

LİTYUM-PİLOKARPİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSSEL EPİLEPSİ MODELİNE ATROPİN VE DİAZEPAMIN KLİNİK VE ELEKTROFİZYOLOJİK ETKİLERİ

İbrahim Bora*, Suat Çelik**, Mustafa Bakar***, Sibel Gürün****, Sadık Sadıkoğlu*, Faruk Turan*****,
Mehmet Zarifoğlu*, Çiğdem Uçkunkaya*****, İ. Hakkı Ulus*****, Erhan Oğul*

Bu çalışmada lityum verilen sıçanlara 24 saat sonra pilokarpin uygulanarak status epileptikus modeli oluşturuldu. Pilokarpinden önce bir muskarinik kolinerjik reseptör blokleri olan atropinin uygulanması jeneralize status epileptikus ortadan kaldırırken limbik nöbetlerin devam ettiği görüldü. EEG aktivitesinde ise belirgin düzelme saptandı. Pilokarpinden önce diazepam uygulanması ile hem status epileptikus ortadan kalktı hem de normal EEG aktivitesi görüldü. Sonuçta kolinerjik mekanizmalarında epileptogenezde rolü olduğu kanısına varıldı.

Anabtar Kelimeler: Atropin, Deneysel epilepsi, diazepam, lityum-pilokarpin, status epileptikus.

Clinical And Electrophysiologic Effects Of Atropine And Diazepam On Experimental Epilepsy Induced By Lithium-Pilocarpine

In this study status epilepticus was induced in rats by administration of lithium chloride followed 24 hours later by injection of pilocarpine. Administration of atropine which a is muscarinic-cholinergic receptor antagonist, before pilocarpine arrested generalised status epilepticus, except limbic seizures. EEG displayed clear improvement. Administration of diazepam prior to pilocarpine blocked seizure and EEG activity. The results of this study suggest that cholinergic mechanisms play an important role in lithium pilocarpine epileptogenesis.

Key Words: Atropine, Experimental epilepsy, diazepam, lithium-pilocarpine, status epilepticus.

Lityum ile tedavi edilen sıçanlara düşük dozlarda pilokarpin uygulanması sıklıkla 24 saat içerisinde ölümlerle sonuçlanan status epileptikus(SE) neden olur (2,5,6). Lityum-pilokarpin modelinde pilokarpinden önce bir muskarinik-kolinerjik reseptör blokleri olan atropinin verilmesinin nöbet aktivitesini bloke ettiği rapor edilmiştir (2,5,6). Lityum-pilokarpin deneysel epilepsi modelinde pilokarpinden önce diazepam verilirse SE'un başlaması engellenir. Eğer SE 'un başlamasından kısa bir süre sonra verilirse SE durur (5,6,8).

Bu çalışmada, lityum-pilokarpin epilepsi modeli üzerine atropin ve diazepamın klinik ve elektroensefalografik (EEG) etkileri karşılaştırılarak epileptogenezde kolinerjik sistemin rolü tartışılmıştır.

MATERYAL-METOD

Bu kimyasal epilepsi modelinde erişkin,erkek, Sprague-Dawley türü, ort. ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen sıçanlar kullanıldı. Çalışmanın başlangıcından 14 gün evvel sıçanlar U. Üniv. Deney hayvanları yetiştirme merkezinden alınarak 4-5 li gruplar halinde oda sıcaklığı 21°C olan bir odaya yerleştirildiler. Standart diet ve su ile beslendiler.

Çalışma grubu 1 (Ç 1):(n:10) Bu gruptaki sıçanlara lityum klorür (3 mEq/kg) intraperitoneal (İP) verildikten 24 saat sonra pilokarpin hidroklorür (30 mgrkg) İP olarak

* Prof. Dr. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji AD
** Dr. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji AD
*** Yard. Doç. Dr. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji AD
**** Uzm Dr Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD
***** Doç Dr Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji AD
***** Uzm Dr Bursa Devlet Hastanesi
***** Prof Dr Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD

enjekte edildi ve sıçanlardaki davranış değişiklikleri gözlemlendi.

