

Genetik Absans Epilepsili WAG/Rij Yavru Sıçanlarda Febril Nöbet Duyarlılığı

Sensitivity to Febrile Seizures in Genetically Absence Epileptic WAG/Rij Rat Pups

Özlem AKMAN, Ayşe KARSON, Nurbay ATEŞ

Epilepsi 2005;11(1):11-15

Amaç: Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) ırkı sıçanlarda, diken dalga deşarjların ortaya çıkmadığı erken dönemde febril nöbetlere karşı duyarlılık araştırıldı.

Çalışma planı: Çalışmada, 21-22 günlük Wistar albino sıçanlar (n=7) ile genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanlar (n=5), ısı 45 °C olan sıcak suyla, iki günde bir olmak üzere toplam 10 kez tekrarlayan febril nöbetlere maruz bırakıldı. Sıçanlar suyun içerisinde en çok dört dakika ya da nöbet başlangıcına dek tutuldu ve vücut sıcaklıkları, sıcak su uygulaması öncesi ve nöbet başlangıcında bir rektal prob ile ölçüldü. Her iki grupta febril nöbet latansı ve süresi kaydedildi. Nöbet şiddeti 0-4 arasında derecelendirilen bir skalaya göre değerlendirildi.

Bulgular: Gruplar arasında nöbet şiddeti açısından bir farklılık gözlenmedi. Febril nöbet latansının WAG/Rij sıçanlarda tüm nöbetlerde daha uzun olduğu gözlemlendi ve 1, 2, 7-10. nöbetlerdeki farklılık anlamlı bulundu (p<0.05). İki grupta da, geçirilen nöbet sayısına bağlı olarak nöbet sürelerinde artış saptandı. Bu artış ilk nöbete göre Wistar grubunda 6-10. nöbetlerde, WAG/Rij grubunda ise 8-10. nöbetlerde anlamlı bulundu (p<0.05). Nöbet süresi açısından iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

Sonuç: WAG/Rij sıçanlarda febril nöbetlere ait latans değerlerinin daha uzun bulunması, bu hayvanlarda limbik yapıları etkileyen nöbetlere karşı oluşan direncin bir göstergesi sayılabilir. Bu direncin gelişiminde GABAerjik sistemin rolü olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Vücut ısısı; hastalık modeli, hayvan; epilepsi, absans/fizyopatoloji/genetik; ısı/yan etki; latans süresi; sıçan, inbred suşlar; nöbet, febril/fizyopatoloji.

Objectives: Sensitivity to febrile seizures was investigated in Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) rats in the early life before spike and wave discharges occurred.

Study Design: Wistar albino (n=7) and WAG/Rij (n=5) rat pups (21-22 days old) were exposed to warm water bath of 45 °C once every other day for a total of ten times to induce febrile seizures. The rats were kept in warm water for a maximum of four minutes or till the onset of seizures and body temperature was measured with the use of a rectal probe before the bath and at the onset of seizures. The latency and duration of seizures were recorded and the severity of seizures was rated using a 0-4 point scale.

Results: The severity of seizures were similar in both groups. The latency of febrile seizures in WAG/Rij rats was longer in all the seizures, being significantly prolonged in the first, second, and 7th to 10th seizures (p<0.05). The number of seizures was correlated with increased seizure duration in both groups, which was significant for the 6th to 10th seizures in the Wistar group, and for the 8th to 10th seizures in the WAG/Rij group (p<0.05). However, the duration of seizures did not differ significantly between the two groups.

Conclusion: The longer latency of febrile seizures observed in WAG/Rij rats may indicate the development of a resistance to seizures related with the limbic structure. GABAergic mechanisms may be responsible for this resistance.

Key Words: Body temperature; disease models, animal; epilepsy, absence/physiopathology/genetics; heat/adverse effects; latency period; rats, inbred strains; seizures, febrile/physiopathology.

Dergiye geliş tarihi: 15.02.2005 Düzeltme isteği: 16.03.2005 Yayın için kabul tarihi: 23.03.2005

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı.

