

Genetik Absans Epilepsili Sıçanların (GAERS) Hipokampusunda Glukoz-6-Fosfataz'ın Histokimyasal Olarak Dağılımı

Gözde Erkanlı Şentürk¹, Şükrü Midillioğlu², Şehnaz Bolkent³, Serap Arbak¹

¹Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji, İstanbul, Türkiye

²Ümraniye 7 Nolu Aile Hekimliği Merkezi, Aile Hekimliği, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Epilepsi tekrarlayan nöbetlerin varlığı ile belirgin ve sıklıkla geçici bilinç kayıplarına neden olan bir hastalıktır. Absans epilepsi modeli için kullanılan deney hayvanları olarak bilinen Genetik Absans Epilepsili Sıçanlar (GAERS) genetik olarak belirlenmiş nöbetler geçirmekte olup, 1980'li yıllardan itibaren insan absans epilepsi modelini teşkil edecek şekilde deneysel çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, absans epilepsi modeli için kullanılan GAERS sıçanlarda beyinde karbonhidrat metabolizmasında anahtar bir enzim olan glukoz-6-fosfataz aktivitesindeki değişiklik histokimyasal metotlarla araştırılmış ve hipokampusdaki glukoz metabolizması – glukoz-6-fosfataz – epileptogenez ilişkileri kontrol grubunu oluşturan Wistar albino sıçanlarla kıyaslanarak belirlenmeye çalışılmıştır. Kontrol gruplarında, epileptik olmayan Wistar albino (*Rattus norvegicus*) 4 aylık (n: 4), erkek, 220–240 gr ağırlığında sıçanlar kullanıldı. Deney gruplarında ise 6 aylık (n: 4), 250–300 gr ağırlığında, EEG'de absans nöbetler geçirdikleri belirlenmiş olan GAERS sıçanlar kullanıldı. Her iki deney grubunda hipokampusun Dentat Girus (DG) ve Cornu Ammonis (CA) bölgelerine glukoz-6-fosfataz histokimyası uygulandı. Kontrol grubu sıçanlara kıyasla GAERS sıçanlarda DG ve CA bölgelerinde glukoz-6-fosfataz reaktivitesinde bir artış olduğu enzim histokimyası uygulaması sonrası saptandı. Sonuç olarak, generalize konvulziv atakların glukoz kullanımını arttırdığının bilinmesinden yola çıkarak epilepsi vakalarında merkezi olarak verilecek glukoz-6-fosfatazın tedaviye yönelik olarak kullanımını destekler deneysel çalışmaların da ileride yapılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: glukoz-6-fosfataz, GAERS, histokimya

HISTOCHEMICAL DISTRIBUTION OF GLUCOSE -6- PHOSPHATASE IN HIPPOCAMPUS OF GENETIC ABSANCE EPILEPTIC RATS (GAERS)

ABSTRACT

Epilepsy is a disease with repeated seizures and usually caused transient ischemic attacks. Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) were recently used as a model for absence epilepsy. It has been used in experimental research in order to form the human absence epilepsy model since 1980. The aim of this study is to reveal changes in glucose-6-phosphatase activity which is the key enzyme of carbohydrate mechanism, at light microscopical levels by means of histochemical methods in GAERS's brain. The correlation between the glucose metabolism and epileptogenesis has also been tried to be evaluated in this study. In control groups, non-epileptic Wistar albino, 4-months old, male, (220–240 gr) rats were used (n: 4). Six-months old, (250–300 gr) GAERS rats with previously determined absence seizures constituted the experimental group (n: 4) Glucose-6-phosphatase histochemistry were examined within hippocampal Dentate Gyrus (DG) and Cornu Ammonis (CA) regions. Glucose-6-phosphatase reactivity were determined to be increased in DG and CA1 region in GAERS groups compared to the control group. As a result, based on the knowing generalized convulsive seizures increases the glucose utilization, glucose-6-phosphatase may be given in experimental studies, in order to treat with glucose-6-phosphatase in the cases of epilepsy in the future.

