

SIÇANLARDA PTZ-KAYNAKLI NÖBETLERDE ERİTROPOİETİNİN HİPOKAMPUS VE FRONTAL KORTEKTE NİTRİK OKSİT SENTAZ TÜRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN ON NITRIC OXIDE SYNTHASE TYPES IN THE HIPPOCAMPUS AND FRONTAL CORTEX IN PTZ-INDUCED SEIZURES IN RATS

Ayşegül KAPUCU¹ 

¹İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the author: A.K. 0000-0002-0946-1407

Cite this article as: Kapucu A. Effects of erythropoietin on nitric oxide synthase types in the hippocampus and frontal cortex in PTZ-induced seizures in rats. J Ist Faculty Med 2019;82(2):107-15. doi: 10.26650/IUITFD.416053

ÖZET

Amaç: Öğrenme-hafıza bozukluklarında ve epileptogenezde önemli bir medyatör olan nitrik oksit, hipokampus başta olmak üzere beyin birçok bölgesinde nöronal hücrelerde nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından oluşturulur. Eritropoietin (EPO)'nun nöroprotektif ve antiepileptik etkileri olduğu gösterilmiştir. EPO ön-uygulamasının, pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen jeneralize nöbet modelinde konvulsiyonlar ve hipokampus ve frontal kortekste NOS türleri üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: *Wistar albino* 40 erkek sıçan 4 gruba ayrıldı: kontrol, PTZ-tek doz 60 mg/kg; EPO-3000 IU/kg; EPO+PTZ grubu-PTZ uygulanmasından 24 saat önce EPO ön-uygulaması yapılan grup. PTZ uygulamasından sonra, nöbet şiddeti gözlemlendi ve skorlandı. Sıçanların plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS), indüklenbilir NOS (iNOS) düzeyleri ve hipokampusde NOS türlerinin anlatımları değerlendirildi.

Bulgular: EPO ön-uygulaması nöbet şiddetini azalttı. Tek başına EPO uygulaması nNOS düzeyini plazma ($p<0,001$), frontal korteks ($p<0,05$) ve hipokampus ($p<0,001$) örneklerinde azalttı. Hipokampus nNOS düzeyi ve anlatımı, EPO+PTZ grubunda, PTZ grubuna göre arttı ($p<0,001$). PTZ uygulamasıyla hipokampusde eNOS ($p<0,01$) ve iNOS ($p<0,05$) azalırken; EPO ön-uygulamasıyla kontrole yakın olduğu gözlemlendi.

Sonuç: EPO ön-uygulaması antikonvulsif etkilerini, eNOS ve nNOS düzeylerini artırarak gösterdi. EPO ön-uygulaması, eNOS aracılığıyla hipokampusde kan akımını artırarak, nöronların hiperexcitabilitesini azaltabilir. Ayrıca EPO, antioksidan görevi göerek eNOS ve nNOS'un azalmasını engelleyerek antikonvulsif etkilerine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Eritropoietin, nitrik oksit sentaz, hipokampus, nöbet

ABSTRACT

Objective: Nitric oxide, an important mediator in the dysfunctions of learning-memory and epileptogenesis, is formed by nitric oxide synthase (NOS) in neuronal cells in many areas of the brain, primarily the hippocampus. It has been shown that erythropoietin (EPO) has neuroprotective and antiepileptic effects. The aims of this study was to investigate the effects of EPO pre-treatment on convulsions and NOS species in the hippocampus and frontal cortex in pentylenetetrazole (PTZ)-induced generalized seizure model.

Material and Method: Forty adult male *Wistar albino* rats were divided into four groups: Control-saline; PTZ-single dose 60 mg/kg; EPO-3000 IU/kg; and EPO+PTZ- EPO pretreatment 24 hours before PTZ administration. After the administration of PTZ, the seizure severity (stage) was observed and scored. The levels of neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS) levels in the plasma, hippocampus and frontal cortex specimens of animals and expressions of NOS species in the hippocampus tissues were examined.

Results: EPO pretreatment decreased seizure stage ($p<0.01$). EPO administration alone reduced nNOS levels in plasma ($p<0.001$), frontal cortex ($p<0.05$), hippocampus ($p<0.001$). Hippocampus nNOS level and expression increased in the EPO+PTZ group compared to the PTZ group ($p<0.001$). eNOS ($p<0.01$) and iNOS ($p<0.05$) levels of hippocampus decreased in the PTZ group; EPO pretreatment before PTZ application improved nNOS level.

Conclusion: The EPO pre-treatment demonstrated anticonvulsive effects by increasing eNOS and nNOS levels. EPO pre-treatment can reduce the hyperexcitability of neurons by increasing blood flow in the hippocampus via eNOS. In addition, EPO may contribute to its anticonvulsive effects by inhibiting the decrease of eNOS and nNOS by acting as antioxidant.

Keywords: Erythropoietin, nitric oxide synthase, hippocampus, seizure

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: akapucu@istanbul.edu.tr

Geliş tarihi/Received Date: 17.04.2018 • Kabul tarihi/Accepted Date: 31.10.2018

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Epilepsi dünyada sık görülen dördüncü nörolojik bir hastalıktır ve beyindeki sinir hücrelerinin artmış uyarılabilirliğinden (nöronal hiperekstabilite) kaynaklanır (1). Epileptik nöbetlerin antiepileptik ilaçlarla engellenebileceği, yüzyıl kadar önce sodyum pentotalin bulunuşu ve kullanılmasıyla ortaya konmuştur (2). Pentilenterazol (PTZ) ve maksimal elektroşok deneysel nöbet modelleri, yaygın olarak antiepileptik ilaçların değerlendirilmesinde kullanılan deneysel modellerdir. PTZ, γ -aminobütirik asit-A (GABA-A) reseptör'ün antagonisti olarak davranır ve glutamerjik nöronal aktivitenin artmasıyla PTZ-indüklü konvülsif nöbetler gerçekleşir (3).

