

Folik Asitin Etosüksimid Üzerine Etkisinin Farelerde Pentilentetrazol ile Oluşturulan Akut Nöbet Modelinde İncelenmesi

Investigation of the Effect of Folic Acid on Ethosuximide in Pentylenetetrazole-Induced Acute Seizures in Mice

Arzuhan ÇETİNDAG ÇILTAŞ¹  Bilal ŞAHİN² 

ÖZ

Amaç: Epilepsi, günümüzde en sık görülen nörolojik hastalıklardan biridir. Çeşitli tedavilere rağmen hala tam olarak nöbet kontrolü sağlanamamaktadır. Yapılan çalışmalar folik asit (FA) ve türevlerinin nöbetler üzerine olumlu etkiler ortaya koymuştur. Bu çalışmanın amacı, farelerde pentilentetrazol ile oluşturulan nöbet-lerde folik asitin etosüksimid üzerine etkisinin yanında beyin dokularında kaspaz-3 ve TOS aktivitesini araştırmaktır.

Araçlar ve Yöntem: Çalışmada BALB/c türü 30 fare rastgele 5 gruba ayrıldı: Kontrol, pentilentetrazol (PTZ); PTZ ile nöbet indüklenen grup, FA; 7 gün boyunca 3 mg/kg verilen ve PTZ uygulanan grup, etosüksimid; 7 gün boyunca 50 mg/kg verilen ve PTZ uygulanan grup, FA+ etosüksimid; 7 gün boyunca 3 mg/kg FA ve 50 mg/kg etosüksimid verilen ve PTZ uygulanan grup. PTZ uygulamasından 24 saat sonra tüm farelerin beyin dokuları çıkarıldı, korteks ve hipokampus ayrıldı.

Bulgular: Folik asit, etosüksimid ve FA+ etosüksimid grupları PTZ grubuna göre nöbet evresini anlamlı olarak azalttı, benzer şekilde first miyoklonik jerk sürelerini uzattı ancak jeneralize tonik-klonik nöbete giriş zamanını FA ve FA+ etosüksimid gruplarının azalttığı bulundu ($p<0.05$). Bununla birlikte FA ve FA+ etosüksimid grupları, hipokampal TOS seviyesini azalttı. ($p<0.05$). Benzer şekilde, hipokampal kaspaz-3 seviyesi FA uygulanan grupta daha düşük bulundu ($p<0.05$).

Sonuç: FA antioksidatif ve antiapoptotik özellikleriyle epilepsi tedavisi için faydalı bir terapötik ajan olabilir. Folik asit, etosüksimid ile sinerjik etkisi nöronal hasara karşı koruyucu etkisini güçlendirebilir.

Anahtar Kelimeler: etosüksimid; folik asit; pentilentetrazol (PTZ)

ABSTRACT

Purpose: Epilepsy is one of the most prevalent neurological diseases today. Despite various treatments, there is still no complete seizure control. Studies have shown the positive effects of folic acid (FA) and its derivatives on seizures. The objective of this study is to investigate Caspase-3 and TOS activity in brain tissues as well as the effect of folic acid on ethosuximide (ETX) in mice with pentylenetetrazol-induced seizures.

Materials and Methods: In this study, 30 mice of BALB/c species were divided randomly into 5 groups: Control; pentylenetetrazol (PTZ); PTZ-induced seizure group; FA in which 3 mg/kg FA and PTZ were administered for 7 days; ETX in which 50 mg/kg ETX and PTZ were administered for 7 days; FA+ ETX in which 3 mg/kg FA and 50 mg/kg ETX and PTZ were administered for 7 days. The brain tissues of all mice were dissected, then the cortex and hippocampus were separated 24 hours after PTZ application.

Results: FA, ETX and FA+ETX groups significantly decreased the seizure stage compared to the PTZ group, and similarly prolonged the first myoclonic jerk times, but the FA and FA+ETX groups were found to decrease the onset of generalized tonic-clonic seizures ($p<0.05$). However, the FA and FA+ETX groups decreased the hippocampal TOS levels. ($p<0.05$). Similarly, hippocampal caspase-3 levels were lower in the FA group ($p<0.05$).

Conclusion: FA can be a useful therapeutic agent for the treatment of epilepsy with its antioxidant and antiapoptotic properties. The synergistic effect of FA with ETX can promote its protective effect against neuronal damage.

Keywords: ethosuximide; folic acid; pentylenetetrazole (PTZ)

Gönderilme tarihi: 25.11.2020; Kabul edilme tarihi: 16.01.2022

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sivas, Türkiye.

² Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye.

Sorumlu Yazar: Dr. Öğr. Üyesi Arzuhan Çetindağ Çiltaş, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sivas, Türkiye. e-posta: acetindag@cumhuriyet.edu.tr

Makaleye atıf için: Çetindağ Çiltaş A, Şahin B, Folik asitin etosüksimid üzerine etkisinin farelerde pentilentetrazol ile oluşturulan akut nöbet modelinde incelenmesi. Ahi Evran Med J. 2022;6(2):154-161. DOI:10.46332/aemj.831240

GİRİŞ

Epilepsi, ani başlayan epileptik nöbetlerle karakterize yaygın nörolojik bozukluklardan biridir.¹ Nöbet, nörobiyolojik açıdan beynin işlevlerinin bozulmasına sebep olan ani, aşırı, anormal ve hipersenkronize elektriksel aktiviteden kaynaklanmaktadır. Bu anormal kortikal aktivite, oluştuğu ve yayıldığı beyin bölgesine özgü semptomlar ve klinik belirtiler oluşturmaktadır.² Merkezi sinir sistemini etkileyen çok sayıda faktör epilepsinin ortaya çıkmasına neden olabilir. Spesifik nedenler değişse de, glutamatın iyonotropik ve metabotropik reseptörler, nöbet aktivitesinde önemli bir yer tutmaktadır.^{3,4} Bu nedenle epilepsi mekanizmalarının araştırılması, epilepsi tedavisi için umut verici niteliktedir.

