

T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN GENETİK VE KİMYASAL ABSANS EPİLEPSİ  
MODELLERİNDE  
HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTENİN İNCELENMESİ

Dr. Erkan AKSÖZ

UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA  
2007

T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN GENETİK VE KİMYASAL ABSANS EPİLEPSİ  
MODELLERİNDE  
HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTENİN İNCELENMESİ

Dr. Erkan AKSÖZ

UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. RÜŞTÜ ONUR

ANKARA  
2007

## TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Prof. Dr. Rüştü ONUR'a, tezin incelenmesi ve düzeltmelerde yardımcı olan Doç. Dr. Yıldırım SARA'ya, GAERS'lerin teminini sağlayan Marmara Üniversitesi Farmakoloji AbD. öğretim üyesi Prof. Dr. Filiz ONAT'a, tez süresince bana destek olan ailem ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, "***Sıçanda Kronik Pentilentetrazol Uygulaması ile Oluşturulan Absans Epilepsi Modelinde Hipokampüste Uzun Süreli Değişimlerin İncelenmesi***" başlıklı "**06 D-09101003**" no'lu proje kapsamında H.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

**Aksöz, E. Sıçan genetik ve kimyasal absans epilepsi modellerinde hipokampal sinaptik plastisitenin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Tezi.** Genetik ve kimyasal absans epilepsi modellerinde sıçanlarda hipokampal CA1 bölgesinde eksitabilite ve sinaptik plastisite değişiklikleri incelenmiştir. GAERS’lerde CA1 nöronlarında, “input-output” ilişkisinde kontrol sıçanlara göre değişiklik olmadığı, çift-uyarı yanıtlarında 80-150 ms aralığında fasilitasyonun inhibe olduğu bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Bu bulgular, GAERS’lerde eksitabilitede değişiklik olmadığını ve rekürren inhibitör internöronal aktivitenin kontrollere göre artmış olduğunu göstermektedir. GAERS’lerde kindling oluşumuna karşı olan dirençte bu aktivite artışının rolü olabilir. Kronik olarak (25 gün) günlük PTZ uygulaması (25 mg/kg) ile oluşturulan absans epilepsi modelinde epileptogenez süreci incelenmiştir. Kronik PTZ uygulanan sıçanlarda çift-uyarı yanıtlarında 40-120 ms aralığında fasilitasyonun arttığı saptanmıştır ( $P<0.01$ ). Selektif T-tipi  $Ca^{2+}$  kanal blokörü mibefradil (1  $\mu M$ ) kullanılarak kısa ve uzun dönem plastisitede bu kanalların katkısı incelenmiştir. Kontrol ve PTZ uygulanan sıçanlarda T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının kısa dönem plastisitede rol oynamadığı bulunmuştur. Mibefradilin (1  $\mu M$ ) kontrol grubunda LTP’yi inhibe ettiği, PTZ grubunda inhibe etmediği saptanmıştır. Yüksek konsantrasyonda (10  $\mu M$ ) her iki grupta da inhibisyona neden olmuştur. Bu bulgular, epileptogenez sürecinde T-tipi  $Ca^{2+}$  kanal aktivitesinin arttığını ve T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının uzun dönem plastisitede önemli rolü olduğunu göstermektedir. PTZ’nin her gün ve gūnaşırı uygulanması ile oluşturulan kindling süreci karşılaştırılmış ve günlük uygulama ile kindling sürecinin daha yavaş geliştiği belirlenmiştir. Bu bulgu, sıçanlarda günlük PTZ uygulaması ile her gün absans nöbeti oluşturmanın kindling gelişimine karşı kısmi bir direnç oluşturduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Absans epilepsi, kindling, T-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları, hipokampüs, sinaptik plastisite.

**Destekleyen kuruluşlar:** HÜTF Araştırma Fonu No: 06 D-09101003

## ABSTRACT

**Aksöz, E. The hippocampal synaptic plasticity in genetic and chemical absence epilepsy models in rats. Hacettepe University, Faculty of Medicine, Thesis in Medical Pharmacology, Ankara, 2007.** Excitability and synaptic plasticity changes in hippocampal CA1 neurons in GAERS and chemical absence epilepsy model were investigated. The input-output relationship did not differ in GAERS from the control group but there was a significant ( $P<0.01$ ) decrease in paired-pulse facilitation between 80-150 ms interpulse interval. This finding indicates that recurrent inhibitor interneuronal activity is increased in GAERS and this may be one of the mechanisms of the resistance to kindling development in GAERS. Chemical absence epilepsy model was produced by chronic (25 days) daily PTZ application (25 mg/kg) and epileptogenesis was investigated. Hippocampal short and long term plasticity changes were evaluated. There was a significant ( $P<0.01$ ) increase in paired-pulse facilitation in the PTZ group between 40-120 ms interpulse interval. The role of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity in short and long term plasticity was investigated by evaluating the effects of mibefradil (1  $\mu\text{M}$ ). Mibefradil had no effect on short term plasticity in both groups. Mibefradil inhibited LTP in the control but not in the PTZ-treated group. At a higher concentration (10  $\mu\text{M}$ ), LTP was inhibited in both groups. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity was found to be increased in TEA-induced LTP in chronically PTZ-treated rats. These results show that T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels do not contribute to short term plasticity but have important role in long term plasticity in CA1 neurons. Development of kindling in daily and every 2 days PTZ-treated rats was also investigated. The kindling process developed slower in the daily PTZ-applied group. This finding indicates that daily induction of absence seizures causes a resistance to kindling development.

**Keywords:** Absence epilepsy, kindling, T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, hippocampus, synaptic plasticity.

**Supported by** HUTF Research Foundation No: 06 D-09101003

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

|                                            |      |
|--------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR.....                              | iii  |
| ÖZET.....                                  | iv   |
| ABSTRACT.....                              | v    |
| İÇİNDEKİLER.....                           | vi   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR.....               | vii  |
| ŞEKİLLER.....                              | viii |
| GİRİŞ                                      |      |
| 1.1 Hipotez.....                           | 1    |
| 1.2 Amaçlar.....                           | 2    |
| GENEL BİLGİLER                             |      |
| 2.1 Epilepsi.....                          | 3    |
| 2.2 Epileptogenezin Araştırılması.....     | 4    |
| 2.3 Kindling.....                          | 4    |
| 2.4 Absans Epilepsi.....                   | 5    |
| 2.5 T-tipi Kalsiyum Kanalları.....         | 8    |
| 2.6 Hipokampüs ve Sinaptik Plastisite..... | 9    |
| MATERYAL VE METOD                          |      |
| 3.1 Absans Modelleri.....                  | 13   |
| 3.2 <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....         | 13   |
| 3.3 <i>In Vitro</i> Çalışmalar.....        | 15   |
| 3.4 İstatistiksel Analiz.....              | 16   |
| BULGULAR                                   |      |
| 4.1 <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....         | 17   |
| 4.2 <i>In Vitro</i> Çalışmalar.....        | 27   |
| TARTIŞMA.....                              | 42   |
| SONUÇ VE ÖNERİLER.....                     | 47   |
| KAYNAKLAR.....                             | 48   |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                |                                                             |
|----------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>CA</b>      | Cornu Ammonis                                               |
| <b>CA1</b>     | Hipokampüste Cornu Ammonis 1 bölgesi                        |
| <b>DL-AP5</b>  | DL-Aminophosphonopentanoic acid                             |
| <b>EEG</b>     | Elektroensefalografi                                        |
| <b>EPSP</b>    | Eksitator Post Sinaptik Potansiyel                          |
| <b>GABA</b>    | Gama Amino Butirik Asit                                     |
| <b>GAERS</b>   | “Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg”          |
| <b>ILAE</b>    | “International League Against Epilepsy”                     |
| <b>i.p.</b>    | Intraperitoneal                                             |
| <b>i.s.v</b>   | Intraserebroventriküler                                     |
| <b>LTD</b>     | “Long Term Depression”                                      |
| <b>LTP</b>     | “Long Term Potentiation”                                    |
| <b>Mib</b>     | Mibefradil                                                  |
| <b>NMDA</b>    | N-Metil D-Aspartat                                          |
| <b>PS</b>      | “Population Spike”                                          |
| <b>PS1</b>     | Çift-uyarı ile oluşturulan PS’lerden birincisinin amplitüdü |
| <b>PS2</b>     | Çift-uyarı ile oluşturulan PS’lerden ikincisinin amplitüdü  |
| <b>PTZ</b>     | Pentilentetrazol                                            |
| <b>TEA</b>     | Tetraetilamonyum                                            |
| <b>TEA-LTP</b> | Tetraetilamonyum ile oluşturulan LTP                        |
| <b>TLE</b>     | Temporal Lob Epilepsisi                                     |
| <b>WAG/Rij</b> | “Wistar Albino rats Glaxo/Rijswijk”                         |
| <b>yBOS</b>    | yapay Beyin Omurilik Sıvısı                                 |
| <b>YFU-LTP</b> | Yüksek Frekanslı Uyarı ile oluşturulan LTP                  |

## ŞEKİLLER

| Şekil                                                                                                                                              | Sayfa No |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 2.1 Horizontal kesitte hippokampal bölgeler ve bölgesel bağlantılar...                                                                             | 10       |
| 3.1 PS Amplitüdünün hesaplanması.....                                                                                                              | 16       |
| 4.1 GAERS ve kontrol sıçanlardan elde edilen örnek EEG traseleri .....                                                                             | 18       |
| 4.2 GAERS ve kontrol sıçanlarda “input-output” ilişkisi. ....                                                                                      | 20       |
| 4.3 GAERS ve kontrol sıçanlarda değişen aralıklı çift-uyarı uygulaması ile elde edilen PS amplitüdlerinin oranındaki (PS2/PS1) değişiklikler. .... | 21       |
| 4.4 GAERS ve kontrol sıçandan 150 ms aralığında elde edilen çift-uyarı yanıtını gösteren örnek traseler. ....                                      | 22       |
| 4.5 Mibefradil (35 µg, i.s.v) uygulamasının “input-output” ilişkisine etkileri. ....                                                               | 24       |
| 4.6 Mibefradil (35 µg, i.s.v) uygulamasının çift-uyarı yanıtlarına etkisi. ....                                                                    | 25       |
| 4.7 Mibefradil uygulaması öncesinde ve sonrasında kaydedilen 40 ms aralıklı çift-uyarı yanıtlarından örnek traseler.....                           | 26       |
| 4.8 Kontrol ve PTZ grubunda “input-output” ilişkisinin karşılaştırılması.                                                                          | 28       |
| 4.9 Kontrol ve PTZ grubunda çift uyarı yanıtlarının karşılaştırılması....                                                                          | 30       |

| <b>Şekil</b>                                                                                                            | <b>Sayfa No</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>4.10</b> Mibefradilin (1 $\mu$ M) kontrol ve PTZ gruplarında “input-output” ilişkisine etkisi.....                   | 32              |
| <b>4.11</b> Mibefradilin (1 $\mu$ M) kontrol ve PTZ gruplarında çift uyarı yanıtlarına etkisi.....                      | 33              |
| <b>4.12</b> Kontrol ve PTZ gruplarında TEA ile oluşturulan LTP cevapları...                                             | 35              |
| <b>4.13</b> Kontrol ve PTZ gruplarında DL-AP5 varlığında TEA ile oluşturulan LTP cevapları.....                         | 36              |
| <b>4.14</b> Kontrol ve PTZ gruplarında DL-AP5+mibefradil varlığında TEA ile oluşturulan LTP cevapları.....              | 37              |
| <b>4.15</b> Kontrol grubunda normal solüsyon, DL-AP5 ve DL-AP5+mibefradil varlığında elde edilen TEA-LTP cevapları..... | 39              |
| <b>4.16</b> PTZ grubunda normal solüsyon, DL-AP5 ve DL-AP5+mibefradil varlığında elde edilen TEA-LTP cevapları.....     | 40              |
| <b>4.17</b> PTZ grubu sıçanlardan hipokampal CA1 bölgesi stratum radiatumdan elde edilen örnek traseler.....            | 41              |

## GİRİŞ

Epilepsi patofizyolojisi günümüzde tam olarak anlaşılamamıştır. Tedavi genellikle semptomatik yaklaşım ile yapılmakta ve nöbetleri sona erdirmeyi amaçlamaktadır. Bazı vakalarda ise kombine ilaç tedavilerinin kullanılmasına rağmen nöbetler kontrol altına alınamamaktadır (12). Bu durum, epilepsi tedavisinde mevcut ilaçların yetersiz kaldığını göstermekte, farklı tedavi yaklaşımlarının ve daha etkili ilaçların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bunun yapılabilmesi için epileptik bozukluklarda ve epilepsi gelişim sürecinde beyinde meydana gelen değişikliklerin anlaşılması ve bu değişiklikleri ortadan kaldıracabilecek yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Epileptik bozuklukların ve epileptogenezin anlaşılabilmesi için hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada, genetik ve kimyasal olarak oluşturulan epilepsi modellerinde, absans epilepsi ve epileptogenezde sinaptik plastisitedeki değişiklikler araştırılmıştır.

Absans epilepsi EEG'de bilateral diken-dalga deşarjlarıyla karakterizedir. EEG'de diken-dalga deşarjı oluşumunda talamokortikal devrelerde meydana gelen senkronize aktivite rol oynar. Bu aktivite oluşurken nöronlar patlama (burst) modunda aksiyon potansiyelleri oluşturur. Nöronların patlama modunda ateşlemesinde T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının aktivasyonu gereklidir (35). T-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları hipokampüste de yoğun olarak bulunmaktadır (46) ve sinaptik plastisitede rol oynadıkları gösterilmiştir (35, 42). Bununla birlikte, absans epilepside ve epileptogenez sürecinde hipokampal T-tipi  $Ca^{2+}$  kanal aktivitesindeki değişikliklerin önemi bilinmemektedir.

### 1.1 Hipotez

Epileptogenez sürecinde hipokampal CA1 bölgesinde T-tipi  $Ca^{2+}$  kanal aktivitesi artar.

## 1.2 Amaçlar

Bu çalışma kapsamında GAERS sıçanlarda hipokampal CA1 nöronlarında eksitabilite ve kısa dönem plastisitenin göstergeleri olan “input-output” ilişkisi ile çift-uyarı fasilitasyonu ve inhibisyonundaki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Epileptogenez sırasında T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının sinaptik plastisiteye katkılarının incelenmesi için kronik olarak PTZ uygulanarak oluşturulan absans epilepsi modelinde eksitabilite ve sinaptik plastisite değişikliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için spesifik T-tipi  $Ca^{2+}$  kanal blokörü olan mibefradil uygulanarak CA1 nöronlarında “input-output” ilişkisi, çift-uyarı ve LTP cevaplarındaki değişiklikler incelenmiştir.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1 Epilepsi

Epilepsi en çok görülen nörolojik bozukluklardan biridir. Genel popülasyonda her yüz kişiden 3'ü hayatı boyunca en az bir epileptik atak ile karşı karşıya gelmektedir (4).

Epilepsi, klinik özellikler, nöbet tipi, eşlik eden nörolojik ve gelişimsel anomaliler veya EEG bulgularına göre farklı şekillerde sınıflandırılmıştır. Epilepsi genel olarak jeneralize ve parsiyel epilepsiler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Jeneralize epilepsilerde nöbetler genellikle eşzamanlı olarak her iki hemisferde başlar, parsiyel nöbetlerde ise tek veya daha fazla odaktan başlar ve bazen her iki hemisfere yayılabilir.

Bugün için en çok kullanılan sınıflandırma International League Against Epilepsy'nin (ILAE) yaptığı sınıflandırmadır. Buna göre epilepsiler lokalize, jeneralize, tanımlanamayan ve özel sendromlar olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar da kendi içlerinde etiyolojik olarak idiyopatik, semptomatik ve kriptojenik olmak üzere sınıflandırılmıştır (11).

Epileptogenez, beyinde spontan ve rekürren nöbetlerin gelişmesine neden olan uzun dönem değişikliklerin oluştuğu süreci ifade eder ve bu nedenle akut nöbetlerden ayırt edilmelidir. Bu sürecin gelişmesine neden olan faktörler genetik veya sonradan edinilmiş olabilir ve beyin fokal bir alanını veya genelini etkileyebilir. Epileptogenez akut veya kronik olarak gerçekleşebilir (5).

Epileptik bozukluklarda günümüzde sadece semptomatik tedavi yapılabilmekte ve nöbetler hastaların %30'unda tedaviye rağmen kontrol altına alınamamaktadır (12, 26). Halen kullanımda olan antiepileptik ilaçların büyük kısmı nöbet oluşumunu engellemeyi hedef almaktadır ancak epileptogenez önlemeye yönelik değildir (1). Klinikte kullanılmaya başlanan levetirasetamın kindling modellerinde epileptogenez önlediği gösterilmiştir ancak bu ilaç genellikle diğer ilaçlarla kombine olarak kullanılmaktadır (26). Var olan epileptik aktiviteyi ortadan kaldıracabilecek yeni ve radikal ilaçların

geliştirilebilmesi için öncelikle epileptogenez mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir.

## **2.2 Epileptogenezin araştırılması**

Epileptogenezden sorumlu mekanizmaların anlaşılabilmesi için çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bunlar genetik modeller ve kindling modelleri olmak üzere 2 grupta toplanabilir.

