

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENETİK ABSANS EPİLEPSİLİ SIÇANLARIN KORTİKAL BEYİN
BÖLGELERİNDE KALSİYUM BAĞLAYAN PROTEİNLERİN İNCELENMESİ**

Sertan ARKAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Fizyoloji Doktora Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

**KOCAELİ
2017**

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENETİK ABSANS EPİLEPSİLİ SIÇANLARIN KORTİKAL BEYİN
BÖLGELERİNDE KALSİYUM BAĞLAYAN PROTEİNLERİN İNCELENMESİ**

Sertan ARKAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Fizyoloji Doktora Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

1. Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARSON
2. Danışman: Doç. Dr. Özlem AKMAN

**Kocaeli Üniversitesi,
Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon (BAP) Birimi
Proje No: 2014/63**

KOÜ HADYEK 8/1-2014

**KOCAELİ
2017**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

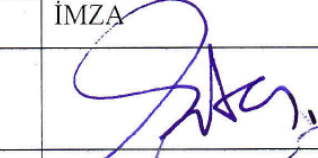

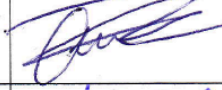
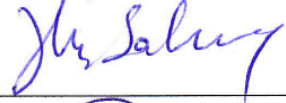
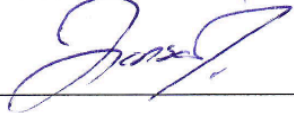
Tez Adı: Genetik Absans Epilepsili Sıçanların Kortikal Beyin Bölgelerinde Kalsiyum Bağlayan Proteinlerin İncelenmesi

Tez yazarı: Sertan ARKAN

Tez savunma tarihi: 15.06.2017

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Ayşe KARSON

Bu çalışma sınav kurulumuz tarafından Fizyoloji anabilim dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN Prof.Dr.	Nurbay ATEŞ	
ÜYE (DANIŞMAN) Doç.Dr.	Ayşe KARSON	
ÜYE (DANIŞMAN) Doç.Dr.	Özlem AKMAN	
ÜYE Doç.Dr.	Deniz ŞAHİN	
ÜYE Doç.Dr.	O. Tansel KORKMAZ	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../05/2017

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Amaç: Absans epilepsi idiyopatik jeneralize epilepsiler sınıfında yer alan bir epilepsi tipidir. Absans epilepsi ile ilgili deneysel çalışmalar daha çok genetik absans epilepsili sıçan modelleri üzerinde gerçekleştirilmektedir. Bu modellerden biri de WAG/Rij ırkı inbred sıçanlardır. Son zamanlardaki çalışmalar, bu sıçanların somatosensöriyel kortekslerinde aşırı uyarılabilir bir odağın varlığı gösterilmiştir. Kortekste oluşan bu aşırı uyarılabilir odağın oluşum nedeni, hücresel ve moleküler özellikleri tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte kortikal GABAerjik sistemde meydana gelen bozulmaların bu odağın oluşumuna katkı sağlayabileceğini düşündüren veriler bulunmaktadır.

Yöntem: Bu çalışmada; temel olarak genetik absans epilepsili WAG/Rij ırkı sıçanların kortikal bölgelerinde GABAerjik nöron belirteci olan ve hücre içi kalsiyumu bağlama özelliği gösteren parvalbumin (PV), calretinin (CL) ve calbindin (CB) proteinlerinin epileptoenez sürecindeki değişimleri incelendi. Bu kalsiyum bağlayan proteinler (CaBP)' in hücresel yoğunluk ve bölgesel dağılım özellikleri sıçanların somatosensöriyel kortekslerinde immünofloresan (IF) boyama ve western blot (WB) yöntemleri kullanılarak araştırıldı.

Bulgular: WAG/Rij ırkı sıçanların SPo1 bölgesini de kapsayan fronto-pariyetal korteksteki PV protein ifadesinde Wistar sıçanlara göre ırka bağlı anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Wistar Albino ırkı sıçanlarda yaşa bağlı olarak bir azalma eğilimi görülmesine rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir.

Sonuç: WAG/Rij ırkı sıçanlarda ise yaşa bağlı bir azalma eğilimi görülmemiştir. Çalışmamızda CaBP'ler ile ilgili en göze çarpan sonuç epileptik gruptaki hayvanların kortikal alanlarında PV miktarında ırka bağlı anlamlı azalma (WB) ve PV pozitif nöron sayısında (IF) görülen azalma eğilimidir. Hem immünblotlama hem de immünfluoresan boyamadan elde edilen sonuçların paralel yönde olması epileptik WAG/Rij sıçanların somatosensöriyel kortekslerinde inhibitör GABAerjik iletinin azaldığını ve bu azalmanın PV içeren nöronlarla sınırlı olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler; WAG/Rij, Epilepsi, Parvalbumin, Calretinin, Calbindin

SUMMARY

Objective: Absence epilepsy is a kind of epilepsy, which is classified idiopathic generalized epilepsies. Experimental studies on absence epilepsy are performed on genetically absence epilepsy rat models. One of these models is WAG/Rij rats, that are inbred rats. Recent studies have shown the existence of hyperexcitable focus in somatosensory cortex of these rats. Cellular and molecular reasons of the formation of this hyper excitable cortical focus remains unknown. However, there is some evidence that GABAergic system deficits might contribute to development of this hyperexcitable focus.

Methods: In this study, we investigate the changes of Parvalbumin, Calretinin and Calbindin proteins, which are neuronal marker, and have intracellular calcium binding properties buffers during epileptogenesis. In our study, we research the cellular density and regional distribution of these calcium binding proteins (CaBPs) in somatosensory cortices of rats by using immunofluorescence (IF) staining and western blot (WB) methods.

Results: PV expression of the SPo1 regions of WAG/Rij rats, including fronto parietal cortex shows a significant decrease, that is depend on strain, compared to Wistar rats. Even though there is a tendency to decrease with age, there is no statistical significance in Wistar rats.

Conclusions: The most striking result of our study related with CaBPs; the amount of PV decrease (WB) in the cortical areas of epileptic animals by depending on strain, and there is tendency to decrease the number of PV positive neuron (IF). The results of both immunoblotting and immunofluorescence staining show that the inhibitor GABAergic conduction is reduced in the somatosensory cortices of epileptic WAG/Rij rats, and that this reduction is limited to the PV containing neurons.

Keywords; WAG/Rij, Epilepsy, Parvalbumin, Calretinin, Calbindin

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince beni her zaman desteklemiş olan bölüm başkanı hocam, Prof. Dr. Nurbay ATES'e,

Doktora eğitimim ve tez çalışmam sırasında bana her türlü çalışma imkanı sunan, her sorunla ilgilenen, her zaman yanımda olan ve cesaretlendiren, bilgisini, tecrübesini paylaşımını ve desteğini hep yanımda hissettiğim, birlikte çalışmaktan ve tanımaktan onur duyduğum değerli danışman hocam, Doç. Dr. Ayşe KARSON'a,

Tezimin önemli bir kısmında beraber çalışma fırsatı yakaladığım ve bilgisini, desteğini ve yardımlarını bana her zaman sunan hocam, Doç. Dr. Özlem AKMAN'a

Uzun yıllar çalıştığım, bilgisi ve hoş görüşü ile çalışmalarına her zaman destek olan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi (DETAB) müdürü ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Tijen UTKAN ve veteriner hekim Cüneyt ÖZER'e

Doktora eğitimim ve tezimin her aşamasında sınırsız yardımlarını, desteğini ve motivasyonu esirgemeyen, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Murat KASAP, Doç. Dr. Gürler AKPINAR ve Yard. Doç. Dr. Aylin KANLI'ya, Klinik araştırmalar biriminde deneylerimi yaptığım süre içerisinde her konuda anlamlı desteğini gördüğüm değerli hocam Doç. Dr. Halime KENAR'a Klinik araştırmalar bulunduğum süre içerisinde, bana her konuda yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Candan YILMAZ ÖZDOĞAN'a, Kübra KARAOSMANOĞLU YÖNETEN'e, Gamze KARA MAĞDEN'e Eylül Ece İŞLEK'e, , Ayimugu ABULA'ya, Mehin ZÜLFİGAROVA'ya Nil GÜZEL'e, Mehmet SARIHAN'a, Mert SELİMOĞLU ve Levent AYDIN'a, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunduğum süre içerisinde birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım, Tuba ŞAHİN, Fazilet DEDE'ye, Alim NURAYDIN'a, Iokhim IPSEFTEL'e ve Fatih HUNÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

ETİK KURUL ONAYI



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



PROJE NO: 2014 /39 BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	WAG/Rij Irkı Sıçanların Kortikal Bölgelerinde Kalsiyum Bağlayan Protein İfadelerinin İncelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Doç.Dr.Ayşe KARSON
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Ar.Gör.Sertan ARKAN, Prof.Dr.Nurbay ATEŞ, Yrd.Doç.Dr.Özlem AKMAN
DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	X
KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararına varılmıştır. KARAR NO: KOU HADYEK 8/1-2014 KARAR TARİHİ:14.10.2014	

ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. İhan TARKUN Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili, Raportör	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deney Hayvanları Araştırma Birimi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç.Dr. Ülkem CİLASUN Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Murat KASAP Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Üye	KOU Deney Hayvanları Araştırma Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

.../05/2017

Sertan ARKAN

SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
ETİK KURUL ONAYI	VII
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
ÇİZİMLER DİZİNİ	XIV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVI
1. GİRİŞ	1
1.1. EPİLEPSİ	1
1.1.1. Epilepsinin Tarihçesi	1
1.1.2. Epilepsinin Tanımı	1
1.1.3. Epilepsinin Sınıflandırılması	2
1.1.4. Absans Epilepsinin Hayvan Modelleri	7
1.1.5. Absans Epilepsi Teorileri	9
1.1.6. Absans Epilepside Patolojik Mekanizmalar	11
1.2. Gamma Aminobütirik Asit (GABA)	14
1.3. KALSİYUM BAĞLAYAN PROTEİNLER	18
1.3.1. Ca ⁺² Bağlayan Bufferlerin Özelliklerini Etkileyen Faktörler	20
1.3.2. Parvalbumin (PV), Calbindin D-28 (CB) ve Calretinin (CR)'nin Beyinde Dağılımları	22
1.3.2.1 Parvalbumin	22
1.3.2.2 Calbindin	23
1.3.2.3 Calretinin	24
2. AMAÇ	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Hayvanlar	27
3.2. Deney Grupları	27
3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar	27
3.4. Cerrahi İşlemler	30

3.4. Western Blot Denevleri	31
3.4.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması	31
3.4.2. Protein Örneklerinin Miktarının Ölçülmesi	31
3.4.3. İmmünblotlama	32
3.4.4. İmmünfloresan Denevleri	33
3.4.5. Histolojik Doğruluma	35
3.5. Verilerin Analizi	36
4. BULGULAR	38
4.1. İmmünblotma Bulguları	38
4.1.1. Parvalbumin	38
4.1.2. Calretinin	39
4.1.3. Calbindin	40
4.2. İmmünfloresan Bulguları	41
4.2.1. Parvalbumin	41
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKÇA	59
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- AMPA : 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionik asit
APS : Amonyum persülfat
Ca⁺² :Kalsiyum
CaBP : Kalsiyum bağlayan proteinler
CaM : Kalmadulin
CB : Calbindin
CCK : Kolesistokinin
cDNA : Komplementer dioksiribonükleik asit
CFM-2 : (1-(4-aminophenyl)-3,5-dihydro-7,8-dimethoxy-4H-2,3-benzodiazepin-4-one)
ChAT : Kolin-asetil tranferans
Cl⁻ : Klor
CNX 36 : Konneksin 36
CR: Calretinin
D2 : Dopamin 2 reseptörleri
DAG : Diaçilgliserol
DDD : Diken dalga deşarjları
DLPFC : Dorsolateral prefrontal korteks
ECoG : Elektrokortiyografi
EDTA : Etilen-diamin-tetraasetik-asit
EEG : Elektroensefalografi
GABA_A R : GABA A reseptörleri
GABA_B R : Gaba B reseptörleri
GABA : Gamma Amino bitürik asit
GAD 65/67 : Glutamik asit dekarboksilaz
GAERS : Genetik absans epileptik rat Strasbourg
GVG : γ -vinyl GABA
HCl : Hidroklorik asit
HCN : siklik nükleitid kapılı katyon kanalları
HRP : horsedish peroksidaz
IGE : İdiyopatik jeneralize epilepsi
ILAE : Uluslararası Epilepsi Savaş Derneği
IMPaz: İnositol monofosfotaz

Ip: Intraperitoneal
IP₃ : İnositoltrifosfat
IPSP : İnhibe edici post sinaptik potansiyeller
K : Potasyum
K⁺ : Potasyum
KCl : Potasyum klorür
Kd : Disasiyasyon Sabiti
Kg : Kilogram
KH₂PO₄ : Monopotasyum fosfat
LTD : Uzun süreli depresyon
LTP : Uzun süreli potansiyasyon
Mg: Magnezyum
mg: milligram
Mg⁺² : magnezyum
mM : milimolar
mRNA : messenger ribonükleik asit
Na⁺ : Sodyum
Na₂HPO₄ : Disodyum fosfat
NaBH₄ : Sodyum borohidrat
NaCl : Sodyum klorür
NaOH : Sodyum hidroksit
NGS : Normal goat serum
NIH : national Health Institute
NMDA_R : N-Metil D-Apsartat reseptörleri
NPY: Nöropeptid Y
PBS : Fosfat tampon çözeltisi
PNN : Perinöral ağlar
PPI : Pre pulse inhibition
PTZ : Pentilentetrazol
PV : Parvalbumin
PVDF : Poliviniliden florid
RTN : Retiküler Talamik Çekirdek
SDS : Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrimalid jel elektroforez

SERCA : Serkoendoplazmikretikulum kalsiyum transport ATPaz

SOM: Somatostatin

SPo1 : Somatosensöriyel Korteks Perioral Bölge

TBS : Tris tampon çözeltisi

TC :Talamo-Kortikal Yolak

THIQ-10c : (N-acetyl-1-(4-chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline)

TLE : Temporal lob epilepsisi

VGB : Vigabatrin

VIP: Vasoaktif İntestinal Peptid

VVA : Vicia Villosa Agglutinin

WAG/Rij : Wistar Albino Glaxo/Rijswick

β -Aktin : Beta aktin

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. İnsan, GAERS ve WAG/Rij ırkı sıçanların EEG kayıtlarında görülen DDD' ler.....	6
Çizim 1.2. WAG/Rij ırkı sıçanlarda görülen bilateral senkronize DDD'ler.....	9
Çizim 1.3. Absans epilepsi teorileri	11
Çizim 1.4. EEG'de görülen senkronize osilasyonlar ve Talamo-kortikal Yolak.....	12
Çizim 1.5. A. Düşük eşikli Ca^{+2} akımı B. Talamo-kortikal yolak C. İnhibe edici post sinaptik potansiyeller (IPSP)	14
Çizim 2.1. GABAerjik nöronların alt grupları.....	15
Çizim 2.2. GABAerjik sistem farmakolojisi ve metabolizması.....	16
Çizim 3.1. EF-Hand proteinlerin yapısı	19
Çizim 3.2. Neokortikal tabakalardaki CaBP'lerin morfolojik yapıları.....	24
Çizim 3.1. Tiyonin asetat boyamaları.....	36
Çizim 4.1. Parvalbumin ve kontrol grubuna ait protein bantları.....	37
Çizim 4.2. 2 ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki Parvalbumin miktarlarının normalize edilmiş miktarları.....	38
Çizim 4.3. Calretinin ve kontrol grubuna ait protein bantları.....	38
Çizim 4.4. 2 ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki CR miktarlarının normalize edilmiş miktarları.....	39
Çizim 4.5. Calbindin ve kontrol grubuna ait protein bantları	39
Çizim 4.6. 2 ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki CB miktarlarının normalize edilmiş miktarları.....	40
Çizim 4.7. 2 ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki PV içeren hücre sayısı.....	41
Çizim 4.8. 2 Aylık Wistar ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerine ait PV ve GABA görüntüleri.....	42
Çizim 4.9. 2 Aylık WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerine ait PV ve GABA görüntüleri.....	43
Çizim 4.10. 8 Aylık Wistar ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerine ait PV ve GABA görüntüleri.....	44
Çizim 4.11. 8 Aylık WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerine ait PV ve GABA görüntüleri.....	45
Çizim 4.12. PV ve GABA antikollarına ait pozitif kontrol görüntüleri.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Epilepsinin sınıflandırılması.....	2
Çizelge 1.2. İdiyopatik Jeneralize Epilepsiler.....	6
Çizelge 1.3. Absans epilepsili araştırılmasında kullanılan farklı hayvan modelleri.....	7
Çizelge 2.1. GABAerjik sistemi etkileyen ilaçların absans epilepsi üzerine etkileri.....	18
Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan sıçan türleri ve sayıları.....	27
Çizelge 3.2. Deneylerde kullanılan solüsyonlar.....	27
Çizelge 3.3. İmmünblotlamada kullanılan birincil ve ikincil antikor dilüsyonları.....	33
Çizelge 3.4. İmmünblotlama deneylerindeki basamaklar.....	33
Çizelge 3.5. Birincil ve ikincil antikor dilüsyonları.....	34
Çizelge 3.6. İmmünofloresan boyamada kullanılan malzemeler.....	34
Çizelge 3.7. Tiyonin asetat boyama protokolü.....	35
Çizelge 4.1. Wistar ve WAG/Rij sıçanlarda somatosensöriyal kortekste tespit edilen PV miktarı.....	37
Çizelge 4.2. Wistar ve WAG/Rij sıçanlarda somatosensöriyal kortekste tespit edilen CR miktarı.....	38
Çizelge 4.3. Wistar ve WAG/Rij sıçanlarda somatosensöriyal kortekste tespit edilen CB miktarı	39
Çizelge 4.4. Wistar ve WAG/Rij sıçanlarda somatosensöriyal kortekste tespit edilen PV miktarı	40

1. GİRİŞ

1.1. EPİLEPSİ

1.1.1. Epilepsinin Tarihçesi

Epilepsi genellikle tekrarlayan nöbetlerin görüldüğü kendine has özelliklere sahip olan tıbbi bir bozukluk veya bozukluklardır. Epilepsi kelimesi yakalanmak, tutulmak “seizure ya da seize upon” anlamına gelen Yunan ve Latin kökenli kelimelerden köken almaktadır. Epileptik bozuklukların antik dönemlerden beri görülen bir durum olduğu düşünülmektedir. Epilepsi ile alakalı olarak bilinen en eski kayıtlar Londra’da bulunan İngiltere Ulusal Müzesi’nde sergilenmekte olan ve yaklaşık olarak 3000 yıl önce Babylonlar tarafından yazılan *Sakikku* (Bütün hastalıklar) adlı eserde yer almaktadır. Babylonların günümüzde tonik-klonik, absans, drop atak, basit ve kompleks parsiyel nöbetleri hatta fokal motor (*Jacksonian*) ve *gelastic* atakları tanımladıkları düşünülmektedir. Antik dönemlerde, doğa üstü güçlerin bedeni ele geçirerek epileptik nöbetlerin oluşumuna neden olduğu ve dolayısıyla tedavisinin şeytan çıkarma gibi çok ruhani yöntemler kullanılarak yapıldığı düşünülmektedir (Global campaign against epilepsy, 2005).

1.1.2. Epilepsinin Tanımı

Epilepsi, dünyada en çok karşılaşılan nörolojik bozukluklardan biridir. Toplumda görülme sıklığı yaklaşık %1 oranında olup, başlıca çocuklar ve yaşlı bireylerde görülmesine rağmen, cinsiyet, ırk, sınıf ve coğrafi etken farkı olmaksızın bütün yaş gruplarını etkilemektedir. Uluslararası Epilepsi Savaş Derneği (ILAE), epilepsiyi “epileptik nöbetler yaratmaya eğilimli ve nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal etkileri olan bir beyin bozukluğu” olarak tanımlamaktadır. Epilepsi tek bir tür hastalık olmayıp, farklı etiyolojik kökenlere sahip olan hastalıklar grubudur. Kafa travmaları, beyin tümörleri, beyin kanaması, enfeksiyonlar ve kalıtsal-genetik mutasyonlara bağlı olarak epilepsi hastalığı gelişebilmektedir. Epilepside görülen nöbetler ise “beyinde nöronların aşırı anormal aktivite göstermeleri veya senkronize aktivitelerden ötürü geçici süreli semptom ve/veya işaretlerin oluştuğu durum” olarak tanımlanmaktadır. Epileptik nöbetler sırasında oluşan bu semptomlar; kısa süreli bilinç kaybından aşırı konvulsif nöbetlere kadar çok farklı derecede olabilmektedir. Epilepsinin tedavisinde daha çok farmakolojik

ajanlar kullanılmakla birlikte nadiren de olsa cerrahi yöntemler tercih edilebilmektedir (Fisher 2005, Seino 2006, Reynolds 2002).

1.1.3. Epilepsinin Sınıflandırılması

Epilepsinin sınıflandırılması geçmişten günümüze kadar sürekli olarak tartışılmaktadır. Uluslararası Epilepsi Savaş Derneği (Shorvon 2011) tarafından resmi olarak tavsiye edilen ve en yaygın kullanılan sınıflandırmaya göre (**Çizelge 1.1**); epilepsi nöbet biçimlerine göre jeneralize ve parsiyel nöbetler olmak üzere iki temel kategoriye ayrılmaktadır (Pikane ve diğ. 2006).

Çizelge 1.1. Epilepsinin sınıflandırılması (Shorvon 2011)

Ana Grup	Alt Grup	Örnek
İdiyopatik Epilepsiler	Tek gen bozukluğundan kaynaklanan epilepsiler	İyi huylu ailesel yeni doğan konvülsiyonlar Otozomal dominant nocturnal frontal lob epilepsi Febril nöbetlerin eşlik ettiği jeneralize epilepsi Çocukluk dönemi şiddetli myoklonik epilepsi Ailesel iyi huylu yetişkin myoklonik epilepsi
	Kompleks kalıtmı epilepsiler	İdiyopatik jeneralize epilepsi ve alt türleri İyi huylu çocukluk dönemi parsiyel epilepsiler West Sendromu
Semptomatik Epilepsiler	Çocukluk çağı epilepsi sendromları	Lennox-Gastaut Sendromu
Genetik veya Gelişimsel nedene dayananlar	İlerleyici myoklonik epilepsiler	Unverricht-Lundborg hastalığı Dentato-rubro-pallidoluysian atrofisi Lafora body hastalığı Mitokondriyel sitopati Sinirsel seroid lipofuskinosis Myoklonus renal yetmezlik sendromu
	Nörokutanöz sendromlar	Tuberöz skleroz Nörofibromatozis Sturge-Weber sendromu

	Diğer nörolojik tek gen bozuklukları	Angelman sendromu Lizozomal bozukluklar Nöroakantositozis Organik asidüriler ve peroksisomal bozukluklar Propiyya Pridoksin bağımlı epilepsi Rett sendromu Üre döngüsü bozuklukları Wilson Hastalığı Kobalimin ve folat metabolizması bozuklukları Down sendromu Fragile X sendromu 4p-sendromu İzodisentrik kromozom 15 Ring kromozom 20 Hemimegaensefali
	Gen bozuklukları	Fokal kortikal displazi Agyria-pachygyria-band spektrum Agenesis of korpus kallosum Polimikrogri Şizensefali Periventiküler nodüler heterotopi Mikrosefali Araknoid kist Hipokampal skleroz
	Serebral yapıdalardaki gelişimsel anomaliler	
Kazanılmış nedenlere dayanan epilepsiler	Hipokampal skleroz	
	Perinatal ve infantile	Neonatal nöbetleri Neonatal sonra nöbetler Serebral palsi Aşılama ve immünizasyon Açık kafa yaralanmaları Kapalı kafa yaralanmaları Beyin ameliyatları Epilepsi ameliyatları sonrası epilepsiler Kaza olmayan kafa yaralanmaları
	Serebral Travmalar	
	Serebral tümör	Glioma Ganglioglioma ve hamartoma Disembriyoplastik nöroepitel tümör

		Hipotalamik hamaratoma Meninjioma Sekonder tümörler Viral menenjit ve ensefalit Bakteriyel menenjit ve abseler Sıtma Tüberküloz Aids (HIV)
	Serebral enfeksiyonlar	
	Serebrovasküler bozukluklar	Serebral hemoraj Serebral infarksiyon Dejenaratif damar hastalıkları Arteriovenöz bozulmalar Kavernöz hemanjiyoma Rasmussen ensefalit
	Serebral immünolojik bozukluklar	SLE ve kollojen vasküler bozukluklar İnflamasyon ve immünolojik bozukluklar Alzheimer ve diğer bunamaya bağlı bozukluklar Multiple skleroz ve demiyelinizasyon bozukluklar Hidrosefali ve porencefali
	Dejenaratif ve diğer nörolojik durumlar	Ateş Menstüral döngü ve katameniyal epilepsi Uyku-Uyanıklık döngüsü Metabolik ve endokrin ile indüklenmiş epilepsi Alkol ve toksin ile indüklenmiş epilepsi
Uyarana bağlı epilepsiler	Uyarıcı faktörler	ışığa duyarlı epilepsiler Ürkme ile indüklenen epilepsiler Okuma epilepsileri İşitme ile indüklenen epilepsiler Yeme epilepsileri Sıcak-su epilepsisi Nedeni bilinmeyen epilepsiler
	Refleks epilepsiler	
Kriptojenik epilepsiler		

Parsiyel Nöbetler

Bölgesel (fokal) nöbetler olarak adlandırılmaktadırlar, beyinin herhangi bir noktasında oluşan odak ve/veya odaklardan köken almaktadırlar. Nöbetlerin şiddeti nöbetin olduğu beyin bölgesine bağlı olarak duyuşal girdilerde bozulmalardan, şiddetli kas kasılmalarının görüldüğü konvulsif nöbetlere kadar çok değişik derecelerde olabilmektedir. Parsiyel nöbetler kendi içinde üç alt gruba ayrılmaktadır.

Basit Parsiyel nöbetler : Bilinçte bir bozulma gözlenmez.

Kompleks Parsiyel nöbetler : Sekonder jeneralize nöbetler olarakta bilinmektedirler. Bilinçte bozulmalar gözlenir.

Basit/Kompleks Parsiyel nöbetler: Sekonder jeneralize nöbetlere dönüşebilir (Pikanen ve diğ. 2006).

Jeneralize Nöbetler

Beynin tamamını veya çok büyük bölgesini etkileyen ve her iki beyin yarım küresini etkileyen nöbetlerdir. Nöbetlerin şiddeti absans nöbetlerde görülen kısa süreli bilinç kaybı şeklinde olabileceği gibi, kas kasılmalarının (konvulsiyon) görüldüğü jeneralize tonik-klonik nöbetler görülebilmektedir (Pikanen ve diğ. 2006).

İdiyopatik Jeneralize Epilepsiler

İdiyopatik jeneralize epilepsi başlığı altında toplanan sendromlar hem klinik hem de fizyolojik olarak çok farklı özellikler göstermektedir. Nöbetler, jeneralize özellik (*bilateral veya bilateral multifocal*) göstermelerinden ötürü aynı sınıf altında toplanmaktadırlar. Belirli bir tip idiyopatik jeneralize nöbet tipi (IGE), daha sonra farklı bir nöbet tipine dönüşebilmektedir. Örneğin; çocukluk döneminde absans nöbetler görülen bir hastada, yaşamın daha sonraki döneminde konvulsif nöbet veya juvenil miyoklonik epilepsi görülebilmektedir (Janz 1997). Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte IGE'lerin temelinde kompleks genetik faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir (Ottman 2005). Mevcut ilaçlar ile pek çok hastanın nöbetleri tamamen veya büyük oranda kontrol altına alınabilmektedir (Wolf ve Sandor, 2015).