İletişim adresi: Dr. Nurbay Ateş, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 41900 Derince, Kocaeli.

Tel: 0262 - 233 59 80 / 1217 Faks: 0262 - 233 54 14 e-posta: nates@kou.edu.tr

Absans epilepsi, sıklıkla 4-12 yaşlar arasında görülen, ortalama 6-7 yıl süren bir çocukluk çağı epilepsisidir. Absans nöbetlere eşlik eden elektroensefalografi (EEG) bulguları, iki taraflı senkron ve simetrik, 2.5-3.5 Hz frekanslı, 100-1200 µV amplitüdünde diken-dalga deşarjlarıdır (DDD).^[1] WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk) ve GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats of Strasbourg) ırkı genetik epilepsili sıçanlar, absans epilepsinin deneysel modelleri olarak tercih edilmektedir.^[2,3] WAG/Rij sıçanları, absans benzeri epilepsi gösteren hayvan çalışmaları için inbred üretilen genetik epilepsili sıçanlardır.^[4] Bu ve diğer absans epilepsi modellerinde, absans epilepsinin EEG fenomeni olan DDD'lerin oluşumundan talamokortikal yapıların sorumlu olduğu ve retiküler talamik çekirdeklerin bu osilasyonların oluşumunda pacemaker aktivite gösterdiği bilinmektedir. Diken-dalga deşarjların limbik yapılarda ortaya çıkmadığı, her iki hemisfer korteksi üzerinde ve talamusun lateral parçasında iki taraflı ve senkron olarak gözlemlendiği bildirilmiştir.^[5,6] WAG/Rij sıçanlarda EEG fenomeni olan DDD'lerin altıncı aydan itibaren tüm bireylerde gözlemlendiği ve yaşa bağımlı olarak arttığı bildirilmiştir.^[5] GABAerjik ilaçlar, insanda olduğu gibi WAG/Rij sıçanlarda da DDD'lerin sayısını artırmaktadır.^[7] Absans epilepsili sıçanlar, jeneralize nöbet ajanlarına daha duyarlıyken limbik nöbet ajanlarına ve sekonder jeneralize epilepsi modeli olarak kabul edilen amigdala kindlinge daha dirençli bulunmuştur.^[8-10]

Febril nöbetler, çocukluk çağının en yaygın nöbet tipini oluşturmaktadır. Febril nöbetlerin deneysel modelleri ile gerçekleştirilen çalışmalar, bu nöbetlerin limbik kaynaklı olduğunu göstermektedir. Tekrarlayan nöbetlerin, hipokampus ve amigdala nöronlarında yapısal değişikliklere neden olduğu ve hipokampal dönüştürme bu değişikliklerin epilepsi gelişimi açısından hazırlayıcı bir faktör olduğu düşünülmektedir.^[11] Tekrarlayan febril nöbetlerde nöbet eşliğinin giderek azalması ve nöbet şiddetinin giderek artması kindling fenomenine benzetilmekte ve tekrarlayan uygulamalar "hipertermik kindling" olarak adlandırılmaktadır.^[12] Febril nöbetlerde GABAerjik sistemin rolünün aydınlatılmasına yönelik çalışmalar sonucunda GABAerjik iletideki eksikliğin febril nöbetlerle ilişkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir.^[13,14]

Bu çalışmada, GABAerjik sistemin her iki nöbet tipindeki rolü, tekrarlayan febril nöbetlerin kindling benzeri etkisi ve absans epilepsili hayvanlarda DDD'lerin ortaya çıktığı dönemdeki limbik nöbetlere olan direnci dikkate alınarak, WAG/Rij sıçanların DDD'lerin ortaya çıkmadığı erken dönemde febril nöbetlere duyarlılığı araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 28-36 gr ağırlığında 21-22 günlük Wistar albino sıçanlar (n=7) ile genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanlar (n=5) kullanıldı. Çalışmanın yapılabilmesi için Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan izin alındı. Hayvanlar sabit ısı bir odada (20-21 °C), 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodunda, yiyecek ve su alımları serbest bırakılarak tutuldu.