Öğrenme-hafıza bozuklukları ve epilepsi patogeneğinde önemli bir medyatör olan nitrik oksit (NO) hipokampus başta olmak üzere beyin birçok bölgesinde nöronal hücrelerde nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-argininin L-sitrüline dönüştürülmesi sırasında oluşur ve üç tip NOS vardır, endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) (4). nNOS ve eNOS, nöronlarda ve endotelial hücrelerde eksprese edilirken; iNOS reaktif astrositlerde eksprese edilir ve immün fonksiyona aracılık eder (5). eNOS'dan kökenli NO, beyindeki mikro sirkülasyonun korunması ve sürdürülmesinde rol oynamaktadır (6). Ayrıca nörotoksititeye karşı koruyucudur ve nöronal sağ kalım için önemlidir. nNOS'dan türetilen NO, nöronal plastisite, bellek oluşumu, merkezi sinir sistemi kan akışının düzenlenmesi, ağrı sinyalleri iletimi ve nörotransmitter salınımı ile ilişkili önemli bir nörotransmitter olarak görev yapar (7). Aşırı miktarda nöronal NO üretildiğinde fizyolojik bir nöromodülatörden nörotoksik bir faktöre dönüşebilir. Bu nedenle nNOS, geniş bir yelpazede hem fizyolojik ve hem de patolojik koşullarda önemlidir. iNOS, pro-inflamatuvar sitokinlere veya endotoksine yanıt olarak makrofajlar, glial hücreler ve tümör hücrelerinde eksprese edilir. Reaktif astrositlerde iNOS ekspresyonunun artması, glutamaterjik yolu uyarır ve hiperekstabiliteye neden olur (5). iNOS aracılı NO, status epileptikus (SE) sonrası dönemde, yani epileptojenез döneminde nöronları uyarmaya devam eder (8) ve bu faktörler, nöronları nöbet eşişğini daha da düşürmek için ısrarla duyarlı hale getirir (9).

Klinik ve deneysel çalışmalar, uzun süreli epileptik nöbetlerin çoğunlukla hipokampusta nöronal hasar oluşturarak bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya neden olduğunu göstermiştir (10). Öğrenme ve hafızadan sorumlu olan hipokampus, cornu ammonis (CA) ve dentat girus olmak üzere iki kısımdan oluşur. Hipokampusun CA bölgesi CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört zondan oluştuğu kabul edilir. CA1 ve CA2 zonları küçük piramidal hücrelerden, CA3 ve CA4 zonları geniş piramidal hücrelerden oluşur. Dentat girus bir kavite şeklindedir ve küçük granül hücrelerden oluşmaktadır. Deneysel oluşturulmuş status epileptikus

modellerinde CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar serebral iskemiye karşı daha hassas oldukları (11, 12), hipokampus CA1, CA3 piramidal nöronlar ve dentat hilus bölgesi granüler nöronlarda histolojik değişiklikler saptanmıştır (13). Ayrıca temporal lob epilepsisinde CA1'in en fazla etkilenen hipokampus alt bölgesi olduğu rapor edilmiştir (14). İlâveten hipokampus alt bölgeleri (DG, CA3, CA1) arasındaki intrahipokampal bağlantılar, epileptik durum oluşturabilen eksitator geri besleme halkaları içeren devrelere sahiptir. CA1 bölgesi nöronları spasyal (uzaysal) öğrenme ve bellek için gereklidir. CA1 bölgesi bir hata dedektörü gibi çalışır ve kortikal bilgiler ile CA3 ve entorniyal korteksten gelen bilgiler arasında uyumsuzluk olup olmadığını kontrol eder. CA1 ve CA3'deki hücre sayıları adölesan dönemden önce daha az iken bu dönemden sonra giderek artmaktadır (15). Epileptik nöbetler ve bilişsel bozukluk ilişkisi iyi bilinmektedir. Uzun süreli anıların oluşumu ve depolanmasındaki zorluklar nöbetlerde hipokampus dışında diğer beyin bölgelerinin de etkilendiğini düşündürmektedir (16, 17). Frontal korteks hipokampusda kodlanan bilgilerin uzun süreli hafızada depolanmasından sorumlu olduğu bilinen en önemli beyin bölgesidir (18). Dolayısıyla çalışmamızda PTZ ile indüklediğimiz nöbetlerin frontal kortekste NOS türlerinin ekspresyonuna eritropoietinin etkisini de araştırdık.

Eritropoietin (EPO) esasen eritropoezde rol oynar. EPO'nun geniş yelpazede nörodejeneratif hastalık modellerinde pleitropik etkileri ortaya konmuştur. EPO öntedavisinin serebral iskemi, travma modellerinde nöron koruyucu ve antiinflamatuvar etkileri, deneysel indüklenmiş epileptik nöbet modellerinde antiepileptik etkisi gösterilmiştir (19-21). EPO'nun vazodilatasyonla sonuçlanan nörovasküler yanıtında kan akışını artırma yoluyla NO üretimini artırarak nöroprotektif etkileri rapor edilmiştir (22). NO'nun, nöronal hücre kültürlerinde EPO reseptörü (EpoR) ekspresyonunu indükleyebildiği (23), vazodilatasyon yoluyla oksijen teminini artırabileceği ve dolayısıyla doku koruyucu etkileri sağlayabileceği ancak NO'nun aşırı üretilmesinin nörotoksik olduğunda bilinmektedir (24). Basal gangliyon hücre kültürlerinde, NO uygulamasının, glial hücrelerde EPO'nun hipoksi indükleyici faktör (HIF) aracılı transkripsiyonuna bağlı olarak aksonal dejenerasyona karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (25).

Bu çalışmada, PTZ ile indüklediğimiz tonik klonik nöbetlerden 24 saat önce EPO uygulamasının nöbet davranışı ile (proflaktik olarak) plazma, frontal korteks ve hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgelerinde NOS türlerinin düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney düzeneği ve gruplar

Bu çalışmada kırk adet ağırlıkları 300-350 g arasında değişen 3 aylık erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı ve sıçanlar standart laboratuvar koşullarında (12 saat aydınlık-12 saat

karanlık, $21 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığı, ad-libitum su ve besin) barındırıldı. Tüm deneyler ulusal sağlık enstitüleri tarafından kabul edilen deney hayvanları bakımı ve kullanımı ilgili kurallar çerçevesinde Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (Etik Kurul Onayı 2016/128 sayılı, 22.04.2016 tarihli olarak Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 'ndan alındı) gerçekleştirildi. Hayvanlar rastgele olarak : (i) tek başına serum fizyolojik (SF) uygulanan (kontrol, n=10); (ii) tek başına pentilentetrazol (PTZ, n=10) uygulanan (24 saat önce SF uygulandı), (iii) tek başına EPO uygulanan (SF uygulamasından 24 saat önce EPO, n=10) ve (iv) PTZ enjeksiyonundan 24 saat önce EPO uygulanan (EPO + PTZ, n=10) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır.

Uygulanan maddeler ve dozları

Rekombinant insan eritropoietini, (r-HuEPO, Eprex; EPOetin alfa, 3000 IU/ml, Santa Farma, Turkey) intraperitoneal (i.p) 3000 IU/kg olacak şekilde SF içerisinde seyreltilerek kullanıldı. Bu doz daha önce kullanılmış olup herhangi bir yan etkisi görülmemesi (17) sebebiyle tercih edilmiştir. EPO veya SF uygulamalarından 24 saat sonra sıçanlara SF içinde çözündürülen 60 mg/kg i.p. PTZ (Sigma) uygulanmıştır. Kontrol ve EPO kontrol gruplarındaki sıçanlara serum fizyolojik uygulandı.

