



Penisilinle oluşturulan epilepside kolinerjik ve nitreerjik maddelerin diken amplitüdüne etkisi

The effects of cholinergic and nitreergic substances on spike amplitude in penicillin induced epilepsy

Abdullah Hilmi Marangoz^{*a}, Mehmet Yıldırım^b

^a Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroşirurji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

^b Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye

MAKALE BİLGİLERİ

Makale geçmişi

Geliş tarihi : 12 / 07 / 2012

Kabul tarihi : 08 / 08 / 2012

* Yazışma Adresi:

Abdullah Hilmi Marangoz
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroşirurji Anabilim Dalı,
Samsun
E-posta: abduallah.marangoz@omu.edu.tr

Anahtar Kelimeler:

Asetilkolin
Nitrik oksit
ECoG
DeneySEL epilepsi
Diken amplitüdü
Sıçan

Keywords:

Acetylcholine
Nitric oxide
ECoG
Experimental epilepsy
Spike amplitude
Rat

ÖZET

Literatürde asetilkolinin (ACh) ve nitrik oksitin (NO) epilepsideki yeriyle ilgili çalışmalar vardır. Bununla birlikte herhangi bir epilepsi modelinde muskarinik kolinerjik sistem ile nitreerjik sistem arasındaki etkileşim bilinmemektedir. Sunulan çalışmanın amacı, penisilin modeli deneySEL epilepside, nitreerjik sistem ile muskarinik kolinerjik sistemin etkileşimini araştırmaktır. Deneylerde ağırlıkları ortalama 220±35 gram olan 70 tane Wistar cinsi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Bu hayvanlar kontrol (200 IU/1µl penisilin), sodyum nitropurid (SNP) (50 µg/5 µl), Nω-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) (100 µg/5 µl), ACh (250 µg/5 µl, i.c.), atropin (100 ng i.c.), atropin+SNP (100 ng atropin ve 10 dk sonra 50 µg SNP i.c.), atropin+L-NAME (100 ng atropin sülfat ve 100 µg/5 µl L-NAME i.c.), L-NAME+ACh (100 µg/5 µl L-NAME ve 10 dk sonra 250 µg/5 µl ACh i.c.), ACh+SNP (250 µg/5µl ACh ve 50 µg SNP i.c.) ve Atropin+ACh gruplarına ayrıldı. Çalışmamızın sonuçlarına göre intrakortikal penisilinden (200 IU/1 mikro litre) 2-5 dakika sonra ECoG'de epileptiform aktivite başladı. Asetilkolin ile SNP birlikte verildiğinde, 10. dakikadan itibaren deneylerin sonuna kadar penisilin oluşturduğu epileptiform aktivite ve diken yükseklikleri, istatistik açıdan çok önemli ölçüde baskılandı. Muskarinik kolinerjik ve nitreerjik sistemlerle ilgili diğer uygulamalar ve diğer maddeler diken yüksekliklerini istatistiksel açıdan önemli sayılabilecek ölçüde etkilememiştir. Sonuç olarak deney şartlarında, asetilkolin tek başına uygulandığında penisilin oluşturduğu epileptiform aktiviteyi şiddetlendirmekte; fakat bir NO verici olan SNP ile birlikte verilince antikonvülzan etki artmakta ve diken yükseklikleri azalmaktadır.

J. Exp. Clin. Med., 2012; 29:304-310

ABSTRACT

The role of acetylcholine (ACh) and nitric oxide (NO) in epilepsy is already known. There is no study on the interactions between cholinergic and nitreergic systems in an epilepsy model. The aim of this study was to investigate the interaction between muscarinic cholinergic system and nitreergic system in the experimental model of penicillin epilepsy. Seventy adult male Wistar rats weighing 220±35 g were used in the experiments. The experimental groups consist of control (200 UI/1 µl penicillin), SNP (50 µg/5 µl), Nω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)(100 µg/5 µl), ACh (250 µg/5 µl), atropin (100 ng.), atropin+SNP (100 ng atropine and 10 min later 50 µg SNP), atropin +L-NAME (100 ng atropine sulphate and 100 µg/5 µl L-NAME.), L-NAME+ACh (100 µg/5 µl L-NAME and 10 min later 250 µg/5 µl ACh), ACh+SNP (250 µg/5 µl ACh and 50 µg SNP) and Atropin+ACh groups. According to the this study, epileptiform activity started within 2-5 min following the intracortical injection of penicillin (200 UI/1 µl). When ACh and SNP were administered together, penicillin induced epileptiform activity and spike amplitudes were significantly suppressed from the 10th min onwards. Amplitudes of the spikes induced by penicillin were significantly reduced in ACh+SNP group while the other compounds related to muscarinic cholinergic and nitreergic systems did not affect it. It can be concluded that acetylcholine increases the epileptiform activity induced by penicillin when administered alone while the anticonvulsant effect is increased when it is administered together with NO donor SNP.

J. Exp. Clin. Med., 2012; 29:304-310

1. Giriş

Antibiyotiklerin epileptiform aktivite oluşturdularını gösteren çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar vardır (Gutnick ve ark., 1976; Fisher, 1989; Grondahl ve Langmoen, 1993; Lösher ve Schmidt, 1994; Marangoz, 1997). Antibiyotikler içinde, çözünürlüğü daha yüksek olduğundan penisilin sodyum ve potasyum tuzları tercih edilir. Deneysel epilepsinin oldukça kullanışlı ve ucuz modellerinden birisi de penisilin modelidir. Penisilin konvulsan özelliği 1945 yılından beri bilinmektedir (Walker ve Johnson, 1945).

1980 yılında asetilkolinin, izole damarlarda genişlemeye sebep olduğu, ancak damar endoteli çıkarıldığında bu etkinin görülmediği bulunmuştur (Furchgott ve Zawadzki, 1980). Daha sonra asetilkolinin uyardığı endotel hücrelerinden endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) denen bir maddenin salgılanarak damarları genişlettiği saptandı. 1987 yılında bu damar genişletici faktörün nitrik oksit (NO, nitrojen monoksit) veya ona benzeyen bir madde olduğu anlaşıldı (Ignarro ve ark., 1987; Palmer ve ark., 1987).

