

Sıçanlarda Pilocarpin ile Oluşturulan Epilepsi Modelinde Topiramate'in Antikonvulsan Etkileri

Behzat NOYAN

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Bu çalışmada, topiramate (TPM) tedavisinin antikonvulsan ve hipokampüste çinko translokasyonu üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu yolla TPM'in hipokampusdeki çinko iyonları üzerinden etki ederek antiepileptik etki göstermesinde bir rolünün olup olmadığı araştırıldı. Deneylerde 300-350g. arasında erkek, erişkin Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Sıçanlardan elektrokortikografik (ECoG) kayıtların alınabilmesi için deneyler öncesinde tüm sıçanlara anestezi altında (thiopental sodium, 40 mg/kg, i.v.) 5 adet çelik paslanmaz vida elektrod epidural olarak yerleştirildi ve i.c.v. enjeksiyon için sol lateral ventriküllerine kanül yerleştirildi. Pilocarpin HCl enjeksiyonu (380 mg/kg i.p.) ile nöbet oluşturuldu. Pilocarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce 20, 60 ve 100 mg/kg topiramate (i.p.), CaEDTA (100 mM i.c.v.) ve ZnCl₂ (35 mg/kg i.p.) enjeksiyonları yapıldı. Aynı zamanda bu hayvanların davranışsal değişiklikleri gözlemlendi. Pilocarpin enjeksiyonundan iki saat sonra diazepam enjeksiyonu ile nöbetler sonlandırıldı. Sıçanlar 24 saat sonunda anestezi altında dekapite edilerek hızla beyinleri çıkarıldı. Hipokampal boyama (TSQ) ile çinko iyonlarının postsinaptik nöronlara geçip geçmediği incelendi. Status epilepticus (SE) insidansı, 24 saatlik yaşam şansı ve nöbet skorları değerlendirildiğinde, TPM'in antikonvulsan etkileri saptandı. Tüm TPM gruplarında ECoG kayıtlarda sivri dalgaların amplitüd ve frekanslarının daha düşük olduğu gözlemlendi. 100 mg/kg dozda uygulandığında TPM'in hipokampüste çinko translokasyonu üzerine etkili olduğu yani çinko iyonlarının yosunsu liflerin presinaptik terminallerinden postsinaptik nöronlara geçişini engellediği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Çinko. Topiramate. ECoG. Pilocarpine. TSQ.

Anticonvulsant Effects of Topiramate in the Pilocarpine Model of Epilepsy in Rats

ABSTRACT

The effects of topiramate (TPM) therapy on zinc translocation and anticonvulsant outcomes have been researched in this study. Also whether TPM has a role on antiepileptic effect by affecting the zinc ions on the hippocampus has been investigated. Adult, male Sprague-Dawley rats between 300-350g. have been used in the experiments. To receive the electrocorticographic (ECoG) data from the rats, 5 stainless steel screw electrodes were implanted epidurally under anesthesia (thiopental sodium, 40 mg/kg, i.v.) to all of the rats and canuls were placed in the left lateral ventricles for i.c.v. injection before the experiments. Seizures were provoked by pilocarpine-HCl injection (380 mg/kg i.p.). Ten minutes before pilocarpine-HCl injection; 20, 60 and 100 mg/kg topiramate (i.p.), CaEDTA (100 mM i.c.v.) and ZnCl₂ (35 mg/kg i.p.) have been introduced into the groups accordingly. Concurrently, the behavioral variances of the animals were observed during this process. After two hours of pilocarpine injection, seizure were terminated by diazepam injection. By the end of 24 hours, the rats under anesthesia were decapitated, their brains were removed rapidly and the state of zinc ions was analyzed by hippocampal staining (TSQ). When the status epilepticus (SE) incidence, 24-hour survival, and the seizure scores were analyzed, the anticonvulsant effects of TPM were confirmed. The amplitude and frequency of the spikes in the ECoG records were less in all of the TPM groups. When 100 mg/kg was applied, TPM was effective on the zinc translocation. This shows that TPM prevents the translocation of zinc ions from the presynaptic terminals of mossy fibers to postsynaptic neurons.

Key Words: Zinc. Topiramate. ECoG. Pilocarpine. TSQ.

Geliş Tarihi: 01.02.2008
Kabul Tarihi: 05.03.2008

Dr. Behzat NOYAN
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı
16059 Görükle / Bursa
Tel: 0 224 4429137
e-mail: noyan@uludag.edu.tr

Epilepsi, tüm popülasyonda yüksek oranında görülen yaygın önemli bir sağlık problemidir^{1,2}. Patogenezinin anlaşılmasındaki ilerlemelere rağmen, nöbetlerin ve epilepsinin hücrel temelleri hala tam olarak bilinmemekte ve dolayısıyla var olan ilaç tedavileri sadece semptomların kontrol altında tutulmasına yönelmektedir^{3,4}.