Epileptik nöbetler geçirildikten 48 saat sonra (kısa ve uzun süreli hafıza testi yapılmıştır, ancak sonuçları burada değerlendirilmemiştir) biyokimyasal analizler için 6 hayvandan kardiyak kan alındı, dekapite edilen hayvanların hipokampus ve korteksleri ayrılarak sıvı azotla donduruldu ve -80°C saklandı. Alınan kanlar 3000 xg'de santrifüjlenerek çalışılmak üzere saklandı. İmmunohistokimyasal çalışmalar için ise perfüzyon yöntemi uygulandı.

PTZ indüklü nöbet şiddetlerinin değerlendirilmesi

Nöbet şiddeti; PTZ verildikten sonra iki saat süre ile sıçanlar gözlenerek nöbetler Racine skalasına göre skorlandı (26). 0 nöbet yok; 1 jeneralize myoklonikjerk (bir kasın geçici olarak kasılıp sarsılması); 2 doğrulma kaybının eşlik etmediği jeneralize klonik nöbet; 3 doğrulma kaybının eşlik ettiği jeneralize klonik nöbet; 4 ön ekstremitte tonusu ile doğrulma kaybı; 5 arka ekstremitte tonusu ile doğrulma refleksinin kaybı olarak kabul edilerek nöbet şiddeti belirlendi.

Hipokampus ve frontal korteks dokularında ve plazma örneklerinde biyokimyasal belirteçlerin çalışılması

Dondurularak saklanan hipokampus ve frontal korteks dokuları 137 mM NaCl, 10 mM fosfat ve 2,7 mM KCl içeren ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda (PBS) homojenize edildikten sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de 10000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Plazma ve doku (hipokampus ve korteks) örneklerinde nNOS (SunLong, SL1253Ra, China), iNOS (SunLong, SL1250Ra, China), eNOS (SunLong, SL1251Ra, China) belirteçleri çalışıldı.

İmmunohistokimyasal metod

Deney sırasında 4 sıçanın perfüzyon yöntemiyle kısmen fikse edilen beyinleri, sağ ve sol hemisferler olarak ayrıldı. %10 nötral formalinde fikse edildi. Dokular daha sonra parafin bloklar haline getirilerek 5 μm kalınlığında alınan kesitler immunohistokimyasal çalışmalar için kullanıldı.

Lamlara alınan kesitler deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemlerinden sonra saf suda yıkandı. Lamlar mikrodalga fırında sitrat tamponu (pH:6,0) içerisinde 600 Watt'ta 10 dakika kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Sitrat tamponunun ardından saf suda yıkanan kesitler 10-15 dakika boyunca PBS (pH:7,2)'de bekletildi. Tüm kesitler, endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için, oda sıcaklığında ve nemli ortamda %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck, 1,08597) içinde 10 dakika tutulduktan sonra PBS'e alındı. Daha sonra, kesitlere oda sıcaklığında 10 dakika Ultra V blok (Thermo Scientific, TA-125-UB) uygulandı. Kesitler nNOS (1:150 dilüsyonunda, Invitrogen 617000) ve eNOS (1:100 dilüsyonunda Labvision RB9279) antikoları $+4^\circ\text{C}$ 'de bir gece (18 saat), iNOS antikoru (1:100 dilüsyonunda, Lab Vision RB1605) ile oda ısısında 1 saat tutuldu. Tüm antikolar, UltrAb Diluent (Lab Vision, TA-125-UD)'de sulandırıldı. Lamlar, PBS' de 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra, 30 dakika oda sıcaklığında, keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikoru (Thermo Scientific, TP-125-BN) ile inkübe edildi. Kesitler PBS' de yıkandıktan sonra, peroksidaz ile işaretili streptavidin (Thermo Scientific, TS-125-HR)'de oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için, maksimum 10 dakika AEC (3-amino-9-etilkarbazol) (Thermo Scientific, TA-004-HAC) ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkandı. 45 saniye boyunca Mayer hematoksilende (Lab Vision, TA-125-MH) tutularak zıt boyama yapılan kesitler, 5 dakika musluk suyunda yıkandıktan sonra gliserol jelatin (Lab Vision, TA-125-UG) ile kapatıldı. Leica ışık mikroskobu ile incelenerek hipokampusun CA3, CA1 ve DG alanlarındaki eNOS, iNOS ve nNOS pozitif reaksiyonlu hücrelerin dağılımı H-skor ile değerlendirildi. [H-skor=S Pi (i + 1), "i" reaksiyon şiddeti ve "P" reaksiyon gösteren hücre yüzdesi] (21). DG, CA3 ve CA1 bölgelelerinin H-skorları birlikte değerlendirilerek ortak bir H-skor değeri elde edildi ve gruplar karşılaştırıldı.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm veriler Instat istatistik yazılımı (Instat Graphpad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Normal dağılım için grupların uyumluluğunun test edilmesinin ardından, doku homojeniteleri ve plazma örnekleri, tek yönlü varyans analizi uygulanarak Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirildi. Nöbet şiddeti ise student-t testi (Mann Whitney post test) ile değerlendirildi. Değerler \pm standart sapma olarak ifade edildi. $P < 0,05$ değeri tüm analizlerde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

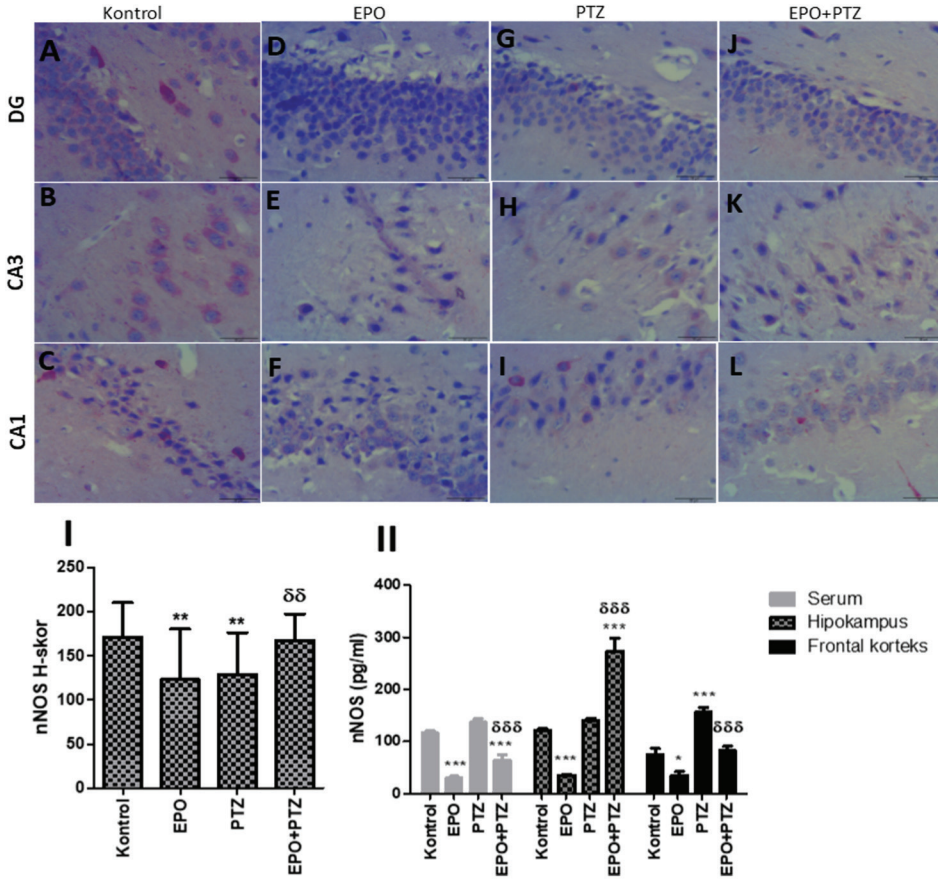
EPO ön-uygulamasının nöbet şiddeti üzerine etkileri