### **2.2.1 Genetik Modeller**

Bu modeller arasında; GAERS (Genetic Absence epilepsy in rats from Strasbourg), WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo Rats Rijswijk), SER (Spontaneous Epileptic Rats), GEPR (Genetic Epilepsy Prone Rats), voltaj kapılı kalsiyum kanal mutasyonları olan fare modelleri (*Tottering*, *Leaner*, *Lethargic* ve *Stargazer*) bulunmaktadır (7, 39).

### **2.2.2 Kindling Modelleri**

Bu grupta elektriksel ve kimyasal olarak oluşturulan modeller bulunmaktadır.

## **2.3 Kindling**

Kindling, subkonvulsif düzeyde tekrarlanan uyarıların zamanla konvulsiyon oluşturmaya başlamasıdır (29). Limbik sistem ve temporal lob kindling gelişimine özellikle duyarlıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kindling sürecinde meydana gelen hücresel ve fonksiyonel düzeydeki değişikliklerin insanda tedavi edilemeyen temporal lob epilepsisindeki (TLE) değişikliklere benzer olduğu gösterilmiştir. TLE’de hipokampüste ilerleyici “mossy fiber” tomurcuklanması, nöronal kayıplar ve hafıza bozuklukları meydana gelir (1). Kindling, elektriksel veya kimyasal olarak oluşturulabilir.

### **2.3.1 Elektriksel Kindling**

1967 yılında ilk defa Goddard tarafından tanımlanmıştır (18). Goddard, amigdalanın epileptik deşarj oluşturmayacak şiddetteki elektriksel uyarılarla

tekrarlı olarak uyarılmasının nöbet geçirmeye karşı duyarlılık artışına ve spontan nöbetlerin oluşmasına kadar ilerleyen geri dönüşsüz bir süreci oluşturduğunu göstermiştir.

### **2.3.2 Kimyasal Kindling**

Kindling kimyasal ajanlar kullanılarak da oluşturulabilir. Kindling oluşturmak için belirli aralıklar ile tekrarlayan subkonvulsif dozlarda ajanlar uygulanır. Bunlar arasında pentilentetrazol (PTZ), pikrotoksin ve bikukulin bulunmaktadır. Bu amaçla en sık PTZ kullanılmaktadır. Kindling oluştuktan sonra subkonvulsif dozlarda uygulanan ajan konvülsiyona yol açar (29).

### **2.3.3 Kindling Evreleri**

Sıçanlarda kindling gelişim sürecinin incelenmesinde genellikle Racine veya modifiye Racine evrelendirmesi kullanılmaktadır (29). Modifiye Racine evrelendirmesi aşağıda belirtildiği şekilde yapılmaktadır (6, 29).

Evre 0: Cevap yok

Evre 1: Kulak ve yüzde “twitching”

Evre 2: Miyoklonik kasılmalar

Evre 3: Miyoklonik kasılmalar ve şahlanma

Evre 4: Yana yatma ve bilateral tonik-klonik nöbetler

Evre 5: Sırtüstü yatma ve bilateral tonik-klonik nöbetler

## **2.4 Absans Epilepsi**

### **2.4.1 Klinik ve Epidemiyoloji**

Absans epilepsi insanda çoğunlukla çocukluk çağında görülen, bilinç kaybı ve donakalma şeklinde ortaya çıkan, 10-30 s kadar süren nöbetlerle karakterize bir epilepsi tipidir (4). Absans nöbetlerinin tedavisinde ilk sıra ilaçlar etosüksimid ve valproik asittir. Paradoksal olarak jeneralize epilepside sık kullanılan ajanlardan fenitoin ve karbamazepin absans nöbetlerini şiddetlendirir. Klasik olarak absans tipi epileptik nöbetlerin önlenmesinde

etkili olan ilaçların test edildiği akut yüksek doz PTZ uygulamasıyla oluşturulan konvulsiyonları önlemede levetirasetamın etkisiz olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, levetirasetamın “kindling” modellerinde etkinliği gösterilmiş ve klinikte absans nöbetlerinin önlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır (26).

#### **2.4.2 Patofizyoloji**

Kedi ve insanda absans nöbetleri sırasında EEG’de 3 Hz’lik diken-dalga kompleksleri gözlenir. Buna karşılık, sıçan modellerinde ise 7-11 Hz’lik diken-dalga aktivitesi saptanmaktadır. Absans tipi epilepsilerde gözlenen anormal EEG aktivitesinin talamokortikal devrelerden kaynaklandığı gösterilmiştir (17, 22). Bu aktivitenin talamustaki nöronların düzenli (regular) ateşleme “mod”undan patlama (burst) “mod”una geçmesi sonucu olduğu düşünülmektedir. Uyku içciklerinin oluşumunda da benzer bir mekanizma devreye girmektedir (43). Talamokortikal nöronların patlama “mod”una geçmesinin T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının aktivasyonu sonucu olduğu gösterilmiştir (22). GABA’erjik aktivitenin artması ile talamokortikal relay nöronlar hiperpolarize olmakta ve bunun sonucunda T-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları deaktifite olmaktadır. Bu durumda membran potansiyeli  $Na^{+}$  kanallarının aktivasyonu için gerekli eşik değerinden uzaklaşmaktadır. Ancak bu koşullar altında nöronun inputlarına gelen EPSP’lerin yarattığı depolarizasyon dalgaları, T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarını aktive ederek uzun süreli  $Ca^{2+}$ -bağımlı bir depolarizasyon oluşturmaktadır. Bu uzun süreli depolarizasyon  $Na^{+}$  kanallarının aktivasyonu ile birlikte nöronların patlama modunda aksiyon potansiyelleri oluşturmaya neden olmaktadır (35).

#### **2.4.3 Absans Epilepsi Modelleri**

Absans epilepsi patofizyolojisinin araştırılmasında hayvan modelleri önemli yer tutmaktadır. GAERS (Genetic Absence Epileptic Rats from Strasbourg) ve WAG/Rij (Wistar Albino Rats Glaxo/Rijswijk) en çok kullanılan genetik absans epilepsi modelleridir (2, 27). Sıçanlarda absans epilepsi ilaçlar ile de oluşturulabilir. Akut olarak düşük doz (25-30 mg/kg) PTZ

uygulanması ile oluşturulan absans epilepsi modeli de geçerli bir model olarak kabul edilmektedir (17, 51). Absans epilepside etkili olan ilaçlar düşük doz PTZ'den sonra ortaya çıkan diken-dalga komplekslerini ortadan kaldırmaktadır. Düşük doz PTZ'nin kısa aralıklarla, kümülatif olarak uygulanması ile absans status epileptikus modeli oluşturulabilmektedir. Absans status epileptikus modelinde EEG'de diken-dalga kompleksleri daha sıklıkla ortaya çıkmaktadır (51).

#### 2.4.4 GAERS

1982 yılında, Vergnes ve Marescaux yetiştirdikleri Wistar sıçanların yaklaşık %30'unda bilateral diken-dalga deşarjları olduğunu farkettiler. Bu deşarjlar sırasında sıçanların hareketsiz durduklarını ve bu epizotların insandaki jeneralize konvülsif olmayan absans epilepsi nöbetlerine benzediğini gözlemlediler. Diken-dalga deşarjları olan sıçanların çiftleştirilmesiyle birkaç nesil sonra tüm hayvanlarda diken-dalga deşarjlarının görüldüğü bir suş elde ettiler. Bunlara GAERS (Genetic Absence Epileptic Rats from Strasbourg) adı verildi (48). Nörofizyolojik, davranışsal, farmakolojik ve genetik çalışmalar sonucunda GAERS'in insan absans epilepsisinin araştırılmasında geçerli bir model olduğu gösterildi (27).

GAERS'de normal EEG aktivitesi üzerine, ani başlangıç ve bitişleri olan, amplitüdüleri 300-1000  $\mu$ V ve frekansı 7-11 Hz olan diken-dalga kompleksleri görülür. Bu komplekslerin görülme sıklığı ortalama olarak 1.3/dak. ve süresi  $17 \pm 10$  s'dir. Diken-dalga kompleksleri hayvan sakinken ve uyku-uyanıklık dönemi arasında ortaya çıkar, dikkat gerektiren aktiviteler veya duyuşsal uyarılar ile ortadan kalkar. Nöbetler, etosüksimid, valproik asit ve benzodiazepinler ile azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilirken, GABA transaminaz inhibitörleri, GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> reseptör agonistleri ile şiddetlenir. Nöbetler arasında herhangi bir nörolojik veya davranışsal bozukluk görülmez (48).

## 2.5 T-tipi Kalsiyum Kanalları

T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının aktivasyon eşikleri diğer  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarına göre daha düşüktür (hipokampüste -63 mV), (32). Bu özellikleri dolayısıyla nöronlara dinlenme durumunda ve eşikaltı uyarımlar ile  $\text{Ca}^{2+}$  girişinde rol oynarlar. T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları diğer  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarına göre daha düşük membran potansiyellerinde inaktive olurlar ve repolarizasyon sırasında yavaş deaktive olurlar. Bunun sonucunda repolarizasyon sırasında kuyruk akımı (tail current) oluştururlar (35). T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının, beyinde talamokortikal devrelerde ve hipokampüste bulundukları gösterilmiştir (46). Bu kanalların hipokampal fonksiyonlardaki ve epileptogenezdeki rolleri bilinmemektedir (35). Bu kanallar mibefradil, amilorid ve  $\text{Ni}^{2+}$  tarafından bloke edilirler. Etosüksimid ve valproik asidin absans epilepsiyi önleyici etkisinde de bu kanalları inhibe etmelerinin rolü olduğu düşünülmektedir.

Mibefradil halen bilinen en selektif T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal blokörüdür (28). Düşük konsantrasyonlarda selektif olarak T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarını bloke edebilmesine rağmen daha yüksek konsantrasyonlarda seçiciliğini kaybeder.  $\text{IC}_{50}$  değeri incelenen dokuya göre farklılık göstermektedir ve bu değerin 250 nM ile 1.5  $\mu\text{M}$  arasında olduğu bildirilmiştir (35, 46). Mibefradil yüksek dozda L-tipi ve N-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarını da bloke etmektedir. Mibefradilin T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları bloke eden konsantrasyonu diğer  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarını bloke eden konsantrasyonundan 15-50 kat daha düşüktür (28). L-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarını bloke edici etkinin mibefradilin direkt etkisine bağlı olmadığı, onun hücre içinde hidrolize uğradıktan sonra ortaya çıkan bir metabolite bağlı olduğu belirtilmiştir ancak mibefradilin *in vitro* uygulanmada ne kadarının bu metabolite dönüştüğü bilinmemektedir (20, 52). Mibefradilin ve T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının hipokampüste kısa ve uzun dönem plastisiteye etkileri hakkında bilgiler çok sınırlıdır. Ayrıca absans epilepside ve epileptogenezde T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının rolü ve mibefradilin hipokampüsteki etkileri de bilinmemektedir.

## 2.6 Hipokampüs ve Sinaptik Plastisite

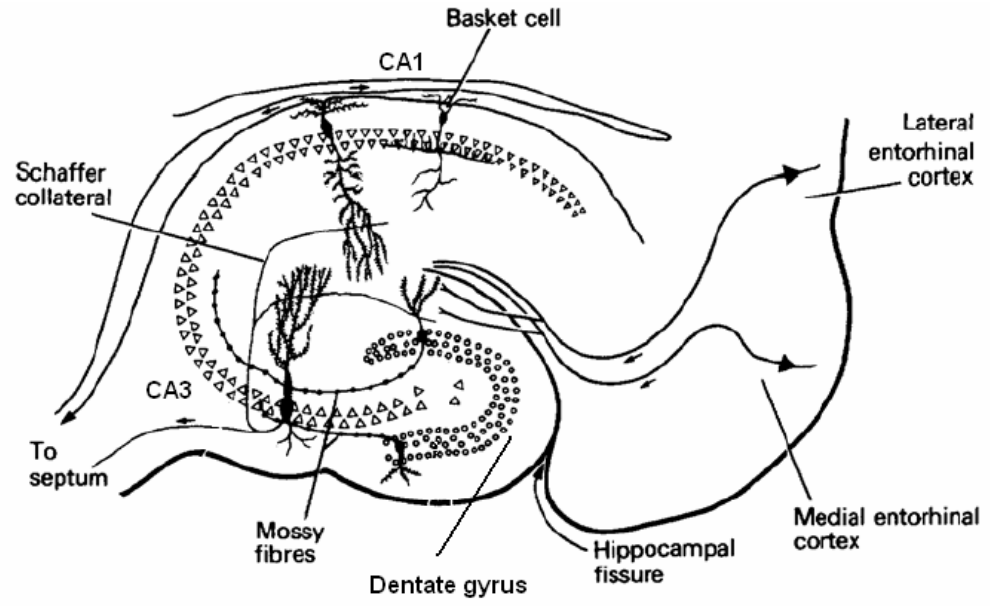
### 2.6.1 Hipokampal Anatomi

Hipokampüs insanda Cornu Ammonis bölgeleri (CA1-CA4) ve dentat girusdan oluşur. Sığıçanda Cornu Ammonis sadece CA1 ve CA3 bölgelerine ayrılmıştır (Şekil 2.1). Cornu Ammonisde primer nöronlar piramidal hücreler, dentat girusda ise granül hücreleridir. Hipokampüs esas olarak entorinal korteksden input alır ve buradan gelen aksonlar dentat girus nöronları ile sinaps yapar. Granül hücrelerin aksonları “mossy” fiberler olarak adlandırılır ve CA3 piramidal hücreleri ile sinaps yaparlar. CA3 nöronlarının aksonları ise Schaffer kollateralleri olarak adlandırılır ve CA1 nöronları ile sinaps yapar. Bu üç sinaps hipokampüste trisinaptik eksitator devreyi oluşturur. Bununla birlikte her bölgede eksitator ve inhibitor internöronları içeren lokal devreler vardır. Piramidal ve granüler hücreler hipokampüste esas hücreler olarak adlandırılır ve sinaptik uçlardan nörotransmitter olarak glutamat salıverirler. İnhibitor internöronlardan ise GABA salıverilir (1, 21).

CA3 bölgesi, komşu nöronlar arasında eksitator bağlantıların sıklığından dolayı epileptik aktiviteye en yatkın bölgedir. Dentat girus granül hücreleri ise güçlü polisinaptik inhibitor bağlantılar nedeniyle epileptik aktiviteye en dirençli bölgedir (1, 19).

### 2.6.2 Hipokampal Fonksiyonlar

Hipokampüs, öğrenmenin ve hafızanın çeşitli biçimlerinin oluşmasından sorumlu bir beyin bölgesidir. Hipokampal lezyonlarda retrograd ve anterograd amnezi ortaya çıkar ancak uzak anıların hatırlanması bozulmamıştır (15, 45). Hipokampüs insanda deklaratif hafızanın oluşumunda ve çoklu duyusal verilerin arasında ilişkilerin kurularak hatırlanmasında rol oynar. Hipokampal lezyonlarda uzak anıların hatırlanmasında bozulma olmaması hipokampüste oluşturulan anının zamanla korteksin başka bölgelerine taşındığını düşündürür. Sığıçanlarda da hipokampüs çoklu duyusal uyarıların arasında ilişki kurulmasında ve özellikle



**Şekil 2.1** Horizontal kesitte hipokampal bölgeler ve bölgesel bağlantılar. (John O'Keefe, Lynn Nadel. *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Chapter 3. *Rat Hippocampal Anatomy*. Oxford University Press. 1978).

uzaysal hafızanın oluşumunda rol oynar. Uzaysal hafızanın test edildiği deneylerde sıçanların çoklu ipuçlarını değerlendirerek yön bulmada başarılı oldukları, ancak hipokampal lezyon oluşturulan sıçanların bu testlerde başarısız oldukları saptanmıştır (15).

Serbest hareket eden sıçanlar, hareket alanının belirli bölgelerine geldiklerinde CA1 ve CA3 piramidal nöronlarının bazılarında yüksek frekanslı ateşlemeler olduğu saptanmıştır. Bu nedenle bu nöronlar “place cells” (yer hücreleri) olarak adlandırılmış ve her “yer hücresi”nin ortamdaki belirli bir lokalizasyonu kodladığı düşünülmüştür (15, 24).

### 2.6.3 Hipokampüs ve Epileptogenez

Kindling modellerinde ve insandaki TLE’de epileptogenez sürecinde hipokampüste hücresel ve sinaptik düzeyde değişiklikler meydana gelmektedir ancak, T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının bu süreçte oynadığı rol hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bir çalışmada pilokarpin ile oluşturulan status epileptikus modelinde hipokampüste T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının yoğunluğunun arttığı gösterilmiştir (44). Kronik PTZ uygulaması ile hipokampüste T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının aktivitesinde meydana gelen değişiklikler bilinmemektedir.

