

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA PENTİLENTETRAZOL İLE OLUŞTURULAN  
EPİLEPTİK NÖBET MODELİNDE PREGABALİNİN BEYİN  
KORTEKSİNDE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. Ahmet TÜFEKÇİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Hasan Rifat KOYUNCUOĞLU**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi  
Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından  
1779-TU-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2010-İSPARTA**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgilerinden ve klinik tecrübelerinden faydalandığım tez danışmanım Doç. Dr. Hasan Rifat KOYUNCUOĞLU başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Süleyman KUTLUHAN, Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ ve Yrd. Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ'ye,

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ'a,

Asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan zevk aldığım asistan arkadaşlarıma,

Desteği, anlayışı ile hep yanımda olan sevgili eşime, dünyaya gelişi ile hayatımıza neşe katan sevgili kızım Naz'a, en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Ahmet TÜFEKÇİ

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	iv
ŞEKİLLER .....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	vi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİ .....	2
2.1. Epilepsi .....	2
2.1.1. Tanım .....	2
2.1.2. Tarihçe .....	3
2.1.3. Epidemiyoloji .....	3
2.1.4. Etiyoloji .....	4
2.1.5. Sınıflandırma .....	5
2.1.6. Fizyopatoloji .....	7
2.1.7. Tedavi .....	11
2.1.8. Pregabalin .....	13
2.1.9. Deneysel Epilepsi Modelleri .....	15
2.1.10. Pentilentetrazol .....	17
2.2. Oksidatif Stres .....	17
2.2.1. Serbest Radikaller .....	17
2.2.1.1. Süperoksit Radikali .....	22
2.2.1.2. Hidrojen Peroksit .....	23
2.2.1.3. Hidroksil Radikali .....	24
2.2.1.4. Nitrik Oksit .....	25
2.2.2. Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasar .....	26
2.2.3. Antioksidanlar .....	28
2.2.3.1. Süperoksit Dismütaz .....	28
2.2.3.2. Katalaz .....	29
2.2.3.3. Glutasyon Peroksidaz .....	29
2.2.4. Oksidatif Stres ve Epilepsi .....	30
2.3. Beyin Korteksi .....	31

3. MATERYAL VE METOD .....	34
3.1. Deney Hayvanları.....	34
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	35
3.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar .....	35
3.4. Deneysel Model .....	36
3.5. Anestezi ve Doku Örnekleri.....	36
3.6. Homojenizasyon İşlemi ve Numunelerin Hazırlanması .....	37
3.7. Süperoksit Dismütaz Enzim Aktivitesinin Tayini.....	38
3.8. Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini.....	38
3.9. Nitrik Oksit Düzeyinin Tayini .....	38
3.10. Malondialdehit Düzeyinin Tayini .....	39
3.11. Numunelerde Protein Tayini .....	39
3.12. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	44
ÖZET .....	53
SUMMARY .....	54
KAYNAKLAR .....	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AEİ</b>	: Antiepileptik ilaç
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>Cl</b>	: Klor
<b>EEG</b>	: Elektroensefalografi
<b>eNOS</b>	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>EPSP</b>	: Eksitator postsinaptik potansiyel
<b>GABA</b>	: Gama amino butirik asit
<b>GAD</b>	: Glutamik asit dekarboksilaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSSH</b>	: Okside glutasyon
<b>H<sup>+</sup></b>	: Hidrojen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>ILAE</b>	: Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>ip</b>	: İntraperitoneal
<b>İPSP</b>	: İnhibitör postsinaptik potansiyel
<b>K</b>	: Potasyum
<b>L<sup>·</sup></b>	: Lipid radikali
<b>L-NA</b>	: N-nitro-L-arjinin
<b>L-NAME</b>	: N-nitro-L-arjinin metil ester
<b>LOO<sup>·</sup></b>	: Lipid peroksit
<b>LOOH</b>	: Lipid hidroperoksit
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>Na</b>	: Sodyum
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Okside nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADH</b>	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADPH</b>	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NBT</b>	: Nitroblue tetrazolium
<b>NMDA</b>	: N-Metil-D-Aspartat
<b>NNDA</b>	: N-Naphtylethylene diamine
<b>nNOS</b>	: Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit
<b>O<sub>2</sub></b>	: Moleküler oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Peroksi
<b>OH<sup>·</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b>PDK</b>	: Paroksizmal depolarizasyon kayması
<b>PGB</b>	: Pregabalin
<b>PTZ</b>	: Pentilentetrazol
<b>RNT</b>	: Reaktif nitrojen türleri

<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SF</b>	: Serum fizyolojik
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SR</b>	: Serbest radikaller
<b>SDÜ</b>	: Süleyman Demirel Üniversitesi
<b>TBA</b>	: Tiobarbitürik asit
<b>TCA</b>	: Triklorasetik asit
<b>VKKK</b>	: Voltaj kapılı kalsiyum kanalları
<b><math>\alpha 2\delta</math></b>	: Alfa-2-delta

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.</b> Pregabalinin etki mekanizması .....	14
<b>Şekil 2.</b> Oksijen ve oksijenin spin kısıtlaması aşılış formları .....	20
<b>Şekil 3.</b> Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu .....	26
<b>Şekil 4.</b> Beyin korteksi malondialdehit düzeyleri .....	42
<b>Şekil 5.</b> Beyin korteksi süperoksit dismütaz aktiviteleri.....	42
<b>Şekil 6.</b> Beyin korteksi nitrik oksit düzeyleri.....	43
<b>Şekil 7.</b> Beyin korteksi katalaz aktiviteleri .....	43

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Epileptik nöbetlerin klinik ve elektroensefalografik sınıflaması .....	5
<b>Tablo 2.</b> Antiepileptik ilaçların saptanan etki mekanizmaları.....	13
<b>Tablo 3.</b> Deneysel epilepsi hayvan modelleri.....	16
<b>Tablo 4.</b> Serbest radikallerin başlıca kaynakları.....	18
<b>Tablo 5.</b> Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler .....	21
<b>Tablo 6.</b> Deneyde kullanılan cihazlar .....	35
<b>Tablo 7.</b> Rat beyin korteksinde süperoksit dismütaz, katalaz enzim aktiviteleri ve malondialdehit, nitrik oksit düzeyleri .....	41

## 1. GİRİŞ

Epilepsi tam olarak fizyopatolojisi anlaşılmayan biyokimyasal ve moleküler olaylardan kaynaklanan yaygın ve heterojen bir nörolojik hastalıktır. Epileptik nöbetin tetiklediği nöronal ölümün etyolojisinde oksidatif stresin önemli rol oynayabileceği ortaya çıkmıştır. Santral sinir sisteminde oksidatif stres oluşumu amigdala kindling, kainik asit, pentilentetrazol (PTZ), elektroşok ile oluşturulan çeşitli deneysel hayvan epilepsi modellerinde gösterilmiştir.

Deneysel çalışmalarda bazı antiepileptiklerin serbest oksijen radikallerini inhibe ederek nörotoksisiteyi önlediği gösterilmiştir. Yeni kuşak bir antiepileptik olan pregabalin (PGB), potent ve selektif olarak hipereksite voltaj kapılı kalsiyum kanallarının (VKKK) alfa-2-delta ( $\alpha 2\delta$ ) alt ünitesine bağlanarak etkisini gösterir. PGB'in antiepileptik özelliği yanında nöroprotektif özelliği olduğu da gösterilmiştir.

PGB ve dokulardaki oksidatif stres üzerine yapılmış bir çalışma literatürde bulunamamıştır. Biz bu projemizde, ratlarda deneysel olarak PTZ ile oluşturulan epileptik nöbet modelinde, beyin korteksinde, oksidatif stresin göstergeleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine PGB'in etkilerini araştırmayı amaçladık.



## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Epilepsi

#### 2.1.1. Tanım

Epileptik nöbet; kortikal nöronların kendini sınırlayıcı, anormal, hipersenkron deşarjlarına bağlı olarak ortaya çıkan beynin geçici fizyolojik disfonksiyonudur. Epileptik nöbetin kendine özgü belirtileri, korteksin tümü yada bir kısmının tutulması, köken aldığı kortikal bölgenin işlevi, iktal deşarjın subkortikal ve beyinsapına yayılma şekline bağlıdır (1). Nöbetler ve etkilerini birkaç döneme ayırarak incelemek mümkündür. Aura veya ilk hissedilen semptom nöbetin başladığı anatomik bölgeyi işaret eder. Bundan sonra nöbetin kendisi gelir ve bunu postiktal dönem takip eder. Nöbetler epilepsinin kardinal bulgusu olmasına rağmen her nöbet epilepsiyi düşündürmez. Örnek olarak nöbetler sadece akut medikal veya nörolojik hastalığın seyrinde ortaya çıkarak kendini sınırlayıcı olabilir, altta yatan bozukluk düzeltildikten sonra devam etmeyebilir (1). Ayrıca bazı insanlar da hayatı boyunca provoke edilmemiş tek bir nöbet geçirebilir.

### 2.1.2. Tarihçe

Tarihsel veriler bir hastalık belirtisi olarak epileptik fenomenlerin ve nöbetin oldukça eski dönemlerden beri, çeşitli toplumlarca fark edildiğini göstermektedir. Günümüzde kullandığımız epilepsi sözcüğü eski Yunancada yakalamak, kavramak anlamlarına gelen epilambanein kelimesinden türetilmiştir ve yalın anlamı yakalama, tutma demektir (2). Epilepsinin varlığı ile ilgili en eski ayrıntılı açıklama, Babil metinlerinde bulunmuştur. Babillerin beyin fonksiyonları yada patolojisi ile ilgili anlayışı yoktu, ancak her bir nöbet tipinin vücudu istila eden bir şeytan sonucu olduğunu düşünüyorlardı (3). Milattan önce beşinci yüzyılda Hipokrat “kutsal hastalık” tanımını yapmış ve diğer birçok şiddetli hastalık gibi, bu hastalıkta da beynin hastalığın merkezi olduğunu ilk kez ifade etmiştir (3). Ondokuzuncu yüzyılın sonlarına kadar hakim olan doğaüstü görüş üzerine Hipokrat’ın tedavi edilebilir beyin hastalığı kavramının küçük bir etkisi olmuştur. Çağlar boyu süren yavaş ilerleme 20. yüzyılın son çeyreğinden itibaren ivme kazanmıştır (2).

### 2.1.3 Epidemiyoloji

Gelişmiş ülkelerde epilepsi insidansı yüzbinde 24-53 iken gelişmekte olan ülkelerde insidans daha yüksektir (4). Gelişmiş ülkelerde yaşa göre insidansa bakıldığında gençler ve yaşlılarda yükseklik saptanırken, gelişmekte olan ülkelerde gençlerde yükseklik mevcutken yaşlılarda dramatik artış bildirilmemektedir. Batı ülkelerinde 70 yaş

üzeri epilepsi insidansı yaşamın ilk on yılına göre daha yüksektir ve epilepsi vakalarının yaklaşık sadece %50'si çocuk ve adolesanları kapsamaktadır (4). Prevalans insidans, ölüm, hastalık remisyon oranları, göç gibi pek çok faktörün etkisine açık bir değerdir. Çok farklı sonuçlar olmasına karşın gelişmiş ülkeler için ortalama epilepsi prevalansının binde 6 olduğu ve geliştirmekte olan ülkelerde bu oranın ortalama binde 18.5 olduğu bildirilmektedir (5). Tümünde olmasa da çalışmaların çoğunda insidanda cinsiyete özgü farklılık saptanmamakta iken prevalansta; erkeklerde kadınlara oranla yükseklik rapor edilmektedir (4).

En sık görülen nöbet tipi parsiyel nöbetlerdir ve bunu jeneralize tonik-klonik nöbetler izlemektedir. Diğer nöbet tipleri, örneğin absans, izole tonik, atonik veya miyoklonik nöbetler nisbeten daha seyrekdir (6).

#### **2.1.4 Etiyoloji**

Yapılan çalışmalarda hastaların yalnızca 1/4-1/3'ünde epilepsi etiyojisi saptanabilmektedir. Eğer geçmişte olan bir olay epilepsi gelişim risk artışına sebep oluyorsa semptomatik epilepsi olarak değerlendirilir. Semptomatik faktörlerin başlıcaları inme öyküsü, beyin malformasyonları, serebral palsi gibi nörogelişimsel anormallikler, bakteriyel menenjit veya viral ensefalit öyküsü, çeşitli genetik durumlar ve tümörlerdir (7). Sebep olabilecek bir faktörün saptanamadığı grup ise semptomatik olmayan olarak değerlendirilip idiyopatik ve kriptojenik olarak iki gruba ayrılır.

### 2.1.5. Sınıflandırma

Nöbetler çeşitli şekilde gruplanır: olası etyolojilerine göre yani idyopatik (primer) veya semptomatik (sekonder); kaynaklandıkları yere göre; klinik şekillerine göre (jeneralize veya fokal); sıklıklarına göre (izole, siklik, tekrarlayıcı veya status epileptikustaki gibi yakın zaman ilişkisi içinde) veya elektrofizyolojik karşılıklarına göre (8).

Sınıflandırma çalışmaları ilk kez 1964 yılında başlamıştır. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) sınıflama komisyonunun uzun süren çalışmaları sonucunda hazırlanan ve halen kullanılmakta olan 1981 Epileptik Nöbetlerin Klinik ve Elektrografik Sınıflaması ve 1989 Epilepsiler ve Epileptik Sendromların Sınıflaması tüm dünyada kabul görmüş ve ortak bir dil oluşumunu sağlamıştır (9). Uluslararası sınıflamanın gücü epilepsili hastalara kolayca uygulanabilmesine ve genel kabul görmesine dayanır. ILAE'nin 1981 de yaptığı sınıflama nöbetlerin klinik tipi ve elektroensefalografi (EEG) karşılığına göre temellendirilmiştir ve tüm dünyada kabul gören Uluslararası Sınıflama olarak bahsedilir (Tablo 1).