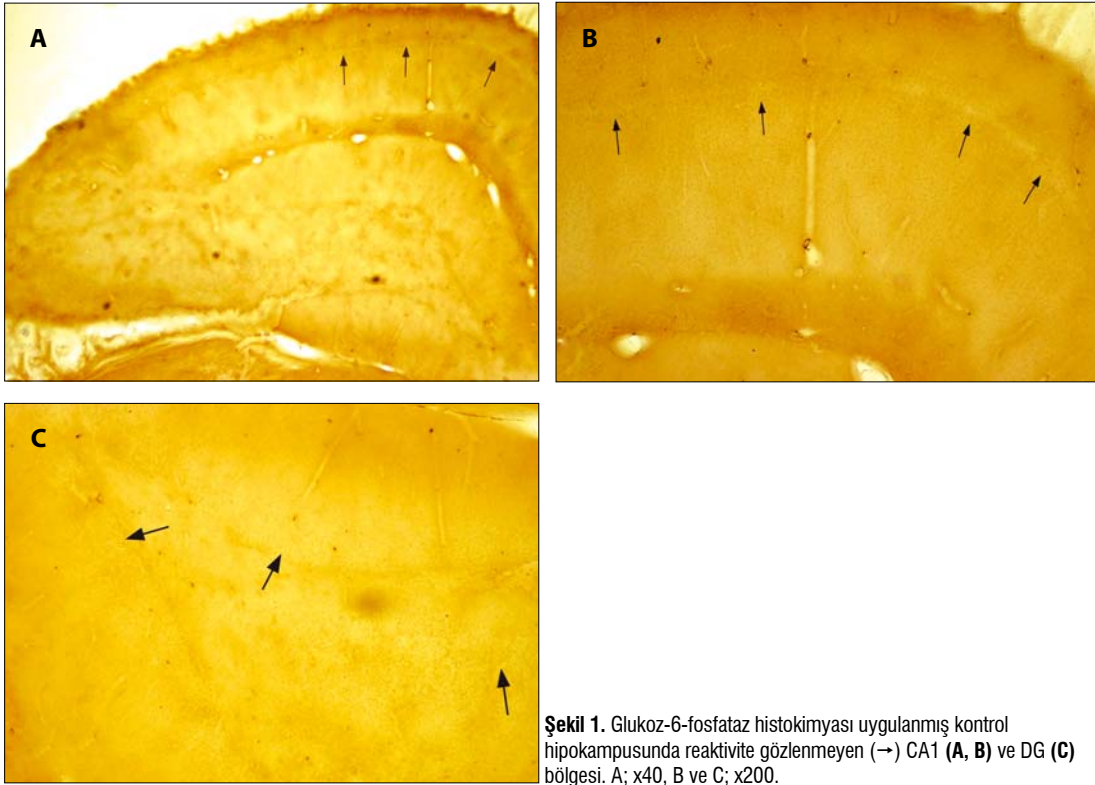
Key word: glucose-6-phosphatase, GAERS, histochemistry

Giriş

Epilepsi tekrarlayan nöbetlerin varlığı ile belirgin ve sıklıkla geçici bilinç kayıplarına neden olan bir hastalıktır. Son yıllarda epileptik nöbetlerin oluşturduğu nöronal hasarın aydınlatılması hususunda yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Gönderilme Tarihi: 26 Ekim 2010 • **Revizyon Tarihi:** 26 Ekim 2010 • **Kabul Tarihi:** 30 Aralık 2010
İletişim: Gözde Erkanlı Şentürk • **Tel:** 0(216) 4580868 • **E-Posta:** gozde.senturk@acibadem.edu.tr

Öte yandan Genetik Absans Epilepsili Sıçanlar (GAERS) absans epilepsi modeli için kullanılan deney hayvanları olarak bilinmektedir. Bu hayvanlar Wistar ırkından olup, genetik olarak belirlenmiş nöbetler geçirmektedirler. 1980'li yılların ilk başında nörofizyolojik, farmakolojik ve genetik çalışmalarda insan absans epilepsi modelini teşkil edecek şekilde kullanılmaya başlanmıştır (1, 2, 3).



Şekil 1. Glukoz-6-fosfataz histokimyası uygulanmış kontrol hipokampusunda reaktivite gözlenmeyen (→) CA1 (A, B) ve DG (C) bölgesi. A; x40, B ve C; x200.

