nonsignificant. Depletion of synaptic vesicles was evident in the mossy terminals of kindling groups. The reason of decreased levels of GABA found in the present study might be that GABA has been released from the synaptic pool rapidly at an early time period as 1 hour after the last stimulation, for compansation mechanisms. Depletion of synaptic vesicles observed in kindling groups shows that even 6 kindling stimulations have an impact of changing hippocampal morphology in trisynaptic cycle. The increased mitochondrial area in GAERS might be related to the increased mitochondrial activity. The increased dendritic spine area might be related to the increased performance of learning in GAERS. Our findings indicating that absence epilepsy and temporal lobe epilepsy have different mechanisms of epileptogenesis might be a basis for further experimental studies.

Key words: Absence epilepsy, GAERS, hippocampus, kindling, GABA, immunocytochemistry

SİMGE VE KISALTMALAR

CA	:	Cornu Ammonis (ammon boynuzu)
DG	:	Dentat girus
DU	:	Dendritik uzantı
GABA	:	Gamma-amino bütirik asit
GAD67	:	Glutamik asit dekarboksilaz 67
GAERS	:	Genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (Genetik absans epilepsi sıçanlar-Strasbourg)
MT	:	Mossy terminali
TLE	:	Temporal lob epilepsi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi dünyada %1 prevelansa sahip olduğu öngörülen, yaygın ve ciddi nörolojik bir bozukluktur (1, 2). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2009 verileri dünyada yaklaşık 50 milyon epilepsili hasta olduğunu bildirmektedir. Limbik sistemden kaynaklanan parsiyel başlangıçlı temporal lob epilepsi (TLE) en yaygın tiptir. Diğer bir grup idiyopatik jeneralize epilepsilerdir. Bu grupta yer alan absans epilepsi patogenezinde kortiko-talamo-kortikal döngü rol almaktadır.

Absans epilepsi ve TLE'nin aynı hastada birlikte gözlenmesi klinikte nadir görülmektedir ve nedeninin anlaşılamamış olması altta yatan mekanizmaların araştırılmasına dayanak sağlamıştır (3, 4). Tipik absans epilepsinin iyi tanımlanmış bir modeli olan GAERS sıçanlar epilepsi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada GAERS sıçanlarda bir TLE modeli olan kindling uygulaması ile hipokampal mossy terminallerindeki (MT) olası morfolojik ve GABA yoğunluğu değişikliklerini incelemeyi amaçladık.

Literatüre göre GAERS'lerde fokal nöbetlerin oluşturulabilirliği TLE modeli oluşturmada kullanılan elektriksel kindling uygulamasıyla araştırılmış ve Wistar kontrollerin 5. derece nöbet geçirdikleri ancak GAERS'lerin 30 kindling uyarısı verilmesine rağmen 2. derece nöbet durumundan öteye gidemedikleri ortaya konmuştur (5). Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Laboratuvarından elde edilen verilere göre, Wistar sıçanların 6 kez ard-deşarj eşikleriyle uyarılması evre 2 limbik nöbet oluşmasını tetiklemektedir. Bu uyarı sayısı, Wistar sıçanların evre 2 nöbette kalan GAERS'ler ile aynı sayıda uyarı almalarına ve aynı nöbet evresinde kalmalarına olanak sağlamıştır. Çalışmamızda Wistar ve GAERS sıçanların nöbet evreleri eşit tutularak olası morfolojik değişikliklerin standardize edilmesi amaçlanmıştır.

Hipokampal CA3 bölgesi MT 4-10 μm çapında dev terminallerdir. Eksitatör bir nörotransmitter olan glutamatı ve inhibitör bir nörotransmitter olan GABA'yı birlikte içerirler (6). Nöbetlerle MT'lerinde 6 ve 24 saat sonra geçici bir glutamik asit dekarboksilaz 67 (GAD67) ve GABA artışı olduğu bildirilmiştir (7). Çalışmamızda çok

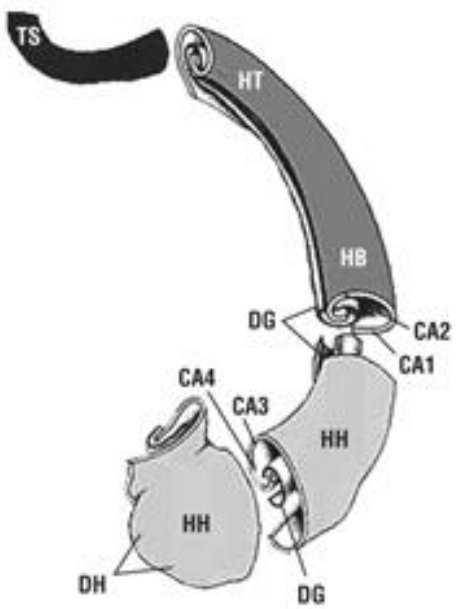
erken dönemde (1. saat) 6 uyarı sonrası Wistar ve GAERS sıçanlarda MT'de morfolojik ve GABA düzeyi açısından değişiklik olup olmadığını incelemek amaçlanmıştır.

Absans epilepsinin oluşmasında kortiko-talamo-kortikal döngülerin, TLE'de ise limbik yapıların rol aldığı düşünülmektedir (8, 9). Her iki hastalığın nöbet döngülerinin birbirinden bağımsız olduğu düşünülse de, genetik absans epilepsili sıçanların kindling uygulamasına dirençli olduğunun gösterilmesi bu iki hastalığın ilgili beyin bölgelerinin etkileştiğine işaret etmektedir. Bu çalışmada genetik absans epilepsili sıçan hipokampusunda kindling uygulamasından sonraki olası morfolojik değişiklikleri elektron mikroskopik düzeyde araştırarak her iki hastalığın gelişmesinde rol oynayan nöronal döngülerin birbirleriyle ilişkilerini, dolayısıyla hastalıkların mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

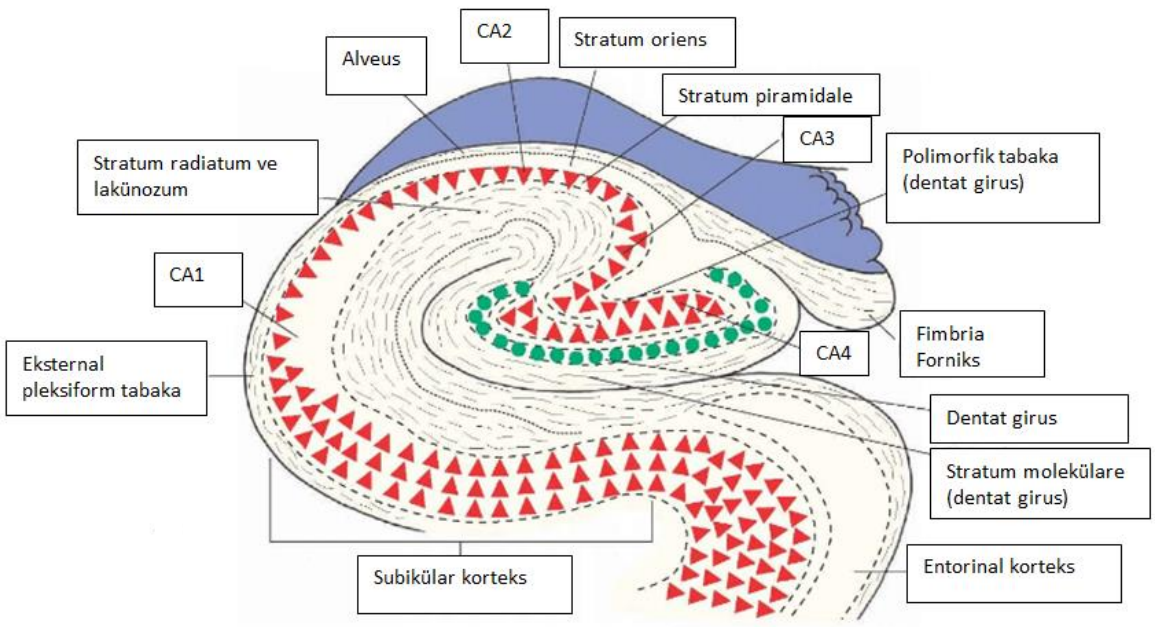
2.1. Hipokampus

Hipokampus filogenetik olarak beynin en eski bölümlerinden biridir. Deniz atına benzerliğinden dolayı hipokampus ismi verilen bu yapının dış yüzü koç boynuzuna benzediğinden Cornu Ammonis adı ile de anılmıştır (10). Koronal kesitlerde C harfi şeklinde görülür. Hipokampus, koroid fissür kavsinin dış parçasından gelişir. Bu süreç; bölgede bulunan öncü nöronların (nöral progenitörler) çoğalması ve göç etmesi ile başlar. Böylece hemisfer duvarı bir yandan kalınlaşırken, diğer yandan ventrikülün medial kenarına doğru bir çıkıntı yapar. Bu çıkıntı hipokampusu meydana getirir. Hipokampus; lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanan, yaklaşık 5-8 cm uzunluğunda bir gri cevher tabakasıdır (10,11). Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölüme ayrılır (Şekil 1).



Şekil 1. HH: Hipokampus baş bölgesi, HB: gövde, HT: kuyruk, TS: kuyruk son kısım, DG: dentat girus, CA: Ammon boynuzu.
(Kaynak: Bradley S. Peterson; HuiMahn A. Choi; Xuejun Hao; Jose A. Amat; Hongtu Zhu; Ronald Whiteman, BA; Jun Liu; Dongrong Xu; Ravi Bansal.
Morphologic Features of the Amygdala and Hippocampus in Children and Adults With Tourette Syndrome. Arch Gen Psychiatry. 2007;64(11):1281-1291).

Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır. Ön tarafı geniş ve düz olup pes hippocampi adını alır. Bu bölümde pençeye benzeyen iki veya üç yüzeysel çıkıntı bulunur. Bu çıkıntılara digitationes hippocampi adı verilir. Hipokampusun bütün ventriküler yüzeyi kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu alveus ile örtülüdür. Bu lifler medialde yassı bir bant şeklinde birbirine yaklaşarak fimbria hipokampiyi meydana getirir. Fimbria hipokampinin ön ucu unkus girus hipokampinin beyaz cevherinde sonlanır. Arka ucu ise alveus ile birlikte krus fornisisi oluşturur. Alveustan gelip fimbriaya dahil olan lifler forniksin başlangıcını meydana getirirler. Cornu Ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak da ifade edilebilen hipokampus bölümü, hücre yapısındaki değişikliklerden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 gibi farklı alanlara ayrılmıştır. Bunlardan CA1 subiculuma, CA4 ise girus dentatusa en yakın olan alandır (Şekil 2).



Şekil 2. Hipokampus anatomisi, hücre tabakaları
(Kaynak: http://what-when-how.com/neuroscience/the-limbic-system-integrative-systems-part-1 23.08.2013).

Histolojik olarak; ventriküler yüzeyden başlayarak derine doğru, hipokampusa ait tabakalar şu şekilde sıralanmaktadır (10,12) (Şekil 2):

1- Alveus: Hipokampusa giren ve hipokampustan çıkan liflerin oluşturduğu subependimal tabakadır.

2- Stratum oriens: Esas olarak piramidal hücrelerin bazal dendritleri ile internöronların yerleştiği tabakadır. Buradaki çoğu nöron aksonları alveus liflerine katılır. Diğer hücre aksonları ise, en derinde yer alan moleküler tabakaya kadar uzanır.

3- Stratum piramidale: Karakteristik olarak bu tabakada büyük piramidal ve Golgi tip II hücreleri çoğunluktadır. Piramidal hücrelerin tabanı hipokampusun ventriküler yüzeyine dönüktür. Bazal ve apikal dendritleri komşu tabakalara kadar uzanır. Aksonları ise stratum oriens'ten geçerek alveus liflerine katılırlar. Hipokampusa asıl şeklini veren buradaki piramidal hücrelerin dizilimidir.

4- Stratum lusidum: CA3 alanındaki piramidal hücreler ile bağlantı sağlayan mossy lifleri (yosunsu lifler) içerir. Diğer primatlara göre insanlarda daha belirgin olup CA1 ile CA2 alanlarında bulunmaz.

5- Stratum radiatum: Stratum piramidalenin daha derine geçen apikal dendritleri ve ilişkili aksonları ile az miktarda piramidal hücre tarafından oluşturulur.

6- Stratum lakünozum: Schaffer kollaterallerinin sinaptik terminalleri bu tabakadadır.

7- Stratum molekülare: İnce sinir lifleri ve çok az sayıda nöron içeren 5., 6. ve 7. tabakalar bazı kaynaklarda, stratum molekülare adı altında tek bir tabaka olarak kabul edilirken, bazı kaynaklarda ise 6. ve 7. tabakalar stratum lakünozum–molekülare ismiyle incelenmektedir.

2.1.1.Hipokampal yolaklar

2.1.1a. Afferent yolaklar

Hipokampus; dolaylı da olsa tüm duyusal uyarıları içeren afferentlere sahiptir. Entorinal alandan gelen uyarılar şu dört yolla hipokampusa iletilir (10,13):

1. Perforan yolak: Entorinal korteksten gelen aksonları subikulum boyunca girus dentatusa ilerler ve CA4 alanı hariç tüm hipokampusa dağılır.

2. Mossy (yosunsu) lifleri: Girus dentatustan CA3 alanına giderler.

3. Schaffer kollateralleri: CA3 ve CA2'den CA1 alanına uzanan piramidal hücre uzantılarıdır.

4. Alvear lifler: Subkortikal alanlardan gelen bu lifler alveustan hipokampusa geçer ve hipokampusun CA1 kısmı ile subikulumun iç tabakasına dağılır.

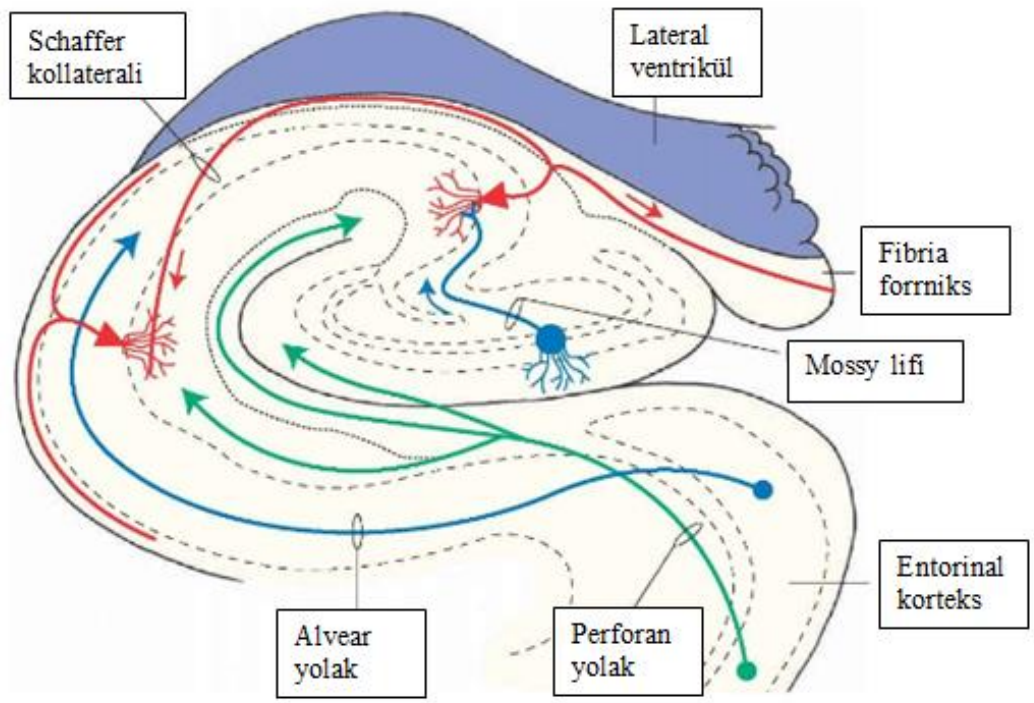
Hipokampus, parahipokampal girus korteksinden de uyarılar alır ve bu uyarıları forniks yolu ile korpus mamillare, septal alan ve bazı hipotalamik çekirdeklere nakleder. Ayrıca hipokampus forniks aracılığı ile anterior talamik çekirdekler, posterior hipotalamik alan, korpus mamillare, septal alan, substansiya innominata, ventral tegmental alan, rafe çekirdeği ve parabrakial çekirdekten lifler alır.

2.1.1b. <u>Efferent yolaklar</u>

Forniks, hipokampusun en büyük efferent yoludur. Hipokampus ve subikulumdan başlayan ve yaklaşık 1,2 milyon kadar olan miyelinli lifler, alveustan fimbria hipokampiye geçer. Bu lifler, splenium korporis kallosinin altında krus fornisis, talamusun arkasında da korpus fornisis olarak devam eder. İki krus arasında çapraz yapan liflere komissüra hipokampi adı verilir. Korpus fornisisten sonra, kolumna fornisis ismiyle uzanan aksonlar, foramen interventrikülare önünde kavis yaparak anterior talamik çekirdekler ve dorsal lateral talamik çekirdeğe lifler (postkomissüral lifler) verir. Buradan hipotalamusa uzanan liflerin çoğu korpus mamillarede ve hipotalamusun ventromedial nükleusunda sonlanır. Kolumna fornisisten kommissura anteriora ayrılan az sayıdaki forniks lifleri (prekomissüral lifler) ise septal alan, substansiya innominata ve hipotalamik rostral alana geçerler.

2.1.2. Papez devresi

Hipokampusun dış bağlantılarını genellikle Papez devresi ifade eder. Klasik Papez devresi sırasıyla; hipokampus, forniks, korpus mamillare, traktus mamillotalamikus, anterior talamik çekirdekler, girus singuli, girus parahipokampalis ve hipokampusa geri bağlantılar yapan nöronları kapsar (Şekil 3). Papez devresi içinde uyarıların bilardo toplarının çarpması gibi art arda birbirlerini izlemeleri yaşadığımız bir duygunun giderek şiddetlenmesine ve iz bırakmasına neden olur. Duygusal tepkilerin olabilmesi için bu devrenin sağlam olması gerekir. Her iki hipokampus komissüral yollarla bağlantı içindedir. Ayrıca hipokampustan neokortekse direkt yollar saptanmıştır (10,14,15).



Şekil 3. Papez devresi (trisinaptik yolak)
(Kaynak: http://what-when-how.com/neuroscience/the-limbic-system-integrative-systems-part-1 23.08.2013).

2.1.3. Fizyolojisi ve kimyası

Hipokampusta monoaminerjik, kolinerjik, GABAerjik afferentler bulunur. Örneğin, glutamat ve aspartat, hipokampustan en çok salgılanan eksitatör nörotransmitterler olarak bilinir. Somatostatin-immünreaktif lifler, stratum lakünozum ve stratum orienste; glutamat dekarboksilaz (GAD)-immünreaktif lifler, stratum piramidale, stratum radiatum ve stratum orienste; kolesistokinin (CCK)-immünreaktif lifler ise özellikle stratum piramidalede gösterilmiştir. Bunun yanında CA3'e giden mossy liflerinde bir opioid peptid olan dinorfin, pek çok hipokampal alanlarda ise VIP (vazoaktif intestinal polipeptid) yaygın olarak bulunur (10,12).

Hipokampus; uzun süreli bir sinaptik ilişki türü olan LTP (long term potentiation) ve iskemiye seçici duyarlılık gibi konularda oldukça dikkat çeken bir yapıdır. Ayrıca hipokampusun bir diğer özelliği ise hipereksitabilitesidir. Örneğin hafif elektriksel uyarılar, hipokampus bölgelerinde uyarı kesildikten sonra saniyeler süren lokal epileptik nöbetlere sebep olur. Bu da hipokampusun normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir (10,16-18).

2.1.4. Fonksiyonları

Hipokampusun hem yapısının karmaşıklığı, hem de beyindeki birçok bölge ile yakın ilişkisi, fonksiyonunun açıklanmasını güçleştirmektedir (10,19-21). Bu nedenle hipokampusun tek başına yaptığı fonksiyonları tanımlamak yerine karmaşık fonksiyonlardaki rolü üzerinde durmak doğru olacaktır (10,22,23).