Tablo 1: Epileptik Nöbetlerin Klinik ve Elektroensefalografik Sınıflaması

1-Parsiyel (fokal, lokal) nöbetler
A-Basit parsiyel nöbetler(bilinç durumu bozulmaksızın)
a-Motor semptomlu
b-Somatosensoryal veya özel duyuusal semptomlu
c-Otonomik semptomlu
d-Psişik semptomlu
B-Kompleks parsiyel nöbetler(bilinç bozukluğu ile giden)

Tablo 1 (devam): Epileptik Nöbetlerin Klinik ve Elektroensefalografik Sınıflaması

a-Basit parsiyel başlangıcı izleyen bilinç bozukluğu
b-Bilinç durumunun başlangıçtan itibaren bozulması
C-Sekonder jeneralize nöbete dönüşen
2-Jeneralize nöbetler(konvülsif veya nonkonvülsif)
A- Absans nöbetleri
B- Myoklonik nöbetler
C- Klonik nöbetler
D- Tonik nöbetler
E- Tonik-klonik nöbetler
F- Atonik nöbetler(astatik)
3-Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler

Bir nöbeti klinik ve EEG bulguları ile sınıflama sayesinde spesifik ilaçlara yanıt ve bir miktar da prognoz öngörebilir (8). Temel olarak bu sınıflama nöbetleri parsiyel ve jeneralize olmak üzere iki gruba ayırır. Parsiyel nöbet, sınırlı bir kortikal alandan kaynaklanırken jeneralize nöbet başlangıçtan itibaren simetrik ve senkron olarak tüm korteksi tutar.

Parsiyel nöbetler üç büyük kategoride toplanır:

1. Basit Parsiyel Nöbetler: Bilinç kaybının olmadığı, fokal epileptik aktivite vardır. Klinik olarak beyinden kaynaklandığı yere göre motor, duyuşal, otonomik, psişik belirtilerle karakterizedir (8).

2. Kompleks Parsiyel Nöbetler: Jeneralize tonik-klonik aktivite olmadan bilincin bozulduğu nöbetlerdir. Kompleks parsiyel nöbetlerin çoğu temporal lobdan kaynaklanırlar, epilepsi cerrahi çalışmaları değerlendirildiğinde hastaların %10-30'unun ekstratemporal kaynaklı olup sıklıkla frontal lobdan kaynaklandığı gösterilmiştir (7).

3. Sekonder Jeneralizasyon Gösteren Parsiyel Nöbetler: Herhangi bir kortikal alandan kaynaklanan parsiyel nöbetler diğer bölgelere

yayılarak, sekonder jeneralize epileptik nöbetlerin gelişmesine neden olurlar. Klinik pratikte sekonder jeneralize nöbetlerin tanısı nöbet öyküsü, fokal beyin lezyonu, tutarlı lokalize zemin aktivite anormalliği yada fokal interiktal epileptiform aktivite varlığı gibi direkt olmayan kanıtlara dayanır (10).

Jeneralize nöbetler konvülsif ve nonkonvülsif olarak iki grupta incelenir. Sık olan konvülsif nöbet tipi tonik-kloniktir. Daha seyrek olarak sadece tonik, sadece klonik veya klonik-tonik-klonik jeneralize nöbetler görülür. Klasik nonkonvülsif jeneralize nöbet bilincin kısa süreli kaybının olduğu absanstır. Ayrıca bu başlık altına minör motor fenomenler örneğin kısa miyoklonik, atonik veya tonik nöbetler de dahil edilmektedir (8).

### **2.1.6. Fیزیopatoloji**

Epileptik nöbetler, inhibisyon ve eksitasyon arasındaki dengesizlik nedeniyle nöronal ağ bağlantısında oluşan anormal hipersenkron elektriksel aktivitenin yansımasıdır. Epileptogenez terimi ise normal nöronal bağlantıların aşırı uyarılabilir hale gelerek tekrarlayan spontan nöbetler oluşturmasını ifade etmektedir (11).

Nöron membranın istirahat potansiyeli -60 ile -70 milivolt arasında değişmektedir. İstirahat membran potansiyelinin korunmasında enerji gerektiren sodyum-potasyum (Na-K) ve klor (Cl) pompalarının önemi büyüktür. Sinaptik alana nörotransmitter salınımı ile lokal postsinaptik potansiyel oluşmaktadır. Eksitatör sinapsta (glutamaterjik)

postsinaptik alanda Na kanallarının açılması ile oluşan depolarizasyona eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) denir. İnhibitör sinapsta (gama amino butirik asit (GABA)) postsinaptik alanda Cl kanallarının açılması ile oluşan hiperpolarizasyona ise inhibitör postsinaptik potansiyel (İPSP) denir. Ritmik olarak oluşan EPSP ve İPSP'lerin birleşmesi ve senkronizasyonu skalp EEG'den kaydedilen normal zemin ritminin temelini oluşturur (11).

Nöbet odağındaki her nöronun stereotipik ve senkronize elektriksel yanıtı vardır ki buna paroksizmal depolarizasyon kayması (PDK) denir. PDK ani, büyük ve uzun süren depolarizasyondan oluşur. PDK'yı ard-hiperpolarizasyon süreci takip eder. Bunlar sırasıyla nöronun membran özellikleri (voltaj bağımlı sodyum, potasyum, kalsiyum kanalları) ile eksitator (glutamaterjik) ve inhibitör (GABA'erjik) nöronların sinaptik aktiviteleri tarafından oluşturulur (12). Anormal elektriksel aktivite odakla sınırlı kaldıkça klinik nöbet göstergesi ortaya çıkmaz ve yalnızca interiktal skalp EEG de fokal diken aktivitesi olarak saptanabilir (13). Normal fizyolojik durumlar altında, piramidal nöronların alt kümesi olan korteksin V. tabakası ve hipokampusun CA3 bölgesi kısa depolarizasyona ani patlama yanıtı oluşturabilir. Epileptik beyinde PDK ilk olarak bu bölgelerde oluşmaya meyillidir (11). Parsiyel bir nöbetin gelişiminde odağın çevresindeki inhibisyon aşılır ve ard-hiperpolarizasyon tedricen azalarak anormal elektriksel aktivite odağın ötesine yayılır (12). Çevresel inhibisyonun ortadan kalkmasında en önemli faktör GABA'erjik iletimin çok labil olmasıdır. Bu labil davranışın GABA salınımı yada GABA'erjik reseptörlerdeki değişikliğe mi bağlı olduğu açık değildir. Çevresel inhibisyon kaybını etkileyen diğer faktörler dendritik yapılardaki kronik değişiklikler, reseptör ve kanalların yoğunluğu veya ekstraselüler

iyonlardır (12). Eğer nöbet aktivitesi yeterince Şiddetli ise, normal kortikal aktivitenin izlediği yollardan, başka beyin bölgelerine yayılır (13). Sekonder jeneralizasyon oluŐursa nöbetin ilk 30 saniyesinde tutulan bölgede uzun süreli depolarizasyon oluşur. Bu dönem kas kontraksiyonlarının tonik fazı ile ilgili olup, inen yollar beyin sapı ve spinal kordaki motor nöronları uyardığında ortaya çıkar. Nöbet ilerledikçe nöronlar repolarize olmaya başlar ve ard-hiperpolarizasyon tekrar ortaya çıkar. Bu depolarizasyon, repolarizasyon döngüleri nöbetin klonik fazını oluşturur. Nöbetin bu evresini azalmış elektriksel aktivite izler. Bu dönemde konfüzyon, uyku hali, hemiparezi gibi (Todd paralizisi) nörolojik defisitler klinik tabloya eşlik eder (12).

Nöbetler beyinde inhibitör sürece oranla eksitatör süreçte artma sırasında meydana gelirler (12). GABA kortikal yapıların ana inhibitör nörotransmitteridir. Birçok alıŐmada GABA'nın epileptogenezdeki rolü gösterilmiştir. İnsanlardan cerrahi olarak çıkarılan epileptik odağı içeren doku rneklelerinde GABA seviyesi ve GABA sentezinde rol alan glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzim aktivitesi azalmış olarak bulunmuştur. Malic enzim gen 2 de homozigot mutasyon saptanmasının adeloosan baŐlangıçlı idyopatik jeneralize epilepsi riskini arttırdığı gösterilmiştir. Bu enzim GABA sentezinde rol almaktadır. Ayrıca hayvan epilepsi çalışmalarında beyin omurilik sıvısında GABA düzeyinin düŐtüđü, substanstia nigra ve amigdalada GAD enzim aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (11). Glutamat ise ana eksitatör nörotransmitterdir. Birçok epilepsi hayvan modelinde postsinaptik glutamaterjik reseptörlerin uyarılmasının hipereksitabilite oluşturduğu ve N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptör antagonistlerinin güçlü antikonvulzan aktiviteye neden olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda sadece absans epilepsili hastalarda yapılan bir çalışmada plazma glutamat



düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Bu artışın primer olarak epileptik olaydan kaynaklandığı yada sekonder fenomen olduğu açık değildir (11).

Jeneralize epilepsilerin altında yatan nöroanatomik temel ile nörokimyasal anormallikler iyi tanımlanmış değildir ve halen aktif araştırmaların konusu olmaya devam etmektedir. Şu anki fizyolojik bilgiler, jeneralize epilepsi formlarının karakteristik EEG bulgularının neokortekste olduğu ve subkortikal yapıların senkronize edici etkileri ile arttığını göstermektedir (8). Jeneralize nöbetlerden üzerinde en çok çalışılan absans nöbetinde, talamokortikal hipersenkroni GABA bağımlı mekanizmalarca sürdürülür (14). Karşılıklı talamokortikal bağlantılarca senkronize edilen kortikal hücrelerde, depolarizasyon patlamalarını güçlü bir hiperpolarizasyon izler; bu EEG'deki tipik diken-dalga görüntüsünü oluşturur (13). T tipi kalsiyum kanalları ve GABA-B reseptörleri, insan absans nöbetlerine benzer aktivitenin oluşmasında önemli rol oynar (12). Hayvan çalışmalarında GABA-B agonistlerinin talamik bölgeye enjeksiyonunun diken dalga deşarjını arttırdığı ve GABA-B antagonistlerinin enjeksiyonunun bu deşarjları doza bağımlı azalttığı gösterilmiştir. Diken dalga aktivitesi ile T tipi kalsiyum kanallarının ilişkisini absans nöbetlerinde etkin bir antiepileptik olan etosüksimid desteklemektedir (15).

Epileptogenez beynin tekrarlayan nöbetlerle karakterize kalıcı bir duruma dönüşmesini tanımlamakta olup genetik ve kazanılmış mekanizmalarla oluşabilmektedir (15,16). Epilepsi oluşum mekanizmalarına yaklaşım idyopatik ve semptomatik/kriptojenik epilepsiler için farklıdır. İdyopatik epilepsilerde daha çok serebral maturasyonun erken evrelerinde oluşan genetik bir defekt sorumlu

tutulurken semptomatik epilepsiler için saptanan yada saptanmayan yapısal bir lezyonun varlığı kabul edilir. Bu lezyonlar;

1. Dendritik dallanmanın oluşumunu bozarak dikensi çıkıntıları ortadan kaldırırlar ve eksitator sinapsları akson tepeciğine yaklaştırabilirler.
2. İyon kanallarında yeni bir organizasyona neden olabilirler.
3. Sinaptik terminalleri tahrip ederek geriye kalan aksonların yeniden filizlenmesine ve nöronal senkronizasyonuna yol açarak tekrarlayıcı kollateral eksitasyonlara yol açabilirler.
4. Senkronizasyonun güçlenmesine neden olabilirler (17).

Afferent girdilerde yapısal veya fonksiyonel değişimler spesifik transmitterlerin kullanımını değiştirir. Reseptörlerin tekrar yapılmasına neden olurlar. Moleküler düzeyde proteinlerin konfigürasyonundaki değişimler presinaptik ve postsinaptik kalsiyum iyon dengesini değiştirerek sinaptik bağlantıları etkiler. Sonuçta iyonik mikroçevrede değişen su ve pH dengesi nöronal enerji metabolizmasını değiştirir. Eşlik eden glial doku değişimleri sonucunda transmitterlerin deaktivasyonu bozulur ve nöronal ateşleme paternleri farklılaşır (17).

### **2.1.7. Tedavi**

Epilepsi cerrahisi, vagal sinir stimülasyonu, nörostimülasyon, fokal ilaç enjeksiyonları, hücre transplantasyonları ve genetik alanında önemli ilerlemelere rağmen antiepileptik ilaçların (AEİ) kullanımı hala epilepside tedavinin temel taşıdır. Epilepsi tedavisine rasyonel yaklaşım doğrudan altta yatan etyolojik nedenin tedavisi ile ilgilidir. Bu durum

bazı özel durumlar dışında (pidoksin eksikliğine sekonder neonatal nöbetleri baskılamak için pidoksin kullanımı) halen mümkün değildir (18).

Yeni tanı konulan epilepsi hastalarına AEİ tedavisi başlarken, monoterapi ile başlamak gerekir. İyi bir tedavi ile hastaların yaklaşık %70'i nöbetsiz hale gelebilir. Ancak bu hastaların %30-40'ında monoterapi ile nöbet kontrolü sağlanamaz ve kombinasyon tedavisi gerekir (19,20).

AEİ tedavisi ile primer amaç; yan etki olmaksızın morbidite ve mortalitede azalma ile birlikte nöbetlerin tam olarak ortadan kaldırılmasıdır (18). Son yıllarda yeni kuşak AEİ'lerin kullanıma girmesi yada eski ilaçların formülasyonlarındaki değişiklikler ile birlikte epilepsi tedavi seçeneklerinde dramatik bir ilerleme olmuştur (21). Epilepsi tedavisinde 1990 yılına kadar yalnızca 6 klasik ilaç (karbamazepin, etosüksimid, fenobarbital, valproik asit, fenitoin, primidon) kullanılabilirken, yeni kuşak AEİ'lerin (vigabatrin, felbamat, gabapentin, lamotrijin, topiramet, tiagabin, okskarbazepin, levetirasetam, zonisamid, pregabalin) kullanılmaya başlaması tedavi seçeneklerini arttırmıştır (22). Ancak yeni kuşak AEİ'lara rağmen epilepsinin temel tedavi prensiplerinde ve refrakter nöbetli hasta sayısında anlamlı bir değişiklik olmamıştır (18).

AEİ'lar başlıca voltaj bağımlı Na kanalları ile yüksek voltaj aktive Ca kanallarını bloke ederek, GABA'nın iletimini arttırarak yada glutamat iletimini azaltarak etki gösterirler. Tablo 2'de AEİ'ların saptanan etki mekanizmaları belirtilmiştir.