Nitrik oksitin hem prokonvulsan (Mollace ve ark., 1991) hem de antikonvulsan (Marangoz ve ark., 1994; Marangoz, 1996; Marangoz ve Bağırıcı, 2001) olduğunu iddia eden çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sıçanda intraserebroventriküler (i.c.v.) N-metil D-aspartat (NMDA)'ın subkonvulsiv dozundan (0,5 mikrogram) bir dakika önce lateral ventriküle verilen NO'nun ön maddesi L-arjinin, elektrokortikogramda (ECoG) yüksek voltajlı senkronize deşarjlara yol açmış; L-arjinin ile NOS inhibitörü N-nitro L-arjinin birlikte uygulandığında epileptiform aktivite önlenmiştir (Mollace ve ark., 1991). NMDA reseptörünün uyarılmasından önce NO üretiminin baskılanması epileptiform aktiviteyi azaltmış, epileptik aktivite başladıktan sonra NO üretiminin engellenmesi ise etkisiz kalmıştır (De Sarro ve ark., 1991). Kainik asit (10 mg/kg, s.c) verilen sıçan beyninde NO üretimi araştırılmış ve üretimin temporal korteks ile amigdalada 6 kat, korteksin diğer kısımlarında ise 12 kat artış gösterdiği; önceden özel bir NOS inhibitörü olan 7-nitroindazol (7-NI) verildiğinde, kainik asitin oluşturduğu NO üretimi ve epileptiform aktivitenin azaldığı bulunmuştur (Mülsch ve ark., 1994). Deneysel epilepside NO üretiminin arttığını gösteren başka çalışmalar da vardır (Marangoz, 1996; Kaputlu ve Uzbay, 1997; Gupta ve Dettbarn, 2003; Kato ve ark., 2005). Bu çalışmalarda NO'nun prokonvulsan olduğu ileri sürülmüştür.

Nitretjik sistemin antikonvulsif olduğunu gösteren çalışma sayısı da oldukça fazladır (Buisson ve ark., 1993; Marangoz ve ark., 1994; Marangoz ve Bağırıcı, 2001; Canan, 2004; Ayyıldız ve ark., 2007; Yang ve Cox, 2007; Hrnčić ve ark., 2010). Farede lateral ventriküle verilen NMDA'nın oluşturduğu epileptiform aktivite, NO sistemi baskılandığında artış göstermiş; NMDA ile birlikte L-arjinin veya cGMP verilmesi epileptik aktiviteyi azaltmıştır (Buisson ve ark., 1993). Deneysel epilepsinin kainik asit modeliyle yapılan çalışmalardan birçoğu, NO'nun antikonvulsan olduğunu göstermiştir (Marangoz ve ark., 1994; Przegalinski ve ark., 1994; Bagetta ve ark., 1995; Maggio ve ark., 1995; Rigaud-Monnet ve ark., 1995). Anestezi altındaki sıçanda beyin korteksine verilen 400-500 ünite penisilinle oluşturulan epileptiform aktiviteyi, bir NO salıncı olan sodyum nitroprussit (SNP) önemli ölçüde

baskılamış; Guanilat siklaz veya NO inhibitörü olan hemoglobin, SNP'nin antikonvulsif etkisini önlemiştir (Marangoz ve ark., 1994).

Asetilkolin reseptörleri nikotinik ve muskarinik diye iki büyük gruba ayrılır. Muskarinik grupta beş ayrı alt tip reseptör (M1-M5) olduğu bilinmektedir. M1, M3 ve M5 alt tiplerinin eksitator sinaptik iletiye, M2 ve M4 alt tiplerinin ise inhibitör sinaptik iletiye aracılık ettikleri saptanmıştır (McKinney ve Coyle, 1991). Pilokarpinin yabani farelerde epileptik nöbet oluşturduğu fakat M1 reseptörünü ihtiva etmeyen farelerde nöbet oluşturmadığı bulunmuştur (Hamilton ve ark., 1997). Ayrıca M2-M5 reseptörlerinin bulunmaması pilokarpinin oluşturduğu epileptik nöbetleri etkilememiştir (Bymaster ve ark., 2003). Özetlenen bulgular, en azından bazı epileptik nöbetler ile M1 reseptörleri arasında ilişki olduğunu göstermektedir (Bymaster ve ark., 2003).

Asetilkolinin merkez sinir sisteminde eksitator bir etki gösterdiği öteden beri bilinmektedir (Krnjevic ve ark., 1971; Echlin, 1974; Krnjevic, 2004). Kortikal piramidal hücrelerin bulunduğu ortama verilen ACh hücrelerin uyarılabilirliğini artırmıştır (McCormick ve Prince, 1985). Asetilkolin, muskarinik reseptörler üzerinden hipokampus piramidal nöronlarında saatlerce süren deşarja yol açmıştır (Bernardo ve Prince, 1982). Muskarinik asetilkolin reseptör sayısının, tutuşma modeli epilepsi (MacNamara, 1978) ve genetik modeli epilepside (Liles ve ark., 1986) azaldığı bulunmuştur. Ayrıca skopolamin, biperiden ve atropin gibi antikolinergik maddelerin de epileptiform aktivite gösterdiklerine dair bulgular vardır (Tan ve ark., 1978).

Muskarinik kolinerjik sistemin epilepside rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. (Minvielle ve ark., 1953; Bagri ve ark., 1999; Eşkazan ve ark., 1999; Peterson ve ark., 2000; Potier ve Psarropoulou, 2001; Martin ve ark., 2005). Asetilkolinin ve kolinomimetik maddelerin, vasküler endotelde olduğu gibi, sıçan omurilik dilimlerinde de nitrik oksitin sentezini uyardıkları ve bir kısım etkilerini bu yolla gösterdikleri tespit edilmiştir (Xu ve ark., 1996). Otonom sinir sisteminde ve merkez sinir sistemiyle ilgili bazı olaylarda ACh ile NO arasındaki etkileşimi konu alan çalışmalar vardır. Ancak özellikle epilepside asetilkolin ile nitrik oksit arasındaki etkileşimin nasıl olduğu bilinmemektedir.