Hipokampusun, 1948 yılına kadar sadece koku ile ilgili olduğu sanılıyordu (10,11). Fakat daha sonra koku yollarının gelişmediği bazı insanlarda, hipokampusun normal geliştiği gözlendi. Hemen her türlü duyusal uyarı (görme, işitme, koku, dokunma, iç organ duyuları vs.), küçük bir alan dahi olsa hipokampusu aktive eder. Hipokampus da ventral talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderir. Böylece, hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinden önce, limbik sistemi etkileyen hipokampus, davranışların şekillenmesine katkıda bulunmuş

olur (10,23). Bu sebepten dolayı hipokampusun, gelen duyusal sinyalleri içerisinden geçiren ek bir kanal rolü oynadığı düşünülebilir (10,16,24). Hipokampusun hafıza, özellikle de kısa süreli hafıza ile ilgili olduğu bilinmektedir (10,25). Kısa süreli hafıza, yeni bilgilerin depolanma kapasitesini ifade etmektedir. Hipokampusun endokrin fonksiyonu üzerinde de durulmaktadır. Örneğin; hipokampusun ön bölgesinde östradiolü konsantre eden nöronlar saptanmıştır. Sıçan deneylerinde ise hipokampusun uyarılması ile ovülasyonda inhibisyon meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca forniksin kesilmesi ile ACTH salınımında bozukluk saptanmıştır (10,26). Hipokampusun şu fonksiyonlara da katıldığı kabul edilmektedir: Heyecan uyandıran reaksiyonlar veya heyecanın kontrolü, iç organlara ait aktivitenin düzenlenmesi ve serebral korteks üzerine olan retiküler aktivitenin ayarlanması (10,27).

2.1.5. Lezyonları

Genel olarak hipokampusun uyarılması ile kızgınlık, sakinlik veya hiperseksüalitenin herhangi biri ortaya çıkar. Hafif uyarılmasında ise, uyarım bittikten sonra bile saniyelerce süren bir epileptik nöbet görülür. Bu nöbetler sırasında birey koku, görme, işitme, dokunma ve benzeri tarzda halüsinasyonlar tanımlar. Birey bilinçlidir ve halüsinasyonların gerçek olmadığını bilir (10,16,28). Metabolik (alkolizm, kronik malnutrisyon veya tiamin eksikliği gibi) veya mekanik (enfarktüs, kanama veya cerrahi gibi) nedenlerden dolayı, hipokampusun iki taraflı lezyonu sonucu yeni hatıraların kaydedilememesi ile ilgili bir amnezi durumu vardır ki buna Korsakoff Sendromu adı verilir.

Yakın zamana kadar yaşlanma sürecinde, hipokampustaki hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı, bunun da yaşlılıkta görülen bunamaya sebep olabileceği Alzheimer Hastalığına yakalanmış insanların hipokampal CA1, CA2 ve CA3 alanlarına ait piramidal hücre sayısında bir azalma tespit edilmiştir (10,29). Hipokampus lezyonları sonucu ortaya çıkan davranış değişikliklerinden, kortikal ve duyusal uyaranlardan gelen bilgiyi kodlayamaması sorumlu tutulmuştur (10,23). GABAerjik inhibitör nöronların ölümü, inhibisyonda azalmaya sebep olur. Bu azalma, özellikle

CA3 alanındaki piramidal ve dentat granül hücrelerinde patolojik hipereksitabiliteye yol açar (10,30,31). Ayrıca hipokampusta nöbetlere bağlı olarak oluşan hücre ölümlerinin altında yatan moleküler mekanizmada, glutamat reseptör alt tipi NMDA (N-metil-D-aspartat) ve intraselüler haberleşme ile nöron ölümüne sebep olan eksitotoksik mekanizma en kuvvetli muhtemel mekanizma olmakla birlikte, yine de nöron ölümü tam olarak aydınlatılamamıştır. Nöbetler, çoğu hipokampal nöronda c-fos (hücresel onkojenik gen) gibi bir erken genin ekspresyonuna sebep olur ve c-fos tekrarlayan şiddetli nöbetlerle, ölmek üzere olan bazı hipokampal nöronlarda gecikmeli olarak uyarılır. Bu son görüş, c-fos geni ekspresyonunun nöron ölümüne katkıda bulunabileceğini ileri sürmektedir (10,32).

2.2. Sinaptik Özellikler

Bir nöron ile bitişiğindeki nöron arasındaki bağlantıya sinaps denmektedir. Gray sinapsları ince yapı özelliklerine göre:

- Tip 1 (postsinaptik kalınlaşma presinaptik kalınlaşmadan fazla)
- Tip 2 (postsinaptik ve presinaptik kalınlaşmalar eşit) olmak üzere sınıflandırmıştır (33).

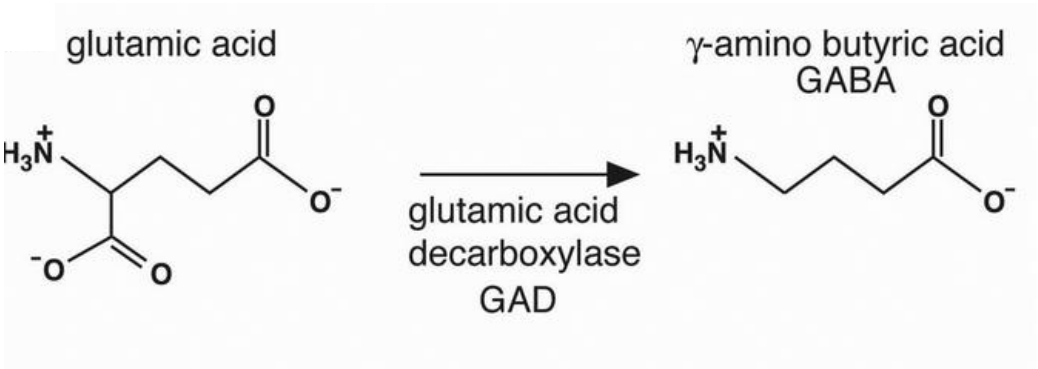
Colonnier, Gray'in tip 1 olarak adlandırdığı sinapları asimetrik, tip 2 olarak adlandırdıklarını da simetrik sinaps olarak tanımlamıştır (34). Tip 1 sinapsların eksitasyon, tip 2 sinapsların inhibisyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (35). İstirahat halinde nöron hücre içi negatif olmak üzere -70, -90 mV değerinde bir potansiyel farkına sahiptir. Bu potansiyeli yaratan faktörler hücre zarının Na^+, K^+ ve Cl^- gibi iyonlara olan farklı geçirgenliği, hücre içinde bulunan ve zardan geçemeyen negatif yüklü proteinler, diğer büyük iyonların varlığı ve özellikle membranda bulunan aktif Na^+ K^+ pompasıdır. Bu pompa + yüklü Na iyonlarının hücre dışına atılmasına neden olur. Hücre dışı pozitif, hücre içi negatif olmak üzere bir istirahat potansiyeli meydana gelir. Presinaptik membrandan salgılanan nörotransmitter postsinaptik zarın Na^+ geçirgenliğini artırıyorsa nöronda depolarizasyon meydana gelir. Hücre içi ve dışı arasında potansiyel farkı azalır ve meydana gelen uyarı nöron boyunca iletilir.

Bu nörotransmitterler eksitatör transmitterlerdir. En önemli eksitatör nörotransmitterler glutamat ve aspartattır.

Presinaptik membrandan salgılanan nörotransmitterler postsinaptik membran geçirgenliğini Cl^- iyonlarına karşı artırıyorsa, Cl^- iyonlarının nörona girmesi postsinaptik membranın istirahat potansiyelini artırarak yani hücreyi hiperpolarize ederek uyarılmasına engel olur. Bu nörotransmitterler inhibitör nörotransmitterler olup, en önemlileri γ-aminobutirik asit (GABA), glisin, noradrenalin, dopamin, serotonin ve taurindir. Ca^{++} iyonları presinaptik uçta bulunan nörotransmitterlerin sinaptik aralığa boşalmasına neden olur. Sinaptik aralığa boşalan nörotransmitterler postsinaptik membrandaki özel reseptörler ile birleşerek membranın Na^+, K^+, Cl^- iyonlarına karşı geçirgenliğini değiştirir ve inhibe veya eksite olmasına neden olur. İnhibisyon ve eksitasyon sonunda nöronun iki tarafında bozulan iyon dengesi membranda bulunan aktif Na^+ K^+ pompası ile yeniden sağlanır. Konvülsiyonlarda inhibitör ve eksitatör nörotransmitterler arasındaki denge bozulmaktadır.

2.3. GABA

Merkezi sinir sisteminde yüksek konsantrasyonda bulunan inhibitör nörotransmitterlerdendir. L-glutamik asitten glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi aracılığıyla sentezlenir (36).



Şekil 4. . Glutamik asitten GAD aracılığıyla GABA sentezlenmesi (Kaynak: Erik M. Jorgensen, Howard Hughes Medical Institute and Department of Biology, University of Utah, http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.pdf 23.08.3013).

Presinaptik nöronal zardan sinaptik aralığa salınan GABA, postsinaptik zarda inhibitör postsinaptik potansiyel (IPSP) adı verilen hiperpolarizasyon oluşturur (37). Presinaptik terminaldeki veziküler taşıyıcı proteinler (veziküler GABA taşıyıcı, VGAT) aracılığıyla veziküllerde depolanır. Sinaptik aktivasyon sonucu veziküler içerik sinaptik aralığa boşaltılır. GABA taşıyıcı proteinler (GAT-1, GAT-2, GAT-3, GAT-4) aracılığıyla sinaptik aralıktan uzaklaştırılır. İyon reseptörü ailesinden olan $GABA_A$ postsinaptik yerleşimli olup GABA ile uyarılınca Cl^- kanallarının açılmasına neden olur. Metabotropik reseptör ailesinden olan $GABA_B$, presinaptik ve/veya postsinaptik yerleşimli olup G proteini aracılı Ca^{+2} ve K^+ kanallarının açılmasına neden olur. Hipokampusta dentat girus (DG) granül hücrelerinden ve CA1, CA3 piramidal nöronlarından çıkan uyarılar inhibitör GABAerjik internöronlar tarafından kontrol edilirler.

GABA aracılı inhibisyonun bozulmasının prokonvulzan etki oluşturması epilepsinin hayvan modellerinde açıkça görülmüştür (38). GAD inhibitörü ile tedavi GABA sentezinin kısmen bloke edilmesi için yeterlidir; bu da normal habeş maymunlarında genetik olarak belirlenmiş epilepsi sendromlarını türetmiştir. Bu nedenle GABAerjik inhibisyonun genetik ya da kazanılmış anormalliği insanlarda görülen epilepsi sendromlarından herhangi birinin sebebi olabilir mi sorusunu doğal olarak düşündürmektedir.

2.4. Mossy Lifleri

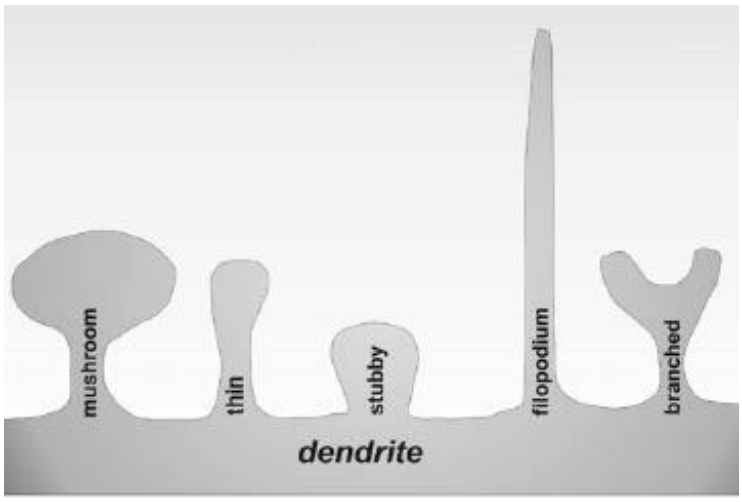
Mossy lif (ML) sistemi morfolojik olarak kompleks bir yapıdır. Yüksek ayırım güçlü mikroskopik gözlemlerde hipokampus dentat girusunun granül hücresi aksonlarını oluşturan ve CA3 piramidal nöronlarını ve hilusta bulunan CA4 mossy hücrelerini uyaran miyelinsiz mossy lifleri, çok büyük boyutlardaki terminalleri ortaya koyarlar. Bu büyük terminal genişlemeler ve bunların uzantıları çok sayıda sıkıca paketlenmiş, yuvarlak sinaptik veziküller içermektedirler. 150-200 nm çapındaki daha büyük veziküller ve merkezi elektron yoğun veziküller de az sayıda gözlenmektedir.
ML aksonları üç tipte terminal morfolojisi göstermektedir:

- Geniş mossy terminalleri (4-10 mikron)
- Filopodyal uzantı (0,5-2 mikron)
- Küçük *en passant* varikoziteler (0,5-2,0 mikron)

Her bir granül hücre aksonu CA3 bölgesinde 15 geniş mossy terminali verir ve her bir CA3 piramidal nöron 50 farklı mossy lif aksonundan uyarı alır (39). Bu da seyrek ama kuvvetli bağlantılar olduklarını gösterir. Bu şekilde piramidal hücrelerin dendritik uzantılarıyla (spine) çoklu asimetrik sinaps oluştururlar. Bu dendritik uzantılar büyük mossy terminalleri içine gömülü durumdadır. Büyük mossy terminalleri piramidal hücrelerin proksimal dendritlerinin gövdeleriyle punkta-adherens benzeri bağlantı yaparlar (39). Mossy terminallerinin filopodyal uzantıları Golgi yöntemiyle dentat girus içerisinde tanımlanmıştır. Sıçan hipokampusunda mossy terminallerinin, CA3 ve dentat girus bölgelerinde sıklıkla genişleyen (büllöz) sonlanmalar veren saç benzeri uzantılar (filopodya) oluşturdukları gözlenmiştir. Elektron mikroskopik gözlemler filopodyal uzantıların da sinaps oluşturduklarını ortaya koymuştur. Bu terminallerin de merkezi elektron yoğun vezikül barındırdıkları ve çoğunlukla tek bir sinaptik bağlantı oluşturdukları bildirilmiştir. Filopodyal uzantıların büyük mossy terminallerinde görülen punkta-adherens benzeri bağlantı oluşturmadığı bildirilmiştir (40). *En passant* terminaller mossy aksonları boyunca gözlenmektedir (41). Işık mikroskopik düzeyde bu terminaller ana aksonun fusiform kalınlaşması olarak gözlenmiştir. *En passant* terminallerin ince-yapısal görünümü de filopodyal sonlanmalara benzemektedir. Bu terminaller de merkezi elektron yoğun vezikül içermektedirler ve sinaps oluşturmaktadırlar. Ancak punkta-adherens benzeri sinaptik bağlantı oluşturmadıkları gözlenmiştir (40). Mossy lif terminallerindeki GABA immünreaktivitesi ile ilgili ilk ışık mikroskopi çalışmaları, sıçan hipokampusunun CA3 stratum lusidum tabakasında gözlenen GABA immünreaktivitesinin mossy lif terminallerinden kaynaklanıyor olduğunu düşündürmüştür. Mossy lif terminalerinin inhibitör terminallerden daha az GABA içerdikleri bildirilmiştir (42,43).

2.5. Dendritik Uzantılar

Beyinde birçok bölgede ana nöronlar dendritik uzantılarla çevrilidir (44). Bu dendritik uzantılar, nöronların eksitatör sinaptik iletilerinin ana yerleşim yerleridir, bir başka deyişle beyindeki iletide anahtar rol oynamaktadırlar. İlk olarak 1888'de Cajal tarafından tarif edilmiş olmasına rağmen hala günümüzde çok iyi anlaşıldıklarını söylemek mümkün değildir. Dendritik uzantıların dağılımı ve yapısı birçok hastalıkta bozulmaktadır (45). MSS'de baş ve boyun yapılarına göre farklı şekillerde dendritik uzantılar bulunmaktadır (Şekil 4).



Şekil 5. 1; Mantar benzeri şekil, 2; ince ve kısa, 3; kalın ve kısa, 4; ince ve uzun, 5; dallı dendritik uzantı örnekleri.
(Kaynak: Oliver von Bohlen und Halbach. Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. Ann Anat 2009; 191:518—531).

Nörotransmitter reseptörlerinin lokalizasyonu dendritik uzantıların baş bölgelerinde sınırlıdır, sinyal molekülleri, iyonlar da uygun sinaptik uyarıyı takiben yine baş bölgesinde konsantre edilmektedir. Dendritik uzantılar (DU) nadiren mitokondri içermekteyken ribozom, endozomal veziküller, düz endoplazmik retikulum (DER) gibi organeller içermektedir. DER kalsiyum kullanımında rol almaktadır. Dendritik uzantılar kalsiyum ve diğer sinyal komponentlerini

içermeleriyle sinaptik etkide dolayısıyla da nöronal plastisitede rol almaktadırlar. Erken postnatal gelişimde DU'ların büyüklük ve morfolojilerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir (46). Büyüklük ve şekillerindeki değişimler yapısal kapasitelerini de etkilemektedir. Hipoteze göre büyük başlı kalın uzantıların hafızadan, küçük başlı ince uzantıların öğrenmeden sorumlu olduğu düşünülmüştür. Büyüklük ve şekilden başka sayıları da önem arzetmiştir. Moser ve ark. 1994 yılında yaptıkları çalışmalarında öğrenme ile DU sayılarında artış tespit etmişlerdir. Epilepsi gibi nörolojik hastalıklarda DU şekillerinde değişiklik ve sayılarında azalma tespit edilmiştir (44).

2.6. Epilepsi

Epilepsi dünyada %1 prevelansa sahip olduğu öngörülen, yaygın ve ciddi nörolojik bir bozukluktur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2009 verileri dünyada yaklaşık 50 milyon epilepsili hasta olduğunu bildirmektedir. Epilepsi insidansının çocukluk çağında ve yaşlılıkta en yüksek düzeyde olduğu gözlemlenirken, erken erişkinlikte daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir (1,2). Fizyolojik olarak epileptik nöbet, paroksismal yüksek frekanslı veya senkronize düşük frekanslı, yüksek voltajlı elektriksel boşalımlar sonucu merkezi sinir sisteminin (MSS) bir parçası ya da tümünün önüne geçilemeyen aşırı aktivitesidir. Normalden fazla elektrik aktiviteye sahip bu hücre grubuna "epileptojenik odak" denir. Normal sinir dokusunda deşarjın komşu hücre gruplarına yayılmasını engelleyen kimyasal ve nöral inhibitör yollar, anormal güçlü olan epileptik deşarj karşısında etkisiz kalır (47,48). Bu nöronların niçin anormal deşarj yaptıkları sorusu hala tam olarak açıklanabilmiş değildir. Hipertermi, hipoksi, hipoglisemi, hiponatremi, hipomagnezemi, amonyak artışı, tekrarlayan duyusal stimülasyonlar bu nöronları aktifleyebilmektedir. Uykuda daha duyarlı oldukları (bu dönem nöronların hipersenkronize oldukları dönemdir) bilinmektedir (47,49). Konvülsiyonda, belirli bir nöron grubu çeşitli nedenlerden dolayı normalden daha fazla elektriksel aktivite göstermektedir. MSS'de nöronlar arasındaki ileti nörotransmitter denilen kimyasal iletici maddelerle olmaktadır.

Nörotransmitterlerin presinaptik uçtan salgılanması ile postsinaptik membranda inhibisyon ya da eksitasyon meydana gelmektedir.

Epilepsi nöbeti; beyindeki bir ya da birkaç grup sinir hücresinin aşırı deşarjına bağlı olarak ortaya çıkan ve klinikte geçici motor, duyusal, duyumsal, duygusal, bilişsel ve otonom, sıklıkla pozitif, bazen de negatif belirtilerle şekillenen bir durumdur.

Epilepsi hastalığı ya da kısaca, epilepsi, nöbetlerin tekrarlama eğiliminin bulunduğu kronik bir durumdur. Bu durum 3 ana grupta toplanabilir:

- İdiyopatik epilepsi
- Kriptojenik epilepsi
- Semptomatik epilepsi

İdiyopatik epilepsiler, mevcut araştırma yöntemleriyle altta yatan bir nedenin gösterilemediği durumlar olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda bu tür epilepsilerin kalıtımsal özellikte olduğu düşünülmektedir. Kriptojenik epilepsiler, idiyopatik epilepsilerin bilinen özelliklerine uymamaları nedeniyle semptomatik gibi görünen fakat mevcut araştırma yöntemlerinin gene de etiyolojik bir bilgi vermediği durumlardır. Semptomatik epilepsi tablosunda yineleyen epilepsi nöbetlerine yol açan yapısal ya da biyokimyasal bir neden vardır. Çok sayıdaki örnekler arasında başta tümör, abse gibi beyinde ilerleyici biçimde yer kaplayan süreçler, geçirilmiş travmalar ya da infeksiyonlar gibi sekel niteliğindeki beyin hastalıkları ve yine sıklıkla yavaş progresyon gösteren kalıtımsal metabolik ve/veya yapısal hastalıklar sayılabilir. Bu epilepsiler, genellikle çocukluk ya da adolesan yaşta başlar; yirmili yaşların ikinci yarısıyla birlikte bu olasılık giderek azalır.

Lokalizasyon özelliklerine göre epilepsiler:

- Parsiyel epilepsiler,
- Jeneralize epilepsiler olarak iki ana başlıkta toplanmaktadır.