Tablo 2: Antiepileptik ilaçların saptanan etki mekanizmaları (23).

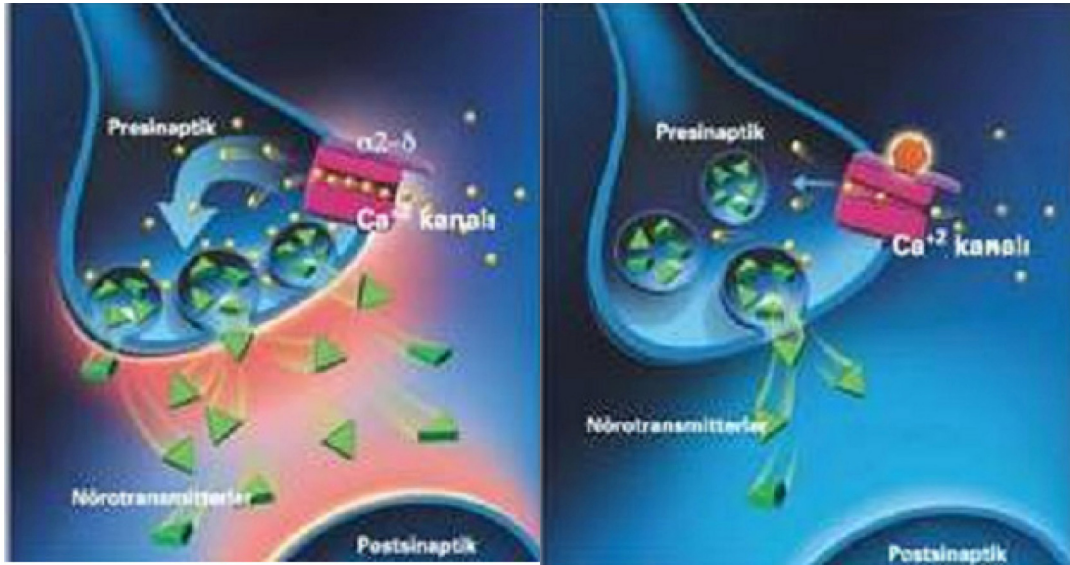
Antiepileptik ilaç	↓ Sodyum kanalları	↓ Kalsiyum kanalları*	↑ GABA iletimi	↓ Glutamat iletimi
<b>Klasik</b>				
Benzodiazepinler			++	
Karbamazepin	++			
Etosüksimid		++(T tip)		
Fenobarbital		?	++	?
Fenitoin	++			
Valproat	?	? (T tip)	+	?
<b>Yeni kuşak</b>				
Felbamat	+	?	+	+
Gabapentin	?	++ ( $\alpha 2\delta$ )	+	
Lamotrijin	++	?		
Levetirasetam**		?	?	?
Okskarbazepin	++			
Pregabalin		++ ( $\alpha 2\delta$ )		
Tiagabin			++	
Topiramat	+	+	+	+
Vigabatrin			++	
Zonisamid	+	+ (T tip)		

\*Yüksek voltajlı kalsiyum kanalları; \*\* Sinaptik vezikül protein 2A ya bağlanarak etki eder. (++) esas etki; (+) muhtemel etki; (?) olası etki.

### 2.1.8. Pregabalin

PGB epilepsi, nöropatik ağrı ve jeneralize anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan yakın zamanda geliştirilmiş bir moleküldür (24). PGB [(S)-3-izobutil GABA], (S)-3-(aminometil)-5-metilheksanoik asit yapısındadır ve GABA'nın üçüncü karbon pozisyonunda alkil türevidir (25). GABA'nın yapısal analogu olmasına rağmen GABA reseptörlerine bağlanmaz (26). PGB esas olarak VKKK'nın  $\alpha 2\delta$  alt ünitesine bağlanır (27). Hipereksite nöronlarda VKKK'na potent olarak bağlandıktan sonra, depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını

modüle ederek şekil 1’de gösterildiği gibi glutamat, noradrenalin ve substans P gibi pek çok eksitator nörotransmitterin salımını azaltır. Böylece postsinaptik reseptörlerin stimülasyonunda azalma oluşur ve nöronlar normal fizyolojik durumuna döner. PGB’in bağlanması ile ilgili önemli bir nokta, normal sinir fonksiyonu değişmezken ektoptik aktivitenin azalmasıdır (28). PGB’in beyin korteks, hipokampus, amigdala, spinal kord VKKK’nın  $\alpha 2\delta$  tip 1 alt ünitesine spesifik olarak bağlandığı genetik modifiye fare modelinde gösterilmiştir (25).



Şekil 1: PGB nin etki mekanizması (28).

PGB tedaviye dirençli parsiyel epilepsi hastalarında tedavi alternatifi sunmaktadır (29). İlaça dirençli epilepsi hastaları ile yapılan açık uçlu üç çalışmanın değerlendirildiği bir meta analizde 600 mg/gün doz ile kompleks parsiyel, basit parsiyel ve sekonder jeneralize nöbetlerde plaseboya göre anlamlı olarak üstün olduğu belirtilmektedir (30).

PGB, maksimal elektroşok tarafından indüklenen nöbetlerde, kimyasal konvülsanların indüklediği nöbetlerde (PTZ, bikukulin,

pikrotoksin ve sitrikinin), sıçanlarda kindling nöbetleri ve genetik olarak duyarlı hayvanlardaki nöbetler dahil olmak üzere pek çok hayvan modelinde antikonvülsan aktivite göstermektedir (28,31).

PGB'in emilimi hızlıdır ve biyoyararlanımı yaklaşık olarak %90'dır. Doruk plazma konsantrasyonuna oral alımından bir saat sonra ulaşır. Plazma proteinlerine bağlanmaz. Minimal metabolizmaya uğrar ve yarı ömrü 5.8–6.3 saat arasındadır. Yaklaşık olarak %98'i böbrekten değişmeden atılır (32). Önerilen optimal törapatik dozu günlük 300-600 mg'dır. En sık rastlanan yan etkiler uyku hali ve sersemlik hissidir. Bunları başağrısı, baş dönmesi, ağız kuruluğu, kilo alımı takip eder (30).

### **2.1.9. Deneysel Epilepsi Modelleri**

Epilepsi hastalığının altında yatan dinamik olaylar bütünüünün açıklanması, yeni AEİ'lerin test edilmesi, uygun tanısal yaklaşımların ve tedavi modalitelerinin geliştirilmesi yada epilepsinin yol açtığı sorunların giderilmesi amacıyla yeni yaklaşımların ortaya konulmasında farklı epilepsi modelleri kullanılır. Filogenetik bakımdan insan ile diğer memeliler arasında kaçınılmaz yapısal ve işlevsel farklılıklar olmasına rağmen ortak temel mekanizmaların varlığı bu modellerden yararlanılmasının temel nedenidir. İnsanlığın gelişim basamaklarında katkısı olan çalışmalarda kullanılan başlıca modeller tablo 3'de gruplandırılmıştır.

Tablo 3: Deneysel epilepsi hayvan modelleri (33).

<p>A-Kindling Modeli</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Elektriksel kindling modeli</li><li>• Kimyasal kindling modeli</li></ul> <p>B-Status Epileptikus modeli</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Lityum-pilokarpin yada pilokarpin ile indüklenen status epileptikus modeli</li><li>• Kainik asit ile indüklenen status epileptikus modeli</li><li>• Uzun süre elektriksel uyarı ile tetiklenen status epileptikus</li></ul> <p>C-Gelişmekte olan hayvanlarda febril nöbetler</p> <p>D-Genetik ve genetik kodu değişmiş modeller</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Transgenik ve gen yerleştirme modelleri</li><li>• Spontan epileptik modeller</li></ul> <p>E-Kimyasal absans modelleri</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Kedi penisilin modeli</li><li>• Düşük doz PTZ modeli</li><li>• Tetrahidroksiizoksazol piridin modeli</li><li>• Gama hidroksi bütirat modeli</li><li>• AY9944 modeli</li><li>• MAM-AY modeli</li></ul> <p>F-Maksimal elektroşok modeli</p> <p>G-PTZ ile oluşturulan akut nöbet modeli</p> <p>H-Kortikal displazi modeli olarak in utero radyasyon</p>
---

### **2.1.10. Pentilentetrazol**

PTZ birçok AEİ'ı değerlendirmede yaygın olarak kullanılan konvülzan bir maddedir. Etki mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Genel olarak pikrotoksinin bağlanma bölgesi olan postsinaptik Cl kanalları ile bağlantılı GABA-A reseptörlerine bağlanıp reseptör blokajı yaparak etkili olduğu bilinmektedir (34). PTZ'nin tetiklediği nöbetlerin başlangıç ve yayılmasında GABA'nın inhibisyonu ve glutamat reseptörlerinin aktivasyonu birlikte rol almaktadır (34-36).

Deney hayvanlarında PTZ düşük dozlarda absans tipi nöbetler, ılımlı-orta dozlarda klonik nöbetler, yüksek dozlarda ise tonik klonik nöbetler oluşturup status ve ölüme de neden olabilmektedir. Yetişkin kemirgenlerde PTZ ile oluşturulan nöbetlerden absans nöbetlerinin oluşumunda talamokortikal döngünün rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada klonik nöbetlerin serebral korteks ile ön beyinden, tonik nöbetlerin de beyin sapından kaynaklandığı tanımlanmıştır (37).

## **2.2. Oksidatif Stres**

### **2.2.1. Serbest Radikaller**

Serbest radikaller (SR) için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; moleküler yada atomik



yörüngesinde genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir (38). Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Paylaşılmamış elektrona sahip moleküller kararsız bir haldedir. Başka bir moleküle etkileşime girerek, dış yörüngesindeki elektronu eşleme ve kararlı duruma gelme eğilimindedirler (39). SR, başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması ile
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile
3. Normal bir moleküle elektron transferi ile (38,40).

SR, organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok reaktif olan SR, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir ve yararlı biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olmaktadır (41).

Tablo 4: Serbest radikallerin başlıca kaynakları (41).

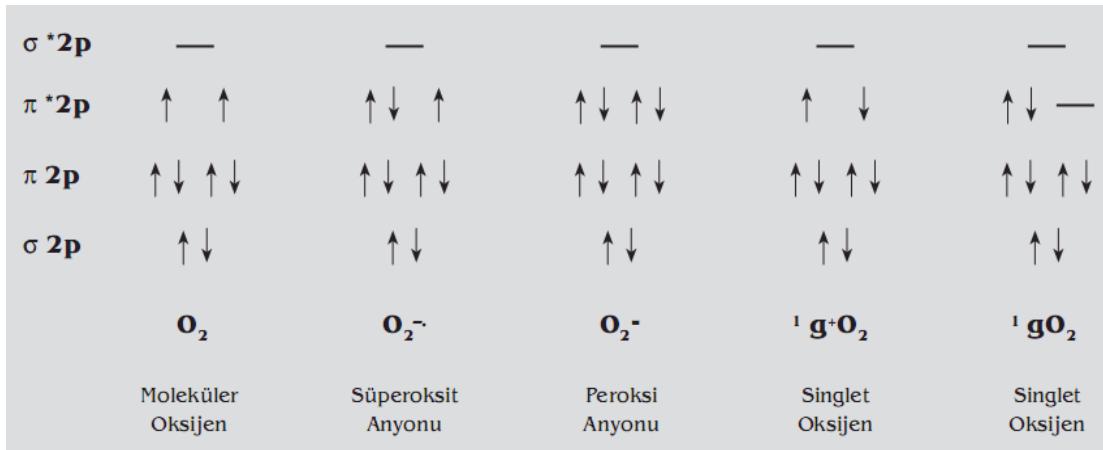
<p>A-Endojen kaynaklar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitokondrial elektron transport zinciri</li> <li>• Endoplazmik retikulum</li> <li>• Redoks döngüsü</li> <li>• Araşidonik asit metabolizması</li> <li>• Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar vs.) ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar</li> <li>• Ksantin oksidaz, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz vs. enzimler</li> <li>• Otooksidasyon reaksiyonları</li> </ul> <p>B-Eksojen Kaynaklar:</p>
--

Tablo 4 (devam): Serbest radikallerin başlıca kaynakları.

<ul style="list-style-type: none"><li>• Diyet faktörleri</li><li>• Çevresel faktörler (hava kirliliği)</li><li>• İlaçlar, ksenobiyotikler</li><li>• Zararlı ışınlar (X ışınları, ultraviole)</li></ul>
--

Aerobik organizmalar için SR'in başlıca kaynağı oksijendir. Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, dönüşleri aynı yönde ve farklı yörüngelerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen diradikal yapıya sahip bir moleküldür. Diradikal yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekülle tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya sahip olması gereklidir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama spin kısıtlaması olarak adlandırılır. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Spin kısıtlaması iki yolla aşılabılır. Birinci yol oksijene elektron transferi ile spin kısıtlamasının kaldırılmasıdır. Bu işlem için canlılar geçiş elementleri sınıfından bazı metal iyonlarından yararlanırlar. Geçiş elementlerinden demir, bakır, manganez, çinko, kobalt ve molibden vücudun gereksinim duyduğu başlıca eser elementler olup, bu elementler dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içerirler. Canlılarda oksijeni kullanan enzimler ya da oksijenle etkileşime giren proteinler, bu elementlerden en az bir tanesini içermek zorundadırlar (42). Oksijene tek

elektron transferi ile süperoksit radikali oluşur. Spin kısıtlaması kalktığı için süperoksit, oksijene göre çok daha reaktiftir. İki elektron transferi ile de peroksi ( $O_2^{\cdot -}$ ) anyonu oluşur. Bu tür ortamdan aldığı iki proton ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'i oluşturur. İkinci yol ise enerji absorpsiyonu ile oksijenin spin kısıtlamasının kaldırılmasıdır. Bu mekanizma ile oksijenin iki uyarılmış formu oluşur. Singlet oksijen ( $^1O_2$ ) diye adlandırılan oksijenin bu formlarında dış orbital paylaşılmamış elektronlarından birisinin spini değişmiştir. Zıt spinli elektronlar aynı orbitalde (delta formu) veya ayrı ayrı orbitallerde (sigma formu) bulunabilirler. Her iki formun reaktivitesi çok yüksektir. Oksijenin spin kısıtlaması aşılmış formları şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2: Oksijen ve oksijenin spin kısıtlaması aşılmış formları (40).

