

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

GENETİK ABSANS EPİLEPSİLİ SIÇANLARDA *KİNDLİNG*
SÜRECİNDE TALAMOKORTİKAL DÖNGÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

NIHAN ÇARÇAK

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜL BAKTIR

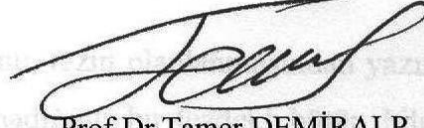
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.





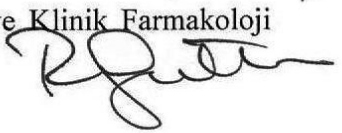
19 / 10 / 2010



Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Müdür

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Farmakoloji
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
 Anabilim Dalı : Farmakoloji
 Tez Sahibi : Nihan ÇARÇAK
 Tez Başlığı : Genetik Absans Epilepsili Sıçanlarda Kindling Sürecinde Talamokortikal Döngünün Araştırılması
 Sınav Yeri : İ.Ü Eczacılık Fakültesi
 Sınav Tarihi : 24 / 06 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)	İmzası
1. Prof. Dr. Gül BAKTIR (İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Farmakoloji Abd)	
2. Prof. Dr. Esat EŞKAZAN (İstanbul Bilim Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji Abd)	
3. Prof. Dr. Filiz ONAT (Marmara Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Abd)	
4. Prof. Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN (İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Farmakoloji Abd)	
5. Doç. Dr. Rezzan GÜLHAN (Marmara Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Abd)	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nihan ÇARÇAK

İTHAF

Annem Nurhan Güzin ÇARÇAK
&
Babam Zafer ÇARÇAK'a ithafen...

.....Zuhûra geldi bütün şiddet ile üstünde
Hücûm ederken üç def'a hamle ile günde.
Bayılma nevbet-i sar'a, tevehhümâta dalar.
Tabipler, hocalar, evliyâlar ,ırsalar.
Bu ızdıraba olan yoktu çâre-cuy-ı hâlas,
Ne edviye, ne etibbâ, ne nüshalar, ne havas.

.....

Neyzen Teyfik
Azab-ı Mukaddes'ten

TEŞEKKÜR

Bu tez yalnızca bilgisayar başında geçirilen uzun saatlerden ibaret değildir, aslında İstanbul, Marmara, Louis Pasteur (Fransa) ve son olarak Melbourne Üniversitesinde (Avustralya) yapmış olduğum çalışmaların, kilometre taşıdır. 5 yıl boyunca peşinden koştuğum soruların cevaplarına bir adım daha yaklaştığım bu tez sürecinde birçok kişiye teşekkür borçluyum.

Değerli Danışman Hocam *Prof. Dr. Gül BAKTIR*'a tez çalışmalarım boyunca vermiş olduğu bilimsel ve manevi destek için teşekkür ederim.

Değerli Danışman Hocam *Prof. Dr. Filiz ONAT*'a teşekkür ederim. Daha yüksek lisans eğitiminin ilk yıllarında bana söylediği şu cümle hiç aklımdan çıkmadı ve bana daima yol gösterdi “*Sen yeter ki ufku hayal et ben sana ufukları getireceğim*”. Doktora tez çalışmalarımın en zorlu dönemleri dahil her aşamasında bilimsel desteğinin yanısıra vermiş olduğu moral ve güven için, gerek bilimsel gerekse kişisel gelişimime sağladığı çok değerli katkılar için *Prof. ONAT*'a özel bir teşekkür borçluyum.

Melbourne Üniversitesi Tıp Fakültesinin Değerli Öğretim Üyesi *Prof. Dr. Terence J O'BRIEN* Avustralya'daki araştırma laboratuvarına beni davet ederek bu özgün çalışmanın hayata geçmesini sağladı. *Prof. O'BRIEN*'e bilimsel gelişimime sağladığı unutulmaz katkılar için, bambaşka bir kıtada inanılmaz bir yaşam deneyimine vesile olduğu ve en önemlisi deneyler sırasında heyecanımı paylaştığı için büyük bir teşekkür borçluyum.

Değerli Hocam *Prof. Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN*'a eğitimim boyunca desteğini ve ilgisini hissettirdiği, ihtiyacım olduğunda kapısını daima açık bulduğum için teşekkür borçluyum.

Değerli Hocam *Prof. Dr. Osman ÖZDEMİR*'e değerli fikirleriyle ve yönlendiriciliği ile varlığını daima hissettirdiği ve bana daima doğruyu işaret ettiği için teşekkür borçluyum.

Değerli çalışma arkadaşlarım *Yrd. Doç. Dr. Alper OKYAR, Yrd. Doç. Dr. Gökçe TOPAL TANYILMAZ, Yrd. Doç. Dr. İlkay ALP YILDIRIM, Yrd. Doç. Dr. Selçuk TAKIR, Araş. Gör. Dr. Deniz KALELİ DURMAN, Araş. Gör. Dr. Zeliha PALA KARA*'ya dostlukları ve bana her konuda destek oldukları için teşekkür borçluyum.

Son olarak sevgilerini daima yüreğimde hissettiğim *Değerli Annem, Babam ve Kardeşime* sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından Yurt-Dışı Araştırma Bursu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. Amaç.....	3
1.2. Çalışmanın Klinik Önemi	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epilepsi	4
2.2. Temporal Lob Epilepsisi.....	5
2.2.1. Mesial Temporal Lob Epilepsisinde Patofizyoloji.....	6
2.2.2. Deneysel MTLE Hayvan Modelleri.....	7
2.2.3. Deneysel MTLE Modeli olarak <i>Kindling</i>	8
2.2.4. Elektiksel <i>Kindling</i>	9
2.3. Çocukluk Çağı Absans Epilepsisi	11
2.3.1. Absans Epilepsisinde Patofizyoloji.....	12
2.3.2. Absans Epilepsisinde Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri	16
2.3.3. Deneysel Absans Epilepsi Modeli olarak GAERS	17
2.4. Talamokortikal Döngünün Organizasyonu	19
2.5. Talamokortikal Döngünün Limbik Epilepsi ile İlişkisi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Hayvanlar.....	24
3.2. Deney protokolü ve Deney grupları.....	24
3.3. Stereotaksik Cerrahi.....	25

3.4. <i>Kindling</i>	26
3.5. <i>In-vivo</i> Elektrofizyolojik Kayıt	26
3.5.1. Anestezi ve cerrahi.....	26
3.5.1.1. Dorsal Penil Ven Katerizasyonu	26
3.5.1.2. Trakeatomi	27
3.5.1.3. Kranial Cerrahi.....	28
3.5.2. Elektrofizyolojik Tek Hücre Kayıtları	30
3.5.3. Ötenazi ve Transkardial Perfüzyon.....	32
3.5.4. Histoloji.....	33
3.5.5. Data Analizi	33
3.5.5.1. Elektrofizyolojik kayıtların analizi	33
3.5.5.2. Hücre morfolojisinin analizi	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. Ekstraselüler Tek Hücre İnteriktal Ateşleme Özellikleri.....	36
4.1.1. Kontrol TRN Hücrelerinin İnteriktal Ateşleme Özellikleri	36
4.1.2. <i>Kindling</i> TRN Hücrelerinin İnteriktal Ateşleme Özellikleri.....	37
4.1.3. GAERS’lerde DDD Sırasındaki İktal TRN Aktivitesi	37
4.1.4. Kontrol VB Talamus Hücrelerinin İnteriktal Ateşleme Özellikleri.....	45
4.1.5. <i>Kindling</i> VB Talamus Hücrelerinin İnteriktal Ateşleme Özellikleri	45
4.2. <i>Kindling</i> Nöbeti Sırasındaki Hücreyel Aktivite	53
4.2.1. <i>Kindling</i> nöbeti sırasında TRN Hücrelerinde Meydana Gelen Ateşleme Değişiklikleri.....	53
4.2.2. <i>Kindling</i> nöbeti sırasında VB Talamus Hücrelerinde Meydana Gelen Ateşleme Değişiklikleri.....	55
4.3. Jukstaselüler olarak işaretlenen TRN ve VB Talamus Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri	57
5. TARTIŞMA	59
5.1. GAERS’lerde <i>Kindling</i> Direnci	59
5.2. Talamokortikal Döngü ve <i>Kindling</i> Direnci Arasındaki İlişki	60
5.3. Metodolojik Hususlar.....	63
5.4. Yapılması planlanan çalışmalar	64
5.5. Sonuç.....	64
KAYNAKLAR	66

ETİK KURUL KARARI	79
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4-1: TRN Nöronlarının İnteriktal Ateşleme Özellikleri	38
Tablo 4-2: VB Talamus Nöronlarının İnteriktal Ateşleme Özellikleri.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Yetişkin Sıçanda <i>Kindling</i> Süreci.	10
Şekil 2-2: Çocukluk Çağı Absans Epilepsisinde DDD Aktivitesi.	12
Şekil 2-3: Talamo-kortikal Döngü.	15
Şekil 3-2: Dorsal Penil Ven Kateterizasyonu (A-B-C) ve Trakeatomi (D-E).	27
Şekil 3-3: <i>Kindling</i> ve <i>in-vivo</i> elektrofizyolojik kayıt işlemleri için yerleştirilen elektrotların şematik olarak gösterilişi.	29
Şekil 3-4: Elektrofizyolojik kayıtlarda kullanılan cam mikroelektrodun temel fiziksel özellikleri.	31
Şekil 3-5: Jukstaselüler yöntemi ile nöronların işaretlenmesi.	32
Şekil 3-6: Nöron Ateşleme Özelliklerinin Analizi.	35
Şekil 4-1: NEK-kontrol ve GAERS-kontrol gruplarında TRN hücrelerine ait AP süreleri.	39
Şekil 4-2: Kontrol NEK (A) ve GAERS (B) gruplarından kaydedilen TRN hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri.	40
Şekil 4-3: <i>Kindling</i> uyarıları sonrasında NEK- <i>kindling</i> (A) ve GAERS- <i>kindling</i> (B) gruplarından kaydedilen TRN hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri.	41
Şekil 4-4: TRN nöronlarının interiktal ateşleme özellikleri.	42
Şekil 4-5: NEK- <i>kindling</i> ve GAERS- <i>kindling</i> gruplarında TRN hücrelerine ait AP süreleri.	43
Şekil 4-6: DDD sırasında TRN nöronlarının ekstraselüler olarak kaydedilen aktivitesi.	44
Şekil 4-7: NEK-kontrol ve GAERS-kontrol gruplarında VB thalamus hücrelerine ait AP süreleri.	48
Şekil 4-8: Kontrol NEK (A) ve GAERS (B) gruplarından kaydedilen VB thalamus hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri.	49
Şekil 4-9: <i>Kindling</i> uyarıları sonrasında NEK- <i>kindling</i> (A) ve GAERS- <i>kindling</i> (B) gruplarından kaydedilen VB thalamus hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri.	50
Şekil 4-10: VB Talamus Nöronlarının İnteriktal Ateşleme Özellikleri.	51
Şekil 4-11: NEK- <i>kindling</i> ve GAERS- <i>kindling</i> gruplarında VB thalamus hücrelerine ait AP süreleri.	52
Şekil 4-12: <i>Kindling</i> nöbeti sırasında TRN hücrelerinde meydana gelen ateşleme değişiklikleri.	54

Şekil 4-13: <i>Kindling</i> nöbeti sırasında VB talamus hücrelerinde meydana gelen ateşleme değişiklikleri.....	56
Şekil 4-14: Jukstaselüler işaretleme yöntemi ile boyanan TRN (A-B) ve VB talamus (D-E) hücreleri.....	58
Şekil 5-1: Talamokortikal ve Limbik Döngüler Arasındaki Etkileşimin Şematik Olarak Gösterilişi.	65

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AD: Art-deşarj

AP: Aksiyon potansiyeli

CAE: Çocukluk çağı absans epilepsisi

DDD: Diken-ve-yavaş dalga deşarj

EEG: Elektroensefalografi

GABA: γ -Aminobütirik asit

GAERS: Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg

IPSP: İnhibe edici post sinaptik potansiyel

MTLE: Mesial temporal lob epilepsisi

NMDA: *N*-metil-D-aspartat

NEK: Non-epileptik kontrol

WAG-Rij: Wistar Albino Glaxo- Rijswijk/Hollanda

PFA: Paraformaldehit

TLE: Temporal lob epilepsisi

TRN: Talamik retiküler çekirdek

TC: Talamokortikal

VB: Ventrobazal

ÖZET

Çarçak, N. (2010). Genetik Absans Epilepsili Sıçanlarda *Kindling* Sürecinde Talamokortikal Döngünün Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Strazburg Genetik Absans Epilepsili Sıçanlar (GAERS) amigdala *kindling* gelişimine karşı direnç göstermektedirler. Korteks ve talamus arasındaki karşılıklı ritmik osilatör ateşlemeler absans nöbetlerinin ortaya çıkışında önemli bir rol oynar. *Kindling* direncinin ritmik senkronize epileptiform talamokortikal ateşlemelerden sorumlu talamik retiküler çekirdek (TRN) hücrelerinde meydana gelen ateşleme değişiklikleri nedeniyle olduğu hipotezinden hareketle bu çalışma planlanmıştır. Amigdalalarına bipolar uyarı elektrodu yerleştirilen hayvanlara art-deşarj eşik şiddetinde günde iki defa 15 gün süre ile toplam 30 uyarı verilmiştir. Hücre dışı tek hücre kayıtları *in-vivo* koşullarda TRN ve ventrobazal (VB) talamustan nörolept anestezisi altında 5. evre seviyesine ulaşan non-epileptik kontrol (NEK) ve NEK'ler ile eşit sayıda uyarı alan GAERS'lerden alınmıştır. TRN hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri analiz edilen özellikler bakımından uyarı almayan GAERS-kontrol (n=7 hücre, 4 hayvan) ve NEK-kontrol (n=10, 5) grupları arasında benzer bulunmuştur. Interiktal olarak NEK-*kindling* (n=10, 6) grubunda TRN ateşlemesi düşük frekanslı epileptiform bir özellik gösterirken bu durum GAERS'lerde gözlenmemiştir. VB talamokortikal hücreler NEK-*kindling* (n=19, 8) grubunda GAERS-*kindling* (n=11, 6) grubuna göre interiktal olarak düşük frekanslı ve burst şeklinde ateşlemeler göstermişlerdir. *Kindling* nöbeti sırasında NEK grubunda TRN ateşlemesi nöbetin başlangıcında ritmik senkronize *burst* şeklindeyken GAERS'lerde ise ya nöbetin sonunda eşlik etmiş ya da hiç eşlik etmemiştir. *Kindling* uyarılarının talamusun epileptiform bir şekilde ateşlemesine neden olması senkronize talamokortikal ateşlemelerin limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonunda mekanistik bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: GAERS, Kindling, Elektrofizyoloji, Talamik retiküler çekirdek, Talamokortikal döngü.

ABSTRACT

Carcak, N. (2010). Investigation of Thalamocortical Circuitry During *Kindling* process in rats with Genetic Absence Epilepsy. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacology. Thesis of Doctorate. İstanbul.

Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) are resistant to the progression of amygdaloid kindling. Rhythmic reciprocal oscillatory firings between the cortex and the thalamus play a critical role in absence seizures. We hypothesized that, the resistance to kindling involves acquired alterations to firing properties in the thalamic reticular nucleus (TRN) that predisposes to rhythmic synchronized epileptiform thalamocortical firing. Rats were implanted with a stimulating electrode in amygdala and stimulated at afterdischarge threshold twice a day. Total number of stimulation was 30. Extracellular single neuron recordings were performed in-vivo in the TRN and ventrobasal (VB) thalamus under neurolept anesthesia in non-epileptic control (NEC) rats reached stage 5 and in GAERS subjected same number of stimulations as NECs. The interictal firing patterns recorded in TRN were similar between GAERS-control (n=7 cells, 4 rats) which not received kindling stimulation and NEC-control (n=10, 5) in all parameters examined. In NEC-kindling (n=10, 6) the TRN firing had evolved to bursting (epileptiform), low frequency pattern, but not seen in GAERS-kindling (n=18, 5) stimulated as kindled NEC. The thalamocortical cells in VB in NEC-kindling (n=19, 8) interictally had lower firing frequency and more burst firing compared to GAERS-kindling (n=11, 6). During kindling seizure in NECs the firing in TRN neurons was affected early in the seizure, with rhythmic synchronized burst firing. However, in GAERS TRN engaged only late in the seizure or not at all. Kindling induces the thalamus to fire in epileptiform pattern, which may play a mechanistic role in the synchronized thalamocortical firing underlying secondary generalization of the limbic seizures.

Keywords: GAERS, Kindling, Electrophysiology, Thalamic reticular nucleus, Thalamocortical circuitry

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsandaki tipik jeneralize absans nöbetlerinin klinik ve farmakolojik özelliklerini taşıyan *Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS)* suşu sıçanlar Wistar sıçanlardan inbred üretilmiş olup, absans epilepsisinin en çok kullanılan ve en geçerli hayvan modellerinden birisidir (Marescaux 1992; Danober ve ark. 1998). GAERS’lerde ventrobazal (VB) talamus, talamik retiküler çekirdek (TRN) (Gloor ve Fariello 1988; Lui ve ark. 1991; Avanzini ve ark. 1992; Blumenfeld ve McCormick, 2000) ve son yıllarda gösterildiği üzere primer somatosensoryel korteksi (Meeren ve ark. 2002) içine alan talamokortikal döngüdeki artmış senkronizasyon (Manning ve ark. 2003) ve γ -Aminobütirik asit (GABA) aracılı inhibisyon ile korteksin derin tabakalarında artmış *N*-metil-D-aspart (NMDA) aracılı eksitasyon (Pumain ve ark. 1992) ya da II. ve III. tabakalardaki azalmış GABAerjik inhibisyon (Luhmann ve ark. 1995) sonucu artan kortikal uyarılabilirliğe bağlı olarak elektroensefalogramda (EEG), absans nöbeti ile ilişkili jeneralize, senkronize ve bilateral diken-ve-yavaş dalga deşarjlarının (DDD) ortaya çıkmasına neden olur (Crunelli ve Leresche 2002).

Temporal lob epilepsi modeli olan *kindling*, amigdala, hipokampus (McIntyre ve ark.1982; Brandt ve ark. 2004), olfaktör bölgeler ve diğer belli yapılara (Cavazos ve Sutula 1990; Inoue ve ark. 1992) günlük tekrarlayan elektriksel uyarılar verilerek oluşturulmaktadır (Goddard 1967). Tekrarlayan uyarılar EEG’de progresif olarak yayılan, büyüyen art-deşarjları (AD) ve sonunda konvülsif motor yanıtları tetikler (McIntyre 2006). *Kindling* gelişimi için en önemli kriterlerden biri AD’nin tetiklenmesidir, AD olmaması olayın ilerlemeyeceğinin göstergesidir (Bragin ve ark. 2002). Peşpeşe verilen uyarılar elektrofizyolojik olarak AD’lerin büyümesine, yaygınlaşmasına ve interiktal diken deşarjların ortaya çıkmasına yol açarken, sonuçta *kindled* davranışsal nöbetlerin gelişmesine neden olur (Sharma ve ark. 2007). İktal limbik davranışsal belirtiler stereotipik gelişim izler. Bu davranışsal nöbetler sıçanlarda 5 döneme ayrılır (Racine, 1972). Başlangıçta çok tipik olan “dona kalma” davranışını (Evre 1), çiğneme ve kafa sallama hareketi izler (Evre 2). Bu davranışın uyarının sinaptik yollar boyunca uzak yapılara dağılmasının bir yansıması olduğu düşünülmektedir (Morimoto ve ark. 2004). *Kindling* modelinin olağan gelişme süreci fokal motor nöbetlerin (Evre 3) ve jeneralize motor nöbetlerin oluşmasıdır (Evre 4-5).

Üst üste birkaç kez 5. evre nöbet geçiren hayvan *kindled* olmuş kabul edilir. Bu etki kalıcıdır ve hayvan birkaç ay hatta birkaç yıl uyarılmadan bırakılsa bile, daha sonra yapılacak ilk elektriksel uyarı 5. evre nöbete yol açar (Pinel ve Rovner, 1978; Wada ve ark. 1974). *Kindling* modeli konvülsif nöbet ve epileptogenez mekanizmalarının aydınlatılması açısından en iyi bilinen deneysel modellerden biridir (McIntyre 2006). En önemli avantajı epileptogenez sürecinin kolaylıkla kontrol edilebilir ve değerlendirilebilir olmasıdır (Sutula ve Ockuly 2006).

İdiyopatik generalize absans epilepsisi ve parsiyel temporal lob epilepsisinin (TLE) aynı hastada birlikte görülmesi oldukça az rastlananan bir durumdur (Koutroumanidis ve ark. 1999; Nicholson ve ark. 2004). Bu iki nöbet tipinin birlikte nadir görülmesi durumunun modellenmesi amacıyla Eşkazan ve arkadaşlarının (2002) GAERS sıçanlarda *kindling* sürecini inceledikleri çalışmada, yetişkin GAERS sıçanların tekrarlayan elektriksel uyarılara rağmen jeneralize nöbetlerin görüldüğü 3., 4. ve 5. evre seviyelerine ulaşamadıkları, limbik nöbetin görüldüğü 2. evre seviyesinde kaldıkları gösterilmiştir. Buna neden olarak da, absans epilepsinin altında yatan mekanizmaların özellikle talamokortikal döngüdeki artmış senkronizasyon ve GABAerjik inhibisyonun limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonunu engelleyici yönde etki edebileceği sonucuna varılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda diğer bir deneysel absans epilepsi modeli olan *Wistar Albino Glaxo- Rijswijk/Hollanda (WAG-Rij)* suşu sıçanlarda da *kindling* direncinin görülmesi limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonuna karşı oluşan direncin sadece GAERS'lere özgü olmadığını, genetik absans epilepsisine bağlı bir durum olduğunu göstermiştir (Aker ve ark. 2006). Ayrıca GAERS ve WAG-Rij sıçanlarda DDD yoğunluğu ile amigdala *kindling* süreci arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiş, *kindling* uyarısının hemen sonrasında DDD süre ve sayısında artış gözlemlenmiştir (Onat ve ark. 2007). DDD'lerin henüz ortaya çıkmadığı 20 günlük GAERS yavrularındaki *kindling* gelişimi aynı yaştaki epileptik olmayan Wistar suşu sıçanlarla benzer gelişim izlemiş ve her iki gruptaki hayvanların 5. evre nöbet seviyesine ulaştıkları gözlenmiştir (Çarçak ve ark. 2008) Bütün bu veriler, GAERS'lerde absans nöbeti ile ilişkili DDD'lerin ortaya çıkışından sorumlu talamokortikal döngünün *kindling* nöbetinin sekonder jeneralizasyonuna karşı görülen dirençte rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

1.1. Amaç

Çalışmada talamokortikal döngünün *kindling* direnci üzerinde rol oynayabileceği hipotezinden hareketle, GAERS suşu sıçanlarda gözlenen direnç mekanizmasının elektrofizyolojik düzeyde araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla *kindling* uyarıları sonrasında *kindling* modeline direnç gösteren GAERS'ler ve direnç göstermeyen non-epileptik kontrol hayvanlarda (NEK) talamokortikal döngüdeki muhtemel farklılıklar elektrofizyolojik kayıt yöntemleri kullanılarak tek hücre düzeyinde *in-vivo* koşullarda incelenecektir.

1.2. Çalışmanın Klinik Önemi

Son yıllarda yapılan yapılan gerek insan gerekse hayvan çalışmalarında TLE'deki parsiyel limbik nöbetlerde talamusun rol oynadığı gösterilmiştir (Bertram 2007; 2008) TLE'de kompleks parsiyel nöbet sırasında oluşan bilinç kaybının talamokortikal döngü ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Englot ve Blumenfeld 2009). Özellikle TRN'nin talamik relay nöronlar üzerindeki ritmik inhibitör etki ile oluşturduğu jeneralize nonkonvülsif nöbetlerden başka limbik, özellikle de hipokampal nöbetlerde rol oynadığı, öğrenme, hafıza ve uzaysal kognisyon gibi ileri kognitif fonksiyonlarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Avanzini ve ark. 1992; Bertram ve ark. 1998; McAlonan ve Brown 2002). Bununla birlikte yapılan çalışmalar TRN'nin limbik nöbetlerin sekonder jeneralizasyonunda önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Yetişkin Wistar sıçanlarda hızlı hipokampal *kindling* sırasında TRN'nin eşzamanlı uyarılması sonucunda jeneralize limbik nöbet gelişiminin baskılandığı gösterilmiştir (Nanobashvili ve ark. 2003).

Bu çalışma *kindling* resistansının ritmik senkronize epileptiform talamokortikal ateşlemelerden sorumlu TRN hücrelerinde meydana gelen ateşleme değişiklikleri nedeniyle olduğu hipotezinden hareketle planlanarak, talamusun ve özellikle de TRN'nin amigdala *kindling* modelindeki rolünün araştırılması hedeflenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen bulgular TLE'deki limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonunda rol oynayan talamusu içine alan kompleks döngülerin incelenmesi yönünden dirençli epilepsiler için farklı bir antikonvülsan tedavi yaklaşımının geliştirilmesine zemin oluşturabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Günümüzden 150 yıl kadar önce henüz biyoelektrik kayıt yöntemlerinin bulunmadığı dönemde İngiliz hekim Hughlings-Jackson, yıllar sonra geliştirilecek karmaşık yöntemlerle doğrulanacak epilepsi nöbetinin tarifini “Beynin bir bölümünün gri maddesinin ani, aşırı ve hızlı deşarjıdır” şeklinde tanımlamıştır (Jackson 1873).

Epilepsi nöbetleri kortikal nöronların anormal deşarjı sonucunda oluşan anormal beyin fonksiyonuna ait semptomlardır (Dodson 2004). Epilepsi ise tekrarlayıcı (iki ve daha fazla), ani, tanımlanabilen bir olayla tetiklenmemiş nöbetlerle karakterize kronik bir durumdur (Aktekin ve Kayrak 2008). Diğer bir deyişle; epilepsi, santral sinir sisteminde, kortikal veya subkortikal bölgelerde yer alan nöron gruplarının ani, anormal ve aşırı derecede senkronize deşarjları sonucunda ortaya çıkan tekrarlayıcı nöbetlerle karakterize nörolojik bir rahatsızlıktır (Gastaut 1969; Fisher ve ark. 2005).

Epilepsi oldukça sık görülen bir hastalık olup, dünya genelinde 50 milyondan fazla insanı etkilemektedir (Leonardi ve Ustun, 2002) ve bu sayının çocuklarda ve yaşlı popülasyonda daha yüksek olduğu bilinmektedir (Forsgren ve ark. 2005). Sağlık sistemlerinin yetersiz olması, beyin enfeksiyonlarının daha yüksek risk taşıması ve genellikle epilepsi hastalarının tedavi görmemesi gibi nedenlerden ötürü, az gelişmiş ülkelerde epilepsi insidansı (100 bin kişiden > 100 kişi/yıl etkilenmekte) daha yüksek olmaktadır (Sander 2004).

Merkezi sinir sistemini etkileyen bütün faktörler epilepsi nedeni olabilmektedir. Birçok epileptik sendromun altında genetik faktörler rol oynamaktadır. İdiyopatik (% 65,5) nedenler, vasküler hastalıklar (% 10,9), konjenital malformasyonlar (% 10,9), travmalar (% 4,1), neoplastik bozukluklar (% 4,1), dejeneratif hastalıklar (% 3,5) ve santral sinir sistemi enfeksiyonları (% 2,5) epilepside gözlenen en yaygın etiyolojik faktörler arasındadır (Hauser ve ark. 1993). Genel popülasyonun % 1’ini etkileyen tüm epilepsi türleri içinde TLE yetişkinlerde en yaygın görülen tiptir (Engel 1996).

2.2. Temporal Lob Epilepsisi

TLE fokal epilepsinin bir türü olup, tek ya da çift taraflı temporal lobdan kaynaklanan tekrarlayan nöbetlerle karakterize nörolojik bir bozukluktur. Anatomik olarak lateral ve mesial temporal lob epilepsileri olarak ikiye ayrılırlar. Lateral temporal lob epilepsisi (LTLE) temporal lobun dış yüzeyindeki neokorteksten kaynaklanır. Mesial temporal lob epilepsisi (MTLE) ya da limbik epilepsi ise hipokampus, parahipokampal girus ve amigdala gibi temporal lobun iç yüzünde bulunan yapılardan kaynaklanır (Margerison ve Corsellis, 1966). Bu bölgelerin epilepsi nöbetlerindeki rolü, cerrahi olarak çıkarıldıklarında epileptik nöbetlerin kontrol edilebilmesi ile ortaya konmuş ve mesial temporal lob bölgesinin nöbet oluşturma açısından önemli bir bölge olduğu gösterilmiştir (Cavazos ve Cross, 2006). Bu bölgelerin nöbeti başlatmadaki potansiyel rolleri, deney hayvanlarında limbik yapılara eşik altı elektriksel uyarı verilerek oluşturulan *kindling* modelinde de desteklenmiştir (Goddard 1969). Bu bölgelerin epilepside rol oynadığını gösteren bu güçlü verilere rağmen, ne yazık ki tam olarak rollerinin ne olduğu ve nöbetin gerçekte nereden başladığı bilinmemektedir (Bertram 2009).

Tüm epilepsiler içinde TLE görülme sıklığı %30-35'ler civarında olup bununda 2/3'si mesial temporal lobdadır (Mathern ve ark. 1995). Nöbet basit parsiyel şeklinde başlayıp, sekonder jeneralize olabilir. TLE'de nöbetler, basit ve kompleks parsiyel nöbetler şeklinde olabilir. Basit parsiyel nöbetler duysal, somatoduysal, otonomik semptomlarla karakterize iken, kompleks parsiyel nöbetlerde bu semptomlara bilincin kaybolması eklenir. (Engel 1996). Basit ve kompleks parsiyel nöbetler kaynaklandığı odağın dışına çıkıp tüm beyne yayıldığında, başka bir deyişle nöbet sekonder jeneralize olduğunda davranışsal olarak jeneralize tonik-klonik nöbetler görülür (Mathern ve ark. 1995; Williamson 2004).

Tipik TLE nöbeti yükselen epigastrik his, korku, öfke, endişe ve ilk kez gördüğü kişi veya çevreyi önceden görmüş gibi olma (*deja vu*) gibi belirtiler içeren aura ile başlar. Bunu daha sonra donakalma, otomotizmalar (yutkunma, yalanma, çiğneme, giyinme veya soyunma gibi), tonik veya postural motor belirtiler ve kafa hareketleri izler. Nöbet amnezi (hasta otomotizmayı hatırlamaz) ve oriyantasyon kaybı ile son bulur (Kotagal 1991; Engel 1996).

Temporal lob nöbetlerinin nedenleri arasında hipokampal skleroz ilk sıradadır. Bunun dışında bu bölgenin benign ve malign tümörleri, viral parazitik veya diğer enfeksiyöz nedenler, serebrovasküler hastalıklar, kortikal gelişimsel malformasyonlar, travma ve diğer yaralanmalar nedenler arasında sayılabilir (Bertram 2009). TLE hastalarının birçoğunda beyne zarar verici bir etken, kafa travması, doğum sırasındaki travmalar, çocuklukta geçirilen febril nöbetler, menenjit, status epileptikus veya inme öyküsü bulunmaktadır. Bu ilk etkeni çoğunlukla süresi hastadan hastaya değişen (en az birkaç hafta, ama genellikle birkaç yıl) “*epileptogenez*” olarak adlandırılan latent (sessiz) dönem izler ve sonrasında spontan, tekrarlayıcı nöbetler oluşur. Epileptogenez sırasında hücrel ve moleküler düzeyde meydana gelen değişiklikler (nöron kaybı (akut, gecikmiş), nörogenez, gliosis, plastisite (aksonik, dendritik), inflamasyon, moleküler reorganizasyon, reseptör alt ünite sentezindeki değişimler vb.) ile beyin epileptik nöbet üretebilme bakımından daha hassas hale gelir (Pitkanen ve Sutula 2002). Bazı hastalarda ise belli bir beyin hasarı olmaksızın kısa süreli parsiyel başlangıçlı nöbetlerin tekrarlamasının kümülatif etkisinden dolayı temporal lob epilepsisi gelişmektedir (Cavazos ve ark. 1994).

TLE medikal tedaviye en az yanıt veren epilepsi tipidir. Kompleks parsiyel nöbetlerin tedavisi zor olup genellikle yüksek ilaç dozlarına çıkılması gerekir. Olgularının yaklaşık % 40’ı antiepileptik ilaçlara dirençli olup cerrahi olarak lezyonektomi, anterior temporal lobektomi ile birlikte amigdalohipokampektomi veya selektif amigdalohipokampektomi ile tedavi edilmektedirler. Cerrahi ameliyat sonrası bile hastaların bir kısmında tekrar nöbetler görülebilmektedir (Hennessy ve ark. 2001; Sharma ve ark. 2007).