PTZ uygulanması sonucunda nöbet şiddeti $4,8 \pm 0,4$ olarak skorlanırken, EPO ön-uygulamasıyla nöbet şiddetlerinin $3,4 \pm 0,5$ olduğu ve EPO ön uygulamasının nöbet şiddetini anlamlı olarak azalttığı ($p < 0,01$) tespit edildi. Son PTZ uygulamasından sonra olacak şekilde hafıza testi (kısa ve uzun süreli hafıza) yapılmıştır ancak sonuçlar verilmemiştir.

EPO ön-uygulamasının plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde nNOS düzeyi ve hipokampusteki ekspresyonu üzerine etkisi

Plazma nNOS düzeyleri kontrol grubunda $116,8 \pm 9,5$; EPO grubunda $29,9 \pm 9$; PTZ grubunda $133,9 \pm 16,6$; EPO+PTZ grubunda $64,1 \pm 25$ pg/ml'dir. Kontrol grubuna göre EPO

grubu nNOS düzeyinin anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,001$) görülürken, PTZ grubunda ise anlamlı bir değişiklik görülmedi. EPO+PTZ grubunun plazma nNOS düzeyi PTZ grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı ($p < 0,001$). Hipokampus nNOS düzeyleri değerlendirildiğinde ise, EPO uygulanan grupta ($35,6 \pm 1,8$) kontrol grubuna ($121,3 \pm 7,4$) göre anlamlı olarak azalış ($p < 0,001$) görülürken; PTZ uygulanan grupta ($140,9 \pm 9,5$) ise kontrole göre farklılık tespit edilmedi. EPO+PTZ grubu nNOS düzeyi ($273,6 \pm 59$) ise PTZ grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p < 0,001$) (Şekil 1). Frontal korteks nNOS düzeyleri kontrol grubuna ($74,6 \pm 30,1$) göre; EPO uygulanan grupta ($35,1 \pm 18,5$) azaldığı ($p < 0,05$); PTZ uygulanan grupta ($156,3 \pm 22$) ise anlamlı olarak arttığı ($p < 0,001$) görüldü. Frontal korteks nNOS düzeyi EPO+PTZ grubunda ($82,8 \pm 20,2$) ise, PTZ grubuna göre azaldı ($p < 0,001$) (Şekil 1).



Şekil 1: Hipokampusde nNOS anlatımı ile plazma, hipokampus ve frontal korteks doku örneklerinde nNOS düzeyleri. A: Kontrol grubu DG, B: Kontrol grubu CA3, C: Kontrol grubu CA1, D: EPO grubu DG, E: EPO grubu CA3, F: EPO grubu CA1, G: PTZ grubu DG, H: PTZ grubu CA3, I: PTZ grubu CA1, J: EPO+PTZ grubu DG, K: EPO+PTZ grubu CA3 ve L: EPO+PTZ grubu CA1 bölgelerinde nNOS anlatımı gösterilmektedir. I: Hipokampusteki nNOS anlatımının H-skor olarak gösterilmesi (n=4). II: Plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde nNOS düzeyleri (n=6).*, kontrol grubuna; δ, PTZ grubuna göre karşılaştırmayı ifade etmektedir. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; δδ $p < 0,01$; δδδ $p < 0,001$. Veriler ortalama±standart sapma olarak değerlendirilmiştir.

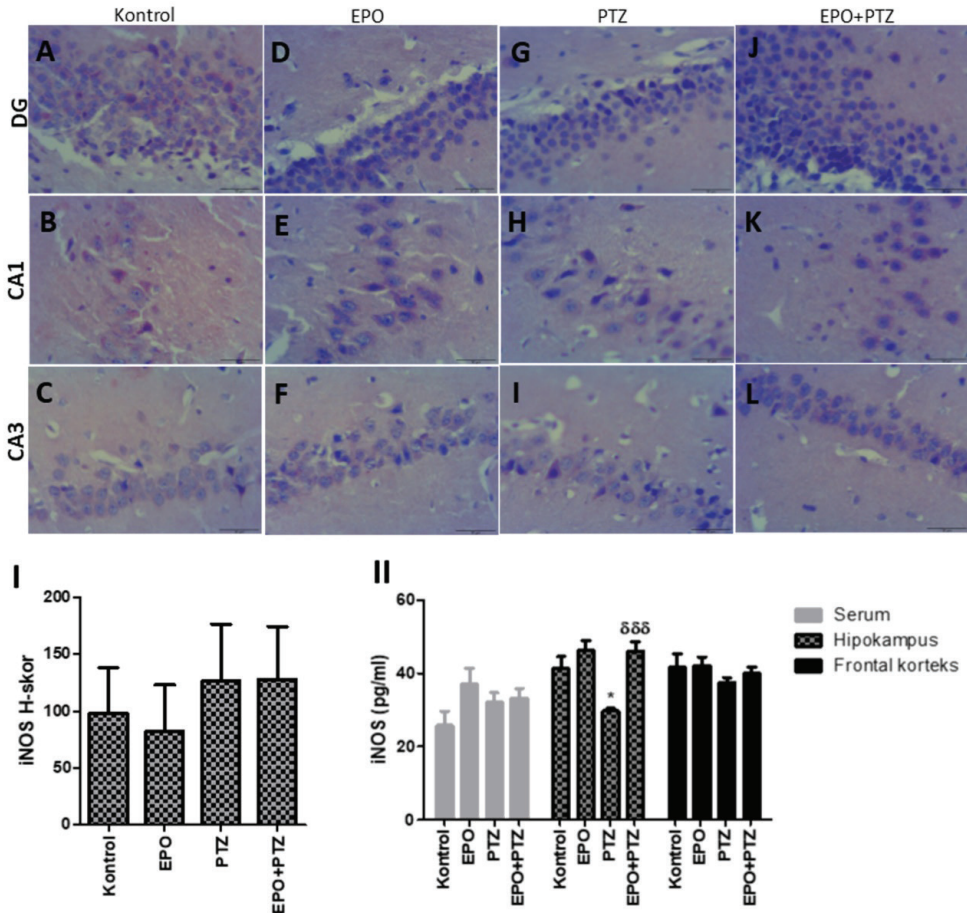
Hipokampusun CA3, CA1 ve DG alanlarında immuno-histokimyasal olarak nNOS pozitif reaksiyonunun şiddeti incelendiğinde EPO grubunda ve PTZ grubunda nNOS reaksiyonunun kontrol grubuna göre azaldığı ($p<0,01$) gözlemlendi. EPO ön-uygulamasından 24 saat sonra PTZ verilen gruptan nNOS anlatımının, PTZ grubuna göre anlamlı olarak bir artışı görüldü ($p<0,01$) (Şekil 1).

