

# Absans Epilepsisinin Patofizyolojisinde Rho/Rho-Kinaz Yolağının Olası Rolü

## The Role of Rho/Rho-Kinase Pathway in the Pathophysiology of Absence Epilepsy



Dr. Nihan ÇARÇAK

✉ Nihan ÇARÇAK,<sup>1</sup> ✉ Melis YAVUZ,<sup>2</sup> ✉ Tuğba ERYİĞİT,<sup>2</sup> ✉ Akif Hakan KURT,<sup>3</sup>  
✉ Meral URHAN KÜÇÜK,<sup>4</sup> ✉ Filiz ONAT,<sup>2</sup> ✉ Kansu BÜYÜKAFŞAR<sup>4</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>3</sup>Sütçüimam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

<sup>4</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin

### Özet

**Amaç:** Rho/Rho-kinaz (ROCK) hücre içi sinyal yolağının nöroinflamasyon, epileptogenez ve konvülsif tip epilepsilerde nöbetlerle ilişkili olduğu deneysel hayvan modellerinde gösterilmiştir. Ancak bu yolağın absans epilepsisinin patofizyolojisindeki rolü henüz aydınlatılmamıştır. Burada, Strazburg kökenli genetik absans epilepsili sıçanlarda (GAERS) diken-ve-yavaş-dalga deşarjların (DDD) ortaya çıkışından sorumlu beyin bölgelerindeki ROCK aktivitesinin değerlendirilmesi ve Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632'in ROCK aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** ROCK aktivitesi, GAERS sıçanlarda somatosensoriyel korteks, hipokampus ve talamusta ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemiyle ölçülmüştür. Bununla birlikte bir grup GAERS sıçana intraserebroventriküler (i.s.v.) olarak 20 nmol/5µl dozunda Y-27632 uygulanmış ve ROCK enzim aktivitesindeki değişiklik değerlendirilmiştir. Ek olarak, i.s.v. yoldan verilen Y-27632'nin DDD'ler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla GAERS sıçanlara iki farklı dozda (20 nmol ve 60 nmol) Y-27632 uygulanmış ve EEG kaydı alınmıştır.

**Bulgular:** GAERS sıçanların somatosensoriyel korteksinde ROCK aktivitesi artmıştır ve Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 bu artışı baskılamıştır. Buna ek olarak, i.s.v. olarak uygulanan Y-2732 DDD'lerin toplam ve ortalama süresini kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır.

**Sonuç:** Bulgularımız, Rho-kinaz sinyal yolağının absans nöbetlerin ortaya çıkışında rol alabileceğini ve dahası Y-27632'nin DDD'leri baskılayıcı etkisini bu yolağın anti-absans etki açısından potansiyel bir terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğine işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: Absans epilepsi; enzim bağlı immünosorbent deneyi; Rho/Rho-kinaz; Rho-kinaz; Strazburg kökenli genetik absans epilepsili sıçanlar; Y-27632.

### Summary

**Objectives:** Rho/Rho-kinase (ROCK) signaling has been shown to contribute to neuroinflammation, epileptogenesis, and seizures in convulsive-type epilepsy models. However, this pathway has not been investigated in the pathophysiology of absence epilepsy. The aim of this study was to investigate ROCK activity in brain regions involved in spike-and-wave discharge (SWD) generation and the effects of the Rho-kinase inhibitor, Y-27632, on ROCK activity in genetic absence epilepsy rats from Strazburg (GAERS).

**Methods:** ROCK activity in the somatosensorial cortex, hippocampus, and thalamus was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). An intracerebroventricular (i.c.v.) injection of Y-27632 was administered at a dose of 20 nmol/5 µl and changes in ROCK activity were assessed. To evaluate the effect of Y-27632 on SWDs, i.c.v. 20 nmol and 60 nmol doses of Y-27632 were administered to the GAERS subjects and electroencephalography was performed.

**Results:** ROCK activity was elevated in the somatosensory cortex in the GAERS study subjects, and the Rho-kinase enzyme inhibitor, Y-27632, suppressed this increase. In addition, Y-27632 significantly reduced the total and mean duration of SWDs compared with the control group.

**Conclusion:** The findings indicate that the Rho-kinase pathway may play a role in the generation of absence seizures, and that the suppressive effect of Y-27632 on SWDs may be a potential therapeutic target for this anti-absent effect.

Keywords: Absence epilepsy; enzyme-linked immunosorbent assay; Rho/Rho-kinase; Rho-kinase; genetic absence epilepsy rats from Strazburg; Y-27632.