Bu çalışmada, GAERS'lerde beyin dokusunda karbonhidrat metabolizmasında anahtar bir enzim olan glukoz-6-fosfataz aktivitesindeki değişiklik, histokimyasal metotlarla ışık mikroskopi düzeyinde araştırılmış ve hipokampusdaki glukoz metabolizması – glukoz-6-fosfataz – epileptogenez ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Gereç ve yöntem

Deney grupları

Kontrol gruplarında; epileptik olmayan Wistar albino (*Rattus norvegicus*). 4 aylık, erkek, 220–240 gr (n=4) ağırlığında sıçanlar kullanıldı. Deney gruplarında ise 6 aylık, 250–300 gr ağırlığında, (n=4) EEG'de absans nöbetler geçirdikleri belirlenmiş olan GAERS sıçanlar kullanıldı. Deneyler süresinde sıçanlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi ve her kafeste üç sıçan tutuldu. 20±3 °C de sıcaklığı kontrollü bir odada tutulan sıçanlara 12 saat aydınlık/ karanlık ortam sağlandı. Sıçanlar Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı Hayvan Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Glukoz-6-fosfataz histokimyasal metodu

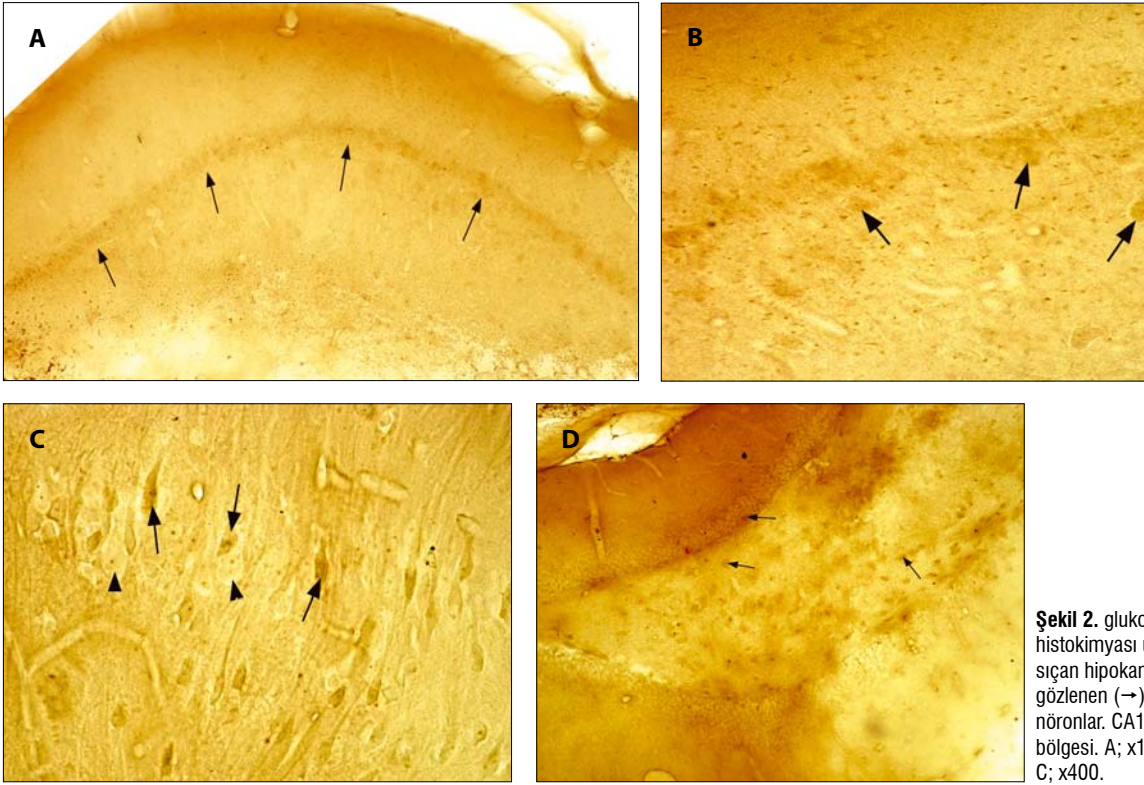
Tüm sıçanlara intraperitoneal ketamin-rompun ile derin anestezi uygulandı ve perfüzyon fiksasyonu uygulanmasından hemen önce heparinize edildi. Her bir sıçan için dakikada 50 cc gidecek şekilde (+4° C) transkardiyak