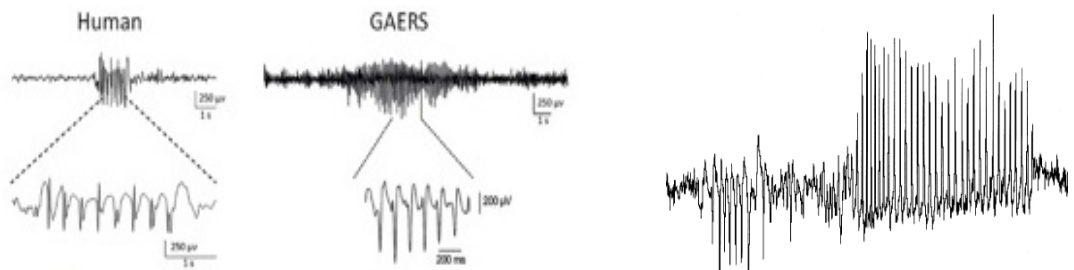
Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) tarafından, idiyopatik jeneralize epilepsiler aşağıdaki gibi sınıflandırmıştır (**Çizelge 1.2**) (Douglas 2005).

Çizelge 1.2. İdiyopatik Jeneralize Epilepsiler (Pikaneen ve diğ. 2006)

İyi huylu (Benign) miyoklonik epilepsiler
Febril nöbetlerin görüldüğü jeneralize epilepsiler
Miyoklonik absansların görüldüğü epilepsiler
Miyoklonik astatik absansların görüldüğü epilepsiler
Çocukluk çağı absans epilepsileri
Juvenil absans epilepsiler
Juvenil miyoklonik epilepsiler
Jeneralize tonik-klonik nöbetlerin görüldüğü epilepsiler

Çocukluk Dönemi Absans Epilepsisi

Petit mal epilepsisi olarakta adlandırılan çocukluk dönemi epilepsisi spontan olarak herhangi bir nedene bağlı olmaksızın nöbetlerin görüldüğü idiyopatik jeneralize epilepsilerdir. Epileptik durumların yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Jallon ve Latour 2005). İdiyopatik epilepsilerde nöbetlerin başladığı herhangi bir beyin bölgesi belli değildir. Nöbetler aniden başlar, bilateral olarak farklı elektroensefalografi (EEG) kanallarından kayıt edilebilecek düzeyde yayılım gösterir ve ani olarak sonlanırlar (Huhges 2009). Absans nöbetler daha çok çocuklarda ve gençlerde görülmektedir (Onat ve diğ. 2013). Genellikle 5-10 saniye süreli nonkonvulsif davranış tutulmaları, dikkat çeken bir bilinç kaybı gözlemlenmekle birlikte hafif bir uyanıklığın söz konusu olduğu ifade edilmektedir (Bayne 2011). Absans epilepsili bir kişinin EEG kayıtlarında 3 Hz dalga boyunda diken dalga deşarjlarının (DDD) (**Çizim 1.1**) yanısıra davranışsal bozulmalar da gözlenmektedir.



Çizim 1.1. İnsan, GAERS ve WAG/Rij ırkı sıçanların EEG kayıtlarında görülen DDD' ler (Depaulis ve Charpier 2017, Pikaneen ve diğ. 2006)

1.1.4. Absans Epilepsinin Hayvan Modelleri

Literatürde absans epilepsi ile alakalı olarak yapılan çalışmalarda çok farklı genetik hayvan modellerinin yanısıra kimyasal ajanlar kullanılarak da absans epilepsinin patolojisine ve tedavisine yönelik çalışmalar mevcuttur (Çizelge 1.3).

Wistar Albino Glaxo from Rijswiks (WAG/Rij) ırkı ve Genetik Absens Epilepsi in Rats from Strasbourg ırkı (GAERS) sıçanlar literatürde yaygın olarak kullanılan hayvan modelleridir (Felix 2002, Akman ve diğ. 2010). Her iki sıçan ırkı da Wistar Albino sıçanlardan köken almaktadırlar. Bu hayvan modellerinin absans epilepsinin tedavisinde kullanılan etosüksimid, valporat ve benzodiazapinler gibi antiepileptik ilaçlara yanıt vermelerinden ötürü idiyopatik jeneralize epilepsilerin araştırılmasında tercih edilen modeller olduğu varsayılmaktadır (Avoli 2012, van Luijtelaar ve diğ. 2002).

Çizelge 1.3. Absans epilepsili araştırılmasında kullanılan farklı hayvan modelleri (Pikanen ve diğ. 2006)

Farmakolojik Modeller				
Model	Tür	Nöbet	DDD Frekansı	Etosüksimide yanıt
Pensilin	Kedi	Enjeksiyondan 1 Saat sonra başlar, 6-8 saat sürer	3 Hz	Var
GHB	Sıçan, Kedi, maymun	Enjeksiyondan 2-5 dk. sonra başlar	7-9 Hz	Var
Genetik Fare Modelleri				
Model	Kromozom Gen Ürünü	Fenotip	DDD Frekansı	Etosüksimide yanıt
Leaner	Kromozom 8/Ca ²⁺	Şiddetli ataksi; DDD	5-7 Hz	Var
Rocker	A _{1A} altünitesi Kromozom 8/Ca ²⁺	Ataksi; DDD	6-7 Hz	Bilinmiyor
Tottering	A _{1A} altünitesi Kromozom 8/Ca ²⁺	Ataksi, motor nöbetler (3 Haftalık); DDD	6-7 Hz	Var
Ducky	A _{1A} altünitesi Kromozom 9/Ca ²⁺	Ataksi, Diskinezi; DDD	6 Hz	Var
Lethargic	A _{1A} B ₂ altünitesi Kromozom 2/Ca ²⁺	Letharji, ataksi, motor koordinasyon kaybı	5-6 Hz	Var

	B ₄ altünitesi	(15.gün); fokal motor nöbet, DDD		
Stargazer	Kromozom 15/Ca ²⁺	Ataksi ve vesitbüler fonksiyonda bozulma, sık ve uzun süreli DDD	6 Hz	Var
Coloboma	G ₂ altünitesi Kromozom 2/SNAP25	Hiperaktivite; DDD	5-6 Hz	Var
Mocha	Kromozom 10/Adaptor benzeri protein kompleksi (AP-3) B altünitesi	Hiperaktivite; DDD	6 Hz	Var
Slow-wave epilepsili fare	Kromozom 4/Na ⁺ /H ⁺ taşıyıcısı(Nhc1)	Ataksi; Tonik-klonik nöbet, DDD	3-4 Hz	Var

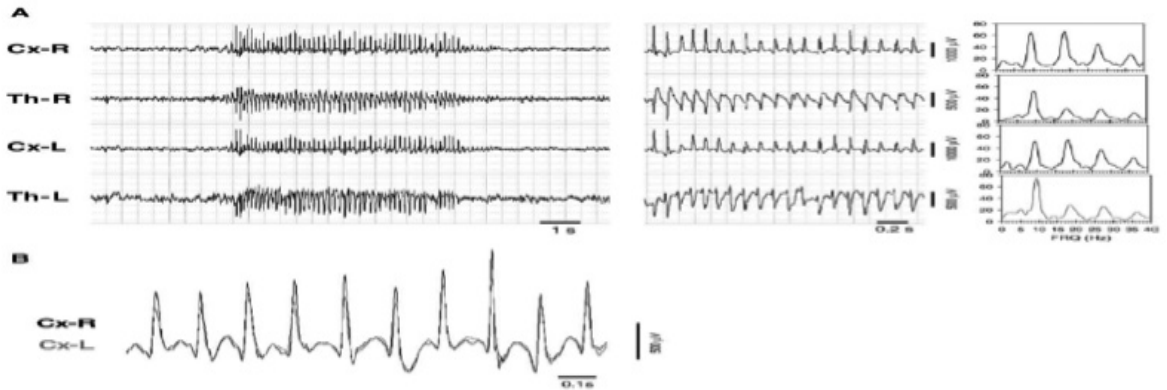
İnbred Sıçan Modelleri

Model	Nöbet görüldüğü yaş	Yaşla birlikte azalma	DDD Frekansı	Etosüksimidyanıt
GAERS	13. hafta	Yok	7-10 Hz	Var
WAG/Rijs	4. ay	Yok	7-11 Hz	Var

WAG/Rij Sıçanlar

Wistar Albino ırkı sıçanlardan köken alan Wistar-Albino-Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) sıçanlar, jeneralize absans epilepsi çalışmaları için geçerliği gösterilmiş bir inbred sıçan türüdür (Coenen ve van Luijtelaar 2003). 2-3 aylık yaş grubuna erişen WAG/Rij ırkı sıçanların kortikal elektroensefalografilerinde (ECoG) senkronize ve iki taraflı 7-11 Hz'lik DDD oluşumlarının yanı sıra, soluk alıp vermede artış, bıyıklarda hafif hareketlenme, kafada hafif salanma ve insanlarda görülen nöbetlere benzer şekilde gözlerde seyirmeler gibi davranışlar ortaya çıkmaktadır (van Luijtelaar ve Sitnikova 2006, van Luijtelaar ve Zobeiri 2014). WAG/Rij ırkı sıçanların nöbetlerinin fenotipi insanlarda görülen absans epilepsideki nöbetlerden bazı noktalarda farklılık gösterir. Absans epilepsi genellikle çocukluk çağı epilepsidir; erişkin yaşlara ulaşıldığında ya görülmez ya da farklı bir epilepsi türüne dönüşebilir. Buna karşılık, WAG/Rij ırkı sıçanlarda nöbetler, puberte (P 50) ile birlikte görülmeye başlar ve 6 aylık yaş grubunda tam olarak olgunlaşır. Absans epilepsili insanlarda görülen diken dalga deşarjları 3 Hz iken WAG/Rij ırkı sıçanlarda görülen diken dalga deşarjları 7-11 Hz'dir. Bu durumun temelinde kemirgenler ile insan

beyini arasındaki anatomik ve fizyolojik farklılıkların yattığı düşünülmektedir (Coenen and van Luijtelaar 1987). DDD'ler bilateral ve simetrik, böylece bütün kortekse yayılım gösterirler (**Çizim 1.2**). Frontal kortikal bölgeler parietal kortikal bölgelere kıyasla daha fazla ve yüksek genlikli DDD'lere sahiptirler (Midzianovskaia ve diğ. 2001). WAG/Rij ırkı sıçanlarda görülen nöbetler insanlarda olduğu gibi sıklıkla pasif uyanıklık ile hafif yavaş dalga uykusunda görülmektedir (van Luijtelaar ve Zobeiri 2014). WAG/rj ırkı sıçanlarda absans nöbetlerle birlikte depresyon geliştiği gösterilmiştir, bu nedenle depresyonun da eşlik ettiği bir epilepsi modeli olarak da düşünülmektedir (Sariskova ve ark 2010, Russo ve diğ. 2011a, Sarkisova ve van Luijtelaar 2011). Son yıllarda, WAG/Rij ırkı sıçanlar kullanılarak gerçekleştirilen patojenez çalışmalarının sayısının artmış olması, bu hayvan ırkının kullanımının absans epilepsiye yönelik farmakolojik çalışmalar ile sınırlı olmayıp epileptojenez sürecinin araştırılmasında da uygun bir deney modeli olduğunu göstermektedir (Blumenfeld ve diğ. 2008, Giblin ve Blumenfeld 2010, White ve Loscher 2014).

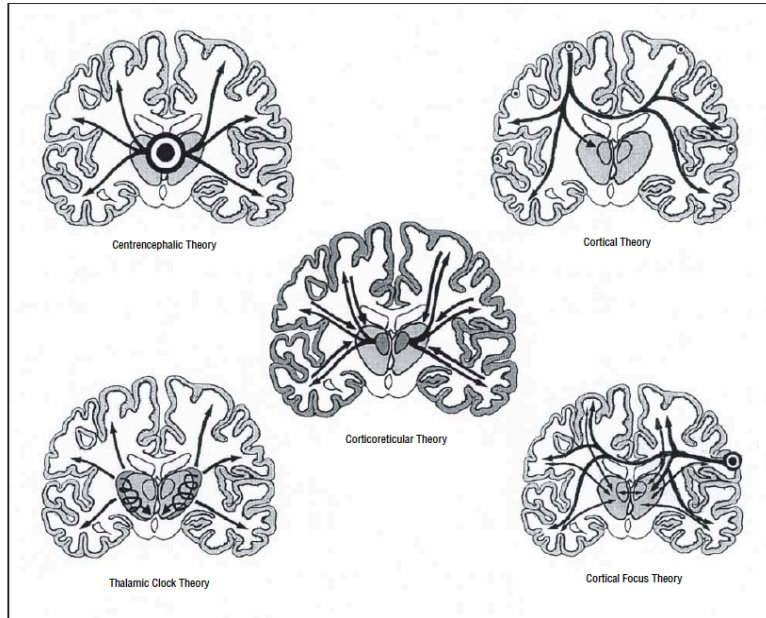


Çizim 1.2. WAG/Rij ırkı sıçanlarda görülen bilateral senkronize DDD'ler (Meeren ve diğ. 2009)

1.1.5. Absans Epilepsi Teorileri

Jeneralize absans nöbetlerinin oluşum mekanizmalarıyla ilgili olarak günümüze kadar farklı görüşler ileri sürülmüştür. 1954 yılında ileri sürülen “senterensefalik” teoriye göre; deşarjların talamusun orta hat (midline) bölgesinde yer alan subkortikal *pacemaker* hücrelerden köken aldığı ileri sürülmüştür (Penfield ve Jasper 1954). 1991 yılında bu hipotez biraz daha farklı bir şekilde yorumlanarak “*talamik clock*” teorisi ileri sürülmüştür. Bu teoriye göre; retiküler talamik çekirdeklerde yer alan *pacemaker* hücrelerin kortekste deşarjlara neden olduğu düşünülmüştür (Buzsaki 1991). 1968 yılında;

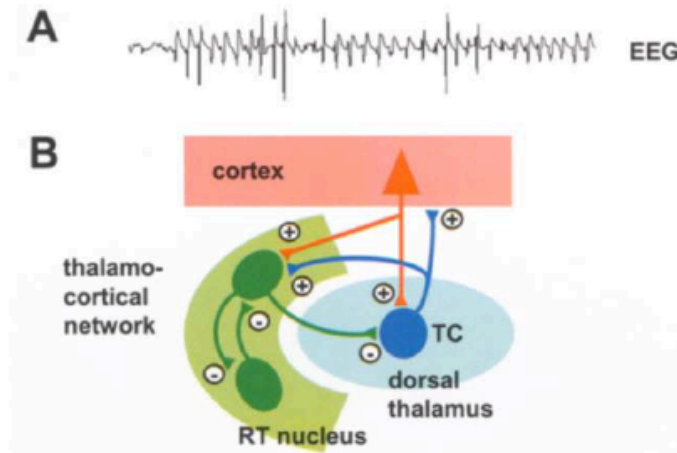
absans nöbetlerin elektrofizyolojik fenomenleri olan DDD'lerin kortekste oluşan bir odaktan köken aldığı ve uyku içciklerinin oluşumunda da rol oynayan talamokortikal yolağı etkileyerek absans nöbetlerin oluştuğunu savunan "kortiko-retiküler" teori ileri sürüldü. Bu teoriye göre; korteks aşırı uyarılabilir hale geldiğinde talamusta oluşan ritmik osilasyonların diken dalga deşarjlarına dönüştüğü ileri sürmektedir (Gloor 1968). Bir grup araştırmacı tarafından, absans nöbetlerin oluşumunda korteksin önemli bir rol oynadığı ve DDD'lerin kortekste fokal olarak başlayıp daha sonra bütün kortekse yayıldığı ileri sürülmüştür (kortikal teori) (Bancaud 1969, Lüders 1984, Niedermeyer 1972). 2002 yılında epileptik sıçanlar kullanılarak yapılan bir çalışmada; DDD'lerin oluşması için fonksiyonel intakt bir talamokortikal yolağın olması gerektiğini ortaya koyulmuştur. Korteks ve talamus arasındaki etkileşimler non-linear bağlantı sinyali analizi kullanılarak araştırılmıştır. Bu analizler sonucunda; somatosensöriyel korteksin perioral (SPo1) bölgesinde bir odak oluştuğu, bu odaktan nöbet aktivitesinin bütün kortekse yayıldığı gösterilmiştir. Nöbetin başlangıcında korteksin talamusu uyardığı daha sonraki süreçte ise korteks ve talamus birbirini karşılıklı olarak etkileyerek ritmik deşarjların yükseltgenmesini ve devamlılığın sağladığı gösterilmiştir. Absans nöbetlerin oluşumunda korteks ile talamus arasındaki etkileşimi net bir şekilde ortaya koyan bu teoriye "kortikal odak teorisi" denilmektedir (**Çizim 1.3**) (Meeren ve ark. 2002).



Çizim 1.3. Absans epilepsi teorileri (Meeren ve diğ. 2005)

1.1.6. Absans Epilepside Patolojik Mekanizmlar

İnsanlarda ve genetik sıçan modellerinde DDD'ler, daha çok hafif dalga uykusu, ve pasif uyanıklık gibi durumlarda görüldüğü için absans epilepsinin uyku ile alakalı bir bozukluk olduğu düşünülmektedir (Coenen ve van Luijtelaar 2003, Drinkenburg ve diğ. 1991, Lannes ve diğ. 1988). Absans epilepside görülen DDD'lerin talamo-kortikal yolaktan köken aldığı bilinmektedir. Bu yolak fizyolojik uyku içciklerinin oluşumundan da sorumlu tutulmaktadır (Gloor ve Fariello 1988, Kostopoulos 2000, Steriade ve diğ. 1993). Absans nöbetlerin oluşumunda; kortiko-talamo-kortikal yolaktaki nöronların karşılıklı etkileşiminin hipersenkronize osilasyonlara yol açtığı düşünülmektedir. Meeren ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış olduğu çok kanallı elektrotlar kullanılarak yapılan kayıtlar ve nonlinear analizler sonucunda; somatosensöriyel korteksin perioral bölgesinde aşırı uyarılabilir bir odağın varlığını gösterilmiştir. Bu odaktan çıkan uyarıların talamus ve korteks arasında absans epilepside görülen hipersenkronize osilasyonların oluşmasına sebep olduğu düşünülmektedir. (Meeren ve diğ. 2005, Meeren ve diğ. 2002). Talamusun ise DDD'lerin senkronizasyonu ile alakalı olduğu ve kortekste bulunan aşırı uyarılabilir odağın başlatmış olduğu nöbetlerin devamlılığını ve amplifikasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. (Crunelli ve Leresche 2002, McCormick ve Bal 1997, Meeren ve ark. 2005). Özellikle, retiküler talamik çekirdek (RTN) ve diğer talamik çekirdeklerin kendi aralarında oluşturdukları bağlantılar (resonant circuits) aracılığı ile absans nöbetlerin amplifiye olarak yayılım gösterdiği düşünülmektedir. (Çizim 1.5) (Crunelli ve Leresche 2002).



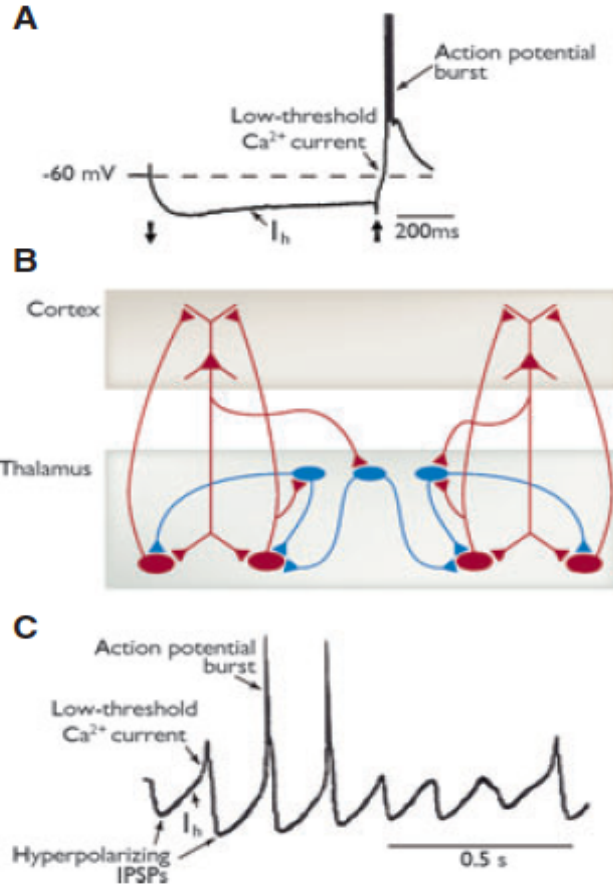
Çizim 1.4. A. EEG’de görülen senkronize osilasyon **B.** Talamo-kortikal Yolak (Pikanen ve diğ. 2006)

Beyinde meydana gelen gelişimsel, yapısal ve fonksiyonel değişimlerin spontan olarak oluşan nöbetlere neden olması ve bu nöbetlerin şiddetini artırarak tekrarlayıcı bir karakter kazanmasını içeren sürece epileptoenez denilmektedir. Günümüzdeki çalışmaların, epileptoenezin oluşumunda en belirgin nedenlerin kafa travmaları ve beyin kanamaları olduğuna dikkat çekmekmesinin yanında başka birçok etmenin epileptoenez sürecine katıldığı düşünülmektedir (Pitkanen ve Engel 2014). Özellikle son zamanlarda moleküler biyolojik tekniklere dayanarak yapılan çalışmalarda, primer jeneralize epilepsilerde iyon kanallarında fonksiyonel değişikliklere yol açan genetik faktörlerin önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir. Deneysel hayvan modelleri kullanılarak spontan epileptik nöbetlerin oluşumuyla ilgili birkaç mekanizma ileri sürülmüştür fakat bu bilgiler oldukça sınırlıdır.

WAG/Rij ırkı sıçanlar incelendiğinde, bu hayvanların ECoG'lerinde interiktal dikenlerin incelenmesi sonucu, epileptoenez süresince oluşan hücresel değişimlerin epileptik bağlantılarda güçlenmelere neden olduğu gösterilmiştir (Lillis ve diğ. 2015, Staley ve diğ. 2005, Staley ve Dudek 2006). Ayrıca, sodyum (Na^+) kanallarının alt tipleri olan $Na_{1.1}$ ve $Na_{1.6}$ kanallarının ifadelerinde bir artış olduğu, nöbetlerin gelişimine bağlı olarak *slow inward rectifier* kanallarının ifadelerinde ise bir azalma olduğu gösterilmiştir. Gözlenen bu değişimlerin absans epilepsideki epileptoenez sürecinin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu bilinmemektedir. WAG/Rij sıçanlar inbred bir ırk oldukları için bütün otozomal genleri ortaktır ve bütün bireyler cinsiyet farkı gözetmeksizin ECoG'lerinde DDDler gösterirler. Bireyler arasında nöbetlerin sayısı ve süresinde farklılıkların olması kalıtımın tek bir gen lokusunda olmadığını ve çevresel ve epigenetik faktörlerin de absans epilepside rol oynadığı düşüncesini desteklemektedir (Schridde ve diğ. 2006, Schridde ve van Luijtelaar, 2004, van Luijtelaar ve Sitnikova, 2006). WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyal kortekslerindeki odakların cerrahi olarak çıkarılmasının DDD'leri tamamen baskıladığı gösterilmiştir (Scicchitano ve diğ. 2015b). Bu durum, kortikal bölgedeki bu odakların belirli bir yaş grubunda ortaya çıkacak biçimde genetik olarak nöbet oluşturma potansiyelinin olduğunu nöbetler oluştuktan sonra talamo-kortikal yolakta değişimleri tetiklediğini düşündürmektedir (Strauss ve diğ. 2004). Yani bu odaklar talamo-kortikal yolaktaki değişimleri tetikleyerek fenotipik olarak bilateral senkronize absans nöbetleri başlatmaktadır. Bu hipoteze dayanarak, sıçanların beyinlerde görülen değişimler bu sürekli olarak aşırı uyarılabilir odaklardan çıkan uyarılara bağlı olduğu düşünülebilir. Önemli olan noktalardan bir tanesi, bu odaktan çıkan uyarıların ne zaman başladığı tespit

edebilmektir.

WAG/Rij ve GAERS ırkı sıçanlarda yapılan çalışmalar, DDD'lerin ilk önce somatosensöriyel kortekste ortaya çıktığını, daha sonra diğer kortikal alanlara ve talamusa yayıldığını göstermektedir. Kortekste patolojik mekanizmanın temelinde, N-Metil D-Apsartat (NMDA_R) reseptörleri aracılı eksitator sinaptik iletide bir artma, inhibitör gamma aminobütirik asit (GABA) iletisinde azalma ve siklik nükleotid kapılı katyon kanallarının (HCN) ifadesinde farklılık olduğu belirtilmektedir. Korteksten köken DDD'ler kortikofokal lifler aracılığı ile talamik retiküler çekirdekteki (RTN) GABAerjik nöronlarda tekrarlayan (yenilenen) patlayıcı türde uyarıcı postsinaptik potansiyellere ve düşük eşikli kalsiyum dikenlerine (LTS) neden olmaktadır. (Slaght ve diğ. 2002, Steriade 1997, Steriade ve diğ. 1993a; Timofeev ve diğ. 1998). Kalsiyum potansiyelleri, hiperpolarizasyonla aktive olan düşük eşik değerli kalsiyum kanallarının aktivasyonu ile oluşan T-akımları aracılığı ile oluşmaktadır (**Çizim 1.4**) (Huguenard, 1996). T-akımlarının büyüklüğü RTN'de bulunan nöronlardaki Cav3.2 kanallarının ifadesindeki artış ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Tsakiridou ve diğ. 1995, Talley ve diğ. 2000). Tamamen GABAerjik özellikte olan RTN'deki nöronlar talamusun eksitator özellik gösteren talamo-kortikal (TC) nöronları ile karşılıklı bağlantılıdır (Steriade ve diğ. 1993b, Steriade ve diğ.1997). TRN'den gelen uyarılar talamustaki relay hücrelerinde GABA_A R ve GABA_B R aracılığıyla inhibe edici özellikte postsinaptik potansiyeller oluşturarak (IPSP) T-tipi kalsiyum (Ca⁺²) akımlarının oluşmasına neden olmaktadır. IPSP'ler sonucunda; talamusta yer alan nonselektif katyon kanalı özelliği gösteren ve hiperpolarizasyon ile aktive olan siklik nükleotid kapılı kanalları (HCN) aracılığı TC nöronlar aktive olur. Bu etkileşimin doğal sonucu olarak kortiko-talamo-kortikal bağlantıda EEG'de görülen DDD'lerin baskın olduğu senkronize patlayıcı deşarjların oluşumuna sebep olmaktadır (Crunelli ve Leresche 2002, Steriade ve diğ. 1993b, Steriade ve diğ. 1997)



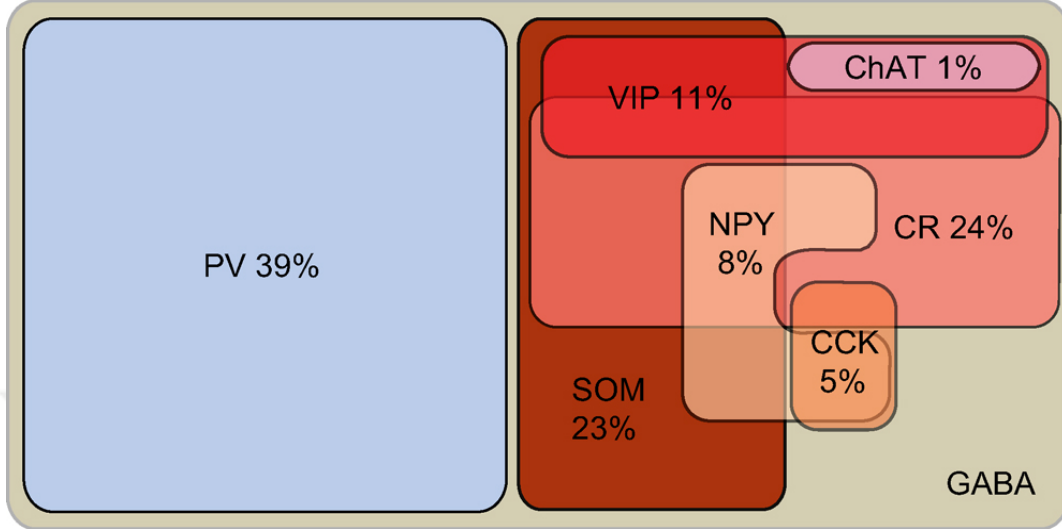
Çizim 1.5. A. Düşük eşikli Ca^{+2} akımı B. Talamo-kortikal yolak C. İnhibe edici post sinaptik potansiyeller (IPSP) (Avoli 2012)

1.2. Gamma Aminobütirik Asit (GABA)

Memeli merkezi sinir sisteminde ana baskılıyıcı nörotransmitter olan GABA'nın en önemli fonksiyonu bütün beyinde nöronal uyarılabilirliği baskılamaktır. 1883 yılında ilk kez sentezlenen GABA'nın başlangıçta sadece bitki ve mikroorganizmaların metabolik ürünleri olduğu düşünülüyordu; fakat, 1950 yılında GABA'nın merkezi sinir sisteminde de bulunduğu gösterilmiştir (Roth ve diğ. 2003). Daha sonraları, GABA'nın bağırsak, mide, pankreas, fallop tüpleri, testis, ovaryum, uterus, böbrek, karaciğer ve akciğer gibi periferdeki organ ve dokularda da bulunduğu tespit edilmiştir (Erdi ve Wolff 1990).

