



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı

79483

**SIÇANLARDA SİSTEMİK LİTYUM-PİLOKARPİN İLE
OLUŞTURULAN EPİLEPSİ MODELİNDE NİTRİK OKSİTİN
NÖBET AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

79483

(DOKTORA TEZİ)

GÜLDAL GÜLEÇ

T.C. YÜ
DOKÜMANI

Danışman: Prof. Dr. KASIM ÖZLÜK

Yrd. Doç. Dr. BEHZAT NOYAN

Bursa - 1998

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	1
SUMMARY	3
GİRİŞ	5
GEREÇ VE YÖNTEM	21
BULGULAR	27
TARTIŞMA VE SONUÇ	40
KAYNAKLAR	48
TEŞEKKÜR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	62

ÖZET

Bu çalışmada, lityum-pilokarpinle oluşturulan nöbetler üzerine, bir endojen nitrik oksit (NO) vericisi olan L-Arginine ve bir NO sentaz inhibitörü olan N^o-nitro L-arginine methyl ester'in (L-NAME) etkileri araştırıldı.

Deneylede 240-340 g ağırlığında 51 adet erişkin, erkek Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Deneysel çalışmalara başlanmadan önce, elektrokortikal aktivitenin kaydedilebilmesi amacıyla, tüm sıçanların kafatasına vida elektrodlar epidural olarak yerleştirildi ve bir hafta sonra deneyle başlandı.

Çalışma, lityum-pilokarpin (kontrol), L-Arginine ve L-NAME grupları olmak üzere üç grup şeklinde planlandı. Her grupta 15'er sıçan kullanıldı. Ayrıca cerrahi girişimin nöropatolojik hasara yol açıp açmadığını değerlendirebilmek için 4 sıçana yalnızca elektrodlar takılarak serum fizyolojik enjeksiyonları yapıldı (sham kontrol), 2 sıçana ise hiçbir işlem uygulanmadı (naif).

Kontrol grubundaki sıçanlara 3 mEq/kg LiCl (i.p.) verildikten 24 saat sonra 45 mg/kg pilokarpin HCl (i.p.) enjeksiyonu yapıldı. L-Arginine grubu sıçanlara 3 mEq/kg LiCl verildikten 24 saat sonraki pilokarpin enjeksiyonundan 30 dakika önce 300 mg/kg L-Arginine (i.p.) uygulandı. L-NAME grubu sıçanlara 3 mEq/kg LiCl verildikten 24 saat sonraki pilokarpin enjeksiyonundan 30 dakika önce 20 mg/kg L-NAME (i.p.) enjekte edildi.

L-Arginine ve L-NAME'in nöbet aktivitesi üzerine etkileri davranışsal ve elektrokortikografik olarak değerlendirildi. Deneyle sonrasında sıçanlar dekapite edilerek beyinleri çıkartıldı ve hipokampal CA1 ve CA3 alanlarında piramidal nöron sayımı yapıldı.

Pilokarpinden 30 dakika önce uygulanan L-Arginine sıçanların status epileptikusa (SE) girmesini önleyici etkinlik gösterdi. L-NAME'in ise nöbet aktivitesi üzerine etkisi olmadı, fakat 24 saatlik yaşam şansını anlamlı olarak azalttı. Tüm gruplarda, SE'a giren sıçanlarda CA1 ve CA3 alanlarında piramidal nöron sayıları SE'a girmeyen sıçanlara göre anlamlı olarak azaldı. L-Arginine ve L-NAME gruplarında SE'a giren sıçanlarda nöron kaybı, kontrol grubunda SE'a giren sıçanlardan anlamlı olarak fazlaydı.

Bu sonuçlar, L-Arginine'in 300 mg/kg dozda antikonvulsan etkinliğe sahip olduğunu, L-NAME'in ise 20 mg/kg dozda nöbetler üzerine etkisiz olduğunu, fakat bu modelde olasılıkla solunum sistemi üzerine etkisi ile mortaliteyi arttırdığını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Lityum, Pilokarpin, Epilepsi, L-Arginine, L-NAME

SUMMARY

The Effect of Nitric Oxide on Seizure Activity in Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy in Rats

The effects of an endogenous nitric oxide (NO) donor L-Arginine and a NO synthase inhibitor N^ω-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) on lithium-pilocarpine-induced seizures were investigated in this study.

51 adult male Wistar albino rats, weighing 240-340 g were used in this experiment. Before the experiments, all rats were implanted with epidural screw electrodes on their skulls in order to obtain electrocortical recordings. One week was allowed to pass before the experimental procedures.

The study was designed as three groups, namely lithium-pilocarpine (control), L-Arginine and L-NAME groups, each of which consisted of 15 rats. In addition, in order to evaluate the neuropathological damage that might be observed due to the surgical procedure, 4 rats were implanted with electrodes and received only saline injections (sham control) and 2 rats were used as naives.

Control rats received 45 mg/kg pilocarpine HCl (i.p.) 24 hours after 3 mEq/kg LiCl (i.p.) injection. Rats in the L-Arginine group were injected with 3 mEq/kg LiCl followed 24 hours later by 45 mg/kg pilocarpine and these rats received 300 mg/kg L-Arginine (i.p.) 30 minutes before the pilocarpine injection. Rats forming the L-NAME group were also

treated with 3 mEq/kg LiCl followed 24 hours later by 45 mg/kg pilocarpine and received 20 mg/kg L-NAME (i.p.) 30 minutes before the pilocarpine treatment.

The effects of L-Arginine and L-NAME on seizure activity were evaluated by means of behavioural and electrocorticographic parameters. At the end of the experiments, rats were decapitated, brains were removed and pyramidal cell counts were obtained from hippocampal CA1 and CA3 fields.

L-Arginine, injected 30 minutes before pilocarpine significantly prevented SE onset. L-NAME had no overt effect on seizure activity, but significantly decreased the 24-hour survival. In all groups, pyramidal cell counts from CA1 and CA3 fields in rats which had entered status epilepticus (SE) were significantly lower than those in rats that had not displayed SE. The neuronal loss induced by SE in L-Arginine and L-NAME groups was significantly greater than that induced by SE in control rats.

These results suggest that, the 300 mg/kg dose of L-Arginine possesses anticonvulsant activity, while 20 mg/kg L-NAME has no overt effect on seizure activity, but increases mortality in this model, possibly due to an effect on the respiratory system.

Key words: Lithium, Pilocarpine, Epilepsy, L-Arginine, L-NAME

GİRİŞ

Santral sinir sisteminde (SSS) nöron popülasyonlarının bozuk, senkron ve ritmik deşarjlarına bağlı geçici davranış değişikliklerine nöbet denir. Epilepsi ise nöbetlerin periyodik ve tahmin edilemeyen tekrarlanmalarıyla karakterize olan, beyin fonksiyonlarındaki bir bozukluktur (1). Epileptik bir atak klinik olarak, hareketlerde kısa süreli bir duraklama ya da geçici düşünce bozukluğundan jeneralize klonik ve tonik hareketlere kadar çok farklı görüntülerle ortaya çıkabilir (2).

Epileptik nöbetler başlıca parsiyel ve jeneralize nöbetler olarak sınıflandırılmaktadır. Parsiyel nöbetler bir kortikal bölgede fokal olarak başlar. Basit parsiyel bir nöbette bilinç korunurken, kompleks parsiyel nöbetlere bilinç bozukluğu eşlik eder. Kompleks parsiyel nöbetler sıklıkla temporal lobdan kaynaklanırlar. Jeneralize nöbetlerde ise başlangıçtan itibaren her iki hemisfer korteksinin tutulumu vardır. Absans, myoklonik, tonik, klonik, tonik-klonik ve atonik nöbetler jeneralize nöbetlerdir. Diğer bir sınıflandırmada ise bilinen bir etyolojiye sahip epilepsiler (semptomatik veya sekonder epilepsi), idyopatik (primer) epilepsilerden ayrılır (3-5).

Epilepsinin moleküler ve hücresele temellerini açıklamak için çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Bunlar; a) nöronal membranda, başlıca iyon transportu veya iyon kanallarının özelliklerinde bir defektin varlığı, b) inhibitör mekanizmalarda, başlıca γ -aminobutirik asit (GABA)-aracılı rekürren inhibisyonda bir yetersizlik olması, c) eksitator sistemlerdeki bir

defekte bağı olarak aşırı eksitasyon gelişmesi ve d) eksitatör ve inhibitör fonksiyonları yöneten düzenleyici sistemlerde bir bozukluk olması şeklinde sıralanabilir (6).

Status epileptikus (SE), çok uzun süren ya da ataklar arasında iyileşme olmayacak kadar sık olan nöbetleri tanımlar. Bazı araştırmacılar bu süreyi 30 dakika olarak kabul ederken, diğerleri SE teriminin kullanılabilmesi için nöbetlerin 60 dakika boyunca sürmesi gerektiğini belirtmektedirler (7). SE'a bağı nörolojik sekeller üç ana grupta toplanmaktadır. Bunlar epileptik beyin hasarı, nörolojik/bilişsel bozukluklar ve spontan rekürren nöbetlerle (SRN) giden epilepsidir (8).

Temporal lob epilepsisi, yaygın görülen ve sıklıkla refrakter bir paroksizmal bozukluk olup, hipokampus ve temporal lobdaki diğer limbik yapılarda elektrofizyolojik ve nöropatolojik anomalilerle ilişkilidir (9). En sık görülen ortak nöropatolojik bulgu, hipokampal veya Ammon boynuzu sklerozu olarak bilinen, hipokampusta nöron kaybı ve gliosistir (2,10). Hipokampal sklerozda karakteristik olarak dentat hilustaki nöronlarda ve hipokampal piramidal hücrelerde belirgin kayıp vardır (11). Mesial temporal skleroz terimi Ammon boynuzu sklerozu ile end folium sklerozunu kapsar (10).

Hipokampus, epilepsi ile ilişkili beyin hasarına en duyarlı yapılardan biridir ve limbik nöbetlerin gelişmesi ve sürdürülmesinde önemli rol oynar. Hipokampal formasyon; hipokampus, dentat girus ve subikulumdan oluşur. Hipokampus; polimorfik tabaka, piramidal hücre tabakası ve moleküler tabaka olmak üzere üç tabakalı bir yapıdır. Piramidal hücre tabakasındaki büyük piramidal hücreler hipokampustaki en karakteristik hücre tipidir. Piramidal hücre tabakası CA1-CA4 olmak üzere 4 alandan oluşur. CA4 alanı dentat girusun polimorfik zonuna uyar. CA3 ve CA2 alanları birlikte inferior bölgeye, CA1 alanı ise superior bölgeye uymaktadır. Subikulum ise CA1'e komşudur (12,13).

Dentat girus da moleküler, granüler ve polimorfik tabakalar olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Dentat girusta en fazla bulunan ve en karakteristik hücreler granüler hücrelerdir.

Granüler hücreler tek bir tabaka şeklinde dizilmiş olup apikal dendritleri moleküler tabakaya yönelmiştir. Dentat girusun kurvaturu, end folium da denilen, CA4'ün polimorfik hücre tabakasını ve CA3'ün piramidal hücre tabakasının proksimal parçasını içeren hilus bölgesini içine alır. CA3 alanı en büyük piramidal nöronları içerir. CA1 alanı CA2'den subikulumu uzanan küçük piramidal hücrelerden oluşur. Subikulum, CA1 yanında tek tabakalı bir yapı olarak başlar ve giderek çok tabakalı bir yapıya dönüşür. Subikulumun moleküler tabakası içinde, perforan yol entorhinal bölgeden hipokampusa uzanır (12,13).

Hipokampus esas hücreler ve aranöronlar olmak üzere iki temel nöron tipinden meydana gelir. Esas hücreler eksitator niteliklidir ve hem lokal, hem de başlıca diğer eksitator nöronlarda sonlanan uzak bağlantılar yaparlar. Hipokampusa gelen başlıca eksitator input perforan yol aracılığıyla'dır. Entorhinal korteksten kaynaklanan lifler, dentat granüler hücrelerin dendritleri ile birlikte dentat moleküler tabakanın 2/3 dış kısmında sonlanırlar. Dentat granüler hücrelerin aksonları yosunsu lifler adını alır ve CA3 piramidal hücrelerinin dendritleri ve hilustaki yosunsu hücrelerle sinaps yapar. Hipokampustaki polisinaptik eksitator yoldaki bir sonraki bağlantı CA3 piramidal hücre aksonlarının (Schaffer kollateralleri) CA1 piramidal hücre dendritlerinde sonlanmasıyla gerçekleşir. Bu hücrelerin aksonları da daha sonra subikulum ve entorhinal kortekse yönelir (12-15). Bu eksitator yollar çeşitli tiplerde inhibitör aranöronlarla düzenlenir (14,16). Başlıca iki ana aranöron popülasyonundan söz edilebilir: Granüler hücreleri innerve eden GABA içeren hücreler ve dentat ipsilateral/komissural projeksiyonların bir parçasını oluşturan somatostatin hücreleri (16). Ayrıca, immunositokimyasal yöntemlerle, nörokimyasal içeriklerine göre kalretinin, parvalbumin, kalbindin, kolesistokinin, somatostatin, vazoaktif intestinal polipeptid ve nöropeptid Y içeren aranöron toplulukları belirlenmiştir. İnhibitör aranöronlar, dentat granüler hücrelerden yosunsu lifler aracılığıyla ve bunun yanı sıra yosunsu hücreler ve somatostatin hücrelerinden de doğrudan eksitator input alırlar. Bu inhibitör hücreler de hem dentat granüler hücreleri hem de piramidal

nöronları inhibe ederler. Hipokampal GABAerjik nöronların bir bölümünün disinhibitör etkinlik gösterdiği de bildirilmiştir (14).

Nöron kaybı ve gliosis ile ilgili düşünceler üç ana grupta toplanabilir: 1) Doğum travması gibi epilepsiden bağımsız bir faktöre bağlıdır, 2) uzun süren başka bir nedene bağlı epilepsinin sonucudur, 3) erken çocukluk dönemindeki uzamış bir nöbete bağlıdır (17). Mesial temporal lobdaki bu gliotik değişikliklerin kompleks parsiyel nöbetleri tetiklediği açıktır.

Sklerotik hipokampusun rezeksiyonunun epileptik durumda dramatik bir iyileşmeyle veya tam tedaviyle sonuçlanması, sklerotik hipokampusun epilepsiye neden olduğunu düşündürmektedir. Sagar ve ark. (17), ilaca dirençli psikomotor epilepsi nedeniyle anterior temporal lobektomi uygulanmış hastalardan elde edilen örneklerde yaptıkları nöropatolojik incelemeler sonucunda, erken çocukluk dönemindeki ağır bir konvulsiyonun Ammon boynuzu sklerozuna karakteristik nöron kaybından sorumlu olduğu, buna karşın daha hafif ve nonspesifik nöron kaybının uzun yıllar boyunca süregelen epilepsiden kaynaklandığı sonucuna varmışlardır. Bertram ve ark. (18), limbik nöbetler ve limbik SE oluşturdukları sıçanların hipokampuslarının morfometrik analizinde, akut olayın hipokampusta nöron kaybına neden olduğunu, fakat tekrarlayan nöbetlerin kümülatif etkisinin ilerleyici bir hasara yol açmadığını göstermişlerdir. Bununla birlikte, tutuşma (kindling) modeliyle oluşturulan ardışık nöbetlerden sonra ilerleyici nöron kaybı olduğu (19) ve intrahipokampal kainik asit (KA) enjeksiyonundan sonra hücre kaybının zamanla arttığı (20) gösterilmiştir.

İnsanlarda kriptojenik (hipokampustan kaynaklanan ve belirgin bir odak bulunmayan) epilepside, dentat hilusta, özellikle polimorfik zonda somatostatin ve nöropeptid Y içeren aranöronlarda selektif kayıp saptanmış, buna karşın belirgin GABAerjik nöron kaybı gözlenmemiştir (21). Glutamik asit dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif hücrelerin korunduğu, Babb ve ark. (22) tarafından epileptik hastalardan elde edilen hipokampal örneklerde de gösterilmiştir.

