

SIÇANLARDA İNTRAHİPOKAMPAL KAINİK ASİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL EPİLEPSİ MODELİ ÜZERİNE MK-801'İN ANTİKONVÜLSİF ETKİSİ

İbrahim Bora*, Oya Ulusan**, Mustafa Bakar***, Sibel Gürün****, Mehmet Zarifoğlu*, Faruk Turan*****, İ. Hakkı Ulus*****, Erhan Oğul*

Santral sinir sisteminde sinaptik ileti nörotransmitter olarak bilinen kimyasal maddeler tarafından sağlanır. Kainik asit beyinde güçlü bir nöroeksitan ajan olup glutamat ve aspartat gibi eksitator aminoasitlerin salınımını sağlar. MK-801 ise eksitator aminoasitlerin etkisini azaltarak antikonvulsan etkili olan bir ajandır. Kainik asit tarafından oluşturulan nöbetler üzerine MK-801'in antiepileptik etkisinin incelenmesini amaçlayan bu çalışmada üç grupta 15'er sıçan alındı. Kainik asitin intrahipokampal olarak verildiği çalışmamızda 1. guruba kainik asit+serum fizyolojik, 2. guruba kainik asit+MK-801 verildi ve 3. gurubada cerrahi işlem yapıldıktan sonra herhangi bir ilaç uygulanmadı. Yapılan bu işlemlerin öncesi ve sonrasında klinik gözlem ve sürekli EEG çekimleri yapılarak elde edilen skorlar kaydedildi. Çalışma ve kontrol gruplarında nöbet başlama süreleri, nöbet skorları ve EEG skorları arasında istatistiki olarak anlamlı fark tespit edildi. Çalışmada kainik asit tarafından oluşturulan klinik nöbet ve elektrofizyolojik nöbet aktiviteleri üzerine MK-801 in göreceli olarak etkili olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Deneysel epilepsi, Kainik asit, MK-801.

Anticonvulsive Effect Of Mk-801 On Experimental Epileptic Model Induced By Kainic Acid In Rats

Synaptic transmission in the central nervous system is supplied by chemical agents known as neurotransmitters. Kainic acid is a strong neuroexcitatory agent in brain which increase releases excitatory amino acids such as glutamate and aspartate. MK-801 is an anticonvulsant agent which reduces the effects of excitatory amino acids. Our aim was to investigate antiepileptic effects of MK-801 on seizures induced by kainic acid. In this study 45 rats were divided into three groups. Kainic acid was given in the hippocampus. The first group was given kainic acid+saline, the second group was given kainic acid+MK-801 (as intraperitoneal) and the third group was served as the control. EEG recording and clinical seizure observation had done before and after these procedures and all scores were recorded. In the study and control groups it was established statistically important differences between seizure starting period, clinical seizures and EEG scores.

In this study, we concluded that MK-801 is moderately effective on clinical and electrophysiological seizure activities induced by kainic acid in rats.

Key Words: Experimental epilepsy, Kainic acid, MK-801.

Son 20 yıldır giderek artan sayıdaki deneysel çalışmalar, Santral Sinir Sistemi (SSS) sinapslarında iletinin yayılması için Eksitator Amino Asit (EAA) (Glutamat, Aspartat) olarak bilinen nörotransmitterlerin kullanıldığını ve bu nörotransmitterlerin birçok nörolojik hastalığın patofizyolojisinde rol aldıklarını göstermiştir (8,10,3).

Kainik asit (KA) bir glutamat analogu olup güçlü nöroeksitan ve nörotoksindir(9,12). Kainik asidin ek-

sitasyonuna karşı en duyarlı olan alanın Hipokampusun CA3 ve daha sonra CA4 bölgesi olduğu sanılmaktadır. KA; postsinaptik reseptörleri aktive ederek Na⁺ iyonunun hücre içerisine girmesiyle nöronun depolarizasyonunu gerçekleştirir (3,7). Aynı zamanda presinaptik yerleşimli glutamat ve aspartat reseptörlerini de aktive ederek EAA'lerin (muhtemelen Glutamat'ın) salınımını sağlamaktadır (1,4).