2.2.1. Mesial Temporal Lob Epilepsisinde Patofizyoloji

MTLE hastalarından cerrahi operasyon sonrası alınan doku örnekleri üzerinden elde edilen verilere göre limbik epilepsilerde gösterilen nöropatolojik bulgular: 1) mesial hipokampal skleroz olarak bilinen hipokampal nöronal kayıp; 2) dentat girusta mossy liflerinin filizlenmesi ve reorganizasyonu; 3) hipokampal gliosis; 4) granül hücrelerinin ektopik bölgelere dispersiyonu ile tanımlanmıştır (Engel 1992; Houser ve ark. 1990; Cavazos ve Cross, 2006). Nöron kaybı daha çok hipokampus dentat girus hilusları ile CA1 bölgesinde görülmektedir (Bertram 2009). Mossy liflerinin yoğun sinaptik reorganizasyonu sonucunda dentat girusdaki granül hücrelerinin uyarılabilme

derecesi artmakta ve bunun sonucunda spontan motor nöbetler oluşmaktadır. Anormal olarak artan mossy lif filizleri granül hücrelerinin dendritleri ile sinaps yapmakta ve tekrarlayan eksitator döngüye yol açmaktadır (Lotman ve ark.1992). Ancak MTLE hastalarında nöronal kayıp, atrofi ve gliosis gibi değişikliklerin görüldüğü hipokampus dışında limbik bölgeler de bulunmaktadır. Bu bölgeler; amigdala, entorinal korteks, olfaktor korteks ve talamusun belirli çekirdeklerini içermektedir (Juhász ve ark. 1999; Hudson ve ark. 1993; Du ve ark. 1993; Bertram 2009). Talamusun mediodorsal çekirdeğinin farmakolojik olarak inaktive edilmesi ya da uyarılabilirliğinin değiştirilmesinin hipokampustaki nöbet aktivitesi üzerinde etkisi olduğunu gösteren son çalışmalar tam olarak talamusun limbik nöbet aktivitesi üzerindeki rolünü açıklayamasa da limbik epilepside önemli rol oynadığını düşünmektedir (Bertram 2008).

2.2.2. Deneysel MTLE Hayvan Modelleri

Epilepsi hastalığının altında yatan mekanizmaların açıklanması, epileptogenez süreci üzerinde önleyici terapilerin geliştirilmesi, yeni antiepileptik ilaçların test edilmesi, farmakorezistansın altında yatan biyolojik mekanizmaların aydınlatılması, uygun tanısal ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi amacıyla deneysel epilepsi modelleri kullanılmaktadır (Sarkasian 2001; Löscher 2002).

MTLE deneysel modellerinde epileptogenez sürecinin araştırılmasında genellikle iki yöntem kullanılır. İlk yöntem, önce status epileptikus gelişmesi ve sonrasında spontan tekrarlayıcı nöbet oluşumuna neden olacak bir eksitotoksik tetikleyici etken ile akut olarak oluşturulur. Bu yöntemde en çok kainik asit ve pilokarpin MTLE modelleri kullanılmaktadır (Cavazos ve Cross, 2006). Kainik asit veya pilokarpin ile konvülsif status epileptikus geçiren sıçanlar MTLE hastalara benzer şekilde hipokampal piramidal nöronlarda hasar ve gliosis, mossy liflerinde filizlenme gibi nöropatolojik ve nörofizyolojik anomaliler göstermektedir (Sutula ve ark. 1992) Bu yöntem tetikleyici etkenin ardından nöbet gelişimine kadar günler süren latent dönemi açıklamakta ancak herhangi bir tetikleyici etken olmaksızın gelişen dirençli MTLE nöbetlerini açıklayamamaktadır. İkinci yöntem de kemokonvülsan ile veya elektriksel olarak limbik yolların uyarılması (örn: *kindling*) şeklinde tekrarlayan küçük tetikleyici etkenler ile kronik olarak oluşturulmaktadır. Genellikle MTLE kronik modelleri ilk tetikleyici ile status epileptikusun oluşturulduğu akut modellere (ilk yöntem) göre daha az hasar meydana getirmektedir. Bununla birlikte kronik model ile indüklenen

patofizyolojik ve nörofizyolojik değişikliklerin şiddeti akut modeldeki değişikliklere göre daha hafif olmaktadır. Kronik modeller dirençli MTLE olgularını daha iyi taklit etmelerine rağmen tetikleyici etken sonrasında oluşan spontan nöbetler kainik asit ve pilokarpin modellerine kıyasla daha az sıklıktadır.

2.2.3. Deneysel MTLE Modeli olarak *Kindling*

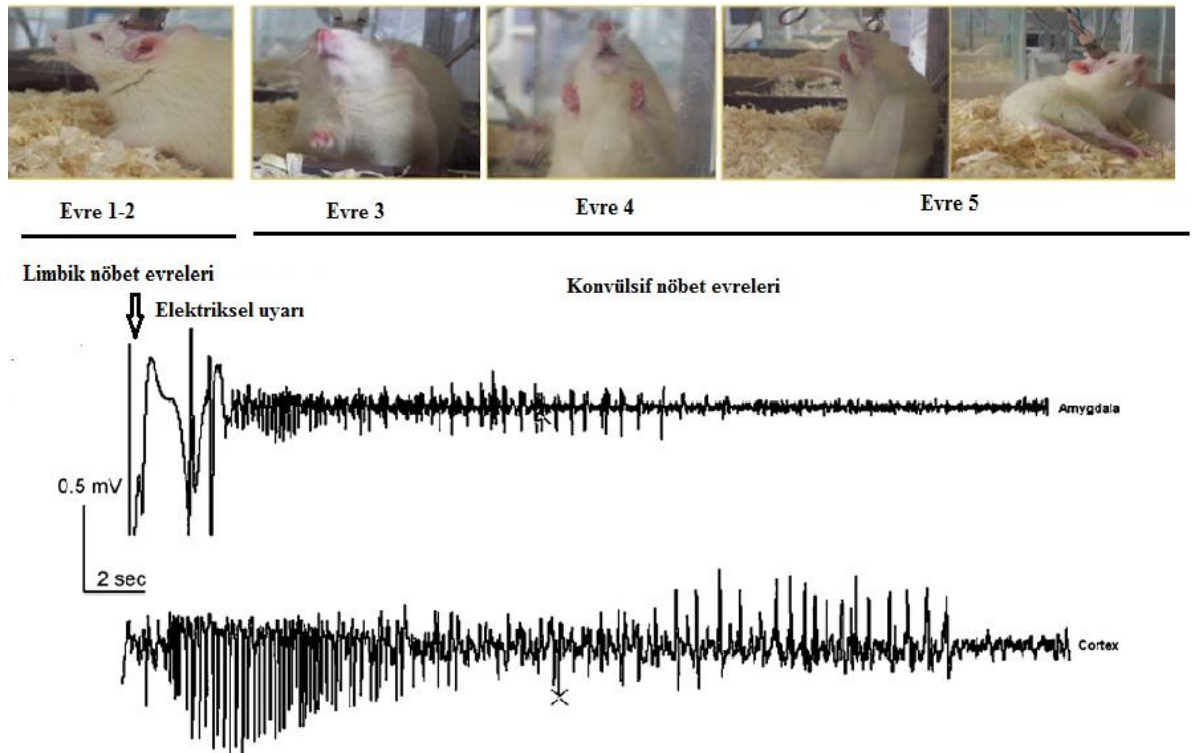
Nöral plastisite fenomeni olarak kullanılan düşük şiddette tekrarlayan elektriksel stimülasyonların konvülsif nöbetlere yol açtığı ve nöbet modeli olarak kullanılabilceği ilk kez Graham Goddard tarafından 1967’de tanımlanmış ve daha sonra *kindling* modeli olarak adlandırılmıştır (Goddard 1967, 1969; McIntyre ve ark. 2002). *Kindling* düşük şiddette tekrarlayan elektriksel ya da kimyasal uyarılar ile ortaya çıkan nöbetlerle karakterize, sekonder jeneralize MTLE modeli olarak kabul edilmektedir (McIntyre 2006). *Kindling*’de temel mekanizma, merkezi sinir sisteminin özellikle limbik alanlar gibi bazı subkortikal yapılarına AD oluşturacak eşik şiddetinde ya da eşik şiddetinin üzerinde elektriksel ya da kimyasal bir uyarının uygulanmasıyla, epileptogenez sürecinin başlatılarak (Coulter ve ark. 2002) EEG’de progresif olarak yayılan ve büyüyen AD’ler ve sonunda konvülsif motor yanıtların tetiklenmesidir (Goddard 1967). Bu süreç bütün limbik yapılarda tetiklenebilir, fakat amigdala ve peririnal, insular ve entorinal korteks gibi komşu korteks bölgelerinde daha çabuk indüklenbilir (McIntyre ve ark. 1999). Merkezi sinir sisteminin limbik yapılar gibi belli bazı bölgelerine tekrarlayan elektriksel ya da kimyasal uyarı verilmesi epileptogenez sürecini başlatmaktadır. Araştırmacılar için *kindling* epileptogenez sürecinin hayvanlarda çalışılması insandaki epileptik sendromlarının patofizyolosini anlamada birçok avantaj sağlamaktadır. *Kindling* modelinde araştırmacı, nöbetin ortaya çıkışını, gelişimini ve sürdürülmesini kontrol edebilmektedir. İndüklenen konvülsif patern kolayca tanımlanabilir ve tekrarlanabilir, ayrıca sıklık ve süre (elektrografik AD) bakımından kolaylıkla kuantifiye edilebilir. Bu nedenle *kindling* ideal bir epilepsi modeli olabilme özelliklerinin çoğunu ve en önemlilerini taşımaktadır (Moshe ve Ludvig, 1988). Elektriksel *kindling*’in başlangıçta uyarının özelliklerini kuantifiye etme, lokalizasyonu belirleme ve kronik epileptogenez gelişimini, nöbet yayılımını ve jeneralizasyonunu rahatlıkla izleyebilme gibi avantajları bulunduğundan kimyasal *kindling*’e göre daha yaygın kullanıma sahiptir (Bertram 2007). Kimyasal *kindling* pentilentetrazol, kokain, lidokain, penisilin, karbakol gibi maddelerin eşik altı dozlarının sistemik ya da

intraserebral yoldan gün aşırı ya da haftada birkaç kez verilmesiyle oluşturulmaktadır (McIntyre 2006). Her iki uyarı tipiyle tetiklenen deşarjlar nörotransmitterler, iyon kanalları, hücre içi haberci sistemler ve nörotropik faktörlere ait mRNA ve proteinlerinde değişiklikler gibi aktivasyon sonrası etkilere sahiptir (Morimoto ve ark. 2004).

2.2.4. Elektiksel *Kindling*

Elektiksel *kindling* süreci, amigdala, hipokampus ve entorinal korteks gibi belirli yapılara yerleştirilen derin uyarı elektrotları aracılığı ile ortalama 50-500 μ A şiddetinde, 1-2 sn süreli alternatif akımın uygulanmasıyla gerçekleştirilir. *Kindling* epileptogenez süreci hem yetişkin hem de gelişmekte olan yavru hayvanlarda gerçekleştirilebilir (Galanpoulou ve Moshe, 2006). Geleneksel *kindling* sürecinde sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez uyarı verilir. Yavru hayvanlarda iki elektiksel uyarı arasındaki süre 15-20 dakika olacak şekilde günde en fazla 20 uyarı olacak şekilde *kindling* süreci oluşturulabilir (Moshe 1981). Peşpeşe uygulanan uyarılar elektrografik olarak AD'lerin büyümesine, yaygınlaşmasına ve interiktal keskin deşarjların ortaya çıkmasına yol açarken, davranışsal olarak da *kindling* nöbetlerin gelişmesine neden olur (şekil 2.1). İktal limbik davranışsal belirtiler stereotipik gelişim izler. Bu davranışsal nöbetler sıçanlarda 5 döneme ayrılır (Racine 1972). Başlangıçta çok tipik olan “dona kalma” davranışını (Evre 0), yüzde seyirmeler, çiğneme ve kafa sallama (onaylama) hareketi izler (Evre 1 ve 2). Bu davranışın, uyarımın sinaptik yollar boyunca karşı hemisfer yapılarına dağılmasının bir yansıması olduğu düşünölmektedir. Daha sonra tekrarlayan uyarılarla nöbet yanıtlarının limbik yapıların dışına yayılması sonucunda önce fokal motor unilateral klonik nöbetler (Evre 3), sonra jeneralize olması ile birlikte bilateral klonik nöbetler (Evre 4) ve bunlara ilave olarak denge kaybı (Evre 5) görölmektedir. Üst üste birkaç kez 5. evre nöbet geçiren hayvan *kindled* olmuş kabul edilir. Bu etki kalıcıdır ve hayvan birkaç ay hatta birkaç yıl uyarılmadan bırakılsa bile, daha sonra yapılacak ilk elektiksel uyarı 5. evre nöbete yol açar (Pinel ve Rovner 1978; Wada ve ark. 1974). Beyinde elektiksel şebekenin yeniden yapılanması sürecinde, sinaptogenez, nörogenez ve epileptogenez basamaklarında uyarıların veriliş sıklığının rolü olduğu bilinmektedir (McIntyre 2006). Tekrarlayan uyarılar, EEG'de önce limbik yapılarda sonra limbik yapılara eşlik eden kortekste AD sürecinde ve bununla beraber EEG'ye eşlik eden davranışsal değişikliklere yol açar. Uyarıların hemen peşinden

ortaya çıkan davranışsal ve EEG'deki değişikliklerin ilerleyişi epileptogenezin bir göstergesidir. Bu modelde hedef, hayvanın 5. evre nöbetleri art arda geçirerek *kindled* olmasıdır. Bir kez gerçekleşen *kindled* nöbetin, hipokampus CA1 ve dentat girus nöronlarında apoptoz oranını iki katına çıkardığı gösterilmiş olmakla beraber, birikmiş nöronal kayıp, sekonder jeneralize 5. evre nöbetin birçok kez tekrarlaması ile tespit edilebilmiştir (Onat 2008). *Kindling* modelinde spontan nöbetlerin gelişmesi için çok sayıda *kindling* uyarısı gerekmektedir (*over-kindling* modeli) (Pinel and Rovner, 1978; Michalakis ve ark. 1998). Amigdala *kindling* yapılan sıçanlarda spontan nöbetlerin gözlenebilmesi için en az 90-100 tane 5. evre nöbeti geçirmesi gerektiği gösterilmiştir (Sayın ve ark. 2003).



Şekil 2-1: Yetişkin Sıçanda *Kindling* Süreci. Şekilde elektriksel uyarı sonrasında indüklenen *kindling* nöbetinin evreleri ile 5. evre nöbet sırasında amigdala ve korteksten kaydedilen EEG'de AD'ler görülmektedir.

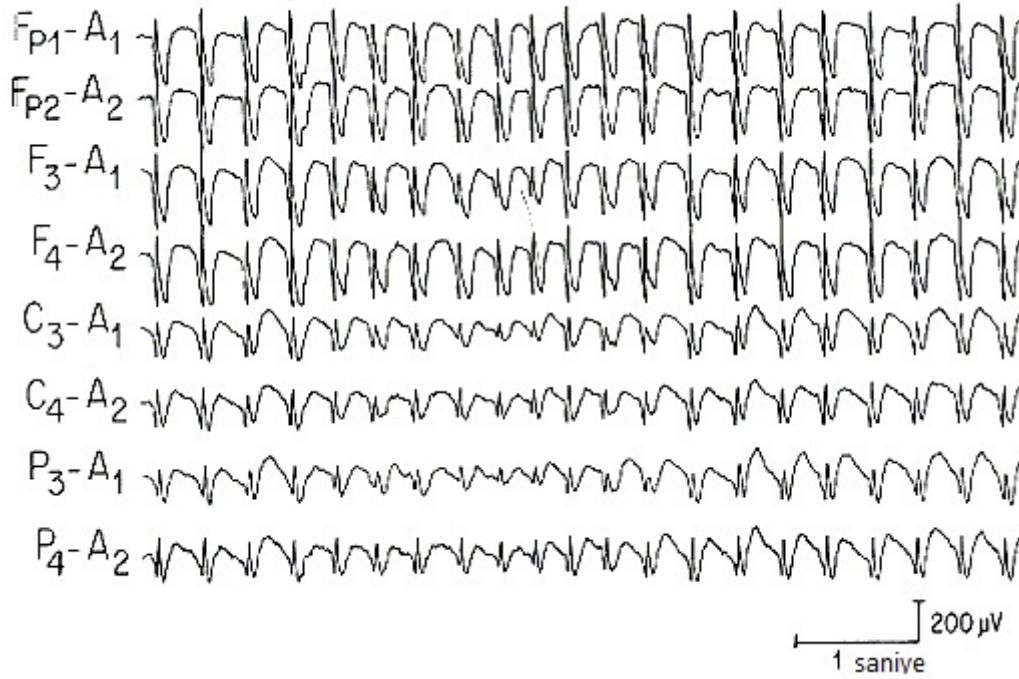
2.3. Çocukluk Çağı Absans Epilepsisi

Çocukluk çağı absans epilepsisi (CAE) idiyopatik, jeneralize, çok faktörlü genetik etiyojolojiye bağlı konvülsif olmayan bir epilepsi türüdür (Crunelli ve Leresche, 2002). 16 yaşın altındaki her 100.000 çocuktan 2-8'ini etkileyen ve kız çocuklarında daha sık görülen çocukluk çağı absans epilepsisi tipik absans nöbetleri ile seyrederek; nöbetler 3 ila 8 yaşları arasında (en çok 6-7 yaş) başlar, genellikle hergün pek çok kez (~200/gün), kısa süreli (1-45 sn), herhangi bir görsel ya da duysal uyaran olmaksızın gerçekleşir (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy 1989).

Nöbetler, fiziksel ve mental aktivitenin aniden durması ve saniyeler sonra kaldığı yerden devam etmesi şeklindedir. Bu sırada hastanın cevapsız ve hareketsiz olduğu, boş bir şekilde baktığı gözlenir. Sadece bilinç kaybı ile seyreden nöbetlere "basit absans", bilinç kaybı ile birlikte hafif klonik, atonik, tonik, ve otonom komponentlerin ve otomatizmaların olduğu nöbetlere "kompleks absans nöbetleri" denir. Tipik absans nöbetlerinin karakteristik iktal EEG bulgusu bilateral, genellikle düzenli ve simetrik, senkronize 3 (2.5-4) Hz frekansında DDD aktivitesidir (Panayiotopoulos, 1997). Deşarjlar preiktal herhangi bir anormali olmaksızın aniden başlar ve biter (Şekil 2.2). DDD'ler sadece CAE'ye özgün olmayıp epilepsiye sahip yetişkinlerin %10-15'inde sıklıkla diğer jeneralize epilepsilerle kombine bir şekilde görülmektedir.

Absans epilepsisinin multifaktöriyel genetik bir etiyojolojiye sahip olduğu hem insanlarda hem de yaygın kullanılan hayvan modellerinde gösterilmiştir. Çin toplumunda CAE hastalarında T-tipi kalsiyum kanal geni üzerinde (CACNA1H) gösterilen mutasyonlar (Chen ve ark. 2003) dışında CAE'nin patojenezinden sorumlu olabilecek genlerin keşfi halen devam etmektedir.

Tipik absans epilepsinin genellikle teşhisi ve tedavisi kolay olmakla birlikte valporik asit ve etosüksimide (tek ya da kombine) iyi cevap verirler. Diğer tip nöbetlerdekinin aksine vigabatrin ve tiagabin gibi GABA-mimetik ilaçlar absans nöbetleri kötüleştirmekte ve rodent modellerinde yapılan çalışmalardan da görüldüğü üzere DDD sayı ve süresini arttırmaktadır (Cocito ve Primavera, 1998; Depaulis ve van Lujtelaar 2006) Bu da absans epilepsisinin aslında bir inhibisyon mekanizma bozukluğu olabileceğini düşündürmektedir (Manning 2003).



Şekil 2-2: Çocukluk Çağı Absans Epilepsisinde DDD Aktivitesi. 11 yaşındaki kız çocuğundan alınan EEG örneğinde düzenli simetrik 3Hz frekansındaki tipik DDD'ler görülmektedir. F_{p1}, F_{p2}, F₃, F₄, C₃, C₄, P₃, P₄, A₁, A₂ işaretleri frontal (F), frontal premotor (F_p), sentral (C) ve parietal (P) loblardaki EEG elektrotlarının ve referans (A) elektrodunun yerleşimini göstermektedir.

2.3.1. Absans Epilepsisinde Patofizyoloji

Absans epilepsisinin patofizyolojisi hakkında elde edilen ilk bilgiler Jasper ve Droogleever-Fortuyn tarafından (1948) kedide orta hat ve intralaminar talamik çekirdeklerin elektriksel olarak uyarılması sonucunda kortikal EEG'de 3 Hz frekansı bilaterale senkronize DDD'lerin üretilmesine dayanmaktadır. Bundan sonraki 20 yıl boyunca senkronize bilaterale DDD'lerin ortaya çıkışından korteksin mi, talamusun mu yoksa her ikisinin birlikte mi sorumlu olduğu tartışma konusu olmuştur (Stefan ve ark. 2008). Bugün tipik DDD'lerin ortaya çıkışında talamokortikal döngünün özellikle talamusun VB çekirdeği ve TRN'nin rolü olduğu bilinmektedir (Avoli ve Gloor, 1982; Danober ve ark. 1998; Blumenfeld 2005) ancak tartışmalar korteksin mi yoksa talamusun mu daha önemli rol oynadığı yönünde halen devam etmektedir.

2002 yılında Meeren ve arkadaşları genetik absans epilepsi sıçan modellerinden biri olan WAG/Rij suşu sıçanlarda DDD'lerin ortaya çıkışında fonksiyonel ve anatomik olarak intakt bir talamokortikal döngünün gerekli olduğunu göstermişlerdir. Karşılıklı kortikotalamik bağlantıların araştırılması amacıyla non-lineer asosiyasyon sinyali analizi

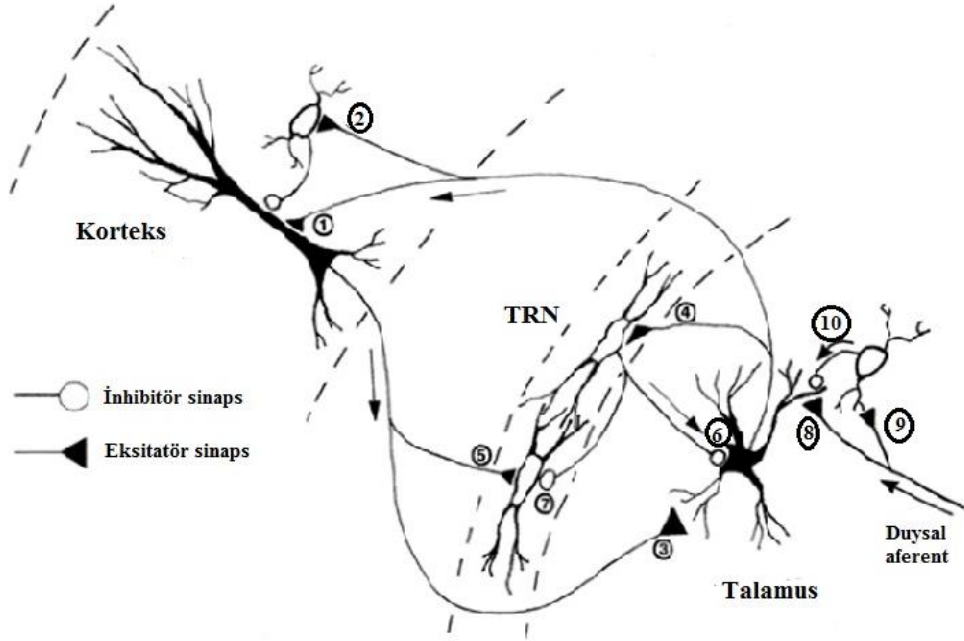
kullandıkları bu çalışmada somatosensoriyel korteksin perioral bölgesinde bir odağın bulunduğunu ve nöbetin bu odaktan diğer kortikal alanlara hızla yayıldığını göstermişlerdir. Nöbetin ilk 500 ms'nlik bölümünde korteksin talamusu yönettiği sonrasında ise ritmik deşarjın sürdürülmesi boyunca korteks ve talamusun birbirleri ile karşılıklı etkileşim ile birbirlerini yönettikleri bulunmuştur (Meeren ve ark. 2002). Absans nöbetlerinin kortikal kaynaklı olduğu bulgusunu destekler nitelikte, GAERS ve WAG/Rij sıçanlarda yapılan fonksiyonel çalışmalarda kortikal fokusa yapılan bilateral etosüksimid, lidokain ve fenitoin enjeksiyonlarının DDD'leri baskıladığı (Sitnikova ve van Luijtelaar, 2004; Manning ve ark. 2004; Gurbanova ve ark. 2006), yapılan moleküler çalışmalarda ise WAG/Rij sıçanlarda somatosensoriyel kortekste sodyum kanal ekspresyonunda artış (Klein ve ark. 2004), hiperpolarizasyon-kapılı HCN1 kanal ekspresyonunda azalma (Strauss ve ark. 2003) gösterilmiştir. Bütün bu verileri destekler şekilde GAERS'lerde yapılan hücre içi elektrofizyolojik kayıtlarda V. ve VI. tabaka somatosensoriyel kortikal nöronların DDD'leri başlattığı gösterilmiştir (Polack ve ark. 2007).

Absans nöbetlerinin altında yatan temel mekanizma talamokortikal döngüyü ve bu döngüden üretilen anormal osilatör ritmleri içerir (Şekil 2.3) (Destexhe ve ark. 1999) Talamo-kortikal döngü uyku içcikleri gibi normal osilatör ritmler üretmenin yanı sıra DDD gibi patolojik ritmler de üretir. Absans epilepsili hastalarda uyanıklık durumu ile DDD oluşumu arasında net bir ilişki bulunmaktadır ve bu durum klinikte nöbetlerin neden daha çok azalmış uyanıklık ya da uykudan uyanıklığa geçiş dönemlerinde ortaya çıktığını açıklamaktadır (Crunelli ve Leresche, 2002). Birçok çalışma normal uyku içciği ritmi ile jeneralize absans epilepsisinin patolojik ritmlerinin benzer mekanizmalar ve sinaptik döngüler üzerinden oluşabileceğini göstermektedir. Kedilerde oluşturulan felin jeneralize absans epilepsi modelinde kas içi penisilin enjeksiyonunu takiben oluşan DDD'lerin normal uyku içciklerinden geliştiği ve 7-14 Hz frekansındaki bu uyku içciklerinin 3-4 Hz frekansındaki DDD'lere dönüşüm sürecinin zamanla artarak ve davranışsal absans semptomlarıyla birlikte seyrettiği gösterilmiştir (Gloor ve Fariello, 1988). *In-vitro* kesit preparatlarında elektriksel uyarı ile oluşturulan talamik osilasyonların T-tipi kalsiyum kanallarını bloke eden anti-absans bir ilaç olan etosüksimid ile baskılandığı gösterilmiştir (Huegenard ve Prince, 1994). Bu çalışmaların devamı şeklinde korteks, talamus ve TRN arasındaki bağlantıların korunduğu *in-vitro* kesit preparatlarında DDD'lere çok benzer ritmlerin oluşturulduğu ve bu ritmlerin

selektif olarak absans epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçlarla baskılandığı gösterilmiştir (Coulter ve Lee, 1993). Yapılan çalışmalar uyarılabilirliği artmış kortikal nöronların, anatomik ve fonksiyonel olarak sağlam talamokortikal döngüde uyku içciklerinin DDD'lere dönüşümünü tetikleyebileceğini düşündürmektedir (Kostopoulos 2000). Uyku içciklerinin DDD'ye dönüşümünde, artmış kortikal uyarılabilirliğin, talamusta hızlı GABA_A reseptör aracılı inhibe edici post sinaptik potansiyellerin (IPSP) yavaş GABA_B reseptör aracılı IPSP'lere dönüşümüne neden olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Normal durumda kortikal input TRN nöronlarında GABA_A aracılı hızlı depolarizasyona neden olarak uyku içciklerinin oluşmasına neden olurken, kortekste artmış hiperpolarizasyon GABA_B reseptör aracılı IPSP oluşturarak DDD oluşumuna neden olur (Blumenfeld ve Coulter, 2008) DDD'lerin ortaya çıkışından sorumlu artmış kortikal uyarılabilirliğin ise korteksin derin tabakalarında artmış NMDA aracılı eksitasyona (Pumain ve ark. 1992) ya da II. ve III. tabakalarda azalmış GABA aracılı inhibisyona bağlı olabileceği düşünülmektedir (Luhman ve ark. 1995).

Talamus ve korteks arasında bilgi akışının kontrolünden sorumlu olarak yer alan TRN talamokortikal döngüdeki osilatör aktiviteden sorumludur (Avanzini ve ark. 1992). TRN hem kendi içindeki diğer nöronlara hem de talamik relay çekirdekteki nöronlara projeksiyon yapan (Şekil 2-3) GABAerjik nöronlardan meydana gelmektedir. Artmış GABAerjik aktivite uzun süreli hiperpolarizasyona neden olarak düşük eşikli Ca²⁺ kalsiyum akımlarının aktive olmasına ve absans nöbetlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Manning ve ark. 2003). Nöronal düşük voltaj kapılı (T-tipi) Ca²⁺ kanallarının istirahat membran potansiyeli yakınlarında Ca²⁺ dikenlerine neden olarak talamokortikal döngüdeki patlama tarzındaki (burst) anormal ateşlemeler ile normal osilatör karakterin meydana gelmesine neden oldukları gösterilmiştir (Huegenard ve Prince, 1992; Perez-Reyes, 2003). Yapılan birçok çalışma T-tipi Ca²⁺ akımlarının absans epilepsi ile ilişkisini göstermektedir. Öncelikle Ca²⁺ kanal mRNA ekspresyonlarının (Talley ve ark. 2000) ve T-tipi Ca²⁺ akımlarının (Tsakiridou ve ark. 1995) genetik absans epilepsili sıçanlarda özellikle TRN'de artış gösterdiği bulunmuştur. İkinci olarak absans epilepsi *knockout* fare modellerinde (*tottering*, *letarjik*, *stargazer*) absans epilepsisi ortaya çıkmadan önceki dönemde talamustaki T-tipi Ca²⁺ akımlarının yükseldiği gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2004). Buna ek olarak CAE'li hastalarda (Chen ve ark. 2003) ve genetik absans epilepsi sıçan modeli olan GAERS suşu sıçanlarda (Powell ve ark. 2009) T-tipi Ca²⁺ kanal geni (CACNA1H)

mutasyonu gösterilmiştir ve son olarak *knockout* fare modellerinde beyindeki T-tipi akımların yükseltilmesi bilateral, senkronize DDD oluşumuna neden olmuştur (Ernst ve ark. 2009).



Şekil 2-3: Talamo-kortikal Döngü. Primer sensoriyel relay çekirdekdeki talamik nöronlar serebral korteksin III, IV, V ve VI. tabakalarına projeksiyon yaparlar. Bu projeksiyonlar hem korteksteki piramidal nöronlarda (sinaps 1) hem de internöronlarda (sinaps 2) sonlanır. IV. tabakadaki kortikal nöronlar karşılıklı olarak yükselen afferentin geldiği talamus bölgesini innerve ederler (sinaps 3). Hem talamokortikal hem de kortikotalamik projeksiyonlar TRN'ye (sinaps 4 ve 5) akson koleteralleri yollarlar. TRN nöronları, talamusa (sinaps 6) ve kendi içindeki diğer nöronlara (sinaps 7) GABAerjik innervasyon sağlarlar. Talamusa gelen duysal uyarın hem talamik relay nöronların dendritleriyle (sinaps 8) hem de inhibitory internöronlar (sinaps 9) ile sinaps yapar. Internöronların dendritleri pre ve post sinaptik elemanlar gibi görev yaparlar ve talamik relay nöron dendritlerinin inhibitory innervasyonu (sinaps 10) yanında aksonal bağlantıları da sağlarlar (*Blumenfeld ve Coulter'den (2008) değiştirilerek alınmıştır*).

