T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

# PENİSİLİN MODELİ DENEYSEL EPİLEPSİDE BAZI ANTİOKSİDANLARIN ETKİLERİ: ELEKTROFİZYOLOJİK BİR ÇALIŞMA

**Proje No**: EÜBAP-FBA–09–720

Normal Araştırma Projesi

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**
Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ
Erciyes Üniversitesi
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Araştırmacılar
Prof. Dr. Erdal AĞAR (Ondokuz Mayıs Ü., Tıp Fakültesi)
Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ (Ondokuz Mayıs Ü., Tıp Fakültesi)
Arş. Gör. Dr. Sedat PER (Bozok Ü., Fen-Edebiyat Fakültesi)
Arş. Gör. Abdulkadir TAŞDEMİR (Erciyes Ü., Fen Fakültesi)

Nisan 2011
KAYSERİ

## TEŞEKKÜR

Bu projeyi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

# İÇİNDEKİLER


| | Sayfa No |
|---|---|
| **TEŞEKKÜR** | i |
| **ÖZET** | iv |
| **ABSTRACT** | v |
| **1. GİRİŞ** | 1 |
| **2. GENEL BİLGİLER** | 4 |
| 2.1. Sinir Sistemi | 4 |
| 2.2. Epilepsi | 5 |
| 2.2.1. Epilepsi Nedenleri | 6 |
| 2.2.2. Nöbetler ve Epileptik Sendromların Sınıflaması | 7 |
| 2.3. Deneysel Epilepsi Modelleri | 8 |
| 2.4. Elektroensefalogram (EEG) | 11 |
| 2.5. Elektrokortikogram (ECoG) | 12 |
| 2.6. Antioksidanlar | 12 |
| 2.7. Nitrik Oksit | 13 |
| **3. GEREÇ VE YÖNTEM** | 15 |
| 3.1. Deney Hayvanları | 15 |
| 3.2. Kimyasal Maddeler ve Uygulanış Şekilleri | 15 |
| 3.2.1. Penisilin G Potasyum | 15 |
| 3.2.2. L-arjinin | 15 |
| 3.2.3. L-NAME | 16 |
| 3.2.4. 7-Nitroindazol (7NI) | 16 |
| 3.2.5. Aminoguanidin (AG) | 16 |
| 3.2.6. Üzüm Çekirdeği özütü (GSE) | 16 |
| 3.3. Deney Grupları | 17 |
| 3.4. Cerrahi İşlem | 18 |
| 3.5. Elektrofizyolojik Kayıtlar | 20 |
| 3.6. İstatistiksel Analiz | 22 |
| **4. BULGULAR** | 25 |
| 4.1. Penisilinle Uyarılan Epileptiform Aktivitenin İncelenmesi | 25 |

4.2. Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi 25

4.2.1. 50 mg/kg Dozda Uygulanan Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi 25
4.2.2. 100 mg/kg Dozda Uygulanan Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi 25
4.2.3. 200 mg/kg Dozda Uygulanan Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi 26
4.2.4. 400 mg/kg Dozda Uygulanan Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi 26
4.3. Nitrik Oksit Agonist ve Antagonistlerinin Epileptiform Aktiviteye Etkisinin İncelenmesi 26
4.3.1. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörü Aminoguanidin'in Epileptiform Aktiviteye Etkisi 26
4.3.2. Üzüm Çekirdeği Özütünün Nitrik Oksit Agonist ve Antagonistleri ile Etkileşimlerinin Epileptiform Aktiviteye Etkisi 27
4.3.2.1. Üzüm Çekirdeği Özütü + L-arjinin Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi 27
4.3.2.2. Üzüm Çekirdeği Özütü + L-NAME Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi 30
4.3.2.3. Üzüm Çekirdeği Özütü + 7-Nitroindazol Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi 30
4.3.2.4. Aminoguanidin + Üzüm Çekirdeği Özütü Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi 30
4.3.2.5. L-arjinin + Aminoguanidin +Üzüm Çekirdeği Özütü Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi 36
**5. TARTIŞMA VE SONUÇ** 37

5.1. Penisilinle Uyarilan Epileptiform Aktivitede Üzüm Çekirdeğinin Etkisi 37
5.2. Penisilinle Uyarılan Epileptiform Aktivite Üzerine Üzüm Çekirdeği Özütünün Gösterdiği Antikonvulsant Etkide Nitrik Oksit Yolunun Rolü 40

**KAYNAKLAR** 45

# ÖZET

Sıçanlarda penisilinle uyarılan epileptiform aktivite üzerine antioksidan olarak seçilen üzüm çekirdeği özütünün (Grape Seed Extract; GSE) etkisi ve GSE'nin etkisi üzerindeki nitrik oksit (NO) yolağının muhtemel rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 98 adet erkek Wistar sıçan üretan ile anesteziye alınarak sol somatomotor korteksleri açılıp stereotaksik cihaza yerleştirildi. Korteks yüzeyine kayıt elektrotları yerleştirilerek dijital kayıt düzeneğine bağlandı. Penisilin + 50 mg/kg GSE, penisilin + 100 mg/kg GSE, penisilin + 200 mg/kg GSE, penisilin + 400 mg/kg GSE, penisilin + 60 mg/kg aminoguanidin, penisilin + 100 mg/kg aminoguanidin, penisilin + etkin doz GSE grubu + 500 mg/kg L-arjinin, penisilin + etkin doz GSE grubu + 60 mg/kg L-NAME, penisilin + etkin doz GSE grubu + 40 mg/kg 7-Nitroindazol, penisilin + 60 mg/kg aminoguanidin + etkin doz GSE, penisilin + 500 mg/kg L-arjinin + 60 mg/kg aminoguanidin + etkin doz GSE grupları oluşturuldu.

Penisilin enjeksiyonundan 30 dakika sonra 50, 100, 200 mg/kg dozlarda uygulanan GSE'nin epileptiform aktivitenin ortalama frekansını azalttığı, fakat amplitüd de değişikliğe neden olmadığı; GSE'nin 400 mg/kg dozunun, epileptiform aktivitenin amplitüdünü ve frekansını değiştirmediği; 200 mg/kg dozunun ise epileptiform aktivitenin frekansını değiştiren en etkili doz olduğu belirlendi. GSE'nin antikonvulsan etkisi, seçici indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan ve aynı zamanda NO substratı L-arjinin tarafından inhibe edilen aminoguanidinin varlığında önemli ölçüde azaldı. Seçici olmayan nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME kısmi olarak GSE'nin antikonvulsan aktivitesini tersine çevirdi. Seçici nöronal nitrik oksit sentaz inhibitörü 7-Nitroindazol ve L-arjinin GSE varlığında benzer antikonvulsan aktivite gösterdi.

Elektrofizyolojik bulgular, GSE'nin epileptiform aktivitenin ortalama frekansını azalttığını ve GSE'nin antikonvulsan etkisinin iNOS'dan kaynaklanabileceğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Deneysel epilepsi, üzüm çekirdeği özütü, nitrik oksit, aminoguanidin, penisilin.

## ABSTRACT

The effect of grape seed extract (GSE) selected as an antioxidant on penicillin-induced epileptiform activity in rat and the potential role of nitric oxide (NO) pathway in the effect of GSE were investigated. For this reason, male Wistar rats (n=98) were anesthetized with urethane. The left somatomotor cortex were opened and were placed on stereotaxic equipment. Recording electrods were put on their cortex and connected to the digital recording system. Penicillin + 50 mg/kg GSE, penicillin + 100 mg/kg GSE, penicillin + 200 mg/kg GSE, penicillin + 400 mg/kg GSE, penicillin + 60 mg/kg aminoguanidine, penisilin + 100 mg/kg aminoguanidine, penicillin + the effective dose of GSE + 500 mg/kg L-arginin, penicillin + the effective dose of GSE + 60 mg/kg L-NAME, penicillin + the effective dose of GSE + 40 mg/kg 7-Nitroindazole, penicillin + 60 mg/kg aminoguanidine + the effective dose of GSE, penicillin + 500 mg/kg L-arginin + 60 mg/kg aminoguanidine + the effective dose of GSE groups were formed.

Thirty minutes after penicillin injection, 50, 100 and 200 mg/kg dose of GSE caused a decrease in the mean frequency of epileptiform activity, but did not changed the amplitude. A dose of 400 mg/kg GSE did not change the amplitude and frequency of epileptiform activity. The most effective GSE dose was 200 mg/kg in changing the frequency of epileptiform activity. The occurrence of anticonvulsant activity caused by GSE was significantly reduced in the presence of selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine, which was inhibited by NO precursor, L-arginine. The administration of non-selective nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME partially reversed the anticonvulsant activity of GSE. Selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-NI and L-arginine showed a similar anticonvulsant activity in the presence of GSE.

The electrophysiological evidences indicated that GSE decreases the mean frequency of epileptiform activity and the anticonvulsant effect of GSE could be originated from the iNOS.

**Keywords:** Experimental epilepsy, grape seeds extract, nitric oxide, aminoguanidine, penicillin.

# 1. GİRİŞ

Epilepsi; tekrarlayan nöbetlerle karakterize, insan yaşamını mental ve fiziksel olarak olumsuz etkileyen en yaygın sinir sistemi hastalıklarından birisidir [1]. Beynin belli bölgelerinde bulunan eksitatör ve inhibitör kontrol sistemleri arasındaki dengenin bozulması epilepsinin oluşumuna yol açmaktadır [2]. Epileptik nöbetlerin çoğu kortikal ve hipokampal yapılarda ortaya çıkan deşarjlarla oluşur [3]. Epilepsinin de dâhil olduğu şiddetli mental ve nörolojik hastalıkların patofizyolojisinde eser elementlerin, elektrolit ve antioksidan metabolizmasındaki anormalliklerin rol aldığı gösterilmiştir [4]. Epilepsi tedavisi her zaman sinir hücrelerinin korunmasıyla ilişkilidir ve bu durum, nöbetleri tamamen baskılamak ya da süresini azaltmak suretiyle gerçekleştirilebilir [5].

Serbest radikallerin biyolojik etkileri en iyi şekilde *in vivo* olarak E, C ve A vitaminleri ve glutatyon gibi antioksidanlarla kontrol edilir [6]. E ve C vitamininin nöron koruyucu etkilerinin yanında epilepsi tedavisinde de etkili olduğunu gösteren deneysel ve klinik çalışmalar vardır [7–14]. Belirtilen çalışmalar incelendiğinde, epilepsinin deneysel modellerinde uygulanan ve ortaya çıkan etkin dozlarda farklılıkların olduğu göze çarpmaktadır. Diğer taraftan üzüm çekirdeği özütünün (Grape Seed Extract; GSE) oksidan hasarı önlemede görev yapan en güçlü antioksidanlardan biri olduğu bilinmektedir [15–24]. Dokuz hafta süreyle 25, 50 ve 75 mg/kg GSE verilen ergin sıçanlarda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu önleyen etkin dozun 75 mg/kg GSE olduğu tespit edilmiştir [24]. Sıçan merkezi sinir sistemindeki yaş ile ilgili oksidatif protein ve DNA hasarını inhibe etmede 100 mg/kg GSE dozunun etkili olduğu bulunmuştur [21–23].

Nitrik oksit (NO) memelilerde nöron, endotel ve makrofaj gibi farklı hücre tiplerinde nitrik oksit sentaz (NOS) olarak adlandırılan üç izoenzim ailesi tarafından sentezlenmektedir. Nöronlarda bulunan nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) yapısal olarak üretilir ve aktivitesi $Ca^{+2}$ tarafından düzenlenir. Diğer bir yapısal ve $Ca^{+2}$'a bağımlı NOS tipi olan endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) damarların endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Ayrıca makrofajlar, indüklenebilen, $Ca^{+2}$'dan bağımsız ve sitokinlerin etkisiyle üretilebilen bir NOS tipini yani indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimini içermektedir. Hipokampus ve diğer beyin bölgelerinin nöronları ayrıca nNOS'un yanında

eNOS'da içermektedir. Bu üç izoenzimin hepsi moleküler oksijen ve nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat'ı (NADPH) ko-substrat gibi kullanarak L-arjininden NO üretirler [25].

Ayrıca, GSE'nin NO üretimini artırdığı da bulunmuştur [26, 27]. NO hücresel üretim hızına bağlı olarak düzenleyici, koruyucu veya toksik etki gösterebilir [28]. NO üretiminin düşük olması reaktif oksijenle ilişkili hasara karşı koruyucu olmaktadır [29]. NO'nun konvulsif veya antikonvulsif etkiye sahip olduğunu bildiren çalışmalar vardır [30–36]. NO'nun E ve C vitaminlerinin antikonvulsif etkisine karıştığı da bildirilmiştir [12–14]. Beyinde reaktif oksijen ve azot ürün artışının epilepsiye yol açtığı göz önünde bulundurulduğunda en güçlü antioksidanlardan biri olan GSE'nin de epilepsiyi önlemede en azından E ve C vitaminleri kadar etkili olacağı kaçınılmaz görünmektedir. Diğer taraftan GSE'nin güvenli doz kullanım aralığı E vitaminine göre oldukça geniştir. Öyle ki 2–4 gr/kg oral dozlarda alınan GSE'nin toksik olmadığı ve herhangi bir mutajenite göstermediği tespit edilmiştir [17].

Arjinin, doğada çok yaygın olarak bulunan esansiyel olmayan bir amino asittir [37]. L-arjinin, NOS'un katalitik etkisiyle NO oluşumunda önemli bir moleküldür [38]. Karaciğer dışı dokularda ornitinden dönüştürülerek elde edilebilir. Her ne kadar tüm insanlar sentez edebiliyorsa da bazılarının diyetle almaları gerekebilir (idiyopatik hipospermi). Özellikle büyüme dönemindeki çocuklarda, yaşlılarda ve iyileşme sürecindeki hastalarda besinlerle alınması gerektiği belirlenmiştir. Arjinin yıkılması büyük ölçüde üre sentezi sırasında görülen son reaksiyonla gerçekleşir. Bu reaksiyonda arjinin, üre ve ornitine dönüşür ve hem üre sentezi hem de arjinin katabolizması gerçekleşir. Arjinin hücre bölünmesi, yara iyileşmesi, amonyağın vücuttan uzaklaştırılması yolu olan üre döngüsü, immun fonksiyonlar ve hormonların salgılanmasında önemli rol oynar. Et, süt ürünleri, kümes hayvanları ve balıkta bol miktarda bulunur. Vücutta kan damarlarının gevşemesinde kullanılan nitrik oksit arjininden sentezlenir. Bu özelliği nedeniyle kardiyovasküler yetmezlikler, impotans ve kadınlarda eşeysel yetersizliklerin tedavisinde kullanılmaktadır [37].

L-NAME ($N_{\omega}$-nitro-L-arjinin metil ester hidroklorid), NO üretimini engelleyen bir arjinin analoğudur. NOS enzimlerinin tamamını etkileyerek NO üretimini engelleyen nonspesifik bir antagonisttir [25].