Çeşitli SE modellerinde, epileptik hasara duyarlılık açısından nöronlar, somatostatin içeren aranöronlar > CA3 nöronları > CA1 nöronları > dentat granüler nöronlar > GABA veya GAD içeren nöronlar şeklinde sıralanmıştır (22,23).

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, hipokampustaki selektif nöron kaybının kalan nöronlarda sinaptik reorganizasyona neden olduğu gösterilmiştir (19,24-31). Hipokampal sklerozda olduğu gibi, CA3 ve CA4 alanlarındaki hipokampal nöron kaybına, CA4'ün hiler nöronlarından dentat girusun iç moleküler tabakasına uzanan komissural-assosiasyonel yolların dejenerasyonu ve yosunsu lif aksonlarının denerve bölgeye filizlenmesi eşlik eder. Bu filizlenen aksonlar morfolojik olarak intakt, eksitator sinaptik terminaller oluştururlar (24). Yosunsu liflerdeki bu lezyona bağlı sinaptik reorganizasyon, Timm metodu olarak bilinen, yüksek miktarda çinko içerikleri nedeniyle yosunsu lif sinaptik terminallerini boyayan histokimyasal yöntemle gösterilebilir (32).

KA verilen sıçanlarda tedavi sonrası yosunsu liflerin filizlendiği gösterilmiştir (24). CA3 ve CA4 aksonlarının dejenerasyonu, bu aksonlarla innerve olan bölgelerdeki sinapsların kaybına yol açmaktadır. Dentat hilustan akson kollateralleri filizlenerek fascia dentatanın granüler hücre tabakasına doğru uzanmakta ve moleküler tabakanın iç üçte birlik kısmında terminal bir pleksus oluşturarak aberran eksitator bağlantılar yapmaktadırlar. Buna göre, yosunsu liflerin filizlenmesi, limbik nöbet aktivitesinin gelişmesini ve yayılmasını sağlayan bir eksitator devre oluşturmaktadır ve epilepside anormal eksitabilitenin gelişmesi ve sürdürülmesinden sorumlu olabilir.

Yosunsu lif filizlenmesi KA modeline özgü ya da yalnızca hipokampal nöronların kaybına bağlı değildir. Deney hayvanlarında, CA4 bölgesinde belirgin bir hasar oluşturmayan perforan yolun elektriksel stimülasyonu ile de filizlenme olduğu ve Timm granüllerinin son stimülasyondan 5 ay sonra da mevcut olduğu gösterilmiştir (25). Frotscher ve ark. (27), erişkin sıçanlarda, fascia dentataya giden entorhinal ve komissural afferentlerin eşzamanlı

çıkarmasıyla dentat granüler hücreleri denerve ettiklerinde, yosunsu liflerin dentat moleküler tabakanın iç kısımlarına filizlendiğini göstermişler ve bunun dentat granüler hücre akson ve dendritlerinin plastisitesinin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Stanfield (26), genetik olarak spontan nöbetler geçiren, fakat belirgin deafferentasyon bulgusu göstermeyen ataksik farelerde de intra-ve supragranüler yosunsu lifleri saptamıştır. Bu gözlemler, anormal aktivitenin tek başına nöronal yolların yapısal reorganizasyonuna neden olabileceğini ve bunun da epileptogenezise yol açabileceğini düşündürmektedir (25).

Sutula ve ark. (9), refrakter parsiyel kompleks epilepsi nedeni ile temporal lobektomi uygulanan hastaların dentat girus ve hipokampuslarını incelemişlerdir. Epileptik kişilerin dentat girusunda supragranüler bölge ve iç moleküler tabakada yoğun boyanan Timm granülleri ve çok sayıda yosunsu lif sinaptik terminalleri saptamışlardır. Buna karşılık nonepileptik primatların dentat girusunda supragranüler bölgede Timm granüllerine rastlanmamıştır. Araştırmacılar, supragranüler Timm granüllerinin epileptik insan hipokampusunun tutarlı bir özelliği olduğunu ve yosunsu liflerin, başlıca projeksiyonları olan CA3 ve CA4 nöronlarının yanı sıra, dentat girusun iç moleküler tabakasının supragranüler bölgesinde de sonlandıklarını bildirmişlerdir.

Temporal lob epilepsisinin patogenezini açıklamaya yönelik bir diğer hipotez ise “uyuyan sepet hücresi” hipotezidir (33). Buna göre, hilustaki eksitator nöronların, belki de yosunsu hücrelerin nöbete bağlı ölümü GABAerjik sepet hücreleri üzerindeki eksitator inputun ortadan kalkmasına neden olur ve yosunsu hücreler tarafından aktive olmayan sepet hücreleri uyur duruma geçerler. Bir kez başladıktan sonra, bu inhibisyonun parsiyel kaybı ile birlikte eksitator sinaptik input granüler hücrelerin aşırı deşarjına, hücre ölümünün ilerlemesine ve başlangıçtaki olaydan yıllar sonra epileptik durumun gelişmesine neden olabilir.

Temporal lob epilepsisinin oldukça sık görülmesi ve konvansiyonel ilaç tedavisine sıklıkla dirençli olması nedeniyle deneysel çalışmalar bu konu üzerinde yoğunlaşmış ve insan

temporal lob epilepsisinin özelliklerini taklit eden çeşitli deneysel modeller ileri sürülmüştür. İnsan temporal lob epilepsisine uygunluk göstermesi açısından, deneysel modellerin bazı kriterlere sahip olmaları gerekmektedir (23): a) Hipokampus, amigdala ve diğer limbik yapılar semptomatolojide esas rolü oynamalıdır; b) Ammon boynuzu sklerozuna uyan beyin hasarı oluşmalıdır; c) Temporal lob epilepsisi tipinde spontan ve tekrarlayan nöbetler görülmelidir; d) İnsan temporal lob epilepsisine paralel olarak antikonvulsanlara dirençli olmalıdır.

Turski ve ark. (34), 1982 yılında kolinerjik agonistler olan karbakol ve betanekolün amigdalaya ya da dorsal hipokampusa mikroenjeksiyonunun sıçanlarda uzun süreli limbik nöbetlere ve beyin hasarına yol açtığını göstermişler, diğer bir kolinerjik muskarinik agonist olan pilokarpinin sistemik uygulanmasının da konvulsif aktiviteye ve yaygın beyin hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir. Pilokarpinin 300-400 mg/kg i.p. enjeksiyonundan sonra nöropatolojik değişiklikler piriform korteks, entorhinal korteks, klastrum, amigdala, dorsal, lateral ve ventromedial talamik nukleuslar, anterior olfaktor nukleuslar, hipokampal CA1, CA3 ve CA4 alanları, substansiya nigra ve neokortekste saptanmıştır. Rhinal sulkusun dorsalindeki temporal korteks ve singulat korteks pilokarpine özellikle duyarlı bulunmuştur. Araştırmacılar, kolinerjik muskarinik reseptörlerin aşırı stimülasyonunun limbik nöbetlere ve beyin hasarına yol açabileceğini ve muskarinik kolinerjik mekanizmaların temporal lob epilepsisi ve epileptik beyin hasarının etyolojisi ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Honchar ve ark. (35), affektif bozukluğu olan hastalarda kullanılabilecek olarak eş dozlarda lityumun, sıçanlara subkonvulzif dozlarda kolinerjik agonistlerden önce uygulanmasının nöbetlere yol açtığını göstermişlerdir. Bu etkiden lityumun fosfoinositid metabolizmasında oluşturduğu değişikliklerin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (35,36). Lityumun kolinerjik agonistlerin etkilerini potansiye ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiş (37-39), fakat bu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Lityumun asetilkolin sentez

ve salınımını stimüle edebileceği bildirilmiştir (40). Lityum ve pilokarpinin cGMP üretiminin stimülasyonundaki additif etkilerinin nöbet başlamasında rolü olabileceği ileri sürülmüştür (41).

Lityum, isoprenaline yanıt olarak oluşan ikincil habercileri azaltarak bu sistemlerin fonksiyonel aktivitesini azaltmaktadır (42). Casebolt ve ark. (43,44), kronik lityum verilen sıçanlarda, inositol fosfolipid metabolizmasının aracılık ettiği noradrenalinle uyarılan sinyal iletilişinin azaldığını göstermişler ve bu etkinin reseptör sayısı ya da reseptör-guanin nükleotid bağlayan protein eşleşmesindeki değişikliklere bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Kolinergik ve noradrenerjik sistemler birbirlerinin aktivitesini dengelerler ve lityum, noradrenalinin fonksiyonuna inhibitör etkiler gösterdiğinden (42-44), lityumun prokonvulsan etkisini bu yolla göstermesi olasıdır. Diğer bir olasılık da lityumun eksitatör aminoasit (EAA) nörotransmitterlerin etkilerini fasilite etmesidir (39). Bu doğrudan bir etki olmayıp, kolinergik ve EAA nörotransmitter sistemleri arasındaki bir etkileşime bağlı olabilir.

Lityum-pilokarpinle oluşturulan limbik nöbetler ve SE'un davranışsal, elektrografik ve nöropatolojik özellikleri oldukça iyi tanımlanmıştır. Sıçanlarda sistemik olarak 3 mEq/kg lityum klorür verildikten 20-24 saat sonra 30 mg/kg sistemik pilokarpin HCl verilmesi, saatlerce süren ve genellikle 24 saat içinde ölümlü sonuçlanan jeneralize konvulsif SE'a neden olmaktadır (35,37-39,45). Davranışsal bulgular, pilokarpin enjeksiyonundan sonra ilk 5 dakika içinde periferik kolinergik stimülasyona bağlı piloereksiyon, salivasyon, diürez gibi bulguları takiben kaşınma, çiğneme, ıslak köpek titremeleri gibi çeşitli davranışsal otomatizmalar, baş sallama, arka ayaklar üzerine kalkma ve ön ayak klonusu ve sonuçta jeneralize konvulsif SE'dan oluşmaktadır (35,37).

SE'da EEG paterni aşamalı olarak değişmektedir. SE tüm kanallarda eşzamanlı olarak ve aniden sonlanan birbirinden ayrı elektrografik nöbetlerle başlar ve bunu düşük voltajlı yavaş bir postiktal patern izler. Daha sonraki aşamada bu postiktal patern izlenmez ve epileptiform aktivite amplitüd ve frekans açısından yükselip alçalsa da tamamen kaybolmaz. Bunu sürekli,

yüksek amplitüdü, hızlı spike'lar takip eder. Bu dönemde izoelektrik EEG peryotları görülebilir. Bu peryotlar frekans ve süre açısından giderek büyür ve sonuçta göreceli olarak düz bir zemin aktivitesi üzerinde periyodik epileptiform deşarjlar (PED) gözlenir (45,46).

Honchar ve ark. (35), 4 saatlik nöbet aktivitesini takiben yaptıkları ultrastrüktürel incelemelerde dendritlerde yoğun şişme, nöron gövdelerinde şişme veya "dark cell" dejenerasyonu, etkilenen nöron gövdelerine komşu astroglialarda da şişme olduğunu, buna karşın aksonların büyük oranda korunduğunu göstermişlerdir. En fazla etkilenen beyin bölümleri piriform ve entorhinal korteks, çeşitli talamik ve amigdaloid nukleuslar, hipokampus, septum ve serebral korteks olarak saptanmıştır.

Cavalheiro ve ark. (47), Wistar türü sıçanlarla yaptıkları çalışmada, 380 mg/kg i.p. pilokarpin ile SE oluşturmuşlar ve SE'tan kurtulan sıçanlarda, pilokarpinden 4-44 gün sonra SRN'ler geliştiğini gözlemlemişlerdir. SRN'lerin süresi genellikle 50-60 saniyeyi aşmamış, hipokampusta spike aktivite burst'leri olarak başlayıp sonra kortekse yayılmış ve davranışsal olarak yüz otomatizmaları, baş sallama, ön ayak klonusu, arka ayaklar üzerine kalkma ve düşme gözlenmiştir. SRN'ler bir latent dönemden sonra 120 gün boyunca sabit frekansta devam etmiştir. Beyinlerin morfolojik incelenmesinde hipokampus, talamus, amigdaloid kompleks, piriform ve entorhinal korteks, neokorteks ve substansiya nigrada karakteristik hasar saptanmıştır. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, beyinde ve başlıca temporal lobdaki yapısal hasarın sıçanlarda SRN'leri tetikleyebileceğini ve kronik epilepsi gelişimine neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Diğer bir çalışmada, Mello ve ark. (29) Sprague-Dawley türü sıçanlarda 350 mg/kg i.p. pilokarpin ile SE oluşturmuşlar ve yüksek mortaliteyi önlemek için SE'dan 1 saat sonra ve gerekirse 3 ve 5 saat sonra i.p. 4 mg/kg diazepam ile nöbetleri durdurmuşlardır. Araştırmacılar pilokarpin enjeksiyonundan sonra belirli zamanlarda sıçanları dekapite ederek, hipokampusta granüler hücre yosunsu liflerini görünür hale getirmek için Neo-Timm boyaması ve komşu

kesitlerde hücre sayımı yapmışlardır. Sıçanlarda 5-34 günlük sessiz bir dönemden sonra SRN'lerle karakterize kronik epilepsi gelişmiş, SRN'ler sıçanların izlendiği 325 gün boyunca sürmüş ve pilokarpinle SE'a girmeyen hiçbir sıçanda SRN görülmemiştir. Nöropatolojik incelemede, yaygın hücre kaybı septum, olfaktor tüberkül, amigdala, piriform korteks, hipokampal formasyon, neokorteks ve talamik nukleuslarda görülmüştür. Hipokampusun hücre sayımı yapılan tüm bölgelerinde hücre yoğunluğu azalmış (dentat granüler hücre tabakası, hilus, CA3, CA1 ve subikulum), fakat tüm hayvanlarda hücre yoğunluğunun kontrolün % 70'inden düşük olduğu tek bölge hilus olarak saptanmıştır. Supragranüler yosunsu lif terminal boyanmasının derecesinin enjeksiyondan sonra zamanla arttığı gösterilmiştir. Filizlenme en erken 4. günde başlamış ve 100 gün sonra platoya ulaşmıştır. SRN'ler sürmesine karşın hücre kaybı zamanla artmamıştır. Yine bu çalışmada, CA3 alanındaki hücre kaybı ile sessiz dönem arasındaki paralel ilişki, bu alanın epileptogenezdeki rolünü göstermektedir. Daha az hücre kaldıkça, epileptojenik uyarının davranışsal nöbet oluşturması, yani epileptik aktivitenin yayılması için gereken süre artmaktadır. Belirli bir noktadan sonra hipokampal hücre kaybı nöbetleri durdurmaktadır; temporal lobektominin terapötik etkisi ve bu deneyde en fazla hücre kaybı olan sıçanda SRN görülmemesi bunun kanıtıdır. Araştırmacılar, pilokarpin modelinde, klinik epilepside olduğu gibi, sessiz dönemin, bir başlatıcı olayın kalıcı beyin hasarı oluşturduğu aktif sinaptik reorganizasyon (filizlenme) aralığını temsil ettiğini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde, farelerde yapılan bir çalışmada da (31), 340 mg/kg i.p. pilokarpinle oluşturulan SE'dan 4-42 gün sonra SRN'ler görüldüğü ve dentat girusun supragranüler tabakasında filizlenme saptandığı bildirilmiştir.

Pilokarpinden önce atropin verilmesi bu modelde nöbet aktivitesini tamamen önlerken, SE başlangıcından kısa bir süre sonra uygulandığında da süregelen nöbetleri durdurur (35,37,38). Fakat eğer atropin ön ayak klonusu başladıktan 20 dakika sonra verilirse devam eden nöbetler üzerine etkisi olmaz (37). Bu durum, bu modelde SE'un başlamasından kolinerjik

stimülasyonun sorumlu olduğunu, buna karşın sürdürülmesinde başka nörotransmitter sistemlerinin de rol aldığını göstermektedir. Yüksek afiniteli kolin transportunun potent bir inhibitörü olan hemikolinyum-3 pilokarpinden önce verildiğinde SE gelişimini önler ve mortaliteyi azaltır (37). Buna göre, presinaptik kolinerjik aktivite SE gelişimini düzenlemektedir.