Tüm sıçanlar, doğumdan sonra 21. günden itibaren, iki günde bir olmak üzere toplam 10 kez tekrarlayan febril nöbetlere maruz bırakıldı.

Deneysel febril nöbet uygulaması 30x30x60 cm büyüklüğünde sıcak su banyosunda gerçekleştirildi. Sıcak su banyosunda, yavru sıçanlar ayağa kalktıklarında, kafaları dışarıda kalacak seviyede su doldurularak suyun ısı 45 °C'ye getirildi ve deney süresince su sıcaklığı sabit tutuldu. Bu sıcaklığın bir saatten daha kısa sürelerde deri hasarına yol açmadığı bildirilmiştir.^[15] Sıçanlar suyun içerisinde, hareketleri engellenmeyecek şekilde, en çok dört dakika ya da nöbet başlangıcına dek tutuldu. Nöbet başlangıcının ilk belirtileri görüldüğünde, hayvanlar sudan hemen çıkartılıp pleksiglas gözlem kafesine alındı. Sıçanların vücut sıcaklıkları, sıcak su uygulaması öncesi ve nöbet başlangıcında bir rektal prob (SKT 100B, MP 100 data acquisition and analysis system, Biopac Systems Inc., CA, ABD) ile ölçüldü. Nöbet latansı, hayvanların suya temas ettikleri an ile nöbet başlangıcının ilk belirtileri (genellikle bir miyoklonik spazm) arasındaki zaman olarak belirlendi. Nöbet süresi ise, nöbet başlangıcından hayvanların bilinçli görüldükleri ve hareketlendikleri ana kadar geçen zaman olarak hesaplandı. Sıçanlar gözlem süresinin hemen ardından nazik bir şekilde kurularak kafeslerine geri konuldu. Nöbet şiddeti 0-4 arasında derecelendirilen bir skalaya göre değerlendirildi: 0. Konvulsif davranış yok; 1. fasyal klonus; 2. ön

ekstremitte klonusları; 3. şaha kalkma hareketi; 4. şaha kalkma ve dengenin kaybolup hayvanın bir tarafı üzerine düşmesi.^[15]

Sonuçlar "ortalama±standart hata" olarak ifade edildi. Hipertermik nöbetlerin latansları ve sürelerini nöbet sayısına bağlı olarak değerlendirmek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc testlerden Tukey kullanıldı. Wistar ve WAG/Rij sıçanlar arasında febril nöbet latans ve sürelerini karşılaştırmak için t-testi uygulandı.

BULGULAR

Her iki grupta da suyun içerisinde nöbetin ilk belirtisi, bir miyoklonik sıçrama ya da tankın dibine batmaya başlama şeklinde gözlemlendi. Febril nöbetin başlamasının ardından hemen gözlem kafesine alınan hayvanlarda, önce fasyal klonus ve kafa sallama hareketleriyle karakterize olan, daha sonra ön ekstremitte ve bunu takiben arka ekstremitte klonusları ile devam eden nöbetler görüldü. Bu kasılmalar gittikçe şiddetlenerek, ön ve arka ekstremiteler tonik ekstansiyona geçti; bu sırada sıçanların kuyrukları kamçı gibi hareketli ve dik bir pozisyondaydı. Bazı hayvanlar ise devrilmeden önce arka ekstremiteleri üzerinde şaha kalkma pozisyonunda kısa bir süre durdu. Hayvanların bilinçli hallerine geri döndüğü, uyarıya yanıt verdiği ya da kendiliğinden doğrularak ön ekstremiteleriyle sık sık yüzlerini temizlediği dönem nöbetin bitişi olarak kabul edildi. Tüm gruplarda, sıcak su uygulamasından önce 37.4 ± 0.2 °C ölçülen bazal vücut ısıları, nöbet başlangıcında 42.90 ± 0.6 °C'ye yükseldi.