**Geliş (Submitted):** 03.07.2018

**Kabul (Accepted):** 03.11.2018

**İletişim (Correspondence):** Dr. Filiz ONAT

**e-posta (e-mail):** fonat@marmara.edu.tr



## Giriş

Absans epilepsisi, primer idiyopatik jeneralize epilepsiler içinde yer alan ve çocukluk çağında veya erken adolesan dönemde başlayan, ani ve kısa süreli bilinç kaybıyla beraber seyreden jeneralize konvulzif olmayan nöbetlerle ve EEG'de diken-ve-dalga deşarjları (DDD) ile karakterize bir epilepsi tipidir.<sup>[1,2]</sup> Absans nöbetlerin farklı bir takım genetik mutasyonlar ve kortiko-talamik döngüdeki anormal aktivite sonucu ortaya çıktığı ortaya konulsa da nöbetlerin altında yatan patofizyolojik mekanizmalar bugün hala tam anlamıyla anlaşılamamıştır.<sup>[1,3,4]</sup> Bununla birlikte farmakolojik tedavinin hastaların %50–80'inde etkili olması,<sup>[5,6]</sup> ya da nöbetlerin baskılanmasına karşın ileri dönemde kognitif bozuklukların<sup>[7]</sup> ve tonik-klonik nöbetlerin gelişebilme olasılığı<sup>[8]</sup> absans epilepsisi için tedavi hedefi olabilecek yeni sinyal yollarının aydınlatılmasını ve bu yollar üzerinde etkili olabilecek yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Rho/Rho-kinaz (ROCK) yolağı bu açıdan bakıldığında santral sinir sisteminde pek çok hücresele olaya aracılık eden ve son zamanlarda önemli olaylara katkı sağladığı gösterilen G-protein aracılı bir hücre içi sinyal ileti mekanizmasıdır.<sup>[9]</sup> Rho/Rho-kinaz yolağının özellikle konvulzif tip epilepsilerde, nöronal hasarlanmada, astroglial ve mikroglial inflamatuvar cevapta, öğrenme ve bellek, gibi çeşitli santral olaylarda rolü olduğu bilinmektedir.<sup>[10–12]</sup> Bu yolağın absans epilepsi patofizyolojisindeki rolü henüz yeteri kadar aydınlatılmamıştır ve bu alanda sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar absans nöbetlerin ortaya çıkışında inflamatuvar bazı moleküllerin rol oynayabileceğini göstermektedir.<sup>[13]</sup> Absans epilepsisinin genetik sıçan modellerinde interleukin-1 $\beta$  gibi nöroinflamatuvar moleküllerin özellikle nöbetlerin kortikal başlangıç noktasında farklılık gösterdiği gösterilmiştir.<sup>[14]</sup>

Yakın bir zamanda laboratuvarımızda absans epilepsisini davranışsal ve farmakolojik açıdan en iyi taklit eden bir deneysel model olan,<sup>[15,16]</sup> Strazburg kökenli genetik absans epilepsili sıçanlar (GAERS) üzerinde yapılan bir çalışmada iki farklı Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ve Fasudil'in ventrikül içerisine lokal olarak verildiğinde DDD'ler üzerindeki baskılayıcı etkisi gösterilmiş ve nöroinflamasyonda rol oynayan bu yolağın absans nöbetler üzerinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.<sup>[17]</sup>

Bu çalışmada ise daha önce elde edilen bulgular ışığında DDD'lerin ortaya çıkışından sorumlu yapılarda (somato-

sensoriyel korteks ve talamus) ve hipokampusta Rho-kinaz enzim (ROCK) aktivitesinin ELISA yöntemiyle ölçülerek değerlendirilmesi ve ventrikül içerisine (i.s.v.) uygulanan Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin ROCK aktivitesi üzerinde meydana getirdiği etkiler araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada 4–7 aylık 250–300 gr ağırlığında epileptik olmayan Wistar ve GAERS suşu erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar deney süresince 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsü bulunan sıcaklık kontrollü (21 $\pm$ 1°C) deney hayvanı ünitesinde, standart sıçan yemi ve su alımları serbest olacak şekilde barındırılmıştır. Deney protokolü, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurul tarafından onaylanmıştır (29.02.2012/04).

### GAERS sıçanlarda beynin çeşitli bölgelerinde Rho-kinaz enzim aktivitesinin değerlendirilmesi

GAERS sıçanların özellikle beynin epilepsi oluşumunda rol oynayan bölgeleri ile (örneğin, somatosensoriyel korteks ve talamus) epilepsi oluşmasında rolü olmadığı bilinen bölgelerinde (örneğin hipokampus) Rho-kinaz aktiviteleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak epileptik olmayan Wistar sıçanların beyin bölgeleri kullanılmıştır. Ayrıca ventrikül içerisine Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 uygulanan bir grup hayvanda Rho-kinaz enzim aktivitesi değerlendirilmiştir.

Wistar (n=4), GAERS (n=4) ve i.s.v olarak 20 nm/5  $\mu$ l Y-27632 (n=4) verilen GAERS gruplarına ait beyin bölgeleri, deney hayvanları tiyopental (100 mg/kg; i.p.) ötenazi yapıldıktan hemen sonra izole edilerek buz soğukluğunda fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanmış ve ardından hücre lizis tamponu (40 mM HEPES, 10 mM EDTA, 100 mM NaF, 10 mM Na4P2O7 10 H2O, 1 mM Na3VO4, 50  $\mu$ M okadaik asit, 1% Triton-X 100, 1mM PMSF ve 0.1 mg/ml aprotinin pH 7.5) homojenize edilmiştir. Bunu takiben doku homojenatları 15,000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant ELISA ile analiz için kullanılmıştır.