Lityum-pilokarpin ile oluşturulan nöbetleri diazepamın önlediği gösterilmiştir (37,38,48). Bununla birlikte, Morrisett ve ark. (38) pilokarpinden 60 dakika sonra verildiğinde diazepamın SE'ü durdurmadığını bildirmişlerdir. Jeneralize konvulsif nöbetlerin tedavisinde kullanılan fenobarbital, fenitoin, karbamazepin ve paraldehid nöbetlerin oluşumunu önlerken, SE tam olarak oluştuğunda paraldehid dışındaki ajanlara direnç göstermiştir.

Jope ve ark. (49), lityum-pilokarpinle oluşturulan SE'un asetilkolin konsantrasyonu, sentez ve salınımı ile kolin konsantrasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Lityum-pilokarpin verilen sıçanlarda, başlangıçta (15 dk) kortekste asetilkolin konsantrasyonu hafifçe düşmüş, 24. dakikadan itibaren sürekli bir yükselme görülmüş ve pilokarpinden 2.5 saat sonra pik yapmıştır. Hipokampusta da aynı değişimler görülmüştür. Striatumda nöbetler öncesi asetilkolin konsantrasyonu düşmüş ve SE'un başlangıç döneminde de düşük seyretmiştir. Daha sonra diğer bölgelerdeki kadar olmamakla birlikte artış göstermiştir. SE sırasında kolin konsantrasyonu üç bölgede de artmıştır. Araştırmacılar ayrıca korteks ve hipokampusta biriken asetilkolinin başlıca hücre içine yerleşmiş bulunduğunu, kortikal dilimlerde, nöbet geçiren sıçanlarda asetilkolin salınımının kontrollerden daha fazla olduğunu ve asetilkolinesteraz aktivitesinin SE'ta değişmediğini saptamışlardır. Buna göre, lityum-pilokarpinle oluşturulan SE'un asetilkolin sentezinin regülasyonunu değiştirdiğini ileri sürmüşlerdir.

Presinaptik terminallerden salınan asetilkolin nörotoksik değildir. Çünkü hipokampusun yüksek dozlarda asetilkolin ile perfüzyonu nörotoksik bir etki oluşturmaz. Oysa glutamat ve aspartat hipokampusta epilepsiyle ilişkili hasarın tüm özellikleriyle ortaya çıkmasına neden olur

(50). Glutamatın aşırı sinaptik salınımı hızla depolarizasyona ve membranların yıkımına neden olur. Asetilkolinin sinaptik salınımı ise membran yıkımına neden olmaksızın nöronları SE'taki gibi sürekli ateşleme durumunda tutar. Kolinoseptif nöronların hiperstimülasyonunun glutamaterjik ya da asparterjik nöronların sekonder olarak aşırı aktivasyonuna yol açması kolinerjik nöbetlerde oluşan nöronal dejenerasyonu açıklayabilir (51). Glutamatın presinaptik aşırı salınımı postsinaptik N-methyl-D-aspartate (NMDA) ve non-NMDA reseptörlerini aktive eder. NMDA reseptörünün iyon kanalından kalsiyumun hücre içine girmesi ve hücre içi depolardan kalsiyum salınması hücre içi kalsiyum düzeyini arttırarak, nöronları irreversibl olarak hasarlayan kalsiyuma bağlı enzimleri aktive eder (7).

Lityum-pilokarpine bağlı SE'un öncesinde ve çeşitli dönemlerinde, belirli beyin bölgelerinde aminoasit konsantrasyonları ölçülmüştür (46). Neokortekste aspartat düzeyleri, özellikle sürekli spike'lar ve PED dönemlerinde anlamlı olarak düşmüştür. Motor kortekste glutamat düzeyleri sürekli spike'lar ve PED dönemlerinde anlamlı olarak düşük, PED döneminde glutamin ve GABA düzeyleri yüksek bulunmuştur. Substansiya nigrada EAA'ler yönünden en belirgin düşüş saptanmış, GABA konsantrasyonu ise yükselmiştir. Hipokampusta aspartat düzeyleri aralıklı nöbetler döneminde anlamlı olarak düşmüş ve sürekli spike'lar ve PED döneminde daha da düşmeye devam etmiştir. GABA düzeyleri sürekli spike ve PED gruplarında artmıştır. Buna göre, aspartat ve glutamat nöbetlerin başlangıcından sürekli spike dönemine kadar hızla salınarak doku konsantrasyonlarında anlamlı azalmaya yol açarlar. GABA düzeylerinin artması ise, GABA sentezinin devam ederken salınımının bozulduğu ve beyin dokusunda biriktiği şeklinde açıklanmıştır.

Buna karşılık, Smolders ve ark. (52), intrahipokampal pilokarpin uygulaması sırasında ekstrasellüler glutamat ve GABA düzeylerinde düşme, limbik nöbetlerin başlamasıyla da her iki aminoasitte de artış saptamışlar ve bu artıştan kolinerjik sistemin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, hipokampusun NMDA reseptör antagonisti MK-801 ile

perfüzyonu nöbetleri tamamen önlemiş ve ekstrasellüler glutamat artışı gözlenmemiştir. Bu bulgular da kolinomimetiklerle oluşturulan epilepside EAA'lerin ve NMDA reseptör aktivasyonunun sekonder rolünü kanıtlamaktadır.

Hipokampusun MK-801 ile perfüzyonunda, hipokampal dopamin salınımının üç kat arttığı saptanmıştır. Hipokampusta dopaminerjik aktivitenin artması antikonvulsan etkiye aracılık eder. Buna göre, MK-801'in antikonvulsan etkisi kısmen hipokampal dopamin salınımını arttırmak yoluyla olabilir (52).

Ormandy ve ark. (39), lityum-pilokarpinle oluşturdukları SE modelinde, MK-801'in elektriksel nöbet aktivitesinin başlangıç dönemlerini önlemediğini, buna karşın doza bağımlı olarak jeneralize konvulsif SE gelişimini engellediğini göstermişler ve MK-801'in nöbetleri başlatan kolinerjik tetikleyici mekanizmayı etkilemediğini, NMDA reseptörlerinin akut nöbetlerin SE'ya dönüşümünde rol oynadığını bildirmişlerdir. Yine, diğer bir nonkompetitif NMDA reseptör antagonisti olan ketaminin, SE başladıktan 15 dakika sonra uygulanmasının beyin hasarından anlamlı olarak koruması, NMDA reseptörünün nöron hasarı ile sonuçlanan olaylardaki rolünü desteklemektedir (53).

Yüksek doz pilokarpin nöbetlerinin, GABA'nın sentetik enzimi GAD'ın aktivitesini substansiya nigra, tektum, septum, temporal korteks, hipokampus, amigdala/piriform korteks ve talamusta azalttığı ve oluşan beyin hasarının GAD aktivitesinde defisit olan bölgelerle paralel olduğu gösterilmiştir. Buna göre pilokarpinle oluşan SE'yu GABA-aracılı inhibisyonda bir disfonksiyon izlemektedir (48). GABAerjik devreler, aşırı glutamat/aspartat salınımına bağlı olarak limbik kompleks parsiyel nöbetlerin erken dönemlerinde fonksiyonlarını yitirebilirler. Bu da nöbet aktivitesinin devamından ve ciddi beyin hasarından sorumlu olabilir (51).

NMDA reseptörü stimülasyonu ile ortaya çıkan bazı fizyolojik ve patolojik etkilere nitrik oksit (NO) aracılık ettiği bilinmektedir. Serebellar hücre süspansiyonlarında (54) ve primer kortikal kültürlerde (55), NMDA reseptörlerinin glutamat ile aktivasyonu NO salınımına

neden olur ve bu salınım cGMP düzeylerinde artma ile paraleldir. Sıçan beyin dilimlerinde NO, potasyum iyonları ile, kalsiyuma bağımlı olarak salınır ve bu salınım glutamat salınımında ve cGMP düzeylerinde artış eşlik eder (56).

NO, suda sınırlı çözünürlüğü olan bir gazdır ve oksijen ve karbon dioksit benzer şekilde hücre membranlarından difüzyonla kolayca geçer. Ayrıca yüksek derecede reaktif ve stabil olmayan bir serbest radikal türüdür (57-59). Memeli hücrelerinde sentezlenerek bir çok dokuda hücreler arası sinyal iletiminde rol oynar. SSS'nde de bir nöronal retrograd haberci görevi yaptığı bilinmektedir (57,60,61). NO cGMP sentezleyen enzim olan guanilat siklazın solubl formunun endojen aktivatörüdür (54,57,61-63). NO guanilat siklazı, aktif bölgesinde bulunan hem'deki demire bağlanarak ve enzimin konformasyonunu değiştirerek aktive eder (64).

SSS'nde NO L-Arginine'den, başlıca NMDA tipi glutamat reseptörleri tarafından aktive edilen kalsiyum/kalmoduline bağımlı konstitütif NO sentaz ile oluşturulur (58,59,61,62). Yaşayan dokuda, NMDA ile uyarılan nöronlardan NO salınımı ekstrasellüler kalsiyuma gereksinim gösterir (54). NMDA reseptörü aktivasyonu, reseptörle bağlantılı iyon kanallarından büyük miktarda kalsiyumun hücre içine girmesiyle sitozolik kalsiyumu artırır ve kalsiyum kalmodulinle birleşerek NO sentazı aktive eder (65,66). Yine aynı kalsiyum girişi NMDA reseptörü aktivasyonunun çeşitli fizyolojik ve patolojik etkilerini başlatır.

NO sentazın nöronal, endotelial, hepatik formlar ve makrofajlarda bulunan bir formu olmak üzere çeşitli izoformları klonlanmıştır (59,67,68). Nöronal ve endotelial formlar aktivasyonları için kalsiyum ve kalmoduline bağımlı olan konstitütif enzimlerdir. Buna karşın makrofajlardaki NO sentaz indüklenebilir ve kalsiyumdan bağımsız mekanizmalarla aktive edilebilir (59,67-69).

NO oluşumu ve etkinliği için iki farklı model ortaya konulmuştur (57). Periferik nonadrenerjik-nonkolinerjik sinirlerden elde edilen sonuçlardan çıkarılan birinci modele göre,

NO aksiyon potansiyelleri ve kalsiyum girişine yanıt olarak presinaptik bölgede oluşur ve daha sonra düz kas hücreleri gibi hedef hücrelere difüze olur. Santral glutamaterjik sinapslarda ise, presinaptik terminalden salınan glutamat NMDA ve non-NMDA reseptörlerini etkiler. Düşük frekanslı ileti sırasında hızlı sinaptik eksitasyonun çoğundan non-NMDA reseptörleri sorumludur, çünkü NMDA reseptör kanalları magnezyum ile bloke durumdadır. Postsinaptik membranın daha uzun süreli depolarizasyonu magnezyumu NMDA kanalından uzaklaştırır ve kalsiyumun hücre içine girmesi ile NO sentazın aktivasyonuna yol açar. NO, anatomik olarak en yakın yapılar olan presinaptik terminallerde ve astrositlerde solubl guanilat siklazı aktive etmek üzere dışarı difüze olur. NO belki de kendi oluştuğu hücrelerde de guanilat siklazı aktive edebilir, fakat NO sentazı aktive etmek için gereken kalsiyum düzeyleri solubl guanilat siklazı inhibe ettiği için bu etki gözlenmez. NO'nin etkisi hedef hücrelerden dışarı difüze olmasının yanı sıra süperoksit anyonu veya scavenger proteinlerle kovalan bağlar kurmak suretiyle sonlanır (59).

Beyinde NO sentaz en yüksek konsantrasyonda serebellumda bulunur. Bunu hipotalamus ve ortabeyin, striatum ve hipokampus izler, en düşük aktivite medulla oblongatada bulunmuştur (70). SSS'nde NO sentazın yalnızca nöronlarda bulunduğu bildirilmiştir (59,64). Bununla birlikte Murphy ve ark. (71) astrositlerde de NO sentaz ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. Serebral kortekste NO sentaz nöronları tüm hücrelerin % 2'sini oluşturur. Hipokampusta, piramidal hücreler NO sentaz içermezken, dentat girusun granül hücrelerinde bol miktarda bulunur. Serebellumda ise Purkinje hücrelerinde bulunmazken, granül ve sepet hücrelerinde çok miktardadır. Guanilat siklaz ve cGMP-bağımlı protein kinazlar selektif olarak Purkinje hücrelerinde bulunur. Granül ve sepet hücreleri eksitatör yosunsu liflerden input alan NMDA reseptörleri içerirler. Bu reseptörlerin stimülasyonu NO oluşumunu tetikler, NO de Purkinje hücrelerine difüze olarak guanilat siklazı aktive eder (59,64).

Beyinde guanilat siklaz ve NO sentazın lokalizasyonlarının farklılık göstermesi NO'in guanilat siklazdan başka hedefleri de olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, guanilat siklaz da NO'den başka nörotransmitterlerle etkileşebilir (59,64). NO sentazın beyinde tek bir transmitterle birlikteliği saptanmamıştır. Serebellumda NO sentaz hem glutamat içeren granüler hücrelerde, hem de GABA içeren sepet hücrelerinde bulunur. Serebral kortikal NO sentaz nöronlarının çoğu da aynı zamanda GABA ve nöropeptid transmitterler içerir (59,64,72).

Bir çok deneysel epilepsi modelinde, çeşitli NO donörleri veya NO sentaz inhibitörleri kullanılarak NO'in epileptik nöbetlerdeki rolü araştırılmış ve oldukça çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, lityum-pilokarpine ile oluşturulan deneysel temporal lob epilepsisi modelinde, bir endojen NO vericisi olan L-Arginine ve bir NO sentaz inhibitörü olan N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)'in nöbetlerin patogenezindeki etkinliklerinin davranışsal, elektrofizyolojik ve histopatolojik olarak karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan, 240-340 g ağırlığında 51 adet Wistar albino türü erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar deneysel çalışmalara başlanmadan 15 gün öncesinden itibaren sıcaklığı 18-22° C arasında sabit olan bir odada, beş tanesi bir kafeste olacak şekilde tutuldular. Standart sıçan diyeti ile beslendiler. Deneyler boyunca sıçanların su ve yem alımları serbest bırakıldı.

Deneysel çalışma kontrol, L-Arginine ve L-NAME grupları olmak üzere 3 grup şeklinde planlandı.

Lityum-pilokarpin grubu (Kontrol grubu): Bu gruptaki 15 sıçana 3 mEq/kg LiCl (Sigma Chemical Co., St. Louis) (i.p.) verildikten 24 saat sonra 45 mg/kg pilokarpin HCl (Sigma Chemical Co., St. Louis) (i.p.) enjeksiyonu yapıldı.

L-Arginine grubu: Bu gruptaki 15 sıçana 3 mEq/kg LiCl verildikten 24 saat sonraki pilokarpin enjeksiyonundan 30 dakika önce 300 mg/kg L-Arginine (Sigma Chemical Co., St. Louis) (i.p.) uygulandı. 30 dakika sonra 45 mg/kg pilokarpin HCl (i.p.) enjeksiyonu yapıldı.

L-NAME grubu: Bu gruptaki 15 sıçana 3 mEq/kg LiCl verildikten 24 saat sonraki pilokarpin uygulamasından 30 dakika önce 20 mg/kg N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma Chemical Co., St. Louis) (i.p.) enjeksiyonu yapıldı. 30 dakika sonra 45 mg/kg pilokarpin HCl (i.p.) enjekte edildi.

Tüm gruplarda pilokarpin enjeksiyonları, I. evre eter anestezisinin santral sinir sisteminde eksitan etkisinden (73) yararlanılmak amacıyla hafif eter anestezisi altında uygulandı.