Çalışma grubu 2 (Ç 2):(n:10) Bu gruptaki sıçanlara Lityum klorid (3 mEq/kg/İP) verildikten 24 saat sonra aynı dozda pilokarpin verilmeden 20 dakika önce atropin sülfat (2 mg/kg) İP olarak verildi ve ortaya çıkan davranış değişiklikleri gözlemlendi.

Çalışma grubu 3 (Ç 3):(n:10) Bu grupta lityum klorür (3 mEq/kg) verildikten 24 saat sonra pilokarpin verilmeden 20 dak. önce diazepam (10 mg/kg) İP olarak verildi ve davranış değişiklikleri gözlemlendi.

Çalışma grubu 4 (Ç 4): (n:10) Sıçanlara aynı dozlarda lityum ve pilokarpin verildikten sonra EEG kayıtları yapıldı.

Çalışma grubu 5(Ç 5):(n:10) Sıçanlara aynı dozlarda lityum-atropin-pilokarpin yapıldıktan sonra EEG kayıtları yapıldı.

Çalışma grubu 6 (Ç 6):(n:10) Sıçanlara aynı dozlarda Lityum-diazepam-pilokarpin verildikten sonra EEG kayıtları yapıldı.

EEG kayıtlarından önce sıçanlara tiopental (50 mg/kg) anestezisi altında Frontopolar 1, Frontopolar 2, Parietal 3, Parietal 4 (FP1, FP2, P3, P4) lokalizasyonlarında olmak üzere 4 adet paslanmaz çelikten yapılmış vida elektrod, dişi matkabı ile kemik yapılar geçilerek epidural mesafeye yerleştirildi. Bu cerrahi işlemden sonra sıçanlar 3 gün süre ile bekletildiler. EEG kayıtları 8 kanallı Nihon-Kohden marka cihaz ile gerçekleştirildi.

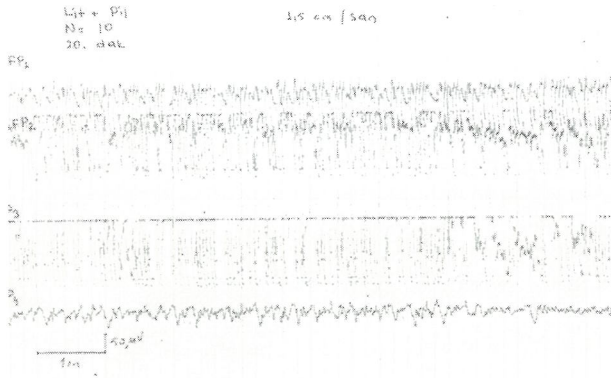
Sıçanların davranış farklılıklarına karar verebilmek için her sıçan üstü açık bir tel kafes içersine konuldu. Sıçanlardaki davranış değişiklikleri 12-18 saatleri arasında Janusz ve ark. kullandıkları (4) ve tarafımızdan modifiye edilen skalaya göre değerlendirildi.

SKOR	DAVRANIŞ
0	normal
1	limbik otomatizm ve tremor
2	baş sallama ya da ıslak köpeğin silkelenme hareketleri
3	düşme ile birlikte ön ekstremiteelerin limbik klonik hareketleri
4	klonik tonik nöbetler
5	status epileptikus(en azından 60 dak. daha uzun nöbet ilave puanlar)
6	pilokarpin verilmesinden sonraki 30 dak. içinde ölüm
7	pilokarpin verilmesinden sonraki 31-180 dak. içinde ölüm.