Antikonvulsanlar, esas olarak merkezi sinir sistemine zarar vermeden ve solunumu deprese etmeden epileptik nöbetlerin baskılanması için kullanılırlar⁵. Birkaç yeni antiepileptik ilaçtan birisi olan topiramate (TPM)

[2,3: 4,5- bis-0- (1-methylethyl-dene) β -D-fructopyranose sulfamate], ($C_{12}H_{21}NO_8S$) hem deneysel^{6,7} hem klinik çalışmalarda⁸ geniş spektrumlu antiepileptik aktiviteye ve nöroprotektif etkiye sahip olduğu bildirilen bir bileşiktir. TPM'in basit veya kompleks parsiyal nöbetlere ve jeneralize tonik-klonik nöbetlere karşı hem çocuklarda hem erişkinlerde etkili olduğu bildirilmiştir⁹. TPM'in diğer antikonvulzanlara benzer şekilde voltaj duyarlı Na^+ kanallarını bloke ettiği, epileptiform deşarjların süresini ve her deşarjda ortaya çıkan aksiyon potansiyellerini azalttığı bildirilmiştir^{10,11}. GABA_A reseptörünün düzenlediği klor akışını arttırdığı yani GABA_A reseptörü üzerine düzenleyici etkisi olduğu ve genellikle GABA aktivitesini güçlendirdiği bildirilmektedir. Sadece TPM'a özgü olduğu öne sürülen bir özellik olarak glutamat reseptör alt tiplerinden Kainat ve AMPA reseptörlerini bloke etmesidir¹¹⁻¹⁴. Ancak NMDA reseptörleri üzerinde anlamlı etkisi olmadığı bildirilmiştir^{11,12}. L tipi yüksek voltajla aktive olan Ca^{++} kanallarında negatif modülasyon sağladığı yani Ca^{++} akışını azalttığı^{10,13,15}, K^+ kanallarını aktive ettiği^{6,13,16}, sinir uçlarından glutamat ve aspartat gibi eksitator aminoasit salınımını inhibe ettiği de bildirilmiştir^{12,17}.

Çinko vücutta en yaygın bulunan ikinci eser elementtir ve memeli beyinde büyük miktarda bulunur. Çinko beyin olgunlaşması ve fonksiyonları için gereklidir^{18,19}. Bütün dokularda çoğu enzimlerin sentezi için esansiyel olmasına rağmen beyindeki çinkonun diğer dokulardan farklı bir özelliği presinaptik terminallerde veziküler lokalizasyonudur²⁰. Çinkonun presinaptik veziküller içine alınmasını sağlayan Zinc-Transporter-3 (ZnT-3) olarak isimlendirilen özel bir pompa, nöronların sinaptik veziküllerinin membranları üzerinde lokalize olmuştur^{22,23}. ZnT-3 proteininin immunohistokimyasal lokalizasyonu sayesinde çinko içeren nöronlar tanınabilmektedir²⁴. Hipokampus ve amigdala bölgeleri yüksek yoğunlukta çinko içeren nöron terminallerine sahiptir²⁵. Beyinde en yüksek yoğunlukta çinko içeren bölge hipokampusdur. Hipokampusun çoğu nöronunda çinko yaygın olmasına rağmen hipokampal yosunsu liflerinin terminallerindeki glutamat içeren veziküllerde çinko konsantrasyonu yaklaşık 300 μM 'dir²⁶. Bu ilişki glutamat depolanması, salınımı veya glutamat reseptörlerinin modülasyonunda çinkonun önemine dikkat çekmektedir²⁴.

Beyindeki toplam çinkonun yaklaşık % 10'u glutamaterjik nöronların sinaptik vezikülleri içinde bulunurken, % 90'lık kısmı ise metalloproteinler tarafından tutulur¹⁹. Metal bağlayan proteinlere sıkıca bağlı olan metabolik çinkonun aksine veziküler çinko serbesttir veya zayıfca bağlıdır. Bu özelliği nedeniyle seçici floresan boyamalar veya Neo-Timm boyama²⁷ yöntemleriyle saptanabilmektedir. Veziküler çinkonun memeli beyinde sinaptik nörotransmisyonunda rol oynadığı ve NMDA, AMPA/Kainat ve GABA gibi

reseptörlerin endojen bir nörotransmitteri ve nöromodulatörü olarak hizmet ettiği düşünülmektedir^{20,28-30}. Veziküler çinkonun glutamat ile beraber epilepsi, beyin travması gibi patolojik durumlardan sonra aşırı salınımında nörotoksik bir hal aldığı bildirilmiştir³¹⁻³⁴. Yapılan çalışmalarda i.c.v. CaEDTA (ekstrasellüler çinko şelatörü) enjeksiyonu ile çinko şelasyonu sonucu hipokampusdaki nöronal hasarın ve nöronal ölümün yavaşladığı saptanmıştır^{35,36}. Epileptik nöbetlerde fazla miktarda salınan çinkonun postsinaptik nöronlarda, kalsiyum bağımlı AMPA/KA reseptörleri için eksitator, NMDA ve GABA_A reseptörleri için de inhibitör bir ajan olarak rol oynadığı bildirilmiştir^{20,37,38}. Ayrıca çinko içeren yollar status epileptikus (SE) ve tekrarlayan nöbetlerde sinaptik reorganizasyon (sprouting) içerisindedir³⁹. Deneysel oluşturulan epilepside, iskemi, kafa ya da beyin travması gibi akut durumlarla ilişkili olarak aşırı miktarda çinko presinaptik vezikülden salındıktan sonra, postsinaptik nöronlara geçmekte ve orada toksik etki göstererek, nöronların hasarlanmasına ve ölümüne neden olmaktadır^{36,40-43}.