7-Nitroindazol (7NI), nNOS'un seçici inhibitörüdür [39]. 7NI'ün kainik asit ve pilokarpini baskılayarak antikonvulsan etkiye neden olduğu belirtilmiştir [40].

Aminoguanidin (AG), L-arjinine (NOS substratı) yapısal olarak çok benzer olduğundan dolayı iNOS'ı diğer inhibitörler kadar inhibe edebilir. Nitekim Corbett [38] tarafından, L-arjinin ve AG'nin kimyasal yapılarının benzer olduğu (her iki kimyasal yapıda da eşdeğer guanidin azotu bulunur) ve AG'nin yarışmalı olarak enzimin substratı yerine geçtiği ileri sürülmüştür. İnhibisyon, ortamdaki L-arjinin konsantrasyonunu artırarak ortadan kaldırılabilir.

Literatürde GSE ile epilepsi arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada sıçanlarda penisilinle oluşturulan epileptiform aktivite üzerindeki intraperitonal GSE enjeksiyonun etkisinin araştırılması ve bu süreçte NO substratı L-arjinin, non-spesifik NOS inhibitörü L-NAME, spesifik nNOS inhibitörü 7-nitroindazol ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) inhibitörü aminoguanidin kullanılarak NO'nun rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, sinir hücreleri ya da nöronlardan ve onların destek hücreleri olan gliadan kurulmuştur. Nöronlar elektriksel olarak uyarılabilir ve aksiyon potansiyeli oluşturup yayabilir. Nöron perikaryon ya da soma denilen bir hücre gövdesi içerir, buradan uzantılar ışınsal olarak çıkar. Bu uzantılar dendritleri içerir; dendritler dallanarak geniş yüzey alanları ile diğer nöronlardan gelen çok yönlü sinyallerin algılanmasını kolaylaştıran dendritik ağaçları oluşturur. Ayrıca somadan diğer hücrelere sinir impulsunu ileten ana uzantıyı ya da aksonu içerir. Nöronal hücre gövdesi boyandığı zaman, belirgin bir nükleolus ile birlikte büyük bir nükleus görülür. Sitoplazma; ATP oluşumu için gerekli sayısız mitokondriyi, serbest ribozomları ve protein sentezi yapan kaba endoplazmik retikulum ile yeni sentezlenen proteinleri değiştiren ve paketleyen Golgi aparatını içerir. Aksonun somayı terk ettiği kısmına akson tümseği denir. Aksonlar, ileti hızı lif çapına bağlı olmak üzere elektriksel impulsları iletir. İletim etkinliği myelin kılıf tarafından sağlanan iyi yalıtıma bağlıdır. Myelin kılıf aksonal membran ya da aksolemmayı örter. Myelin, esas olarak lipid ve proteinlerden oluşur ve periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri tarafından, merkezi sinir sisteminde ise oligodendrositler tarafından yapılır [41].

Sinir sistemi beyin ve omuriliği içeren merkezi sinir sistemi ile kraniyal ve spinal sinirleri ve bunların gangliyonlarını içeren periferik sinir sistemi şeklinde iki ana bölümden oluşur. Dura mater, araknoid mater ve pia mater olmak üzere üç membran hem omuriliği hem de beyni sarar [41]

Dura mater: Kollagen bağ dokusundan oluşmuş çok kalın ve sağlam bir zardır.
Araknoid mater: Örümcek ağı şeklinde, ince şeffaf bir zardır. Beyni torba gibi sarar. Altındaki pia mater ile arasında içi beyin omurilik sıvısı ile dolu belirli bir aralık vardır.
Pia mater: Çok damarlı, ince bir bağ dokusu zarıdır. Beynin yüzeyine sıkıca yapışıktır [42].

Beyinin his, irade, hafıza, düşünce, zeka, muhakeme, yaratıcılık gibi ruhsal fonksiyonlarını beyin korteksi yapar. Ayrıca iskelet kaslarının motor aktivitelerini idare eden motor merkezler ve duyuların idrak edilmesini sağlayan duyu merkezleri beyin korteksinde bulunur [43]. İnsan beynini diğer omurgalıların beyninden ayıran en önemli

özellik korteksin aşırı ölçüde geniş olmasıdır. Nörofizyolojinin uğraştığı önemli konulardan biri beyin korteksinin organizasyonunu aydınlatmak ve hafıza, his, hareket ve ifade kabiliyeti gibi davranışların beyin korteksiyle olan ilişkisini çözmektir [44].

Yetişkin bir insan beyni, yaklaşık 1350–1400 gram ağırlığındadır [45]. 28 x $10^9$ nöron ve aynı sayıda glia hücresi içeren beyin korteksinin alanı yaklaşık 2600 $m^2$'dir. Korteksin kalınlığı 3–4 mm aralığında değişmektedir [46].

Sinir hücrelerindeki göç beyinin çoğu bölgesinde meydana gelir. Fakat insanları da içine alan primatlarda özelikle serebral kortekste gözlenir [47]. Beyin korteksinin her kısmına impulslar gelmekte ve buralardan impulslar çıkarak başka yerlere gitmektedir. Buna göre, korteksin her bölgesi afferent yolların sonu ve efferent yolların başlangıcıdır [43].

Korteksteki nöronların aksonları ak maddeye geçerek aynı hemisferin değişik kısımlarına veya omurilik gibi çok daha uzakta bulunan korteks altı yapılara kadar uzayabilir. Kortekste bulunan bazı nöronlar korteksin dışına akson göndermezler. Yani, korteksteki nöronlar anatomik ve histolojik yönden farklılık gösterirler. Yapı ve şekil ayrılığına rağmen dağılımlarında düzenlilik görülür.

## 2.2. Epilepsi

Epilepsi ismi eski Yunancada Epi-lipsis (**επλαμßανειν-epilambanein)** kuşatmak, tutmak anlamına gelmektedir. Kelimenin birinci anlamı hastalığın şeytanların yakalaması sonucunda saldırı, atak hamle şeklinde oluşan bir kavram olduğu inancıdır. Bu kavram özellikle hastaların bilinçlerinin kaybolduğu vücutlarının sarsıldığı ve sanki başka biri tarafından kontrol ediliyormuşçasına hareket ettiği epileptik nöbetlerin tanımlanması için kullanılmıştır [48]. İkinci anlamı olan yakalanmak ise aniden oluşan nöbet ve sonrası olaylardan kaçma şansı vermeden yakalayan hastalık olarak yorumlanmıştır. Eski çağlarda epilepsi; Tanrı tarafından gönderilen tehlikesi büyük kötü ruhlarla bağlantılı bir hastalık olup kalbin hastalanması ve ters duruşu ile oluşan mukaddes bir hastalık gibi değerlendirilmiştir [49, 50]. Ülkemizde halk arasında sara, tutar, tutarık adları da kullanılmaktadır.

İlk kez Hipokrat tarafından bir beyin hastalığı olarak öngörülen epilepsi tıp terminolojisine ise İbn-i Sina tarafından sokulmuş ve ''Epileptik nöbet beyinden

kaynaklanır, duyuların kaybı ve düşme olur'' şeklinde tanımlanmıştır [51, 52]. Tarihte, nöbet olunca hastalara dönen ve parlayan bir çömleğe baktırma, ziftli kömür koklatma ve keçiboynuzu tütsüsü koklatma gibi işlemler uygulanmıştır.

Epilepsi terimi ilk defa 1874 yılında Jackson tarafından "epilepsi gri maddenin zaman zaman ortaya çıkan ani, aşırı hızlı ve lokal boşalımlarının adıdır." şeklinde tanımlanmıştır [53]. Klinik ayrımlarını yapmak güç olsa da bu tanım modern epileptik görüngüleri anlamanın temeli olarak kalmıştır. İlk kez 1920 yılında Hans Berger tarafından elektroensefalogram (EEG) kullanımı ile epileptik nöbetler anlaşılmaya başlanmıştır [54]. EEG ile epilepsi tipleri Grandmal, psikomotor, petitmal diye gruplandırılmıştır [55]. Lennox, elektroklinik sınıflama yaparak epileptik nöbetleri; petitmal triadı (saf petitmal, myoklonik, atonik), konvulsif triad (jeneralize, fokal, Jaksonien, temporal lob triadı (subjektif, tonik fokal, otonomik) olarak tanımlamıştır [56, 57].

Nöbetler ve epilepsi farklı bozukluklardır ve terminolojik açıdan alternatif olarak kullanılamazlar. Epilepsi için "nöbet hastalığı" olarak bahsedilmesine rağmen nöbetlerden epilepsi olarak bahsedilmesi doğru değildir. Nöbetler bulgudur, oysa epilepsi tekrarlayan nöbetlerle karakterize bir hastalıktır. Nöbetler nöronların anormal istemsiz, ritmik deşarjlarından kaynaklanan zaman sınırlı paroksismal belirtilerdir. Nöbetler istemsiz olaylardır. Hastalar genellikle nöbetlerin başlangıç ve bitişlerini kontrol edemezler. Nöbetler genellikle 5 dakikadan daha kısa sürmektedirler. Tüm nöbetler konvülsif olmadığı gibi tüm konvülsiyonlarda nöbet değildir. Konvulsiyonlar sürekli veya kesintili istemsiz kas kontraksiyonları ile giden ataklardır. Epilepsi konvulsiyonların belli bir paroksizm içinde tekrarlaması olayıdır. Epilepsinin varlığından söz edilebilmesi için en az iki nöbet geçirilmesi gerekir. Merkezi sinir sistemi dışından kaynaklanan birçok değişiklik (özellikle çocuklarda) epileptik nöbetleri uyarabilir [58, 59].

### 2.2.1. Epilepsi Nedenleri

Hipoksik iskemik ensefalopati, serebrovasküler hadiseler, beyin içine kanama ve infarkt, travma, ensefalit, menenjit, abse, intrauterin enfeksiyonlar, postnatal enfeksiyonlar, hiperamonyemi, hipoglisemi, hiperglisemi, hiponatremi, hipokalsemi, hipomagnezemi, selenyum eksikliği, glikojen depo hastalıkları, merkezi sinir sisteminin dejeneratif hastalıkları (Tay-Sachs, Seroid lipofusinozis vb), peroksizomal hastalıklar, metabolik hastalıklar, mitokondrial hastalıklar, piridoksin eksikliği, piridoksin bağımlılığı,

polimikrogri, heterotopiler, lisensefali, holoprosensefali, hidransefali, kortikal displaziler, annenin kullandığı ilaçların ani kesilmesine bağlı yenidoğanlarda görülen yoksunluk sendromu, idyopatik benign neonatal nöbetler, tubero sklerozis, incontinentia pigmenti, nörofibromatozis, intrakraniyal tümörler, porfiri, hipertansiyon, karaciğer yetmezliği, böbrek yetmezliği, toksinler, mesial temporal skleroz, ilaç tedavisinin kesilmesi epilepsiye neden olabilir [59-72].

### 2.2.2. Nöbetler ve Epileptik Sendromların Sınıflaması

Epileptik sendromlar; nöbet tipi, nöbet başlangıç yaşı, aile hikâyesi, fiziki inceleme, iktal, interiktal EEG ve görüntüleme tetkikleri gibi pek çok faktörle tanımlanır. Her epileptik sendromun kendine özel bir hikâye, prognoz ve tedavisi vardır. Epileptik sendromların terminolojisi ve tanımı sağlık personeli arasında hastalığı tanımada iletişimi kolaylaştırır; prognoz ve tedavide yol gösterici olabilir. Epileptik sendromlar, bir arada oluşan belirtiler ve semptomlar topluluğudur. Bu bulgu ve semptomlar nöbetin tipini, rekürrens sıklığını, nörolojik bulgularını ve nororadyolojik özelliklerini içerir. Bir sendromun birden çok nedeni ve değişik sonuçları olabilir. Bazı epileptik sendromlar ortak klinik-EEG bulgularını içermekle kalmaz, belirgin ortak seyir gösterir [62-68].

Epileptik nöbetlerin ilk sınıflandırması Uluslararası Epilepsiyle Savaşım Birliği (ILAE) tarafından 1969 yılında kabul edilmiştir [73]. 1969 ILAE sınıflaması altı kritere dayanır. Bunlar; nöbetin klinik tipi, EEG'nin interiktal ve iktal özellikleri, anatomik durum, etyoloji ve yaştır. 1969 ILAE sınıflandırması 1981 yılında yeniden düzenlenmiştir [74]. Son yıllarda epilepsi sınıflandırmasından çok epileptik sendromları şekillendirecek bir tablo yapmak için çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. ILAE, 1989 yılında epileptik sendromları bir arada toplayan uluslararası epilepsi ve epileptik sendrom sınıflaması ortaya çıkarmıştır [75].

**Epilepsi ve Epileptik Sendromların ILAE Sınıflaması (1989)**

1. Lokalizasyona bağlı (fokal, lokal, parsiyel) epilepsiler

A. İdiyopatik Epilepsiler:

B. Semptomatik Epilepsiler:

C. Kriptojenik Epilepsiler:

2. Jeneralize epilepsiler

A. İdiopatik Epilepsiler

B. Kriptojenik veya semptomatik

C. Semptomatik

C. 1. Nonspesifik etyoloji

C. 2. Spesifik etyoloji

3. Fokal veya jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsi ve sendromlar.

A. Hem generalize hem fokal nöbetler

B. Fokal veya generalize görünüşün belirgin olmadığı durumlar

4. Özel sendromlar

A. Duruma bağlı nöbetler

## 2.3. Deneysel Epilepsi Modelleri

Epilepsi çalışmalarında kullanılan deneysel model çeşidi oldukça fazladır. Bunun birkaç önemli nedeni vardır:

1. Modeli oluşturulacak klinik nöbetler çeşitlidir.
2. Modellerin hiçbirisi klinik epilepsiyle tamamen aynı değildir.
3. Çeşitli modellerden elde edilen sonuçların karşılaştırılarak test edilmesi gerekir.
4. Geliştirilen yeni metotlara ve yeni şartlara daha uygun yeni modeller oluşturulmaktadır.

İdeal bir epilepsi modeli aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

1. Spontan olarak tekrarlayan nöbetleri olmalıdır.
2. Nöbetler insan epilepsisindekine benzemelidir.
3. Modeldeki EEG'nin biçimi ilgili epilepsi çesidindekine benzemelidir.
4. Nöbetlerin frekansı, ilaçların etkisini akut veya kronik olarak test etmeye yetecek ölçüde olmalıdır.
5. Antiepileptik ilaçların farmakokinetigi insandakine benzer olmalıdır.
6. Antiepileptiklerin etkili olduklari plazma ve beyin seviyeleri, insanda ilgili nöbeti önleyen seviye kadar olmalıdır.

Bu kriterlerin tümünü karşılayan tek bir model şimdilik bilinmemektedir [76].