EPO ön-uygulamasının plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde iNOS düzeyi ve hipokampusteki ekspresyonu üzerine etkisi

Plazma iNOS düzeyleri kontrol grubunda $25,9\pm9,5$; EPO grubunda $37,0\pm10,7$; PTZ grubunda $32,1\pm6,4$ ve EPO+PTZ grubunda $33,2\pm6,7$ pg/ml'dir ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Hipokampus iNOS düzeyinde, EPO uygulanan grup ($46,3\pm6,3$) ile kontrol grubu

($41,4\pm8,0$) arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken; PTZ uygulanan grupta ($29,8\pm1,5$) iNOS düzeyinin kontrol grubuna göre ($p<0,05$) azaldığı görüldü. EPO+PTZ grubu iNOS düzeyi ($46,1\pm6,2$), PTZ grubuna göre arttı ($p<0,001$) (Şekil 2). Frontal korteks iNOS düzeyleri ise kontrol grubunda $41,8\pm8,6$; EPO grubunda $42,2\pm5,6$; PTZ grubunda $37,6\pm3,0$ ve EPO+PTZ grubunda $40,0\pm4,3$ pg/ml'dir ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

İmmunohistokimyasal olarak hipokampusun CA3, CA1 ve DG alanları incelendiğinde EPO grubundave PTZ grubunda iNOS pozitif reaksiyonu, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermedi. EPO ön-uygulamasından 24 saat sonra PTZ verilen grup ile PTZ grubu arasında da belirgin farklılık gözlemlenmedi (Şekil 2).

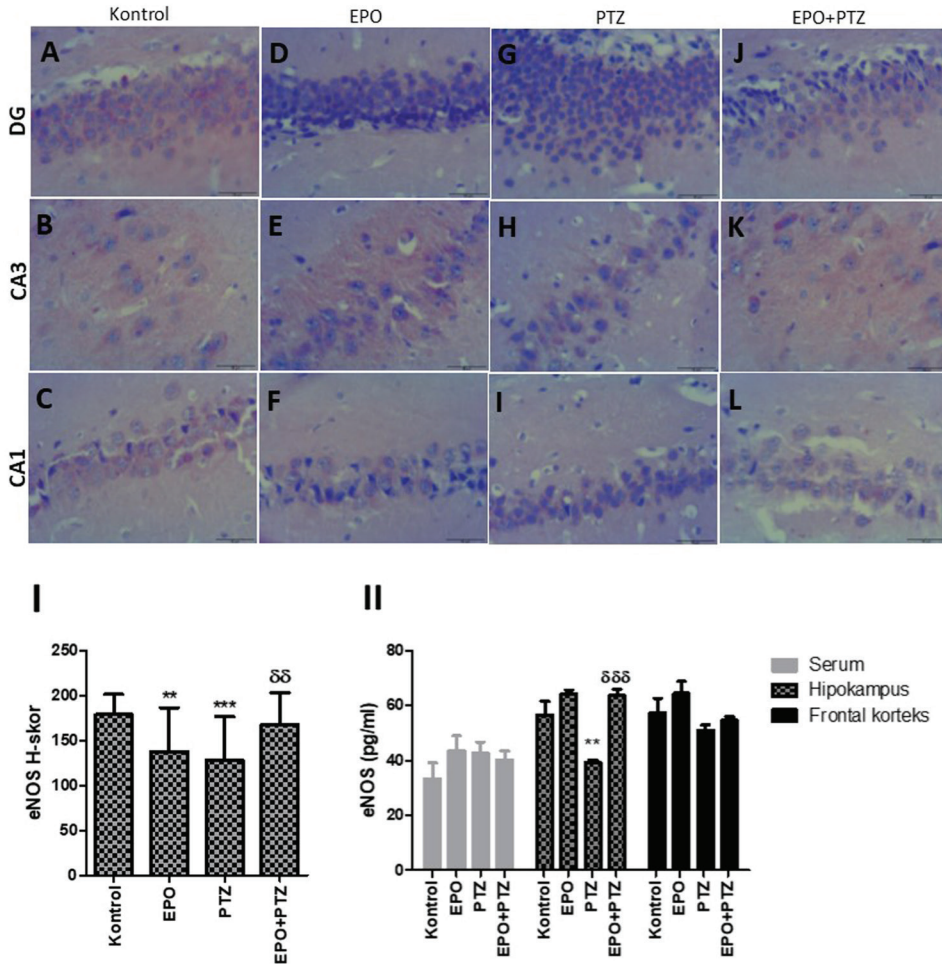


Şekil 2: Hipokampusde iNOS anlatımı ile plazma, hipokampus ve frontal korteks doku örneklerinde iNOS düzeyleri. A: Kontrol grubu DG, B: Kontrol grubu CA3, C: Kontrol grubu CA1, D: EPO grubu DG, E: EPO grubu CA3, F: EPO grubu CA1, G: PTZ grubu DG, H: PTZ grubu CA3, I: PTZ grubu CA1, J: EPO+PTZ grubu DG, K: EPO+PTZ grubu CA3 ve L: EPO+PTZ grubu CA1 bölgelerinde iNOS anlatımları gösterilmektedir. I: Hipokampusteki iNOS anlatımının H-skoru olarak gösterilmesi (n=4). II: Plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde iNOS düzeyleri (n=6). *, kontrol grubuna; δ, PTZ grubuna göre karşılaştırmayı ifade etmektedir. * $p<0,05$; ** $p<0,001$; ^{δδδ} $p<0,001$. Veriler ortalama±standart sapma olarak değerlendirilmiştir.