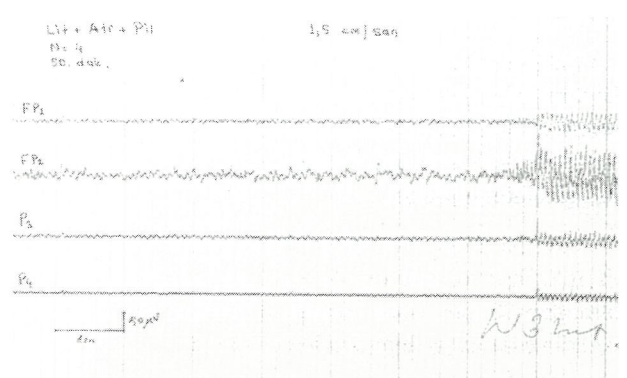
EEG skor	SKORLAMASI EEG
0	normal
1	fokal/jen.yavaş dalga aktivite
2	seyrek fokal epileptik aktivite
3	sık aralıklarla fokal epileptik aktivite
4	fokal başlayıp jeneralize olan epileptik aktivite
5	seyrek jen. epileptik aktivite
6	sık aralıklarla jen. epileptik aktivite
7	fokal/jen. status

SONUÇLAR

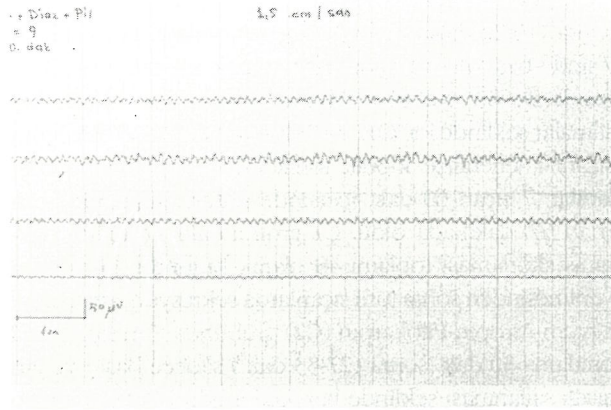
Lityum-pilokarpin verilen grupta(Ç1) ort. 19.5 dak. sonra (16-22 dak.) limbik nöbetler başladı. Hayvanların 7'sinde baş sallama ya da ıslak köpek silkelenmesi, 3 sıçanda ise ön ayakların havaya kalkması ve klonik kasılmalar şeklinde idi. Ort. 29.2 dak. sonra (24-38 dak.) tüm sıçanlar jeneralize klonik tonik nöbet geçirmeye başladılar. 7 sıçan 60 dak. içersinde statusa girdi. Bir sıçan (n.9) 67. dakikada öldü. Ç1 grubundaki sıçanların davranış skorlaması toplamı 48 olarak bulundu. Pilokarpin verilmesinden sonra tüm sıçanlarda sekresyon artışı oldu. Lityum-Atropin-Pilokarpin (Ç2) grubunda tüm sıçanlarda ortalama 30 dak. sonra (27-33 dak.) sadece başın yukarı aşağı sallanması şeklinde hareketler görüldü ve bu tablo ortalama 45 dak. kadar sürdü. İki sıçan (n.2 ve 5) 90 dakikalık süre içersinde kısa süreli jeneralize tonik klonik nöbet geçirdiler. 24 saat sonraki gözlemlerde durumlarında bir anormallik yoktu. Bu gruptaki sıçanların davranış skorları toplamı 26 olarak saptandı. Lityum-Diazepam-pilokarpin (Ç3) grubunda diazepamdan ort. 4 dak. sonra tüm sıçanlar uyudu. Pilokarpin verildikten sonra ise tüm sıçanlarda eksoftalmi, sekresyon artışı ve defekasyon görüldü. Sıçanların 6 sında sağ arka ekstremitede, 3 ünde ise sol arka ekstremitede kaşınma benzeri fokal hareketler oldu. Pilokarpinden 20 dak. sonra tüm sıçanlar hipotonik olarak uyuyorlardı. Hiçbir sıçanda nöbet gözlenmedi. Bu gruptaki sıçanların davranış skorları toplamı 0 idi. Lityum-pilokarpin verildikten sonra EEG kaydı yapılan grupta (Ç4) 7 sıçanın EEG sinde fokal+jen. epileptik aktivite, 3 sıçanın EEG sinde ise jen. epileptik aktivite saptandı (Resim 1). Ç4 grubunda EEG skoru toplamı 63 olarak bulundu. Lityum-atropin-pilokarpin verildikten sonra EEG kaydı yapılan (Ç5) grupta; 4 sıçanda normal EEG kaydı, 2 sıçanda sık olarak fokal epileptik aktivite, 2 sinde fok.+jen. epileptik aktivite, 1 inde seyrek jen., 1 inde ise sık aralıklarla jen. epileptik aktivite saptandı (Resim 2). Ç5 grubundaki EEG skoru toplamı 25 olarak bulundu. Lityum-diazepam-pilokarpin verildikten sonra



