

## Nitrik Oksit Ve Deneysel Epilepsi

Dr. Cafer MARANGOZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

✓ Nitrik oksit (NO) ile endotel kaynaklı gevşetici faktörün (EDRF) aynı molekül olduğu 1987 yılında anlaşıldı. Bir yıl sonra, serebellumun kültür ortamındaki hücrelerinin, glutamat reseptörü agonisti N - metil - D aspartat (NMDA) ile uyarılmasının siklik guanozin 3-5 monofosfat (cGMP) seviyesini artırdığı ve buna nitrik oksit salgısındaki artışın yol açtığı ileri sürüldü. *Science* Dergisi'nin editörleri 1992'yi "NO Yılı" olarak ilan ettiler. 1988 yılına ait Medline da "nitrik oksit" terimi 85 kez geçerken; bu miktar 1995 yılında 3178'e ulaşmıştır.

NO, depo bölgeleri ve salgı mekanizması olmayan reaktif serbest radikal bir gazdır. Normal fizyolojik şartlarda yarı ömrü 5 saniyeden azdır. Beyinde NO, bir amino asit olan L-argininin L-sitrüline dönüşmesi sonucu meydana gelir. Bu reaksiyonları nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile çeşitli kofaktörler katalizler. Hedef hücrelerde NO, eriyebilen guanilat siklaz enzimini aktifleyerek cGMP seviyesini yükseltir veya hem ihtiva eden diğer proteinler ile etkileşir.

Trans sinaptik retrograd bir haberci olarak kabul edilen NO, çok çeşitli fizyolojik ve fizyopatolojik olaylarla ilgili önemli bir moleküldür. Bu derlemede, sadece NO'nun epileptiform aktiviteyle ilgili olduğunu gösteren deliller tartışılacaktır. NO'nun endojen bir konvulsan olduğu düşünülürken, bu molekülün aynı zamanda endojen bir antikonvulsan olduğunu gösteren bulgular da artmaktadır. Laboratuvarımızda elde edilen sonuçlar NO'nun endojen bir antikonvulsan olabileceğini göstermektedir.

Özetlenen çalışmalara göre, merkez sinir sistemini ilgilendiren epilepsi ve diğer bir çok hastalığın daha iyi anlaşılması ve daha kolay tedavi edilebilmesi için NO gibi küçük-gaz tabiatlı haberci moleküllerin de gözönüne alınması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Nitrik Oksit, deneysel epilepsi.

### ✓ Nitric Oxide and Experimental Epilepsy

In 1987, it was revealed that endothelium - derived relaxing factor (EDRF) and nitric oxide (NO) are the same molecule. One year later, it was reported that stimulation of cultured cerebellar cells with the glutamate receptor agonist N-methyl-D-aspartate (NMDA) induced an elevation of cyclic guanosine 3-5 monophosphate (cGMP) levels, which was associated with the release of nitric oxide. 1992 was announced as the "year of NO" by the Editorial Board of Science.

In 1995, 3178 papers including the term "nitric oxide" were indexed in Medline, while the number was only 85 in 1988.

NO is a reactive free radical gas that has neither storage sites nor release mechanisms. It has a half-life of less than 5 second under normal physiological conditions. In the brain, NO is produced via **conversion of the amino acid L-arginine into L-citrulline**. These reactions are catalysed by the enzyme, nitric oxide synthase (NOS) and various co-factors. In the target cells, NO activates soluble guanylate cyclase to increase the cGMP level or interact with other heme containing proteins.

NO, which is accepted as a transsynaptic retrograde messenger, is an important molecule in many physiological and pathophysiological states. In this review, we discuss only the evidence that NO is involved in epileptiform activity. While NO was envisaged as endogenous convulsant, a growing body of evidence demonstrates that this molecule is also anticonvulsant. Our own results demonstrated that NO might be an endogenous anticonvulsant substance.

As a conclusion, small-gaseous messenger molecules such as NO should be taken into consideration for a better understanding and an easier treatment of epilepsy and many other diseases related to central nervous system.

**Key Words:** Nitric oxide, experimental epilepsy.

Serbest radikal bir gaz olan nitrik oksit (NO), yaklaşık 10 yıl öncesine kadar

sadece kimyacılar ile atmosferin kirlenmesiyle ilgilenen çevrecilerin dikkatini

çekmekteydi. 1980 yılında izole damarlar-  
da asetilkolinin gevsemeye sebep olduğu;  
ancak damarın endoteli çıkarılınca bu et-  
kinin görülmediği tesbit edildi<sup>(1)</sup>. Bunun ü-  
zerine, asetilkolin ile uyarılan endotel hü-  
relerinden **endotel kaynaklı gevşetici**  
**faktör (EDRF)** denen bir maddenin salgı-  
lanarak damarı gevşettiği bulundu. 1987  
yılında, EDRF'nin nitrik oksit veya ona  
benzeyen bir madde olduğu anlaşıldı<sup>(2,3)</sup>. Bir  
yıl sonra, N-metil-D-aspartat (NMDA)'a ma-  
ruz kalan kültür ortamındaki sıçan sere-  
bellumunun granül hücrelerinden NO'ya  
benzeyen bir maddenin salgılandığı göste-  
rildi<sup>(4)</sup>. Ayrıca 1989'da, sıçanın ön beynin-  
de nitrik oksitin sentezini sağlayan, nitrik  
oksit sentaz (NOS) enziminin varlığı anla-  
şıldı<sup>(5)</sup>.

Heyecan verici ilk çalışmalar nitrik ok-  
sidi konu edinen araştırmaların hızla art-  
masına yol açtı. Index Medicus'a giren der-  
gilerde "nitrik oksit" teriminin geçtiği  
çalışmaların sayısı yıllar itibariyle şöyle-  
dir: 1987, 55; 1988, 85; 1989, 160; 1990, 291;  
1991, 582; 1992, 1073; 1993, 1863; 1994,  
2935; 1995, 3178. **Science Dergisi'nin**  
editörleri 1992'yi **NO Yılı** ilan ettiler<sup>(6)</sup>.

Bugünkü bilgilere göre NO, sinir, sindi-  
rim, immün, kardiyovasküler ve ürogenital  
sistemlerde bulunan çok önemli bir  
düzenleyici molekül, ikinci haberci ve  
transmitterdir. Normal fizyolojik fonk-  
siyonlar yanında, septik şok, hipertansi-  
yon, inme, epilepsi ve diğer nörodejeneratif  
hastalıklar gibi patofizyolojik durumlarla  
da yakından ilgilidir. NO, özellikle Parkin-  
son, Huntington, Alzheimer ve epilepsi gibi  
nörodejeneratif hastalıklarda rol oynar.  
Ağrı duyusunun iletimine aracılık eder.  
Transmitter ve hormon serbestlenmesini  
düzenler. Uzun süreli potansiyasyon (LTP)  
ve uzun süreli depresyon (LTD)'da ve sonuç  
olarak öğrenmede rol alır.

Sinir sisteminde morfogenezi etkiler.  
Morfine olan bağılılığın gelişmesini sağlar.  
Uyku-uyanıklık ve diğer ritmik olayları  
düzenler<sup>(7-10)</sup>. Diğer taraftan NO, viral repli-

kasyonu önler. Septik şokta hipotansiyona  
sebeptir. Önemli bir endojen vazodila-  
tatórdür. Platelet agregasyonunu durak-  
latır. Demir metabolizmasını düzenler.  
Bakterileri ve kanser hücrelerini öldürür.  
Penisin ereksiyonunu sağlar. Sindirim  
kanalındaki peristaltik hareketleri  
düzenler ve akciğer fonksiyonlarını etkiler.

Son yıllarda nitrik oksidin, bir kısmı  
yukarıda sayılan etkileri ve nitrik oksit  
sisteminin yapısıyla ilgili çok önemli der-  
leme çalışmaları yapılmıştır. Nitrik oksi-  
din, epilepsi dışındaki fizyopatolojik olay-  
lar ile ilgisi için okuyucu bu çalışmalara  
başvurmalıdır<sup>(7-12)</sup>.

Nitrik oksidin keşfi, sinir hücreleri  
arasındaki haberleşmeyle ilgili bilgi ve  
görüşlerin değişmesine sebep oldu. Nitrik  
oksidin keşfinden önce bilinen  
nörotransmitterler, genellikle amino asit ve  
peptit yapılarıydı. Bunlar presinap-  
tik uçlardaki keseciklerde depolanır ve  
uygun uyarının varlığında kalsiyuma  
bağımlı olarak sinaptik aralığa serbestle-  
nirler. Halbuki çok küçük bir molekül olan  
NO, keseciklerde depolanmaz, özel bir pro-  
tein reseptörü ve salgı mekanizması yok-  
tur. İhtiyaç duyulan yerde ve özellikle post-  
sinaptik hücrede (klasik transmitterlerin  
aksine) NO sentaz enziminin etkisiyle L-  
arjininden sentezlenir, hızlı difüzyonla  
hedef hücrelere ulaşarak etkisini gösterir.  
Normal fizyolojik şartlarda yarı ömrü 5 sa-  
niyeden azdır. Hedef hücrelerde NO, guani-  
lat siklazı aktifler, cGMP seviyesini artırır,  
hem ihtiva eden diğer proteinlerle kovalent  
bağlar kurmak üzere etkileşir veya oksijen  
ile reaksiyona girer<sup>(7,8,10)</sup>.

## 2. NİTRİK OKSİDİN BİYOSENTEZİ

Beyinde L-sitrülini L-arjinosüksinata ve  
onu da L-arjinine dönüştüren enzimlerin  
bulunduğu öteden beri bilinmektedir. Bu  
yolun bir görevi NO'nun ön maddesi olan L-  
arjinini sürekli olarak bulunur kılmaktır  
<sup>(13)</sup>.

Arjininin NO'ya dönüşmesi iki ayrı ba-

samakta katalizlenir (Şekil 1).

