

## Tavşanlarda Penisilin ile Oluşturulan Akut Spike Fokusu Üzerine Fenitoinin Etkisi

Dr. Sedef GİDENER, Dr. Yüksel KESİM,  
Dr. Süleyman ÇELİK, Öğr.Gör. Mustafa AYYILDIZ  
O.M.Ü. Tıp Fakültesi, Farmakoloji ABD, Fizyoloji ABD, SAMSUN

- ✓ Bu çalışmada, intrakortikal (i.c.) penisilin uygulaması ile oluşturulan akut fokal spike fokusu üzerine fenitoinin etkilerinin kantitatif olarak incelenmesi amaçlandı. Fenitoin enjeksiyonundan hemen önceki spike frekansı ile fenitoiden sonraki spike frekansları karşılaştırıldığında progresif bir azalmanın meydana geldiği ve 3. doz fenitoinin spike frekansında istatistiksel olarak belirgin bir azalmaya neden olduğu tespit edildi ( $p<0.05$ ). Spike amplitüdü üzerine üç ayrı dozdaki fenitoin enjeksiyonunun herhangi belirgin bir etkisi bulunmadı ( $p>0.05$ ). İlk fenitoin enjeksiyonu iki spike arası mesafeyi belirgin olarak etkilemedi ancak, 2. enjeksiyondan ( $p<0.05$ ) ve 3. enjeksiyondan ( $p<0.01$ ) sonraki iki spike arası mesafe anlamlı olarak uzadı. Sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar literatür bilgileri gözünönü alınarak tartışıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Spike fokusu, Fenitoin, Tavşan.

**The Effects of Phenytoin on Penicillin Produced Acute Focal Spike Focus in Rabbits**

- ✓ This study aimed to demonstrate quantitative phenytoin effects on focal spike focus induced by intracortical (i.c.) penicillin injections. Spike frequencies prior and after phenytoin injections showed a progressive reduction. This reduction was statistically significant after the third dose of phenytoin injection ( $p<0.05$ ). Evidently, none of the phenytoin injection affected the spike amplitude ( $p>0.05$ ). First phenytoin injection did not affect the interval between two spikes significantly, but the interval was found delayed significantly after second ( $p<0.05$ ) and third ( $p<0.01$ ) injections. The results have been discussed in view of the recent literature reports.

**Key Words:** Spike focus, Phenytoin, Rabbit.

**S**antral sinir sisteminde aktif tutarık fokusu ritmik paroksizmal deşarjların gelişmesiyle karakterizedir<sup>(1)</sup>. Fenitoin (5,5-diphenylhydantoin DPH) bu anormal elektiriksel aktiviteyi kontrol eden ajanlardan birisi olarak bilinir<sup>(1)</sup>.

Fenitoin, 1938'de Merrit ve Putnam tarafından majör antikonvülsant olarak<sup>(2)</sup> tanımlandığı zamandan bu yana nörolojik fonksiyonları çok az veya hiç etkilemeden tutarık hastalıklarında etkin bir ilaç olarak sıklıkla kullanılmaktadır<sup>(2-6)</sup>. Antiepileptik yapısına ek olarak ağırlı nöropatilerin tedavisinde<sup>(5,7)</sup> ve kardiak aritmiler için de kullanılır<sup>(5)</sup>.

Fenitoinin antikonvülsan ve diğer etki-

lerinin hücresel ve moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamış<sup>(1-3, 5-9)</sup> ve deneysel epileptojenik spike fokusu üzerine etkisi açıkça tanımlanamamıştır<sup>(3)</sup>. Antiepileptik ilaçların etki mekanizmalarının açıklanması ile tutarıkların mekanizmaları daha iyi anlaşılacaktır. Çeşitli hayvanların, serebral korteksine penisilin uygulanması ile oluşturulan epileptiform fokus, epilepsinin deneysel çalışmaları için yaygın olarak kullanılan bir modeldir<sup>(10)</sup>. 1968'de Louis ve arkadaşları penisilinle oluşturulan spike fokusunda fenitoinin herhangi bir değişiklik oluşturmadığını veya spike frekansını hafif derecede azalttığını bildirmişlerdir<sup>(11)</sup>. Julien ve Halpern ise