Resim 1: Lityum-pilokarpin verilen ve statusa giren sıçanda EEG trasesi.



Resim 2: Pilokarpin öncesi atropin uygulanan sıçanda nöbet aktivitesi.



Resim 3: Pilokarpin öncesi diazepam uygulanan sıçanda Normal EEG trasesi.

EEG kaydı yapılan grupta(Ç6); 6 sıçanda EEG normal olarak değerlendirildi. Bir sıçanda trasede yavaş dalga hakimiyeti, bir sıçanda sık aralıklarla fokal aktivite, 2 sinde ise fok.+jen. epileptik aktivite saptandı (Resim 3). Ç6 grubundaki EEG skoru toplamı ise 12 idi.

TARTIŞMA

Lityum-pilokarpin ile oluşturulan nöbetler kolinerjik sistem yolu ile düzenlenmektedir. Çünkü bu nöbetler atropin ya da hemikolinium-3 tarafından azaltılmakta ya da ortadan kaldırılmaktadır (5). Lityum-pilokarpin modelinde atropin pilokarpinden önce verildiğinde ya da pilokarpinden kısa bir süre sonra verildiğinde nöbet aktivitesini ortadan kaldırdığı halde daha geç dönemde verilirse devam eden nöbet aktivitesi üzerine etkili değildir (5). Bu nedenle bu epilepsi modelinde her ne kadar kolinerjik stimülasyon SE'un başlamasından sorumlu olsada statusun sürdürülmesinde diğer nörotransmitterlerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Kolinerjik sistem nöbet aktivitesinin başlatılmasında rol oynayabilir (7). Nöronal hasardan sorumlu eksitotoksik mekanizmaları

uyararak nöbet aktivitesinin sürdürülmesini sağlar (7,9). Bu hipotez antikolinerjik ilaçların nöbetlerin başlamasını engellemesine rağmen devam eden nöbetlere etki etmemesini açıklar. Antikolinerjik ilaçların antikonvülzan etkilerinin olmaması epileptogenezde ACh in anahtar rol oynadığı görüşüne engel değildir. Atropin ve skopolamin, doza bağımlı olarak sıçanlarda amigdala'nın elektriksel stimülasyonu ile oluşan kindling nöbetlerinin gelişimini geciktirir, fakat gelişen nöbetleri ortadan kaldırmaz (1). Atropin keza karbakol ile sıçanlarda oluşturulan amigdala kindling nöbetlerinin ortaya çıkmasını engeller fakat karbakol ile nöbet oluştuğundan sonra nöbetleri ortadan kaldırmaz (13). Jope ve ark. lityum ile tedavi edilen sıçanlara pilokarpin enjeksiyonundan 15 dak. önce atropin sülfat (5mg/kg/IP) verilmesinin tüm nöbet aktivitesini ortadan kaldırdığını (5), Honchar ve ark. da lityum-pilokarpin modelinde pilokarpinden 30 dak. önce atropin verildiğinde nöbetlerin ve beyin hasarının önlendiğini bildirmişlerdir (2). Bu çalışmada ise pilokarpinden 20 dakika önce atropin verildiğinde atropinin jen. tonik klonik nöbetleri engellediği, hiç bir sıçanın statusa girmediği ancak başın yukarı aşağı sallanması şeklinde limbik nöbetlerin devam ettiği gözlemlenmiştir. Bu modelde atropin verildikten sonra yapılan EEG kayıtlarında da klinik düzelmeye paralel olarak istatistiksel olarak anlamlı düzelmeye saptanmıştır. Sıçanlarda pilokarpin ile oluşturulan nöbetler sistematik olarak verilen diazepam, klonezepam, fenobarbital, valproat ile önlenirken karbamazepin ve hidantoin etkisizdir. Pilokarpin ile oluşturulan nöbetler keza 2-kloro adozin, baklofen ve non-steroidal anti-inflamatuar ajan olan mefenamik asit tarafından da önlenir (3,10). Ancak antiepileptik ilaçların bu modeldeki etki profilleri diğer modeller için geçerli değildir.