Şekilde yalnızca farklılıkların gerçekleştiği 2p orbitallerinin elektron konfigürasyonları görülmektedir. Oksijenin enzimatik olarak vücutta kullanımı sırasında, içerdikleri metal iyonlarının yardımı ile, spin kısıtlaması bu mekanizmalarla aşılır. Ancak enzimler tarafından üretilen reaktif türler normal koşullarda genellikle düşük derişimde olup, ortama verilen radikaller sınırlıdır. Patolojik durumlarda ise enzimatik olarak üretilip ortama verilen ve nonenzimatik tepkimelerle yapılan radikal

miktarındaki artışa bağlı olarak oksijenin toksik etkileri görülmeye başlar (40). Normal şartlarda organizmada SR'in oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Bu denge sağlandığı sürece organizma, SR'den etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, SR'in oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (38).

Hücrel koşullarda oluşabilen oksijen radikalleri ile oksijen içeren reaktif türlerin önemli olanları tablo 5'de görülmektedir (40). SR, reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) olmak üzere başlıca iki büyük gruba ayrılır (43).

Tablo 5: Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler (40).

<b>Tür</b>	<b>Adı</b>	<b>Tür</b>	<b>Adı</b>
$^1O_2$	Singlet oksijen	$NO\cdot$	Nitrik oksit
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit	$NO_2\cdot$	Nitrojen dioksit
$H_2O_2$	Hidrojen peroksit	$NO_2^+$	Nitril katyonu
$\cdot OH$	Hidroksil radikali	$NO^-$	Nitroksil
$ROO\cdot$	Peroksi radikali	$NO^+$	Nitrozil (nitrozonyum iyonu)
$ROOOH$	Hidroperoksit	$ONOO^-$	Peroksinitrit
$RO\cdot$	Alkoksil radikali	$ONOO\cdot$	Peroksinitrit radikali
$ROOR'$	Endoperoksit	$N_2O_3$	Dinitrojen trioksit
$HO_2\cdot$	Hidroperoksi radikali	$N_2O_4$	Dinitrojen tetroksit

Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı yüzlerce farklı tür şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında süperoksit,  $H_2O_2$ ,  $NO$  ve hidroksil radikalinin özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve  $NO$  temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve  $NO$  enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen

radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler. Oksijen bulunan bir ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Özellikle oksijenin metabolize edildiği canlılarda önemli değişim ve çeşitlilikte radikal üretimi gerçekleşir. NO, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur (40). Oksidatif stresi, NO'nin reaktif türlerinden kaynaklanan toksik etkilerden ayırmak mümkün olmadığından, nitrozatif stresten ayırmak imkansızdır. Bu bakımdan, oksidatif hasar süperoksitten kaynaklanan radikaller ile NO reaktif türlerinin neden olduğu hasarların toplamıdır (40).

### 2.2.1.1. Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ), moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır ve oluştuğu yerden fazla uzağa diffüze olamaz. Serbest radikal olarak zarar verici etkisi azdır. Asıl önemli olan,  $H_2O_2$  kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olan süperoksit, mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) okside nikotinamid adenin dinükleotide ( $NAD^+$ ) okside olması ile üretilir. Ayrıca pek çok oksidaz tarafından da üretilir. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir

yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise SOD enzimi ile  $H_2O_2$  ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altındadır (44).

### 2.2.1.2. Hidrojen Peroksit

Doğal oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron almışsa peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen ( $H^+$ ) molekülü ile birleşirse  $H_2O_2$  oluşur.  $H_2O_2$  süperoksitin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak da üretilebilmektedir.  $H_2O_2$  aslında radikal değildir. Ancak üretildiği bölgede kalan süperoksitin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksitin ulaşmadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Haber-Weiss reaksiyonu).  $H_2O_2$  başka bir şekilde de serbest  $Fe^{+2}$  ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur (Fenton reaksiyonu).  $H_2O_2$  de bakterilere karşı lokosit defansının diğer bir komponentidir (44).  $H_2O_2$ , CAT ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülür (45).

### 2.2.1.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir; ilk karşılaştığı molekül ile  $10^{-6}$  saniye içinde reaksiyona girer. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbohidrat ve lipidler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur (45). DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından, proteinler proteolitik yıkıma götürülür. Hücre zarı su içermediğinden, hidroksil radikalının başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırıp yine hücre ölümüne neden olabilir (40). *In vivo* herhangi bir hidroksil radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle hidroksil radikalının oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir (45).

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir. Birincisi iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle su moleküllerinin iyonlaşması ile, ikincisi Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarında  $\text{H}_2\text{O}_2$ ' in indirgenmesi ile oluşur (40).

#### 2.2.1.4. Nitrik Oksit (NO)

Lipid ve suda çözünen serbest radikal bir gazdır. Endojen NO oluşturan tek kaynak NO sentaz (NOS) enzimleridir. L-argininin L-sitruline metabolizması sırasında oluşur. Bu oluşum esnasında moleküler oksijen ile, kofaktör olarak, NADPH, flavin adenin dinükleotid, flavin mononükleotid ve tetrahydrobiopterine ihtiyaç vardır (46).

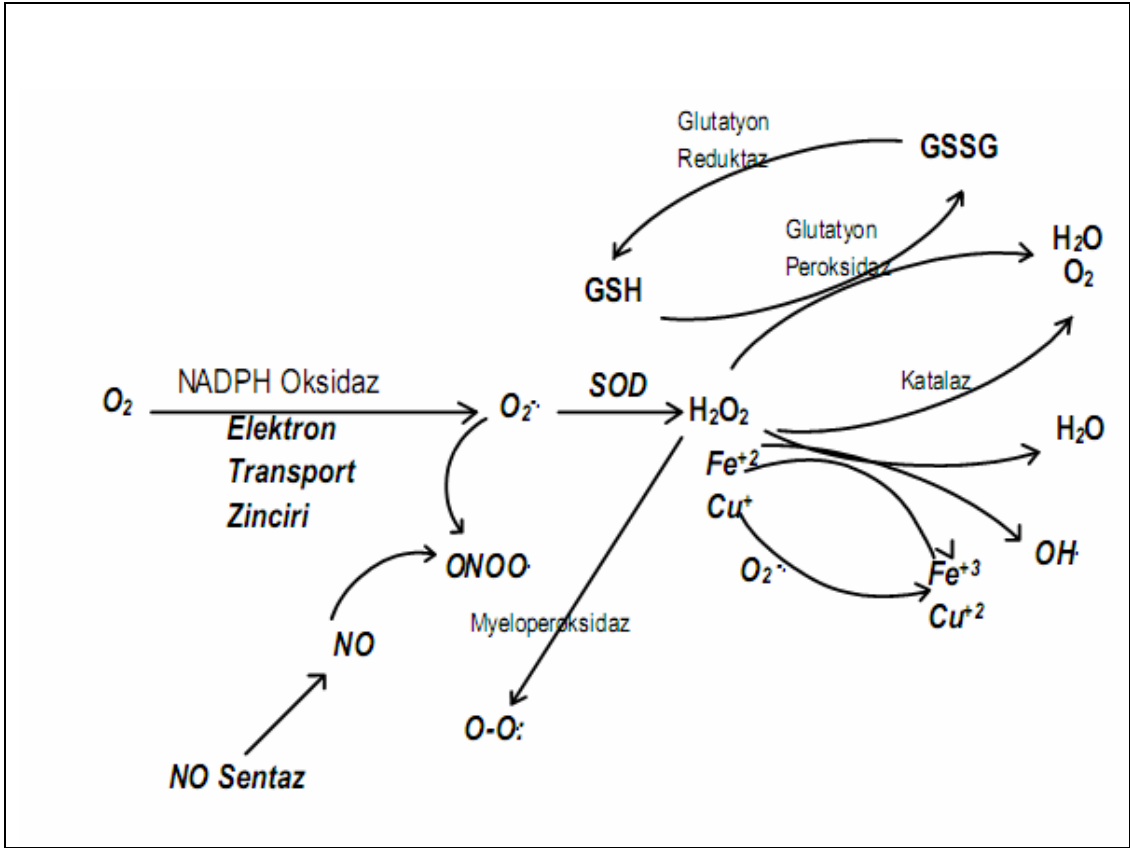
NOS enziminin; nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç formu vardır. eNOS ve nNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük derişimdeki NO sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olarak kullanılır. Haberci molekül olarak sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde cGMP derişimini artırır. cGMP ise çeşitli enzimler aracılığı ile hücre içi kalsiyum derişiminin düzenlenmesini sağlar. iNOS formu ise başta fagositik lökositler olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur ve sentezi sitokinler ile bakteriyel toksinler tarafından indüklenir. iNOS enziminin aktivitesi kalsiyumdan bağımsızdır (40).

NO; nörotransmisyon, kan basıncı regülasyonu, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi ve immun regülasyon gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol olan önemli bir oksidatif biyolojik sinyal molekülüdür (36).

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit, hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata oksitlenerek aktivitesi



sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, NO'ü ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir, derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır (40).



Şekil 3: Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu (44).

### 2.2.2. Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasar

SR'in yüksek konsantrasyonları lipidler, nükleik asitler ve proteinlerin hücresel hasarlanmasında önemli rol oynarlar (39).

Lipidler SR'e en hassas moleküllerdir. Hücre membranlarında bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları SR'le kolayca reaksiyona girebilir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ROT'lerine maruz kalması lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonunun ilk aşamasında yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren H atomu çıkarılması ile lipid radikali (L $\cdot$ ) oluşur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini (LOO $\cdot$ ) oluşturur. Lipid peroksit radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksitler ortamdaki H atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksitleri (LOOH) oluştururlar. Lipid peroksitler daha sonra MDA ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA yada proteinler ile reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler. MDA, üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır. MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir (44).

DNA'nın temel yapı taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları ve deoksiriboz bağlanma bölgesi oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (39,42).

SR'in duyarlı amino asitler ile etkileşimi sonucunda proteinler hasara uğramaktadır. Oksidasyona en çok maruz kalan aminoasitler metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu içeren ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik yapıda olanlardır. Oksidasyon sonucu

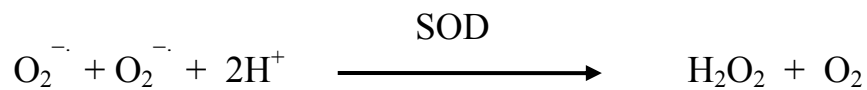
proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında değişiklikler oluşur ve fonksiyonları etkilenir (42).

### 2.2.3. Antioksidanlar

SR'e maruz kalan organizmalar bir dizi savunma mekanizmaları geliştirir. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunma ve antioksidan savunmayı içerir. Enzimatik antioksidan savunma SOD, GSH-Px, CAT'dan oluşur. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında askorbik asit (Vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (Vitamin E), glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğerleri yer alır. Normal koşullar altında, bu antioksidanların hücre içi seviyeleri ve aktiviteleri arasında denge vardır. Bu denge organizmanın hayatta kalması ve sağlığı için gereklidir (39).

#### 2.2.3.1. Süperoksit Dismutaz

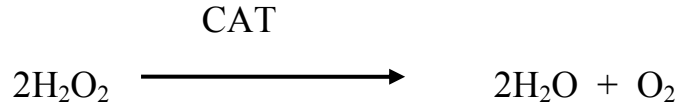
SOD, süperoksit radikalının  $H_2O_2$  ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit radikali üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafında düşük tutulur (45).



İnsanlarda SOD enziminin sitozolik Cu, Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD, ve ekstraselüler-SOD olmak üzere üç formu bulunur (47).

### 2.2.3.2. Katalaz

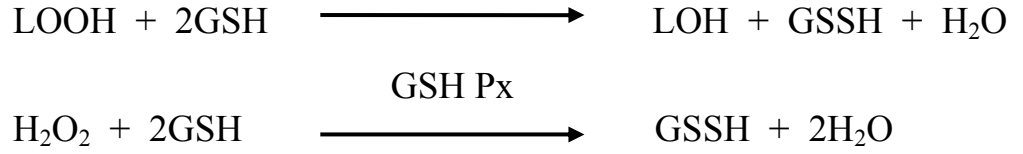
CAT, yapısında dört hem grubu bulunduran bir hemoproteindir. Esas olarak peroksizomlarda lokalizedir. SOD'ın oluşturduğu  $H_2O_2$ 'i CAT ve peroksidazlar  $O_2$  ve  $H_2O$ 'a parçalar (44).



GSH-Px'ın  $H_2O_2$ 'e karşı  $K_m$ 'i CAT'a göre daha düşüktür. Yani düşük konsantrasyonlarda  $H_2O_2$ 'i GSH-Px parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise CAT aktivite kazanır (44).

### 2.2.3.3. Glutasyon Peroksidaz

GSH-Px, her birinde selenosistein içeren dört alt birimden oluşur (44). Gerek  $H_2O_2$  ve gerekse LOOH'leri metabolize etmektedir. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından  $H_2O_2$  ve LOOH indirgenirken GSH okside şekline (GSSH) dönüşür. GSSH ise NADPH bağımlı GSH redüktaz tarafından tekrar GSH'a indirgenir (45).



GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px'in fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır (45).

#### 2.2.4. Oksidatif Stres ve Epilepsi

Nöbetin tetiklediği nöronal ölümün etyolojisi birçok faktörü içermektedir. Bunlar arasında genetik faktörler, intraselüler elektrolit metabolizma bozukluğuna yol açan artmış glutamaterjik hücre toksisitesi, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, büyüme faktörü azalması ve artmış sitokin konsantrasyonu yer alır (43).

Penisilin, kainat, pilokarpin ve PTZ ile epileptik nöbet oluşturularak yapılmış birçok çalışma, oksidatif stresin epilepsi patofizyolojisine dahil edilebileceğini göstermiştir (43). Tekrarlayan nöbetler sonucu hücresel makromoleküllerde artmış oksidasyonun görülmesi ve antioksidan içerikli bileşiklerin nöbetin tetiklediği patolojiyi engellemesi nöronal ölümün etyolojisinde SR'in genel rolünü desteklemektedir. SOD mutant fareleri kullanılarak yapılan çalışmalar, nöbetin tetiklediği süperoksit üretiminin kaynağının çoğunun mitokondriyal olabileceğini göstermiştir (48).

