

Absans epilepsinin genetik sıçan modeli olan WAG/Rij sıçanların beyin dokularında Fetuin-A ekspresyonu

The expression of Fetuin-A in brain tissues of WAG/Rij Rats, genetic rat model of absence epilepsy

Ramazan Yüksel¹, Gönül Gürol², Zeynep Seçkin Akkılık¹, Sibel Sarı², Sevil Arabacı², Didem Güneri¹, Kadir Demircan³, Fatih Ekici¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada epilepsinin tanı, tedavi ve prognoz takibinde yeni olası belirteçlerin saptanmasına katkı sağlamak amacı ile absans epilepsili Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) sıçanlarda beyinin farklı bölgelerinde Fetuin-A düzeylerinin saptanması amaçlandı.

Yöntemler: Bu çalışmada genetik absans epilepsili 1, 3 ve 6 aylık erkek WAG/Rij sıçanlar (n=21) kullanıldı. Anestezi altında dekapite edilen tüm sıçanların korteks ve talamus dokuları izole edildi. Gruplar arasındaki Fetuin-A 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 sıçanların korteks ve talamus bölgelerinde Fetuin-A ekspresyonu saptanmadı.

Sonuç: Bu çalışmada yaşa bağlı gelişim sürecinde absans epilepsili WAG/Rij sıçanların korteks ve talamuslarında Fetuin-A ekspresyonunun olmadığı gösterildi. Elde edilen bulgulardan yola çıkılarak daha ileri moleküler ve histolojik yöntemleri içeren kapsamlı çalışmalar planlanmalı, deneysel olarak elde edilen Fetuin-A bulguları konfirme edilmelidir.

Anahtar kelimeler: Absans epilepsi, Fetuin-A, WAG/Rij sıçan

ABSTRACT

Objective: In the present study, we aimed to determine the Fetuin-A levels in different regions of the brain in absence epileptic Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) rats in order to contribute the identification of new potential biomarkers of the diagnosis, prognosis and follow up the epilepsy treatment.

Methods: 1, 3 and 6 months old male WAG/Rij rats (n=21) with absence epilepsy were used in this study. All of the rats were decapitated under anesthesia and their cortex and thalamus tissues were isolated. Fetuin-A levels of the groups were determined by Western Blot method by using standard techniques and differences between densities of the groups were compared.

Results: According to data obtained, there was no Fetuin-A expression in brain cortex and thalamus tissues of WAG/Rij rats with absence epilepsy.

Conclusion: In this study, it was shown that Fetuin-A is not expressed in brain cortex and thalamus tissues of WAG/Rij rats with absence epilepsy throughout the age-related development. By evaluating the findings obtained, extensive researches that contain molecular and histological methods must be planned, Fetuin-A findings that are obtained experimentally must be confirmed. *J Clin Exp Invest* 2015; 6 (4): 387-390

Key words: Absence epilepsy, Fetuin-A, WAG/Rij rat

¹ Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

² Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

³ Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Correspondence: Ramazan Yüksel,

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyojji AD, Bilkent, Ankara, Türkiye Email: ryuksel38@gmail.com

Received: 07.10.2015, Accepted: 26.10.2015

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2015, All rights reserved

GİRİŞ

Epilepsi dünyada yaygın olan, populasyonda %1 prevalansında öngörülen bir durumdur. Epilepsi, beyindeki nöronların hipereksitabilite ve hipersenkronizasyon durumundan kaynaklanan, spontan tekrarlayan nöbetler ile karakterize nörolojik bir durumdur [1]. En yüksek insidans çocukluk çağıında ve yaşlılıkta bulunurken, daha düşük düzeyleri erken erişkinlikte meydana gelmektedir [2]. Çocukluk çağı absans epilepsisinde tipik absans nöbetlerine eşlik eden 5-10 saniye süreli bilateral senkron 3 Hz diken dalga aktivitesi elektroensefalogram (EEG) de görülmektedir [3].

Absans nöbetlerin primer sebebi olarak özellikle, talamokortikal ritimdeki anormal dönüşümler genellikle tarif edilmektedir [4-5]. İnsandaki absans epilepsi ile benzerliklerinden dolayı geçerli bir genetik model olarak kullanılan Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) sıçanlarda EEG'de kendiliğinden görülen diken dalga deşarjları 2-3 aylıkken belirginleşip (daha erken yaşlarda görülmemekle birlikte), 6 aylık sıçanlarda tam olarak görülmektedir [6].