### 2.6.4 Uzun Dönem Sinaptik Güçlenme - “Long Term Potentiation”

“Long Term Potentiation” (LTP) sinaptik iletimin uzun süreli olarak güçlenmesidir. LTP yüksek frekanslı uyarılar ile (100 Hz, 1 s) veya TEA (25 mM) varlığında düşük frekanslı uyarılar (0.1 Hz) ile oluşturulabilir (3, 9). Hipokampal CA1 bölgesinde yüksek frekanslı uyarılar ile oluşturulan LTP (YFU-LTP), NMDA reseptör aktivitesine bağımlıdır. Her iki yöntemde de LTP oluşumu hücre içine  $Ca^{2+}$  girişine bağlı olarak gerçekleşir ancak  $Ca^{2+}$  giriş yolu farklılık gösterir. TEA ile oluşturulan LTP (TEA-LTP), T-tipi  $Ca^{2+}$  kanal blokörü olan  $Ni^{2+}$  (50  $\mu$ M) ile zayıflatılabilir.  $Ni^{2+}$  (50  $\mu$ M) ve NMDA kanal blokörü DL-AP5 (50  $\mu$ M) varlığında ise TEA-LTP tamamen bloke edilir (41). YFU-LTP ise T-tipi kanal blokörlerinden etkilenmez ve DL-AP5 ile tamamen ortadan kaldırılır (40, 41). TEA-LTP, DL-AP5 varlığında kısmi olarak oluşturulduğunda hücre içine  $Ca^{2+}$  girişinin tamamen T-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları

aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmiştir (42). Bu şekilde oluşturulan LTP amplitüdü incelenerek T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının nöronal membrandaki yoğunluğu hakkında dolaylı olarak bilgi edinmek mümkün olabilir ve bu tez kapsamında bu yöntem kullanılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

### 3.1 Absans Modelleri

Genetik absans modeli olarak 3 aylık, 250-300 g ağırlığındaki GAERS'ler ve bunların kontrolü olarak aynı yaş ve ağırlıklardaki Wistar Albino sıçanlar kullanıldı. GAERS'ler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Filiz Onat tarafından temin edildi.

Kimyasal absans epilepsi modeli oluşturmak için 1 aylık 50-60 g ağırlığındaki Wistar albino sıçanlara 25 gün boyunca her gün 25 mg/kg (i.p., 1ml/kg serum fizyolojik içinde) PTZ uygulandı. Aynı cins, yaş ve ağırlıktaki kontrol grubu sıçanlara aynı süre boyunca aynı hacimde serum fizyolojik uygulandı. Deneyler, enjeksiyon süresinin bitiminden 4-5 gün sonra 2 aylık ve 190-230 g ağırlığına erişmiş olan sıçanlarda yapıldı.

Diğer bir grup sıçanda (1 aylık, 50-60 g) kindling oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla daha uzun süreli (45-60 gün) kronik PTZ (25 mg/kg, i.p., 1 ml/kg serum fizyolojik içinde) uygulaması yapıldı. 3'er sıçanda günlük ve 2 günde bir olmak üzere 2 ay süresince kronik PTZ uygulaması yapıldı ve kindling aşamaları değerlendirildi.

### 3.2 *In Vivo* Çalışmalar

#### 3.2.1 Uyanık hayvanda EEG kaydı

Sıçanlar ketamin–ksilazin ile anesteziye edildikten sonra kafa derileri orta hattan bir insizyonla açıldı. Parietal kemiğin sagittal suture göre 3 mm lateralinde ve frontal kafa kemiklerinde sagittal suture'nin 2 mm lateralinde olmak üzere simetrik olarak 2'şer adet yaklaşık 1 mm çapında delik açılarak uçları duraya temas edecek şekilde EEG elektrodları yerleştirildi. Daha sonra dental akrilik ile konnektör sabitlendi ve 1 hafta yara iyileşmesi için beklendi. Her hemisferin EEG aktivitesi parietal ve frontal bölgeler arasından diferansiyel olarak EEG amfisi ile kayıt edildi (BIOPAC MP-30, USA). Kayıtlar, sıçanların kafes içinde serbest hareketini engellemeyen esnek kablolar kullanılarak elde edildi.

### 3.2.2 *İn Vivo* Hipokampal Kayıtlar

Sıçanlar üreten (1.4 g/kg, i.p.) ile anesteziye edildikten sonra stereotaksik düzeneğe yerleştirildi. Vücut sıcaklığı elektrikli battaniye ile 37°C'de sabit tutuldu. Fimbria-kommissür stimülasyonu ve hipokampal CA1 bölgesi kayıtları için Paxinos sıçan beyin atlası (34) koordinatlarına uygun olarak kafatasına iki adet yaklaşık olarak 3x3 mm boyutlarında “burr hole” açıldı. Fimbria-kommissür stimülasyonu paralel bipolar tungsten elektrotlar ile yapıldı. Alan kayıtları 2M NaCl ile doldurulan ve rezistansları 10-15 MΩ olan cam mikroeletrotlar ile elde edildi. Veriler Scope 3.7.8 (ADInstruments, Inc.) yazılımı kullanılarak Powerlab/8SP (ADInstruments, Inc.) data aktarım cihazı ile bilgisayara aktarıldı.

Nöronal eksitabilitenin değerlendirilmesi için “input-output” ilişkisi ve “recurrent” inhibitör sistemlerin aktivitesinin değerlendirilmesi için değişen aralıklı çift-uyarı uygulaması ile elde edilen alan potansiyelleri incelendi. PS (Population Spike) amplitüdlere şekil 3.1 de gösterildiği gibi hesaplandı. “Input-output” ilişkisi, 0.1 Hz, 0.2 ms süreli, 3-15 V genliğindeki uyarılara verilen alan cevapları üzerinden PS amplitüdlere hesaplanarak saptandı. Çift-uyarı cevapları, 0.03 Hz, 0.2 ms süreli ve farklı aralıklarla (30, 40, 50, 60, 80, 100, 150 ms) uygulanan uyarılar ile elde edildi. Çift-uyarı yanıtları ikinci PS amplitüdünün (PS2) birinciye (PS1) oranı hesaplanarak değerlendirildi. GAERS'lerden elde edilen yanıtlar kontrol sıçanlardan elde edilmiş olan yanıtlar ile karşılaştırıldı. Ayrıca, mibefradilin bu parametrelere etkileri değerlendirildi. Mibefradil lateral ventrikül içine yerleştirilen (koordinatlar: Bregmanın 1.4 mm posterior, 1,8 mm lateralinde, 3.6 mm derinliğinde) bir kanül aracılığıyla Hamilton enjektörü kullanılarak intraserebroventriküler olarak 25-50 µg dozlarında 10 µl hacminde uygulandı. Her deney sonrasında aynı bölgeye metilen mavisi enjekte edilerek ilacın lateral ventrikül içine enjekte edildiği doğrulandı.

### 3.3 *In Vitro* Çalışmalar

Sıçanlara eter anestezisi uygulandıktan sonra giyotin ile dekapite edilerek beyinleri çıkarıldı ve karbojen ile gazlandırılan buz soğukluğundaki yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS, bileşimi: NaCl: 124 mM, KCl: 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.25 mM, NaHCO<sub>3</sub>: 26 mM, Glukoz: 10 mM, MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O: 1 mM, CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O: 2 mM. pH: 7.34) içinde 1 dakika bekletildi. Daha sonra hipokampüsler çıkarılarak WPI vibratom ile 400 µm kalınlığında dilimlendi. Elde edilen dilimler 32°C'de yBOS içeren ve karbojen ile gazlandırılan beherler içinde en az bir saat süresince dinlendirildi. Dilimler 32°C'de sabit tutulan ve 4 ml/dak yBOS ile perfüze edilen kayıt banyosuna yerleştirildi. Hipokampüs dilimleri Schaffer kolaterallerine yerleştirilen “ko-aksiyel” bipolar elektrot (WPI, USA) ile stimüle edildi. Alan cevapları ise CA1 bölgesi, stratum piramidale ve radiatumdan 3-10 MΩ rezistansındaki borosilikat cam mikroelektrodlar kullanılarak elde edildi. Bu elektrotlar 2 M NaCl ile dolduruldu. Veriler Axoscope 9 (Axon Instruments, Inc.) yazılımı kullanılarak Digidata 1322A (Axon Instruments, Inc.) data aktarım cihazı aracılığıyla bilgisayara aktarıldı.

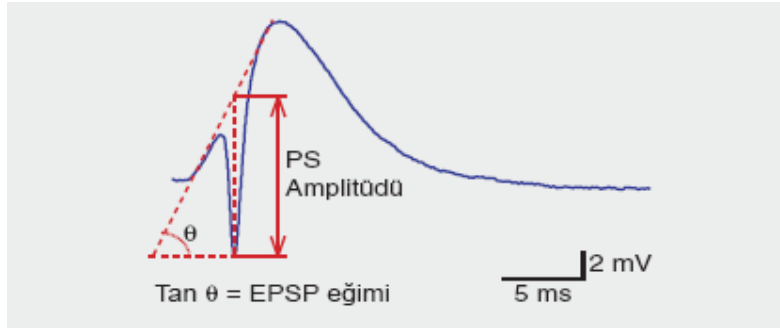
Input-output ilişkisi, 0.1 Hz, 0.2 ms süreli, 3-15 V genliğindeki uyarılara verilen alan cevapları üzerinden PS amplitüdlere hesaplanarak saptandı.

Çift-uyarı cevapları, 0.03 Hz, 0.2 ms süreli ve farklı aralıklarla (20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 ms) uygulanan uyarılara verilen cevaplardaki değişiklikler üzerinden değerlendirildi. Her dilimde mibefradil uygulaması öncesi ve sonrası PS2/PS1 oranları hesaplanarak çift-uyarı depresyon/fasilitasyon değerlendirildi.

Uzun dönem plastisitenin incelenmesi amacıyla TEA (Tetraetil-amonyum) ile LTP oluşumu değerlendirildi. Bu amaçla 0.1 Hz, 0.2 ms süreli, uyarılar uygulanarak hipokampal dilimlerde stratum radiatumdan alınan alan cevaplarının stabilizasyonu için 15 dakika beklendikten sonra kayda başlandı. TEA (25 mM), her dilimde 5 ile 15. dakikalar arasında perfüzyon sıvısı içinde uygulandı. NMDA reseptör blokörü DL-AP5 (50 µM) ve T-tipi Ca<sup>2+</sup> kanal blokörü mibefradil (1 µM) 0-60. dakikalar arasında perfüzyon

sıvısı içinde uygulandı. EPSP amplitüdleri her dakika için 6 kaydın ortalaması alınarak hesaplandı ve grafiklerde ilk 5 dakikada hesaplanan değerlerin ortalamasının yüzdesi olarak ifade edildi.

PTZ (Sigma)'dan temin edildi ve distile su içinde çözülerek i.p. yoldan enjekte edildi. Mibefradil (Sigma), TEA (Sigma), DL-AP5 (Tocris) perfüzyon sıvısı içinde uygulandı.



**Şekil 3.1** PS Amplitüdünün hesaplanması

PS ve EPSP amplitüdleri MATLAB ortamında yapılan bir yazılım ile hesaplandı.

### 3.4 İstatistiksel Analiz

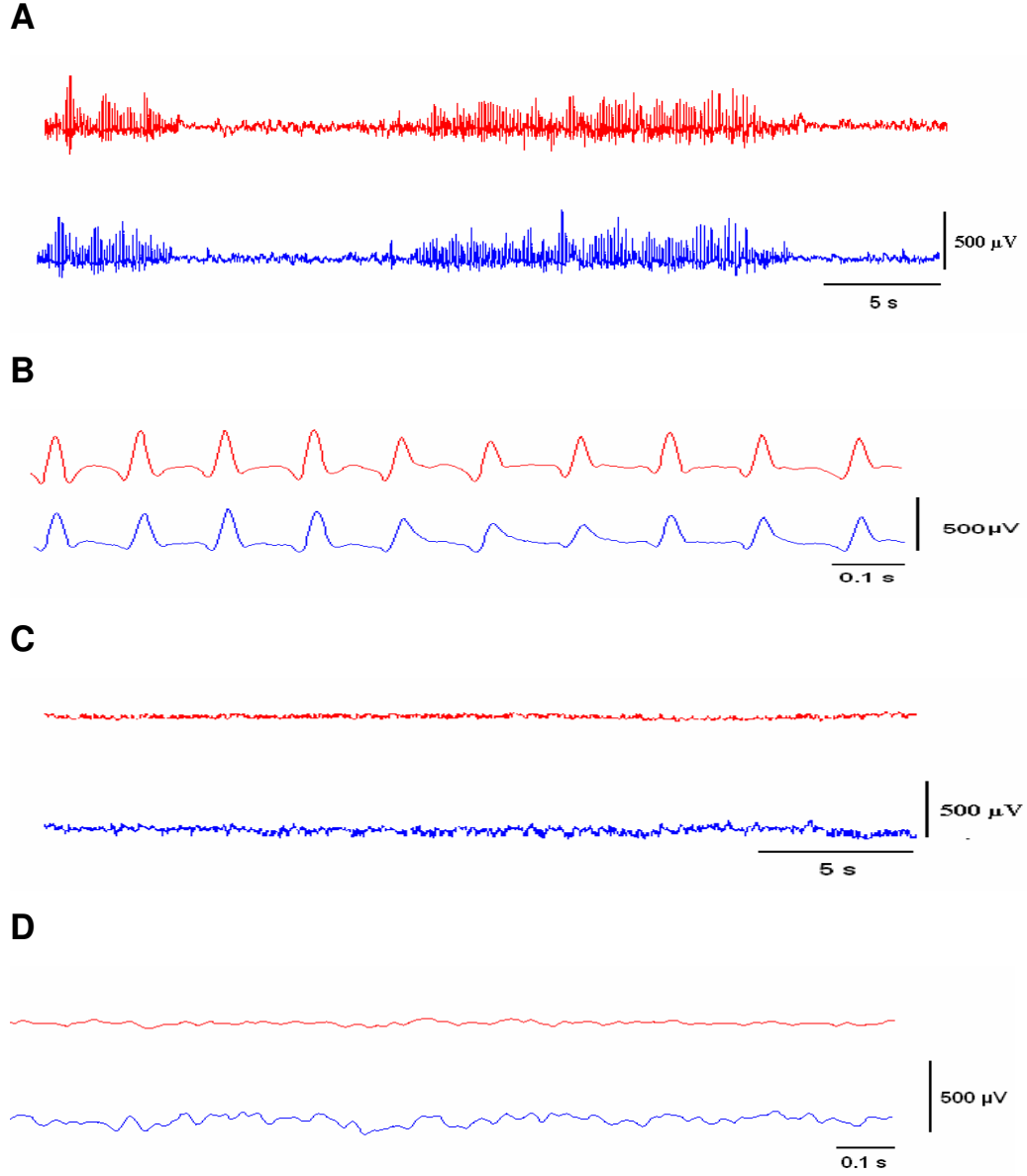
Elde edilen sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz ANOVA kullanılarak yapıldı. Post hoc hesaplamalarda Bonferoni testi kullanıldı. İstatistiksel hesaplamalar Graphpad Prism 5 yazılımı ile yapıldı.