Hücresel düzeyde incelendiğinde, artmış nöbet aktivitesi NMDA ve voltaj bağımlı iyon kanallarının aracılığı ile yoğun kalsiyum akışına yol açarak hücre içi kalsiyumu artırır ve mitokondriyal kalsiyum artışı ile SR'in üretimi ve nöronal ölüm gelişir (43). Son yapılan çalışmalar,

kazanılmış epilepsilerde kalsiyum hemostaz bozukluğunun rol oynadığını göstermiştir. İdyopatik jeneralize epilepsilerde de VKKK'nın alt ünitelerinde defektlerin (özellikle P/Q tip ve T tip) nöbet genetiğine katkıda bulunduğu ve ağ bağlantı aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir (49).

### 2.3. Beyin Korteksi

Beyin korteksi, duyuların algılanması ve değerlendirilmesinde, bellek oluşumunda, hareketlerin planlanması ve eşgüdümle yürütülmesinde, değişik duysal girdiler arasında ilişkilerin kurularak kararların verilmesinde ve iç dengenin korunmasında en üst kontrol noktası olarak işlev görür (50).

Hemisferlerin dış yüzünü örten beyin korteksi, yaklaşık olarak  $0,25 \text{ m}^2$  civarında bir alan kaplamasına rağmen büyük kısmı sulkusların ve fissuraların derinliklerinde bulunduğu için dışarıdan bakıldığında tüm yüzeyinin ancak  $1/3$ 'ü görülebilir. Beyin korteksinin kalınlığı girusların en çıkıntılı kısımlarında 4,5-5 mm, sulkusların derininde ise 1,2-1,6 mm dir (50).

Beyin korteksinde temel olarak piramidal hücreler, granüle hücreler ve fuziform hücreler olmak üzere üç tip nöron bulunur. Piramidal hücreler en fazla sayıda bulunan nöron tipi olup beyin korteksinin temel efferent nöronlarıdır (50). Primer duysal alanlarda granüler hücreler daha baskın iken, motor alanlarda piramidal hücreler daha baskındır (51).

Filogenetik gelişim bakımından beyin korteksi, allokorteks ve neokorteks olarak iki kısımdan oluşur. Filogenetik açıdan daha eski olan allokorteksin arşikorteks ve paleokorteks adı verilen iki bölümü vardır. Hipokampus ve dentat girusun oluşturduğu arşikorteks ile piriform korteksin oluşturduğu paleokorteksin histolojik olarak üç tabakası vardır. Filogenetik olarak daha yeni olan ve beyin korteksinin %90'ını oluşturan neokorteks ise histolojik olarak altı tabakadan oluşmuştur (50). Bu tabakalar:

1. En dıştaki moleküler tabaka, talamus yada korteksten gelen spesifik olmayan afferent lifleri içerir.
2. Dış granüler tabaka, seyrek olarak kümelenmiş küçük hücrelerden oluşan bir tabakadır.
3. Dış piramidal tabaka, genellikle sıra halinde dizilmiş piramidal nöronlardan oluşmuştur.
4. İç granüler tabaka, dış granüler tabakadaki hücrelere benzeyen hücrelerden oluşmuş ince bir tabakadır. Bu hücreler talamustan spesifik afferent lifler alırlar.
5. İç piramidal tabaka, çoğu bölgede dış piramidal tabakadan daha az sayıda fakat daha büyük piramidal hücreler içerirler. Bu hücreler liflerini beyin sapı ve medulla spinalise gönderirler.
6. Fuziform tabaka, aksonlarını bitişikteki beyaz cevhere gönderen düzensiz fuziform hücreler içerir (52).

Yapısal ayrımlar gösteren korteks alanları fonksiyonel bakımdan da birbirinden farklıdır. Deneysel ve klinik bulgularla kortikal alanlar sınıflandırılmıştır. Bu alanların günümüzde en yaygın olarak kullanılan sınıflandırması Brodmann isimli araştırmacının 1909 yılında yaptığı haritadır. Brodmann, beyin korteksinde 52 farklı alan tanımlamıştır.

Beyin korteksinin fonksiyonel alanlarını tanımlamada pozitron emisyon tomografisinin kullanılması ile değişik fonksiyonel alanlar hakkında daha fazla bilgi elde edilmiştir (50,53).



### 3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Tıp Fakültesi Nöroloji ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının işbirliği ile Tıbbi Biyoloji ve Deney Hayvanları Laboratuvarlarında yapılmıştır. SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1779-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışmada deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılabilmesi için SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan onay alınmış ve çalışma etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada; 40 adet Wistar-Albino cinsi, ağırlıkları 200-250 gr arasında olan erkek rat kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık ve oda ısısı koşullarında (20-22°C) bulunduruldu. Her bir grup ayrı kafeslere konuldu. Ratlara yeterli miktarda içme suyu ve standart yem verildi.

### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Pentilentetrazol(PTZ), Sigma; Lyrica (Pregabalin), Pfizer; genel anestezi için kullanılan Ketalar (Ketamin) Eczacıbaşı ve Alfazin (Ksilazin) Egevet firmasının üretimidir.

Ayrıca biyokimyasal ölçümler için kullanılan kimyasal maddeler şunlardır:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , HCl, Folin&Ciocalteu's Phenol Reagent,  $\text{Na}_3\text{Sitrat}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH, ksantin, ksantin oksidaz, EDTA (2 Na tuzu), nitroblue tetrazolium (NBT), bovine serum albumin,  $\text{CuCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , NaCN,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kadmiyum granülleri, glisin, sülfanamid, N-Naphthylethylene daimine (NNDA),  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ . triklorasetik asit (TCA), tiobarbitürik asit (TBA)

### 3.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Deneyde kullanılan cihazlar tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6: Deneyde kullanılan cihazlar

1	Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 32 R, Hettich Universal 320 (Almanya)
2	Derin dondurucu	Beko 8460 T (Türkiye)
3	Hassas terazi	Shimadzu AX200 (Japonya)
4	Vorteks (karıştırıcı)	Nüve NM 100 (Türkiye)
5	Otomatik pipetler	Eppendorf Research 100-1000-5000 (Almanya)
6	UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1700 (Japonya)
7	Homojenizatör	Heidolph DIAX 900 (Almanya)
8	pH metre	Hanna Instruments (Portekiz)
9	Su banyosu	Temel Labarotuar Aletleri 820 3 (Türkiye)

### 3.4. Deneysel Model

Ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı.

Grup 1: Kontrol grubu; gavaj yolu ile distile su (2mg/kg) 12 saatte bir toplam 5 kez verilip son dozdan bir saat sonra intraperitoneal (ip) serum fizyolojik (SF) (2mg/kg) uygulanan grup (n=10)

Grup 2: PTZ grubu; gavaj yolu ile distile su (2mg/kg) 12 saatte bir toplam 5 kez verilip son dozdan bir saat sonra ip PTZ (2mg/kg SF ile sulandırılıp) 50 mg/kg uygulanarak epileptik nöbet oluşturulan grup (n=10)

Grup 3: PGB grubu; gavaj yolu ile PGB (2mg/kg distile su ile sulandırılıp) 50 mg/kg dozunda 12 saatte bir toplam 5 kez verilip, son dozdan bir saat sonra ip SF (2mg/kg) uygulanan grup (n=10)

Grup 4: PGB+PTZ grubu; gavaj yolu ile PGB (2mg/kg distile su ile sulandırılıp) 50 mg/kg dozunda 12 saatte bir toplam 5 doz verilip, son dozdan bir saat sonra ip PTZ (2mg/kg SF ile sulandırılıp) 50 mg/kg uygulanarak epileptik nöbet oluşturulan grup (n=10)

### 3.5. Anestezi ve Doku Örnekleri

Beslenmesi bir gece önceden kesilen ratlara PTZ veya SF uygulamasından bir saat sonra ketamin hidroklorür (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) karışımı ip. olarak uygulandı. Daha sonra bütün ratlar sakrifiye edilip beyin korteks dokuları çıkarıldı. Çıkarılan beyin

korteks dokuları derin dondurucuda (-20 °C) on saatten daha az süre bekletildi.

### **3.6. Homojenizasyon İşlemi ve Numunelerin Hazırlanması**

Beyin korteksinin homojenizasyon işleminde pH: 7,5, 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Beyin korteks ağırlıkları yaş olarak tartıldı ve soğuklukları muhafaza edilerek cam tüplere aktarıldı. Üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Plastik kaplar içine buz dolduruldu ve cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızında 3 dakika homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Homojenatların ısı arttırılmadan eppendorf tüplere kondu. Tüpler numaralandırıldı. Elde edilen homojenatlardan MDA ve NO düzeyi tayini yapıldı. Homojenatlar, 5000 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatan elde edildi. Süpernatanlardan CAT aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Süpernatan 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortekslenip 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle +4°C de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD aktivitesi ve protein aktivite tayini yapıldı.

### **3.7. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Tayini**

Total SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının tanımladığı yöntemle ölçüldü (54). Bu metod ile NBT'un ksantin/ksantin oksidaz sistemini indirgemesi esas alındı.

### **3.8. Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini**

CAT aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (55). Deney ortamına ilave edilen  $H_2O_2$ , CAT tarafından su ile oksijene parçalanmakta ve spektrofotometride absorbans azalması izlenmektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

### **3.9. Nitrik Oksit Düzeyinin Tayini**

NO düzeyini saptamak için Griess metodu kullanılmıştır (56). Total NO miktarı, aktifleştirilmiş kadmiyum granüllerinin nitratı nitrite dönüştürmesinden sonra spektrofotometride ölçülerek bulunmuştur.

### **3.10. Malondialdehit Düzeyinin Tayini**

MDA düzeyi, Draper ve Hadley'in çift ısıtmalı metodu kullanılarak ölçüldü (57). Bu yöntemde, MDA ile TBA reaksiyonunun meydana getirdiği renk oluşumu spektrofotometrik ölçümle değerlendirilir.

### **3.11. Numunelerde Protein Tayini**

Protein tayini Lowry Metodu ile yapıldı (58). Bakır ile protein alkali çözeltide kompleksi oluşturarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler. Oluşan koyu mavi rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. .

### **3.12. İstatistiksel Analiz**

İstatistikler, Windows uyumlu SPSS 9.0 programı ile yapıldı. Grupların dağılımları Non-parametrik testlerden "One-sample Kolmogorov-Smirnov Test" ile değerlendirildi. Gruplar normal dağılım gösterdiğinden, grupların karşılaştırılmasında parametrik testlerden "One-way ANOVA" testi uygulandı. Gruplar arası anlamlılık Post Hoc testlerden Least Significant Difference (LSD) ile incelendi. Değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi ve istatistiksel anlamlılık için;  $p < 0.05$  olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Rat beyin korteksinde SOD, CAT enzim aktiviteleri ve MDA ve NO düzeyleri Tablo 7 ve Şekil 4-7’de gösterilmiştir.

Kontrol grubu ile PTZ grubu karşılaştırıldığında; PTZ grubunda MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptandı ( $p=0.013$ ), SOD, CAT ve NO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişiklik saptanmadı.

Kontrol grubu ile PGB grubu karşılaştırıldığında; PGB grubunda MDA ve SOD seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma (sırasıyla  $p= 0.001$ ,  $p= 0.002$ ), NO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış ( $p= 0.0001$ ) saptanırken, CAT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişiklik saptanmadı. PGB grubu ile PTZ grubu karşılaştırıldığında; PGB grubunda MDA ve SOD seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma (sırasıyla  $p= 0.0001$ ,  $p= 0.01$ ), NO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış ( $p= 0.0001$ ) saptandı, CAT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişiklik saptanmadı.

Kontrol grubu ile PGB+PTZ grubu karşılaştırıldığında; PGB+PTZ grubunda MDA ve SOD seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma (sırasıyla  $p= 0.0001$ ,  $p= 0.001$ ), NO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış ( $p= 0.0001$ ) saptandı, CAT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişiklik saptanmadı. PGB+PTZ grubu ile PTZ grubu karşılaştırıldığında; PGB+PTZ grubunda MDA ve SOD seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma (sırasıyla  $p= 0.006$ ,  $p= 0.0001$ ), NO seviyelerinde istatistiksel olarak

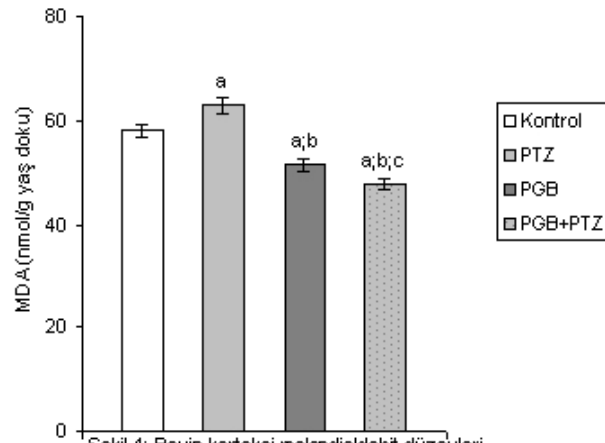
anlamli düzeyde artiş (p= 0.0001) saptandı, CAT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamli düzeyde değişiklik saptanmadı. PGB+PTZ grubu ile PGB grubu karşılaştırıldığında; PGB+PTZ grubunda MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamli düzeyde azalma (p= 0.046), NO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamli düzeyde artiş (p= 0.003) saptandı, SOD ve CAT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamli düzeyde değişiklik saptanmadı.

Tablo 7: Rat beyin korteksinde süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri ve malondialdehit ve nitrik oksit düzeyleri.