Bu çalışmada epileptik nöbetlerde hipokampuste glutamat ile birlikte aşırı miktarda salınan ve nöronlarda eksitotoksitesi nedeniyle hücre ölümüne neden olan çinko iyonları ile yeni bir antiepileptik ajan olan topiramatin antikonvulsan etkisini gösterdiği reseptör tiplerinin aynı olmasına dayanılarak, topiramatin tedavisinin çinko translokasyonu üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda TPM'in davranışsal değişiklikler ve ECoG kayıtları üzerine hangi dozunun antikonvulsan olarak etkin olduğu saptanmaya çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada ağırlıkları 300-350g arasında 120 adet erkek, erişkin Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Merkezi'nden sağlandı. Çalışma için Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi'nden izin alındı. Sıçanlar sıcaklığı 20-22°C olan odalarda (12 saat aydınlık/12 saat karanlık) beş tanesi bir kafeste olacak şekilde tutuldu ve standart sıçan diyeti ile beslendi. Yem ve su alımları serbest bırakıldı.

Çalışma, deneysel epilepside TPM'in beklenen antikonvulsan etkisinin, nöbetlerde aşırı miktarda salınan çinkoyu etkileyip etkilemediğini gözlemlemek amacı için yapıldığından, deney gruplarında pilokarpin HCl enjeksiyonları yapıldı ve TPM tedavisi ile birlikte çinko veya çinko şelatörü verildi. CaEDTA'nın çinko iyonlarını bağladığı ve $ZnCl_2$ 'ün de bir çinko kaynağı olduğu bilindiğinden topiramatin çinko iyonları üzerine etkisinin araştırılabilmesi için çalışma aşağıda belirtilen gruplardan oluşturuldu;

Pilocarpin Epilepsisinde Topiramamat

- 1) Nöbet Kontrol Grubu (n=10): Pilocarpin HCl enjeksiyonu (380 mg/kg i.p.) ile nöbet oluşturulan grup.
- 2) Nöbet + TPM Tedavili Grup (n=30): Pilocarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce 20, 60 ve 100 mg/kg topiramamat (i.p.) verilen grup.
- 3) Nöbet + TPM + CaEDTA Grubu (n=40): Pilocarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce 20, 60 ve 100 mg/kg topiramamat ve CaEDTA (100 mM i.c.v.) enjeksiyonu yapılan grup.
- 4) Nöbet + TPM + ZnCl₂ Grubu (n=40): Pilocarpin HCl enjeksiyonundan 10 dk. önce 20, 60 ve 100 mg/kg topiramamat ve ZnCl₂ (35 mg/kg i.p.) enjeksiyonu yapılan grup.

Nöbetlerde periferik yan etkilerinin azaltılması için pilokarpin HCl verilmeden 30 dk. önce metilscopolamine (1 mg/kg, s.c.) enjeksiyonu yapıldı.

CaEDTA'nın intraserebroventriküler enjeksiyonu için stereotaksik koordinatlar göz önüne alınarak (Bregma'nın 1,5 mm sol laterali ve 1 mm posteriorü, 4,0-4,2 mm derinlik) sıçanların kafatasına bir kanül yerleştirdi ve enjeksiyonlar (10 µl CaEDTA) Hamilton mikroenjektörü ile yapıldı.

ECoG Kayıtlarının Alınması

Sıçanlardan elektrokortikografik (ECoG) kayıtların alınabilmesi için deneyler öncesinde tüm sıçanlara anestezi altında (thiopental sodium, 40 mg/kg, i.v.) 4 adet çelik paslanmaz vida elektrod epidural olarak yerleştirildi (fronto-parietal elektrodlar, bregmanın 2 mm anterior ve 2 mm posteriorüne ve orta hattın her iki tarafta 2 mm lateraline). Nazal kemik üzerine yerleştirilen bir elektrod referans elektrod olarak kullanıldı. Bütün elektrotlar kafatasına dişçi akriliği ile sabitlendi, lokal antibiyotik ve ağrı kesici uygulanarak deri kapatıldı. Deneylere cerrahi işlemlerden 3 gün sonra başlandı.

DeneySEL İşlemler

DeneySEL işlemlerden önce tüm hayvanların ECoG (MP 100 data acquisition and analysis system, Biopac Systems, Inc.) kayıtları alındı. Kayıtlamaya pilokarpin HCl enjeksiyonundan 120 dk. sonraya kadar devam edildi. Bu süreçte hayvanların davranışsal değişiklikleri gözlemlenerek aşağıdaki Racine⁴⁴ skalasına göre skorlandırıldı;

0: Hareketsiz

1: Fasial otomatizmalar

2: Baş sallama

3: Unilateral veya bilateral ön ekstremite klonusu

4: Bilateral ön ekstremite klonusu ve ayağa kalkma

5: Ayağa kalkma, düşme, yuvarlanma, jeneralize konvulsiyonlar ve status epileptikus

Nöbet şiddetleri bu şekilde değerlendirilen sıçanlar ayrıca status epileptikusa (SE) girme oranı, nöbet latansı ve 24 saatlik yaşam şansı açısından da davranışsal olarak değerlendirildi. TPM'in akut etkisinin incelenmesi için nöbetler pilokarpin enjeksiyonundan iki saat sonra diazepam enjeksiyonu ile sonlandırıldı.