Deneysel epilepsi modelleri epileptik nöbette rol oynayan temel mekanizmaların anlaşılması ve aydınlatılması için geliştirilmiştir. GABA_A reseptörünün seçici antagonisti olan pentilentetrazol (PTZ), nöbet oluşturmak için kullanılan kimyasal bir ajandır. PTZ, kalsiyum ve potasyum kanallarını etkiler, hücre içi kalsiyum iyonu rezervlerini serbest bırakır ve nörotransmitter kaynaklı klorür iletkenliğini azalmasına neden olur.⁵ Pentilentetrazol ile oluşturulan nöbet modelleri antiepileptik ilaç geliştirme çalışmaları için sıklıkla kullanılmaktadır. Oksidatif stres, hücrel metabolizma sonucu oluşan artmış reaktif oksijen türleri ile karakterize ve antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması sonucu oksidatif dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Lipid bileşimi ve güçlü metabolik ihtiyaçlar nedeniyle beyin, oksidatif strese karşı en savunmasız organlardan biridir.⁶ Ek olarak, yapılan deneysel çalışmalarda, oksidatif stresin epileptik nöbetlerde ve epileptogenezin ilerlemesinde etkin olabileceği gösterilmiştir.^{7,8} Ayrıca, PTZ ile indüklenen nöbetler ile oksidatif stres arasında doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmiştir.⁹

Folik asit (FA) memelilerde fizyolojik bir öneme sahip olmakla birlikte norepinefrin, dopamin ve serotonin sentezi gibi birçok önemli metabolik süreçte yer almaktadır.¹⁰ Doğal olarak oluşan folatlar genellikle 5, 6, 7 ve 8 pozisyonlarında hidrojen ile tetrahidrofolata veya 7 ve 8 pozisyonlarında hidrojen ile dihidrofolata indirgenir ve N-5 veya N-10 pozisyonlarında veya her ikisinde bir tek karbonlu birime (metil, metilen, metenil, formil veya formimino) sahiptirler. Folat, merkezi sinir sisteminde tek metil grubu

donörü olduğundan, DNA sentezi ve nöroplastisite gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir.¹¹ Giderek artan sayıda kemirgen ve insan çalışması, folat eksikliği ile majör depresyon, şizofreni, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları dâhil nörodejeneratif hastalıklar arasındaki korelasyonu göstermiştir.¹² Bu vitamin takviyesi, felç ve çeşitli nörodejeneratif bozuklukların klinik özelliklerini önemli ölçüde azaltabilir.¹³ Araştırmalar folik asit ve aktif metabolitlerin antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik, antidepresan ve nöroprotektif etkileri olduğunu göstermiştir.¹⁴⁻¹⁵

Epilepsi tedavisinde geleneksel ve güncel ilaçlar kullanılmasına rağmen bu ilaçlar nöbet kontrolü sağlamada yetersiz kalmaktadır. Alternatif olarak antioksidan özelliği bilinen folik asit, epileptik nöbetler üzerine olumlu etkisi olabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışmada amacımız, farelerde pentilentetrazol ile oluşturulan akut nöbet modelinde folik asitin'in antikonsülsan etkinliğe sahip olan etosüksimid üzerine ve beyin (hipokampus ve kortekste) dokularında kaspas-3 ve TOS seviyelerine etkisini araştırmaktır.

ARAÇLAR ve YÖNTEM

Deney Hayvanları

Araştırma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yürütüldü. Çalışmada strese maruz kalmamış ve standarda uygun kafeslerde bakılan 30 adet 4-5 aylık 30-40 gr BALB/c albino fare kullanıldı. Fareler 22±1 C° oda sıcaklığında 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusunun sağlandığı, sestem yalıtılmış odada ve %55±6 oranda nemli ortamda tutuldu ve uygun oranda beslenmeleri sağlandı. Deney uygulaması 09:00-16:00 saatleri arasında gerçekleşti ve deney ortamının ışık ile ses düzeyi sürekli kontrol altında tutuldu. Deneysel süreçler Sivas Cumhuriyet Üniversitenin Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Komitesi (lisans numarası 19.10.2020 tarih ve 2020/349 sayı) tarafından onaylandı.

PTZ -Akut Epilepsi Protokolü

PTZ akut nöbet modeli oluşturmak için farelere önceki çalışmalardan referans alınarak 60 mg/kg'lık (10 ml/kg) tek doz PTZ uygulaması yapıldı.¹⁶ PTZ enjeksiyonundan

sonra, fareler pleksiglas kafeslere (40 cm X 40 cm X 30 cm) yerleştirildi ve davranışları 30 dakika videoya alındı. Nöbet şiddeti Racine skalası (RS) (0-6) kullanılarak şu şekilde değerlendirildi: 0. Hiç nöbet yanıtı yok, 1. Hareketsizlik, göz kapanması, kulak oynatılması, bıyık oynatılması, koklama hareketi, 2. Daha ağır fasiyal klonusa baş sallanması eklenmesi, 3. Ön ekstremitelerden birinin klonusu, miyoklonik jerk şahlanma yok, 4. Bilateral ön ekstremitelerde klonusu, şahlanma var, 5. Şahlanma ve jeneralize klonik nöbetten dolayı bir taraf üzerine düşme, 6.Ölüm.¹⁷

Deney Kimyasalları

Pentilentetrazol, etosüksimid ve folik asit Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, ABD'den satın alındı. Etosüksimid ve folik asit dozları literatürde yer alan önceki çalışmalara göre belirlenmiştir.¹⁸⁻²⁰ PTZ ve etosüksimid serum fizyolojik içinde, folik asit phosphate buffered saline (PBS)'de çözülerek tabloda belirtilen dozlara uygun olarak hazırlandı. Çözeltiler deney günlerinde taze hazırlandı.