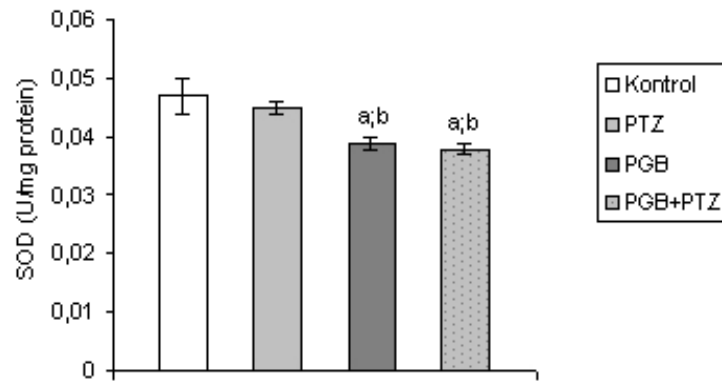
Gruplar	SOD (U/mg protein)	CAT (k/g protein)	MDA (nmol/g yaş doku)	NO (µmol/g yaş doku)
Grup1: Kontrol(n:10)	0.047±0.003	0.038±0.004	58.082±1.140	0.711±0.032
Grup 2: PTZ (n:10)	0.045±0.001	0.045±0.006	62.865±1.592	0.765±0.040
Grup 3: PGB (n:10)	0.039±0.001	0.036±0.007	51.560±1.198	0.984±0.024
Grup 4: PGB+PTZ (n:10)	0.038±0.001	0.041±0.006	47.798±1.165	1.142±0.042
Karşılaştırılan gruplar	p değerleri			
Grup 1-2	A.D.	A.D.	0.013	A.D.
Grup 1-3	0.002	A.D.	0.001	0.0001
Grup 1-4	0.001	A.D.	0.0001	0.0001
Grup 2-3	0.010	A.D.	0.0001	0.0001
Grup 2-4	0.006	A.D.	0.0001	0.0001
Grup 3-4	A.D.	A.D.	0.046	0.003

A.D.: Anlamli değil; PTZ: Pentilentetrazol; PGB: Pregabalin; SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: Katalaz; MDA: Malondialdehit; NO: Nitrik oksit

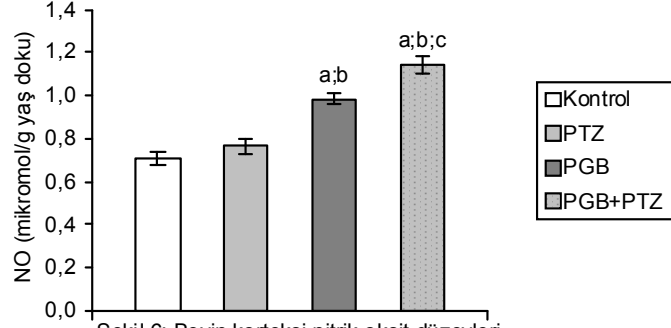




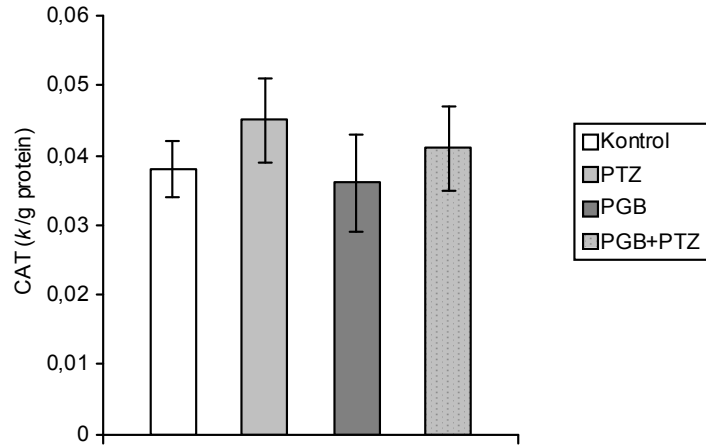
Şekil 4: Beyin korteksi malondialdehit düzeyleri.  
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$   
b: PTZ grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$   
c: PGB grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$



Şekil 5: Beyin korteksi süperoksit dismutaz aktiviteleri  
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$   
b: PTZ grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$



Şekil 6: Beyin korteksi nitrik oksit düzeyleri  
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$   
b: PTZ grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$   
c: PGB grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$



Şekil 7: Beyin korteksi katalaz aktiviteleri.  
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Epilepsinin fizyopatolojik mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır. Son çalışmalar nöbet oluşumunda oksidatif stresin rolü üzerine odaklanmıştır (48,59,60). Yapılan *in vivo* çalışmalarla SR'in eksitotoksisite oluşumuna direk olarak katıldığı gösterilmiş ve SR'in eksitotoksik mekanizmalara katıldığı nörolojik hastalıklarda antioksidanların faydalı olabileceği belirtilmektedir (61). Ayrıca yeni kuşak antiepileptiklerin oksidatif stresi azalttığı ve nöroprotektif olduğunu gösteren yayınlar artmaktadır.

Çalışmamız PGB ile oksidatif stres ilişkisini değerlendiren ilk çalışmadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre PGB'in epileptik nöbet sırasında ratların beyin korteksinde oluşan oksidatif stresi önlediği söylenebilir.

Çalışmamızda kullandığımız PTZ ve PGB uygulamalarını literatürle uyumlu doz ve sürelerde yapıldı (62-66). Oksidatif stres oluşumunu net olarak değerlendirmek için literatüre uygun şekilde PTZ uygulamasından 1 saat sonra ratlar sakrifiye edildi (67). PTZ uygulanan gruplarda süre ve şiddeti farklı olan epileptik nöbetler gözlemlendi.

Literatürde PTZ ile beyin, beyin korteksi, serum, eritrosit ve karaciğerde lipid peroksidasyon artışı birçok çalışma ile gösterilmiştir (35,63,65,67-70). Beyin korteksi MDA düzeylerini PTZ grubunda kontrole göre anlamlı oranda yüksek bulduk ve bu sonuç literatür ile uyumludur.

Kontrol grubu ile PTZ grubunun beyin korteksi SOD, CAT ve NO düzeylerini karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Epileptik nöbet sırasında SOD, CAT ve NO düzeyleri birçok çalışmada araştırılmıştır. İlhan ve ark. yaptığı iki çalışmada PTZ ile farelerde oluşturulan epileptik nöbetlerde beyin dokusunda MDA ve NO düzeylerinin arttığını, SOD aktivitesinin değişmediğini bildirmektedir (35,71). Obay ve ark. yaptıkları çalışmada ratlarda PTZ ile oluşturdukları epileptik nöbet modelinde nöbet geçirenlerin beyin dokusunda MDA düzeyinin kontrollere göre arttığını, SOD, CAT, GSH düzeylerinin azaldığını göstermişlerdir (63). Erakovic ve ark. ise tek doz PTZ sonrası beyin dokusunda SOD aktivitesinin kontrollere göre anlamlı farklılığının olmadığını göstermiştir. SOD aktivitesinde değişiklik oluşmamasının oksidatif stres sonucu enzimin aşırı aktivasyonu nedeniyle bozulması ve ardından kendiliğinden azalmasına bağlı olabileceğini düşündüklerini bildirmişlerdir (64). Akbaş ve ark. PTZ ile oluşturdukları nöbet modelinde SOD aktivitesinin kontrollerle karşılaştırıldığında eritrosit ve karaciğerde azalmış, CAT aktivitesinin ise eritrositte azalırken karaciğerde değişmemiş olduğunu bildirmiştir (65). Freitas ve ark. yaptığı çalışmada ratlarda pilokarpin ile oluşturulan epileptik nöbet modelinde hipokampusta MDA ve nitrit düzeylerinin arttığını ancak SOD ve CAT aktivitelerinin değişmediğini saptamıştır (72). Nazıroğlu ve ark. yaptığı çalışmada PTZ ile nöbet oluşturulan ratların beyin korteksinde MDA düzeyinde kontrollere göre artış oluşurken NO düzeyinde değişiklik oluşmadığını bildirmiştir (69). Devi ve ark. yaptığı derlemede çeşitli epilepsi modellerinde beyin korteksindeki oksidatif stres bulgularını toplamıştır. Çalışmalarda SOD ve CAT aktiviteleri ile ilgili farklı sonuçlar vardır. Pilokarpin ile oluşturulan status epileptikus modelinde iki çalışmadan birinde CAT

aktivitesinin azaldığı diğerinde arttığı; lityum- pilokarpin ile oluşturulan status epileptikus modelindeki bir çalışmada CAT aktivitesinin azaldığı; FeCl<sub>2</sub> ile oluşturulan nöbet modelini içeren bir çalışmada da CAT aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. SOD aktivitesinin birçok çalışmada arttığı bildirilmiş ancak PTZ ile oluşturulan kindling modelini içeren iki çalışmada ve elektroşok ile nöbet oluşturulan bir çalışmada SOD aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (70). Bu çalışmalardaki sonuçlar arasında tutarsızlık mevcuttur. Bazı çalışmalar epileptik nöbet sırasında SOD, CAT ve NO düzeylerinin arttığını, bazıları değişmediğini, bazıları ise azaldığını bildirmektedir. Bu farklılıklar çalışmalarda kullanılan metodlardan kaynaklanıyor olabilir. Oksidatif stres sonucu oluşan enzim aktivitesindeki artış bir süre sonra enzimin bozulması nedeniyle azalabilir.

Epilepsi ve NO arasındaki ilişki birçok çalışmada bildirilmiştir. Ancak bu ilişkinin doğası halen açık değildir. Bazı araştırmacılar NO oluşumunun inhibe edilmesinin nöbet oluşumunu önlediğini bildirmektedir (73,74). Bazıları da tersini iddia etmekte ve endojen NO'nun nöbetten koruyucu rol etkisinin olabileceğini bildirmektedir (75). Bu çelişkili sonuçlar epilepsi ve NO arasındaki ilişkinin kompleks olduğunu göstermektedir. NO diğer nörotransmitter sistemlerini düzenleyerek (dopamin, GABA, diğer eksitatör aminoasitler) nöronal uyarılabilirliği ayarlayabilir. Glutamat salınımını arttırarak prokonvulzan/nörotoksik, GABA salınımını arttırarak antikonvulzan/nöroprotektif etki gösterebilir (76). Noh ve ark. NOS-knockout fareler üzerinde yaptıkları deneysel çalışma ile ketojenik diyetin hipokampustan NOS ekspresyonunu arttırıp endojen NO salınımında artışa yol açarak antiepileptik etki gösterdiğini bildirmiştir (77).

NMDA reseptörlerinin uyarılması NO oluşumuna yol açmaktadır. Oluşan NO, redoks modülatör bölgesindeki sülfidril grubu üzerine inhibitör feedback etki göstererek NMDA reseptörlerini regüle edilebilmektedir. Böylece NMDA reseptör aktivitesi azalmakta ve nöronlar aşırı reseptör uyarılmasından kurtulmaktadır (75,78). Ferraro ve ark. yaptıkları çalışmada, beyin korteksi ve hipokampusta NO düzeydeki azalmanın NMDA reseptörlerinde aktivasyonu arttırarak eksitator nörotransmisyonu arttırdığını göstermiştir (76). Son gelişmeler GABA ve NO arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir. NO'in yüksek konsantrasyonu GABA salınımını potansiyelize eder ve GABA-A reseptörlerinde postsinaptik GABA bağımlı klorid akışını arttırır. Tersine düşük NO konsantrasyonu GABA erjik iletimde inhibitör etki ortaya çıkarabilir (79). NO konsantrasyonunun düşmesi ile GABA transaminaz enzim aktivitesinin artarak GABA seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (80). Zanelli ve ark. hipokampus kültüründe duble immunositokimya tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmada nNOS'ın GABA'erjik sinapslarda yerleştiğini göstermişlerdir (81). Szadadits ve ark. da elektron mikroskopi tekniği ile sıçan hipokampusunda nNOS'ın piramidal hücrelerin üzerindeki GABA'erjik sinapslarda simetrik olarak yerleştiğini göstermişlerdir (82).

PGB grubu ile kontrol grubu ve PGB+PTZ grubu ile PTZ grubu karşılaştırıldığında; PGB uygulanan gruplarda MDA ve SOD düzeyinin anlamlı şekilde azaldığı, NO düzeyinin ise anlamlı şekilde arttığı sonucunu bulduk. MDA düzeyindeki azalma PGB in oksidatif stresi önlediğini göstermektedir. Ancak PGB içeren gruplarda oksidatif stres oluşmadığı halde NO düzeyinin artmış olması akla şu soruyu getirmektedir: Acaba NO, PGB'in antiepileptik etkisine katkı mı sağlamaktadır? MDA düzeyindeki azalma, NO'in reaktif formu olan

peroksinitriti de içeren serbest radikal oluşumunun önlendiğini göstermektedir. Bu bilgi ışığında artan NO düzeyinin nörotoksik /prokonvulzan etki yaratmadığı aksine antikonvulzan/nöroprotektif etki oluşturabileceği sonucuna varılabilir. PGB hipereksite nöronları normal fizyolojik durumuna getirmektedir ve hipereksite nöronlardaki etkisi eksite olmamış nöronlara göre daha belirgindir (26). PGB+PTZ grubunda MDA düzeyindeki azalma ve NO düzeyindeki artış PGB grubundan anlamlı şekilde farklıdır. Bu sonuç PGB'nin nöbet oluşmuş yani hipereksite grupta oksidatif stresi önlemede daha etkili olduğunu göstermektedir. Hipereksite nöronlarda PGB'nin antioksidan etkisi daha belirgin olurken NO düzeyindeki artışın da belirginleşmesi, NO'in PGB' in antiepileptik etkisine katkı sağladığı düşüncesini doğurmaktadır. Sharpe ve ark. NO'in canlı beyindeki konsantrasyonlarının organik bileşikler Fenton ve Haber–Weiss reaksiyonlarının oksidasyonundan koruduğunu göstermiştir (83). PGB içeren gruplarda saptadığımız NO düzeyi artışı bu yolla serbest oksijen radikallerini temizlemeye katkı sağlayıp antioksidan etki yaratıyor olabilir. Bu katkı nedeniyle SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin substratları azaldığı için aktivitelerinde düşüş oluşabilir. Çalışmamızda PGB uygulanan gruplarda, NO düzeyinde oluşan artışın SOD aktivitesinde azalma ile birliktelik göstermesi bu açıdan anlamlı bir bulgu olabilir.