‘Parsiyel nöbet’, bir hemisferdeki herhangi bir hücre topluluğunun aşırı deşarjı ile ilişkili olup başlangıç semptomları klinik veya elektroensefalografik olarak o bölgenin işlevsel özellikleri ile ilgilidir. Parsiyel nöbetler sırasında bilinç açık kalıyor ve nöbet sonradan anımsanıyorsa ‘basit parsiyel nöbet’, nöbet sırasında bilinç bulanıklığı

oluyor ya da nöbet sonradan anımsanmıyorsa ‘kompleks parsiyel nöbet’ adı verilir. Bir nöbet basit semptomla başlayıp kompleks semptomla sürebilir, fakat başlangıcı kompleks semptomlu ise basit semptomla devam etmez. Kompleks parsiyel nöbetlerde bilinç bulanıklığının nedeni epileptojenik deşarjların karşı hemisfere yayılmaları olup, bu sürecin limbik yapıların olaya katılımıyla oluştuğu düşünülmektedir. Klinik ve EEG’de, başlangıcından itibaren beynin iki tarafını da aynı anda etkileyen nöbetlere ‘primer jeneralize’ nöbet adı verilir. Bu tür nöbetlerin en yaygın tanınan örnekleri absans nöbetleri ve primer jeneralize tonik-klonik nöbetlerdir; jeneralize nöbetler tonik, klonik ve atonik biçimlerde de görülebilir. Özetle, epilepsi nöbetleri kısaca ‘parsiyel’ ve ‘jeneralize’ olmak üzere iki ana grupta toplanır. Bu özellikten yola çıkarak epilepsiler de lokalizasyonlarına göre ‘parsiyel epilepsiler’ ve ‘jeneralize epilepsiler’ olarak iki grupta, etiyolojik özelliklerine göre ise, ‘idiyopatik’, ‘kriptojenik’ ve ‘semptomatik’ olmak üzere 3 ana grupta toplanmaktadırlar.

2.6.1. Epilepsi fizyopatolojisi

Deneysel olarak oluşturulmuş epileptik nöbetlerde GABA’nın %50-60 oranında azaldığı, GABAerjik inhibitör sinapsların fonksiyon kaybının epileptik odağı oluşturduğu düşünülmüştür. GABA’nın iki mekanizma ile nöbetten sorumlu olabileceği düşünülmektedir (47,50). Birincisi sinapslardaki GABA konsantrasyonu düşünce nöronal inhibisyonda azalma olacaktır. İkincisi GABA’nın konsantrasyonu normal olabilir, ancak mevcut GABA kullanılamamaktadır.

İkincisini destekleyen bir çalışma Walton tarafından yapılmıştır (50). Lityum ve pilokarpin enjeksiyonu ile status epileptikus oluşturulmuş olan bu çalışmada beyinde eksitatör aminositlerin konsantrasyonlarının düşmüş olduğu, buna karşın GABA konsantrasyonunun ise beklenmedik bir şekilde özellikle nöbetin şiddetlendiği dönemde artmış olduğu, nöbetin başlangıcında da düşmüş olduğu saptanmıştır. Ayrıca Chapman ve ark. bikukilin ile oluşturdukları epileptik nöbetlerde de benzer sonuçlar elde etmişlerdir (47,51). Nöroaktif aminoasitlerin konsantrasyonunun

düşmüş olabileceği beklenen bir sonuçtur (47,52). Ancak GABA miktarındaki artışı açıklamak güçtür. Buna, araştırmacılar sinaptik bölgede GABA'nın geri-alımındaki bir bozukluk veya metabolize olamaması nedeniyle GABA düzeyinin artmış olabileceğine ilişkin açıklama getirmişlerdir. GABA sentezi var, ancak kullanılamamaktadır. Epileptik nöbetlerde en fazla etkilenen nöronlar GABA'erjik nöronlardır. Biyojenik aminlerin de epileptik nöbetlerin patogenezinde önemli olduğu, katekolaminlerin antikonvülzan etki gösterdiği bilinmektedir. Alfa, beta adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesi nöbet eşiğini düşürmektedir. Siklik nükleotidlerden siklik adenozin mono fosfat (cAMP) artışının nöbetleri önlediği, siklik guanozin mono fosfat (cGMP) artışının nöbetleri başlattığı, adenozin ve biyojenik aminlerin ise MSS'de cAMP düzeyini yükselterek inhibitör etki gösterdikleri bilinmektedir. ACh ise guanil siklazı aktive ederek veya Na^+ K^+ geçişini etkileyerek depolarizasyon oluşturmaktadır (47,49).

Na^+ K^+ pompasının hücre içi Na^+ ve Ca^{++} miktarını düzenlediği bilinmektedir. Hücre içi Ca^{++} miktarı artışı ise nörotransmiter salınımı ve sinaptik iletiyi bozmaktadır. Hücre içi Ca^{++} artışı hücre hasarının en önemli göstergesidir. Nitekim epileptik nöbetlerin oluşumunda beynin en önemli pacemaker merkezi kabul edilen hipokampus CA3 piramidal hücrelerinde sınırlı Ca^{++} artışının NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörlerinin aktivasyonuna neden olduğu ve Mg'nin de bu reseptörler üzerinde Ca^{++} geçişini modüle ettiği de çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir (47,53).

Tetik çeken nedenler ne olursa olsun, epileptik nöronun fizyolojik özelliği şudur: Nöronlarda ''Paroksismal depolarizasyon şifti (PDS)'' oluşmaktadır. PDS eksitan bir postsinaptik potansiyele (EPSP) benzer. Ancak EPSP'ye göre çok daha geniş amplitüdlüdür. PDS'nin bir başka özelliği ise oluşumunda çok hızlı ve pek çok sayıda aksiyon potansiyeli yaratmasıdır. Bu nöronlarda normal EPSP geliştikten sonra PDS gelişir. PDS muhtemelen fokus içindeki nöronlar arası eksitan bir feed-back sonucudur ve tüm nöronun somatodendritik bölgesini kaplar. PDS nöbet öncesi oluşur. PDS'nin yarattığı ardışık yüksek frekanslı impuls dizileri bir nörondan diğerine yayılır ve böylece epileptik nöbet veya spike (diken) aktivitesi oluşur (47, 54,55). PDS'den sonra hiperpolarizasyon dönemi ise abartılmış inhibe edici

postsinaptik potansiyele (IPSP) benzer. Sağlıklı bir GABA'erjik sistem bu mekanizmanın daha etkin şekilde çalışmasını, IPSP'ler arasında oluşan toplu depolarizasyonların daha güçlü olmasını sağlar. Eksitatör aminoasitlerin ise kortikal aktiviteyi daha da şiddetlendirdiği, böylece diken-dalga potansiyellerinin gücünü ve devamlılığını sağladığı anlaşılmaktadır. Jeneralize nöbetler ise diken-dalga boşalımlarının yavaş dalga komponentinin inhibisyonu söz konusu olduğunda ortaya çıkar. Bu inhibisyonda ise, derin yerleşik hücrelerin ve bağlantı sistemlerinin bilateral yayılmasınında rol oynadıkları düşünülmektedir. Glutamat-aspartat eksitasyonu ve GABA inhibisyonu diken dalga boşalımlarının stabil hale geçmesini sağlar. GABAerjik inhibisyonun kırılması ile nonkonvülzif primer jeneralizeden (petit-mal) grand mal'e geçiş oluşabilmektedir. Bu sonuç Walton ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada görülen nöbetin başlangıcında GABA eksikliği ve nöbetin şiddetlendiği dönemde GABA artışının olası sebebini açıklayabilir (47,50). Epileptik nöbetlerin oluşumunda GABA'nın farklı bir açıdan önemini ortaya koyan Bonnet ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, çeşitli epileptik ajanların epileptojenik eşik konsantrasyonlarında hipokampus CA3 nöronlarının GABA yanıtları araştırılmıştır (47,56). Bu çalışmada deneysel nöbet oluşturan pentilentetrazol, bikukulin metiodid, penisilin, kafein gibi maddelerin nöbet oluşturabilecek eşik konsantrasyonlarının GABA'erjik IPSP'yi değiştirmek için gerekli konsantrasyonlar olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu deneyden elde edilmiş olan sonuçlar;

a) GABA antagonisti olan pentilentetrazol ve bikukulin metiodidin düşük konsantrasyonlarında epileptik aktiviteyi uyandırabilecek konsantrasyon GABA'erjik IPSP'yi değiştirmemiştir.

b) BMI ile oluşturulan epileptik paroksismal depolarizasyon, organik Ca^{++} antagonisti verapamil tarafından bloklanmıştır. Burada, verapamilin sinaptik transmisyonu engellemediğini açıklamak gerekir.

Bu bilgilerin ışığında; halen çalışılmamış olsa da, farklı epileptik maddelerin hipokampusta farklı bölgeleri etkilemesi açısından nöronlardaki GABA reseptörlerinin önemine dikkat çekilebilir. Konvülzif ilaçların epileptojenik etkisinde GABA antagonistik özellikleri yanında, intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonunu

değiştirerek epileptik aktiviteye neden olabilecekleri düşünülebilir. Epileptik aktivite oluşumundan, anlaşılacağı üzere tek bir neden sorumlu tutulamaz. Birçok presipitan faktör söz konusudur. Ancak GABA eksikliğinin sebep olduğu konusunda artık daha toleranslı düşünüp, aksine GABA'erjik sistemin diken-dalga boşalımlarının güçlenmesi için zemin hazırladığı sanılmaktadır. GABA'erjik sistemin çalışması, eksitatör aminoasitlerin oluşturacakları depolarizasyonların uzaysal ve temporal sumasyonu için gerekli zamanın sağlanması ve diken-dalga boşalımlarının daha da güçlenmesini sağlamaktadır. Ancak, çeşitli nedenlerle, belki de GABAerjik sinapsların haraplanması ve mevcut GABA'nın kullanılamaması nedeniyle GABA inhibisyonunun kırılması üzerine jeneralize nöbetler oluşabilmektedir. Bu arada bir takım faktörler nedeniyle hücre içi Ca^{++} miktarı artışı gözardı edilmemelidir.

2.6.2. Absans epilepsi

Klinik bilgiler ve EEG değişikliklerine göre jeneralize nöbet çeşidi olan absans nöbetleri, EEG'ye bilateral senkronize diken-dalga deşarjlarıyla yansıyan, bilincin paroksismal ani kaybı ve geri gelmesi olarak tanımlanabilir. Ortaya çıkış zamanı açısından genellikle 4 yaş ve adolesan çağı arasında gözlenir (57). Jeneralize absans nöbetleri yalnızca etosüksimid, trimetadion, valproik asit ya da benzodiazepinlere yanıt verirler; fenitoin, barbitüratlar ya da karbamezepine dirençlidirler veya bu ilaçlarla artış gösterirler (58). 1947'de Jasper ve Droogleever-Fortuyn, kedilerde talamusun orta hat ve intralaminar çekirdeklerinin 3 siklus/sn frekansında elektriksel uyarılmasıyla kortikal EEG'de bilateral senkronize diken-dalga deşarjları oluştuğunu gözlemişlerdir. 1953'te Williams absans epilepsili bir çocuktan aldığı derinlik elektrodu kayıtlarında, bilateral senkronize diken-dalga deşarjlarının talamustan kaynaklandığını gözlemiştir (59). GAERS (60) ve WAG/Rij (61) sıçan suşları ise jeneralize absans epilepsinin genetik hayvan modellerini oluşturmaktadırlar.

2.6.3. Genetik Absans Epilepsili Sıçanlar - Strasbourg (GAERS)

1982 yılında Vergnes ve Marescaux, herhangi bir lezyonu olmayan kontrol Wistar sıçanların %30'unun EEG'sinde tüm kortekste bilateral senkronize spontan diken-dalga deşarjlarına rastladılar (62). Kendi içlerinde çiftleştirerek ürettikleri bu suşu "Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS)" olarak adlandırdılar. Diken-dalga deşarjı kompleksleri uyanıklık ya da yavaş dalga uykusu ve uyanıklık arasındaki dönem esnasında, 8-10 siklus/sn frekansında ve saniyeler süren patlamalar şeklinde görülmektedir (63). Bu deşarjlar hayvanlar uyanıkken hareketsiz halde olduklarında ortaya çıkmaktadır ve bir noktaya devamlı bakma, bıyıkların devamlı titremesi, yüz kaslarının kasılması şeklinde davranışsal aktiviteyi etkilemektedir. Boyundaki kas tonusunun bazen azaldığı gözlenebilir; bu da başın yavaşça ve hafifçe düşmesine neden olur. Deşarjın sona ermesini başın ani ekstansiyonu izler. Bazı durumlarda deşarjlar sıçan hareket halindeyken de ortaya çıkabilir; bu durumda hareket aniden durur ve deşarjlar sona erdiğinde hareket olduğu yerden devam eder (60,64-66). Diken-dalga deşarjları esnasında hafif duyusal uyarılara yanıt ortadan kalkar ancak güçlü ve beklenmedik uyarılarla deşarjlar ortadan kalkar (67). Vergnes ve ark. bu deşarjlarda ventrolateral talamik çekirdeğin rol oynadığını bulmuşlardır. Talamik aktivitenin kortikal deşarjlarla eşzamanlı ve hatta bazen de bu deşarjlardan daha önce olduğu gözlenmiştir (68). İnsanda petit-mal epilepside etkili olan ilaçlar bu hayvanlarda da etkilidir. Jeneralize tonik-klonik ya da parsiyel nöbetlerde kullanılan fenitoin ve karbamezepin gibi ilaçlar ise bu sıçanlarda etkili değildir ya da nöbetleri artırmaktadır (60). GABA mimetiklerin GAERS sıçanlarının nöbetlerini artırdığı ve epileptik olmayan kontrol sıçanlarda spontan diken-dalga deşarjlarına neden olduğu gözlenmiştir (69).

2.6.4. GAERS ve hipokampus

Absans epilepside kabul edilen mekanizma talamo-kortiko-talamik döngüdeki aşırı GABAerjik etkileşim olmakla birlikte, yakın zamanda yapılan çalışmalarda hipokampustaki nöronal ağa dikkat çekilmiştir. Diken-dalga deşarjlarının talamus ve korteksten kaynaklandığı gösterilmiş olsa da, absans epilepsinin altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar kendilerini hipokampus gibi beynin diğer bölgelerinde de gösterebilmektedirler. Absans epilepsi modellerinde limbik yapıların fonksiyonunun da değişime uğradığı kanıtlanmıştır. Nehlig ve ark. erişkin ve immatür GAERS'te hipokampusu da içine alan limbik yapılarda enerji metabolizmasının ve metabolik aktivitenin arttığını bulmuşlardır (70,71). İmmatür GAERS'lerde diken-dalga deşarjlarının ortaya çıkmasından önce, hipokampusu ve DG'yi de içine alan başlıca limbik sisteme ait olan bölgelerde serebral glukoz kullanımının arttığı gösterilmiştir (70). Bir başka çalışmada hipokampusta mikrodiyaliz yöntemiyle ölçülen hücre dışı glutamatın bazal seviyelerinin GAERS'te epileptik olmayan kontrollere göre önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (72).

2.6.5. GAERS ve konvülzif nöbetler

GABAerjik inhibitör nöro-iletinin diken-dalga deşarjlarının patogenezinde kritik rol oynadığı ve GABA agonistleriyle GABAerjik inhibisyonun beyinde jeneralize absans epilepsinin klinik ve deneysel formlarını ağırlaştırdığı gösterilmiştir (73,74). Nonkonvülzif jeneralize absans nöbetleri konvülzif nöbetlerden farklı nöronal mekanizmalar göstermektedirler (75). Absans epilepsi nöbetlerinde kullanılan ilaçlar konvülzif nöbetlerde etkili değildir; antikonvülzan tedavi absans nöbetlerini etkilemez ve bu iktal durumları deneysel modellerde ve insanlarda ağırlaştırmaktadır (59,74,76,77). Nonkonvülzif nöbetlerin aksine, spontan rekürran jeneralize konvülzif nöbetlerin patogenezinde glutamat ile yönlendirilen eksitatör sinaptik mekanizmalar rol oynamaktadır (78). Aynı hastada idiyopatik jeneralize

absans ve parsiyel TLE seyrek görülmektedir (3,4) ve bunun nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Eşkazan ve ark. çalışmalarında Wistar kontrollerin 5. derece nöbet geçirmelerine rağmen, GAERS'in ancak 2. derece nöbet geçirdiğini gözlemişlerdir (5). Absans epilepsili sıçanlarda limbik fokal nöbetin motor nöbete dönüşmesinde zıt mekanizmaların işliyor olabileceği, absans epilepsi ile sekonder jeneralize konvülzyonların altta yatan patofizyolojik mekanizmalarının farklı olabileceği ve jeneralize absans nöbetlerinin mekanizmalarının limbik nöbetlerin sekonder jeneralizasyonuna direncin sorumlusu olabileceği öne sürülmüştür. Epilepsinin idiyopatik ve edinsel formları genellikle GABAerjik inhibisyondaki değişikliklerle ilişkilidir ve bu da epileptojenik ajanlara duyarlılığın artmasıyla sonuçlanır. Sesle uyarılan jeneralize klonik-tonik konvülzyon modeli olan genetik olarak epilepsiye eğilimli sıçanlarda çeşitli konvülzanlarla nöbete duyarlılığın arttığı (79-81) ve inferior kollikulusta $GABA_A$ reseptörü ile yönlendirilen inhibisyonun odiyojenik nöbet duyarlılığında rolü olduğu (82) bildirilmiştir. Nonepileptik sıçanlarda düşük doz pentilentetrazol diken dalga deşarjlarını uyarmaktadır ve absans nöbetlerinin farmakolojik modeli olduğu düşünülmektedir. Pentilentetrazolün subkonvülzan dozlarının injeksiyonu kimyasal kindling oluşturur ve bu da $GABA_A$ reseptör antagonistleriyle uyarılan konvülzyonlara artmış duyarlılıkla ilişkilidir (83). Ayrıca intrakortikal GABAerjik sistemin etkinliğindeki küçük bir azalmanın ilerleyen senkronize deşarjlara yol açabileceği gösterilmiş ve bunun da epileptogeneze duyarlılıkta rol oynayabileceği öne sürülmüştür (84,85). Diken-dalga deşarjlarının altında yatan bozukluk, özellikle GABA fonksiyonundaki ve/veya kortikal eksitabilitedeki olası bir değişiklik, çeşitli konvülzanlara olan nöbet duyarlılığını değiştirebilir (86). Önceki çalışmalar GAERS'in kontrol sıçanlara kıyasla kortikal GABA yoksunluğu ile uyarılan fokal nöbetlere ve Pentilentetrazol ile uyarılan jeneralize nöbetlere daha duyarlı olduğunu göstermiştir (87). Bu nedenle, Vergnes ve ark. GAERS'te konvülzanlara olan seçici duyarlılığın absans epilepsinin patogenezi hakkında bilgi sağlayabileceğinden yola çıkarak, çeşitli konvülzan maddelerle GAERS ve kontrol sıçanların nöbete olan duyarlılığını incelemişlerdir (86). Absans nöbetleri kortikal eksitabilitedeki aşırılıkla ilişkilidir (88). Ancak, talamokortikal absans

nöbetleri artmış GABAerjik ileti ile artar (66) ve inhibitör GABA sisteminin nöbetleri olarak düşünülmektedir (88-90). Kortekste başlayan nöbetlere duyarlılıkta artış ve/veya GABAerjik iletiyle etkileşen ilaçlara aberan duyarlılık GAERS'te spontan diken-dalga deşarjlarının oluşmasında rolü olan olası anormalliklere işaret edebilir. Eksitasyon/inhibisyon arasındaki gelişimsel bir dengesizliğin diken-dalga deşarjlarının oluşumuyla paralellik gösterebileceği öne sürülmüştür.

2.6.6. Kindling

Kompleks parsiyal epilepsinin önemli bir modeli de "kindling" denilen "tutuşma" modelidir (91). Sıçanda amigdalanın ve hipokampusun uyarılmasıyla oluşturulan kindling nöbetlerinin 1. ve 2. safhalarında görülen davranış biçimi insanda temporal lobdan kaynaklanan kompleks parsiyel nöbetlerdekiyle tıpatıp aynıdır. Kindling amigdala nöbetlerinde amigdala ve hipokampus bölgelerinden alınan EEG bulgularının şekli insanda kompleks nöbetler esnasında kaydedilene benzemektedir. Her iki olayın farmakolojileri de benzerdir. Fenobarbital, karbamazepin, valproat ve diazepam, davranışı etkilemeyecek dozlarda bile amigdala kaynaklı tutuşma nöbetlerini baskılamaktadır. Ancak, insanda petit mal epilepsiye karşı kullanılan etosüksimid kindling modelinde etkisizdir.