EPO ön-uygulamasının plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde eNOS düzeyi ve hipokampusteki ekspresyonu üzerine etkisi

Plazma eNOS düzeyleri kontrol grubunda $33,3 \pm 14,2$; EPO grubunda $43,5 \pm 13,3$; PTZ grubunda $42,7 \pm 9,5$; EPO+PTZ grubunda $40,1 \pm 8,1$ pg/ml'dir ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Hipokampus eNOS düzeyleri kontrol grubunda $56,8 \pm 12$; PTZ uygulanan grupta $39,2 \pm 2,2$; EPO grubuna $64,1 \pm 3,6$ ve EPO+PTZ grubunda $63,7 \pm 5,3$ pg/ml'dir. PTZ grubu hipokampal eNOS düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken ($p < 0,01$); EPO grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmedi. EPO+PTZ grubunda ise PTZ grubuna göre eNOS düzeyinin arttığı ($p < 0,001$) ve kontrol ile EPO gruplarına yaklaştığı görüldü (Şekil 3). Frontal korteks eNOS düzeyleri ise kontrol grubunda $57,3 \pm 13$; EPO grubunda $64,4 \pm 10,7$; PTZ grubunda $51,0 \pm 4,5$ ve EPO+PTZ grubunda $54,5 \pm 3,3$ pg/ml'dir ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur (Şekil 3).

İmmünohistokimyasal olarak hipokampusun CA3, CA1 ve DG alanlarındaki eNOS pozitif reaksiyonu EPO grubunda ($p < 0,01$) ve PTZ grubunda ($p < 0,001$) kontrol grubuna göre azaldı. EPO ön-uygulamasından 24 saat sonra PTZ verilen grupta eNOS anlatımının PTZ grubuna göre ($p < 0,01$) anlamlı olarak arttığı görüldü (Şekil 3).



Şekil 3: Hipokampusteki eNOS anlatımı ile plazma, hipokampus ve frontal korteks doku örneklerinde eNOS düzeyleri. A: Kontrol grubu DG, B: Kontrol grubu CA3, C: Kontrol grubu CA1, D: EPO grubu DG, E: EPO grubu CA3, F: EPO grubu CA1, G: PTZ grubu DG, H: PTZ grubu CA3, I: PTZ grubu CA1, J: EPO+PTZ grubu DG, K: EPO+PTZ grubu CA3 ve L: EPO+PTZ grubu CA1 bölgelerinde eNOS anlatımları gösterilmektedir. I: Hipokampusteki eNOS anlatımının H-skoru olarak gösterilmesi (n=4). II: Plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde eNOS düzeyleri (n=6). *kontrol grubuna; δ , PTZ grubuna göre karşılaştırmayı ifade etmektedir. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; δ δ $p < 0,01$; $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Eritropoietin, antikonvulsan etkileriyle beraber, üç NOS izoformu üzerinden hipokampus veya frontal korteksde farklı etkiler göstermektedir. PTZ uygulamasından 24 saat önce EPO uygulanması, hipokampusda ağırlıklı olarak nNOS olmak üzere kısmen eNOS ve iNOS üzerinden hipokampus ve frontal korteksde etkileri olmaktadır.

Deneyssel olarak indüklenen nöbetlerde, EPO ön-tedavisinin serebral iskemi, travma modellerinde nöron koruyucu ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir (20, 21). Bizim de çalışmamızda EPO ön-uygulanmasıyla nöbet şiddetlerinin azaldığını gösterdik ve literatürle uyumludur. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu L-argininden NO üreten enzimleri tetikler (27). EPO'nun nöroprotektif etkisinde NO'nun sorumluluğu, genellikle NO'nun vazodilatatör etkisi yani kan akımını artırması ile açıklanmaktadır (22). NO'nun, nöronal hücre kültürlerinde EpoR ekspresyonunu indükleyebildiği (23), vazodilatasyon yoluyla oksijen teminini artırdığı ve dolayısıyla doku koruyucu etkileri sağlayabileceği ancak NO'nun aşırı üretilmesinin nörotoksik olduğu da bilinmektedir (24). Bazal gangliyon hücre kültürlerinde, NO uygulamasının, glial hücrelerde EPO'nun HIF aracılıklı transkripsiyonuna bağlı olarak aksonal dejenerasyona karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (25).

Farelerde, normal koşullarda NO içeriği serebral korteksin temporal bölgesinde (amigdala dahil); hipokampus, serebellum ve serebral korteksin diğer bölgelerinden daha fazla olduğu bildirilmiştir (28). PTZ indüklü konvulsif nöbetlerden sonra tüm beyin bölgelerinde NO miktarının %50'den fazla arttığı gösterilmiştir (3). nNOS (-/-) olan farelerde, PTZ ile nöbet oluşması daha yüksektir (29). PTZ, dozuna da bağlı olarak beyin farklı bölgelerinde farklı hücrelerde farklı etkiler gösterir. NO, NOS bağımlı hücreye özgü sinyal kompleksleri aracılığıyla bu etkilerini seğileyebilir (30). NO'nun prokonvulsan etkisini rapor eden çalışmalar (31, 32), yanında antikonvulsan etkisini gösteren çalışmalarda mevcuttur (29). PTZ ile indüklenen kindling nöbetlerde NO'nun elektriksel deşarjları azaltarak antikonvulsan etkisi gösterilmiştir (32). nNOS tarafından NO üretimi, hipoksi süresince veya sonrasında artar (33). Bizim çalışmamızda da PTZ ile oluşturulan tonik klonik nöbetler sonrasında frontal korteksde nNOS düzeyi artış göstermiştir. Ancak PTZ grubunda, serum düzeyinin aksine hipokampus alt bölgelerinde nNOS ekspresyonunun düşmesinin bir nedeni epileptik nöbetlerin indüklediği oksidatif stres olabilir. NMDA reseptörü içeren nöronların yüksek oranda nNOS içerdikleri rapor edilmiştir (34). Epileptik nöbetlere özellikle hipokampal nöronların hassasiyeti ve nöbetlerin oluşumunda hipokampal nöronlardaki aşırı elektriksel aktivitenin sorumluluğu bilinmektedir. Dolayısıyla frontal korteksten farklı olarak hipokampusda NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, hücre içine aşırı kalsiyum girişi reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna ne-

den olur. Bu oksidatif ürünlerin hipokampusda nNOS ile reaksiyona girip oksidatif peroksit ürünlerinin oluşumuna (35) böylece hipokampusda nNOS'da azalmaya neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca deneyin hafıza testinden sonra sonlandırılması, iyileşme süreçlerinin devreye girmiş olmasını da etkin kılmış olabilir. İlginç olarak tek başına EPO uygulamasından sonra hem plazma, hipokampus ve frontal korteksdeki düzeyleri ve hem de hipokampusdaki nNOS anlatımının (kontrol grubuna kıyasla) çok belirgin olarak düşmüş olması, tek başına EPO uygulamasının nNOS üzerine baskılayıcı olabileceğini düşündürmektedir. Bu düşüncemiz Kılıc ve ark. (2005) tarafından yapılan murin beyinde rhEPO'sunun transgenik ekspresyonu, striatal nöronlarda nNOS ekspresyonunu baskıladığını bildiren çalışmayla da örtüşmektedir (36).