Cerrahi girişim öncesinde sıçanlara 40 mg/kg Thiopental Sodyum (Pentothal Sodium-Abbott) (i.v.) anestezisi uygulandı. Kafatası orta hattı üzerinde 1-1.5 cm'lik bir insizyonla kemik yapı görünür hale getirildi. Bregmanın 2 mm anterior ve 2 mm posterioruna, orta hattın her iki tarafta 2 mm lateraline uyacak şekilde dişçi matkabıyla 0.8 mm çapında 4 adet delik açılarak, elektrokortikografik (ECoG) kayıtlar elde edebilmek amacıyla paslanmaz çelik vida elektrodlar epidural olarak yerleştirildi. Nazal kemik üzerine yerleştirilen diğer bir elektrod referans elektrod olarak kullanıldı. Tüm elektrodlar dental akrilik ile kafatasına sabitlendi. İnsizyon yeri sütür ile kapatılarak lokal antibiyotik uygulandı. Cerrahi girişim sonrasında sıçanların her biri ayrı kafeslere konuldu. Deneylere başlamak için 1 hafta süreyle beklendi.

Ayrıca, histopatolojik incelemede sıçanlarda cerrahi girişimin nöropatolojik bir hasar oluşturup oluşturmadığını değerlendirebilmek için, 4 sıçana cerrahi girişim uygulandıktan sonra yalnızca serum fizyolojik enjeksiyonları yapıldı (Sham kontrol), 2 sıçana ise herhangi bir işlem yapılmadı (Naif).

LiCl distile su ile, pilokarpin, L-Arginine ve L-NAME ise serum fizyolojik ile, 0.2 ml'lik bir hacimde sulandırılarak uygulandılar.

Pilokarpin uygulanmasından önce gruptaki tüm sıçanlardan, her bir madde enjeksiyonundan önce ve hemen sonra ECoG kayıtları alındı. Ayrıca bu maddelerin sıçanların davranışları üzerine etkileri gözlemlendi. Pilokarpin uygulandıktan sonra 90 dakika boyunca davranışsal ve elektrokortikal değişiklikler izlendi.

Davranışsal Bulguların Değerlendirilmesi

Davranışsal bulgular Janusz ve ark. (74) tarafından geliştirilen davranış skalasına göre skorlandırıldı (Tablo-1).

Tablo-1 : Sıçanlarda gözlemlenen davranışsal bulguların skorlandırılması

Skor	Davranış
0	Normal davranış
1	Limbik otomatik hareketler ve tremor
2	Baş sallama ve/veya ıslak köpek titremeleri
3	Arka ayaklar üzerine kalkma ile birlikte limbik ön ayak klonik nöbetleri
4	Status epileptikus (en az 60 dakika süren devamlı nöbetler) ve/veya klonik-tonik nöbetler
Ek puanlar	
+2	Pilokarpin uygulanmasından sonra 30 dakika içinde ölüm
+1	Pilokarpinden sonra 31-180 dakika içinde ölüm

Elektrokortikografik Bulguların Değerlendirilmesi

Sıçanların kafatası üzerine yerleştirilmiş vida elektrodlardan gelen sinyaller 8 kanallı bir EEG cihazına (Nihon Kohden) aktarıldı. ECoG sinyalleri dört kanal olarak kayıt edildi. Kayıtlar 1.5 cm/sn hızda ve 50 μ V'luk bir potansiyel kalemlerde 7 mm'lik bir sapma oluşturacak şekilde ayarlandı. Normal bir sıçandan elde edilen ECoG kayıtları Şekil-1'de görülmektedir. Nöbet sırasında amplitüdlerin çok artmasına bağlı olarak kazanç tüm kanallar için 1/8'e indirildi. Ayrıca yüksek frekans filtresi ile 15 Hz üstü frekanslar kesildi. SE başlangıcı, ECoG'da ilk ayırd edilebilir epileptiform aktivitenin açıkça görüldüğü zaman olarak kabul edildi (Şekil-2). Pilokarpin enjeksiyonundan 20-24 saat sonra sıçanlardan tekrar ECoG kayıtları alındı (Şekil-3).

Beynin Histolojik Preparasyonu - Nöron Sayımı

Deneyler sonrası 12. günde SE'a giren ve girmeyen, yaşayan tüm sıçanlar (sham kontrol ve naif gruplar da dahil) dekapite edilerek hızla beyinleri çıkarıldı. Beyinler CO₂ gazı ile dondurularak -20 °C'de saklandı. L-NAME grubu sıçanlarda ise SE sırasında mortalitenin yüksek olması nedeniyle bu grupta elektrokortikal olarak beyin ölümü saptanan sıçanlar hemen dekapite edildiler.

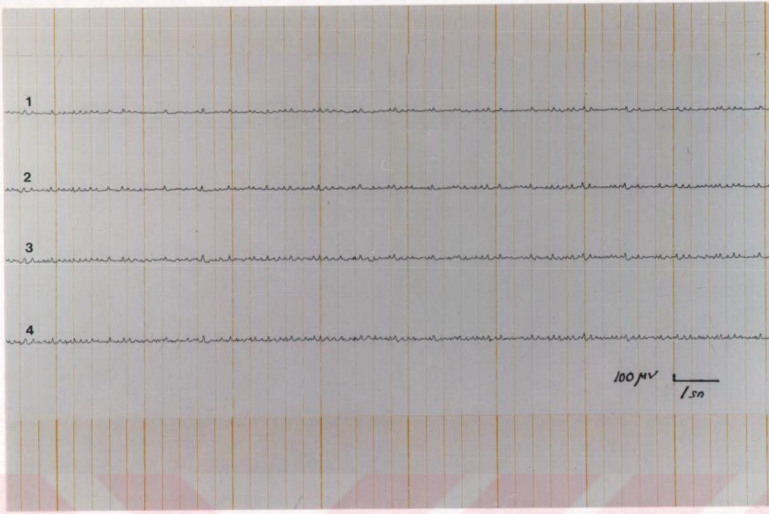
Hipokampusun anterior ve posterior bölgelerine uyacak şekilde, bregmanın 2.8 ve 5.6 mm posteriorundan kryostat ile 12 µm'lik koronal kesitler alındı. İki seri hazırlanan kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Toluidin mavisi ile boyanarak histolojik preparatlar hazırlandı. Bir oküler grid kullanılmak suretiyle, her bir kesitte, hipokampal CA1 ve CA3 alanlarındaki piramidal nöron sayımları rastgele örnekleme ile yapıldı. Sayılacak alanın dört farklı bölgesinden, x 40 büyütmede 2300 µm²'lik 5'er karedeki sağlam nöronların somaları sayılarak Abercrombie (75) tarafından önerilen formüle göre düzeltildi ve mm²'deki alansal nöron yoğunluğu hesaplandı.

Abercrombie formülü:

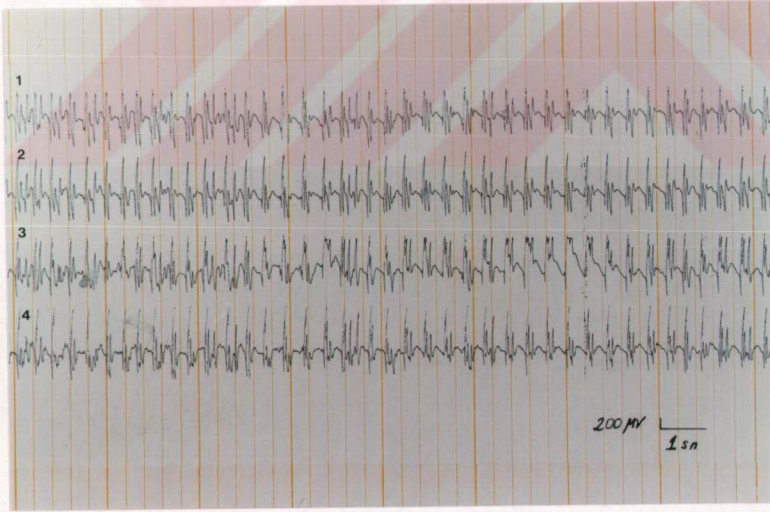
$$\text{Herbir kesitteki ortalama nöron sayısı} = \frac{\text{Sayılan nöron} \times \text{Kesit kalınlığı} (\mu\text{m})}{\text{Kesit kalınlığı} (\mu\text{m}) + \text{Ortalama nöron çapı} (\mu\text{m})}$$

İstatistiksel Değerlendirme

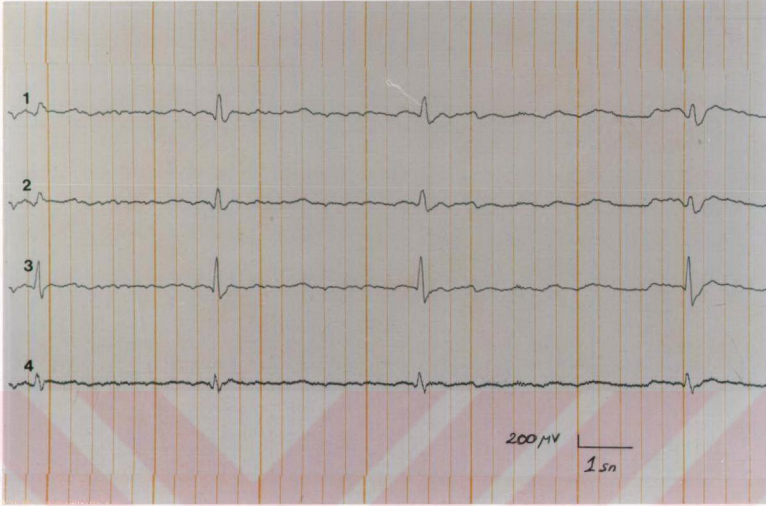
Kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarından elde edilen status epileptikusa girme oranı ortalamaları ve 24 saatlik yaşam şansı ortalamaları birbirleriyle **Fisher's Exact Testi** ile, status epileptikus latansları ve davranışsal nöbet skorları da **Student's-t Testi** (unpaired-t testi) ve **Mann-Whitney-U Testi** kullanılarak karşılaştırıldı. Naif, sham kontrol, kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarında status epileptikusa giren ve girmeyen sıçanların CA1 ve CA3 hipokampal alanlarına ait ortalama nöron sayılarının karşılaştırılmasında **Varyans Analizi** (ANOVA) kullanıldı.



Şekil-1 : Normal bir sıçandan kaydedilen elektrokortikal aktivite (1: F3, 2: F4, 3: P3, 4: P4)



Şekil-2 : Status epileptikustaki bir sıçandan 41. dakikada kaydedilen sürekli, yüksek amplitüdü, hızlı spike'lar (1: F3, 2: F4, 3: P3, 4: P4)



Şekil-3 :Status epileptikustaki bir sıçandan 20. saatte kaydedilen peryodik epileptiform deşarjlar (1: F3, 2: F4, 3: P3, 4: P4)

BULGULAR

L-Arginine ve L-NAME'in lityum-pilokarpin ile oluşturulan nöbetlere etkileri, SE'a girme oranı, SE latansı, 24 saatlik yaşam şansı, davranışsal nöbet skorları ve nöropatolojik hasar yönünden değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu sıçanlarda LiCl enjeksiyonundan sonra herhangi bir anormal davranışsal ve elektrokortikal bulgu saptanmadı. Pilokarpin enjeksiyonunu takiben, sıçanlarda periferik kolinerjik stimülasyon bulguları olan piloereksiyon, salivasyon ve diürezin yanısıra tremor ve kaşınma, çiğneme hareketleri gibi limbik otomatik hareketler saptandı. Bunu bazı sıçanlarda baş sallama ve arka ayaklar üzerine kalkma ile birlikte ön ayak klonusu izledi. Sıçanların 12 tanesi (% 80,00) ortalama $30,41 \pm 2,07$ dakika sonra davranışsal ve elektrografik olarak SE'a girdi ve SE'un saatlerce sürdüğü bu parametrelerle tespit edildi. Bu gruptaki sıçanların 24 saatlik yaşam şansı % 86,66 olarak saptandı. Davranışsal nöbet skoru ise ortalama $3,60 \pm 0,21$ olarak bulundu (Tablo-2).

L-Arginine grubunda, pilokarpinden 30 dakika önce uygulanan L-Arginine enjeksiyonundan sonra pilokarpin verilmesine kadar geçen süreçte (30 dk.) sıçanlarda davranışsal ve elektrokortikal değişiklikler gözlenmedi. Sıçanların 5 tanesi (% 33,33) $30,40 \pm 1,63$ dakika sonra SE'a girdi ve 24 saatlik yaşam şansı % 100,00 olarak bulundu. Bu grubun davranışsal nöbet skoru $2,46 \pm 0,32$ olarak saptandı (Tablo-3).

Tablo-2 : Kontrol grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk.)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	-		+	2
2	+	25	+	4
3	-		+	2
4	+	31	+	4
5	+	33	+	4
6	+	25	+	4
7	+	39	+	4
8	+	43	-	4
9	+	33	+	4
10	+	33	+	4
11	+	22	+	4
12	+	37	+	4
13	-		+	2
14	+	21	+	4
15	+	23	-	4
% x ± SH	80,00	30,41 ±2,07	86,66	3,60 ± 0,21

Tablo-3 : L-Arginine grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk.)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	+	35	+	4
2	-		+	2
3	-		+	1
4	+	30	+	4
5	-		+	1
6	+	32	+	4
7	+	30	+	4
8	-		+	2
9	-		+	2
10	-		+	1
11	+	25	+	4
12	-		+	3
13	-		+	2
14	-		+	2
15	-		+	1
% x ± SH	33,33	30,40 ± 1,63	100,00	2,46 ± 0,32

L-NAME grubunda; pilokarpinden 30 dakika önce uygulanan L-NAME, sıçanlarda davranışsal ve elektrokortikal değişimler oluşturmadı. 11 sıçanın (% 73,33) SE'a girdiği bu grupta SE latansı ortalama 29,09±2,44 dakika ve 24 saatlik yaşam şansı % 26,66 olarak saptandı. Davranışsal nöbet skoru ortalama 3,93±0,40 olarak belirlendi (Tablo-4). Bu gruptaki sıçanlarda diğer gruplardan farklı olarak, pilokarpin enjeksiyonu sonrasında solunum güçlüğü saptandı.

Tablo-4 : L-NAME grubu sıçanların status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru değerleri

DENEK NO	STATUS EPİLEPTİKUS	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk.)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
1	+	30	-	5
2	+	22	-	5
3	+	36	-	5
4	+	23	-	5
5	+	15	-	5
6	+	20	-	5
7	-		+	1
8	+	36	-	4
9	-		+	2
10	+	41	-	5
11	+	30	-	5
12	+	31	-	4
13	+	36	-	5
14	-		+	2
15	-		+	1
% x ± SH	73,33	29,09 ± 2,44	26,66	3,93 ± 0,40

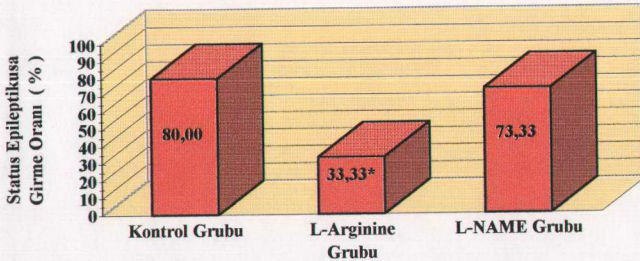
Her üç grubun SE'a girme oranı, SE latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skorları karşılaştırıldığında, L-Arginine grubunda kontrol grubuna göre SE'a girme oranının anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$) (Tablo-5, Şekil-4). Bu grupta SE latansı ve 24 saatlik

yaşam şansı kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$), (Tablo-5, Şekil-5, Şekil-6). Davranışsal nöbet skorunda ise anlamlı azalma saptandı ($p<0.01$) (Tablo-5, Şekil-7). L-NAME grubu sıçanlarda, SE'a girme oranı, SE latansı ve davranışsal nöbet skoru kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermezken ($p>0.05$) (Tablo-5, Şekil-4, Şekil-5, Şekil-7), 24 saatlik yaşam şansı anlamlı olarak azaldı ($p<0.005$) (Şekil-6).