Yukarıda sıralanan bilgi ve bulgular deneysel epilepside nitrik oksit ile asetilkolin arasında bir etkileşimin olması gerektiğini düşündürmektedir. Sunulan çalışmanın amacı, henüz araştırılmamış olan bu konuyu penisilin modeli deneysel epilepside ele almak, diken frekansını ele alan çalışmamıza (Marangoz ve ark., 2012) katkı sağlamak, nitretjik sistem ile muskarinik kolinerjik sistemin diken amplitüdüne olan etkisini tespit etmek, böylece epileptogenezin temel mekanizmalarını daha ileri ölçüde aydınlatmak ve nihayet klinik çalışmalara ışık tutmaktır.

2. Gereç ve yöntem

2.1. Deneysel hayvanları

Deneysel hayvanlar, ortalama 220±35 gram ağırlığında 70 adet Wistar cinsi, erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 10-12 haftalık oluncaya kadar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nde doğal aydınlık-

karanlık döngüsünde herhangi bir yem ve su kısıtlaması olmaksızın yetiştirildiler. Deneysel çalışmadan yaklaşık 10 gün önce Cerrahi Araştırma Merkezi'nden alınan hayvanlar, Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda benzer bakım koşullarında kontrol altında tutuldular. Deneysel araştırma standartlarına uymayan sıçanlar çalışma dışında bırakıldılar. Deneysel çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Etik Kurulundan onay alındı.

2.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve uygulanış şekilleri

Penisilin G potasyum DEVA Holding A.Ş. (İstanbul) firmasından temin edildi. Deneysel çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, US)'dan temin edildi. Epileptiform aktiviteyi başlatmak için 200 ünite (IU) penisilin 1 µl hacimde intrakortikal (i.c.) olarak uygulandı. Penisilin hayvanın sol somatomotor korteksine, Bregma'dan 3 mm laterale, 2 mm posteriyör ve 2 mm ventral koordinatlara uygun şekilde Hamilton mikroenjektör kullanılarak verildi (şek. 1).

SNP, penisilin enjeksiyonu ile başlayan epileptiform aktiviteden yaklaşık 30 dk sonra serum fizyolojikte çözülerek hazırlanmış olan SNP, hayvan başına 50 µg/5 µl oranında i.c. olarak uygulandı. Nω-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) hidroklorid arjinin analogu olan L-NAME, NO üretimini engelleyen nonspesifik bir ajandır. Penisilin enjeksiyonu ile başlayan epileptiform aktiviteden yaklaşık 30 dk sonra serum fizyolojikte çözülerek hazırlanmış olan L-NAME, hayvan başına 100 µg/5 µl oranında i.c. olarak uygulandı.

Asetilkolin kuvaterner amonyum esteri olan ACh, penisilin enjeksiyonu ile başlayan epileptiform aktiviteden yaklaşık 30 dk sonra, serum fizyolojikte çözülerek, hayvan başına 250 µg/5 µl oranında i.c. olarak uygulandı. Penisilin enjeksiyonu ile başlayan epileptiform aktiviteden yaklaşık 30 dk sonra serum fizyolojikte çözülerek hazırlanmış olan atropin, hayvan başına 100 ng/1 µl oranında i.c. olarak uygulandı.

2.3. Deneysel grupları

Penisilin modeli deneysel epilepside, kolinerjik ile nitrejik sistemlerin etkileri ve etkileşimlerini araştırmak için öncelikle her iki sistemin etkisi ayrı ayrı incelendi. Daha sonra bu iki sisteme ait etken maddeler birlikte uygulandı. Deneysel grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

1. Kontrol grubu: (n=6) 200 IU/1µl penisilin i.c. verildikten 30 dk sonra 5 µl serum fizyolojik i.c. olarak uygulandı.

2. SNP grubu: (n=6) 200 IU/1µl penisilin verildikten 30 dk sonra 50 µg SNP serum fizyolojikte çözülerek 5 µl hacimde i.c. olarak uygulandı.

3. L-NAME grubu: (n=6) 200 IU/1µl penisilin verildikten 30 dk sonra serum fizyolojikte çözülerek 100 µg L-NAME 5 µl hacimde i.c. olarak uygulandı.

4. Asetilkolin grubu: (n=6) 200 IU/1µl penisilin verildikten 30 dk sonra serum fizyolojikte çözülerek 250 µg asetilkolin 5 µl hacimde i.c. olarak uygulandı.

5. Atropin grubu: (n=6) 200 IU/1µl penisilin verildikten 30 dk sonra serum fizyolojik ile sulandırılan 100 ng/µl atropin sülfat i.c. olarak uygulandı.

6. Atropin+SNP grubu: (n=6) Epileptiform aktivite oluşumundan yaklaşık 30 dk sonra 100 ng atropin sülfat ve 10 dk sonra 50 µg SNP i.c. olarak uygulandı.

7. Atropin+L-NAME grubu: (n=6) Epileptiform aktivite oluşumundan yaklaşık 30 dk sonra 100 ng atropin sülfat ve bir dakika içinde 100 µg/5 µl L-NAME i.c. olarak uygulandı.

8. L-NAME+Asetilkolin grubu: (n=6) Epileptiform aktivite oluşumundan yaklaşık 30 dk sonra 100 µg/5 µl L-NAME ve 10 dk sonra 250 µg/5 µl asetilkolin i.c. olarak uygulandı.

9. Asetilkolin+SNP grubu: (n=6) Epileptiform aktivite oluşumundan yaklaşık 30 dk sonra 250 µg/5 µl asetilkolin ve bir dakika içinde 50 µg SNP i.c. olarak uygulandı.

Yukarıdaki deney gruplarına ilave olarak, ikişer hayvana penisilin uygulanmaksızın yalnızca serum fizyolojik, SNP, L-NAME, asetilkolin veya atropin i.c. olarak uygulanarak, bu maddelerin bazal ECoG aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi.