KA'nin sistemik veya intraserebral olarak verildiği deneysel çalışmalarda temporal lob epilepsisine benzerlik gösteren, sonunda parsiyel ya da jeneralize status epileptikus'a dönüşen limbik epileptik nöbetlere neden olduğu ve belirgin beyin hasarına yol açtığı görülmüştür (12,1,4,5).

* 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

MK-801 ((+)-5-Metil-10-11-dihidro-5-h-dibenzo (a,d) siklohepten-5,+10-imin maleat) NMDA antagonisti olup en fazla yoğunlukta bağlandığı bölgeler hipokampusun CA1 alanı, serebral korteksin derin tabakaları ve dentat girusun moleküler tabakalarıdır (3,11).

Bu çalışmada sıçanlarda kainik asidin intrahipokampal uygulanması sonucunda oluşan deneysel epilepsi modeli üzerine bir eksitator aminoasit antagonisti olan MK-801'in antikonvulzif etkisinin klinik ve elektrofizyolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL-METOD

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 300-450 g olan 45 adet Sprague-Dawley türü erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Tüm sıçanlar çalışmadan 14 gün önce U.Ü. Deney Hayvanları yetiştirme merkezinden alınarak 18-24 °C sıcaklıkta ve gün ışığı (12 saat karanlık, 12 saat aydınlık) kontrollü odada 4-6saat kadar bir kafeste olacak şekilde su ve yem alımları serbest bırakılarak yapıldı.

Cerrahi İşlem: Her bir sıçanın sağ hipokampusunun CA1 bölgesine ilaç enjeksiyonu sağlayan kanül, bilateral frontal ve parietal korteks bölgelerine de EEG kaydı yapılabilmesi için dural elektrot yerleştirmek amacı ile pentobarbital (40 mg/kg I.P) verilerek anestezi sağlandı. Takiben her sıçanın stereotaksik alete yerleştirildi. Sıçanın kafası, kulaklarından ve çenesinden geçen vidalarla sabitleştirildi. Kafası traşlandıktan sonra, orta hat hizasından yapılan insizyonla periost kaldırılıp, sıçanın bregması saptandı. Bregma referans noktası alınarak Paxinas-Watson stereotaksik sıçan beyin atlasından hipokampusun CA1 bölgesinin, frontal ve parietal korteksin koordinatları saptandı. Bu bölgelere dışı matkabı ile burr hole açıldı. CA1 bölgesine 20 nolu paslanmaz çelik iğneden hazırlanmış 10 mm uzunluğunda kanül yerleştirildi. Cerrahi işlem sonrası tüm sıçanlar 3 gün bekletildi. EEG kaydı 8 kanallı Nihon-Kohden marka elektroensefalografi cihazı ile yapıldı.

İlaçlar: Kainik asit (Sigma): 20 l'de 2 g olacak şekilde %0.9'luk NaCl çözeltisi içinde çözüldü. NaOH ile pH: 7.2'ye ayarlandı. İlaç sağ hipokampusun CA1 bölgesine verildi. MK-801 (Merck-Sharp-Dohme): 1 mg/kg olacak şekilde %0.9'luk NaCl ile çözüldükten sonra kainik asit uygulamasından 30 dakika önce IP olarak verildi.

Çalışmamıza alınan herbir sıçan nöbet formlarına göre değerlendirildi.

Nöbet Skoru

Skor 0 - Değişiklik yok.

Skor 1 - Paroksizmal "wet shake" (dakikada 2'den fazla silkinme)

Skor 2 - Baş hareketleri (aşağıya, yukarıya)

Skor 3 - Ön ayaklarda tremor ve klonus (Limbik motor nöbetler)

Skor 4 - Postural kontrolün kaybı ve kuyrukta hipertoni ile birlikte tam limbik nöbetler.