Kindling uygulanan beyinde çeşitli değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Bunların bir kısmı sıralanacak olursa (92-94) :

1. Kindling uygulanan beyinde, beyin fonksiyonları değiştiğinde meydana gelen bir protein olan c-fos aktivasyonuna rastlanır.
2. Eksitatör sinaptik bağlantılar daha güçlü hale gelir.
3. GABA, noradrenalin, tirotropin-serbestleyici hormon (TRH), adenozin sistemlerinin tutuşmayı baskılayıcı etki gösterdikleri bildirilmiştir.
4. Kindling durumunda nöronlara klorür girişi azalmaktadır.
5. Kindling modelinde nitrik oksitin hem prokonvulsan hem de antikonvulsan gibi davrandığını gösteren çelişkili sonuçlar vardır (95).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada erkek, 6 aylık (250-350 gr) epileptik olmayan Wistar ve GAERS suşu sıçanlar kullanıldı. Tüm hayvanlar standart laboratuvar koşullarında, 12/12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde, yiyecek ve içecek alımları serbest olacak şekilde barındırıldı. Hayvanlar, stereotaksik cerrahi işlemlerin ardından her kafeste bir hayvan olacak şekilde tutuldu. Deney grupları aşağıdaki şekilde planlandı:

- Yalancı-opere Wistar grubu (n= 4)
- Yalancı-opere GAERS grubu (n= 4)
- Kindling uyarısı almış Wistar grubu (n= 4)
- Kindling uyarısı almış GAERS grubu (n= 4)

Çalışmamız Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu tarafından değerlendirilip onaylandı (57.2012.mar).

3.1. Stereotaksik Cerrahi

Hayvanların EEG kayıtları, stereotaksik cerrahi ve kindling uygulamaları Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Farmakoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Cerrahi işlemler sırasında kindling gruplarındaki tüm hayvanlara ketamin (100 mg/kg-i.p.) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg-i.p.) anestezisi altında, stereotaksi aleti yardımıyla koordinatları Paxinos ve Watson (1998) atlasına uygun olarak bazolateral amigdalaya uyarı/kayıt elektrodu, kortekse kayıt elektrotları yerleştirildi. Elektrot ve kılavuz kanüller yerleştirildikten sonra dental akrilik yardımıyla kafatasına sabitlenerek sıçanlar 10 gün süreyle iyileşme periyoduna bırakıldı.

Elektrot ve kanül koordinatları şu şekildedir:

EEG kaydı için; AP 2.0 mm, L 3.5 mm (frontal bölge), AP -6.0, L 2.0 mm (parieto-oksipital bölge) ve referans elektrodu serebellum üzerinde olacak şekilde tripolar kayıt elektrodu yerleştirildi. Kindling için; bipolar uyarı/kayıt elektrotları bazolateral amigdalaya (AP -2.6 mm, L 4.8 mm, V -8.5 mm) yerleştirildi.

3.2. Kindling

Stereotaksik cerrahiden sonraki 10 günlük iyileşme döneminin ardından bazal diken-dalga deşarjlarının sayı ve sürelerini belirlemek amacı ile 3 saatlik EEG kaydı alındı. Bazal EEG kayıtlarının ardından, bazolateral amigdalada ard-deşarj eşiğini tespit etmek amacıyla başlangıçta 50 µA (80 Hz, 1 msn kare dalgalar, toplam süre 2 sn) olarak uyarı verildi ve ilk ard-deşarj görülene dek 25 µA'lik arttırmalarla devam edildi. Her hayvan için tespit edilen ard-deşarj eşiğindeki uyarı şiddetiyle, günde 2 kez (sabah ve akşamüzeri) uyarı verildi. Kindling uyarıları ile tetiklenen nöbetler Racine'in standart 5 aşamalı (Racine, 1972) nöbet skalası ile değerlendirildi. Tüm hayvanların evre 2 nöbette kalmasını sağlamak amacı ile ard-deşarj eşiğindeki uyarı şiddetiyle toplam 6 kez elektriksel uyarı verildi. Son uyarıdan 1 saat sonra hayvanlara derin anestezi altında perfüzyon işlemi uygulandı.

3.3. Geçirimli Elektron Mikroskopi

Perfüzyon fiksasyonu ve dekapitasyon işlemi için sıçanlara i.p. ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) ile derin anestezi uygulandı. Derin anestezi durumu kornea ve pençe refleksleriyle doğrulandıktan sonra göğüs kafesi açılarak ve aortadan perfüzyon pompası yardımıyla 50 ml/dk hızında perfüzyon işlemi yapıldı. Hayvanlar önce 6-7 ml heparin (1000 Ü/ml, pH 7.3, 0.1 M HEPES tamponu içinde) ve daha sonra da aralıksız olarak 300 ml pH 7.3, 0.1 M HEPES tamponu içinde %2.5 gluteraldehit, %0.5 paraformaldehit, %0.1 pikrik asit içeren fiksatif ile perfüze edildi. Perfüzyonu tamamlanan sıçanlar dekapite edildi. Beyinler çıkarıldıktan sonra aynı fiksatif içinde $4^{o}C$'de gece boyunca tutularak post-fiksasyon işlemi yapıldı.

Fiksasyondan 24 saat sonra beyinler 0.1 M HEPES tamponunda (pH 7.3) yıkanarak vibratomda (Leica VT1000S) 300 µm kalınlığında kesitler alındı. CA3 bölgeleri stereomikroskop altında çıkarılarak %1 osmium tetroksit/%1.5 potasyum ferrisiyanid (distile suda 1:1 oranında) içinde 30 dakika post-fiksasyona alındı. Kesitler %0.5 uranil asetat ile 30 dakika oda ısısında ve karanlıkta boyama işlemine

alındı ve daha sonra yükselen alkol serileri ve propilen oksit ile dehidrate edildi. Gece boyunca 1:1 oranında propilen oksit/epon karışımında bekletilen dokular ertesi gün 3 saat saf eponda tutulduktan sonra Epon 812'ye gömüldü. 24 saat boyunca 60^{o}C'lik etüvde polimerizasyon işlemi yapıldı. Doku bloklarından Leica Ultracut R ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı-ince kesitler alındı. Toluidin mavisi ile boyanan yarı-ince kesitlerde uygun alan belirlendikten sonra bu alandan alınan 100 nm kalınlığındaki ince kesitler Coat-Quick 'G' pen ile kaplanmış 200 mesh nikel gridler üzerine alındı ve 3-4 saat kurumaya bırakıldı. Kesitler anti-GABA antikoruyla inkübe edildi.

3.4. GABA immün-altın immünsitokimyası

İnce kesitleri içeren gridler TBST (%0.1 Triton X-100, %0.9 sodyum klorür, 0.05 M Tris tamponu, pH 7.6) tamponunda yıkandıktan sonra oda ısısında ve nemli ortamda primer antikor (anti-GABA, Sigma kod:A2052) ile inkübe edildi. Anti-GABA antikoru TBST pH 7.6'da 1:20000 oranında sulandırılarak kullanıldı. Daha sonra kesitler sırasıyla pH 7.6 ve pH 8.2 TBST tamponunda yıkandı ve 10 nm altın partiküllerine bağlı keçi anti-tavşan IgG antikorunda (Sigma kod:G7402), pH 8.2 TBST içinde 1:50 oranında sulandırılmış) 90 dakika inkübe edildi. TBST pH 7.6 ve sonrasında distile suda yıkanan kesitler kurumaya bırakıldı. Uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama yapıldıktan sonra geçirimli elektron mikroskobu (JEOL 1200 EXII) ile inceleme yapıldı. Hipokampus CA3 bölgesi mossy lif terminalleri GABA immün-altın yoğunlukları açısından niceliksel olarak değerlendirildi.

Negatif kontroller için primer antikor basamağı atlanarak kesitler bunun yerine gece boyunca TBST pH 7.6'da bekletildi.

3.5. Analiz yöntemi

Alınan ince kesitlerde CA3 stratum lusidum bölgesinde asimetrik sinaps özelliği gösteren ML terminalleri belirlendi. Her hayvandan 10 adet ML terminali mikrografı çekildi. Mikrograflar GABA immun-altın yoğunlukları açısından NIH Image Analysis (Image J) programı ile niceliksel olarak değerlendirildi. İmmunsitokimyasal niceliksel değerlendirme için terminal alanı hesaplandı ve presinaptik ML terminallerindeki 10 nm büyüklüğündeki altın partikülleri sayıldı. Altın partikül sayısının MT alanına bölünmesiyle GABA yoğunluğu hesaplandı. Arka-plan işaretlenmeleri devre dışı bırakmak için her gridde 3 adet damar lümeninin içindeki altın partikülleri sayılarak GABA yoğunluğu hesaplandı. Damar GABA yoğunluğu herbir MT GABA yoğunluğundan çıkartılarak net GABA yoğunluğu elde edildi. Mitokondriyal, veziküler ve sitoplazmik GABA yoğunlukları ayrı ayrı hesaplandı. Her bir terminaldeki toplam mitokondri alanı MT alanına oranlandı. Benzer şekilde, her bir terminalin asimetrik tipte sinaps yaptığı toplam dendritik uzantı (spine) alanı hesaplandı ve MT alanına oranlandı. Sonuçlar “One-way ANOVA” ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri ile değerlendirilip karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama±S.E.M. olarak ifade edildi ve anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

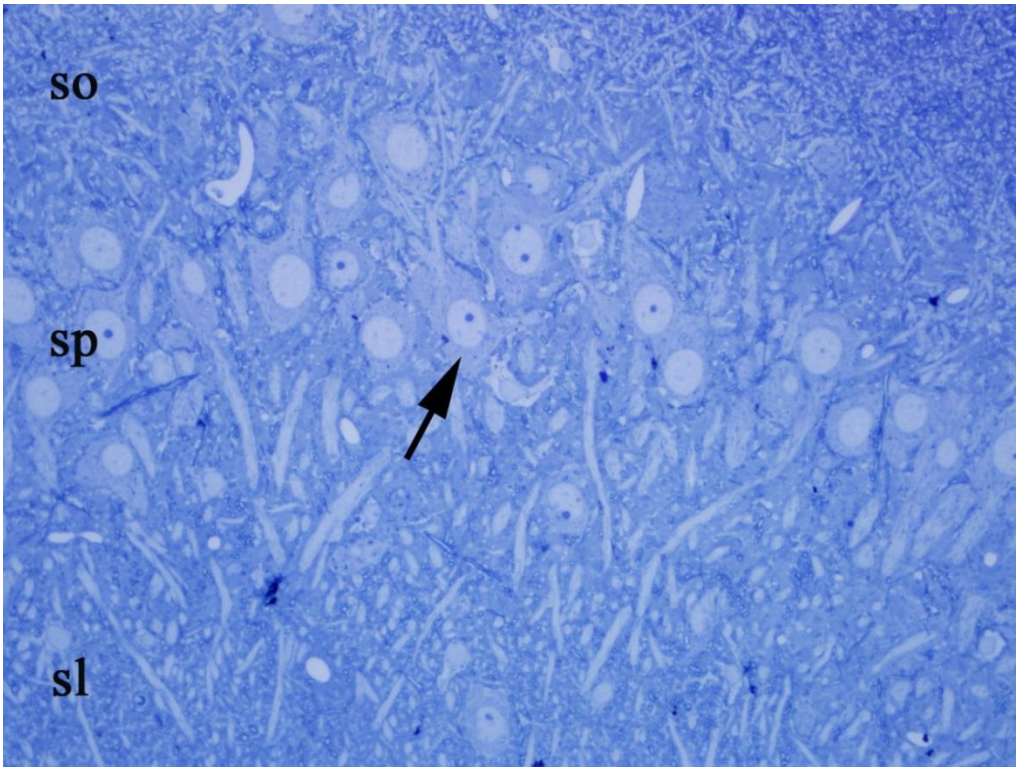
4. BULGULAR

4.1. Işık mikroskopi bulguları

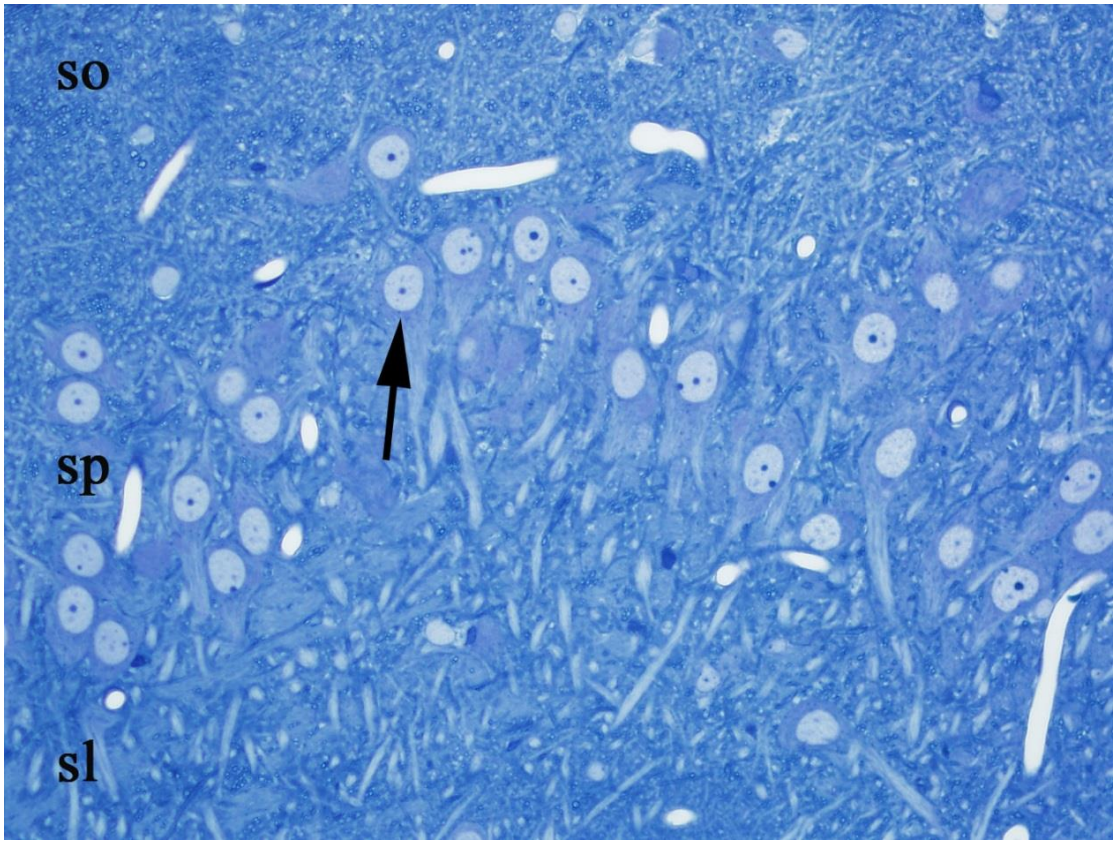
Çalışmamızda yalancı-opere Wistar, kindling Wistar, yalancı-opere GAERS ve kindling GAERS gruplarının hipokampus CA3 bölgesinden alınan 1 µm kalınlığındaki toluidin mavisi ile boyanmış kesitler genel morfoloji açısından değerlendirildi.

4.1.1. Yalancı-opere Wistar ve GAERS grupları

Yalancı-opere Wistar (Resim 1) ve yalancı-opere GAERS (Resim 2) gruplarında CA3 bölgesi piramidal nöronları normal yapıda izlendi. Nöron sitoplazması ve çekirdeği gibi yapıların bütünlüklerini koruduğu gözlendi. Nöron hasarına ilişkin bulguya rastlanmadı. Her iki grupta da Ammon boynuzu genel morfolojisini ve bütünlüğünü korumaktaydı. Kalitatif olarak nöron kaybı izlenmedi.



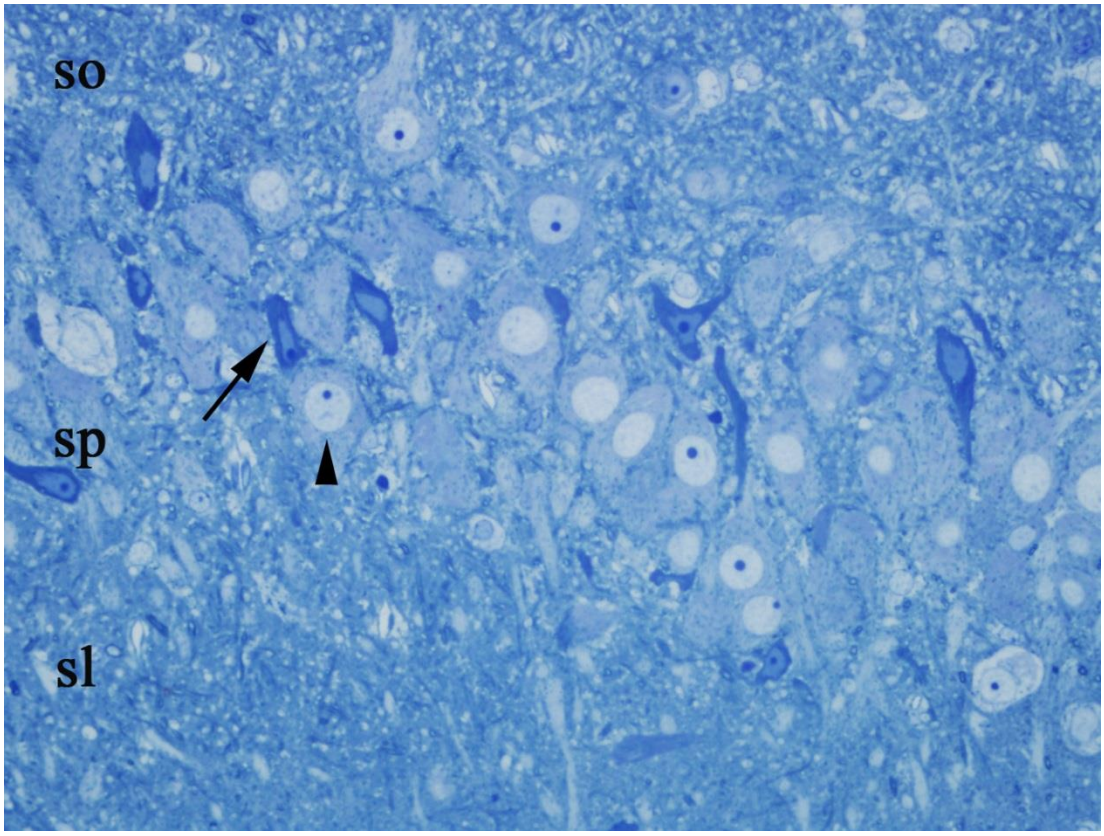
Resim 1. Yalancı-opere Wistar sıçan hipokampusunda CA3 bölgesindeki büyük piramidal hücre gövdeleri (ok). so: Stratum oriens, sp: Stratum piramidale, sl: Stratum lusidum. Toluidin mavisi (x400).



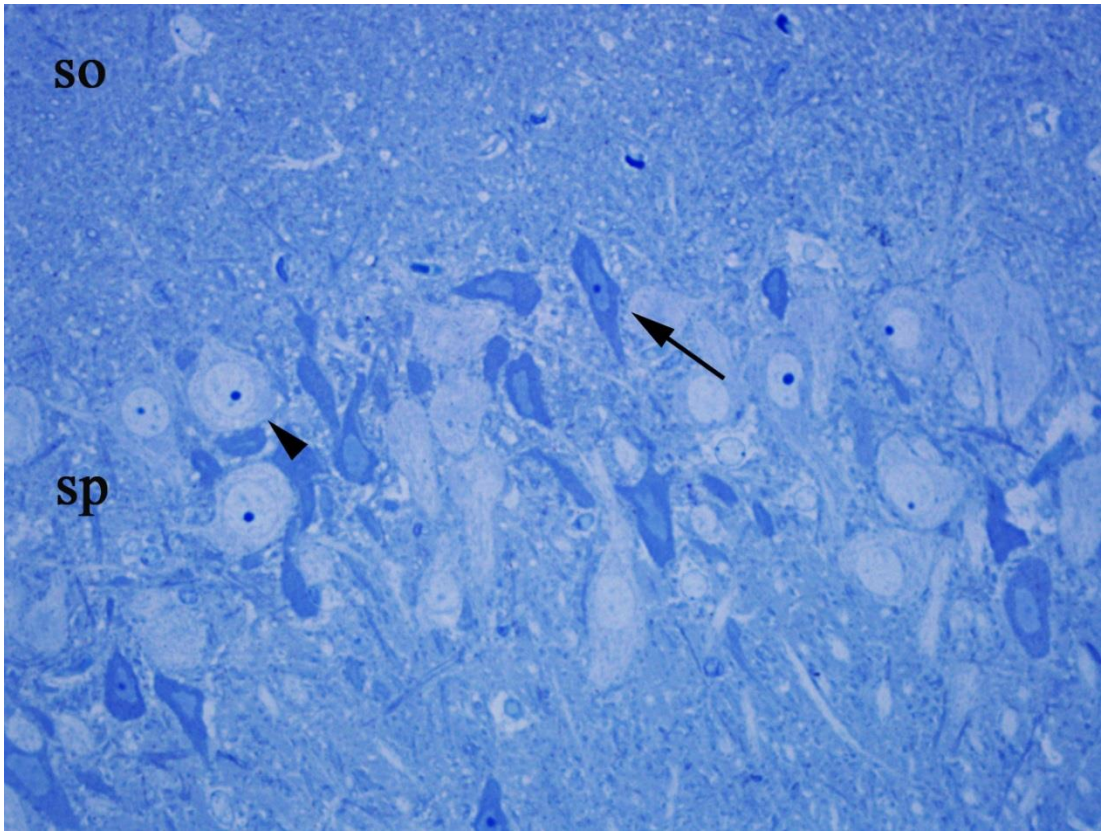
Resim 2. Yalancı-opere GAERS sıçan hipokampusu CA3 bölgesindeki büyük piramidal hücre gövdeleri (ok). so: Stratum oriens, sp: Stratum piramidale, sl: Stratum lusidum. Toluidin mavisi (x400).