2.4. Cerrahi işlem

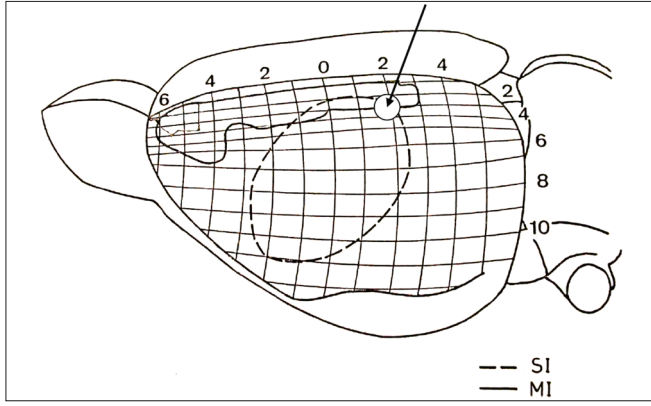
Operasyon öncesi 24 saat aç bırakılan sıçanlara, 1,2 g/kg üreten intraperitoneal (i.p.) yoldan verilerek anestezi uygulandı. Sıçanın başının üst kısmında iki kulak arasındaki tüyler temizlendikten sonra, hayvan operasyon masasına tespit edildi. Hayvanın kafa derisi rostro-kaudal doğrultuda, ortalama 3-4 cm uzunluğunda kemik dokuya kadar insize edilerek gerekli ekartasyon sağlandı. Sol somatomotor korteks üzerinde periost disseke edilerek, tur motoruyla kafatası kemiği dikkatlice kaldırıldı. Kemik dokuda meydana gelebilecek kanamalar bonewax (kemik mumu) ile engellendi. Sürtünmeden kaynaklanan ısınmayı önlemek amacıyla tur uygulanan alana eşzamanlı serum fizyolojik enjeksiyonu uygulandı. Kafatası kemiği tamamen uzaklaştırıldı.

2.5. Elektrofizyolojik kayıt işlemi

Cerrahi operasyondan sonra sıçanlar stereotaksik cihaza sabitlendi. Hayvanın kafa derisi 4 köşeden cerrahi ipliklerle tutturularak 37°C'lik sıvı vazelin havuzu oluşturuldu. Böylece beyin ve diğer dokulardan sıvı kaybının engellenmesi, ısının muhafaza edilmesi ve sinyal artefaktların önlenmesi sağlandı. Rektal proba bağlı bir homeotermik battaniye (Harvard Instrument, USA) ile hayvanların vücut ısıları monitörize edilerek, 37°C'de sabitlendi. Elektrofizyolojik kayıt için 2 adet Ag/AgCl top elektrot ve topraklama amacıyla 1 adet Ag/AgCl klemp elektrot kullanıldı. Top elektrotlardan pozitif olanı bregmanın 2 mm önüne, negatif olanı ise bregmanın 5 mm arkasına, toprak elektrot ise kayıt jeli sürülerek sağ kulağa yerleştirildi. Elektrotlar yardımıyla alınan aktivite, bir amplifikatör (BioAmp ADInstruments, Australia) yardımıyla yükselttilerek, PowerLab 4/SP (ADInstruments, Australia) veri kayıt sistemine aktarıldı. PowerLab ile korteksten elde edilen biyolojik sinyaller (ECoG aktivitesi) Chart v5.1 (ADInstruments, Australia) yazılımı ile monitörize edilerek bilgisayara online kaydedildi. Veriler daha sonra offline olarak analiz edildi.

2.6. Enjeksiyonlar

Beyine yapılan tüm intrakortikal enjeksiyonlar, Bregma noktasından 3 mm lateral, 2 mm posteriyör ve 2 mm ventrale bir Hamilton mikroenjektörü aracılığıyla gerçekleştirildi. İntarakortikal enjeksiyonlarda enjektör ucunun damarları zedelememesine dikkat edildi. Penisilin enjeksiyonu öncesinde tüm sıçanlardan yaklaşık 10 dk bazal aktivite kaydı alındı.



Şek. 1. Sıçan beyninin sol hemisferinin üstten görünümü ve milimetrik koordinatları. Sıfır işaretli çizgi Bregmayı göstermektedir. Ok işareti enjeksiyon yerini belirtmektedir. S1 duyuusal, M1 motor bölgeler (Marangoz, 2010).

2.7. İstatistiksel analiz

Elektrofizyolojik kayıtlar Chart v5.1 (ADInstruments, Avustralya) yazılımı ve bu yazılımın makro özellikleri sayesinde birer dakikalık dilimlere ayrıldı. Her bir dakika başına düşen ortalama spike amplitüdü otomatik olarak hesaplatıldı (Şek. 2a-2b). Bu işlemler her bir hayvan için tekrarlandı. Elektrofizyolojik kayıtlar sayısal verilere dönüştürüldükten sonra bu veriler, SPSS v12.0 yazılımı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi.

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu, One-Sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak incelendi. Veriler normal dağılıma uyduğu için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Varyans analizi sonucunda gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu görüldü. Grup varyansları heterojen olduğundan farkın nereden kaynaklandığını saptamak için Tamhane Post Hoc testi kullanıldı. Grafik ve metin içerisinde kullanılan deney gruplarına ait değerler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Testlerden elde edilen sonuçlara göre p değeri 0,05'in altında olan farklılıklar anlamlı kabul edildi (Şek. 1).

3. Sonuçlar

Tüm sıçanlarda, alınan bazal aktivite kayıtları arasında herhangi bir farklılığın bulunmadığı ve bazal aktivite kayıtlarında spontan spike oluşmadığı görüldü. Penisilin uygulanmaksızın sadece serum fizyolojik, SNP, L-NAME, asetilkolin ve atropinin intrakortikal enjeksiyonları sonucunda bazal ECoG aktivitesinde herhangi bir değişimin olmadığı ve spontan spike oluşmadığı saptandı.

Intrakortikal olarak penisilin (200 IU/1 μ l) uygulanan tüm hayvanlarda bilateral spike ve spike-dalga kompleksleri ile karakterize epileptiform ECoG aktivitesi oluştu. Epileptiform aktivite enjeksiyondan yaklaşık 2-5 dk sonra başladı. Bu aktivitede spike amplitüdü, enjeksiyondan yaklaşık 25 dk sonra kararlı bir seviyeye ulaştı ve ortalama 4 saat devam etti.

Sunulan çalışmada ECoG aktivitesi penisilin enjeksiyonundan itibaren 90 dk süreyle kaydedildi. Bunun ilk 30 dakikasında aktivite kararlı bir seviyeye ulaştı. Kalan 60 dk'lık dönemde nitrejik ve kolinerjik sistemlere ait maddelerin enjeksiyonları yapılarak epileptiform aktivite üzerindeki etkileri incelendi.