## BULGULAR

### 4.1 *İn Vivo* Çalışmalar

#### 4.1.1 GAERS'den Elde Edilen Sonuçlar

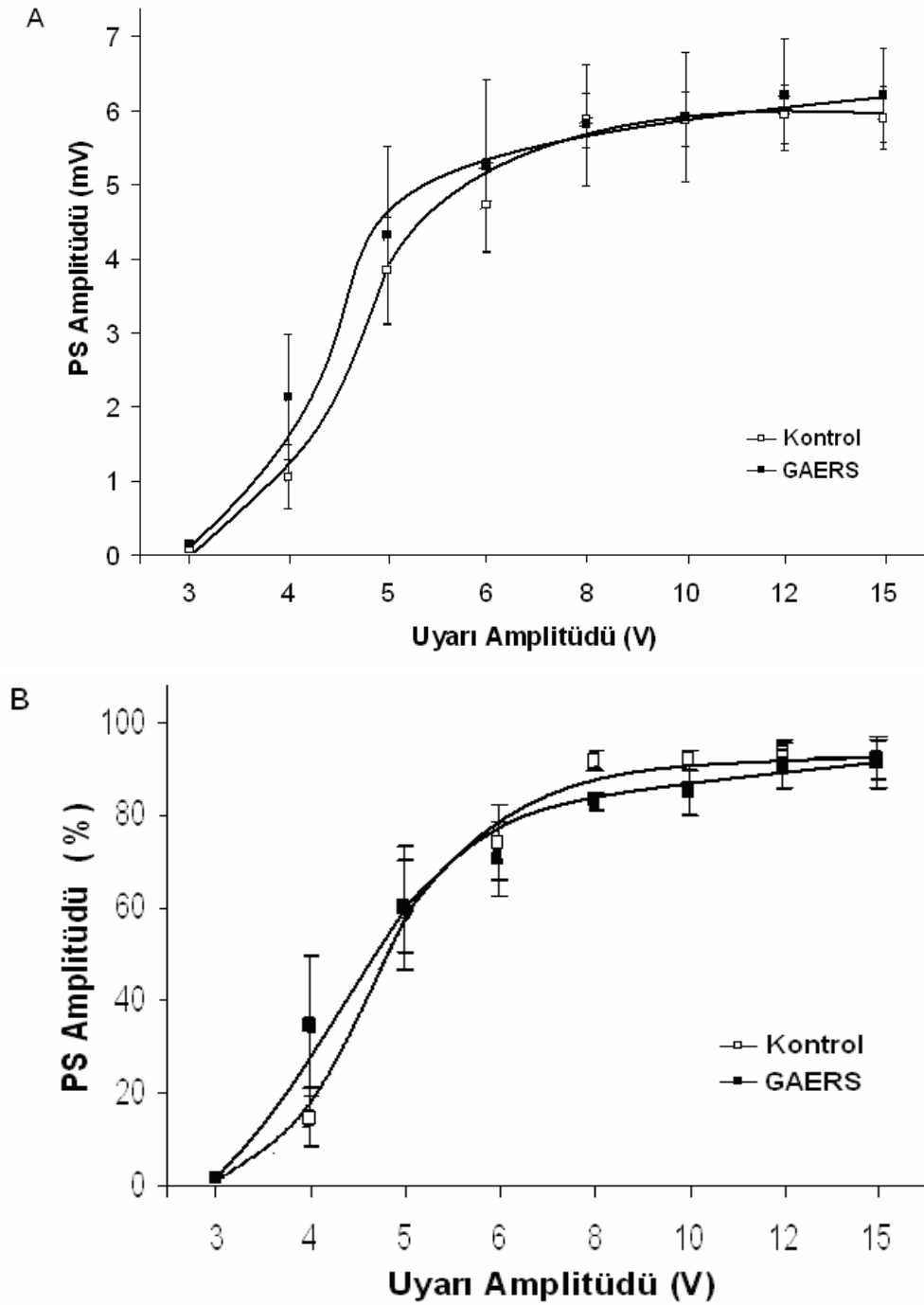
Tüm GAERS grubu sıçanlar sinaptik plastisitenin incelenmesinden önce absans tipi epilepsinin varlığı açısından EEG kayıtları ile kontrol edildi. GAERS'lerde EEG kaydı sırasında 8-11 Hz'lik süresi  $12 \pm 8$  s ve amplitüdü 300-600  $\mu$ V olan deşarjlar gözlemlendi (n=5, Şekil 4.1A). Bu deşarjlar uyanık hayvanda, hayvanın sakin ve duyusal uyaranlara maruz kalmadığı koşullarda kayıt edildi. Deşarjlar 30-50  $\mu$ V'luk düşük amplitüdlü bazal EEG aktivitesi sırasında periyodik olmayan ve 15-20 s devam eden artmış bir elektriksel aktivite olarak gözlemlendi. Bu aktivitenin amplitüdü zamanla artış gösterdi ve bazı kayıtlar sırasında 500-600  $\mu$ V'a ulaştı. Genellikle EEG aktivite artışı maksimuma ulaştıktan sonra azalarak düşük amplitüdlü bazal düzeye ulaştı. Daha geniş zaman skalası içinde değerlendirildiğinde bu aktivitenin absansa tipik diken-dalga deşarjlardan oluştuğu saptandı (Şekil 4.1B). Bu deşarjların kaydı sırasında hayvanların duyusal uyaranlara (ses, dokunma, ışık şiddeti değişimi gibi) maruz bırakılmaları durumunda deşarjların söndüğü ve bazal EEG aktivitesine geri döndüğü gözlemlendi. Kontrol grubundaki sıçanlardan uyanıklık esnasında alınan EEG kayıtlarının hiçbirisinde GAERS'lerdekine benzer şekilde diken-dalga deşarjlar saptanmadı (n=5, Şekil 4.1C). GAERS'lerde ürethan anestezisi uygulandıktan sonra EEG kayıtları tekrar alındığında diken-dalga deşarjlarının ortadan kalktığı saptandı. Ürethan ile anesteziye edilen kronik PTZ uygulanmış sıçanlarda da benzer şekilde EEG kaydı sırasında diken-dalga deşarjların inhibe edildiği saptandı.



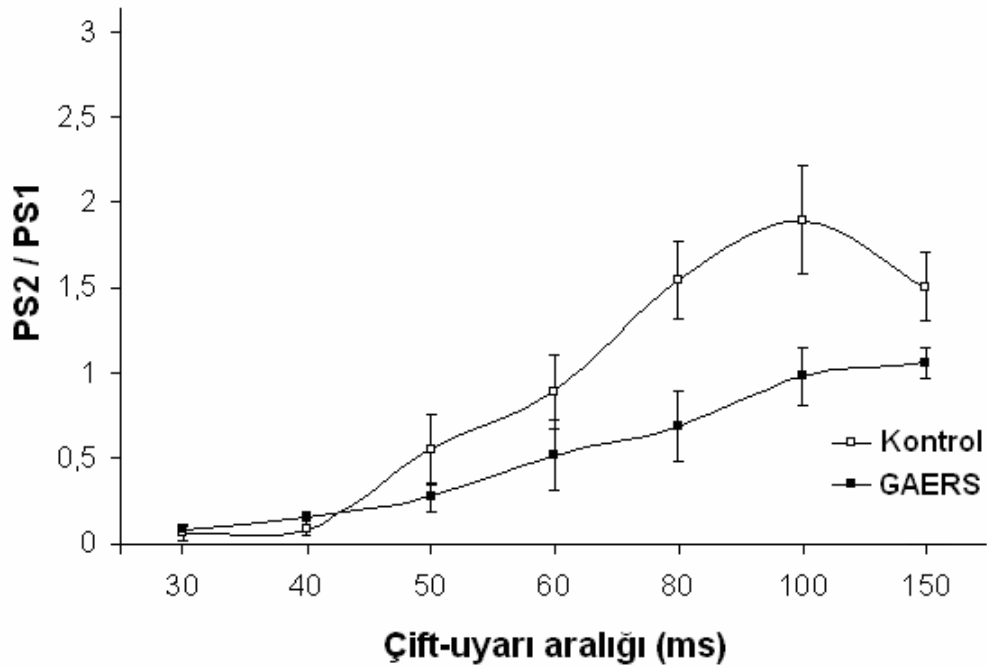
**Şekil 4.1** GAERS ve kontrol sıçanlardan elde edilen örnek EEG traseleri (Üstteki kayıtlar sağ, alttakiler sol hemisferden kaydedilmiştir). A) GAERS'de bazal EEG aktivitesini takip eden artmış elektriksel aktivite ve B) GAERS'deki artmış elektriksel aktivitenin daha geniş skalada incelendiğinde diken dalga deşarjları biçiminde olduğu görülmektedir. C) Kontrol sıçandan alınan EEG aktivitesi ve D) geniş skaladaki görünümü. Kontrol kayıta diken-dalga deşarjları gözlenmemiştir.

GAERS'de CA1 nöronlarında eksitabilite ve kısa dönem plastisitenin epileptik olmayan sıçanlara göre farklılık gösterip göstermediğini saptamak amacıyla "input-output" ilişkisi ve çift-uyarı yanıtları değerlendirildi. GAERS'de CA1 nöronları elektriksel uyarılabilme bakımından kontrol grubundaki sıçanların nöronlarına göre farklılık göstermedi (Şekil 4.2).

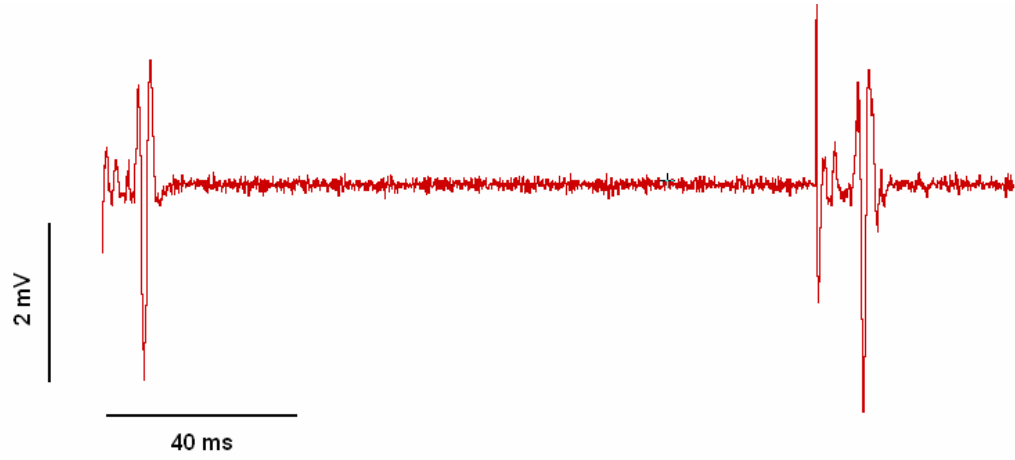
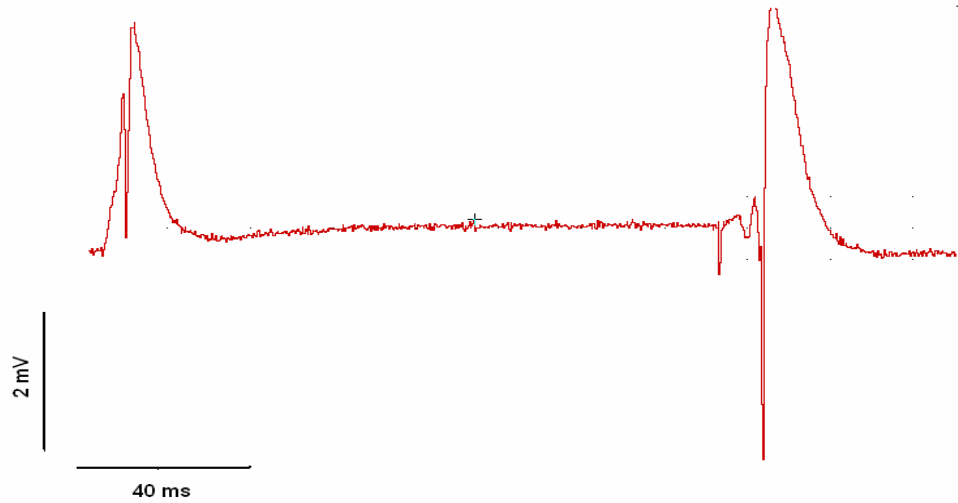
Kontrol grubu sıçanlarda yapılan çift-uyarı deneylerinde 40 ms'ye kadar olan aralıkta ikinci uyarı ile oluşturulan alan cevabı (Population Spike) amplitüdünün (PS2) yaklaşık % 100 oranında inhibe olduğu görüldü. İkinci uyarı cevaplarının amplitüdleri 60-70 ms aralığında birinci uyarı ile oluşturulan cevaplar (PS1) ile eşit düzeye geldiler ve bu aralıktan yaklaşık 100 ms'ye kadar olan aralıkta ise PS2/PS1 oranı PS2 lehinde artış gösterdi. PS2 üzerindeki fasilitasyon 100 ms'den sonra azalma gösterdi. Diğer taraftan GAERS grubunda da kontroller ile benzer şekilde 30 ve 40 ms'lik uyarı aralığında PS2'de yaklaşık tam bir inhibisyon gözlenmekle beraber PS1 ve PS2 amplitüdlерinin aynı olduğu çift-uyarı aralığı 150 ms olarak saptandı. GAERS'te 60-100 ms arasında çift-uyarı inhibisyonu azalarak devam etti (Şekil 4.3, n=5,  $P<0.01$ ). GAERS grubunda 100 ms'den sonra inhibisyon ortadan kalktı, ancak fasilitasyon oluşmadı (Şekil 4.3).



**Şekil 4.2** GAERS ve kontrol sıçanlarda “input-output” ilişkisi. Uyarılar 0.1 Hz ile ve 0.2 ms devam süresinde uygulanmıştır. A) PS amplitüdlere kontrol grubu ile GAERS arasında farklılık göstermemiştir. B) “Input-output” ilişkisi, maksimum PS Amplitüdünün yüzdesi olarak gösterilmiştir. Kontrol grubu ile GAERS arasında farklılık görülmemektedir (n=5 her iki grup için).



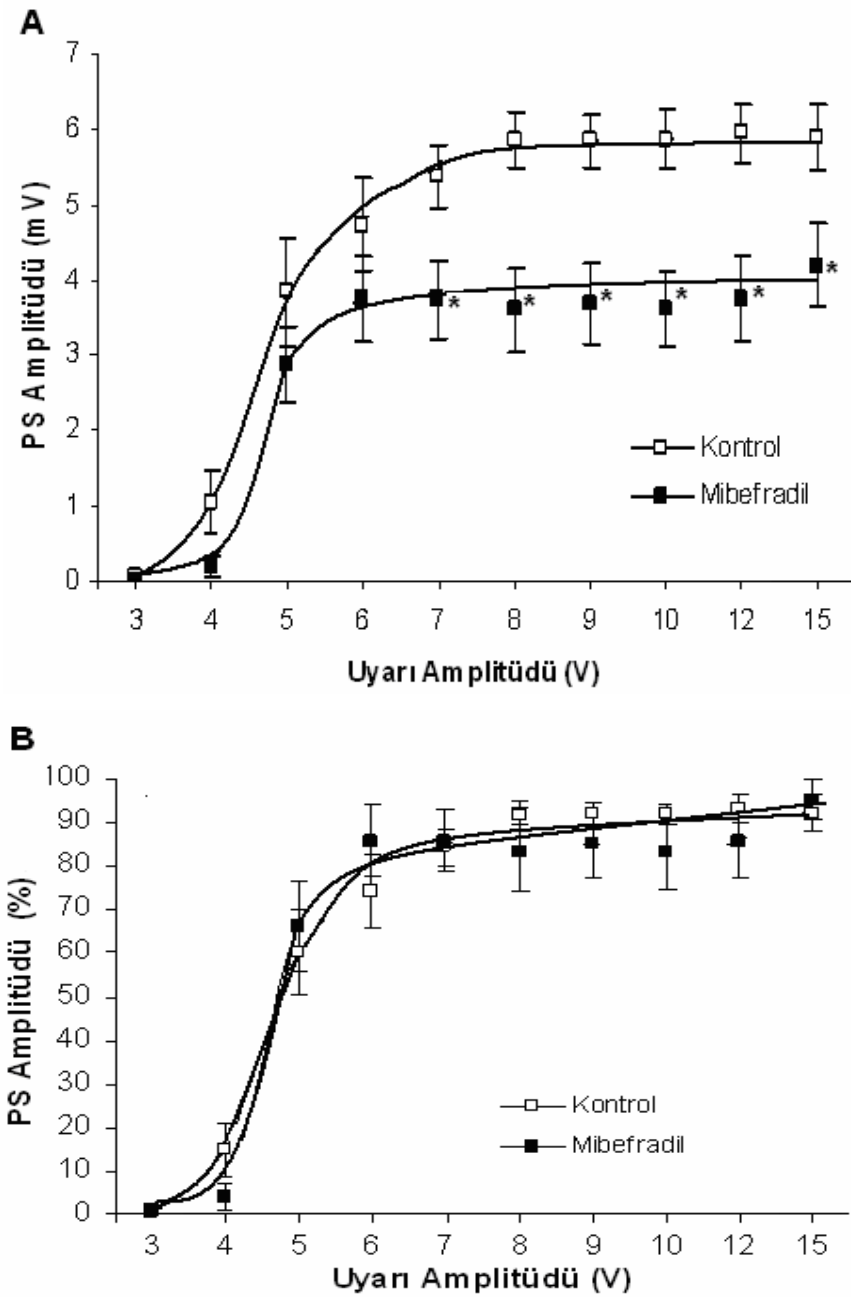
**Şekil 4.3** GAERS ve kontrol sıçanlarda değişen aralıklı çift-uyarı uygulaması ile elde edilen PS amplitüdlerinin oranındaki (PS2/PS1) değişiklikler. Her bir çift-uyarı uygulaması 0.03 Hz, 0.2 ms devam süresinde ve PS1 amplitüdü yarı-maksimum olacak şiddette uygulandı. GAERS'de PS2/PS1 oranı 80-150 ms aralıklarında anlamlı olarak düşük bulundu (n=5 her grup için, \*P<0.01).

**A****B**

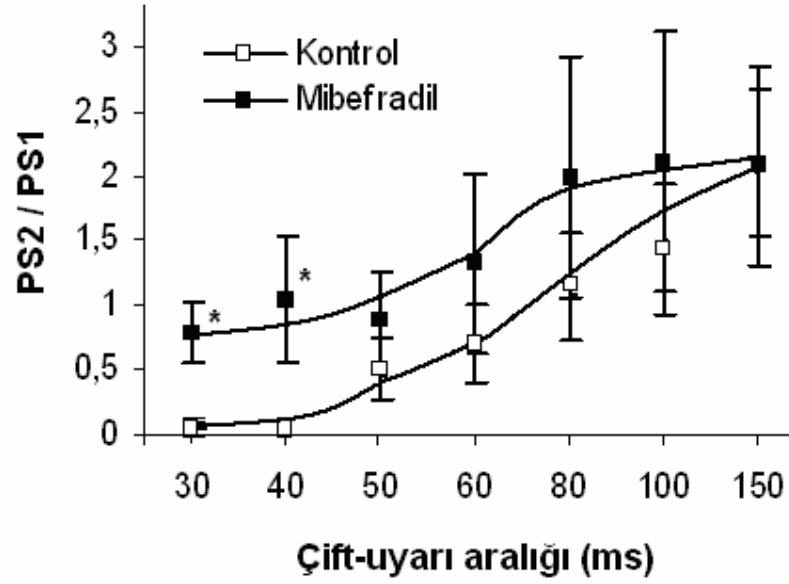
**Şekil 4.4** GAERS (A) ve kontrol sıçandan (B) 150 ms aralığında elde edilen çift-uyarı yanıtlarını gösteren örnek traseler. Çift-uyarı uygulaması 0.03 Hz, 0.2 ms devam süresinde ve PS1 amplitüdü yarı-maksimum olacak şiddette uygulandı. Bu kayıtlarda PS2/PS1 oranları sırasıyla 1.1 ve 1.9 olarak saptandı.