Epilepsinin mekanizmalarını ortaya koymak ve tedavisinde yeni yaklaşımlar sağlamak amacıyla deneysel epilepsi modelleri sınıflandırılmıştır [77];

1. Parsiyel epilepsi modelleri

a. Neokortikal

* Elektrik stimülasyonu (akut)
* Topikal konvülsan ilaç (penisilin, bikukulin, pikrotoksin, pentilentetrazol) uygulaması
* Parsiyel olarak izole edilmiş kortikal dilimler
* Dondurularak oluşturulan lezyonlar
* Metallerin (Alüminyum, kobalt, tungstik asit, demir klorür) topikal uygulanması
* Neokortikal kindling

b. Limbik

* Elektrik stimülasyonu (akut)
* Hipokampusta uzun süreli potansiyasyon (LTP)
* Topikal metal uygulaması
* İntraserebral veya sistemik kainik asit
* Amigdala veya hipokampal kindling
* Polikarpin modeli

2. Jeneralize epilepsi modelleri

a.Konvülsif modeller

* Maksimal elektroşok nöbetleri (MES)
* Maksimal pentilentetrazol nöbetleri
* Flurotil ile oluşturulan maksimal nöbet
* Maksimal odiyojenik nöbetler
* Kedi omuriliğinde posttetanik potansiyasyon
* İmmatür hayvanlara hipertemi uygulaması

b. Konvülsif olmayan “Petit mal” nöbetler

* Sistemik pentilentetrazol uygulaması
* Felin jeneralize penisilin epilepsi modeli
* İntraserebroventriküler opioid (enkefalin ve endorfin)
* Sistemik gamahidroksibütirant uygulaması
* THIP ( tetrahidroksiizooksosolopridin) modeli
* Subkortikal stimülasyon, lezyon veya konvülzan madde uygulamsı

* $CO_2$ kesilmesi nöbetleri
* Kedi omuriliğinin tekrarlayan stimülasyonları

3. Genetik modeller
**Papio papio babun* (bir maymun türü)
*Odiyojenik fare
*Genetik olarak epilepsiye eğilimli sıçan (GEPR)
*Nöbete eğilimli gerbil
*Diğer mutant fare modelleri (totering)
*Beagle suşu köpek
*Epileptik kuşlar
*Spontan diken-dalga deşarjlı sıçan modeli

**Penisilin Modeli:** Basit parsiyel nöbetlerle ilgili çalışmalarda topikal olarak en çok kullanılan konvulsan madde bir antibiyotik olan penisilindir. Penisilin sistemik olarak verildiğinde, sistemik fokal epilepsi ile jeneralize (petit mal) epilepsi modelleri oluşmaktadır. Penisilinin konvulsiv özelliği ilk kez Walker ve Johnson tarafından gözlenmiştir. Topikal penisilin modeli, epilepsinin nasıl yayıldığını araştırma bakımından da uygun bir metottur. Muhtemelen penisilin GABA'nın etkisini bloklayarak epileptiform aktiviteye sebep olmaktadır. Penisilin *in vitro* hipokampus dilimlerinde inhibitör postsinaptik potansiyelleri önler; asetilkolinin uyarıcı etkisini ve presinaptik uçlardan asetilkolin salgısını artırır. Penisilinin korteks dilimlerinden glutamat salgısını artırdığı da bildirilmiştir. Ayrıca, penisilinin parasinaptik yollardan ve kalsiyum üzerinden de etki ederek börst aktivitesine yol açabileceği tespit edilmiştir [76].

## 2.4. Elektroensefalogram (EEG)

Hans Berger 1929 yılında Siemens çift bobinli galvanometre (130 µV/cm duyarlılıkta) kullanarak fotoğraf kâğıdı üzerine üç dakikalık kayıt almıştır. Bu tarihten itibaren, EEG terimi Electro (beynin elektriksel aktivitesinin kaydedilmesinin karşılığı) Ensefalo (baştan orjinlenen sinyallerin ortaya çıkmasının karşılığı) ve Gram yada grafi (çizme yada yazmanın karşılığı) kelimelerinin kombine edilmesiyle oluşturulmuş olup beynin elektriksel nöral aktivitesini anlamak için kullanılır. İngiliz W. Gray Walter beyin anormalliklerin tanısında ve önemli klinik hastalıkları başlatan yavaş beyin aktivitesini

(delta dalgalar) keşfederek klinik elektroensefalogramın öncüsü olmuştur. EEG için diğer bir önemli öncülüğü Hallowel ve Pauline Davis ilk kez uyuyan insanda EEG kaydı alarak yapmışlardır [78].

Mikro ya da makro elektrotlar kullanılarak, beyin korteksinde nöron gruplarının davranışları kaydedilip gözlemlenebilir. Makro elektrotlarla yoğun hücre gruplarının toplam aktivitesi kaydedilirken, mikroelektrotlarla tek hücre davranışı kaydedilir. Kafatasının üzerinden, saçlı deriden beyin dalgalarının kaydedilmesine EEG adı verilir. EEG pek çok fizyolojik ve epilepsi gibi patalojik olay üzerinde araştırma yapmak için kullanılır [79].

1958 yılında, Elektroensefalografi ve Klinik Nörofizyoloji Uluslararası Federasyonu "10–20 elektrot yerleştirme sistemini" elektrot yerleştirmenin standardizasyonunu benimsemiştir. Bu sistem kafatası üzerine elektrotların yerlerinin belirtilmesi ve fiziksel yerleştirilmesini standart haline getirmiştir [78]. Bu sisteme göre baş dört standart nokta ile işaretlenmiştir. Bunlar burun (nasion), başın arka kısmı (inion), sol ve sağ kulak arkalarıdır (preauriculars). Elektrotlar nazyon ve inyon arasına % 10–20–20–20–20–10 olacak şekilde bölünerek yerleştirilir. Sistemin 10–20 sistemi olarak adlandırılmasının sebebi de buradan gelmektedir [80]. Genellikle uygulamada 19 elektrot kullanılmaktadır [81].

EEG üzerindeki her bir çizgi veya kanal, bir çift elektrodun altında kalan serebral korteks alanları arasında, zaman içinde ölçülen potansiyel farkını yansıtmaktadır. EEG sinapstaki membran potansiyellerinin toplamını (EPSP ve IPSP) kaydetmektedir. Potansiyellerin amplitüdü (genliği) senkron şekilde ateşlenen nöronların sayısını göstermektedir. Eksitatör-inhibitör postsinaptik potansiyel kompleksinin süresi, ritm frekansıyla; yani belirli bir zaman dilimindeki olayların sayısıyla gösterilmektedir. Frekans (sıklık), hertz (Hz) adı verilen birimlerle ifade edilir ve bir saniyede bir siklusa eşittir. EEG ağrısız ve zararsız bir inceleme yöntemidir. Saçlı deriden kaydedilen potansiyellerin çoğu piramidal hücrelerdeki toplam sinaptik potansiyellerin ekstraselüler akımlarla ilişkisinin sonucudur. Normalde çok zayıf olan bu elektriksel potansiyeller saçlı deri üzerine yerleştirilen elektrotlarca kaydedilir ve amplifikatörlerle güçlendirilir. Beyin dalgaları eksitatör ve inhibitör postsinaptik potansiyellerin (EPSP ve IPSP) cebirsel

toplamı sonucu arta kalan sinaptik aktivitenin senkronizasyonu yoluyla oluşur ve yüzeydeki kaydedici elektrot yardımıyla yazdırılır. Epileptik desarjlar EEG'nin aşırı senkronizasyonunu ifade eder [45].

### 2.5. Elektrokortikogram (ECoG)

Epilepsinin cerrahi tedavisinde beyin korteksinin yüzeyinden elektrotlarla direk olarak alınan elektriksel aktivitelere elektrokortikogram (ECoG) denilmektedir [82]. ECoG ile ilgili ilk çalışma 1929 yılında Hans Berger tarafından kafatası hasarı olan hastanın dura mater yüzeyine elektrotlar yerleştirerek kayıt almasıyla yapılmıştır. ECoG, epilepsinin cerrahisinde ameliyat sırasında hasarlı bölgeyi ve epileptogenik bölgenin sınırlarını belirlemek için kullanılmaktadır. ECoG ile interiktal epileptik bozukluğun dağılımının genellikle frontal, merkezi motor ve parietal bölgelerde olduğu belirlenmiştir. Ameliyathanede ECoG'la 16–21 kanallı elektroensefalografi kullanarak kâğıt üzerine kayıt yapılır. Kayıt elekrotları gümüş platin ya da paslanmaz çelik olmalı ve tam olarak korteks yüzeyine temas etmelidir. Sert olanlardan ziyade esnek olan elektrotlar tercih edilmelidir. Beyin dokusuna temas eden elektrot bölgesi top şeklinde olmalıdır [83].

### 2.6. Antioksidanlar

Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri temizleyerek, oksidasyonun teşvik etmiş olduğu zararları hücresel düzeyde engellemekte, dolayısıyla dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır. Antioksidanlar, iki grupta sınıflandırılırlar: enzimatik ve non-enzimatik. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx), non-enzimatik antioksidanlar ise vitamin E, vitamin C, vitamin A (a-karoten), fenolik bileşikler, selenyum, transferin ve laktoferrindir [84–86].

Fenolik bileşikler, benzenin hidroksi türevleri olan sekonder metabolitlerdir ve bitkilerde fazla miktarda bulunurlar. Fenollerin antioksidant etkileri de benzen halkasında hidroksi gruplarının bulunmasından kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavonoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında, özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar [86, 87].

**Üzüm Çekirdeği:** Vitaceae (asmagiller) familyasının üyelerinden olan üzüm (*Vitis* spp.)'de bulunan fenolik bileşiklerinden en önemlileri fenolik asitler, antosiyanidinler, flavonol glukozitleri, sinnamik asit türevleri, katesinler ve protoantosiyanidinlerdir [88]. GSE, proantosiyanin içeren doğal antioksidandır [23]. GSE en etkili antioksidan aktiviteye sahip benzer flavanoidlerin bir karışımıdır [24, 89, 90].

GSE serebral yaralanmalar esnasında sinirleri koruyucu etkiye sahiptir [20, 91-93]. Ayrıca, GSE'nin yapılan bir çalışmada; ratların omurilik, serebral korteks ve hipokampus da yaşlanma ile ilgili oksidatif DNA zararını inhibe ettiği gözlenmiştir [23]. Yüksek dozlarda üzüm çekirdeği proantosiyanin özütü, NO'in sebep olduğu oksidatif stresi artırarak sitotoksiteyi uyardığı belirlenmiştir [16].

## 2.7. Nitrik Oksit

Nitrik Oksit molekül ağırlığı 30, kaynama noktası −151ºC olan, hem yağda hem suda çözünebilme yeteneği ve üzerinde yük taşımaması ve çiftleşmemiş elektron bulundurmasıyla biyolojik membranlardan hiçbir bariyerle karşılaşmadan çok rahat geçebilen renksiz bir gazdır. Havdaki NO, kısa sürede $O_2$'le oksitlenerek nitrojen dioksit'e dönüşür. Nitrojen dioksit dokular için oldukça zararlı bir bileşiktir. Serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol alır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır [94–96].

NO memelilerde nöron, endotel ve makrofaj gibi farklı hücre tiplerinde NOS olarak adlandırılan üç izoenzim ailesi tarafından sentezlenir. Nöronlarda bulunan nNOS, damarların endotelyal hücrelerinde bulunan eNOS yapısal olarak üretilir ve yapısal nitrik oksit (cNOS) olarak isimlendirilirler. cNOS, hücre içinde sürekli bir şekilde var olan ve vasküler tonus ile nöronal aşırım için aralıklarla ve küçük miktarlarda NO üretir. cNOS, kofaktör olarak $Ca^{+2}$ / kalmoduline bağımlı olup intraselüler $Ca^{+2}$ düzeyini yükselten agonistlerle aktive edebilir. $Ca^{+2}$'un yükselmesi kalmodulinin NOS'a bağlanmasını uyarır ve süratli bir şekilde pikomolar düzeylerde NO sentezlenir. Makrofajlar indüklenebilen, $Ca^{+2}$'dan bağımsız ve sitokinler etkisiyle üretilebilen iNOS içermektedir. Bu üç izoenzim,

moleküler oksijen ve NADPH'yı ko-substrat gibi kullanarak L-arjininden NO üretir. NO, bütün vücudun organ ve dokuların da fonksiyonel düzenlenmelere katılır [25, 97, 98].

L-arjininden NO oluşumu, N-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N-nitro-L-arjinin metal ester (L-NAME), N-nitro-L-arjinin (L-NA), N-amino-Larjinin (L-NAA) ve N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) tarafınfan inhibe edilir [97, 98]. Fizyolojik olarak NO, hedef hücrede yapısında hem içeren guanilat siklazın (GC) aktif merkezine bağlanır ve hem demirinin porfirin halka düzleminin dışına çekilmesiyle enzimi aktifler. Aktif guanilat siklaz, siklik guanozin monofosfatı (cGMP) oluşturan reaksiyonu katalizler ve bir ikinci haberci olan cGMP'nin miktarı artar. Nitrik oksit etkisiyle artan cGMP, protein kinazları, fosfodiesterazları ve iyon kanallarını etkiler [99-102]. NO'nun ayrıca cGMP'ye bağlı yoldan başka, cGMP'den bağımsız olarak nöronal fonksiyonları düzenlediği düşünülmektedir. İkinci mekanizma NO tarafından reseptörlerin düzenlenmesi ve onun toksik etkileriyle ilgilidir. NO'nun cGMP'den bağımsız mekanizması nitrosilasyona yol açan proteinler ile doğrudan reaksiyonunu ve peroksinitrit oluşumu sebebiyle süperoksit ile NO'nun reaksiyonunu kapsar. Kortikal nöronlardaki NO kısa bir süre için uyarılabilirliği artırarak cGMP'den bağımsız GABA aracılıklı $Cl^-$ akımını azaltır [25].

NO, hücre içi cGMP seviyesini artırması, kalsiyum homeostasini değiştirmesi, protein fosforilasyonuna sebep olması ve G protein ribozilasyonuna sebep olması gibi dört farklı yolla sinaptik iletiye etkisi gösterebilir. NO muhtemelen lokal nöron devrelerinde glutamat ve diğer uyarıcı nörotransmitterlerin salgılanmasını artırarak eksitatör etki göstermektedir. Diğer taraftan, NO, negatif geribesleme yoluyla NMDA reseptörlerinde duyarsızlığa ve inhibitör transmitter salınmasına yol açarak duraklatıcı etki gösterebilir [102].

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan 98 adet albino erkek Wistar sıçan, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış ve 22 ± 4° C'lik oda sıcaklığında, ortalama ağırlıkları 225–260 g arasında 80–100 günlük olana kadar yetiştirilmiştir. Deneysel çalışmalar başlamadan 10 gün önce araştırma merkezinden alınan hayvanlar üçerli gruplar halinde saydam plastik kafeslere konularak Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Beyin Araştırma Laboratuarına nakledilmiştir. Cihaz alımının gerçekleştirilmesi ve laboratuarın kurulması sonucu deneylerin bir kısmı laboratuarımızda gerçekleştirilmiştir.