Deney grupları ve Prosedür

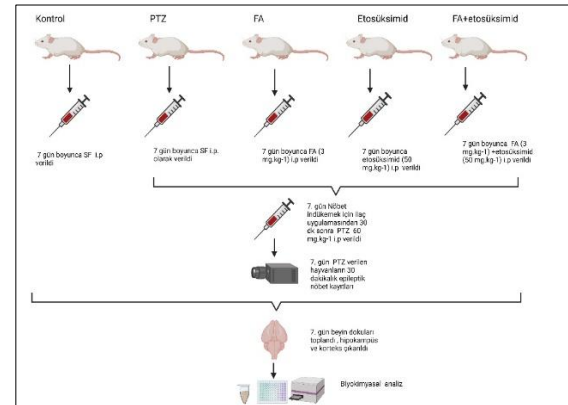
Çalışmada hayvanlar, her grupta 6 fare olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı:

1. Kontrol; 7 gün boyunca serum fizyolojik uygulanan grup,
2. PTZ; 7. gün PTZ (60 mg/kg) uygulanan grup,
3. FA; 7 gün boyunca 3 mg/kg (10 mg/kg) FA uygulanan grup,
4. Etosüksimid; 7 gün boyunca 50 mg/kg etosüksimid (10 mg/kg) uygulanan grup.
5. FA+ etosüksimid; 7 gün boyunca 3 mg/kg +50 mg/kg FA+ etosüksimid uygulanan grup.

FA, etosüksimid, FA+ etosüksimid grubundaki farelere 7 gün boyunca yukarıda belirtilen dozlarda FA ve etosüksimid verildikten sonra, 7. gün PTZ uygulanarak nöbet oluşturuldu. PTZ grubundaki farelere ise 7. gün PTZ uygulanarak nöbet indüklendi. PTZ ile epileptik nöbet oluşturulan farelerin nöbet davranışları kaydedildi.

Nöbet indüklemek için, farelere 60 mg/kg tek doz PTZ i.p. olarak enjekte edildi. Her enjeksiyondan sonra, fareler 30 dakika boyunca izleneceği ayrı bir pleksiglas kafese konularak nöbetlerin varlığını ve şiddetini değerlendirmek için Racine Skalası (RS), epileptik deşarjlar şeklinde eş zamanlı olarak ortaya çıkan kısa, bilinçsiz miyoklonik sarsılmaları belirlemek için first miyoklonik jerk (FMJ) (dk) ve kas katılaşması (tonik faz), kasların kasılıp gevşemesine bağlı olarak da ekstremitelerin sarsıntısı ve ritmik titremenin (klonik faz) görüldüğü jeneralize tonik-klonik (JTK) nöbete giriş zamanı (sn) değerleri kaydedildi.

Tüm hayvanlar 7. günün sonunda dekapite edilerek, aseptik cerrahi koşullarda hipokampusları ve korteksleri çıkarıldı ve ileri biyokimyasal analizler için uygun koşullarda saklandı. Deneysel prosedür Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Çalışmanın deneysel tasarımı (BioRender tarafından oluşturulmuştur). Serum fizyolojik (SF), pentilentetrazol (PTZ), folik asit (FA), etosüksimid, intraperitoneal (i.p.)

Beyin Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Hayvanların beyin dokusu örnekleri (beynin hem korteks hem de hipokampus alanı) soğuk Phosphate-Buffered Saline (PBS) çözeltisi (pH 7.4) içinde homojenize edildi ve 12000 g'de 10 dakika boyunca 4 C°de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar TOS ve kaspaz-3 düzeylerinin ölçülmesinde kullanıldı. Örneklerdeki toplam protein seviyelerini belirlemek için Bradford protein tahlil kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı.²¹

Kaspaz-3 Ölçümü

Beyin süpernatantlarından kaspaz-3 düzeylerinin belirlenmesinde ELISA ticari kiti (YL Biont, Shanghai, Çin) kullanıldı. İşlem protokolleri, üreticinin talimatlarına göre yapıldı. Kısaca, standart ve doku örnekleri plakaya eklenmiş

ve 37 C°'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Yıkama aşamasından sonra, boyama çözeltileri ilave edildi ve 15 dakika 37 C°'de inkübe edildi. Durdurma çözeltisi ilave edildi ve ELISA okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, İngiltere) tarafından 450 nm'de okundu. Bu kitlerin tümü için hesaplamalar için standart eğriler kullanıldı. Plakaların içindeki ve arasındaki varyasyon katsayıları %10'dan azdı.