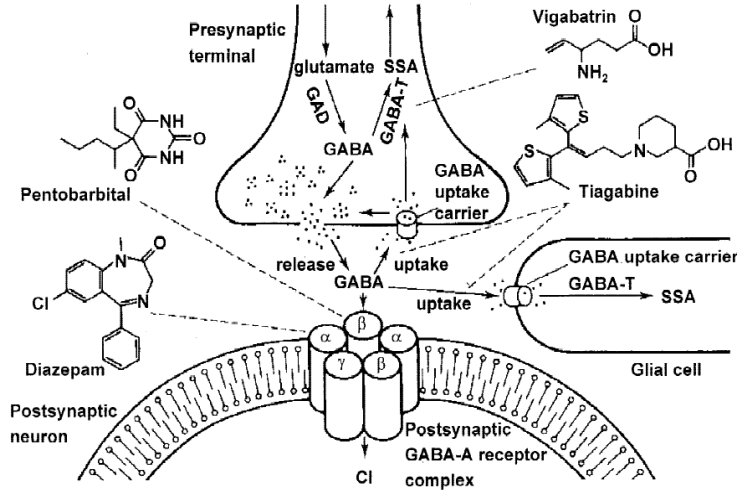
Sinir sistemindeki nöronların çok büyük bir kısmı baskılıyıcı özellikte olan GABA içeren ara nöronlardan oluşmaktadır (**Çizim 2.1**). Pirimidal hücrelere gelen uyarıların şekillenmesi, aşırı uyarılabilirliğin engellenmesi, kortikal reseptif alanın sınırlandırılması, kortikal osilasyonlar olarak da tanımlanan hücresel ritimlerin zamanlaması ve senkronizasyonu gibi pek çok önemli fizyolojik mekanizmalarda GABA

içeren ara nöronlar önemli rol oynamaktadır. GABAerjik sistemde meydana gelen bozulmaların, epilepsi, mental gerilik, otizm ve şizofreni gibi nöro-gelişimsel hastalıklara neden olabileceği literatürde yer almaktadır (Kandel ve diğ. 2013).



Çizim 2.1. GABAerjik nöronların alt grupları (PV: Parvalbumin, VIP: Vasoaktif İntestinal Peptid, SOM: Somatostatin, NPY: Nöropeptid Y, CR: Calretinin, CCK: Kolesistokinin, ChAT: kolinasetil tranferans) (Gonchar ve diğ. 2008)

Glutamat dekarboksilaz enzimi (GAD 65/67) beyinde glutamattan GABA sentezini gerçekleştirmektedir (Schousboe ve Waagepeetersen 2007). GABA etkisini hücre zarında pre-sinaptik ve post-sinaptik olarak bulunan ligand kapılı iyonotropik bir reseptör olan $GABA_A$ R ve G protein bağlı metabotropik özellikteki $GABA_B$ R aracılığı ile göstermektedir. GABA'nın reseptörlerine bağlanması ile hücre içine negatif yüklü bir iyon olan klor (Cl^-) iyonunun girmesi veya pozitif yüklü olan potasyum (K^+) iyonunun hücre dışına çıkması hiperpolarizasyona neden olmaktadır. Sinaptik aralığa salgılanan GABA nörotransmitterinin iki temel sonlandırılma mekanizması vardır. Özelleşmiş GABA taşıyıcıları aracılığı ile GABA'nın hücre içine geri alınması veya GABA'nın yıkıcı enzimi olan GABA transaminaz ile yıkılmasıdır (**Çizim 2.2**) (Kandel ve diğ. 2013).



Çizim 2.2. GABAerjik sistem farmakolojisi ve metabolizması

GABA'nın rol oynadığı fizyolojik ve patofizyolojik mekanizmalar talamo-kortikal yollakta çok sık olarak çalışılmış ve hem GABA'nın hem de reseptörlerinin DDD'lerin oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir. (Snead 1995; van Luijtelaar ve Sitnikova 2006).

GABA-mimetik bir ajan olan tiagabinin farklı dozlarının absans nöbetler üzerine olan etkileri WAG/Rij, GAERS ırkı sıçanlar ve letarjik fareler kullanılarak incelenmiştir ve kullanılan tiagabinin doza bağlı olarak nöbetlerin hem sayısını hem de ortalama süresini arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum konvulsif nöbetlerin görülmediği absans epilepside GABAerjik sistemde bir hiperaktivite olabileceğini düşündürmektedir (van Luijtelaar ve diğ. 2002). Diğer bir GABA-mimetik ve GABA transaminaz inhibitörü olan vigabatrin'nin (VGB) nöbetleri şiddetlendirici (Parker ve diğ. 1998). Vigabatrinin tip 2 DDD'ler üzerine etkileri AC ratlar kullanılarak araştırılmıştır ve tip 2 nöbet sıklığı ve süresinde artışa neden olduğu bulunmuştur (Bouwman ve diğ. 1998). Absans nöbetlerin başlama ve sonlanma mekanizmaları VGB kullanılarak araştırılmıştır ve yüksek düzeylerdeki GABA'nın DDD'lerin sonlanma mekanizmalarını değiştirdiği ve daha uzun nöbetlerin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. γ -vinyl GABA (GVG)'nin GAERS ırkı sıçanlarda DDD'leri artırdığı gösterilmiştir (Liu ve diğ. 1991, Marescaux ve diğ. 1985, Vergnes ve diğ. 1984)

Farmakolojik olarak yapılan bu çalışmalar sonucunda GABAerjik sistemin absans nöbetlerde önemli bir rolünün olduğu net bir şekilde ortaya koyulmuştur. Sistemik olarak verilen GABA agonistlerinin büyük bir kısmının (benzodiazepinler hariç) DDD'leri

artırdığı, antagonistlerin ise baskıladığı ortaya konulmuştur (**Çizelge 2.1**). Ayrıca, GABA'nın sinaptik aralıkta kalma süresinin artırılması da nöbetlerde bir artışa neden olmuştur (Bazyan ve van Luijtelaar 2013).

Yukarıda da değinildiği gibi RTN'deki nöronların ve bu nöronların talamustaki relay çekirdeklere yapmış olduğu bağlantıların absans nöbetlerin oluşumunda ve kontrolünde rol oynadığı yaygın olarak kabul edilen bir görüştür (Hosford ve diğ. 1997; Snead 1992; Snead ve diğ. 1992). TC bağlantıdaki senkronizasyon ve desenkronizasyonlardaki rollerinden ötürü GABA_A R'leri absans epilepsinin patojenezinde önemli bir rol oynamaktadır. WAG/Rij ırkı sıçanların korteks ve talamuslarında GABA_A R fonksiyonlarına ait değişmelerin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, elektrofizyolojik yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinde Wistar ırkı sıçanlara oranla intrakortikal inhibisyonun azaldığı gösterilmiştir (D'Antuono ve diğ. 2006; Luhmann ve diğ. 1995). GAERS ırkı sıçanlarda yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda intralaminar talamik çekirdeklere ve retiküler çekirdeklere GABAerjik sinaptik iletide değişmeler olduğu bulunmuştur (Bessaih ve diğ. 2006). Rostral retiküler çekirdeğe bicucillin verilmesi veya non-kompetetatif 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionik asit (AMPA) reseptör antagonistleri olan CFM-2 (1-(4-aminophenyl)-3,5-dihydro-7,8-dimethoxy-4H-2,3-benzodiazepin-4-one) ve THIQ-10c (N-acetyl-1-(4-chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) somatosensöriyal korteksin perioral bölgesine verilmesi DDD'lerin sayısını ve süresini azaltmıştır (Aker ve diğ. 2006, Citraro ve diğ. 2006a, Tolmacheva ve van Luijtelaar 2007). Talamusun relay çekirdeklerine GABA_A R ve GABA_B R agonistleri verildiğinde, nöbetlerin daha da şiddetlendiği görülmüştür. Talamustaki GABAerjik iletinin güçlenmesi, talamik senkronizasyonun artmasına neden olarak absans nöbetlerin oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Son zamanlarda GAERS ırkı sıçanlarda yapılan deneyler, sistemik olarak verilen GABA_A R antagonistlerinin ön beyin bölgelerinde nöbetlerin oluşumunu kolaylaştırdığını ve GABA_A R antagonistlere karşı aşırı duyarlı olduğu gösterilmiştir (Danover ve diğ. 1998). Kortikal uyarılabilirlikteki bu artış GABAerjik nöronların aktivasyonlarının ve/veya sayılarının azalmasına, veya korteksteki postsinaptik inhibisyonun azalması sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. WAG/Rij ırkı sıçanlarda in-vitro olarak yapılan çalışmalarda, frontopariyatel kortekste intrakortikal aşırı uyarılabilirliğe eşlik eden önemli derece GABAerjik inhibisyonun etkinliğinde azalma görülmüştür (Luhmann ve diğ. 1995). Bu sonuçlar absans epileptik hayvanların

beyinlerindeki GABAerjik sistemi nöbet oluşumu üzerindeki etkisini bölgesel farklılıklar gösterdiğini düşündürmektedir.

Çizelge 2.1. GABAerjik sistemi etkileyen ilaçların absans epilepsi üzerine etkileri (Panayiotopoulos,1999)

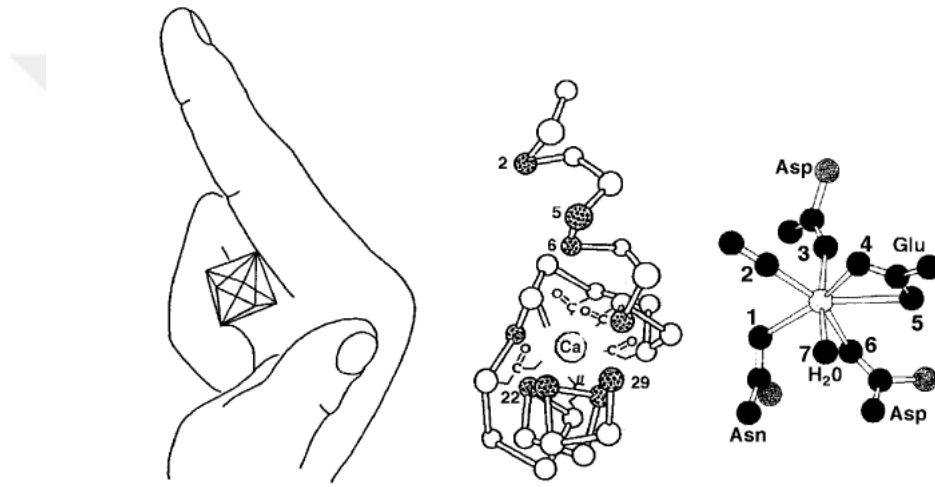
Antiepileptik ilaç	İnsan	Rat Model
Benzodiazepines	Baskılama	Baskılama
Barbiurates	Bifazik etki	Bifazik etki
Valproate	Baskılama	Baskılama
Ethosuximid	Baskılama	Baskılama
Trimethaidione	Baskılama	Baskılama
Carbamazepine	Artırma	Artırma
Phenytoin	Artırma	Artırma
Gabapentin	Artırma	Artırma
Lamotrigine	Baskılama	Etkisiz
Levetiracetam	Baskılama	Baskılama
Pregabalin	Baskılama	Baskılama
Progabide	Etkisiz	Etkisiz
Tiagabine	Artırma	Artırma
Topiramate	Baskılama	Baskılama
Vigabatrin	Artırma	Artırma

1.3. KALSİYUM BAĞLAYAN PROTEİNLER

Kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) hücrel fonksiyonlarda pek çok yaşamsal roller oynayan bir ikincil habercidir. Fertilizasyon, kas kasılması, sinir hücreleri arasında haberleşme, hücre döngüsünün düzenlenmesi, programlanmış hücre ölümü gibi pek çok farklı işlemler, bölgesel ve zamansal olarak Ca^{+2} sinyalleri ile yakından ilişkilidir. (Berridge 1998, Berridge ve diğ. 2013). Nöronlarda kalsiyum sinyalleri intrinsik membran uyarılabilirliği, gen transkripsiyonları, nörotransmitter salgılanması, sinaptik plastisite, uzun süreli potansiyalizasyon (LTP), uzun süreli depresyon (LTD), osilatör aktivite, dendritlerin büyümesi ve dallanması, dendritik spinlerin oluşması gibi morfolojik ve fonksiyonel özelliklerin oluşmasında rol oynamaktadır. Bu kadar önemli rolleri olan Ca^{+2} iyonun hücre zarından geçmesi, sarkoplasmik retikulum ve mitokondri gibi hücre içindeki depolarından salgılanması ve geri alınması amacıyla Ca^{+2} -ATPaz, Na^{+2}/Ca^{+2} zıt taşıyıcı, ve SERCA gibi özelleşmiş moleküller önemli roller oynarlar.

Hücrel proteinler hücre içindeki Ca^{+2} iyonunu değişken affiniteler ile bağlayarak hücre içinde kalsiyum sinyallerini modüle edebilmektedirler. *EF-hand* proteinler,

Annexinler ve C2 alan proteinler gibi proteinler evrimsel olarak iyi korunmuş Ca^{+2} bağlayabilen alt bölgelere sahiptirler (Celio ve diğ. 1996, Schwaller ve diğ. 2004). Bu kalsiyum bağlayan proteinler (CaBP) arasında *EF-hand alan* en yaygındır (Celio ve diğ. 1996, Kawasaki ve diğ. 1998). *EF-hand alan* içeren proteinler 29 aminoasitin oluşturduğu *helix-loop-helix* motifine sahiptirler. Üç helikal çift AB, CD ve EF olarak isimlendirilir ve C-terminal α -helix 5 ve 6 sahip olan alanlar bu proteinlerin adını verir. *EF-hand alan* proteinler sağ elin baş ve işaret parmakları iki helixi, eğilmiş bir şekilde tutulan orta parmak ise altı oksijen atomuna sahip Ca^{+2} iyonunu koordine eden loop'u sembolize eder (**Çizim 3.1**).



Çizim 3.1. EF-Hand proteinlerin yapısı (Schwaller, 2007)

EF-hand CaBP'lar yapısal ve fonksiyonel olarak Ca^{+2} sensör/modülatör ve Ca^{+2} buffer olmak üzere iki ayrı gruba ayrılır (Skelton ve diğ. 1994, Ikura 1996, Nelson ve Chalzin 1998). Ca^{+2} sensörleri Ca^{+2} 'ye bağlı olarak konfirmasyon değişikliği yapabilme özelliğine sahiptirler. Ca^{+2} sensörlerine ait en göze çarpan örnek farklı türlerde iyi bir şekilde korunmuş ve yaygın olarak ifade edilen 146 aminoasite sahip ve moleküler ağırlığı 17kDa olan Kalmadulin (CaM) proteindir (Cohen ve Klee 1988). CaM proteini sinaptik ileti, nöroplastisite, kısa ve uzun süreli potansiyalizasyon, öğrenme ve hafıza gibi sinir sistemi ile ilişkili pek çok fizyolojik fonksiyonlarda rol oynamaktadır (Leclerc ve diğ. 2006). Nöronal kalsiyum sensörler (Braunewell ve Cundelfinger 1999, Burgoyne ve Weiss 2001) ve S100 proteinler (Marenholz ve diğ. 2004) Ca^{+2} sensör ailesine ait proteinlerdir.

EF-hand kalsiyum bufferlarının iki önemli klasik örneği parvalbumin (PV) (insan gen sembolü PVALB) ve Calbindin D-9k (CB) (Calbindin 3, CaBP-9k ve CABP1 olarak

da bilinir ve insan gen sembolü S100G). Her iki protein de Ca^{+2} bağlanması ile birlikte konfirmasyonel değişikliğe uğrar. Fakat, serbest ve metal bağlanış halleri yapısal olarak aynıdır (Skelton ve diğ. 1995). Bugüne kadar, bu iki protein için kalsiyum bağlanmalarına eşlik eden bir partner bulunmamıştır. Günümüze kadar yapılan araştırmalarda CB-D9k'nın merkezi sinir sisteminde ifade edilmediği gösterilmiştir. Calretinin (CR) (Calbindin 2 olarak bilinen, protein 10 (Winsky ve diğ. 1989) ve Calbindin 30 kDa (Hubbard ve McHugh 1995); gen sembolü CALB2) ve CB D-28K (calbindin 1 olarak da bilinir, CaBP-28k ve spot 35 (Yamakuni ve diğ. 1987); gen sembolü CALB1) için durum biraz daha karışıktır. Pek çok yayında hala Ca^{+2} buffer olarak tanımlanırken, son zamanlarda sensor olarak işlev gördüğü düşünülmektedir.

1.3.1. Ca^{+2} Bağlayan Bufferlerin Özelliklerini Etkileyen Faktörler

Dinlenme koşullarındaki sitozolik kalsiyum konsantrasyonu, nöron ve glia hücreleri de dahil olmak üzere hemen hemen tüm hücrelerde 50-100 nM'dır. Çoğu CaBP'nin ayrışma sabitleri (disiasyon sabitleri) (Kd) mikromolar seviyelerindedir. Bu nedenle dinlenme koşullarında çoğu CaBP'ler Ca^{+2} serbest durumundadır. Reseptör ya da iyon kanal kompleksleri veya hücre içindeki kalsiyum depoları aracılığı ile hücre içindeki Ca^{+2} derişimi artarsa, CaBP'ler spasyotemporal olarak Ca^{+2} sinyallerini module ederler. CaBP'lerin buffer özelliklerini etkileyen parametreler; (1) Hücre içi kalsiyum miktarı (2) Ca^{+2} iyonuna ve diğ. metallere olan ilgi (3) Ca^{+2} bağlama ve serbestleme kinetikleridir.

Hücre İçi Kalsiyum Miktarı

CaBP'lerin nöronlardaki hücre içi miktarlarını tam olarak tespit etmek çok kolay değildir. Bugüne kadar elde edilen sonuçlar, biyokimyasal, immünohistokimyasal, radyoimmünojenetik ve elektrofizyolojik yöntemler kullanılarak elde edilmiştir. Her üç proteinin de sinir hücrelerinin morfolojik yapılarının karışık olması nedeni ile merkezi sinir sisteminde çok sınırlı bir şekilde ifade edildikleri gösterilmiştir. Örneğin; kurbağalarda yapılan bir çalışmada, CR'nin miktarı immünoblotlama yöntemi ile incelenmiş ve oldukça yüksek miktarda (1.2 mM) (Edmonds ve diğ. 2000) bulunduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise sıçanların iç ve dış kohlear hair hücrelerinde immünohistokimyasal yöntemle yapılan ölçümde sırası ile 19 ± 3 mM ve 35 ± 3 mM olduğu bulunmuştur (Hackney ve diğ. 2005). CB'nin farklı sinir hücrelerindeki miktarı genellikle yüksektir; serebellumdaki

purkinje hücrelerinde 150-360 mM (Schwaller ve diğ. 2002), hipokampüsteki dentate gyrusun granüller hücrelerinde, CA3 stratum radiatum ara nöronlarında, ve CA1 pyrimadal hücrelerinde 40-50 mM düzeyinde bulunduğu immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak gösterilmiştir (Muller ve diğ. 2005). PV'nin miktarı farelerdeki purkinje hücrelerinde 80 mM (Schmidt ve diğ. 2003b) civarındaki iken, sıçanlarda yaklaşık olarak 116 ± 30 mM'dır (Hackney ve diğ. 2005).

Metal Bağlama Affiniteleri

EF-hand proteinlerde, Ca^{+2} bağlayan bölgeler farklı Ca^{+2} ve magnezyum (Mg^{+2}) seçiciliğine ve bağlanma ilgisine bağlı olarak iki farklı bölgeye ayrılmaktadır. CR beş fonksiyonel Ca^{+2} spesifik bölgeye sahip iken, CB'de dört adet bulunmaktadır (Celio ve diğ. 1996). Genel olarak bu bölgelerin Ca^{+2} ilgileri (KCa: 10^{-3} - 10^{-7}) ile Mg^{+2} iyonu ilgileri oldukça düşüktür (KMg: 10^{-1} - 10^{-2}) (Nagerl ve diğ. 2000b). PV'de bulunan karma Ca^{+2}/Mg^{+2} bölgesi Ca^{+2} karşı yüksek bağlanma eğilimine, Mg^{+2} ise ortada derecede ve Ca^{+2} ile yarışmalı bir biçimde bağlanma eğilimine sahiptir (disassiyasyon sabitleri KCa: 10^{-7} - 10^{-9} ; KMg: 10^{-3} - 10^{-4}). Bu nedenle, dinlenme halindeki PV içeren nöronların sitoplazmalarında Ca^{+2}/Mg^{+2} bölgeleri, Ca^{+2} bağlanmadan önce bu bölgelerden ayrılması gereken Mg^{+2} ile bağlanmış durumdadır.

Metal Bağlama Kinetikleri

Hücre içinde kalsiyum bağlama kinetikleri çok değişken olabilmektedir. Kalsiyum bağlanması hızlı olan kas kasılması gibi biyolojik durumlardaki proteinler için (Troponin C) bağlanma hızı $10^8 M^{-1} s^{-1}$ gibi yüksek değerler olabilirken, PV yavaş bağlanma hızı gösteren proteinlerde bu hız $3 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ olduğu ve hatta özellikle PV'nin Ca^{+2}/Mg^{+2} bağlayan bölgeleri ile direk olarak bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Mg^{+2} bulunmadığı durumlarda, Ca^{+2} bağlama hızının çok daha yüksektir (Lee ve diğ. 2002). CB ve CR için metal bağlama kinetikleri henüz tespit edilmeye başlamıştır ve CR için muhtemelen $10^8 M^{-1} s^{-1}$ civarında olduğu (Edmonds ve diğ. 2000), CB için Ca^{+2} bağlama kinetiğinin daha yavaş olduğu düşünülmektedir (Nagerl ve diğ. 2000b).

1.3.2 Parvalbumin (PV), Calbindin D-28 (CB) ve Calretinin (CR)'nin Beyinde Dağılımları

1.3.2.1 Parvalbumin

PV'nin merkezi sinir sistemindeki ifadesi nöronlarla sınırlıdır ve büyük oranda GABAerjik nöronlarda ifade edilmektedir (Celio 1986) (**Çizim 3.2**). PV'nin sıçan beyinindeki dağılımı ilk olarak Celio (1990) tarafından gösterilmiştir. Daha sonra gelişimsel olarak (Hendrickson ve diğ. 1991, Solbach ve Celio 1991), farklı türlerdeki dağılımı (Hof ve diğ. 1999), patolojik durumlardaki değişimleri (Heizmann ve Braun 1992) ile alakalı çalışmalar yapılmıştır. Bütün beyin bölgelerinde GABAerjik ara nöronların, özellikle PV içerenlerin, senkronize aktivitelerde ve osilasyonlarda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. PV içeren nöronların güçlü inhibisyona yol açtığı ifade edilmektedir. Neokortekste; chandelier ve basket hücreleri (Kawaguchi ve Kubota 1998, Gupta ve diğ. 2000), hipokampüste; basket hücreleri (Freund ve Buzsaki 1996), serebellumda moleküler tabakadaki ara nöronlar, stellate ve basket hücreleri (Celio 1990, Kosaka ve diğ. 1993), aksonik, perisomatik ve dendritik inhibisyondan sorumludur. Bahsedilen bu üç beyin bölgesi “mikrobağlantılar” (Grillner ve diğ. 2005) denilen tekrarlayan modüllerden oluşmaktadır ve PV ifade eden nöronlar bu bağlantıların önemli bir parçasıdır.

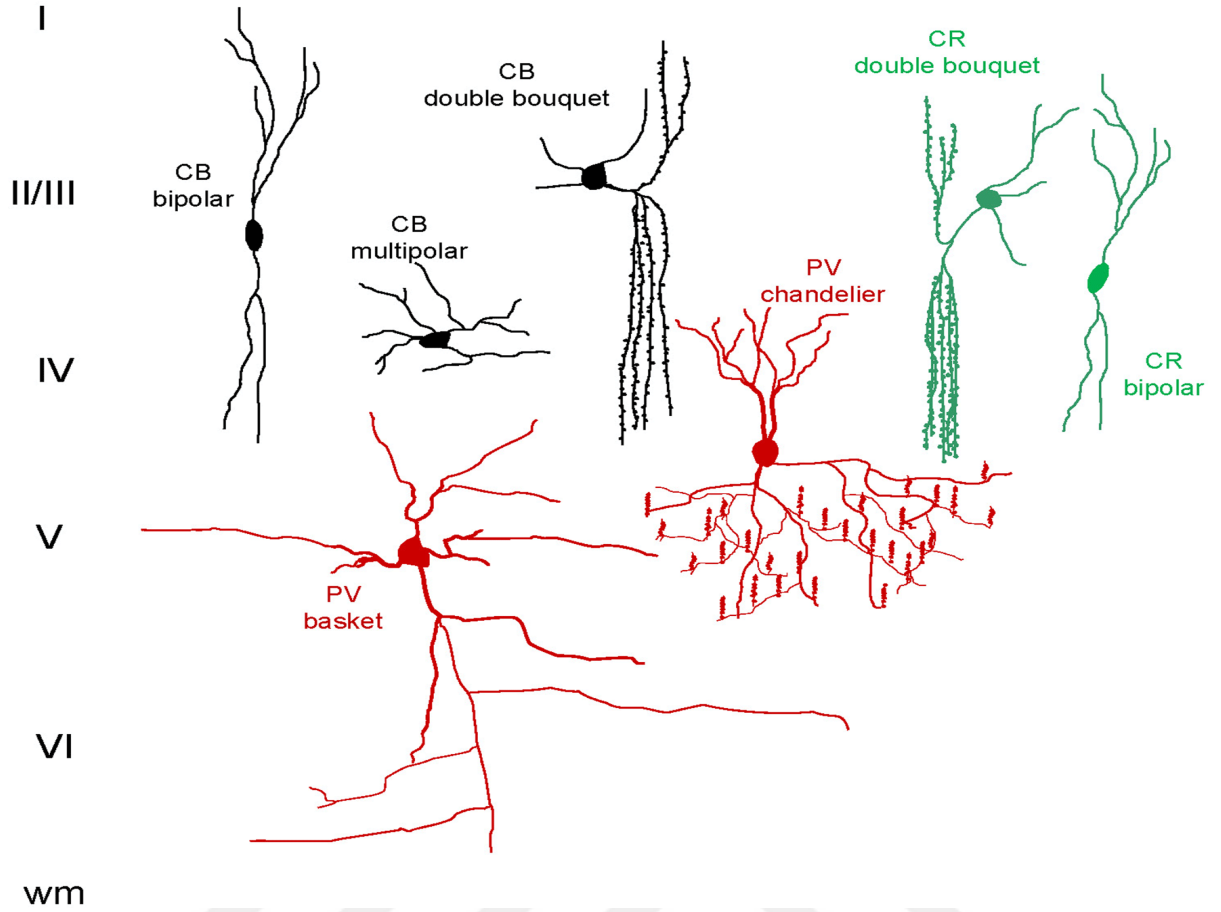
Talamustaki yapılarda, bazı özel nöronlar PV ifade etmektedir, özellikle RTN'deki nöronların çok büyük bir kısmı PV içerir (Seto-Ohshima ve diğ. 1989). Yetişkin sıçanların RTN nöronlarının büyük bir kısmı PV ifade etmekte ve bu nöronlar yoğun bir şekilde çoğunlukla dorsal talamik bölgeleri innerve etmektedir (Frassoni ve diğ. 1991). Daha önceleri, PV immünoreaktif olduğu gözlenmemiş olan GABAerjik kalsiform terminallerin, bölgesel PV immünoreaktif ara nöronların perikaryasından köken aldığı ve PV negatif dendritlerle sinaps yaptığı gösterilmiştir. Bu sinapsların intrinsik hücre-hücre iletişimlerinde rol oynadığı düşünülmekte ve muhtemelen talamo-kortikal osilasyonların senkronizasyonlarına katıldığı varsayılmaktadır (Csillik ve diğ. 2005). PV içeren nöronların karşılıklı mikro bağlantıları genellikle neokortekste, hipokampüste ve serebellumda görülmektedir (Grillner ve diğ. 2005). İlginç bir şekilde bu nöronlar sadece kimyasal sinapslarla değil aynı zamanda Connexin 36 içeren elektriksel sinapslar da kurmaktadır (Gibson ve diğ. 1999, Fukuda ve Kosaka 2000, Galarreta ve Hestrin 2001). Connexin 36 (CNX 36) knock-out farelerde yapılan çalışmada gamma osilasyonlarının

amplitüdünün azaldığı gösterilmiştir (Hormuzdi ve diğ. 2001).