Sıcak suda, en çok dört dakika tutulan hayvanların tümü nöbetin 4. ve 5. evrelerine girdiler. Gruplar arasında nöbet şiddeti açısından bir farklılık gözlenmedi.

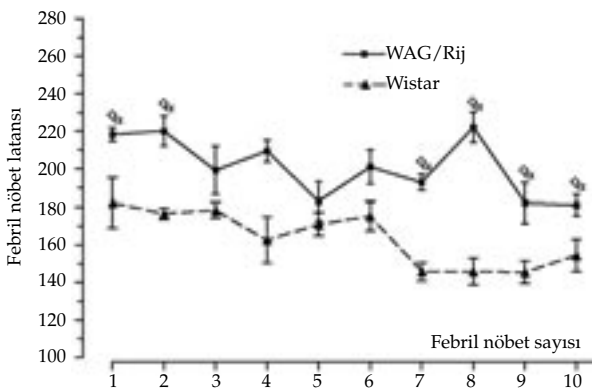
Hem Wistar hem WAG/Rij gruplarında, febril nöbet latansları, geçirilen nöbet sayısının artışına bağlı olarak bir azalma gösterse de gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşmadı. Febril nöbet latansı açısından değerlendirildiğinde, WAG/Rij sıçanların latansının tüm nöbetlerde daha uzun olduğu gözlemlendi ve 1, 2, 7-10. nöbetlerdeki farklılık anlamlı bulundu ($p<0.05$, Şekil 1).

Her iki grupta da, geçirilen febril nöbet sayısına bağlı olarak nöbet sürelerinde artış saptandı. Bu artış ilk nöbete göre Wistar grubunda 6-10. nöbetlerde, WAG/Rij grubunda ise 8-10. nöbetlerde anlamlı bulundu ($p<0.05$). Febril nöbet süreleri açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Şekil 2).

TARTIŞMA

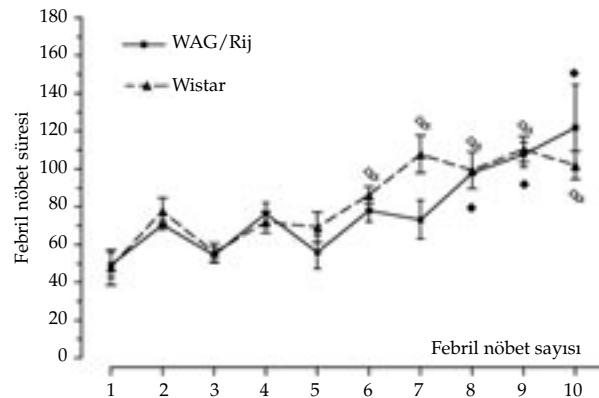
Çalışmamızda, tekrarlayan sıcak su uygulamaları sonucunda, Wistar ve WAG/Rij sıçan yavrularının benzer nöbet paternine sahip oldukları görüldü. Her iki grupta, febril nöbet sayısına bağlı olarak nöbet sürelerinin anlamlı olarak arttığı, nöbet latanslarında ise anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı. Febril nöbet latansları ve süreleri karşılaştırıldığında, nöbet sürelerinin ve şiddetinin her iki grupta benzer, nöbet latanslarının ise WAG/Rij sıçan yavrularında daha uzun olduğu görüldü.

DeneySEL epilepsi çalışmalarındaki nöbetler, "süre" ve "latans" gibi iki parametre ile değerlendirilebilir. Latans, nöbetlerin başlama, süre



ŞEKİL 1

WAG/Rij ve Wistar sıçanlarda febril nöbet latansları.