Total Oksidan Seviye (TOS) Düzeylerinin Ölçümü

TOS düzeylerinin belirlenmesinde Erel tarafından geliştirilen deney kiti (Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye) kullanıldı.²² Ortamda yeterli miktarda oksitleyici mevcut olduğunda demir iyonları demir iyonlarına oksitlendiğinden, yöntem, ksilenol portakal kullanımıyla demir iyonlarının doku seviyelerini ölçerek TOS seviyelerinin ölçülmesine izin verir. Analizin kalibrasyonu için hidrojen peroksit kullanıldı. Testin sonuçları, miligram doku proteini başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğerleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq} / \text{mg protein}$) olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

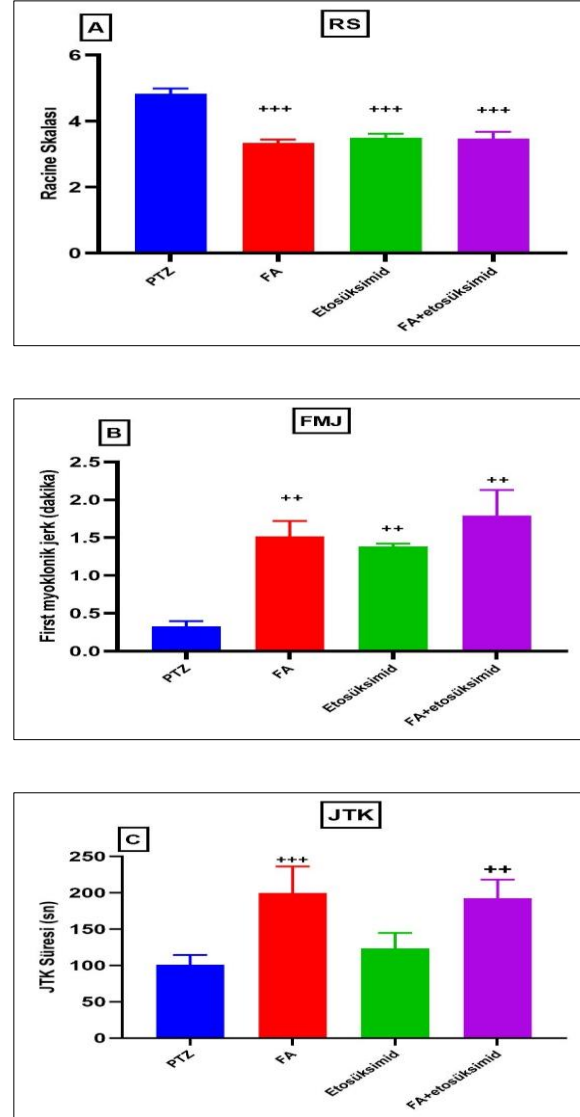
Tüm deneysel sonuçlar Ort. \pm SH (ortalamanın standart hatası) olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz için SPSS istatistik programı (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) kullanıldı. Veriler normal dağılıma uygunluk gösterdiğinden dolayı verilerin gruplar arası karşılaştırılması için varyans analizi (One way ANOVA), gruplar arası farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Tukey HSD (post-hoc test) ile tespit edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde tanımlandı.

BULGULAR

Davranışsal Bulgular

Bu çalışmada, davranışsal parametreler, farelere PTZ enjeksiyonundan sonra alınan video kayıtları analiz edilerek belirlendi. Şekil 2A'da gösterildiği gibi, FA, etosüksimid ve FA+ etosüksimid gruplarında RC skalası PTZ grubuna göre daha düşük bulundu ($p < 0.001$). Ayrıca Şekil 2B'de FMJ zamanı FA, etosüksimid ve FA+ etosüksimid tedavisi alan hayvanlarda PTZ grubuna kıyasla yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.01$). Şekil 2C'de ise jeneralize tonik-klonik (JTK) nöbete giriş zamanı PTZ grubuna kıyasla FA ve

FA+ etosüksimid gruplarında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.01$). Jeneralize tonik-klonik (JTK) nöbete giriş zamanı FA grubu ile karşılaştırıldığında etosüksimid ve FA+ etosüksimid grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

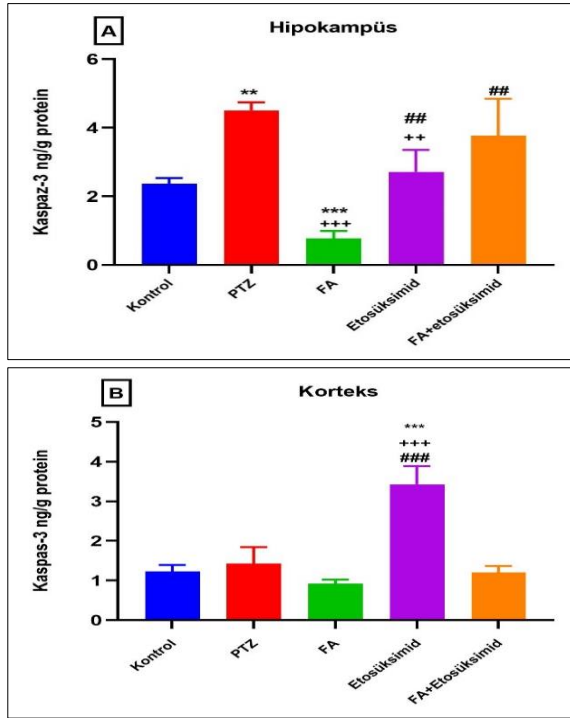


Şekil 2. Folik asitin, farelerde (n = 6) PTZ ile indüklenen nöbetten sonraki Racine Skalası (RC) (A), First miyoklonik jerk (FMJ) (B) ve jeneralize tonik-klonik (JTK) nöbete giriş zamanı (C) üzerindeki etkileri. Değerler ortalama \pm SH olarak sunulmuştur; PTZ grubuna kıyasla +++ $p < 0.001$ ve ++ $p < 0.01$; ## $p < 0.01$ FA grubuna kıyasla.