Absans epilepsisinin talamokortikal döngü içerisinde kaynaklandığı (Crunelli ve Leresche 2002; Blumenfeld 2005) bilinmekle birlikte altında yatan hüresel mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bozulmuş GABAerjik inhibisyon (von Krosigk ve ark. 1993; Huntsman ve ark. 1999) ve GABA_A reseptör alt ünite mutasyonları tipik absans epilepsili hastalarda tanımlanmıştır (Moljevic ve ark. 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ekstrasinaptik GABA_A reseptör bağımlı tonik inhibisyonun GABA taşıyıcısı GAT-1 aracılığı ile GABA uptake'inin artmasına paralel

olarak talamokortikal nöronlarda arttığı çeşitli genetik ve farmakolojik absans epilepsi modellerinde gösterilmiştir (Cope ve ark. 2009).

2.3.2. Absans Epilepsisinde Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri

Absans epilepsisinde kullanılan hayvan modellerinin geçerliği için gerekli ölçüt, insandaki durumu iyi yansıtmasıdır. Bunun için, EEG ve davranış özellikleri, gelişimsel ve farmakolojik profil ve patofizyolojik olarak benzer döngüleri içine alması bakımından insandaki absans epilepsisi ile benzerlik göstermelidir (Manning ve ark. 2003). Bugün kullanılan deneysel absans epilepsi modelleri EEG ve davranış özellikleri bakımından insandaki durumu taklit eder, tekrarlanabilir, tahmin edilebilir, niceliksel özellik taşıyıcı ve talamokortikal döngüleri içine alır. GABA_Aerjik ilaçlarla alevlenir ve GABA_B antagonistleri ile baskılanır (Gören ve Onat, 2007; Onat 2008). Bu hayvansal modeller başlıca 2 gruba ayrılarak incelenebilir: (1) Kimyasal bir ajanın uygulanmasıyla oluşturulan ve epileptik nöbetin semptomatik özelliklerini taşıyan *kimyasal modeller*, (2) Genetik olarak epilepsiye yatkın olmaları amacıyla selektif olarak üretilen, *genetik hayvan modelleri*.

Genetik yaklaşım, nöbetlerin spontan oluşması nedeniyle insanlardaki patofizyolojinin aydınlatılması bakımından sadece nöbeti semptomatik olarak taklit eden kimyasal modellere göre avantaj sağlar (Crunelli ve Leresche, 2002). Kimyasal olarak indüklenen modeller arasında, kedi-penisilin, düşük doz pentilentetrazol (PTZ), tetrahidroksiizoksazol piridin (THIP), γ -Hidroksi butirat (GHB) modelleri sayılabilir (Sarkasian 2001).

Genetik modeller tek gen mutasyon (monogenetik) fare modelleri ve poligenetik sıçan modelleri olmak üzere ikiye ayrılabilir. Tek gen mutasyon fare modellerinin birçoğunun voltaj kapılı Ca²⁺ kanallarını kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak oluşturulması bu kanalların hastalık patojenezi üzerinde oynadığı merkezi rolü göstermesi açısından önemlidir (Felix 2002). Ancak bu fare modellerinde gen mutasyonlarına bağlı olarak ataksi, hareket bozuklukları gibi diğer bazı nörolojik anormalitelerin görülmesi absans epilepsisinde davranışsal ve fizyolojik model olarak kullanımlarını kısıtlamaktadır (Manning ve ark. 2003).

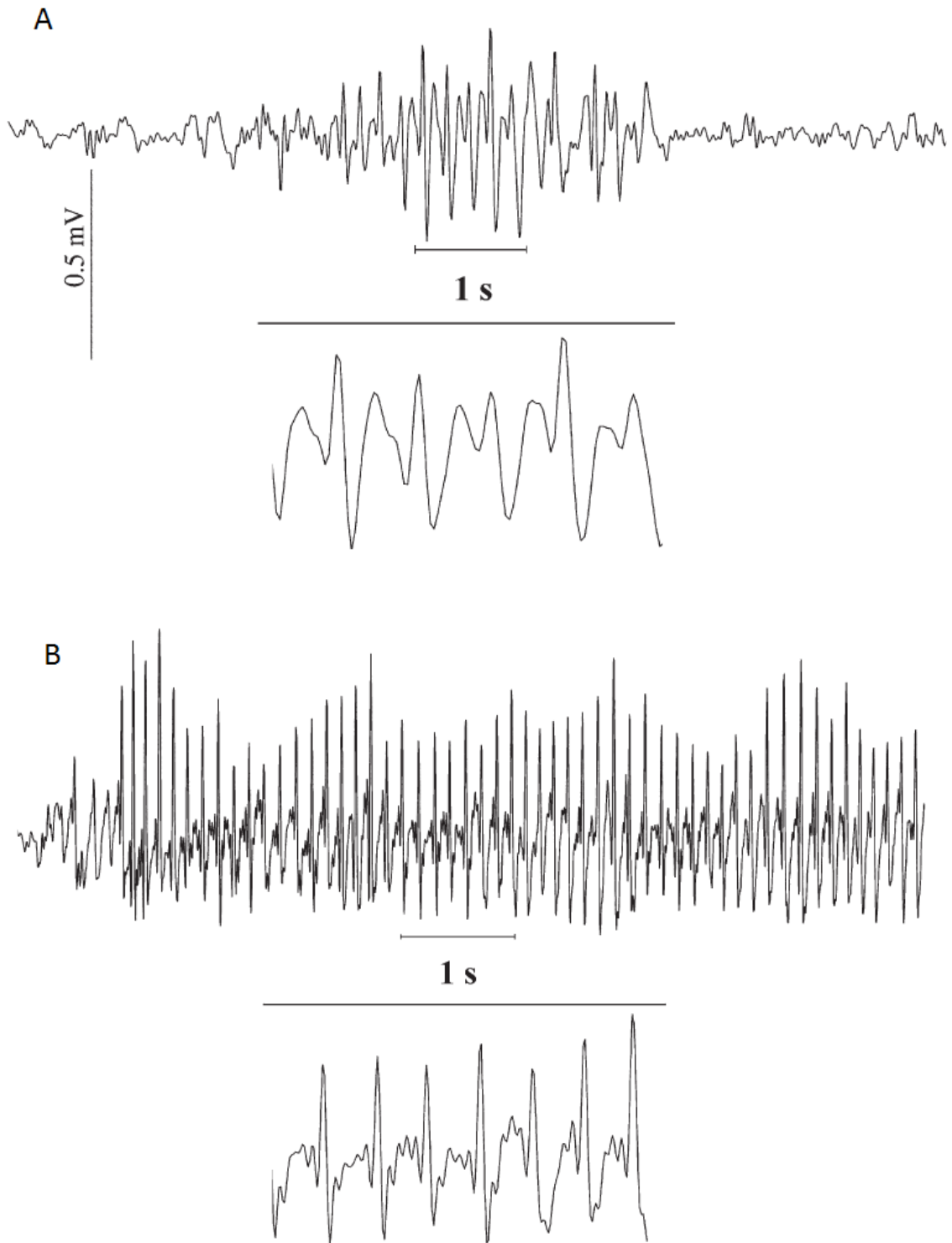
Absans epilepsi genetik sıçan modeli olarak en çok kullanılan deneysel modeller arasında, tekrarlanabilir ve spontan DDD'lerin normal bir fenotip üzerinde

gözlenebildiği modeller olan GAERS (Danober ve ark. 1998) ve WAG/Rij (Coenen ve van Luijtelaar 2003) suşu sıçanlar yer almaktadır.

2.3.3. Deneysel Absans Epilepsi Modeli olarak GAERS

1980'li yıllarda, Vergnes ve Marescaux yetiştirdikleri Wistar sıçanların yaklaşık %30'unda EEG'de spontan bilateral DDD olduğunu farkettiler. Bu deşarjlar sırasında sıçanların hareketsiz durduklarını ve bu epizotların insandaki jeneralize konvülsif olmayan absans epilepsi nöbetlerine benzediğini gözlemlediler. DDD'leri olan sıçanların çiftleştirilmesiyle birkaç nesil sonra tüm hayvanlarda DDD görüldüğü bir suş elde edildi ve bu suşa GAERS (*Genetic Absence Epileptic Rats from Strasbourg*) adı verildi (Vergnes ve ark. 1982). Benzer şekilde EEG'lerinde spontan DDD gözlenmeyen bir grup hayvan da kendi aralarında çiftleştirilerek GAERS'ler için bir kontrol suş oluşturuldu ve bu suşa da NEK (*non-epileptik kontrol*) adı verildi (Danober ve ark. 1998).

Yetişkin GAERS sıçanlarda EEG'de birdenbire ortaya çıkan, frekansı 7-11 Hz, amplitüdüleri 300 ile 1000 μ V arası değişen ortalama süresi 1-20 sn olan DDD kompleksleri 30 günlükten küçük yavrularda görülmemekte, 30. günden sonra ise saatte 1 veya 2 tane olacak şekilde seyrek, düşük frekanslı (4-5Hz) ve kısa süreli 1-3 sn olarak ortaya çıkmaktadır (Çarçak ve ark. 2008; Vergnes ve ark. 1986) (Şekil 2-4). DDD aktivitesi uyku-uyanıklık döneminde ortaya çıkar, dikkat gerektiren aktiviteler veya duyuşsal uyarılar ile ortadan kalkar. Nöbetler arasında herhangi bir nörolojik veya davranışsal bozukluk görülmez (Marescaux ve ark. 1992). Nöbetler, etosüksimid, valproik asit ve benzodiazepinler ile azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilirken, GABA transaminaz inhibitörleri, GABA_A ve GABA_B reseptör agonistleri ile şiddetlenir (Micheletti ve ark. 1985).



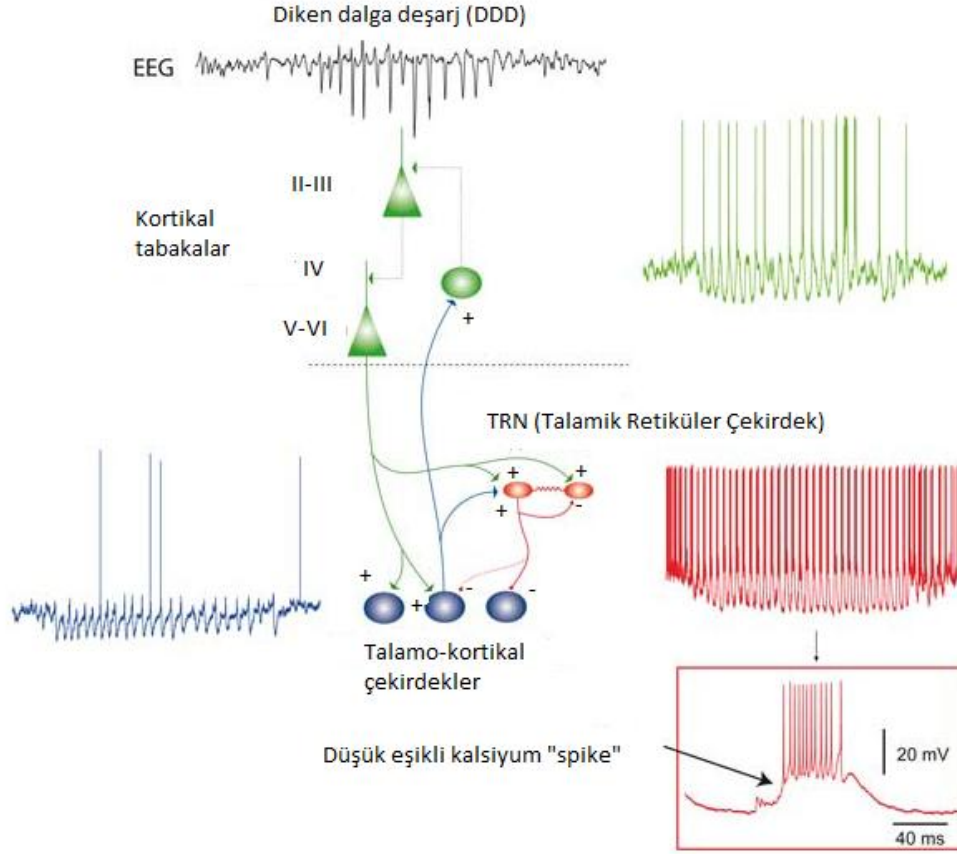
Şekil 2-4. GAERS'lerde EEG'de izlenen DDD aktivitesi

30 günlük (A) ve Yetişkin (B) GAERS'e ait EEG kaydında DDD patterni gözlenmektedir (Çarçak ve ark. 2008'den değiştirilerek alınmıştır).

2.4. Talamokortikal Döngünün Organizasyonu

GAERS'lerde izlenen DDD'lerin jenerasyonunda VB talamus, TRN ve son zamanlarda gösterildiği üzere primer somatosensoriyel korteksin perioral bölgesini içine alan talamo-kortiko-talamik döngüdeki GABAerjik inhibisyonda ve senkronizasyonda artışın rol oynadığı düşünülmektedir (Steriade ve Amzica 2003). Talamus serebral kortekse giden subkortikal inputların büyük bir kısmını oluşturur. Talamokortikal aksonların büyük bir kısmı kortikal tabaka IV ve III'de sonlanır (Alloway ve ark. 1993). Buna karşılık olarak tabaka V ve VI'daki piramidal nöronlar talamusu büyük ölçüde innerve ederler (Boussara ve ark. 1995) ve hem talamokortikal hem de kortikotalamik bağlantılar esas olarak glutamaterjiktir (Deschênes ve Hu 1990). Buna ek olarak bütün talamik relay çekirdekler primer GABA kaynağı olan TRN'den GABAerjik inhibitör projeksiyon alırlar (Pinault ve ark. 1995). TRN nöronları direkt olarak kortekse projeksiyon yapmazlar bunun yerine hem talamokortikal hem de kortikotalamik nöronlardan eksitator koleteraller alırlar (Boussara ve ark. 1995) (Şekil 2-3).

Elektrofizyolojik *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda talamokortikal nöronların uyku-uyanıklık döngüsünün çeşitli evrelerinde 2 farklı modda spontan aktivite gösterdikleri bulunmuştur (Steriade ve ark. 1993). Uyanıklık ve dikkat anında sodyum ve potasyuma bağımlı aksiyon potansiyellerinden oluşan hızlı tonik modda ateşleme görülür. Tonik mod sırasında talamustan gelen bilginin kortekse iletimi sağlanır. Tersine uyku sersemliği ve yavaş-dalga uyku sırasında talamokortikal nöronlar burst şeklinde ritmik düşük eşikli kalsiyum dikenlerinden oluşan ateşlemeler yaptıkları osilatör moda geçerler (McCormick 1992; Sherman 2001). Osilatör mod sırasında TRN'in *pacemaker* görevi yaptığı, kortikal senkronizasyon ile birlikte uyku sırasında ritmik deşarjların oluştuğu bilinmektedir (de Curtis ve Avanzini 1994). Absans epilepsideki esas problem tonik moddan osilatör moda geçiş sırasında meydana gelen anormaliden kaynaklanmaktadır. Bu patolojik geçiş neyin sebep olduğu henüz tam olarak bilinmemekle birlikte talamus ve TRN'deki Ca²⁺ kanallarının önemli rol oynadığı bilinmektedir (Avanzini ve ark. 1992).



Şekil 2-5. GAERS’lerde DDD sırasında kaydedilen hücre içi aktivite ve talamokortikal döngü. GAERS’lerde V. tabaka kortikal nöronlardan (yeşil), TRN (kırmızı) ve talamo-kortikal relay çekirdeklerden (mavi) DDD sırasında kaydedilen hücre içi aktivite. Küçük resimde düşük-eşikli kalsiyum “spike” üzerinde yüksek frekanslı burst şeklindeki aksiyon potansiyelleri görülmektedir.

Ca^{2+} bağımlı *burst* ateşlemeleri TRN nöronlarında meydana gelir ve bu ateşlemeler sonucunda talamik relay nöronlarda yüksek oranda $GABA_B$ aracılı IPSP oluşur. $GABA_B$ aktivitenin artması ile talamokortikal relay nöronlar hiperpolarize olur ve bunun sonucunda T-tipi Ca^{2+} kanalları de-inaktive olur. IPSP’nin depolarizasyon fazında düşük eşikli kalsiyum “spike” üzerinde *burst* şeklinde aksiyon potansiyelleri meydana gelir. Bu mekanizma ile TRN’den kaynaklanan osilatör aktivite talamusta ritmik *burst* ateşlemelerine ve devamında talamik nöronların projeksiyon yaptıkları kortekse yayılır (de Curtis ve Avanzini, 1994). GAERS’lerde yapılan çalışmalar selektif TRN lezyonlarının ya da bir inorganik Ca^{2+} blokörü olan Cd^{2+} ’un lokal enjeksiyonları sonucunda DDD aktivitesinin baskılandığı gösterilmiştir (Avanzini ve ark. 1993). GAERS’lerde yapılan *patch-clamp* kayıtlarda TRN’de genetik olarak düşük eşikli Ca^{2+} akımlarının kontrol hayvanlara göre artmış olduğu bulunmuştur. Bu

artış TRN üzerinden talamokortikal relay nöronlara GABA aracılı output'un yüksek olmasına neden olarak DDD oluşumununun patojenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Tsakiridou ve ark. 1995).

2.5. Talamokortikal Döngünün Limbik Epilepsi ile İlişkisi

Genel anlamda absans epilepsisinin GABA aracılı inhibitör aktivitenin yoğunluğuna bağlı olduğu, tersine limbik epilepsilerde görülen jeneralize ve fokal konvülsif nöbetlerin ise artmış bir eksitator aktiviteye bağlı olduğu söylenebilir (Manning ve ark. 2003). GAERS'lerde sistemik olarak uygulanan GABA_A veya GABA_B agonistlerinin doza bağımlı olarak DDD süresini arttırdıkları (Vergnes ve ark. 1984) ve artmış GABA aktivitesinin düşük eşikli Ca²⁺ akımlarının aktivasyonuna neden olan uzun süreli hiperpolarizasyona neden olarak DDD oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir (Manning ve ark. 2003). MTLE'de artmış glutamaterjik aktivitenin hipokampusta hücrel hipereksitabiliteye yol açarak epileptogenez sürecinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Deney hayvanlarında *kindling* nöbetini takiben granül hücrelerde uzun süreli NMDA reseptör aracılı sinaptik eksitabilitenin uzun süreli artışı gözlenmiştir (Mody 1999; Onat 2009). Bütün klinik, farmakolojik ve patofizyolojik veriler limbik epilepsiler ile absans epilepsi altında yatan mekanizmaların birbirinden oldukça farklı olduğunu işaret etmektedir. Öte yandan juvenil ya da CAE hastalarında temporal lob nöbetlerinin birlikte görülmesi çok nadirdir. Birliktelik idiyopatik jeneralize epilepsilerin sadece %1'inde görülmektedir (Koutroumanidis ve ark. 1999; Nicholson ve ark. 2004). Bu durum beraberinde iki farklı epilepsi tipinin: absans epilepsi ve MTLE'nin karşılıklı nasıl bir etkileşim içinde olduğu sorusunu gündeme getirmiştir. İki farklı epilepsi tipinin karşılıklı etkileşim mekanizmasının aydınlatılmasında şüphesiz ki bir deneysel hayvan modelinin kullanılması gereklidir. Amigdala *kindling* daha önce belirtildiği üzere fokal başlangıçlı sekonder jeneralize konvülsif nöbetlerle karakterize MTLE modelidir. GAERS ve WAG/Rij suşu sıçanlar ise absans epilepsisinin davranışsal, EEG, patofizyoloji ve farmakolojik açıdan insandaki durumu en iyi taklit eden genetik sıçan modelleridir. İki farklı nöbet tipinin tek bir modelde birleştirilmesi amacıyla absans epilepsisinin genetik modelleri olan GAERS ve WAG/Rij suşu sıçanlarda bir MTLE modeli olan fokal başlangıçlı sekonder jeneralize nöbetlerle karakterize *kindling* süreci incelenmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda WAG/Rij ve GAERS sıçanların elektriksel amigdala *kindling* modelinde

limbik fokal nöbetlerin sekonder jeneralizasyonuna karşı dirençli oldukları gösterilmiştir (Eşkazan ve ark. 2002, Onat ve ark. 2005; Aker ve ark. 2006). Bu çalışmalarda GAERS ve WAG/Rij sıçanlardaki DDD'lerin total süresinin *kindling* sürecinin hızıyla negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Onat ve ark. 2007). Aynı zamanda, elektriksel *kindling* uyarıları bu sıçanlardaki DDD'lerin sayı ve sürelerinde bir artışa neden olmuştur (Onat ve ark. 2007; Aker ve ark. 2006). Tüm bu veriler, EEG'de DDD'leri oluşturan talamokortikal aktivitenin gerek kortikolimbik gerekse talamolimbik bağlantılar aracılığıyla *kindling* sürecini engelleyebileceğini düşündürmektedir. Bunu destekler nitelikte GAERS'lerde amigdala *kindling* sürecinde 2. evre nöbet sırasında özellikle talamus ve limbik yapılarda kan akım hızının arttığı gösterilmiştir (Çarçak ve ark. 2009). Yavru GAERS'lerde yapılan amigdala *kindling* çalışmasında ise DDD'lerin henüz oluşmadığı 20 günlük yavru sıçanlarda *kindling* direncinin gözlenmediği, DDD maturasyonu ile birlikte yaşa bağlı olarak *kindling*'e dirençli hayvan yüzdesinin arttığı bulunmuştur (Çarçak ve ark. 2008). *Kindling* direncinin sadece amigdalaya özgü olup olmadığının araştırılması amacıyla GAERS ve WAG/Rij sıçanlarda hipokampal *kindling* süreci incelenmiş ve amigdala *kindling* modelindeki sürece benzer şekilde limbik nöbet jeneralizasyonuna karşı direnç gözlenmiştir (Akman ve ark. 2008). GAERS'lerin sadece elektriksel *kindling* modeli ile indüklenen nöbetlere değil amigdalaya uygulanan kainik asit ile oluşturulan jeneralize konvülsif nöbetlere de non-epileptik hayvanlara kıyasla daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Gurbanova et al. 2008). *Kindling* direnci ile DDD süresi arasındaki anlamlı negatif bir korelasyon bulunması DDD aktivitesinin farmakolojik olarak anti absans bir ilaçla silinmesinin *kindling* direnci üzerine etkisinin incelenmesine zemin hazırlamış ve yetişkin GAERS sıçanlara *kindling* süreci boyunca sistemik etosüksimid uygulanması ilacın EEG'de DDD'leri silmesine bağlı olarak GAERS'lerin evre 3-4 nöbet seviyesine kadar ilerleyebilmesine olanak sağlamış ve ilacın *kindling* direnci üzerinde parsiyel olarak bir etki gösterdiği bulunmuştur (Onat ve ark. 2009). Benzer şekilde etosüksimidin DDD deşarjların ortaya çıkışından sorumlu somatosensoryel kortekse lokal olarak uygulanması sonucunda *kindling* direncinde azalma gözlenmiştir (Gülhan ve ark. 2009). Son olarak GAERS'lerde 2. evre nöbet sırasında lokal serebral kan akım hızının özellikle TRN, VB ve somatosensoryel kortekste anlamlı artış gösterdiği bulunmuştur (Çarçak ve ark. 2009). Tüm bulgular GAERS'lerdeki *kindling* direncinde

DDD'lerin oluşumundan sorumlu talamokortikal döngünün ve bu döngü elemanlarının önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Tüm bu veriler ışığında amigdala *kindling* sürecinde GAERS'lerde limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonuna karşı oluşan dirençte absans epilepsisinin patofizyolojisinden primer olarak sorumlu talamokortikal döngünün anahtar rol oynadığı hipotezinden hareketle çalışmanın hedefleri şöyle özetlenebilir:

- i. TRN'nin amigdala *kindling* modelinde limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonunda rolünün araştırılması,
- ii. *Kindling* süreci sırasında talamokortikal döngünün *in-vivo* koşullarda elektrofizyolojik olarak tek bir sinir hücresi seviyesinde izlenmesi ve meydana gelen değişiklerin hem GAERS hem de NEK grubunda saptanması ve böylelikle GAERS'lerde görülen *kindling* direncinin mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunulması,
- iii. *Kindling* sürecinin talamus üzerindeki etkisinin elektrofizyolojik olarak ilk defa gösterilebilmesi, *kindling* nöbetine bağlı olarak talamus nöronlarında ateşleme değişikliklerinin kaydedilmesi,
- iv. GAERS'lerde 2. evre *kindling* nöbeti sırasında talamokortikal döngüyü içine alan yapılar da meydana gelen değişikliklerin *in-vivo* koşullarda nöron düzeyinde gösterilmesi
- v. NEK grubunda 5. evre nöbet sırasında talamokortikal döngüde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar

Çalışma kapsamında yetişkin, 280-350 g ağırlığında, erkek, NEK (n=30) ve GAERS (n=30) suşu 4-6 aylık sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, ısı kontrollü, 12 saat gündüz ve gece siklusu olan bir hayvan odasında, hayvan yemi ve içme suyu olan kafeslerde barındırılmıştır.

Çalışmada deney hayvanları üzerinde uygulanan tüm prosedürler Melbourne Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (18.09.2008 tarih ve 0706287.3 numaralı onay). Hayvanlara sırasıyla aşağıdaki prosedürler uygulanmıştır: 1. Stereotaksik cerrahi ve elektrot implantasyonu, 2. Amigdala *Kindling*, 3. Genel anestezi, penil ven kateterizasyonu ve trakeotomi, 4. Kraniotomi ve Duratomi 5. Nörolept anestezisi ve *in-vivo* kayıt, 6. Ötenazi ve transkardial perfüzyon.

3.2. Deney protokolü ve Deney grupları

Çalışmada *kindling* süreci sonrasında *kindling*'e direnç gösteren GAERS'ler ve direnç göstermeyen NEK hayvanlarda *in-vivo* elektrofizyolojik kayıt yöntemi kullanılarak talamokortikal döngü elemanlarında (TRN, VB) *kindling* sonrasındaki ve *kindling* nöbeti sırasındaki nöron düzeyindeki ateşleme farklılıkları *in-vivo* koşullarda incelenerek uyarı almayan kendi kontrollerine göre karşılaştırılarak incelenmiştir. Buna göre deney grupları şu şekilde oluşturulmuştur;

- I. NEK-kontrol (n=15),
- II. NEK-*kindling* (n=15),
- III. GAERS-kontrol (n=15),
- IV. GAERS-*kindling* (n=15).

Kontrol grubundaki hayvanlarda amigdalaya elektrot yerleştirilmiş ve sadece elektrot yerleşiminin doğrulanması amacıyla stereotaksik cerrahiden 1 hafta sonra AD eşik tespiti yapılmıştır. Uyarı sonrasında eşik tespiti yapılan hayvanlar kontrol olarak gruba dâhil edilerek bu hayvanlardan *in-vivo* elektrofizyolojik tek hücre kayıtları alınmıştır.

Kindling grubundaki hayvanlarda ise stereotaksik cerrahiden 1 hafta sonra sabah ve akşam AD eşik şiddetinde verilen elektriksel uyarılar ile önce *kindling* modeli

oluşturulmuştur. Her iki gruba da eşit sayıda, toplam 30 uyarı verilmiştir. Ardından *in-vivo* koşullarda elektrofizyolojik kayıtlar alınmıştır.

3.3. Stereotaksik Cerrahi

Tüm deney gruplarındaki hayvanlar elektrot implantasyonu için intraperitoneal (i.p.) ketamin (100 mg/kg; Ketazol®; Richterpharma ve ksilazin 10 mg/kg; Rompun®; Bayer) anestezisi ile uyutulmuştur. Anestezinin derinliği kornea ve pençe refleksleri ile doğrulandıktan sonra hayvanların kafaları kulak delikleri ve ön dişlerden, sabitleme çubukları aracılığı ile stereotaksi aletine yerleştirilerek (Stoelting Model 51600; Wood-Dale; ABD), kafa üzerindeki tüyler kesilmiş, kafa derisi antiseptik solüsyonla temizlenip longitudinal olarak açılarak kafatası ortaya konmuştur. Lambda ve bregma aynı düzlemde olacak şekilde hizalanarak, hayvanların tek taraflı olarak sol bazolateral amigdalasına, saptanan koordinatlar (bregma referans noktasından 2,6 mm arkaya, 4,8 mm yana ve kemik üzerinden 8,5 mm aşağıya) doğrultusunda bipolar (Plastic's One Inc., Roanoke, VA, ABD- MS303-1 çift sarmal) uyarı elektrodu Paxinos ve Watson'un (1998) sıçan beyin atlası kullanılarak yerleştirilmiştir. Kortikal kayıt için paslanmaz çelik vida üzerine lehimlenmiş altın kaplama erkek konnektörler (Farnell Components) kullanılmıştır. Kafatası üzerinde 1mm çapında delikler açılarak elektrotlar tek taraflı olarak sol frontal (2,0 mm öne, 3,5 mm yana) ve sol oksipital (6,0 mm arkaya, 4,0 mm yana) korteks üzerindeki noktalara ve bir referans elektrot serebellum üzerine vidalanarak yerleştirilmiştir. *In-vivo* kayıtların *kindling* sonrasında yapılabilmesi için sağ hemisfer ve bregma referans noktası açıkta kalacak şekilde kortikal kayıt elektrotları ve amigdalaya yerleştirilen uyarı elektrodu sol hemisfer üzerinde dental akrilik (Vertex™; Vertex-Dental, Hollanda) ile kafatasına sabitlenmiş ve sonrasında kesi yeri dikilmiştir (Dysilk 3/0). Cerrahi işlemin hemen sonrasında analjezi sağlamak amacıyla i.p. 1ml/kg karprofen (5mg/kg; Rimadyl®; Pfizer) enjeksiyonu yapılmış, sıvı kaybını önlemek için ise cilt altına ılık % 0,9 NaCl (vücut ağırlığının her 100 g başına 1 ml) çözeltisi ile enjekte edilmiştir. Ameliyat sonrası dönemde hayvanların genel durumu 1 haftalık dinlenme dönemi boyunca takip edilmiş, vücut ağırlıklarının %10'undan fazlasını kaybeden hayvanlar çalışmaya dâhil edilmemiştir.

3.4. *Kindling*

Stereotaksik cerrahiden 1 hafta sonra *kindling* deneylerine başlanmıştır. Önce AD eşiklerini belirlemek amacıyla sıçanlara başlangıç uyarısı olarak 50 μ A şiddetinde elektriksel akım (80 Hz ve 1 msn) süreli dalgalar şeklinde, toplam 2 sn) uygulanmıştır. Bu uyarılar 50 μ A'lık artışlarla ilk AD tetikleninceye kadar devam etmiş, en az 2 sn süre ile AD'nin tetiklendiği akım şiddeti “AD eşiği” olarak tanımlanmıştır. AD eşiği her hayvan için tespit edildikten sonra hayvanlar 2 sn süre ile günde iki defa sabah ve akşam olmak üzere AD eşik şiddetinde bir elektriksel akım ile uyarılmışlardır. Uyarı öncesi ve sonrasında amigdala ve korteksten EEG kaydı alınmıştır ve uyarı sonrasında AD süreleri kaydedilmiştir. Her uyarıdan sonra ortaya çıkan nöbet evresi Racine'in 5 evreli skalasına göre değerlendirilmiştir (Racine 1972):

1. Evre; yüz ve bıyık hareketleri,
2. Evre; ritmik baş hareketleri, başla onaylama hareketi,
3. Evre; tek taraflı ön ekstremite klonusu,
4. Evre; iki taraflı ön ekstremite klonusu,
5. Evre; bunlarla beraber denge kaybı ve geriye düşme.

3.5. *In-vivo* Elektrofizyolojik Kayıt

3.5.1. Anestezi ve cerrahi

Verilen en son *kindling* uyarısının en az 1 saat sonrasında hayvanlar ketamin (100 mg/kg; i.p.; (Ketasol®; Richterpharma) ve ksilazin (10 mg/kg; Rompun®; Bayer) anestezisi ile uyutulmuştur. Hayvanlar ısıtıcı battaniye üzerine alınarak rektal prob yerleştirilmiş ve vücut sıcaklığı işlem boyunca 36-37 °C'de tutulmuştur. Pulse-oksimetre hayvanların ayağına yerleştirilerek Oksijenasyon > %90, ve kalp atımı dakikada 200-350 vuruş olacak şekilde idame edilmiştir. Anestezinin derinliği kornea ve pençe refleksleri ile doğrulandıktan sonra dorsal penil ven kateterizasyonuna geçilmiştir.