#### 4.1.2 Mibefradilin Hipokampal Alan Yanıtlarına Etkileri

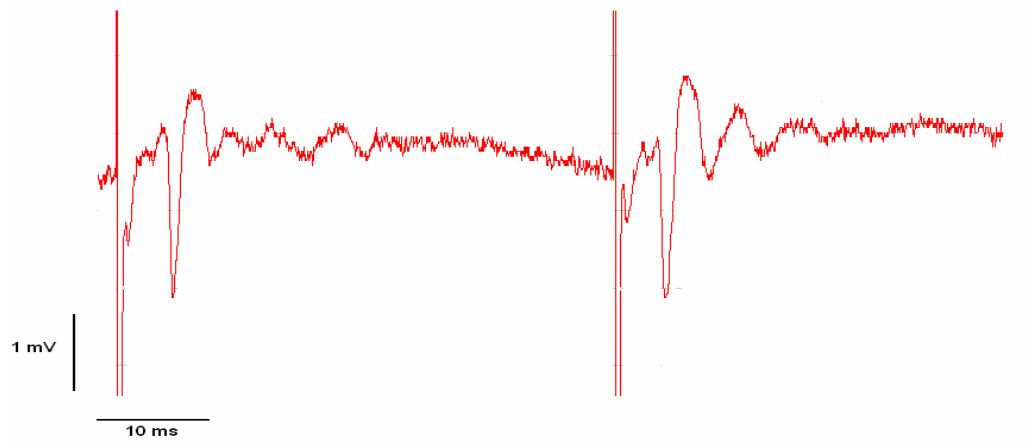
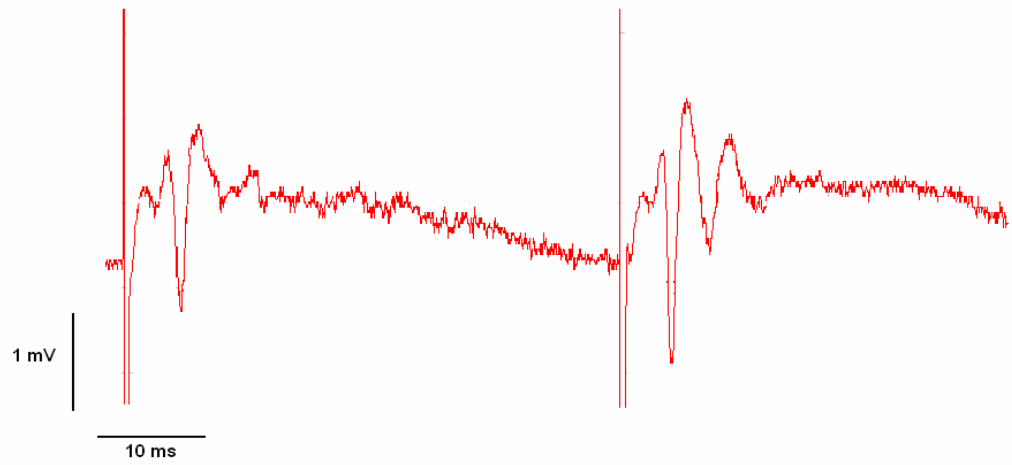
Kontrol hayvanlarda, T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının eksitabilite ve kısa dönem plastisiteye katkısının incelenmesi amacı ile CA1 nöronlarda “input-output” eğrileri ve çift- uyarı yanıtları elde edildi. T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının mibefradil ile blokajından sonra bu yanıtlarda meydana gelen değişiklikler üzerinden kanalların plastisitedeki rolleri değerlendirildi. Mibefradil kan-beyin engelini geçemediğinden (36) dolayı ilaç lateral ventriküle yerleştirilen kanüllerden intraserebroventriküler (i.s.v) olarak 10  $\mu\text{l}$  hacim içerisinde 25-50  $\mu\text{g}$  dozunda uygulandı. PS'lar ilk olarak 3-4 V şiddetindeki uyarımlarla görülmeye başlandı ve stimülasyon şiddeti ile orantılı olarak arttı. Maksimum PS amplitüdüleri 14 V şiddetinde elde edildi. “Input-output” ilişkisinin saptandığı çalışmalar haricindeki tüm deneylerde stimülasyon şiddeti maksimumun % 50'si olacak şekilde ayarlandı ve bu koşullarda PS amplitüdü  $3\pm0.5$  mV olarak bulundu. Mibefradil (25  $\mu\text{g}$ ) uygulaması PS amplitüdlerinde değişikliğe yol açmadı ( $n=3$ ). Mibefradil 35  $\mu\text{g}$  dozunda uygulandığında,  $1\pm0.5$  dak. sonra PS amplitüdüleri azalmaya başladı ve  $10\pm2$  dak. sonra PS amplitüdlerindeki azalma maksimuma ulaştı ve bu sırada PS amplitüdüleri %  $30\pm5$  oranında azaldı ve bu düzeyi  $8\pm3$  dak. süresince korudu ( $n=3$ ). PS amplitüdüleri ilacın verilmesinden  $30\pm10$  dak. sonra tam olarak geri döndü. Mibefradil dozu 50  $\mu\text{g}$ 'a çıkıldığında  $40\pm15$  s içinde PS amplitüdüleri geri dönüşsüz bir biçimde tamamen ortadan kalktı ( $n=3$ ). Bu verilerin elde edilmesinden sonra kontrol sıçanlarda hipokampal CA1 bölgesinde “Input-output” ilişkisi ve çift-uyarı yanıtları 35  $\mu\text{g}$  mibefradil uygulanması öncesinde ve 15 dakika sonrasında kaydedildi. “Input-output” eğrisinde farklılık gözlenmedi (Şekil 4.5A) ancak, maksimum PS amplitüdünde yaklaşık % 30 azalma saptandı ( $n=5$ ,  $P<0.01$ , Şekil 4.5B). Çift-uyarı uygulaması ile PS1, PS2 amplitüdüleri ve PS2/PS1 oranı hesaplandı. Mibefradil uygulaması (35  $\mu\text{g}$ ) ile PS1 ve PS2 amplitüdlerinde azalma meydana geldi. PS1 amplitüdündeki azalma daha fazlaydı dolayısıyla PS2/PS1 oranı mibefradil uygulaması sonrasında arttı (Şekil 4.6). Bu artış 30 ve 40 ms aralığında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $n=5$ ,  $P<0,05$ ). Mibefradil uygulaması öncesinde ve sonrasında alınan kayıtlardan örnekler şekil 4.7A ve 4.7B'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.5** Mibefradil (35 µg, i.s.v) uygulamasının “input- output” ilişkisine etkileri. Uyarılar 0.1 Hz ile, ve 0.2 ms devam süresinde uygulanmıştır. A) PS amplitüdüleri mibefradil uygulaması sonrasında azalmıştır ve bu fark 7-15 V uyarı amplitüdüleri için istatistiksel olarak anlamlıdır (n=5 her iki grup için, \*P<0.01). B) “Input-output” ilişkisi, maksimum PS Amplitüdünün yüzdesi olarak gösterilmiştir. Mibefradil uygulaması ile “input-output” ilişkisinde değişiklik oluşmamıştır.



**Şekil 4.6** Mibefradil (35 µg, i.s.v) uygulamasının çift-uyarı yanıtlarına etkisi. Her bir çift-uyarı 0.03 Hz ile, 0.2 ms devam süresinde ve PS1 amplitüdü yarı-maksimum olacak şiddette uygulandı. Mibefradil uygulaması ile 30 ve 40 ms aralıklarında PS2/PS1 oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (n=5 her iki grup için, \*P<0.05).

**A****B**

**Şekil 4.7** Mibefradil uygulaması öncesinde (A) ve sonrasında (B) kaydedilen 40 ms aralıklı çift-uyarı yanıtlarından örnek traseler.

### 4.1.3 Kronik PTZ Uygulaması İle Kindling Oluşumuna Dozlama Protokolünün Etkisi

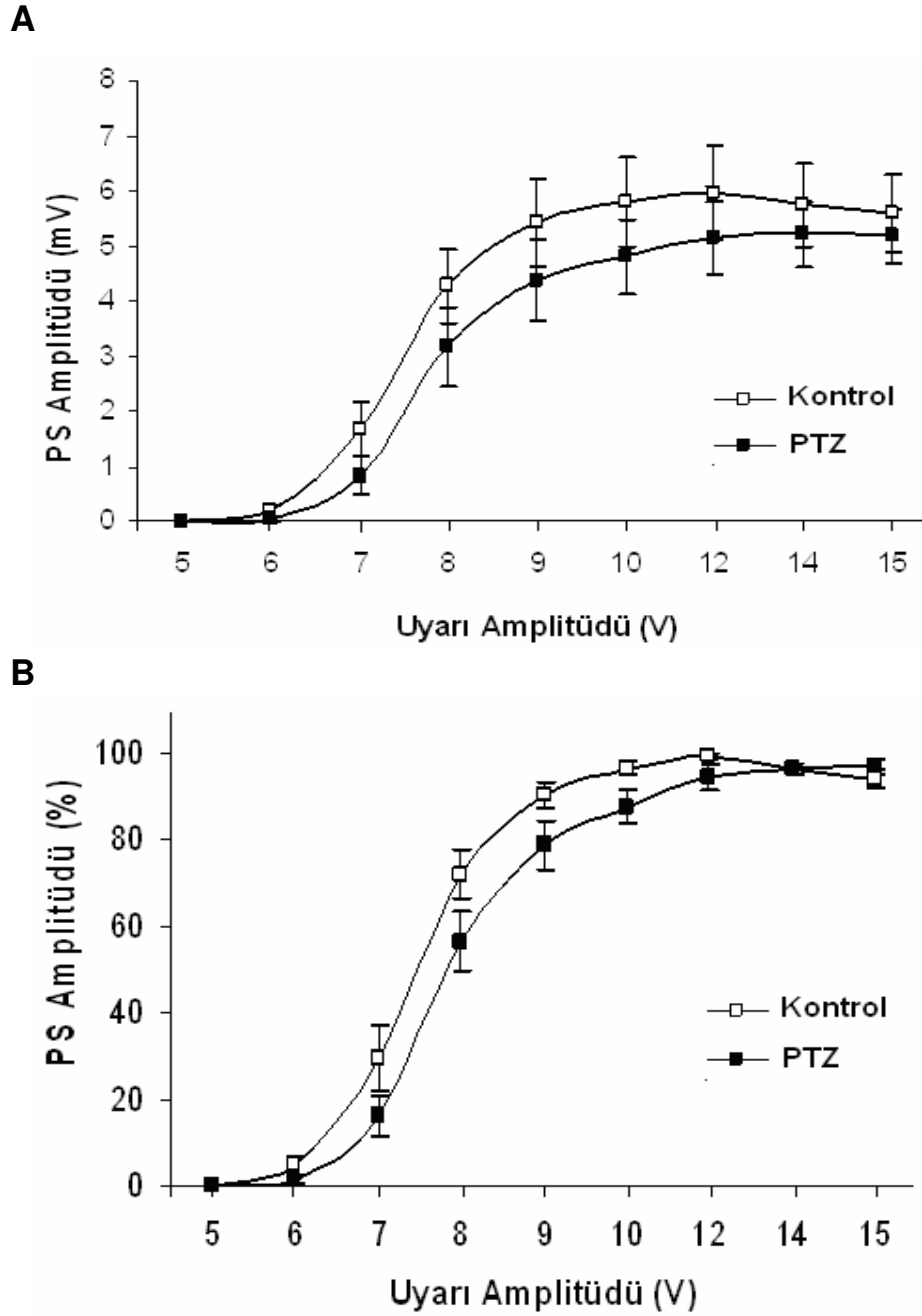
Kronik düşük doz (25 mg/kg) PTZ uygulaması ile kindling oluşumu değerlendirildi. Bu amaçla 3'er adet sıçandan oluşan 2 grup kullanıldı. Gruplardan birine gūnaşırı, diğerine ise her gün PTZ uygulandı. Her iki grupta evre 2 kindling oluşum süresi benzerdi ( $32 \pm 4$  gün). Bununla birlikte, gūnaşırı PTZ uygulanan sıçanlarda  $45 \pm 2$  günde tam (evre 5) kindling oluşurken, günlük PTZ uygulanan grupta 2. ayın sonunda evre 5 kindling oluşmadı ve bu grup sıçanlar evre 2'de kaldı.

## 4.2 *In Vitro* Çalışmalar

Mibefradilin *in vivo* çalışmalarda hipokampüsteki etkileri ve bunun doz ile ilişkisi incelendikten sonra CA1 bölgesinde konsantasyon-etki ilişkilerinin ve T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının kısa ve uzun dönem plastisitedeki etkilerinin anlaşılabilmesi amacı ile *in vitro* çalışmalara başlandı. Mibefradil etkilerinin incelenmesinden önce kronik PTZ uygulanan sıçanlarda kısa dönem plastisitede meydana gelen değişiklikler incelendi.

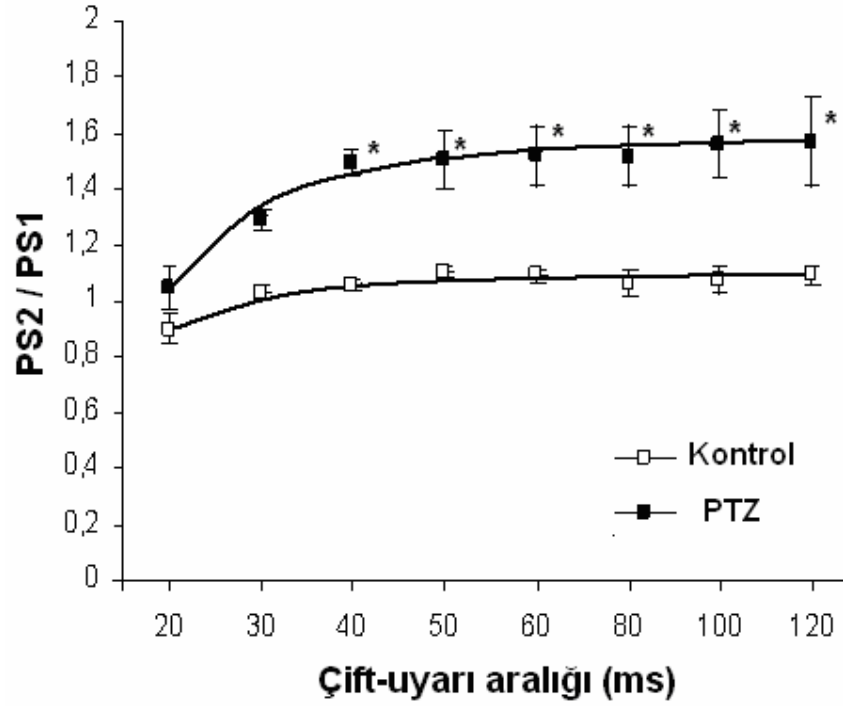
### 4.2.1 Kronik PTZ Uygulanan Sıçanlarda Kısa Dönem Plastisite

Kronik PTZ uygulamasının sıçan hipokampal CA1 bölgesi nöronlarında "input-output" ilişkisinde ve çift-uyarı cevapları üzerine yaptığı değişiklikler incelendi. Kontrol ve PTZ gruplarının her ikisinde de uyarılabilme eşiğinin benzer olarak 5-6 V arasında olduğu saptandı. "Input-output" eğrileri değerlendirildiğinde kronik PTZ uygulanan grupta kontrol grubuna göre PS amplitüdlerinin daha düşük olduğu gözlemlendi ancak, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.8,  $n=6$ ).



**Şekil 4.8** Kontrol ve PTZ grubunda input-output ilişkisinin karşılaştırılması. Uyarılar 0.1 Hz ile 0.2 ms devam süresinde uygulanmıştır. A) PS amplitüdüleri PTZ grubunda azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. B) “Input-output” ilişkisi, maksimum PS Amplitüdünün yüzdesi olarak gösterilmiştir. Kontrol ve PTZ grubunda farklılık görülmemektedir (n=6 her iki grup için).

Çift-uyarı cevapları incelendiğinde kronik PTZ uygulanan grupta PS2/PS1 oranının arttığı gözlemlendi. Kontrol grubunda 20 ms'lik çift-uyarı aralığında PS2'in inhibisyonu gözlenirken 30 ms ve daha uzun aralıklarda PS2/PS1 oranı eşitlendi ve fasilitasyon yönünde bir artış gözlenmedi. PTZ grubunda ise 20-120 ms aralığında çift-uyarı inhibisyonu saptanmazken, özellikle 40 ms'den daha büyük çift-uyarı aralıklarında belirgin olarak fasilitasyon gelişti ve bu etki 40-120 ms arasında değişiklik göstermeden devam etti. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.9,  $n=6$ ,  $P<0.01$ ).