3.1. Penisilin verilmesinden sonraki ilk 30 dakikalık bölümün spike amplitüdü açısından karşılaştırılması

Penisilin enjeksiyonundan sonra etkisi araştırılacak maddelerin verildikleri döneme kadar geçen yaklaşık 30 dakikalık dönemde, epileptik diken dalga amplitüdü açısından yapılan değerlendirmede gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ($p>0,05$). Tüm deney gruplarında etkisi araştırılacak madde enjeksiyonu öncesinde ortalama spike amplitüdünün $1190\pm 184 \mu V$ düzeyinde olduğu tespit edildi.

3.2. Nitrik oksit spike amplitüdüne etkisi

SNP ve L-NAME enjeksiyonlarından 30 dk ve sonra ortalama spike amplitüdü sırasıyla $1270\pm 168 \mu V$, $1550\pm 183 \mu V$ olarak hesaplandı. SNP uygulandıktan kısa süre sonra ortalama spike amplitüdü kısmen azalarak deney sonuna kadar aynı düzeyde devam etmiştir. SNP grubundaki bu kısmi amplitüd azalmasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). L-NAME grubunda ise spike amplitüdünün yüzde değişiminin kontrol grubu değerleriyle yaklaşık paralel olduğu görüldü (Şek. 2a-2b; Tablo 1).

3.3. Asetilkolinin spike amplitüdüne etkisi

Asetilkolin ve atropin enjeksiyonundan 30 dk ve sonra ortalama spike amplitüdü sırasıyla $1060\pm 55 \mu V$, $800\pm 93 \mu V$ olarak hesaplandı. Asetilkolin uygulanan grupta enjeksiyondan yaklaşık 5 dk sonra spike amplitüdünde kısmi bir artış gözlenirse de, artışın anlamlı olmadığı ($p>0,05$), elektrofizyolojik kaydın geri kalan bölümlerinde ise kontrol grubu düzeylerinde olduğu saptandı. Atropin uygulanan grupta ise 10 dakikadan itibaren 25. dakikaya kadar anlamlı olmayan kısmi bir artışın olduğu fakat sonrasında kontrol grubu düzeylerine döndüğü tesbit edildi (Şek. 2a-2b; Tablo 1).

3.4. Nitrik oksit ve asetilkolin etkileşiminin spike amplitüdüne etkisi

a) Muskarinik blokajda nitrik oksit etkisi

Bu gruptaki hayvanlara muskarinik reseptör blokörü atropin (100 ng/5 μ l/sıçan, i.c.) enjeksiyonundan 10 dk sonra NO donörü SNP (50 μ g/5 μ l/sıçan, i.c.) uygulandı. Atropin+SNP enjeksiyonundan 30 dk sonra ortalama spike amplitüdü $616\pm 208 \mu V$ olarak hesaplandı. Atropin+SNP enjeksiyonu sonrasında spike amplitüdü kontrol grubu değerlerine göre azalmış olsa da standart hata değerinin (ve standart sapma) oldukça yüksek olmasından dolayı bu azalmadan kaynaklanan farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edildi (Şek. 2a-2b; Tablo 1).

b) Nitrik oksit eksikliğinde asetilkolinin rolü

L-NAME ve asetilkolin etkileşimini araştırmak için oluşturulan deney grubuna ilk önce L-NAME (100 μ g/5 μ l/sıçan, i.c.) uygulandı. L-NAME+asetilkolin enjeksiyonundan 30 dk sonra ortalama spike amplitüdü $1000\pm 169 \mu V$ olarak hesaplandı. Her iki maddenin enjeksiyonu sonrasında spike amplitüdünün kontrol grubu değerlerine yakın olduğu görüldü ($p>0,05$; Şek. 2a-2b; Tablo 1).

c) Asetilkolin ve nitrik oksit birlikte etkileri

Asetilkolin ve nitrik oksit aynı ortamda birlikte artışlarından ortaya çıkacak etkileri görmek amacıyla oluşturulan deney grubuna penisilinden 30 dk sonra asetilkolin (250 μ g/5

$\mu\text{l/sıçan, i.c.}$) ve SNP (50 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l/sıçan, i.c.}$) birlikte ve aynı anda uygulandı. Asetilkolin+SNP enjeksiyonundan 30 dk sonra ortalama spike amplitüdü 333 \pm 152 μV olarak hesaplandı. Her iki madenin aynı anda uygulanmasının spike amplitüdünde ilk dakikalardan itibaren başlayan ve deney sonuna kadar süren bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Asetilkolin+SNP grubunda 50. ve 60. dakikalar arasında kalan spike amplitüdü değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde azalmış olduğu tespit edildi ($p<0,05$; Şek. 2a-2b; Tablo 1).

d) Asetilkolin ve nitrik oksitin inhibisyonunun etkileri

Bu deney grubunda muskarinik asetilkolin reseptör antagonisti atropin ve NOS inhibitörü L-NAME penisilin enjeksiyonundan 30 dk sonra aynı anda uygulandı. Atropin +L-NAME enjeksiyonundan 30 dk sonra ortalama spike amplitüdü 680 \pm 144 μV olarak hesaplandı. Her iki sistemin aynı anda inhibe edilmesiyle spike amplitüdünde kontrol grubu değerlerine göre anlamlı bir farklılığın bulunmadığı saptandı ($p>0,05$; Şek. 2a-2b; Tablo 1).

Tablo 1. Penisilin ve diğer maddelerin uygulanması sonrası on beşer dakika aralıklarla tespit edilen gerçek amplitüd değerleri (μV).