Sıçanlar 24 saat sonunda anestezi altında dekapite edilerek hızla beyinleri çıkarıldı. Hipokampal boyama için sol hemisfer izole edildi ve alınan parçalar CO₂ gazı ile dondurularak -80°C de saklandı. Daha sonrasında alınan kesitlerde N-(6-methoxy-8-quinoly)-para-toluenesulfonamide (TSQ) boyaması yapılarak hipokampusta çinko floresanı yoluyla çinko iyonlarının transloke olup olmadığı tespit edildi.

TSQ Floresan Boyaması

Çinkonun floresan görünümü için -80° C de saklanan beyin parçalarından kryostat yardımıyla -25° C de 10 µm kalınlığında frozen kesitler alındı ve kesitlerde TSQ boyaması yapıldı. Kesitler 1 dakika boyunca TSQ (4,5 µM) solüsyonunda (140 mM sodyum barbutal ve 140 mM sodyum asetat tamponunda) immerse edildikten sonra 1 dk boyunca serum fizyolojik (NaCl, %0.9) ile yıkandı ve bir floresans mikroskopunda incelendi⁴⁵. 360 nm eksitasyon, 460 nm emisyon filtreleri kullanıldı. Mikroskoba bağlı bir kamera ile çekilen hipokampuse ait görüntüler kayıt ve analizleri için bilgisayar ortamına aktarıldı.

İstatistik

Status epileptikusa girme ve 24 saat yaşam şansı yüzdeleri nöbet kontrol grubu ile diğer gruplar arasında Fisher'in kesin ki-kare testi uygulanarak değerlendirildi. SE latansı yüzdelerinin nöbet kontrol grubuna göre değerlendirilmesinde ANOVA testi kullanıldı. Anlamlı farklılık düzeyi olarak p<0.05 alındı.

Bulgular

Tüm gruplarda pilokarpin verilmesinden yaklaşık 5 dk sonra kolinerjik stimülasyon bulguları olan salivasyon, piloereksiyon, diuresis, tremor, çiğneme hareketleri gibi limbik otomatik hareketler saptandı. 15-20 dk sonrasında bazı sıçanlarda baş sallama, rearing ve forelimb clonus görüldü. Bunu bazı sıçanlarda düşme, jeneralize konvulsiyonlar ve SE takip etti. SE tüm gruplarda ortalama pilokarpine enjeksiyonundan 39-41 dk sonrasında görüldü. Grupların SE latansları arasında fark görülmedi (Tablo-I). Nöbet-kontrol grubunda %90 görülen SE insidansı TPM'in 100 mg/kg verildiği sıçanlarda %30'a düştü. 24 saatlik yaşam şansı bulguları da kontrol grubunda ancak %20 iken, TPM 100 mg/kg grubunda %90 olarak bulundu. Nöbet skorları değerlendirildiğinde TPM'in 100 mg/kg enjekte edildiği hayvanlardaki nöbet şiddetin-

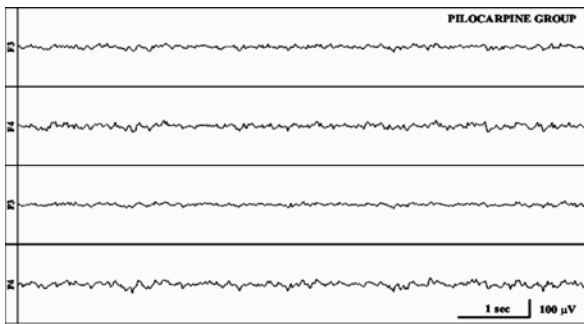
deki azalmalar nöbet-kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi (Tablo-I).

Tablo I. Nöbet-kontrol grubu ile farklı dozlarda TPM, CaEDTA ve ZnCl₂ verilen grupların status epileptikusa girme oranı, nöbet latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve nöbet skoru açısından karşılaştırılması ve grupların ortalamaları (mean ± S.H.).