Skor 5 - Orta derecede ajitasyon ve hipermobilité periyodları ile birbirini takip eden

tam limbik nöbetler.

Skor 6 - Şiddetli ajitasyon, belirgin hipermobilité, devamlı dairesel dönme hareketleri, sıçramalar (kaçak hareket) ile birbirini takip eden jeneralize klonus ve silindirvari dönme hareketleri, opistotonus ile birlikte olan jeneralize tonik-klonik nöbetler.

Skor 7 - Ölüm.

Çekilen EEG ler aşağıdaki gibi skorlandı.

Skor 0: Değişiklik yok

Skor 1a: Yaygın yavaş dalga

b: Fokal yavaş dalga

Skor 2: Üçten fazla olmayan maksimum 3 saniye süreli jeneralize diken dalga aktivitesi

Skor 3: Süresi 10 saniyeden fazla olmayan multipl jeneralize diken dalga aktivitesi

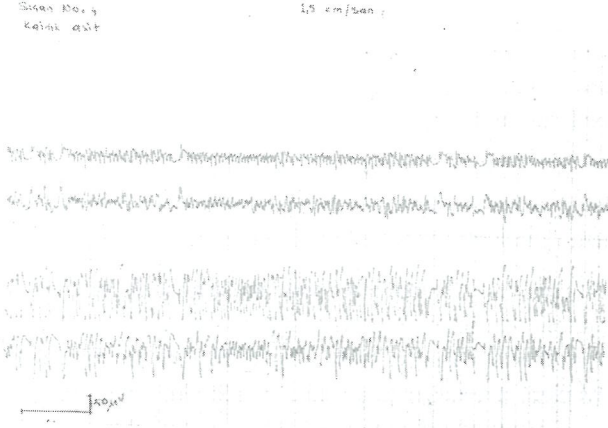
Skor 4: Süresi 30 saniyeden az olmayan 1 adet jeneralize diken dalga aktivitesi

Skor 5: Süresi 30 saniyeden az olmayan iki veya daha fazla jeneralize diken dalga aktivitesi.

Skor 6: Status.

Grup 1 (G1): 15 adet sıçan kullanıldı. Bu gruptaki sıçanlar EEG kaydı için tespit edildikten sonra 15 dak. süre ile EEG kaydı yapıldı. 15. dakikada 1 cc serum fizyolojik (SF) IP olarak uygulandı ve takiben EEG kaydı yapıldı. SF uygulanmasından 30 dakika sonra ise sağ hipokampusun CA1 bölgesine konulmuş kanüle, içinde enjekte edilecek kainik asidin bulunduğu 15 cm. uzunluğunda PE 10 (polietilen) tüpü aracılığı ile 25 ml hacimli Hamilton mikroenjektöre bağlanmış 25 numaralı paslanmaz çelikten yapılmış diğer bir enjeksiyon probu takıldı. Bu yolla PE 10 tüpü içindeki Kainik asit Hamilton mikroenjektörü ile sıçan uyanık iken 20 µg/20 µl dozunda sıçanın sağ hipokampusuna verildi ve sıçanlar elektrofizyolojik ve klinik olarak gözlemlendi (Resim 1).

Grup 2 (G2): Bu grupta 15 sıçan çalışmaya alındı. Tüm sıçanlara farmakolojik ajan verilmeden önce EEG çekimi için G1 grubuna uygulanan işlemler yapıldı. 15 dk.'lık



Resim 1: Kainik asit uygulanan sıçanda jeneralize epileptik aktivite

EEG çekiminden sonra MK-801 1mg/kg dozunda İP olarak uygulandı. MK-801 veriliminden 30 dk. sonra sağ hipokampusu 2 mg/20 ml dozunda kainik asit verildi. Kainik asit uygulanmasından sonra 90 dk. kadar sıçanlar gözlenerek, elektrofizyolojik ve klinik olarak değerlendirildi (Resim 2).