RhoA aktivasyonunun saptanması amacı ile hazır ticari RhoA aktivasyon ölçüm kiti (G-LISA) kullanılmıştır. Wistar, GAERS ve 20 nm/5  $\mu$ l Y-27632 (i.s.v.) verilen GAERS'lerden elde edilen beyin bölgelerinin homojenatları hazır ticari kitin içindeki pleytlere yüklenmiş ve el kılavuzadaki talimatlara göre bir dizi işlemler yapılarak ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda örneklerin absorpsiyon ölçümü yapılmış ve sonuçlar optik dansite (OD) cinsinden verilmiştir.

**Stereotaksik cerrahi**

Hayvanlar ketamin (100 mg/kg, ip.) ve ksilazin (10 mg/kg, ip.) anestezisi altında stereotaksik cerrahi aletine yerleştirilerek, kafa derileri orta hattan bir insizyonla açılarak, kafatası kemikleri, bregma ve lambda noktaları ortaya çıkarılmıştır. Bregma referans noktası alınarak fronto-parietal korteksten EEG kayıtlarının yapılabilmesi için 4 adet vida elektrot sağ ve sol frontal ve parietal kemikler üzerine ve 1 adet i.s.v. kılavuz kanül ise Anterior-Posterior: 0.8 mm, Lateral: 1.5 mm ve Ventral: 3.5 mm koordinatları<sup>[18]</sup> doğrultusunda ventrikül içerisine yerleştirilmiştir. Kafatası üzerine yerleştirilen kortikal vida elektrotlar önce bir mikrokonnek-töre lehimlenmiş ve daha sonra da kılavuz kanül ile birlikte soğuk dental akrilik kullanılarak kafatası kemiğine sabitlenmiştir. Akrilik başlık iyice kuruyup sertleştikten sonra kılavuz kanül içerisinde bir kör tıpa (dummy) yerleştirilerek kanülün tıkanmasının önüne geçilmiş ve hayvanlar bir hafta süreyle iyileşmeye bırakılmıştır. Ameliyat sonrası dönemde hayvanlara gerekli serum fizyolojik (SF) ve analjezik takviyesi (Karprofen; 5 mg/kg) yapılmıştır.

**EEG kaydı ve analizi**

Stereotaksik cerrahiden sonraki bir haftalık iyileşme döneminin ardından bazal DDD'lerin sayı ve sürelerini belirlemek amacı ile GAERS suşu sıçanlardan enjeksiyon öncesinde bazal EEG kaydı (3 saat) alınmış ve yalnızca EEG'lerinde 7–11 Hz frekansında bilateral senkronize DDD aktivitesi görülen sıçanlar deneye alınmıştır. Enjeksiyon yapılacağı gün pleksiglass kafes içine alınan hayvanlardan, 20 dakikalık bazal EEG kaydının ardından ventrikül içerisine Y-27632 enjeksiyonu yapılmış ve ardından 120 dakika boyunca EEG kaydına devam edilmiştir. Hayvanların kafasına sabitlenmiş mikrokonnek-töre bağlanan uzatma kablosu vasıtasıyla alınan EEG sinyalleri Powerlab 8S EEG kayıt sistemi ile kaydedilmiş ve "Chart 7.0 for Windows" programı ile analiz edilmiştir. Kayıt işlemi 1–100 Hz arasında filtre edilerek saniyede 200 örnek olacak şekilde ayarlanmıştır.

SF ve Y-27632 enjeksiyonları öncesi ve sonrası kaydedilen kortikal EEG'de GAERS'lerde gözlenen DDD'lerin toplam süresi, sayısı ve tek bir DDD'nin ortalama süresi değerlendirilmiştir.

**Intraserebroventriküler (i.s.v.) madde enjeksiyonu**

İ.s.v enjeksiyon öncesinde, GAERS suşu sıçanlar rastgele seçilerek 2 gruba ayrılmıştır. Aynı anda bir gruba 5 µl SF içerisinde çözündürülmüş Y-27632 (20 ve 60 nmol) (Sigma-

Aldrich,Hollanda) enjeksiyonu yapılırken kontrol olarak seçilen diğer grup hayvana aynı hacimde (5µl) SF enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyonlar için polietilen tüp ucuna yerleştirilmiş olan infüzyon kanülü, kılavuz kanül içerisine yerleştirilerek ve sabitlenmiş, polietilen tüpün serbest ucu 10 µl hacmindeki Hamilton enjektörüne takılarak infüzyon pompası aracılığıyla 5µl/2 dakika hızında gerçekleştirilmiştir. Hayvanlardan enjeksiyon öncesinde 20 dakika bazal, sonrasında ise 120 dakika EEG kaydı alınmıştır.