perfüzyon gerçekleştirilerek 0,1 M (pH 7,2) Na-Kakodilat + %2 glutaraldehit ile perfüzyon yapıldı. Fiksatif perfüzyonunu takiben, perfüzyon kesilmeksizin, her bir sıçan için 50 cc (+4° C) 0,1 M pH 7,2 Na-Kakodilat+ 0,23 M sukroz (~%8) ile perfüzyon uygulamasına devam edildi. Perfüzyon bitimini takiben sıçanlar dekapite edildi ve karaciğerleri ile beyinleri çıkarıldı. Karaciğer dokusu histokimyasal metodun kontrolünü gerçekleştirmek üzere alındı.

Çıkarılan karaciğer ve beyin dokuları yine aynı tampon içerisine daldırıldı (+4° C) {0,1 M pH: 7,2 Na-Kakodilat+ 0,23 M sukroz (~%8)}.

Karaciğer ve beyin dokuları sırasıyla vibratom kesitler alınmak üzere vibratom havuzuna alındı. {vibratom havuzu: 0,1 M pH 7,2 Na-Kakodilat + 0,23 M sukroz (~%8)}. Vibratomda yaklaşık 10–20 µ'luk kesitler ışık mikroskopik düzeyde inceleme yapmak üzere alındı.

Vibratomda elde edilen yaklaşık 10–20 µ'luk kesitler jelatin kaplı lamalar üzerine alındı ve oda ısısında kurutuldu. Lamların yarısına substratlı diğer yarısına substratsız inkübasyon uygulandı. (37° C, 15 dakika){İnkübasyon medyumumu: 4 cc. % 0,125 Glukoz 6-fosfat + 4 cc, Tris-malate buffer pH 6,7 + 0,6 cc, %2 kurşun nitrat + 1,4 cc. Distile su}{4}. Filtre edilmeyi takiben 0,1 N NaOH ile pH ölçümü



Şekil 2. glukoz-6-fosfataz histokimyası uygulanmış GAERS sıçan hipokampusunda reaktivite gözlenen (→) ve gözlenmeyen (▶) nöronlar. CA1 (A, B, C) ve DG (D) bölgesi. A; x100, B ve D; x200, C; x400.

yapıldı. (pH 6,7). 2 kez distile suda iyice yıkamayı takiben (2 dk), parçalar %1 amonyum sülfid ile muamele edildi. (2 dk). Daha sonra distile suda yıkandı ve gliserin jel ile kapatılan kesitler Olympus BX 51 fotomikroskopu ile görüntüledi.

Bulgular

Glukoz-6-fosfataz histokimyası uygulanmış kontrol sıçanların hipokampusundaki tüm Cornu Ammonis (CA) bölgelerinde (Şekil 1A, B) ve Dentat Girus (Şekil 1C) bölgesinde yer alan nöronlarda yaygın bir reaktivite görülmemiştir.

Glukoz-6-fosfataz histokimyası uygulanmış GAERS grubundaki sıçanların özellikle CA1 (Şekil 2A, B, C) ve Dentat girus (DG) (Şekil 2D) bölgelerinde yaygın olarak reaktif nöronlar ve glia hücreleri görülmektedir. CA1 ve DG bölgesinde kontrole oranla artmış reaktiviteye karşılık her nöronun boyalı olmadığı da izlenmektedir (Şekil 2C ve 2D).

Tartışma

Tipik absans epilepsisi, davranış aktivitesinin ve dış uyarılara tepkinin aniden kesilmesinin yanı sıra EEG'de bilateral senkronize diken ve dalgaların eşlik etmesi ile karakterizedir (2).

Öte yandan GAERS sıçanlar absans epilepsi deneylerinde kullanılan deney hayvanları olarak bilinmektedir. Bu hayvanlar Wistar ırkından olup, genetik olarak belirlenmiş nöbetler geçirmektedirler. 1980'li yılların ilk başında nörofizyolojik, farmakolojik ve genetik çalışmalarda insan absans epilepsisi modelini teşkil edecek şekilde kullanılmaya başlanmıştır (1, 2, 3, 5, 6).