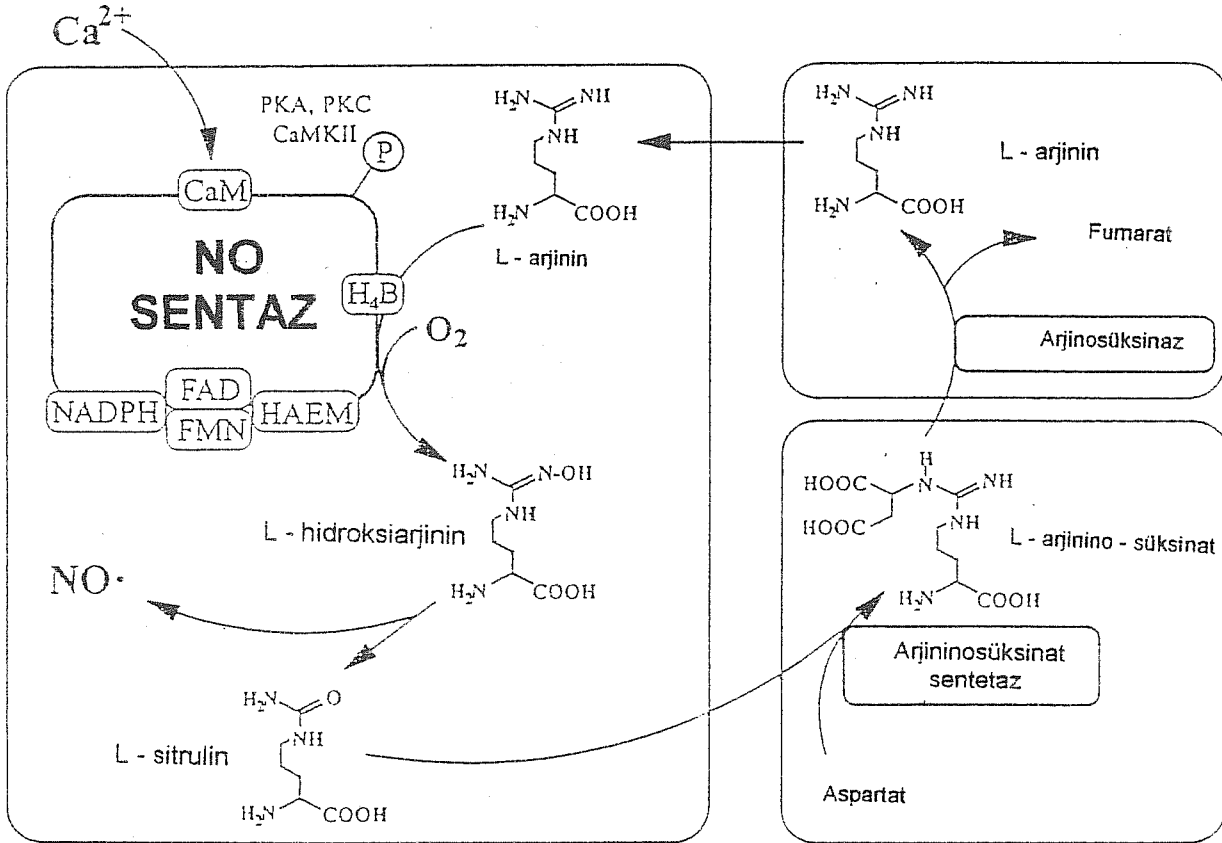
1. Arjininin NW- hidroksiarjinine (NHA) dönüştüğü basamak. Bu basamakta kofaktör olarak, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavinler, moleküler oksijen, kalsiyum ve kalmodulin ile tetrahidrobiopterin ( $H_4B$ ) kullanılır. Karbonmonoksit (CO) bu basamağı bloklar<sup>(9,11)</sup>.

2. İkinci basamakta hidroksiarjinden NO ile sitrulin oluşur. Bu oksidasyon basamağında NADPH, moleküler oksijen, kalsiyum-kalmodulin,  $H_4B$ 'ye ihtiyaç vardır. Karbonmonoksit ile arjinin analogları bu basamağı duraklatır<sup>(9,11)</sup>. Ayrıca, üretilen NO'da NOS enziminin hem prostetik grubuyla etkileşerek negatif feedback (geri beslemeli) bir inhibisyona yol açar.

Sinir sisteminde arjininin NO ile sitru-

line dönüşmesini başlatan en önemli uyarıcı glutamat reseptörünün aktiflenmesidir. Bununla birlikte, NO üretiminin sadece NMDA reseptörünün (glutamatın iyonotropik reseptörlerinden bir çeşidi) kontrolünde olduğu söylenemez. Erişkin serebellumunda iyonotropik glutamat reseptörlerinden diğer iki alt grubunun (kainat ve alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izokazolepropionat-AMP)'da NO üretimini sağladığı bilinmektedir<sup>(13)</sup>. Ayrıca, bradikinin, endotelin, 5HT<sub>3</sub>, asetilkolin ve noradrenalin reseptörlerinin de NO üretimini başlatabileceği bildirilmiştir<sup>(13)</sup>.

Diğer taraftan, herhangi bir uyarandan kaynaklanan depolarizasyon, hücre içindeki serbest kalsiyum seviyesini artırarak NO üretimini gerçekleştirebilir<sup>(13)</sup>.



Şekil 1. Nitrik oksit (NO) üretimini sağlayan ve ön madde olan L-arjinini sürekli olarak bulundurabilen devirli olayların şematik yapısı. Devirli reaksiyonların 3 ana unsurundan her birinin ayrı bir hücre çeşidinde cereyan ettiği sanılmaktadır. İki ayrı basamakta NO ve sitrulin üretimini katalizleyen NO sentaz enzimi, çok sayıda kofaktörün yanında moleküler oksijene de ihtiyaç duyar. Reaksiyonun her iki basamağı kalsiyum-kalmoduline bağımlıdır. CaM, kalmodulin; NADPH, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; FMN, flavin mononükleotid; FAD, flavin adenin dinükleotid;  $H_4B$ , tetrahidrobiopterin; HAEM, Hem; PKA, protein kinaz A; PKC, protein kinaz C; CaM K II, kalsiyum-kalmoduline bağımlı protein kinaz II; P, enzim fosforilasyon bölgesi (13).

## 2.1. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzimi

Beyinde NOS, en fazla serebellumda en az da medullada bulunur<sup>(10)</sup>. Vücutta NOS'un farklı izoformları vardır. Şimdiye kadar klonlanan 4 izoform şunlardır (Şekil 2):

**1. Beyinde bulunan izoform (bNOS, 14).** bNOS, nöronlarda redükte NADPH ile birlikte bulunur. Bu nedenle, NOS enzimini ihtiva eden nöronlar NADPH-diaforaz histokimyası denen bir metotla işaretlenebilir<sup>(13)</sup>. bNOS kalsiyum-kalmoduline bağımlıdır ve normal fizyolojik şartlarda beyinde hazır olarak bulunur. Ancak, beyin hasarını takiben yeni bNOS sentezi olduğu da gösterilmiştir<sup>(9,11)</sup>.

Beyinde NMDA reseptörlerini uyaran glutamat, postsinaptik hücre içine kalsiyum girişini başlatır. İçeriye giren kalsiyum kalmoduline bağlanarak var olan NOS'u aktifler ve NO üretimi başlar.

Nöronal NOS'un fosforilasyonunu sağlayan maddelerden en önemlileri şöyle sıralanabilir: Protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC), siklik GMP'ye bağımlı protein kinaz (PKG) ve kalsiyum-kalmoduline bağımlı protein kinaz (CAM-K). Kalsiyum, protein kinaz C'yi aktifler; o da fosforilasyon yoluyla NOS'u duraklatır<sup>(11)</sup>.

Beyin korteksindeki bütün hücrelerin ancak %2'si NOS ihtiva eder. Hipokampusun piramidal hücrelerinde bNOS yoktur. Ancak girus dentatustaki granül hücrelerinde bol miktarda bNOS tesbit edilmiştir. Serebellumun purkinje hücrelerinde NOS bulunmazken, sepet ve granül hücrelerinde bol miktarda olduğu gösterilmiştir. Granül ve sepet hücrelerinde bulunan NMDA reseptörleri uyarıcı yosunsu liflerden giriş alır. Bu hücrelerdeki reseptörlerin uyarılması NO üretimini başlatır. Difüzyonla purkinje hücrelerine geçen NO orada guanilat siklazı aktifler<sup>(11)</sup>.

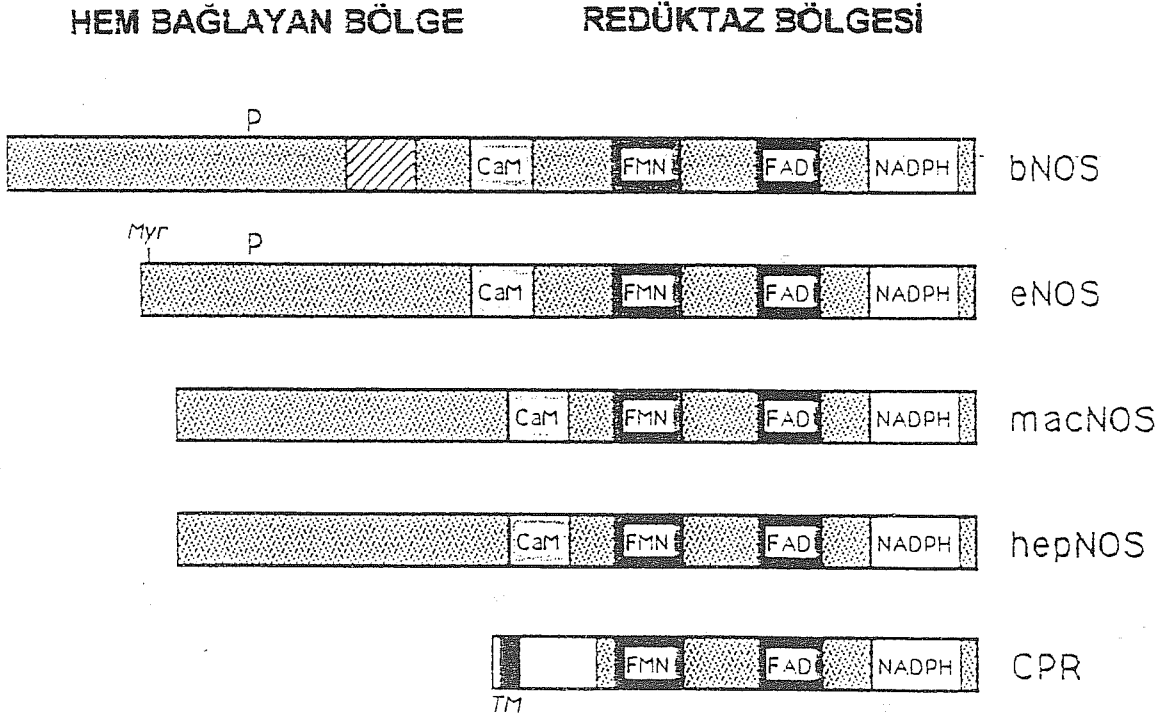
**2. Endotelde bulunan izoform (eNOS).** Kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan, ayrı bir genin ürünü olan ve non-adrenerjik, non-kolinerjik sinir liflerinin uyarılması sonucu kan damarlarındaki genişlemeye aracılık eden enzimdir<sup>(15)</sup>. Hipokampustaki bazı nöronlarda da eNOS'a rastlanmıştır. Kalsiyum kalmoduline bağımlıdır.