**Intraserebroventriküler (i.s.v.) yerleşim için histolojik doğrulama**

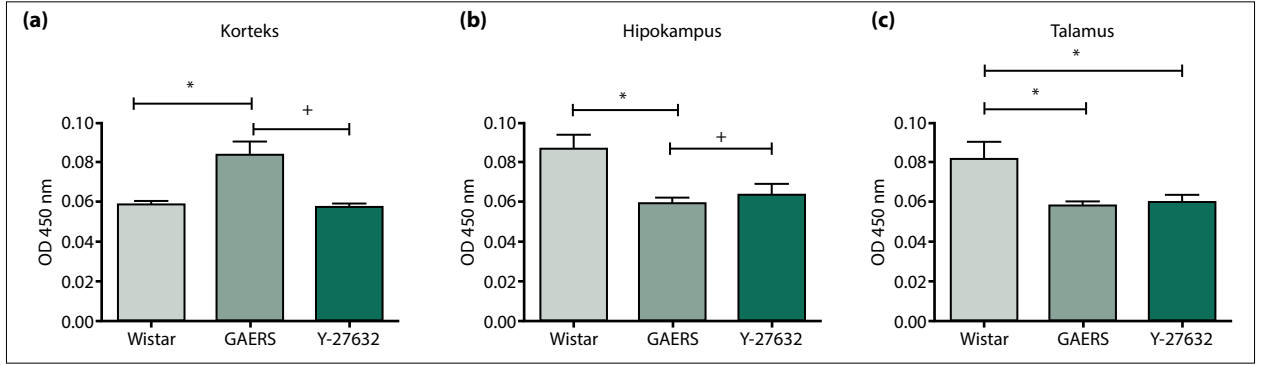
İ.s.v enjeksiyonlardan sonra kanüllerin ventrikül içinde olup olmadığını kontrol etmek amacıyla infüzyon kanülü aracılığı ile ventrikül içine 5 µl metilen mavisi verilmiştir. Yaklaşık 1 dk sonra hayvan dekapite edilmiş ve beyinler çıkarılmıştır. Çıkarılan beyinlerden 2 mm'lik kesitler alınarak metilen mavisinin ventriküller boyunca ilerleyişi kontrol edilerek i.s.v. yerleşimin doğrulaması yapılmıştır. Yalnızca yerleşimi doğru olan hayvanlar çalışmaya dâhil edilmiştir.

**İstatistiksel analiz**

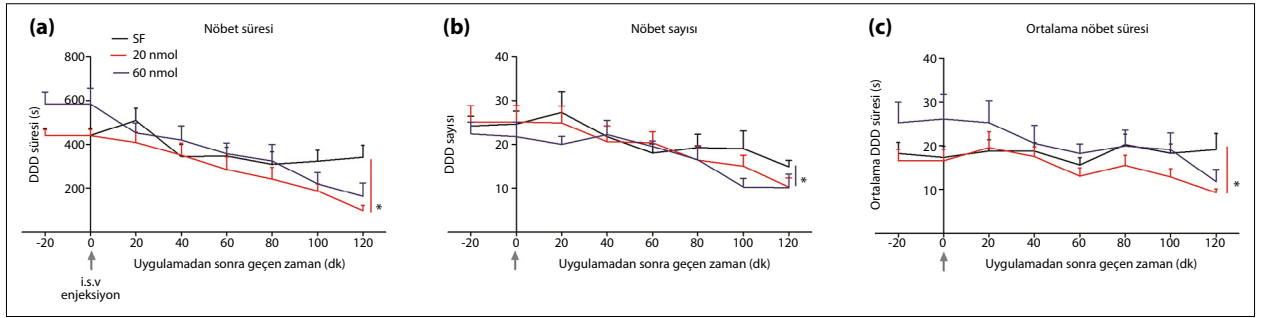
Bütün istatistiksel analizler GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software, San Diego, USA) programı ile yapılmıştır. GAERS sıçanlarda Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin DDD toplam süre ve sayısı üzerindeki etkisinin değerlendirildiği gruplar arası karşılaştırma Wilcoxon signed rank test kullanılarak yapılmıştır. ROCK aktivitesi ELISA yöntemi ile 450 nm dalga boyundaki optik dansite (OD 450 nm) cinsinden kantitatif olarak değerlendirilmiş ve ikili gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme için non-parametrik Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edilmiştir. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

**Bulgular****GAERS ve kontrol sıçanların korteks, talamus ve hipokampus bölgelerinde ROCK aktivitesinin değerlendirilmesi**

ELISA yöntemi ile ROCK aktivitesinin ölçüldüğü deney serilerinde, GAERS sıçanların korteksinde ROCK aktivitesi Wistar (kontrol) sıçanlara göre artmış bulunmuştur (p=0.028) (Şekil 1a). Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 (20 nmol/5µl) bu artışı baskılamış ve bu gruptaki ROCK aktivitesi naive GAERS grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0.03). Buna karşılık Wistar grubu ile arasında bir farklılık gözlenmemiştir (p=0.657) (Şekil 1a).