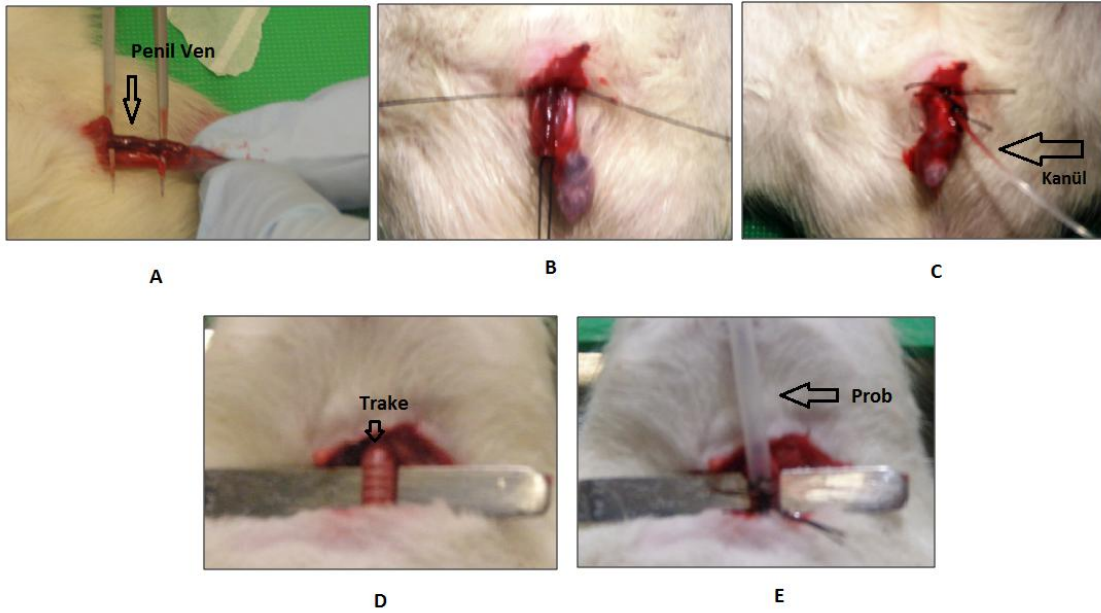
3.5.1.1. Dorsal Penil Ven Kateterizasyonu

Penis geri çekilerek üzerindeki cilt ve dorsal ven üzerindeki subkütanöz doku temizlendikten sonra ven komşu dokulardan ayrılarak ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3.2A). Etrafındaki dokulardan iyice temizlenen venin altından biri proksimal diğeri distal uçta olacak şekilde iki küçük parça ipek iplik geçirilmiştir. Proksimaldeki iplik serbest

birakılarak distal uçtaki sıkıca bağlanmıştır (Şekil 3.2B). Penil ven üzerinde cerrahi göz makası ile küçük bir kesi oluşturularak, 3 ml'lik enjektöre bağlı şekilde içi serum fizyolojik ile dolu, iç çapı 0.8 mm olan PVC kanül ven içine en az 1,5 cm girecek şekilde yerleştirilmiştir. Kanülün yerleşimi enjektörün geri çekilerek kan gelmesi ve kolay serum fizyolojik enjeksiyonu ile doğrulandıktan sonra kanül sıkıca bağlanarak *in-situ* şekilde sabitlenmiştir (Şekil 3.2C).

3.5.1.2. Trakeatomi

Göğüs kemiği çıkıntısının hemen üzerinden orta hat boyunca cilt üzerine küçük bir kesi (1-1,5 cm) atıldıktan sonra kas tabakası küt diseksiyon ile ayrılarak trakea ortaya çıkarılmıştır. Etrafındaki fasyal dokudan temizlenen trakea altına bir destek konularak yükseltilmiştir (Şekil 3.2D). İki parça iplik trakea'nın altından geçirilerek hafifçe bağlanmıştır. Trakea kesisi, iki trakea halkası arasında olacak şekilde yapıldıktan sonra trakeatomi tübü 0.5 cm proksimal trakea içine itilmiştir. Trakea etrafındaki iplikler ile önce dorsal sonra proksimaldeki uç olacak şekilde trakea ve tüp bağlanarak sabitlenmiştir (Şekil 3.2E). İşlem sonrasında trakea içine tübün girmesine bağlı oluşabilecek kanama ve salgılardan temizlenmek amacıyla trakea bir enjektör ve ucuna bağlı kateter ile vakumlanmıştır.



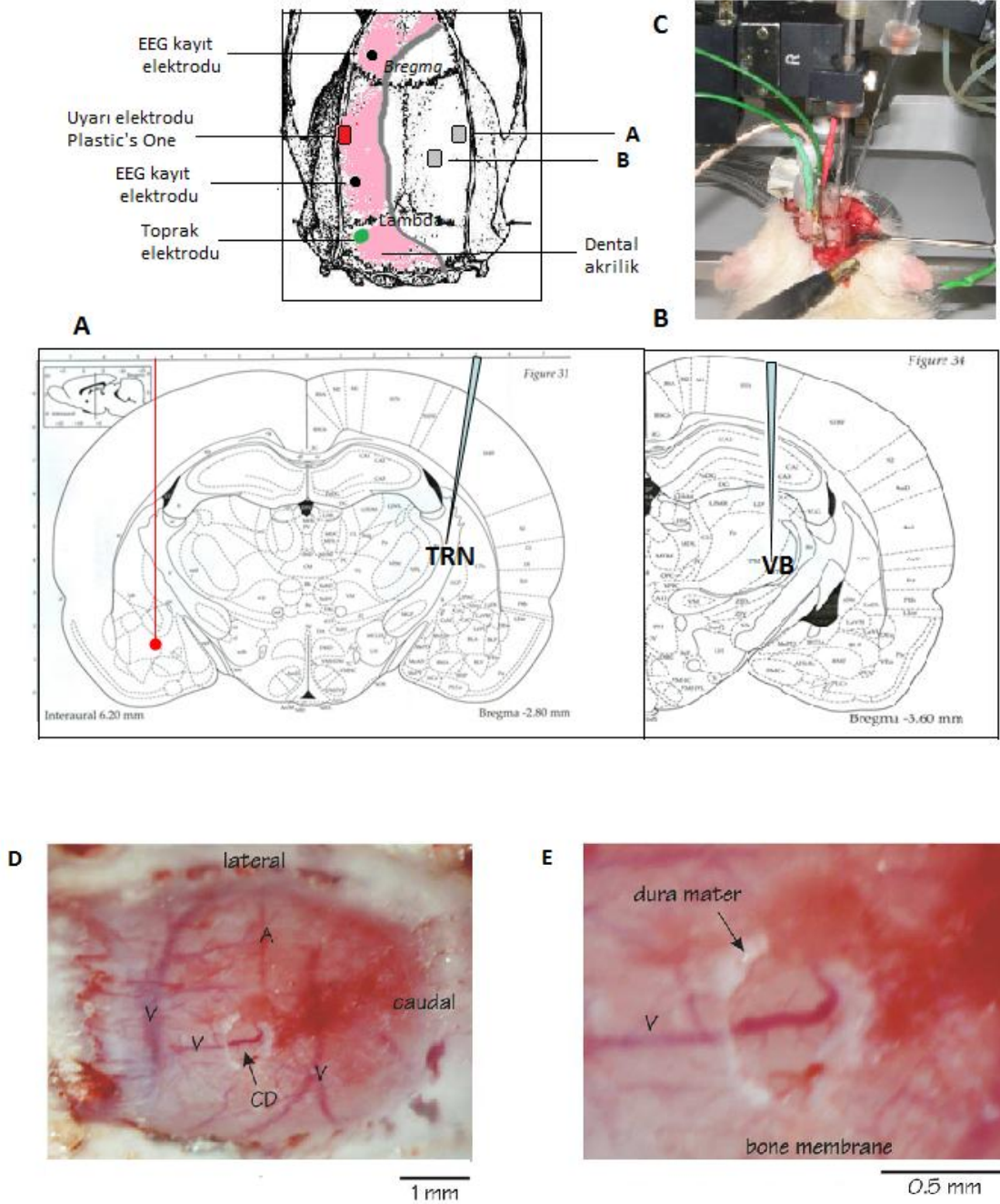
Şekil 3-1: Dorsal Penil Ven Kateterizasyonu (A-B-C) ve Trakeatomi (D-E).

3.5.1.3. Kranial Cerrahi

Trakeaotomi ve penil ven kateterizasyonunu takiben hayvanlar vibrasyon-izole platform üzerinde bulunan stereotaksik alete yerleştirilerek kayıt alınacak sağ hemisfer bregma referans noktasıyla birlikte ortaya çıkacak şekilde temizlenerek kranium ve dura mater'in kaldırılması (kraniotomi ve duratomi) için hazır hale getirilmiştir. Bütün cerrahi işlemler boyunca hayvanların rektal vücut sıcaklıkları 36,8- 37,2 °C derecede termoregülatörlü ısıtıcı battaniye (Fine Science Tools., Inc, Heidelberg, Germany) ile sabit tutulmuştur. İğne şeklindeki EKG elektrotları bilateral olarak göğüs üzerine yerleştirilerek kalp atımı dakikada 200-350 vuruş olacak şekilde idame ettirilmiştir.

Kraniotomi ve duratomi işlemleri diseksiyon mikroskobu altında (Leica) sağ hemisferde TRN (2,8 mm arkaya, 4,8 mm yana, 12,5° açılı) ve VB talamus (3,6 mm arkaya, 3,6 mm yana) koordinatlarının (Paxinos ve Watson, 1998) bregma referans noktasına göre işaretlendiği noktalarda yapılmıştır (Şekil 3.2). Elektrotların gireceği noktalarda kemik üzerinde yaklaşık 0,5 mm çapında yuvarlak bir pencere oluşturacak şekilde mikrodrill ile kemik doku çıkarılmıştır. Bu işleme çalışılan noktadaki kemik zar haline gelip duradaki damarları gösterecek kadar saydam olana kadar devam edilmiştir (Şekil 3.3D). İğne forceps yardımıyla duraya temas eden zar halindeki kemik elektrodun gireceği noktada nazikçe çıkarılmıştır. Bunu takiben ortaya çıkan dura mater, ucu kanca şekline getirilmiş 26G enjektör ucu ile nazikçe delinmiş ve sonrasında iğne uçlu forceps ile genişletirlererek elektrodun girişine hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.3E).

Kraniotomi ve duratomi sonrasında açıkta kalan kortikal alanların kurumasını önlemek amacıyla yapay serebrospinal sıvıya (mM cinsinden: NaCl 137, KCl 3, CaCl₂ 1,3, NaH₂PO₄.H₂O 1,13, MgCl₂.6H₂O 1, glukoz 11, NaHCO₃ 2,4, final PH 7,4) batırılmış cerrahi mikro süngerler açılan bölgedeki korteks üzerine yerleştirilmiştir. Bu işlemlerin ardından nörolept anestezisi için hazırlanan (300 g'lık hayvana saat başı verilen miktar üzerinden): D-tubokürarin (0,4mg; Sigma Aldrich), fentanil (0,375 µg; Mayne Pharma), haloperidol (50 µg; Janssen) ve glukoz (25mg) karışımı ketamin-ksilazin anestezisinin etkisi bitmeden penil vene yerleştirilen katater ile intravenöz olarak 0,5ml/saat hızında verilmeye başlanmıştır. Bu sırada hayvan trakea içine daha önce yerleştirilen bir prob ile ventilatöre (SAR-830, CWE, Ardmore, ABD) bağlanarak dakikada 60-65 soluk alıp veriş olacak şekilde suni solunuma başlanmıştır. Nörolept anestezisinin derinliğini sabit tutmak amacıyla hayvanın EEG, sıcaklık ve kalp atım hızı



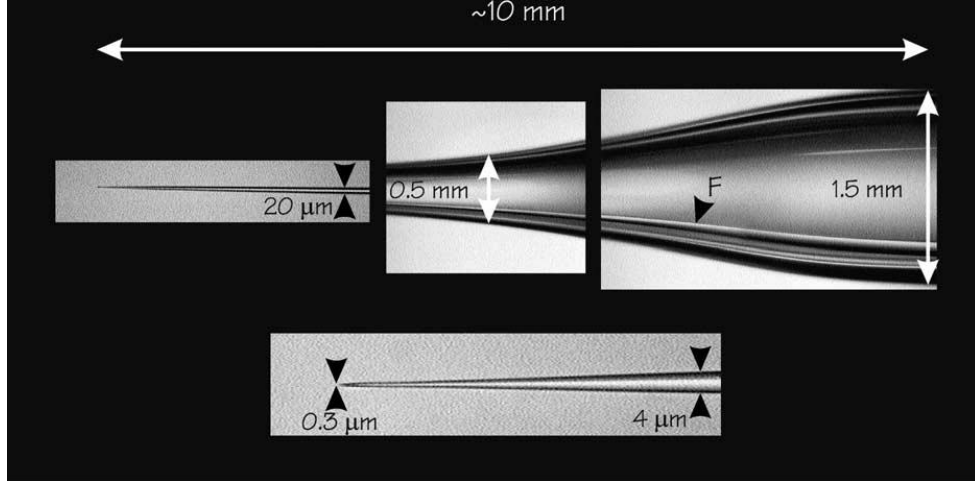
Şekil 3-2: Kindling ve in-vivo elektrofizyolojik kayıt işlemleri için yerleştirilen elektrotların şematik olarak gösterilişi. Kranium üzerinde gri karelerle belirtilen bölgeler stereotaksik olarak mikropipetlerin serbestçe girişine olanak sağlayacak şekilde açılmış mikro delikleri (çapı 0,8-1mm) göstermektedir. Kranium üzerindeki pembe alan *kindling* uyarı ve kortikal EEG elektrotlarının sabitlenmesi için dental akrilikle kapatılan alandır. Bregma ve sağ hemisferin açık olduğu görülmektedir. A ve B ile gösterilen çizgiler mikropipetlerin hedeflendiği kayıt bölgelerinin frontal kesitlerini işaret etmektedir. Bu kesitlerin kaudal görünümünde bregmanın 2,8 mm arkasında TRN (A) ve 3,6 mm arkasında ise VB (B) kayıt bölgelerini hedefleyen mikroelektrotların giriş pozisyonları görülmektedir. D’de kraniotominin geniş, duratominin ise sadece mikropipetin girişine olanak sağlayacak kadar küçük ölçüde yapılması gerektiği görülmektedir. Duratominin yakından görünüşü E’de verilmiştir. CD: kraniotomi-duratomu, V: görülen serebral ven, A: serebral ven (*Pinault 2005’ten değiştirilerek alınmıştır*).

(maksimum kabul edilebilir 350 atım/dakika) sürekli olarak *in-vivo* elektrofizyolojik kayıt boyunca izlenmiştir. Elektrofizyolojik kayıt seansına bütün bu cerrahi işlemlerin bitiminden 1 saat sonra başlanmıştır.

3.5.2. Elektrofizyolojik Tek Hücre Kayıtları

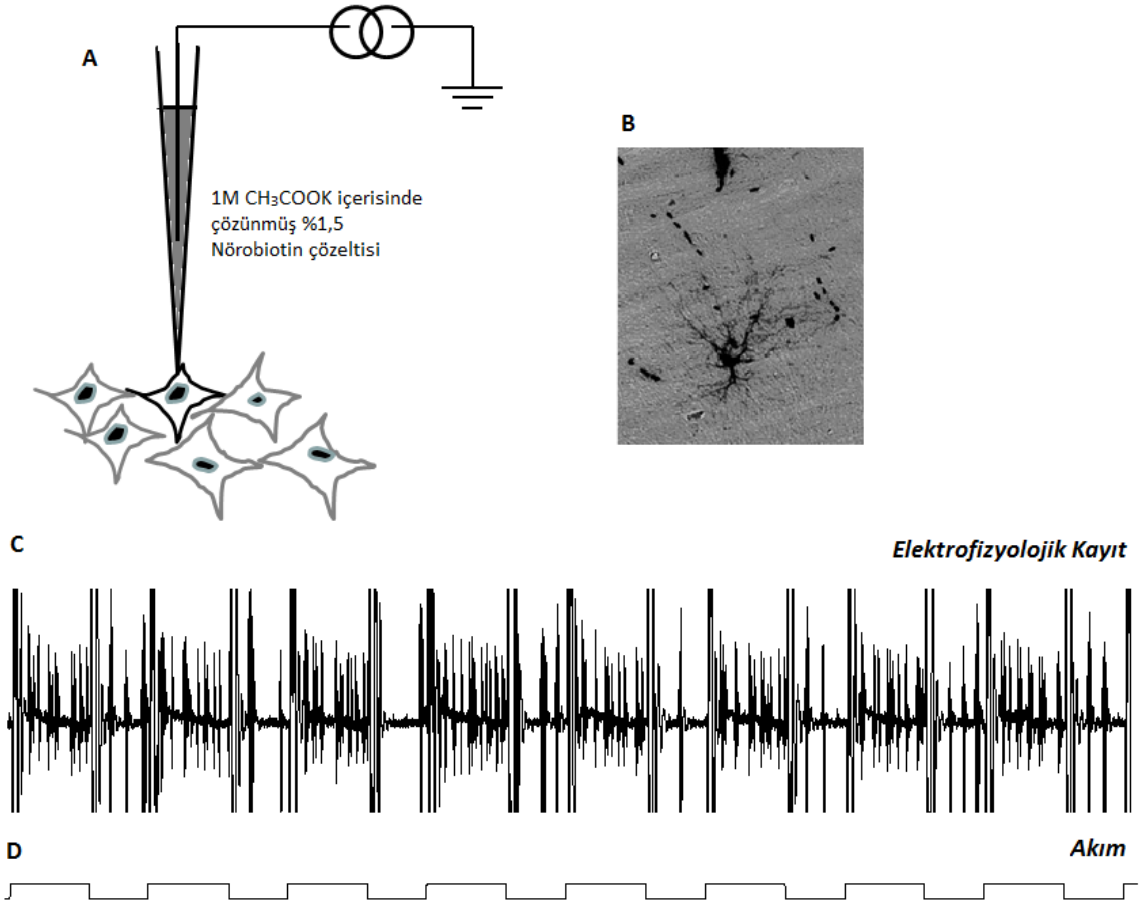
Elektrofizyolojik kayıt işlemleri için kullanılan mikropipetler 1,5 mm çapında borosilikat cam kapillerden (30-0020; Harvard Apparatus Ltd., UK) vertical bir çekici (Shutter Instruments) kullanılarak üretilmiştir (Şekil 3-3). Herbirinin rezistansı 30-50 m Ω olacak şekilde (uç çapı 1-1,5 μ m) hazırlanan cam mikropipetler kayıt işleminin 24 saat öncesinde 1M CH₃COOK içerisinde çözülmüş %1,5 N-(2 aminoetil) biotinamid hidroklorür (Neurobiotin®; Vector labs, Burlingame, CA, USA) çözeltisi ile doldurulmuştur.

Doldurulan pipetler stereotaksik olarak hedeflenen bölge üzerindeki kemik ve duradan temizlenmiş mikrodelik içinde korteks yüzeyine temas edecek şekilde yerleştirilmiş ve bu nokta sıfır kabul edilerek pipetler aşağıya doğru indirilmeye başlanmıştır. Her bir pipet içinde bulunan tel ile amplifier'a (Cyber-Amp 380, Axon Instruments, Union City, CA, ABD) bağlanmıştır. Eşzamanlı olarak iki mikropipet (TRN ve VB) korteks yüzeyinden bir mikromauplatör (Narishige; Tokyo, Japonya) ile manuel olarak aşağıya indirilerek, TRN için duradan 5 mm ve VB talamik çekirdek için duradan 6 mm aşağıdaki seviyelerde yeterince yaklaşabilinen sağlıklı nöronlardan ekstraselüler tek hücre kayıtları alınmıştır. Gürültüsüz ve en az 10 dakika kayıt alınabilen istikrarlı nöronlar çalışmaya dâhil edilmiştir. Nöron kaydı sırasında amigdala ve korteksten sürekli olarak EEG kaydı alınmıştır. 10 dakika süre mikropipetin ucunda sabit kalabilen nörondan kayıt alındıktan sonra hayvanlara nörolept anestezisi altında sol hemisferdeki amigdala elektrodu bir stimulatöre bağlanarak *kindling* uyarısı verilmiş ve *kindling* nöbetinin TRN ve VB talamus nöronlarında meydana getirdiği ateşleme değişiklikleri uyarı ile indüklenen nöbet boyunca ve nöbet sonrasında en az 10 dakika boyunca kaydedilmiştir.



Şekil 3-3: Elektrofizyolojik kayıtlarda kullanılan cam mikroeletrodun temel fiziksel özellikleri. F, filament.

Kayıt işleminin bitiminde her hayvan için, en son kayıt alınan nöronlar (TRN ve VB) histolojik verifikasyon ve hücre morfolojisinin incelenmesi amacıyla jukstaselüler izleyici mikroiyofores yöntemini (Pinault 1996) kullanılarak işaretlenmiştir. Bu yöntemde pipetin ucu nöronun içinde değil nöron membranına dokunur vaziyettedir (jukstaselüler) (Şekil 3.5A). Bu sırada nöron membranına mikropipet ile 0,5-8 nA arasında değişen şiddette pozitif akımlar her 200 msn’de bir verilip kapatılarak, 10-15 dakika boyunca uygulanmıştır (Şekil 3.5D). Bu yöntem, pipet içindeki izleyici maddenin (Nörobotin) hücrenin pozitif akıma verdiği ateşleme cevabıyla birlikte mikroiyofores ile nöron boyunca ilerleyerek nöron çekirdeğini ve aksonunu boyaması esasına dayanmaktadır. Verilen pozitif darbeler sırasında nöronun ateşleme cevabının devam etmesi gerekmektedir (Şekil 3.5C). Ateşleme cevabı olmayan nöronlar, akımla birlikte nöron membranının zarar görmesi nedeniyle ya da uyarı sırasında nöronların pipetin ucundan ayrılma olasılığı nedeniyle işaretlenememektedir. İyi bir işaretlemede en az 10 dakika boyunca nöron pipet ucunda kalmalı ve verilen pozitif darbelerle senkronize biçimde ateşlemelidir (Pinault, 1996). Sürenin bitiminde, mikropipetler nöronun zarar görmesini engellemek amacıyla nazik bir şekilde hücreden uzaklaştırılmışlardır. Şekil 3.5B’de nörobotin ile hücre gövdesi ve dendritleri boyanan VB hücresi görülmektedir.



Şekil 3-4: Jukstaselüler yöntemi ile nöronların işaretlenmesi. Pipet ucuna en yakın olan nöron (A) 0,5-8 nA arasında verilen pozitif akımlarla işaretlenir (B). Bu sırada elektrofizyolojik (C) olarak ve akımın verildiği zaman aralıklarında (D) hücre davranışı izlenir.

3.5.3. Ötenazi ve Transkardial Perfüzyon

Elektrofizyolojik kayıtların bitiminde en son kayıt alınan hücrenin işaretlenmesini takiben yarım saat içerisinde hayvanlar i.v yoldan yüksek doz pentobarbital (Lethobarb; Virbac; Avustralya) verildikten sonra transkardial olarak fosfat tamponu (PBS; 10mM, % 0,9 NaCl, pH: 7,45; 250 ml) ve sonrasında 500 ml % 4 paraformaldehit (PFA) içeren fiksatif ile perfüze edilmişlerdir. Beyin çıkarıldıktan sonra post fiksasyon için tekrar % 4'lük PFA solüsyonunda + 4 °C'de 24 saat bekletilmiştir.

3.5.4. Histoloji

Fikse edilen beyinlerden vibrotom (Vibratome™, St Louis, MO, USA) ile 100 µm kalınlığında koronal kesitler alınmış ve sırasıyla 10 mM PBS içinde toplanmıştır. Alınan kesitlerdeki işaretlenmiş nöronlardaki izleyici maddenin tespiti, hücre morfolojisi ve yerleşimin anlaşılması amacıyla standard diaminobenzidin (DAB; SK-4100; DAB substrate Kit for Peroxidase; Vector labs, Burlingame, CA, USA) yöntemi kullanılmıştır. PBS içine alınan kesitler oda sıcaklığında üç kez 10'ar dakika ara ile 10 mM PBS ile yıkanmıştır. Sonrasına yıkanan kesitler üzerine 10 ml 10mM PBS içinde; 1:100 avidin-biotin-peroksidaz kompleksi (Vectastain ABC Kit; Vector labs, Burlingame, CA, USA), % 0,3 Triton X-100 bulunan solüsyon eklenerek +4°C'de çalkalayıcı üzerinde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kesitler oda sıcaklığında 3 kez 10 mM PBS ile yıkandıktan sonra DAB peroksidaz kiti ile muamele edilerek izleyici madde boyanmıştır. Bu enzimatik reaksiyon sonucunda izleyici madde ile işaretlenen nöron görünür hale gelmiştir (Horikawa ve Armstrong, 1988). Bu işlem sırasında açık kahverengiye dönüşen kesitler üzerine çeşme suyu eklenerek DAB reaksiyonu durdurulmuş ve çeşme suyu ile kesitler yıkanarak DAB uzaklaştırılmıştır. Boyanan kesitler her bir lamda 6 kesit olacak şekilde sırasıyla jelatinli lamlara alınmışlar ve 1 gece kurumaya bırakılmışlardır. Lamlardaki kuruyan kesitler DPX (Fluka) ile kapatılarak tekrar kurumaya bırakılmıştır. Boyanan kesitlerdeki işaretlenmiş nöronun yeri ışık mikroskobu altında (Leica) sıçan beyin atlası kullanılarak belirlenmiş, yerleşimi hedeflenen bölgede olan hücrelerin yeri ve morfolojisi belirlenmiştir (Paxinos ve Watson, 1986).

3.5.5. Data Analizi

Çalışmada elde edilen bütün veriler ortalama \pm ortalamanın standard hatası (SEM) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık derecesi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

3.5.5.1. Elektrofizyolojik kayıtların analizi

İnteriktal ve iktal dönemdeki hücresel aktivite pClamp-Clampfit 10.2 programı (Axon Instruments) ile analiz edilmiştir. İnteriktal dönem GAERS grubu için iki DDD (iktus=nöbet) arasındaki dönem, NEK grubu için ise kortikal EEG'de DDD gözlenmediğinden senkronize herhangi bir osilasyonun EEG'de izlenmediği dönem olarak belirlenmiştir.

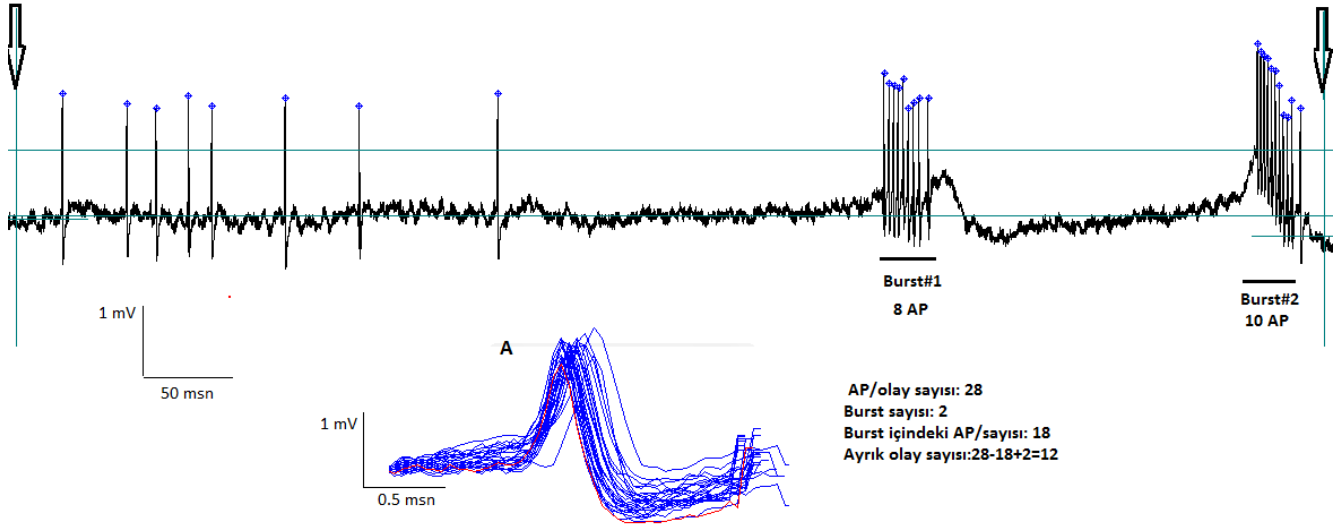
Gruplarda tek bir nöron ateşlemesinin interiktal analizi için EEG’de seçilen üç ayrı zaman diliminde;

1. *Toplam aksiyon potansiyeli (AP) sayısı*
2. *Burst sayısı:* 4 milisaniye içerisinde en az 2 AP’den oluşan deşarj grubu bir *burst* olarak kabul edilmiştir. *Burst* içindeki her bir AP’ye ise “olay” adı verilmiştir. Şekil 3.6’da seçilen zaman diliminde analiz örneklenmiştir.
3. *Ortalama ateşleme frekansı:* Ayrık AP sayısının analiz edilen zaman dilimine bölünmesiyle hesaplanmıştır. Ayrık AP sayısı ise; Toplam AP sayısından, *burst* içindeki AP sayısının çıkarılıp, bulunan değere *burst* sayısının eklenmesi ile bulunmuştur. Şekil 3.6’da bir örnek verilmiştir.
4. *Burst yüzdesi:* *Burst* sayısının ayrık AP sayısına bölünüp, 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.
5. *Burst başına düşen ortalama AP sayısı:* *Burst* içindeki toplam AP sayısının *burst* sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır.
6. *Burst başına düşen maksimum sayıdaki AP sayısı:* Analiz edilen zaman dilimi içerisinde bir *burst* içindeki en fazla AP sayısı.
7. *Intraburst (burst içindeki) ateşleme frekansı (Hz):* *Burst* içindeki toplam AP sayısının *burst* süresine bölünmesiyle hesaplanmıştır.
8. *Ortalama AP süresi:* Tek bir AP’nin izoelektrik hattı kestiği iki nokta arasındaki uzaklık milisaniye olarak hesaplanarak AP süresi olarak kaydedilmiştir.

Student-t testi, yukarıda analiz edilen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılmasında kullanılmıştır.

3.5.5.2. Hücre morfolojisinin analizi

İzleyici madde ile doldurulmuş nöronlar ışık mikroskobu (E600 Nikon) altında analiz edilmiş ve yerleşimler sıçan beyin atlası kullanılarak doğrulanmıştır (Paxinos ve Watson, 1998).



Şekil 3-5: Nöron Ateşleme Özelliklerinin Analizi. A'da analiz edilen zaman dilimindeki her bir aksiyon potansiyeli üst üste gelecek şekilde gösterilmiştir. Şekil başında ve sonunda bulunan oklar analiz edilen zaman diliminin başlangıç ve bitişi işaret etmektedir.

4. BULGULAR

Çalışmada sol bazolateral amigdalya kronik olarak uyarı elektrodu yerleştirilen GAERS ve NEK sıçanlardan nörolept anestezisi altında *in-vivo* koşullarda ekstraselüler tek hücre kaydı ve eşzamanlı olarak EEG kaydı alınmıştır. Ekstraselüler kayıtlar absans nöbetlerin altında yatan osilatör talamokortikal ritimlerin ortaya çıkışında ve sürdürülmesinde rol oynayan talamus çekirdekleri olan TRN ve VB talamustan alınmıştır.

4.1. Ekstraselüler Tek Hücre İnteriktal Ateşleme Özellikleri

Kontrol grubundaki hayvanlardan (GAERS ve NEK) AD eşik tespitini, *kindling* grubundaki hayvanlardan ise verilen maksimum sayıdaki *kindling* uyarılarını takiben absans nöbetlerin ortaya çıkışından sorumlu talamus çekirdeklerinden (TRN ve VB) *in-vivo* koşullarda ekstraselüler tek hücre kayıtları alınmış ve ateşleme özellikleri analiz edilmiştir.

4.1.1. Kontrol TRN Hücrelerinin İnteriktal Ateşleme Özellikleri

İnteriktal dönemde *kindling* uyarısı verilmeyen NEK-kontrol (n=10 hücre, 5 hayvan) ve GAERS-kontrol (n=7 hücre, 4 hayvan) grubundaki TRN hücreleri analiz edilen özellikler bakımından (ortalama ateşleme frekansı, *burst* yüzdesi, *burst* başına düşen maksimum AP sayısı, *burst* başına düşen ortalama AP sayısı, intraburst ateşleme frekansı) birbirlerine göre anlamlı bir farklılık göstermemişlerdir (Tablo 4.1).

TRN hücrelerinin ortalama AP süresinin NEK-kontrol grubunda ortalama $0,6 \pm 0,04$ msn (median; 0.58 msn), GAERS-kontrol grubunda ise $0,6 \pm 0,03$ msn (median; 0.55 msn) olduğu bulunmuştur. Şekil 4.1'de TRN hücrelerine ait AP sürelerinin NEK-kontrol ve GAERS-kontrol gruplarında TRN hücre sayısına göre dağılımı verilmiştir. Her iki grupta da TRN hücrelerinin çoğunluğunun AP süresinin 0,4-0,6 msn arasında olduğu görülmektedir.