1972'de fenitoin enjeksiyonunu takiben after-discharge süresinde ve frekansında azalma gözlemişler<sup>(12)</sup> fakat Edmons 1974'de yaptığı bir çalışma sonunda fenitoin enjeksiyonunu takiben after-discharge'ların sayısı veya spike frekansında herhangi bir değişim gözlemediğini bildirmiştir<sup>(13)</sup>.

Bu çalışmada, antiepileptik etkisi bilinen ancak etki mekanizması tam anlamı ile açıklanmamış olan fenitoinin penisilin ile oluşturulan spike fokus modeli üzerine etkilerinin kantitatif olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

#### MATERYAL VE METOD

Deneylerde, 2-2.5 kg. ağırlıklarında her iki cins albino 20 tavşan kullanıldı. Genel anestezi (1.2 gr/kg i.p. uretan) altında kafatasında, sol frontal korteks üzerinde 1.5 cm çapında delik açıldı. Aseptik şartlar altındaki bu cerrahi işlemi takiben deney masasına taşınan hayvan stereotaksik alete (David Kopf, A.B.D) yerleştirildi. Ağrı ve basınç yerlerine gerektiğinde tekrarlanarak deney süresince lokal anestezik infiltre edildi.

Elektrokortikogram (ECoG) pia veya dura yüzeyine konan Ag-AgCl top elektrotları ile kaydedildi. Referans elektrot sağ kulağa bağlandı. Elektrotlar giriş ünitesi üzerinden amplifikatör ve osiloskoba (Nihon Kohden Dual-Becam memory oscilloscope VC-10) bağlandı. Osiloskobun ekranında izlenen yüzey aktivitesi iki kanallı kaydedici (Nihon Kohden model RJG-4022) aracılığı ile yazdırıldı.

Beyin korteksine Hamilton mikroyektör yolu ile 100.000İÜ/ml olacak şekilde hazırlanan potasyum penisilin G'den 5ml i.c. verilerek akut fokal epilepsi odağı oluş-

turuldu. Çalışmanın başlangıcında deney hayvanlarından üç tanesine intrakortikal (i.c.) penisilin enjeksiyonu uygulayıp, sonraki 120 dakikalık süre boyunca izlendi ve biyoelektriksel epileptiform aktivitenin bu süre zarfında devam ettiği gözlemlendi. Bu çalışmada her deney hayvanı kendisinin kontrolü olarak kullanıldı. İ.c. penisilin enjeksiyonundan sonraki 45 dakikalık periyot süresince kaydedilen ECoG'dan hesaplanan değerler kontrol değerleri olarak kabul edildi ve i.c. penisilin uygulamasının 45. dakikası referans olarak seçilip, ilk doz fenitoin (20-25 mg/kg. i.v.) enjeksiyonu bu zamanda yapıldı ve 30 dk.lık aralarla en az 3 kez yinelenildi. Tüm ilaçların çözeltileri, kullanılacağı gün hazırlandı.

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde "Wilcoxon" analizi kullanıldı.

#### BULGULAR

5µl penisilin i.c. enjeksiyonundan sonra zemin aktivitesinde ortalama 6.43±0.41 dakika kadar süren bir inhibisyon gözlemlendi.

Biyoelektriksel epileptiform aktivite enjeksiyondan 11.00±0.62 dakika sonra gelişti ve kontrol deneylerinde takip eden 120 dakikalık periyot boyunca devam etti.