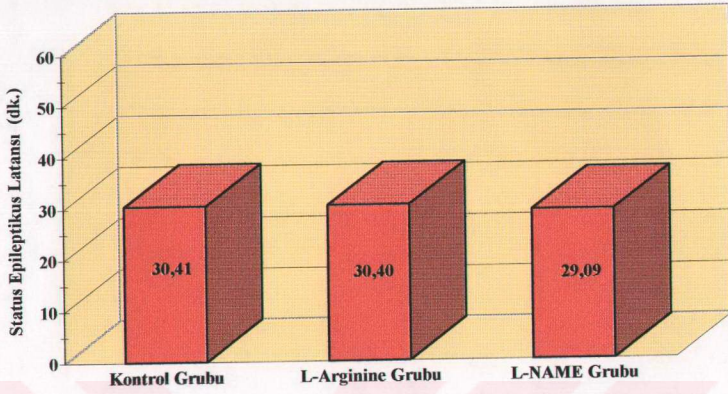
Tablo-5 : Kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarında status epileptikusa girme oranı, status epileptikus latansı, 24 saatlik yaşam şansı ve davranışsal nöbet skoru ortalamalarının karşılaştırılması

	STATUS EPİLEPTİKUS (%)	STATUS EPİLEPTİKUS LATANSI (dk)	24 SAATLİK YAŞAM ŞANSI (%)	DAVRANIŞSAL NÖBET SKORU
Kontrol Grubu	80,00	30,41 ± 2,07	86,66	3,60 ± 0,21
L-Arginine Grubu	33,33*	30,40 ± 1,63	100,00	2,46 ± 0,32**
L-NAME Grubu	73,33	29,09 ± 2,44	26,66***	3,93 ± 0,40

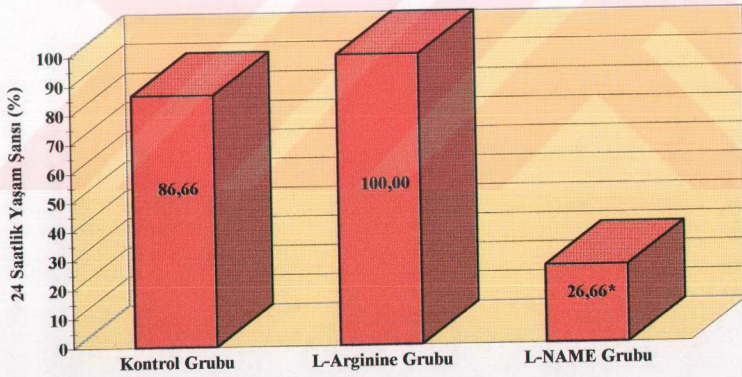
Kontrol grubuna göre * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$



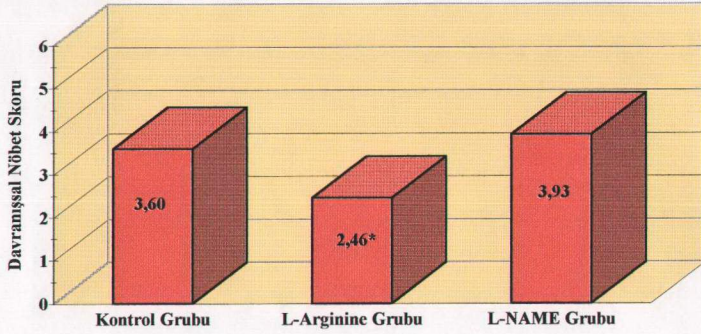
Şekil-4 : Kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarında status epileptikusa girme oranlarının karşılaştırılması (* : $p<0.05$)



Şekil-5 : Kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarında status epileptikus latansının karşılaştırılması



Şekil-6 : Kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarında 24 saatlik yaşam şansının karşılaştırılması (* : $p < 0.005$)



Şekil-7 : Kontrol, L-Arginine, L-NAME gruplarında davranışsal nöbet skorlarının karşılaştırılması (* : $p<0.01$)

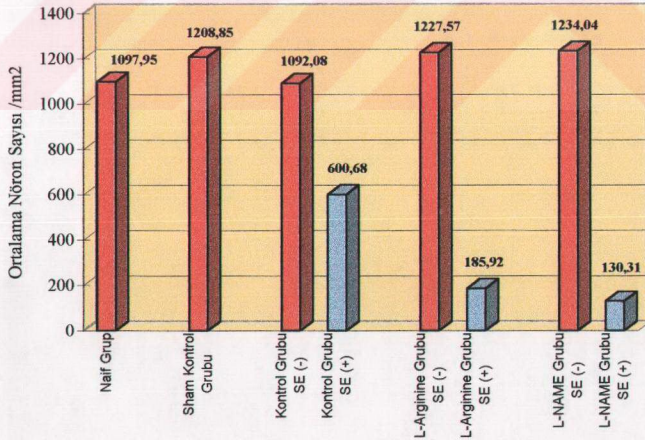
Hipokampal CA1 ve CA3 alanlarındaki nöron sayılarının değerlendirilmesinde, tüm gruplarda sağ ve sol hemisferler ya da anterior ve posterior hipokampal kesitler arasında piramidal nöron sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadığından, ortalama nöron sayıları anterior ve posterior kesitlerdeki sağ ve sol hemisferlerden elde edilen sonuçlar birleştirilerek hesaplandı. CA1 ve CA3 alanlarındaki nöron sayısı yönünden naif sıçanlar ve sham kontrol grubu arasında ve naif sıçanlar ile kontrol grubu SE'a girmeyen sıçanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarının herbirinin grup içi değerlendirmelerinde, SE'a giren sıçanlarda her iki alanda da ortalama nöron sayılarının SE'a girmeyenlere göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.001$) (Tablo-6, Şekil-8, Şekil-9).

Tablo-6 : Naif, sham kontrol, kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarında status epileptikusa giren “SE (+)” ve girmeyen “SE (-)” sıçanların hipokampal CA1 ve CA3 alanlarındaki ortalama nöron sayıları

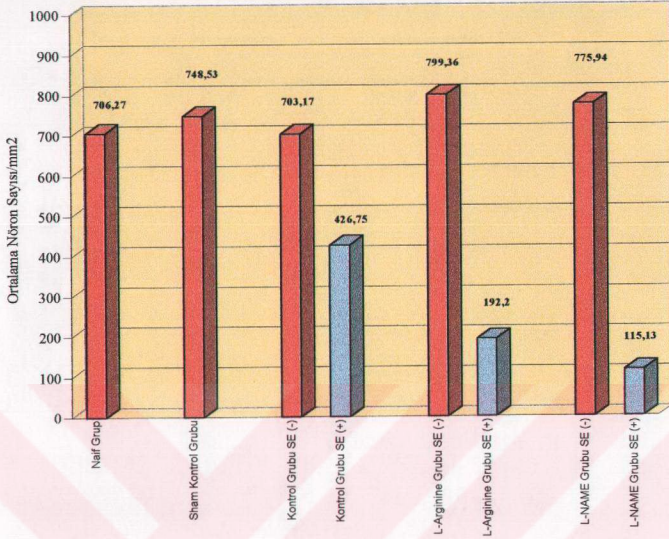
		CA1 ALANI NÖRON SAYISI ($x \pm SH / mm^2$)	CA3 ALANI NÖRON SAYISI ($x \pm SH / mm^2$)
NAİF GRUP		1097,95±29,01	706,27±20,78
SHAM KONTROL GRUBU		1208,85±25,74	748,53±15,45
KONTROL GRUBU	SE (-)	1092,08±53,90	703,00±17,65
	SE (+)	600,68±46,99*	426,75±11,61**
		p<0.001	p<0.001
L-ARGININE GRUBU	SE (-)	1227,57±34,79	799,36±18,28
	SE (+)	185,92±40,51*	192,21±43,79**
		p<0.001	p<0.001
L-NAME GRUBU	SE (-)	1234,04±44,70	775,94±25,24
	SE (+)	130,31±28,67*	115,13±19,73**
		p<0.001	p<0.001

* : CA1 alanında kontrol grubu SE (-) sıçanlara göre anlamlılık düzeyi (p<0.001)

** : CA3 alanında kontrol grubu SE (-) sıçanlara göre anlamlılık düzeyi (p<0.001)



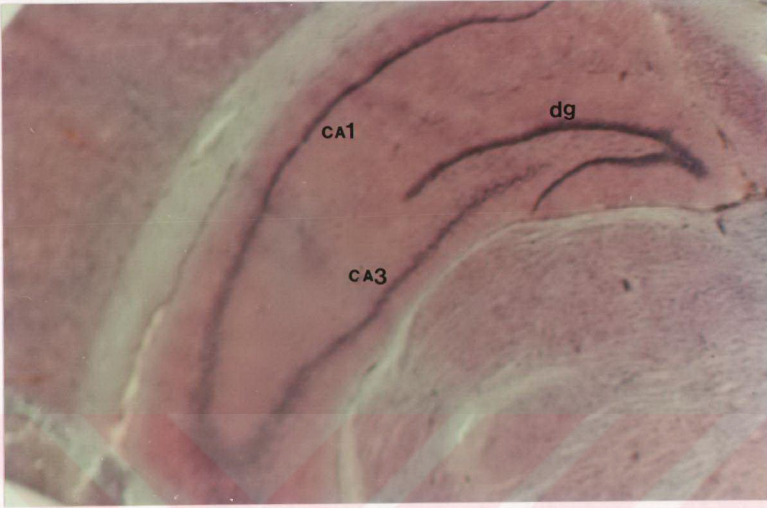
Şekil-8 : Naif, sham kontrol, kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarında CA1 alanında ortalama nöron sayısı



Şekil-9 : Naif, sham kontrol, kontrol, L-Arginine ve L-NAME gruplarında CA3 alanında ortalama nöron sayısı

SE'a girmeyen kontrol grubu sıçanlarla diğer grupların karşılaştırılmasında, CA1 ve CA3 alanlarında SE'a girmeyen sıçanlarla farklılık saptanmazken, SE'a giren sıçanlarda SE'a girmeyen kontrol grubu sıçanlara göre nöron sayısında anlamlı azalma vardı ($p < 0.001$) (Tablo-6, Şekil-8, Şekil-9). SE'a giren sıçanların CA1 ve CA3 alanlarında ışık mikroskopik olarak stromal ödem ve vakuolizasyon, nükleusta veziküler görünüm ve kromatin toplanmaları, nükleolusta belirginleşme ve yer yer asidofil hücreler gibi nöron hasarı bulgularının yanısıra belirgin gliosis saptandı (Şekil-10-18).

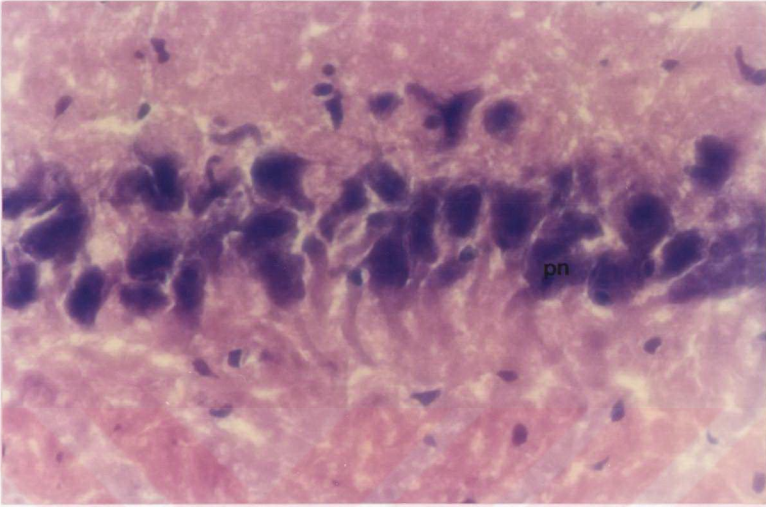
L-Arginine ve L-NAME gruplarında SE'a giren sıçanlarda ortalama nöron sayısı her iki alanda da kontrol grubu SE'a giren sıçanlardan anlamlı olarak azdı ($p < 0.001$). L-Arginine ve L-NAME grupları arasında SE'a giren sıçanların ortalama nöron sayıları açısından hiçbir alanda anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo-6, Şekil-8, Şekil-9).



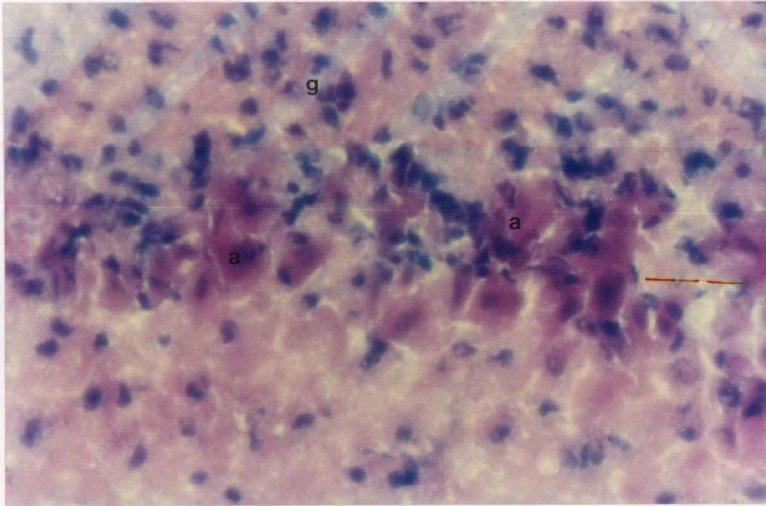
Şekil-10 : Kontrol grubunda status epileptikusa girmemiş bir sıçanda hipokampusun genel görünümü. H&E, x3. (dg : dentat girus)



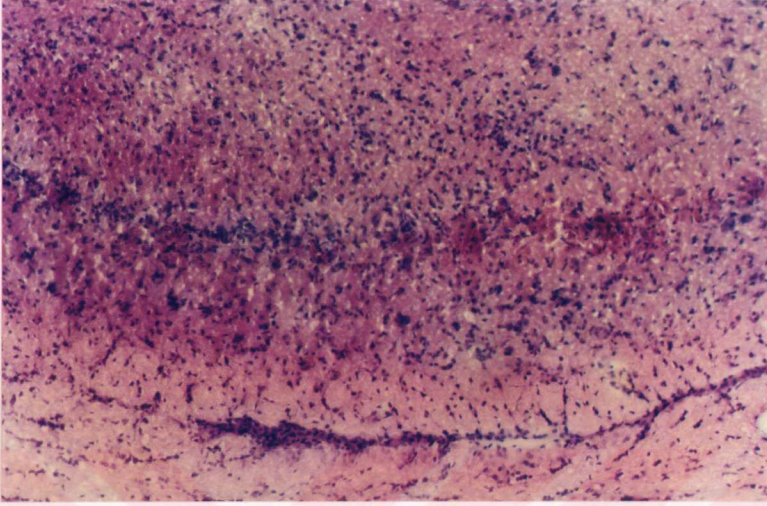
Şekil-11 : Kontrol grubunda status epileptikusa girmiş bir sıçandan elde edilen mikrofotografda CA1 alanında nöron kaybının görünümü. H&E, x3



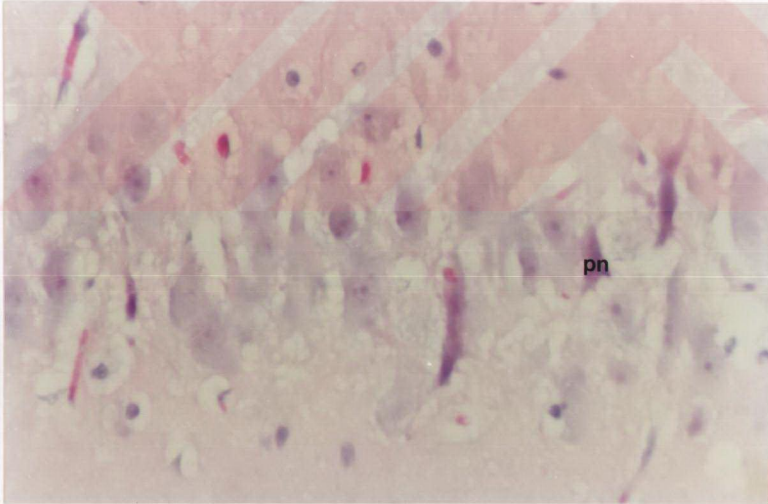
Şekil-12 : L-Arginine grubunda status epileptikusa girmemiş bir sıçanda hipokampal CA3 alanındaki büyük piramidal nöronların normal görünümü. H&E, x40. (pn: piramidal nöron)