1.3.2.2 Calbindin

Çok farklı türde nöron CB içermektedir (Celio 1990), ve türler arasında da önemli farklılıklar göstermektedir (**Çizim 3.3**) (Hof ve diğ. 1999). Sıçanlarda, CB proteini merkezi sinir sisteminde embriyolojik gelişimin 14. günde, duyu organlarında ve periferik sinir sisteminde ise 15. günde ifade edilmeye başlamaktadır. CB'nin beyindeki pek çok bölgedeki ifadesi doğumdan önce tamamlanmıştır (Enderlin ve diğ. 1987, Hof ve diğ. 1999). Bu durum, gelişimsel süreçte geçici olarak ifade edilen CR ile terstir. CB proteini genellikle lokal ara nöronlarda bulunmaktadır. Korteksin üst tabakaları olan 2. ve 3. tabakada yer almaktadırlar. Moleküler tabakadaki küçük multipolar nöronların yukarı yönde dallanan dendritlerinde küçük bituft hücrelerde, 2. tabakadaki pirimidal benzeri hücrelerde, moleküler tabakanın horizontal hücrelerinde, multipolar hücrelerin aşağı inen uzun dendritlerinde, ve büyük double bouquet hücrelerde bulunduğu bilinmektedir (Ferrer ve diğ. 1992). Ayrıca, maymunlardaki CB içeren double bouquet hücrelerin aynı zamanda CR içerdiği gösterilmiştir (Zaitsev ve diğ. 2005). Somatostatin içerdiği bilinen Martinotti hücrelerinin aynı zamanda CB immünreaktif olduğu da gösterilmiştir (Kawaguchi ve Kubota 1997).

Pirimidal hücrelerin alt grubunda zayıf olarak CB pozitifdir. Hipotalamusta CB immünoreaktif hücreler oldukça yaygındır. Hipokampusun bütün alt bölgelerinde ifade edilmektedirler. İnsan dentate gyrusundaki granül hücrelerinde de yaygın olarak ifade edilmektedirler, fakat CA1 bölgesinde bulunmamaktadırlar. Kemirgenlerde ise CA1 bölgesinde CB ifadesi gözlemlenmektedir (Sloviter ve diğ.1991). Serebellumda ise purkinje hücreleri CB ifade eden tek hücre tipidir (Bastianelli 2003).



Çizim 3.2. Neokortikal tabakalardaki CaBP'lerin morfolojik yapıları (Gonchar ve diğ. 2008)

1.3.2.3 Calretinin

İnsan korteksinde CR, PV ve CB gibi birincil olarak bütün kortikal tabakalarda bulunan ara nöronların alt türlerinde ifade edilmektedirler, fakat daha çok 2. ve 3. tabakada, daha az olarak 6. tabakada görülmektedirler. 1. tabakadaki büyük horizontal hücreler olan Cajal Retzius hücreleri CR immünoreaktif hücrelerdir (Vogt Weisenhorn ve diğ. 1994, Belichenko ve diğ. 1995). CR immünoreaktif nöronların bipolar, bitufted, fusiform ve double bouquet cell gibi çok farklı morfolojik çeşitlilik göstermektedirler (**Çizim 3.3**) (Fonseca ve Soriano 1995). Birbirine benzer morfolojik özellik gösteren nöronlarda CB ve CR'nin aynı nörondaki ifadesi (doubled bouquet cells) çok nadirdir (Schwaller ve diğ. 1999a). Bu nedenle double bouquet hücreleri kimyasal olarak heterojenik nöron topluluğudur (Toledo-Rodriguez ve diğ. 2005). Ana ve yardımcı olfaktör bulbuslar, granuler ve periglomerular ve mitral hücreler CR immünoreaktiftir. CR pozitif hücreler ayrıca, substansiya nigra, ventral tegmental alanda, nigrostriatal ve

mezolimbik bağlantılarda bulunmaktadır. Hipokampüsün CA1-CA3'ün bütün alt kısımlarında ve dentate gyrusta özel CR reaktif ara nöronlarda bulunmaktadır ve bu nöronların %80'i GABAerjiktir (Gulyas ve diğ. 1992, Miettinen ve diğ., 1992, Freund ve Buzsaki 1996). GABAerjik olmayan CR immünoreaktif hücreler dentate gyrusun hilusunda ve C3 alt bölgesinin stratum lucidum kısmında dikensi (spiny) bir morfoloji göstermektedir. *Spine-free* CR immünoreaktif hücreler genellikle GABA pozitif özellik göstermektedir. Bu nedenle iki farklı morfolojik ve nörokimyasal özellikte CR immünoreaktif hücre topluluğu bulunmaktadır. Hipokampüsteki CR immünoreaktif hücreler asla PV ile birlikte ifade edilmez iken, çok az miktarda CB ile ifade edilmektedir (%5). Bu nedenle; CR, CB ve PV içeren nöronlar minimal düzeyde aynı nöronda ifade edilir. Talamustaki, periventriküler, retiküler ve lateral habenula hücrelerinde CR ifade edilmektedir. Serebellumda, CR birincil olarak granüler hücrelerde ve onların paralel uzantılarında ifade edilmektedir (Arai ve diğ. 1993). Unipolar bursh hücreleri (Floris ve diğ. 1994), Golgi ve Lugaro hücreleri, monodendritik hücreler (Braak ve Braak 1993) ve granül hücrelerde sonlanan mossy fiberler de CR ifade etmektedirler.

2. AMAÇ

Absans epilepsinin tanı kriterlerinden biri olan EEG kayıtlarında tespit edilen diken dalga deşarj (DDD) oluşumunun hücresele mekanizmalarına yönelik çalışmalar, bu paroksizmal aktivitenin korteks ve talamus arasındaki karşılıklı eksitatör ve inhibitör bağlantılardan kaynaklandığını göstermektedir. Farmakolojik ve lezyon çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında, absans nöbetlerin oluşumuna şüphesiz ki bilinen ve/veya bilinmeyen pek çok moleküler mekanizmanın katılımı söz konusu olmakla birlikte, GABAerjik sistemin ciddi bir rolünün olduğu aşikârdır. Ne yazık ki, GABAerjik iletide meydana gelen bozulmaların kökeni hala aydınlatılamamıştır. Meeren ve arkadaşlarının 2002 yılında yayınladığı çalışmada, WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerinin perioral bölgesinde (SPo1) aşırı uyarılabilir bir odağın varlığının gösterilmesi bütün dikkatleri bu bölgeye çekmiştir. Diğer bir genetik absans epilepsi sıçan modeli olan GAERS ırkı sıçanlarda somatosensöriyel korteksin derin bölgelerindeki hücrelerin absans nöbetleri başlatığının gösterilmesi absans nöbetlerin kortikal bir odaktan köken aldığı düşüncesini destekler niteliktedir (Polack ve diğ. 2007). Her iki sıçan modelinde de aşırı bir uyarılabilir odağın varlığı gösterilmesine rağmen, bu odağın oluşumu hala açıklanabilmiş değildir. Bu nedenle çalışmamızda; somatosensöriyel odağın oluşumunda GABAerjik nöronların büyük bir kısmında ifade edilen, kalsiyum bağlayan proteinler olan, parvalbumin (PV), calbindin (CB) ve calretinin (CR) protein ifadelerinin immünblotlama ve immünohistokimyasal yöntemler kullanarak araştırmayı planladık. Bu amaçla absans nöbetlerin henüz ortaya çıkmadığı 2 aylık WAG/rij ırkı sıçanlar, absans nöbetlerin tüm bireylerde görüldüğü 8 aylık WAG/Rij sıçanlar, ırk ve yaş faktörü dikkate alınarak, Wistar Albino sıçanlar ile karşılaştırıldı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Laboratuvarında (DETAB) üretilen genetik absans epilepsili WAG/Rij ve epileptik olmayan Wistar Albino ırkı erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışmamıza Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulundan onay verilmiştir (KOÜ HADYEK 8/1-2014). Tüm hayvanlar standart laboratuvar koşullarında sabit ısı (20 C⁰) ve 40-70% bağıl nemli bir odada ventilizasyon sistemi altında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde, yiyecek ve içecek alımları serbest olacak şekilde barındırıldı.

3.2. Deney Grupları

Deneylerimizde deney grubu olarak absans epilepsili 2 ve 8 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile epileptik özellik göstermeyen 2 ve 8 aylık Wistar Albino ırkı sıçanlar kullanılmıştır. Epileptik WAG/Rij sıçanlar 2 aylık dönemde nöbet aktivitesi göstermezken 8 aylık dönemde sık nöbet geçirmektedir. Deney grupları ve hayvan sayıları **Çizelge 3.1'** de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan sıçan türleri ve sayıları

	Wistar 2 Ay	WAG/Rij 2 Ay	Wistar 8 Ay	WAG/Rij 8 Ay
İmmunblotlama	n:5	n:6	n:6	n:6
İmmünfloresan	n:5	n:5	n:5	n:5

3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar

İmmünblotlama ve immünfloresan deneylerimizde kullanılan kimyasalların yüzdeleri ve miktarları verilmiştir (**Çizelge 3.2**).

Çizelge 3.2. Deneylerde kullanılan solüsyonlar

Tampon Çözelti Adı Hazırlanışı	Konsantrasyonu ve Miktarı	Hazırlanışı
Tris.HCl pH 8,8	1,5 M, 100 ml	18,15 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü. HCl

			ile pH 8,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
Tris.HCl pH 6,8	0,5 M, 100 ml		6 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH 6,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
TBE	1 X, 1 lt		10,8 g Tris, 5,5 g boric asit, 4 ml EDTA (0,5 M pH 8,0) 1 lt suda çözülerek otoklavlandı.
Sodyum asetat	3M, 10 ml		2,46 g sodyum asetat 10 ml saf suda çözüldü.
Gliserol	% 10, 1L		100 ml gliserol 1L su ile karıştırıldı otoklavlandı ve + 4 °C'de saklandı.
SDS	% 10, 10 ml		1 g SDS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
Amonyum persülfat (APS)	% 10, 10 ml		1 g APS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.
Akrilamid / bisakrilamid	% 30, 100 ml		29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid tartılıp 100 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.
SDS-PAGE Yürütme Tamponu	5 X, 300 ml		4,5 g Tris, 21,6 g glisin ve 1,5 g SDS saf suda çözülerek 5 X tampon 1 X 'e seyreltildi.
SDS-PAGE Yükleme Tamponu	4 X, 8 ml		1 ml 0,5 M Tris.HCl pH 6,8, 0,8 ml gliserol, 1,6 ml % 10 SDS, 0,4 ml β ME, 0,2 ml BFB (% 0.05) ve 4

SDS-PAGE sabitleştirici solüsyon	% 40 Metanol, % 10 Asetik asit, 100 ml	ml saf su karıştırıldı. 1 X olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı. 40 ml metanol ve 10 ml asetik asit karıştırılarak su ile 100 ml'ye tamamlandı
SDS-PAGE boyama solüsyonu	% 0,1 (w/v) Coomassie mavisi, 250 ml	SDS-PAGE sabitleştirici solüsyonun içerisine 0,25 g Coomassie mavisi eklenerek hazırlandı.
Western Blot Transfer Tamponu	100 ml	0,58 gr Tris, 0,29 gr Glisin, 0,025g SDS (0,375 ml %10 SDS'den) tartılarak 100 ml saf suda çözüldü.
TBST pH 7.6	25 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2 % 0.1 Tween 20, 1L	2.42gr Tris, 8g NaCl, 1ml Tween 20 900 ml saf suda çözüldü. pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra 1L'ye tamamlandı.
Ponceau S boyama solüsyonu	% 0.1 (w/v)	0.1gr Ponceau S ve 0.5 ml asetik asit karıştırılarak 100 ml saf suda çözüldü.
Bloklama Tamponu (Western Blot)	% 5, 10 ml	5 g bloklama tozu (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad, ABD), 10 mL TBST içinde çözüldü ve Filt kâğıdından geçirilerek kullanıldı.
HyperFilm Developer solüsyonu	Kodak RP X-OMAT LO (CarestreamHealth, Belçika)	Üreticinin tavsiye ettiği şekilde hazırlandı. 140 ml saf su, 50 ml solüsyon

HyperFilm solüsyonu	Fiksleme	Kodak RP X-OMAT LO (Carestream Health, Belçika)	A, 2 ml solüsyon B ve 2 ml solüsyon C ile karıştırılarak kullanıldı. Üreticinin tavsiye ettiği şekilde hazırlandı. 140 ml saf su, 50 ml solüsyon A ve 10 ml solüsyon B ile karıştırılarak kullanıldı.
TBS		50mM pH: 7.6 , 1 L	6,06 gr Tris, 8,76 gr NaCl 1 saf suda çözüldü ve 1000 ml' ye tamamlandı. HCl ve NaOH ile pH 7.4 'e ayarlandı.
% 0.5 Triton X-100		%0.5, 100 ml	99,5 ml TBS içerisine 500µl TritonX-100 karıştırıldı.
Bloklama Solüsyonu		% 10, 10 ml	1 ml NGS ile 9 ml %0.5 TritonX-100 ile karıştırıldı.
NaBH ₄		%1, 100 ml	1gr NaBH ₄ , 100 ml PBS içerisinde çözüldü.
PBS		10X, 1 L	81,8 gr NaCl, 2,01 gr KCl, 14,196 gr Na ₂ HPO ₄ , 2,45 gr KH ₂ PO ₄ Distile suda çözüldükten sonra HCl ve NaOH ile pH 7.4 'e ayarlandı.

3.4. Cerrahi İşlemler

İmmünblotlama için: 2 aylık ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij erkek sıçanlar ketamin (100 mg/kg-ip) ve xylazin (12mg /kg-ip) anestezisi altına alınmıştır. Anestezinin derinliği kornea ve pençe refleksi ile kontrol edildikten sonra, hayvanlara transkardiyak olarak ağırlığı oranında serum fizyolojik (SF) peristaltik perfizyon pompası yardımı aracılığı ile 8 aylık sıçanlara 20 ml/dk, 2 aylık sıçanlara 10 ml/dk hızında verildi. Sıçanların kafaları

giyotin ile kesilerek tüm beyin çıkartıldı. İmmünblotlama deneylerinde kullanılacak somatosensöriyel korteks bölgesi, bregma referans alınarak +3 mm ve -3 mm (Paxinos ve Watson , 6. Ed.) olacak şekilde beyin matriksi (Plastic one, ABD) kullanılarak izole edildi ve sıvı azot kullanılarak hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

İmmünfloresan Boyama: 2 aylık ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij erkek sıçanlar ketamin (100 mg/kg-ip) ve xylazine (12 mg/kg-ip) anestezisi altına alınmıştır. Anestezinin derinliği kornea ve pençe refleksleri ile kontrol edildikten sonra, hayvanlara intrakardiyak olarak ağırlığı oranında serum fizyolojik (SF) verildikten sonra ağırlığının yarısı kadar fiksatif (10% Formalin, Tekkim-Türkiye) peristaltik perfüzyon pompası aracılığı ile 20 ml/dk hızında verildi. Sıçanların kafaları giyotin ile kesilerek tüm beyin çıkartıldı. Beyin dokuları bir gece falkon tüpü içerisindeki 10%'luk formalinde bekletildikten sonra 50 ml'lik falkon tüpleri içerisindeki %30 şekerli su çözeltisinde +4 °C'de beyin dokuları dibe çökünceye bekletildi ve metil-bütan (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.4. Western Blot Deneyleri

3.4.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Beyin örnekleri yıkama TPER solüsyonu ile 0.5 mm. çapındaki çelik bilyeler kullanılarak +4 °C'de bullet blender (Next Advance, ABD) yardımı ile doku homojenatları hazırlandı. 10.000 devirde +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilen örneklerden elde edilen süpernatantlar ependorf tüplerine alındı ve 20.000 devirde +4 °C'de 1 saat santrifüj edilen örneklerden protein miktarı tayin edildi (Çizim 3.1).

3.4.2. Protein Örneklerinin Miktarının Ölçülmesi

Protein miktarını ölçmek için Bradford Assay kullanıldı. 1 mikro litre örnek 9 mikro litre 2D *extract buffer* kullanılarak 1:10 dilüsyon oluşturuldu. Daha sonra 1:10 dilüsyondaki örnekten 2 mikrolitre alınıp 18 mikrolitre 2D *extract buffer* kullanılarak ikinci bir dilüsyon elde edildi. Son elde edilen örnekten 3 ile 5 kez Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) ile 750 nm'de önceden oluşturulmuş standart eğri ile karşılaştırılarak protein ölçümü yapıldı. Elde edilen değerlerin aritmetik ortalaması alınıp toplam dilüsyon

faktörü ile çarpılarak protein miktarları belirlendi.

3.4.3 Immünblotlama

Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra jel nitroselüloz / PVDF membrana transfer edilerek hedef protein için analiz edildi. Western Blot için yarı kuru transferi sağlayan Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponunun içerisine alınarak 10 dakika bekletildi. Süre sonunda sırasıyla iki kat Whatman kağıdı, membran, 7 cm'lik jel ve tekrar iki kat Whatman kağıdı şeklinde sıralandı ve 15 V sabit voltajda 30 dakikada süreyle uygulandı. Transfer sonunda membran üzerindeki proteinler Ponceau S ile boyanarak transferrin kalitesi kontrol edildi. Saf su ile Ponceau S boyası uzaklaştırıldıktan sonra membran % 5 bloklama tamponu ile oda ısısında 1 saat çalkalanarak bloklandı. Süre sonunda membran 3 kez TBS-T solüsyonu ile (15 dk, 5 dk, 5 dk) çalkalanarak yıkandı. Membran üreticinin tavsiye ettiği oranda TBS-T içerisinde hazırlanan birincil antikör ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi (**Çizelge 3.3**). Süre sonunda membran 3 kez TBS-T solüsyonu ile (15 dk, 5 dk, 5 dk) çalkalanarak yıkandı. İkincil antikorda 10 ml. TBS-T içerisinde hazırlandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membran 3 kez TBS-T solüsyonu ile (15 dk, 5 dk, 5 dk) çalkalanarak yıkandı. Görüntülemeye yüksek duyarlılıkta sinyal üretebilen kemilüminesans metodu (Life Science Inc. ABD) kullanıldı. Bu amaçla eşit oranda alınan Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer çözeltisi (Bio-Rad, ABD) karıştırılarak membran üzerine yayıldı ve membran yüzeyine teması sağlandı. Fazla sıvı bir peçete ile emildi ve membran plastik stretch film ile sarılarak Hypercassette (Amersham, Biosciences) içerisine yerleştirildi. Karanlık odada membran üzerine oluşan ışığı algılayabilecek bir hiper duyarlı X-ray filmi yerleştirildi ve sinyalin film üzerine yansımaları için bir süre bekletildi. Daha sonra oluşan sinyal, film 3 dakika HyperFilm developer solüsyonunda, 30 saniye saf suda ve 1 dakika HyperFilm fiksleme solüsyonunda yıkandıktan sonra görünür hale getirildi (**Çizelge 3.4**). Deneylede membrana transfer edilen protein miktarlarının eşit olduğunu göstermek amacı ile aynı deney protokolü PVDF membranestrip solüsyonu ile yıkandıktan sonra Beta-aktin antikoru (Santa-Cruz, ABD) ile inkübe edildi.

Çizelge 3.3. İmmünblotlamada kullanılan birincil ve ikincil antikor dilüsyonları

Birincil Antikor	Dilüsyon	İkincil Antikor	Dilüsyon
Parvalbumin(Sigma)	1:2000	Anti-Mouse (Bio-Rad)	1:20.000
Calretinin(Millipore)	1:500	Anti-Mouse (Bio-Rad)	1:20.000
Calbindin (Abcam)	1:2000	Anti-Mouse (Bio-Rad)	1:20.000
Actin (Santa-Cruz)	1:2000	Anti-Mouse (Bio-Rad)	1:20.000

Çizelge 3.4. İmmünblotlama deneylerindeki basamaklar

KullanılanCihaz/Solüsyon	Kullanma Sebebi	Süre
TPER	Doku Homojenatı	10 dakika
Soğutmalı Santrifüj	Doku Homojenatı	60 dakika
Bradford Assay	Protein miktarı tespit etme	-
Nanodrop 1000	Protein miktarı tespit etme	3-5 ölçüm
Sıvı azot tankı	Hızlı Dondurma	1-2 saniye
Elektroforez Cihazı	Elektroforez	60 dakika
SDS-PAGE	Elektroforez	60 dakika
Watmann kağıtları	Membran transfer	30 dakika
Transfer solüsyonu	Membran transfer	30 dakika
PVDF membran	Membran transfer	30 dakika
Ponceu S boyası	Membran transfer	5 dakika
Süt tozu (%5)	Membran bloklama	60 dakika
Birincil Antikor	Protein işaretleme	24 saat
Sekonder Antikor	Protein işaretleme	60 dakika
Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi	Protein Bandı gösterme	5 dakika
Hypercassette	Protein Bandı gösterme	5 dakika
X-ray filmi	Protein Bandı gösterme	5 dakika
Hyperfilmdeveloper/fiksatif	Protein Bandı gösterme	1-2 saniye
TBS-Tween 20	Yıkamalar	15-5-5dakika
Bullet Blender	Doku Homojenatı	10 dakika

3.4.4. İmmünfloresan Deneyleri

İmmünblotlama sonuçlarına göre anlamlı farkın tespit edildiği CaBP' ler (PV) için immünofloresan boyama gerçekleştirildi. Bunun için -80 °C' de saklanan beyin örnekleri

çözöldükten sonra Tissue-Tek içerisine gömüldü ve Kryostat kullanılarak -20 °C'de 40 µ'luk seri kesitler halinde içerisinde PBS bulunan kuyucuklara alındı. Hedeflenen somatosensöriyel korteks bölgesi stereotaksik beyin atlası kullanılarak belirlendi (Paxinos ve Watson, 6. Ed.). Bregma noktası refereans alınarak -2mm ile -3 mm arasındaki bölgeden kesitler alındı. Kesitler 1 saat süresince shaker üzerinde 1%'lik sodyum borohidrat (NaBH₄, Merck, ABD) solüsyonunda inkübe edildi. Süre sonunda kesitler 3 kez (5 dk aralıklarla ile) PBS ile yıkandı. %0.5 TBS-Triton X-100 kullanılarak hazırlanan %10'luk Normal Goat Serum (NGS) (Vectorlabs, ABD) ile bloklama işleminden sonra %3'lük NGS + TritonX-100 çözeltisi içinde birincil antikolar (Çizelge 3.5) overnight olarak +4 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün kesitler 3 kez 5 dk aralıklarla PBS ile yıkandıktan sonra kesitler %3'lük NGS + TritonX-100 çözeltisi içinde ikincil antikolarlar ile karanlık odada 2 saat süre inkübe edildikten sonra 3 kez 5 dk aralıklarla ile PBS yıkandı ve pozitif şarjlı lamlara alınarak anti-fade mounting medium kullanılarak lamel ile kapatıldı (Çizelge 3.6). Boyamaların spesifik olduğunu göstermek amacı ile boyamalarda kullanılan kesitlerden her bir protein için bir örnek alınarak birincil antikor ile inkübe edilmeden deney protokolü uygulandı. Bir gece oda sıcaklığında karanlıkta bekletilen kesitler fluoressan mikroskop kullanılarak (Zeiss Axio 10, Almanya) incelendi.

Çizelge 3.5. Birincil ve ikincil antikor dilüsyonları

Birincil Antikor	Dilüsyon	İkincil Antibody	Dilüsyon
Parvalbumin (Sigma)	1:2000	Alexa Fluor 350	1:200
GABA (Sigma)	1:2000	Alexa Fluor 488	1:200

Çizelge 3.6. İmmünofloresan boyamada kullanılan malzemeler

KullanılanCihaz/Solüsyon	Kullanma Sebebi	Süre
Peristaltik perfüzyon pompası	Perfüzyon ve fiksasyon	2 Aylık Sıçan: 20 ml/dk 8 Aylık Sıçan : 10 ml/dk
Serum Fizyolojik	Perfüzyon	2 Aylık Sıçan: 20 ml/dk 8 Aylık Sıçan : 10 ml/dk
%10 Formalin	Fiksasyon	2 Aylık Sıçan: 20 ml/dk 8 Aylık Sıçan : 10 ml/dk
%30 Şekerli su	Kroyoprotektif	Yaklaşık 3 gün
Metil Bütan	Hızlı dondurma	-20 °C de 2-3dk
Tissue-Tek	Krostata kesit alma	10 dk.

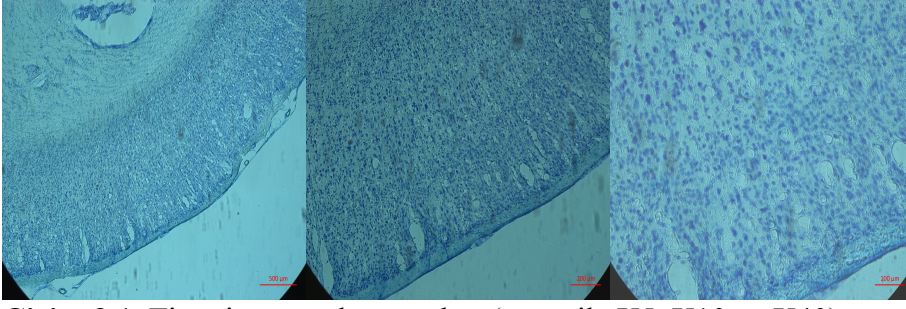
Cryostate Cihazı	Kesit alma	-
PBS	Kesitleri yıkama	5 dakika 3 kez
%1 NaBH ₄	Zemin ışımasını azaltmak	1 saat
% 10 NGS	Bloklama	1 Saat
% 0.5 TritonX-100	Protein işaretleme	1 saat
Birincil antikor	Protein işaretleme	Overnight
Sekondor antikor	Protein İşaretleme	2 saat
Pro-Long Anti-fade mount	Kapatma Solüsyonu	Overnight

3.4.5. Histolojik Doğruluma

Kryostat ile (Leica, Almanya) 40 µm kalınlığında koronal kesitler alındı. 24'lük kuyucukların her birine seri olarak alınan 5' er kesit konuldu. İmmünfloresan kesitlerde kullanılan kesitlere komşu olan kesitler pozitif şarjlı lamaların üzerine alındıktan sonra alkol serileride muammele edildikten sonra tiyonin asetat (Sigma Aldrich, ABD) ile boyanarak (**Çizelge 3.7**) invert ışık mikroskobunda (Zeiss Axio 10, Almanya) incelendi (**Çizim 3.1**).