Sham grubu: 15 adet sıçan cerrahi işlem yapıldıktan sonra hiçbir ilaç verilmeden klinik olarak gözlendi ve EEG kayıtları yapıldı.

İstatistik Çalışma: Nöbet başlama süreleri T testi ile Nöbet Skorları ve EEG skorları Mann-Whitney U testi ile istatistik olarak değerlendirildi.

SONUÇLAR

Grup 1 (G1):

Bu grupta çalışılan 15 sıçanın tümünde deney öncesi herhangi bir nöbet formuna rastlanmadı. Kainik asit veriliminden sonra, nöbet başlangıcı minimum 1 sn, maksimum 12 sn`de oluştu ve ortalama değer 3.43 olarak bulundu.

Kainik asit veriliminden sonra tüm sıçanların nöbet skorları değerlendirildi. Nöbet skorunun minimum değeri 3, maksimum değeri 7 ve aritmetik ortalaması 5.8 olarak bulundu. Bu gruptaki sıçanlardan 4`ünde nöbet skorunun 7 olduğu gözlemlendi.

Bu gruptaki 15 sıçanın farmakolojik ajan veriliminden önceki EEG skoru sadece 4 sıçanda 1a, diğerlerinde ise 0 idi. Kainik asit veriliminden sonraki EEG skoru sadece 2 sıçanda 5, diğer 13 sıçanda ise 6 olarak değerlendirildi ve aritmetik ortalaması 5.86 olarak bulundu.

Grup 2 (G2):

Bu gruptaki 15 sıçanın tümünde deneye başlamadan önce herhangi bir nöbet formu gözlemlenmedi. MK-801 veriliminden sonraki 30. dk.`dan itibaren tüm sıçanlarda a-



Resim 2: Kainik asit öncesi MK-801 uygulanan sıçanda jeneralize diken dalga aktivite

taksi, postüral tonus kaybı gibi MK-801`e bağlı klinik tablolar görüldü. Bu gruptaki sıçanlarda nöbet başlangıcının minimum 2 sn, maksimum 2 dk. ve aritmetik ortalamasının 27.6 sn olduğu görüldü.

Kainik asit veriliminden sonra yapılan değerlendirmede, minimum nöbet skoru 2, maksimum nöbet skoru ise 6 olarak saptandı. Bu gruptaki sıçanlarda ölüm gözlemlenmedi. Nöbet skorunun aritmetik ortalama değeri ise 3.2 olarak bulundu.

Bu gruptaki 15 sıçanın farmakolojik ajan verilmeden önce EEG skoru 2 sıçanda 1a, 1 sıçanda 1b ve diğer 12 sıçanda ise 0 olarak değerlendirildi. MK-801 sonrası EEG skoru 13 sıçanın tümünde 1a idi. Kainik asit veriliminden sonra ise minimum EEG skoru 2, maksimum EEG skoru 5 ve aritmetik ortalaması 3.66 olarak bulundu.

Kontrol ve çalışma gruplarının nöbet başlama süreleri arasında istatistik olarak anlamlı fark bulundu. Kontrol grubunun nöbet başlama sürelerinin çalışma grubuna göre anlamlı olarak daha kısa olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

Nöbet skorları açısından kontrol ve çalışma grupları arasında istatistik olarak anlamlı fark vardı. Kontrol grubunun nöbet skorları, çalışma gruplarına göre anlamlı olarak yüksek idi ($p < 0.0001$).

EEG skorları açısından, kontrol ve çalışma grupları arasında istatistik olarak anlamlı fark bulundu. Kontrol grubunun EEG skorlarının çalışma gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$).