**Şekil 1.** ROCK aktivitesinin GAERS ve kontrol (Wistar) sıçanların talamus, korteks ve hipokampuslarında ELISA yöntemi ile değerlendirilmesi. Wistar (n=4), GAERS (n=4) ve 20 nm/5 µl Y-27632 (ROCK inhibitörü) (n=4) verilen GAERS'lerin korteks (a), Hipokampus (b) ve talamus (c) bölgelerinde Rho-kinaz enzim aktivitesi. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için non-parametrik Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edilmiştir. \*: p<0.05, Wistar'dan farklı, +: p<0.05 GAERS'ten farklı.



**Şekil 2.** Rho-kinaz Enzim İnhibitörü, Y-27632'nin i.s.v. Uygulamasının GAERS'lerde DDD'ler Üzerine Etkisi. Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632'nin i.s.v. uygulanmasının (SF, 20, 60 nmol/5 µl; her bir grup için n=8) GAERS'lerde Toplam DDD süresi (a), DDD sayısı (b) ve ortalama DDD süresi (c) üzerine etkisi. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel karşılaştırma için Wilcoxon-rank test kullanılmıştır. \*p<0.05.

Hipokampüste GAERS grubunda ölçülen Rho-kinaz enzim aktivitesi korteksten farklı olarak Wistar sıçanlara göre anlamlı derecede düşük bulunmuş ( $p=0.02$ ) ve i.s.v. olarak uygulanan Y-27632, GAERS'lerde Rho-kinaz aktivitesinde bir artışa neden olmuştur (Şekil 1b). Talamusta ise hem naive hem de Y-27632 uygulanan gruplarda ölçülen enzim aktivitesi Wistar sıçanlarla kıyaslandığında anlamlı derecede düşük bulunmuş ( $p=0.029$ ), uygulanan Y-27632 talamustaki ROCK aktivitesi üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 1c).

#### Rho-kinaz enzim inhibitörü, Y-27632'nin i.s.v. uygulamasının GAERS'lerde DDD'ler üzerine etkisi

Çalışmamızda, GAERS suşu sıçanlarda, Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin özellikle somatosensoryel kortekste Wistar sıçanlara göre anlamlı derecede artış gösteren Rho-kinaz enzim aktivitesini anlamlı derecede baskıladığı gösterilmiş ve Rho-kinaz inhibitörünün yapmış olduğu bu baskılamamın

absans nöbetler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla iki farklı konsantrasyonda (20 ve 60 nmol) SF içerisinde çözündürülerek hazırlanan Y-27632 solüsyonu 5 µl hacim içerisinde i.s.v. olarak lateral ventrikül içerisine verilerek, oluşan etki aynı hacimde serum fizyolojik (SF) verilen GAERS grubu (kontrol) ile kıyaslanmıştır.

Randomize olarak GAERS sıçanlara SF içerisinde çözündürülmüş 20 nmol (n=8) ve 60 nmol/5 µl (n=8) Y-27632 veya kontrol olarak yalnızca 5 µl SF (n=8) uygulanmıştır. Daha önce elde edilen veriler ile paralel olarak 20 nmol dozunda uygulanan Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 toplam DDD süresini ( $p=0.042$ ) ve tek bir DDD'nin ortalama süresini ( $p=0.023$ ) kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır (Şekil 2a-c).<sup>[17]</sup> Ancak Y-27632 daha yüksek dozda uygulandığında (60 nmol) sadece DDD sayısında anlamlı bir azalmaya ( $p=0.039$ ) neden olurken toplam süre ve ortalama DDD süresi üzerinde herhangi bir anlamlı değişiklik göz-

termemiştir (Şekil 2a-c). Buna göre ELISA sonuçlarında GAERS'lerde somatosensoryel kortekste artmış olan enzim aktivitesini anlamlı ölçüde azaltan 20 nmol Y-27632'in, absans nöbetlerin EEG'deki karakteristik bulgusu olan bilateral, senkronize, 7–11 Hz frekansındaki DDD aktivitesi üzerinde de 60 nmol Y-27632'ye göre daha etkili olduğu görülmüştür (Şekil 2a).

## Tartışma

Çalışmamızda GAERS'lerde DDD'lerin ortaya çıkışından sorumlu yapılarıdaki ROCK aktivitesi ELISA yöntemiyle ölçülerek ventrikül içerisine uygulanan Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin hem ROCK aktivitesi hem de absans nöbetler üzerinde meydana getirdiği değişiklikler araştırılmıştır.