**3. Makrofajlarda bulunan izoform (mNOS).** İmmünolojik NOS da denen bu enzime, normal şartlarda beyinde rastlanmamıştır. Toksik veya enfeksiyöz uyarılar glia hücrelerini uyardığında beyinde de görülmeye başlar. Enfeksiyöz ajanlar ile savaşta önemli bir rol oynar. İlk kez fare makrofajlarından elde edilmiştir<sup>(16)</sup>. Kalsiyum-kalmoduline bağımlı değildir, fakat kalmodulini bağlayan bölgesi vardır.

**4. Hepatosit izoformu (hNOS).** Kalmodulin bağlama bölgesi bulunmaktadır ve kalsiyum-kalmodulinden etkilenmektedir<sup>(17)</sup>.

## 2.2. Nitrik Oksidin Etkisi

NO'nun ana etkisi eriyebilen guanilat siklaz (GC) enzimini aktifleme yoluyla, hedef hücrelerde cGMP seviyesini artırmaktır. cGMP immünokimyası metodunu kullanarak hedef dokuları tespit etmek mümkündür<sup>(13)</sup>. Araştırmalarda NMDA yerine NO'nun ekzojen kaynakları kullanıldığında hem nöronal elemanlarda hem de glia hücrelerinde belirgin ölçüde cGMP birikimi olduğu görülür. Serebellumda bu elemanlar, granül hücreleri gibi postsinaptik yapılar ve çeşitli presinaptik elemanlardır<sup>(18)</sup>. Bu bulgular, postsinaptik bölgelerde üretilen NO'nun, diğer postsinaptik nöronal yapıları ve presinaptik sinir uçlarını etkilediğini gösterir. Üstelik, bu presinaptik yapıların NO'yu üreten sinapsa ait olması gerekmez. İşte nitrik oksidin belirtilen bu özellikleri



**Şekil 2.** NOS izoformları ile sitokrom P450 redüktazın (CPR) temel yapısı. Şimdiye kadar klonlanan bütün NOS'lar sitokrom P450 ile homolog kısımları ve aynı koenzim bağlayan bölgeleri ihtiva eder. FAD, flavin adenin dinukleotid; FMN, flavin mononukleotid; NADPH, redükte nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; CaM, kalmodulin ve hem molekülü klonlanan tüm NOS'larda bulunur. Nöronal izoform (bNOS) ile endotelial izoformda (eNOS) cAMP'ye bağımlı kinaz için fosforilasyon bölgesi (P) vardır. Hep NOS, hepatik NOS; TM, CPR'nin transmembran kısmı; Myr, endotel NOS'un amino ucunda bulunan miristilasyon bölgesi(11).

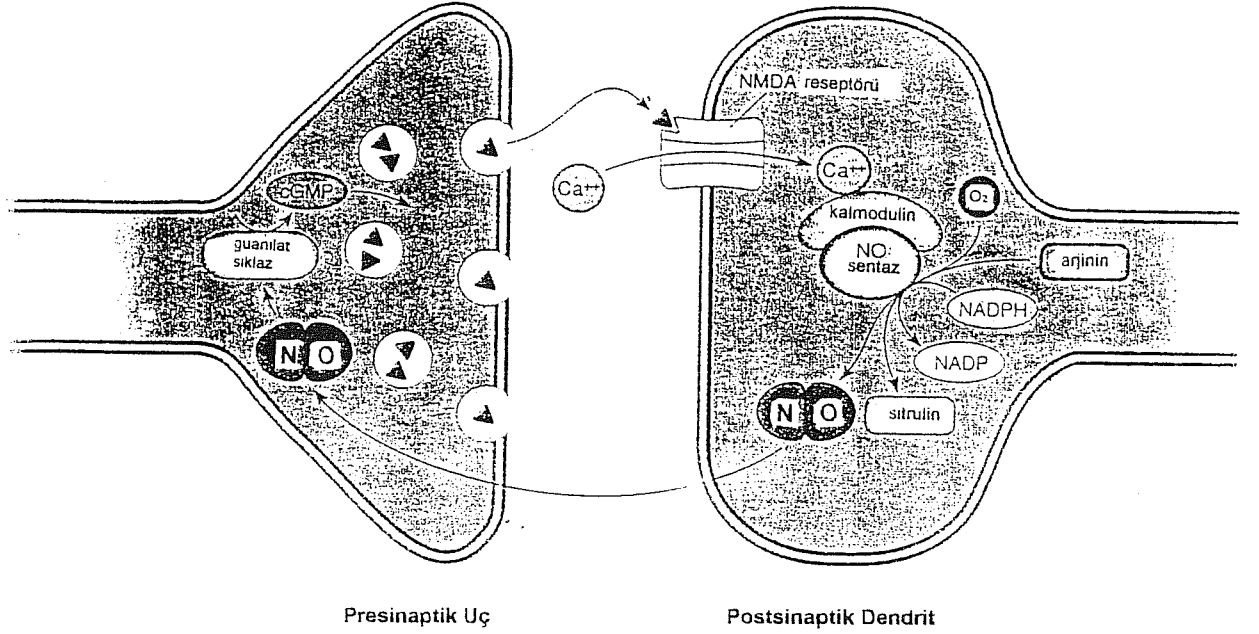
sinaptik ileti ve hücreler arası haberleşme hakkındaki eski bilgilerimizin değişmesine sebep olmuştur.

NO'nun sinaptik iletiye olan etkilerinden birisi, Şekil 3'de görülmektedir. Eksitator transmitter olan glutamat presinaptik uçtan serbestlenerek postsinaptik membrandaki NMDA reseptörüne tutunur. Açılan iyon kanalından dendrit içine kalsiyum girişi olur. Kalsiyum kalmoduline bağlanarak NOS enzimini aktifler. Arjininden NO üretilir. NO, retrograd bir haberci olarak difüzyonla geriye, presinaptik uca geçer ve burada demir ihtiva eden bir enzim olan guanilat siklazı aktifler. Aktif guanilat siklaz cGMP'yi oluşturan reaksiyonu katalizler ve bir ikinci haberci olan cGMP'nin miktarı artar.

Nitrik oksidin etkisiyle artan cGMP'nin

üç muhtemel hedefi vardır. 1. Protein kinazlar. 2. Fosfodiesterazlar. 3. İyon kanalları<sup>(10)</sup>. Ancak, NO bütün etkilerini cGMP üzerinden göstermez. Yani, eriyebilen guanilat siklaz NO'nun tek hedefi değildir<sup>(10)</sup>. NO'nun başka hedefleri de vardır.

Nitrik oksit sistemini etkileyen maddeleri kullanarak NO'nun sinir sistemindeki muhtemel görevlerini araştırmak mümkündür. Nitrovazodilatörlerin çoğu NO serbestleterek etki eder. En çok kullanılan NO vericiler şunlardır: Sodyum nitroprussit (SNP), hidrosilamin, izosorbit dinitrat, 3-morfoline-sidonimin (SIN-1), S-nitrozo-N-penisilamin (SNAP) ve S-nitro glutasyon (SNOG). Bu maddelerden SIN-1 ve SNAP membranlardan geçemez. Bu nedenle NO'yu ekstra sinaptik alana verirler. Hidrosilamin ile izosorbit dinitrat hücre içinde iken



Şekil 3. Nitrik oksidin sinaptik iletiye etkisi(19).

NO verebilen maddelerdir. Çünkü, NO oluşturmak için katalazlar ile sitokromlar gibi hücre içi enzimlere ihtiyaç duyarlar. Sodyum nitroprussit, NO verici özelliğine bağlı olmadan NMDA reseptör fonksiyonunu duraklatabilir<sup>(20)</sup>. Bir molsidomin türevi olan SIN-1, NO ile birlikte süperoksit iyonlarını da meydana getirir. Hidroksilamin katalazın aktivitesini duraklatır ve serebellum dilimlerinde serbest radikal toksisitesine yol açar<sup>(21)</sup>. S-nitrosoglutasyonun bir yan ürünü de glutasyondur. O halde, görülen etki, hem nitrik oksite hem de glutasyona ait olabilir<sup>(22)</sup>.

### 2.3. NO Sentaz İnhibitörleri:

NOS'un çok sayıda kompetitif inhibitörü bilinmektedir. Bunlardan NG-monometil-L-arginin (L-NMMA), NG-nitro-L-arginin (NARG) ve L-nitro arjinin metil ester (L-NAME) L-argininin türevleridir. Bu

maddelerin D-izomerik formları genelde NOS'u etkilemezler. Bu nedenle deneylerde kontrol materyali olarak kullanılırlar<sup>(17)</sup>.

NO'nun etkisini bloklamak için kullanılan maddelerden birisi de hemoglobindir. NO ve karbonmonoksit hemoglobindeki hem grubunda bulunan demire tutunur. Hemoglobin hücre membranından geçemez. Onun için, NO'nun hücreler arası etkisi hakkında yapılan çalışmalarda kullanılabilir<sup>(17)</sup>. Nihayet, sıklıkla eriyebilen guanylat siklaz inhibitörü olarak kullanılan metilen mavisinin, aslında guanylat siklazı duraklatmaktan çok, süperoksit iyonlarını üreterek NO'nun etkisini önlediği ileri sürülmüştür<sup>(23)</sup>. Yani, metilen mavisinin NO-cGMP yolunu tıkamaktadır.