İnteriktal dönemde TRN hücrelerinin hem NEK-kontrol hem de GAERS-kontrol grubunda ateşlemelerinin tonik modda, tek tek aksiyon potansiyellerinden oluştuğu ya da kısa süreli *burst* ve onu takiben tek tek AP'lerden oluştuğu görülmüştür.

Şekil 4.2’de NEK-kontrol (A) ve GAERS-kontrol (B) gruplarındaki TRN hücre ateşlemelerine ait kayıt örnekleri verilmiştir.

4.1.2. *Kindling* TRN Hücrelerinin İnteriktal Ateşleme Özellikleri

Kindling uyarıları sonrasında NEK-*kindling* grubundaki (n=10 hücre, 6 hayvan) TRN ateşlemeleri kendi kontrol grubuna kıyasla daha düşük frekanslı ve daha çok, *burst* şeklinde ateşlemelerin görüldüğü epileptiform bir hale gelmiştir. NEK-*kindling* grubuyla eşit sayıda uyarı alan GAERS-*kindling* (n=18 hücre, 5 hayvan) grubunda ortalama ateşleme freksında kendi kontrolüne göre anlamlı bir fark bulunmaz iken, *burst* yüzdesi, *burst* başına düşen ortalama AP sayısı ve intraburst ateşleme frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Tablo 4.1; Şekil 4.3).

NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında analiz edilen tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. *Kindling* uyarıları sonrasında NEK-*kindling* grubunda TRN ateşlemelerinin daha çok burst şeklinde meydana gelmesi, diğer bir deyişle *burst* yüzdesinin artması, GAERS-*kindling* grubunda ateşleme frekansının artarak *burst* yüzdesinin azalması iki grup arasında anlamlı farklılık göstermiştir (Şekil 4.4) ve bu farklılık kayıtlarda görsel olarak da anlaşılmaktadır.

TRN hücrelerinin ortalama AP süresinin NEK-*kindling* grubunda ortalama $0,54 \pm 0,04$ msn (median; 0.53 msn), GAERS-*kindling* grubunda ise $0,59 \pm 0,1$ msn (median; 0.65 msn) olduğu bulunmuştur. Bu değerler kontrol gruplarındaki değerlere daha düşük olmakla birlikte göre anlamlı farklılık göstermemiştir. Şekil 4.5’te TRN hücrelerine ait AP sürelerinin NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* gruplarında TRN hücre sayısına göre dağılımı verilmiştir.

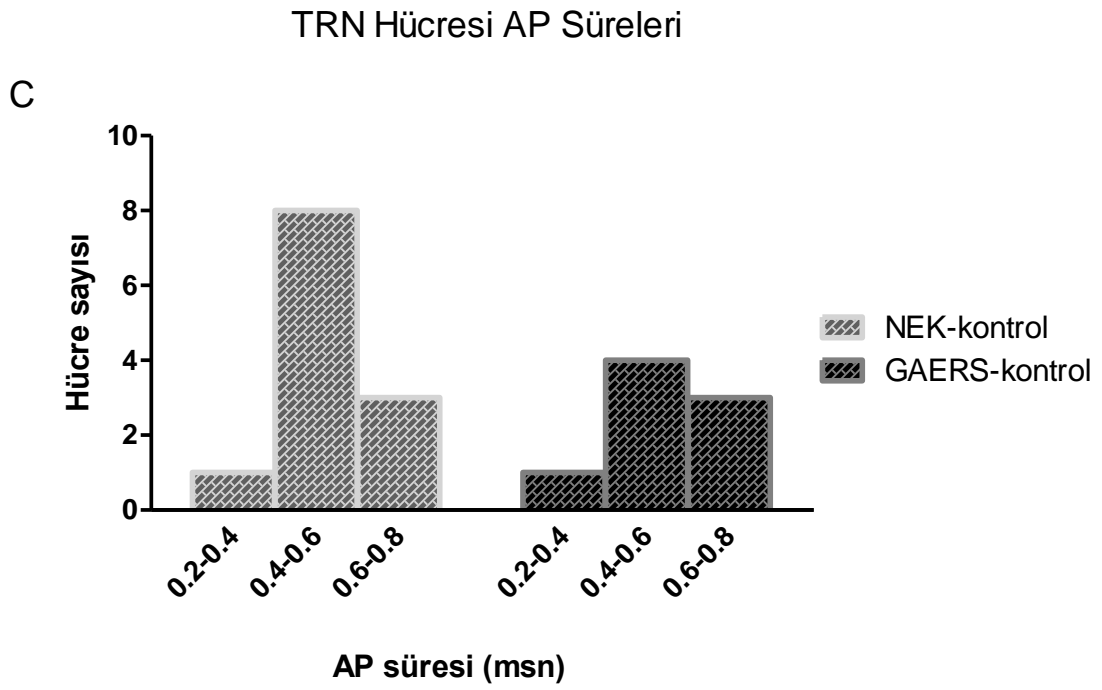
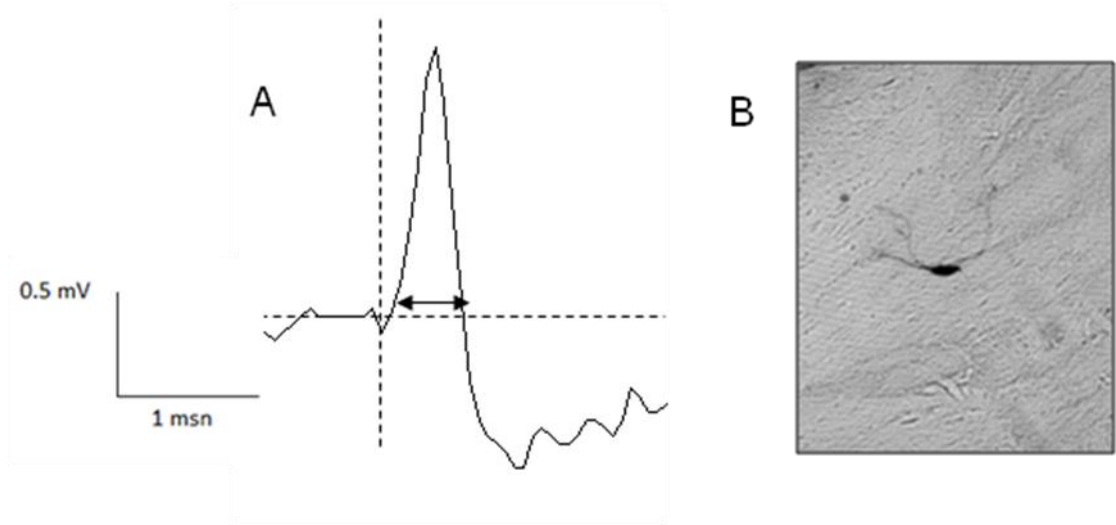
4.1.3. GAERS’lerde DDD Sırasındaki İktal TRN Aktivitesi

GAERS’lerde EEG’de DDD ortaya çıktığı anda (iktal dönemde) TRN nöronlarının birden bire ritmik, yüksek frekanslı, *burst* modunda ateşlemeye başladıkları ve bu ateşlemenin DDD bitene kadar ritmik olarak devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 4-6A-A1). Her bir *burst* bir DDD kompleksine eşlik etmekte ve DDD ile aynı frekansta ateşlemektedir (Şekil 4-6B) Yüksek frekanslı *burst* ateşlemelerinin süresi 25.9 ± 4.8 msn, ortalama intraburst frekansı 301 ± 48 Hz, ve *burst* başına düşen AP sayısının 6 ile 15 arasında değişen sayıda olduğu bulunmuştur.

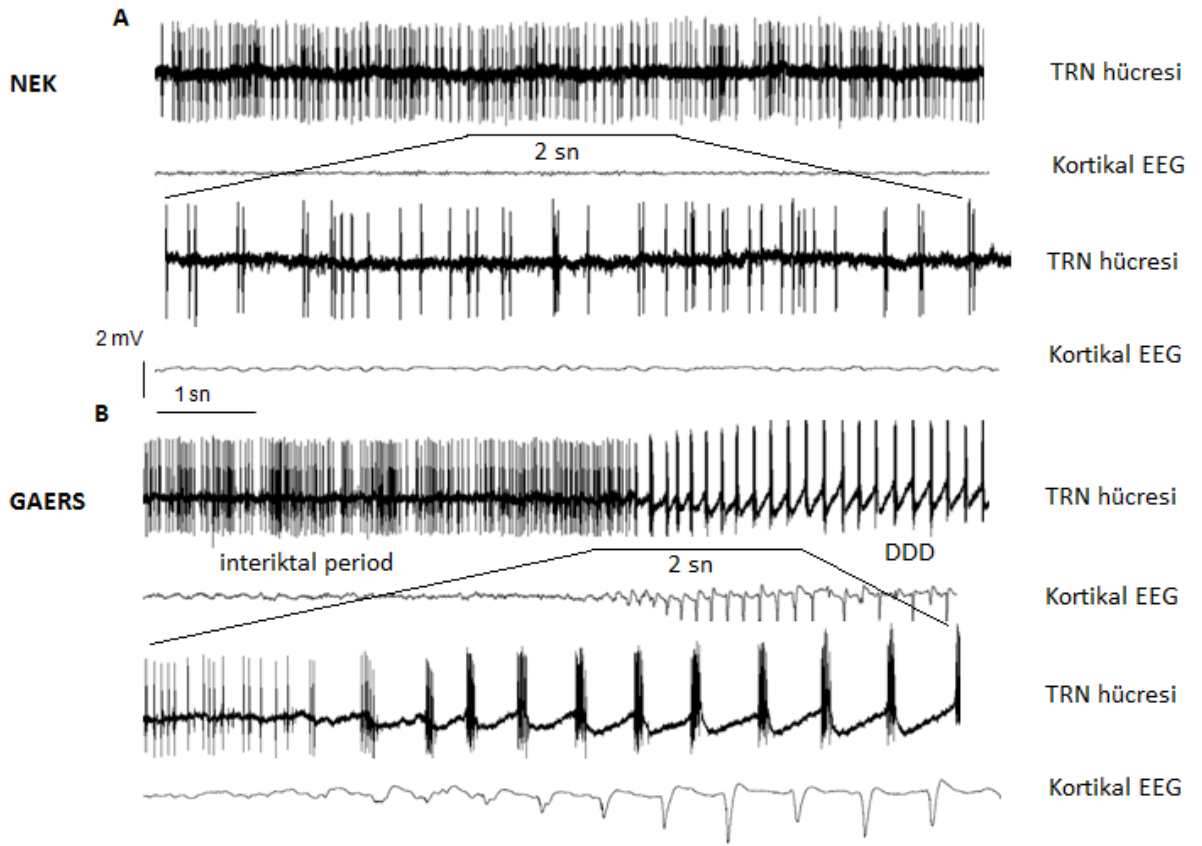
Tablo 4-1: TRN Nöronlarının İnteriktal Ateşleme Özellikleri

Analiz edilen parametreler /Gruplar	NEK Kontrol (n=10 hücre, 5 hayvan)	GAERS Kontrol (n=7 hücre, 4 hayvan)	NEK Kindling (n=10 hücre, 6 hayvan)	GAERS Kindling (n=18 hücre, 5 hayvan)
Ateşleme Frekansı	12,9±2,6	7,3±3,4	4,7±1,5 ^{oo}	14,2±2 ^{***}
Burst Yüzdesi	11,8± 5,7	24±7,4	33,4±7,2 ^o	8,7±2,8 ^{***, †}
Burst başına düşen ortalama AP sayısı	3,2±0,3	5,2±1,3	4,5±0,5	3,0±0,3 ^{**, †}
Burst başına düşen maksimum AP sayısı	4,6±0,5	6,6±1,6	6,8±0,8 ^o	4,5±0,7 [*]
Intraburst Ateşleme Frekansı	381,4±25,1	383,9±28	386,5±22,6	316,8±13,3 ^{**, †}

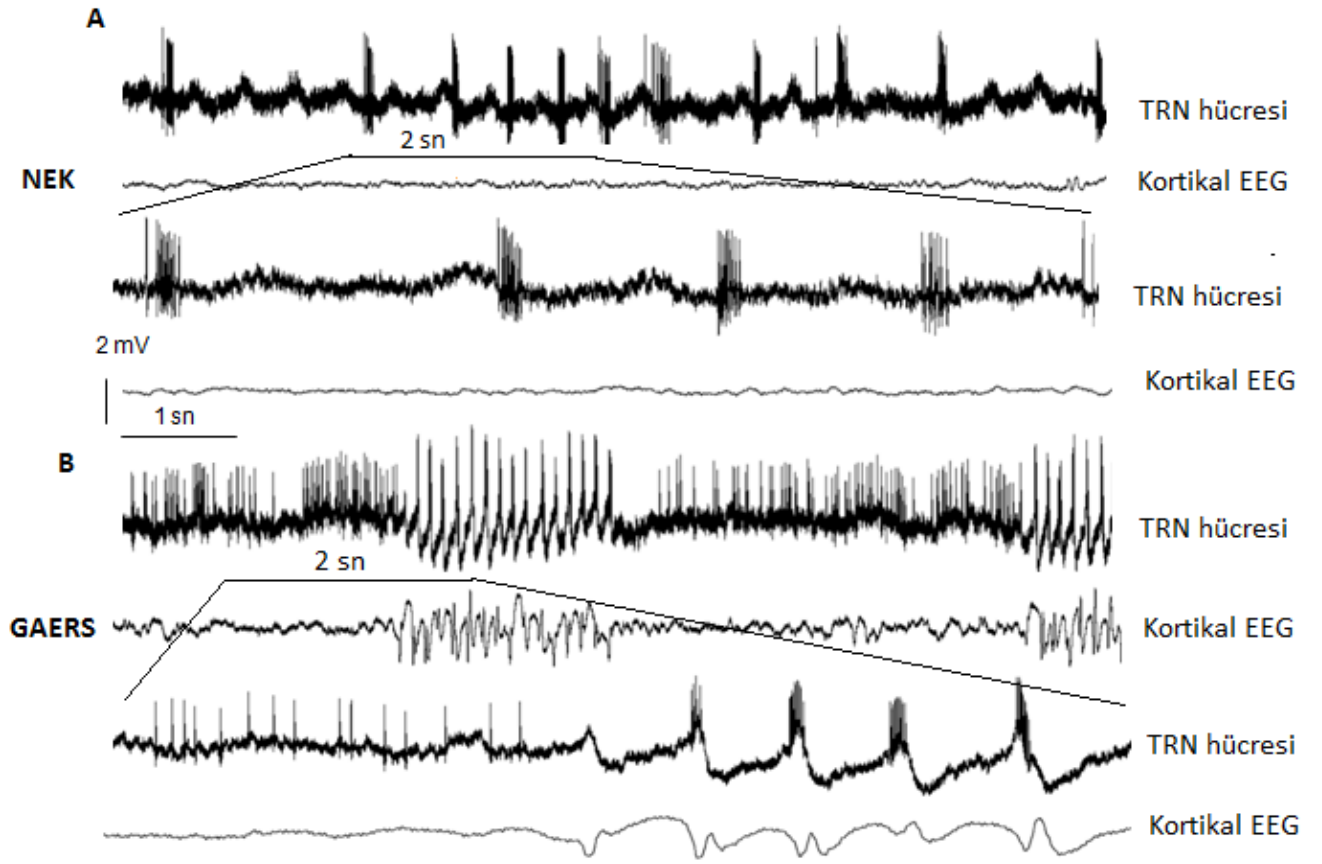
Veriler ortalama \pm ortalamanın standard hatası (SEM) şeklinde ifade edilmiştir.
* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, NEK-kindling ve GAERS-kindling grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark.
^o p<0.05, ^o ^o p<0.01, NEK-kontrol ve NEK-kindling grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark.
[†] p<0.05, GAERS-kontrol ve GAERS-kindling grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark. AP: Aksiyon potansiyeli



Şekil 4-1: NEK-kontrol ve GAERS-kontrol gruplarında TRN hücrelerine ait AP süreleri. TRN hücresine ait AP eğrisi (A) ve TRN hücresi (B) verilmiştir. NEK-kontrol ve GAERS-kontrol gruplarında TRN hücre sayısının AP sürelerine (msn) göre dağılımı verilmiştir (C).

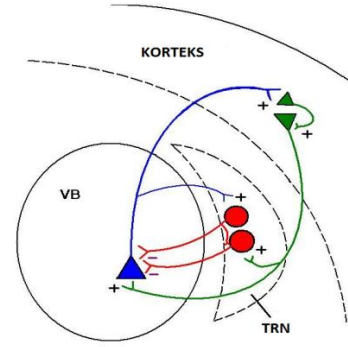
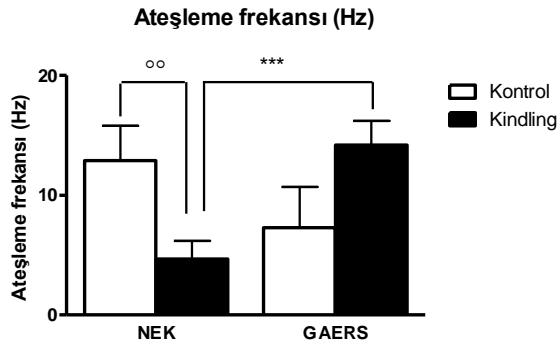


Şekil 4-2: Kontrol NEK (A) ve GAERS (B) gruplarından kaydedilen TRN hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri. 2 saniyelik periyodlar açılmış şekilde her grup için gösterilmiştir. GAERS (B) grubunda DDD sırasında TRN ateşlemesinde meydana gelen değişiklik görülmektedir.

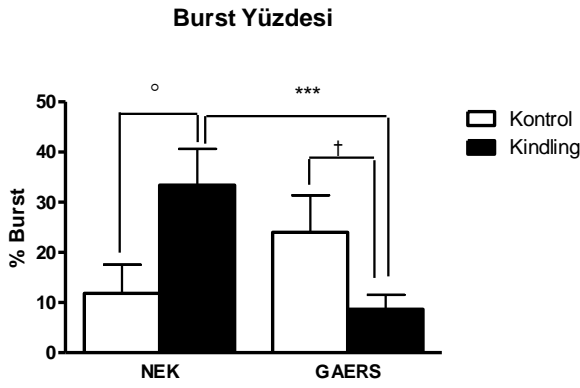


Şekil 4-3: Kindling uyarıları sonrasında NEK-kindling (A) ve GAERS-kindling (B) gruplarından kaydedilen TRN hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri. 2 saniyelik periyodlar açılmış şekilde her grup için gösterilmiştir.

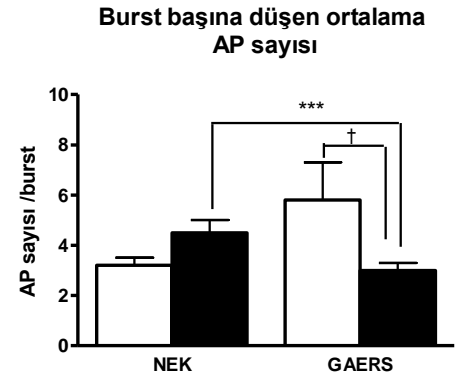
A



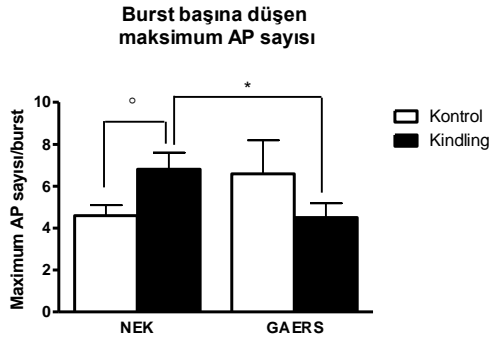
B



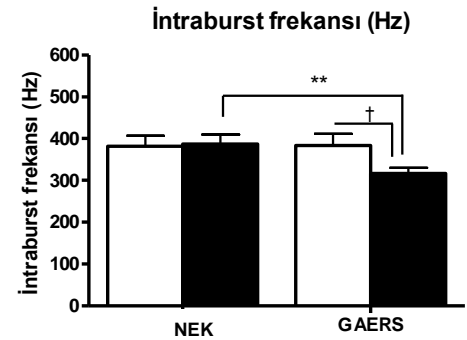
C



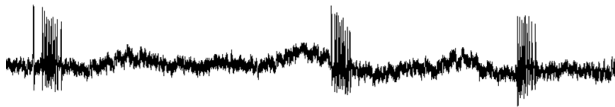
D



E



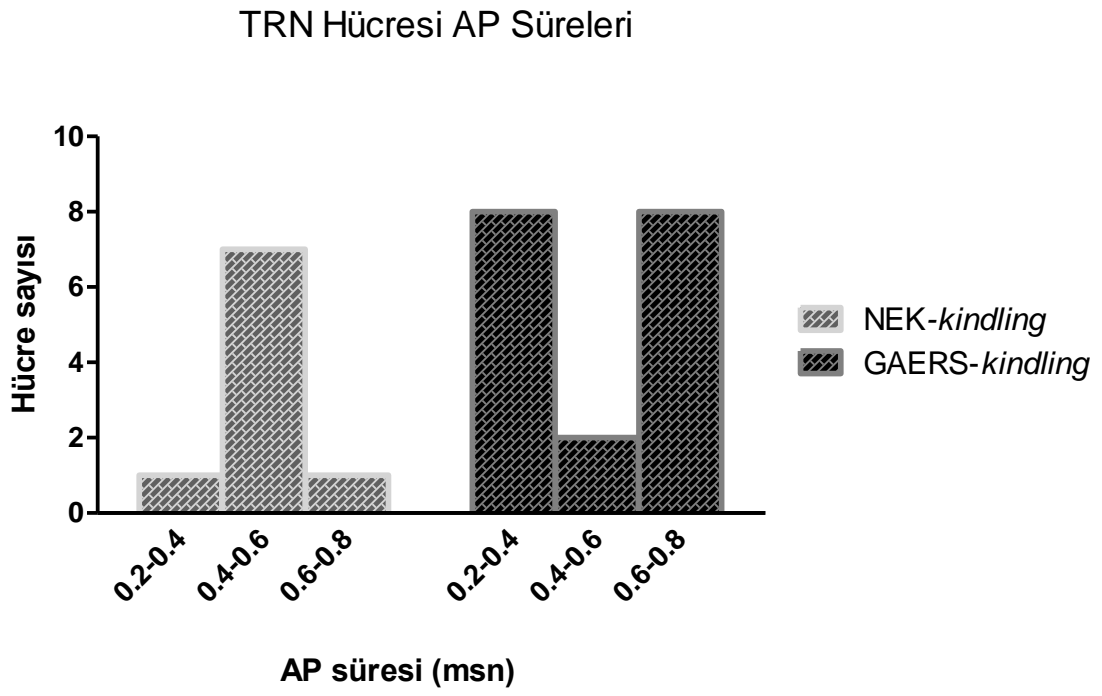
F



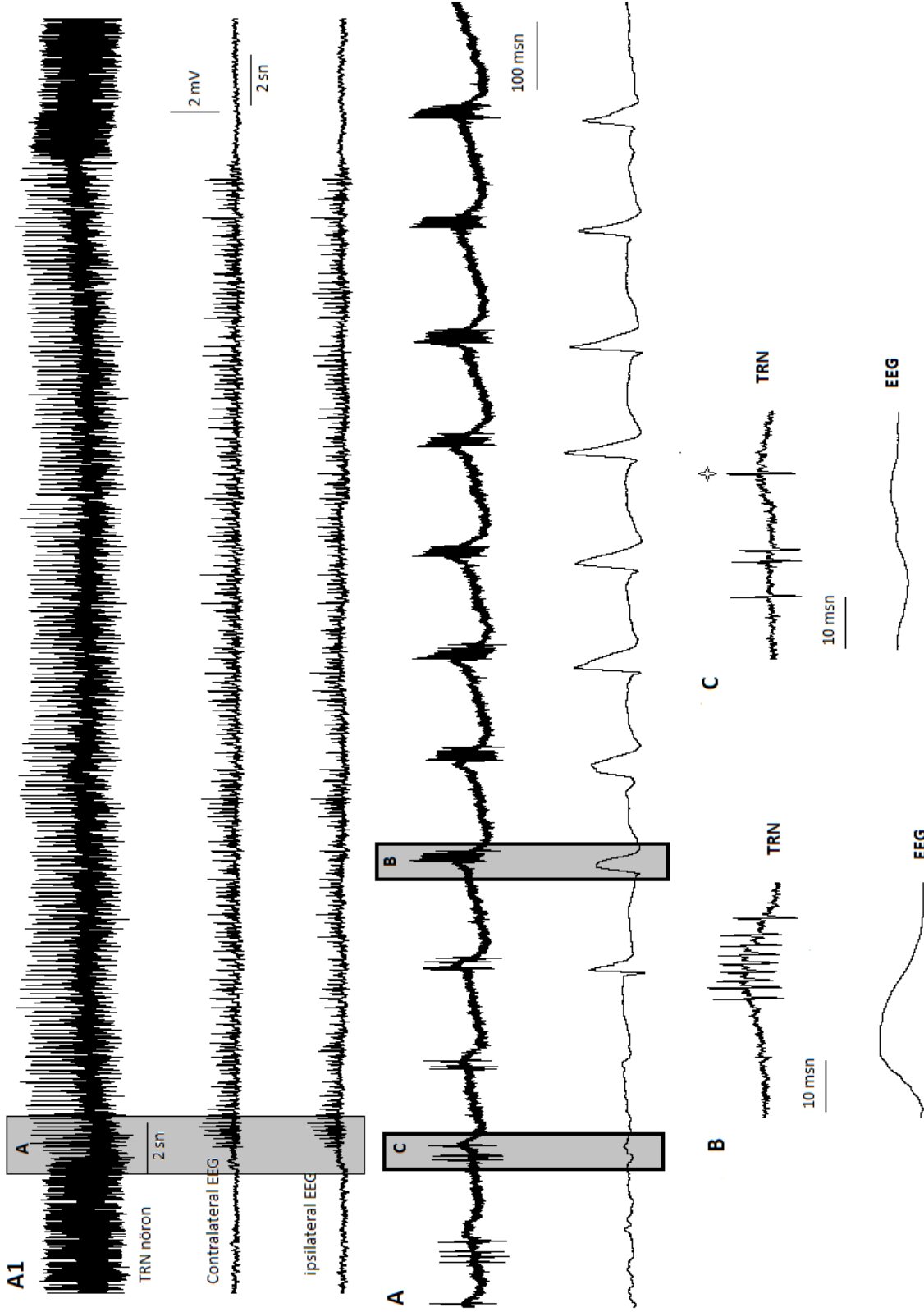
G



Şekil 4-4: TRN nöronlarının interiktal ateşleme özellikleri. Ateşleme frekansı (A), *Burst* yüzdesi (B), *Burst* başına düşen ortalama AP sayısı (C), *Burst* başına düşen maksimum AP sayısı (D) ve İntraburst frekansı (E) özellikleri bakımından tüm gruplar karşılaştırılmıştır. En altta NEK-*kindling* (F) ve GAERS-*kindling* (G) gruplarına ait kayıt örnekleri verilmiştir * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark. ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$, NEK-kontrol ve NEK-*kindling* grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark. † $p < 0.05$, GAERS-kontrol ve GAERS-*kindling* grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark. AP: Aksiyon potansiyeli



Şekil 4-5: NEK-kindling ve GAERS-kindling gruplarında TRN hücrelerine ait AP süreleri.
NEK-kindling ve GAERS-kindling gruplarında TRN hücre sayısının AP sürelerine (msn) göre dağılımı verilmiştir.



Şekil 4-6: DDD sırasında TRN nöronlarının ekstraselüler olarak kaydedilen aktivitesi. En üstte sıkıştırılmış trasede (A1), EEG'de izlenen DDD aktivitesinin başlangıç ve bitişi ve buna eşzamanlı olarak TRN nöron aktivitesi görülmektedir. Gri ile belirtilen alanda (A); A1 trasesinin 2 saniyelik açılmış dilimi verilmiştir. A trasesinde DDD öncesinde tek tek aksiyon potansiyelleri oluşturacak şekilde (C) tonik aktivite gösteren TRN hücrelerinin, DDD'nin ilk diken-dalga kompleksini takiben patlama tarzında (B) ritmik ateşleme moduna geçişleri görülmektedir. C'de TRN nöronunun oluşturduğu tek bir aksiyon potansiyeli * ile gösterilmiştir. *TRN: Talamik retiküler çekirdek*

4.1.4. Kontrol VB Talamus Hücrelerinin İnteriktal Ateşleme Özellikleri

İnteriktal dönemde *kindling* uyarısı verilmeyen NEK-kontrol (n=8 hücre, 5 hayvan) grubunda VB talamus hücrelerinin ortalama ateşleme frekansı $3,8 \pm 0,7$ Hz ve *burst* başına düşen ortalama aksiyon potansiyeli sayısı $2,7 \pm 0,2$ olarak bulunmuştur. GAERS-kontrol (n=10 hücre, 5 hayvan) grubundaki ise VB talamus hücrelerinin ortalama ateşleme frekansı $14,3 \pm 3,1$ Hz ve *burst* başına düşen ortalama aksiyon potansiyeli sayısı $2,3 \pm 0,1$ olarak bulunmuş ve gruplar arasında anlamlı farklılık gösterilmiştir. (Tablo 4.2). Analiz edilen diğer parametrelerde bulunan farklılıklar ise anlamlılık göstermemiştir.

VB hücrelerinin AP süreleri NEK-kontrol grubunda ortalama $1,1 \pm 0,1$ msn, (median; 0,99 msn) GAERS grubunda ise $1,0 \pm 0,1$ msn (median; 1,05 msn) olarak bulunmuştur. Şekil 4.7’de VB talamus hücrelerine ait AP sürelerinin NEK-kontrol ve GAERS-kontrol gruplarında VB talamus hücre sayısına göre dağılımı verilmiştir.

İnteriktal dönemde VB talamus hücreleri hem NEK-kontrol hem de GAERS-kontrol grubunda düzensiz tek tek AP’lerden oluşan tonik ateşleme tarzında bazen de birkaç AP’nin biraraya gelmesiyle oluşan *burst* şeklinde yüksek frekanslı (en fazla 500 Hz) ateşleme aktivitesinde bulunmuştur (Şekil 4.8).

4.1.5. *Kindling* VB Talamus Hücrelerinin İnteriktal Ateşleme Özellikleri

Kindling uyarıları sonrasında NEK-*kindling* grubundaki (n=20 hücre, 9 hayvan) VB talamik hücreler kendi kontrol grubuna göre kıyaslandığında yalnızca intraburst ateşleme frekansının anlamı derece arttığı gözlenmiş, analiz edilen diğer parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı sayıda uyarı alan GAERS-*kindling* (n=11 hücre, 6 hayvan) grubu kendi kontrolüne göre kıyaslandığında analiz edilen bütün parametrelerde bir azalma gözlenirken, *burst* yüzdesinin anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. VB talamus nöronlarının interiktal ateşleme özellikleri ayrıntılı olarak Tablo 4.2’de verilmiştir.

NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* gruplarına bakıldığında ise analiz edilen tüm parametreler yönünden birbirlerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermişlerdir (Şekil 4.9). NEK-*kindling* grubunda VB talamik hücrelerinin GAERS-*kindling* grubundaki VB talamus hücrelerine kıyasla daha yavaş frekansta ve daha çok *burst* şeklinde epileptiform bir ateşleme paterni izlenmiştir.

Şekil 4.10'da VB talamus hücrelerinin interiktal özellikleri analize edilen parametreler bakımından tüm grupları karşılaştıracak şekilde verilmiştir.

NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* gruplarındaki AP süresi ise her iki grupta da $1,2 \pm 0,1$ msn olarak bulunmuş, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Şekil 4-11'de NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* gruplarında VB talamus hücrelerin AP sürelerine göre dağılımı verilmiştir.

Tablo 4-2: VB Talamus Nöronlarının İnteriktal Ateşleme Özellikleri

Analiz edilen parametreler /Gruplar	NEK Kontrol (n=8 hücre, 5 hayvan)	GAERS Kontrol (n=10 hücre, 5 hayvan)	NEK Kindling (n=20 hücre, 9 hayvan)	GAERS Kindling (n=11 hücre, 6 hayvan)
Ateşleme Frekansı	3,8 ±0,7	14,3±3,1 ^{##}	5,9±1,7	12,1±2,4 ^{**}
Burst Yüzdesi	15,7± 6,6	4,3±1,3	24,7±4,9	1,0±0,4 ^{**, †}
Burst başına düşen ortalama AP sayısı	2,7±0,2	2,3±0,1 [#]	2,9±0,2	2,2±0,2 ^{**}
Burst başına düşen maksimum AP sayısı	3,9±0,3	3,5±0,4	4,2±0,2	2,6±0,3 ^{***}
Intraburst Ateşleme Frekansı	296,5±22,5	310,5±12	384,5±14,9 ^{°°}	285,9±10,8 ^{***}

Veriler ortalama ± ortalamanın standard hatası (SEM) şeklinde ifade edilmiştir.