Bu çalışmada ilk olarak ELISA yöntemiyle absans nöbetler ile ilişkili beyin bölgelerinde ölçülen ROCK aktivitesinin GAERS'lerin özellikle somatosensoryel korteks bölgesinde artmış olduğu ve ROCK inhibitörü Y-27632'in ROCK aktivitesini baskılayarak absans nöbetleri etkin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, daha önce GAERS'lerde somatosensoryel kortekste translokasyonu artan RhoA bulgusuyla paralel görünmektedir.<sup>[17]</sup> Çünkü ROCK enzimi RhoA proteininin bir alt-efektörüdür ve RhoA aktivasyonu, ROCK aktivitesinin artışına aracılık edebilir.<sup>[19]</sup> Ancak, GAERS'lerin diğer beyin bölgelerinde (talamus ve hipokampüste) ROCK aktivitesi kontrole göre düşük bulunmuştur. Gerçekte RhoA aktivasyonu GAERS sıçanların hipokampus ve talamusunda Wistar sıçanlarla kıyaslandığında bir değişkenlik göstermemiştir.<sup>[17]</sup> Bu durumun temel sebebinin şu an için henüz bilememekteyiz ancak bir sonraki aşamada GAERS sıçanlarda kortikal, hipokampal ve talamik nöronlardaki RhoA protein ekspresyonunun değerlendirilmesi bu bulgulara bir açıklama getirebilir. Ayrıca, hipokampus aslında direkt olarak absans nöbetlerin ortaya çıkışından sorumlu kortiko-talamik döngü içerisinde yer almamasına rağmen GAERS sıçanlarda hipokampal nöronlardaki GABAerjik inhibisyon artışının absans nöbetleri baskıladığı bilinmektedir.<sup>[20]</sup> Mevcut bulgular, diğer tip epilepsilerde olduğu gibi, absans epilepsisine aracılık eden tek bir yapının olmadığını, aslında nöbetlerin farklı beyin bölgelerinin katkılarının bileşkesiyle ortaya çıktığına işaret etmektedir. Diğer taraftan, Rho/Rho-kinaz yolağının, bir hücre içi sinyal transdüksiyon mekanizması olarak, absans epilepsisinde hangi beyin bölgelerinde, hangi upstream aktivatörler tarafından tetiklendiğinin ortaya konulması ve potansiyel bir anti-absans terapötik hedef olarak değerlendirilmesi açısından oldukça önemli olacaktır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda beyindeki istenmeyen inflamasyon yanıtının baskılanması nöbetleri ve hatta epilepsiyi tedavi edici yeni bir strateji olarak değerlendirilmektedir.<sup>[21]</sup> Genetik absans epilepsili hayvan modellerindeki deneysel çalışmalar absans nöbetler ile nöroinflamasyon oluşumu arasında güçlü bir bağlantı olduğunu işaret etmektedir.<sup>[13,14,22,23]</sup> Her geçen gün elde edilen kanıtlar, ROCK yolağının inflamatuvar yanıtları düzenleyen nükleer faktör kappa B (NF-κB) yolu ile nöroinflamasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını da göstermiştir.<sup>[24]</sup> Bunu destekler şekilde, ROCK inhibitörlerinin anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.<sup>[25–30]</sup> Bu nedenle, ROCK inhibitörlerinin absans nöbetler üzerindeki akut baskılayıcı etkileri, anti-inflamatuvar özelliklerinden ötürü olabilir, bu da kortiko-talamik ağda nöronal uyarılabilirliği inhibe edebilir.

Karşılıklı olarak birbiri ile etkileşen korteks ve talamus absans nöbetlerin ortaya çıkışında anahtar rol oynamaktadır.<sup>[31–34]</sup> Absans epilepsisinin deneysel hayvan modellerinde<sup>[35,36]</sup> ve insanda<sup>[37,38]</sup> korteks üzerinde spesifik bir bölgedeki nöronların absans nöbetlerini başlattığı ortaya konmuştur. Bu kortikal bölgenin çeşitli voltaj kapılı kanal ve reseptör ekspresyonlarında farklılık gösterdiği ve dolayısıyla diğer kortikal alanlara kıyasla daha uyarılabilir olduğu bilinmektedir.<sup>[39,40]</sup> Korteksin absans nöbetler açısından iktojenik rolü ile tutarlı şekilde, GAERS'lerden alınan hücre içi *in-vivo* kayıtlar DDD'lerin, somatosensoryel korteksin perioral bölgesinin derin tabakasındaki (tabaka 5 ve 6) nöronlarda başladığını, nöbetin başlangıcında bu nöronlarda ateşlemenin arttığını<sup>[36,41]</sup> ve son olarak somatosensoryel korteksin farmakolojik olarak inhibisyonunun nöbet aktivitesinin ortaya çıkışını önlediğini göstermiştir.<sup>[42]</sup> Rho/Rho-kinaz yolağının, epileptik bir hasarı takiben uyarılabilirliği artan bu kortikal bölgelerde aktive olduğu<sup>[43]</sup> ve ROCK aktivitesinin inhibisyonunun, glutamat kaynaklı nörotoksiteyi önlediği gösterilmiştir.<sup>[44,45]</sup> Bu sonuçlar kortekste artmış ROCK aktivasyonunun, GAERS'lerde DDD'lerin başlamasından sorumlu olan kortikal uyarılabilirlik artışına katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bu bulgu aynı zamanda, Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin GAERS'lerde hem artmış olan ROCK aktivitesini hem de DDD'ler üzerindeki baskılayıcı etkileriyle de desteklenmektedir. Bu nedenle elde edilen bulgular doğrultusunda ROCK sinyal yolağı ve hücre içerisinde ilişkili olduğu proteinler, gelecekte absans nöbetlerin tedavisi için yeni ve umut verici bir terapötik hedef olarak görünmektedir.