Zaman	15 dk	30 dk	45dk	60 dk
Gruplar				
Kontrol (Penisilin)	1000 \pm 185	900 \pm 178	900 \pm 147	900 \pm 166
SNP	1290 \pm 108	1270 \pm 168	1210 \pm 203	1200 \pm 268
L-NAME	1550 \pm 170	1550 \pm 183	1620 \pm 168	1480 \pm 181
ACh	940 \pm 55	1060 \pm 55	1080 \pm 48	1060 \pm 33
Atropin	880 \pm 79	800 \pm 93	780 \pm 94	720 \pm 104
Atropin+SNP	567 \pm 190	616 \pm 208	600 \pm 191	600 \pm 191
L-name+ACh	1066 \pm 200	1000 \pm 169	1066 \pm 190	783 \pm 54
Atropin+L-Name	780 \pm 168	680 \pm 144	540 \pm 187	660 \pm 158
ACh+SNP	333 \pm 154	333 \pm 152	233 \pm 147	117 \pm 116

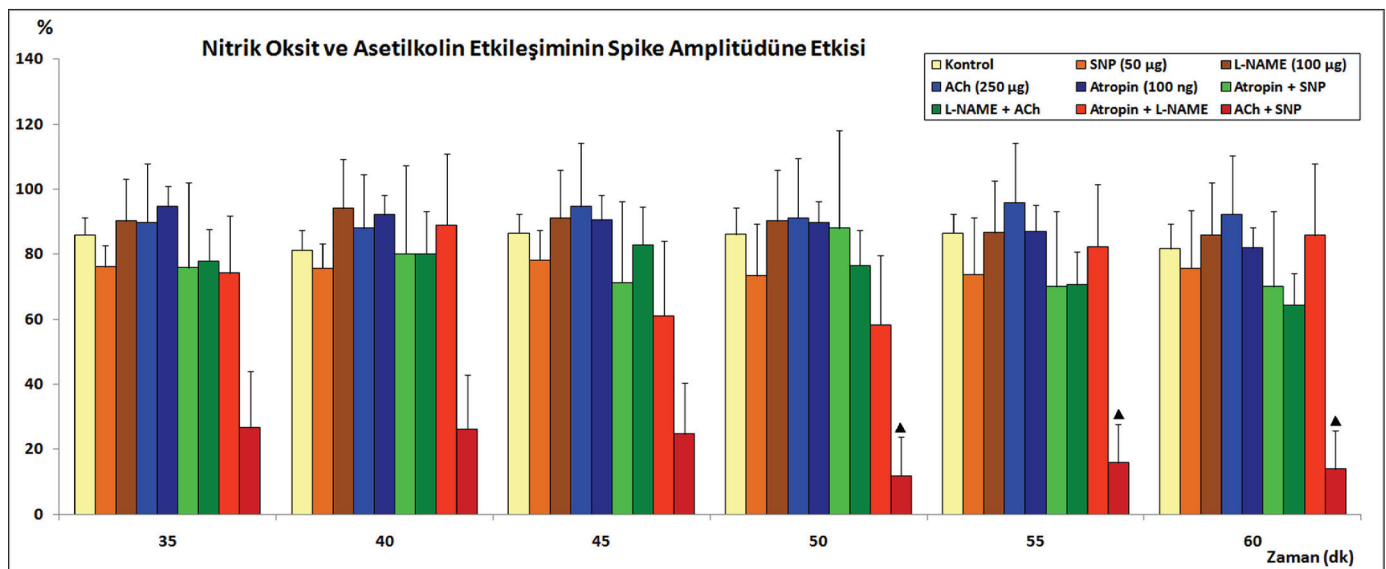
4. Tartışma

Atropinden sonra verilen SNP spike amplitüdünü önemli ölçüde etkilemedi. Bu bulgu literatür bilgileriyle uyumludur

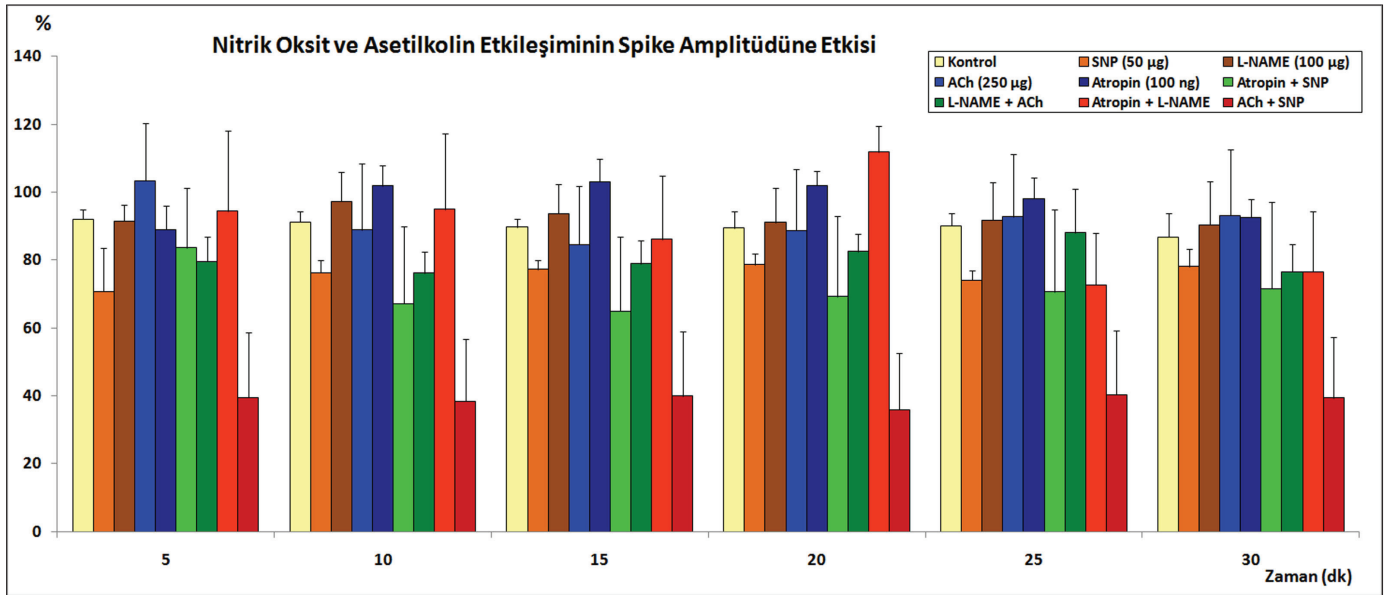
(Yıldırım ve Marangoz, 2006; Marangoz, 2010; Yıldırım ve ark., 2011; Marangoz ve ark., 2012). Spesifik olmayan nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü L-NAME'den 10 dk sonra verilen asetilkolin diken frekansını anlamlı ölçüde etkilememiştir (Marangoz ve ark., 2012).