Çizelge 3.7. Tiyonin asetat boyama protokolü

% Alkol	Süre
Xylen	2 dakika
100% Alkol	2 dakika
98% Alkol	2 dakika
70% Alkol	2 dakika
50% Alkol	2 dakika
Tiyonin Asetat	1 dakika
50% Alkol	1-2 saniye
70% Alkol	1-2 saniye
98% Alkol	1-2 saniye
100% Alkol	1-2 saniye
Xylen	1-2 saniye



Çizim 3.1. Tiyonin asetat boyamaları (sırası ile X5, X10 ve X40)

3.5. Verilerin Analizi

İmmünblotlama Analizleri

İmmünblotlama işlemlerinden sonra, araştırmamızda hedef proteinler olan CaBP'lara ait bantlar ve kontrol olarak kullanılan β -aktin bantlarının yoğunluğu İmage J programı (NIH, ABD) ile analiz edildikten sonra elde edilen değerler normalize (araştırılan protein bant yoğunluğu/kontrol grubu bant yoğunluğu) hale getirilmiştir. 2 ve 8 aylık Wistar Albino ve WAG/Rij ırkı sıçanlardan elde edilen değerler GraphPad Prism (versiyon 6) paket programında two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir.

İmmünfluorasan Boyama Analizleri

Fluoresan mikroskopta (Zeiss AX 10 Invert) 10X büyütme mercek kullanılarak çekilen somatosensöriyal kortekse ait resimler Fiji (İmageJ programı, NIH) kullanılarak mm^2 pozitif hücrelerin sayısı tespit edilmiştir. TIFF formatında dijitalize edilmiş resimlerin tümü aynı kriterler kullanılarak analiz edildi. Bu yazılım kullanılarak (1) dijital resmin gri değer dağılımını belirlendi (2) somadaki pozitif boyanmayı net olarak gösterecek şekilde eşik değer belirlendi (3) eşik değer belirlendikten sonra immünoreaktif alan ve pozitif boyalı pikseller seçildi (Wolf ve diğ, 2016). Her bir kesitte 3 mm^2 alan değerlendirilerek, PV+ hücre sayısı tespit edildi ve mm^2 'ye düşen hücre sayısı hesaplandı. 2 ve 8 aylık Wistar Albino ve WAG/Rij ırkı sıçanlardan elde edilen değerler GraphPad Prism (versiyon 6) paket programında two-way ANOVA testi kullanılarak istatistiksel analizleri yapılmıştır.

İstatiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ortalama±standart hata (SEM) olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel karşılaştırma yaş ve ırk faktörüne göre iki yönlü varyans analizi (ANOVA) (GraphPad Prism, version 6, ABD) ile değerlendirilmiş ve post hoc Tukey testi ile uygulanmıştır. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir



4. BULGULAR

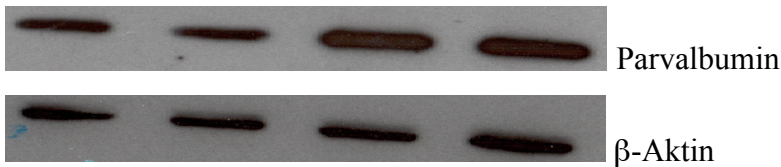
4.1. İmmünblotma Bulguları

4.1.1. Parvalbumin

Çizelge 4.1’de Parvalbumin proteinine ait immünblotlama analizleri gösterilmiştir. Farklı yaş gruplarında (2 ve 8 Ay) Wistar ve WAG/Rij sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki parvalbumin miktarı ırk ve yaş faktörleri açısından 2 yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde, Wistar Albino ve WAG/Rij grubu sıçanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($F(1,19)=4.618$, $p=0,044$). Buna göre WAG/Rij sıçanların somatosensöriyel kortekslerinde PV ifadesi kontrol grubu olan Wistar Albino ırkı sıçanlara oranla azalmıştır. Çoklu karşılaştırma testi Tukey uygulandığında ise tek tek gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Wistar Albino ırkı sıçanlarda Parvalbumin miktarında yaşa bağlı olarak azalma eğilimi görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmemiştir. WAG/Rij ırkı sıçanlarda yaşa bağlı bir azalma eğilimi görülmemiştir.

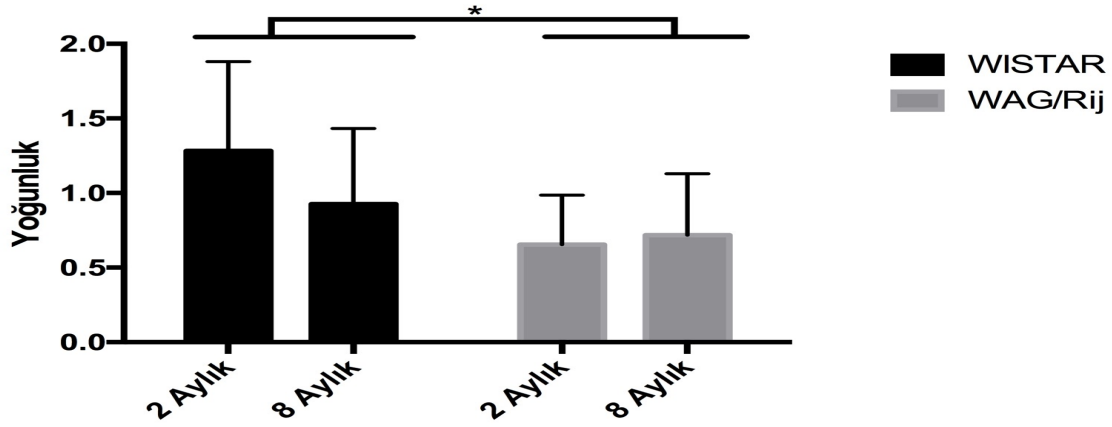
Çizelge 4.1. Wistar ve WAG/Rij sıçanlarda somatosensöriyel kortekste tespit edilen PV miktarı Bulgular “ortalama± SEM” olarak ifade edilmiştir.

İrk	Hayvan Sayısı	Yoğunluk
Wistar 2 Aylık	5	1,282±0,2678
WAG/Rij 2 Aylık	5	0,6543±0,1351
Wistar 8 Aylık	5	0,9262±0,2069
WAG/Rij 8 aylık	5	0,7183±0,1676



Çizim 4.1. Parvalbumin ve kontrol grubuna ait protein bantları (2 aylık Wistar, 2 aylık WAG/Rij, 8 aylık Wistar, 8 aylık WAG/Rij)

Parvalbumin İmmünblotlama



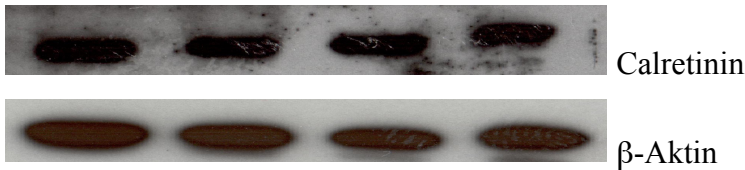
Çizim 4.2. 2 ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki Parvalbumin miktarlarının normalize edilmiş miktarları (two way-ANOVA, $P>0.05$)

4.1.2. Calretinin

Çizelge 4.2’de CR proteinine ait immünblotlama analizlerin ortalama±SEM değerleri verilmiştir. Absans epilepsili WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki Calretinin miktarının kontrol grubu olan Wistar Albino ırkı sıçanlarla karşılaştırılması sonucunda ırka ve yaşa bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmemiştir.

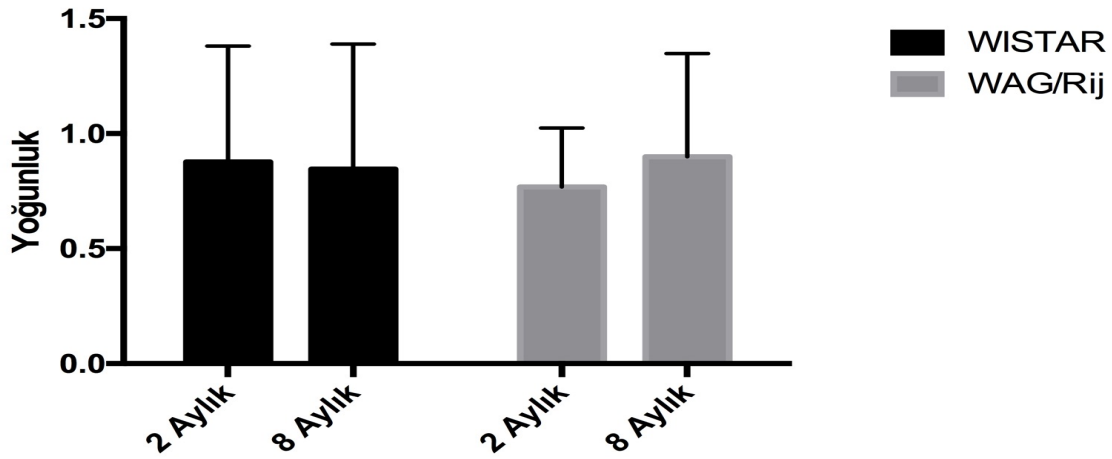
Çizelge 4.2. Wistar ve WAG/Rij sıçanlarda somatosensöriyal kortekste tespit edilen CR miktarı Bulgular “ortalama± SEM” olarak ifade edilmiştir.

İrk	Hayvan Sayısı	Yoğunluk
Wistar 2 Aylık	6	0,8763±0,2254
WAG/Rij 2 Aylık	6	0,7685±0,1042
Wistar 8 Aylık	6	0,8456±0,2219
WAG/Rij 8 aylık	6	0,8999±0,1828



Çizim 4.3. Calretinin ve kontrol grubuna ait protein bantları (2 aylık Wistar, 2 aylık WAG/Rij, 8 aylık Wistar, 8 aylık WAG/Rij)

Calretinin İmmünblotlama



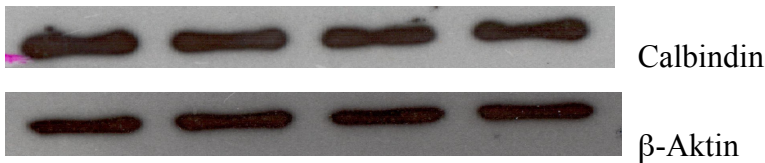
Çizim 4.4. 2 ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki Calretinin miktarlarının normalize edilmiş miktarları (Two way-ANOVA, $P>0.05$).

4.1.3. Calbindin

Çizelge 4.3’de CB proteinine ait immünblotlama analizlerin ortalama \pm SEM değerleri verilmiştir. Absans epilepsili WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki Calretinin miktarının kontrol grubu olan Wistar Albino ırkı sıçanlarla karşılaştırılması sonucunda ırka ve yaşa bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmemiştir ($p>0,05$)

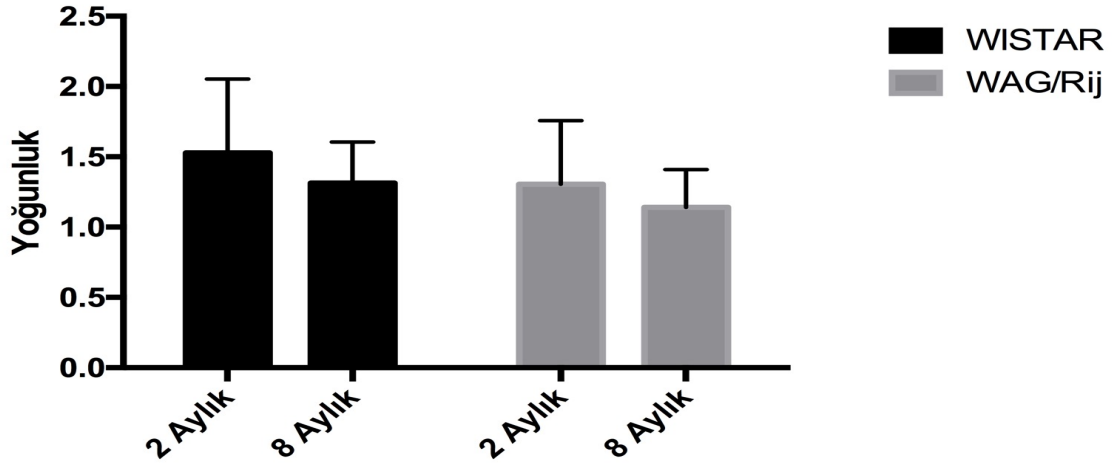
Çizelge 4.3. Wistar ve WAG/Rij sıçanlarda somatosensöriyel kortekste tespit edilen CB miktarı Bulgular “ortalama \pm SEM.” olarak ifade edilmiştir.

İrk	Hayvan Sayısı	Yoğunluk
Wistar 2 Aylık	6	1,527 \pm 0,2348
WAG/Rij 2 Aylık	6	1,306 \pm 0,1841
Wistar 8 Aylık	6	1,314 \pm 0,1184
WAG/Rij 8 aylık	6	1,141 \pm 0,1097



Çizim 4.5. Calbindin ve kontrol grubuna ait protein bantları (2 aylık Wistar, 2 aylık WAG/Rij, 8 aylık Wistar, 8 aylık WAG/Rij)

Calbindin İmmünblotlama



Çizim 4.6. 2 ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki Calbindin miktarlarının normalize edilmiş miktarları (Two-way ANOVA, $P>0.05$)

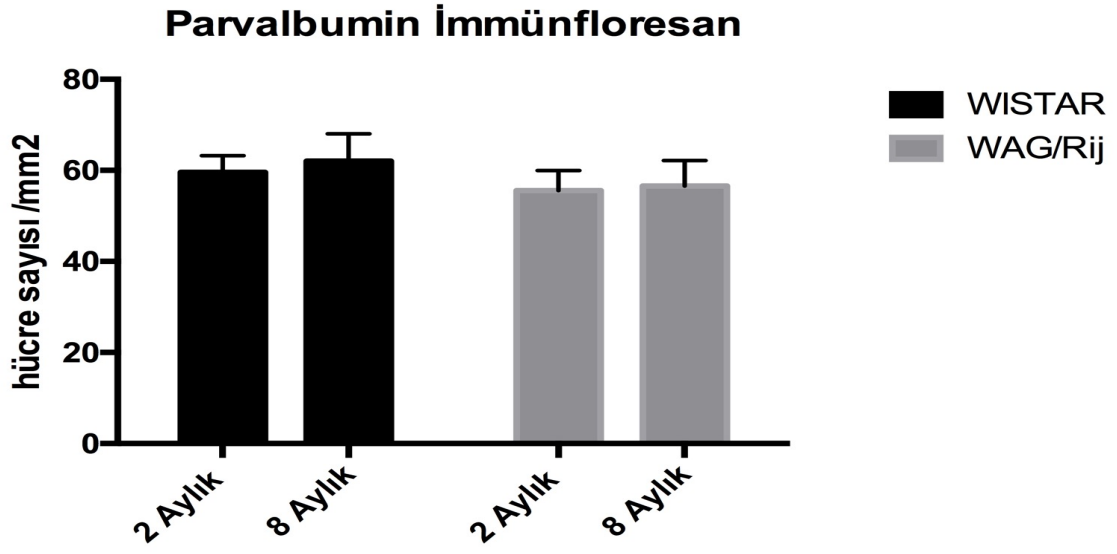
4.2. İmmünfluoresan Bulguları

4.2.1. Parvalbumin

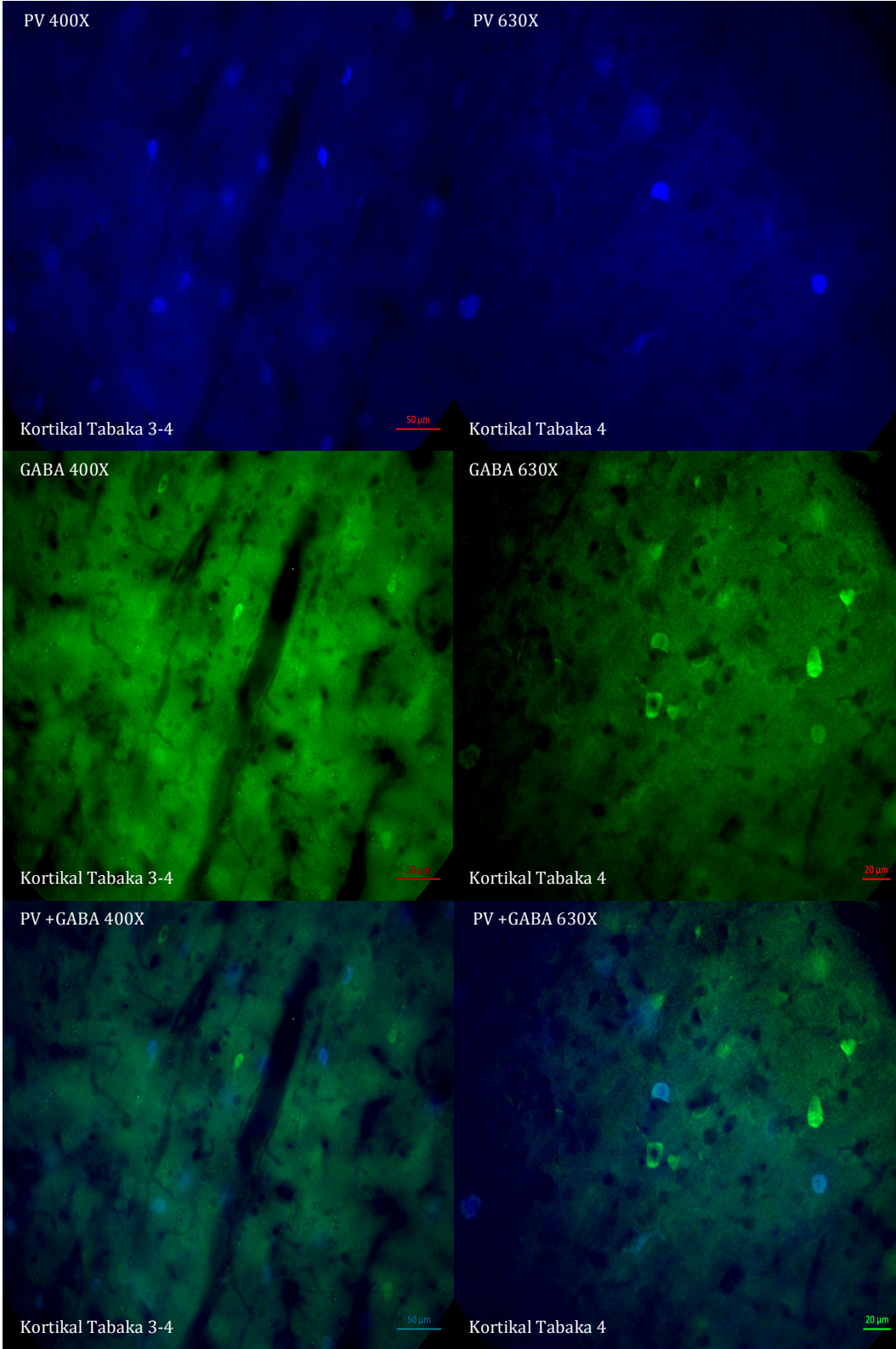
Çizelge 4.4’de PV proteinine ait immünfluoresan analizlerinin ortalama \pm SEM değerleri verilmiştir. Absans epilepsili WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerinde PV içeren nöron sayısında kontrol grubu Wistar Albino sıçanlara oranla istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir azalma eğilimi tespit edilmiştir. Wistar Albino ırkı sıçanlarda PV miktarında yaşa bağlı azalma eğilimi görülmesine rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç görülmemiştir. WAG/Rij ırkı sıçanlarda anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Çizelge 4.4. Wistar ve WAG/Rij sıçanlarda somatosensöriyal kortekste tespit edilen PV miktarı Bulgular “ortalama \pm SEM.” olarak ifade edilmistir.

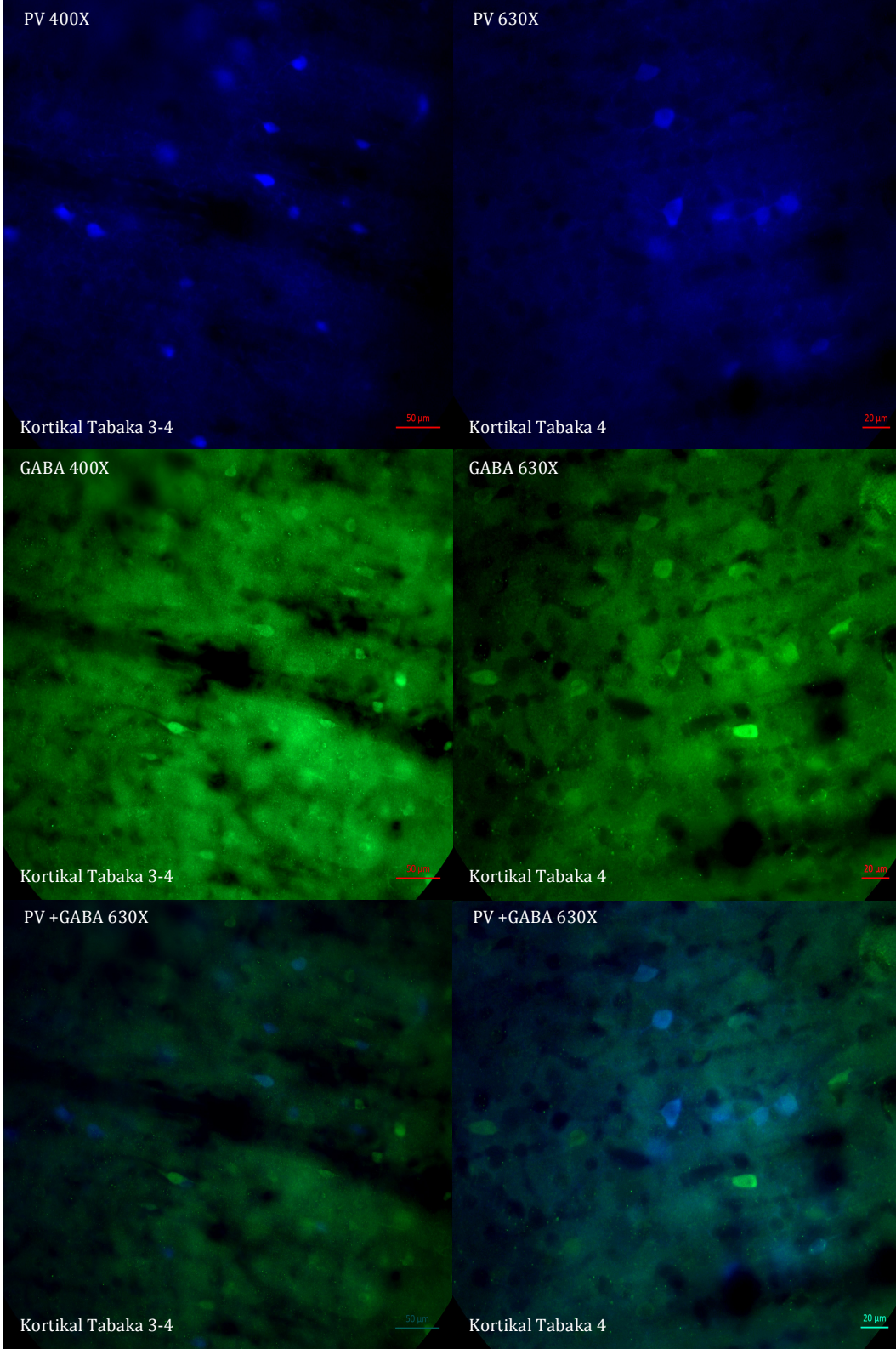
İrk	Hayvan Sayısı	Hücre Sayısı/ mm ²
Wistar 2 Aylık	5	59,60 \pm 1,631
WAG/Rij 2 Aylık	5	55,60 \pm 1,965
Wistar 8 Aylık	5	62,00 \pm 2,683
WAG/Rij 8 aylık	5	56,60 \pm 2,482



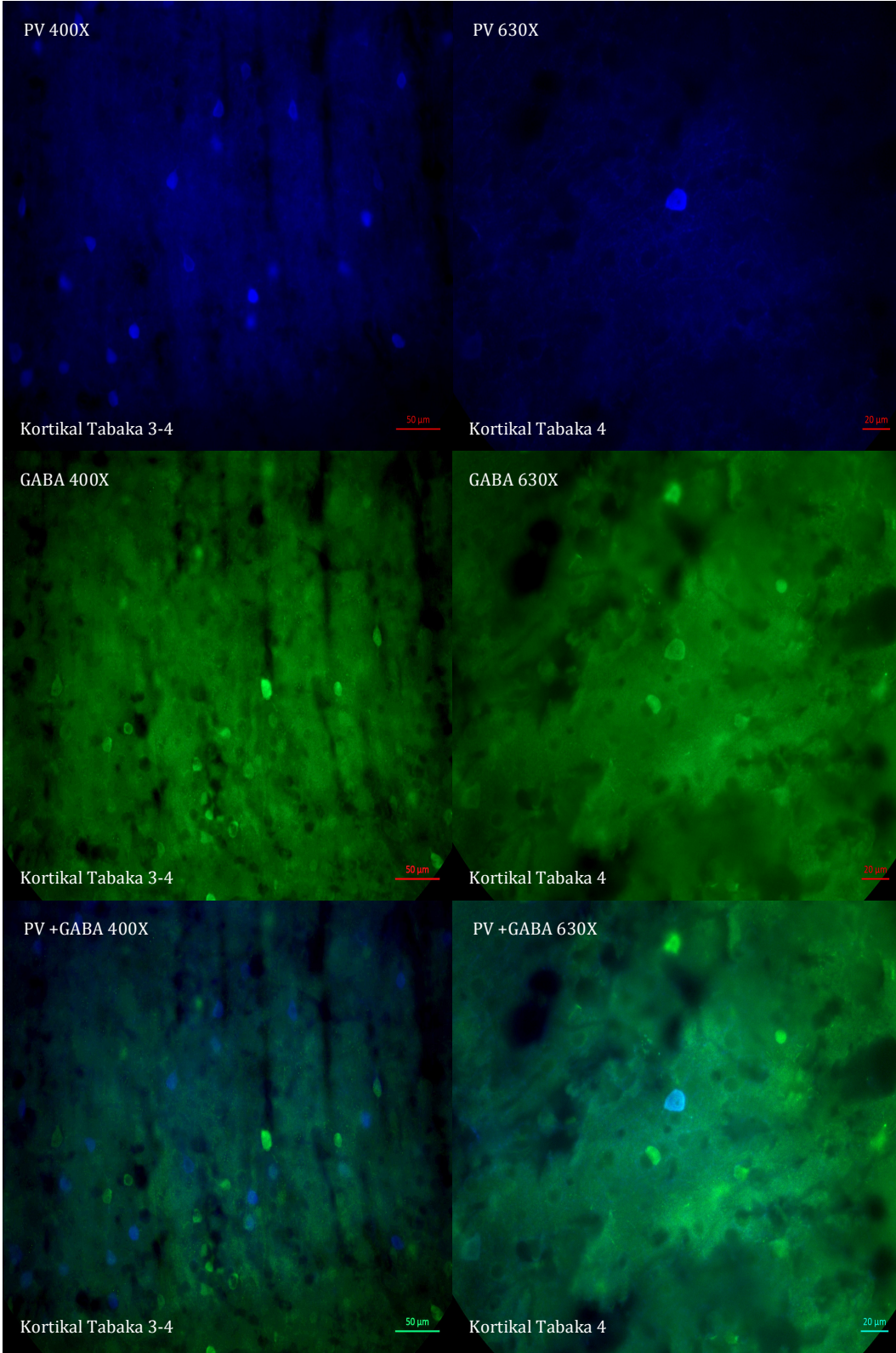
Çizim 4.7. 2 ve 8 aylık Wistar ve WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerindeki Parvalbumin içeren hücre sayısı normalize (two way-ANOVA, $P>0.05$)