### 2.4. NO'nun Sinaptik Olaylardaki Rolü:

NO, Sinaptik plastisiteyi dört ayrı yolla

etkiliyor olabilir<sup>(7,17)</sup>:

1. Hücre içi cGMP seviyesini artırarak.
2. Kalsiyum homeostazisini değiştirerek.
3. Protein fosforilasyonuna sebep olarak.
4. G protein ribozilasyonuna sebep olarak.

NO muhtemelen lokal nöron devrelerinde glutamat ve diğer uyarıcı nörotransmitterlerin salgısını artırarak eksitator etki göstermektedir. Diğer taraftan, NO, negatif geri besleme devresi yoluyla NMDA reseptörlerinde duyarsızlığa ve inhibitör transmitter salgısına yol açarak duraklatıcı etki gösteriyor olabilir.

NO, mikroçevrenin fizikokimyasal yapısına bağlı olarak şu üç farklı oksidasyon-redüksiyon durumunda bulunabilir<sup>(24)</sup>:

1. Azot monoksit veya kaynak form (NO)
2. Nitrik oksit veya redükte form (NO<sup>•</sup>)
3. Nitrosonium iyonu veya okside form (NO<sup>+</sup>).

Mesela, NO'nun redükte formunun (NO<sup>•</sup>) süperoksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturduğu ve sonuçta nörotoksitete sebep olduğu bildirilmiştir. Halbuki, NO tek başına bu etkiyi göstermeyebilir. Diğer taraftan okside formu (NO<sup>+</sup>) NMDA reseptörünün üzerindeki tiol guruplarıyla reaksiyona girerek hücre içine kalsiyum girişini durdurur ve böylece sinaptik iletiyi önler<sup>(24)</sup>. NO'un inhibitör etkisi böylece ortaya çıkar. Ayrıca, epilepsi, nörotoksite, öğrenme ve benzeri fizyopatolojik olaylarda nitrik oksit veya nitrik oksit vericilerinin etkileri konusunda elde edilen çelişkili sonuçları, NO'nun farklı oksidasyon-redüksiyon durumunda bulunabilme özelliğiyle açıklamak mümkündür.

## 2.5. Nitrik Oksit Metabolizması:

NO sulu ortamda oksijen ile kolayca

reaksiyona girerek nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) gibi inaktif anyonları meydana getirir. Oksijen ile NO arasındaki reaksiyon çok hızlı olduğundan NO'nun yarı ömrü ancak saniyeler kadardır<sup>(10)</sup>. NO, süperoksit anyonu ile de reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) anyonunu meydana getirir. Diğer taraftan NO hemoglobin gibi demir ihtiva eden moleküllerle birleşerek inaktif duruma geçer<sup>(10)</sup>.

## 3. NO - EPİLEPSİ İLİŞKİSİ

Merkez sinir sistemindeki inhibitör sistemler ile eksitator sistemler arasında bir denge vardır. Bu denge bozulduğunda beyin görevini tam olarak yerine getiremez ve eksitator sistemler baskın duruma geçince, en yaygın nörolojik hastalıklardan biri olan epilepsi görülür. Hayvanlarda oluşturulan epilepsi modellerinde yapılan araştırmaların esas amacı, konvulsyonların fizyolojik temellerini aydınlatmak ve daha etkili tedavi yollarını keşfetmektir.

Nitrik oksidin epileptiform aktiviteyle olan ilgisini belirlemek için deneysel epilepsinin çok çeşitli modelleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların bir kısmı NO'nun endojen bir prokonvulsan olduğunu gösterirken, diğer önemli bir kısmı bu küçük inorganik molekülün anti-konvulsan olduğunu vurgulamaktadır. Burada önce NO'nun prokonvulsan etkisini bildiren çalışmalar ele alınacaktır.

### 3.1. Nitrik Oksitin Prokonvulsan Etkisinin Delilleri

#### 3.1.1. Eksitator Amino Asit Modelleri

Mollace ve ark.<sup>(25)</sup> sıçanda lateral ventriküle NO'nun ön maddesi L-arjinini (300 µg'a kadar) verdiklerinde elektrokortikogramda (ECoG) senkronize yüksek voltajlı dalgalar gördüler. NMDA'nın subkonvulsif

dozundan (0,5 µg,i.c.v) bir dakika önce L-arjinin verdiklerinde ECoG'de epileptiform aktivite belirdi. Yani, L-arjinin NMDA'nın epileptojenik özelliğini artırmaktaydı. L-arjinin ile birlikte NOS inhibitörü N-nitro-L-arjinin uygulandığında epileptiform aktivite önlendi. Burada, L-arjininin gösterdiği prokanvulsan etkinin, NO üretiminin artmasıyla gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

De Sarro ve ark.<sup>(26,27)</sup> endojen NO'nun eksitator amino asitlerle oluşturulan epilepside rol oynadığını buldular. Sıçanda prepiriform korteksin derinliklerine verilen NMDA klonik nöbetlere yol açtı. NMDA'dan önce NMDA antagonisti verilen hayvanlarda epilepsi önlendi. NMDA reseptör aktivasyonundan önce NO'nun inhibisyonu da epilepsiyi baskıladı. Ancak, epileptik aktivite başladıktan sonra NO üretiminin durdurulması etkisiz kaldı<sup>(26)</sup>. Yine, NMDA veya kainik asit (KA)'in prepiriform kortekse mikroenjeksiyonuyla oluşturulan epileptiform aktiviteyi, L-arjinin artırdı; fakat D-arjinin etkisiz kaldı. L-arjinin ile birlikte NOS inhibitörü L-NAME verildiğinde, L-arjininin epileptiform aktiviteyi artırıcı etkisi önlendi. Aynı bölgeye NO verici SNP (5-20 nmol) uygulanması da epileptiform aktiviteye yol açtı. Metilen mavisi (20 nmol) SNP'nin etkisini önledi<sup>(27)</sup>.

Mülsch ve ark.<sup>(28)</sup>, kainik asit (10mg/kg, s.c) verdikleri sıçan beyninin çeşitli bölgelerinde NO üretiminin durumunu araştırdılar. NO üretiminin amigdala ve tüm temporal kortekste 6 kat, korteksin diğer bölgelerinde ise, daha yavaş olmakla beraber 12 kat artış gösterdiğini tespit ettiler. NOS'un özel bir inhibitörü olan 7-nitroindazol veya diazepamın önceden verilmesi NO üretimini ve KA'nın oluşturduğu epileptiform aktiviteyi azalttı. Bu modelde, NO seviyesinin artışı, araştırmacıların iddia-

larının aksine, epilepsiyi durdurma amacına yönelik olabilir.

Sıçanlara KA'nın subkonvulsif dozundan (6 mg/kg i.p.) önce bir NOS inhibitörü olan N-omega-nitro-L-arjinin (NNA, 50 mg, i.p) verildiğinde epileptik nöbet görülmüştür<sup>(29)</sup>. Fakat, bu çalışmada NNA'nın pilokarpin, bikukullin, pikrotoksin ve pentilentetrazol epilepsilerinde epileptik nöbetlerin latensini etkilemediği bulunmuştur. Epilepsinin çeşitli modellerinde görülen bu etki farkı, kan akımının düzenlenmesindeki farklılıkla izah edilmiştir<sup>(29)</sup>.

### 3.1.2.Kokainin Konvulsif Etkileri ve NO

Kokainin toksik ve konvulsif etkilerinin NOS inhibitörleri tarafından bloklanıp bloklanmadığını tespit etmek amacıyla önemli araştırmalar yapılmıştır<sup>(30-33)</sup>. Fareye 7 gün süreyle verilen kokain (45 mg/kg, i.p) epileptik nöbetlere sebep olmuş; yedinci güne gelindikçe nöbetlerin süre ve şiddeti artmıştır. Kokainden önce NOS inhibitörleri L-NAME (100 mg/kg, i.p) ve NG-L-arjinin (NRG) (25 mg/kg/gün, i.p) verilince konvulsiyonlar önlenmiştir<sup>(30)</sup>. Bir başka çalışmaya göre L-NAME, NMDA reseptör antagonisti MK-801 (0,35 mg/kg/gün) ile aynı etkiyi göstermektedir<sup>(31)</sup>.

Kokainin amigdaller ve hipokampusta epileptiform aktivitenin yayılışını kolaylaştırdığı daha önceden biliniyordu. Ancak, bunun mekanizması açık değildi. NOS inhibitörlerinin kokainin sebep olduğu konvulsiyonları önlediği<sup>(31)</sup> ve hipokampusta proenkefalin mRNA seviyesini %240 artırdığı bulununca<sup>(32)</sup> NO sisteminin kokainle oluşturulan eksitabilite artışında rol oynadığı ileriye sürüldü. Anestezili, paralize sıçanlara i.v. olarak verilen kokain (4 mg/kg/dak.) epileptiform aktiviteye neden olmuş; kokainden önce 30 dakika



süreyle L-NAME (2 mg/kg/dak. i.v) verilince epileptiform aktivite önemli ölçüde azalmıştır<sup>(33)</sup>. Bu sonuçlar da kokainden önce verilen NOS inhibitörünün NO sentezini engelleyerek kokainin merkez sinir sistemine olan uyarıcı etkisini ölediği şeklinde yorumlanabilir. Özellenen bulgular, deneysel epilepsinin kokain modelinde NO'nun prokonvulsan bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

### 3.1.3. Tutuşma Modeli ve NO

Al-Ghoul ve ark.<sup>(34)</sup> temporal lob epilepsinin tutuşma modelini kullanarak, jeneralize epileside plazma vazopressin (VP) ve supraoptik nukleusta VPmRNA seviyesinin arttığını buldular. Aynı araştırmacılar sıçanlarda amigdallere yerleştirilen elektrotlarla günde iki kez elektrik akımı (60 Hz; 0,45 ms; 400 µA) vererek tutuşma modelini oluşturdular<sup>(34)</sup>. Amigdala tutuşma modeli oluştuktan bir ay sonra NOS aktivitesinin durumunu belirlemek için NADPH-diaforaz histokimyası uygulandı. Sonuçta, supraoptik nukleusta işaretlenen hücre sayısı ve hücre yoğunluğunun arttığı görüldü<sup>(34)</sup>. Bu sonuç, tutuşma modelinde NO üretiminin arttığı anlamına gelir. Ancak, NO üretimindeki artışın tutuşmanın sebebi mi, yoksa onu önlemeye çalışan sonucu mu olduğu henüz açık değildir.