#### 1-Spike frekansı üzerine fenitoin enjeksiyonlarının etkisi:

İ.c. penisilin enjeksiyonundan sonraki kontrol döneminde spike frekansı 24.60±1.82/dakika olarak hesaplandı. Fenitoinin ilk iki dozu spike frekansında belirgin bir değişmeye neden olmadı, ancak fenitoinin 3. dozu belirgin bir azalmaya neden oldu (p<0.05) (Tablo-I). Deneylerin

**Tablo-I** : Fenitoin Enjeksiyonlarının Penisilin ile Oluşturulan Spike'lar Üzerine Etkisi

	Spike frekansı	Spike amplitüdü	İki spike arası süre
Kontrol değeri	24.60±1.82/dk	170±15.7µv	3.41±0.17 sn
İlk doz fenitoin	22.80±3.01/dk.	172±18.6 µv	3.85±0.17 sn
2. doz fenitoin	22.33±2.09/dk	165±14.9 µv	4.14±0.23 sn*
3. doz fenitoin	15.20±3.51/dk	180±11.7µv	0.39±1.64 sn**

\* p<0.05

\*\* p<0.01 : Kontrol değerleri ile fenitoin enjeksiyonları sonrası değerler karşılaştırılmıştır. n=20

sadece birinde spikeler tamamen yok oldu.

### 2- Spike amplitüdü üzerine fenitoin enjeksiyonlarının etkisi:

Denenen üç doz fenitoinin de spike amplitüdü üzerine etkisi yoktu (Tablo-1).

### 3- İki spike arası süre üzerine fenitoin enjeksiyonlarının etkisi:

İki spike arası sürenin kontrol değeri  $3.4 \pm 9.17$  saniye iken ilk doz fenitoinden sonra mesafe artarak  $3.85 \pm 0.38$  saniye oldu, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. 2. doz fenitoinden sonra ara mesafe  $4.14 \pm 1.23$  saniye ( $p < 0.05$ ) olarak, 3. dozdan sonra  $9.30 \pm 1.64$  saniye ( $p < 0.01$ ) olarak bulundu.

## TARTIŞMA

Fenitoin, tutarık hastalıklarında, anormal elektriksel aktiviteyi kontrol eden ajanlardan biri olarak bilinmektedir. Topikal konvülsan ilaçların uygulanması ile oluşturulan akut fokal epileptojenik aktivitedeki ECoG değişiklikleri üzerine fenitoinin etkisini inceleyen birçok araştırma yapılmıştır<sup>(3,11,12,14)</sup>.

Sunulan çalışmamızda, ilk epileptiform spike'ler i.c. penisilin uygulamasından 6-7 dakika sonra gözlenmeye başladı ve pik amplitüdüne 11. dakikada ulaştı. Ancak Gartside<sup>(14)</sup> rat sensorimotor konteksine 25Ü Na-penisilin enjeksiyonunu takiben ilk epileptiform spike'ların 1-3 dakika sonra başladığını ve spike boyunun progresif olarak artarak 5-10 dakikada pik amplitüdüne ulaştığını bildirmiştir. Penisiline bağlı epileptiform spike oluşma aşamasında gözlenen bu farklar, kullanılan deney hayvanının cinsine, uygulanan penisilin dozuna ve penisilin Na ve K tuzları farkına bağlı olabilir.

Çalışmamızda, fenitoinin ilk dozu ve ikinci dozu spike frekansında, progresif olarak hafif bir azalmaya neden oldu, ancak bu veriler, istatistiksel olarak anlamlı değildi. Fenitoinin üçüncü dozu ile spike frekansında istatistiksel olarak belirgin bir azalma meydana getirdi. Julien ve Halpern<sup>(12)</sup> ve Gartside<sup>(14)</sup> bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, fenitoin enjeksiyonlarını takiben frekansda belirgin dep-