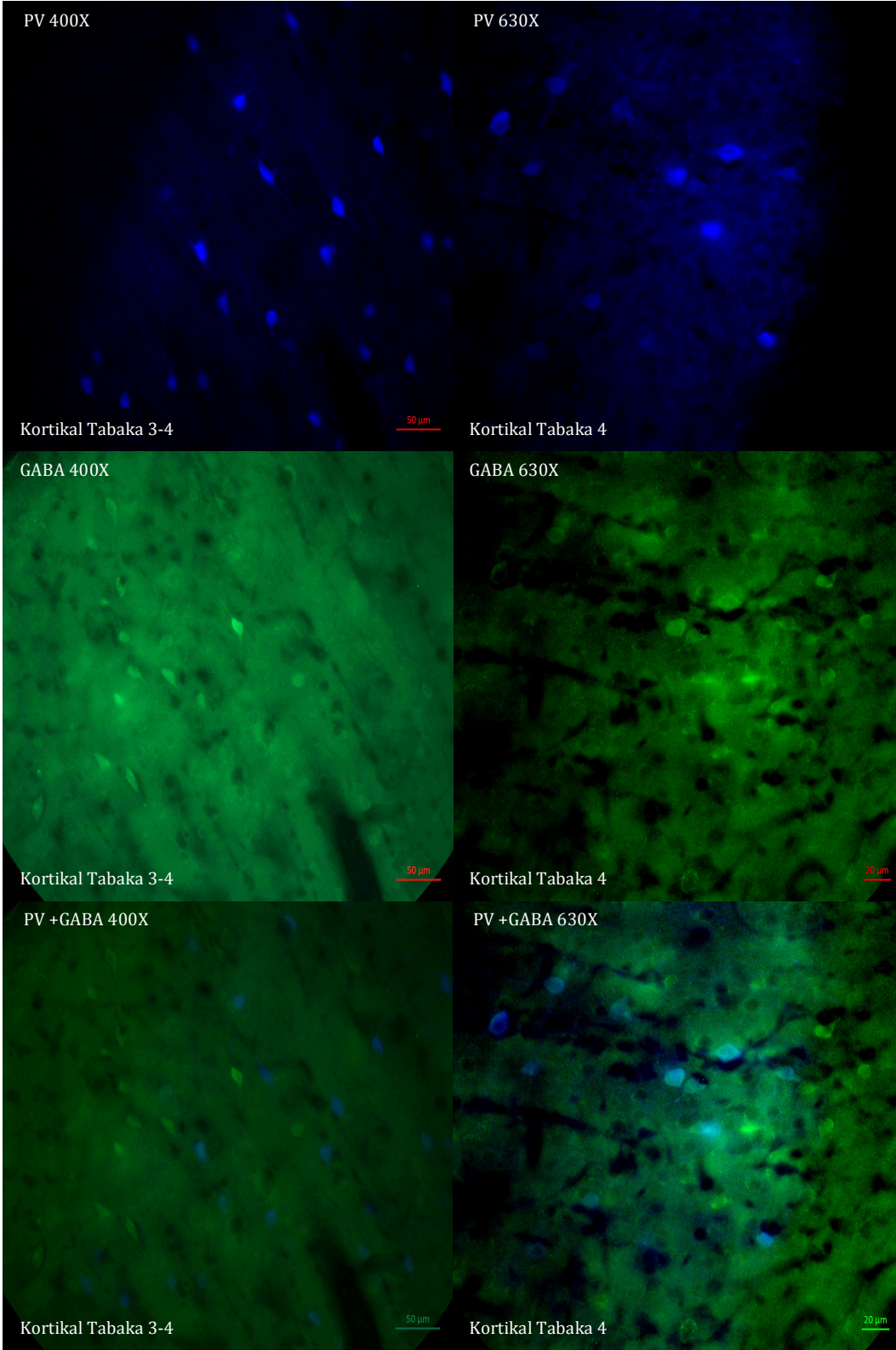
Çizim 4.8. 2 Aylık Wistar ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerine ait Parvalbumin ve GABA Görüntüleri



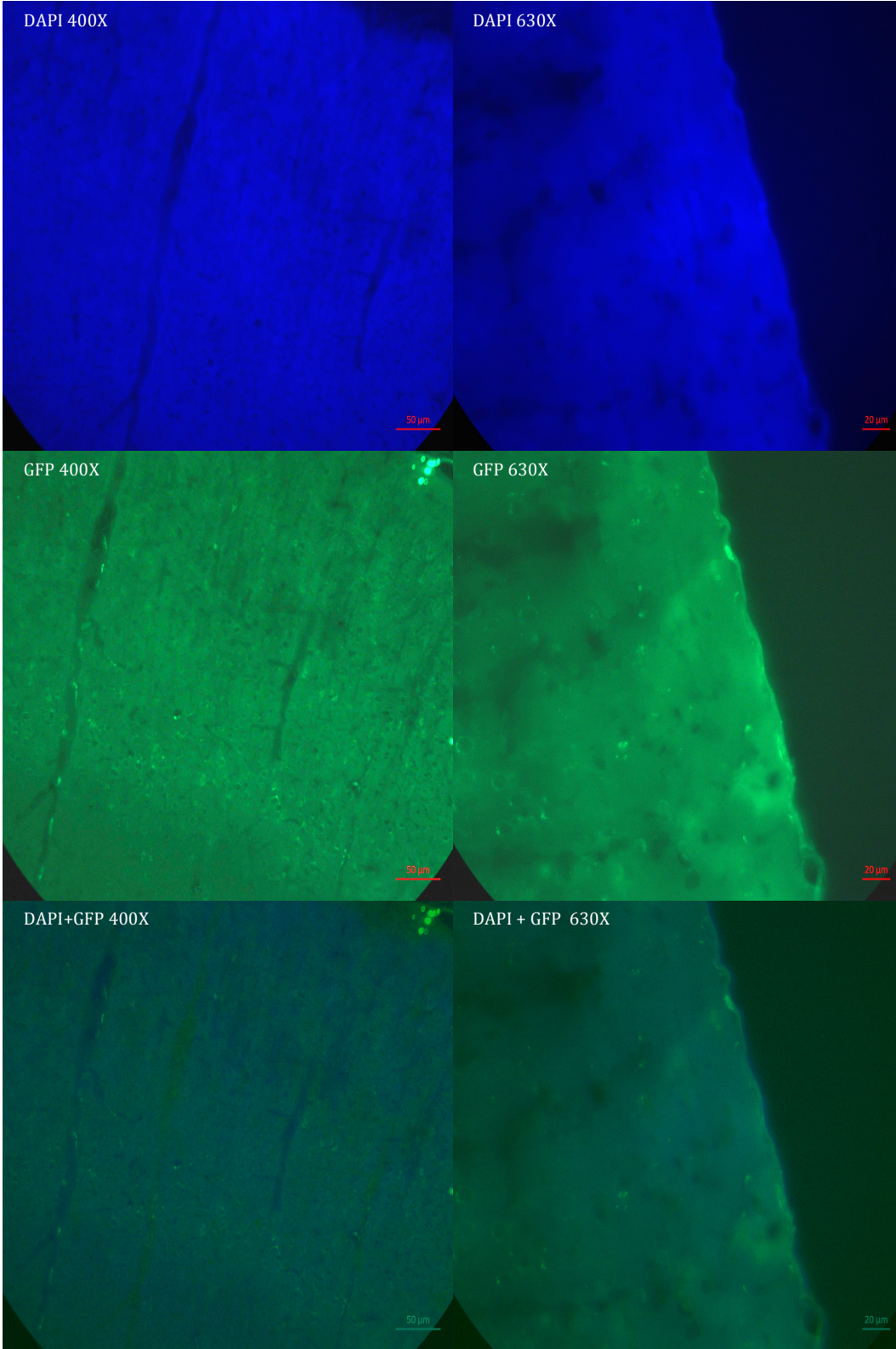
Çizim 4.9. 2 Aylık WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerine ait Parvalbumin ve GABA Görüntüleri



Çizim 4.10. 8 Aylık Wistar ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerine ait Parvalbumin ve GABA Görüntüleri



Çizim 4.11. 8 Aylık WAG/Rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerine ait Parvalbumin ve GABA Görüntüleri



Çizim 4.12. Parvalbumin ve GABA antikorlarına ait pozitif kontrol görüntüleri

5. TARTIŞMA

İmmünblotlama sonuçları değerlendirildiğinde; WAG/Rij ırkı sıçanların SPo1 bölgesini de kapsayan fronto-pariyetal kortesteki PV protein ifadesinde Wistar sıçanlara göre ırka bağlı anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Wistar Albino ırkı sıçanlarda yaşa bağlı olarak bir azalma eğilimi görülmesine rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. WAG/Rij ırkı sıçanlarda ise böyle bir azalma eğilimi görülmemiştir. CB ve CR proteinleri için ırk ya da yaş faktörlerine bağlı bir artma veya azalma eğilimi görülmemiştir.

İmmünfloresan boyama yöntemi kullanarak SPo1 bölgesindeki PV içeren nöronların sayısında istatistiksel olarak anlamlı olmayan ırka bağlı bir azalma eğilimi olduğu tespit edilmiştir. PV için elde ettiğimiz immünfloresan ve immünblotlama sonuçları birbirlerini destekler niteliktedir.

Sinir hücrelerindeki Ca^{+2} sinyalleri oldukça farklı özellikler gösterebilmektedir. Ca^{+2} dalgaları, dikenleri (spike), geçişleri (transient), uzaysal ve zamansal özelliklere bağlı olarak çok değişken karakterde olabilmektedir. Hücre içerisindeki Ca^{+2} iyonlarının çok farklı türde Ca^{+2} bağlayan proteinler (CaBP) tarafından kontrol edildiği pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. CaBP'lerin yapmış olduğu düzenlemeler, sinir hücrelerinden nörotransmitter salımını, sinaptik plastisiteyi, nöro-duyusal iletimi, aktivite bağımlı gen ifadesini, hücre içindeki hareketliliği ve pek çok önemli fizyolojik fonksiyonları etkilemesinden ötürü giderek daha fazla araştırmanın konusu olmaktadır. EF-hand süper ailesine ait proteinler; sensörler ve Ca^{+2} bağlayan proteinler olmak üzere iki alt grubuna ayrılmasına rağmen, CaBP'ler (PV, CB ve CR) hem sensör hem de Ca^{+2} bağlama özelliği gösterebilir; hatta bazı araştırmacılar her iki fizyolojik fonksiyonu aynı anda yapabileceğini belirtmektedir. Ancak, literatürde daha çok Ca^{+2} bağlama özellikleri yaygın olarak yer almaktadır (Kreutz ve diğ. 2012). Ayrıca CaBP'ler proteinler bahsettiğimiz fizyolojik fonksiyonlarının yanısıra, son zamanlarda nöron belirteci olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır (Heizmann ve Braun 1992). CaBP'lerin hücre içi Ca^{+2} kontrolünde önemli bir rolünün olması aynı zamanda hücrelerin elektriksel ve fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir. Bu duruma en güzel örnek PV^{-/-}, CB^{-/-} ve CR^{-/-} knock-out farelerin hepsinde EEG kayıtlarında 160 Hz'lik osilasyonların ortaya çıkması ve motor koordinasyonlarda bozulmaların görülmesidir. Bu kortikal osilasyonlarda meydana gelen

değişmelerin pek çok nöro-psikiyatrik bozuklukdaki yeri incelenmekte ve tartışılmaktadır (Cheron ve diğ. 2004).

CB proteinin, böbreklerden Ca^{+2} geri Emilimi (Boros ve diğ. 2009) ve pankreastaki beta hücrelerinde insülin üretimi ve salgılanması gibi rolleri olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Reddy ve diğ. 1997, Sooy ve diğ. 1999). CB'nin eksitotoksisteye karşı koruyucu etkilerinin olduğu uzun süredir araştırılmakla birlikte, bu etkinin varlığı tam olarak gösterilememiştir (Schwaller ve diğ. 2002, Schwaller 2009). Korteksteki multipolar özellikteki patlayıcı (bursting) tipte nöronal aktivite gösteren hücreler ile primidal hücreler arasında veya hipokampüsteki mossy fiber-CA3 primidal hücreler arasındaki sinapslarda görülen kısa süreli nöroplastisitenin CB'den etkilendiğinin (Blatow ve diğ. 2003) gösterilmesi, CB'nin elektriksel aktivite oluşumundaki rolünü desteklemektedir. Ayrıca, son zamanlarda bir grup araştırmacı tarafından CB'nin dendritik spinlerden dendritik *shaftlara* Ca^{+2} taşınmasında rol oynadığını göstermiştir (Schmidt ve diğ. 2007, Schmidt ve Eilers 2009). CB'nin bir diğer rolünün ise Ca^{+2} bağlı CB'nin myo-inositol 1 (veya 4) katalize eden inositol monofosfataz (IMPaz) ile etkileşime girerek hücre içindeki ikincil habercilerden biri olan Inozitoltrifosfat (IP_3) ve diaçilgliserol (DAG)'ün öncül molekülü olan myo-inositol'un oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Berggård ve diğ. 2002). CB'in bu farklı fonksiyonel özellikleri, pek çok fizyolojik ve patofizyolojik mekanizmalarda rol oynayabileceğini düşündürmekle birlikte, bu konuda yapılan araştırmalar oldukça sınırlı düzeyde kalmaktadır.

Beyindeki nöronlar dışında, CR'nin mezotelial hücrelerinde (Blum ve Schwaller 2013), kolon kanseri hücrelerinde de (Gander ve diğ. 1996) bulunduğu bilinmektedir. Hücre içinde Ca^{+2} bağlama özelliğine sahip olan proteinlerden bir diğeri CR'dir. Bu proteinin aynı zamanda Ca^{+2} sensörü olduğunu gösteren çalışma literatürde yer almaktadır (Billing-Marczak ve Kuznicki 1999). CR'nin de CB gibi nörokoruyucu etkilerinin olduğu ileri sürülmekle birlikte bu etkinin indirekt bir etki olduğu düşünülmektedir (D'Orlando ve diğ. 2001, Lukas ve Jones 1994, Pike ve Cotman 1995). CR-/- farelerin hipokampuslerinde uzun süreli potansiyalizasyonda bozulmaların meydana geldiği, aynı zamanda serebellar granül hücrelerinde ise uyarılabilirliğin artması ve daha hızlı aksiyon potansiyelleri oluşturması (Gall ve diğ. 2003) CR proteinin nöronal uyarılabilirliğe etkisini gösterir niteliktedir (Schwaller 2009).

CaBP'ler arasında en çok ilgi çeken ve önemli fizyolojik ve patofizyolojik mekanizmalarda role sahip olduğu gösterilen Ca^{+2} bağlayan protein PV'dir. Schwaller ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda PV-/- knock out farelerde kas sarsının gevşeme süresinin PV içeren *wild-tip* farelere oranla daha yavaş olduğu gösterilmiştir (Schwaller ve diğ. 1999). Yavaş kas sarsı özelliği gösteren kaslara Pvalb cDNA verilerek PV'nin miktarının artırılması durumunda kasların gevşeme hızında ciddi bir artış görülmesi (Muntener ve diğ. 1995), PV'nin elektiriksel uyarılabilir hücrelerinin fonksiyonlarında belirgin rollerinin olduğunu göstermektedir. PV'nin Purkinje hücrelerinde eş-uyarılı kolaylaştırmayı (paried-pulse fasitilasyonu) azalttığı, PV -/- ve *wild-tip* fareler arasında eş uyarılı modülasyon arasında farklılıkların görülmesi, *wild-tip* farelerinin hipokampusünün CA3 bölgesinde kainat ile oluşturulan gamma osilasyonlarının (30-80 Hz) PV -/- knock out farelere oranla 3 kat yüksek olması (Mihaly ve diğ. 1997), PV -/- farelerde pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen nöbetlerde nöbet eşiğinin daha düşük olması (Schwaller ve diğ. 2004), serebellar bağlantılarda PV'nin bulunmadığı durumlarda 160 Hz'lik osilasyonların görülmesi (Servais ve diğ. 2005), PV -/- farelerin purkinje hücrelerinin ateşleme özelliklerinin *wild-tip* farelere göre farklı özellik göstermesi (Farre-Castany ve diğ. 2007) PV'nin hücrelerin elektriksel aktivitesine etki ettiğini göstermektedir.

Ca^{+2} proteinlerin ifadelerindeki değişimler, epilepsi, beyin kanaması, şizofreni, otizm spectrum bozukluğu, Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi patolojik durumlarda ve bu hastalıkların farklı deneysel modellerinde incelenmektedir (Heizmann ve Braun 1992). Fakat, elde edilen sonuçlar araştırmacılar arasında tam bir görüş birliği oluşturamayacak kadar değişkendir. Örneğin; Alzheimer hastalığında CaBP'lerin değişimlerine ait bulgularda tutarlılık görülmemiştir. Bazı çalışmalarda postmortem beyin incelemelerinde PV'nin prefrontal, frontal ve inferior temporal kortekslerinde bir değişme görülmez iken (Hof ve diğ. 1991, Iwamoto ve Emson 1991), diğer çalışmalarda, parahippokampal, frontal, pariyetal ve temporal kortekste PV hücrelerinin sayısında ve boyutunda bir azalma olduğunu gösterilmiştir (Aria ve diğ. 1987, Satoh ve diğ. 1991). CB için de benzer bir durum söz konusudur, temporal, pariyetal ve frontal kortekste genel bir azalma durumunu ifade eden çalışmalar mevcut olmakla birlikte (McLachian ve diğ. 1987, Ichimiya ve diğ. 1988), kortekste bir azalma olmadığı diğer taraftan strium, hipokampus ve rafe çekirdeğinde ciddi azalmalar olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Lacopino ve Christakos 1990). CB proteinin Alzheimer hastalarının hipokampuslerindeki CA3

bölgesinde, subiculum ve presubiculum bölgelerinde azalmış olduğu gözlenmiştir (Brady ve Mufson 1991). Yukarıda bahsedilen çalışmalar, nörodejenartif hastalıklarda CaBP proteinlerin farklı beyin bölgelerindeki ifadelerinde tam net bir patern göstermediğini düşünmektedir.

Son zamanlarda, CaBP ile alakalı olarak dikkat çeken bir başka patolojik durum ise otizmdir. Otizm ile alakalı olarak pek çok mekanizma araştırılmaktadır. Bunlardan bir tanesi, GABAerjik nöronların alt tiplerinden biri olarak bilenen PV içeren ara nöronlarında meydana gelen değişimlerdir. PV içeren nöronların nöronlar arasındaki bağlantılarda ve osilasyonlarda rol üstlendiğinden bahsetmiştik. Otizm hastalığının hayvan modellerinde PV immünoaktif hücrelerin sayısında bir azalma olduğu (Gogolla ve diğ. 2009), benzer durumun insanlarda yapılan post-mortem çalışmalarda da gözlendiğini belirten çalışmalar mevcuttur (Hashemi ve diğ. 2016). PV +/- veya PV-/- farelerde, insanda otizm hastalığında görülen semptomlara benzer davranış bozukluklarının olduğu belirtilmiştir (Wöhr ve diğ. 2015). PV’de görülen bu azalmanın nöron sayısındaki azalmayla mı yoksa PV miktarındaki azalmayla mı ilişkili olduğu bilinmemektedir. Vicia Villosa Agglutinin (VVA) olarak bilinen lektin molekülü, PV nöronların etrafında bulunan ekstraselüler matrikse bağlanarak perinöral ağların (PNN) belirteci olarak kullanılmaktadır. PV ve VVA belirteçleri kullanılarak, otizm ile alakalı olduğu düşünülen mediyal prefrontal korteks, somatosensöriyel korteks ve striatum bölgesindeki VVA pozitif nöronlar sayılmış ve her üç bölgede aynı olduğu gösterilmiştir (Filice ve diğ. 2016). Otizmde görülen PV içeren nöronların sayısındaki azalma hangi tip PV içeren nöronlarda geldiğini tespit edebilmek adına PV içeren farklı morfolojik, elektrofizyolojik ve nörokimyasal yapıya sahip olan GABAerjik chandelier ve basket hücrelerinin sayıları PNN işaretçisi kullanılarak otizmliler hastaların postmortem prefrontal kortekslerinde araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre basket hücreler de bir değişme gözlenmezken, chandelier hücrelerde azalma olduğu görülmüştür (Arize ve diğ. 2016). Otizmliler hastaların hipokampuslarının incelendiği başka bir çalışmada PV, CB ve CR proteinlerinin yoğunlukları değerlendirilmiştir. Otizmliler hastalarda; PV immünoaktif hücrelerin yoğunluğunun CA1 ve CA3 bölgesinde, CR’nin CA1 bölgesinde, CB’nin ise *dentate gyrus* bölgesinde seçici olarak arttığı gösterilmiştir (Lawrence ve diğ 2009).

PV’nin otizm dışında başka hastalıklarla ciddi bağlantısının olduğu pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Şizofreni hastalığı hiç kuşkusuz en göze çarpan

örneklerden birisidir. Farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen araştırmalarda şizofreni hastalarının dorsolateral prefrontal kortekslerinde (DLPFC) GABA' nin sentezleyici enzimlerinden birisi olan GAD 67'nin mRNA (Gonzalez- Burgos ve diğ. 2010) ve protein (Guidotti ve diğ. 2000, Curley ve diğ. 2011) seviyelerinde azalmaların olduğu gözlenmiştir. Görülen bu azalmanın hastalığın seyri, anti-psikotik kullanımı ya da hastalığın etyopatogenezi ile ilişkisi hakkında tartışmalar devam etmektedir. Literatürdeki araştırmalara göre, GAD 67 enzimindeki azalmanın hastalığın temel bir nedeni olduğunu ileri sürülmektedir (detaylı derleme için bkz: Lewis ve diğ. 2012). Şizofrenide GAD 67 enziminde görülen bu azalmanın hangi GABAerjik alt nöron türünde olduğunu göstermek amacı ile yapılan çalışmalarda, PV içeren nöronların yaklaşık %50'sinde GAD 67 mRNA'sı olmadığı gösterilmiştir (Hashimoto ve diğ. 2003). Şizofreni hastalarının PV mRNA düzeyinde bir azalma görülmüştür. DLPFC'de protein (Woo ve diğ. 1997, Beasley ve diğ. 2002, Tooney ve Chahl 2004) ve mRNA (Hashimoto ve diğ. 2003) düzeyinde görülen bu azalma kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değildir. Bu bilgiler ışığında, şizofreni hastalığında PV nöron sayısında bir azalma görülmemekle birlikte PV nöronlarının içerdiği GAD 67 enziminde bir azalma meydana geldiği düşünülebilir. Primatların DLPFC bölgesindeki GABAerjik nöronların %45'ini CR içermesine rağmen CR ile GAD 67 arasında bir bağlantı bulunamamıştır (Lewis ve diğ. 2005).

Şizofreni hastalığı ile alakalı olarak gösterilen ve PV ile bağlantılı olabilecek ilginç bir bulgu ise, çalışan hafızada önemli bir rolü olan gamma osilasyonlarında görülen bozulmalardır (Uhlhaas ve Singer, 2010). Gamma osilasyonlarında görülen bu bozulmaların GABAerjik iletide meydana gelen bozulmalardan kaynakladığı görüşü güncel olarak tartışılmaktadır (Jobb ve diğ. 1995). Farelerde in-vivo olarak yapılan çalışmalarda PV içeren GABAerjik nöronların gamma osilasyonlarının oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Sohal ve diğ. 2009). Şizofreni hastalarının postmortem beyin dokularında yapılan bir çalışmada PV içeren GABAerjik nöronlar üzerindeki eksitator sinaptik sonlanmanın azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar PV'nin sahip olduğu uyarıcı bağlantı sayısındaki azalmanın PV ve GAD 67 enzim miktarında aşağı yönde düzenlemeye (down regülasyon) neden olduğu tartışılmaktadır. PV ve GABA'nin kortikal osilasyonların oluşumunda oynadığı rol dikkate alındığında PV ve GAD 67 enzimindeki azalmanın şizofrenide görülen gamma osilasyonlarında ve çalışan hafızada görülen bozulmalarla ilişkisi olabileceği öne sürülmektedir (Chung ve diğ. 2016).

Hücre içinde aşırı miktardaki Ca^{+2} iyonunun, proteinlerin ve lipidlerin enzimatik parçalanmasına, mitokondride fonksiyonel bozulmalara ve enerji yetmezliğine neden olarak hücreyi ölüme götürdüğü uzun zamanlardan beri bilinmektedir (Siesjo ve Wieloch 1986). Epilepsi ve iskemi gibi hastalıklarda şüphesiz ki Ca^{+2} iyonunun önemli katkısı bulunmaktadır. Dolayısıyla CaBP'lerin özellikle elektriksel aktivitedeki bozulmalar sonucunda ortaya çıkan hastalıkları etkilediği ve/veya etkilendiği pek çok araştırmacı tarafından ileri sürülmektedir. Örneğin, iskeminin hipokampüsteki nöronlar arasındaki elektriksel aktivitede bozulmalarda neden olduğu ve bu durumun nöronlarda oluşan hasarın ilk belirtilerinden birinin olduğu deneysel olarak belirtilmiştir. Bu gibi durumlarda hücre içinde CaBP proteinlerinin miktarının artırılması, oluşacak hasarı azaltmaya yardımcı olacağını düşünülebilir. İnsanda ve deney hayvanlarında bu yönde yapılan çalışmalar bulunmakla birlikte CaBP'lerin bu tür koruyucu etkilerinin olduğunu konusunda çelişkili sonuçlar ortaya koyulmaktadır (Heizmann ve Braun 1992). Nöbetlere bağlı olarak eksitatör amino asit reseptörlerinin aktivasyonunun, hücre içerisindeki Ca^{+2} miktarında artışa yol açarak, sinir hücrelerinde hasarların oluşmasına ve hücreleri ölüme götürdüğü ileri sürülmüştür (Meldrum 1981). Bu hasarın sadece belirli bölgedeki hücrelerde olması nedeniyle, bu proteinlerin koruyucu etkilerinin olduğunu düşünülmesine sebep olmuştur (Leranth ve Ribak 1991). İnsan beyin dokusu üzerinde yapılan çalışmalarda, bir grup araştırmacı PV ve CB proteinlerinde ciddi bir değişim olmadığına işaret ederken, diğerleri PV ve CB proteinlerini sentezleyen nöronlarda ciddi bir azalma olduğunu göstermişlerdir (Soliveter ve diğ. 1991).

CaBP'lerin değişen kan akımı ve oksijen miktarına bağlı olarak hücre içi Ca^{+2} seviyesini düzenleyebilmesi mümkün görünmesine rağmen, farklı beyin bölgelerinde immünohistokimyasal ve gümüş boyama teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalar tutarlı ve sistematik bulguların olmadığına dikkat çekmektedir. Hipoksik hücrelerde anormal miktarda görülen Ca^{+2} iyonunu düzenleyebilmek amacı ile Ca^{+2} bağlayabilme özelliği gösteren CaBP'lerin miktarlarında bir artış olabileceği ve bu artışın hücreleri koruma etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Kısa süreli iskemi durumunda, hipokampusün CA1 ve CA3 bölgelerindeki PV içeren hücrelerin gövdelerinde ve liflerinde PV reaktivitesinde azalma görülürken, hücrelerin aksonal terminallerinde PV reaktivitesinde artış gözlenmiştir. Zamanla önce hücre gövdelerinde sonrasında ise hücrelerinin liflerinde (fiber) PV artışı gözlenmiştir. Bu hücresel bölgeler arasında PV'nin regülasyonunda farklılıklar olduğunu düşündürmektedir (Siesjo ve Wieloch 1986). CA1 bölgesinde CB

reaktivitesi kalıcı olarak kaybolurken, ara nöronlarda ve dentat granül hücrelerinde bir değişme gözlenmemiştir (Johansen ve diğ. 1990).