Asetilkolin ile SNP birlikte uygulandıklarında 10. dakikadan itibaren deneylerin sonuna kadar, penisilinin oluşturduğu epileptiform aktivitede diken amplitüdünü istatistik açıdan çok önemli ölçüde baskıladı. Benzer olarak asetilkolin ve SNP'nin birlikte uygulanmasının spike frekansını da baskıladığı gösterilmiştir (Marangoz, 2010; Marangoz ve ark., 2012).

Sunulan çalışmada, penisilinin oluşturduğu diken yüksekliklerinin sadece Asetilkolin+SNP grubunda etkilendiği ve istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi. Muskarinik kolinerjik ve nitrejik sistemlerle ilgili diğer uygulamalar ve diğer maddeler diken yüksekliklerini istatistik açıdan önemli sayılabilecek ölçüde etkilemedi. Melatonin penisilinin oluşturduğu diken frekansını önemli ölçüde baskılamak, diken amplitüdünü etkilememiştir (Yıldırım ve Marangoz, 2006). Nitrik oksit ile adenosinin etkileşmesini konu edinen bir çalışmada, tek başına veya adenosin ile birlikte verilen SNP'nin diken amplitüdünü etkilemediği gösterilmiştir (Yıldırım ve ark., 2011). Diğer taraftan intrakortikal SNP'nin penisilin modelinde diken amplitüdünü azalttığını gösteren çalışmalar da vardır (Marangoz ve ark., 1994). Söz konusu uyumsuzluk deney şartlarının farklı olmasıyla izah edilebilir. Tek başına prokonvulsif olan ACh'nin SNP ile birlikte verildiğinde, diken amplitüdünü hangi mekanizmayla baskıladığı henüz bilinmemektedir. ACh ve SNP'nin birlikte verilmesinin diken frekansını, SNP'nin tek başına olan etkisinden daha fazla baskıladığını gösteren Marangoz ve ark. (2012)'na göre bu konuda şu mekanizmalardan biri veya birkaçı birlikte devrede olmuş olabilir: 1) ACh nitrik oksit üretimini artırmış olabilir. 2) SNP kolinerjik maddelerin inhibitör muskarinik reseptörlere bağlanma ihtimalini artırıyor olabilir. 3) NO'nun etkisi redoks durumuna bağlıdır. ACh, NO'nun redoks durumunu etkileyerek onun baskılayıcı özelliğini öne çıkarıyor olabilir. 4) NO ACh yanında diğer nörotransmitterlerin sentezini de etkilemektedir. Asetilkolinle birlikte verilen SNP inhibitör transmitterlerin salgılanmasını daha fazla etkiliyor



Şek. 2a. Asetilkolin, atropin, SNP, L-NAME ve bunların kombinasyonunun epileptiform aktivitede diken (spike) amplitüdüne etkisi (0-30 dakikalar).



Şek. 2b. Asetilkolin, atropin, SNP, L-NAME ve bunların kombinasyonunun epileptiform aktivitede diken (spike) amplitüdüne etkisi (30-60. dakikalar).

olabilir. 5) Asetilkolin dolaylı yoldan, NO ise doğrudan beyin kan akımını artırarak hücre dışı potasyum miktarını azaltır. Sonuçta epileptiform aktivite ileri ölçüde baskılanabilir.

Özet olarak mevcut deney şartlarında elde edilen sonuçlara göre, dışarıdan verilen kolinerjik agonistler tek başına ol-

duklarında epileptik aktiviteyi kolaylaştırırken, nitrejik agonistler birlikte olduklarında, tersine olarak inhibitör sistemleri güçlendirmekte ve bu yolla epileptiform aktiviteyi ve diken amplitüdünü baskılamaktadırlar.

KAYNAKLAR

- Bagetta, G., Iannone, M., Palma, E., Rodinò, P., Granato, T., Nisticò, G., 1995. Lack of involvement of nitric oxide in the mechanisms of seizures and hippocampal damage produced by kainate and ouabain in rats. *Neurodegeneration*. 4, 43-49.
- Bagri, A., Di Scala, G., Sandner, G., 1999. Myoclonic and tonic seizures elicited by microinjection of cholinergic drugs into the inferior colliculus. *Therapie*. 54, 589-594.
- Bernardo, L.S., Prince, D.A., 1982. Cholinergic excitation of mammalian hippocampal pyramidal cells. *Brain Res*. 249, 315-331.
- Buisson, A., Lakhmeche, N., Verrecchia, C., Plotkine, M., Boulu, R.G., 1993. Nitric oxide: An endogenous anticonvulsant substance. *Neuroreport*. 4, 444-446.
- Bymaster, F. P., Carter, P. A., Yamada, M., Gomeza, J., Wess, J., Hamilton, S. E., Nathanson, N. M., McKinzie, D. L., Felder, C.C., 2003. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur. J. Neurosci*. 17, 1403-1410.
- De Sarro, G., Di Paola, E.D., De Sarro, A., Vidal, M.J., 1991. Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid-induced seizures from the deep prepiriform cortex. *Fund. Clin. Pharmacol*. 5, 503-511.
- Echlin, F., 1974. Time course of development of supersensitivity to topical ACh in partially isolated cortex. *EEG and Clin. Neurophysiol*. 18, 225-233.
- Eşkazan, E., Aker, R., Onat, F., Köseoğlu, S., Gören, M.Z., Hasanoğlu, A., 1999. Effect of pirenzepine, a muscarinic M1 receptor antagonist, on amygdala kindling in rat. *Epilepsy Res*. 37, 133-140.
- Fisher, R.S., 1989. Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Rev*. 14, 245-278.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. Obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288, 373-376.
- Grondahl, T.O. and Langmoen, I.A., 1993. Epileptogenic effect of antibiotic drugs. *J. Neurosurg*. 78, 938-943.
- Gupta, R.C., Dettbarn, W.D., 2003. Prevention of kainic acid seizures-induced changes in levels of nitric oxide and high-energy phosphates by 7-nitroindazole in rat brain regions. *Brain Res*. 981, 184-192.
- Gutnick, M.J., Van Duijn, H., Citri, N., 1976. Relative convulsant potencies of structural analogues of penicillin. *Brain Res*. 114, 139-143.
- Hamilton, S.E., Loose, M.D., Qi, M., Levey, A.I., Hille, B., McKnight, G.S., Idzerda, R.L., Nathanson, N.M., 1997. Disruption of the M1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 13311-13316.
- Hrnčić, D., Rašić-Marković, A., Krstić, D., Macut, D., Djuric, D., Stanojlović, O., 2010. The role of nitric oxide in homocysteine thiolactone-induced seizures in adult rats. *Cell Mol. Neurobiol*. 30, 219-231.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G., 1987. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9265-9269
- Kaputlu, I., Uzbay, T., 1997. L-NAME inhibits pentylentetrazole and strychnine-induced seizures in mice. *Brain Res*. 753, 98-101.
- Kato, N., Sato, S., Yokoyama, H., Kayama, T., Yoshimura, T., 2005. Sequential changes of nitric oxide levels in the temporal lobes of kainic acid-treated mice following application of nitric oxide synthase inhibitors and phenobarbital. *Epilepsy Res*. 65, 81-91.
- Krnjević, K., Pumain, B., Renaud L., 1971. The mechanism of excitation by ACh in the cerebral cortex. *J. Physiol*. 215, 247-268.
- Krnjević, K., 2004. Synaptic mechanisms modulated by acetylcholine in cerebral cortex. *Prog. Brain Res*. 145, 81-93.