Bu çalışmada, absans epilepsisi modeli için kullanılan GAERS'lerde beyinde karbonhidrat metabolizmasında anahtar bir enzim olan glukoz-6-fosfataz aktivitesindeki değişiklik histokimyasal metotlarla ışık mikroskopisi düzeyinde araştırılmış ve hipokampusdaki glukoz metabolizması - glukoz-6-fosfataz - epileptogenez ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Beyin arteriyel kandan %10 glukoz ve %50 oksijen alır. Memeli beyinde glukoz temel enerji kaynağı olup, beyin fonksiyonları için en önemli substrattır. Beyinde, nöron ve glialarda özellikle glukoz sağlayan taşıyıcı proteinler bulunur (7). Histokimyasal çalışmalarda; memeli beyinde özellikle nöron hücre gövdelerinde ve dentrit köklerinde bazı enzimlerin aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Beyindeki enzimatik aktivitenin azalması ya da değişmesi sonucunda glikolitik yoldaki glukoz, glukoz-6-fosfataz gibi bazı maddelerin konsantrasyonları da değişmektedir

(8). Glukoz-6-fosfataz hem glukoneogenez hem de glikolizde en son aşamaları katalize eden bir enzimdir. Özellikle karaciğer gibi dokularda glukoz sentezinde çok önemli bir rol oynamaktadır.

Glukoz-6-fosfataz nukleer bölgede ve endoplazmik retikulumda yer almaktadır. Hücrenin bu her 2 bölgesi birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Glukoz-6-fosfataz membranla ilişkili olmasından dolayı, lipide bağımlı bir sistem oluşturmaktadır. Bu nedenle aktivitesi lipid peroksidasyonu ile rahatlıkla bozulabilmektedir (9). Böbreklerde yüksek dozda ve uzun süreli siklofosamid uygulamasının oluşturduğu yapısal değişikliklerin yanı sıra glukoz-6-fosfataz aktivitesindeki değişiklikler de araştırılmıştır (10). Ayrıca serabral korteks ve kalp kasında da glukoz-6-fosfataz aktivitesi incelenmiştir.(11). Glukoneogenik dokular olan karaciğer ve böbrek korteksinde bulunan glukoz-6-fosfataz enziminin aynı gen tarafından sentezlendiği belirlenmiştir (12) Son yıllarda özellikle Alzheimer hastalığında beyindeki glukoz-6-fosfataz seviyesindeki değişiklikleri belirlemeye yönelik araştırmalar sürmektedir (13).

Beyinde de enerji kullanımı nöronal fonksiyonu ile ilişkilidir (14). Erişkin bireylerin nöronları tamamen glukozla bağımlı olup, glikojen rezervleri bulunmaz. Glukoz metabolizmasındaki değişiklikler epilepside başlıca nöbet aktivitesi oluşturan etkenler arasındadır. Generalize konvulzif atakların glukoz kullanımını arttırdığı bilinmektedir (15). Nöbetler sırasında beyinde bir enerji boşalması gerçekleşmektedir. Bu durum, absansa bağlı ataklarda da ortaya

çıkmakta olup, GAERS'lerde yapılan çalışmalarda serebral kan akışında bir azalma olduğu ortaya konmuştur (1) Buna bağlı olarak beyin glukoz alımında da bir azalma olabileceği düşünülebilir. Yine benzer bir çalışmada (3) erişkin GAERS'lerde metabolik aktivitede bir artış olduğu gözlenmiştir. Beyin travmalarında da glukoz metabolizmasında belirgin bir artış olduğu bildirilmektedir (16) Erişkin GAERS'lerin beyin bölgelerinde metabolik aktivitenin arttığı bilinmektedir (2). Metabolik aktivite artışı da glukoz kullanımı ile ilişkilendirilmektedir. Biz de bu çalışmamızda literatüre uyumlu olarak kontrol Wistar albino sıçanlara kıyasla GAERS sıçanlarda daha belirgin bir glukoz-6-fosfataz reaksiyonu izledik. Bu artışın GAERS'lerdeki metabolik aktivite artışının bir yansıması olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, GAERS sıçanlarda glukoz metabolizmasında kontrol Wistar albino sıçanlara kıyasla daha belirgin bir artış olduğu söylenebilir. Ancak ileriye yönelik olarak yapılacak çalışmalarda aktivitede artış gösteren nöronların sayımı ile daha kesin bir sonuca varılabileceğini düşünmekteyiz. İlerideki çalışmalarda bu sonuca dayanarak taze dokuda perfüzyon fiksasyonu yapmaksızın histokimyasal metodu uygulamayı planlamaktayız.