CaBP' ler ile epilepsi arasındaki ilişki yeterince incelenmemiştir. Bu proteinlerin ifadelerindeki değişimler epilepsinin hayvan modellerinde, özellikle fokal epilepsiler bağlamında çalışılmış, ayrıca protein knockout farelerde kısmen incelenmiştir. Deney hayvanları kullanılarak oluşturulan epilepsi modellerinden biri olan kindling modelinde; hipokampüse giden perforant yolağın lokal olarak uyarılmasının, GABAerjik dentat hücrelerde PV içeren basket hücrelerinin sayısında bir azalmaya neden olurken, granül hücrelerdeki CB içeren nöronlarda bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Sloviter 1991). Kindling modeli kommissural liflere uygulandığında ise PV içeren nöronların sayısında bir artış gözlenmiştir (Kamphuis ve diğ 1989). Bu çalışmalarda dikkat çekilmesi gereken sonuçlardan bir tanesi, PV reaktivitesindeki görülen değişimlerin, nöronların sayısındaki gerçek artış ve azalmalar olup olmadığı ve hücre içi konsantrasyonlardaki değişimleri yansıtip yansıtmadığıdır. Sonuçta elektriksel uyarıya bağlı olarak PV proteinin konfirmasyonel yapısında değişikliklere neden olarak antikorun bağlanma niteliğinin değişmesine de neden olmuş olabilir. PV immüno-reaktivitesinde görülen bu değişikliklerin ilgili nöronlarda fonksiyonel değişikliklere dikkat çekebilir. Diğer taraftan, PV immünoreaktivitesinde ve sayısında görülen azalmanın dentate gyrustaki hücrelerde GABAerjik inhibisyonun azalmasına neden olduğu düşünülebilir. Ancak, aynı kesitlerdeki diğer bölgelerde GABAerjik inhibisyon azalmasına rağmen PV proteininde bir değişiklik olmadığını gözlenmesi bu konuda ortaya çıkan başka bir çelişkili sonuçtur (Sloviter 1991).

Nöronal uyarılmaya bağlı olarak CB miktarında da çelişkili bulgular elde edilmiştir. Perforant yollağın uyarılması CB mRNA seviyesinde geçici bir artışa neden olurken (Lowenstein ve ark. 1991), amigdaloid ve kommissural kindling CB proteininde bir değişim gözlenmemiş, fakat dentate granül hücrelerinde, yosunsu lifler (mossy fibers) de dahil olmak üzere CB miktarında bir azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, temporal lob epilepsili (TLE) hastaların ammon's horn sklerozlu hipokampus bölgesindeki CR nöronların ifadeleri incelenmiş ve CR proteinine ait her hangi bir değişim olmadığı görülmüştür (Blumcke ve diğ. 1996). Çalışmamızda ele aldığımız epilepsi türü ve kullanılan deney modeli ve hedef beyin bölgesi, insanda görülen TLE'den tamamen farklı özellikte patolojik mekanizmaya sahip olmak ile birlikte, çalışmamızda CR proteinin ırka ya da yaşa bağlı herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Fokal kortikal dispilazide

GABAerjik sistemde bir takım değişmelerin olduğu belirtilmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada; fokal dispilazili hastaların kortekslerinde CaBP içeren nöronların sayısı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada en dikkat çekici bulgu, epileptik özellik gösteren temporal neokortekste PV'ye sahip olan hücrelerin, kontrol grubuna göre artış göstermesidir. Bu durumun kortikal malformasyon ile alakalı olabileceği düşünülmektedir. CB' de görülen artışın ise epileptik nöbet aktivitesine bağlı olarak oluşmuş olabileceği ileri sürülmüştür. Genel olarak CaBP içeren nöron sayılarında görülen artışın nöbetlerin aktivitesine bağlı olabileceği ve ilaa dirençli epilepside görülen nöron kaybını kompanse edici bir mekanizma ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Kuchukhidze ve diğ. 2015).

Yukarıda adı geçen fokal epilepsiler/epilepsi modelleri dışında CaBP'ler ile jeneralize epilepsi arasındaki ilişki PTZ nöbetleri ve WAG/Rij ırkı sıçanlarda PV ile sınırlı kalarak incelenmiştir. PV -/- ve PV +/- fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, PTZ ile indüklenen tonik-klonik nöbetler incelenmiş ve PV -/- farelerde nöbetlerin şiddetinin PV +/- farelere oranla daha şiddetli olduğu ileri sürülmüştür (Schwaller ve diğ. 2004). Başka bir ifadeyle PV eksikliği PTZ nöbet duyarlılığını arttırmıştır. WAG/Rij ırkı sıçanlarda PV'nin sayıca dağılımının immünohistokimya yöntemi kullanılarak incelendiği bir çalışmada WAG/Rij ırkı sıçanlar epileptik olmayan ACI ırkı sıçanlarla karşılaştırılmış; WAG/Rij sıçanların somatosensöriyel kortekslerinde (zellikle, parietal korteks 1, forelimb area) PV miktarının azalmış olduğu gösterilmiştir (van de Bovenkamp-Janssen ve diğ. 2011). Bizim alışmamızda karşılaştırılan gruplar ve incelediğimiz somatosensöriyel alan farklı olmakla birlikte, PV içeren nöronlarda görülen bu azalma çalışmamızdaki immnoblottlama ve immünfluoresan boyamalardan elde ettiğimiz PV'deki azalma eğilimi bulgusu ile uyumludur. CB ve CR'nin absans epilepsiyle ilişkili değişimleri ise ilk defa bizim çalışmamızda incelenmiş olup immnoblottlama ölümlerde gruplar arasında fark bulunmamıştır.

PV içeren GABAerjik nöron sayısındaki azalma ile GABAerjik nöronlarda PV ifadesindeki azalma fonksiyonel sonuçları farklı olabilir. Birinci seçenekte GABAergic iletide azalma gözlenirken ikincisi GABAerjik iletide artış ile sonuçlanabilir. Örneğin, PV -/- fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada PV'nin olmaması durumunda inhibitör post sinaptik akımlarda bir kolaylaşma meydana geldiği ve GABA salımında kısa süreli kolaylaştırmaya neden olduğu gösterilmiştir (Vreugdenhill ve diğ 2003). Ayrıca, PV -/- farelerin hipokampslerinde GABAerjik iletide bir kolaylaşma görülmüştür (Schwaller ve

diğ. 2004). GABA'nın nöronların senkronize aktivasyonunda önemli rol oynadığını ve absans epilepside GABAerjik iletinin önemli bir rolü olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Bu bilgiler dahilinde çalışmamızda korktete PV miktarının azalmasına bağlı olarak talamo-kortikal yollaktaki RTN'deki GABAerjik iletide kolaylaştırmaya neden olarak absans nöbetlerin oluşumunda katkısının olabileceğini de gözardı etmemek gerekir. Çalışmamızdaki tespit edilen PV'de görülen azalmaların GABAerjik iletide bir artışa neden olarak senkronize osilasyonlar olan absans nöbetlerin oluşmasına katkısı olabilir.

Şizofreni ile GABAerjik nöronlar (özellikle PV içeren) arasında bağlantı olabileceğinden yukarıda değinilmişti. Şizofreni benzeri psikotik semptomların epilepsi hastalarında normal insanlara oranla daha fazla görüldüğünü belirten çalışmalar literatürde yer almaktadır (Janz 2002). Bu psikotik semptomların epilepsi hastalarında gözlenmesi, epilepsi hastalığı ile psikotik semptomlar arasında bir bağlantının olabileceğini düşündürmektedir. Fakat bu konuda bilgi yok denecek kadar azdır. Epilepsi hastalarında görülen psikotik semptomlar; örneğin genetik yatkınlık gibi ortak bir nedene bağlı olabileceği gibi, beyinde sürekli olarak meydana gelen nöbetlerin sonucunda da oluşmuş olabileceğini dikkate almak gerekmektedir. Literatürde bu bağlantı arasında net bilgi yer almamaktadır.

Diğer taraftan, genetik absans epilepsili sıçan ırklarından bir diğeri olan GAERS ırkı sıçanlarda yapılan bir çalışmada epilepsi ile psikotik semptomlar arasındaki bağlantı incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, GAERS ırkı sıçanların kortikal gamma osilasyonlarında iki kat bir artış gözlenmiştir. GAERS ırkı sıçanlarda görülen bu artışın insanlarda yapılan çalışmalar ile tutarlı olması (Willoughby ve diğ. 2003), gamma osilasyonlarında görülen artışın hastalıkla bir ilişkisi olduğunu desteklemektedir. Fakat bu artışın nedeni herhangi bir biyolojik veri ile gösterilmemiştir. Dolayısı ile gamma osilasyonlarında görülen bu bozulmanın PV ile bağlantısı bilinmemektedir. Ayrıca, kaudat çekirdek ve nükleus akumbens'in core kısmında dopamin taşıyıcılarında azalma, kaudat çekirdekteki D2 reseptörlerinde azalma görülmesi; GAERS ırkı sıçanların davranışsal, elektrofizyolojik ve nörokimyasal olarak psikoza benzer bir endofenotip özellik gösterdiğine işaret etmektedir. Dolayısı ile GAERS ırkı sıçanların epilepside görülen psikotik semptomların araştırılması için uygun bir model olduğu varsayılmaktadır. Literatürde, bu konu ile alakalı olarak WAG/Rij ırkı sıçanlar kullanılarak yapılmış bir

çalışma bulunmamakla birlikte şizofreni modeli olarak kabul edilen APO-SUS sıçanların EEG kayıtlarında WAG/Rij ve GAERS sıçanlara benzer şekilde belirgin DDD aktivitesinin gözlenmesi ilginç bir veridir ve epilepsi ile psikoz arasındaki ilişkinin araştırılması için bir zemin oluşturmaktadır.

Çalışmamız ile alakalı olarak bahsedilmesi gereken diğer önemli konu ise CaBP'lerde yaşla bağlantılı değişimdir. Yaşa bağlı değişimlerin incelendiği bir çalışmada CaBP'ların perirhinal korteksteği ifadeleri incelenmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçları CB miktarında yaşa bağlı bir azalma olduğunu göstermiştir, PV ve CR miktarlarında ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuçlar yaşa bağlı anlamlı değişikliklerin gözlenmediği bizim çalışmamızın bulgularıyla uyuşmamaktadır. Diğer taraftan farklı korteks bölgelerine bağlı olarak CaBP miktarları arasında farklılıklar bulunması olasıdır. Ayrıca, çalışılan hayvan ırkı (Sprague Dawley sıçanlar) bizim kullandığımız ırklardan farklıdır. Aynı çalışmada CaBP'ların kortikal tabakalara özel bir dağılım gösterdiği gözlenmiştir (Moyver ve diğ. 2011). Çalışmamızda PV'nin daha çok 4 ve 6 tabakada yaygın olarak bulunduğu gözlenmiştir. Literatürde PV, CB ve CR'nin yaşa bağlı olarak değişimlerini farklı ırktaki hayvanlarda ve beyin bölgelerinde inceleyen çalışmalar mevcuttur (Krzywkowski ve diğ. 1996, Potier ve diğ. 1994, Villa ve diğ. 1994); bu çalışmalarda yaşa bağlı bir azalma bulunmuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda CaBP'ler ile ilgili en göze çarpan sonuç; epileptik gruptaki hayvanların kortikal alanlarında PV miktarında ve PV pozitif nöron sayısında görülen azalma eğilimidir. Bu durum hem immünblotlama hem de immünfluoresan boyamada görülen bir durumdur. İmmünoblotlamada tespit edilen anlamlı azalmanın nedeni hücrelerin PV ifadesindeki azalma ve/veya PV + hücre sayısındaki azalma olabilir. İmmünofluoresan boyamada ise PV + nöron sayısında anlamlı olmayan azalma eğilimi tespit edilmiştir. Irklar arasındaki bu farklılığın yaşla ilişkili olmaması başka bir ifadeyle WAG/Rij sıçanların PV miktarının ve PV + hücre sayısındaki azalmanın absans nöbetlerin görülmediği 2 aylık yaş grubunda ve nöbet sıklığının yüksek olduğu 8 aylık yaş gruplarında da ortaya çıkması, bu durumun absans nöbetlerin neden olduğu bir farklılıktan çok absans nöbet gelişiminden sorumlu bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. WAG/Rij sıçanlarda PV'de görülen bu azalma eğiliminin absans nöbetlerle ilişkisinin farklı moleküler ve fizyolojik yöntemlerin kullanıldığı araştırılmalarda detaylı olarak incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Mevcut çalışma epileptik ve epileptik olmayan hayvanları karşılaştırmakta olup, absans epilepsili sıçanlarda nöbet aktiviteleri arasındaki bireysel farklılıklar da dikkate alındığında, bu hayvan modelinde PV miktarı ile absans nöbetlerin şiddeti arasındaki ilişkinin araştırılması gerekmektedir.

Kortikal PV ifadesindeki ırkı bağlı farklılığın diğer beyin bölgelerinde de var olup olmadığının incelenmesi nöbet aktivitesine katılan veya etkilenen beyin bölgelerinin tespit edilmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Aker RG, Yananli HR, Gurbanova AA ve diğ. Amygdala kindling in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Epilepsia*. 2006; 47; 33-40.
- Akman O, Demiralp T, Ates N, Onat FY. Electroencephalographic differences between WAG/Rij and GAERS rat models of absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 2010; 89(2-3):185-193.
- Andersen P, Andersson SA. Physiological Basis of the Alpha Rhythm. Appleton-Century- Crofts, New York, 1968.
- Arai H, Emson PC, Mountjoy CQ ve diğ. Loss of parvalbumin-immunoreactive neurones from cortex in Alzheimer-type dementia. *Brain Res*. 1987; 418(1):164-9.
- Arai R, Jacobowitz DM, Deura S. Ultrastructural localization of calretinin immunoreactivity in lobule V of the rat cerebellum. *Brain Res*. 1993; 613: 300-04.
- Ariza J , Rogers H , Hashemi E ve diğ. The Number of Chandelier and Basket Cells Are Differentially Decreased in Prefrontal Cortex in Autism. *Acta Neurol Scand*. 2010; 121(2): 99-108.
- Avoli M. A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia*. 2012;53(5):779-789.
- Baimbridge KG, Mody I, Miller JJ. Reduction of rat hippocampal calcium-binding protein following commissural, amygdala, septal, perforant path, and olfactory bulb kindling. *Epilepsia*. 1985; 26(5): 460-465.
- Bancaud J. Physiopathogenesis of generalized epilepsies of organic nature (stereoencephalographic study). Gastaut H, Jasper HH, Bancaud J, Waltregny A (Ed). The Physiopathogenesis of the Epilepsies. Springfield, Ill, Charles C Thomas Publisher, 1969.
- Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum*. 2003; 2: 242-62.
- Bayne T. The presence of consciousness in absence seizures. *Behav Neurol*. 2011;24(1): 47-53.
- Bazyan AS, van Luijtelaa G. Neurochemical and behavioral features in genetic absence epilepsy and in acutely induced absence seizures. *ISRN Neurol*. 2013; (Doi:10.1155/2013/875834).
- Beasley CL, et al. Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biol. Psychiatry* 2002; 52:708-715.
- Belichenko PV, Vogt WD, Myklossy J ve diğ. Calretinin-positive Cajal-Retzius cells persist in the adult human neocortex. *Neuroreport*. 1995; 6: 1869-874.
- Berggård T, Szczepankiewicz O ,Thulin E ve diğ. Myo-inositol mono phosphatase is an activated target of calbindin D28k. *J. Biol.Chem*. 2002; 277: 41954-41959.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signaling: Dynamics, homeostasis, and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 517-29.
- Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron*. 1998; 21: 13-26.
- Bessaih T, Bourgeois L, Badiu CI. Nucleus-specific abnormalities of GABAergic synaptic transmission in a genetic model of absence seizures. *Journal of neurophysiology*. 2006; 96: 3074-308.
- Billing-Marczak K, Kuznicki J. Calretinin-sensor or buffer-function still unclear. *Pol J Pharmacol*. 1999; 51: 173-178.
- Blatow M, Caputi A, Burnashev N ve diğ. Ca²⁺ buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron*. 2003; 38: 79-88.

- Blum W, Schwaller B. Calretinin is essential for mesothelioma cell growth/survival in vitro: a potential new target for malignant mesothelioma therapy? *Int.J.CancerJ.Int.ducancer*. 2013; 133: 2077-2088.
- Blumcke I, Beck H, Nitsch R ve diğ. Preservation of calretinin-immunoreactive neurons in the hippocampus of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; 55(3): 329-41.
- Blumenfeld H, Klein JP, Schridde U ve diğ. Early treatment suppresses the development of spike-wave epilepsy in a rat model. *Epilepsia*. 2008; 49: 400-09.
- Boros S, Bindels RJ, Hoenderop JG. Active Ca reabsorption in the connecting tubule. *Pflugers Arch* 2009; 458: 99-109.
- Bouwman BM, van den Broek PLC, van Luijtelaar G ve diğ. The effects of vigabatrin on type II spike wave discharges in rats. *Neuroscience Letters*. , 2003: 338(3): 177-180.
- Bown AW, Shelp BJ. The Metabolism and Functions of γ -Aminobutyric Acid. *Plant Physiol*.1997; 115 (1): 1-5.
- Braak E, Braak H. The new monodendritic neuronal type within the adult human cerebellar granule cell layer shows calretinin-immunoreactivity. *Neurosci Lett*. 1993; 154: 199-202.
- Brady DR , EJ. (1991) Soc. Neurosci. Abstr. 17, 691
- Braunewell KH, Gundelfinger ED. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: A family of EF-hand calcium binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res*. 1999 ; 295: 1-12.
- Burgoyne RD, Weiss JL. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J*. 2001; 353: 1-12.
- Buzsáki G. The thalamic clock: emergent network properties. *Neuroscience*. 1991; 41: 351- 364.
- Celio M, Pauls T, Schwaller B (Ed). Guidebook to the Calcium-Binding Proteins. Oxford University Press, Oxford, 1996.
- Celio MR. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*. 1990; 35: 375-475.
- Celio MR. Parvalbumin in most gaminobutyric acid containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science*. 1986; 231: 995-97.
- Cheron G, Gall D, Servais L ve diğ. Inactivation of calcium-binding protein genes induces 160 Hz oscillations in the cerebellar cortex of alert mice. *J Neurosci*. 2004; 24: 434-441.
- Chung DW, Fish KN, Lewis DA. Pathological Basis for Deficient Excitatory Drive to Cortical Parvalbumin Interneurons in Schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2016;173(11): 1131-1139.
- Citraro R, Russo E, Di Paola ED ve diğ. Effects of some neurosteroids injected into some brain areas of WAG/Rij rats, an animal model of generalized absence epilepsy. *Neuropharmacology*. 2006a; 50: 1059-71.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K ve diğ. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 1995; 378: 75-78.
- Coenen AM, Van Luijtelaar EL. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behavior genetics*. 2003; 33: 635-55.
- Coenen AM, Van Luijtelaar EL. The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. *Epilepsy research*. 1987; 1: 297-301.
- Cohen P, Klee CB. Calmodulin. Elsevier, Amsterdam-New York- Oxford, 1988.

- Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nature reviews. Neuroscience*. 2002; 3: 371-82.
- Csillik B, Mihaly A, Krisztin-Peva B ve diğ. GABAergic parvalbumin-immunoreactive large calyciform presynaptic complexes in the reticular nucleus of the rat thalamus. *J Chem Neuroanat*. 2005; 30: 17-26.
- Curley AA, Arion D, Volk DW ve diğ. Cortical deficits of glutamic acid decarboxylase 67 expression in schizophrenia: clinical, prote and cell type-specific features. *Am. J. Psychiatry*. 2011; 168: 921-929.
- D'Antuono M, Inaba Y, Biagini G ve diğ. Synaptic hyperexcitability of deep layer neocortical cells in a genetic model of absence seizures. *Genes, brain, and behavior*. 2006; 5: 73-84.
- D'Orlando C, Fellay B, Schwaller B ve diğ. Calretinin and calbindin D-28k delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in transfected P19 cells. *Brain Res*. 2001; 909: 145-158.
- Danober L, Deransart C, Depaulis A ve diğ. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol*. 1998; 55(1): 27-57.
- Depaulis A, Charpier S. Pathophysiology of absence epilepsy: Insights from genetic models. *Neurosci Lett*. 2017; S0304-3940(17)30141-6.
- Douglas R, Nordli J. Idiopathic generalized epilepsies recognized by the International League Epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46:48-56.
- Drinkenburg WH, Coenen AM, Vossen JM ve diğ. Spike-wave discharges and sleep-wake states in rats with absence epilepsy. *Epilepsy research*. 1991; 9: 218-24.
- Edmonds B, Reyes R, Schwaller B ve diğ. Calretinin modifies presynaptic calcium signaling in frog saccular hair cells. *Nat Neurosci* 2000; 3: 786-790.
- Enderlin S, Norman AW, Celio MR. Ontogeny of the calcium-binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol*. 1987; 177: 15-28.
- Erdő SL, Wolff JR. γ -Aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J. Neurochem*. 1990; 54 (2): 363-72.
- Farre-Castany MA, Schwaller B, Gregory P ve diğ. Differences in locomotor behavior revealed in mice deficient for the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin D-28k or both. *Behav Brain Res*. 2007; 178: 250-261.
- Felix R. Insights from mouse models of absence epilepsy into Ca^{+2} channel physiology and disease etiology. *Cell Mol Neurobiol*. 2002; 22(2): 103-120.
- Ferrer I, Tunon T, Soriano E ve diğ. Calbindin immunoreactivity in normal human temporal neocortex. *Brain Res*. 1992; 572: 33-4.
- Floris A, Dino M, Jacobowitz DM, ve diğ. The unipolar brush cells of the rat cerebellar cortex and cochlear nucleus are calretinin-positive: A study by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* 1994; 189: 495-520.
- Fonseca M, Soriano E. Calretinin-immunoreactivity neurons in the normal temporal cortex and in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1995; 691: 83-91.
- Frassoni C, Bentivoglio M, Spreafico R, Sanchez MP, Puelles L, et al. Postnatal development of calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the thalamus of the rat. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991; 58: 243-49.
- Freund TF, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 1996; 6: 347-470.
- Fukuda T, Kosaka T. Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus. *J Neurosci*. 2000; 20: 1519-528.

- Galarreta M, Hestrin S. Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2: 425-33.
- Gall D, Roussel C, Susa I ve diğ. Altered neuronal excitability in cerebellar granule cells of mice lacking calretinin. *J Neurosci.* 2003; 23: 9320-9327.
- Gander JC, Gotzos V, Fellay B ve diğ. Inhibition of the proliferative cycle and apoptotic events in WiDr cells after down-regulation of the calcium-binding protein calretinin using anti sense oligodeoxynucleotides. *Exp. CellRes.* 1996; 225: 399-410.
- Giblin KA, Blumenfeld H. Is epilepsy a preventable disorder? New evidence from animal models. The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, *Neurology and Psychiatry.* 2010; 16: 253-75.
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature.* 1999; 402: 75-79.
- Global campaign against epilepsy care, Atlas epilepsy care in the world. 2005. WHO, ILAE IBE.
- Gloor P. Generalized cortico-reticular epilepsies: some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge. *Epilepsia.* 1968; 9: 249-63.
- Gloor P, Fariello RG. Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. *Trends in neurosciences* 1988; 11: 63-68.
- Gogolla N, Leblanc JJ, Quast KB ve diğ. Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *J Neurodev Disord.* 2009; 1(2): 172-81.
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat.* 2008; 1-3.
- Gonzalez-Burgos G, Hashimoto T, Lewis DA. Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.* 2010; 12; 335-344.
- Gray CM, Singer W. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989; 86 (5): 1698-1702.
- Grillner S, Markram H, De Schutter E ve diğ. Microcircuits in action—from CPGs to neocortex. *Trends Neurosci.* 2005; 28: 525-33.
- Guidotti A, Auta J, Davis JM ve diğ. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2000; 57: 1061-1069.
- Gulyas AI, Miettinen R, Jacobowitz DM ve diğ. Calretinin is present in nonpyramidal cells of the rat hippocampus-I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience.* 1992; 48: 1-27.
- Gupta A, Wang Y, Markram H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science.* 2000; 287: 273-78.
- Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A ve diğ. The concentrations of calcium-buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 2005; 25: 7867-875.
- Hashemi E, Ariza J, Rogers H ve diğ. The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Medial Prefrontal Cortex in Autism. *Cereb Cortex.* 2017; 27(3): 1931-1943.
- Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM ve diğ. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J. Neurosci.* 2003; 23: 6315-6326.
- Heizmann CW, Braun K. Changes in Ca⁺²-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 1992; 15: 259-264.

- Heizmann CW, Braun K. Changes in Ca²⁺-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Neuron*. 1992; 15(7): 259-264.
- Hendrickson AE, Van Brederode JF, Mulligan KA ve diğ. Development of the calcium-binding protein parvalbumin and calbindin in monkey striate cortex. *J Comp Neurol*. 1991; 307: 626-46.
- Hof PR, Cox K, Young WG ve diğ. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 199; 50(4): 451-62.
- Hof PR, Glezer II, Conde F ve diğ. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: Phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat*. 1999; 16: 77-116.
- Hormuzdi SG, Pais I, Le Beau FE ve diğ Impaired electrical signaling disrupts g frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron*. 2001; 31: 487-95.
- Hosford DA, Wang Y, Cao Z. Differential effects mediated by GABAA receptors in thalamic nuclei in lh/lh model of absence seizures. *Epilepsy research*. 1997; 27: 55-65.
- Hubbard MJ, McHugh NJ. 1995. Calbindin 28 kDa and calbindin 30 kDa (calretinin) are substantially localized in the particulate fraction of rat brain. *FEBS Lett* 374: 333-37.
- Hughes JR. Absence seizures: a review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behav*. 2009;15(4):404-412.
- Huguenard JR. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol*. 1996; 58: 3329-248.
- Iacopino AM, Christakos S. Corticosterone regulates calbindin-D28k mRNA and protein levels in rat hippocampus. *J Biol Chem*. 1990; 265(18): 10177-80.
- Ichimiya Y, Emson PC, Mountjoy CQ ve diğ. Loss of calbindin-28K immunoreactive neurones from the cortex in Alzheimer-type dementia. *Brain Res*. 1988; 475(1):156-159.
- Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci*. 1996; 1: 14-17.
- Iwamoto N, Piers CE. Demonstration of neurofibrillary tangles in parvalbumin-immunoreactive interneurons in the cerebral cortex of Alzheimer-type dementia brain. 1991: 128(1); 81-84 *J Comp Neurol*. 1991; 308(3): 381-96.
- Jallon P, Latour P. Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*. 2005; 46(s9)(suppl 9): 10-14.
- Janz D. The psychiatry of idiopathic generalized epilepsy. Trimble MR, Schmitz B (Ed). *The Neuropsychiatry of Epilepsy*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- Janz D. The idiopathic generalized epilepsies of adolescence with childhood and juvenile age of onset. *Epilepsia*. 1997; 38: 4-11.
- Johansen FF, Tønder N, Zimmer J ve diğ. Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 1990; 120(2): 171-174.
- Jones NC, Martin S, Megatia I ve diğ. A genetic epilepsy rat model displays endophenotypes of psychosis. *Neurobiol Dis*. 2010; 39(1):116-25.
- Kamphuis W, Huisman E, Wadman WJ ve diğ. Kindling induced changes in parvalbumin immunoreactivity

- in rat hippocampus and its relation to long-term decrease in GABA-immunoreactivity. *Brain Res.* 1989; 479(1): 23-34.
- Kamphuis W, Huisman E, Wadman WJ ve diğ. Kindling induced changes in parvalbumin immunoreactivity in rat hippocampus and its relation to long-term decrease in GABA-immunoreactivity. *Brain Res.* 1989; 479(1): 23-34.
- Kandel E, Schwartz JH, Jessel TM (Ed) Principles of neural science. New York, McGraw Hill. 2013
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex.* 1997; 7: 476-86.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience.* 1998; 85: 677-701.
- Kawasaki H, Nakayama S, Kretsinger RH. Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals.* 1998; 11: 277-95.
- Kosaka T, Kosaka K, Nakayama T ve diğ. Axons and axon terminals of cerebellar Purkinje cells and basket cells have higher levels of parvalbumin immunoreactivity than somata and dendrites: Quantitative analysis by immunogold labeling. *Exp Brain Res.* 1993; 93: 483-491.
- Kostopoulos GK. Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. *Clinical neurophysiology:official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology.* 2000; 111: Suppl 2, 27-38.
- Kreutz MR, Naranjo JR, Koch KW ve diğ. The Neuronal Functions of EF-Hand Ca²⁺-Binding Proteins. *Front Mol Neurosci.* 2012; 5: 92.
- Krzywkowski P, Potier B, Billard JM ve diğ. Synaptic mechanisms and calcium binding proteins in the aged rat brain. *Life Sci.* 1996; 59: 421-428.
- Kuchukhidze G, Wieselthaler-Hözl A, Drexel M ve diğ. Calcium-binding proteins in focal cortical dysplasia. *Epilepsia.* 2015; 56(8): 1207-1216.
- Lannes B, Micheletti G, Vergnes M ve diğ. Relationship between spike-wave discharges and vigilance levels in rats with spontaneous petit mal-like epilepsy. *Neuroscience letters.* 1988; 94: 187-91.
- Lawrence YA, Kemper TL, Bauman ML ve diğ. Parvalbumin, calbindin, and calretinin-immunoreactive hippocampal interneuron density in autism. *Acta Neurol Scand.* 2010; 121(2): 99-108.
- Leclerc I, Sturchler E, Heizmann CW. Calcium regulation by EF-hand proteins in the brain. Lajtha A (Ed). *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology (3. Baskı)*. New York: Springer, 2006.
- Lee SH, Schwaller B, Neher E. Kinetics of Ca⁺² Binding to parvalbumin in bovine chromaffin cells: Implications for [Ca₂] transients of neuronal dendrites. *J Physiol.* 2000; 525 (2): 419-32.
- Leranth C, Ribak CE. Calcium-binding proteins are concentrated in the CA2 field of the monkey hippocampus: a possible key to this region's resistance to epileptic damage. *Exp Brain Res.* 1991; 85(1): 129-36.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6: 312-324.
- Lillis KP, Wang Z, Mail M ve diğ. Evolution of Network Synchronization during Early Epileptogenesis Parallels Synaptic Circuit Alterations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2015; 35: 9920-34.
- Liu Z, Vergnes M, Depaulis A ve diğ. Evidence for a critical role of GABAergic transmission within the thalamus in the genesis and control of absence seizures in the rat. *Brain Research.* 1991; 545(1-2): 1-7.