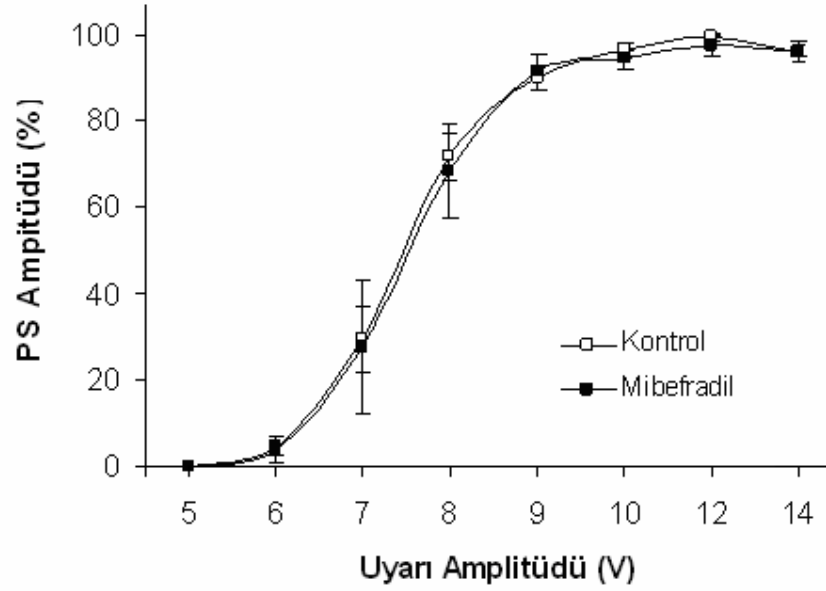
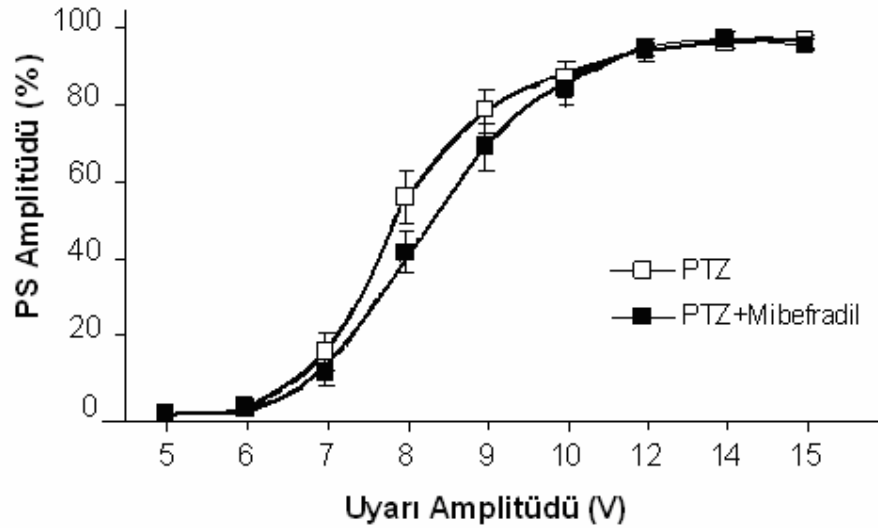
**Şekil 4.9** Kontrol ve PTZ grubunda çift uyarı yanıtlarının karşılaştırılması. Her bir çift-uyarı uygulaması 0.03 Hz, 0.2 ms devam süresinde ve PS1 amplitüdü yarı-maksimum olacak şiddette uygulandı. PTZ grubunda PS2/PS1 oranı artmıştır ve bu artış 40-120 ms aralığında anlamlı bulunmuştur (n=6, her iki grup için, \*P<0.01).

#### 4.2.2 Mibefradilin Hipokampüste Kısa Dönem Plastisiteye Etkileri

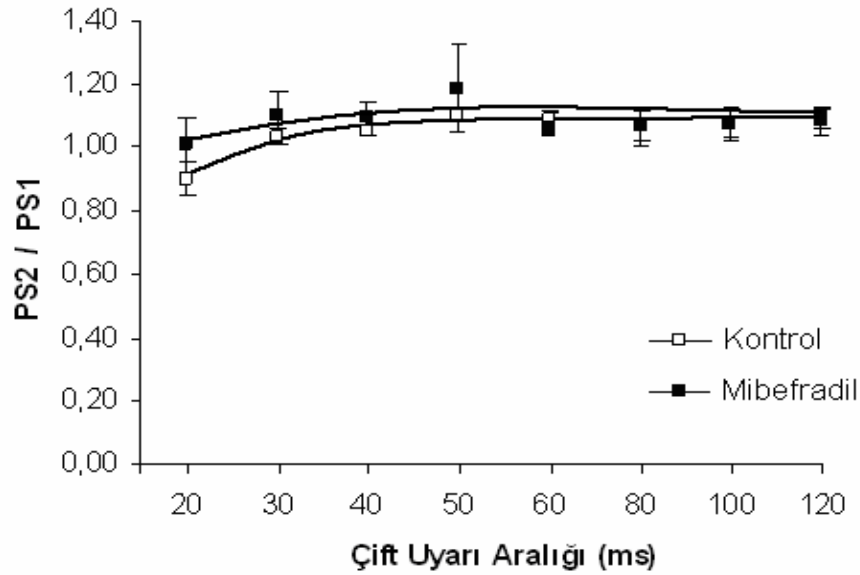
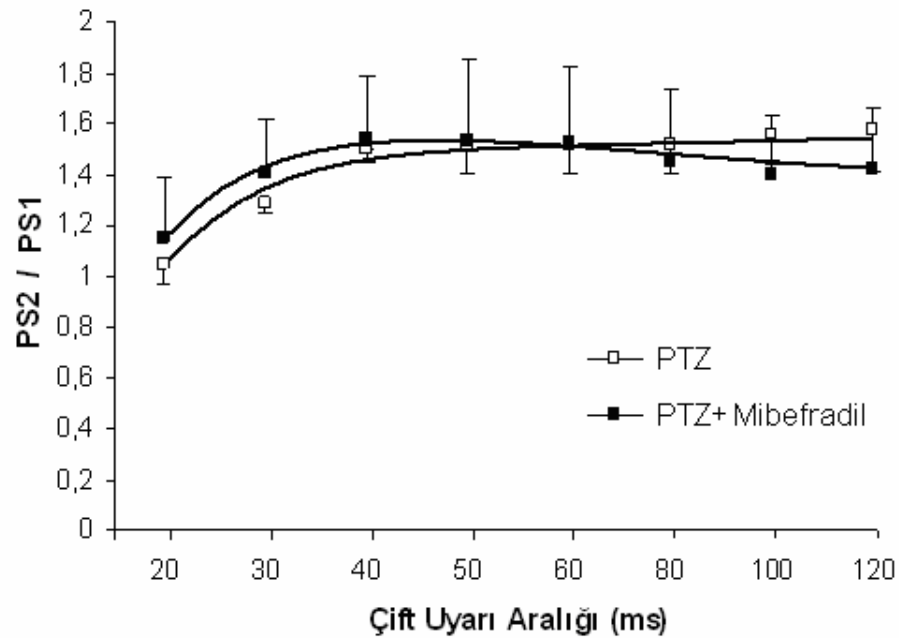
Mibefradil hipokampal dilimlerde 0.5 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında PS'ler tamamen ortadan kalktı ve yBOS ile perfüzyona geçildiğinde bu inhibisyon kısmen geri döndü (n=3). Mibefradil 1 mM konsantrasyonunda kullanıldığında ise PS'ler geri dönüşsüz olarak ortadan kalktı (n=3). Mibefradil 100  $\mu$ M konsantrasyonunda uygulandığında PS amplitüdleri %  $20 \pm 4$  oranında azaldı ve normal solüsyona geçildiğinde mibefradilin inhibitör etkisi tamamen geri döndü (n=3). Mibefradil 10  $\mu$ M konsantrasyonunda uygulandığında ise PS amplitüplerinde %  $6 \pm 2$  azalma gözlemlendi ve normal solüsyona geçildiğinde bu etki geri döndü (n=3). Mibefradilin 1  $\mu$ M konsantrasyonunda uygulanması ile PS amplitüplerinde değişiklik meydana gelmedi (n=6). T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının kontrol ve kronik PTZ uygulanmış sıçanlarda kısa dönem plastisitedeki rollerinin anlaşılması amacıyla 1  $\mu$ M mibefradil uygulamasının hipokampal CA1 nöronlarında "input-output" ilişkisine ve çift-uyarı yanıtlarına etkileri değerlendirildi.

Mibefradil (1  $\mu$ M) uygulanması ile kontrol ve kronik PTZ verilmiş sıçanlarda PS1 ve PS2 amplitüplerinde değişiklik meydana gelmedi. Uyarılma eşiği kontrol sıçanlarda mibefradil uygulaması öncesi ve sonrasında  $6 \pm 1.0$  V düzeyindeydi. Maksimum cevaplar 14 V uyarım ile elde edildi. Kontrol grubunda ve kronik PTZ uygulanan sıçanlarda CA1 nöronlarında uyarılma eşiğinde ve maksimum PS amplitüplerinde mibefradil uygulaması öncesi ve sonrasında farklılık gözlemlenmedi. "Input-output" ilişkisi her iki grupta farklılık göstermedi (n=6, Şekil 4.10A ve 4.10B ).

Çift-uyarı cevapları kontrol ve PTZ gruplarında mibefradil uygulaması öncesi ve sonrasında değerlendirildi. Her iki grupta da mibefradil çift-uyarı cevaplarında değişikliğe yol açmadı (n=6, Şekil 4.11A ve 4.11B).

**A****B**

**Şekil 4.10** Mibefradilin (1  $\mu$ M) kontrol (A) ve PTZ (B) gruplarında “input-output” ilişkisine etkisi. Uyarılar 0.1 Hz ile 0.2 ms devam süresinde uygulanmıştır. Her iki grupta da mibefradil “input-output” ilişkisinde anlamlı bir fark oluşturmamıştır (n=6 her iki grup için).

**A****B**

**Şekil 4.11** Mibefradilin (1  $\mu$ M) kontrol (A) ve PTZ (B) gruplarında çift uyarı yanıtlarına etkisi. Her bir çift-uyarı uygulaması 0.03 Hz, 0.2 ms devam süresinde ve PS1 amplitüdü yarı-maksimum olacak şiddette uygulandı. Mibefradil, her iki grupta da çift-uyarı yanıtlarında anlamlı bir fark oluşturmadı (n=6, her iki grup için).

### 4.3 Kontrol ve kronik PTZ uygulanan sıçanlarda uzun dönem plastisite

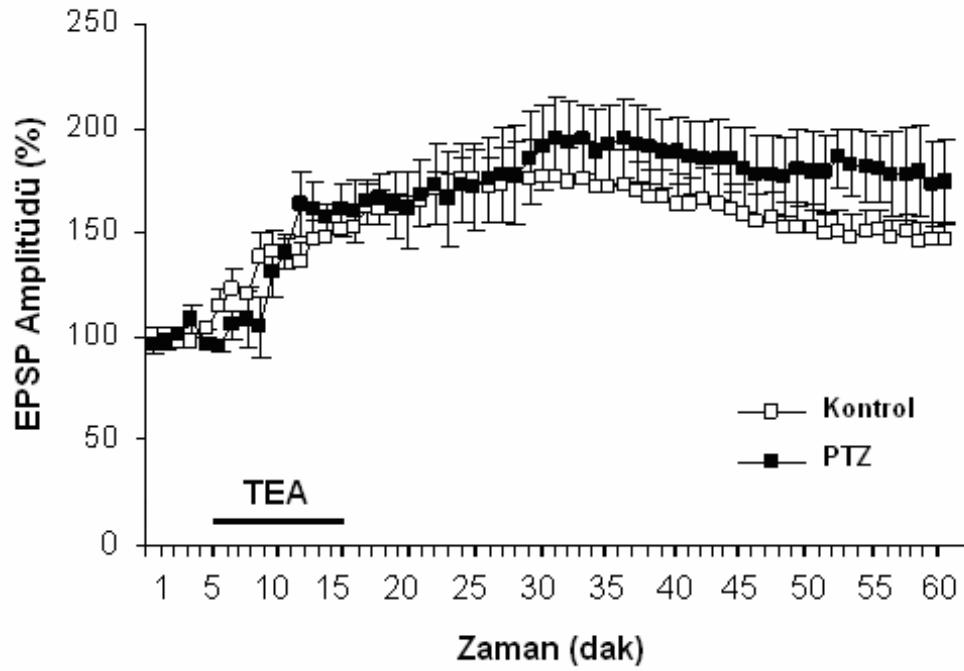
Kontrol ve kronik PTZ uygulanan sıçanlarda uzun dönem nöronal plastisitenin bir ifadesi olan LTP cevapları incelendi. T-tipi  $Ca^{2+}$  kanal aktivitesinin LTP'deki rolünün değerlendirilebilmesi amacıyla, LTP indüksiyonunda bu kanalların aktivitesinin yüksek oranda katkısının olduğu bilinen TEA-LTP araştırıldı. Kayıtlar deney boyunca hipokampal CA1 bölgesinde stratum radiatumdan düşük frekanslı (0.1 Hz) uyarımlar ile elde edildi. Her deneyde hipokampal dilimlerde 5-15. dakikalar arasında 10 dak. süresince TEA (25 mM) uygulaması yapıldı.

Kontrol ve PTZ uygulanmış sıçanlarda TEA-LTP deneyleri normal solüsyon, DL-AP5 varlığında ve DL-AP5+mibefradil varlığında olmak üzere 3 grupta yapıldı. TEA uygulamasından 1-3 dak. sonra EPSP amplitüdləri artmaya başladı. Kontrol grubunda EPSP amplitüdləri 30. dakikada %  $176 \pm 18$  düzeyinde maksimuma ulaştı ve yavaş bir azalma göstererek %  $146 \pm 8$  düzeyinde kararlı durumda devam etti. PTZ grubunda ise artış 30-35. dakikalara kadar devam ederek %  $195 \pm 15$  düzeyine ulaştı ve daha sonra yavaş bir azalma göstererek %  $175 \pm 8$  düzeyinde devam etti. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $n=5$ , şekil 4.12).

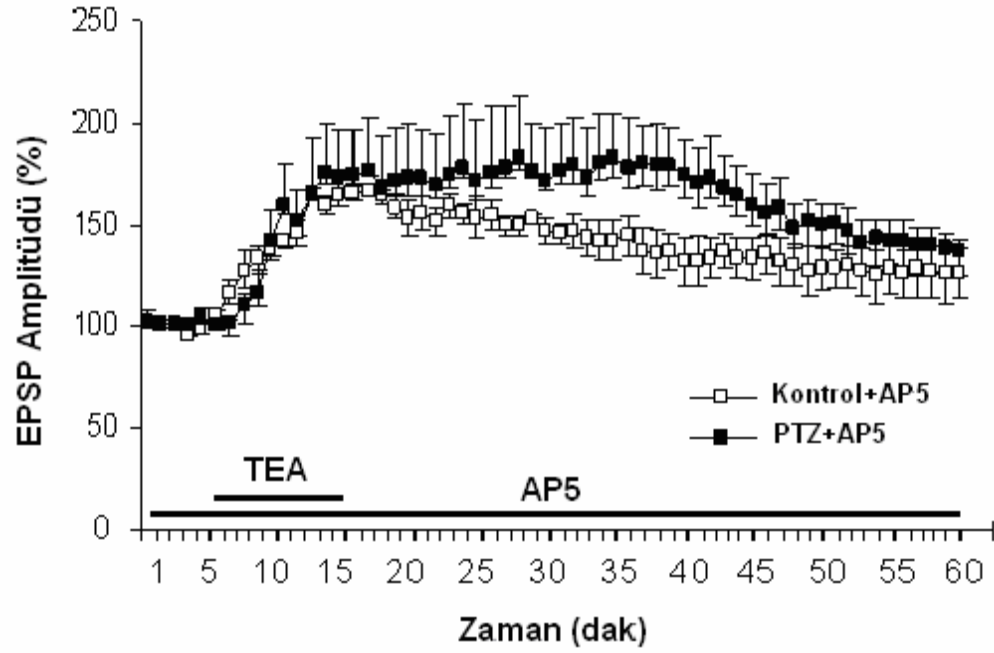
Kontrol ve PTZ uygulanan gruplarda TEA-LTP'nin NMDA reseptör bağımlı komponentini ortadan kaldırmak amacıyla deneyler DL-AP5 (50  $\mu$ M) varlığında tekrarlandı. EPSP amplitüdləri her iki grupta yaklaşık 15. dakikada maksimuma ulaştı. PTZ grubunda 20 dak. boyunca maksimumda seyreden EPSP amplitüdləri 1. saat sonunda değerlendirildiğinde %  $137 \pm 5$  düzeyindeydi. Kontrol grubunda EPSP amplitüdləri maksimuma ulaştıktan sonra daha hızlı bir azalma göstererek 1. saat sonunda %  $126 \pm 15$  düzeyine indi ( $n=5$ , şekil 4.13)

T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının, kronik PTZ uygulanmış sıçanlarda TEA-LTP üzerindeki katkısının değerlendirilebilmesi için deneyler DL-AP5 (50  $\mu$ M) ve mibefradil (1  $\mu$ M) varlığında tekrarlandı. EPSP amplitüdləri PTZ grubunda 25. dakikaya kadar artış gösterdi ve daha sonra yavaş bir azalma ile %  $140 \pm 8$  düzeyinde platoya ulaştı. Kontrol grubunda ise % 144 düzeyinde maksimuma ulaştıktan hemen sonra azalma göstererek 1. saat sonunda %  $105 \pm 7$

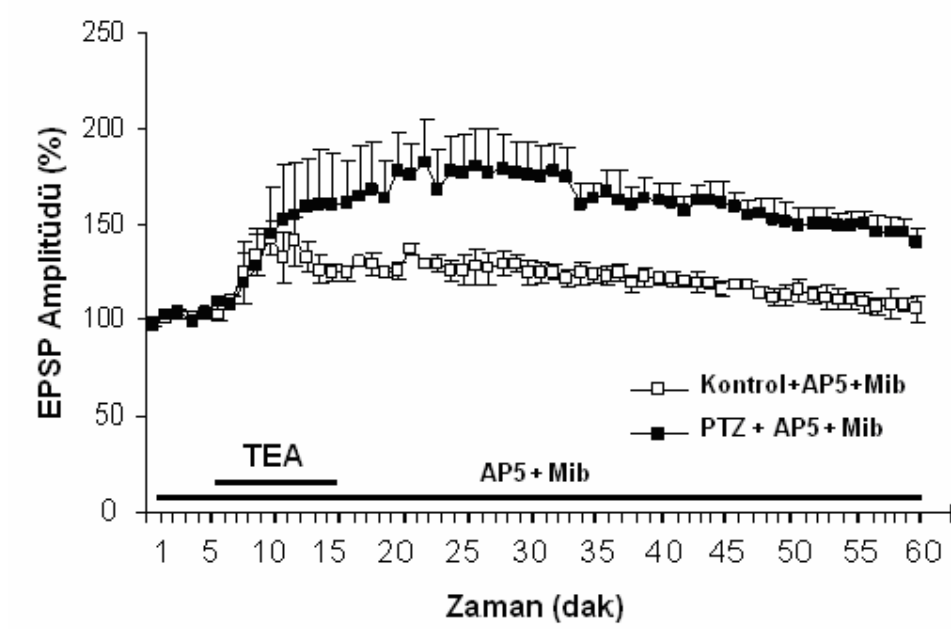
düzeyine indi. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $n=5$ ,  $P<0.05$ , şekil 4.14).