4.1.2. Kindling Wistar ve GAERS grupları

Kindling Wistar (Resim 3) ve kindling GAERS (Resim 4) gruplarında hipokampus CA3 bölgesi genel morfolojisini korumaktaydı. Niteliksel incelemede nöron kaybı gözlenmedi; ancak koyu renkli nekrotik nöronlar görüldü.



Resim 3. Kindling uygulanmış Wistar sıçan hipokampusu CA3 bölgesinde sitoplazmik ve nükleus yapısı bozulmuş koyu renkli piramidal hücre gövdesi (ok). Ok başı: Normal morfolojik yapıda piramidal hücre gövdeleri so: Stratum oriens, sp: Stratum piramidale, sl: Stratum lusidum. Toluidin mavisi (x400).



Resim 4. Kindling uygulanmış GAERS sıçan hipokampusu CA3 bölgesinde sitoplazmik ve nükleus yapısı bozulmuş koyu renkli piramidal hücre gövdeleri (ok). Ok başı: Normal morfolojik yapıda piramidal hücre gövdeleri. so: Stratum oriens, sp: Stratum piramidale. Toluidin mavisi (x400).

4.2. Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları

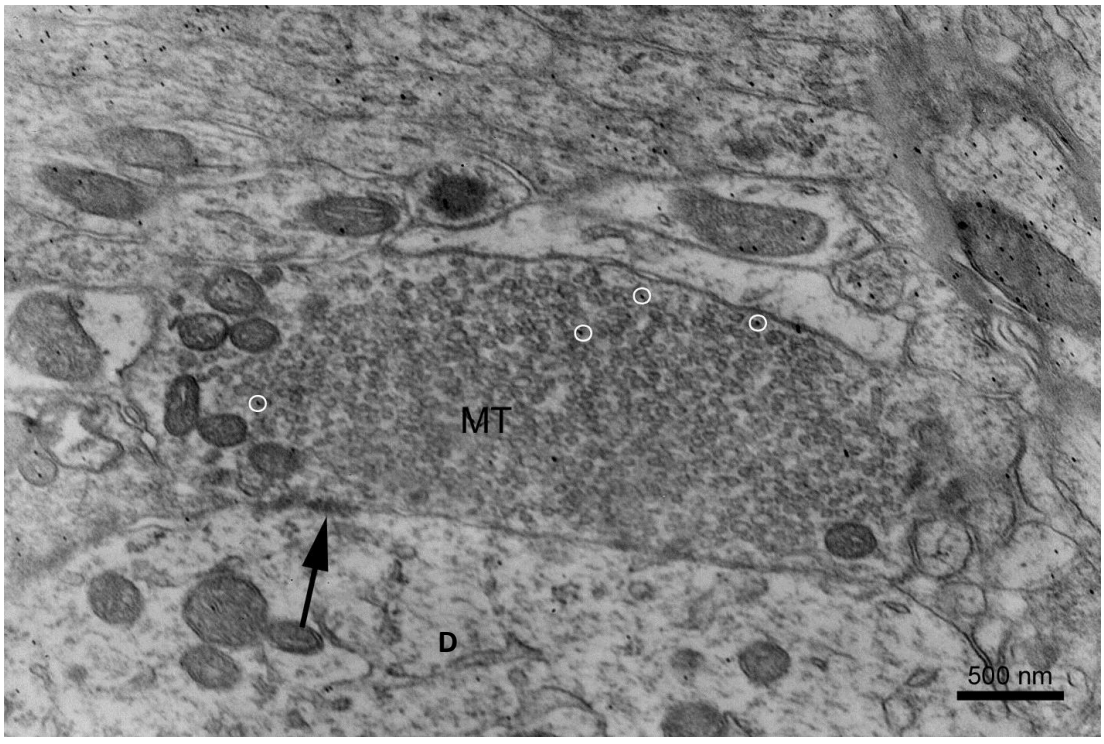
Elektron mikroskopi düzeyindeki gözlemler kontrol ve GAERS hipokampuslarının genel histolojik organizasyonu içerisinden CA3 bölgelerinin izole edilerek GABA immünsitokimya tekniğinin kullanımına ve kantite edilmesine dayanmaktadır.

4.2.1. Yalancı-opere Wistar grubu

CA3 bölgesi mossy lif terminalleri çok büyük çaplarıyla diğer terminallerden ayırt edildi. Genel görünümde yoğun, yuvarlak veziküllerin yanısıra, az sayıda daha büyük çaplı, merkezi elektron yoğun veziküller de görüldü (Resim 5). Mossy terminallerinin

çevrelediği dendritlerin terminal içine doğru dallanmalar (spine) yaptığı gözlendi. MT içerisindeki mitokondrilerin genellikle terminal zarına yakın yerleşimi belirgindi (Resim 5). Mossy terminallerinin dendritik uzantılarla asimetrik tipte sinaps yaptıkları görüldü. Ayrıca büyük mossy terminallerinin asimetrik tip sinapslardan farklı olarak dendrit gövdeleriyle sinaptik olmayan dezmozom benzeri bağlantı yaptıkları görüldü. GABA immün-işaretlenmesi MT'deki vezikül zarlarında, vezikül içinde, terminal sitoplazmasında ve mitokondrilerde gözlendi. GABA ayrıca dendritler üzerinde de izlendi.

Yalancı-opere Wistar grubunda MT ortalama alanı 8,14±1,16 μm^2 olarak bulundu. Ortalama veziküler GABA 4,42±1,66, sitoplazmik GABA 3,41±1,75 ve mitokondriyal GABA yoğunluğu 1,25±0,43 partikül/μm^2 olarak bulundu. Ortalama mitokondriyal alan/terminal alanı oranı 0,59±0,005 ve ortalama spine alanı/MT alanı oranı 0,07±0,01 olarak hesaplandı.

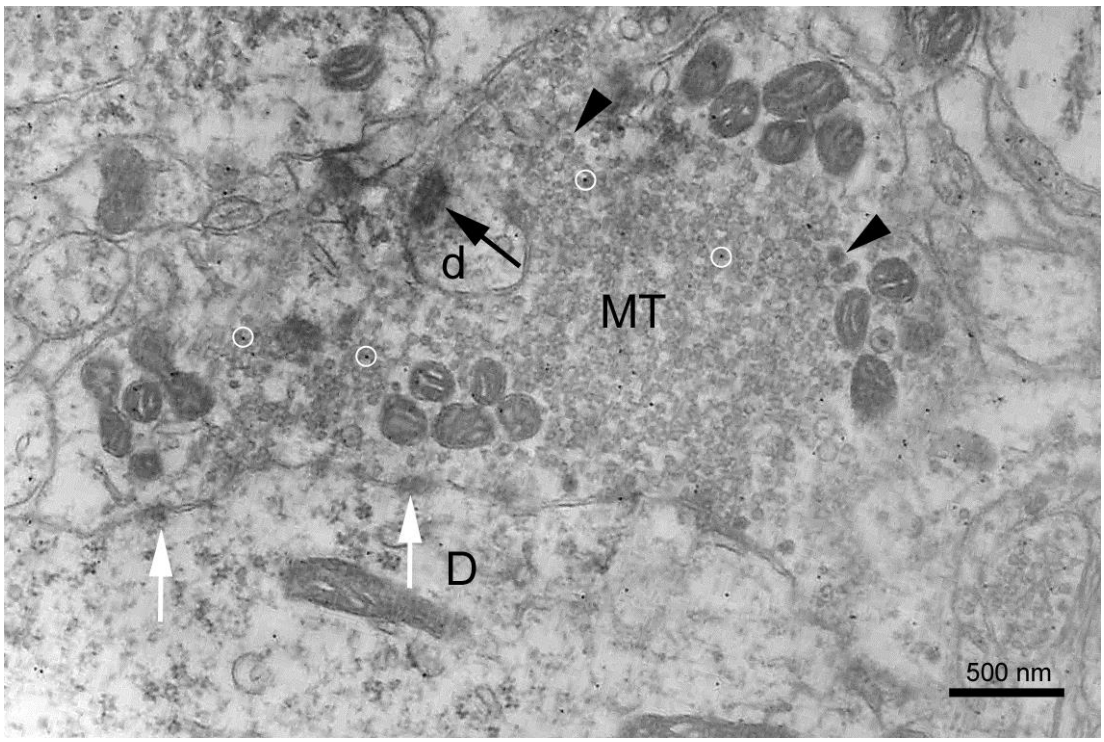


Resim 5. Yalancı-opere Wistar kontrol grubunda normal görünümde GABA-ir (o) mossy terminali (MT). Ok: Mossy terminali ve dendrit (D) gövdesi arasındaki dezmozom benzeri bağlantı.

4.2.2. Yalancı-opere GAERS grubu

Yalancı-opere GAERS sıçanlarda hipokampal CA3 bölgesi piramidal hücreleri ile sinaps yapan dentat girus granül hücrelerinin mossy akson lif terminalleri ince-yapısal görünümde yuvarlak veziküller içeren morfolojide gözlenmiştir. Mossy lif terminallerinin çevrelediği dendritlerin terminal içerisine doğru dallanmalar yaptığı (spine) ve bu dendritik uzantılarla asimetrik tipte sinaps yaptıkları gözlendi (Resim 6). Yuvarlak veziküllerden çok daha az sayıda ve daha büyük merkezi elektron yoğun veziküller görüldü. Bu grupta mitokondrilerin fazlalığı dikkati çeken bir bulguydu. GABA immün-işaretlenmesi MT'deki vezikül zarlarında, vezikül içinde, terminal sitoplazmasında ve mitokondrilerde gözlendi.

Yalancı-opere GAERS grubunda MT ortalama alanı 8,08±0,78 μm^2 olarak bulundu. Ortalama veziküler GABA 2,50±0,68, sitoplazmik GABA 2,42±0,76 ve mitokondriyal GABA yoğunluğu 0,81±0,28 partikül/μm^2 olarak bulundu. Ortalama mitokondriyal alan/terminal alanı oranı 0,07±0,01 ve ortalama spine alanı/MT alanı oranı 0,17±0,17 olarak hesaplandı.

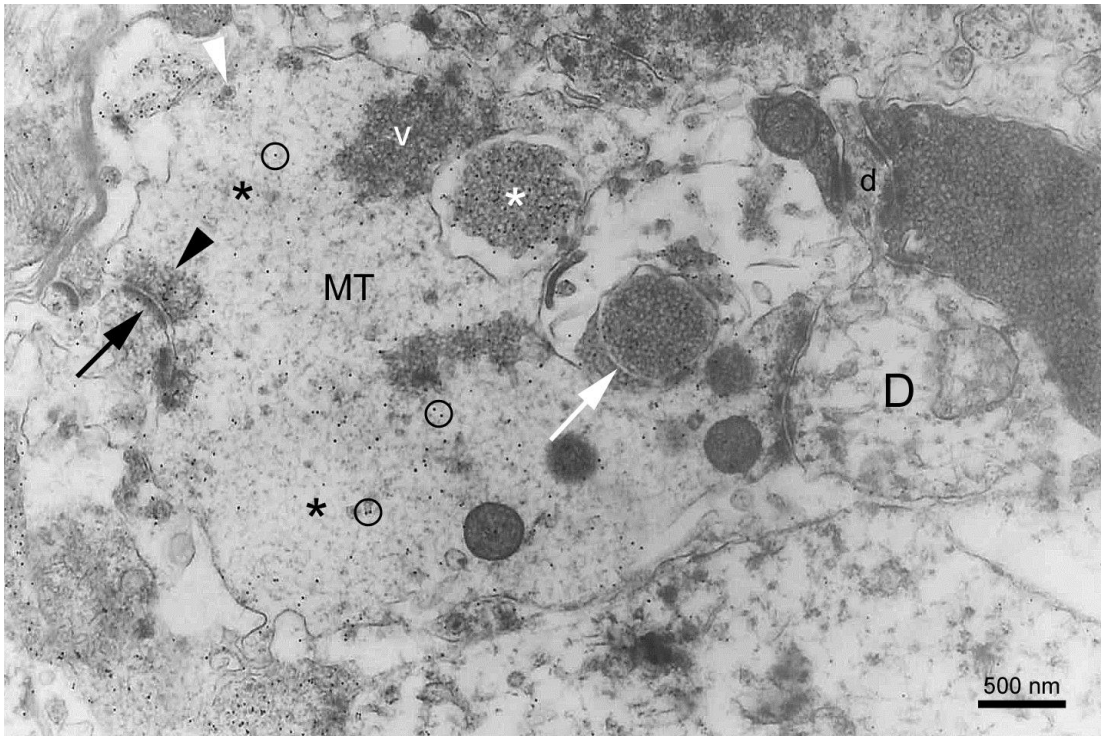


Resim 6. Yalancı-opere GAERS grubunda normal görünümde GABA-ir (o) mossy terminali (MT). Beyaz ok: Mossy terminali ve dendrit (D) gövdesi arasındaki dezmozom benzeri bağlantı. Siyah ok: Mossy terminali ile dendritik uzantı arasındaki asimetrik tip sinaps. Ok başı: Merkezi elektron yoğun vezikül.

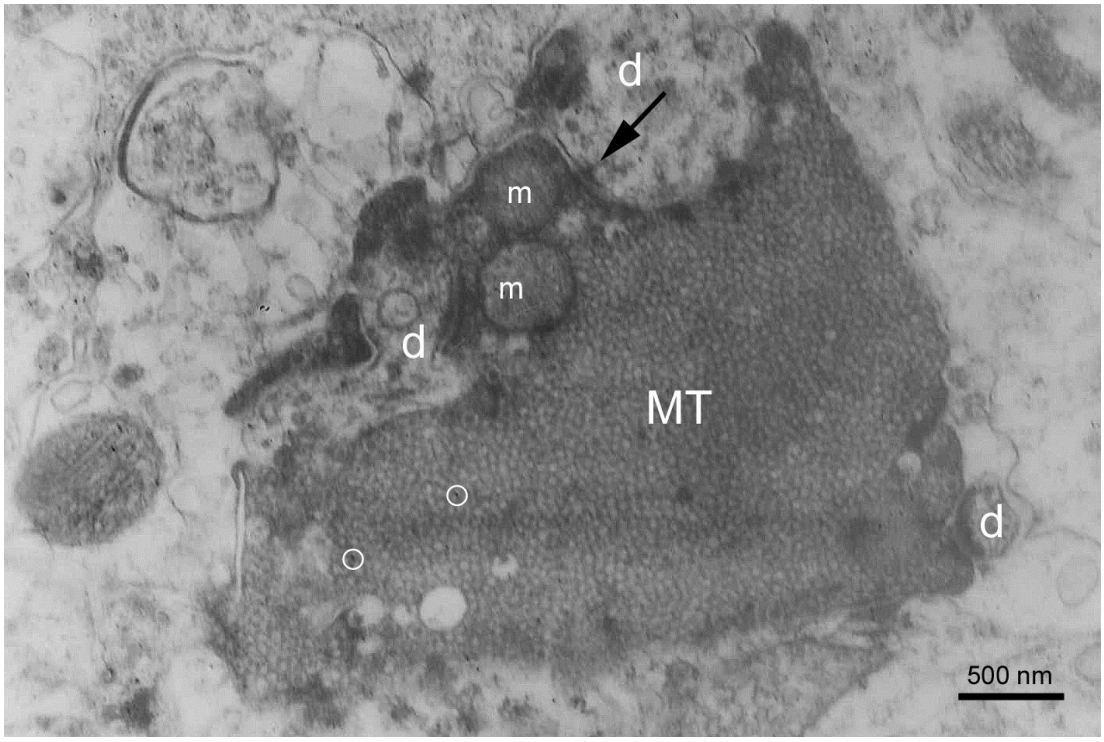
4.2.3. Kindling Wistar grubu

Kindling uygulanan Wistar sıçanlarda da yalancı-opere Wistar sıçanlardakine benzer şekilde hipokampal CA3 bölgesi piramidal hücreleri ile sinaps yapan dentat girus granül hücrelerinin MT'leri, geniş terminal büyüklüğü, yuvarlak yoğun veziküller ve az sayıda merkezi elektron yoğun vezikül içermeleri ile ayırt edildi. MT'lerinin dendritik uzantılarla asimetrik tipte sinaps yaptıkları gözlendi. MTleri ile sarılmış olan dendritlerin genellikle dikensi uzantılar verdiği ve bu uzantıların da MT'lerine gömülü olarak yerleştiği gözlendi. Terminal içerisinde ileri derecede vezikül kaybı olduğu ve geride kalan yuvarlak veziküllerin terminalin belli bir alanında kümelenmiş şekilde bulunduğu izlendi (Resim 7). Yuvarlak veziküllerden çok daha az sayıda ve daha büyük merkezi elektron yoğun veziküller ise daha çok yuvarlak vezikül kümesinin dışında kalan alanda görüldü. Bazı terminallerin içinde ve/veya dışında zarla çevrili vezikül kümeleri olduğu izlendi. Bazı MT'leri koyu renkli, dejenere görünümdeydi (Resim 8). Kontrol grubuna benzer şekilde, GABA immün-işaretlenmesi MT'deki vezikül zarlarında, vezikül içerisinde, terminal sitoplazmasında ve mitokondrilerde gözlendi.

Kindling Wistar grubunda MT ortalama alanı 10,30±1,09 μm^2 olarak bulundu. Ortalama veziküler GABA 2,99±1,64; sitoplazmik GABA 2,75±1,46 ve mitokondriyal GABA yoğunluğu 0,58±0,18 partikül/μm^2 olarak bulundu. Ortalama mitokondriyal alan/terminal alanı oranı 0,06±0,001 ve ortalama spine alanı/MT alanı oranı 0,08±0,02 olarak hesaplandı.



Resim 7. Kindling uygulanmış Wistar grubunda içi boşalmış görünümdeki GABA-ir (o) mossy terminali (MT). Siyah ok: Mossy terminali ile dendritik uzantı arasındaki asimetrik tip sinaps. Ok başı: Aktif zonda veziküler kümelenme. Siyah asterisk: Terminalde vezikül kaybı. Beyaz asterisk: Terminal içinde zarla çevrili veziküller. Beyaz ok: Terminal dışında zarla kaplı veziküller. D: Dendrit gövdesi.



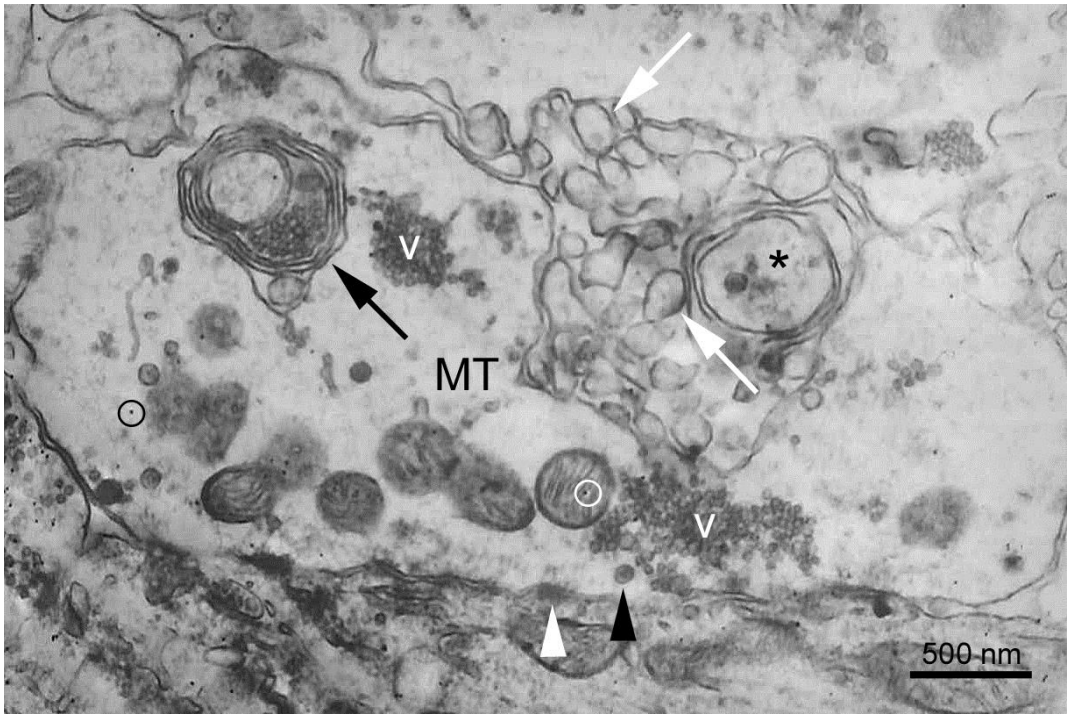
Resim 8. Kindling uygulanmış Wistar grubunda koyu renkli, dejenere görünümde GABA-ir (o) mossy terminali (MT). Siyah ok: Mossy terminali ile dendritik uzantı arasındaki asimetrik tip sinaps. m: Mitokondri, d: dendritik uzantı.