- Lowenstein DH, Miles MF, Hatam F ve diğ. Up regulation of calbindin-D28K mRNA in the rat hippocampus following focal stimulation of the perforant path. *Neuron*. 1991; 6(4): 627-33.
- Lüders H, Lesser RP, Dinner DS ve diğ. Generalized epilepsies: a review. *Cleve Clin Q*. 1984; 51: 205-26.
- Luhmann HJ, Mittmann T, van Luijteleaer G ve diğ. Impairment of intracortical GABAergic inhibition in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 1995; 22(1): 43-51.
- Lukas W, Jones KA. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity. *Neuroscience*. 1994; 61: 307-316.
- Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: From evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 322: 1111-122.
- Marescaux C, Micheletti G, Vergnes M ve diğ. Diazepam antagonizes GABA mimetics in rats with spontaneous petit mal-like epilepsy. *European Journal of Pharmacology*. 1985; 113, (1): 19-24.
- McCormick DA, Bal T. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annual review of neuroscience*. 1997; 20: 185-215.
- McLachlan DR, Wong L, Bergeron C ve diğ. Calmodulin and calbindin D28K in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1987; 1(3): 171-179.
- Meeren H, van Luijteleaer G, Lopes da Silva F. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Archives of neurology*. 2005; 62: 371-76.
- Meeren HK, Pijn JP, Van Luijteleaer EL ve diğ. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002; 22: 1480-95
- Meeren HK, Veening JG, Mödersheim TA ve diğ. Thalamic lesions in a genetic rat model of absence epilepsy: dissociation between spike-wave discharges and sleep spindles. *Exp Neurol*. 2009; 217(1): 25-37.
- Meldrum BS. Metabolic effects of prolonged epileptic seizures and the causation of epileptic brain damage. Rose FC. (Ed) *Metabolic Disorders of the Nervous System*, Pitman Medical, London, 1981.
- Midzianovskaia IS, Kuznetsova GD, Coenen AM ve diğ. Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats. *Brain research*. 2001; 911: 62-70.
- Miettinen R, Gulyas AI, Baimbridge KG ve diğ. Calretinin is present in nonpyramidal cells of the rat hippocampus-II. Coexistence with other calcium binding proteins and GABA. *Neuroscience*. 1992; 48: 29-43.
- Mihaly A, Szente M, Dubravcsik Z ve diğ. Parvalbumin and calbindin containing neurons express c-fos protein in primary and secondary (mirror) epileptic foci of the rat neocortex. *Brain Res*. 1997; 761: 135-145.
- Moyer JR, Furtaka SC, McGanna JP ve diğ. Aging-related changes in calcium binding proteins in rat perirhinal cortex. *Neurobiol Aging*. 201; 32(9): 1693-1706.
- Muller A, Kukley M, Stausberg P ve diğ. Endogenous Ca^{+2} buffer concentration and Ca^{+2} microdomains in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2005; 25: 558-65.
- Muntener M, Kaser L, Weber J ve diğ. Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 6504-6508.
- Nagerl UV, Novo D, Mody I, ve diğ. Binding kinetics of calbindin D-28k determined by flash photolysis of caged Ca^{+2} . *Biophys J* 2000b; 79: 3009-018.
- Nelson MR, Chazin WJ. Structures of EF-hand Ca^{+2} binding proteins: Diversity in the organization, packing,

and response to Ca⁺² binding. *Biometals*. 1998; 11: 297-318.

Niedermeyer E. The Generalized Epilepsies: A Clinical Electroencephalographical Study. Springfield, Ill: Charles C Thomas Publisher, 1972.

Onat FY, van Luijtelaar G, Nehlig A, Snead OC III. The involvement of limbic structures in typical and atypical absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 2013;103(2-3):111-123.

Ottman R. Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia*. 2005; 46(suppl. 10): 7-14.

Panayiotopoulos CP. Typical absence seizures and their treatment. *Arch Dis Child*. 1999; 81: 351-355.

Parker APJ, Agathonikou A, Robinson RO ve diğ. Inappropriate use of carbamazepine and vigabatrin in typical absence seizures. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 1998; 40 (8): 517-19.

Penfield WG Jasper HH Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain. Boston, Mass: Little Brown & Co; 1954.

Pikainen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (Ed) Models of seizures and epilepsy. Elsevier, USA, 2006.
Pike CJ, Cotman CW. Calretinin-immunoreactivity neurons are resistant to B-amyloid toxicity in vitro. *Brain Res*. 1995; 671: 293-298.

Pitkanen A, Engel J. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2014; 11: 231-41.

Polack PO, Guillemain I, Hu E ve diğ. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J. Neurosci*. 2007; 27: 6590-6599.

Potier B, Krzywkowski P, Lamour Y ve diğ. Loss of calbindin-immunoreactivity in CA1 hippocampal stratum radiatum and stratum lacunosum-moleculare interneurons in the aged rat. *Brain Res*. 1994; 661: 181-188.

Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on classification and terminology of the international league against epilepsy. 1989; 30 (4): 389-399.

Reddy D, Pollock AS, Clark SA ve diğ. Transfection and overexpression of the calcium binding protein calbindin-D28k results in a stimulatory effect on insulin synthesis in a rat beta cell line (RIN 1046-38). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 1961-1966.

Reynolds EH. Epilepsy in the world. Launch of the Second Phase of the ILAE/IBE/WHO Global Campaign Against Epilepsy. *Epilepsia*. 2002; 43(Suppl.6):1-5.

Roth RJ, Cooper JR, Bloom FE. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford (Oxfordshire): Oxford University Press, 2003.

Russo E, Citraro R, Scicchitano F ve diğ. Effects of early long-term treatment with antiepileptic drugs on development of seizures and depressive-like behavior in a rat genetic absence epilepsy model. *Epilepsia*. 2011; 52:1341-50.

Sarkisova K, van Luijtelaar G. The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression [corrected]. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2011; 35: 854-76.

Sarkisova KY, Kuznetsova GD, Kulikov MA ve diğ. Spike-wave discharges are necessary for the expression of behavioral depression-like symptoms. *Epilepsia*. 2010; 51: 146-60.

Satoh J, Tabira T, Sano M ve diğ. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the human central nervous system are decreased in Alzheimer's disease. *J. Acta Neuropathol*. 1991; 81(4): 388-95.

Schmidt H, aEilers J. Spine neck geometrydeterminesspino- dendriticcross-talkinthepres-

- ence of mobile endogenous calcium-binding proteins. *J. Comput. Neurosci.* 2009; 27: 229-243.
- Schmidt H, Kunerth S, Wilms C ve diğ. Spino-dendritic cross-talk in rodent Purkinje neurons mediated by endogenous Ca^{2+} -binding proteins. *J. Physiol.* 2007; 581: 619-629.
- Schmidt H, Stiefel KM, Racay P ve diğ. Mutational analysis of dendritic Ca^{+2} kinetics in rodent Purkinje cells: Role of parvalbumin and calbindin D-28k. *J Physiol.* 2003b; 551: 13-32.
- Schousboe A, Waagepetersen HS. GABA: homeostatic and pharmacological aspects. *Prog. Brain Res. Progress in Brain Research.* 2007; 160: 9-19.
- Schridde U, Strauss U, Brauer AU ve diğ. Environmental manipulations early in development alter seizure activity, Ih and HCN1 protein expression later in life. *The European Journal of Neuroscience.* 2006; 23: 3346-58.
- Schridde U, van Luijckelaar G. The influence of strain and housing on two types of spike-wave discharges in rats. *Genes, brain, and behavior.* 2004; 3: 1-7.
- Schwaller B. Emerging Functions of the ‘‘ Ca^{+2} Buffers’’ Parvalbumin, Calbindin D-28k and Calretinin in the Brain. Lajtha A, Banik N. (Ed) Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology. Springer, USA, 2007.
- Schwaller B, Bruckner G, Celio MR ve diğ.. A polyclonal goat antiserum against the calcium-binding protein calretinin is a versatile tool for various immunochemical techniques. *J Neurosci Methods* 1999a ;92: 137-144.
- Schwaller B, Dick J, Dhoot G ve diğ. Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1999; 276: 395-403.
- Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S. ‘New’ functions for ‘old’ proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum.* 2002. 1: 241-258.
- Schwaller B, Tetko IV, Tandon P ve diğ. Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Mol Cell Neurosci.* 2004; 25: 650-663.
- Schwaller B. The continuing disappearance of ‘‘pure’’ Ca^{2+} buffers. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66: 275-300.
- Scicchitano F, van Rijn C, van Luijckelaar G. Unilateral and bilateral cortical resection: effects on Spike-Wave discharges in a genetic absence epilepsy model. *PloS one.* 2015b; 11: 10(8) | DOI:10.1371/journal.pone.0133594.
- Servais L, Bearzatto B, Schwaller B, Dumont M, De Saedeleer C, Dan B, Barski JJ, Schiffmann SN, Cheron G. 2005. Mono- and dual-frequency fast cerebellar oscillation in mice lacking parvalbumin and/or calbindin D-28k. *Eur J Neurosci.* 22: 861–870.
- Seto-Ohshima A, Emson PC, Berchtold MW ve diğ. Localization of parvalbumin mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Exp Brain Res.* 1989; 75: 653-58.
- Shorvon S. The etiological classification of epilepsy. *Epilepsia,* 2011; 52(6):1052-1057.
- Siesjo BK, Wieloch T. Epileptic brain damage: pathophysiology and neurochemical pathology. Delgado-Escueta AV, Ward AA Jr. (Ed) in *Advances in Neurology* pp. 813-847, Raven Press, 1986.
- Skelton NJ, Kordel J, Akke M ve diğ. Signal transduction versus buffering activity in Ca^{+2} binding proteins. *Nat Struct Biol.* 1994; 1: 239-45.
- Skelton NJ, Kordel J, Chazin WJ. Determination of the solution structure of Apo calbindin D-9k by NMR

spectroscopy. *J Mol Biol.* 1995; 249: 441-62.

Slaght SJ, Leresche N, Deniau J ve diğ. Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *J Neurosci.* 2002; 22: 2323–334.

Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM ve diğ. Calcium-binding protein (calbindin D-28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol.* 1991; 308: 381-96.

Sloviter RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus.* 1991; 1(1): 41-66.

Snead OC 3rd. Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Annals of neurology.* 1995; 37: 146-57.

Snead OC 3rd, Depaulis A, Banerjee PK ve diğ. The GABAA receptor complex in experimental absence seizures in rat: an autoradiographic study. *Neuroscience letters.* 1992; 140: 9-12.

Snead OC 3rd, Evidence for GABAB-mediated mechanisms in experimental generalized absence seizures. *European Journal of Pharmacology.* 1992; 213: 343-49.

Sohal VS, Zhang F, Yizhar O ve diğ. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 2009;459: 698-702.

Solbach S, Celio MR. Ontogeny of the calcium-binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat Embryol.* 1991; 184: 103-24.

Sooy K, Schermerhorn T, Noda M ve diğ. Calbindin-D (28k) controls [Ca²⁺]_i and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem.* 1999; 274: 34343-34349.

Staley K, Hellier JL, Dudek FE. Do interictal spikes drive epileptogenesis? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry.* 2005; 11: 272-76.

Staley KJ, Dudek FE. Interictal spikes and epileptogenesis. *Epilepsy currents/American Epilepsy Society.* 2006; 6: 199-202.

Steriade M, Contreras D, Curro Dossi RC ve diğ. The slow (<1Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: Scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. *J Neurosci.* 1993a; 13: 3284-299.

Steriade M, Jones EG, McCormick DA, Thalamus. Amsterdam: Elsevier, 1997.

Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science.* 1993b; 262: 679-685.

Steriade M. Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance. *Cereb Cortex.* 1997; 7: 583-604.

Strauss U, Kole MH, Brauer AU ve diğ. An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *The European journal of neuroscience.* 2004;19: 3048-58.

Talley EM, Solorzano G, Depaulis A ve diğ. Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000; 75: 159-65.

Timofeev I, Grenier F, Steriade M. Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. IV. Paroxysmal fast runs in cortical and thalamic neurons. *J Neurophysiol.* 1998; 80: 1495–513.

Toledo-Rodriguez M, Goodman P, Illic M ve diğ. Neuropeptide and calcium-binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *J Physiol.* 2005; 567: 401-13.

- Tolmacheva EA, van Luijtelaar G. Absence seizures are reduced by the enhancement of GABA-ergic inhibition in the hippocampus in WAG/Rij rats. *Neuroscience letters*. 2007; 416: 17-21.
- Tooney PA, Chahl LA. Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2004; 28: 273-278.
- Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M ve diğ. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *Journal of Neuroscience*. 1995; 15(4): 3110-117.
- Uhlhaas PJ, Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(2):100-113.
- van de Bovenkamp-Janssen MC, Korosi A, Veening JG ve diğ. Neuronal parvalbumin and absence epilepsy in WAG/Rij rats. *Neurobiol Aging* 2011; 32(9): 1693-1706.
- van Luijtelaar EL, Drinkenburg WH, van Rijn CM, Coenen AM. Rat models of genetic absence epilepsy: what do EEG spike-wave discharges tell us about drug effects? *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2002;24 Suppl D:65–70.
- van Luijtelaar G, Sitnikova E. Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2006; 30: 983-1003.
- van Luijtelaar G, Zobeiri M. Progress and outlooks in a genetic absence epilepsy model (WAG/Rij). *Current medicinal chemistry* 2014; 21: 704-21.
- Vergnes M, Marescaux C, Micheletti G ve diğ. Enhancement of spike and wave discharges by gabamimetic drugs in rats with spontaneous petit-mal-like epilepsy. *Neuroscience Letters*. 1984; 44(1): 91-94.
- Villa A, Podini P, Panzeri MC ve diğ Ca²⁺ binding proteins during rat brain ageing: loss of calbindin and calretinin in the hippocampus, with no change in the cerebellum. *Eur J Neurosci*. 1994; 6: 1491-1499.
- Vogt Weisenhorn DM, Prieto EW, Celio MR. Localization of calretinin in cells of layer I (Cajal–Retzius cells) of the developing cortex of the rat. *Dev Brain Res*. 1994; 82: 293-97.
- Vreugdenhil M, Jefferys JG, Celio MR ve diğ. Parvalbumin-deficiency facilitates repetitive IPSCs and gamma oscillations in the hippocampus. *J Neurophysiol*. 2003; 89(3): 1414-22.
- White HS, Loscher W. Searching for the ideal antiepileptogenic agent in experimental models: single treatment versus combinatorial treatment strategies. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2014; 11: 373-84.
- Willoughby PO, Fitzgibbon SP, Pope KJ ve diğ. Persistent abnormality detected in the non-ictal electroencephalogram in primary generalised epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2003; 74: 51-55.
- Winsky L, Nakata H, Martin BM ve diğ. Isolation, partial amino acid sequence, and immunohistochemical localization of a brain-specific calcium-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10139-10143
- Wöhr M, Orduz D, Gregory P ve diğ. Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism-core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. *Transl Psychiatry*. 2015; 5: e525; (doi:10.1038/tp.2015.19)
- Wolf DC, Bueno-Júnior LS, Lopes-Aguiar ve diğ. The frequency of spontaneous seizures in rats correlates with alterations in sensorimotor gating, spatial working memory, and parvalbumin expression throughout limbic regions. *Neuroscience*. 2016; 312: 86-98.
- Wolf P, Beniczky S. Understanding ictiogenesis in generalized epilepsies. 2015 expert review
- Woo TU, Miller JL, Lewis DA. Schizophrenia and the parvalbumin containing class of cortical local circuit neurons. *Am. J. Psychiatry*. 1997; 154: 1013-1015.

Yamakuni T, Kuwano R, Odani S ve diğ. Molecular cloning of cDNA to mRNA for a cerebellar spot 35 protein. *J Neurochem* 1987; 48: 1590-596.

Zaitsev AV, Gonzalez-Burgos G, Povysheva NV ve diğ. Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2005; 15: 1178-186.



ÖZGEÇMİŞ

Sertan ARKAN

Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı
Kocaeli/TÜRKİYE
+90 533 338 7899
sertanarkan@gmail.com

Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı

Doktora, Fizyoloji, (Eylül 2011- Devam ediyor)

Tez Konusu: *WAG/Rij ırkı sıçanların kortikal nöronlarında kalsiyum bağlayan proteinlerin incelenmesi.*

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı

Bilim Uzmanlığı, Fizyoloji, (Eylül 2005- Kasım 2008)

Tez Konusu: *Karvakrol ve Timolün izole sıçan kalp kası üzerine etkileri*

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Lisans: Biyoloji (Şeref Derecesi, Not Ortalaması: 3.02/4) (Eylül 2001- Temmuz 2005)

ARAŞTIRMA ALANLARI

Araştırma Konuları ; Epilepsi, Nörodejeneratif hastalıklar, Karar verme mekanizmaları, Talamo-kortikal yolak, Sirkadyen Ritim.

Teknik Araştırma Konuları; Elektrofizyoloji (EEG, LFP), Optogenetik, İmmünohistokimya ve İmmünofloresan boyama teknikleri, Konfokal, 2-foton and Süper-çözünürlük mikroskopisi.

İŞ TECRÜBESİ

Araştırma Görevlisi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli Üniversitesi (2011- Devam ediyor)

Deney hayvanlarında elektrofizyolojik kayıtlar ve davranış deneylerinin yürütülmesi ,analizlerinin yapılması ve yorumlanması.

Beyin dokularında moleküler,immünohistolojik ve mikroskopik incelemeleri, analizlerinin yapılması ve yorumlanması.

BİLİMSEL KURS VE STAJLAR

1. Ulusal ve Uluslararası Proje Yazma Kursu, 9 Şubat 2017, Gebze Teknik Üniversitesi, Gebze-Kocaeli/TÜRKİYE
2. ICGEB-Hücreyel Görüntüleme Kursu, 12-16 Aralık 2016, Uluslararası Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir/ TÜRKİYE
3. Floresan Mikroskopi Kursu, 2-4 Mayıs 2016, Uluslararası Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Merkezi (ICGEB), Trieste/İTALYA
4. Beyin Dokusunda Safılaştırma (CLARITY) için Kompakt Organ Elektroferez Sistemi kullanımı. 7 Mayıs 2017, Sakarya Üniversitesi, Sakarya/TÜRKİYE
5. Optogenetik Kursu, 29 Kasım 2015, İstanbul Medipol Üniversitesi, İstanbul/ TÜRKİYE
6. Sinirbilim Alanında Proje Yazma Kursu, 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 30 Nisan 2015, Selcuk Üniversitesi, Konya/TÜRKİYE
7. IBRO/NERKA Nörofotonik: “Uluslararası Işık ve Işık Kökenli Teknolojiler Yılı 2015”, 28 Kasım-05 Aralık 2014, Belgrad/SIRBİSTAN
8. FEBS Uygulamalı Mikrospektroskopik kursu: Biyolojik sistemlerin fonksiyonel görüntülenmesi, 2-11 Eylül 2014, Nijmegen-Wageningen/HOLLANDA
9. Fare beyin kesitlerinde patch-clamp kayıtları kursu, 01 Aralık 2013, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep/ TÜRKİYE
10. Kortikal-indüklenmiş potansiyeller kursu, 10 Eylül 2013, Hacettepe Üniversitesi, Ankara/ TÜRKİYE
11. Hücre kültüründeki nöronlarda Patch-Clamp kayıtları kursu, 02 June 2013, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta/ TÜRKİYE
12. 2. Temel Klinik Proteomik Kursu, KABI- Proteomik Laboratuvarı, 17-21 Aralık 2012, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli/ TÜRKİYE
13. Cincinnati Üniversitesi, Moleküler ve Hücreyel Fizyoloji Bölümü, Yaz Stajı 2009, Cincinnati- Ohio/US (Real Time PCR, Ahmet Oosit and Zebrafish teknikleri, Na ATPaz fluometrik ölçümleri, Western Blot)
14. TICAM–Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 05 Temmuz 2007, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir/ Türkiye

POSTER ve SÖZLÜ BİLDİRİMLER

1. Sahin D.T., **Arkan S.**, Karson A., Utkan T., Ates N. The effects of etanercept on absence epilepsy, 29th ECNP Congress, 17-20 September 2016, Vienna/Austria (*Poster*)
2. Genetik absans epilepsili WAG/rij ırkı sıçanların somatosensöriyel kortekslerinde kalsiyum bağlayan protein ifadelerinin incelenmesi. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 7-10 Mayıs 2017, Sakarya/Türkiye
3. Yazir Y., Utkan T., Sahin D.T., Gocmez S.S., Gacar G., **Arkan S.**, Karson A. Etnanercept improves cognitive deficits by reducing both peripheral inflammation and neuroinflammation and maintaining hippocampal BDNF levels in aging. 29th ECNP Congress, 17-20 September 2016, Vienna/Austria (*Poster*)
4. **Arkan S.**, Korkmaz O.T., Karson A., Ates N., Tuncel N. The Effects of vasoactive intestinal peptid (VIP) on absence epilepsy, FENS Forum 2016, 2-6 July 2016, Copenhagen/Denmark (*Poster*)
5. Sengul A., **Arkan S.**, Vural C., Ozer C., Bayrak B.Y., Tas A. The effect of diminazaneon mono-crotalin induced pulmonary hypertension rat model, European Respiratory Society Congress 26-30 September 2015, Amsterdam/Netherland (*Poster*)
6. **Arkan S.**, Korkmaz O.T., Karson A., Ates N., Tuncel N. The chronic and acute effects of Vasoactive intestinal peptid (VIP) on absence seizures, 12th International symposium on VIP, PACAP and related peptides, 21-26 September 2015, Cappadocia/Turkey (*Poster*)
7. Korkmaz O.T., Oncu E.M., **Arkan S.**, Akdere O., Demirbas B., Kılıcdogan C., Karson A., Ates N., Tuncel N. Absence Epilepsy: The effects of VIP Application on somatosensorial cortex of WAG/Rij rats, 12th International symposium on VIP, PACAP and related peptides, 21-26 September 2015, Cappadocia/Turkey (*Poster*)
8. Demirtas T., **Arkan S.**, Karson A., Utkan T. Effect of chronic etanercept (a TNF-a inhibitor) treatment on depressive-like behavior in aged rats, 28th ECNP Congress, 29 August-1 September 2015, Amsterdam/Netherlands (*Poster*)
9. Utkan T., Demirtas T., Aksoz E., **Arkan S.** Chronic etanercept treatment exerts antidepressant-like effect in cafeteria diet-fed rats, 28th ECNP Congress, 29 August-1 September 2015, Amsterdam /Netherlands (*Poster*)

10. **Arkan S.**, Karson A., Ates N. The effects of vibrasal sensory modulation on absence seizures, Neuronus-2015 (IBRO-IRUN) Neuroscience Forum, 17-19 April 2015, Krakow/Poland (*Poster*)
11. Sengul A., Vural C, **Arkan S.**, Ozer C., Tas A., Yaprak B., Bildirici O. Rapamycin Improve Vacular Remodelling Monocrotaline Induced Pulmonary Hypertension, CHEST 2014, 25-30 October 2014, Austin, Texas, USA (*Poster*)
12. Gurol G., **Arkan S.**, Demircan K., Utkan T., Ates N. The effect of YC-1 on the expression of matrix metalloproteinase 9 in single-dose pentylene-tetrazol-induced epileptic seizures, FEBS-EMBO, 30 August-4 September 2014, Paris/France (*Poster*)
13. Gurol G., Tekin N., Yildizhan H., Sari S., **Arkan S.**, Ates N., Demiralp O.D. Cytokine gene polymorphism Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) rats which are genetic models of absence epilepsy, European Biotechnology Congress, 15-18 May 2014, Lecce/Italy (*Poster*)
14. **Arkan S.**, Karson A., Ates N. Likofelonun diken dalga deşarjları üzerine etkileri. 36. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 10-14 Eylül 2013, Hacettepe University, Ankara/Turkey (*Poster*)
15. Dogan N., Uzuner K., **Arkan S.** Effects of intestinal parasite infections on cardiovascular function, 13th International Congress of Infectious Diseases, 19-22 June 2008 Kuala Lumpur/Malaysia (*Poster*)
16. Sengul A., **Arkan S.**, Vural C., Ozer C., Bayrak B.Y., Tas A. Ratlarda Monocrotalin ile oluşturulmuş pulmoner hipertansiyonda Dimizanenin etkisi, 36. Ulusal TUSAD, 15-19 Ekim 2014, Çeşme, İzmir/Turkey (*Oral*)
17. Buyukburgaz U., **Arkan S.**, Karson A., Iseri P. Rotenon ile oluşturulan parkinson modelinde Etannerceptin davranışsal etkilerinin incelenmesi, 49t Ulusal Nöroloji Kongresi, 15-21 Kasım 2013, Antalya/TÜRKİYE (*Oral*)

BİLİMSEL YAYINLAR

1. Sengul A., **Arkan S.**, Vural C., Ozer C., Bayrak Y. B., Tas A., Kocak N.D., Akturk U.A. Physiological and pathological effects of diminazone on pulmonary hypertension: a controlled rat model study. Int. J. Exp. Med., 9(2): 909-917, 2016.
2. Sengul A., Vural C., **Arkan S.**, Ozer C., Bayrak Y. B., Tas A., Altıntaş N. Rapamycin improves vascular remodeling in a controlled rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension, West Indian Medical Journal. DOI: 10.7727/wimj.2015.222

AKADEMİK GÖREVLER

Editör Yardımcısı , Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (2015- Devam ediyor)

ÖDÜLLER

- 1. Poster Sunum Ödülü Grant:** CDA Grant 2016, 29th ECNP Congress, 17-20 September 2016, Vienna/Austria
- 2. Seyahat Desteği Ödülü :** IBRO/NERKA Nörofotonik: “Uluslararası Işık ve Işık Kökenli Teknolojiler Yılı 2015”, 28 Kasım-05 Aralık 2014, Belgrad/SIRBİSTAN
- 3. Sözlü Sunum Ödülü:** Actelion Pulmoner-Vasküler Sistem Araştırma Ödülü, Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği, 36. Ulusal TUSAD Kongresi, İzmir/Turkey.
- 4. Sözlü Sunum Ödülü:** Türk Toraks Derneği, 18. Ulusal kongresi, Deneysel Araştırma Ödülü