**Şekil 4.12** Kontrol ve PTZ gruplarında TEA ile oluşturulan LTP cevapları. Her bir uyarı 0.1 Hz ve 0.2 ms süresinde uygulandı. Kontrol grubunda 60 dak. sonunda EPSP amplitüdlerinin PTZ grubuna göre azalmış olduğu gözlemlendi ancak, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $n=5$ , her iki grup için).

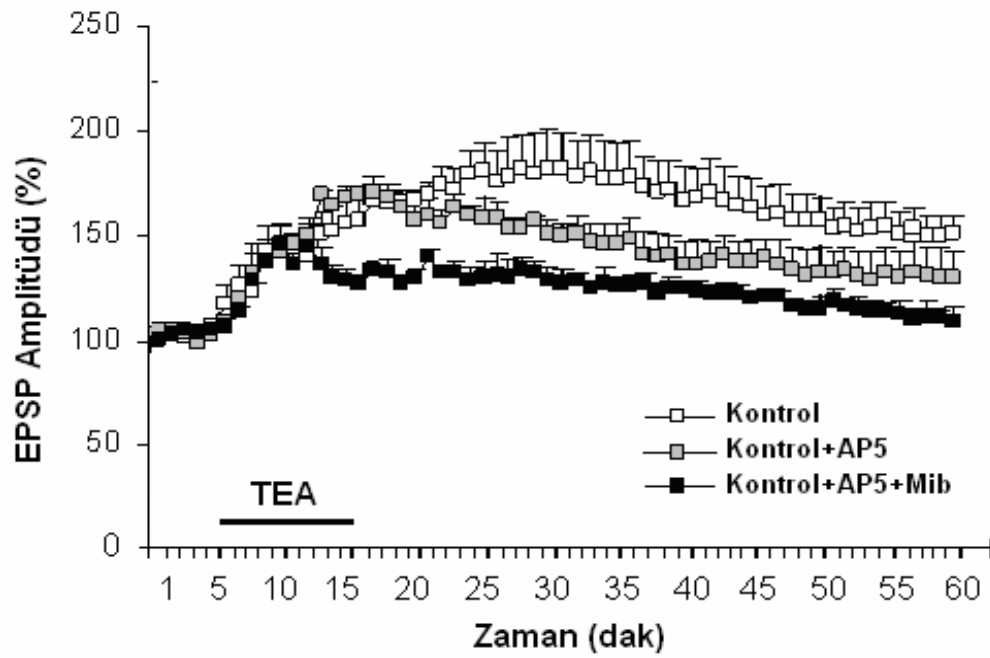


**Şekil 4.13** Kontrol ve PTZ gruplarında DL-AP5 varlığında TEA ile oluşturulan LTP cevapları. Her bir uyarı 0.1 Hz ve 0.2 ms süresinde uygulandı. Kontrol grubunda 60 dak. sonunda EPSP amplitüdlerinin PTZ grubuna göre azalmış olduğu gözlemlendi ancak, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $n=5$ , her iki grup için).

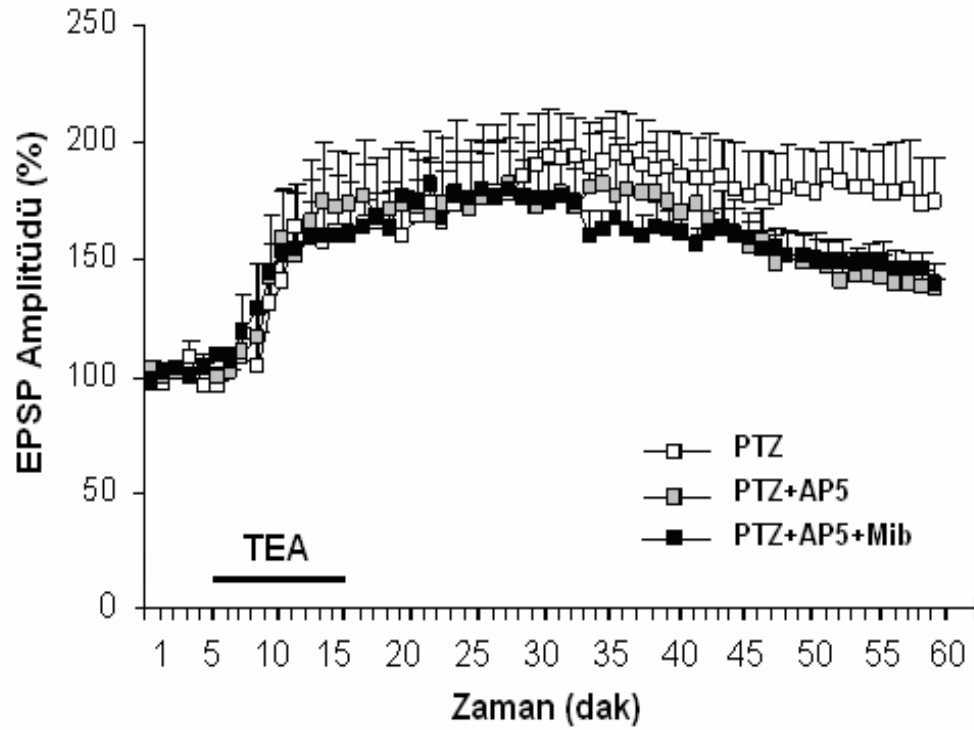


**Şekil 4.14** Kontrol ve PTZ gruplarında DL-AP5+Mib (Mibefradil) varlığında TEA ile oluşturulan LTP cevapları. Her bir uyarı 0.1 Hz ve 0.2 ms süresinde uygulandı. PTZ grubunda EPSP amplitüdlerinin 15. dakikadan itibaren kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu gözlemlendi (n=5, her iki grup için, \*P<0.05).

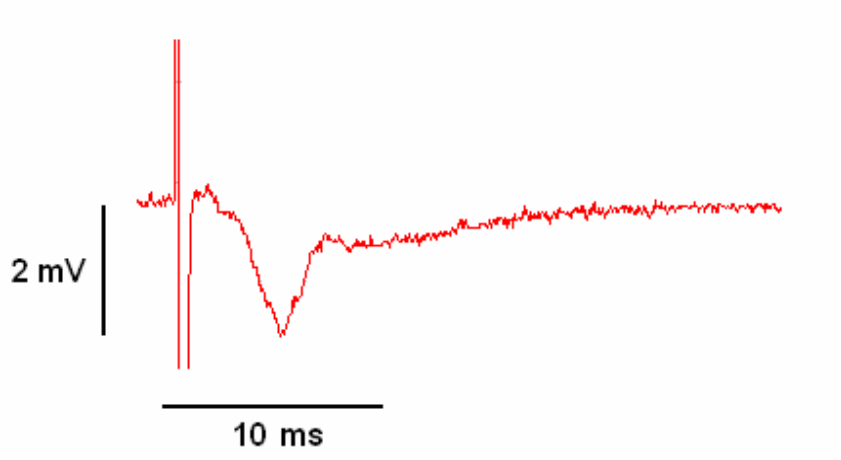
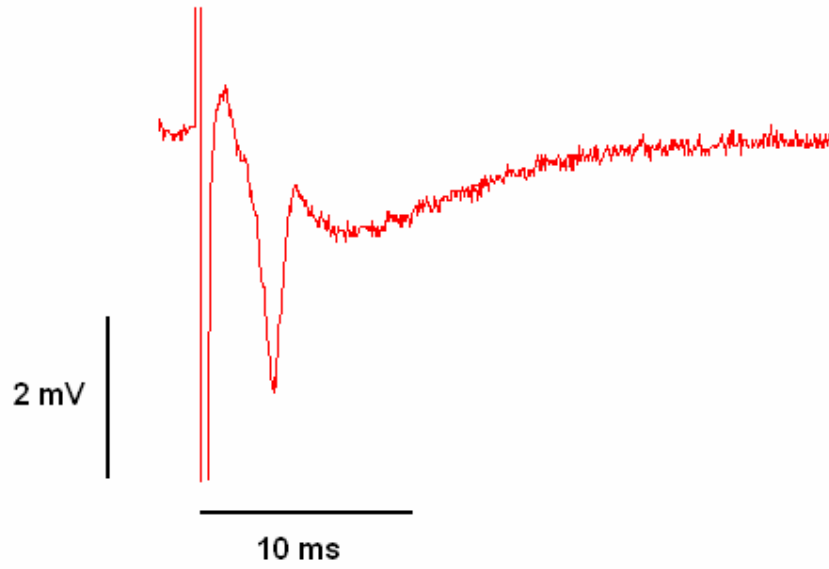
Daha sonra kontrol ve PTZ gruplarında normal solüsyon, DL-AP5 varlığında ve DL-AP5+mibefradil varlığında alınan cevaplar kendi içlerinde karşılaştırıldı. Kontrol grubunda EPSP amplitüdleri normal solüsyonla oluşturulan TEA-LTP'ye göre DL-AP5 varlığında azaldı, DL-AP5+mibefradil varlığında ise bu azalmanın daha belirgin olduğu bulundu (şekil 4.15). Bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (n=5). PTZ grubunda aynı karşılaştırma yapıldığında EPSP amplitüdlerinin kendi kontrollerine göre DL-AP5 varlığında ve DL-AP5+mibefradil varlığında eşit derecede azaldığı gözlemlendi (şekil 4.16) ancak, bu azalmalar da istatistiksel olarak anlamlı değildi (n=5). PTZ grubu sıçanlardan TEA uygulamasından önce ve TEA uygulaması sonrasında 45. dakikada elde edilen örnek traseler şekil 4.17 de gösterilmiştir.



**Şekil 4.15** Kontrol grubunda normal solüsyon (yBOS), DL-AP5 ve DL-AP5+Mib (Mibefradil) varlığında elde edilen TEA-LTP cevapları. Her bir uyarı 0.1 Hz ve 0.2 ms süresinde uygulandı. EPSP amplitüdüleri normal solüsyonla oluşturulan TEA-LTP'ye göre DL-AP5 varlığında azaldı, DL-AP5+mibefradil varlığında ise bu azalmanın daha belirgin olduğu bulundu (n=5, her iki grup için).



**Şekil 4.16** PTZ grubunda normal solüsyon (yBOS), DL-AP5 ve DL-AP5+Mib (Mibefradil) varlığında elde edilen TEA-LTP cevapları. Her bir uyarı 0.1 Hz ve 0.2 ms süresinde uygulandı. EPSP amplitüdüleri normal solüsyonla oluşturulan TEA-LTP'ye göre DL-AP5 ve DL-AP5+mibefradil varlığında eşit derecede azaldı (n=5, her iki grup için).

**A****B**

**Şekil 4.17** Kronik PTZ uygulanan sıçanlardan elde edilen hipokampal dilimlerde CA1 bölgesi stratum radiatumdan elde edilen örnek LTP kaydı. A) TEA uygulamasından önce B) TEA uygulaması sonrası 45. dakikada elde edilen kayıt.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada T-tipi  $Ca^{2+}$  kanal aktivitesinin kronik PTZ uygulaması ile meydana getirilen epileptogenez sürecinde CA1 nöronlarında artış gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, T-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının hipokampal CA1 bölgesinde eksitabilitede ve kısa dönem plastisitede rolü olmadığı ve bu kanalların esas olarak uzun dönem plastisitede rol oynadıkları sonucuna varılmıştır. Yine bu çalışmada kronik PTZ uygulamasının eksitabiliteyi değiştirmedığı, kısa dönem plastisitede değişikliğe yol açtığı ve bu sıçanların hipokampal CA1 bölgesinde çift-uyarı fasilitasyonunda artış meydana geldiği bulunmuştur.

Bu çalışmanın amaçlarından birisi de absans epilepsi ve epileptogenez arasındaki ilişkiler hakkında bilgi edinilmesidir. Daha önceki çalışmalarda GAERS'de ve WAG/Rij sıçanlarda kindling oluşumunun geciktiği gösterilmiştir (2, 16). Bu bulgular absans epilepside kindling oluşumuna karşı bir direnç geliştiğini düşündürmektedir fakat bu direnç gelişiminin mekanizması henüz anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, direnç mekanizmasının anlaşılabilmesine katkıda bulunmak amacıyla GAERS'lerin hipokampal CA1 nöronlarında eksitabilite ve kısa dönem plastisite *in vivo* olarak incelenmiştir. Bunun sonucunda, GAERS'de CA1 nöronlarında eksitabilitede değişiklik olmadığı fakat çift-uyarı cevaplarında fasilitasyonun ortadan kalktığı gözlenmiştir. Kronik PTZ uygulaması ile oluşturulan kindling çalışmalarında gūnaşırı veya haftada 3 gün 30 mg/kg PTZ uygulamasının, her gün PTZ uygulamasına göre kindling oluşumunu daha hızlı bir şekilde gerçekleştirdiği gösterilmiştir (33). Bu çalışmada da, gūnaşırı 25 mg/kg PTZ uygulaması ile, her gün PTZ uygulamasına göre kindling sürecinin daha hızlı geliştiği saptanmıştır. Elde edilen bu bulgu, sıçanlarda gūnlük PTZ uygulaması ile her gün absans nöbeti oluşturmanın kindling sürecini yavaşlattığını düşündürmektedir.

Kindling oluşumu bir epileptogenez sürecinde meydana gelir. Epileptogenez süreci elektriksel ve kimyasal olarak başlatılabilir. Bu süreç beyinde nöronal plastisitede kalıcı değişikliklerinin oluşmasını gerektirmektedir. Kindling oluştuğunda, başlangıçta epileptik olmayan beyin spontan olarak epileptik nöbetler oluşturacak şekilde değişikliğe uğramıştır.

Bu değişikliğe uğrayan bölgelerden en önemlilerinden biri hipokampüstür. Epileptogenez sürecinde hipokampüste meydana gelen kısa ve uzun dönem plastisite değişiklikleri hakkında literatürde henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca absans epilepsinin çoğu zaman talamokortikal devrelerin tutulumu ile sınırlı kaldığı düşünölmekte ve uzun dönemde diğer beyin bölgelerinde ve özellikle hipokampüste ne gibi değişikliklere yol açtığı hakkında çok az bilgi bulunmektedir.

GAERS'ler ile yapılan çalışmalarda, sıçanların amigdala kindling oluşumuna karşı direnç gösterdiğinin anlaşılması da absans epilepsinin yalnızca talamokortikal devreleri ilgilendiren sonuçları olmadığını düşöndürmüştür (16). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, WAG/Rij modelinde de amigdala kindling oluşumuna karşı direncin olduğu gösterilmiştir (2). Ayrıca düşük doz PTZ uygulaması ile sıçanlarda absans nöbeti oluşturulabildiğı gibi, kronik PTZ uygulaması ile de bir epileptogenez süreci başlatılmaktadır. Kronik PTZ uygulaması ile oluşturulan kindling deneylerinde gúnaşırı veya haftada 3 gün PTZ uygulamasının, her gün PTZ uygulamasına göre daha hızlı bir epileptogenez süreci oluşturduğu gözlenmiş ancak bunun sebebi anlaşılammıştır. Kimyasal kindling çalışmalarında genellikle haftada 3 gün veya gúnaşırı 35-37.5 mg/kg i.p. PTZ uygulaması yapılmaktadır. Bu doz, akut absans nöbeti oluşturmak için gerekli dozun (20-25 mg) biraz üzerindedir. Bu çalışmada, kronik olarak 25 mg/kg PTZ gúnaşırı olarak uygulandığında da sıçanların evre 5 kindling düzeyine ulaştığı gözlendi fakat bu süre literatürde 35-37.5 mg/kg PTZ uygulaması ile oluşturulan kindling süresinden oldukça uzundu ( $17 \pm 2$  güne karşı  $45 \pm 4$  gün). Günlük 25 mg/kg PTZ uygulamasında ise 2. ayın sonunda sıçanlar evre 2 kindling düzeyinin ötesine geçemediler. Bu bulgu literatürde günlük 30 mg/kg PTZ uygulaması ile alınan sonuçlarla uyumludur (33). Bu veriler, günlük olarak absans nöbeti oluşturmanın epileptogenez sürecini yavaşlattığı ve günlük düşük doz PTZ uygulamasının kindling gelişimine karşı kısmi bir direnç oluşturduğunu düşöndürmektedir. Bunun mekanizması bilinmemekle birlikte, genetik absans modellerinde (GAERS ve WAG/Rij), talamokortikal devrelerde sıklıkla tekrarlayan diken-dalga deşarjlarının diğer beyin

bölgelerinde ve hipokampüste, genel bir inhibitör mekanizmayı devreye soktuğu düşünülmektedir (2). Günlük olarak uygulanan kronik düşük doz PTZ ile oluşturulan absans modelinde de aynı mekanizma geçerli olabilir. Diken-dalga deşarjları sırasında diğer beyin bölgelerinde aktivitenin azalması ve amnezi olması da bu düşüncüyü desteklemektedir. Vagal sinir stimülasyonu ile epileptik aktivitenin önlenbilmesinde de benzer bir mekanizmanın devreye girdiği düşünülebilir. Vagal sinir stimülasyonu ile elektriksel uyarının nucleus tractus solitarius aracılığı ile talamik nukleuslara iletilebildiği bildirilmiştir (8, 23).

