

ABSANS EPİLEPSİ PATOFİZYOLOJİSİNDE NETRİN-1'İN YERİ

The Role of Netrin-1 in Absence Epilepsy Pathophysiology

Ramazan Yüksel¹, Gönül Gürol², Zeynep Seçkin Akkılık¹, Yunus Yükselten³, Sibel Sarı²,
Ahmet Emre Yeni¹, Sevil Arabacı², Didem Güneri¹, Fatih Ekici¹, Kadir Demircan⁴

¹Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

³Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara

⁴Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ÖZ

Amaç: Netrin-1 proteininin embriyonik gelişim boyunca akson yöneliminde ve hücre göçünde etkin rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca netrinin epilepsi patofizyolojisinde anormal sinaps gelişimi ve nöron göçüne katılabileceği de gösterilmiştir. Ancak absans epilepsinin gelişim sürecindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) sıçanların korteks ve talamus dokularındaki netrin ekspresyon düzeylerinin saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada genetik absans epilepsili 2 ve 6 aylık erkek WAG/Rij sıçanlar (n=14) ile epileptik olmayan 2 aylık ve 6 aylık erkek Wistar kontrol sıçanlar (n=14) kullanıldı. Anestezi altında dekapite edilen tüm sıçanların korteks ve talamus dokuları izole edildi. Gruplar arasındaki netrin-1 ekspresyonunun düzeyi standart teknikler kullanılarak Western Blot yöntemiyle tayin edildi ve dansiteler arasındaki farklar gruplar arasında karşılaştırıldı.

Bulgular: Elde edilen verilere göre; absans epilepsili WAG/Rij sıçanlar ile epileptik olmayan Wistar sıçanların beyin korteks ve talamus bölgelerinde netrin-1 ekspresyonu saptanmamıştır.

Sonuç: Bu çalışma, netrin-1 ekspresyonunun absans epilepsideki etkisinin Western Blot yöntemiyle araştırıldığı ilk çalışmadır. Elde edilen bulgulardan yola çıkılarak moleküler ve histolojik yöntemleri içeren kapsamlı çalışmalar planlanmalı, deneysel olarak elde edilen netrin-1 bulguları konfirme edilmelidir.

Anahtar Kelimeler: WAG/Rij sıçan, Absans epilepsi, Netrin-1

ABSTRACT

Aim: It is known that netrin-1 protein features in axon drift and cell migration during embryologic development. Also it is shown that netrin can attend abnormal synapse development and neuron migration within epilepsy pathophysiology. However the effect of netrin on absence epilepsy progress process hasn't known yet. In this study, we aimed to determine expression level of netrin in cortex and thalamus tissues of Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) rats.

Material and Method: 2 months old and 6 months old male WAG/Rij rats (n=14) with absence epilepsy and for control 2 months old and 6 months old non-epileptic male Wistar rats (n=14) are used. All of the rats are decapitated under anesthesia and their cortex and thalamus tissues are isolated. Netrin-1 level of the groups are determined by Western Blot method by using standart techniques and differences between dansities of the groups are compared.

Results: According to data obtained, there was no netrin-1 expression in brain cortex and thalamus tissues of WAG/Rij rats with absence epilepsy and non-epileptic Wistar rats.

Conclusion: This is the first study that searched the effect of netrin-1 expression on absence epilepsy by Western Blot method. By evaluating the findings obtained, extensive researches that contain molecular and histological methods must be planned, netrin-1 findings that are obtained experimentally must be confirmed.

Key Words: WAG/Rij rat, Absence epilepsy, Netrin-1

Gönderme tarihi / Received: 13.10.2015 **Kabul tarihi / Accepted:** 30.10.2015

İletişim: : Ramazan YÜKSEL, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Eskişehir Yolu Lodumlu Mevkii, Ankara Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Yanı, Bilkent, Ankara TURKEY