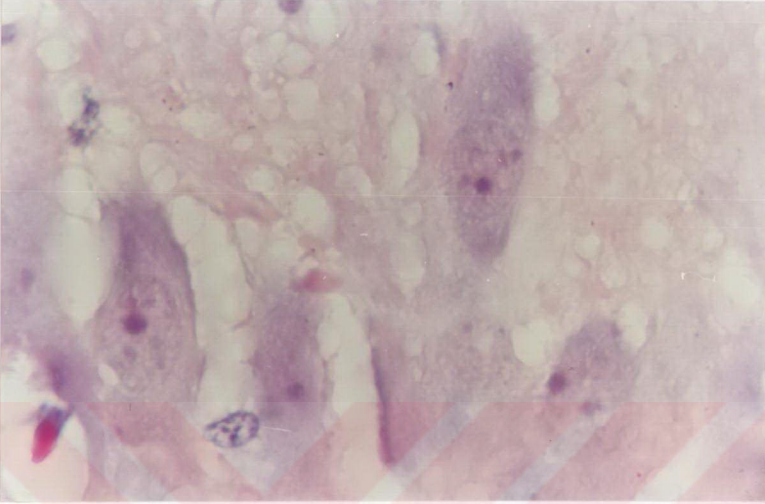
Şekil-13 : L-Arginine grubunda status epileptikusa girmiş bir sıçanda CA3 alanında asidofilik gösteren hasarlı nöronlar ve gliosis. H&E, x40. (a: asidofilik nöronlar, g: gliosis)



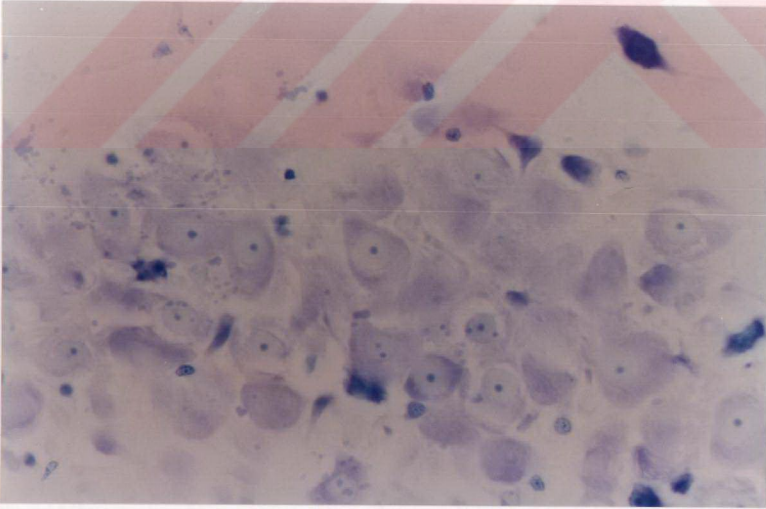
Şekil-14 : Şekil-13’de görülen nöron hasarı ve gliosisin genel görünümü. H&E, x20.



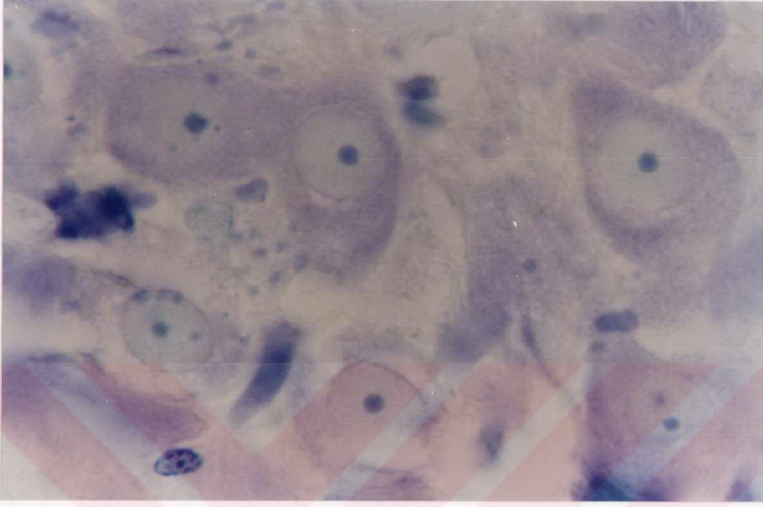
Şekil-15: L-NAME grubunda status epileptikusa girmiş bir sıçandan hazırlanan mikrofotografıta; stromal ödem ve vakuolizasyon, CA3 alanında veziküler nukleus ve belirgin nukleolus, yer yer kromatin toplanmalarıyla karakterize nöronal hasar alanının görünümü. Aynı alanda az sayıda normal piramidal nöronlar. H&E, x40. (pn: piramidal nöron)



Şekil-16 : Şekil-15'te görülen hasarlı nöron alanının daha yüksek büyütmedeki görünümü.
H&E, x100.



Şekil-17 : Şekil-15'teki mikrofotografin ait olduğu sıçandan aynı bölgeden alınan komşu kesitte nöron hasarının toluidin mavisi boyamasıyla gösterilmesi. x40.



Şekil-18 : Şekil-17'de gösterilen nöronal hasar alanının daha yüksek büyütmedeki detaylı görünümü. Toluidin mavisi, x100.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Temporal lobdan kaynaklanan kompleks parsiyel nöbetler, insanlarda en sık görülen nöbet tiplerindedir (11,76). Temporal lob epilepsisi olan hastalarda kişilik bozukluklarının, bilişsel ve davranışsal bozuklukların insidansında artış olduğu bildirilmektedir (76). Hastaların büyük çoğunluğunda temporal loblardan kaynaklanan nöbetlerin, hipokampus ve diğer temporal lob yapılarındaki nöron kaybı ve gliosisle, bir kısmında da tümör ve malformasyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (10). İlaç tedavisine oldukça dirençli olan temporal lob epilepsisini taklit eden çeşitli deneysel modeller ileri sürülmüştür (9,23,77).

KA modeli, limbik sistemde epileptik deşarjların gelişimi, yayılması ve patolojik süreçlerini değerlendirmek için uygun bir modeldir (23). Yüksek dozlarda KA'in sistemik veya intraserebral uygulanması ciddi nöbetlere ve beyin hasarına yol açmaktadır (23,76). Bununla birlikte, bu modelde SRN'lerin düşük oranda oluştuğu ve sıklıkla 45-60 günde kaybolduğu bildirilmiştir (78). Etkin ve letal dozların birbirine yakın oluşu da KA modeli için bir dezavantaj oluşturmaktadır (79). Diğer bir kompleks parsiyel epilepsi modeli olan tutuşma modelinde SRN'ler oldukça nadir görülmekte ve nöropatolojik hasar saptanmamaktadır (29,80). Elektriksel stimülasyonla oluşturulan limbik SE'ta elektrografik SRN'ler sıçanların yalnızca % 50'sinde oluşmaktadır (81). Tetanus toksininin hipokampusa mikroenjeksiyonu ile kronik / semikronik limbik epilepsi oluşmakta ve ışık mikroskopik olarak nöron hasarı saptanmamaktadır (80).

Yüksek doz pilokarpin veya lityum-pilokarpinle oluşturulan kolinerjik nöbetler, nöropatolojik hasar açısından insan temporal lob epilepsisine uyumluluğu (29,31,34,35,48,82), SRN'lerin sürekliliği (29,31,47) ve çeşitli antikonvulsanlara dirençli olmalarıyla (38,83) insan temporal lob epilepsisini oldukça iyi taklit etmektedir. Ayrıca, nöbetler ve mortalite arasında geniş bir güvenlik aralığı olması özelliğiyle de epilepsi araştırmalarında önemli bir yere sahiptir (82,84). Bu özellikleri nedeniyle bu çalışmada deneysel epilepsi oluşturmak için lityum-pilokarpin modeli tercih edilmiştir.

Bizim bulgularımıza göre, LiCl enjeksiyonundan 24 saat sonra pilokarpin uygulanması kontrol grubu sıçanlarda % 80 oranında SE oluşturdu. Çeşitli yayınlarda, LiCl'den 24 saat sonra 30 mg/kg pilokarpin enjeksiyonunun Sprague-Dawley türü sıçanlarda % 100 oranında jeneralize konvulsif SE'a neden olduğu ve genellikle ölümlü sonuçlandığı bildirilmektedir (37-39). Bununla birlikte, Wistar türü sıçanlarla yapılan bir çalışmada, LiCl sonrasında 30 mg/kg pilokarpin ile SE'a girmeyen sıçanlara ikinci bir doz 30 mg/kg pilokarpin verildiği bildirilmektedir (53). Sıçan türleri arasındaki bu farklılık, beyinde muskarinik reseptör yoğunluğu veya kolin asetiltransferaz düzeylerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir (85). Bizim yaptığımız ön çalışmalarda da, 30 mg/kg pilokarpin ile SE'a giren sıçan sayısının düşük olması nedeniyle, çalışmamızda pilokarpin dozu 45 mg/kg olarak belirlendi. 24 saatlik yaşam şansının Wistar türü sıçanlarda Sprague-Dawley türü sıçanlara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (47,82). Bizim sonuçlarımız da % 86,66'lık yaşam şansı ile literatüre uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda, pilokarpinden 30 dakika önce 300 mg/kg dozda L-Arginine uygulandığında, sıçanların SE'a girme oranı ve davranışsal nöbet skorları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Buna karşın, SE latansı ve 24 saatlik yaşam şansı anlamlı farklılık göstermedi. Buna göre, 300 mg/kg dozda L-Arginine'in sıçanları SE'tan koruduğu sonucuna varılabilir. Diğer taraftan, 20 mg/kg L-NAME pilokarpinden 30 dakika önce

uygulandığında sıçanlarda SE'a girme oranı, SE latansı ve davranışsal nöbet skorları anlamlı farklılık göstermedi. 24 saatlik yaşam şansı ise anlamlı olarak azaldı.

Hipokampal CA1 ve CA3 alanlarındaki piramidal nöron sayımı işleminde, sham kontrol grubu sıçanlarla naif sıçanlar arasında nöron sayısı açısından anlamlı fark olmaması, elektrokortikal kayıtların alınması için epidural olarak yerleştirilen vida elektrodların beyinde herhangi bir hasar oluşturmadığını göstermektedir. L-Arginine'in sıçanları SE'a girmekten belirgin olarak korumasına karşın, bu grupta, SE'a giren sıçanlarda CA1 ve CA3 alanlarındaki piramidal nöron sayıları, kontrol grubu SE'a giren sıçanlardan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, L-NAME grubunda SE'a giren sıçanlardaki nöron kaybının kontrol grubu SE'a giren sıçanlardan anlamlı olarak fazla olduğu saptanmıştır. Buna göre, her iki ilacın da, nöbetlerin başlangıcındaki rolü ne yönde olursa olsun, SE sürecinde nöron kaybını belirgin olarak arttırdıkları sonucuna varıldı. Kontrol grubu SE' a girmeyen sıçanlarla, sham kontrol ve naif sıçanların nöron sayısı yönünden farklılık göstermemeleri ve her grup içinde SE'a giren sıçanlardaki nöron sayısının SE'a girmeyenlere göre anlamlı olarak düşük bulunması, epilepside nöron hasarına yol açan etkenin SE olduğunu desteklemektedir (7,17,51,86).

NO'in epilepsi patogenezindeki rolünü araştırmaya yönelik çalışmaların sonuçları oldukça çelişkilidir. De Sarro ve ark. (60), derin prepiriform kortekse NMDA ve KA mikroenjeksiyonu ile oluşturdukları nöbetlerde L-Arginine'in etkinliğini incelemişlerdir. NMDA veya KA enjeksiyonundan 10 dakika önce yine derin prepiriform kortekse 5-10 nmol dozlarında L-Arginine uyguladıklarında, davranışsal ve elektrokortikal nöbetleri doza bağımlı olarak anlamlı şekilde potansiye ettiğini göstermişlerdir. NMDA ve KA enjeksiyonundan 15 dakika önce 40 nmol L-NAME'in mikroenjeksiyonu ise, L-Arginine-NMDA ve L-Arginine-KA kombinasyonları ile oluşturulan nöbetlerden koruyucu etkinlik göstermiştir. Aynı çalışmada, spontan olarak NO serbestleten sodyum nitroprussid'in (SNP) derin prepiriform kortekse mikroenjeksiyonu davranışsal ve elektrografik olarak epileptik bulgulara yol açarken, solubl

guanilat siklaz inhibitörü olan metilen mavisinin SNP'den 15 dakika önce uygulandığında nöbetlerden anlamlı olarak koruduğu, yine 2,5 nmol dozda SNP'in NMDA ve KA ile oluşturulan nöbetleri fasilite ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, derin prepiriform kortekste EAA reseptörü aktivasyonuna bağlı olarak L-Arginine'den NO sentezinin gerçekleştiğini ve nöbet aktivitesinin gelişmesinde NO'nin rol oynadığını bildirmişlerdir.

Buna benzer diğer bir çalışmada, subkonvulsif dozda i.c.v. NMDA uygulanmasından önce i.c.v. olarak verilen 300 µg L-Arginine'in davranışsal ve elektrokortikal nöbetlere yol açtığı ve bu etkilerin L-NAME ile önlendiği gösterilmiş ve L-Arginine'in NO sentezinde artışa neden olarak prokonvulsan etkinlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (87).

KA ile oluşturulan nöbetler sırasında sıçan beyninin farklı bölgelerinde NO oluşumu incelendiğinde, amigdala ve temporal korteks bölgesinde 30-60 dakika içinde NO oluşumunun 6 kat arttığı gösterilmiş ve KA nöbetlerinde NO'nin bir prokonvulsan mediatör olduğu bildirilmiştir (88). Diğer bir çalışmada, herediter primer jeneralize konvulsif bozukluğu olan kümes hayvanlarında, önbeyinde NO sentaz aktivitesinin iki kat arttığı saptanmış ve herediter epileptogeneze adaptif bir yanıt olarak bazı beyin bölgelerinde NO sinyal iletilisinin arttığı ileri sürülmüştür (89).

NO sentaz inhibitörleri ile yapılan bazı çalışmalar da NO'nin prokonvulsan rolünü desteklemektedir. Libri ve ark. (90), kobaylardan elde ettikleri piriform korteks dilimlerini Mg^{2+} dan yoksun bir solüsyonda tutarak epileptiform aktivite oluşturdukları çalışmalarında L-NAME'in bu aktiviteyi baskıladığını göstermişler ve bu etkinin olasılıkla presinaptik transmitter salınımındaki azalmaya bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Farelerde kokainle oluşturulan nöbetlerin de L-NAME (2-10 mg/kg i.p.) ile baskılandığı gösterilmiş ve kokain nöbetlerinin, NMDA reseptörü aktivitesinin NO tarafından potansiasyonu ile oluşabileceği ileri sürülmüştür (91).

Tüm bu çalışmaların sonuçları NO'nin belirgin bir prokonvulsan etkinliğe sahip olduğu ve NO sentaz inhibitörlerinin ise antikonvulsan oldukları konusunda birleşmektedirler. Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda saptadığımız, L-Arginine'in SE'dan koruyucu etkisiyle uyumsuzdur. Yine, bizim çalışmamızda bir NO sentaz inhibitörü olan L-NAME'in SE'tan koruyucu bir etkinliği belirlenmemiştir. Buna karşılık, Bagetta ve ark. (92), LiCl ve bir asetilkolin esterase inhibitörü olan takrin kombinasyonu ile oluşturdukları nöbetlerde, takrinden 15 dakika önce i.c.v. olarak 30 µg L-NAME uyguladıklarında, nöbetlerin ve beyin hasarının anlamlı olarak azaldığını, SE'a giren sıçanlarda da L-NAME'in SE latansını anlamlı olarak uzattığını göstermişlerdir. Oysa bizim çalışmamızda, L-NAME uygulanan sıçanlarda SE latansı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmamıştır.