TARTIřMA

Epileptik aktivite ve epileptik beyin hasarı oluşmasında EAA`lerin rol oynadığı bilinmektedir. Günümüzde epilepsi tedavisinde, EAA`lerin etkilerini azaltan farmakolojik ajanların kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu ajanlar içerisinde her ne kadar nörotoksik olsa da

MK-801 non-kompetitif NMDA antagonistidir ve EAA'lerin etkilerini post sinaptik bölgede bloke ederek antikonvülzan etkisini göstermektedir (3,11).

Clifford ve ark. sıçanlarda sistemik olarak verilen KA ile oluşturulmuş epileptik nöbetlere ve beyin hasarına karşı, KA veriliminden 30-60 dak. önce MK-801 (1 mg/kg) verildiğinde maksimum etkili olduğunu göstermişler ve sıçanlarda 1mg/kg MK-801'in KA'in oluşturduğu beyin hasarına karşı amigdalada, hipokampusun CA1 bölgesinde ve piriform korteksde talamusda koruyucu etkisini saptamışlardır (2). Ancak hipokampusun CA3 bölgesinde lateral septumda bu etki gösterilememiştir (2). Virgili ve ark. MK-801'in (1 mg/kg) dozunda; KA'in oluşturduğu beyin hasarına karşı koruyucu etkisinin olmadığını saptamışlardır (14).

Velisek ve ark. MK-801'in değişik dozlarda antikonvülzan etkisini araştırmışlar ve MK-801'in 0.5 mg/kg ve üstündeki dozlarda antikonvülzan etkisinin jeneralize nöbetlerde, limbik nöbetlere göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bunun nedeni olarak da büyük nöbetlerin patofizyolojisinde NMDA'nın daha fazla rol oynadığını öne sürmüşlerdir (13). Çalışmamızda da literatüre uyumlu olarak Jeneralize tonik klonik nöbetlerin belirgin olarak azaldığı limbik nöbetlerin ise devam ettiği saptanmıştır.

Stafstrom ve ark., sıçanlarda KA'in sistemik olarak (10-12 mg/kg) verilmesi ile %100 oranında status epileptikus ve %71 oranında mortalite gözlemişlerdir (12). Kulkarni ve ark. 5 µg intra serebro ventriküler (İ.S.V.) KA verdikleri sıçanlarda %67, 10 µg I.S.V. verilen sıçanlarda ise %100 mortalite saptamışlardır (6). Bizim çalışmamızda ise kontrol grubumuzdaki sıçanlarda %93.3 oranında status epileptikus ve %26.6 oranında mortalite gözlenmiştir. Çalışmada status epileptikus ve mortalite oranının daha düşük olmasının nedeni, KA'ı 2 µg dozunda vermemize bağlı olabilir. Kulkarni ve ark. KA verdikleri sıçanlarda MK-801'in mortaliteyi %100 den, %45'e düşürdüğünü saptamışlardır (6). Bizim çalışmamızda da MK-801 sıçanların yaşam süresini uzatırken mortaliteyi önlemiştir.

Chronopoulos ve ark. sıçanlara KA'nın 12 mg/kg IP olarak verilmesinden sonra ilk 30 dak. içinde limbik nöbetlerin daha yoğun olduğunu saptamışlardır (1). Kulkarni ve ark. I.S.V. 5-10 µg KA verilen sıçanların tümünde hemen başlayan limbik örnekli ve sekonder jeneralize karakterde epileptik nöbetler tespit etmişlerdir (6). Bizim çalışmamızda da intrahipokampal 2 µg KA verilen sıçanlarda, KA verilmesinden kısa bir süre sonra (ort. 3.5 sn) epileptik nöbetler başlamıştır.

Stafstrom ve ark. erişkin sıçanlarda KA'in sistemik (12 mgr/kg IP) verilmesini takiben birkaç günden birkaç haftaya kadar değişen zamanlarda spontan rekürren nöbetlerin varlığını ortaya koymuşlardır (12).

Biz ise KA veriliminden sonra tüm sıçanları 24 saat izleyip ardından dekapitasyon yaptığımızdan dolayı daha uzun süreli olarak nöbetleri izleme olanağı bulamadık.