AEİ ile NO ilişkisini araştıran deneysel çalışmalar NOS inhibitörleri ve L-arjinin kullanılarak yapılmıştır. Luszczi ve ark. yaptığı çalışma ile farelerde PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde bir NOS inhibitörü olan N-nitro-L-arjinin (L-NA) uygulamasının, vigabatrin ile okskarbazepinin etkilerini azalttığını ancak gabapentin ve tiagabinin etkilerini değiştirmediğini göstermiştir (84). Luszczi ve ark. yaptığı çalışma ile farelerde maksimal elektroşok ile oluşturulan epilepsi

modelinde NOS inhibitörü L-NA uygulamasının felbamat ve lamotrijinin antiepileptik etkilerini azaltırken okskarbazepin ve topiramatin antiepileptik etkilerinde değişiklik oluşturmadığını göstermiştir (85). Czuczwar ve ark. farelerde PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde L-NA uygulamasının etosüksimidin antiepileptik aktivitesini azaltırken valproik asit, fenobarbital ve diazepamın etkilerini değiştirmediğini bildirmiştir. Bu çalışmada L-arjinin uygulaması ile L-NA'nın tetiklediği azalma önlenmiştir (86). Borowicz ve ark. yaptığı çalışmada farelerde maksimal elektroşok ile oluşturulan epilepsi modelinde NOS inhibitörü N-nitro-L-arjinin metil esterinin (L-NAME) valproik asit ve fenobarbitalin antiepileptik etkilerini azaltırken karbamazepin ve fenitoinin antiepileptik etkilerinde değişiklik oluşturmadığını göstermiştir. Ancak fenobarbitalin etkisindeki azalma L-arjinin uygulaması ile artmamıştır (87). Borowicz ve ark. farelerde PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde NOS inhibitörü olan 7-nitroindazolün etosüksimit ve klonazepamın antiepileptik etkisini arttırırken valproik asit ve fenobarbitalin antiepileptik etkilerinde değişiklik oluşturmadığını göstermiştir. Ancak bu etki artışı L-arjinin ile azalmamıştır (88). Rajasekaran ve ark. yaptığı çalışmada ratlarda pikrotoksinle oluşturulan nöbetlerde 7-nitroindazolün gabapentin, fenobarbiton ve diazepamın antiepileptik aktivitesini arttırdığını göstermiştir (89). Bu çalışma sonuçlarının bazıları NO'nin antiepileptik etkiye katkı sağladığını bazıları ise antiepileptik etkiyi azalttığını göstermektedir. Bizim çalışmamız PGB uygulamasının rat beyin korteksinde NO düzeyini arttırdığını göstermiştir. Bize göre PGB uygulaması ile oluşan NO artışı, PGB'nin antiepileptik etkisine katkı sağlamaktadır. Ancak NOS inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmalarla bu ilişkinin doğrulanması gerekmektedir.



Yeni kuşak bir antiepileptik olan PGB'in nöroprotektif özelliği olduğuna dair yayınlar bildirilmeye başlamıştır. Andre ve ark. lityum-pilokarpin modeli ile oluşturulan epilepsi modelinde PGB'in rat piriform korteksinin II. tabakası ve entorhinal korteksin III-IV. tabakalarında nöroprotektif özellik gösterdiğini ancak hipokampusta nöroprotektif olmadığını bildirilmiştir (66). Ha ve ark. ratlarda spinal kord hasarlanması sonrası uygulanan PGB tedavisinin nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmiştir (62). Bizim çalışmamızın sonuçları, PGB'in NO artışı oluşturarak nöroprotektif etkiye katkı sağlayabileceğini desteklemektedir.

AEİ tedavisi ile oksidatif stres ilişkisi üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Pavone ve ark. primer rat astrosit kültüründe yaptığı çalışmada; gabapentin, lamotrijin, tiagabin, levetirasetamın MDA düzeyi ve serbest oksijen radikali oluşumuna kontrolden farklı etki göstermediğini; karbamazepin, topiramet, okskarbazepinin MDA düzeyi ve serbest oksijen radikali oluşumunu kontrole göre anlamlı düzeyde arttırdığını göstermiştir. Ayrıca tiagabin ve levetirasetam NO oluşumunu arttırmazken, diğer AEİ'lerin doza bağımlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (90). Liu ve ark. uzun dönem fenitoin ve karbamazepin monoterapisi alan hastalarda yaptığı çalışmada fenitoinin serum MDA ve SOD düzeylerini arttırdığını, karbamazepinin ise hafif düzeyde SOD artışı dışında anlamlı değişiklik yapmadığını göstermiştir. Bunun sonucu karbamazepinin oksidatif dengeyi daha az bozan bir AEİ olduğu belirtilmiştir (91). Yalçın ve ark. epileptik çocuklarda karbamazepin ve fenobarbital kullanımının, eritrosit lipid peroksit düzeylerinde kontrollere göre anlamlı artış yaptığını göstermiş ve AEİ alanlarda antioksidan kullanmanın faydalı olabileceğini bildirmiştir (92). Kıyıcı ve ark. karbamazepin, valproik asit, fenitoin kullanan hastalarda eritrosit MDA

düzeylerini değerlendirdikleri çalışmada, fenitoin kullanan grupta diğer gruplar ve kontrole göre eritrosit MDA düzeylerinde anlamlı artış saptamıştır (93). Peker ve ark. yaptıkları çalışmada valproik asit kullanan epilepsi hastalarının serumunda MDA, SOD, CAT düzeylerinin değişmediğini ancak NO düzeyinin arttığını göstermiştir. Yorum olarak valproik asit tedavisinde NO'nin antiepileptik aktivite mekanizmasına katkıda bulunduğunu düşündüklerini ifade etmişlerdir (94). Sobaniec ve ark. antiepileptik kullanan çocuklarda kontrole karşılaştırmalı yaptıkları çalışmada; valproik asit tedavisi alanlarda eritrosit MDA düzeyinin artarken, SOD, GSH-Px düzeylerinin azaldığı; karbamazepin kullananlarda eritrosit MDA düzeyinin azalırken, SOD, GSH-Px düzeylerinin arttığı; politerapi alanlarda ise eritrosit MDA ve SOD düzeylerinin azalırken, GSH-Px düzeyinin arttığı bulunmuştur (95). Michoulas ve ark. valproik asit kullanan çocukların idrarında, oksidatif stresin göstergesi olan 15-F2t-isoprostane düzeyinin kontrollere göre anlamlı derecede arttığını göstermiştir (96). Kinoshita ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada fenobarbital verilen farelerin karaciğer hücre çekirdeklerinde 8-OH-deoksiguanozin oluşumu gösterilmiştir (97). Oliveira ve ark. farelerde pilokarpin ile oluşturdukları epilepsi modelinde, levetirasetamın hipokampusta lipid peroksidasyon ve nitrit-nitrat düzeylerini anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir (98). Nazıroğlu ve ark. yaptığı çalışmada ratlarda topiramamat alan grup ile kontrol grubu arasında beyin korteksindeki MDA ve NO düzeylerinde farklılık olmadığını göstermiştir (69). Bashkatova ve ark. rat beyin dokusunda yaptığı çalışmada PTZ uygulaması ile oluşan MDA ve NO düzeylerindeki artışın fenobarbital, lamotrijin, fenazepam, meksidol,  $\alpha$ - tokoferol tedavileri ile azaldığı gösterilmiştir (67). Yukarıda bildirilmiş olan klinik ve deneysel çalışmalardan kesin olarak bazı antiepileptiklerin

oksidatif stresi azalttığı yada arttırdığı kanısına varmak güçtür. Ancak eski jenerasyon AEİ'lerin oksidatif stres oluşturmaya meyilli oldukları, yeni jenerasyon AEİ'lerin ise oksidatif stres oluşturmayıp hatta azaltıcı etkilerinin olabileceği değerlendirilebilir. Bizim çalışmamız bu değerlendirmeyi desteklemektedir.

PGB ve oksidatif stres ilişkisinin ilk kez incelendiği bu çalışmanın sonuçları, PGB ve NO ilişkisini araştıran ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

## ÖZET

### **Ratlarda Pentilentetrazol ile Oluşturulan Epileptik Nöbet Modelinde Pregabalinin Beyin Korteksinde Oksidatif Stres Üzerine Etkileri**

Epileptik nöbet kortikal nöronların kendini sınırlayıcı, anormal, hipersenkron deşarjlarına bağlı olarak ortaya çıkan beynin geçici fizyolojik disfonksiyonudur.

Nöbetin tetiklediği nöronal ölümün etyolojisinde oksidatif stres de yer almaktadır. Artmış nöbet aktivitesi NMDA ve voltaj bağımlı iyon kanalları aracılığı ile hücre içi kalsiyumunu artırır. Mitokondriyal kalsiyum artışı ile serbest radikal üretimi ve nöronal ölüm gelişir.

ROT'nin yüksek konsantrasyonları nükleik asitler, lipidler ve proteinler için zarar vericidir. Lipidlerin ROT'ne maruziyeti sonucu oluşan son ürün MDA'dır. Enzimatik antioksidan savunma SOD, GSH-Px ve CAT'ı içerir.

Biz bu projemizde, deneysel olarak PTZ ile oluşturulan epileptik nöbet modelinde, beyin korteksinde, oksidatif stresin göstergeleri olan SOD, CAT, NO ve MDA düzeyleri üzerine PGB'in etkilerini araştırmayı amaçladık.

Kırk adet Wistar-Albino cinsi erkek rat randomize olarak dört eşit gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol olup ikinci gruba tek doz PTZ uygulandı. Üçüncü ve dördüncü gruba 100 mg/kg/gün ikiye bölünmüş dozlarda intragastrik yolla iki gün PGB uygulandı. İkinci ve dördüncü gruplara tek doz PTZ (ip 50 mg/kg ) uygulanarak epileptik nöbet oluşturuldu. PTZ uygulamasından bir saat sonra tüm ratlar sakrifiye edilip beyin korteksleri çıkarıldı ve SOD, CAT, NO, MDA düzeyleri çalışıldı.

Çalışmamızın sonuçları, PGB'in epileptik nöbet sırasında ratların beyin korteksinde oluşan oksidatif stresi önlediğini ve NO artışına yol açtığını göstermiştir. Oluşan NO artışının PGB'nin antiepileptik etkisine katkı sağladığını düşünmekteyiz. Ancak NOS inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmalarla bu ilişkinin doğrulanması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Epilepsi, Oksidatif stres, Pregabalin, Pentilentetrazol.

## SUMMARY

### **The Effects of Pregabalin on Cerebral Cortical Oxidative Stress of Rats in Pentylentetrazole Induced Epileptic Seizure**

Epileptic seizure is a temporary physiologic dysfunction of the brain caused by a self limited, abnormal, hypersynchronous electrical discharge of cortical neurons.

Oxidative stress contributes to etiology of neuronal cell death which is triggered by seizure. Intense seizure activity typically initiates a massive influx of calcium ions via voltage gated and NMDA-dependent ion channels. Elevated mitochondrial calcium leads to production of free radicals which trigger acute neuronal cell death.

At high concentrations, ROS can damage cell structures, nucleic acids, lipids and proteins. Final product of lipid oxidation by ROS exposure is MDA. Enzymatic antioxidant defences include SOD, GSH-Px and CAT.

In this experimental model of epileptic seizure induced by PTZ, we aimed to investigate the effect of PGB on SOD, CAT, NO and MDA levels, indicators of oxidative stress, in brain.

Fourty male Wistar rats were randomly divided into four equal groups. First group was used as control and second group received a single dose of PTZ. Third and forth groups were given 50 mg/kg/BID PGB intragastrically for two days. Epileptic seizure was induced in group II and IV by administration of PTZ (ip 50 mg/kg). After one hours of PTZ administration all rats were sacrificed and brain cortex tissues were taken. SOD, CAT, NO and MDA levels were studied in brain cortex tissues.

Our study results indicated that PGB prevents from oxidative stress and increases NO levels of rat brain cortical tissues during epileptic seizure. We think that increased NO contribute to PGB's antiepileptic effect. On the other hand this relation needs to be confirmed by further studies using NOS inhibitor.

**Key words:** Epilepsy, Oxidative stress, Pregabalin, Pentylentetrazole.

## KAYNAKLAR

1. Rowland, L.P., *Merrit's Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins. 11 th Ed. 2005; 990.
2. Eşkazan E, Tarihte epilepsi ve Epileptolojinin kısa tarihçesi, *Epilepsi*, ed. Yeni, S.N., Bora, İ., Gürses, C., Nobel Tıp kitapevleri, 2008; 3-10.
3. Reynolds, E.H., Milestones in epilepsy. *Epilepsia*, 2009; 50(3):338-42.
4. Engel, J., Pedley, T., *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2 th Ed. 2008; 45-54.
5. Yeni,S.N., Epilepsi insidansı prevalansı ve risk faktörleri, *Epilepsi*, ed. Yeni,S.N., Bora, İ., Gürses, C., Nobel Tıp kitapevleri, 2008; 65-71.
6. Bradley, W.G., Daroff, R.B., Finechel, G.M., Jankovic, J., *Neurology in Clinical Practice*. Butterworth Heinemann. 4 th Ed. 2004; 1954.
7. Wyllie, E., Gupta, A., Lachhwani, D.K., *The Treatment of Epilepsy. Principles&Practice*. Lippincott Williams & Wilkins. 4 th Ed. 2006; 110, 243.
8. Ropper, A.H., Brown, R.H., *Adams and Victor's. Principles of Neurology*. McGraw-Hill Medical Publishing Division. 8 th Ed. 2005; 270-83.
9. Aktekin, B., Kayrak, N., Epilepsilerde sınıflandırma çalışmaları, *Epilepsi*, ed. Yeni,S.N., Bora, İ., Gürses, C., Nobel Tıp kitapevleri. 2008; 89-102.
10. Aktekin, B., Jeneralize tonik klonik nöbetler, *Epilepsi*, ed. Yeni,S.N., Bora, İ., Gürses, C., Nobel Tıp kitapevleri, 2008; 119-24.
11. Badawy, R.A., A.S. Harvey, and R.A. Macdonell, Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy - part 1. *J Clin Neurosci*, 2009; 16(3):355-65.
12. Subutay-Öztekin, N., Epilepsi Fizyopatolojisi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji*. 2004; 2(2):97-101.
13. Yiğit, A., *Epilepsi*. Veri Medikal Yayıncılık, 2008; 10-3.
14. Avoli, M., Rogawski, M.A., Avanzini, G., Generalized epileptic disorders: an update. *Epilepsia*. 2001; 42(4):445-57.
15. Acharya, J.N., Recent advances in epileptogenesis, *Current Science*, Vol. 82, No. 6, 25 March 2002
16. Badawy, R.A., A.S. Harvey, and R.A. Macdonell, Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: Understanding the mechanisms of epilepsy - part 2. *J Clin Neurosci*, 2009; 16(4):485-500.
17. Şahiner, T., Epilepside temel mekanizmalar, *Epilepsi*, ed. Yeni, S.N., Bora, İ., Gürses, C., Nobel Tıp kitapevleri, 2008; 29-34.
18. Bora, İ., Epilepside tedavi yaklaşımları. *Epilepsi*, ed. Yeni, S.N., Bora, İ., Gürses, C., Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 613-26
19. Czuczwar, S.J., Borowicz, K.K., Polytherapy in epilepsy: the experimental evidence. *Epilepsy Res*, 2002; 52(1):15-23.
20. Sander, J.W., The use of antiepileptic drugs-principles and practice. *Epilepsia*, 2004; 45(S6):28-34.
21. Schmidt, D., Elger, C., Holmes, G.L., Pharmacological overtreatment in epilepsy: mechanisms and management. *Epilepsy Res*, 2002; 52(1):3-14.
22. Bek, S., Kaşıkçı, T., Koç, G., Genç, G., Gökçil, G., Odabaşı, Z., Epilepsi Tedavisinde Klasik ve Yeni Antiepileptik İlaç Seçimi. *Türk Nörol Derg.*, 2009; 15:71-7.