4.2.4. Kindling GAERS grubu

Kindling uygulanan GAERS sıçanlarda da yalancı-opere GAERS sıçanlardaki gibi hipokampal CA3 bölgesi piramidal hücreleri ile sinaps yapan dentat girus granül hücrelerinin MT'leri, geniş terminal büyüklüğü, yuvarlak yoğun veziküller ve az sayıda merkezi elektron yoğun vezikül içermeleri ile ayırt edildi. MT'lerinin dendritik uzantılarla asimetrik tipte sinaps yaptıkları gözlendi. MT'leri ile sarılmış olan dendritlerin genellikle uzantılar verdiği ve bu uzantıların da MT'lerine gömülü olarak yerleştiği gözlendi. Yuvarlak veziküllerin yalancı-opere GAERS sıçanlardaki gibi yaygın dağılımda değil terminalin belli bölgelerinde kümelenmiş şekilde bulunduğu gözlendi (Resim 9). Yuvarlak veziküllerden çok daha az sayıda ve daha büyük merkezi elektron yoğun veziküller ise daha çok yuvarlak vezikül kümesinin dışında kalan alanda gözlendi. Bazı terminallerin etrafında terminalden kopmuş olduğu düşünülen zar kümeleri görüldü. Diğer gruplarda olduğu gibi, GABA immün-

işaretlenmesi MT'lerindeki vezikül zarlarında, vezikül içerisinde, terminal sitoplazmasında ve mitokondrilerde gözlendi. Bazı terminallerde terminal içinde ve/veya dışındaki vezikül kümeleri yer yer lameller tarzda zarla çevrili olarak gözlendi.

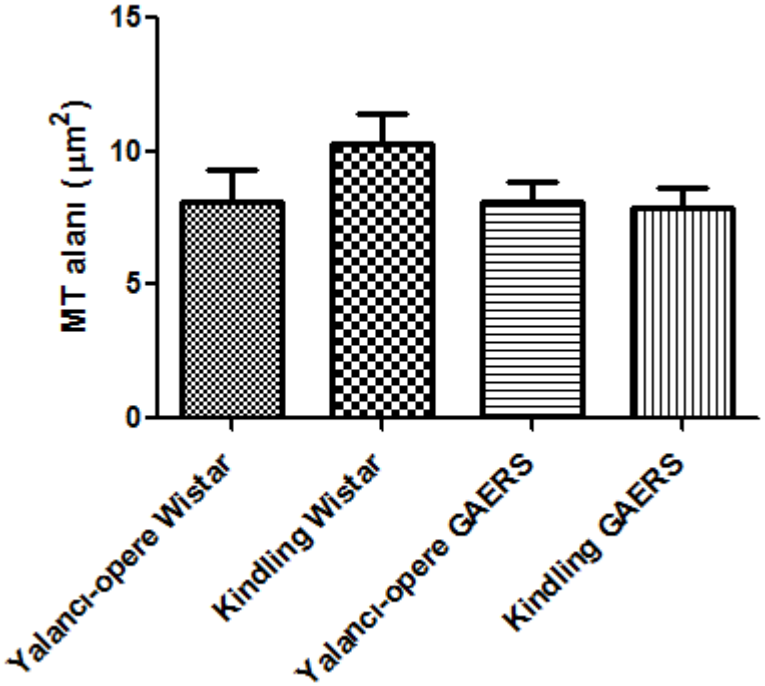
Kindling GAERS grubunda MT ortalama alanı 7,89±0,76µm^2 olarak bulundu. Ortalama veziküler GABA yoğunluğu 1,60±0,31; sitoplazmik GABA 2,11±0,70 ve mitokondriyal GABA 0,52±0,14 partikül/µm^2 olarak bulundu. Ortalama mitokondriyal alan/terminal alanı oranı 0,07±0,006 ve ortalama spine alanı/MT alanı oranı 0,11±0,02 olarak hesaplandı.



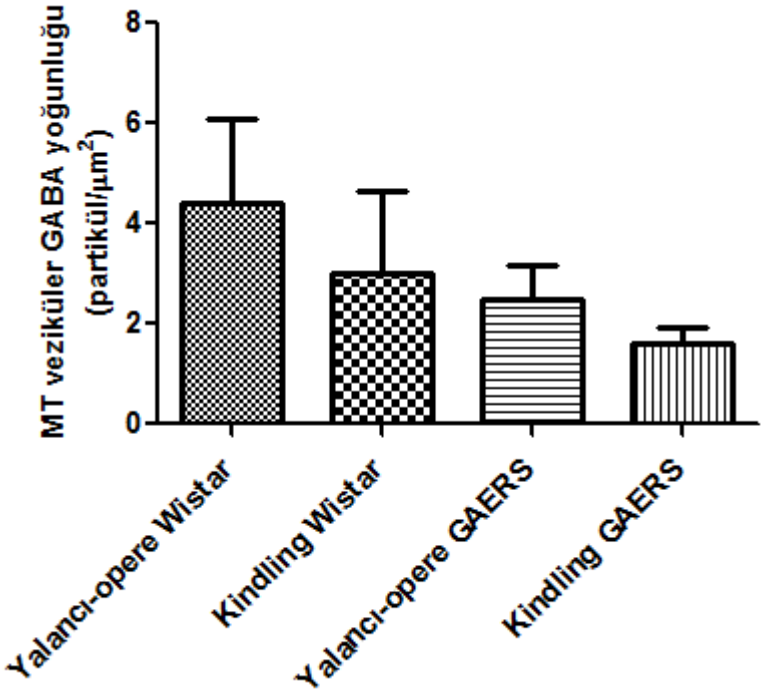
Resim 9. Kindling uygulanmış GAERS grubunda dejenere görünümde GABA-ir (o) mossy terminali (MT). Siyah ok: Mossy terminali içinde lameller tarzda zarla çevrili veziküller. v: Terminal içinde vezikül kümelenmesi. Siyah asterisk: Terminalden kopmuş olduğu düşünülen lameller tarzda zar yapısı içindeki yuvarlak ve merkezi elektron yoğun veziküller. Beyaz ok: Terminal dışında terminalden koptuğu düşünülen zar parçaları. Beyaz ok başı: Terminal ile dendrit gövdesi arasındaki dezmozom benzeri bağlantı. Siyah ok başı: Merkezi elektron yoğun vezikül.

4.3. İstatistiksel Analiz

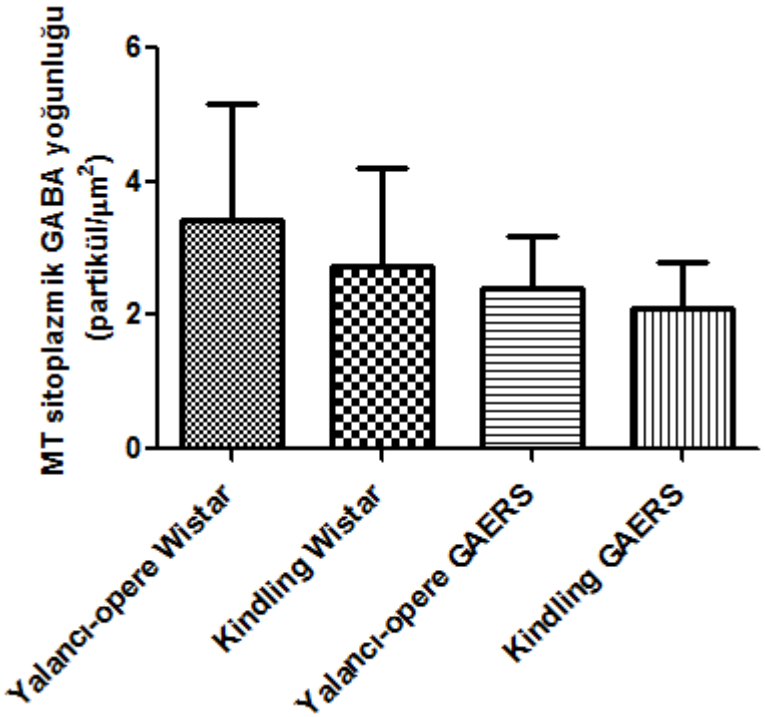
Gruplar arasında MT alanları karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görüldü (Şekil 6). Veziküler (Şekil 7), sitoplazmik (Şekil 8), veziküler+sitoplazmik (Şekil 9), mitokondriyal (Şekil 10) ve toplam GABA (Şekil 11) yoğunlukları açısından da gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Benzer şekilde, mitokondriyal alan/MT alanı (Şekil 12) ve spine alanı/MT alanı (Şekil 13) oranlarında da gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık görülmedi. Ancak, terminal alanı değerlendirmesinde en yüksek alan değerinin Wistar kindling grubuna ait olduğu görüldü. Sitoplazmik, veziküler ve toplam GABA yoğunluğu değerlendirmelerinde ise kindling gruplarında kendi kontrollerine göre, GAERS gruplarında ise Wistar gruplarına göre GABA yoğunluğunda azalma eğilimi olduğu; mitokondriyal alan/MT alanı ve spine alanı/MT alanı oranlarının GAERS gruplarında Wistar gruplarına göre artma eğiliminde olduğu saptandı.



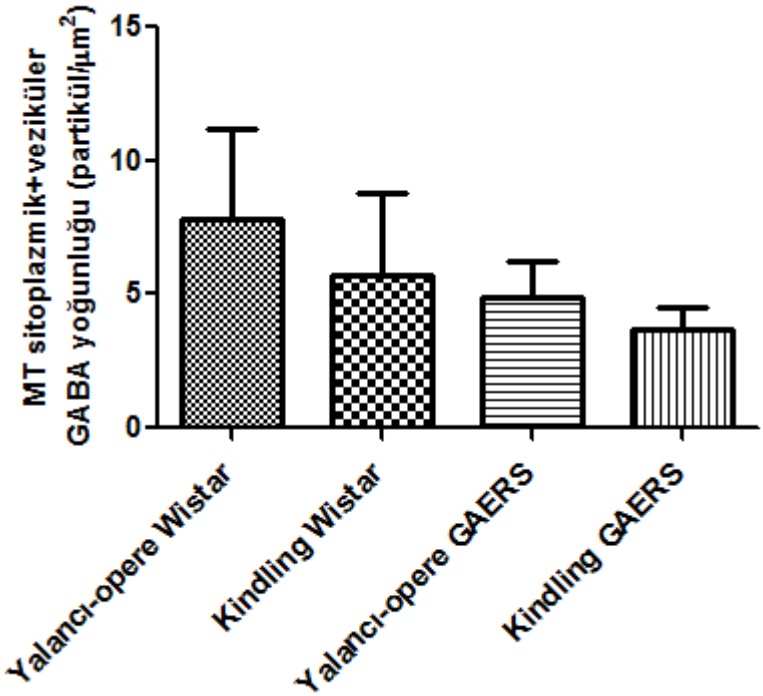
Şekil 6. Hipokampus CA3 bölgesinde mossy terminal alanlarının karşılaştırılması. (p>0,05).



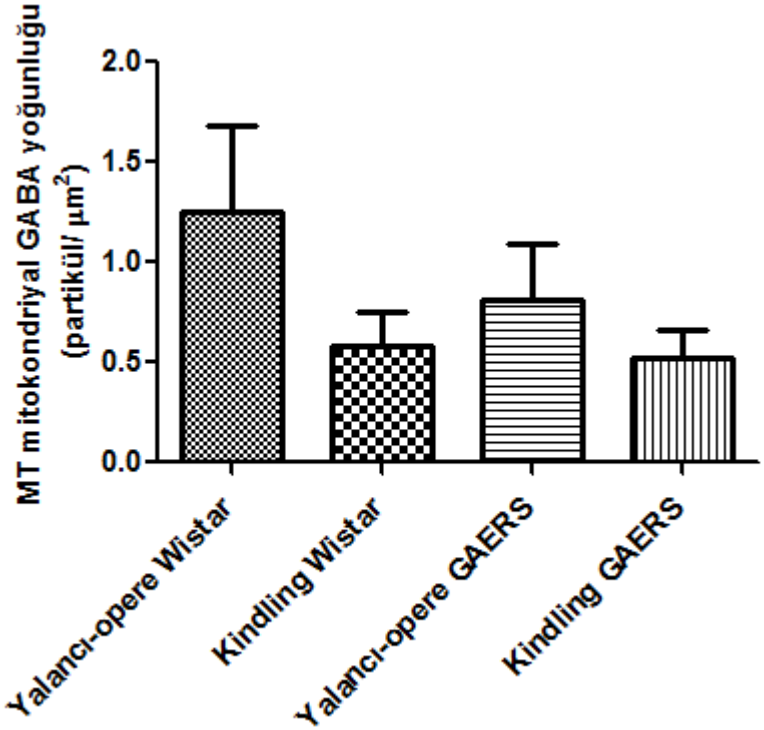
Şekil 7. Hipokampus CA3 bölgesinde mossy terminallerindeki veziküler GABA yoğunluğunun karşılaştırılması. (p>0,05).



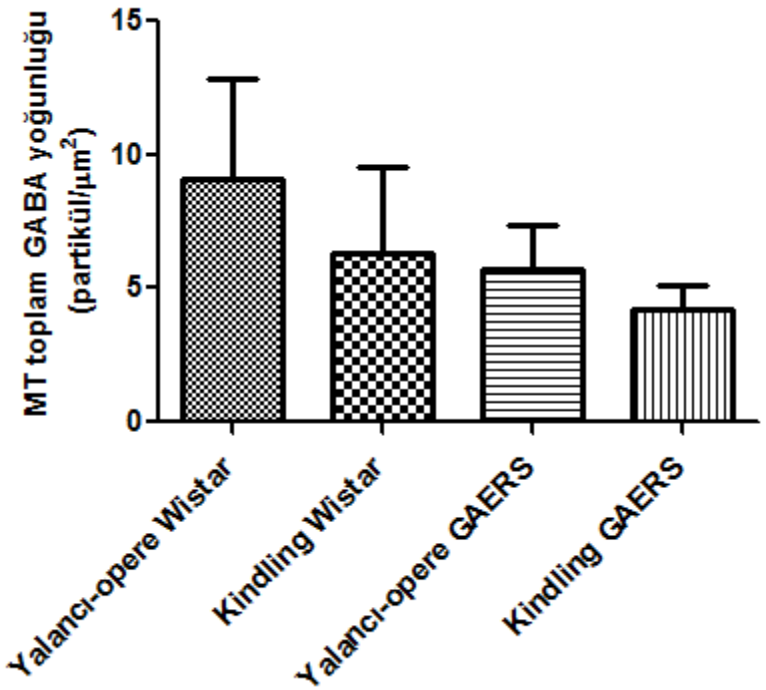
Şekil 8. Hipokampus CA3 bölgesinde mossy terminallerindeki sitoplazmik GABA yoğunluğunun karşılaştırılması. (p>0,05).



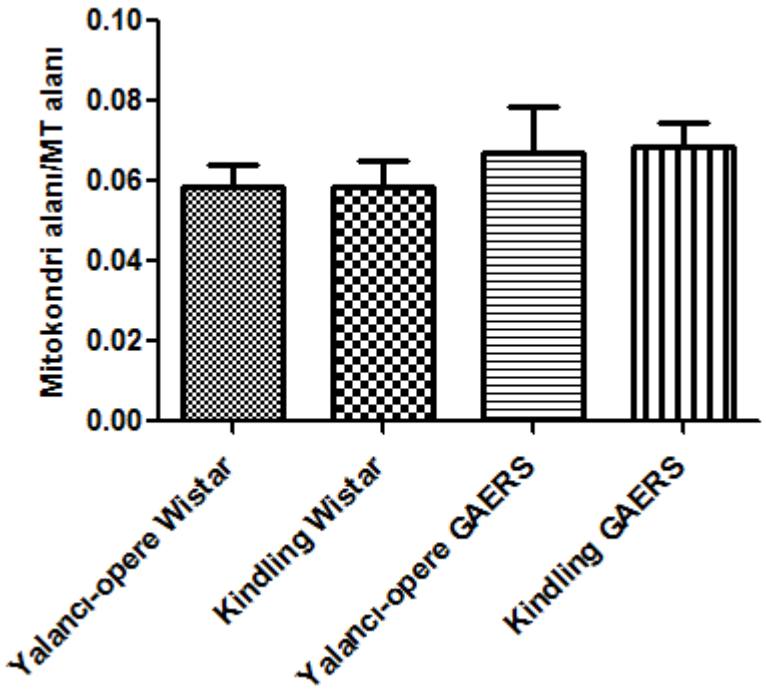
Şekil 9. Hipokampus CA3 bölgesinde mossy terminallerindeki sitoplazmik+veziküler GABA yoğunluğunun karşılaştırılması. (p>0,05).



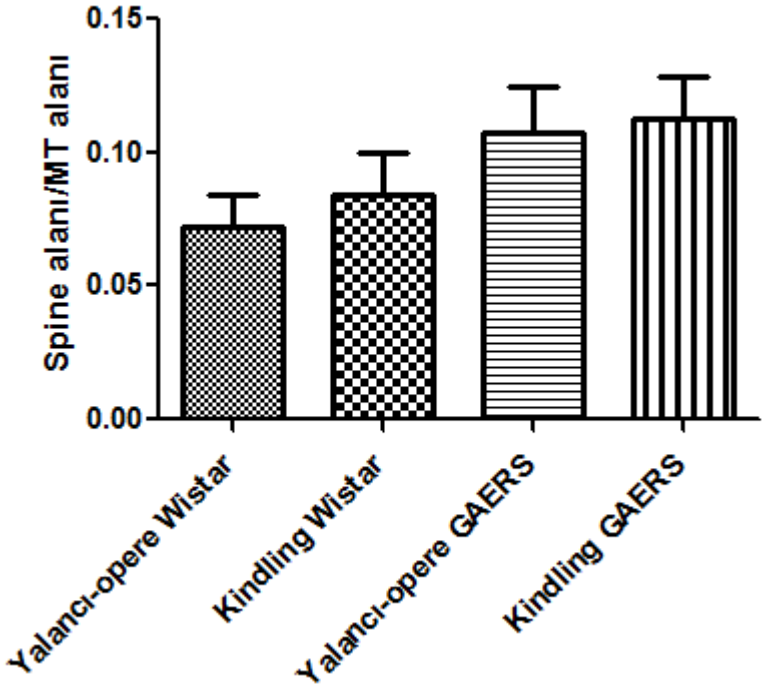
Şekil10. Hipokampus CA3 bölgesinde mossy terminallerindeki mitokondriyal GABA yoğunluğunun karşılaştırılması. (p>0,05).



Şekil 11. Hipokampus CA3 bölgesinde mossy terminallerindeki toplam GABA yoğunluğunun karşılaştırılması. (p>0,05).



Şekil 12. Hipokampus CA3 bölgesinde mossy terminallerindeki mitokondri alanı/terminal alanı oranlarının karşılaştırılması. (p>0,05).



Şekil 13. Hipokampus CA3 bölgesindeki dendritik uzantı (spine) alanı/MT alanı oranlarının karşılaştırılması. (p>0,05).

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Çalışmamızda kindling uyarısı alan Wistar ve GAERS grubu sıçanlarda ve kontrollerinde hipokampus CA3 bölgesi mossy lif terminalleri incelenmiştir. Bu çalışmada; a) CA3 mossy lif terminal alanları değerlendirmesinde en yüksek alanın Wistar kindling grubuna ait olduğu, b) CA3 mossy lif terminallerindeki sitoplazmik ve veziküler GABA yoğunluğu değerlendirmesinde ise kindling gruplarında kendi kontrollerine göre, GAERS gruplarında ise Wistar gruplarına göre GABA yoğunluğunun daha az olduğu, c) mitokondriyal alan/MT alanı ve spine alanı/MT alanı oranlarının GAERS gruplarında Wistar gruplarına göre daha fazla olduğu, ancak tüm bu niceliksel değerlendirmelerde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı bulunmuştur.