- Liles, W.C., Taylor, S., Finnel, R., Lai, H., Nathanson, N.M. 1986. Decreased muscarinic acetylcholine receptor number in the central nervous system of the tottering Mouse. *J. Neurochem.* 46, 977-982.
- Löshner, W., Schmidt, D., 1994. Strategies in antiepileptic drug development: Is rational drug design superior to random screening and structural variation? *Epilepsy Res.* 17, 95-134.
- MacNamara, J.O., 1978. Muscarinic cholinergic receptors participate in the kindling model of epilepsy. *Brain Res.* 154,415-420
- Maggio, R., Fumagalli, F., Donati, E., Barbier, P., Racagni, G., Corsini, G.U., Riva, M., 1995. Inhibition of nitric oxide synthase dramatically potentiates seizures induced by kainic acid and pilocarpine in rats. *Brain Res.* 679, 184-187.
- Marangoz, A.H., 2010. Deneysel epilepside kolinerjik ve nitreerjik maddelerin etkileşimi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun
- Marangoz, A.H., Yıldırım, M., Ayyıldız, M., Marangoz, C., 2012. The interactions of nitric oxide and acetylcholine on penicillin-induced epilepsy in rats. *Neurochem. Res.* 37, 1465-1474.
- Marangoz, C., 1997. Deneysel epilepsi modelleri. *O.M.Ü. Tıp Dergisi.* 14, 147-186.
- Marangoz, C., 1996. Nitrik oksit ve deneysel epilepsi. *O.M.Ü. Tıp Dergisi.* 13, 165-183.
- Marangoz, C., Ayyıldız, M., Açar, E., 1994. Evidence that sodium nitroprusside possesses anticonvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuroreport.* 5, 2454-2456.
- Marangoz, C., Bagirci, F., 2001. Effects of L-arginine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 86, 297-301.
- Martin, E.D., Cena, V., Pozo, M.A., 2005. Cholinergic modulation of status epilepticus in the rat barrel field region of primary somatosensory cortex. *Exp. Neurol.* 196, 120-125
- McCormick, D.A., Prince, D.A., 1985. Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6344-6348.
- McKinney, M., Coyle, J.T., 1991. The Potential for muscarinic receptor subtype-specific pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Mayo Clin. Proc.* 66,1225-1237.
- Minvielle, J., Cadilhac, J., Passouant, P., 1953. The effect of atropine in epileptics. *Rev. Neurol. (Paris)* 89, 430-433.
- Mollace, V., Bagnetta, G., Nistico, G., 1991. Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuroreport.* 2, 269-272.
- Mülsch, A., Busse, R., Mordvintsev, P.I., Vanin, A.F., Nielsen, E.O., Scheel-Krüger, J., Olesen, S.P., 1994. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *Neuroreport.* 5, 2325-2328.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327, 524-526.
- Peterson, S.L., Armstrong, J.J., Walker, M.K., 2000. Focal microinjection of carbachol into the periaqueductal gray induces seizures in the fore-brain of the rat. *Epilepsy Res.* 42, 169-181.
- Potier, S., Psarropoulou, C., 2001. Endogenous acetylcholine facilitates epileptogenesis in immature rat neocortex. *Neurosci. Lett.* 302, 25-28.
- Przegalinski, E., Baran, L., Siwanowicz, J., 1994. The role of nitric oxide in the kainate-induced seizures in mice. *Neurosci. Lett.* 170, 74-76.
- Rigaud-Monnet, A.S., Heron, A., Seylaz, J., Pinard, E., 1995. Effect of inhibiting NO synthesis on hippocampal extracellular glutamate concentration in seizures induced by kainic acid. *Brain Res.* 673, 297-303.
- Tan, Ü., Şenyuva, F., Marangoz, C., 1978. Electroencephalographic effects of topically applied scopolamine. *Epilepsia.* 19, 223-232.
- Walker, A.E., Johnson, H.C., 1945. Convulsive factor in commercial penicillin. *Arch. Surg.* 50, 69-73.
- Xu, Z., Yong, C., Eisenach, J.C., 1996. Acetylcholine stimulates the release of nitric oxide from rat spinal cord. *Anesthesiology.* 85, 107-111.
- Yang, S., Cox, C., 2007. Modulation of inhibitory activity by nitric oxide in the thalamus. *J. Neurophysiol.* 97, 3386-3395.
- Yıldırım, M., Marangoz, C., 2006. Anticonvulsant effects of melatonin on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain Research.* 1099, 183-188.
- Yıldırım, M., Marangoz, A.H., Ayyıldız, M., Ankaralı A., Marangoz, C., 2011. The interactions of nitric oxide and adenosine on penicillin induced epileptiform activity in rats. *Acta. Neurobiol. Exp.* 71, 208-219.