NO'in, kortikal nöronlarda eksitotoksositeye karşı koruyucu fakat hipokampusdaki nöronlarda uyarılabilirliğe karşı hücre tiplerine özgü etki gösterdiği düşünülmektedir (30). Glial (Shwann) hücre kültüründe, NO-indüklü aksonal korumanın hipoksi indükleyici faktör (HIF)-1 aracılı olarak EPO transkripsiyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (25). Çalışmamızda da EPO uygulamasından sonra PTZ verilen hayvanların hipokampuslarında nNOS ekspresyonunun kontrol seviyesinde korunması, EPO'nun antioksidan etkisine bağlı olduğunu düşündürmektedir. EPO hipokampusda oksidatif stresi azaltarak mevcut nNOS ekspresyonunun korunmasını sağlayabilir. Nitekim EPO ön tedavisinin, PTZ indüklü epileptik nöbetlerin hipokampusda indüklediği lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (21).

PTZ verilerek akut nöbet oluştuktan 1 saat sonra izole edilen sıçan hipokampuslarında iNOS düzeyi artarken eNOS düzeyinin azaldığı bildirilmektedir (21). Buna karşın 60 mg/kg PTZ ile indüklenen akut nöbetlerde hipokampusda iNOS ekspresyonunun değişmediğini rapor eden çalışma da mevcuttur (37). Bizim çalışmamızda PTZ verilen grupta hipokampus eNOS düzeyi literatürle uyumlu şekilde düşmüştü, ancak ilginç olarak iNOS düzeyleri de düşüktü. Bu durum literatürle çelişmektedir. Bunun nedeni nöbetlerden sonra örneklerin alınma süreleri arasındaki farklılık olabilir. Ayrıca nöbetlerin neden olduğu oksidatif stres tüm NOS türleri ile üretilmiş NO ile birleşerek reaktif nitrojen ürünleri oluşturabilir, bu nedenle diğer NOS türlerinde olduğu gibi iNOS da düşük bulunmuş olabilir. Nitekim reaktif oksijen ürünlerinin iNOS ile reaksiyonu yüksek oranda gerçekleşmektedir. EPO'nun, inflamatuvar uyarılara maruz kalmış oligodendrositlerdeki proinflamatuvar medyatör olan iNOS ekspresyonunu hafiflettiği, buna karşın EPO'nun orta düzeyde eNOS'u aktive edebileceği bildirilmektedir (37). Bahçekapılı ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada EPO ön uygulaması ile hipokampusda eNOS düzeyinin arttığı, iNOS seviyesinin de azaldığı rapor edilmiştir (21). Çalışmamızda PTZ uygulamasından önce EPO ön-uygulanması ile hipokampusde-

ki iNOS ve eNOS düzeyleri ve anlatımları kontrol grubu değerlerine yaklaştı. eNOS ve iNOS normal değerlere yaklaşıırken, nNOS düzeyinin yaklaşık 2 kat kadar hipokampusde belirgin olarak artmış olması, EPO ön-uygulamasının tonik klonik nöbetlerde hipokampusde nNOS'u artırarak koruyucu özelliklerini sergileyebileceğini düşündürmektedir. Bu düşünce de, nNOS'un beynin farklı bölgelerinde ve farklı durumlarda prokonvulsan veya antikonvulsan davranış sergilediği şeklinde yorumlanabilir. Bazı çalışmalarda nNOS'un antikonvulsan özelliklerinin de ortaya konmasıyla epilepsi tedavilerinde NO aracılı tedavi yöntemlerini ve olasılıklarını geliştirme gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, EPO ön uygulaması yapılan kontrol grubu hayvanların serum, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde nNOS düzeyinin düşük olması ilginç bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu bulgu bize EPO'nun ağırlıklı olarak nNOS'u da etkileyebileceğini gösterir.

Çalışmamızda hipokampusdeki NOS türleri anlatımlarının zaman zaman biyokimyasal ölçümlerden farklı olması, biyokimyasal incelemeler için total hipokampus dokusu kullanılması ve anlatımlarının incelemesi hipokampusdeki belli zonlardaki hücrelerin sayımı ile ince bir kesit üzerinde yapılmış olmasından kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, EPO ön-uygulamasının nöbet şiddetini azalttığı ve PTZ indüklü nöbetlerden 48 saat sonra deneyin sonlandırılmasıyla EPO uygulaması, hipokampus alt bölgelerinde eNOS ve daha belirgin olarak nNOS düzeyini artırmıştır. EPO'nun antiepileptik etkisini NOS'lar bağlamında değerlendirecek olursak; EPO ön tedavisi; 1) eNOS aracılığıyla nöbete hassas bölge olan hipokampusda kan akımını artırarak nöbetlerin neden olduğu iskemiyi engellenmesi ve dolayısıyla kanlanmanın azalmasına bağlı nöronlardaki hipereksitabilitenin engellenmesi ile, 2) muhtemelen antioksidan etki ile nöbetlerin neden olduğu oksidatif etkiyi azaltıp antioksidan etki ile hem eNOS hem de nNOS'un azalmasını engellemiştir. Böylelikle EPO ön tedavisi eNOS ve nNOS aracılığı ile antikonvulzif etki gösterebilir. Bu preliminere ancak özgün bulgularımız EPO'nun antiepileptik ve antiamezik etkisinde NO'nun sorumluluğunun spesifik NO inhibitörleri ile daha ileri araştırılması gerekliliğini düşündürdü.

Teşekkür: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 21796). Ayrıca Prof. Dr. Kadriye Akgün Dar ve Prof. Dr. Gülay Üzümlü'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Etik Komite Onayı: Etik komite onayı bu çalışma için, yerel etik komiteden alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Gerekli değil.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- A.K., K.A.D., G.Ü.; Veri Toplama- A.K.; Veri Analizi/Yorumlama- A.K.; Yazı Taslağı- A.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- A.K.; Son Onay ve Sorumluluk- A.K.; Malzeme ve Teknik Destek- A.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu araştırmanın finansal desteği, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi tarafından sağlanmıştır.

Acknowledgments: This work was supported by Scientific Research Project Coordination Unit of Istanbul University. Project number: 21796. Also, I would like to thank Prof. Dr. Kadriye Akgün Dar and Prof. Dr. Gülay Üzümlü for their supports.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the local ethics committee.

Informed Consent: Not required.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- A.K., K.A.D., G.Ü.; Data Acquisition- A.K.; Data Analysis/Interpretation- A.K.; Drafting Manuscript- A.K.; Critical Revision of Manuscript- A.K.; Final Approval and Accountability- A.K.; Technical or Material Support- A.K.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Financial and/or material support for this research has been provided from an institution named Scientific Research Project Coordination Unit of Istanbul University.