resyon gördüklerini bildirmişlerdir. Louise ve ark.<sup>(11)</sup> ise fenitoinin frekans üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını veya frekansı hafif derecede deprese ettiğini bildirmişlerdir. Bu veri çalışmamızda ilk ve ikinci doz fenitoin enjeksiyonları sonucu gözlediğimiz bulgular ile uyumlu olarak değerlendirilebilir. Busmante ve ark.<sup>(3)</sup> fenitoinin primer spike frekansını artırdığını ileri sürmüşlerdir. Edmonda ve Stark<sup>(13)</sup> SC-13504 kod numaralı başka bir antikonvülsan ilacın frekansları belirgin olarak artırdığını ancak fenitoinin spike frekansında belirgin bir değişiklik yapmadığını bildirmişlerdir. Fenitoin normal tetikleme hızındaki aksonal akımları deprese etmez ancak sürekli yüksek frekanslı deşarjları içeren tutarıklar, fenitoinin etkisine aksyonların hassasiyetini artırır<sup>(15)</sup>. Fenitoin, aksonlarda maksimal tutarık aktivitesi gelişimi sırasında hücre dışı  $K^+$  artışı ve  $Ca^{+2}$  azalışının neden olduğu spike burst'lerinin sayısının artmasını ve ekloptik burst üretimini, bu iyonların konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikleri önleyerek engeller<sup>(9)</sup>. Ayrıca nöronal membranın Na iyonlarına permeabilitesini azaltarak epileptik fokus içindeki ve dışındaki yüksek frekanslı nöronal aktiviteyi süprese eder<sup>(16)</sup>. Penisilinle epileptiform spike oluşturma çalışmalarında i.c. penisilin dozu 25-1000 Ü arasında değişmektedir<sup>(14)</sup>, bu doz farklılığının da fenitoinin spike frekansı üzerindeki farklı etkinliğine katkısı olabilir. Kubato<sup>(17)</sup> dört neokortikal alan (unilateral visual, temporal, parietal, motor korteks) ve hipokampusu repetitif elektriksel stimülasyon uygulandığında tutarık deşarjlarının eşliğinde bölgesel farklılıklar saptamış; fenitoin enjeksiyonlarının bu bölgelerdeki tutarık deşarjları üzerine etkisinin farklı olduğunu bildirmiş ve bunun fenitoinin, beyin değerlerinin bölgesel farklılığına ile nöronal sinaps ve membranlar üzerindeki farklı etkinliğine bağlı olduğunu ileri sürmüştür.

Deneylerimizde fenitoinin spike amplitüdü üzerinde belirgin herhangi bir etkisini gözlemedik. Bu bulgumuzla uyumlu olarak, Busmante ve ark.<sup>(3)</sup> fenitoinin sadece

zayıf spike fokusunda (20000 IU/ml) spike amplitüdünü etkilediğini ancak bizimde uyguladığımız gibi güçlü spike fokusunda (100000IU/ml) spike amplitüdünün değişmediğini bildirmişlerdir. Düşük doz penisilin ile oluşturulan spike fokusundaki spike amplitüdüleri üzerine fenitoinin depresan etkisi paroksizmal depolarizan şifitleri doğuran nöronların sayısındaki azlığa ve/veya düşük amplitüdüne bağlı olabilir<sup>(15)</sup>.

Çalışmamızda 3. parametre olarak fenitoinin iki spike arası süreye etkisini değerlendirdik. Fenitoin iki spike arası süreyi progresif olarak artırdı. İlk dozun iki spike arası süreye artırıcı etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi ancak ikinci doz fenitoin  $p<0.05$  derecesinde anlamlı bir artışa neden olurken üçüncü doz fenitoinin iki spike arası süreyi artırıcı etkisi  $p<0.01$  ile ileri derecede anlamlı bulundu. Na kanallarının blokajının repetitif firing epizodlarının kısaltılmasında etkin olduğu bilinmektedir<sup>(1,9)</sup>. Ayrıca normal ve patolojik burst aktivitesine katkıdan sorumlu tutulan tip 1 Ca kanallarının fenitoin tarafından blokajı ise paroksizmal depolarizan şifitler süresince gelişen içe akımın belirgin bir kısmını süprese ederek frekansda depresyona neden olduğu bildirilmiştir<sup>(1)</sup>. Fenitoin, izole insan neokortikal nöronlarında kalsiyum kanallarından kalsiyum akımını tama yakın derecede azaltmıştır<sup>(18)</sup>.