## 3.2. Kimyasal Maddeler ve Uygulanış Şekilleri

### 3.2.1. Penisilin G Potasyum

Moleküler ağırlığı 372,48 gr/mol ve moleküler formülü $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$ olan penisilin (4-Tia-1-azabisiklo (3.2.0) heptan-2-karboksilik asit, 3,3-dimetil-7-okso-6-(2-fenilasetamid)), hücre duvarı mukopeptidinin biyosentezini inhibe etmek suretiyle etkisini gösterir. Epileptiform aktiviteyi başlatma etkisi, yapısal olarak bikukuline benzerliğinden kaynaklanmaktadır. GABA reseptörleri üzerindeki bikukulinin bağlanma bölgesine tutunan penisilin bu reseptörleri inhibe etmek suretiyle eksitabiliteyi artırmakta ve epileptiform aktiviteye neden olmaktadır [25].

Sunulan çalışmada penisilin, epileptiform aktivite oluşturmak üzere 500 ünite (IU) doz ve 2,5 µl hacimde intrakortikal (i.c.) yoldan uygulandı. Sol beyin korteksine, Bregma'dan 3 mm lateral, 2 mm posteriyor ve 2 mm ventral koordinatlarda Hamilton mikroenjektörü kullanılarak verildi (penisilinin infüzyon hızı; 0,5 µl/dk).

### 3.2.2. L-arjinin

Moleküler ağırlığı 174,2 g/mol ve moleküler formülü $C_6H_{14}N_4O_2$ olan L-arjinin, doğada çok yaygın olarak bulunan esansiyel olmayan bir amino asittir. Karaciğer dışı dokularda

ornitinden dönüştürülerek elde edilebilir. Arjinin yıkılması büyük ölçüde üre sentezi sırasında görülen son reaksiyonla gerçekleşir. Bu reaksiyonda arjinin üre ve ornitine dönüşür ve bu sırada hem üre sentezi hem de arjinin katabolizması gerçekleşir [37].

Serum fizyolojikte (SF) çözülen L-arjinin, epileptiform aktivite başladıktan 30 dakika sonra hayvan başına 500 mg/kg doz olacak şekilde intraperitonal (i.p.) olarak uygulandı.

### 3.2.3. L-NAME

Moleküler ağırlığı 269,69 gr/mol ve moleküler formülü $C_7H_{15}N_5O_4 \cdot HCl$ olan L-NAME ($N_\omega$-nitro-L-arjinin metil ester hidroklorid), NO üretimini engelleyen bir arjinin analoğudur. NOS enzimlerinin tamamını etkileyerek NO üretimini engelleyen nonspesifik bir antagonisttir [25].

SF'de çözülen L-NAME, epileptiform aktivite başladıktan 30 dakika sonra hayvan başına 60 mg/kg doz olacak şekilde i.p. olarak uygulandı.

### 3.2.4. 7-Nitroindazol (7NI)

Moleküler ağırlığı 163,1335 gr/mol ve moleküler formülü $C_7H_5N_3O_2$ olan 7NI , nNOS'un seçici inhibitörüdür [39,103].

7-Nitroindazol 3:7 hacim:hacim oranında dimetilsülfoksid (DMSO) / SF'de çözüldükten sonra epileptiform aktivite başladıktan 30 dakika sonra hayvan başına 40 mg/kg doz olacak şekilde i.p. olarak uygulandı.

### 3.2.5. Aminoguanidin (AG)

Moleküler ağırlığı 74,09 gr/mol ve moleküler formülü $CH_6N_4$ olan AG, iNOS'un inhibitörüdür [38]. AG, SF'de çözüldükten sonra 60 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarda i.p. yoldan uygulandı.

### 3.2.6. Üzüm Çekirdeği Özütü (GSE)

Çalışmada kullanılan GSE, Solgar® Vitamin (Solgar Co., Türkiye)'den temin edilmiştir ve % 95'i monomerik polifenol, sitrik, gallik ve malik asidi içeren oligomerik proantosiyanidinlerden oluşmaktadır. 100 mg GSE, 4 ml distile suda çözüldü. Etkin doz belirleme çalışmaları için epileptiform aktivite başladıktan 30 dakika sonra 50, 100, 200,

400 mg/kg uygulamaları gerçekleştirildi. Ayrıca, belirlenen GSE etkin dozunun diğer kimyasal maddeler ile etkileşimlerini incelemek için i.p. yoldan uygulamaları gerçekleştirildi.

### 3.3. Deney Grupları

GSE ile epilepsi arasındaki ilişkiyi göstermek ve NO agonist ve antagonistleriyle etkileşimini araştırmak için aşağıdaki deney grupları oluşturuldu:

1. Grup Kontrol grubu (n=7 ); Herhangi bir madde verilmeden 2 saat kayıt alındı.
2. Grup Suni beyin-omurilik sıvısı (Artificial cerebrospinal fluid (aCSF)) grubu (n=7): aCSF 2.5 µl, i.c. yoldan verilerek 2 saat kayıt alındı.
3. Grup Penisilin (500 IU ) grubu (n=7); 500 IU (2,5 µl i.c) penisilin uygulandıktan sonra 2 saat kayıt alındı.
4. Grup Penisilin + 50 mg/kg GSE grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 50 mg/kg GSE i.p. yoldan verilerek 2 saat kayıt alındı.
5. Grup Penisilin + 100 mg/kg GSE grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 100 mg/kg GSE i.p. yoldan verilerek 2 saat kayıt alındı.
6. Grup Penisilin + 200 mg/kg GSE grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 200 mg/kg GSE i.p. yoldan verilerek 2 saat kayıt alındı.
7. Grup Penisilin + 400 mg/kg GSE grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 400 mg/kg GSE i.p. yoldan verilerek 2 saat kayıt alındı.
8. Grup Penisilin + 800 mg/kg GSE grubu (n=7) (Bu grup etkin doz belirlendiği ve 400 mg/kg doz etkisiz olduğundan doz yükseltmesi yapılmamıştır.)
9. Grup Penisilin + 60 mg/kg aminoguanidin grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 60 mg/kg aminoguanidin i.p., yoldan uygulanarak 2 saat kayıt alındı.
10. Grup Penisilin + 100 mg/kg aminoguanidin grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 100 mg/kg aminoguanidin i.p. yoldan uygulanarak 2 saat kayıt alındı.
11. Grup Penisilin + etkin doz GSE grubu + 500 mg/kg L-arjinin grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 500 mg/kg L-arjinin i.p., L-arjininden 10 dakika sonra 200 mg/kg GSE i.p. yoldan uygulanarak 2 saat kayıt alındı.

12. Grup Penisilin + etkin doz GSE grubu + 60 mg/kg L-NAME grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 60 mg/kg L-NAME i.p., L-NAME'den 10 dakika sonra 200 mg/kg GSE i.p. yoldan uygulanarak 2 saat kayıt alındı.

13. Grup Penisilin + etkin doz GSE grubu + 40 mg/kg 7-Nitroindazol grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 40 mg/kg 7-Nitroindazol i.p., 7NI'den 10 dakika sonra 200 mg/kg GSE i.p. yoldan uygulanarak 2 saat kayıt alındı.

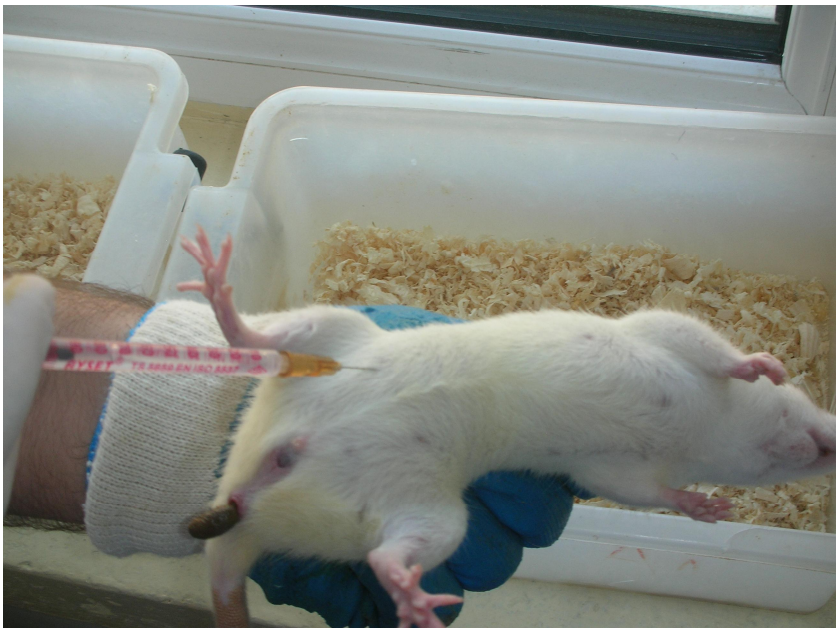
14. Grup Penisilin + 60 mg/kg aminoguanidin + etkin doz GSE grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 200 mg/kg GSE i.p., GSE'den 10 dakika sonra 60 mg/kg aminoguanidin i.p. yoldan uygulanarak 2 saat kayıt alındı.

15. Grup Penisilin + 500 mg/kg L-arjinin + 60 mg/kg aminoguanidin + etkin doz GSE grubu (n=7); 500 IU penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra 500 mg/kg L-arjinin i.p., L-arjininden 5 dakika sonra 60 mg/kg aminoguanidin i.p. aminoguanidin'den 5 dakika sonra 200 mg/kg GSE i.p. yoldan uygulanarak 2 saat kayıt alındı.

### 3.4. Cerrahi İşlem

Deneylere başlamadan 24 saat önce aç bırakılan sıçanların ağırlıkları belirlenerek 1,25 gr/kg üretan i.p. yoldan verilerek anesteziye alındı ve kulaklarının arkalarına kadar başlarının üst kısmındaki kılların tıraşları yapıldı (Şekil 3.1).

Sıçanların tıraşları yapıldıktan sonra operasyon masasına sabitlendi. Hayvanların kafa derisi rostro-kaudal doğrultuda, bir bistüri ile yaklaşık 3 cm uzunluğunda açıldı. Kafa derisi altındaki yumuşak dokuda oluşabilecek kanamalar elektrokoter vasıtasıyla önlendi. Sol korteks üzerindeki yumuşak doku uzaklaştırıldıktan sonra kafatası bir tur motoru ile dairesel hareketler yaparak inceltildi ve kafatası kemiği uzaklaştırıldı. Tur motoru kullanırken oluşacak sürtünmeden meydana gelebilecek ısınmayı engellemek için belirli aralıklarla spanç yardımıyla serum fizyolojik tampon uygulandı. Kafatası kemiğinde oluşabilecek küçük kanamalar bonewax (kemik mumu) sürülerek önlendi (Şekil 3.2).



A

B

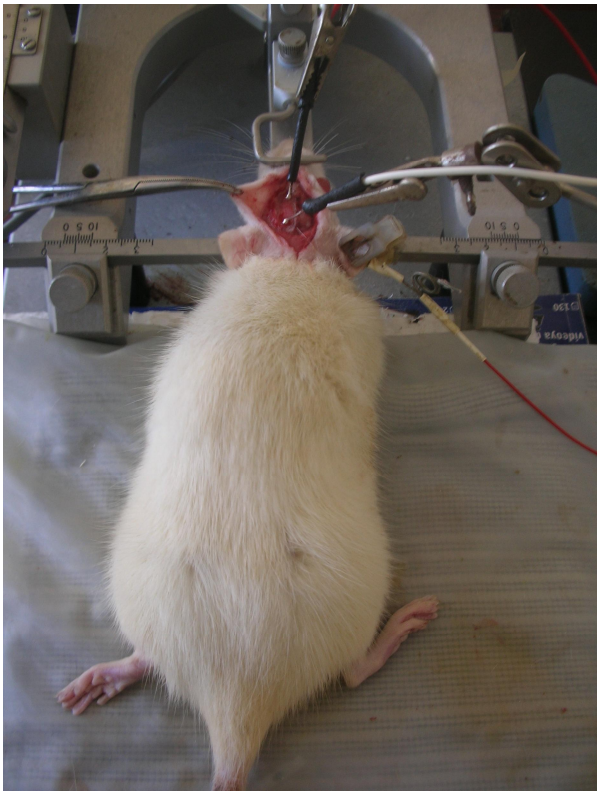
Şekil 3.1. A) Hayvanlara intraperitonal yolla üretan verilmesi,
B) Hayvanların tıraş edilmesi

Şekil 3.2. Hayvanların kafatası kemiğinin beyin korteksine kadar açılması.

### 3.5. Elektrofizyolojik Kayıtlar

Korteks açığa çıkarıldıktan sonra hayvanlar stereotaksik cihaza sabitlendi. Beyin ve diğer dokulardan sıvı kaybının önlenmesi, ısının muhafaza edilmesi ve parazit kayıtların önlenmesi amacıyla hayvanların kafa derisi 4 köşeden makaslar kullanılarak 37 °C' lik sıvı vazelin havuzu oluşturuldu. Deney anında hayvanların vücut sıcaklığını 37 °C'de sabit tutabilmek için homeotermik bir battaniye (Harvard Instrument) kullanıldı. Elektrofizyolojik kayıt için 2 adet Ag/AgCl top elektrot kullanıldı. Top elektrotlardan pozitif olanı Bregmanın 1 mm anterior, sagital sütürün 2 mm lateraline, negatif olanı ise Bregmanın 5 mm posterior, sagital sütürün 2 mm lateraline yerleştirildi. Topraklama için 1 adet Ag/AgCl klemp elektrot kayıt jeli sürülerek sağ kulak kepçesine sabitlendi (Şekil 3.3 ve 3.4).

Şekil 3.3. Hayvanların beyin korteksine iki adet Ag/AgCl top elektrot ve sağ kulak kepçesine referans elektrot yerleştirilmesi.



Şekil 3.4. Sol korteksi açılmış hayvanın kayıt anındaki görüntüsü.

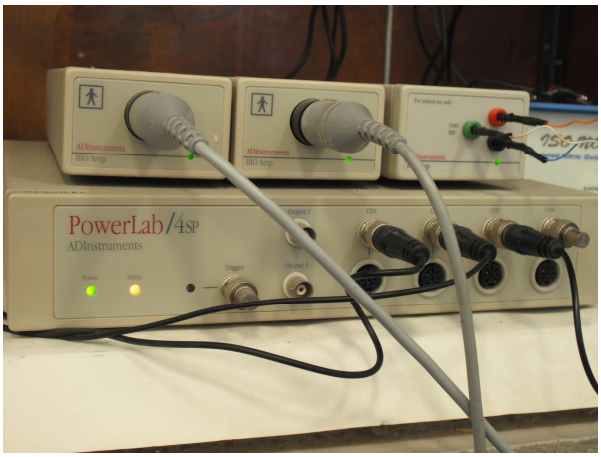
Elektrotlar ile alınan aktivite BioAmp (ADInstruments, Avustralya) arabiriminde yükseltilerek PowerLab 4/SP (ADInstruments, Avustralya) veri kazanım ünitesine anında

aktarıldı. PowerLab ile korteksten elde edilen analog sinyaller sayısal hale dönüştürüldükten sonra bilgisayara aktarıldı. Beyin aktivitesi Chart v5.1 (ADInstruments, Avustralya) yazılımı ile görüntülenerek deney sonrası analiz için bilgisayara kaydedildi (Şekil 3.5 ve 3.6). İntrakortikal enjeksiyonların hepsi, Bregma noktasından 3 mm lateral, 2 mm posteriyor ve 1 mm ventrale bir Hamilton mikroenjektör ile yapıldı. Enjeksiyon sırasında enjektör ucunun damarı zedelememesine dikkat edildi.