Lityum-pilokarpin ile oluşturulan nöbetlerde karbamazepin ve hidantoin son derece yüksek dozlarda (100-200 mg/kg) nöbetleri önlemektedir (11). Diazepam,

pilokarpinden önce verildiğinde lityum-pilokarpin nöbetlerini önler. Olney ve ark. diazepamın 20 mg/kg dozunda pilokarpinden 60 dak. sonra bile statusu durdurduğunu rapor ederlerken (8), Morriset ve ark. aynı dozda ve aynı zamandaki diazepamın SE'ü durdurmada etkisiz olduğunu bildirmişlerdir (6). Lityum-pilokarpin modelinde oluşan SE' da Walton ve Treiman dört farklı EEG paterni gözlemlemişlerdir (12). Bunlar A; Farklı elektrografik nöbetler, düşük voltajlı yavaş aktivite ile birlikte tüm kanallarda ve aynı anda sonlanan değişik elektrografik nöbetler. B; artan ya da azalan epileptiform aktivite, C; sürekli, yüksek amplitüdü hızlı diken aktivite, D; periodik epileptiform aktivite ve rölatif olarak zemin aktivitesinde düzleşmedir. Walton ve Treiman, diazepam verildiği sırada EEG de farklı elektrografik bulgular var ise nöbetlerin hemen durduğunu, artan yada azalan epileptiform aktivite esnasında diazepamın başarı oranının giderek düştüğünü, sürekli diken aktivite ya da periodik epileptiform deşarjlar sırasında ise başarı oranının çok düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada Diazepamın (10 mg/kg /İP) yüksek dozu kullanılmıştır. Pilokarpinden önce verildiğinde, diazepam, bu epilepsi modelinde görülen tüm davranış şekillerini ortadan kaldırmıştır. Sonuç olarak lityum pilokarpin ile oluşturulan kolinerjik epilepsi modelinde diazepamın pilokarpinden önce verildiğinde hem nöbet aktivitesini hem de elektroansefalografik aktiviteyi tam olarak düzenlediği, bir muskarinik kolinerjik reseptör blokleri olan atropinin ise pilokarpinden önce uygulandığında jeneralize tonik klonik nöbetleri önlediği ancak sıçanların limbik nöbetlerinin devam ettiği, elektroansefalografik etkilerinin ise belirli bir düzelme ile sınırlı kaldığı gözlenmiş, epileptogenezde kolinerjik mekanizmaların ara kademe de olsa önemli rolü olduğu sonucuna varılmıştır.

LİTYUM-ATROPİN-PİLOKARPİN GRUBUNDA KLİNİK SKOR

No	NBZ	Nöbet Şekli	Skor
1	29	baş sallama	2
2	30	sey.jen.nöb.	5
3	30	baş sallama	2
4	28	"	2
5	31	sey.jen.nöb.	5
6	27	baş sallama	2
7	32	"	2
8	33	"	2
9	30	"	2
10	30	"	2
ort.	30	"	26

NBZ:Nöbet Başlama Zamanı

Sey. Jen. Nöb:Seyrek jeneralize nöbet

LİTYUM-DİAZEPAM-PİLOKARPİN GRUBUNDA KLİNİK SKOR

No	NBZ	Nöbet şekli	Skor
1	-	-	0
2	-	-	0
3	-	-	0
4	-	-	0
5	-	-	0
6	-	-	0
7	-	-	0
8	-	-	0
9	-	-	0
10	-	-	0
ort.	-	-	0