Farelerde PTZ İle İndüklenen Nöbet Sonrası Hipokampus ve Korteksteki Kaspaz-3 Seviyeleri Üzerine Folik Asidin Etkileri

ELISA ölçümleri hipokampusta ve kortekste kontrol, PTZ, FA, etosüksimid ve FA+ etosüksimid gruplarında kaspaz-3 seviyelerine olan etkilerini değerlendirmek için

yapıldı. Hipokampus kaspaz-3 düzeyi PTZ grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunurken, FA grubunda daha düşük bulundu (sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.001$). Folik asit ile tedavi edilen grup, PTZ grubuna kıyasla kaspaz-3 seviyeleri hipokampusta önemli ölçüde düşürdü ($p < 0.001$; Şekil 3A), bununla birlikte FA+ etosüksimid ile tedavi edilen grup kaspaz-3 seviyesini FA grubuna göre anlamlı şekilde arttırdı ($p < 0.01$; Şekil 3A). Diğer yandan etosüksimid ve FA+ etosüksimid gruplarında hipokampal kaspaz-3 düzeyleri FA grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek elde edildi ($p < 0.01$). Etosüksimid grubunda korteks kaspaz-3 düzeyleri kontrol, PTZ ve FA grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu (** $p < 0.001$, +++ $p < 0.001$, ### $p < 0.001$; Şekil 3B).

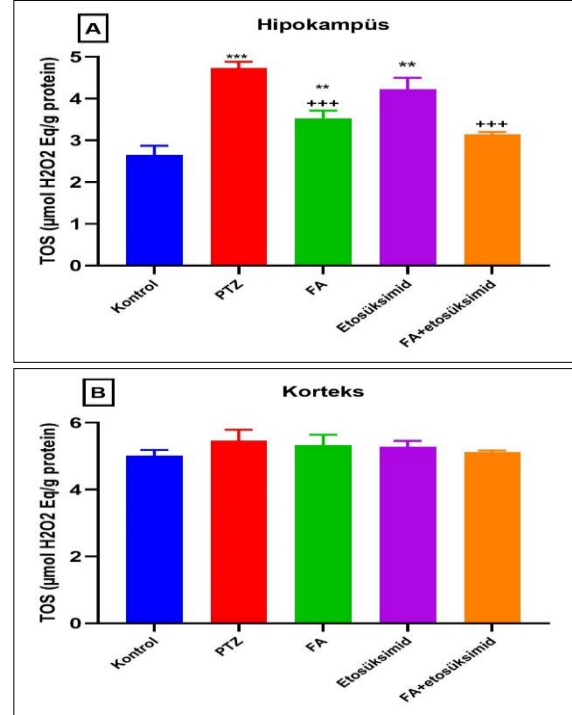


Şekil 3. Folik asitin (FA), farelerde (n = 6) PTZ ile indüklenen nöbetten sonra hipokampus (A) ve korteks (B) kaspaz-3 seviyeleri üzerindeki etkileri. Değerler ortalama \pm SH olarak sunulmuştur; *** $p < 0.001$ ve ** $p < 0.01$ Kontrol grubuna kıyasla; +++ $p < 0.001$ ve ++ $p < 0.01$ PTZ grubuna kıyasla; ### $p < 0.001$ ve ## $p < 0.01$ FA grubuna kıyasla.

Farelerde PTZ İle İndüklenen Nöbet Sonrası Hipokampus ve Kortekste TOS Seviyeleri Üzerine Folik Asidin Etkileri

Hipokampus TOS düzeylerindeki artış, PTZ, FA ve etosüksimid gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p < 0.001$ ve $p < 0.01$). Diğer yandan FA ve FA+ etosüksimid grupları PTZ grubuna kıyasla TOS seviyesi daha

düşük olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$; Şekil 4A). Ancak kortekste gruplar arasındaki TOS seviyesi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$; Şekil 4B).



Şekil 4. Folik asitin (FA), farelerde (n = 6) PTZ ile indüklenen nöbetten sonra hipokampus (A) ve korteks (B) Total Oksidan Seviye (TOS) seviyeleri üzerindeki etkileri. Değerler ortalama \pm SH olarak sunulmuştur; ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ Kontrol grubuna kıyasla; +++ $p < 0.001$ PTZ grubuna kıyasla.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, farelerde pentilentetrazol ile oluşturulan deneysel akut nöbet modelde folik asitin'in antikonvülsan özelliklere sahip olan etosüksimid üzerine etkisinin yanında beyin (hipokampus ve kortekste) dokularında kaspaz-3 ve TOS seviyelerine etkisi incelendi.

Epilepsi, nöbetlerle karakterize ve anormal nöronal uyarının neden olduğu yaygın bir nörolojik bozukluktur. Epilepsi, nöronlar ve glia hücreleri üzerinde aşırı metabolik bir yük olarak kabul edilir.²³ Antiepileptik bir ilaç olan etosüksimid, T tipi kalsiyum kanalını bloke ederek absans epilepsi tedavisinde kullanılmaktadır.²⁴ Yapılan bir çalışmada 35 mg/kg PTZ tek doz verildiğinde elektrofizyolojik açıdan etosüksimidin diken dalga deşarj sayısını ve süresini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur.²⁵ Bununla birlikte 80 mg/kg PTZ tek doz ile oluşturulan tonik-klonik