Tutuşma modelinin bir çeşidi de **hızlı tutuşmadır**. Bu modelde hipokampus elektriklerle uyarılır ve 3 saat içinde 40 kadar epileptik nöbet oluşturulur. Sıçanda, tekrarlayan 40 nöbetten sonra beyindeki bazı bölgelerin NOS mRNA seviyesi **in situ** hibridizasyon metoduyla ölçülmüştür<sup>(35)</sup>. Sonuçta NOS mRNA'sı, nukleus dentatusun granüler hücrelerinde %56 azalmış; amigdallerde bir değişiklik olmamış; CA1'in piramidal tabakasında %420, priform kortekste ise %1260 oranında artış görülmüş-

tür<sup>(35)</sup>. Ayrıca, gen ifadesinin bir hafta sonra normal seviyeye döndüğü tesbit edilmiştir.

### 3.1.4. Diğer Modellerden Elde Edilen Sonuçlar

Sıçanlarda lityum klorürden önce verilen, güçlü asetilkolinesteraz inhibitörü takrin (5mg/kg, i.p)'in oluşturduğu epileptik nöbetlerin L-NAME tarafından azaltıldığı tesbit edilmiştir<sup>(36)</sup>. Bu sonuç, takrinin sebep olduğu epilepsi ve beyin hasarının artan NO'ya bağlı olduğu şeklinde açıklanabilir. Ancak, L-NAME'nin önceden verilmesi, epileptik nöbetlerin latensini uzattığı halde; süre ve şiddetini etkilemez. O halde, L-NAME sıçanda takrin-lityum klorür epilepsisinin başlamasıyla ilgili mekanizmayı etkilemekte, fakat devamını sağlayan mekanizmayı etkilememektedir<sup>(36)</sup>.

Farelerde siyanürle oluşturulan tonik epilepsi modelinde NG-nitro-L-arjinin (300mg/kg i.p) verilerek NOS'un aktivitesi azaltılınca epileptik nöbet eşiğinin yükseldiği tespit edilmiştir. Bu sonuç NO'nun prokonvulsan olduğunu göstermektedir<sup>(37)</sup>.

NOS inhibitörleri NG-metil-L-arjinin ve N<sup>ω</sup>-nitro-L-arjinin metil esterinin i.p. uygulanmasının pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan epilepsiye olan etkileri bilinmektedir<sup>(38)</sup>. NOS inhibitörleri, bu modelde görülen miyoklonik kasılmaları, klonik nöbetleri ve tonik jeneralize ekstansiyonları baskılar; nöbet latensini uzatır. Elde edilen sonuç NO'nun epileptojenik özelliğine bağlanabilir.

Sıçanlarda sesle (8 dB) oluşturulan elektrokortikal cevapları, önceden verilen L-NAME (10 mg/kg i.p veya 300 mg i.c.v) önemli ölçüde küçültür<sup>(39)</sup>. NO sentezinin durdurulmasıyla uyanma cevabının küçülmesi, NO'nun hipereksitabiliteyi etkilediği anlamına gelir.

Hipokampus dilimlerine, zayıf tetanik uyarılarla birlikte verilen NO, uyarılmış sinaptik potansiyelleri artırır ki bu da NO'nun eksitator etki yaptığını gösterir<sup>(40)</sup>. Diğer taraftan, uyanık sıçanlarda lateral ventriküle verilen NO serbestletici S-nitroso-N-asetilpenisilamin (SNAP, 0,25-2 µmol) doza bağımlı olarak konvulsiyonlara sebep olur<sup>(41)</sup>. SNAP (1 µmol)'den önce ventriküle metilen mavisi verildiğinde konvulsiyonlar kaybolur. Diğer taraftan, metilen mavisi 2 µmol SNAP'nin etkisini bloklar. Ancak, aynı çalışmaya göre diğer bir NO verici olan SNP (2 µmol) konvulsiyon oluşturmaz. Onun için, birinci uygulamada görülen konvulsiyonları NO'ya bağlamak oldukça güçtür. Zaten bazı araştırmacılar NO vericileri kullanmanın aşağıdaki sakıncalarına dikkat çekmişlerdir<sup>(42)</sup>:

1. Bazı NO vericilerinin yapısında bulunan taşıyıcı bileşikler transmitter salgısını artırabilir.

2. Aşırı NO üretimi ani ve beklenmeyen bir etki gösterebilir.

Bu nedenle, transmitter fonksiyonlarına NO'nun düzenleyici etkileri araştırılırken NOS inhibitörlerini kullanmak daha uygun olur.

Bir NOS inhibitörü olan LG-monometil-L-arjinin (L-NMMA) sıçanda doza bağımlı olarak GABA konsantrasyonunu artırmaktadır. Bu sonuç, NO aktivitesindeki düşüşün GABA salgısını artırdığı şeklinde yorumlanabilir<sup>(42)</sup>. Yazarlara göre NO, direkt olarak GABA minerjik sinir uçlarını etkileyerek GABA'nın salgı veya sentezini durdurmakta ve böylece epileptojenik etki göstermektedir.

Hipokampus ve parahipokampustaki devrelerde yansımaları epileptiform deşarjlarla NO'nun etkisi araştırılmış, NOS inhibitörleri ile metilen mavisi kullanılmış ve epileptiform aktivitenin pek etkilenmediği bulunmuştur<sup>(43)</sup>. Bu çalışmanın sonuçlarına

göre NO antikonvulsif bir madde değildir.

Sıçanda hiperbarik oksijenin NO üzerinden konvulsiyonlara neden olduğu; NOS inhibitörlerinin bu konvulsiyonları önlediği ileri sürülmüştür<sup>(44)</sup>.

### 3.2. Nitrik Oksidin Antikonvulsan Etkisinin Delilleri

#### 3.2.1. Eksitator Amino asit Modelleri

Uyanık farede lateral ventriküle verilen NMDA (5 µl) epileptiform aktivite oluşturur. Bu durumda NO sistemi baskılanır veya metilen mavisi verilirse epileptiform aktivite artar<sup>(45)</sup>. NMDA ile birlikte NO prekürsörü L-arjinin veya cGMP verilmesi epileptik aktiviteyi azaltır<sup>(45)</sup>. O halde, NMDA reseptörünün aktiflenmesiyle NO, cGMP artışına, o da epileptik nöbetlerin azalmasına sebep olur.

Deneyisel epilepsinin kainik asit modelinde de NO antikonvulsif etki gösterir<sup>(46-50)</sup>. Klonik konvulsiyon oluşturmak için gereken kainik asit dozu, NO'nun ön maddesi olan L-arjinin (150-600 mg/kg, i.p) tarafından yükseltilir. Halbuki D-arjinin aynı antikonvulsif etkiyi göstermez. Çünkü, D-arjinin NO üretiminde substrat olarak yer almaz. NOS inhibitörleri L-NAME ve L-NMMA (3-30 mg/kg, i.p) kainik asidin konvulsan dozunu düşürür. Ayrıca, L-NAME (3 mg/kg), L-arjininin antikonvulsan etkisini antagone eder<sup>(46)</sup>.

Uyanık, spontan solunum yapan sıçanda kainik asitten 30 dakika önce verilen L-NAME (10 mg/kg, i.p) epileptik nöbetlerin, kontroldekine göre 10 dakika daha erken başlamasına sebep olur<sup>(47)</sup>. Ayrıca L-NAME verilen sıçanlarda hipokampusun kan akımı, kontrollerine göre daha az artış gösterir. Yani, NO kainik asit epilepsisinde serebral kan akımının düzenlenmesiyle de ilgilidir. Kainik asitle oluşturulan status

epileptikus esnasında L-NAME verilen sıçanların ölmesi, serum fizyolojik verilenlerin ise ölmemesi de NO'nun antikonvulsif etkisiyle ilgili olabilir<sup>(48)</sup>.

Dorsal hipokampusa ouabain (1 µg) ve daimik asit verilerek oluşturulan epileptiform aktiviteyi, konvulsif maddeden 15 dakika önce verilen N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arjinin önlememiştir. Bu sonuç, NO üretimindeki artışın epileptojenik olmadığı anlamına gelir<sup>(49)</sup>. Sıçanlara 4 gün süreyle verilen N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arjinin kainik asit veya pilokarpinle oluşturulan konvulsiyonları artırır<sup>(50)</sup>.

Deneysel epilepsinin quinolinik asit (QA) modelinde NO'nun antikonvulsif etki gösterdiğini bildiren çalışmalar vardır<sup>(51,52)</sup>. Nitrik oksit sentezi duraklatıldığında QA'nın etkisi şiddetlenir<sup>(51)</sup>. NO verici olan SNP, QA ile oluşturulan konvulsiyonları azaltır<sup>(52)</sup>. Muhtemelen SNP'den ayrılan NO, NMDA reseptörünün aktivitesini azaltır ve aşırı eksitasyonu önleyerek konvulsiyonları bloklar. Ancak, bu çalışmada QA'dan önce verilen L-arjinin konvulsiyonları artırmış; NG-monometil-L-arjinin ise azaltmıştır<sup>(52)</sup>. Çalışmanın SNP verilerek yapılan bölümüne göre NO antikonvulsif; diğer bölümü dikkate alındığında da konvulsif etki göstermektedir.

### 3.2.2. Tutuşma Modeli

Deneysel epilepsinin tutuşma modelinde yapılan bazı çalışmalara göre NO endojen bir antikonvulsandır<sup>(53-55)</sup>. NOS inhibitörü L-NG-nitro arjinin sıçanda tutuşma modeli epilepsinin başlangıç döneminde tutuşma oluşumunu kolaylaştırır<sup>(53)</sup>. Ancak, tutuşma modeli tamamen oluşturulunca, bu NOS inhibitörü epileptik aktiviteyi artık etkilemez. NO üretimi azalınca, NO'nun NMDA reseptörüne gösterdiği inhibitör negatif geri besleme de zayıflar ve böylece postsin-

naptik eksitabilite artar. Grooms ve Jones<sup>(54)</sup>, sıçan hipokampusundan alınan dilimlerde **in vitro** tutuşma modeli oluşturarak, NOS inhibitörlerinin etkisini araştırdılar. Deney grubundaki dilimlere, tutuşmadan 1 saat önce aktif NOS inhibitörü metil-L-arjinin (100 µM) verildi. Sonuçta, hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerinde interiktal benzeri spontan börstlerin arttığı görüldü<sup>(54)</sup>. Yani, NO sentezinin durdurulması **in vitro** tutuşmayı kolaylaştırmaktadır.