GRUPLAR (n=10)	SE (%)	SE Latansı (dk) (ortalama ± S.H.)	24-saat Yaşam şansı (%)	Nöbet Skoru (sayı- dereceleme) (ortalama ± S.H.)
Nöbet-Kontrol Grubu (pilokarpin 380 mg/kg)	90	40.7±1.6	20	4.6±0.1
N-TPM 20 mg/kg	80	39.1±1.7	60	4.1±0.2
N-TPM 60	80	40.1±1.3	60	3.9±0.2
N-TPM 100	30*	40.3±1.4	90**	2.9±0.3***
N-ZnCl ₂	60	48.7±8.9	60	4±0.4
N-ZnCl ₂ -TPM 20	70	52.5±11.3	60	3.5±0.3
N-ZnCl ₂ -TPM 60	60	42.8±4	60	4±0.4
N-ZnCl ₂ -TPM 100	60	35±4.5	70	3.4±0.3
N-CaEDTA	70	40±6.1	70	4.2±0.2
N-CaEDTA-TPM 20	70	39.2±5.9	60	4.4±0.2
N-CaEDTA-TPM 60	70	40.7±4.5	50	4.2±0.2
N-CaEDTA-TPM 100	70	38.5±4.8	70	4.1±0.3

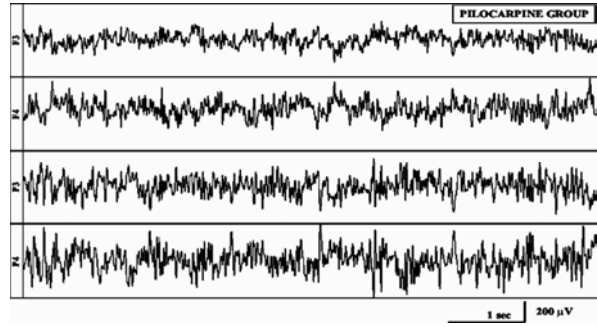
Nöbet-Kontrol grubuna göre * p<0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.001

ECoG açısından nöbet kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm Nöbet-TPM gruplarında spike'ların amplitüdlerinin ve frekanslarının daha düşük olduğu gözlemlendi. Nöbet-TPM 100 grubunda spike'ların voltajlarının diğer TPM gruplarına göre oldukça düşük olması dikkati çekti. Nöbet-TPM 20, Nöbet-TPM 60 grupları arasında ECoG paterni açısından önemli farklılık gözlemlenmedi. Nöbet ile beraber TPM verilen gruplarla karşılaştırıldığında CaEDTA ile beraber TPM verilen gruplarda bir değişiklik görülmedi. Çinko ile beraber TPM verilen gruplarda da bir farklılık belirlenmedi (Şekil: 1-5).



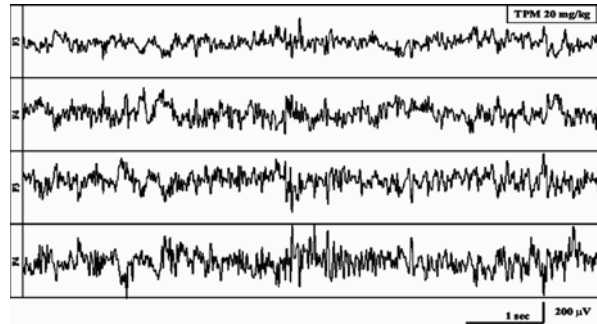
Şekil 1:

Nöbet kontrol grubunda pilokarpin (380 mg/kg) verilmeden önceki ECoG kaydı



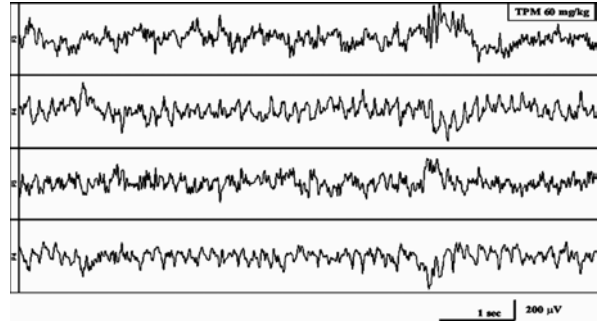
Şekil 2:

Nöbet kontrol grubunda pilokarpin (380 mg/kg) verildikten sonra nöbet sırasında ECoG kaydı.



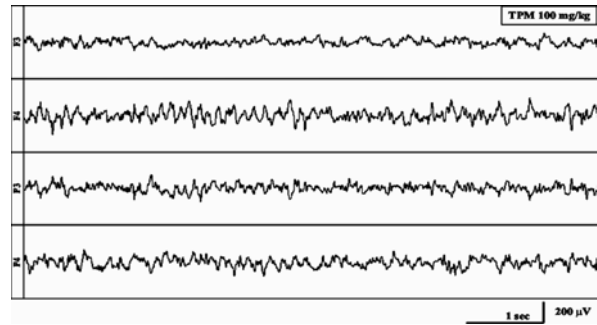
Şekil 3:

Pilokarpin (380 mg/kg) verildikten sonra 20 mg/kg dozda TPM uygulanan grubun ECoG kaydı.



Şekil 4:

Pilokarpin (380 mg/kg) verildikten sonra 60 mg/kg dozda TPM uygulanan grubun ECoG kaydı.