akut epileptik nöbet modelinde etosüksimidin ilk miyoklonik jerk süresini uzattığı ve tonik-klonik nöbete giriş zamanını arttırdığı bulunmuştur.²⁶ Bu çalışmaya benzer bir şekilde 60 mg/kg subkutan PTZ tek doz ile oluşturulan tonik-klonik nöbet çalışmasında etosüksimidin ilk miyoklonik jerk zamanını arttırdığı ve tonik-klonik nöbete giriş zamanını uzattığı belirlenmiştir.²⁷ Çalışmamızda 50 mg/kg etosüksimidin akut nöbet model hayvanlar üzerine etkileri davranışsal olarak incelendiğinde first miyoklonik jerk süresini süresini arttırmış, Racine skalasını azaltmış ancak tonik-klonik nöbete giriş süresine bir etki göstermemiştir. Bununla birlikte FA+ etosüksimid kombine tedavisi de Racine skalasını azalttı, first miyoklonik jerk süresini süresini arttırdı ve tonik-klonik nöbete giriş süresini uzattı. Ayrıca çalışmamızda folik asidin etosüksimidin antikonvülsan etkinliğini güçlendirdiği gösterilmiştir.

Oksidatif stres, normal metabolik süreç esnasında oluşan reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden, antioksidan savunma sistemindeki yetersizlik sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır²⁸. Oksidatif stres sürecinde serbest radikaller nedeniyle enzimlerin inaktivasyonu, lipitlerin oksidasyonu ve nükleik asitlerin bozulması meydana gelir.²⁹ Oksidatif stres, epilepsinin patofizyolojisinde kilit rol oynamakta ve nörodejenerasyonun ilerlemesinde risk oluşturmaktadır. Ayrıca, anti-epileptik ilaçlar, ekstra oksidatif stres yük uygulayarak oksidan/antioksidan homeostazı ve beyindeki antioksidan kapasiteyi bozmaktadır.³⁰ Çalışmamızda antikonvülsan bir ajan olan etosüksimid kontrole göre hipokampal TOS seviyesini artırırken kortekste TOS seviyesine bir etki göstermedi. Kaminski ve ark. yapmış olduğu çalışmada farelerde PTZ ile indüklenen tonik-klonik nöbetlere karşı etosüksimidin doza bağımlı olarak 50 mg/kg üzerinde koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur.²⁷

Folat, B kompleks grubunun suda çözünen bir vitamindir ve sağlık, büyüme ve gelişme için gereklidir. Bir kofaktör veya koenzim olarak folat, çeşitli fizyolojik süreçlerde anahtar rol oynar: genomun onarımı, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, amino asit metabolizması, nörotransmitter sentezi ve miyelin oluşumu.³¹ “Folik asit” ve “folat” terimleri sıklıkla birbirinin yerine kullanılsa da, folatlar doğal olarak oluşan form iken folik asit, gıda takviyesi ve besin takviyeleri için kullanılan vitaminin sentetik formudur.

Gıdalarla vücuda alınan folik asit ince bağırsağın ilk kısmı duodenumda emilir.³² Folik asit epileptik hastalarda uzun yıllar tartışma konusu olmuştur. Folik asidin başlangıçta epileptojenik olduğu düşünülmüştür, ancak araştırmalar suprafizyolojik konsantrasyonlardan daha düşük miktardaki folik asidin nöbet oluşturmadığı gösterilmiştir. Son yıllarda, epileptologlar bazı antiepileptik ilaçlar alan epilepsili kişilerde folik asit seviyesinin çok düşük olabileceğini öngörmüşlerdir. Buna bağlı olarak rutin folik asit desteğinin antiepileptik alan kadınlar ve erkekler için önemli olduğu düşünülmektedir.³³ Son çalışmalar FA'nın beyin gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.³⁴ Konvülsiyonların serebral metabolik hızı hızlandığı, oksijen ihtiyacını artırdığı ve serbest radikaller ürettiği bilinmektedir.³⁵ Antoniadis ve ark. FA'nın hem in vivo hem de in vitro süperoksit üretimini azalttığı gösterilmiştir.³⁶ Benzer şekilde, Cano ve ark. maternal FA takviyesi alan 21 günlük yavru ratları oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir.³⁷ Çalışmamızda PTZ alan grupta hipokampuste TOS seviyelerinin yüksek olduğu, FA takviyesinin ise oksidatif stres üretimi engelleyerek TOS seviyesinin düşürdüğü bulunmuştur. Benzer şekilde FA+ etosüksimid grubunun TOS seviyelerini azalttığını gösterilmiştir. Bu bulgular, folik asitin epileptik nöbet sırasında antioksidan özellikler gösterdiği sonucuna varılmıştır. Giroto ve ark. ise hamile sıçanlara yüksek doz FA uygulamasının kainik asit kaynaklı modelde nöbet eşliğini düşürdüğü gösterilmiştir.³⁸ Literatüre uyumlu olarak çalışmamızda FA takviyesi alan farelerde nöbet evresi PTZ grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte first miyoklonik jerk zamanını uzattığı ve jeneralize tonik-klonik nöbete giriş zamanına daha geç girdiği bulunmuştur. Wang ve ark. yaptığı çalışmada PTZ ile indüklenen deneysel epilepsi immatür sıçanlarda FA ile tedavi edilen grupta nöbet sıklığı, nöron ölüm derecesi ve nörona özgü enolaz seviyeleri PTZ grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur.³⁹ Bizim çalışmamızda da benzer şekilde FA uygulanan grupta PTZ grubuna göre nöbet evresi daha düşük, FMJ ve jeneralize tonik-klonik (JTK) zamanına daha geç girdiği gözlemlenmiştir. Wang ve ark. diğer çalışmasında ise PTZ ile indüklenen kindling model genç sıçanlarda FA+ topiramate sinerjik etkisinin nöbet sıklığı, nörona özgü enolaz seviyesini ve nekrotik nöron sayısını azalttığı bulunmuştur.⁴⁰ Bizim bulgularımızda ise tipik absans nöbetlere karşı sık kul-

lanılan bir ajan olan etosüksimid ve folik asit uygulamasının sinerjik etkisi nöbet evresini ve FMJ zamanını düşürürken, jeneralize tonik-klonik nöbete giriş zamanı üzerine bir etki göstermemiştir.