Sıçanda tutuşma modelinin ilk 6 gününde L-arjinin tutuşmanın seyrini ve nöbet şiddetini etkilemez. NOS inhibitörü L-nitro arjinin (100 mg/kg) , verildiği gün konvulsiyonları artırır, fakat daha sonraki günlerde etkisiz kalır<sup>(55)</sup>. Tutuşma tam olarak meydana geldikten sonra kontrol maddesi veya NOS inhibitörü verilen hayvanlara 10 dakika arayla 6 veya daha çok uyaran uygulandığında, NOS inhibitörü alanlarda mortalite oranının daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir<sup>(55)</sup>. Bu modelde NO koruyucu, NOS inhibitörü ise postiktal direnci azaltıcı bir etki göstermektedir.

### 3.2.3. Genetik Modelde İkili Etkiler

Absans epilepsi ile NO sistemi arasındaki ilişki hakkında çok az bilgi vardır. NO talamokortikal nöronlarda spontan aktiviteyi baskılamaktadır<sup>(56)</sup>. Bu etkinin absans epilepsi bakımından önemli olduğu bildirilmiştir<sup>(45,57)</sup>. Sıçanların WAG/Rij ırkı absans epilepsi için uygun bir genetik modeldir. Bu hayvanlardan kaydedilen elektroensefalogramda 7-10 Hz'lik diken-dalgalar görülür. NOS inhibitörü L-NAME'nin periferden verilmesi (7,5-60 mg/kg, i.p) diken-dalga sayısını artırır; sürelerini etkilemez<sup>(57)</sup>. NOS inhibitörleri veya NO vericiler doğrudan doğruya beyine verildiğinde (i.c.v) tam tersi bir etki görülür<sup>(57)</sup>.

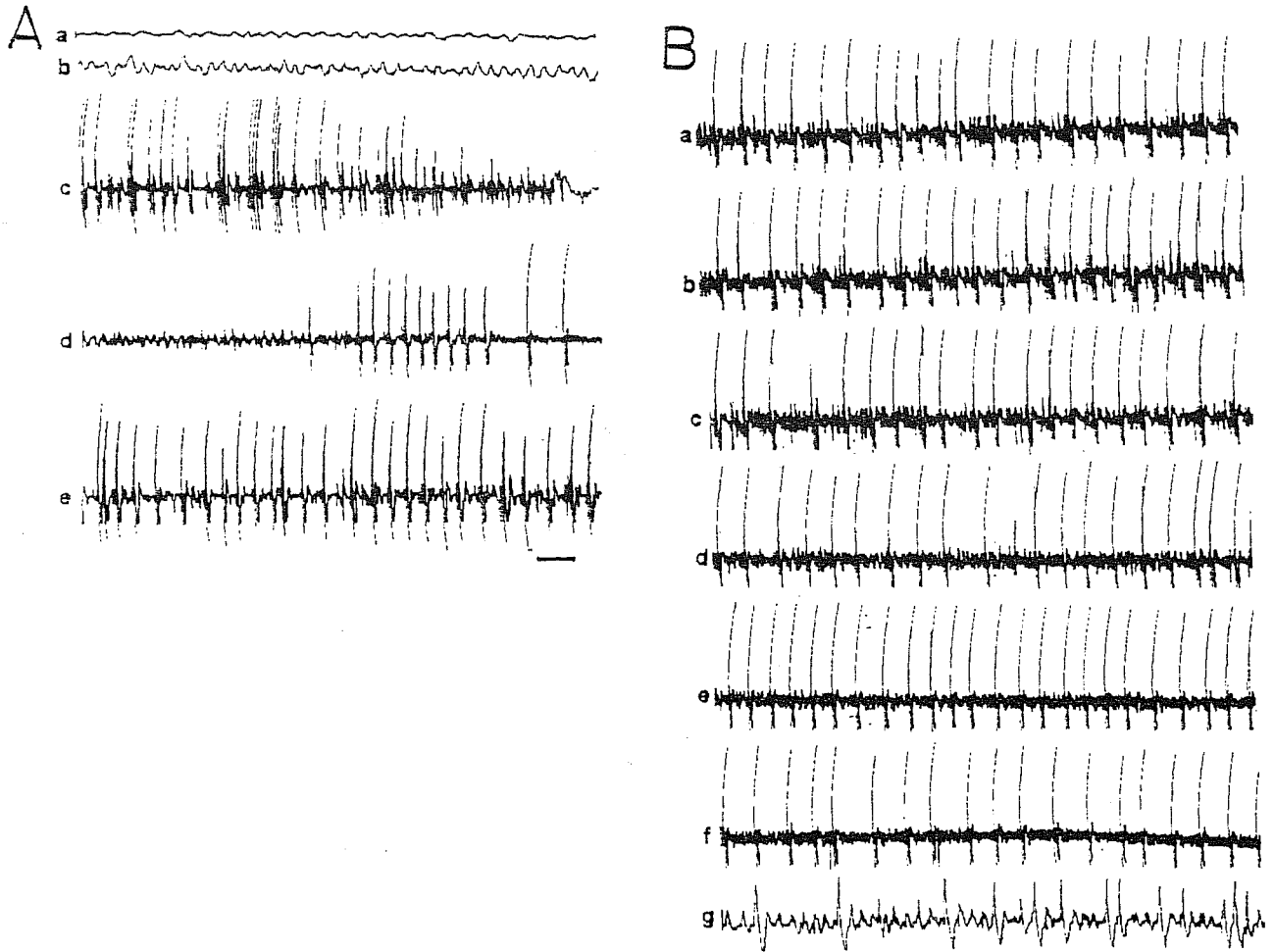
Yani, NO ve NOS inhibitörleri aynı modelde uygulanan doza<sup>(58)</sup> ve verildikleri yere<sup>(57)</sup> bağlı olmak üzere hem anti hem de prokonvulsan aktivite gösterebilirler.

### 3.2.4. Bikukullin Ve Penisilin Modeli

Güçlü NOS inhibitörü nitro-L-arjinin 4 gün süreyle sıçanlara verildiğinde bikukullinle oluşturulan epileptik nöbetin süresi iki katına çıkar, beyindeki NOS aktivitesi de %97'den fazla bir oranda baskılanır<sup>(59)</sup>.

NO'nun endojen bir konvulsan gibi davrandığını ve NOS inhibe edilince epileptik nöbet süresinin uzadığını gösteren başka çalışmalar da vardır<sup>(60)</sup>. Anestezili sıçanlarda bikukullinin beyin korteksine topikal olarak verilmesiyle oluşturulan fokal epilepsi modelinde NO hem vazodilatatör hem de antikonvulsif bir etki gösterir<sup>(61)</sup>.

Bir GABA antagonisti olan bikukullin ile penisilin arasında yapısal benzerlikler bulunmaktadır<sup>(62)</sup>. Bu nedenle, penisilin



**Şekil 4.A.** SNP'nin ECoG'ye etkisi. a, SNP'den 2 dakika sonra; b, SNP'den 8 dakika sonra; c, Penisilin deşarjlarının SNP tarafından baskılanması; d, SNP'den 4 dakika; e, 10 dakika sonra . B. Metilen mavisi ve hemoglobinin etkisi. a. penisilin+metilen mavisinin 5. dakikası; b, Metilen mavisinden 5 dakika sonra verilen SNP'nin etkisiz kalışı (birinci dakika); c, SNP'nin 3. dakikası; d, Penisilin + hemoglobin (5. dakika); e, Hemoglobinden 5 dakika sonra verilen SNP'nin etkisiz kalışı (ikinci dakika); f, SNP'nin 4. dakikası (etki yok); g, Hemoglobinin konvulsan etkisi (5. dakika); Bar: 200 µV; 4 saniye (63).

modeli epilepside yapılacak çalışmalardan benzer sonuçlar beklenebilir. Anestezili sıçanda korteks içine verilen 400-500 ünite kristalize penisilinle oluşturulan epileptiform aktiviteyi, bir NO verici olan SNP (5-20 nM, 5 µl) önemli ölçüde baskılar (Şekil 4). Guanilat siklaz (veya NO) inhibitörü olan metilen mavisi (20 nM, 5 µl) ve bir NO tutucu olan hemoglobin (5 µl) SNP'nin bu etkisini önler<sup>(63)</sup>. Epilepsinin penisilin modelinde yapılan bu ilk çalışma NO'nun endojen bir antikonvulsan olabileceğini düşündürmektedir.

### 3.2.5. Diğer Modellerden Elde Edilen Sonuçlar

Kedide kobalt verilerek oluşturulan epilepsi odağında alfa-guanidino glutarik asidin (GGA) miktarı artar. GGA, aslında endojen bir NOS inhibitörü ve epileptojendir. NO substratı L-arjinin, GGA verilerek oluşturulan epileptik nöbetlerin eşliğini yükseltmektedir<sup>(64)</sup>.

Sıçanda doğrudan doğruya beyin korteksine verilen elektrik uyaralarıyla oluşturulan epilepsi modelinde, NOS inhibitörlerinin prokonvulsan veya antikonvulsan etkilerinin doza bağlı bir özellik olduğu gösterildi<sup>(58)</sup>.

NO vericilerden olan SIN-1'in lokal tatabiki talamokortikal nöronlardaki yavaş osilasyonlar ile aksiyon potansiyellerini 7 dakika süreyle durdurur<sup>(56)</sup>. Talamokortikal sistemde asetilkolin ile birlikte bulunan NO bu sistemin aktivitesini ve uyku-uyanıklık ritmini düzenlemede de rol oynayabilir.

Nitrik oksitin sinaptik potansiyele olan etkisi presinaptik uyarının frekansına bağlıdır<sup>(58)</sup>. Düşük uyarın frekansında NO uzun süreli depresyona; yüksek frekanslı

uyarının varlığında ise potansiyasyona yol açar<sup>(65)</sup>.