Sonuç olarak; tavşanlarda i.c. penisilin ile oluşturulan akut fokal spike fokusunda, fenitoinin spike frekansını azalttığı ve iki spike arası süreyi anlamlı şekilde uzattığı gözlemlendi. Fenitoinin bu etkilerini muhtemelen iyon alışverişlerini etkileyerek yaptığı kanısındayız. Daha detaylı çalışmaların fenitoinin etki mekanizmasına açıklık getireceğine inanıyoruz.

**Geliş Tarihi:** 23.12.1993

**Yayına Kabul Tarihi:** 28.02.1994

#### KAYNAKLAR

1. Twombly DA, Yoshii, M, Narahashi T: Mechanisms of calcium channel block by phenytoin. J.Pharmacol. Exp. Ther. 1988; 246: 189-195.
2. Porter RJ, Pitlick WH: Antiepileptic drugs. In: Basis and Clinical pharmacology.; ed. Katzung BG. 4.nd edition, 1989; 287-291.
3. Bustamente L, Laeders H, Pippenger C et al. The effects of phenytoin on the penicillin-induced spike Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 1980; 48: 90-97.
4. Kayaalp SO. Antiepileptik ilaçlar. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 6. Baskı Ankara, Feryal Matbaacılık, 1992; Sayfa 2122-2126.
5. Phillis JW. Interactions of the anti-convulsants diphenylhydantoin and carbamazepine with adenosine on cerebral cortical neurons Epilepsia. 1984; 25: 765-772.
6. Yaari Y, Selzer ME, Pincus JH. Phenytoin: Mechanisms of its anticonvulsant action. Ann. Neurol. 1986; 20: 171-184.
7. Messing RO, Carpenter CL, Greenberg DA. Mechanism of calcium channels antagonist. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1985; 235(2): 407-411.
8. Greenberg DA, Cooper EC, Carpenter CL. Phenytoin interacts with calcium channels in brain membranes. Ann Neurol. 1984; 16: 616-617.
9. Worley PF, Baraban JM. Site of anti-convulsant action on sodium channels: Autoradiographic and electrophysiological studies in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84: 3051-3055.
10. Fisher RS. Epilepsy. Experimental Surgery and Physiology: Induced animal models of human disease. Dum MMS, Dum RJA (ed). Williams and Wilkins, Baltimore USA, 1988.
11. Louis S, Kutt H, McDowell F. Intravenous diphenylhydantoin in experi-

- mental seizures. Effect on penicillin-induce seizures in cat. Arch. Neurol. 1968; 472-477.
12. Julien RM, Halpern CM. Effects of diphenylhydantoin and other antiepileptic drugs on epileptiform activity and purkinje cell discharge rates. Epilepsia. 1972; 13: 387-400.
  13. Edmonds HL, Stark LG, Hollinger MA. The effects of diphenylhydantoin, phenobarbital and diazepam on the penicillin-induced epileptogenic focus in the rat. Exp.Neurol. 1974; 45: 377-386.
  14. Gartside IB. The action of diazepam and phenytoin on a low dose penicillin epileptiform focus in the anaesthetised rat. Br. J. Pharmac. 1978; 62: 289-292.
  15. Forster FM, Booker HE. The epilepsies and convulsive disorders (ed) Baker AB, Joynt RJ, Clinical Neurology. 1985; vol.2, chap. 31: 9-14.
  16. Sironi VA, Navagnati L, Ettore G et al. Differences between the concentrations of antiepileptic drugs in normal and pathological human brain. Eur J.Clin. Pharmacol. 1982; 22: 447-449.
  17. Kubota T, Jibiki I, Hirose S. Antiepileptic effects under steady of phenytoin serum levels produced in acute experiments. Epilepsia. 1987; 28(2): 169-178.
  18. Sayer RJ, Brown AM, Schwindt PC, et al. Calcium currents in acutely isolated human neocortical neurons. J. Neurophysiol. 1993; 69: 1596-1606.