23. Stephen, L.J., Brodie, M.J., Selection of antiepileptic drugs in adults. *Neurol Clin*, 2009; 27(4):967-92.
24. Ben-Menachem, E., Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia*, 2004; 45(S6):13-8.
25. Bian, F., Li, Z., Offord, J., Davis, M.D., McCormick, C., Taylor, C.P., et al., Calcium channel alpha2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res*, 2006; 1075(1): 68-80.
26. Kavoussi, R., *Pregabalin: From molecule to medicine*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2006; 16(S2):128-33.
27. Taylor, C.P., Angelotti, T., Fauman, E., Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res*, 2007; 73(2):137-50.
28. Ceyhan, M., Tan, E., Yeni bir antikonvülsan pregabalin: prelinik veriler. *Türk Nörol Derg.*, 2008 ;14(3)161-71
29. Brandt, C., May, T.W., Pohlmann-Eden, B., Nieder, E., Elsner, H., Witte-Boelt, K., et al., Retention rate of pregabalin in drug-resistant epilepsy: 1-year follow-up, single-centre observation in 105 consecutive, adult patients. *Seizure*, 2009; 18(9): 634-8.
30. Tassone, D.M., Boyce, E., Guyer, J., Nuzum, D., Pregabalin: a novel gamma-aminobutyric acid analogue in the treatment of neuropathic pain, partial-onset seizures, and anxiety disorders. *Clin Ther*, 2007; 29(1):26-48.
31. Vartanian, M.G., Radulovic, L.L., Kinsora, J.J., Serpa K.A., Vergnes, M., Bertram, E., et al., Activity profile of pregabalin in rodent models of epilepsy and ataxia. *Epilepsy Res*, 2006; 68(3):189-205.
32. Luszczki, J.J., Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep*, 2009; 61(2):197-216.
33. Onat, F., Epilepsinin deneysel modelleri. ed Bora, İ., Yeni, S.N., Gürses, C., *Epilepsi*. Nobel Tıp kitabevleri, 2008; 37-43.
34. Erdoğan, F., Küçük, A., Gölgeli, A., Pentilentetrazol İle Oluşturulan Kindling Modelinde Nöbet ve EEG Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *Journal of Neurological Sciences [Turkish]*, 2006; 23(2):84-92.
35. İlhan, A., Iraz, M., Gurel, A., Armutcu, F., Akyol, O., Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylenetetrazol-induced seizures in mice. *Neurochem Res*, 2004; 29(12):2287-92.
36. Souza, M.A., Oliveİra, M.S., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Lima, F.D., et al., Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia*, 2009; 50(4):811-23.
37. Andre, V., Pineau, N., Motte, J.E., Marescaux, C., Nehlig, A., Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur J Neurosci*, 1998; 10(6): 2094-106.
38. Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C., Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]*, 2006; 31(2):51-6.

39. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007; 39(1):44-84.
40. Kılınç, K., Kılınç, A., Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2002; 33(2):110 -8.
41. Gümüştas, M.K., Atukeren, P., Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklar ile ilişkisi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi No:62. Mart 2008; 329-40.
42. Akkoç, H., Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*. 2008; 35(3):211-5
43. Naziroglu, M., Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res*, 2009.
44. Memişoğulları, R., Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005; 3:30-9.
45. Şener, G., Yeğen, B.Ç., İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim*, 2009; 22(3):5-13.
46. Aladağ, M.A., Türköz, Y., Özerol, İ.H., Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. *T Klin Tıp Bilimleri*, 2000; 20:107-11.
47. Mates, J.M., Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 2000; 153(1-3):83-104.
48. Patel, M., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*, 2004; 37(12):1951-62.
49. Wojda, U., Salinska, E., Kuznicki, J., Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*, 2008; 60(9):575-90.
50. Taner, D., Atasever, A., Durgun, B., *Fonksiyonel Nöroanatomi*. 5 Baskı. ODTÜ yayıncılık, 2004; 255-8.
51. Duus, P., *Nöroloji Tanıda Lokalizasyon*, Türkçe çeviri grubu, Oğuz, Y., Özkaynak, S., Önal, M.Z., Palme Yayıncılık, 2001; 263.
52. Waxxman, S.G., *Korrelatif Nöroanatomi*, Türkçe çeviri editörü Yıldırım, M., Nobel Tıp Kitapevleri, 2002; 141.
53. Zıylan, T., Murshid, K.A., Korteksin anatomik yapısı ve fonksiyonel alanları. *Genel Tıp Derg*, 2000; 10(2):87-91.
54. Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 1988; 34(3):497-500.
55. Aebi, H., Bergmeyer, U., *Catalase*. Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press, 1974; 673-7.
56. Cortas, N.K., Wakid, N.W., Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, 1990; 36(8 Pt 1): 1440-3.
57. Draper, H.H., Hadley, M., Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1990; 186:421-31
58. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193:265-75.
59. Frantseva, M.V., Valezquez, J.L., Hwang, P.A., Carlen, P.L., Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. *Eur J Neurosci*, 2000; 12(4):1431-9.



60. Sudha, K., Rao, A.V., Rao, A., Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta*, 2001; 303(1-2):19-24.
61. Schulz, J.B., Henshaw, D.R., Siwek, D., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Cipolloni P.B., et al., Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem*, 1995 ;64(5):2239-47.
62. Ha, K.Y., Kim, Y.H., Rhyu, K.W., Kwon, S.E., Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats. *Eur Spine J*, 2008; 17(6):864-72.
63. Obay, B.D., Tasdemir E., Tumer, C., Bilgin, H.M., Atmaca, M., Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides*, 2008; 29(3):448-55.
64. Erakovic, V., Zupan, G., Varljen, J., Simonic, A., Pentylenetetrazol-induced seizures and kindling: changes in free fatty acids, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int*, 2003; 42(2):173-8.
65. Akbas, S.H., Yegin, A., Ozben, T., Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin Biochem*, 2005; 38(11):1009-14.
66. Andre, V., Dube, C., Francois, J., Leroy, C., Rigoulot, M.A., Roch, C., et al., Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model. *Epilepsia*, 2007; 48(S5):41-7.
67. Bashkatova, V., Narkevich V., Vitskova, G., Vanin, A., The influence of anticonvulsant and antioxidant drugs on nitric oxide level and lipid peroxidation in the rat brain during penthylenetetrazole-induced epileptiform model seizures. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003; 27(3): 487-92.
68. Kutluhan, S., Naziroglu, M., Celik, O., Yılmaz, M., Effects of selenium and topiramate on lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in blood of pentylenetetrazol-induced epileptic rats. *Biol Trace Elem Res*, 2009; 129(1-3): 181-9.
69. Naziroglu, M., Kutluhan, S., Yılmaz, M., Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, and EEG records in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *J Membr Biol*, 2008; 225(1-3):39-49.
70. Devi, P.U., Manocha, A., Vohora, D., Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert Opin Pharmacother*, 2008; 9(18):3169-77.
71. Ilhan, A., Aladag, M.A., Kocer, A., Boluk, A., Gurel, A., Armutc, F., Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. *Brain Res Bull*, 2005; 65(6):495-9.
72. Freitas, R.M., The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett*, 2009; 455(2):140-4.
73. De Luca, G., Di Giorgio, R.M., Macaione, S., Calpona, P.P., Di Paola, E.D., Costa, N., et al., Amino acid levels in some brain areas of inducible nitric oxide synthase knock out mouse (iNOS<sup>-/-</sup>) before and after pentylenetetrazole kindling. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006; 85(4):804-12.

74. Kaputlu, I., Uzbay, T., L-NAME inhibits pentylenetetrazole and strychnine-induced seizures in mice. *Brain Res*, 1997; 753(1):98-101.
75. Royes, L.F., Figuera, M.R., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Petry, J.C., et al., The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: an electroencephalographic and neurochemical study. *Epilepsy Res*, 2007; 73(3):228-37.
76. Ferraro, G., Montalbano, M.E., La Grutta, V., Nitric oxide and glutamate interaction in the control of cortical and hippocampal excitability. *Epilepsia*, 1999; 40(7):830-6.
77. Noh, H.S., Kim, D.W., Cho, G.J., Choi, W.S., Kang, S.S., Increased nitric oxide caused by the ketogenic diet reduces the onset time of kainic acid-induced seizures in ICR mice. *Brain Res*, 2006; 1075(1):193-200.
78. Nagatomo, I., Akasaki, Y., Uchida, M., Tominaga, M., Hashiguchi, W., Takigawa, M., Effects of combined administration of zonisamide and valproic acid or phenytoin to nitric oxide production, monoamines and zonisamide concentrations in the brain of seizure-susceptible EL mice. *Brain Res Bull*, 2000; 53(2):211-8.
79. Talarek, S., Listos, J., Fidecka, S., *Role of nitric oxide in the development of tolerance to diazepam-induced motor impairment in mice*. *Pharmacol Rep*, 2008;60(4):475-82.
80. Paul, V., Jayakumar, A.R., A role of nitric oxide as an inhibitor of gamma-aminobutyric acid transaminase in rat brain. *Brain Res Bull*, 2000; 51(1):43-6.
81. Zanelli, S., Naylor, M., Kapur, J., Nitric oxide alters GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*, 2009; 1297:23-31.
82. Szabadits, E., Cserep, C., Ludanyi, A., Katona, I., Gracia-Llanes, J., Freund, T.F., et al., Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. *J Neurosci*, 2007; 27(30):8101-11.
83. Sharpe, M.A., Robb, S.J., Clark, J.B., Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J Neurochem*, 2003; 87(2):386-94.
84. Luszczyk, J.J., Szadkowski, M., Czuczwar, S.J., Effect of NG-nitro-L-arginine on the anticonvulsant action of four second-generation antiepileptic drugs in pentetrazole-induced clonic seizures in mice. *Pharmacol Rep*, 2007; 59(4):467-73.
85. Luszczyk, J.J., Czuczwar, M., Gawlik, P., Sawiniec-Pozniak, G., Czuczwar, K., Sawicka, K.M., et al., Influence of NG-nitro-L-arginine on the anticonvulsant and acute adverse effects of some newer antiepileptic drugs in the maximal electroshock-induced seizures and chimney test in mice. *Pharmacol Rep*, 2006; 58(6):955-60.
86. Czuczwar, S.J., Tutka, P., Klonowski, P., Kleinrok, Z., N(G)-nitro-L-arginine impairs the anticonvulsive action of ethosuximide against pentylenetetrazol. *Eur J Pharmacol*, 1999; 366(2-3):137-42.
87. Borowicz, K.K., Starownik, R., Kleinrok, Z., Czuczwar, S.J., The influence of L-NG-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthase, upon the anticonvulsive activity of conventional antiepileptic drugs against maximal electroshock in mice. *J Neural Transm*, 1998; 105(1):1-12.

88. Borowicz, K.K., Luszczyki, J., Kleinrok, Z., Czuczwar, S.J., 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, enhances the anticonvulsive action of ethosuximide and clonazepam against pentylenetetrazol-induced convulsions. *J Neural Transm*, 2000; 107(10):1117-26.
89. Rajasekaran, K., Jayakumar, R., Venkatachalam, K., Increased neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity triggers picrotoxin-induced seizures in rats and evidence for participation of nNOS mechanism in the action of antiepileptic drugs. *Brain Res*, 2003; 979(1-2):85-97.
90. Pavone, A., Cardile, V., An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia*, 2003; 44(S10):34-9.
91. Liu, C.S., Wu, H.M., Kao, S.H., Wei, Y.H., Serum trace elements, glutathione, copper/zinc superoxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic patients with phenytoin or carbamazepine monotherapy. *Clin Neuropharmacol*, 1998; 21(1):62-4.
92. Yalcin, A.D., Onaran, I., Yalcin, A.S., Effect of antiepileptic drugs on erythrocyte osmotic fragility and lipid peroxidation. *Epilepsy Res*, 1994; 19(3):249-52.
93. Kıyıcı, A., Yücel, D., Antiepileptik ilaç kullanımı ve oksidatif stres. *Tip Araştırmaları Dergisi*, 2007; 5(2):57-62.
94. Peker, E., Oktar, S., Arı, M., Kozan, R., Dogan, M., Cagan, E., et al., Nitric oxide, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme levels in epileptic children using valproic acid. *Brain Res*, 2009; 1297:194-7.
95. Sobaniec, W., Solowiej, E., Kulak, W., Bockowski, L., Smigielska-Kuzia, J., Artemowicz, B., Evaluation of the influence of antiepileptic therapy on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in erythrocytes of children with epilepsy. *J Child Neurol*, 2006; 21(7):558-62.
96. Michoulas, A., Tong, V., Teng, X.W., Chang, T.K., Abbott, F.S., Farrell, K., Oxidative stress in children receiving valproic acid. *J Pediatr*, 2006; 149(5):692-6.
97. Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Imaoka, S., Ogawa, M., Masuda, C., Morimura, K., et al., Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1), cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis*, 2002; 23(2):341-9.
98. Oliveira, A.A., Almeida, J.P., Freitas, R.M., Nascimento, V.S., Aguiar, L.M., Junior, H.V., et al., Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol*, 2007; 27(3):395-406.