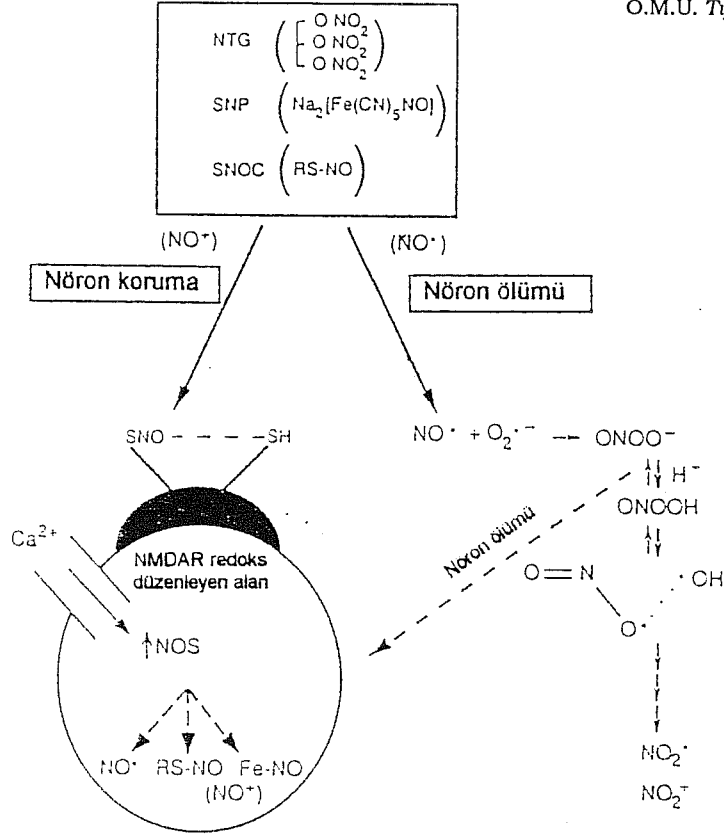
SNP kurbağada son plak potansiyelini ortalama %57 oranında küçültür<sup>(66)</sup> Bu etkiyi, postsinaptik duyarlığı azaltarak değil, nörotransmitter salgısını engelleme yoluyla gösteriyor olabilir. Son plak preparatı, SNP verilmeden önce hemoglobin solusyonuna daldırılır veya 24 saat önce hazırlanmış SNP kullanılırsa inhibitör etki görülmez<sup>(66)</sup>.

### 3.2.6. Antikonvulsif Etkinin Mekanizması

Nitrik oksidin antikonvulsif etkisinin mekanizmasına ışık tutan bir çok çalışma vardır<sup>(7,24,45,54,58,67,68,69)</sup>. NO, NMDA reseptörlerini bloklayarak inhibisyon oluşturabilir<sup>(70)</sup>. NO'nun sebep olduğu inhibisyon üç ayrı yoldan gerçekleşebilir:

1. NMDA reseptöründe kompetitif inhibisyon yaparak. Bilindiği gibi, NMDA reseptörünün aktiflenmesi NO üretimine yol açar. Fizyolojik şartlarda, üretilen NO NMDA reseptöründe negatif geri beslenmeli bir inhibisyona sebep olur<sup>(67,68)</sup>. NO vericilerden SIN-1, hem NMDA reseptör aktivitesini hem de hücre içinde kalsiyum seviyesinin artışı bloklayarak. Hemoglobin tarafından önlenen bu etki, SIN-1'in diğer yıkım ürünlerinden değil, NO'dan ileri gelmektedir<sup>(67)</sup>. Aynı şekilde, SNP'de NMDA reseptörlerini bloklamış ve etki kompetitif NMDA reseptör antagonistleri tarafından ortadan kaldırılmıştır.

2. NO antikonvulsif etkiyi NMDA reseptörlerinin redoks düzenleyici kısmıyla etkileşerek gösteriyor olabilir<sup>(24,69)</sup>. Nitrik oksidin etkisi redoks durumuna bağlıdır. Nitrik oksidin redükte formunun (NO<sup>•</sup>) süperoksit (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) ile reaksiyona girip peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) oluşturması hücre ölümüne



**Şekil 5.** Nitrik oksidin nöronlara olan etkisini açıklayan hipotetik mekanizma. NTG, nitroglicerini; SNP, sodyum nitroprussit; SNO, S-nitrozosistein; ONOO<sup>-</sup>, peroksinitrit; NO<sub>2</sub>, azot dioksit; RS - NO, S-nitrozoprotein; -SH, serbest tiol grubu; NMDAR, NMDA reseptör-kanal kompleksi; NOS, nitrik oksit sentaz; Fe-NO, demir nitrozil(24).

sebepler olurken, okside (NO<sup>+</sup>) formu NMDA reseptörünün redoks düzenleyici kısmındaki tiol gruplarıyla reaksiyona girerek inhibitör ve nöron koruyucu etki gösterir(24). Şekil 5'te bu mekanizma açıklanmaktadır.

**3. İn vitro** bulgular guanin nükleotidlerinin (cGMP) kompetitif bir mekanizma ile reseptördeki tanıma bölgesinden NMDA reseptörlerinde inhibisyona sebep olduğunu göstermektedir(68-69). Bu bilgiler NO'nun antikonvulsan etkisini açıklayabilir.

#### 4. ÇELİŞKİLİ SONUÇLARIN SEBEBİ

Nitrik oksit ile konvulsif fenomen

arasındaki ilişkiyi konu edinen araştırmaların sonuçları çelişkilidir. Bu çelişkinin kesin sebebi bilinmemektedir. NOS inhibitörlerinin periferden ve santralden verilmeleri halinde tamamen zıt etki gösterdikleri(57), uygulanan dozun da farklı etkiye neden olabileceği(58) daha önce belirtilmişti. Kültür ortamındaki hücrelere 5-10 nM NO verildiğinde spontan minyatür sinaptik akımın frekansı artar; halbuki NO dozu 40 nM veya daha yüksek değere çıkarıldığında spontan sinaptik akım tamamen kaybolur ve hücreler ölmeye başlar(71). Çelişkili sonuçların muhtemel sebeplerini şöyle sıralayabiliriz:

1. Epilepsi modelinin farklı olması
2. Çalışılan beyin bölgesinin farklı olması
3. NO sistemiyle ilgili maddelerin verilmiş yollarının farklı olması
4. Uygulanan dozların farklı olması
5. NO sistemini etkileyen diğer maddeler
6. Mikro çevreye bağlı olan farklı redoks durumu
7. Deney metodundaki diğer farklılıklar.

## 5. SONUÇ

Yakın zamana kadar inorganik toksik bir gaz, sigara dumanında bulunan bir element ve atmosferi kirletici bir molekül olarak bilinen nitrik oksidin, hücreler arası haberleşmede önemli rol oynayan endojen bir madde olduğu anlaşılmıştır. Beyindeki NO sistemi muhtemelen retrograd ve ortograd haberleşmede en hızlı ve en ekonomik yolu oluşturmaktadır. Endojen NO'nun varlığı ve etkileri anlaşılınca kadar, sinir hücreleri arasındaki kimyasal iletinin tek yönlü olduğu ve sadece sinapslardan gerçekleştiği bilinirdi. Halbuki, NO ve benzeri haberciler çok yönlü hareket edebilen, hücre membranlarından kolaylıkla ve hızlı bir şekilde geçen ve özelleşmiş sinaptik yapılara gerek duymayan moleküllerdir.

NOS enzimi merkez sinir sisteminin bir çok yerinde bulunur. Nöron ve ara öronlardan nöropeptit, asetilkolin, katekolamin ve GABA ihtiva edenler aynı zamanda NO'da üretirler. Bu yaygın dağılım, NO'nun bulunduğu yere göre çok farklı görevler yapabileceği anlamına gelir. Mevcut bulgulardan bir kısmı NO'nun edojen bir antikonvulsan; bir kısmı da konvulsan olduğunu göstermektedir. Nitrik oksidin etkisi, üretilen miktarına, NO'nun ve mikro çevrenin re-

doks durumuna göre değişebilir.

Epilepsi ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde, NO sistemini etkilemek üzere geliştirilecek iyi bir ilaç, redükte nitrik oksit üretimini önleyici, okside nitrik oksit üretimini ise artırıcı özellikte olmalıdır. En azından, bu maksatla geliştirilecek bir ilaç nitrik oksidi (NO<sup>·</sup>) molekülün NO<sup>+</sup> formuna dönüşürebilmelidir.

Özet olarak, nitrik oksit, karbonmonoksit ve benzeri haberci moleküller üzerine yapılacak ileri çalışmalar, çok sayıda canlılık olayını daha iyi açıklamamızı sağlayacak ve epilepsi dahil diğer bir çok hastalığın tedavisinde yeni ufuklar açacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan kaynaklardan bazıları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Fonu'ndan SB004 No'lu Projeye verilen destekle temin edilmiştir. Makalenin hazırlanmasında katkıları bulunan Arş. Gör. Mehmet BOŞNAK ile Sekreter Zeliha ÇİR'a teşekkür ederim.