Absans epilepside ve epileptogenezde hipokampüste meydana gelen değişikliklerin anlaşılabilmesi amacıyla CA1 bölgesinde kısa ve uzun dönem plastisite incelendi. GAERS'lerde, "input-output" eğrilerinde kontrollere göre farklılık bulunmaması bu sıçanlarda CA1 nöronlarında kontrollere göre eksitabilitede farklılık olmadığını göstermektedir. GAERS'den elde edilen çift-uyarı yanıtlarında ise, çift-uyarı aralığının artırılması ile fasilitasyonun ortaya çıkmadığı saptandı. Bu bulgu GAERS'de rekürren inhibitör internöronal aktivitenin daha etkin ve/veya uzun süreli olduğunu göstermektedir. GAERS'de kısa dönem plastisitede meydana gelen bu değişiklik kindling oluşumunun gecikmesine katkıda bulunan mekanizmalardan biri olabilir.

Kronik PTZ uygulaması da CA1 nöronlarında kısa dönem plastisitede değişikliğe yol açtı. Çift-uyarı cevaplarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fasilitasyonda artış olması, rekürren inhibitör internöronal aktivitenin azaldığını ve/veya nöronal presinaptik membranda  $Ca^{2+}$  girişinin arttığını düşündürmektedir. Kronik PTZ uygulanan sıçanlarda "input-output" ilişkisinde değişiklik olmaması, kronik PTZ uygulamasının nöronal eksitabilitede değişikliğe yol açmadığını göstermektedir. "Input-output" eğrilerinin karşılaştırılmasında PTZ grubunda PS amplitüdlerinin kontrole göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ancak, bu değişiklik günlük PTZ uygulaması ile kindling oluşumuna karşı gelişen kısmi direncin sonucu ortaya çıkmış olabilir. Tam kindling oluşturulmuş sıçanlarda CA1 bölgesindeki eksitabilite değişiklikleri bilinmemektedir.

Mibefradil kan beyin engelini geçemeyen bir moleküldür (52). Bu nedenle antiepileptik olarak kullanılmaya uygun değildir. Bununla birlikte, mibefradil düşük konsantrasyonda kullanıldığında selektif T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal blokörüdür (42) ve T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal aktivitesi hakkında bilgi elde etmek için en uygun ilaçtır. Bu nedenle mibefradilin hipokampal alan yanıtlarına etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak incelendi.

*In vivo* çalışmalarda mibefradil i.s.v olarak 25-50 µg doz aralığında uygulandı. 25 µg dozunda PS amplitüdlerinde etki görülmedi. 50 µg dozunda ise PS amplitüdlere geri dönüşsüz olarak bloke oldu ve 35 µg dozunda uygulandığında PS amplitüdlere %  $30 \pm 5$  oranında azaldı. Bu etki  $30 \pm 10$  dak. sonra tamamen ortadan kalktı. Doz aralığı belirlendikten sonra mibefradil 35 µg dozunda uygulanarak kısa dönem plastisiteye etkileri incelendi. Mibefradilin “input-output” ilişkisinde değişikliğe yol açmaması nöronal eksitabiliteyi etkilemediğini ve postsinaptik membranda etki göstermediğini düşündürmektedir. Mibefradilin PS amplitüdlerinde azalmaya yol açmış olması ise presinaptik bir etkiyi telkin etmektedir. Bu etki mibefradilin presinaptik N-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarını bloke ederek nörotransmitter salıverilmesini inhibe etmesine bağlı olabilir. Yüksek dozlarda mibefradilin N-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarını bloke ettiği bilinmektedir (30). Çift-uyarı yanıtlarında ise mibefradilin PS2/PS1 oranını artırması mibefradilin GABA’erjik internöronal aktiviteyi azalttığını düşündürmektedir. Bu azalma internöronlarda presinaptik N-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının bloke edilmesine bağlı olabilir.

Mibefradilin konsantrasyona bağlı etkilerinin incelendiği *in vitro* çalışmalarda *in vivo* çalışmalarda olduğu gibi mibefradil yüksek konsantrasyonlarda PS amplitüdlerini azalttı. 1 µM konsantrasyonunda ise PS amplitüdlerinde değişikliğe yol açmadı. Bu bulgu, mibefradilin 1 µM konsantrasyonda N-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarına etkisi olmadığını düşündürmektedir ve daha sonraki deneylerde T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının incelenmesi amacıyla bu konsantrasyon kullanılmıştır.

Daha sonraki çalışmalarda T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının kontrol ve kronik PTZ uygulanmış sıçanlarda kısa ve uzun dönem plastisitedeki rolleri incelendi. Kronik PTZ uygulanmış sıçanlarda epileptogenez sürecinde T-tipi

$\text{Ca}^{2+}$  kanal aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, mibefradil T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarına selektif olduğu bildirilen konsantrasyonda (1  $\mu\text{M}$ ) kullanıldı (35, 46).

Mibefradil, kontrol ve kronik PTZ uygulanmış sıçanlarda “input-output” ilişkisinde ve çift-uyarı cevaplarında değişikliğe yol açmadı. Bu bulgu T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının hipokampal CA1 bölgesi nöronlarında eksitabilite ve kısa dönem plastisitede rolü olmadığını göstermektedir.

T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının uzun dönem plastisitede rolü olduğu ise bilinmektedir (41). T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları LTP ve LTD (Long term depression) oluşumunda rol oynar (31, 49, 50). Bununla birlikte, hipokampal CA1 bölgesinde yüksek frekanslı uyarımlar ile LTP oluşumu NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna bağımlıdır ve L-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının da hücre içine  $\text{Ca}^{2+}$  girişinde rol oynadığı düşünülmektedir (38). TEA ile LTP oluşturulduğunda ise T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının bloke edilmesinin LTP amplitüdünü azalttığı gösterilmiştir (42). TEA-LTP’nin, NMDA reseptörlerinin ve T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının DL-AP5 (50  $\mu\text{M}$ ) ve  $\text{Ni}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) ile bloke edilmesi ile tamamen ortadan kaldırılabildiği bulunmuştur (35). Bu çalışmada kontrol hayvanlarda yapılan deneylerde benzer bulgular DL-AP5 (50  $\mu\text{M}$ ) ve mibefradil (1  $\mu\text{M}$ ) uygulaması ile elde edildi. Kronik PTZ uygulanmış sıçanlarda ise TEA-LTP, DL-AP5 ve mibefradil ile bloke edilmedi. TEA-LTP oluşumunun NMDA reseptörleri ve T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları aracılığı ile hücre içine  $\text{Ca}^{2+}$  girişine bağılı olduğu düşünüldüğünde, kronik PTZ uygulanmış sıçanlardaki bu değişikliğin NMDA reseptör kanalından veya T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarından  $\text{Ca}^{2+}$  girişinin artmasına bağılı olabileceği söylenebilir. Bununla birlikte, DL-AP5’in  $\text{IC}_{50}$  değerinin (<0,9  $\mu\text{M}$ ) deneylerde kullanılan 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonuna göre çok düşük olması (25, 36), DL-AP5 varlığında yapılan deneylerde hücre içine  $\text{Ca}^{2+}$  girişinin NMDA reseptör aracılı olması olasılığını büyük ölçüde azaltmaktadır. Kronik PTZ uygulanmış sıçanlarda TEA-LTP’nin, DL-AP5 (50  $\mu\text{M}$ ) ve mibefradil (1  $\mu\text{M}$ ) ile bloke edilememesi T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal aktivitesindeki artışa bağılı olmasının daha muhtemel olduğunu telkin etmektedir. Mibefradilin  $\text{IC}_{50}$  değeri (250 nM-1.5  $\mu\text{M}$ ) deneylerde kullanılan konsantrasyona eşittir (28). Daha sonra yapılan deneylerde DL-AP5 (50  $\mu\text{M}$ )

ve 10  $\mu\text{M}$  mibefradil varlığında TEA-LTP oluşumunun tamamen bloke edilmesi de T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal aktivitesindeki artışı desteklemektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışma göstermiştir ki, beyinde T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal aktivitesinde artma, epileptogenezde genel bir mekanizma olabilir. T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları kindling oluşumunu engellemede ve epileptogenezi önlemede farmakolojik bir hedef olabilir. Bunun için kan-beyin engelini geçebilen, beyindeki T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarına selektif ve daha potent T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal blokörlerinin geliştirilmesi yeni tedavi yaklaşımlarına yol açabilir. Bu amaçla, T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal alttiplerine spesifik ilaçlar da geliştirilmelidir. T-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanal alttiplerini kodlayan genlerin “knock-out” edildiği hayvan modellerinde epileptogenezin incelenmesi de bu kanalların epilepsi gelişim sürecindeki rolleri hakkında daha fazla bilgi sağlayacaktır. Ayrıca absans epilepsi modellerinde kindling gelişimine karşı oluşan direncin mekanizmalarının ortaya çıkarılması, beyindeki inhibitör aktivitenin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yol açacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Acharya, J.N., 2002. Recent advances in epileptogenesis. *Current Science*, 82, 679-685.
2. Aker, R.G., Yananli, H.R., Gurbanova, A.A., Ozkaynakci, A.E., Ates, N., van Luijtelaar, G., Onat, F.Y., 2006. Amygdala kindling in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Epilepsia* 47, 33-40.
3. Aniksztejn, L., Ben Ari, Y., 1991. Novel form of long-term potentiation produced by a K<sup>+</sup> channel blocker in the hippocampus. *Nature* 349, 67-69.
4. Annegers, J.F., 2001. The epidemiology of epilepsy. The treatment of epilepsy: principles and practice. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 131-138.
5. Avanzini, G., Franceschetti, S., 2003. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol.* 2, 33-42.
6. Becker, A., Grecksch, G., Brosz, M., 1995. Antiepileptic drugs--their effects on kindled seizures and kindling-induced learning impairments. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 52, 453-459.
7. Benatar, M.G., 1999. Calcium channelopathies. *QJM.* 92, 133-141.
8. Binder, D.K., 2004. Recent Advances in Epilepsy Research. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 240-241.
9. Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

10. Chang, B.S., Lowenstein, D.H., 2003. Epilepsy. *N.Engl.J.Med.* 349, 1257-1266.
11. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30, 389-399.
12. D'Ambrosio, R., 2004. The role of glial membrane ion channels in seizures and epileptogenesis. *Pharmacol.Ther.* 103, 95-108.
13. Danover, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., Marescaux, C., 1998. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog. Neurobiol.* 55, 27-57.
14. Doherty, J., Dingledine, R., 2002. The roles of metabotropic glutamate receptors in seizures and epilepsy. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* 1, 251-260.
15. Eichenbaum, H., 1999. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav.Brain Res.* 103, 123-133.
16. Eskazan, E., Onat, F.Y., Aker, R., Oner, G., 2002. Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia* 43, 1115-1119.
17. Futatsugi, Y., Riviello, J.J., 1998. Mechanisms of generalized absence epilepsy. *Brain & Development* 20, 75-79.

18. Goddard, G.V., 1967. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214, 1020-1021.
19. Hammond, C. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2003. Second Edition. Elsevier Limited, 453-456.
20. Huang, L., Keyser, B.M., Tagmose, T.M., Hansen, J.B., Taylor, J.T., Zhuang ve diğ., M., 2004. NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphtyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 309, 193-199.
21. Keefe, J., Nadel, L., 1978. The Hippocampus as a Cognitive Map. Chapter 3, 103-109.
22. Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M.J., Kim, S.S., McEnery, M.W., Shin, H.S., 2001. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking  $\alpha(1G)$  T-type  $Ca^{2+}$  channels. *Neuron* 31, 35-45.
23. Krout, K.E., Loewy, A.D., 2000. Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J.Comp Neurol.* 428, 475-494.
24. Kubie, J.L., Muller, R.U., Bostock, E., 1990. Spatial firing properties of hippocampal theta cells. *J.Neurosci.* 10, 1110-1123.

- 25.** Lombardi, G., Dianzani, C., Miglio, G., Canonico, P.L., Fantozzi, R., 2001. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. *Br.J.Pharmacol.* 133, 936-944.
- 26.** Majkowski, J., 2005. Antiepileptic Drugs. Combination therapy and interactions. Cambridge University Press, 120-123.
- 27.** Marescaux, C., Vergnes, M., Depaulis, A., 1992. Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg-a review. *J.Neural Transm.Suppl* 35, 37-69.
- 28.** McDonough, S.I., Bean, B.P., 1998. Mibefradil inhibition of T-type calcium channels in cerebellar purkinje neurons. *Mol.Pharmacol.* 54, 1080-1087.
- 29.** McIntyre, D.C., Poulter, M.O., Gilby, K., 2002. Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res.* 50, 79-92.
- 30.** Molderings, G.J., Likungu, J., Gothert, M., 2000. N-Type calcium channels control sympathetic neurotransmission in human heart atrium. *Circulation* 101, 403-407.
- 31.** Nicoll, R.A., Oliet, S.H., Malenka, R.C., 1998. NMDA receptor-dependent and metabotropic glutamate receptor-dependent forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neurobiol.Learn.Mem.* 70, 62-72.

32. Nunez, A., Garcia-Austt, E., Buno, W., 1990. Slow intrinsic spikes recorded in vivo in rat CA1-CA3 hippocampal pyramidal neurons. *Exp.Neurol.* 109, 294-299.
33. Ono, J., Walson, P.D., 1991. Effects of injection interval on pentylenetetrazol (PTZ) kindled seizures in rats. *Med.J.Osaka Univ* 40, 45-49.
34. Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press Ltd. Third Edition. Figure 24.
35. Perez-Reyes, E., 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.* 83, 117-161.
36. Pittaluga, A., Raiteri, M., 1992. N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptors regulating hippocampal norepinephrine release. III. Changes in the NMDA receptor complex induced by their functional cooperation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 263, 327-333.
37. Racine, R.J., Steingart, M., McIntyre, D.C., 1999. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies. *Epilepsy Res.* 35, 183-195.
38. Revest, P., Longstaff, A., 1998. *Molecular Neuroscience.* BIOS Scientific Publishers Limited, 154-156.
39. Sarkisian, M.R., 2001. Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders. *Epilepsy Behav.* 2, 201-216.

40. Smith, C.U.M. Elements of molecular neurobiology. 2002. Third Edition. John Wiley Sons Limited, 501-503.
41. Song, D., Xie, X., Wang, Z., Berger, T.W., 2001. Differential effect of TEA on long-term synaptic modification in hippocampal CA1 and dentate gyrus in vitro. *Neurobiol.Learn.Mem.* 76, 375-387.
42. Song, D., Wang, Z., Berger, T.W., 2002. Contribution of T-type VDCC to TEA-induced long-term synaptic modification in hippocampal CA1 and dentate gyrus. *Hippocampus* 12, 689-697.
43. Steriade, M., McCormick, D.A., Sejnowski, T.J., 1993. Thalamocortical Oscillations in the Sleeping and Aroused Brain. *Science* 262, 679-685.
44. Su, H., Sochivko, D., Becker, A., Chen, J., Jiang, Y., Yaari, Y., Beck, H., 2002. Upregulation of a T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J.Neurosci.* 22, 3645-3655.
45. Sutherland, R.J., Weisend, M.P., Mumby, D., Astur, R.S., Hanlon, F.M., Koerner, A. Ve diğ., 2001. Retrograde amnesia after hippocampal damage: recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus* 11, 27-42.
46. Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Perez-Reyes, E., Bayliss, D.A., 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J.Neurosci.* 19, 1895-1911.

47. Thomas, E., Grisar, T., 2000. Increased synchrony with increase of a low-threshold calcium conductance in a model thalamic network: a phase-shift mechanism. *Neural Comput.* 12, 1553-1571.
48. Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, L., Ve dič., 1982. Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci.Lett.* 33, 97-101.
49. Wang, Y., Rowan, M.J., Anwyl, R., 1997. Induction of LTD in the dentate gyrus in vitro is NMDA receptor independent, but dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx via low-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores. *J.Neurophysiol.* 77, 812-825.
50. Wasling, P., Hanse, E., Gustafsson, B., 2002. Long-term depression in the developing hippocampus: low induction threshold and synapse nonspecificity. *J.Neurosci.* 22, 1823-1830.
51. Wong, M., Wozniak, D.F., Yamada, K.A., 2003. An animal model of generalized nonconvulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects. *Exp.Neurol.* 183, 87-99.
52. Wu, S., Zhang, M., Vest, P.A., Bhattacharjee, A., Liu, L., Li, M., 2000. A mibefradil metabolite is a potent intracellular blocker of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in pancreatic beta-cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 292, 939-943.