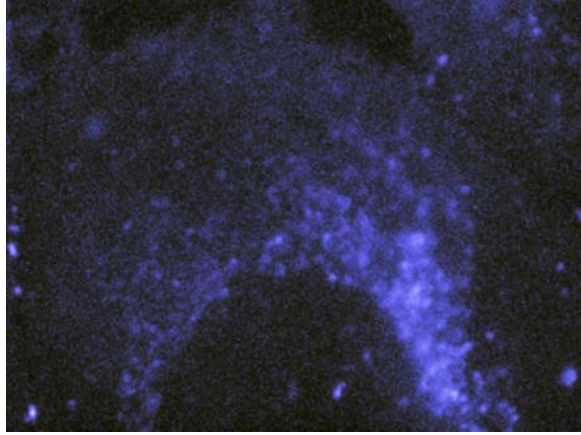


Şekil 5:

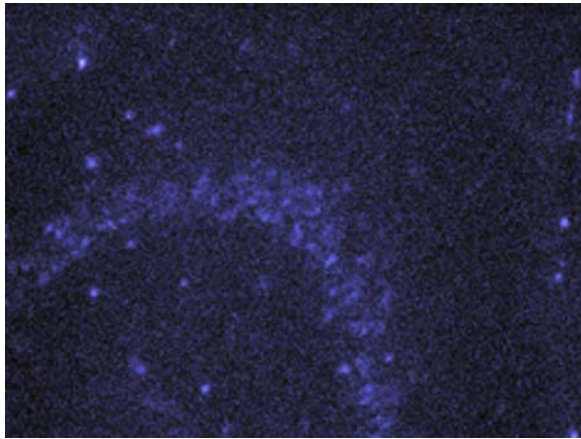
Pilokarpin (380 mg/kg) verildikten sonra 100 mg/kg dozda TPM uygulanan grubun ECoG kaydı.

Pilocarpin Epilepsisinde Topiramamat

Çinko iyonlarının translokasyonu açısından değerlendirildiğinde (TSQ boyama) yalnızca 100 mg/kg dozda TPM verildiğinde çinko iyonlarının postsinaptik nöronlara geçmediği gözlemlenirken, 20 ve 60 mg/kg dozda TPM ve nöbet kontrol gruplarında çinko iyonlarının postsinaptik nöronlara geçtiği gözlemlendi (Şekil: 6, Şekil: 7). Nöbet ile beraber TPM verilen gruplarla CaEDTA ile beraber TPM verilen gruplar karşılaştırıldığında olumlu yönde bir değişiklik görülmedi yine çinko iyonları ile beraber TPM verilen gruplarda da bir değişiklik saptanmadı.



*Şekil 6:
Hipokampusde Nöbet-Kontrol Grubuna ait TSQ floresan görüntüsü. Beyazlamalar (bleaching) çinko iyonlarının postsinaptik nöronlara geçişini göstermektedir.*



*Şekil 7:
Hipokampusde 100 mg/kg dozda TPM verilen ve nöbet oluşturulan gruba ait TSQ floresan görüntüsü. Beyazlamanın azaldığı ve sadece CA3 alanındaki yosunsu liflere ait presinaptik uçlarda çinko iyonlarının normal floresan verdiği görülmektedir.*

Tartışma

Çalışmamızda pilokarpin enjeksiyonundan 10 dakika önce uygulanan TPM'in antikonvulsan etkileri, özellikle 100 mg/kg dozda uygulanan TPM'in ECoG ve

davranışsal değişiklikler gibi parametreler üzerinde olumlu etkileri görüldü. Her ne kadar dozaj farklılıkları olsada pilokarpin ile oluşturduğumuz akut SE modelimizdeki bulgularımız insan ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda TPM'in belirtilen antikonvulsan etkisi ile paralel sonuçlardır⁶⁻⁸. 20 ve 60 mg/kg dozlarda SE insidansı ve nöbet skoru açısından azalma, 24 saat yaşam şansı açısından bir artış görülmekle beraber bu bulgularımız istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. TPM 100 mg/kg dozda verildiğinde sıçanların yaşama şanslarını önemli derecede yükseltirken, nöbet skorlarını ve SE insidansını da önemli derecede azaltmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 mg/kg TPM'in nöbet sırasındaki ECoG dalgalarının amplitüdlerinde ve frekanslarında azalmaya neden olduğu bulgumuz, SE'a girme oranı ve düşen nöbet skorları ile birbirini destekler niteliktedir ve antikonvulsan etkiyi göstermektedir. Bu akut antikonvulsan etki TPM'in etkisinin araştırıldığı EEG çalışmaları ile benzerlik göstermektedir^{10,46,47}. Ayrıca TPM'in nöbet frekansı üzerine fazla etkisi olmamasına rağmen yüksek dozlarda, spike amplitüdlerinde azalma eğilimi olduğu fakat bunun da istatistiksel olarak anlamsız olduğunu ileri süren çalışmalar da vardır¹³.