İlk olarak fetal sığır serumundan izole edilmiş bir protein olan Fetuin-A'nın, gerek fizyolojik gerekse patofizyolojik birçok süreçte rol alan sistein proteaz inhibe edici faktör 'sistatin' süper ailesine ait 59 kDa ağırlığında bir peptid olduğu belirtilmektedir [7-8]. Embriyogenezde fetal gelişim sırasında Fetuin-A'nın beyin, karaciğer, kemik, böbrek, solunum ve kardiyovasküler sistemlere ait gelişmekte olan birçok dokuda eksprese olduğu gösterilmiştir [9]. Son dönemdeki çalışmalarda Fetuin-A'nın sinir sistemindeki etkileri araştırılmaya başlanılmıştır. Ancak absans epilepsideki rolü henüz bilinmemektedir.

WAG/Rij sıçanlarda yaşa bağlı olarak görülen nöbet aktivitesinin ortaya çıkması ile ilişkili olabilecek olası protein ekspresyon değişikliklerinin bilinmesi, hem yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesine hem epilepsi açısından risk altında bulunan bireylerin belirlenmesine belki de epileptogenezin engellenmesine aracılık edebilmesi açısından, gerekmektedir. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı farklı yaş gruplarındaki WAG/Rij sıçanların farklı beyin bölgelerinde Fetuin-A'nın ekspresyon düzeylerinin saptanmasıdır.

YÖNTEMLER

Hayvanlar

Çalışmada genetik absans epilepsili 1, 3 ve 6 aylık erkek WAG/Rij sıçanlar (n=21) kullanıldı. Tüm hayvanlar standart laboratuvar koşullarında, 12/12 saat

aydınlık-karanlık döngüsünde, $21 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, %50 nem, yiyecek ve içecek alımları serbest olacak şekilde barındırıldı. Etik kurul onayı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (protokol no: 2014/23).

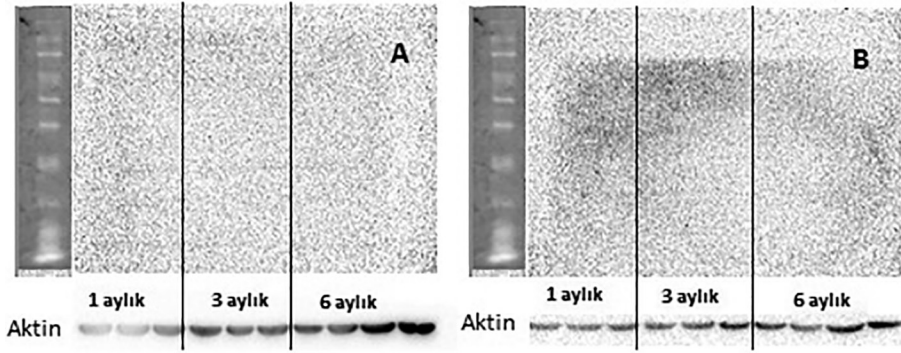
Western Blot Analizi

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 Fetuin-A'nın ekspresyon düzeyi standart Western Blot protokolü ile belirlendi [10].

Tüm korteks ve talamus dokularında protein ekstraksiyonu ticari kit (CellLytic M Cell lysis reagent, Sigma, St. Louis, MO) ile tarif edildiği gibi uygulanmıştır. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Her bir 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 blokama solüsyonu ile bloklandı. Blokama sonrası membranlar 4°C 'de bir gece primer antikorlar Fetuin-A: Anti- Fetuin-A antikoruna (Santa Cruz Biotechnology Inc.) ile inkübe edildi. Sonrasında HRP ile konjuge edilmiş sekonder antikorlar ile inkübe edildi. Kemilüminesans saptama kiti (ECL; Amersham Biosciences, İngiltere) kullanılarak protein bantları görüntülendi. Bantların yoğunluğu Quantity One (Bio-Rad) Software programı kullanılarak belirlendi. Bantların yoğunluğu beta-aktin (Abcam) antikoruna göre normalize edildi.

BULGULAR

1 aylık WAG/Rij sıçanların ortalama ağırlıkları $63,5 \pm 12,8$ gr iken 3 aylık WAG/Rij sıçanların ortalama ağırlıkları $202 \pm 3,4$ olarak bulundu. 6 aylık WAG/Rij sıçanların ise ortalama ağırlıkları $253 \pm 4,3$ olarak hesaplandı. Protein ekstraksiyonu sonrası boya bağlama esaslı yöntem olarak en yaygın kullanılan Bradford yöntemiyle yapılan miktar tayininde 1, 3 ve 6 aylık WAG/Rij'lar için sırasıyla $4,2 \pm 1,9$, $6,1 \pm 4,5$, $9,2 \pm 2,1$ mg/ml düzeyinde protein saptandı. Tüm gruplarda deney protokolü 4 kez tekrar edildi ve tüm çalışmalarda iç kontrol olarak kullanılan beta-aktin için pozitif bulgu elde edildi. Fetuin-A için hiçbir grupta ekspresyon saptanamadı (Şekil 1).