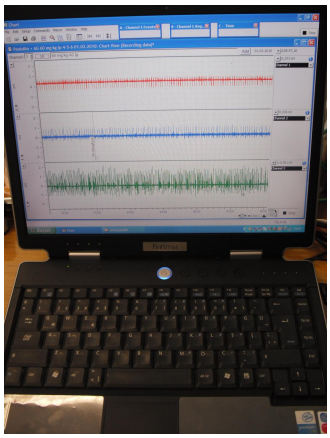
### 3.6. İstatistiksel Analiz

Bilgisayara kaydedilen elektrofizyolojik kayıtlar Chart v5.1 (ADInstruments, Avustralya) yazılımı ve bu yazılımın makro özellikleri sayesinde birer dakikalık bölümlere ayrıldı. Her bir dakika başına düşen spike sayısı ve spike'ların ortalama amplitüdleri (peak-to-peak) bu yazılımın özellikleri sayesinde otomatik olarak hesaplatıldı (Şekil 3.7). Deneyde kullanılan tüm hayvanlardan elde edilen kayıtlar için bu hesaplama teker teker yapıldı. Elektrofizyolojik kayıtların tamamı rakamsal verilere dönüştürüldü ve SPSS v12.0 yazılımından yararlanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Deney grupları üç ayrı karşılaştırma için gruplandırıldı. Kontrol grubu ile GSE doz grupları, kontrol grubu ile aminoguanidin grupları ve kontrol grubu ile GSE-NO etkileşim grupları ayrı ayrı istatistiksel olarak analiz edildi. Elde edilen veriler normal dağılıma uyduğu için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Varyans analizi sonucunda gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptandı ve grup varyanslarının heterojen oldukları görüldü bunun için farkın nereden kaynaklandığını saptamak maksadıyla bir Post Hoc testi olan Tamhane kullanıldı. Grafik ve metin içerisinde kullanılan deney gruplarına ait değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Testlerden elde edilen sonuçlara göre *p* değeri 0.05'in altında olan değişmeler anlamlı kabul edildi.

A



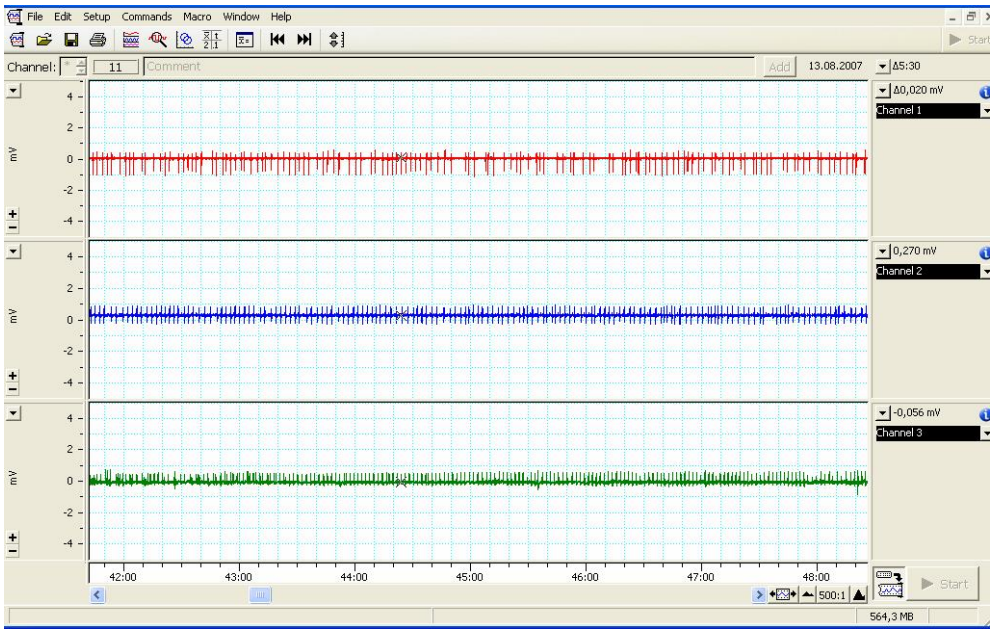

B



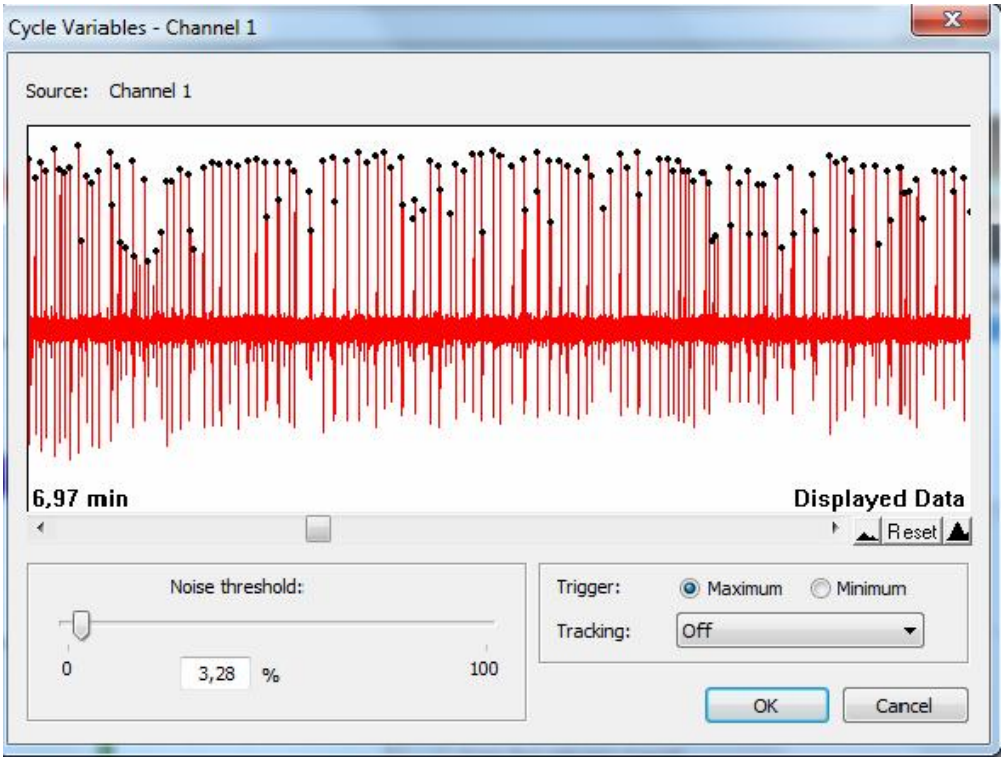
C

D

Şekil 3.5. Elektrofizyolojik kayıt düzeneği; A) Hayvanların sterotaksik cihaza yerleştirilmesi, B) Power Lab 4/SP, C) Verilerin bilgisayara aktarılması, D) Kayıt esnasında hayvanların vücut ısılarını 37 °C'de sabit tutabilmek için kullanılan homeotermik battaniye.




Şekil 3.6. Elektrofizyolojik kayıt için kullanılan paket program ve kayıt anından bir görüntü.




Şekil 3.7. Elipeptik aktivite de spike frekansı ve amplitüdün hesaplanmasında kullanılan kayıt programının işlem penceresi görüntüsü. Nokta bulunan diken dalgalar hesaplamada kullanılanları göstermektedir.

# 4. BULGULAR

Sunulan çalışmanın ilk bölümünde penisilin ile oluşturulan epileptiform aktivitede GSE'nin farklı dozları uygulanarak etkin doz belirlendi; ikinci bölümde ise GSE'nin NO agonist ve antagonistleriyle etkileşimi incelendi.

## 4.1. Penisilinle Uyarılan Epileptiform Aktivitenin İncelenmesi

Epileptiform aktiviteyi başlatmak için 500 IU penisilin i.c. yoldan korteks içine enjekte edildi. Enjeksiyondan sonraki 2–4 dakika içinde epileptiform aktivite başladı. Spike frekansı ve amplitütüdü 30 dakikada kararlı bir düzeye ulaştı ve yaklaşık 4 saat sürdü. Kararlı düzeyde ortalama spike frekansı 29±2 spike/dk., amplitüdü ise 1,007±193 µV olarak belirlendi (Şekil 4.1-B).

## 4.2. Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi

### 4.2.1. 50 mg/kg Dozda Uygulanan Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi

Penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra GSE 50 mg/kg dozda i.p. yoldan enjekte edildi. Enjeksiyon yapıldıktan 80 dakika sonra epileptiform aktivitenin ortalama frekansında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma oldu ($p<0.05$, Şekil 4.1-C ve Şekil 4.2). Sekseninci dakikada ortalama frekansın değişiminin % 49.03 olduğu belirlendi (Şekil 4.2). Bu gruptaki ortalama amplitüd (960±69 µV) ile kontrol grubu (1,007±193 µV) karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edildi ($p>0.05$, Şekil 4.1-C ve Tablo 4.2). GSE'nin 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarının uygulanmasından sonraki her 30 dakikada tespit edilen spike frekansı değerleri de Tablo 4.1'de görülmektedir.

### 4.2.2. 100 mg/kg Dozda Uygulanan Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi

Penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra GSE 100 mg/kg dozda i.p. yoldan enjekte edildi. Enjeksiyon yapıldıktan sonra 40 dakika sonra epileptiform aktivitenin ortalama frekansında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma oldu ($p<0.05$, Şekil 4.1-D ve Şekil 4.2). Kırkıncı dakikada ortalama frekansın değişiminin % 44.06 olduğu belirlendi (Şekil

4.2). Bu grup ile kontrol grubunun (1,007±193 µV) ortalama amplitüdü (980±78 µV) arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$, Şekil 4.1-D ve Tablo 4.2).

### 4.2.3. 200 mg/kg Dozda Uygulanan Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi

Penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra GSE 200 mg/kg dozda i.p. yoldan enjekte edildi. Enjeksiyon yapıldıktan 20 dakika sonra epileptiform aktivitenin ortalama frekansında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma oldu ($p<0.05$, Şekil 4.1-E ve Şekil 4.2). Yirminci dakikada ortalama frekansın değişiminin % 36.21 olduğu belirlendi (Şekil 4.2). Bu grubun ortalama amplitüdü (750±85 µV) ile kontrol grubu (1,007±193 µV) karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edildi ($p>0.05$, Şekil 4.1-E ve Tablo 4.2). 200 mg/kg GSE'nin antikonvulsan etkiyi gösteren en etkili ve bu etkiyi en erken ortaya çıkaran doz olduğu tespit edildi.

### 4.2.4. 400 mg/kg Dozda Uygulanan Üzüm Çekirdeği Özütünün Epileptiform Aktiviteye Etkisi

Penisilin uygulandıktan 30 dakika sonra GSE 400 mg/kg dozda i.p. yoldan enjekte edildi. Enjeksiyon yapılmasından deney sonuna kadar epileptiform aktivitenin ne frekansında ne de amplitüdünde kontrol grubuna (ortalama spike frekansı 29±2 spike/dk., amplitüdü ise 1,007±193 µV) göre önemli bir değişikliğe neden olmadı ($p>0.05$, Şekil 4.1-F, Şekil 4.2). GSE'nin 400 mg/kg i.p. enjeksiyonundan 90 dakika sonra epileptiform aktivitede ortalama spike frekansının 30.50±5.6 spike/dk, ortalama amplitüdün 983±144 olduğu bulundu (Tablo 4.2).

## 4.3. Nitrik Oksit Agonist ve Antagonistlerinin Epileptiform Aktiviteye Etkisinin İncelenmesi

### 4.3.1. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörü Aminoguanidin'in Epileptiform Aktiviteye Etkisi

Seçici indüklenebilir NOS inhibitörünün rolünü değerlendirmek için iki farklı aminoguanidin dozu (60, 100 mg/kg, i.p.) kullanıldı. 500 IU penisilin i.c. yoldan

uygulandıktan 30 dakika sonra AG'nin 60 ve 100 mg/kg (i.p.) dozlarının enjeksiyonu yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 60 mg/kg AG'nin 60. dakikadan itibaren ($p<0.001$) ve 100 mg/kg AG'nin 70 dakikadan itibaren ($p<0.05$) epileptiform aktivitenin frekansını anlamlı düzeyde azalttığı (Şekil 4.1-G-H, Şekil 4.3), amplitüdünü ise değiştirmediği belirlendi ($p>0.05$, Şekil 4.1-G-H). En iyi ve erken etki AG'nin 60 mg/kg dozunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.1-G, Şekil 4.3).

AG'nin 60 mg/kg i.p. enjeksiyonundan 60 dakika sonra epileptiform aktivitede ortalama spike frekansının 25.6±10.4 spike/dk, ortalama amplitüdün 800±80 µV, AG'nin 100 mg/kg i.p. enjeksiyonundan 70 dakika sonra epileptiform aktivitede ortalama spike frekansının 22.5±6 spike/dk, ortalama amplitüdün 786±78 µV olduğu bulundu.

### 4.3.2. Üzüm Çekirdeği Özütünün Nitrik Oksit Agonist ve Antagonistleri ile Etkileşimlerinin Epileptiform Aktiviteye Etkisi

#### 4.3.2.1. Üzüm Çekirdeği Özütü + L-arjinin Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi

500 IU penisilin i.c. yoldan uygulandıktan 30 dakika sonra 500 mg/kg L-arjinin i.p., L-arjininden 10 dakika sonra 200 mg/kg GSE (i.p.) enjekte edildi. L-arjinin + GSE varlığında 50. dakikada epileptiform aktivitenin ortalama frekansında (23.5±5.8 spike/dk) kontrol grubuna göre (26.7±1.8 spike/dk) anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0.05$, Şekil 4.1-M, Şekil 4.4 ve Tablo 4.3). Ortalama amplitüdde (1150±239 µV) kontrol (920±153 µV) grubuna göre önemli bir değişme olmadı ($p>0.05$, Şekil 4.4 ve Tablo 4.4). GSE'nin enjeksiyonundan 80 dakika sonra epileptiform aktivitede ortalama spike frekansı 11.0±2.9, spike/dk, ortalama amplitüd 787±59, µV'dur (Şekil 4.1-M).