Çinkonun sinaptik transmisyonadaki rolünün fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda hala tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen veziküler çinkonun glutamat ile beraber epilepsi, beyin travması ve iskemi gibi durumlardan sonra aşırı salınımında nörotoksik bir hal aldığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir³¹⁻³⁴. Bu koşullarda çinko iyonları presinaptik veziküllerden salındıktan sonra postsinaptik nöronlara geçmekte ve nöronların hasarlanmasına veya ölümüne neden olmaktadır^{25,41-43,48,49}. Yaptığımız literatür taramasında TPM'in epileptik nöbetlerde beyinde çinko iyonlarının çeşitli kaynaklardan salınımı ve regülasyonu üzerine olan etkisine ait herhangi bir bilgiye rastlanamamıştır. Çeşitli histokimyasal boyama yöntemleri içerisinde TSQ boyaması hipokampusde çinkonun lokalizasyonunun belirlenmesi açısından tam duyarlı bir yöntemdir. Nöbet kontrol grubu TSQ boyamalarımızda bizde nöbet sırasında çinkonun yosunsu liflerin uçlarından postsinaptik nöronlara geçişini gözlemledik. Yine Suh ve arkadaşları⁴⁹ pilokarpin HCl enjeksiyonu yoluyla nöbet oluşturdukları sıçanlardan 24 saat sonra aldıkları hipokampal kesitlerinde neuropil floresansının azaldığını ve postsinaptik nöronlarda TSQ boyanması görüldüğünü dolayısıyla çinko translokasyonunun olduğunu gösterdiler. Oysa akut çalışmamızda 100 mg/kg dozdaki TPM grubunda TSQ boyaması sonucunda postsinaptik nöronlara geçiş görülmemiştir. Dolayısıyla bu dozda TPM çinkonun presinaptik uçlardan salınımını engellemiştir. Yapılan çalışmalarda i.c.v. CaEDTA (ekstrasellüler çinko şelatörü) enjeksiyonu ile çinko şelasyonu sonucu hipokampusdeki nöronal hasarın ve nöronal ölümün yavaşladığı saptanmıştır³⁶. Bizim çalışmamızda CaEDTA'nın bu tip bir etkisi

görülmemiştir. Benzer şekilde akut dönemde çinko şelatörünün etkisizliği daha öncede bildirilmiştir^{41,50}. İlginç olarak bazı çalışmalarda ekstraselüler çinko şelatörü CaEDTA'nın "ZnT₃-null mice" larda kainatla oluşturulan ve iki saatte sona erdirilen nöbet şiddetini azaltmadığı gösterilmiştir^{22,23}.

Sonuçta çalışmamızda 100 mg/kg TPM tedavisinin, SE insidansını azalttığını, nöbet skorunu düşürdüğünü, 24 saat yaşam şansını arttırdığını, ECoG'de spike'ların amplitüdlerinin ve frekanslarının daha düşük olmasına neden olduğunu gözlemledik. Ayrıca çalışmamız hipokampuste çinko iyonlarının postsinaptik nöronlara geçişini engellemesi nedeniyle TPM'in antiepileptik ve nöron koruyucu etkisi üzerine daha önce saptanmış olan yollarının yanı sıra beyin çinko iyonları üzerine de etki ederek antiepileptik etki göstermesinde rolü olabileceğini göstermektedir.