**Geliş Tarihi:** 07.10.1996

**Yayına Kabul Tarihi:** 04.11.1996

## KAYNAKLAR

1. Furchgott R, Zawadzki D. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
2. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
3. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood

- KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical. *Circ Res* 1987; 61: 866-879.
4. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 385-388.
  5. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5159-5162.
  6. Culotta E, Koshland DE Jr. Molecule of the year. NO news is good news. *Science* 1992; 258: 1862-1865.
  7. Garthwaite, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991; 14: 60-67.
  8. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide, physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
  9. Bredt DS, and Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 1994; 63: 175-195.
  10. Vincent SR. Nitric oxide: A radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1994; 42: 129-160.
  11. Zhang J, and Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 213-233.
  12. Dawson TM, and Dawson VL. Nitric oxide synthase: Role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. *Ann Rev Med* 1996; 47: 219-227.
  13. Garthwaite J. Nitric oxide signalling in the nervous system. *Semin Neurosci* 1993; 5: 171-180.
  14. Bredt DS, Hwang PH, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, and Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase, *Nature* 1991; 351: 714-718.
  15. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P. and Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6348-6352
  16. Xie Q-W, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T. and Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256:228.
  17. Schuman EM, and Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Ann Rev Neurosci* 1994; 17: 153-183.
  18. Southam E, Morris R, Garthwaite J. Sources and targets of nitric oxide in rat cerebellum. *Neurosci Lett* 1992; 137: 241-244.
  19. Lancaster JR, Jr. Nitric oxide in cells. *Amer Sci* 1992; 80: 248-259.
  20. East SJ, Batchelor AM, Garthwaite J. Selective blockade of N-methyl-D-aspartate receptor function by the nitric oxide donor, nitroprusside. *Eur J Pharmacol* 1991; 209: 119-121.
  21. Garthwaite G, Garthwaite J. Cyclic GMP and cell death in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 1988; 26: 321-326.
  22. Guo N, McIntosh C, Shaw C. Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience*



- 1992; 51: 835-842.
23. Marczin N, Ryan US, Catravas ID, Methylene blue inhibits nitrovasodilator and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 170-179.
  24. Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Cho H-SV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, and Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364: 626-632.
  25. Mollace V, Bagetta G, Nistico G. Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuro Report* 1991; 269-272.
  26. De Sarro GB, Dipaola ED, De Sarro A, Vidal M.J. Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid induced seizures from the deep prepiriform cortex. *Fundam Clin Pharmacol* 1991; 5: 503-511.
  27. De Sarro G, Di Paola ED, De Sarro A, and Vidal MJ. L-arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep prepiriform cortex. *Eur J Pharmacol.* 1993; 230: 151-158.
  28. Mülsch A, Busse R, Mordvintcev PI, Vanin AF, Nielsen EO, Krüger JS and Olesen S P. Nitric oxide promotes seizure activity in kainat-treated rats. *Neuro Report* 1994; 5: 2325-2328.
  29. Penix LP, Dawis W, Subramaniam S. Inhibition of NO synthase increases the severity of kainic acid-induced seizures in rodents. *Epilepsy Res.* 1994; 18: 177-184.
  30. Itzhak Y. Blockade of sensitization to the toxic effects of cocaine in mice by nitric oxide synthase inhibitors. *Pharmacol Toxicol.* 1994; 74: 62-166.
  31. Itzhak Y. Modulation of the PCN/ NMDA receptor complex and sigma binding sites by psychostimulants. *Neurotoxicol Teratol* 1994; 16: 363-368.
  32. Przewlocka B, Lason W, Machelska H, Przewlocki R. The effects of cocaine induced seizures on the proenkephalin mRNA level in the mouse hippocampus: a possible involvement of the nitric oxide pathway. *Neuroci Lett* 1994; 168: 81-84.
  33. Heavner JE, Shi B, Pitkanen M. Effects of nitric oxide synthesis inhibition with or without nitric oxide inhalation on responses to systemic cocaine administration in rats. *Life Sciences* 1995; 57: 715-728.
  34. Al-Ghoul WM, Meeker RB, Greenwood RS. Kindling induces a long-lasting increase in brain nitric oxide synthase activity. *Neuro Report* 1995; 6: 457-460.
  35. Elmer E, Alm P, Kokaia Z, Kokaia M, Larsson B, Keep M, Andersson K-E and Lindvall O. Regulation of neuronal nitric oxide synthase mRNA levels in rat brain by seizure activity. *Neuro Report* 1996; 7: 1335-1339.
  36. Bagetta G, Iannone M, Scorsa A.M. and Nistico G. Tacrine-induced seizures and brain damage in LiCl-treated rats can be prevented by N<sup>ω</sup>-nitro L-arginine methyl ester. *Eur J Pharmacol.* 1992; 213: 301-304.
  37. Yamamota H.A hypothesis for cyanide-induced tonic seizures with supporting evidence. *Toxicology* 1995; 95: 19-26.
  38. Osonoe K, Mori N, Suzuki K, Osonoe M, Antiepileptic effects of inhibitors of

- nitric oxide synthase examined in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Brain Res.* 1994; 663: 338-340.
39. Bagetta G, Iannone M, Del Duca C, and Nistico G. Inhibition by N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester of the electrocortical arousal response in rats. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 858-860.
  40. Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 1993; 260: 1946-1950.
  41. Gross PM, Weaver DF, Bowers RJ, Nag S, Ho LT, Pang JJ, Espinosa FJ. Neurotoxicity in conscious rats following intraventricular SNAP, a nitric oxide donor. *Neuropharmacol* 1994; 33: 915-927.
  42. Semba J, Sakai M, Miyoski R, and Kito S. NG monomethyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, increases extracellular GABA in the striatum of the freely moving rat. *Neuro Report* 1995; 6: 1298-1300.
  43. Stringer JL, Erden F. In the hippocampus in vitro nitric oxide does not appear to function as an endogenous antiepileptic agent. *Exp Brain Res* 1995; 105: 391-401.
  44. Zhang J, Sam AD, Klitzman B, Piantadosi CA. Inhibition of nitric oxide synthase on brain oxygenation in anesthetized rats exposed to hyperbaric oxygen. *Undersea and Hyperb Med* 1995; 22: 377-382.
  45. Buisson A; Lakhmeche, N, Verrecchia C, Plotkine M, and Boulu, RG. Nitric oxide: an endogenous anticonvulsant substance. *Neuro Report* 1993; 4: 444-446.
  46. Przegaliniski E, Baran L, Siwanowicz J. The role of nitric oxide in the kainate-induced seizures in mice. *Neurosci Lett.* 1994; 170: 74-76.
  47. Rigaud-Monnet AS, Pinnard E, Borredon J, Seylaz J. Blockade of nitric oxide synthesis inhibits hippocampal hyperemia in kainic acid-induced seizures. *J Cerebral Blood Flow Metabol.* 1994; 14: 581-590.
  48. Rigaud-Monnet AS, Heron A, Seylaz J, Pinnard E. Effect of inhibiting NO synthesis on hippocampal extracellular glutamate concentration in seizures induced by kainic acid. *Brain Res.* 1995; 673: 297-303.
  49. Bagetta G, Iannone M, Palma E, Rodino P, Granato T, Nistico G. Lack of involvement of nitric oxide in the mechanisms of seizures and hippocampal damage produced by kainate and ouabain in rats. *Neurodegeneration.* 1995; 4: 43-49.
  50. Maggio R, Fumagalli F, Donati E, Barbier P, Racagni G, Corsini GV, Riva M. Inhibition of nitric oxide synthase dramatically potentiates seizures induced by kainic acid and pilocarpine in rats. *Brain Res.* 1995; 679: 184-187.
  51. Haberny KA, Pou S, and Eccles CU. Potentiation of quinolinate-induced hippocampal lesions by inhibition of NO synthesis. *Neurosci Lett.* 1992; 146: 187-190.
  52. Nakamura TA, Yamada K, Hasegawa T, Nabeshima T. Possible involvement of nitric oxide in quinolinic acid-induced convulsion in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 51: 309-312.
  53. Rondoin G, Lerner-Natoli M, Manzoni O, Lafon-Cazal M, Bockaert J. A nitric oxide (NO) synthase inhibitor accelerates amygdala kindling. *Neuro Report.* 1992; 3: 805-808.

54. Grooms SY and Jones LS. Hippocampal in vitro kindling is not blocked by nitric oxide synthase inhibitors. *Neuro Report* 1994; 5: 1102-1104.
55. Herberg LJ, Grottick A, Rose IC. Nitric oxide synthesis, epileptic seizures and kindling. *Psychopharmacol* 1995; 119: 115-123.
56. Pape HC, Mager R. Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron* 1992; 9: 441-448.
57. Przewlocka B, Lason W, van Luijteleaer G, Coenen T, Przewlocki R. The role of nitric oxide in genetic model of absence epilepsy in rats. *Neurosci Res Com* 1996; 18: 125-131.
58. Rundfeldt C, Koch R, Richter A., Mevisen M, Gerecke U, Loscher W. Dose-dependent anticonvulsant and proconvulsant effects of nitric oxide synthase inhibitors on seizure threshold in a cortical stimulation model in rats. *Eur J Pharmacol.* 1995; 274: 73-81.
59. Wang Q, Theard MA, Pelligrino DA, Baughman VL, Hoffman WE, Albrecht RF, Cwik M, Paulson OB, Lassen NA. Nitric oxide (NO) is an endogenous anticonvulsant but not a mediator of the increase in cerebral blood flow accompanying bicuculline-induced seizures in rats. *Brain Res* 1994; 658: 192-198.
60. Theard MA, Baughman VL, Wang Q, Pelligrino DA, Albrecht RF. The role of nitric oxide in modulating brain activity and blood flow during seizures. *Neuro Report.* 1995; 6: 921-924.
61. Pereira de Vasconcelos A, Baldwin RA, Wasterlain CG. Nitric oxide mediates the increase in local cerebral blood flow during focal seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3175-3179.
62. Marangoz C, Karatoy M. Penisilin epilepsisi odağında inhibitör sistemler üzerine deneysel bir çalışma, Atatürk Üniv. Fen Fak. Der. Özel Sayı 1982; 1: 112-122.
63. Marangoz C, Ayyıldız M, Açar E. Evidence that sodium nitroprusside possesses anticonvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuro Report.* 1994; 5: 2454-2456.
64. Yokoi I, Kabuto H, Habu H, Mori A. Alpha-guanidinoglutaric acid an endogenous convulsant, as a novel nitric oxide synthase inhibitör. *J Neurochem* 1994; 63: 1565-1567.
65. Zhuo M, Kandel ER, and Hawkins RD. Nitric oxide and cGMP can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimulation in the hippocampus. *Neuro Report.* 1994; 5: 1033-1036.
66. Lindgren CA and Laird MV. Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction *Neuro Report* 1994; 5: 2205-2208.
67. Manzoni O, Prezeau L, Marin P, Desagher S, Bockaert J, Fagni L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron.* 1992; 8: 653-662.
68. Manzoni O, Prezeau L, Desagher S, Sahuquent A, Sladeczek F, Bockaert J, Fagni L. Sodium nitroprusside blocks NMDA receptors via formation of ferrocyanide ions. *Neuro Report.* 1992; 3: 77-80
69. Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HSV, Hartman J, Sucher NJ, and Lipton SA. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.* 1992; 8: 1087-1099.
70. Hoyt KR, Tang L-H, Aizenman E, Rey-

nolds IJ. Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular  $Ca^{2+}$  in cultured rat forebrain neurons. Brain Res 1992; 592: 310-316.

71. O' Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER,

Arancio O. Tests on the roles of two diffusible substances in LTP: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 11285-11289.