Tel: +905078872463 **E-posta:** ryuksel38@gmail.com

GİRİŞ

Absans epilepsi, genelde 4-12 yaşlar arasında görülen, yaklaşık 6-7 yıl kadar süren bir çocukluk çağı epilepsisidir. Elektroensefalografi (EEG)'de absans nöbetlere, çift taraflı senkron ve simetrik, 2.5-3.5 Hz frekanslı, 100-1200 µV genlikte diken-dalga deşarjları (DDD) eşlik eder (1). Absans epilepsi deneysel modelinde insandaki absans epilepsi ile benzerliklerinden dolayı, inbred olarak üretilen Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) ve Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS) ırkı genetik epilepsili sıçanlar tercih edilmektedir (2, 3). Absans epilepsi modellerinde, DDD'lerin oluşumundan temelde talamokortikal döngüdeki anormal salınımların sorumlu olduğu ve bu ossilasyonların oluşumunda retiküler talamik çekirdeklerin pacemaker aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu deşarjlar, 2-3 aylıkken belirginleşip (daha erken yaşlarda görülmemekle birlikte), 6 aylık sıçanlarda tam olarak görülmektedir. Bu DDD'lerin her iki hemisfer kortekste ve talamusun lateral parçasında çift taraflı ve senkron olarak gözlemlendiği ancak limbik yapılarda ortaya çıkmadığı bilinmektedir (4, 5).

Epilepsi, popülasyonda %0,5-1 prevalansı ile kronik spontan tekrarlayan epileptik nöbetler ile karakterize yaygın nörolojik bozukluklardan biridir (6, 7). Epileptogenezis gibi patolojik durumlarda nöronal ağların yeniden organize olması adına aktif bir sinaptogenez süreci söz konusudur (8). Sinaps oluşumu ve devamlılığının sağlanmasında etkili olduğu bilinen netrin ailesinin özellikle sinaptogenezis ve sinaptik fonksiyon için yeni regülatörler olabileceği vurgulanmaktadır (9, 10).

Netrin-1, sinirsel gelişim esnasında akson yöneliminde etkili olan 60-80 kD ağırlığında laminin benzeri bir proteindir (11). Netrin-1'in embriyonik gelişim boyunca akson yöneliminde ve hücre göçünde etkin rol oynadığı bilinmektedir (12). Netrin ailesi üyelerinden biri olan netrin-1'in kortikal sinapslarda arttığı ve sinaptogenezisin erken postnatal periyotlarında maksimum düzeye ulaştığı

belirtilmektedir. Goldman ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada juvenil (postnatal 5 ve 20 günlük) sıçanların korteks dokularında artan netrin-1'in eksitator sinapslarla yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir (13).

Netrin-1'in nöronal gelişim sürecindeki etkisinin yanı sıra ekstrasellüler matriks ve/veya membranlarda da etkin olabileceğine dair kanıtların var olması üzerine netrin molekülünün epilepsi patofizyolojisindeki rolü son zamanlarda araştırma konusu olması açısından güncelliğini korumaktadır. Bu alandaki çalışmaların neticesinde netrinin epilepsi patofizyolojisinde anormal sinaps gelişimi ve nöron göçüne katılabileceği birkaç çalışma ile gösterilmiştir (14). Ancak absans epilepsinin genetik bir modeli olan WAG/Rij sıçanlardaki epilepsinin gelişim sürecindeki etkisi henüz çalışılmamıştır. Bu çalışmada ise WAG/Rij sıçanların korteks ve talamus dokularındaki netrin ekspresyon düzeylerinin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar

Çalışmada genetik absans epilepsili 2 ve 6 aylık erkek WAG/Rij sıçanlar (n=14) ile 2 ve 6 aylık epilepsi olmayan Wistar kontrol sıçanlar (n=14) kullanıldı. Tüm hayvanlar standart laboratuvar koşullarında, 12/12 saat aydınlık karanlık döngüsünde, 21 ± 2°C sıcaklık, %50 nem, yiyecek ve içecek alımları serbest olacak şekilde barındırıldı. Etik kurul onayı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı.

Western Blot Analizi

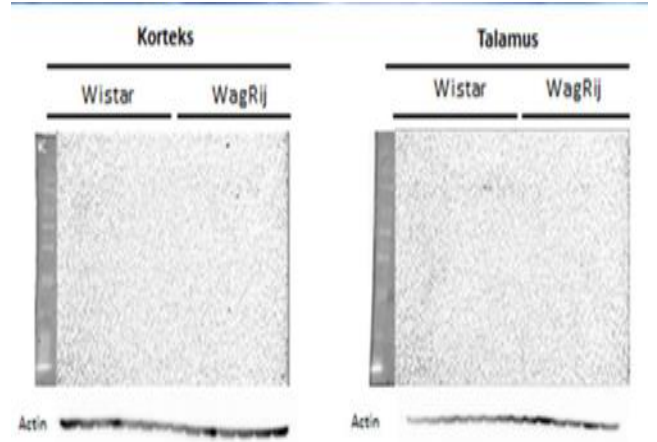
Tüm hayvanlar ketamin (100 mg/kg-ip) ve klorpromazin (1 mg/kg-ip) anestezisi altında perfüze edildikten sonra dekapite edildi. Korteks ve talamus dokuları izole edilerek soğuk zincirle moleküler çalışmaların yapıldığı Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na götürüldü. Moleküler çalışmaların yapılacağı güne kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Tüm dokulardaki

netrin-1'in ekspresyon düzeyi standart Western Blot protokolü ile belirlendi (15).