Elde ettiğimiz verilere dayanarak, generalize konvulzif atakların glukoz kullanımını arttırdığının bilinmesinden yola çıkarak epilepsi vakalarında merkezi olarak verilecek glukoz-6-fosfatazın tedaviye yönelik olarak kullanımını destekler deneysel çalışmaların da ileriye yapılabileceğini düşünmekteyiz.

Teşekkür

Bu araştırma makalemizde kullanmış olduğumuz Genetik Absans Epilepsili Sıçanların (GAERS) temininde çok değerli yardımları bulunan, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Filiz Onat'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Nehlig A, Vergnes M, Waydelich R, Hirsh E, Charbonne R, Marescaux C, Seylaz J. Absence seizures induce a decrease in cerebral blood flow: human and animal data. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:147-155.
2. Şirvancı S, Meshul C, Onat F, Şan T. Immunocytochemical analysis of glutamate and GABA in hippocampus of genetic absence epilepsy rats (GAERS). *Brain Res* 2003;988: 180-188.
3. Nehlig A, Vergnes M, Boyet S, Marescaux C. Local cerebral glucose utilization in adult and immature GAERS. *Epilepsy Res* 1998; 32:206-212.
4. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques* Fifth edition. Elsevier, 2002;596-602.
5. Armand V, Hoffman P, Vergnes M, Heinemann U. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the entorhinal cortex hippocampal slices of rats with genetically determined absence epilepsy (GAERS). *Brain Res* 1999;841:62-69.
6. Marescaux C, Micheletti G, Vergnes M, Depaulis A, Rumbach L, Ve Warter JMA Model of chronic spontaneous petit-mal-like seizures in the rat comparison with pentilentetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 1984;25:326-331.
7. Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose Transporter protein in brain. *FASEB J* 1994;8:1003-1011,
8. Pertsch M, Duncan GE, Stumpf WE, Pilgrim CA. Histochemical study of the regional distribution in the rat brain of enzimatik activity hydrolyzing glucose and 2-deoxyglucose-6-phosphat. *Histochemistry* 1988;88(3-6):257-262.

9. Plewka A, Kaminski M, Plewka D, Nowaczyk. Glucose-6-phosphatase and age: biochemical and histochemical studies. *Mech Ageing Dev* 2000;113: 49–59.
10. Bolkent Ş. The effects of Cyclophosphamide on the kidney tissue of Swiss black C 57. *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der*, 1994;57:113-140.
11. Plaschke K, Muller D, Hoyer S. Effect of adrenalectomy and corticosterone substitution on glucose and glycogen metabolism in rat brain, *J Neural Transm* 1996;103(1–2):89–100.
12. Nadler, JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978;271:676–677.
13. Nordlie RC, ve Aron WJ. Liver microsomal glukoz-6-phosphotransferase, *J. Biol. Chem* 1965;241(8):2155:2164.
14. Dufour F, Koning E, Nehlig A. Basal levels of metabolic activity are elevated in Genetic Absence Epilepsy Rats from Starsbourg (GAERS): measurement of regional activity of cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase by histochemistry. *Exp Neurol* 2003;182:346–352.
15. Darbin O, Rizzo JJ, Carre E, Lonjon M, Naritoku D. Metabolic changes in rat striatum following convulsive seizures. *Brain Res* 2005;1050:124–129.
16. Fowler J, Volkow N, Cilentio R, Wang GJ, Felder C, Logan J. Comparison of brain glucose metabolism and monoamine oxidase B (MAO B) in traumatic brain injury. *Clin Positron Imaging* 1999;2:71–79.