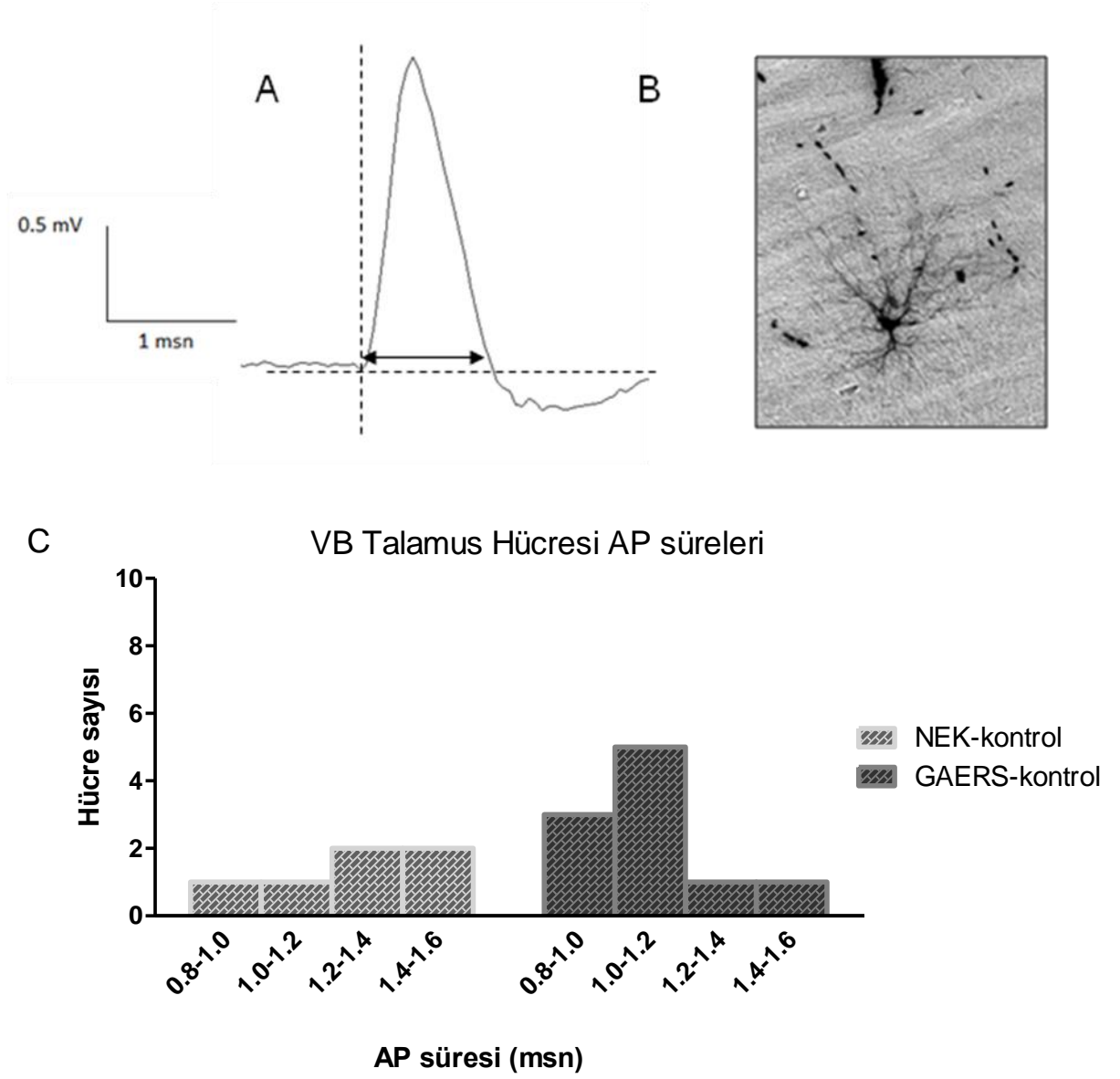
* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, NEK-kindling ve GAERS-kindling grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark.

°° p<0.01, NEK-kontrol ve NEK-kindling grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark.

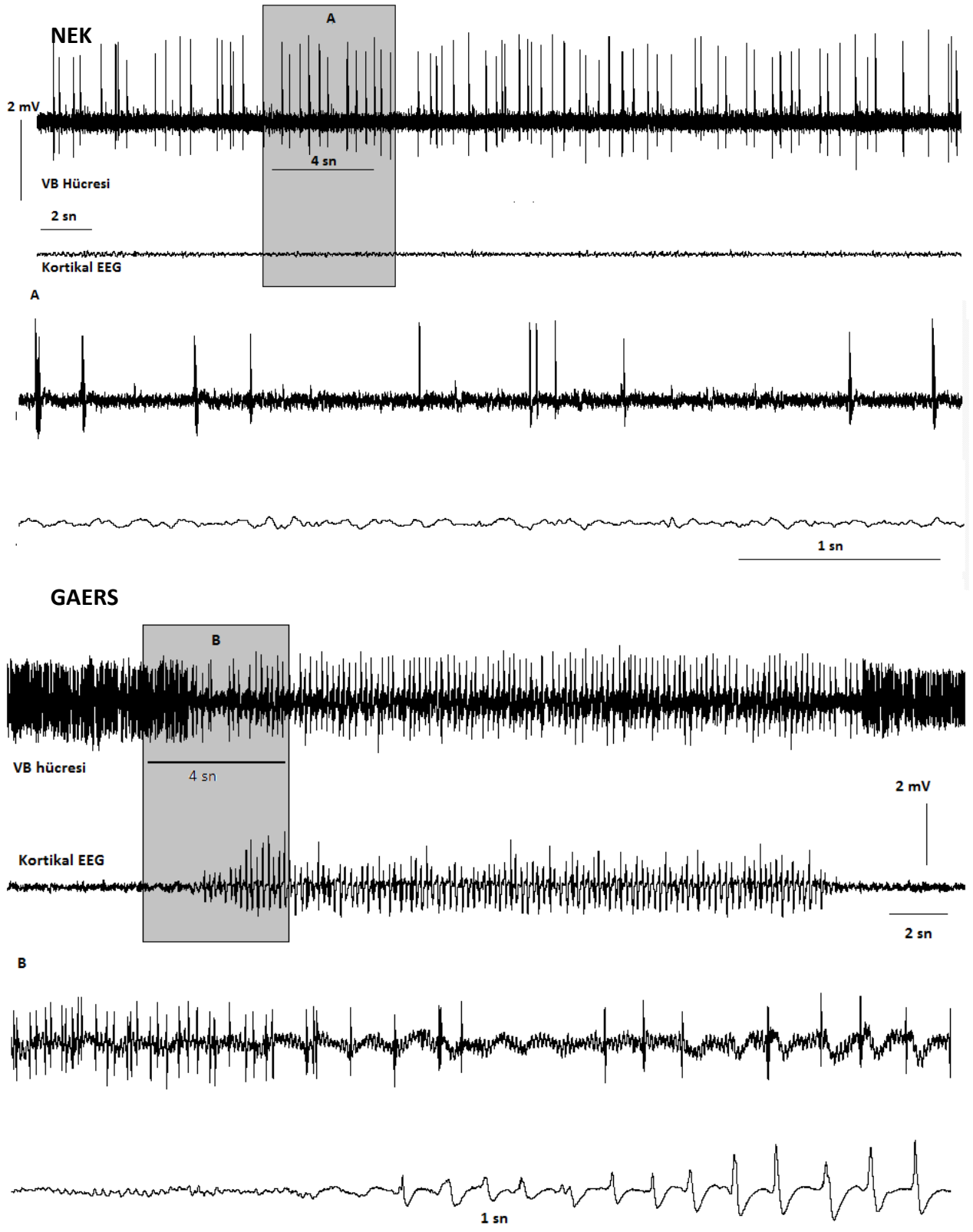
† p<0.05, GAERS-kontrol ve GAERS-kindling grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark.

p <0.05, ## p <0.01, NEK-kontrol ve GAERS-kontrol grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark.

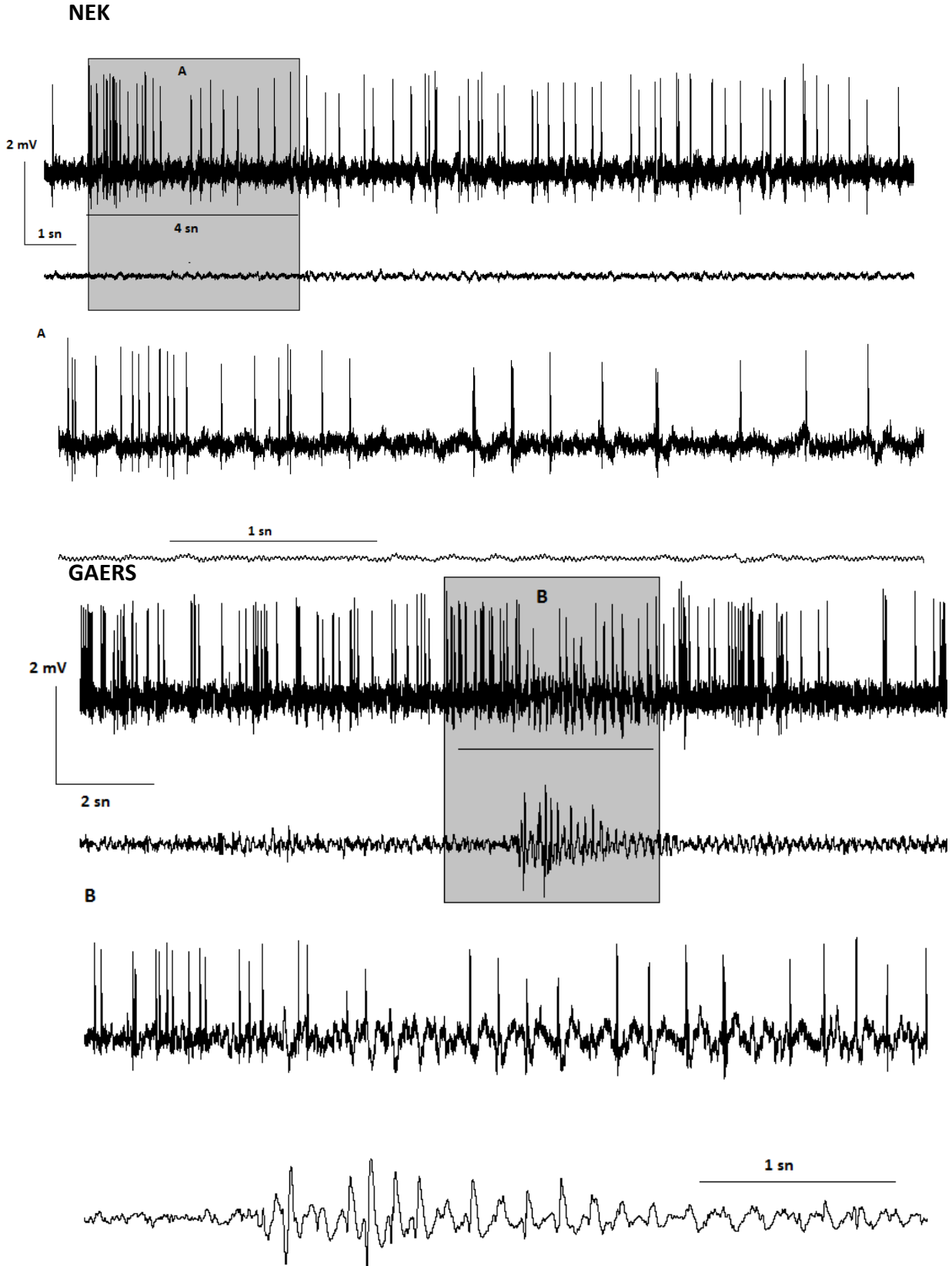
AP: Aksiyon potansiyeli.



Şekil 4-7: NEK-kontrol ve GAERS-kontrol gruplarında VB thalamus hücrelerine ait AP süreleri. VB thalamus hücresine ait AP eğrisi (A) ve Vb thalamus hücresi (B) verilmiştir. NEK-kontrol ve GAERS-kontrol gruplarında VB thalamus hücre sayısının AP sürelerine (msn) göre dağılımı verilmiştir (C).

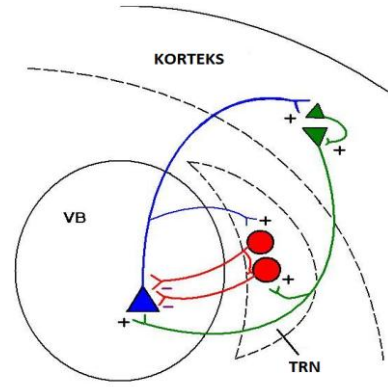
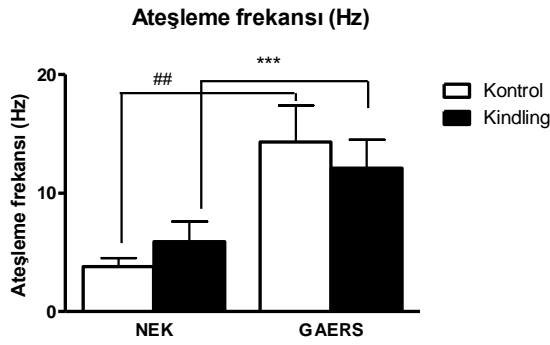


Şekil 4-8: Kontrol NEK (A) ve GAERS (B) gruplarından kaydedilen VB talamus hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri. 4 saniyelik periyodlar açılmış şekilde her grup için gösterilmiştir. GAERS (B) grubunda DDD sırasında VB ateşlemesinde meydana gelen değişiklik görülmektedir.

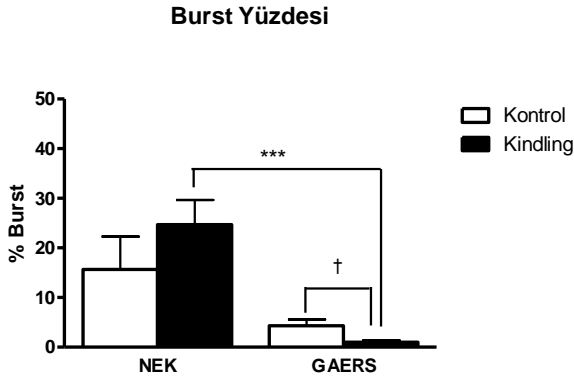


Şekil 4-9: Kindling uyarıları sonrasında NEK-kindling (A) ve GAERS-kindling (B) gruplarından kaydedilen VB thalamus hücrelerinin interiktal ateşleme özellikleri. 4 saniyelik periyodlar açılmış şekilde her grup için gösterilmiştir.

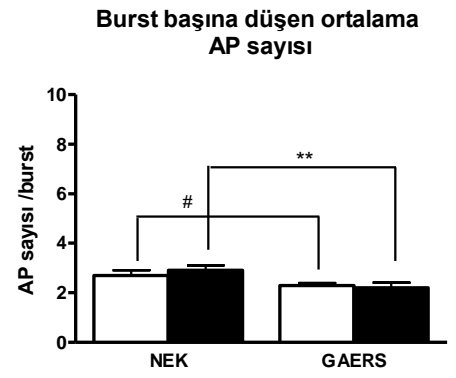
A



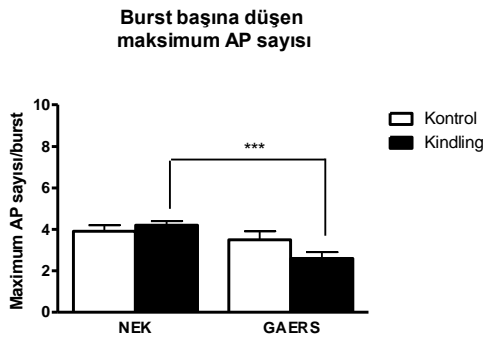
B



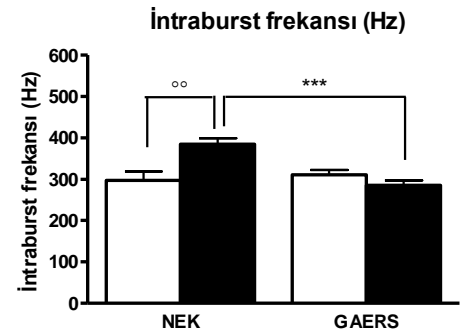
C



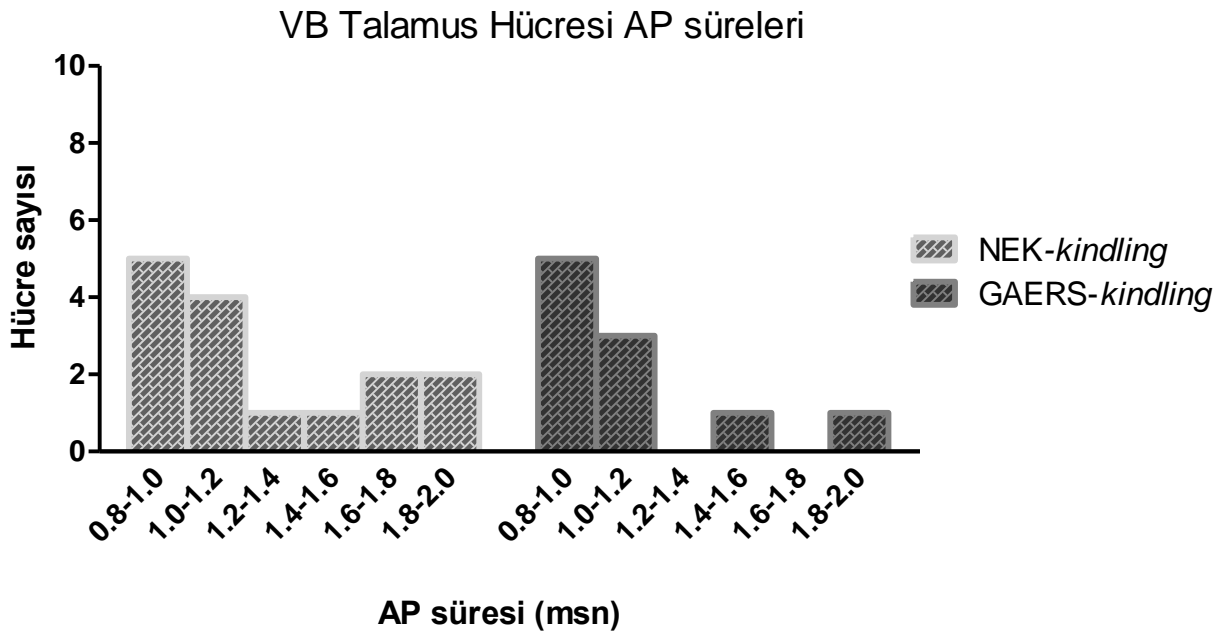
D



E



Şekil 4-10: VB Talamus Nöronlarının İnteriktal Ateşleme Özellikleri. Ateşleme frekansı (A), *Burst* yüzdesi (B) *Burst* başına düşen ortalama AP sayısı (C), *Burst* başına düşen maksimum AP sayısı (D) ve İntraburst frekansı (E) özellikleri bakımından tüm gruplar karşılaştırılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark. °° $p < 0.01$, NEK-kontrol ve NEK-*kindling* grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark. † $p < 0.05$, GAERS-kontrol ve GAERS-*kindling* grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, NEK-kontrol ve GAERS-kontrol grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark. AP: Aksiyon potansiyeli.



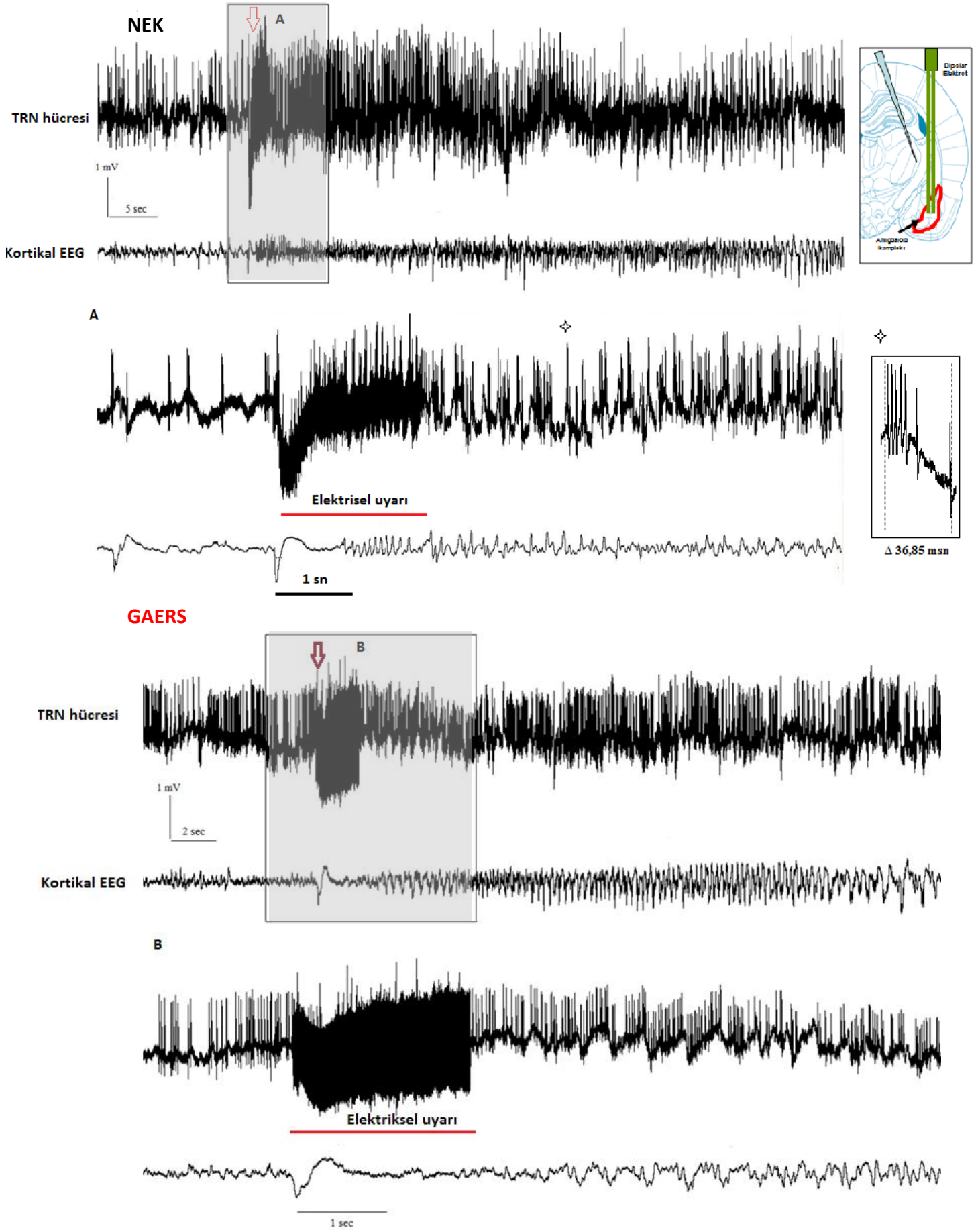
Şekil 4-11: NEK-kindling ve GAERS-kindling gruplarında VB thalamus hücrelerine ait AP süreleri. NEK-kindling ve GAERS-kindling gruplarında VB thalamus hücre sayısının AP sürelerine (msn) göre dağılımı verilmiştir.

4.2. *Kindling* Nöbeti Sırasındaki Hücresel Aktivite

Kindling süreci boyunca toplam 30 adet uyarı alan NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* gruplarındaki hayvanlar nörolept anestezisi altında *in-vivo* ekstraselüler tek hücre kayıtları sırasında amigdala bulunan uyarı elektrodu ile bir stimülatöre bağlanarak uyarılmışlardır. Herbir hayvan için AD eşik şiddetinde verilen elektriksel uyarı, amigdala ve kortekste EEG’de izlenen diken deşarjlarla karakterize nöbet aktivitesini indüklerken bu sırada kayıt alınan talamik hücrelerde (TRN ve VB) ateşleme değişikliklerine neden olmuştur.

4.2.1. *Kindling* nöbeti sırasında TRN Hücrelerinde Meydana Gelen Ateşleme Değişiklikleri

Nöroleptik anestezi altında NEK-*kindling* ve GAERS-*kindling* gruplarına verilen elektriksel uyarılar EEG’de izlenen bir nöbet aktivitesi oluşturmuştur. İndüklenen nöbet süresi NEK-*kindling* grubunda $43,3 \pm 14$ sn, GAERS- *kindling* grubunda ise $40,9 \pm 9,2$ sn olarak bulunmuştur. *Kindling* nöbeti sırasında NEK-*kindling* grubundaki hayvanların (n=10, 6 hayvan) TRN nöronlarında *kindling* uyarısı nöbetin hemen başlangıcında ateşleme değişikliğine neden olmuş, TRN hücrelerinin AP deşarjları EEG’deki diken deşarjlar ile eşzamanlı, ritmik senkronize ateşlemeler göstermişlerdir (Şekil 4.12A). GAERS-*kindling* grubunda ise (n=18 hücre, 5 hayvan) verilen *kindlig* uyarısı TRN hücrelerinde nöbet başlangıcında belirgin bir değişikliğe neden olmazken, nöbetin sonlarına doğru NEK’lere kıyasla gecikmeli olarak kısa süreli, EEG’deki diken deşarjlar ile eşzamanlı senkronize ve ritmik ateşleme göstermişlerdir (Şekil 4.12B). NEK-*kindling* grubunda TRN nöronlarının AP deşarjları uyarıdan $6,0 \pm 1,3$ sn sonra nöbet ile senkronize ve ritmik bir hal almıştır. GAERS-*kindling* grubunda ise $15,5 \pm 2,1$ sn olan bu süre NEK-*kindling* grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede uzun bulunmuştur (p=0.004). TRN hücreleri her iki grupta nöbet sırasında *burst* modunda ateşlemeler göstermiştir. İlk *burst* modundaki ateşleme NEK-*kindling* grubunda uyarı sonrasında $3,9 \pm 0,6$ sn, GAERS-*kindling* grubunda ise $7,8 \pm 1,0$ sn olarak NEK-*kindling* grubuna kıyasla anlamlı derecede uzun bulunmuştur (p=0,01).

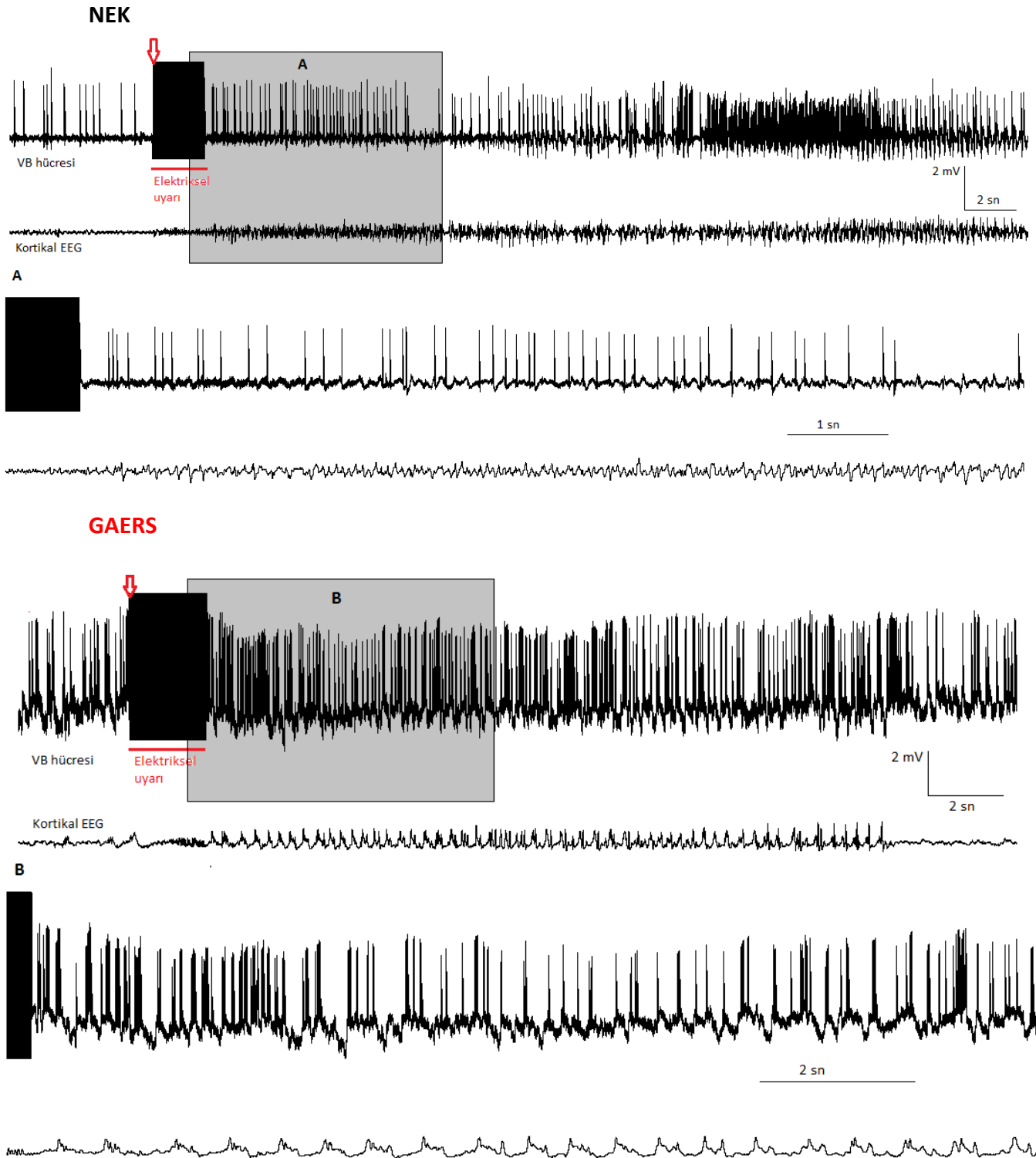


Şekil 4-12. Şekil yazısı için arka sayfaya bakınız.

4.2.2. *Kindling* nöbeti sırasında VB Talamus Hücrelerinde Meydana Gelen Ateşleme Değişiklikleri

Kindling nöbeti sırasında NEK-*kindling* grubundaki hayvanlarda (n=20, 9 hayvan) VB talamus nöronları nöbetin sonlarında etkilenmiş ve kortikal diken deşarjlarla eşzamanlı ateşlemeler göstermiştir (Şekil 4.13A). Buna karşılık GAERS-*kindling* grubunda (n=11 hücre, 6 hayvan) VB hücreleri nöbetin hemen başlangıcında etkilenerek kortikal deşarjlar ile senkronize ritmik patlama tarzında ateşlemeler göstermişlerdir (Şekil 4.13B). NEK-*kindling* grubunda VB talamus nöronlarının AP deşarjları uyarıdan $14,9 \pm 3,2$ sn sonra nöbet ile senkronize ve ritmik bir hal almıştır. GAERS-*kindling* grubunda ise $4,5 \pm 0,7$ sn olan bu süre NEK-*kindling* grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede kısa bulunmuştur ($p=0.01$). VB talamus hücreleri her iki grupta nöbet sırasında *burst* modunda, ateşlemeler göstermiştir. İlk *burst* modundaki ateşleme NEK-*kindling* grubunda uyarı sonrasında $5,3 \pm 1,1$ sn, GAERS-*kindling* grubunda ise $2,6 \pm 0,3$ sn olarak daha kısa bulunmuş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir ($p=0,06$).

Şekil 4-12: *Kindling* nöbeti sırasında TRN hücrelerinde meydana gelen ateşleme değişiklikleri. NEK-*kindling* (A) ve GAERS-*kindling* (B) gruplarında uyarı öncesi ve uyarı sonrası dönem örneklenmiştir. Kutu içine alınmış 10 sn'lik zaman dilimleri NEK (A) ve GAERS (B) grubundaki hayvanlar için ayrı ayrı alttaki traselerde açılmış şekilde verilmiştir. NEK grubunda uyarı sonrası dönemde oluşan *burst* modundaki ateşlemelerden bir tanesi '★' ile işaretlenerek açık şekilde yan tarafta verilmiştir. *Burst* içindeki ilk AP ile son AP arasındaki fark 36.85 ms olarak hesaplanmıştır. Şeklin sağ üst köşesinde amigdala bulunan uyarı elektrodu ile kayıt alınan cam elektrodun yerleşimleri sıçan atlası üzerinde şematize edilmiştir.