Kaynaklar

- Blackburn TP, Sloviter RS. Epilepsy, parkinson's disease, migraine and brain plasticity-the next paradigm shift? *Current Opinion in Pharmacology* 2003; 3: 3-5.
- Löscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences* 2002; 23(3): 113-8.
- McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 1994; 14(6): 3413-5.
- McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 1999; 399(6738 Suppl): 15-22.
- Soderpalm B. Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. *European Journal of Pain* 2002; 6(Suppl. A): 3-9.
- Shank RP, Gardocki JF, Vaught JL, et al. Topiramate: preclinical evaluation of structurally novel anticonvulsant. *Epilepsia* 1994; 35: 450-60.
- Wauquier A, Zhou S. Topiramate: a potent anticonvulsant in the amygdala-kindled rat. *Epilepsy Res* 1996; 24: 73-7.
- Bourgeois BF. New antiepileptic drugs. *Curr. Opin. Pediatr* 1996; 8: 543-8.
- Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, et al. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference. *Epilepsy Res* 1999; 34: 1-41.
- Rigoulot MA, Boehrer A, Nehlig A. Effects of topiramate in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the audiogenic Wistar AS. *Epilepsia* 2003; 44(1): 14-9.
- Niebauer M, Grunthal M. Topiramate reduces neuronal injury after experimental status epilepticus. *Brain Research* 1999; 837: 263-9.
- Borowicz KK, Luszczki JJ, Duda AM, Czuczwar SJ. Effect of topiramate on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in two models of experimental epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44(5): 640-6.
- Fisher A, Wang X, Cock HR, Thom M, Patsalos PN, Walker MC. Synergism between topiramate and bupropion in refractory status epilepticus in the rat. *Epilepsia* 2004; 45(11): 1300-7.
- Koh S, Jensen FE. Topiramate blocks perinatal hypoxia-induced seizures in rat pups. *Ann. Neurol* 2001; 50: 366-72.
- Kaminski RM, Banerjee M, Rogawski MA. Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology* 2004; 46: 1097-1104.
- Glauser T. Topiramate. *Epilepsia* 1999; 40(suppl 5): 71-80.
- Kanda T, Kurokawa M, Tamura S, Nakamura J, Ishii A, Kuwana Y, et al. Topiramate reduces abnormally high extracellular levels of glutamate and aspartate in the hippocampus of spontaneously epileptic rats (SER). *Life Sci* 1996; 59(19): 1607-16.
- Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Research Reviews* 2000; 34: 137-48.
- Takeda A, Minami A, Seki Y, Oku N. Differential effects of zinc on glutamatergic and GABAergic neurotransmitter systems in the hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* 2004; 75: 225-9.
- Weiss JH, Sensi SL, Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2000; 23: 365-71.
- Weiss JH, Sensi SL, Koh JY. Zn²⁺: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends in Pharmacological Science (TIPS)* 2000; 21: 395-401.
- Palmiter RD, Cole TB, Quaipe CF, Findley SD. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93:14934-9.
- Wenzel HJ, Cole TB, Bom DE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 94: 12676-81.
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CATHY J, Tompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. *J. Nutr* 2000; 130: 1471-83.
- Frederickson CJ. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol* 1989; 31: 145-238.
- Frederickson CJ, Klitenick MA, Manton WI, Kirkpatrick JB. Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res* 1983; 273: 335-9.
- Danscher G. The autometallographic zinc-sulphide method. A new approach involving in vivo creation of nanometer-sized zinc sulphide crystal lattices in zinc-enriched synaptic and secretory vesicles. *Histochem. J* 1996; 28(5): 361-73.
- Dudek FE. Zinc and epileptogenesis. *Epilepsy Currents* 2001; 1(2): 66-70
- Smart TG, Xie X, Krishek BJ. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog. Neurobiol* 1994; 42: 393-441.
- Frederickson CJ, Bush AI. Synaptically released zinc: Physiological functions and pathological effects. *BioMetals* 2001; 14: 353-66.
- Danscher G, Juhl S, Stoltenberg M, Krunderup B, Schroder HD, Andreasen A. Autometallographic silver enhancement of zinc sulfide crystals created in cryostat sections from human brain biopsies: a new technique that makes it feasible to demonstrate zinc ions in tissue sections from biopsies and early autopsy material. *J. Histochem. Cytochem* 1997; 45: 1503-10.
- Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, Rao SS, Weiss JH. Preferential Zn²⁺ influx through Ca²⁺-permeable AMPA/Kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96: 2414-9.
- Yin HZ, Weiss JH. Zn²⁺ permeates Ca²⁺ permeable AMPA/Kainate channels and triggers selective neural injury. *NeuroReport* 1995; 6: 2553-6.
- Yin HZ, Ha DH, Carriedo SG, Weiss JH. Kainate-stimulated Zn²⁺ uptake labels cortical neurons with Ca²⁺-permeable AMPA/Kainate channels. *Brain Res* 1998; 781: 45-55.
- Lee JY, Park J, Kim YH, Kim DH, Kim CG, Koh JY. Induction by synaptic zinc of heat shock protein-70 in hippocampus after kainate seizures. *Exp. Neurol* 2000; 161: 433-41.

Pilocarpin Epilepsisinde Topiramamat

36. Suh SW, Chen JW, Motamedi M, Bell B, Listiak K, Pons NF, et al. Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Research* 2000; 852: 268-73.
37. Gibbs JW, Shumate MD, Coulter DA. Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA_A receptor function in dentate granule and CA1 neurons. *J. Neurophysiol* 1997; 77: 1924-38.
38. Molnar P, Nadler JV. Synaptically-released zinc inhibits N-methyl- D- aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. *Brain Research* 2001; 910: 205-7.
39. Ben-Ari Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* 2001; 42(Suppl-3): 5-7.
40. Frederickson CJ, Hernandez MD, McGinty JF. Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Research* 1989; 480(1-2): 317-21.
41. Noyan B, Jensen MS, Danscher G. The lack of effects of zinc and nitric oxide in initial state of pilocarpine-induced seizures. *European Journal of Epilepsy* 2007; 16(5):410-6.
42. Tonder N, Johansen FF, Frederickson CJ, Zimmer J, Diemer NH. Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat. *Neurosci. Lett* 1990; 109: 247-52.
43. Koh JH, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 1996; 272: 1013-6.
44. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol* 1972; 32: 281-94.
45. Frederickson CJ, Kasarakis EJ, Ringo D, Frederickson RE. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J. Neurosci. Methods* 1987; 20(2): 91-103.
46. Rigoulot KE, Ferrandon A, Nehlig A. Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004; 308(2): 787-95.
47. Placidi F, Tombini M, Romigi A, Bianchi L, Izzi F, Sperli F, et al. Topiramate: effect of EEG interictal abnormalities and background activity in patients affected by focal epilepsy. *Epilepsy Research* 2004; 58: 43-52.
48. Standstead HH, Frederickson CJ, Penland JG. History of zinc as related to brain function. *J. Nutr* 2000; 130: 496-502.
49. Suh SW, Listiak K, Bell B, Chen J, Motamedi M, Silva D, et al. Detection of pathological zinc accumulation in neurons: methods for autopsy, biopsy, and cultured tissue. *J. Histochem. Cytochem* 1999; 47: 969-72.
50. Noyan B. Temporal Lob Epilepsi'sinde L-Arginine ve CaEDTA'nın Etkileri. *Uludağ Üniv. Tıp Fak. Dergisi* 31(1): 15-9, 2005.

Teşekkür

Bu çalışma TUBİTAK tarafından (Proje No:SBAG-HD-117, 106S012) desteklenmiştir.