Hipokampusta Ammon boynuzu ve dentat girus, çeşitli nöbet modellerinde gösterildiği gibi nöbete duyarlı bölgelerdir (96,97). İnce-yapısal ve niceliksel çalışmalar epilepsi araştırmalarında plastisite ve sinaptik etkinlik gibi parametreleri anlaşılır kılmaktadır. Elektron mikroskopik çalışmalar 1970'lerden günümüze epileptik beyinde ışık mikroskopik verilerin doğrulanması ve nöronların ince-yapı-işlev ilişkilerinin anlaşılmasında önemli olmuştur (98). Epilepsinin patofizyolojisini anlamada en önemli problemlerden biri bu hastalıkta beyinde birden fazla bozukluğun olmasıdır (99). Bu bozuklukların bazıları edinsel, bazıları da genetik veya konjenitaldir. Epilepsinin temelini anlamadaki sıkıntılardan biri de beynin belli bir bölgesinde karşılaşılan değişikliğin epilepsideki rolünü yorumlayabilmektir. Epilepside nöbetler tek bir nöron popülasyonundan kaynaklanmamaktadır; aksine bir bölgede veya bölgeler arasında başlayan kompleks etkileşimlerdir. Bir kanaldan başlayıp tüm beyne yayılan akım üzerinde birçok röle istasyonlar bulunmaktadır. Benzer şekilde EEG bulguları da beyni kara kutu olmaktan çıkarmaktadır. Tablonun bütününü görmek açısından, nöbetin başlaması, sürmesi ve yayılımının nasıl olduğu konusunda, tek bir hücreden beynin bütününe tüm noktaları birleştiremesek de, nöbet esnasında beynin farklı hiyerarşik düzeylerinde ne olduğunu anlamak değişiklikleri daha iyi yorumlamamızı sağlayacaktır. Bir nöronda oluşan fizyolojik

değişiklikleri yorumlamaktaki sorunlardan biri de o nöronun belli bir devre içerisinde nerede bulunduğu ve nasıl çalıştığını bilmektir. Bertram 2013 yılında yayınlanan bir derlemesinde şu soruları gündeme getirmiştir (99): Bu nöron bir bölgeden diğerine eksitatör iletiyi artıran bir projeksiyon nöronu mudur? Bu nöron artmış eksitabilitenin artmış inhibisyonla sonuçlandığı bir inhibitör nöron mudur? Oluşan bu değişiklik epilepsi gelişimine katkıda mı bulunmaktadır, yoksa homeostazın tekrar sağlanabilmesi için bir reaksiyon mudur? Artmış eksitatör iletinin hedefindeki bölge nöbet olasılığını artıran ya da azaltan eksitatör ya da inhibitör bir modülatör bölge midir? Fokal nöbet devresi dikkate alındığında nöbet gelişiminde en az üç aşama bulunmaktadır. Nöbetin başlaması (interiktalden iktal aşamaya geçiş), nöbet oluşumu (erken evre) ve nöbet yayılımı (ilave bölgelerin ve devrelerin dahil edilmesi). Nöbeti bu farklı fazlara ayırmak her birinin farklı devreler ve farklı fizyolojiler içermesiyle ilişkilidir. Bu soruları cevaplayabilmek için en ideali spontan nöbet modelleri üzerinde çalışmak olsa da başlangıç bölgesinin bilinmesi açısından indüklenen nöbet modelleri tercih edilmektedir (99) . Biz de çalışmamızda Wistar kontrol ve genetik absans epilepsili sıçanlarda elektriksel kindling ile indüklenen nöbetlerin hipokampal CA3 bölgesi MT'lerinin içerdiği GABA nörotransmitteri üzerindeki etkilerini inceledik.

Genetik absans epilepsi modeli olan GAERS sıçanlar 4 yaş ve ergenlik dönemi arasında başlayan insan absans epilepsisini taklit eden nöbetleri ortaya koyarlar. Konvülzif olmayan jeneralize absans epilepsi, konvülzif parsiyel temporal lob epilepsi ile birlikte aynı hastada çok nadir görülmektedir (4,100-102). Deneysel olarak GAERS'lerde fokal nöbetlerin oluşturulabilirliği, TLE modelinde kullanılan elektriksel uyarıların (kindling) verilmesi ile araştırılmış, veriler epileptik olmayan sıçanların 5. derece nöbet geçirdiklerini, GAERS'lerin ise 30 kindling uyarısı verilmesine rağmen 2. derece nöbet durumundan öteye gidemediklerini ortaya koymuştur (5).

Mossy terminalleri 4-10 µm çapında dev terminallerdir. Sıçanda CA3 bölgesinde MT ortalama alanı Blackstad ve Kjaerheim (1961) tarafından yaklaşık 8,2 μm^2 olarak bulunmuştur (103). Şirvancı ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada CA3

bölgesinde MT ortalama alanı naif Wistar kontrollerde 4,75±0,26 μm^2 ve naif GAERS'lerde 4,45±0,30 μm^2 olarak bulunmuş ve aralarında istatistiksel açıdan fark gözlenmemiştir (104). Akakın ve ark.nın çalışmasında yalancı-opere Wistar sıçanların CA3 bölgesinde MT ortalama alanı 4,48±0,44 μm^2; yalancı-opere GAERS'te 4,07±0,50 μm^2; kindling Wistar (evre 5) grubunda 4,29±0,18 μm^2; kindling GAERS (evre 2) grubunda 4,07±0,32 μm^2 olarak bulunmuştur (105). Çalışmamızda da CA3 bölgesinde MT ortalama alanı yalancı-opere Wistar sıçanlarda 8,14±1,16 μm^2; yalancı-opere GAERS'te 8,08±0,78 μm^2; kindling Wistar (6 uyarı) grubunda 10,30±1,09 μm^2; kindling GAERS (6 uyarı) grubunda 7,89±0,76 μm^2 olarak bulunmuştur. İstatistiksel açıdan anlamlı olmasa da, en yüksek ortalama terminal alan değeri kindling Wistar grubuna ait gözükmektedir. Bu gruba ait terminal değerlerine bakıldığında, en yüksek alan değeri 30,6 μm^2 olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu değer mossy terminali için çok yüksek bir değerdir. Bu tarz yüksek alan değerlerinin incelenen terminallerin çoğunluğunda olmayışı sebebiyle gruplar arasında alan açısından anlamlı fark çıkmamış olabilir. Pierce ve ark. pentilentetrazol ile evre 5 nöbet oluşturdukları sıçanlarda dorsal ve ventral hipokampusta DG MT'lerini incelemişler, dorsal hipokampusta kontrol ve deney grupları arasında MT alanları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulmamışlardır (106). Ancak ventral hipokampus MT alanının nöbet grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığını bulmuşlardır. Diğer çalışmalar serebellar paralel lif lezyonu ve septohipokampal deaferentasyon sonrası geride kalan sinir terminallerinde alan artışı saptamışlardır (107,108). Bu artış, bir kompansasyon mekanizması olarak yorumlanmıştır. Çalışmamızda Wistar kindling grubundaki bazı terminallerde istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da gözlediğimiz alan artışının benzer bir mekanizmadan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Uyarı alan gruplarda MT'leri etrafındaki çok sayıda ufak, zarla çevrili, sitoplazmik parçalar, bu parçaların dejenerasyona giden komşu MT'den kopmuş olabileceğini düşündürmekterdir. Bazı mossy terminallerinde gözlediğimiz alan artışı, dejenere olan terminallerin fonksiyonunu kompanse etmeye yönelik olabilir. Bir başka olasılık da

dejenerasyonun kendisinin MT içerisinde şişmeye neden olmuş olabileceğidir; gözlediğimiz bu tarz MT'lerinde veziküllerin çok az yer kapladığı dikkati çekmiştir.

Glutamat ve aspartat gibi eksitatör aminoasitler beyinde en fazla bulunan aminoasitlerdir. MSS'deki yüksek konsantrasyonları ve yaygın dağılımları nedeniyle eksitatör aminoasitler normal nöronal fonksiyonlarda olduğu kadar patolojik durumlardaki hücresel anormalliklerde de rol oynar. Lucas ve Newhouse 1956'da glutamatın toksik etkisiyle ilgili yaptıkları çalışmada glutamata kısa süreli maruz kalan nöronlarda gecikmiş hücre ölümü ortaya koymuşlardır (9). Bu şekilde epileptogenez gibi patolojilerde aminoasit reseptörlerin eksitotoksik etkileri ilgi odağı haline gelmiştir. Epilepside glutamat toksisitesine en duyarlı bölge hipokampus Ammon boynuzunda CA3 piramidal nöronlarıdır (109,110). Çalışmamızda gözlenen CA3 nöronlarının hasarı, uyarı sonrası mossy terminallerinden aşırı glutamat salınımı nedeniyle olabilir.

Mossy terminallerinin eksitatör bir nörotransmitter olan glutamatı içermelerine rağmen aynı zamanda inhibitör bir nörotransmitter olan GABA'yı da içerdikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Mossy terminallerinde GABA varlığı ilk kez Sandler ve Smith tarafından 1991 yılında bildirilmiştir (6). GAERS sıçanlarda CA3 hipokampus MT'de GABA varlığı Şirvancı ve ark.nın (104,111) ve Akakın ve ark.nın (105) çalışmalarında gösterilmiştir. Benzer şekilde, yaptığımız bu çalışmada da yalancı-opere Wistar ve GAERS grubu sıçanlar ile kindling grubu sıçanlarda MT'de GABA varlığı gösterilmiştir.

Glutamat ve GABA'nın mossy terminallerinden birlikte salınıyor olması, mossy liflerinin uyarılmasıyla CA3 piramidal hücrelerinde oluşan EPSP (eksitatör postsinaptik potansiyel)–IPSP (inhibitör postsinaptik potansiyel) sekansının bazı yönlerini açıklayabilir. Bu yanıtın bir yönü de IPSP'nin büyük ve uzun süreli oluşudur (112,113). Ortaya çıkan IPSP'nin CA3 piramidal hücrelerinin proksimal dendritleriyle temasta bulunan mossy lif terminalerinden salınan GABA ile oluştuğu öne sürülmektedir (6). Akakın ve ark. kindling uyarısı almış Wistar ve GAERS sıçanlarla yaptıkları çalışmada kindling Wistar grubu MT'deki GABA yoğunluğunu kendi kontrollerinden ve kindling GAERS grubundan yüksek bulmuşlardır (105). Akakın ve

ark.nın bu çalışmasında kindling Wistar grubu hayvanlar son 5. derece nöbetten ve kindling GAERS grubu hayvanlar 2. derece nöbetten 24 saat sonra dekapite edilmişlerdir. MT'deki GABA yoğunluğuna son nöbetten 24 saat sonra bakılmıştır. Benzer modelde gerçekleştirilen çalışmamızda sıçanlar son nöbetten 1 saat sonra dekapite edilmişlerdir. Dolayısıyla 2. derece nöbet geçiren Wistar sıçanlarda çok erken dönemde (1. saat) GABA yoğunluğu açısından 24. saatteki gibi artış olmadığı görülmüştür. Sıçanlarda granül hücrelerinde kainik asit enjeksiyonundan 6 ve 24 saat sonra hızlı ancak geçici bir GAD67 mRNA artışı bildirilmiştir (7). Çalışmamızda istatistiksel anlamlılık olmasa da kindling gruplarındaki GABA yoğunluğunun kendi kontrollerine kıyasla azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Çalışmamızın bulguları kindling uyarısından sonraki ilk saatlerde MT'deki GABAnın düşüş göstermiş olabileceğini düşündürmektedir. Bunun nedeni yalnızca 6 uyarı verilmesi ve son uyarıdan 1 saat sonrası gibi çok erken dönemde GABA'nın MT sinaptik havuzundan kompansasyon amaçlı hızla salınıp havuzdaki GABA'yı azaltması olabilir.

Çalışmamızda gruplar arasında GABA yoğunluğu açısından anlamlı fark bulunmayışının bir diğer nedeni kindling Wistar grubunun, kindling GAERS grubuna benzer şekilde sadece 6 uyarı almış ve 5. derece nöbete erişmemiş olmaları olabilir. Akakın ve ark.nın çalışmasında hayvanlar en fazla 30 uyarı almalarına rağmen, Wistar grubu 5. derece; GAERS grubu 2. derece nöbet geçirmiştir. İkinci derece nöbet geçiren GAERS grubu ile yalancı-opere GAERS grubu kıyaslandığında aralarında anlamlı fark bulunmamıştır. Benzer şekilde, bizim de çalışmamızda 2. derecede kalan GAERS ve Wistar sıçanların kendi kontrolleriyle aralarında fark olmadığı saptanmıştır. GABA ilk birkaç saat içinde hızlıca salınıp daha sonraki saatlerde terminal içinde miktarı artıyor olabilir. Akakın ve ark. çalışmalarında kindling uygulanan ve evre 5 nöbet geçiren Wistarlarda, kindling uygulanan ve evre 2 nöbet geçiren GAERS grubuna göre, MT'de GABA'nın son nöbetten 24 saat sonra arttığını bulmuşlardır. Çalışmamızda ise niceliksel GABA seviyesi Wistar kindling grubunda GAERS kindling grubuna göre artmış ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamızda bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmayışı

hayvanların yalnızca evre 2 nöbet geçirmeleri ve son nöbetten 1 saat sonra GABA seviyelerini incelememizden kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda GAERS gruplarında MT'lerindeki GABA yoğunluğu Wistar gruplarına göre daha az bulunmuştur ancak istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır. MT'lerinin sinaps yaptığı nöronların çoğu inhibitördür (40,114-116). Şirvancı ve ark. yaptıkları bir çalışmada kontrol Wistar ve GAERS sıçanlarda hipokampal MT'de GAD65/67'nin varlığını incelemişler, gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptamamışlardır (117). Ancak niceliksel bulgulara bakıldığında GAD65/67'nin GAERS grubunda azalma eğiliminde olduğu görülmektedir (7). Bu da çalışmamızla uyumlu bir bulgudur. GAERS'lerde MT içinde GABA'nın az olması inhibitör nöronlar üzerindeki inhibisyon (disinhibisyon) etkisini azaltıyor ve inhibitör nöronların daha etkili çalışmasını sağlıyor olabilir. Bu da GAERS'lerin kindlinge olan dirençlerinin bir nedeni olabilir.

Bu çalışmada hipokampal mossy terminallerinde bulunan GABA havuzu, veziküler, sitoplazmik ve mitokondriyal olmak üzere üç bölgede değerlendirilmiştir. İmmünsitokimya tekniğinde sinaptik vezikül içinde ya da vezikül membranı üzerinde gözlenen altın partikülleri, veziküler GABA havuzu içinde değerlendirilmiş, bunun dışındaki altın partikülleri ise sitoplazmik GABA havuzuna dahil edilmiştir. Terminaldeki mitokondriler üzerinde bulunan altın partikülleri mitokondriyal GABA havuzunu temsil etmektedir. Meshul ve ark.da 1994 çalışmalarında terminal içindeki havuzu üç bölümde incelemişler, sitoplazmik havuzun da veziküler havuzla birlikte değerlendirilebileceği sonucuna varmışlardır (118). Biz de benzer şekilde tüm bu havuzların hem ayrı ayrı hem de toplam değerlendirmelerini yaptık.

Beyinde birçok bölgede ana nöronlar dendritik uzantılarla çevrilidir. Bu dendritik uzantılar (spine), nöronların eksitatör sinaptik iletilerinin ana yerleşim yerleridir, bir başka deyişle beyindeki iletide anahtar rol oynamaktadırlar. Dendritik uzantıların dağılımı ve yapısı birçok hastalıkta bozulmaktadır (44,45). Dendritik uzantılar kalsiyum ve diğer sinyal komponentlerini içermeleriyle sinaptik etkide dolayısıyla da nöronal plastisitede rol almaktadırlar. Erken postnatal gelişimde dendritik uzantıların büyüklük ve morfolojilerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir

(46). Büyüklük ve şekillerindeki değişimler yapısal kapasitelerini de etkilemektedir. Hipoteze göre büyük başlı kalın uzantıların hafızadan, küçük başlı ince uzantıların öğrenmeden sorumlu olduğu düşünülmüştür. Büyüklük ve şekilden başka sayıları da önem arz etmiştir. Moser ve ark.nın 1994 yılında yaptıkları çalışmada öğrenmenin dendritik uzantı sayısını artırdığı tespit edilmiştir (119). Epilepsi gibi nörolojik hastalıklarda dendritik uzantı şekillerinde değişiklik ve sayılarında azalma olduğu bildirilmiştir (47). Şirvancı ve ark.nın yaptıkları çalışmada GAERS ile epileptik olmayan kontrol sıçanların hipokampus CA3 ve dentat girus hilar bölgelerinde MT'nin sinaps yaptığı dendritik uzantı morfolojisinde değişiklik olup olmadığı incelenmiştir (120). Gruplar arasında dendritik uzantıların sayısı ve alanlar açısından fark tespit edilmemiştir. TLE'de görülen farklılığın absans epilepside tespit edilmemesi bu iki epilepsi türünün farklı patogenetik mekanizmalara sahip olduğunu düşündürmüştür. Drakew ve ark. kültürde hipokampal dilimler ile yaptıkları çalışmada bikukulin ve pikrotoksin ile "epileptik" durum oluşturmuşlar ve deney grubunda CA3 piramidal hücre dendritlerinin dendritik uzantı sayısında azalma gözlemişler; ancak alan açısından anlamlı fark saptamamışlardır (121). Daha önceki çalışmalara paralel olarak bu çalışmamızda da dendritik uzantı alanlarının MT alanına oranı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Ancak, GAERS gruplarında Wistar kontrollere kıyasla dendritik uzantı alanı/MT alanı oranının artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Hipokampusun öğrenme ve hafıza ile ilişkili olduğu bilinmektedir (122). GAERS'lerin kontrollerine kıyasla öğrenmede daha iyi performans sergiledikleri bildirilmiştir (67,123). Yapılan bu çalışmalara paralel olarak, bizim de çalışmamızda GAERS grubunda gözlemlediğimiz MT'lerinin sinaps yaptığı dendritik uzantı alanındaki artma eğilimi, bu suşun öğrenme performansındaki artış ile ilişkili olabilir.

Çalışmamızda MT'lerindeki mitokondri alanının terminal alanına oranı GAERS gruplarında Wistar gruplarına göre yüksek bulunmuştur; ancak istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Bu bulgumuza paralel şekilde, GAERS korteksinde nöron ve astrositlerde mitokondriyal aktivitede artış olduğu (124), GAERS hipokampusunda ise glukoz metabolizmasında artış olduğu bildirilmiştir (58). Absans nöbetlerinin

talamokortikal döngüyle sınırlı olduğunun bilinmesine rağmen GAERS suşunda görülen bu mutasyon tüm beyin hücrelerini içermektedir (124). Bu nedenle GAERS'lerin hipokampusunda görülen bu metabolik değişiklikler şaşırtıcı değildir. Dolayısıyla, çalışmamızda saptadığımız GAERS'lerdeki mitokondri oranındaki artış eğilimi bu suştaki artmış mitokondriyal aktivite ve serebral glukoz kullanımıyla uyumlu bir bulgudur (125,126).

MT'de sinaptik vezikül kümelenmesi daha önce genetik olarak epilepsiye eğilimli gerbilde gösterilmiştir (127). Akakın ve ark. da çalışmalarında kindling gruplarında MT'de vezikül kaybı ve kümelenme bildirmişlerdir (105). Çalışmamızda da benzer şekilde kindling gruplarında MT'de ileri derecede vezikül kaybı olduğu, kalan veziküllerin ise terminalin bazı alanlarında kümelendiği gözlenmiştir. Bu bulgular yalnızca 6 elektriksel kindling uyarısının bile hipokampustaki trisinaptik döngüde yapısal değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak GAERS'lerin kontrollerle karşılaştırıldığında GABA yoğunluğu, mitokondriyal alan/MT alanı ve spine alanı/MT alanı oranları açısından istatistiksel anlamlılık olmasa da farklılıklar gösteren bulgularımız, TLE ve absans epilepsilerin farklı epileptogenez mekanizmasına sahip olduklarını düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçları ileri deneysel çalışmalar için temel oluşturma niteliğindedir.

6. KAYNAKLAR

1. Bambal G, Çakıl D, Ekici F. Deneysel epilepsi modelleri. Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi. 2011; 2 (1):118-123.
2. Zupec-Kania BA, Spellman E. An overview of the ketogenic diet for pediatric epilepsy. Nutr. Clin. Pract. 2009; 23:589-596.
3. Geller EB, Lancman ME, Van Ness P. Coexistence of generalized and partial epilepsies. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 1995; 95:17P.
4. Koutroumanidis M, Hennessy M, Elwes RD. Coexistence of temporal lobe and idiopathic generalized epilepsies. Neurology. 1999; 53:490-495.
5. Eskazan E, Onat FY, Aker R, Oner G. Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy. Epilepsia. 2002; 43(10):1115-1119.
6. Sandler R., Smith A.D. Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. J. Comp. Neurol. 1991; 303:177-192.
7. Schwarzer C., Sperk G. Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. Neuroscience. 1995; 69:705-709.
8. Avanzini G., Panzica F., de Curtis M. The role of the thalamus in vigilance and epileptogenic mechanisms. Clin. Neurophysiol. 2000; 111:19-26.
9. Liu Z., Mikati M., Holmes GL. Mesial temporal sclerosis: Pathogenesis and significance. Pediatr Neurol. 1995; 12:5-16.
10. Sarsılmaz M, Songur A, Özen OA, Hipokampus. T. Klin. J. Med. Sci. 2001; 21:427-431.
11. Arıncı K, Elhan A. Anatomi (2. Cilt). Ankara: Güneş Kitabevi, 1995:403-4.
12. Barry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous System. In: Williams PL, editor. Gray's Anatomy. (38th Edition). London: Churchill Livingstone, 1995: 1121-1125.