## Sonuç

Sonuç olarak Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı en azından kısmen, deneysel hayvan modellerinde absans nöbetlerin patofizyolojisinde rol oynayabilir. Ayrıca, ROCK inhibitörleri potens ve selektivite yönünden geliştirilerek muhtemel yeni anti-absans ilaç adayı molekül olarak değerlendirilebilir.

## Etik Komite Onayı

Etik kurul onayı alındı (29.02.2012/04).

## Hakem Değerlendirmesi

Dış bağımsız.

## Çıkar Çatışması

Yoktur.

## Yazarlık Katkıları

Konsept: F.O., K.B., N.Ç.; F.O., K.B., N.Ç., M.U.K.; Veri Toplama veya İşleme: N.Ç., M.Y., T.E., A.H.K.; Analiz ve Yorumlama: N.Ç., M.Y., T.E., A.H.K., F.O., K.B., M.U.K.; Literatür Arama: F.O., K.B., N.Ç.; Yazan: N.Ç., F.O., K.B.

## Kaynaklar

- Blumenfeld H.. Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia* 2005;46(Suppl9):21–33. [CrossRef]
- Panayiotopoulos CP, Michael M, Sanders S, Valeta T, Koutroumanidis M. Benign childhood focal epilepsies: Assessment of established and newly recognized syndromes. *Brain* 2008;131(Pt9):2264–86. [CrossRef]
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010;51(4):676–85. [CrossRef]
- Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(5):371–82. [CrossRef]
- Glauser T, Cnaan A, Shinnar S, Hirtz DG, Dlugos D, Masur D, et al; Childhood Absence Epilepsy Study Group. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy. *N Engl J Med* 2010;362(9):790–9. [CrossRef]
- Glauser TA, Cnaan A, Shinnar S, Hirtz DG, Dlugos D, Masur D, et al; Childhood Absence Epilepsy Study Group. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy: Initial monotherapy outcomes at 12 months. *Epilepsia* 2013;54(1):141–55. [CrossRef]
- Masur D, Shinnar S, Cnaan A, Shinnar RC, Clark P, Wang J, et al. Pretreatment cognitive deficits and treatment effects on attention in childhood absence epilepsy. *Neurology* 2013;81(18):1572–80. [CrossRef]
- Bouma PA, Westendorp RG, van Dijk JG, Peters AC, Brouwer OF. The outcome of absence epilepsy: a meta-analysis. *Neurology* 1996;47(3):802–8. [CrossRef]
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 2000;20(14):5329–38.
- Inan S, Büyükafşar K. Antiepileptic effects of two Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, in mice. *Br J Pharmacol* 2008;155(1):44–51. [CrossRef]
- Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(5):387–98. [CrossRef]
- Roser AE, Tönges L, Lingor P. Modulation of microglial activity by Rho-kinase (ROCK) inhibition as therapeutic strategy in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Front Aging Neurosci* 2017;9:94. [CrossRef]
- Citraro R, Leo A, Marra R, De Sarro G, Russo E. Antiepileptogenic effects of the selective COX-2 inhibitor etoricoxib, on the development of spontaneous absence seizures in WAG/Rij rats. *Brain Res Bull* 2015;113:1–7. [CrossRef]
- Akin D, Ravizza T, Maroso M, Carcak N, Eryigit T, Vanzulli I, et al. IL-1 $\beta$  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(3):259–69. [CrossRef]
- Depaulis A, van Luijtelaar G. Genetic models of absence epilepsy in the rat. In: Pitkanen A, Schwartzkroin P, Moshe S, editors. *Animal Models of Seizures and Epilepsy*. San Diego: Elsevier Inc; 2005. p. 223–48.
- Depaulis A, David O, Charpier S. The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J Neurosci Methods* 2016;260:159–74. [CrossRef]
- Çarçak N, Yavuz M, Eryiğit Karamahmutoğlu T, Kurt AH, Urhan Küçük M, Onat FY, et al. Suppressive effect of Rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil on spike-and-wave discharges in genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS). *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2018;391(11):1275–83. [CrossRef]
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd edition. San Diego: Academic Press; 1998.
- Zong H, Kaibuchi K, Quilliam LA. The insert region of RhoA is essential for Rho kinase activation and cellular transformation. *Mol Cell Biol* 2001;21(16):5287–98. [CrossRef]
- Onat FY, van Luijtelaar G, Nehlig A, Snead OC 3rd. The involvement of limbic structures in typical and atypical absence epilepsy. *Epilepsy Res* 2013; 103(2–3):111–23. [CrossRef]
- Dey A, Kang X, Qiu JG, Du YF, Jiang J. Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37(6):463–84. [CrossRef]
- Kovács Z, Dobolyi A, Juhász G, Kékesi KA. Lipopolysaccharide induced increase in seizure activity in two animal models of absence epilepsy WAG/Rij and GAERS rats and Long Evans rats. *Brain Res Bull* 2014;104:7–18. [CrossRef]
- Russo E, Andreozzi F, Iuliano R, Dattilo V, Procopio T, Fiume G, et al. Early molecular and behavioral response to lipopoly-