Nöbet sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması, mitokondri ve DNA'ya zarar vererek beyindeki kaspaz-3 seviyesini artırır ve hücre apoptozunu tetikler.⁴¹ Faherty ve ark. yaptığı çalışmada kainik asit ile oluşturulan epilepsi modelinde nöbet sonrası beyinde kaspaz-3 düzeylerinde artış olduğu rapor edilmiştir.⁴² Yapılan başka bir çalışmada lityum-pilokarpin ile indüklenen nöbetlerde proapoptotik protein olan kaspaz-3 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir.⁴³ Önceki çalışmalara uyumlu olarak çalışmamızda PTZ grubunda kaspaz-3 seviyelerinin hipokampusta yüksek çıktığı bulunmuştur. Bunun nedeni özellikle hipokampusün hipoksik ve toksik hasara karşı en duyarlı bölge olmasından kaynaklanmaktadır. Zhang ve ark. SOD1^{G93A} transgenik farelerde FA'nın kaspaz-3 seviyelerini azalttığı, Bcl-2 seviyelerini ise arttığı bulunmuştur.⁴⁴ Başka bir çalışmada SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerinde folat yoksunluğunun, artan sitozolik kalsiyum, reaktif oksijen türleri ve apoptoz dâhil olmak üzere nörodejeneratif değişiklikleri indüklediği rapor edilmiştir.⁴⁵

Bu çalışmanın potansiyel sınırlamaları vardır. Çalışmada kullanılan etosüksimid dozunun 50 mg/kg seçilmesinden kaynaklı literatüre göre sonuçlarda farklılık görülmüştür. Aynı zamanda FA+ etosüksimid grubunda TOS ve kaspaz-3 seviyelerinin düşük olması sinerjik bir etkiden kaynaklı mı yoksa folik asitin etkileri mi olduğu net değildir. Bu nedenle 50 mg/kg üzerindeki etosüksimid dozu ile daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmanın bulguları, folik asitin farelerde PTZ'nin neden olduğu epileptik nöbetlere karşı anti-epileptik aktiviteye sahip olmasının yanı sıra antioksidan ve antiapoptotik özellikte göstermiştir. Folik asit, etkin dozlarda etosüksimid ile sinerjik bir etki oluşturarak nöronal hasara karşı nöroprotektif olabilir. Bu nedenle FA anti-epileptik, antioksidatif ve antiapoptotik özellikleriyle epilepsi tedavisi için faydalı bir terapötik ajan olabilir. İlgili olası mekanizmalar hakkında ortaya çıkan soruları cevaplamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Beyannamesi

Mevcut çalışma ile ilgili yazarların herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Kurul İzni

Deneysel süreçler Sivas Cumhuriyet Üniversitenin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Komitesi (lisans numarası 19.10.2020 tarih ve 2020/349 sayı) tarafından onaylandı.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Ana fikir/Planlama: AÇÇ. Veri toplama/İşleme: AÇÇ. Veri analizi ve yorumlama: AÇÇ, BŞ. Literatür taraması: AÇÇ, BŞ. Yazım: AÇÇ. Gözden geçirme ve düzeltme: AÇÇ, BŞ.

KAYNAKÇA

1. Owoalade SA, Lou DMM, Yadav K, Poudel S. A Review on anti-epileptic activity of seaweed Ecklonia cava. *Drug Deliv J.* 2019;9(1):425-432.
2. Altay EE, Bilir E, İrkeç C. Demans ve epilepsi. *Demans Dizisi.* 1999;1(4):116-128.
3. Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 1999;36(2-3):189-204.
4. Gunes H, Ozdemir E, Arslan G. Coenzyme Q10 increases absence seizures in WAG/Rij rats: The role of the nitric oxide pathway. *Epilepsy Res.* 2019;154:69-73.
5. Kandratavicius L, Balista P, Lopes-Aguiar C, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations *Neuropsychiatr Dis. Treat.* 2014;10:1693-1705.
6. Shibata N, Kobayashi M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases *Brain Nerve.* 2008;60(2):157-170.
7. Aguiar CCT, Almeida AB, Araújo PV, De Abreu PRV, et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012;1-12.
8. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy *Epilepsy Res.* 2010;88(1):23-45.
9. Naziroğlu M, Akay MB, Çelik Ö, Yildirim MI, Balci E, Yürekli VA. Capparis ovata modulates brain oxidative toxicity and epileptic seizures in pentylentetrazol-induced epileptic rats. *Neurochem. Res.* 2013;38(4):780-788.
10. Fava M, Mischoulon D. Folate in depression: efficacy, safety, differences in formulations, and clinical issues. *J Clin Psychiatry.* 2009;70(5):12-17.
11. Hamid A, Wani NA, Kaur J. New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption--association with epigenome stability and cancer development. *FEBS J.* 2009;276(8):2175-2191.
12. Brocardo PS, Budni J, Lobato KR, Santos ARS, Rodrigues ALS. Evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of folic acid in the mouse forced swimming test. *Behav Brain Res.* 2009;200(1):122-127.
13. Djurić E, Hrnčić D, Šutulović N, et al. Folic acid supplementation alleviates behavioral manifestations of lindane-induced seizure. *Arch Biol Sci.* 2019;71(3):403-408.