Urbanska ve ark. (93), farelerde oluşturdukları çeşitli epilepsi modellerinde, bir NO sentaz inhibitörü olan N^G-nitro-L-arginine'in (NNA) nöbet duyarlılığına etkisini araştırmışlardır. NNA, pentilenetetrazol, amino oksiasetik asit ve elektrokonvulsif şokla oluşturulan nöbetler öncesinde uygulandığında herhangi bir etki oluşturmamış, buna karşın aminofilinle oluşturulan nöbetleri anlamlı olarak arttırmıştır. Araştırmacılar NO sentaz inhibitörlerinin farklı etkilerinin, deneklerin farklı genetik altyapılarına, epileptogenezde rol oynayan farklı mekanizmalara ve kullanılan farklı NO sentaz inhibitörlerinin özelliklerine bağlı olabileceğini bildirmişler ve yine basit farmakokinetik etkileşimlerin bu farklı etkilere neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine aynı ilacın pilokarpin ve pentilenetetrazol nöbetlerinde denendiği diğer bir çalışmada, farklı deneysel modeller arasında ya da aynı modelin farklı dozlarda konvulsan ajanlarla oluşturulduğu durumlarda, NO sentaz inhibisyonu ile farklı sonuçlar elde edildiği gösterilmiş ve inhibitör ile konvulsan doz arasında özel bir etkileşim olduğu ve farklı deneysel modellerde NO sentaz inhibisyonunun değişik etkileri olabileceği hipotezine destek sağlanmıştır (94). Bununla birlikte, bu etkilerden sorumlu moleküler mekanizmalar henüz açıklık kazanmamıştır.

NO'in antikonvulsan etkinliğe sahip olduğunu ileri süren çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Farelerde KA ile nöbet oluşturulan bir çalışmada, L-Arginine'in 150-600 mg/kg (i.p.) dozlarda verilmesi, farelerin % 50'sinde klonik konvulsiyonlar oluşturmak için gereken KA dozunu, doza bağımlı olarak arttırmıştır (95). Buna karşılık, aynı çalışmada NO sentaz inhibitörleri L-NAME ve N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) 3-30 mg/kg dozlarda konvulsif eşiği düşürmüştür. NO sentaz inhibitörü L-NG nitroarginine (L-NOARG) amigdala tutuşma modelinde sıçanların duyarlanma hızını arttırmış, buna karşın duyarlanmış sıçanlarda nöbetler üzerine etkisi olmamış, fakat bu sonuca bir açıklık getirilememiştir (96). Diğer bir çalışmada da, SNP'in penisilin ile oluşturulan nöbetleri anlamlı olarak önlediği ve bu etkinin metilen mavisi ve bir NO scavengeri olan hemoglobinin ile inhibe olduğu gösterilmiş ve NO'in endojen bir antikonvulsan ajan olabileceği sonucuna varılmıştır (97). Yine, intraamigdaloid KA ile oluşturulan nöbetlerde L-NOARG'in epilepsiyi ağırlaştırdığı (98) ve i.c.v. NMDA ile oluşturulan nöbetlerde NO sentaz inhibisyonunun nöbet aktivitesinin süresini uzattığı (99) bildirilmiştir.

3-Aminopiridin ile oluşturulan fokal nöbetlerde N-nitro-L-arginine'in i.p. ve i.c.v. enjeksiyonlarının, epileptiform olayın yayılmasına ve iktal periyotların sayısının artmasına neden olduğu bildirilmiştir (58). Yine aynı ilacın, bikukullin ile oluşturulan nöbetlerde nöbet süresini anlamlı olarak uzattığı gösterilmiştir (100).

Starr ve ark. (101), farelerde pilokarpin modeli epilepside, 500 mg/kg L-Arginine veya 1-125 mg/kg L-NAME (i.p.) uygulandığında SE latansının değişmediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın, L-NAME verilen grupta konvulsiyon frekansı ve mortalitenin daha yüksek olduğunu ve bu nedenle L-NAME'in epileptogenezi kolaylaştırmış olabileceğini bildirmişlerdir. Bu bulgular bizim sonuçlarımıza uyum göstermektedir. Bununla birlikte, araştırmacılar kullanılan dozda L-Arginine'in

prokonvulsan bir etkinliğini saptamamışlardır. Bu da, kullanılan ilaçların farklı dozlarda farklı etkinlik gösterebileceğini düşündürmektedir.

Tüm bu çalışmalardan elde edilen çelişkili sonuçlar göz önüne alındığında, NO'nin epilepsi patogenezindeki rolünün henüz aydınlanmadığı, deneysel epilepsi modeli, hayvan çeşidi, ilacın verilmiş yolu ve dozu, konvulsan maddenin dozu gibi değişkenlerin deney sonuçlarını büyük ölçüde değiştirdiği gözlenmektedir. Yine NO üzerine yapılan araştırmalar, bu molekülün çeşitli özellikleri nedeniyle de prokonvulsan ve antikonvulsan rol oynayabileceğini vurgulamaktadır.

NO yalnızca NMDA reseptörü stimülasyonuna yanıt olarak guanilat siklazı aktive etmek suretiyle hedef hücrelerde cGMP'yi arttırmakla kalmaz, aynı zamanda NMDA reseptör kompleksi üzerindeki bir redoks modülatör bölgeyi ya da NMDA tanıma bölgesini inhibe etmek yoluyla kendi sentezi üzerine negatif feedback etki gösterebilir (102-104). Böyle bir inhibitör mekanizma NMDA reseptörlerinin aşırı stimülasyonunu önleyerek nöronal eksitasyonun aşırı yayılmasını ve buna bağlı olarak nörotoksisiteyi engelleyebilir. Primer striatal nöron kültürlerinde NO oluşturan ya da NO içeren ajanların NMDA reseptörü aktivasyonunu bloke ettiği ve bu yolla NMDA reseptörü aktivasyonunun rol aldığı epileptiform aktiviteyi etkileyebileceği gösterilmiştir (69).

Buna karşılık, NO'nin guanilat siklazı aktive ederek cGMP oluşumunu arttırması sonucu, olasılıkla glutamatın presinaptik salınımı artarak prokonvulsan (60,69,87) ve nörotoksik (105) etkiler meydana gelebilir. NMDA reseptörlerinin stimülasyonu hem NO hem de süperoksit anyonu (O_2^-) oluşumuna neden olur (55). NO'nin O_2^- ile etkileşimi sonucu oluşan peroksinitrit anyonları spontan olarak sitotoksik hidrojen radikallerine dekompoze olurlar (106, 107). Bu yolla NO nörotoksik etki gösterebilir. Nöroprotektif etkisinden ise antioksidan özelliği sorumlu olabilir (108). Bazal koşullarda, L-Arginine-NO yolağının striatal dokuları, NMDA reseptörü aracılı glutamaterjik tonusa bağlı serbest radikal üretiminden koruduğu gösterilmiştir (106).

Yine NO'in oksidasyon-redüksiyon durumuna göre nöroprotektif ya da nörodestrüktif etkinlik gösterebileceği bildirilmiştir (105, 109).

Çalışmamızda, L-NAME grubu sıçanlarda L-NAME ve 30 dakika sonra pilokarpın uygulanması sonucunda sıçanlarda belirgin solunum yetmezliği saptandı ve sıçanların çoğu pilokarpinden sonra 1-2 saat içinde öldüler. Bu grupta kısa süreli mortalitenin yüksek olmasından bu solunum yetmezliği sorumlu olabilir. Muskarinik agonistler bronş düz kasında kontraksiyona neden olurlar (110). NO'in hayvanların havayollarında potent bir bronşial vazodilatör olduğu da bilinmektedir (111). Pilokarpinin vazokonstriktör etkisine NO sentezinin L-NAME ile inhibisyonu sonucu bronşlarda gelişen daralmanın eklenmesi, bu gruptaki sıçanlarda gelişen solunum yetmezliği ve yüksek mortaliteden sorumlu olabilir.

Bu çalışma, lityum-pilokarpin ile oluşturulan deneysel epilepsi patogenezinde NO'in rolünü araştırmak amacıyla planlandı. Çalışmanın sonuçlarına göre, bir endojen NO vericisi olan L-Arginine sıçanları SE'a girmekten korurken, L-NAME nöbetler üzerine anlamlı bir etki göstermedi, fakat SE'a bağlı mortaliteyi anlamlı olarak arttırdı. SE tüm gruplarda belirgin nöron kaybına yol açtı, bu kayıp ilaç verilen gruplarda kontrole göre anlamlı olarak fazlaydı. NO'in epilepsideki rolü konusunda birbirine ters düşen birçok çalışma olması nedeniyle, bu konunun açıklığa kavuşturulabilmesi için, çok sayıda model ve doz çalışmalarına ve SE'da NO yolağı hakkında moleküler düzeyde bilgiye gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- 1- McNAMARA, J.O.: Cellular and molecular basis of epilepsy, *J Neurosci.*, 14 (6): 3413-3425, 1994.
- 2- MELDRUM, B.S., BRUTON, C.J.: *Epilepsy*, Greenfield's Neuropathology Ed. ADAMS, J.H., DUCHEN, L.W., Hodder and Stoughton Limited, Great Britain, 1992, 1246-1283.
- 3- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY: Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes, *Epilepsia*, 30 (4): 389-399, 1989.
- 4- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY: Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures, *Epilepsia*, 22: 489-501, 1981.
- 5- KING, J.A.: *Seizures and Epilepsy*, Essentials of Pathophysiology Ed. KAUFMAN, C.E., McKee, P.A., Little Brown and Company, U.S.A., 1996, 719-728.
- 6- MELDRUM, B.S.: Excitatory amino acid transmitters in epilepsy, *Epilepsia*, 32 (Suppl.2): 1-3, 1991.
- 7- WASTERLAIN, C.G., FUJIKAWA, D.G., PENIX, L., SANKAR, R.: Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus, *Epilepsia*, 34 (Suppl. 1): 37-53, 1993.
- 8- LOTHMAN, E.W., BERTRAM, E.H.: Epileptogenic effects of status epilepticus, *Epilepsia*, 34 (Suppl. 1): 59-70, 1993.

- 9- SUTULA, T., CASCINO, G., CAVAZOS, J., PARADA, I., RAMIREZ, L.: Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe, *Ann Neurol.*, 26: 321-330, 1989.
- 10- MARGERISON, J.H., CORSELLIS, J.A.N.: Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes, *Brain*, 89: 499-530, 1966.
- 11- SLOVITER, R.S.: The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy, *Ann Neurol.*, 35: 640-654, 1994.
- 12- HOLMES, G.L.: Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic, *Epilepsia*, 38 (1): 12-30, 1997.
- 13- BURT, A.M.: Textbook of Neuroanatomy, 1st edition, W. B. Saunders Co., U.S.A., 1993, 485-490.
- 14- GULYAS, A.I., HAJOS, N., FREUND, T.F.: Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus, *J Neurosci.*, 16 (10): 3397-3411, 1996.
- 15- LAURBERG, S., ZIMMER, J.: Lesion-induced sprouting of hippocampal mossy fiber collaterals to the fascia dentata in developing and adult rats, *J Comp Neurol.*, 200: 433-459, 1981.
- 16- SLOVITER, R.S., NILAVER, G.: Immunocytochemical localization of GABA-, Cholecystokinin-, Vasoactive intestinal polypeptide-, and Somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat, *J Comp Neurol.*, 256: 42-60, 1987.
- 17- SAGAR, H.J., OXBURY, J.M.: Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions, *Ann Neurol.*, 22: 334-340, 1987.
- 18- BERTRAM, H.B., LOTHMAN, E.W., LENN, N.J.: The hippocampus in experimental chronic epilepsy: a morphometric analysis, *Ann Neurol.*, 27: 43-48, 1990.

- 19- CAVAZOS, J.E., SUTULA, T.P.: Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis, *Brain Res.*, 527: 1-6, 1990.
- 20- MATHERN, G.W., KUPFER, W.R., PRETORIUS, J.K., BABB, T.L., LEVESQUE, M.F.: Onset and patterns of hippocampal sprouting in the rat kainate seizure model: evidence for progressive cell loss and neoinnervation in regio inferior and superior, *Dendron*, 1: 69-84, 1992.
- 21- DE LANEROLLE, N.C., KIM, J.H., ROBBINS, R.J., SPENCER, D.D.: Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy, *Brain Res.*, 495: 387-395, 1989.
- 22- BABB, T.L., PRETORIUS, J.K., KUPFER, W.R., CRANDALL, P.H.: Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus, *J Neurosci.*, 9 (7): 2562-2574, 1989.
- 23- BEN-ARI, Y.: Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy, *Neuroscience*, 14 (2): 375-403, 1985.
- 24- TAUCK, D.L., NADLER, J.V.: Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats, *J Neurosci.*, 5 (4): 1016-1022, 1985.
- 25- SUTULA, T., XIAN-XIAN, H., CAVAZOS, J., SCOTT, G.: Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity, *Science*, 239: 1147-1150, 1988.
- 26- STANFIELD, B.B.: Excessive intra- and supragranular mossy fibers in the dentate gyrus of tottering (*tg/tg*) mice, *Brain Res.*, 480: 293-299, 1989.
- 27- FROTSCHER, M., ZIMMER, J.: Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique, *J Comp Neurol.*, 215: 299-311, 1983.

- 28- CRONIN, J., DUDEK, F.E.: Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats, *Brain Res.*, 474: 181-184, 1988.
- 29- MELLO, L.E.A.M., CAVALHEIRO, E.A., TAN, A.M., KUPFER, W.R., PRETORIUS, J.K., BABB, T.L., FINCH, D.M.: Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting, *Epilepsia*, 34 (6): 985-995, 1993.
- 30- CAVAZOS, J.E., GOLARAI, G., SUTULA, T.P.: Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression and permanence, *J Neurosci.*, 11 (9): 2795-2803, 1991.
- 31- CAVALHEIRO, E.A., SANTOS, N.F., PRIEL, M.R.: The pilocarpine model of epilepsy in mice, *Epilepsia*, 37 (10): 1015-1019, 1996.
- 32- DANSCHER, G.: Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy, *Histochemistry*, 71: 1-16, 1981.
- 33- SLOVITER, R.S.: Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy, *Hippocampus*, 1: 41-66, 1991.
- 34- TURSKI, W.A., CZUCZWAR, S.J., KLEINROK, Z., TURSKI, L.: Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats, *Experientia*, 39: 1408-1411, 1983.
- 35- HONCHAR, M.P., OLNEY, J.W., SHERMAN, W.R.: Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats, *Science*, 220: 323-325, 1983.
- 36- SHERMAN, W.R., MUNSELL, L.Y., GISH, B.G., HONCHAR, M.P.: Effects of systemically administered lithium on phosphoinositide metabolism in rat brain, kidney, and testis, *J Neurochem.*, 44: 798-807, 1985.
- 37- JOPE, R.S., MORRISETT, R.A., SNEAD, O.C.: Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats, *Exp Neurol.*, 91: 471-480, 1986.