ŞEKİL 2

WAG/Rij ve Wistar sıçanlarda febril nöbet süreleri.

ise sonlanma mekanizmalarıyla ilişkili görünmektedir.^[16] Çalışmamızda, febril nöbetlerin süresindeki artış, tekrarlayan nöbetlerin daha çok sonlanma mekanizmaları üzerine etkisi ile açıklanabilir. Tekrarlayan febril nöbetlerin süre ve latanslarının değerlendirildiği çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Klauenberg ve Sparber^[12] tekrarlayan nöbetlere paralel olarak nöbet sürelerinin arttığını ve nöbet latanslarının azaldığını; Gulec ve Noyan^[17] ise nöbet sürelerinin etkilenmediğini bildirmişlerdir. Bu değişik sonuçlar, yaş grupları ve deneysel yöntemlerdeki farklılıklara bağlı olabilir.

Çalışmamızda, WAG/Rij yavrularının febril nöbet latanslarının Wistar sıçanlara göre daha uzun bulunması, bu hayvanlarda limbik nöbet gelişimine karşı var olan direncin bir göstergesi olarak değerlendirildi ve bu direncin, nöbetin başlama mekanizmaları ile ilişkili olduğu düşünüldü.

Absans nöbetlerinin temporal lop epilepsisi ile ilişkisine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Eşkazan ve ark.^[9] tarafından yapılan bir çalışmada GAERS ırkı sıçanların, amigdala-ya uygulanan elektriksel kindlinge dirençli olduğu saptanmıştır. Jeneralize absans nöbetlerin, amigdalanın kindlingi süresince limbik nöbetlerin ikincil jeneralizasyonuna karşı bir direnç nedeni olabileceği ileri sürülmüştür. Aynı ırkta yapılan diğer bir çalışmada ise, nöbetleri latans ve süre açısından epileptik olmayan grupla karşılaştırıldığında, bu hayvanların GABAerjik sisteme etkili konvulsan ajanlara daha duyarlı, limbik nöbet ajanı olan kainik aside daha dirençli oldukları bildirilmiştir.^[10] Sonuçlarımız, deneysel febril nöbetlerin limbik kaynaklı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, genetik absans epilepsili sıçanların limbik nöbetlere daha dirençli olduğu düşüncesini destekler niteliktedir.

WAG/Rij sıçan yavrularında febril nöbetlerin daha geç gelişmesinden bu ırktaki GABAerjik hiperaktivasyon sorumlu tutulabilir. WAG/Rij sıçanlarda absans nöbetlerin oluşum mekanizmalarına bakıldığında, GABAerjik sistemin DDD oluşumunda önemli bir rol oynadığı görülmektedir. GABAerjik aktivitenin artması genetik modellerde absans nöbetleri şiddetlendirirken, normal hayvanlarda DDD oluşumuna yol açmaktadır. Diğer taraftan, GABA antagonistlerin absans

nöbetleri baskıladıkları ve konvulsif nöbetlere neden oldukları bilinmektedir.^[15,6]

GABAerjik iletim eksikliği, febril nöbetlerle ilişkili bir faktör olabilir. Yavru sıçanlar ile yapılan çalışmalarda, glutamat dekarboksilaz (GAD) düzeyindeki düşmenin febril nöbetlere duyarlılığı artırdığı saptanmıştır.^[15,17] GABA transaminaz enzimini inhibe ederek GABA konsantrasyonlarını yükselten gamma-vinil GABA'nın, deneysel febril nöbet ve insanda kompleks parsiyel nöbet sıklığında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.^[18,19] Tüm bu veriler, febril nöbet gelişiminde GABA'nın koruyucu bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. WAG/Rij sıçanlarda iyi tanımlanmış olan GABAerjik hiperaktivasyon, DDD'lerin ortaya çıktığı yetişkin dönemde gösterilmiş olsa da febril nöbetlerin uygulandığı doğum sonrası üçüncü haftada da mevcut olabilir. Nitekim sıçanlarda GABAerjik sistemin en önemli gelişiminin doğum sonrası ikinci-üçüncü haftada olduğu ve bu dönemde bu inhibitör sistemin dentate gyrusta tümüyle geliştiği bildirilmiştir.^[20]