Çalışmada, kontrol grubundaki sıçanlarda, KA'in verilmesinden sonra EEG de limbik nöbetler esnasında sağ hemisferde daha yüksek amplitüdü diken dalga aktiviteleri, jeneralize tonik klonik nöbetler esnasında ise daha uzun süreli jeneralize diken dalga aktivitesi görüldü.

Çalışmamızda nöbet skoru ile EEG skoru arasındaki ilişki her zaman doğru orantılı değildi. Nöbet skoru 3 olan sıçan ile 5 olan sıçanın aynı EEG skoruna sahip oldukları gözlemlendi. Stafstrom ve ark. da sistemik KA uygulanan sıçanlarda silkinme hareketleri ve ön bacak klonusunun benzer EEG bulguları verdiklerini gözlemişler ve klinik ile EEG arasında kesin bir ilişki saptayamamışlardır(12). Bizim çalışmamızda patolojik dalgalann sağ hemisferde daha yüksek amplitüdü olmasının nedeni ise muhtemelen konvülzan ajanın direkt olarak sağ hipokampusa verilmesine bağlıdır.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda intrahipokampal KA verilen sıçanlarda KA'in neden olduğu epileptik nöbetleri, elektrofizyolojik nöbet aktivitelerini ve beyin hasarını MK-801'in tam olarak önlemediğini fakat orta derecede etkili olduğunu söyleyebiliriz. Ancak bu konuda daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1- Chronopoulos A, Stafstrom C, Thurber S, et al. Neuroprotective effect of felbamate after kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsia* 1993; 34 (2): 359-366.
- 2- Clifford DB, Olney JW, Benz AM, et al. Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizures-related brain damage. *Epilepsia* 1990; 31(4): 382-390.
- 3- Collingridge GL, Lester RA. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacological Rev.* 1989; 40: 143-210.
- 4- Holmes GL. Do seizure cause brain damage? *Epilepsia* 1991;32 (Suppl. 5): 14-28.
- 5- Holmes GL, Thompson JL, Marchi T, et al. Behavioral effects of kainic acid administration on the immature brain. *Epilepsia* 1988;29 (6): 721-730.
- 6- Kulkarni SK, Mehta AK, Ticku MK. Comparison of anticonvulsant effect of ethanol against NMDA, Kainic Acid, and Picrotoxin-induced convulsions in rats. *Life Sciences* 1989;46: 481-487.

- 7- Mayer ML, Miller RJ. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca²⁺ in mammalian neurons. Trends in Pharmacological Sciences (special report). 1991; 36-42.
- 8- Meldrum BS. Excitatory amino acid transmitters in epilepsy. Epilepsia 1991;32(Suppl.2): 2-3.
- 9- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of central nervous system. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1989;29: 365-402.
- 10- Sherwin A, Robitaille Y, Quesney F. et al. Excitatory amino acids are elevated in human epileptic cerebral cortex. Neurology 1988; 38: 920-923.
- 11- Sparenborg S, Brennecke LH, Jaax NK. et al. Dizocilpine (MK-801) arrest status epilepticus and prevents brain damage induced by soman. Neuropharmacology 1992;31: 357-368.
- 12- Stafstrom CE, Thompson JL, Holmes GL. Kainic acid seizures in the developing brain: status epilepticus and spontaneous recurrent seizures. Developmental Brain Research. 1992;65: 227-236.
- 13- Velisek L, Veresova S, Pobisova H. et al. Excitatory amino acid antagonists and pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis II.: The effect of MK-801. Psychopharmacology 1991;104: 510-514.
- 14- Virgili M, Migani P, Contestabile A. et al. Protection from kainic acid neuropathological syndrome by NMDA receptor antagonist: Effect of MK-801 and CGP 39551 on neurotransmitter and glial markers. Neuropharmacology 1992;31(5): 469-474.