LİTYUM-ATROPİN-PİLOKARPİN GRUBUNDA EEG SKORU

n.N.	YD	SeFA	SıFA	F+J	SeJA	SıJA	St
1+	-	-	-	-	-	-	-
2+	-	-	-	-	-	-	-
3+	-	-	-	-	-	-	-
4-	-	-	-	-	+	-	-
5+	-	-	-	-	-	-	-
6-	-	-	+	-	-	-	-
				(FP1)			
7-	-	-	-	-	-	+	-
8-	-	-	-	+	-	-	-
				(FP1+FP2+jen)			
9-	-	-	-	+	-	-	-
				(P4+P3+jen)			
10-	-	-	+	-	-	-	-
				(FP1+FP2)			

YD: Yavaş Dalga, SeFA:Seyrek Fokal Aktivite, SıFA:Sık Fokal Aktivite F+J: Fokal+jeneralize Aktivite, SeJ:Seyrek jeneralize Aktivite, SıJA:Sık jeneralize aktivite, St:Status.

LİTYUM-DİAZEPAM-PİLOKARPİN GRUBUNDA EEG SKORU

n.N.	YD	SeFA	SıFA	F+J	SeJA	SıJA	St
1-	-	-	-	+	-	-	-
				(FP1+FP2+jen)			
2-	-	-	+	-	-	-	-
				(P3+P4)			
3+	-	-	-	-	-	-	-
4+	-	-	-	-	-	-	-
5-	-	-	-	+	-	-	-
				(P3+P4+jen)			
6+	-	-	-	-	-	-	-
7+	-	-	-	-	-	-	-
8+	-	-	-	-	-	-	-
9-	+	-	-	-	-	-	-
10+	-	-	-	-	-	-	-

KAYNAKLAR

- 1- Cain D.P, Mc Kitrick DJ, Desborough KA. Effects of treatment with scopolamine and naloxone, singly and combination on amygdala kindling. *Exp.Neurol.*1987;96:97-103
- 2- Honchar MP, Olney JW, Sherman WR. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 1983;220:323-325
- 3- Ikonomidou-Turski C, Cavalheiro EA, Turski L, et al. Differential effects of non steroidal anti inflammatory drugs on seizures produced by pilocarpine in rats. *Brain Res.* 1988;462:275-285
- 4- Janusz W, Kleinrok Z. The role of central serotonergic system in pilocarpine-induced seizures receptor mechanism. *Neuroscience Res.* 1989;7:144-153
- 5- Jope RS, Morrisett RA, Snead OC. Characterization of Lithium potentiation of pilocarpine induced status epilepticus in rats. *Exp.Neurol.* 1986;91:471-480
- 6- Morrisett RA, Jope RS, Snead OC. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium pretreated rats. *Exp.Neurol.* 1987;97:193-200
- 7- Olney JW, Collins RC, Sloviter RS. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv. Neurol.*1986;44:857-877
- 8- Olney JW, Honchar MP, Sherman WR. Diazepam prevents Lithium-pilocarpine neurotoxicity in rats.*Soc.Neurosci.Abstr.* 1983;9:401
- 9- Olney JW, de Gubareff T, Labruyere J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents.*Nature* 1983;301:520-522
- 10- Turski L, Cavalheiro EA, Czuczwar SJ, et al. The seizures induced by pilocarpine :Behavioral,electroencephalographic and neuropathological studies. *Pol. J. Pharmacol. Phar.*1987;39:545-555
- 11- Turski WA, Cavalheiro EA, Coimbra C, et al. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine.*Brain Res. Rev.*1987;12:281-305
- 12- Walton NY, Treiman DM. Response of status epilepticus induced by lithium and pilocarpine to treatment with diazepam. *Exp.Neurol.* 1988;101:267-275
- 13- Wasterlain CG, Jonec V. Chemical kindling by muscarinic amygdaloid stimulation in the rat. *Brain Res.*1983;271:311-335.