Tüm korteks ve talamus dokularında protein ekstraksiyonu ticari kit (CellLytic M Cell lysis reagent, Sigma, St. Louis, MO) ile tarif edildiği gibi uygulandı. Protein konsantrasyonu Bradford (Biorad) yöntemi kullanılarak yapıldı. Herbir örnek için 10 µg protein %4-5'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jele yüklendi. Proteinler nitroselülöz membrana (Millipore, Billerica, MA) transfer edildi ve 1 saat bloklama solüsyonu ile bloklandı. Bloklama sonrası membranlar 4°C'de bir gece primer antikolar Netrin-1: Anti-Netrin 1 antikoru (Abcam, cat.no. ab126729) ile inkübe edildi. Sonrasında HRP ile konjuge edilmiş sekonder antikolar ile inkübe edildi. Kemilüminesans saptama kiti (ECL; Amersham Biosciences, İngiltere) kullanılarak protein bantları görüntüledi. Bantların yoğunluğu Quantity One (Bio-Rad) Software programı kullanılarak belirlendi. Bantların yoğunluğu beta-aktin (Abcam) antikoruyla göre normalize edildi.

BULGULAR

Her iki grupta 2 aylık sıçanların ortalama ağırlıkları 165,7 ±32,3 gr, 6 aylık sıçanların ortalama ağırlıkları 274,5 ±28,2 gr olarak saptandı. Protein ekstraksiyonu sonrası boya bağlama esaslı yöntem olarak en yaygın kullanılan Bradford yöntemiyle yapılan miktar tayininde 2 ve 6 aylık WAG/Rij ile 2 ve 6 aylık Wistar sıçanlar için sırasıyla 5,8±2,8, 8,6±3,4, 5,2±3,1, 9,2±3,2 mg/ml düzeyinde protein varlığı saptandı. Tüm gruplarda deney protokolü 4 kez tekrar edilmiş tüm çalışmalarda iç kontrol olarak kullanılan Actin için pozitif bulgu elde edildi. Ancak netrin-1 için hiçbir grupta ekspresyon saptanamadı (Şekil 1).



Şekil 1. İki (a) ve altı (b) aylık Wag/Rij ve Wistar sıçanların korteks ve talamus dokularındaki Netrin-1 ekspresyon görüntüsü.

TARTIŞMA

Epileptogenez gibi patolojik şartlarda nöronal ağların yeniden organize olması adına aktif bir sinaptogenez süreci söz konusudur (8). Posttravmatik epilepsi ve status epileptikusta, anormal aksonal filizlenme ve anormal sinaptogenezin epileptik oluşumuna katkı sağladığı gösterilmektedir (16). Ayrıca nöronal yaralanmayı takiben temporal lob içinde aksonal filizlenme ve sinaptik reorganizasyonun temporal lob epilepsisi (TLE) patogenezini de kapsadığı bildirilmektedir (17). Pereno ve ark. (2010) dirençli TLE'nin deneysel modellerinde kainik asit uygulanımı sonrasında amigdalada nöron filizlenmesinin reaktif sinaptogenez süreci için önemli bir kanıt olabileceğini bildirmişlerdir (18). Elektrokonvülsif terapi sıçan modelinde tekrarlayan nöbetlerin sıçan hipokampusunda nörojenezi, sinaptogenez ve sinapsların yeniden oluşumunu uyardığı tasarım tabanlı stereology kullanarak hipokampusun alt bölgelerindeki farklı sinaps tiplerine ve nöron sayılarına göre saptanmıştır. Ayrıca hipokampal CA1 bölgesinde filizlenen sinaps ve toplam sinaps sayısında önemli bir artış belirlenmiştir (19). Dolayısıyla netrin ailesi de sinaps oluşumunun ve devamlılığının sağlanmasında etkili olduğu için netrinlerin, sinaptogenez ve sinaptik fonksiyon için

yeni regülatörler olabileceği vurgulanmaktadır (9, 10).