Sonuç olarak, WAG/Rij ırkı sıçan yavrularında, tekrarlayan febril nöbetlere ait latans değerlerinin Wistar grubuna göre daha uzun oluşu, bu hayvanlarda, deneysel febril nöbetler gibi limbik yapıları etkileyen nöbetlere karşı direncin bulunduğu şeklinde açıklanabilir. Bu direncin gelişiminde GABAerjik sistemin rolü olabileceği düşünülmeye rağmen, altta yatan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Dreifuss FE. The epilepsies: clinical implications of the international classification. *Epilepsia* 1990;31 Suppl 3:3S-10S.
2. Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A. Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg-a review. *J Neural Transm Suppl* 1992;35:37-69.
3. van Luijtelaa EL, Drinkenburg WH, van Rijn CM, Coenen AM. Rat models of genetic absence epilepsy: what do EEG spike-wave discharges tell us about drug effects? *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24 (Suppl D):65-70.
4. Coenen AM, Drinkenburg WH, Inoue M, van Luijtelaa EL. Genetic models of absence epilepsy, with emphasis on the WAG/Rij strain of rats. *Epilepsy Res* 1992;12:75-86.
5. Coenen AM, Van Luijtelaa EL. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* 2003;33:635-55.
6. Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M,

- Marescaux C. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 1998;55:27-57.
7. Peeters BW, van Rijn CM, Vossen JM, Coenen AM. Effects of GABA-ergic agents on spontaneous non-convulsive epilepsy, EEG and behaviour, in the WAG/RIJ inbred strain of rats. *Life Sci* 1989;45: 1171-6.
 8. Ates N, Esen N, Ilbay G. Absence epilepsy and regional blood-brain barrier permeability: the effects of pentylenetetrazole-induced convulsions. *Pharmacol Res* 1999;39:305-10.
 9. Eskazan E, Onat FY, Aker R, Oner G. Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia* 2002;43: 1115-9.
 10. Vergnes M, Boehrer A, Reibel S, Simler S, Marescaux C. Selective susceptibility to inhibitors of GABA synthesis and antagonists of GABA(A) receptor in rats with genetic absence epilepsy. *Exp Neurol* 2000; 161:714-23.
 11. Bender RA, Dube C, Gonzalez-Vega R, Mina EW, Baram TZ. Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 2003;13: 399-412.
 12. Klauenberg BJ, Sparber SB. A kindling-like effect induced by repeated exposure to heated water in rats. *Epilepsia* 1984;25:292-301.
 13. Arias C, Valero H, Tapia R. Inhibition of brain glutamate decarboxylase activity is related to febrile seizures in rat pups. *J Neurochem* 1992;58:369-73.
 14. Pedder SC, Wilcox R, Tucek J, Johnson DD, Crawford RD. Protection by GABA agonists, gamma-hydroxybutyric acid, and valproic acid against seizures evoked in epileptic chicks by hyperthermia. *Epilepsia* 1988;29:738-42.
 15. Jiang W, Duong TM, de Lanerolle NC. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat. *Epilepsia* 1999;40:5-19.
 16. Peeters BW. Studies on the basic mechanism underlying spike-wave discharges in rats. NICI, Nijmegen: University of Nijmegen: 1991.
 17. Gulec G, Noyan B. Do recurrent febrile convulsions decrease the threshold for pilocarpine-induced seizures? Effects of nitric oxide. *Brain Res Dev Brain Res* 2001;126:223-8.
 18. Johnson DD, Wilcox R, Tucek JM, Crawford RD. Experimental febrile convulsions in epileptic chickens: the anticonvulsant effect of elevated gamma-aminobutyric acid concentrations. *Epilepsia* 1985; 26:466-71.
 19. Rimmer EM, Richens A. Double-blind study of gamma-vinyl GABA in patients with refractory epilepsy. *Lancet* 1984;1(8370):189-90.
 20. Lubbers K, Wolff JR, Frotscher M. Neurogenesis of GABAergic neurons in the rat dentate gyrus: a combined autoradiographic and immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 1985;62:317-22.