Şekil 1. WAG/Rij sıçanların korteks (A) ve talamus (B) dokularındaki Fetuin-A ekspresyon görüntüsü

TARTIŞMA

Epilepsinin gelişmesinde birçok faktör etkili olabilmektedir. Epilepsi ile ilgili fizyolojik, moleküler ve hüresel düzeyde bugüne kadar birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen epilepsinin patogenezi yeterli bir şekilde bilinmemektedir. Bununla birlikte, nöbetlerin indüklenmesinin altında yatan yollar ve moleküler mekanizmalar da henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Son dönemde yapılan birçok çalışmanın neticesinde epileptik nöbetler ile beyindeki inflamatuvar yanıt arasında bir ilişkinin olduğu fikrine ulaşılmıştır [11-12]. Mikroglia ve astrositlerin aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin ve ilişkili moleküllerin üretimini içeren inflamatuvar süreçler hem epilepsinin deneysel modellerinde hem de epilepsi hastalarında tanımlanmıştır. Nöbetlerin indüklediği glial aktivasyonun ve proinflamatuvar sitokinlerin up-regülasyonunun ya direk olarak glutamaterjik nörotransmisyon ile etkileşerek ya da indirekt olarak gen transkripsiyonunu aktive ederek nöronal uyarılmaya ve nöronal hasara neden olabileceği çeşitli deneysel verilerle vurgulanmaktadır [13]. IL-1 β ve TNF- α seviyelerinin elektriksel amigdala kindling sonrasında tüm beyin dokusunda arttığı belirtilmiştir [14]. Ayrıca farklı bir çalışmada, intraperitoneal TNF- α uygulamasının ardından amigdalanın kindling yatkınlığının arttığı gösterilmiştir [15]. Buna ek olarak, sistemik kainik asit enjeksiyonuna cevap olarak IL-1 β mRNA'sının hızla arttığı gösterilmiş ve IL-1 sisteminin eksitotoksik hasar sırasında inflamatuvar cevapta rol aldığı desteklenmiştir [16]. Absans epilepsinin genetik modelleri olan WAG/Rij sıçanlarda da IL-1 β ve TNF- α 'nın sistemik olarak uygulanmasının ardından EEG kayıtlarında gözlenen diken dalga deşarjlarının önemli ölçüde arttığı da gösterilmiştir [17-18].

Proinflamatuvar sitokin üretimini inhibe eden bir antiinflamatuvar glikoprotein olan Fetuin-A trombositopeni, ateroskleroz, serebral iskemide gibi farklı pek

çok inflamatuvar sürece katılmaktadır [18-21]. Fetuin-A gen ekspresyonunun sıçan karaciğer hepatositlerinde TNF- α ve insan hepatositlerinde de IL-6 ve IL-1 β tarafından down-regüle edildiği ifade edilmektedir [22-23]. Fetuin-A'nın fetal beyin omurilik sıvısındaki (BOS) düzeyi yüksektir. Fetuin-A'nın BOS/plazma oranının fetüs ve yenidoğanda yetişkinlere oranla daha yüksek bulunmuş olması yaşla birlikte ekspresyonunun değişebileceğini düşündürmektedir [7-9]. Bununla birlikte proteom çalışmalarında Fetuin-A'nın multiple skleroz [24-25] ve Alzheimer hastalıkları için biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir [26]. Ancak literatürde epilepsi ile Fetuin-A arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada absans epilepsili WAG/Rij sıçanlardaki diken dalga deşarjlarının oluşumundan sorumlu olan talamokortikal döngüdeki ateşlenmenin yaşa bağlı gelişiminde Fetuin-A'nın rolünün olmadığı ilk kez gösterilmiştir. Ancak bu bulguların WAG/Rij sıçanlarda moleküler ve histolojik bulgular ile desteklenerek teyit edilmesi gereklidir. Bununla birlikte Fetuin-A ekspresyonunun, diğer klinik ve deneysel epilepsi modellerinde de araştırılarak epilepsideki olası rolünün açıkça literatürde belirtilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, et al. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 2013;36:174-184.
2. Zupec-Kania BA, Spellman E. An overview of the ketogenic diet for pediatric epilepsy. *Nutr Clin Pract* 2009;23:589-596.
3. Vanlı Yavuz EN, Bebek N. Epilepsi tanı ve tedavisinde elektroensefalografinin (EEG) yeri. *Klinik Gelişim* 2010;23:35-38.
4. Sitnikova E, van Luijckelaar G. Cortical and thalamic coherence during spike-wave seizures in WAG/Rij rats. *Epilepsy Res* 2006;71:159-180.