Tablo 4.1. Sıçanlarda penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin frekansı üzerine farklı dozlardaki üzüm çekirdeği özütünün her 30 dakikadaki etkisi.

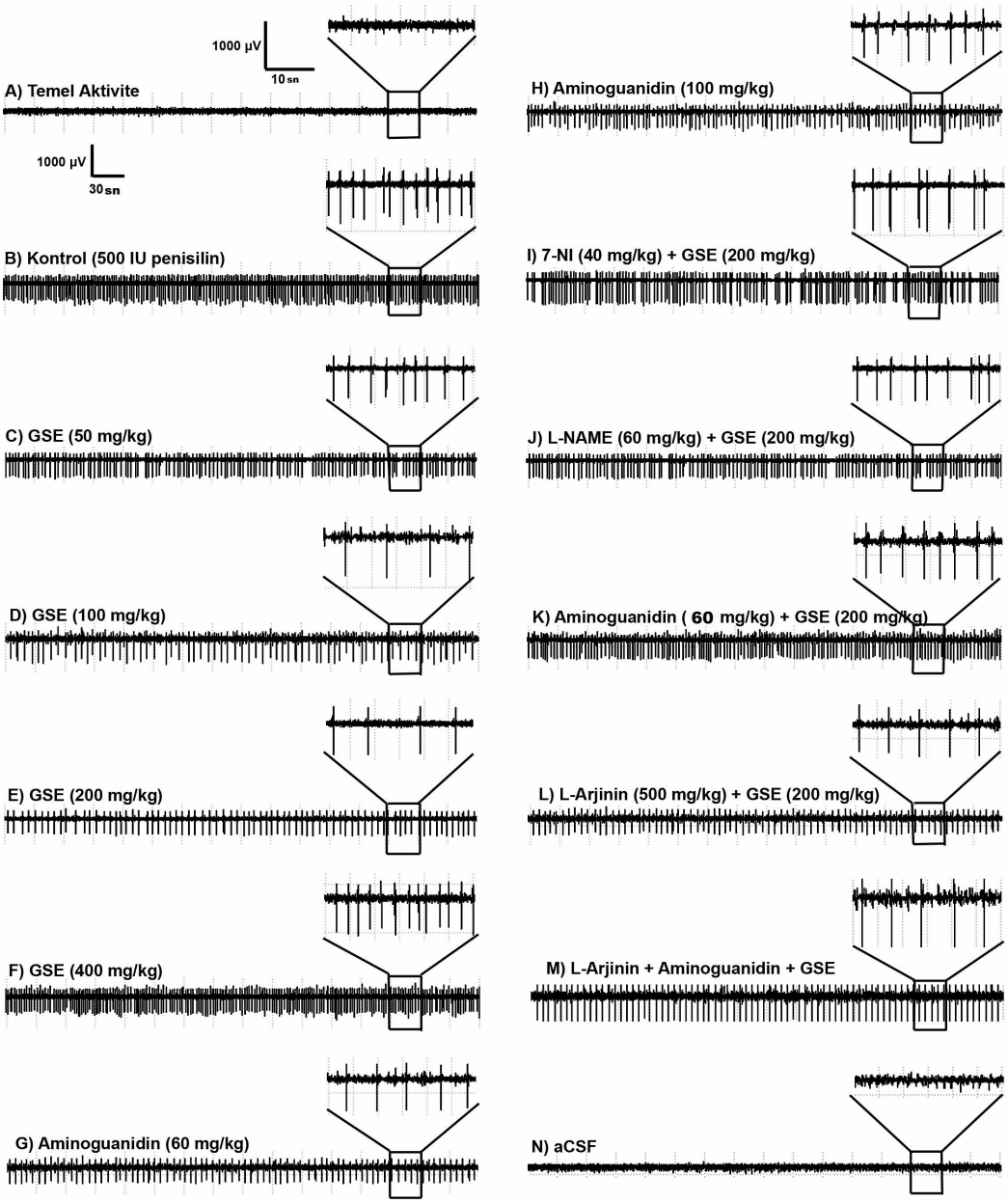
Ortalama frekans (spike / dk)

| **Gruplar** | **30. dk** | **60. dk** | **90. dk** | **120. dk** | **150. dk** |
|---|---|---|---|---|---|
| Kontrol grubu | 26.76±1.8 | 28.23±2.5 | 30,43±2.6 | 31.56±3.3 | 30.78±1.1 |
| 50 mg/kg GSE | 34.80±7.1 | 25.20±4.6 | 20,60±6.2 | 15.4±4.8 | 12±3.8 |
| 100 mg/kg GSE | 22±5.7 | 13.50±3.1 | 10,83±2.2 | 10.33±2.7 | 9.33±2,2 |
| 200 mg/kg GSE | 26.83±4.4 | 18.66±3.9 | 15,33±3.9 | 12.33±3.8 | 13.33±3.3 |
| 400 mg/kg GSE | 37.83±3.1 | 36.16±3.8 | 30.50±5.6 | 26±7.1 | 24±6.6 |

Tablo 4.2. Sıçanlarda penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin amplitüd üzerine farklı dozlardaki üzüm çekirdeği özütünün her 30 dakikadaki etkisi.

Ortalama amplitüd (µV)

| **Gruplar** | **30. dk** | **60. dk** | **90. dk** | **120. dk** | **150. dk** |
|---|---|---|---|---|---|
| Kontrol grubu | 940±178 | 880±166 | 900±177 | 880±127 | 920±157 |
| 50 mg/kg GSE | 800±100 | 700±68 | 640±66 | 600±57 | 620±54 |
| 100 mg/kg GSE | 850±111 | 850±95 | 700±77 | 666±162 | 700±182 |
| 200 mg/kg GSE | 783±107 | 666±111 | 700±106 | 650±92 | 650±92 |
| 400 mg/kg GSE | 916±107 | 1000±121 | 983±144 | 1083±149 | 950±140 |




Şekil 4.1. **A)** Kortekse herhangi bir madde enjekte edilmeden önceki bazal ECoG aktivite, **B)** penisilinin 500 IU i.c. enjeksiyonu ile epileptiform aktivitenin başlaması, **C)** 50 mg/kg GSE i.p. enjeksiyonu sonrasında 80. dakika da epileptiform aktivitede amplitü değişmeksizin ortalama frekansın önemli derecede azalması **D)** 100 mg/kg GSE i.p. enjeksiyonu sonrasında 40. dakika da epileptiform aktivitede amplitü değişmeksizin ortalama frekansın önemli derecede azalması, **E)** 200 mg/kg GSE i.p. enjeksiyonu sonrasında 20 dakika da epileptiform aktivitede amplitü değişmeksizin ortalama frekansın önemli derecede azalması, **F)** 400 mg/kg GSE i.p. enjeksiyonu sonrası epileptiform aktivitede ne ortalama frekans ne de amplitü değişmemesi, **G)** 60 mg/kg AG i.p. enjeksiyonu sonrasında 60 dakika da epileptiform aktivitede amplitüdü değişmeksizin ortalama frekansın önemli derecede azalması, **H)** 100 mg/kg AG i.p. enjeksiyonu sonrasında 70 dakika da epileptiform aktivitede amplitüdü değişmeksizin

ortalama frekansın önemli derecede azalması, **I)** 7-NI + GSE ve **J)** L-NAME + GSE gruplarında 90 dakika da epileptiform aktivitede amplitüdü değişmeksizin ortalama frekansın önemli derecede azalması, **K)** AG (60 mg/kg) + GSE grubunda, AG GSE'nin antikonvulsan etkisini tersine çevirmesi, **L)** L-arjinin + GSE grubunda 50 dakika da epileptiform aktivitede amplitüdün değişmeksizin ortalama frekansın önemli derecede azalması, **M)** L-arjinin + AG (60 mg/kg) + GSE grubunda, L-arjinin epileptiform aktivitede GSE'nin antikonvulsan etkisinde AG'nin etkisini durdurması, **N)** DMSO i.p. ve SF i.c. enjeksiyonu (2.5 µl) ile epileptitiform aktivitede frekans ve amplitüdün değişmemesi.

#### 4.3.2.2. Üzüm Çekirdeği Özütü + L-NAME Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi

500 IU penisilin i.c. yoldan uygulandıktan 30 dakika sonra 60 mg/kg L-NAME (i.p.), L-NAME'den 10 dakika sonra 200 mg/kg GSE (i.p.) enjekte edildi. L-NAME + GSE nin varlığında 90. dakikadan itibaren deney sonuna kadar epileptiform aktivitenin ortalama frekansının (14.2±2.6 spike/dk) kontrol grubuna (30.43±2.6 spike/dk) göre istatistik açıdan anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0.05$, Şekil 4.1-J, Şekil 4.4 ve Tablo 4.3). Ortalama amplitüdde (840 ± 55 µV) kontrol grubuna (900±177 µV) göre önemli bir değişme olmadı ($p>0.05$, Şekil 4.1-J, Şekil 4.4 ve Tablo 4.4).

#### 4.3.2.3. Üzüm Çekirdeği Özütü + 7-Nitroindazol Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi

500 IU penisilin i.c. yoldan uygulandıktan 30 dakika sonra 40 mg/kg 7-Nitroindazol (i.p.), 7-NI'den 10 dakika sonra 200 mg/kg GSE (i.p.) enjekte edildi. 7-NI + GSE nin varlığında 90. dakikadan itibaren deney sonuna kadar epileptiform aktivitenin ortalama frekansının (16±2.7 spike/dk) kontrol grubuna (30.43±2.6 spike/dk) göre istatistik açıdan anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0.05$, Şekil 4.1-I, Şekil 4.4 ve Tablo 4.3). Ortalama amplitüdde (800±81 µV) kontrol grubuna (900±177 µV) göre önemli bir değişme olmadı ($p>0.05$, Şekil 4.1-I, Şekil 4.4 ve Tablo 4.4).

#### 4.3.2.4. Aminoguanidin + Üzüm Çekirdeği Özütü Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi

500 IU i.c. yoldan uygulandıktan 30 dakika sonra 200 mg/kg GSE (i.p.), GSE'den 10 dakika sonra 60 mg/kg aminoguanidin (i.p.) enjekte edildi. AG'nin etkin dozu (60 mg/kg, i.p.), GSE'nin antikonvulsan etkisini kısmen tersine çevirdi (Şekil 4.4). Öyle ki GSE'nin

enjeksiyonundan 110 dakika sonra epileptiform aktivitenin ortalama frekansının (13.8 ± 4.6 spike/dk) kontrol grubuna (31.3±3.8 spike/dk) göre istatistik açıdan anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0.05$, Şekil 4.1-K, Şekil 4.4 ve Tablo 4.3). Ortalama amplitüdde (520 ± 110 µV) kontrol grubuna (940±147 µV) göre önemli bir değişme olmamıştır ($p>0.05$, Şekil 4.1-K, Şekil 4.4 ve Tablo 4.4).

Tablo 4.3. Sıçanlarda penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin frekansı üzerine üzüm çekirdeği özütünün etkin dozu ile NO agonist ve antagonistlerinin her 30 dakikadaki etkisi.

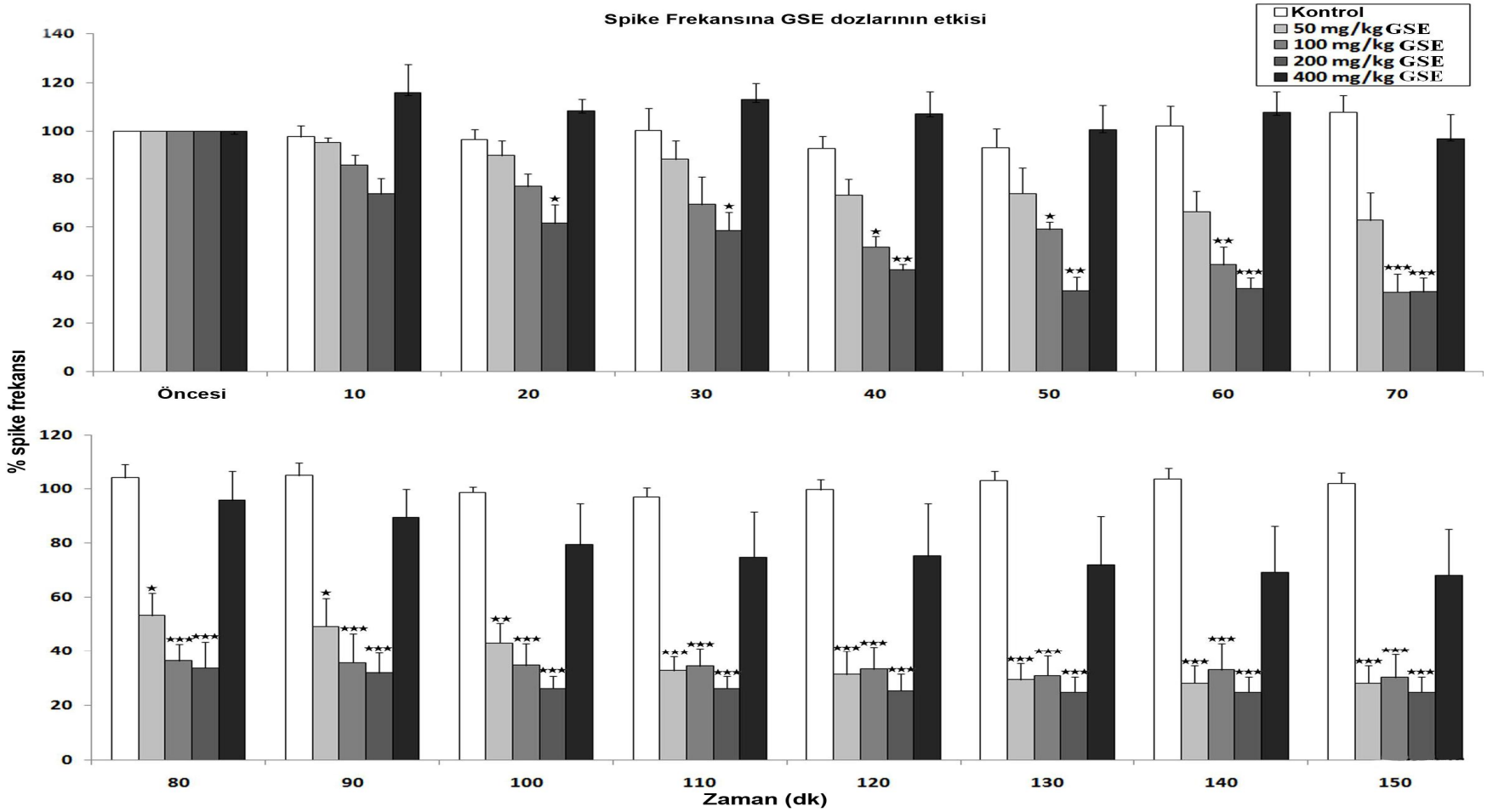
Ortalama frekans (spike / dk)

| **Gruplar** | **30. dk** | **60. dk** | **90. dk** | **120. dk** | **150. dk** |
|---|---|---|---|---|---|
| Kontrol grubu | 26.76±1.8 | 28,23±2.5 | 30.43±2.6 | 31.56±3.3 | 30.78±1.1 |
| GSE (200 mg/kg) | 26.83±4.4 | 18.66±3.9 | 15,33± 3.9 | 12,33±3.8 | 13,33±3.3 |
| AG (60 mg/kg) | 40.2±15.1 | 25.6±10.4 | 15.4±7 | 14.4±7.1 | 13±6.7 |
| AG (100 mg/kg) | 25.5±7.8 | 25±5.9 | 20.4±6.2 | 10.8±4.3 | 6.1±3 |
| 7-NI (40 mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 27.2±3.6 | 22.8±3.8 | 16±2.8 | 12.8±2.5 | 9.6±1.9 |
| L-NAME (60 mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 24±4.8 | 15.8±2.4 | 14.2±2.6 | 13.4±1.9 | 13.8±2.1 |
| AG (60 mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 32.2±6.6 | 33±10.3 | 30±8.2 | 12.4±3.6 | 5.4±1.3 |
| L-arjinin (500 mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 29±4.7 | 19±5.8 | 15.1±5.9 | 11±3.8 | 10.5±3.6 |
| L-arjinin (500 mg/kg) + AG (60 olacak mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 52.2±7 | 49±9.3 | 19.7±5.4 | 17.5±11.2 | 10±3.9 |