- 38- MORRISETT, R.A., JOPE, R.S., SNEAD, O.C.: Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats, *Exp Neurol.*, 97: 193-200, 1987.
- 39- ORMANDY, G.C., JOPE, R.S., SNEAD, O.C.: Anticonvulsant actions of MK-801 on the lithium-pilocarpine model of status epilepticus in rats, *Exp Neurol.*, 106: 172-180, 1989.
- 40- JOPE, R.S.: Effects of lithium treatment in vitro and in vivo on acetylcholine metabolism in rat brain, *J Neurochem.*, 33: 487-495, 1979.
- 41- JOPE, R.S., MORRISETT, R.A.: Neurochemical consequences of status epilepticus induced in rats by coadministration of lithium and pilocarpine, *Exp Neurol.*, 93: 404-414, 1986.
- 42- MORK, A., GEISLER, A.: Effects of GTP on hormone-stimulated adenylate cyclase activity in cerebral cortex, striatum, and hippocampus from rats treated chronically with lithium, *Biol Psychiatry.*, 26: 279-288, 1989.
- 43- CASEBOLT, T.L., JOPE, R.S.: Chronic lithium treatment reduces norepinephrine-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in rat cortex, *Eur J Pharmacol.*, 140: 245-246, 1987.
- 44- CASEBOLT, T.L., JOPE, R.S.: Long-term lithium treatment selectively reduces receptor-coupled inositol phospholipid hydrolysis in rat brain, *Biol Psychiatry.*, 25: 329-340, 1989.
- 45- WALTON, N.Y., TREIMAN, D.M.: Response of status epilepticus induced by lithium and pilocarpine to treatment with diazepam, *Exp Neurol.*, 101: 267-275, 1988.
- 46- WALTON, N.Y., GUNAWAN, S., TREIMAN, D.M.: Brain amino acid concentration changes during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine, *Exp Neurol.*, 108: 61-70, 1990.
- 47- CAVALHEIRO, E.A., LEITE, J.P., BORTOLOTTI, Z.A., TURSKI, W.A., IKONOMIDOU, C., TURSKI, L.: Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage

of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures, *Epilepsia*, 326 (6): 778-782, 1991.

48- TURSKI, L., CAVALHEIRO, E.A., SIEKLUCKA-DZIUBA, M., IKONOMIDOU-TURSKI, C., CZUCZWAR, S.J., TURSKI, W.A.: Seizures produced by pilocarpine: Neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain, *Brain Res.*, 398: 37-48, 1986.

49- JOPE, R.S., SIMONATO, M., LALLY, K.: Acetylcholine content in rat brain is elevated by status epilepticus induced by lithium and pilocarpine, *J Neurochem.*, 49 (3): 944-951, 1987.

50- SLOVITER, R.S., DEMPSTER, D.W.: "Epileptic" brain damage is replicated qualitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine, *Brain Res Bull.*, 15: 39-60, 1985.

51- OLNEY, J.W., COLLINS, R.C., SLOVITER, R.S.: Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage, *Adv Neurol.*, 44: 857-877, 1986.

52- SMOLDERS, I., KHAN, G.M., MANIL, J., EBINGER, G., MICHOTTE, Y.: NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis, *Br J Pharmacol.*, 121: 1171-1179, 1997.

53- FUJIKAWA, D.G.: Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset, *Epilepsia*, 36 (2): 186-195, 1995.

54- GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L., CHESS-WILLIAMS, R.: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain, *Nature*, 336: 385-388, 1988.

55- DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., LONDON, E.D., BREDT, D.S., SYNDER, S.H.: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 88: 6368-6371, 1991.

- 56- DICKIE, B.G.M., LEWIS, M.J., DAVIES, J.A.: Potassium-stimulated release of nitric oxide from cerebellar slices, *Br J Pharmacol.*, 101: 8-9, 1990.
- 57- GARTHWAITE, J.: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system, *Trends Neurosci.*, 14 (2): 60-67, 1991.
- 58- BODA, B., SZENTE, M.: Nitric oxide synthase inhibitor facilitates focal seizures induced by aminopyridine in rat, *Neurosci Lett.*, 209: 37-40, 1996.
- 59- DAWSON, T.M., SYNDER, S.H.: Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain, *J Neurosci.*, 14 (9): 5147-5159, 1994.
- 60- DE SARRO, G., DI PAOLA, E.D., DE SARRO, A., VIDAL, M.J.: L-Arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep prepiriform cortex, *Eur J Pharmacol.*, 230: 151-158, 1993.
- 61- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A.: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication, *Biochem Pharmacol.*, 38 (11): 1709-1715, 1989.
- 62- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A.: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol Rev.*, 43 (2): 109-142, 1991.
- 63- GARTHWAITE, J., GARTHWAITE, G., PALMER, R.M.J., MONCADA, S.: NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices, *Eur J Pharmacol.*, 172: 413-416, 1989.
- 64- BREDT, D.S., SYNDER, S.H.: Nitric oxide: a physiologic messenger molecule, *Ann Rev Biochem.*, 63: 175-195, 1994.
- 65- MAYER, M.L., MILLER, R.J.: Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca²⁺ in mammalian neurons, *Trends Pharmacol Sci.*, 11: 254-260, 1990.

- 66- AKAIKE, A., TAMURA, Y., TERADA, K., NAKATA, N.: Regulation by neuroprotective factors of NMDA receptor mediated nitric oxide synthesis in the brain and retina, *Prog Brain Res.*, 103: 391-403, 1994.
- 67- KNOWLES, R.G., MONCADA, S.: Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem J.*, 298: 249-258, 1994.
- 68- FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H.H.H.W., POLLOCK, J.S., SHENG, H., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., NAKANE, M., MURAD, F.: Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types, *Biochem Pharmacol.*, 42 (10): 1849-1857, 1991.
- 69- SMITH, S.E., MAN, C.M., YIP, P.K., TANG, E., CHAPMAN, A.G., MELDRUM, B.S.: Anticonvulsant effects of 7-nitroindazole in rodents with reflex epilepsy may result from L-arginine accumulation or a reduction in nitric oxide or L-citrulline formation, *Br J Pharmacol.*, 119: 165-173, 1996.
- 70- FÖRSTERMANN, U., GORSKY, L.D., POLLOCK, J.S., SCHMIDT, H.H.H.W., HELLER, M., MURAD, F.: Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain, *Biochem Biophys Res Commun.*, 168 (2): 727-732, 1990.
- 71- MURPHY, S., SIMMONS, M.L., AGULLO, L., GARCIA, A., FEINSTEIN, D.L., GALEA, E., REIS, D.J., MINC-GOLOMB, D., SCHWARTZ, J.P.: Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells, *Trends Neurosci.*, 16 (8): 323-328, 1993.
- 72- VALTSCHANOFF, J.G., WEINBERG, R.J., KHARAZIA, V.N., SCHMIDT, H.H.H.W., NAKANE, M., RUSTIONI, A.: Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA, *Neurosci Lett.*, 157: 157-161, 1993.
- 73- MODICA, A., TEMPELHOFF, R., WHITE, P.F.: Pro- and anticonvulsant effects of anesthetics (Part 1), *Anesth Analg.*, 70: 303-315, 1990.

- 74- JANUSZ, W., KLEINROK, Z.: The role of the central serotonergic system in pilocarpine-induced seizures: receptor mechanisms, *Neurosci Res.*, 7: 144-153, 1989.
- 75- ABERCROMBIE, M.: Estimation of nuclear population from microtome sections, *Anat Rec.*, 94: 239-247, 1946.
- 76- HOLMES, G.L., THOMPSON, J.L., MARCHI, T., FELDMAN, D.S.: Behavioral effects of kainic acid administration on the immature brain, *Epilepsia*, 29 (6): 721-730, 1988.
- 77- PRZEWLOCKA, B., MACHELSKA, H., LASON, W.: Kappa opioid receptor agonists inhibit the pilocarpine-induced seizures and toxicity in the mouse, *European Neuropsychopharmacology*, 4: 527-533, 1994.
- 78- CAVALHEIRO, E.A., RICHE, D.A., LE GAL LA SALLE, G.: Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.*, 53 (6): 581-589, 1982.
- 79- OLNEY, J.W., RHEE, V., HO, O.L.: Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate, *Brain Res.*, 77: 507-512, 1974.
- 80- DARCEY, T.M., WILLIAMSON, P.D.: Chronic/semichronic limbic epilepsy produced by microinjection of tetanus toxin in cat hippocampus, *Epilepsia*, 33 (3): 402-419, 1992.
- 81- LOTHMAN, E.W., BERTRAM, E.H., KAPUR, J., STRINGER, J.L.: Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus, *Epilepsy Res.*, 6 (2): 110-118, 1990.
- 82- TURSKI, L., IKONOMIDIU, C., TURSKI, W.A., BORTOLOTTI, Z.A., CAVALHEIRO, E.A.: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: A novel experimental model of intractable epilepsy, *Synapse*, 3: 154-171, 1989.
- 83- TURSKI, W.A., CAVALHEIRO, E.A., COIMBRA, C., BERZAGHI, M.P., IKONOMIDOU-TURSKI, C., TURSKI, L.: Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine, *Brain Res Rev.*, 12: 281-305, 1987.

- 84- TURSKI, W.A., CAVALHEIRO, E.A., BORTOLOTTI, Z.R., MELLO, L.M., SCHWARTZ, M., TURSKI, L.: Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis, *Brain Res.*, 321: 237-253, 1984.
- 85- MICHALEK, H., FORTUNA, S., PINTOR, A.: Age-related differences in brain choline acetyltransferase, cholinesterases and muscarinic receptor sites in two strains of rats, *Neurobiology of Aging*, 10: 143-148, 1989.
- 86- HOLMES, G.L.: Do seizures cause brain damage?, *Epilepsia*, 32 (Suppl. 5): 14-28, 1991.
- 87- MOLLACE, V., BAGETTA, G., NISTICO, G.: Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide, *Neuroreport*, 2 (5): 269-272, 1991.
- 88- MULSCH, A., BUSSE, R., MORDVINTCHEV, P.I., VANIN, A.F., NIELSEN, E.O., SCHEEL-KRUGER, J., OLESEN, S.P.: Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats, *Neuroreport*, 5 (17): 2325-2328, 1994.
- 89- SANDIRASEGARANE, L., MIKLER, J.R., TUCHEK, J.M., SULAKHE, P.V.: Enhanced forebrain nitric oxide synthase activity in epileptic fowl, *Brain Res.*, 735: 311-313, 1996.
- 90- LIBRI, V., SANTARELLI, R., NISTICO, S.: Inhibition of nitric oxide synthase prevents magnesium-free-induced epileptiform activity in guinea-pig piriform cortex neurones in vitro, *Naunyn-Schmiedeberg's Arc Pharmacol.*, 355: 452-456, 1997.
- 91- PRZEWLOCKA, B., LASON, W., MACHESKA, H., PRZEWLOCKI, R.: The effects of cocaine-induced seizures on the proenkephalin mRNA level in the mouse hippocampus: a possible involvement of the nitric oxide pathway, *Neurosci Lett.*, 168: 81-84, 1994.
- 92- BAGETTA, G., IANNONE, M., SCORSA, A.M., NISTICO, G.: Tacrine-induced seizures and brain damage in LiCl-treated rats can be prevented by N^o-nitro-L-arginine methyl ester, *Eur J Pharmacol.*, 213: 301-304, 1992.

- 93- URBANSKA, E.M., DRELEWSKA, E., BOROWICZ, K.K., BLASZCZAK, P., KLEINROK, Z., CZUCZWAR, S.J.: NG-nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, and seizure susceptibility in four seizure models in mice, *J Neural Transm.*, 103 (10): 1145-1152, 1996.
- 94- DEL-BEL, E.A., OLIVEIRA, P.R., OLIVEIRA, J.A.C., MISHRA, P.K., JOBE, P.C., GARCIA-CAIRASCO, N.: Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models, *Braz J Med Biol Res.*, 30 (8): 971-979, 1997.
- 95- PRZEGALINSKI, E., BARAN, L., SIWANOWICZ, J.: The role of nitric oxide in the kainate-induced seizures in mice, *Neurosci Lett.*, 170: 74-76, 1994.
- 96- RONDOUIN, G., LERNER-NATOLI, M., MANZONI, O., LAFON-CAZAL, M., BOCKAERT, J.: A nitric oxide (NO) synthase inhibitor accelerates amygdala kindling, *Neuroreport*, 3 (9): 805-808, 1992.
- 97- MARANGOZ, C., AYYILDIZ, M., AĞAR, E.: Evidence that sodium nitroprusside possesses anticonvulsant effects mediated through nitric oxide, *Neuroreport*, 5 (18): 2454-2456, 1994.
- 98- RONDOUIN, G., BOCKAERT, J., LERNER-NATOLI, M.: L-nitroarginine, an inhibitor of NO synthase, dramatically worsens limbic epilepsy in rats, *Neuroreport*, 4 (10): 1187-1190, 1993.
- 99- BUISSON, A., LAKHMECHE, N., VERRECCHIA, C., PLOTKINE, M., BOULU, R.G.: Nitric oxide: an endogenous anticonvulsant substance, *Neuroreport*, 4 (4): 444-446, 1993.
- 100- WANG, Q., THEARD, M.A., PELLIGRINO, D.A., BAUGHMAN, V.L., HOFFMAN, W.E., ALBRECHT, R.F., CWIK, M., PAULSON, O.B., LASSEN, N.A.: Nitric oxide (NO) is an endogenous anticonvulsant but not a mediator of the increase in cerebral blood flow accompanying bicuculline-induced seizures in rats, *Brain Res.*, 658: 192-198, 1994.

- 101- STARR, M.S., STARR, B.S.: Paradoxical facilitation of pilocarpine-induced seizures in the mouse by MK-801 and the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME, *Pharmacol Biochem Behav.*, 45: 321-325, 1993.
- 102- MANZONI, O., PREZEAU, L., MARIN, P., DESHAGER, S., BOCKAERT, J., FAGNI, L.: Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors, *Neuron*, 8: 653-662, 1992.
- 103- LEI, S.Z., PAN, Z.H., AGGARWAL, S.K., CHEN, H.S.V., HARTMAN, J., SUCHER, N.J., LIPTON, S.A.: Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex, *Neuron*, 8: 1087-1099, 1992.
- 104- LIPTON, S.A.: Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide, *Trends Neurosci.*, 16 (12): 527-532, 1993.
- 105- LIPTON, S.A., CHOI, Y.B., PAN, Z.H., LEI, S.Z., CHEN, H.S.V., SUCHER, N.J., LOSCALZO, J., SINGEL, D.J., STAMLER, J.S.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds, *Nature*, 364: 626-632, 1993.
- 106- LANCELOT, E., LEROUET, D., CALLEBERT, J., REVAUD, M.L., BOULU, R.G., PLOTKINE, M.: Nitric oxide modulates the basal NMDA receptor-mediated hydroxyl radical production in brain, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 15 (Suppl. 1): 448, 1995.
- 107- RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A.: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch Biochem Biophys.*, 228 (2): 481-487, 1991.
- 108- BAUTISTA, A.P., SPITZER, J.J.: Inhibition of nitric oxide formation in vivo enhances superoxide release by the perfused liver, *Am J Physiol.*, 266: G783-G788, 1994.
- 109- LEVY, D.I., SUCHER, N.J., LIPTON, S.A.: Redox modulation of NMDA receptor-mediated toxicity in mammalian central neurons, *Neurosci Lett.*, 110: 291-296, 1990.

110- WATANABE, A.M., KATZUNG, B.G.: Cholinoceptor-activating & cholinesterase-inhibiting drugs, Basic & Clinical Pharmacology Ed. KATZUNG, B.G., Lange Medical Publications, Lebanon, 1992, 82-96.

111- ALVING, K., FORNHEM, C., WEITZBERG, E., LUNDBERG, J.M.: Nitric oxide mediates cigarette-smoke-induced vasodilatory responses in the lung, Acta Physiol Scand., 146: 407-408, 1992.



TEŞEKKÜR

Doktora tezimin hazırlanması sırasında değerli katkılarını gördüğüm danışman hocam sayın *Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK'e*, tez çalışmamın tüm aşamalarında ilgisini ve emeğini esirgemedi bana destek olan ikinci danışman hocam sayın *Yrd. Doç. Dr. Behzat NOYAN'a*, histopatolojik çalışmalar sırasındaki içten yardımları ve bölümlerindeki olanaklardan yararlanmamı sağladıkları için Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın *Yrd. Doç. Dr. Semiha NOYAN'a* ve Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın *Prof. Dr. Şahsine Tolunay'a* teşekkürü borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında İstanbul'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Bursa'da tamamladım. 1985 yılında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdim ve 1986 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne yatay geçiş yaparak 1992 yılında mezun oldum. Üç yıl Bursa Merkez Fevzi Çakmak sağlık ocağında çalıştıktan sonra 1995 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım ve aynı yerde araştırma görevlisi kadrosuna atandım. Halen Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği üyesiyim. Evliyim ve 5 yaşında bir oğlum var.