- saccharide in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy and depressive-like behavior, involves interplay between AMPK, AKT/mTOR pathways and neuroinflammatory cytokine release. *Brain Behav Immun* 2014;42:157–68. [CrossRef]
24. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, et al. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor  $\kappa$ B inhibition: Evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology* 2003;124(5):1180–7. [CrossRef]
  25. Büyükaşar K, Yalçın I, Kurt AH, Tiftik RN, Sahan-Firat S, Aksu F. Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. *Eur J Pharmacol* 2006;541(1-2):49–52. [CrossRef]
  26. Köksel O, Yıldırım Ç, Tiftik RN, Kubat H, Tamer L, Cinel L, et al. Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *Eur J Pharmacol* 2005;510(1-2):135–42. [CrossRef]
  27. He Y, Xu H, Liang L, Zhan Z, Yang X, Yu X, et al. Antiinflammatory effect of Rho kinase blockade via inhibition of NF- $\kappa$ B activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58(11):3366–76. [CrossRef]
  28. Çayan S, Saylam B, Tiftik N, Ünal ND, Apa DD, Efesoy O, et al. Rho-kinase levels in testicular ischemia-reperfusion injury and effects of its inhibitor, Y-27632, on oxidative stress, spermatogenesis, and apoptosis. *Urology* 2014;83(3):675.e13–8. [CrossRef]
  29. Chen J, Yin W, Tu Y, Wang S, Yan X, Chen Q, et al. L-F001, a novel multifunctional ROCK inhibitor, suppresses neuroinflammation in vitro and in vivo: Involvement of NF- $\kappa$ B inhibition and Nrf2 pathway activation. *Eur J Pharmacol* 2017;806:1–9. [CrossRef]
  30. Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* 2005;280(37):32485–92. [CrossRef]
  31. Avanzini G, de Curtis M, Marescaux C, Panzica F, Spreafico R, Vergnes M. Role of the thalamic reticular nucleus in the generation of rhythmic thalamo-cortical activities subserving spike and waves. *J Neural Transm Suppl* 1992;35:85–95. [CrossRef]
  32. McCormick DA, Contreras D. On the Cellular and Network Bases of Epileptic Seizures. *Annu Rev Physiol* 2001;63:815–46. [CrossRef]
  33. Snead OC. Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann Neurol* 1995;37(2):146–57. [CrossRef]
  34. Steriade M, Contreras D. Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. I. Role of neocortex and thalamus. *J Neurophysiol* 1998;80(3):1439–55. [CrossRef]
  35. Meeren HK, Pijn JP, van Luijtelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 2002;22(4):1480–95. [CrossRef]
  36. Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, Charpier S. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 2007;27(24):6590–9. [CrossRef]
  37. Tenney JR, Duong TQ, King JA, Ferris CF. FMRI of brain activation in a genetic rat model of absence seizures. *Epilepsia* 2004;45(6):576–82. [CrossRef]
  38. Holmes MD, Brown M, Tucker DM. Are “generalized” seizures truly generalized? Evidence of localized mesial frontal and frontopolar discharges in absence. *Epilepsia* 2004;45(12):1568–79. [CrossRef]
  39. Klein JP, Khera DS, Nersesyan H, Kimchi EY, Waxman SG, Blumenfeld H. Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Res* 2004;1000(1-2):102–9. [CrossRef]
  40. Kennard JT, Barmanray R, Sampurno S, Ozturk E, Reid CA, Paradiso L, et al. Stargazin and AMPA receptor membrane expression is increased in the somatosensory cortex of Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg. *Neurobiol Dis* 2011;42(1):48–54.
  41. Polack PO, Mahon S, Chavez M, Charpier S. Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cereb Cortex* 2009;19(9):2078–91. [CrossRef]
  42. Sitnikova E, van Luijtelaar G. Cortical control of generalized absence seizures: Effect of lidocaine applied to the somatosensory cortex in WAG/Rij rats. *Brain Res* 2004;1012(1-2):127–37.
  43. Dubreuil CI, Marklund N, Deschamps K, McIntosh TK, McKerracher L. Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. *Exp Neurol* 2006;198(2):361–9. [CrossRef]
  44. Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kumai T, Lam TT, Kuribayashi K, Isenoumi K, et al. Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res* 2004;1018(1):111–8. [CrossRef]
  45. Jeon BT, Jeong EA, Park SY, Son H, Shin HJ, Lee DH, et al. The Rho-Kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 protects against excitotoxicity-induced neuronal death in vivo and in vitro. *Neurotox Res* 2013;23(3):238–48. [CrossRef]