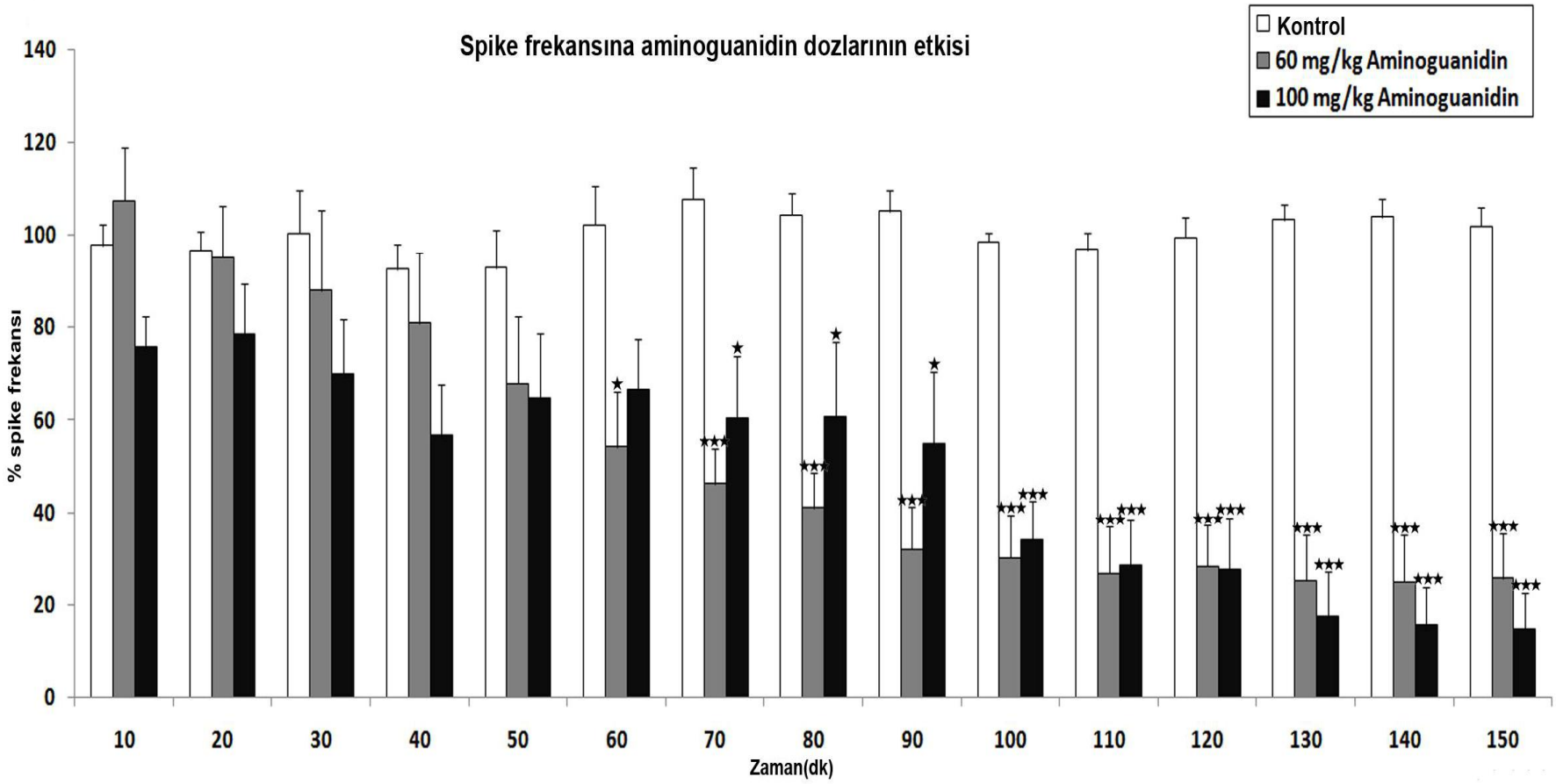
Tablo 4.4. Sıçanlarda penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin amplitüd üzerine üzüm çekirdeği özütünün etkin dozu ile NO agonist ve antagonistlerinin her 30 dakikadaki etkisi.

Ortalama amplitüd (µV)

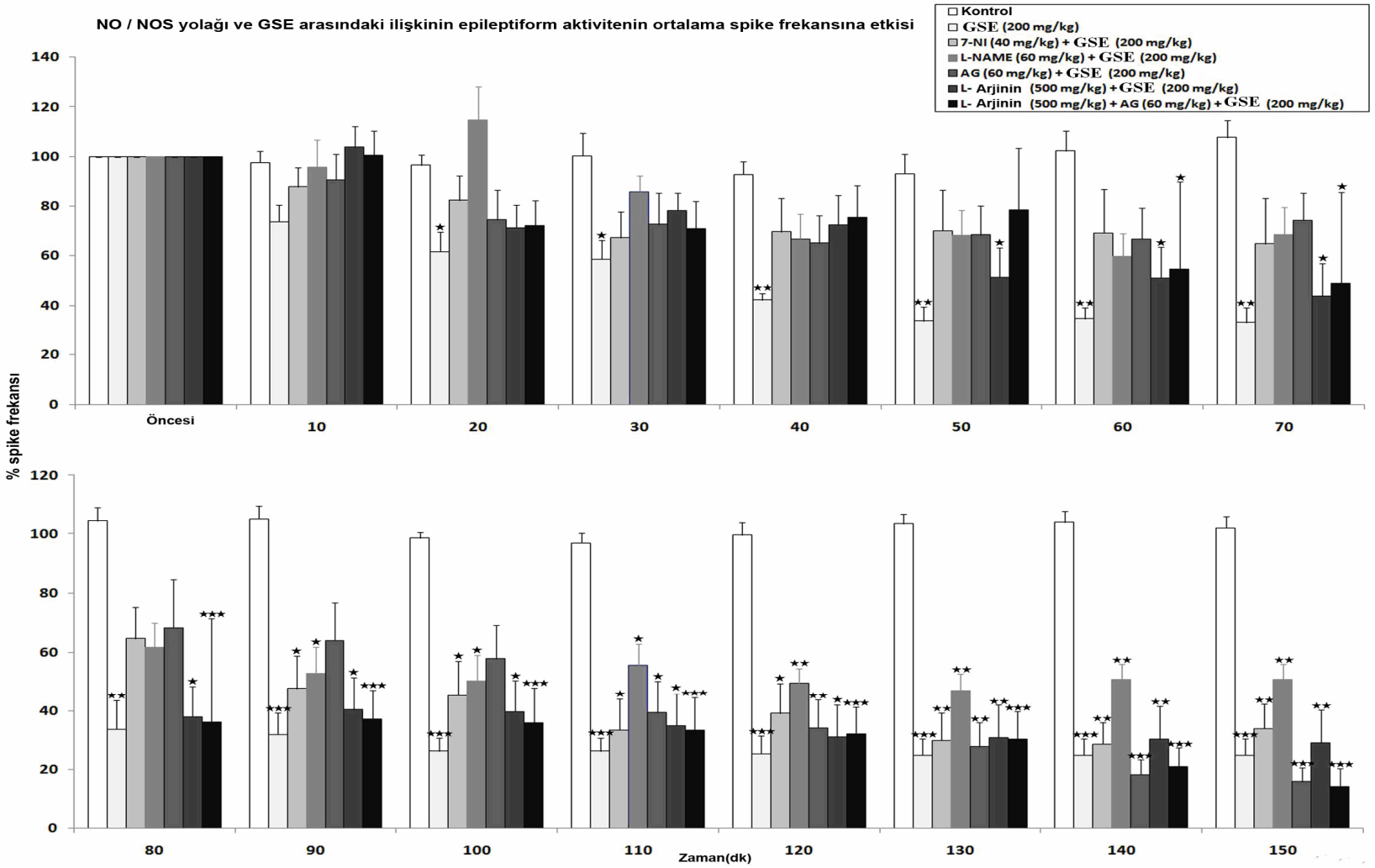
| **Gruplar** | **30. dk** | **60. dk** | **90. dk** | **120. dk** | **150. dk** |
|---|---|---|---|---|---|
| Kontrol grubu | 940±178 | 880±166 | 900±177 | 880±127 | 920±157 |
| GSE (200 mg/kg) | 783±107 | 666±111 | 700±106 | 650±92 | 650±92 |
| AG (60 mg/kg) | 920±92 | 800±80 | 740±74 | 700±70 | 600±60 |
| AG (100 mg/kg) | 829±82 | 814±81 | 671±67 | 429±42 | 300±30 |
| 7-NI (40 mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 1040±80 | 820±70 | 800±81 | 900±103 | 820±83 |
| L-NAME (60 mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 920±87 | 920±60 | 840±55 | 780±90 | 760±95 |
| AG (60 mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 900±106 | 900±118 | 780±113 | 480±101 | 520±107 |
| L-arjinin (500 mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 1200±217 | 1183±246 | 1150±234 | 1050±140 | 916±218 |
| L-arjinin (500 mg/kg) + AG (60 olacak mg/kg) + GSE (200 mg/kg) | 1000±137 | 850±74 | 625±48 | 625±168 | 575 ±149 |




Şekil 4.2. Üzüm çekirdeği özütünün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg (i.p.) dozlarının, GSE enjeksiyonu yapıldıktan sonra 20., 40., 80. dakikalarda epileptiform aktivite de ortalama spike frekansları (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).




Şekil 4.3. AG'nin 60, 100 mg/kg (i.p.) dozlarının penisilinle uyarılan epileptiform aktivitede ortalama spike frekansları ( * $p<0.05$ ; *** $p<0.001$).




Şekil 4.4. L-NAME, 7-NI, AG ve L-arjinin penisilinle uyarılan epileptiform aktivitede GSE'nin antikonvulsant aktivitesine etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$)

#### 4.3.2.5. L-arjinin + Aminoguanidin +Üzüm Çekirdeği Özütü Grubunun Epileptiform Aktiviteye Etkisi

500 IU i.c. yoldan uygulandıktan 30 dakika sonra 500 mg/kg L-arjinin (i.p.), L-arjininden 5 dakika sonra 60 mg/kg AG (i.p.), AG'den 5 dakika sonra 200 mg/kg GSE (i.p.) enjekte edildi. NO substratı L-arjinin (500 mg/kg, i.p.), GSE'nin etkin dozundan (200 mg/kg, i.p.) 10 dakika önce verildiğinde, penisilinle uyarılan epileptiform aktivitede GSE'nin antikonvulsan etkisindeki AG'nin etkinliğini engelledi. AG varlığında GSE'nin antikonvulsan etkisi 110. dakikada ortaya çıkarken, L-arjininin AG'yi baskılaması neticesinde GSE'nin etkisinin 60. dakikada ortaya çıktığı belirlendi ($p<0.05$, Şekil 4.1-L, Şekil 4.4 ve Tablo 4.3). GSE'nin enjeksiyonundan 60 dakika sonra epileptiform aktivitede ortalama spike frekansı 49±9.3 spike/dk, ortalama amplitüd 850±74 µV'dur (Şekil 4.4 ve Tablo 4.4).

Ayrıca penisilin enjekte edilmemiş hayvanları kontrol grubu olarak değerlendirdiğimizde, dimetil sülfoksit (DMSO)'in intarperitonal enjeksiyonu ve serum fizyolojik (SF)'in intrakortikal enjeksiyonu (2,5 µl) epileptitiform aktivitenin frekansında ve amplitütünde hiçbir değişiklik meydana getirmemiştir (Şekil 4.1-N).

# 5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Sunulan çalışma ile ilk kez sıçanlarda penisilinle uyarılan epileptiform aktivite üzerine üzüm çekirdeği özütünün etkisi araştırıldı. Öncelikle GSE'nin farklı dozlarının etkisi araştırıldı. Ardından etkin doz GSE ile nitrik oksit sisteminin etkileşimini içeren deneyler yapıldı. Bunun için çalışmada non-spesifik NOS inhibitörü L-NAME, seçici indüklenebilir NOS inhibitörü aminoguanidin, seçici nöronal NOS inhibitörü 7-NI ve NO substratı L-arjinin kullanıldı

## 5.1. Penisilinle Uyarilan Epileptiform Aktivitede Üzüm Çekirdeğinin Etkisi

Üzüm çekirdeği proantosiyanidin özütü (GPSE), 50 µg/ml dozda kardiyomiyositlerde iskemi/reperfüzyonla oluştururulan hücre ölümüne karşı çok belirgin ve önemli bir koruma sağlamıştır [89]. GSPE'nin (10, 20, 40, 60 µg/ml) doza bağlı olarak adenokarsinoma hücrelerinin (A549) göç etme kapasitelerini azalttığı bulunmuştur [104]. Başka bir çalışmada ise GSE, asetaminofeninin neden olduğu apoptotik ve non-apoptotik karciğer hücre ölümlerini önlemiş ve puromisinin neden olduğu nefrozda proteinüriyi azaltmıştır [105]. *In vitro* olarak yapılan bir çalışmada GSE'nin lipoprotein lipaz ve pankreatik lipaz aktivitelerini inhibe ettiği bildirilmiştir [106]. Yine laboratuar ortamında yapılan bir çalışmada, insan göbeği toplardamar endotel hücre kültürüne 10, 25 ve 50 µg/ml dozlarda GSE verilmiş ve GSE'nin hücre büyümesine ve hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. 25 ve 50 µg/ml dozlardaki GSE'nin, % 91 oranında hücre büyümesini azalttığı tespit edilmiştir. Trypan mavisi boyama yöntemi ile ölen hücrelerin skorlaması yapılmış ve GSE'nin 25 ve 50 µg/ml dozlarda hücre canlılığını % 64 oranında azalttığı, 10 µg/ml dozunun hücre büyümesine ve hücre canlılığına etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır [107]. Bir başka çalışmada ise 30 gün boyunca ağız yoluyla 100 mg/kg dozda üzüm çekirdeği özütü ile beslenen yaşlı sıçanlarda (24–26 aylık 400 ±20 g) DNA protein çapraz-bağ seviyesinin yaşlı kontrollere göre önemli derecede azaldığı bulunmuştur [23]. Bu çalışmaların aksine Shao ve ark., [15] civciv kardiyomiyosit modelinde yüksek doz GSE'nin (100, 500 µg/ml) efektör kaspaz-2 aktivasyonu ve sonuçta reaktif oksijen türlerinin oluşturulması yoluyla apoptotik hücre yaralanmasına sebep olduğunu belirtmiştir [15].