KAYNAKLAR

1. Palabıyık M. Kronik levetirasetam uygulanan normal ve temporal lob epilepsi modeli oluşturulmuş sıçanlarda aromataz ekspresyonu değişiklikleri. 2015 Ankara Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
2. Shorvon SD. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959–2009. *Epilepsia* 2009;50(s3):93-130. [CrossRef]
3. Watanabe M, Miyai A, Danjo S, Nakamura Y, Itoh K. The threshold of pentylene-tetrazole-induced convulsive seizures, but not that of nonconvulsive seizures, is controlled by the nitric oxide levels in murine brains. *Exp Neurol* 2013;247:645-52. [CrossRef]
4. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric oxide* 2010; 23(3):153-65. [CrossRef]
5. Samland H, Huitron-Resendiz S, Masliah E, Criado J, Henriksen SJ, Campbell IL. Profound increase in sensitivity to glutamatergic-but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. *J Neurosci Res* 2003;73(2):176-87. [CrossRef]
6. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev* 2009;61(1):62-97. [CrossRef]

7. Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev* 2003;55(2);271-324. [\[CrossRef\]](#)
8. Kim SY, Buckwalter M, Soreq H, Vezzani A, Kaufer D. Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. *Epilepsia* 2012;53(6);37-44. [\[CrossRef\]](#)
9. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Inflammation and epilepsy. *Handb Clin Neurol*. 2012;107;163-75. [\[CrossRef\]](#)
10. Vezzani A, Auvin S, Ravizza T, Aronica E. Glia-neuronal interactions in ictogenesis and epileptogenesis: role of inflammatory mediators. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. [\[CrossRef\]](#)
11. İzci Y, Erbaş YC. Hippocampus: Its Structure and Functions, *Türk Nöroşir Derg*, 2015;25:3;287-95.
12. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto SI, Hatano O, Kawahara N, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110(4);429-41. [\[CrossRef\]](#)
13. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978;271(5646);676. [\[CrossRef\]](#)
14. Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, Eilers A, Kivi A, Schulze K et al. Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia* 2000;41(6);S190-4. [\[CrossRef\]](#)
15. Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, Kurachi M. Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cereb Cortex* 2004;15(2);187-93. [\[CrossRef\]](#)
16. Stretton J, Thompson PJ. Frontal lobe function in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2012;98(1);1-13. [\[CrossRef\]](#)
17. Cave CB, Squire LR. Intact verbal and nonverbal short-term memory following damage to the human hippocampus. *Hippocampus* 1992;2(2);151-63. [\[CrossRef\]](#)
18. Chapados C, Petrides M. Ventrolateral and dorsomedial frontal cortex lesions impair mnemonic context retrieval. *Proc Biol Sci* 2015;282(1801);20142555.
19. Erbaş O, Çınar BP, Solmaz V, Çavuşoğlu T, Ateş U. The neuroprotective effect of erythropoietin on experimental Parkinson model in rats. *Neuropeptides* 2015;49;1-5. [\[CrossRef\]](#)
20. Gu L, Xu H, Wang F, Xu G, Sinha D, Wang J, Lu L. Erythropoietin exerts a neuroprotective function against glutamate neurotoxicity in experimental diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(12);8208-22. [\[CrossRef\]](#)
21. Bahçekapılı N, Akgün-Dar K, Albeniz I, Kapucu A., Kandil A., Yağız O, Üzüm G. Erythropoietin pretreatment suppresses seizures and prevents the increase in inflammatory mediators during pentylenetetrazole-induced generalized seizures. *Int J Neurosci* 2014;124(10);762-70. [\[CrossRef\]](#)
22. Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Gure A. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett* 2001;298(2);139-41. [\[CrossRef\]](#)
23. Chen ZY, Wang L, Asavaritkrai P, Noguchi CT. Up-regulation of erythropoietin receptor by nitric oxide mediates hypoxia preconditioning. *J Neurosci Res* 2010;88(14);3180-8. [\[CrossRef\]](#)
24. Tian J, Kim SF, Hester L, Snyder SH. S-nitrosylation/activation of COX-2 mediates NMDA neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105(30);10537-40. [\[CrossRef\]](#)
25. Keswani SC, Bosch-Marcé M, Reed N, Fischer A, Semenza GL, Höke A. Nitric oxide prevents axonal degeneration by inducing HIF-1-dependent expression of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(12);4986-90. [\[CrossRef\]](#)
26. Homayoun H, Khavandgar S, Dehpour AR. Anticonvulsant effects of cyclosporin A on pentylenetetrazol-induced seizure and kindling: modulation by nitric oxide system. *Brain Res* 2002;939:1-10. [\[CrossRef\]](#)
27. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(6);a005710. [\[CrossRef\]](#)
28. Itoh K, Watanabe M. Paradoxical facilitation of pentylenetetrazole-induced convulsion susceptibility in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* 2009;159;735-43. [\[CrossRef\]](#)
29. Gotti S, Sica M, Viglietti-Panzica C, Panzica G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc Res Tech* 2005;68(1);13-35. [\[CrossRef\]](#)
30. Sandoval R, Gonzalez A, Caviades A, Pancetti F, Smalla KH, Kaehne T, Michea L, Gundelfinger ED, Wyneken U. Homeostatic NMDA receptor down-regulation via brain derived neurotrophic factor and nitric oxide-dependent signalling in cortical but not in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2011;118;760-72. [\[CrossRef\]](#)
31. Chuang YC, Chen SD, Lin TK, Liou CW, Chang WN, Chan SH, Chang AY. Upregulation of nitric oxide synthase II contributes to apoptotic cell death in the hippocampal CA3 subfield via a cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following induction of experimental temporal lobe status epilepticus in the rat. *Neuropharmacology* 2007;52;1263-73. [\[CrossRef\]](#)
32. Kovacs R, Rabanus A, Otahal J, Patzak A, Kardos J, Albus K, Heinemann U, Kann O. Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices. *J Neurosci* 2009;29;8565-77. [\[CrossRef\]](#)
33. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment—from bench to bedside. *Exp Neurol* 2015;263;235-43. [\[CrossRef\]](#)
34. Standaert DG. NMDA receptors and nitric oxide synthase. *Nature* 1999;4;13-14.
35. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB life* 2001;52(3-5);189-95. [\[CrossRef\]](#)
36. Kilic U, Kilic E, Soliz J, Bassetti CI, Gassmann M, Hermann DM. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/2. *FASEB J* 2005;19(2);249-51. [\[CrossRef\]](#)
37. Abdallah DM. Genetics- Anticonvulsant potential of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone in pentylenetetrazole-induced acute seizures and kindling in mice. In: Acton QA, editor. *Epilepsy: New Insights for the Healthcare Professional*. Atlanta; 2011. p.72.
38. Nguyen AQ, Cherry BH, Scott GF, Ryou MG, Mallet RT. Erythropoietin: powerful protection of ischemic and post-ischemic brain. *Exp Biol Med* 2014;239(11);1461-75. [\[CrossRef\]](#)