14. Sarna LK, Wu N, Wang P, Hwang S-Y, Siow YL, Karmin O. Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(2):155-165.
15. Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, et al. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int.* 2009;54(1):7-13.
16. Taştumur Y, Gumus E, Ergül M, et al. Positive effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, captopril, on pentylenetetrazole-induced epileptic seizures in mice. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research.* 2020;19(3):637-643.
17. Racine, RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972;32(3):281-294.
18. Erdogan MA, Yusuf D, Erdogan A, Erbas O. Levodropropazine suppresses seizure activity in rats with pentylenetetrazol-induced epilepsy. *Epilepsy Res.* 2019;150:32-37.
19. Kaminski RM, Tochman AM, Dekundy A, Turski WA, Czuczwar SJ. Ethosuximide and valproate display high efficacy against lindane-induced seizures in mice. *Toxicol Lett.* 2004;154(1-2):55-60.
20. Oyama K, Sugimura Y, Murase T, et al. Folic acid prevents congenital malformations in the offspring of diabetic mice. *Endocr J.* 2009;56(1):29-37.
21. Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. *J Vis Exp.* 2010;12(38):1918.
22. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37(2):112-119.
23. Chakravarthy N, Tsakalis K, Sabesan S, Iasemidis L. Homeostasis of brain dynamics in epilepsy: a feedback control systems perspective of seizures. *Ann Biomed Eng.* 2009;37(3):565-585.
24. Taskiran AS, Ozdemir E, Gumus E, Ergul M. The effects of salmon calcitonin on epileptic seizures, epileptogenesis, and postseizure hippocampal neuronal damage in pentylenetetrazole-induced epilepsy model in rats. *Epilepsy Behav.* 2020;113:107501.
25. Babycha L, Valte V (2018). Anticonvulsant activity of aqueous extract of *Eupatorium birmanicum* DC. Leaves on seizure induced by PTZ in albino mice, alone and in combination with ethosuximide. *Int J Pharm Sci Res.* 2018;9(5):2048-2052.
26. Chen SD, Yeh KH, Huang YH, Shaw FZ (2011). Effect of intracranial administration of ethosuximide in rats with spontaneous or pentylenetetrazol-induced spike-wave discharges. *Epilepsia.* 2011;52(7):1311-1318.
27. Beal, M.F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1366(1-2):211-223.
28. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;827(1):65-75.
29. Kazmi Z, Zeeshan S, Khan A, et al. Anti-epileptic activity of daidzin in PTZ-induced mice model by targeting oxidative stress and BDNF/VEGF signaling. *Neurotoxicology.* 2020;79:150-163.
30. Shin EJ, Jeong JH, Chung YH, et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int.* 2011;59(2):122-137.
31. Djukic A. Folate-responsive neurologic diseases. *Pediatr Neurol.* 2007;37(6):387-397.
32. Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet.* 1996;347(9002):657-659.
33. Peleg-Raibstein D, Luca E, Wolfrum C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav Brain Res.* 2012;233(2):398-404.
34. Hyland K, Smith I, Bottiglieri T, et al. Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase deficiency. *Neurology.* 1988;38(3):459-462.
35. Seker FB, Yorulmaz H, Kaptan E, Caglayan B, Oztas B. Gestational treatment of folic acid attenuates blood-brain barrier leakage in pregnant- and prepubertal rats after pentylenetetrazole-induced seizure. *Nutr Neurosci.* 2016;19(2):55-62.
36. Antoniadis C, Shirodaria C, Warrick N, et al. 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation.* 2006;114(11):1193-1201.
37. Cano MJ, Ayala A, Murillo ML, Carreras O. Protective effect of folic acid against oxidative stress produced in 21-day postpartum rats by maternal-ethanol chronic consumption during pregnancy and lactation period. *Free Radic Res.* 2001;34(1):1-8.
38. Giroto F, Scott L, Avchalumov Y, et al. High dose folic acid supplementation of rats alters synaptic transmission and seizure susceptibility in offspring. *Sci Rep.* 2013;3(1):1465.
39. Wang P, Ren RN, Cai SY, Chen XM, Ye LY. Influence of folic acid on the protective role of topiramate against neuronal damage in immature rats. *Chin. J. Contemp. Pediatr.* 2008;26(2):96.
40. Wang P, Ren RN, Cai SY, Chen XM, Ye LY. Neuroprotective effects of topiramate and folic acid on young rats with kindling-induced epilepsy. *Chin. J. Contemp. Pediatr.* 2008;10(1):65-69.
41. Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, Rodríguez-Martínez E, Yescas Gómez P. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxid Med Cell Long.* 2014;2014:293689.
42. Faherty CJ, Xanthoudakis S, Smeyne RJ. Caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Mol Brain Res.* 1999;70(1):159-163.
43. Ali AE, Mahdy HM, Elsherbiny DM, Azab SS. Rifampicin ameliorates lithium-pilocarpine-induced seizures, consequent hippocampal damage and memory deficit in rats: Impact on oxidative, inflammatory and apoptotic machineries. *Biochem Pharmacol.* 2018;156:431-443.
44. Zhang X, Chen S, Li L, Wang Q, Le W. Folic acid protects motor neurons against the increased homocysteine, inflammation and apoptosis in SOD1 G93A transgenic mice. *Neuropharmacology.* 2008;54(7):1112-1119.
45. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, et al. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis.* 2003;14(1):32-42.