Şekil 4-13. Şekil yazısı için arka sayfaya bakınız.

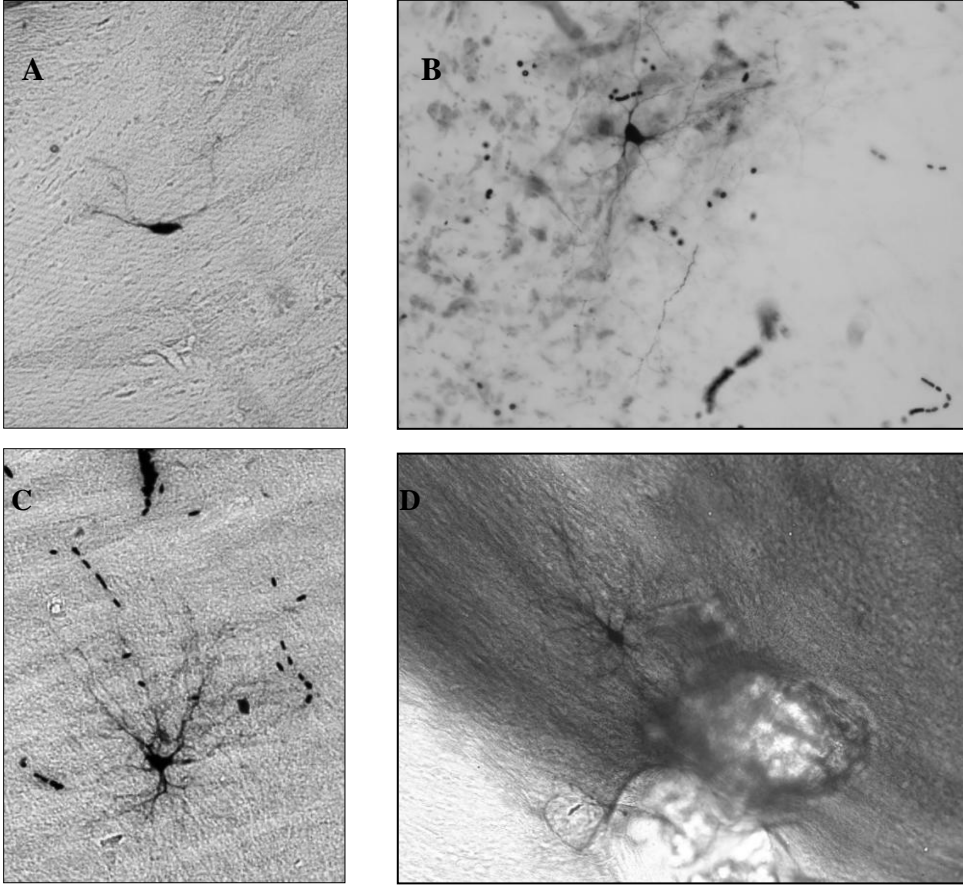
4.3. Jukstaselüer olarak işaretilenen TRN ve VB Talamus Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri

Nöroleptik anestezi altında *in-vivo* koşullarda kayıt edilen TRN ve VB talamus hücreleri kayıt bitiminde nörobiotin ile doldurulmuş cam pipetler aracılığı ile jukstaselüer işaretleme tekniği kullanılarak (Pinault 1996) belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Kayıt bitiminde jukstaselüer işaretleme yapılan 20 hücreden 10 tanesi başarılı şekilde belirlenerek mikroskop altında incelemiştir. Kayıt işlemleri sonunda izleyici madde ile doldurulan TRN nöronlarının ışık mikroskonu altında bipolar, yuvarlak gövdeli, nöron gövdesinden primer olarak çıkan ve diken şeklinde dallanan uzun dentritlerden oluştuğu ve dentritlerin kendi içinde 3-5 dala ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.14). TRN nöronlarının aksonları tam olarak izleyici madde ile dolmadığı için hücre aksonları mikroskop altında seçilememiştir.

İşaretleme yapılan 25 VB talamus hücresinden 10 tanesi mikroskop altında incelenebilmiştir. VB talamus nöronlarının ışık mikroskobu altında TRN hücrelerine göre daha büyük, *bushy* tipte, multipolar, yuvarlak gövdeli olduğu, dentritlerin ise hücre gövdesinden uzaklaştıkça kendi içinde giderek daha çok dallanma gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4-14).

Şekil 4-13: Kindling nöbeti sırasında VB thalamus hücrelerinde meydana gelen ateşleme değişiklikleri. NEK-kindling (A) ve GAERS-kindling (B) gruplarında uyarı öncesi ve uyarı sonrası dönem örneklenmiştir. Kutu içine alınmış 10 saniyelik zaman dilimleri NEK (A) ve GAERS (B) grubundaki hayvanlar için ayrı ayrı olarak alttaki traselerde açılmış şekilde verilmiştir.



Şekil 4-14: Jukstaselüler işaretleme yöntemi ile boyanan TRN (A-B) ve VB talamus (D-E) hücreleri. Resimlerde ışık mikroskobu altında x40 büyütme ile nörobiotin ile işaretlenen TRN ve VB talamus hücrelerinin karakteristik özellikleri görülmektedir.

5. TARTIŞMA

GAERS ve NEK sıçanlarda *kindling* sürecinin talamokortikal döngüdeki tek bir nöronun ateşleme paterni üzerindeki etkisinin *in-vivo* koşullarda incelendiği bu ilk ve özgün çalışmada elde edilen ana bulgular şöyle özetlenebilir:

1. *Kindling* uyarıları NEK sıçanlarda TRN hücrelerinin düşük frekanslı, çoğunlukla *burst* şeklinde epileptiform ateşlemeler göstermesine neden olurken bu değişiklikler aynı sayıda uyarı alan GAERS'lerde gözlenmemiştir.
2. *Kindling* nöbeti sırasında TRN nöronları NEK sıçanlarda nöbetin hemen başlangıcında kortikal diken deşarjlar ile senkronize ritmik ateşleme değişikliği gösterirken bu durum GAERS'lerde gözlenmemiştir.
3. *Kindling* uyarıları NEK sıçanlarda VB talamus nöronlarının ateşleme paterninde belirgin bir değişikliğe neden olmazken GAERS'lerde *burst* yüzdesinin azalmasına neden olmuştur.
4. *Kindling* nöbeti sırasında VB talamus nöronları NEK sıçanlarda nöbetin sonlarında kortikal diken deşarjlar ile senkronize ritmik ateşleme değişikliği gösterirken GAERS'lerde nöbetin hemen başında nöbete eşlik eder tarzda ritmik ve *burst* şeklinde ateşlemeler göstermişlerdir.

Bu bölümde yukarıdaki ana bulgular doğrultusunda *kindling* sürecinde limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonu ile senkronize talamokortikal döngü ritimleri arasındaki ilişki GAERS suşu sıçanlarda görülen *kindling* direnci üzerinden tartışılacaktır.

5.1. GAERS'lerde *Kindling* Direnci

Çalışmada AD eşik şiddetinde geleneksel *kindling* protokolü uygulanan NEK sıçanlarda 30 uyarının sonunda sekonder jeneralize motor konvülsiyonlar (Evre 5) görülmüş GAERS'ler ise daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak (Eşkazan ve ark. 2002) verilen aynı sayıdaki uyarıya rağmen lokal olarak başlayan nöbetin sekonder jeneralizasyonuna direnç göstererek 2. evre nöbet seviyesinde kalmışlardır. Ancak bir hayvanda bu direnç kısmi olarak kırılmış ve bu hayvanda fokal başlayan *kindling* nöbeti

jeneralize olarak hayvan 4. evre nöbet seviyesine ulaşmıştır. Yapılan çalışmalarda genetik absans epilepsili sıçanlar arasında nöbet hassasiyeti bakımından bireysel farklılıklar görüldüğü bildirilmiştir (Midzyanovskaya ve ark. 2004; Aker ve ark. 2006). Bununla birlikte GAERS'lerde limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonuna karşı görülen direncin mutlak olmadığı ve tetikleyici etkenin büyüklüğüne başka bir deyişle meydana getirdiği nöronal hasara bağlı olarak kırılabilirdiği gösterilmiştir (Onat ve ark. 2005; Gurbanova ve ark. 2008). Diğer bir genetik absans epilepsili sıçan modeli olan WAG-Rij sıçanlarda *kindling* modeline direnç göstermeyen alt grubun bazal EEG'sinde direnç gösteren alt guruba kıyasla daha az DDD aktivitesi bulunduğu gösterilmiş ve bundan DDD'nin altında yatan talamokortikal döngü içindeki senkronizasyon derecesinin *kindling* direnci ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Şimdiki çalışmada direnç gözlenmeyen bu tek hayvandaki bireysel farklılık, DDD oluşumundan sorumlu sistemdeki senkronizasyonun üzerinde etkili olabilir ya da tetikleyici etkenin şiddetini arttırarak limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonunu kolaylaştırmış olabilir.

5.2. Talamokortikal Döngü ve *Kindling* Direnci Arasındaki İlişki

GAERS'lerde *kindling* direncinin incelendiği çalışmalarda talamokortikal döngü ile limbik döngülerin birbirleriyle ilişkili olduğu işaret edilmektedir (Çarçak ve ark. 2008; Onat ve ark. 2005; Aker ve ark. 2006; Onat ve ark. 2007; 2009). Ancak bu ilişkinin hangi şekilde oluştuğu ve tam olarak hangi beyin bölgelerinin bu dirençte aktif rol oynadığı gibi sorulara henüz cevap verilememiştir. Bu nedenle limbik epilepsi ile absans epilepsisi arasındaki ilişkinin daha ayrıntılı incelemesi gerekmektedir.

Bu çalışma ilk olarak amigdala *kindling* modelinde *in-vivo* koşullarda tek bir nöron düzeyinde talamusun oynadığı rolü (hem *kindling* nöbeti sırasında hem de uyarı almış hayvanlardaki talamus hücrelerinde meydana gelen ateşleme değişikliklerinden anlaşıldığı üzere) açıkça ortaya konmuştur. Chassagnon ve arkadaşları (2005) Wistar sıçanlarda amigdala *kindling* modelinde 5. evre nöbet sırasında ölçülen lokal serebral kan akım hızının VB talamusta (ventroposteromedyan (VPM) ve ventrolateral (VL) çekirdeklerde) oldukça yüksek oranda artmasına bağlı bir aktivasyon göstermişlerdir. Bunu destekler nitelikte bu çalışmada NEK-*kindling* grubu sıçanlarda VB talamus hücrelerinde interiktal dönemde ateşleme frekansının ve *burst* yüzdesinin arttığı bulunmuştur. GAERS-*kindling* grubunda ise bu parametrelerin uyarı almayan kendi kontrolüne göre azaldığı gösterilmiştir. Kemirgenlerde oluşturulan PTZ (Mirski ve ark.

1986), pilokarpin (Bittencourt ve ark. 2010), amigdala *kindling* (Gallego ve ark. 2009) gibi epilepsi modellerinde çeşitli talamik çekirdeklerin (mediodorsal, reuniens, anterior talamik çekirdek) lokal GABAerjik ajan mikroenjeksiyonları, lezyon ya da yüksek frekanslı uyarı ile inhibisyonunun (Mirski ve ark. 1997) antikonvülsan etkili olduğu ve nöbetin jeneralizasyonunu etkilediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Benzer şekilde klinik çalışmalarda anterior talamik çekirdeğin inhibitör elektriksel akım ile uyarılmasının nöbet jeneralizasyonu etkilediği gösterilmiştir (Andeade ve ark.2006). Bu durum talamusun subkortikal yapılardan kortkese ve korteksen subkortikal yapılara bilgi akışında gerek motor fonksiyonların, postur ve hareketlerin koordinasyonunda gerekse limbik fonksiyonların kontrolünde rol oynadığını düşündürmektedir (Price 1995). Bunlara ek olarak genetik ve farmakolojik absans epilepsi modellerinde ekstrasinaptik GABA_A reseptör bağımlı tonik inhibisyonunun arttığı bildirilmiştir (Cope ve ark. 2009). Bu çalışmada GAERS-*kindling* grubundaki VB talamus ateşleme frekansının ve burst yüzdesinin düşük olması yukarıdaki çalışmalar ile uyumludur. GAERS’lerde talamustaki artmış GABAerjik aktivite *kindling* nöbetinin sekonder jeneralizasyonu engelliyor olabilir. arttığının Bütün bu bilgiler ışığında talamus amigdaldan kaynaklanan limbik nöbetin jeneralizasyonunu durdurmak üzere seçilebilecek uygun bir hedef olarak düşünülebilir.

NEK-*kindling* grubundaki hayvanlarda *kindling* nöbeti sırasında TRN’nin nöbet ile eşzamanlı olarak ateşlemesi buna karşılık GAERS-*kindling* grubunda *kindling* direnci ile ilişkili olarak böyle bir değişikliğin görülmemesi TRN’nin amigdala *kindling* modelinde limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonunda mekanistik bir rol oynadığını düşündürmektedir. *Kindling* uyarısı almış NEK sıçanlarda TRN ateşlemesinin düşük frekanslı ve burst şeklinde ateşlemelerden oluşan epileptiform bir hal alması TRN’nin amigdala *kindling* modelinde epileptogenez üzerinde rol oynadığını göstermektedir. Epileptogenez mekanizmalarını incelendiği pilokarpin (Guo ve ark. 2009) ve kainik asit (Goffin ve ark. 2009) modellerinde talamusun epileptogenez boyunca istikrarlı bir şekilde hipometabolizasyon gösterdiği ve bunun epileptik beyinde meydana gelen nöral plastisite nedeniyle oluşabileceği ortaya atılmıştır (Joo ve ark. 2005). Bu çalışma ilk olarak metabolizasyon ve görüntüleme çalışmalarının dışında epileptogenez boyunca elektrofizyolojik olarak talamusta meydana gelen değişiklikleri göstermesi bakımından önem taşımaktadır. GAERS’lerde *kindling* uyarıları ile talamusta böyle bir değişikliğin

gözlenmemesi bu hayvanlarda talamus düzeyinde epileptogenez sürecinin baskılandığını düşündürülebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar TRN'nin talamik relay nöronlar üzerindeki ritmik inhibitör etki ile oluşturduğu jeneralize nonkonvülsif nöbetlerden başka limbik, özellikle de hipokampal nöbetlerde rol oynadığını ve öğrenme, hafıza ve uzaysal kognisyon gibi ileri kognitif fonksiyonlarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Avanzini ve ark. 1992; Bertram ve ark. 1998; McAlonan ve Brown 2002). TRN hipokampal formasyondan direkt projeksiyon alan tek çekirdektir (Dolleman-Vander Weel 1997). TRN ile temporal lob yapıları arasındaki bağlantılar son yıllarda yapılan çalışmalar ile desteklenmektedir. WAG/Rij suşu sıçanlarda hipokampal formasyona yapılan antiepileptik ilaç enjeksiyonları talamokortikal döngü içerisinde oluşan DDD'lerin azalmasına neden olmuştur (Tolmacheva ve van Luijtelaar, 2007). Bunu destekler nitelikte hipokampal *kindling* modelinde TRN'nin eşzamanlı uyarılmasının limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Nanobashvili ve ark. 2002). Bu bulgu *kindling* nöbeti sırasında talamokortikal sistemin çeşitli şekillerdeki modülasyonunun talamik relay hücrelerde inhibisyona neden olarak motor konvülsiyonların oluşumunu etkileyebileceğini düşündürmektedir. Nitekim limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonuna direnç görülen GAERS'lerde kortikal DDD sırasında talamokortikal relay hücreler TRN hücrelerinden gelen tekrarlayıcı IPSP'ler nedeniyle tonik hiperpolarizasyon gösterirler (Steriade ve Contreras, 1995).

Bütün talamik relay hücreler gelen eksitatör inputa karşılık tonik ya da *burst* adı verilen 2 farklı ateşleme modundan biri ile cevap verirler (Sherman 2001). Tonik ateşleme modunun normal uyanık durumlarında burst modunun ise uyku sersemliği, yavaş dalgalı uyku ve çeşitli patolojik durumlarda olduğu bildirilmiştir (Steriade ve ark. 1993). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar burst modunun normal uyanıklık durumunda normal talamik fonksiyonun bir olduğunu ve dikkat ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Sherman 2001). Tonik ateşleme sırasında AP'ler direkt olarak o hücredeki eksite edici postsinaptik potansiyele (EPSP) bağlıdır. Ancak burst modunda EPSP ile AP arasındaki bağlantı indirektir. Buna ek olarak *burst* şeklindeki ateşlemeler nöronlar arasında güvenilir bilginin iletimi için gereklidir (Lisman 1997). *Burst* şeklindeki AP'ler tonik AP'lere göre bilginin sinaptik olarak iletiminin kesin olmasını ve bilginin nöronlar arasında selektif olarak aktarılmasını sağlar. Yüksek intraburst

frekans gösteren nöronlar daha büyük postsinaptik potansiyel oluşturarak sinaptik iletinin netliğinin sağlaması bakımından önem taşımaktadır (Izhikevich ve ark. 2003). Tekrarlayan uyarılar NEK-*kindling* grubunda jeneralize konvülsif nöbet seviyesine bağlı olarak (5. evre) daha çok *burst* şeklinde ateşleme görülmesine neden olmuştur. Aynı sayıda uyarı alan fakat nöbet evresi olarak fokal limbik nöbetin görüldüğü evrede (2.evre) kalan GAERS'lerde tersine burst yüzdesinin azaldığı dikkati çekmektedir. Bu farklılık bu nedenle her iki grupta verilen aynı sayıda uyarıya rağmen farklı nöbet evresi izlenmesine neden olmuş olabilir. Bu durum her iki grupta *kindling* evrelerinin gelişiminin altında yatan mekanizmaları birbirinden farklı olduğunu açıklamaktadır.

Kindling uyarısı alan hayvanlarda TRN ve VB talamus nöronlarında meydana gelen *burst* epileptiform ateşleme paterni talamokortikal sistem ile limbik sistem arasındaki etkileşimi oldukça net bir şekilde ortaya koymaktadır. Amigdala ve hipokamus talamusun orta hatta yakın bölümünde bulunan çekirdekleri ile bağlantılıdır (Zhang ve Bertram, 2002). Mediodorsal, sentromedyal ve anterior çekirdek gibi limbik çekirdekler TRN'nin rostral bölgesi ile limbik bölgesi arasında çift yönlü iletişim halindedir (Onat ve ark. 2009; Çavdar ve ark, 2007; Romanski ve LeDoux 2002). TRN hücrelerinin NEK grubunda *kindling* nöbeti sırasında nöbet ile senkronize ritmik ateşlemelerde bulunması limbik çekirdekleri aracılığıyla amigdala üzerinden eksitatör input aldığını göstermektedir (Şekil 5.1).

5.3. Metodolojik Hususlar

Çalışmada kullanılan *in-vivo* yöntem elektrofizyolojik kayıtların deney hayvanlarında intakt sinaptik bağlantıların korunduğu, GAERS'ler için ise normalde spontan oluşan DDD'ler varlığında alınması yönünden avantaj sağlamıştır.

Nörolept anestezisi altında alınan kayıtlarda anestezinin hücre ateşlemesi ve nöbet üzerine etkili olabileceği düşünülebilir. Ancak GAERS ve WAG-Rij sıçanlarda yapılan çalışmalarda nörolept anestezisinin temel elektrofizyolojik ve davranışsal özellikleri değiştirmedeği yalnız bu koşullarda DDD oluşumunu fasilite ettiği, prokonvülsan etkili olduğu, bildirilmiştir. (Inoue ve ark. 1994; Seidenbecher ve ark. 1998). Bu çalışmada nörolept anestezisi altında GAERS-kontrol grubundan kaydedilen DDD'ler süre ve ortalama frekans bakımından daha önce tanımlandığı (Marescaux ve ark. 1992; Vergnes ve ark. 1986) şekilde gözlenmiştir. Amigdalaya uygulanan elektriksel uyarı ise uyanık hayvandakine benzer şekilde ve GAERS ve NEK

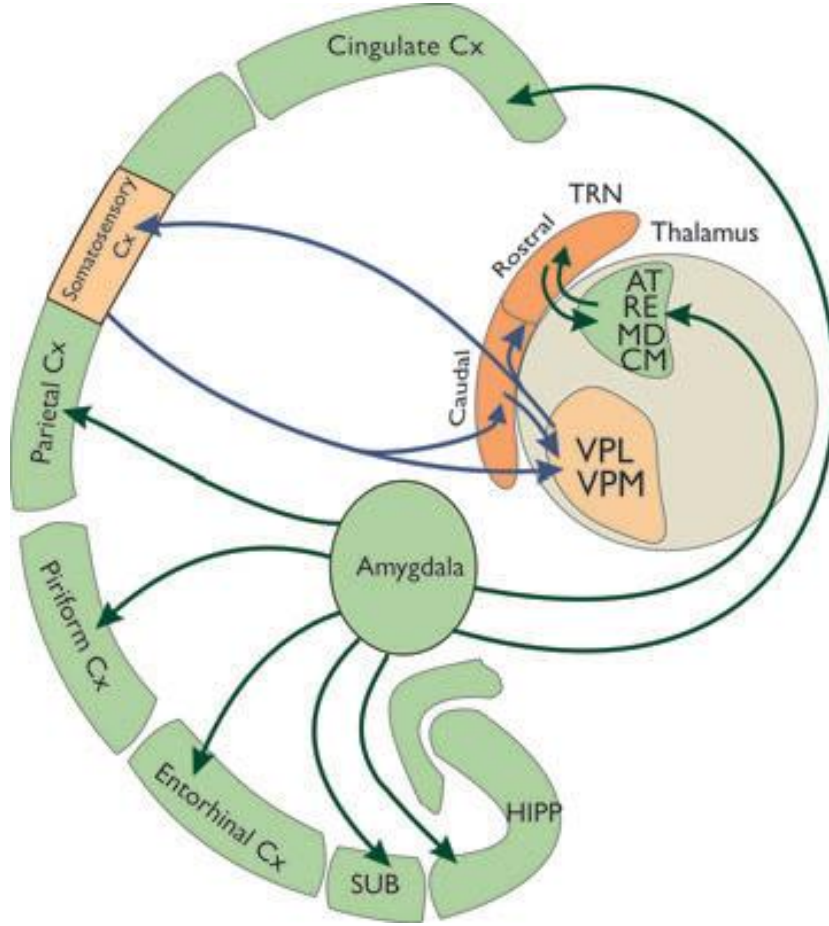
gruplarında EEG’de kortikal deşarjlardan oluşan nöbet aktivitesi indüklemiş ve nöbet süresi bakımından farklılık gözlenmemiştir. Amigdala *kindling* modelinin bir avantajı bu modelin oluşturulduğu hayvanlarda (*fully kindled*), bundan sonra verilen artçı uyarıların modelin özelliklerini değiştirmemesidir (Goddard ve ark. 1969). Bu nedenle elektrofizyolojik kayıt sırasında elektriksel uyarı verilmesi uygun görülmüştür.

5.4. Yapılması planlanan çalışmalar

Bu çalışmada eşit sayıda *kindling* uyarısı alan NEK ve GAERS suşu sıçanlarda talamik hücrelerdeki ateşleme farklılıkları birbirleri ile ve uyarı almayan kendi kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Eşit sayıda *kindling* uyarısı almalarına rağmen NEK suşu sıçanlarda *kindling* nöbeti jeneralize olurken (5. evre), GAERS’lerde *kindling* direnci görüldüğünden *kindling* sürecinin sonunda 2. evre limbik nöbet seviyesinde kalmışlardır. Aynı sayıda uyarı almalarına rağmen her iki grup arasındaki nöbet jeneralizasyon derecesinin farklı olması ateşleme değişiklerinin farklı olmasına ya da ateşleme değişikliklerinin farklı olması evrelerin farklı olmasına neden olmuş olabilir. Aslında bu sorunun cevabı çalışmaya eklenebilecek erken *kindling* grupları ile verilebilir. İleride yapılması planlanan bu çalışmada her iki gruptaki hayvanlar ortak eriştikleri nöbet seviyesi olan 2. evre nöbet seviyesine ulaşana kadar uyarıldıktan (maksimum 6 uyarı) sonra talamik hücre ateşleme farklılıklarının incelenmesi hem evre hem de uyarı sayısının eşitlendiği durumda iki suş arasındaki farklılığın gösterilebilmesi amaçlanmaktadır.

5.5. Sonuç

Çalışmamız amigdala *kindling* sürecinde ve amigdaladan indükelen *kindling* nöbeti sırasında NEK ve GAERS sıçanlarda *in-vivo* koşullarda talamus ateşlemelerinin elektrofizyolojik olarak kaydedildiği ilk özgün çalışmadır. Elde edilen bulgular talamusun hem amigdala *kindling* epileptogenez sürecinde hem de limbik nöbetin sekonder jeneralizasyonunda mekanistik bir rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 5-1: Talamokortikal ve Limbik Döngüler Arasındaki Etkileşimin Şematik Olarak

Gösterilişi. Talamokortikal döngü *kindling* nöbetlerinin yayılımında amigdala dışında limbik talamik çekirdekleri (AT, RE, MD, CM) ve korteksi aktive edebilir. Amigdaloid çekirdekler, limbik TRN, rostral TRN ile çift yönlü bağlantıları olan talamusun limbik çekirdekleri ile bağlantılıdır. Yeşil ile gösterilen bölgeler beyindeki limbik alanları, turuncu ile gösterilen bölgeler ise talamokortikal döngüyü işaret etmektedir. Koyu yeşil oklar limbic döngüyü, mavi oklar ise talamokortikal döngüyü göstermektedir. Sub, subtalamik çekirdek; Hipp, hipokampus; TRN, talamik retiküler çekirdek; AT, anterior talamik çekirdek; RE, reuniens çekirdek; MD, mediodorsal talamik çekirdek; CM, sentromedyal talamik çekirdek; VPL, ventroposterolateral talamik çekirdek; VPM, ventroposteromedyal talamik çekirdek. *Çarçak ve ark (2009)'dan alınmıştır.*

KAYNAKLAR

- Aker, R.G., Yananlı, H.R., Gurbanova, A.A., Özkaynakçı A.E., Ateş, N., Luijtelaar, G., ve Onat, F.Y. (2006). Amygdala *kindling* in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Epilepsia*, 47(1), 33-40.
- Akman, O., Karson A., Aker, R.G., Ates, N., Onat, F.Y. (2008). Hippocampal *kindling* in rats with absence epilepsy resembles amygdaloid *kindling*. *Epilepsy Research* 81(2-3), 211-219.
- Aktekin, B. ve Kayrak, N. (2008). Epilepsilerde Sınıflandırma Çalışmaları. İçinde: Bora, İ. (Ed.), *Epilepsi*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri; 89-102.
- Alloway, K.D., Johnson, M.J., Wallace, M.B. (1993). Thalamocortical interactions in the somatosensory system: interpretations of latency and cross-correlation analyses. *Journal of Neurophysiology*, 70(3), 892-908.
- Andrade, D.M., Zumsteg, D., Hamani, C., Hodaie, M., Sarkissian, S., Lozano A.M. (2006). Long-term follow-up of patients with thalamic deep brain stimulation for epilepsy. *Neurology*, 66, 1571-1573.
- Avanzini, G., de Curtis M., Marescaux, C., Panzica, F., Spreafico, R., Vergnes, M. (1992). Role of the thalamic reticular nucleus in the generation of rhythmic thalamo-cortical activities subserving spike and waves. *Journal of Neural Transmission Supplementum*, 35, 85-95.
- Avanzini, G., Vergnes, M., Spreafico, R., Marescaux, C. (1993). Calcium-dependent regulation of genetically determined spike and waves by the reticular thalamic nucleus of rats. *Epilepsia*, 34(1), 1-7.
- Avoli, M., Gloor, P. (1982) Interaction of the cortex and thalamus in spike wave discharges of feline generalised penicillin epilepsy. *Experimental Neurology*, 76, 196–217.
- Bittencourt, S., Dubiela F.P., Queiroz C., Covolan, L., Andrade, D, Lozano, A., Mello, L.E., Hamani, C. (2010). Microinjection of GABAergic agents into the anterior nucleus of the thalamus modulates pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. *Seizure*, 19(4), 242-246.
- Blumenfeld, H., McCormick, D.A. (2000) Corticothalamic inputs control the pattern of activity generated in thalamocortical networks. *Journal of Neuroscience*, 20,5153–5162.
- Blumenfeld, H. (2005) Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia*, 46 (Supplement 9), 21-33.

- Blumenfeld, H., Coulter, D.A. (2008) Thalamocortical Anatomy and Physiology. İçinde J Engel, TA Pedley (Ed.), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, (2nd ed.). Oxford: Lippincott Williams & Wilkins, 354-368.
- Bertram, E.H., Zhang, D.X., Mangan, P., Fountain, N., Rempe, D. (1998). Functional anatomy of limbic epilepsy: a proposal for central synchronization of a diffusely hyperexcitable network. *Epilepsy Research*, 32, 194-205.
- Bertram, E. (2007). The relevance of *kindling* for human epilepsy. *Epilepsia*, 48 (Suppl 2):65-74.
- Bertram, E.H., Zhang, D.X., Williamson, J.M. (2008). Multiple roles of midline dorsal thalamic nuclei in induction and spread of limbic seizures. *Epilepsia*, 49, 256-268.
- Bertram, E. (2009). Temporal lobe epilepsy: Where do the seizures really begin? *Epilepsy & Behavior*, 14, 32-37.
- Bourassa, J., Pinault, D., Deschênes, M. (1995). Corticothalamic projections from the cortical barrel field to the somatosensory thalamus in rats: a single-fibre study using biocytin as an anterograde tracer. *European Journal of Neuroscience*, 7(1), 19-30.
- Bragin, A., Wilson, C.L, Jr. Engel, J. (2002). Increased afterdischarge threshold during *kindling* in epileptic rats. *Experimental Brain Research*, 144, 30-37.
- Brandt, C., Ebert, U., Loscher, W. (2004). Epilepsy induced by extended amygdala-*kindling* in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Research*, 62, 135-156.
- Carcak, N., Aker, R.G., Ozdemir, O., Demiralp, T., Onat, F.Y. (2008). The relationship between age-related development of spike-and-wave discharges and the resistance to amygdaloid *kindling* in rats with genetic absence epilepsy. *Neurobiology of Disease*. 32,355- 363.
- Carcak, N., Ferrandon, A., Koning, E., Aker, R.G., Ozdemir, O., Onat, F., Nehlig, A. (2009). Effect of stage 2 *kindling* on local cerebral blood flow rates in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia*, 50(1), 33-43.
- Cavazos, J.E, Sutula, T. (1990). Progressive neuronal loss induced by *kindling*: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Research*, 527, 1-6.
- Cavazos, J.E., Das, I., Sutula, T. (1994). *Kindling* induces a pattern of neuronal loss in the hippocampus that resembles human hippocampal sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 14, 3106–3121.
- Cavazos, J., ve Cross, D. (2006). The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behaviour*, 8, 483–493.

- Cavdar, S., Onat, F., Cakmak, Y.O., Yananlı, H.R., Gulcebi, M., Aker, R. (2008). The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reunions nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat. *Journal of Anatomy*, 212, 249-256.
- Chassagnon, S., Pereira de Vasconcelos, A., Ferrandon, A., Koning, E., Marescaux, C., Nehlig, A. (2005). Time course and mapping of cerebral perfusion during amygdala secondarily generalized seizures. *Epilepsia* 46, 1178–1187.
- Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Yao, Z., Ding, K., Lo, W.H., Qiang, B., Chan, P., Shen, Y., Wu, X., (2003). Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Annals of Neurology* 54, 239–243.
- Cocito, L., Primavera, A. (1998). Vigabatrin aggravates absences and absence status. *Neurology*, 51, 1519-1520.
- Coenen, A.M., Van Luijtelaar, E.L. (2003). Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behaviour Genetics*, 33,635-55.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy: Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. (1989), *Epilepsia*. 30, 389-399.
- Coulter, D.A., Lee, C.J. (1993). Thalamocortical rhythm generation in vitro: extra- and intracellular recordings in mouse thalamocortical slices perfused with low Mg²⁺ medium. *Brain Research*, 631(1), 137-142.
- Coulter, D.A., McIntyre, D. C., Loscher W. (2002) Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? *Brain Pathology*, 12, 240–256.
- Cope, D.W., Giuseppe Di Giovanni, G., Fyson, S.J., Orbán, G., Errington, A.C., Lőrincz, M.L., Gould, T.M., Carter, D.A., Crunelli, V (2009). Enhanced tonic GABAA inhibition in typical absence epilepsy. *Nature Medicine*, 15(12), 1392-1398.
- Crunelli, V., Leresche N. (2002) Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nature Review Neuroscience*, 3(5), 371-382.
- Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., ve Marescaux , C. (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Progress in Neurobiology*, 55,27-57.
- de Curtis, M. Avanzini, G. (1994). Thalamic regulation of epileptic spike and wave discharges. *Functional Neurology*, 9(6), 307-326.
- Depaulis, A., van Luijtelaar, G. (2006). Genetic models of absence epilepsy in the rat. İçinde: Pitkanen, A., Schwartzkroin, P., Moshe, S. (Eds.) *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Inc, San Diego, CA, 233–248.