İnsandaki absans epilepsi ile benzerliklerinden dolayı geçerli bir genetik model olarak kullanılan WAG/Rij sıçanlarda EEG’de kendiliğinden görülen DDD’ler talamokortikal döngüdeki anormal salınımlardan kaynaklanmaktadır. DDD’ler, bu sıçanlarda 2-3 aylıkken belirginleşirken (daha erken yaşlarda görülmemekle birlikte), 6 aylık sıçanlarda tam olarak görülmektedir. Çalışmamızın sonucunda netrin-1’in hem WAG/Rij hem de Wistar sıçanlarda yaşa bağlı olarak eksprese edilmediği bulunmuştur. Ancak bu ön bulguların daha kapsamlı moleküler ve histolojik yöntemler ile konfirme edilmesine ihtiyaç vardır.

REFERANSLAR

1. Dreifuss FE. The epilepsies: clinical implications of the international classification. *Epilepsia*. 1990;31:53-10.
2. Bambal G, Çakıl D, F E. Deneysel epilepsi modelleri. *Journal Of Clinical & Experimental Investigations / Klinik Ve Deneysel Arastirmalar Dergisi*. 2011;2(1):118-23.
3. Akman Ö, Karson A, Ateş N. Genetik Absans Epilepsili WAG/Rij Yavru Sıçanlarda Febril Nöbet Duyarlılığı. *Epilepsi*. 2005;11(1):11-5.
4. Coenen AM, Van Luijteleaer EL. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behavior genetics*. 2003;33(6):635-55.
5. Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Progress in neurobiology*. 1998;55(1):27-57.
6. Deng H, Zheng W, Song Z. Genetics, molecular biology, and phenotypes of x-linked epilepsy. *Molecular neurobiology*. 2014;49(3):1166-80.
7. Perks A, Cheema S, Mohanraj R. Anaesthesia and epilepsy. *British journal of anaesthesia*. 2012;108:562-71.
8. Sbai O, Khrestchatisky M, Esclapez M, Ferhat L. Drebrin A expression is altered after pilocarpine-induced seizures: time course of changes is consistent for a role in the integrity and stability of dendritic spines of hippocampal granule cells. *Hippocampus*. 2012;22(3):477-93.
9. Shen K, Cowan CW. Guidance molecules in synapse formation and plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(4):a001842.
10. Flores C. Role of netrin-1 in the organization and function of the mesocorticolimbic dopamine system. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*. 2011;36(5):296-310.
11. Akino T, Han X, Nakayama H, McNeish B, Zurakowski D, Mammoto A, et al. Netrin-1 promotes medulloblastoma cell invasiveness and angiogenesis, and demonstrates elevated expression in tumor tissue and urine of patients with pediatric medulloblastoma. *Cancer research*. 2014;74(14):3716-26.
12. Hakanen J, Duprat S, Salminen M. Netrin1 is required for neural and glial precursor migrations into the olfactory bulb. *Developmental biology*. 2011;355:101-14.
13. Goldman JS, Ashour MA, Magdesian MH, Tritsch NX, Harris SN, Christofi N, et al. Netrin-1 promotes excitatory synaptogenesis between cortical neurons by initiating synapse assembly. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(44):17278-89.
14. Pan Y, Liu G, Fang M, Shen L, Wang L, Han Y, et al. Abnormal expression of netrin-G2 in temporal lobe epilepsy neurons in humans and a rat model. *Experimental neurology*. 2010;224(2):340-6.
15. Demircan K, Topcu V, Takigawa T, Akyol S, Yonezawa T, et al. ADAMTS4 and ADAMTS5 knockout mice are protected from versican but not aggrecan or brevican proteolysis during spinal cord injury. *BioMed Research International*. 2014;2014:693746
16. Zhao CS, Overstreet-Wadiche L. Integration of adult generated neurons during epileptogenesis. *Epilepsia*. 2008;49(5):3-12.
17. Lerner AJ. Axonal sprouting and synaptogenesis in temporal lobe epilepsy: possible pathogenetic and therapeutic roles of neurite growth inhibitory factors. *Seizure*. 1995;4(4):249-58.
18. Pereno GL, Beltramino CA. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity. *Brain research*. 2010;1328:130-8.
19. Chen F, Madsen TM, Wegener G, Nyengaard JR. Repeated electroconvulsive seizures increase the total number of synapses in adult male rat hippocampus. *European neuropsychopharmacology*. 2009;19(5):329-38.