13. Barr ML, Klernam JA. The Human Nervous System. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Comp, 1988: 266-269.
14. Amaral DG, Insausti R. Hippocampal Formation. In: Paxinos G, editor. The Human Nervous System. (2nd Edition). California: Academic Press Inc., 1990.
15. Burt Alvin M. Textbook of Neuroanatomy. An HBJ International Edition 1993; 479.
16. Guyton AC. Textbook of Medical Physiology (Türkçe 1. baskı). İstanbul: Merck Yayıncılık, 1987: 980-981.
17. Wieraszko A, Ball GF. Long-term potentiation in the avian hipokampus does not require activation of the n-methyl-d-aspartame (NMDA) receptor. Synapse 1993; 13: 173-178.
18. Cizkova D, Vonicky I, Gottlieb M, Marsala J. Ischemic damage in the hippocampus: a silver impregnation and immunocytochemical study in the rat. Archives Italiennes de Biologie. 1996; 134: 279-290.
19. Nolte J. The Human Brain: An Introduction to Its Functional Anatomy. 2nd ed. Toronto: C.V. Mosby Company, 1988.
20. Cooper LN. Distributed Memory in The Central Nervous System: Possible Test of Assumptions in Visual Cortex. In: Schmitt FO, Worden FG, Adelmar G, Dennis SG, editors. The Organisation of The Cerebral Cortex. 2nd ed. Cambridge: MIT Press, 1981: 479-503.
21. Kandel ER. Cellular Insinghts into Behavior and Learning. In: The Harvey Lectures, Volume 73. New York: Academic Press Inc. 1979: 19-92.
22. Carpenter MB, Sutin J. Human Neuroanatomy. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Press, 1983: 237.
23. Brodal H. Neurological Anatomy. 3th ed. Oxford: Oxford University Press, 1981.
24. O'keefe J, Coway DH. Hippocampal place units in the freely moving rat. In: Why they fire where they fire? Exp. Brain Res. 1978; 31:573-590.
25. Green JD. The Hippocampus. In: Field J., editor. Handbook of Physiology (1st Ed). Vol. 2. Washington: American Physiological Society. 1960; 1373-1389.

26. Aktan ZA. Limbik Sistem. Sendrom 1997; 9 (1): 65-69.
27. Green JD, Shimamota T. Hippocampal seizures and their propagation. Arch Neurol Psychiatry. 1953; 70: 687-702.
28. Dere F. Nöroanatomi (3. Cilt). Adana: Nobel Tıp Kitabevi. 2000; 428.
29. Selkoe DJ. Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of the Alzheimer's disease. Trends Neurosci 1993; 16:403-409.
30. Serrano CP, Sanches AJC, Garcia GT. Mesial temporal sclerosis (I): Histological data, physiopathological hypothesis end etiological factors. Rev Neurol 1997; 25 (140): 584-589.
31. Sloviter RS. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. Science 1987; 235:73-76.
32. Smeyne RJ, Vendell M, Hayward M et al. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. Nature 1993; 363:166-169.
33. Gray EG The granule cells, mossy synapses and Purkinje spines synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations. J. Anat 1961; 95:345-356.
34. Colonnier M. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscopy study. Brain Res 1968; 9:268-287.
35. Uchizono K. Characterisation of the excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. Nature 1965; 207:642-643.
36. Satterfield TS. Neuroscience. Exploring the brain. Copyright Williams and Wilkins. 1996.
37. Bullock J, Boyle J, Wang MB. Physiology, National Medical Series for Independent Study. Mass Publishing Co. 1994.
38. Gale, K. GABA in epilepsy: The pharmacologic basis. Epilepsia 1989; 30:S1-S11.
39. Amaral DG. Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentata. Anat Embryol. 1979; 155:241-251.

40. Acsady L., Kamondi A., Sık A., Freund T., Buzsaki G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippcoampus. J Neurosci. 1998; 18(9):3386-3403.
41. Gulyas AI., Miettinen R., Jacobowitz DM., Freun TF. Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus-I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fiber system. Neurosci. 1992; 48:1-27.
42. Ottersen OP., Storm-Mathisen J. Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In: A. Björklund, T. Hökfelt, MJ Kuhar (eds): Handbook of chemical neuroanatomy. Vol.3: Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS, Part II Amsterdam: Elsevier 1984; 141-246.
43. Storm-Mathisen J, Ottersen OP. Antibodies against amino acid neurotransmitters. In: P. Panula, H. Paivarina, S. Soinila (eds): Neurohistochemistry: Modern methods and applications. 1986; 107-136.
44. Fiala JC., Spacek J., Harris KM. Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders? Brain Res Reviews 2002; 39:29-54.
45. W.E. Kaufmann, H.W. Moser. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation, Cereb. Cortex. 2000; 10:981-991.
46. Fiala JC., Feinberg M., Popov V., Harris KM. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. J. Neurosci. 1998; 18:8900-8911.
47. Üzüm G. Epileptik nöbet oluşumunda hücresel mekanizmalar. İst. Tıp Fak. Mecmuası 1998; 61(4):512-516.
48. Adams, R.D., Victor, M.: Principles of neurology. 1989; p.258.
49. Öztaş, B.: Konvulsiyonların etyopatogenezine nöron düzeyinde yaklaşım Nöropsikiyatri arşivi XXIII/1-2 1986.
50. Walton, N.Y., Gunawan, S., Treiman, D.M.: Brain amino acid concentration changes during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. Exp Neurol. 1990; 108:61-70.
51. Chapman, A.G., Meldum, B.S., Siesjo, B.K. Cerebral metabolic changes during prolonged seizures in rats. J Neurochem. 1977; 28:1025-1035.

52. Cain, D.H., Boon, P., Bevan, M.: Failure of aspartame to affect seizure susceptibility in kindled rats. Neuropharmacology. 1989; 28:433-435.
53. Durlach J., Poenaru S., Rouhani S., Bara M., Guiet-Bara A. The control of central neurol. Hyperexcitability in Magnesium Deficiency. Nutrients and Brain Function. 1987; p48.
54. Engel, J.Jr., Kuhl, D.E., Phelps, M.E., Chandall, P.H. Comparative localization of epileptic foci in partial epilepsy by PCT and EEG. Ann Neurol. 1982; 12:529-537.
55. Green, J.D., Petsche, H. Hippocampal electrical activity. IV. Abnormal electric activity. Electroencephalogr. Clin Neurophysiol. 1961; 13:868.
56. Bonnet, U., Bingmann, D. GABA-responses of CA3 neurones at epileptogenic threshold concentrations of convulsants. Neuroreport 1993; 4:715-718.
57. Lockman LA. Absence, myoclonic and atonic seizures. Pediatr Clin North Am. 1989; 36:331-343.
58. Snead OC, Hosey LC. Exacerbation of seizures in children by carbamezepine. N Engl J Med. 1985; 313:916-921.
59. Snead lll OC. Basic mechanisms of generalized absence seizures. Ann Neurol. 1995; 37:146-157.
60. Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A. Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg - a review. J Neurol. 1992; 35:37-70.
61. Coenen AM, Drinkenburg WH, Inoue M, Van Luijtelaar EL. Genetic models of absence epilepsy, with emphasis on the WAG/Rij strain of rats. Epilepsy Res. 1992; 12:75-86.
62. Marescaux C, Vergnes M. Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg (GAERS). Ital J Neurol Sci. 1995; 16:113-118.
63. Micheletti G, Vergnes M, Marescaux C, Depaulis A, Rumbach L, Warter JM. Antiepileptic drug evaluation in a new animal model: spontaneous petit mal epilepsy in the rat. Arzneim-Forsch. 1985; 35:483-485.

64. Marescaux C, Micheletti G, Vergnes M, Depaulis A, Rumbach L, Warter JM. A model of chronic spontaneous petit mal-like seizures in the rat: Comparison with pentilenetetrazol-induced seizures. Epilepsia. 1984; 25:326-331.
65. Vergnes M, Marescaux C, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM. Spontaneous spike and wave discharges in Wistar rats: A model of genetic generalized nonconvulsive epilepsy. In: Avoli M, Gloor P, Kostopoulos G, Naquet R. (eds.) Generalized epilepsy. London: Birkháuser. 1990; 238-253.
66. Vergnes M, Marescaux C. Pathophysiological mechanisms underlying genetic absence epilepsy in rats. In: Idiopathic Generalized Epilepsies: Clinical, Experimental and Genetic Aspects (Malafosse A, Hirsch E, Marescaux C, Broglin D, Bernasconi R, Eds.). 1994; pp. 151-168, Libbey, London.
67. Vergnes M, Marescaux C, Boehrer A, Depaulis A. Are rats with genetic absence epilepsy behaviorally impaired? Epilepsy Res 1991; 9:97-104.
68. Vergnes M, Marescaux C, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM. Spontaneous spike and wave discharges in thalamus and cortex in rat model of genetic petit mal-like seizure. Exp Neurol 1987; 96:127-136.
69. Danober L, Deransart C, Depaluis A, Vergnes A, Marescaux C. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. Prog Neurobiol 1998; 55:27-57.
70. Nehlig A, Vergnes M, Boyet S, Marescaux C. Local cerebral glucose utilization in adult and immature GAERS. Epilepsy Res 1998; 32:206-212.
71. Nehlig A, Vergnes M, Marescaux C, Boyet S. Mapping of cerebral energy metabolism in rats with genetic generalized nonconvulsive epilepsy. J Neural Transm 1992; 35(Suppl):141-153.
72. Richards DA, Morrone LA, Bowery NG. Hippocampal extracellular amino acids and EEG spectral analysis in a genetic rat model of absence epilepsy. Neuropharmacology 2000; 39:2433-2441.

73. Olsen RW. Progress in epilepsy research, GABA and epileptogenesis. Epilepsia 1997; 38:399-407.
74. Vergnes M, Marescaux C, Micheletti G et al. Enhancement of spike and wave discharges by GABA mimetic drugs in rats with spontaneous petit-mal epilepsy. Neurosci Lett. 1984; 44:91-94.
75. Engel J. Concepts of epilepsy. Epilepsia 1995; 36(suppl 1):S23-29.
76. Dreifus FE, Mattson RH, Meldrum BS et al. eds. (1995) Antiepileptic drugs. 4th ed. New York: Raven Press.
77. Shieds WD, Saslow E. Myoclonic, atonic and absence seizures following institution of carbamazepine therapy in children. Neurology 1983; 33:1487-1489.
78. Meldrum BS (1994) The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. Neurology 44:14-23.
79. Browning RA, Wang C, Lanker ML, Jobe PC. Electroshock and pentylenetetrazol-induced seizures in genetically epilepsy-prone rats (GEPRs): Differences in threshold and pattern. Epilepsy Res 1990; 6:1-11.
80. Franck JE, Ginter KL, Schwartzkroin PA. Developing genetically epilepsy-prone rats have an abnormal seizure response to flurothyl. Epilepsia 1989; 30:1-6.
81. Jobe PC, Mishra PK, Adams-Curtis LE, Ko KH, Dailey JW. The GEPR model of the epilepsies. In: Idiopathic Generalized Epilepsies: Clinical, Experimental and Genetic Aspects (Malafosse A, Hirsch E, Marescaux C, Broglin D, Bernasconi R, Eds.), 1994; pp. 385–398. Libbey, London.
82. Faingold CL, Li Y, Evans MS. Diminished GABA-A receptor-mediated inhibition in the inferior colliculus may subserve audiogenic seizure susceptibility. Epilepsia 1998; 39(S6):37.
83. Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Osvaldo G. Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: Antagonism by MK-801. J Pharmacol Exp Ther 1992; 262:792-800.

84. Chagnac-Amitai Y, Connors BW. Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. J Neurophysiol 1989; 62: 1149-1162.
85. Luhmann HJ, Prince DA. Control of NMDA receptor-mediated activity by GABAergic mechanisms in mature and developing rat neocortex. Dev Brain Res 1990; 54: 287-290.
86. Vergnes M, Boehrer A, Reibel S, Simler S, Marescaux C. Selective susceptibility to inhibitors of GABA synthesis and antagonists of GABA-A receptor in rats with genetic absence epilepsy. Exp Neurol 2000; 161:714-723.
87. Brailowsky ST, Montiel A, Boehrer C, Marescaux, Vergnes M. Susceptibility to focal and generalized seizures in Wistar rats with genetic absence-like epilepsy. Neuroscience 1999; 93:1173-1177.
88. Gloor P, Fariello RG. Generalized epilepsy: Some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. Trends Neurosci 1988; 11:63-68.
89. Fromm GH. Role of inhibitory mechanisms in staring spells. J Clin Neurophysiol 1986; 3:297-311.
90. Myslobodsky MS. Petit mal epilepsy: Too little or too much GABA? In: Neurotransmitters, Seizures, and Epilepsy II (Fariello RG et al.,Eds.), 1984; pp. 337-345, Raven Press, New York.
91. Marangoz C. Deneysel epilepsi modelleri O.M.Ü. Tıp Der. 1997; 14(3):147-186
92. Ribak CE. Epilepsy and the cortex: anatomy. In: Peters A (Ed). Cerebral cortex. Vol. 9. New York, Plenum, 1991: 427-483.
93. Racine RJ and Burham WM The kindling model. In: Schwartzkroin PA, Wheal H (Eds). Electrophysiology of Epilepsy. London. Academic Press, 1984: 153-171.
94. Sato M, Racine RJ, and McIntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. Electroenceph Clin Neurophysiol 1990; 76:459-472.

95. Marangoz C. Nitrik oksit ve deneysel epilepsi O.M.Ü. Tıp Der. 1996; 13:165-183.
96. Gale K., Browning RA. Anatomical and neurochemical substrates of clonic and tonic seizures. In: Dichter MA. (ed), Mechanisms of epileptogenesis. The transition to seizures. Plenum Press, New York, 1988; 1111-1152.
97. Lothman EW., Stringer JL., Bertram EH. The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. The dentate gyrus and its role in seizures. Epilepsy Res. 1992; 7:301-313.
98. Brown JW. Structural substrates of seizure foci in the human temporal lobe. In: Epilepsy, its phenomena in man, edited by MAB. Brrazier. 1973;337-374.
99. Bertram EH. Neuronal circuits in epilepsy: Do they matter? Experimental Neurology 2013; 244:67-74.
100. Geller EB., Lancman ME., Van Ness PC., Dinner DS. Coexistence of generalized and partial epilepsies. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1995; 95:17p.
101. Jeha LE., Morris HH., Burgess RC. Coexistence of focal and idiopathic generalized epilepsy in the same patient population. Seizure 2006; 15(1):28-34.
102. Grosso S., Galimberti D., Gobbi G., Farnetani M., Di Bartolo RM., Morgese G., Balestri P. Typical absence seizures associated with localization-related epilepsy: a clinical and electroencephalographic characterization. Epilepsy Res 2005; 66(1-3):13-21.
103. Babb TL., Kupfer WR., Pretorius JK., Crandall PH., Levesque MF. Synaptic reorganisation by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. Neuroscience, 1991; 42(2):351-363.
104. Sirvanci S, Meshul CK, Onat F, San T. Immunocytochemical analysis of glutamate and GABA in hippocampus of genetic absence epilepsy rats (GAERS). Brain Res. 2003; 988:180-188.
105. Akakın D., Sirvancı S., Gurbanova A., Aker R., Onat F., San T. Ultrastructural GABA immunocytochemistry in the mossy fiber terminals of Wistar and

genetic absence epileptic rats receiving amygdaloid kindling stimulations. Brain Res 2011; 101-108.

106. Pierce JP., Milner TA. Parallel increases in the synaptic and surface areas of mossy fiber terminals following seizure induction. Synapse. 2001; 39:249-256.
107. Hillman DE, Chen S. Reciprocal relationship between size of postsynaptic densities and their number: constancy in contact area. Brain Res. 1984; 295:325-343.
108. Hillman DE, Chen S.Compensation in the number of presynaptic dense projections and synaptic vesicles in remaining parallel fibres following cerebellar lesions. J Neurocytol. 1985; 14:673-687.
109. Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1971; 30:75-90.
110. Olney JW., Rhee V., Ho. Kainic acid: A powerful neurotoxic analogue of flutamate. Brain Res. 1974; 77:507-512.
111. Sirvanci S, Meshul CK, Onat F, San T. Glutamate and GABA immunocytochemical electron microscopy in the hippocampal dentate gyrus of normal and genetic absence epilepsy rats. Brain Res 2005; 16;1053(1-2):108-115.
112. Kehl SJ., McLennan H. An electrophysiological characterisation of inhibitions and postsynaptic potentials in rat hippocampal CA3 neurons in vitro. Exp. Brain Res. 1985; 60:299-308.
113. Janigro D., Schwartzkroin PA. Effects of GABA on CA3 pyramidal cell dendrites in rabbit hippocampal slices. Brain Res, 1988; 453:265-274
114. Claiborne BJ., Amaral DG., Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. J. Comp Neurol 1986; 246:435-458.
115. Frotscher M. Mossy fibres from synapses with identified pyramidal basket cells in the CA3 region of the guinea-pig hippocampus: a combined Golgi-electron microscope study. J Neurocytol 1985; 14:245-259.

116. Soriano E and Frotscher M. Spiny nonpyramidal neurons in the CA3 region of the rat hippocampus are glutamate-like immunoreactive and receive convergent mossy fiber input. J Comp Neurol. 1993; 333:435-448.

117. Sirvancı S. Canıllıoglu Y., Akakın D., Mıdıllıoglu S., Yıldız SD., Onat F., San T. Glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in the mossy fiber terminals of the hippocampus of genetic absence epileptic rats. Turkish Neurosurgery 2011; 21(4):499-503.

118. Meshul CK., Stallbaumer RK., Taylor B., Janowsky A. Haloperidol induced synaptic changes in striatum are associated with glutamatesynapses, Brain Res. 1994; 648:181-195.

119. Moser M.B., Trommald M., Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. Proc. Natl. Acad. Sci. 1994; 12673-12675.

120. Sirvancı S., Midillioglu S., Meshul CK., Onat F., San T. Dendritic spines in the hippocampus of genetic absence epilepsy rats (GAERS): An ultrastructural quantitative analysis. Marmara Medical Journal. 2003; 16(3):195-200.

121. Drakew A., Muller M., GahwilerTBH., Thompsont TSM and Frotscher M. Spine loss in experimental epilepsy: quantitative light and electron microscopic analysis of intracellularly stained CA3 pyramidal cells in hippocampal slice cultures. Neuroscience. 1996; 70(1):31-45

122. Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev 1992; 99(3):582.

123. Getova D.,Bowerya NG. Effects of GABAB receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. European Journal of Pharmacology 1997; 320(1):9-13.

124. Melø TM., Sonnewald U., Touret M., Nehlig A. Cortical glutamate metabolism is enhanced in a genetic model of absence epilepsy. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2006; 26:1496-1506.

125. Nehlig A, Vergnes M, Marescaux C, Boyet S, Lannes B Local cerebral glucose utilization in rats with petit mal-like seizures. Ann Neurol. 1991; 29:72-77.
126. Nehlig A, Vergnes M, Boyet S, Marescaux C. Local cerebral glucose utilization in adult and immature GAERS. Epilepsy Res. 1998; 32:206-212.
127. Farias PA., Low SQ., Peterson GM., Ribak CE. Morphological evidence for altered synaptic organization and structure in the hippocampal formation of seizure-sensitive gerbils. Hippocampus. 1992; 2:229-245.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	57.2012.mcf
	PROJE ADI	Kindling uyarısı alan genetik absans epilepsili sıçanlarda hipokampal mossy terminallerinde elektron mikroskopik GABA değerlendirilmesi
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç.Dr. Serap ŞİRVANCI
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	M.Ü Tıp Fak.
	DESTEKLEYİCİ	.....

KARAR BİLGİLERİ	Tarih :
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	**Uzmanlık Dalı**	**Kurumu / EK Üyeliği**	**Onaylanan Proje ile İlişkisi**	**Toplantıya katılım**	**İmza**
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	. Var . Yok	. Evet . Hayır	
Prof.Dr. İnci ALİCAN	Fizyoloji	Yürütücü Sekreteri	. Var . Yok	. Evet . Hayır	
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi	. Var . Yok	. Evet . Hayır	
Doç.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü Tıp Fakültesi	. Var . Yok	. Evet . Hayır	YÜRÜTÜCÜ
Doç.Dr. Hasan Raci YANANLI	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	. Var . Yok	. EVET . HAYIR	
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	. Var . Yok	. Evet . Hayır	
Öğr. Gör.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	. Var . Yok	. Evet . Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	. Var . Yok	. Evet . Hayır	
Billur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	. Var . Yok	. Evet . Hayır	