5. Sitnikova E, van Luijtelaar G. Electroencephalographic characterization of spike-wave discharges in cortex and thalamus in WAG/Rij rats. *Epilepsia* 2007;48:2296-2311.
6. Coenen AM, van Luijtelaar EL. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* 2003;33:635-655.
7. Mori K, Emoto M, Inaba M. Fetuin-A and the cardiovascular system. *Adv Clin Chem* 2012; 56: 175-195.
8. Ma S, He Z, Zhao J, et al. Association of AHSG gene polymorphisms with ischemic stroke in a Han Chinese population. *Biochem Genet* 2013;51:916-926.
9. Dziejielewska KM, Mollgard K, Reynolds ML, Saunders NR. A Fetuin-related glycoprotein (alpha 2HS) in human embryonic and fetal development. *Cell Tissue Res* 1987;248:33-41.
10. Demircan K, Topcu V, Takigawa T, et al. ADAMTS4 and ADAMTS5 knockout mice are protected from versican but not aggrecan or brevicin proteolysis during spinal cord injury. *Biomed Res Int* 2014;2014:693746.
11. Patel HC, Ross FM, Heenan LE, et al. Neurodegenerative actions of interleukin-1 in the rat brain are mediated through increases in seizure activity. *J Neurosci Res* 2006;83:385-391.
12. Akin D, Ravizza T, Maroso M, et al. IL-1 β is induced in reactive astrocytes in the somatosensory cortex of rats with genetic absence epilepsy at the onset of spike-and-wave discharges, and contributes to their occurrence. *Neurobiol Dis* 2011;44:259-269.
13. Choi J, Koh S. Role of brain Inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J* 2008;49: 1-18.
14. Vezzani A. Brain inflammation and seizures. *Epilepsy Curr* 2004;4:73-75.
15. Shandra AA, Godlevsky LS, Vastyanov RS, et al. The role of TNF-alpha in amygdala kindled rats. *Neurosci Res* 2002;42:147-153.
16. Eriksson C, Zou LP, Ahlenius S, et al. Inhibition of kainic acid induced expression of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist mRNA in the rat brain by NMDA receptor antagonists. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;85:103-113.
17. Bambal G, Çakıl D, Ekici F. Models of experimental epilepsy *J Clin Exp Invest* 2011;2:118-123.
18. Luijtelaar G, Lyashenko S, Vastyanov R, et al. Cytokines and absence seizures in a genetic rat model. *Neurophysiology* 2012;43:478-486.
19. Bilgir F, Bilgir O, Kebapçılar L, et al. Soluble CD40 ligand, high sensitive C-reactive protein and fetuin-A levels in patients with essential thrombocythemia. *Transfus Apher Sci* 2012;46:67-71.
20. Lim P, Moutereau S, Simon T, et al. Usefulness of fetuin-A and C-reactive protein concentrations for prediction of outcome in acute coronary syndromes (from the French Registry of Acute ST-Elevation Non-ST-Elevation Myocardial Infarction [FAST-MI]). *Am J Cardiol* 2013;111:31-37.
21. Smith ER, Nilforooshan R, Weaving G, Tabet N. Plasma fetuin-A is associated with the severity of cognitive impairment in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011;24:327-333.
22. Daveau M, Davrinche C, Djelassi N, et al. Partial hepatectomy and mediators of inflammation decrease the expression of liver alpha 2-HS glycoprotein gene in rats. *FEBS Lett* 1990;273:79-81.
23. Daveau M, Christian-Davrinche, Julien N, et al. The synthesis of human alpha-2-HS glycoprotein is down-regulated by cytokines in hepatoma HepG2 cells. *FEBS Lett* 1988;241:191-194.
24. Harris VK, Donelan N, Yan QJ, et al. Cerebrospinal fluid fetuin-A is a biomarker of active multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013;19:1462-1472.
25. Ottervald J, Franzén B, Nilsson K, et al. Multiple sclerosis: Identification and clinical evaluation of novel CSF biomarkers. *J Proteomics* 2010;73:1117-1132.
26. Puchades M, Hansson SF, Nilsson CL, et al. Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;118:140-146.