- Deschênes, M., Hu, B. (1990). Electrophysiology and Pharmacology of the Corticothalamic Input to Lateral Thalamic Nuclei: an Intracellular Study in the Cat. *European Journal of Neuroscience*, 2(2), 140-152.
- Destexhe, A., McCormick D.A., Sejnowski, T.J. (1999) Thalamic and thalamocortical mechanisms underlying 3 Hz spike-and-wave discharges. *Progressive Brain Research*, 121, 289-307.
- Dodson, W.E. (2004). Definitions and Classification of Epilepsy. İçinde: Shorvon S, Perucca E, Fish D, Dodson E (Eds.). *The Treatment of Epilepsy*. Blackwell Science, Massachusset, USA, 3-20.
- Dolleman-Van der Weel, M.J., Lopes da Silva, F.H., Witter, M.P. (1997). Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 17, 5640–5650.
- Du, F., Whetsell, W.O, Abou-Khalil, B., Blumenkopf, B., Lothman, E.W., Schwarcz, R. (1993) Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 16, 223-233.
- Engel, Jr. J. (1992). Update on surgical treatment of the epilepsies. *Clinical Experimental Neurology*, 29, 32-48.
- Engel, J. (1996). Excitation and inhibition in epilepsy. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 23, 167-174
- Englot, D.J., Blumenfeld, H. (2009) Consciousness and Epilepsy: Why are complex-partial seizures complex? İçinde Laureys S (Ed.) *Progress in brain research*, 177, 147-170.
- Ernst, W. L., Zhang Y., Yoo, J.W., Ernst, S.J, Noebels, J.L. (2009). Genetic enhancement of thalamocortical network activity by elevating alpha 1g-mediated low-voltage-activated calcium current induces pure absence epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 29(6), 1615-1625.
- Eşkazan, E. Onat, F.Y., Aker, R., Öner, G. (2002). Resistance to propagation of amygdaloid *kindling* seizures in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia*, 43(10), 1115-1119.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J.Jr. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) *Epilepsia*, 46(4), 470-472.
- Forsgren, L., Beghi, E., Oun, A. (2005). The epidemiology of Epilepsy in Europe-a systematic review, *European Journal of Neurology*, 12, 245-253.

- Galanpoulou, A.S., Moshe, S.L. (2006). Electrical *kindling* in developing rats. İçinde: Pitkanen, A., Schwartzkroin P.A., ve Mosche S.L. (Ed.). *Models of seizures and Epilepsy*. Elsevier,
- Gallego, J.M., Ortiz,L., Gutierrez R., ve Barcia, J.A. (2009) Continuous bilateral infusion of GABA in the dorsomedian nucleus of the thalamus elevates the generalized seizure threshold in amygdala-kindled rats, *Seizure* 18,537–540.
- Gastaut, H. (1969) Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia*, 10,14-21.
- Gloor, P. (1969). Neurophysiological bases of generalized seizures termed centrencephalic. İçinde: Gaustaut, H., Jasper, H.H., Bancaud, J., Waltregny, A. (Eds.), *The Physiopathogenesis of the Epilepsies*. Charles C. Thomas, Springfield, IL, 209–236.
- Gloor, P., Fariello, R.G. (1988). Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. *Trends in Neuroscience* 11, 63–68.
- Goddard, G.V. (1967). Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*. 214,1020-1021.
- Goddard, G.V., McIntyre, D.C., Leech, C.K. (1969). A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurology*, 25,295-330.
- Goffin, K., Paesschen, W.V., Dupont, P., Laere, K.V. (2009). Longitudinal microPET imaging of brain glucose metabolism in rat lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Experimental Neurology* 217, 205–209.
- Gören, Z., Onat, F.Y. (2007). Etosuximide: From bench to bed side. *CNS Drug Reviews*, 13 (2) 224-239.
- Guo, Y., Gao, F., Wang, S., Ding, Y., Zhang, H., Wang, J., Ding, M.P. (2009). In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study. *Neuroscience*, 16, 972-979
- Gurbanova, A.A., Aker, R.G., Sirvanci, S., Demiralp, T., Onat, F.Y. (2008). Intra-amygdaloid injection of kainic acid in rats with genetic absence epilepsy: the relationship of typical absence epilepsy and temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 28(31), 7828-7836.
- Gurbanova, A.A., Aker, R.G., Berkman, K., Onat, F.Y., van Rijn, C.M., van Luijtelaar G. (2006). Effect of systemic and intracortical administration of phenytoin in two genetic models of absence epilepsy. *British Journal of Pharmacology*, 148,1076-82.

- Hauser, W.A., Annegers, J.F., Kurland, L.T. (1993). The incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota. *Epilepsia* 34, 453-468.
- Hennessy, M.J., Elwes, R.D., Rabe-Hesketh, S., Binnie, C.D., Polkey, C.E. (2001). Prognostic factors in the surgical treatment of medically intractable epilepsy associated with mesial temporal sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 103, 344-350.
- Horikawa, K., Armstrong, W.E. (1988). A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *Journal of Neuroscience Methods* 25(1), 1-11.
- Houser, C., Miyashiro, J., Swartz, B., Walsh, G., Rich, J., Delgado-Escueta, A. (1990). Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 10, 267-282.
- Hudson, L.P., Munoz, D.G., Miller, L., McLachlan, R.S., Girvin, J.P., Blume, W.T. (1993) Amygdaloid sclerosis in temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, 33, 622-631.
- Huguenard, J.R., Prince, D.A. (1994). Intrathalamic rhythmicity studied in vitro: nominal T-current modulation causes robust antioscillatory effects. *Journal of Neuroscience*, 14(9), 5485-5502.
- Huntsman, M.M., Porcello, D.M., Homanics, G.E., DeLorey, T.M., Huguenard, J.R. (1999). Reciprocal inhibitory connections and network synchrony in the mammalian thalamus. *Science*, 283, 541-543.
- Inoue, K., Morimoto, K., Sato, K., Yamada, N., Otsuki, S. (1992). Mechanisms in the development of limbic status epilepticus and hippocampal neuron loss: an experimental study in a model of status epilepticus induced by *kindling*-like electrical stimulation of the deep prepyriform cortex in rats. *Acta Medica Okayama*, 46, 129-139.
- Inoue, M., Ates, N., Vossen, J.M., Coenen, A.M. (1994) Effects of the neuroleptanalgesic fentanyl-fluanisone (Hypnorm) on spike-wave discharges in epileptic rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 48(2), 547-551.
- Izhikevich, E.M., Desai, N.S., Walcott, E.C., Hoppensteadt, F.C. (2003). Bursts as a unit of neural information: selective communication via resonance. *Trends in Neuroscience*, 26 (3), 161-166.
- Jackson J.H (1873) On the anatomical, physiological and pathological investigations of epilepsies. *West Riding Lunatic Asylum Med Reports*, 3, 315-339.
- Jasper, H.H., Droogleever-Fortuyn, J. (1948). Thalamo-cortical systems and the electrical activity of the brain, *Federation Proceedings*, 7(1 Pt 1), 61.

- Joo, E.Y., Hong, S.B., Han, H.J., Tae, W.S., Kim, J.H., Han, S.J., Seo, D.W., Lee, K.H., Hong, S.C., Lee, M., Kim, S., Kim, B.T. (2005). Postoperative alteration of cerebral glucose metabolism in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain* 128,1802–1810.
- Juhász, C., Nagy, F., Watson, C. (1999) Glucose and [C-11]flumazenil positron emission tomography abnormalities of thalamic nuclei in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 53, 2037-2045.
- Klein, J.P., Khera, D.S., Nersesyan, H., Kimchi, E.Y., Waxman, S.G, Blumenfeld, H. (2004). Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Research*, 1000(1-2), 102-109.
- Kostopoulos, G.K. (2000). Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. *Clinical Neurophysiology*, 111 (Suppl. 2): 27-38.
- Kotagal, P. (1991). Seizure symptomatology of temporale lobe epilepsy. İçinde H. Luders (Ed.), *Epilepsy surgery*. New York: Raven Press Ltd; 143-146.
- Koutroumanidis, M., Hennessy M. J., Elwes, R.D., Binnie, C.D., Polkey, C.E. (1999). Coexistence of temporal lobe and idiopathic generalized epilepsies. *Neurology*, 53(3), 490-495.
- Leonardi, M., Ustun, T. (2002). The global burden of epilepsy. *Epilepsia* , 43(Suppl 6):21-25.
- Lisman, J.E. (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends in Neurosciences*, 20, 38-43.
- Liu Z., Vergnes, M., Depaulis, A., Marescaux, C. (1991). Evidence for a critical role of GABAergic transmission within the thalamus in the genesis and control of absence seizures in the rat. *Brain Research*, 545,1–7.
- Lothman, E.W., Stringer, J. L., Bertram, E.H. (1992). The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Research*, Suppl: 7, 301–313.
- Löscher, W. (2002). Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease modifying drugs. A comparison of the pharmacology of *kindling* and post status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 50,105-123.
- Luhmann, H. J., Mittmann, T., Van Luijtelaa, G. Heinemann, U. (1995). Impairment of intracortical GABAergic inhibition in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Research*, 22, 43–51.

- Maljevic, S., Krampfl, K., Cobilanschi, J., Tilgen, N., Beyer, S., Weber, Y.G., Schlesinger, F., Ursu, D., Melzer, W., Cossette, P., Bufler, J., Lerche, H., Heils, A. (2006) A mutation in the GABAA receptor $\alpha 1$ -subunit is associated with absence epilepsy. *Annals of Neurology*, 59, 983–987.
- Manning, J.P.A., Richards, D.A., Bowery, N.G. (2003). Pharmacology of absence epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(10), 542-549.
- Manning, J.P., Richards, D.A., Leresche, N., Crunelli, V., Bowery, N.G. (2004). Cortical area specific block of genetically determined absence seizures by ethosuximide. *Neuroscience*, 123(1), 5-9.
- Marescaux C., Vergnes M., Depaulis A. (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg- a review. *Journal of Neural Transmission*. Suppl., 35, 37-70.
- Margerison, J.H., Corsellis, J.A. (1966). Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*, 89, 499-530.
- Mathern, G.W., Babb, T.L., Pretorius, J.K., Melendez, M., Levesque, M.F. (1995). The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 21, 133-147.
- Meeren, H.K., Pjin, J.P., Van Luijtelaar E.L.J.M., Coenen, A.M. ve Lopes da Silva, F.H. (2002). Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *The Journal of Neuroscience*, 22, 1480-1495.
- Micheletti, G., Vergnes, M., Marescaux, C., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, L. ve Warter, J.M. (1985). Antiepileptic drug evolution in a new animal model: Spontaneous petit mal epilepsy in the rat. *Arzneimittelforschung/Drug Research*, 35(1), 483-485.
- Mody, I. (1999) Synaptic plasticity in *kindling*. İçinde Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RW (Eds.) *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. *Advance in Neurology*. 3rd ed., vol 79, Philadelphia: Lippincot Williams&Wilkins. 631-643.
- McAlonan, K., Brown, V.J. (2002). The Thalamic reticular nucleus: More than a Sensory Nucleus? *The Neuroscientist*, 8, 302-305.
- McCormick, D.A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Progressive Neurobiology*, 39(4), 337-388.
- McIntyre, D.C., Nathanson, D., Edson, N. (1982). A new model of partial status epilepticus based on *kindling*. *Brain Research*, 250, 53-63.

- McIntyre, D., Kelly, M. Dufresne, C. (1999). FAST and SLOW amygdala *kindling* rat strains: Comparison of amygdala, hippocampal, piriform and perirhinal cortex *kindling*. *Epilepsy Research*, 35, 197-207.
- McIntyre, D.C, Poulter, M.O., Gilby, K. (2002). *Kindling*: some old and some new. *Epilepsy Research* 50, 79–92.
- McIntyre, D.C (2006) The *kindling* phenomenon. In Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL (Eds) *Models of seizures and epilepsy*, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 351-363.
- Michalakis, M., Holsinger, D., Ikeda-Douglas, C., Cammisuli, S., Ferbinteanu, J., DeSouza C., DeSouza, S., Fecteau, J., Racine, R.J., Milgram, N.W. (1998). Development of spontaneous seizures over extended electrical *kindling*. I. Electrographic, behavioral, and transfer *kindling* correlates. *Brain Research*, 793, 197–211.
- Midzyanovskaya I.S., Kuznetsova G.D., Vinogradova L.V., Shatskova A.B., Coenen A.M., van Luijteleaer G (2004). Mixed forms of epilepsy in a subpopulation of WAG/Rij rats. *Epilepsy Behaviour*, 5(5), 655-661.
- Mirski, M.A., Ferrendelli, J.A. (1986). Anterior thalamic mediation of generalized pentylentetrazol seizures, *Brain Research*, 399, 212–223.
- Mirski, M.A., Rossell, L.A, Terry, J.B., ve Fisher, R.S.(1997). Anticonvulsant effect of anterior thalamic high frequency electrical stimulation in the rat, *Epilepsy Research*, 28, 89–100.
- Morimoto, K., Fahnstock, M., Racine, R.J. (2004). *Kindling* and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiology*, 73, 1-60.
- Moshe, S.L. (1981). The effect of age on the *Kindling* phenomenon. *Developmental Psychobiology*, 14, 75-81.
- Moshe S.L., Ludvig N. (1988). *Kindling*. İçinde T.A. Pedley, B.S. Meldrum (Ed.), *Recent Advances in Epilepsy*. Churchill Livingstone; 21-37.
- Nanobashvili, Z., Chachua, T., Nanobashvili, A., Bilanishvili, I., Lindvall, O., Kokaia, Z. (2003). Suppression of limbic motor seizures by electrical stimulation in thalamic reticular nucleus. *Experimental Neurology*, 181, 224-230.
- Nicholson, A., Chadwick, D.W., Smith, D.F. (2004). The coexistence of idiopathic generalized epilepsy and partial epilepsy. *Epilepsia*, 45,682-685.
- Onat FY, Eşkazan E, Aker R (2005). Experimental absence versus amygdaloid *kindling*. *Advances in Behavioral Biology*; İçinde: *Kindling* 6. Editörler: M. Corcoran, SL Moshe, Springer,.

- Onat, F.Y., Aker, R.G., Gurbanova, A.A., Ateş, N., van Luijtelaar G. (2007) The Effect of Generalized Absence Seizures on the Progression of *Kindling* in the Rat. *Epilepsia*, 48(Suppl. 5), 150-156.
- Onat, F. (2008). Epilepsinin deneysel modelleri. İçinde İ. Bora (Ed.), *Epilepsi*, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 37-43.
- Onat, F.Y., Eşkazan E., Aker, R.G. (2009). Interactions between cortico-thalamo-cortical and Limbic seizures. İçinde: Schwartzkroin AP (ed). *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*, Vol 2 . Oxford, Academic Press, 825-830.
- Paxinos, G., Watson, N. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (4th ed.) San Diego: Academic Press.
- Panayiotopoulos, C. (1997). Absence epilepsies. İçinde: Engel, J. & Pedley, T.A. (Ed.). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2327-2346.
- Penfield, W.G., Jasper, H.H. (1954). *Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain*. Little Brown & Co. Boston, MA.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83, 117-161.
- Pinault, D., J. Bourassa, M., Deschênes, M. (1995). The axonal arborization of single thalamic reticular neurons in the somatosensory thalamus of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 7(1), 31-40.
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *Journal of Neuroscience Methods*, 65(2), 113-136.
- Pinault, D. (2005). A new stabilizing craniotomy-duratomy technique for single-cell anatomo electrophysiological exploration of living intact brain networks. *Journal of Neuroscience Methods*, 141(2), 231-42.
- Pinel, J.P., ve Rovner, L.T. (1978). Electrode placement and *kindling*-induced experimental epilepsy. *Experimental Neurology*, 58,335-346.
- Pitkanen, A., ve Sutula, T.P. (2002). Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporale lobe epilepsy. *Lancet Neurology*,1,173-181.
- Price, J.L. (1995). Thalamus.İçinde: Paxinos, G. (Ed). The rat Nervous system. 2nd ed. San Diego, Academic Press, 629-648.
- Polack, P. O., Guillemain, I. (2007). Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *Journal of Neuroscience*, 27(24), 6590-6599.

- Powell, K.L., Cain, S.M., Ng, C., Sirdesai, S., David, L.S., Kyi, M., Garcia, E., Tyson, J.R., Reid, C.A., Bahlo, M., Foote, S.J., Snutch, T.P., O'Brien, T.J. (2009). A Cav3.2 T-type calcium channel point mutation has splice-variant-specific effects on function and segregates with seizure expression in a polygenic rat model of absence epilepsy. *Journal of Neuroscience*, **29**(2), 371-380.
- Pumain, R., Louvel, J., Gastard, M., Kurcewicz, I., Vergnes, M. (1992). Responses to N-methyl-D-aspartate are enhanced in rats with *petit mal*-like seizures. *Journal of Neural Transmission*. 35 (Suppl.), 97-108.
- Romanski, L.M., LeDoux, J.E. (2002). Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 12, 4501-4509.
- Sander, J.W. (2004) Infectious agents and epilepsy. İçinde: Knobler S, O'Connor S, Lemon SM, Najafi M. (Eds) *The infectious etiology of chronic diseases: defining the relationship, enhancing the research and mitigating the effects*. Washington: The National Academies Press, 93-99.
- Sarkasian, M.R. (2001). Overview of current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy & Behaviour*, 2, 201-216.
- Sayin, U., Osting, S., Hagen, J., Rutecki, P., Sutula, T. (2003). Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *Journal of Neuroscience*. 23:2759-68.
- Seidenbecher, T., Staak, R., Pape, H.C. (1998) Relations between cortical and thalamic cellular activities during absence seizures in rats. *European Journal of Neuroscience*, 10, 1103-1112
- Sharma, A.K., Reams, R.Y., Jordan, W.H., Miller, M.A., Thacker, H.L., Snyder, P.W. (2007). Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicologic Pathology*, 35, 984-99.
- Sherman, S.M. (2001). Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. *Trends in Neuroscience*, 24(2), 122-126.
- Sitnikova, E., G. van Luijtelaar (2004). Cortical control of generalized absence seizures: effect of lidocaine applied to the somatosensory cortex in WAG/Rij rats. *Brain Research*, 1012(1-2), 127-137.
- Sutula T., Cavazos J., Golarai G. (1992). Alteration of long-lasting structural and functional effects of kainic acid in the hippocampus by brief treatment with phenobarbital. *Journal of Neuroscience*, 12, 4173-4187.
- Sutula T.P., Ockuly, J. (2006) *Kindling*, spontaneous seizures, and the consequences of epilepsy: more than a model. In Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL (eds) *Models of seizures and epilepsy*, Elsevier Academic Press, San Diego, 395-406.

- Stefan H., Snead C., Eeg-Olofsson O (2008) Typical and Atypical Absence Seizures, Myoclonic Absences, and Eyelid Myoclonia. İçinde Pedley ve Engel (Ed.),
- Steriade, M., Mc Cormick, D.A., Sejnovski, T.J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*, 262, 679-685.
- Steriade, M., Contreras D. (1998). Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. I. Role of neocortex and thalamus. *Journal of Neurophysiology*, 80(3),1439-1455.
- Steriade, M., Amzica F. (2003). Sleep oscillations developing into seizures in corticothalamic systems. *Epilepsia*, 44 Suppl 12, 9-20.
- Strauss, U., M. H. Kole, et al. (2004). An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *European Journal of Neuroscience*, 19(11), 3048-3058.
- Talley, E.M., Solórzano, G., Depaulis, A., Perez-Reyes, E., Bayliss, D.A. (2000). Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 75(1), 159-165.
- Tolmacheva, E.A., van Luijtelaar, G. (2007). Absence seizures are reduced by the enhancement of GABA-ergic inhibition in the hippocampus in WAG/Rij rats. *Journal of Neuroscience Letters*, 6, 68–81.
- Tsakiridou, E., Bertollini, L., de Curtis, M., Avanzini, G., Pape, H.C. Tsakiridou (1995). Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 15(4), 3110-3117.
- Wada, J.A., Sato, M., ve Corcoran, M.E. (1974). Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats. *Epilepsia*, 15, 465-478.
- Williamson, P.D. (2004). Mesial temporal lobe epilepsy. İçinde: Gilman S, (ed.) *Medlink*, San Diego CA:Arbor Publishing.
- Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, L., ve Warter, J.M. (1982). Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalised non-convulsive epilepsy. *Neuroscience Letters*, 33,97-101.
- Vergnes, M., C. Marescaux, Micheletti, G., Depaulis, A., Rumbach, L., Warter JM. (1984). Enhancement of spike and wave discharges by GABA-mimetic drugs in rats with spontaneous petit-mal-like epilepsy. *Neuroscience Letters*, 44(1), 91-94.
- Vergnes, M., Marescaux, C., Depaulis, A., Micheletti, G., ve Warter, J.M. (1986). Ontogeny of spontaneous petit-mal-like seizures in Wistar rats. *Developmental Brain Research*, 30,85-87.

- von Krosigk, M., Bal, T., McCormick, D.A. (1993). Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus. *Science*, 261,361–364.
- Zhang DX, Bertram E (2002). Midline thalamic region: widespread excitatory input to entorhinal cortex and amygdala. *Journal of Neuroscience*, 22, 3277-3284.
- Zhang, Y., Vilaythong, A.P. (2004). Elevated thalamic low-voltage-activated currents precede the onset of absence epilepsy in the SNAP25-deficient mouse mutant coloboma. *Journal of Neuroscience*, 24(22), 5239-5248.

ETİK KURUL KARARI**Contact details for this correspondence:**

Helen Gardiner
Committee Secretary
Melbourne Research Office

Telephone: 03 8344 2055
email: hg@unimelb.edu.au

In report please quote Ethics ID 0706287.3

18th September 2008

ATTENTION: Professor Terence O'Brien

Professor Terence O'Brien
Department of Medicine (RMH)
The University of Melbourne

Dear Professor O'Brien

Amended Research Application

Ethics ID: 0706287.3

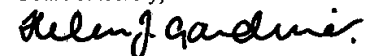
Title: *The effect of carbamazepine and related antiepileptic drugs on single cell and brain network activity in a rat model of absence epilepsy.*

Thank you for your response to queries raised by the Biochemistry & Molecular Biology, Bio21, Dental Science, Medicine RMH, and Microbiology & Immunology Animal Ethics Committee at a meeting held on Tuesday 2 September 2008 to consider the above-named amended application [rats to undergo electrode implantation and electrical amygdala kindling stimulations prior to in-vivo electrophysiology recordings].

On behalf of the Committee the Chair has **approved** the amended application. Please see overleaf, *Summary Details for Approved Animal Ethics Project and Conditions of Approval*.

Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Yours sincerely,



Helen Gardiner
Committee Secretary

Summary Details for Approved Animal Ethics Project

TITLE: *The effect of carbamazepine and related antiepileptic drugs on single cell and brain network activity in a rat model of absence epilepsy.*

ETHICS ID: **0706287.3**

START DATE: 21st November 2007 **EXPIRY DATE:** 21st November 2010

AMENDMENT APPROVAL DATE: 16th September 2008

RESPONSIBLE AEC: Biochemistry & Molecular Biology, Bio21, Dental Science, Medicine RMH, and Microbiology & Immunology

SCIENTIFIC PROCEDURES PREMISES LICENCE:

Department of Medicine, Royal Melbourne Hospital (035)

PRIMARY CONTACT: **Prof Terence O'Brien**

PROJECT SUPERVISOR: **Prof Terence O'Brien**

OTHER INVESTIGATORS: **Thomas Zheng**
Ms Lisa Cardamone
Dr Christopher Reid
Dr Christopher French
Professor Margaret Morris
Dr Didier Pinault
Mrs Valentina Jovanovska
Ms Leena Van Raay
Arun Kumar Gandrathi
Ms Carcak Nihan

Animals Approved:

Category	Type/Species	Breed/Strain	Sex	Age	Total Number
Laboratory Animals	Rat	Non-epileptic Wistar rat	M	7 weeks or older	240
Laboratory Animals	Rat	Genetic absence rats from Strasbourg (GAERS)	M	7 weeks or older	360

Conditions of Approval

Any amendment proposed to the project, and the reasons for that change, must be submitted to the AEC for approval and must not be implemented until approval is granted.

The AEC must be notified of:

1. any adverse incidents involving animals used in the project and the steps taken in response
2. any changes to approved investigators
3. change in location(s) for using and/or holding animals other than those specified in the application.

A record of details of any animals used in the project must be retained.

All work must be conducted in accordance with the *Prevention of Cruelty to Animals Act 1986* and associated Regulations, and the *Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes*.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nihan	Soyadı	ÇARÇAK
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	24.09.1981
Uyruğu	TC	TC Kim No	31577580956
Email	nihan.carcak@gmail.com	Tel	0212440 0000-13450

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD	2010
Yük.Lis.	İ.Ü Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD	2006
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2004
Lise	Eskişehir A. Yesevi Lisesi	2000

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi	2005-halen
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	85	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	70	68	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Graph Pad	Çok iyi

Yayımları

- **Carçak N.**, Aker RG, Ozdemir O, Demiralp T, Onat FY (2008). The relationship between age-related development of spike-and-wave discharges and the resistance to amygdaloid *kindling* in rats with genetic absence epilepsy. *Neurobiol Dis.* Dec;32(3): 355-63
- **Carçak N.**, Ferrandon A, Konig E, Aker R, Özdemir O, Onat F, Nehlig A (2009). Effect of stage 2 *kindling* on local cerebral blood flow rates in rats with genetic absence epilepsy *Epilepsia.* Jan;50(1):33-43
- Gülhan Aker R, Tezcan K, **Carçak N.**, Sakallı E, Akın D, Onat FY (2010). Localized cortical injections of ethosuximide suppress spike-and-wave activity and reduce the resistance to *kindling* in genetic absence epilepsy rats (GAERS). *Epilepsy Res.* Mar;89(1):7-16.

Tebliğleri

Sözlü Bildiriler

- **Carçak N.**, Sahiner M., Ketenci S., Eskazan E., Snead C., Onat F. The effect in a chemical model of absence epilepsy on *Kindling* in Wistar rats. 9th National Neuroscience Congress, 13-16 Apr 2010, Istanbul
- **Carçak N.**, Aker RG, Ozdemir O, Demiralp T, Onat FY. The relationship between age-related development of spike-and-wave discharges and the resistance to amygdaloid *kindling* in rats with genetic absence epilepsy. 3rd Eilat International Educational Course: Pharmacological treatment of Epilepsy, Eilat, Israel, 6 – 13 Eylül 2009.
- Carçak N.**, Ferrandon A., Koning E., Aker R., Ozdemir O., Onat F., Nehlig A. Effect of *Kindling* on Local cerebral blood flow rates in rats with Genetic Absence Epilepsy. Idiopathic Generalized Epilepsy (IGE): Developmental Aspects, Bridging Basic Science and Clinical Research. 3-7 October, 2007, Antalya, Turkey
- Carçak N.**, Ferrandon A, Konig E, Aker R, Özdemir O, Onat F, Nehlig A. Effect of *Kindling* on Local cerebral blood flow rates in rats with Genetic Absence Epilepsy 19. National Pharmacology Congress, Trabzon, 24-27 October 2007
- Carçak N.**, Ferrandon A., Koning E., Aker R., Ozdemir O., Onat F., Nehlig A. Measurement of cerebral blood Flow during amygdala *kindling* process in rats with genetic absence epilepsy (GAERS). 6th National Neuroscience Congress, April 10-14 2007, Karabük, Turkey
- **Carçak N.**, Aker R., Özdemir O., Onat F. Amygdala *Kindling* in 20-day old GAERS. National Epilepsy Congress Jun 7-10 2006, Bursa, Turkey
- Carçak N.**, Aker R., Özdemir O., Onat F. Amygdala *kindling* in pups and young adult rats with genetic absence epilepsy . 5th National Neuroscience Congress April 10-14 2006, Zonguldak, Turkey

Poster Bildirileri

- **Carçak N.**, Onat F., French C., Pinault D., O'Brien TJ. In vivo study of the impact of amygdala *kindling* on the firing pattern of thalamic reticular nucleus neurons in GAERS. 63rd AES Annual Meeting in Boston, Massachusetts 4th-8th December 2009.
- **Carçak N.**, Onat F., French C., Pinault D., O'Brien TJ. In vivo study of the impact of amygdala *kindling* on the firing pattern of thalamic reticular nucleus neurons in GAERS. 28th International Epilepsy Congress, Budapest, June 28th - July 2nd 2009
- **Carçak N.**, Aker R., Onat F. The role of sodium channels on *kindling* resistance in rats with genetic absence epilepsy. 6th National Epilepsy Congress, Çeşme, 4-8 Jun 2008.
- Sara Y, Onur R, **Carçak N.**, Aker R., Onat F. The enhancement of hippocampal inhibitory activity may play a role in resistance to temporale lobe epilepsy in genetic absence epilepsy. 6th National Epilepsy Congress, Çeşme, 4-8 Jun 2008.
- **Carçak N.**, Ferrandon A., Koning E., Aker R., Ozdemir O., Onat F., Nehlig A. Measurement of Local Cerebral Blood Flow During Amygdala *Kindling* Process in Rats with Genetic absence epilepsy. 27th International Epilepsy Congress, 8-12 July 2007, Singapore.
- **Carçak N.**, Aker R., Özdemir O., Onat F. Amygdala *Kindling* in 20- and 30-Day Old Rats with Genetic Absence Epilepsy. American Epilepsy Society 61th Annual Meeting Nov 30- Dec 4 2006, Philadelphia, USA
- **Carçak N.**, Aker R., Özdemir O., Onat F. Amygdala *kindling* in rat pups with genetic absence epilepsy. 7th European Congress on Epileptology July 2-7 2006, Helsinki, Finland
- **Carçak N.**, Azizova A., Aker R., Ozdemir O., Onat F. "Effect of "*Kindling*" phenomon in 30 and 60 day old Wistar rats." Turkish Pharmacological Society, 18th National Congress of Pharmacology. September 28-October 1 2005, İzmir, Turkey

Sertifikaları

- Deney hayvanları kullanımı ve etik yaklaşım (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı, İstanbul, 29 Haziran 2005.
- Mikrodializ Teknikleri (V.Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, Zonguldak, 10-14 Nisan 2006,
- Radtotelemetrik transmitter implantasyon eğitimi, DSI Eğitim Merkezi, Minnesota, ABD, 12-16 Şubat 2007.
- 3rd Eilat International Educational Course: PHARMACOLOGICAL TREATMENT OF EPILEPSY, Eilat, Israel, 6 – 13 Eylül 2009.
- -Advance International Course on Epilepsy: Bridging Basic with Clinical Epileptology-3 Venice International University, Island of San Servolo, Venice (Italy) 28 Temmuz – 8 Ağustos 2008.

Ödülleri

- İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Okul Birinciliği (2004)
- 1. Türkiye Geneli Eczacılık Öğrencileri Hasta Bilgilendirme Yarışması Türkiye üçüncülüğü (2004)
- Beyin Araştırmaları Derneği (BAD) Seyahat ve Eğitim ödülü (2005)
- Beyin Araştırmaları Derneği Novartis Yayın Teşvikleri Birincilik Ödülü (2009).

Bursları

- İstanbul Üniversitesi Rektörlük Bursu (2003-2004)
- 7. Avrupa Epilepsi Kongresi Seyahat ve Katılım Bursu (2006)
- 27. Uluslararası Epilepsi Kongresi Seyahat ve Katılım Bursu (2007)
- Türk Epilepsi Derneği Kongre Katılım Bursu (2007)
- Uluslararası SanServolo Eğitim Kursu Seyahat ve Katılım Bursu (2008)
- 3. Eliat Uluslar arası Eğitim Kursu Seyahat ve katılım Bursu (2009)
- Tübitak Yurtdışı Araştırma Bursu (2009).
- 9. Avrupa Epilepsi Kongresi Seyahat ve Katılım Bursu (2010)