GSE'nin kan basıncı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, metabolik sendromlu 27 yetişkin (25–80 yaşları arasında, bir yıldan fazla sigara kullanmamış, vitamin ilaçları kullanmayan, koroner ve pulmoner damar hastalıkları ile mide ve böbrek hastalıkları olmayan)

insana dört gün boyunca ağız yoluyla 300 mg ve 150 mg GSE verilmiş ve düzenli olarak her saat tansiyonları ölçülmüştür. GSE'nin hem sistolik hem de diyastolik kan basınçlarını düşürdüğü gözlenmiştir. Aynı çalışmada okside düşük yoğunluklu lipoprotein değerlerinde azalma olduğu diğer kan parametrelerinde ise bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir [108]. Başka bir çalışmada ise sıçanlara 45 gün boyunca ağız yoluyla 100 mg/kg GSE ve su içerisinde kurşun asetat (100 ppm) verildiğinde, sadece kurşun asetat verilen hayvanlarda kan basıncı ve kalp atış hızının önemli derecede arttığı, kurşun asetat ve GSE'nin beraber verilen hayvanlarda ise kan basıncı ve kalp atış hızının değişmediği gözlenmiştir [109].

Sıçanlara yüksek kolesterol diyeti uygulanarak, hiperkolesterolemi hastalığı üzerine GSE'nin etkisinin incelendiği bir araştırmada, ağız yolu ile beslemede yarı yarıya yüksek kolesterol diyeti ve GSE verilmiş, toplam kolesterolü % 31, iyi kolesterolü % 25, kötü koleterolü % 41 düşürerek GSE'nin hiperkolesterolemiye karşı koruyu etkisi belirlenmiştir [110]. Bir başka çalışmada yüksek yağ diyeti uygulanan sıçanlarda, diyetle birlikte GSE verilmiştir. Vücut ağırlığında artışın GSE verilen grupta azaldığı görülmüştür. Aynı çalışmada kan ve karaciğerden alınan örneklerde, kan yağ konsantrasyonunda azalma olduğu da belirtilmiştir [111].Sıçanlarda yapılan bir diğer çalışmada, ağız yoluyla 14 gün boyunca 2 – 4 g/kg GSE verilmiştir. Kontrol grubundaki hayvanların vücut ağırlıklarında bir artış gözlenirken, 4 g/kg GSE verilen hayvanların vücut ağırlıklarında az miktarda azalma gözlenmiştir [112].

GSE'nin promisin-aminonükleositle uyarılan nefroz hastalığındaki etkisine bakmak için 50 sıçan kullanılan bir çalışmada, beş grup oluşturularak 30 gün süresince ilk gruba sadece su (i.p.), ikinci gruba su ve GSE (10 mg/100g, i.p.), üç, dört ve beşinci gruplara ise GSE (10 mg/100g, i.p.) verilmiştir. Dokuzuncu günden sonra GSE dozu artırılarak 40 mg/100g olarak enjekte edilmiştir. GSE üç, dört ve beşinci gruplarda idrarda protein, kanda kolestorel ve trigliserit seviyelerini azaltmış, albumin ve kreatinin seviyelerinde ise değişikliğe neden olmamıştır [113]. Yine sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada 15 gün boyunca ağız yoluyla GSE (100 mg/kg) verilmiş, onuncu günden itibaren GSE'ye ek olarak metotreksat (20 mg/kg, i.p.) enjekte edilmiştir. Onaltıncı günün sonunda derin anestezi altında karaciğer dokusundan örnekler alınmıştır. Doku homojenatında, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit, süperoksit dismutazın aktivitesi ve katalaz seviyeleri incelenmiştir. Metotreksat tek başına, malondialdehit seviyesini artırırken, süperoksit dismutaz ve katalazın aktivitelerini azaltmıştır. GSE ve metotreksat birlikte uygulandığında ise bu değişimlerin önemli derecede

tersine çevrildiği, metotreksatın bütün kan parametrelerini azaltığı, GSE'nin önemli bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur [114].

Son zamanlarda yapılan farklı bir çalışmada Bregmanın 1.4 mm anteroposterior, 6.8 mm dorsoventral, 3.2 mm mediolateralından infüzyon pompasıyla her beş dakikada 0.2 µg/µL olmak üzere toplamda 6 µg/µL ibotenik asitle uyarılan Alzheimer modelinde, (sıçanlarda Morris su tankı kullanılarak) uzaysal hafıza üzerine GSE'nin etkisi incelenmiştir. Sıçanlarda ibotenik asidin tek başına uzaysal hafıza kapasitesinin bozulmasına neden olduğu, 30 gün boyunca ibotenik asit enjekte edilmeden önce ağız yoluyla 100 mg/kg GSE verildiğinde, uzaysal hafızada bozulmanın azaldığı tespit edilmiştir [115]. Diğer bir çalışmada dokuz hafta süreyle ağız yoluyla 25, 50, 75 mg/kg dozda GSE uygulanmış, GSE'nin 75 mg/kg'lık dozunun ergin sıçan beyninin korteks, beyincik ve hipokampus bölgelerindeki nöronları koruduğu ifade edilmiştir [24]. Buna ilaveten, kronik olarak kullanılan GSE'nin (GSE'nin toplam fenolik içeriği 9 ayda 592,5 mg/kg idi) genetik bir fare modelinde Alzheimer hastalığının gelişimini önlediği tespit edilmiştir [93].

Başka bir çalışmada genç (3 – 4 aylık 140±20 g) ve yaşlı (24 aylık 400 ±20 g) gruplara ağız yoluyla 100 mg/kg GSE verilerek sıçanlar 30 gün boyunca beslenmiştir. Yaşlı ve genç olmak üzere iki grup da kontrol grubu olarak seçilmiştir. Yaşlı kontrol grubunda sıçanların omurilik, serebral korteks, striatum ve hipokampus bölgelerindeki lipid peroksidasyonunda önemli derecede artış gözlenmiş, genç grupta ise lipid peroksidasyon seviyelerinde değişiklik gözlenmemiştir. GSE verilen yaşlı sıçanlarda lipid peroksidasyonunun azaldığı bildirilmiştir. Yaşlı ve genç grubun süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi karşılaştırıldığında yaşlı grubun omurilik, serebral korteks, striatum ve hipokampus bölgelerinde SOD aktivitesinin önemli derecede azaldığı görülmüştür [22].

Sunulan çalışmada 50, 100, 200 mg/kg (i.p) GSE uygulanan sıçanlarda, epileptiform aktivitenin amplitüdü değişmezken frekansı önemli derecede azaldı. GSE'nin 200 mg/kg dozu epileptiform aktivitenin ortalama frekansını azaltan en etkili doz olarak belirlendi. Yüksek doz GSE (400 mg/kg) epileptiform aktivitenin amplitüdünü de frekansını da değiştirmedi.

Ayyıldız ve ark., [12] penisilin modeli deneysel epilepside penisilinden 30 dakika sonra E vitaminin 100, 300, 500 mg/kg dozlarını uygulamışlar. E vitamininin 100 mg/kg dozu epileptiform aktivitenin amplitüd ve frekansında değişikliğe neden olmamıştır. E vitaminin 300,

500 mg/kg dozları epileptiform aktivitenin amplitüdünü değiştirmezken frekansını önemli düzeyde azaltmıştır. Farklı bir çalışmada Ayyıldız ve ark., [14] penisilin modeli deneysel epilepside penisilinden 30 dakika sonra bu kez C vitaminin 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 mg/kg dozlarını uygulamışlar. C vitamininin düşük dozunun (25 mg/kg) ve yüksek dozunun (800 mg/kg) epileptiform aktivitenin amplitüd ve frekansında değişikliğe neden olmadığını, 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarının ise epileptiform aktivitenin amplitüdünü değiştirmezken frekansı önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. Bu iki çalışma ile Ayyıldız ve ark., [12,14] penisilin modeli deneysel epilepside penisilinden 30 dakika sonra verilen C ve E vitaminlerinin epileptiform aktiviteyi anlamlı düzeyde azalttığını ve E vitaminin etkin dozunu 500 mg/kg, C vitaminin etkin dozunu ise 100 mg/kg olarak bulmuştur. Sunulan çalışma ile Ayyıldız ve ark., [12, 14] yapmış olduğu iki çalışma karşılaştırıldığında GSE ile C ve E vitaminlerinin antikonvulsan etkinliği arasında bir fark bulunamadı.

## 5.2. Penisilinle Uyarılan Epileptiform Aktivite Üzerine Üzüm Çekirdeği Özütünün Gösterdiği Antikonvulsant Etkide Nitrik Oksit Yolunun Rolü

Epilepsinin NO ile ilişkisini açıklamak için çeşitli NOS inhibitörü ve NO donörü kullanılarak değişik deneysel epilepsi modellerinde çalışmalar yapılmıştır [33, 34, 36, 116]. Nöbet uyaranlarına, NO'nun hücresel formuna ve spesifik NOS izoformlarının aktivasyonlarına bağlı olarak nitrik oksitin anti-konvulsant veya pro-konvulsant olarak etki gösterebileceği bildirilmiştir [31, 33, 34, 36].

Beyinde en azından üç çeşit NOS izoenzimi (nöronal NOS, indüklenebilir NOS ve endotel NOS) olduğu belirtilmiştir [117, 118]. Sunulan çalışmada, sıçanlarda penisilinle uyarılan epileptiform aktivitede GSE'nin etkisinde NO/NOS yolağının rolünü değerlendirmek için üç farklı NOS inhibitörü (nonspesifik NOS inhibitörü L-NAME, selektif indüklenebilir NOS inhibitörü aminoguanidin ve selektif nöronal NOS inhibitörü 7-NI) ve bir NO substratı (L-arjinin) kullanıldı.

Sunulan çalışmada 60 mg/kg dozda kullanılan L-NAME, GSE'nin antikonvulsant etkisini azalttı. Diğer taraftan Ayyıldız ve ark., [13] ile Boşnak ve ark., [103] yaptıkları çalışmalarda aynı dozda kullanılan L-NAME'nin penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin frekansını da amplitüdünü de etkilemediğini bildirmişlerdir.

GSE'nin koruyucu etkilerine NO yolunun muhtemelen karıştığını gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır [15,89, 104, 119]. Shao ve ark. [89] 200 µmol/L dozda L-NAME'nin NOS aktivasyonunun bloklanması ile kardiyomiyosit ölümünün GSE-aracılı azalmasını kısmen engellediğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada 1 mmol/L L-NAME ile inkübasyon yapılması tavşan aort yayında GSE'ye karşı oluşan gevşeme cevabını da ortadan kaldırdı [120]. Bununla birlikte 200 µmol/L L-NAME'nin yüksek doz GSE ile ilişkili (NOS aktivasyonu ve aşırı NO üretimini işaret eden) sitotoksisite ve apoptotik hücre ölümünü önemli derecede azalttığı ifade edilmiştir [16]. Bunların tersine, Punathil ve Katiyar [104] NOS inhibitörü L-NAME ve NO öncüsü L-arjinin kullanarak küçük hücreli olmayan insan akciğer kanser hücresi göçü üzerine GSE'nin gösterdiği inhibitör etkideki NO/NOS yolunun rolünü değerlendirmişler ve NO-aracılı göçün L-NAME (1 mmol/L) tarafından bloklandığını, aşırı L-arginin (5 nmol/L) varlığında ise bu fonksiyonun geri geldiğini bulmuşlardır. Çalışmalarının sonucunda Punathil ve Katiyar [104] GSE'nin A549 ve H1299 hücrelerinde NOS ekspresyonunu inhibe ederek NO seviyelerinde bir azalmaya neden olduğunu belirttiler.

Sunulan çalışma kapsamında penisilin modeli epileptiform aktivitede NO yolunun rolünü değerlendirmek için nispi seçici iNOS inhibitörü olan AG kullanıldı. İntraperitoneal olarak 60 ve 100 mg/kg dozlarda uygulanan aminoguanidin epileptiform aktivitenin ortalama frekansını anlamlı düzeyde azalttı. En iyi azaltıcı etki aminoguanidinin 60 mg/kg dozunda görüldü. Bu sonuç Rehni ve arkadaşlarının [121] farelerde 50 ve 100 mg/kg, (i.p.) aminoguanidinin pilokarpinle oluşturulan spontan tekrarlayıcı nöbetlerin ve PTZ ile oluşturulan tutuşma nöbetlerininin gelişimini baskıladıklarını buldukları çalışmadaki sonuçlarını desteklemektedir. Byun ve ark., [122] kainik asitle uyarılan eksitotoksisitede 200 mg/kg (i.p) dozda uygulanan aminoguanidinin fare hipokampusundaki hücre ölümünü azalttığını bildirmişler, oysa aynı çalışmalarında 50 mg/kg (i.p) dozda uygulanan L-NAME'in ise CA3 bölgesindeki nöronal ölümü artırdığını ifade etmişlerdir. Yine 100 mg/kg (i.p) dozda uygulanan aminoguanidinin farede nikotinle oluşturulan konvulsiyonları etkilemediği bulunmuştur [123]. Başka bir çalışmada 50 ve 100 mg/kg dozlarda verilen aminoguanidinin normal veya strese maruz kalan farelerde nöbet etkilenebilirliğini değiştirmediği, ayrıca stresle oluşturulan antikonvulsan etki üzerine morfin veya L-arjininin kuvvetlendirici etkilerini de değiştirmediği tespit edilmiştir [124].

AG'nin toksik etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, sıçanlara i.p. olarak 1600 mg/kg/gün AG enjekte edildiğinde hayvanlardan birinin öldüğü diğer beşinin ise 10 gün sonunda sağ

kaldığı gözlenmiştir. 1200 ve 800 mg/kg/gün i.p. dozlarda AG enjekte edildiğinde ise sıçanlarda toksik bir etki gözlenmemiştir. AG, 30 mg/kg/gün enjekte edildiğinde aşırı hareketler ve nöbet benzeri hareketler gözlenmiş ve 3 gün sonunda hayvanlar ölmüştür. Diğer taraftan on sıçana 10 mg/kg/gün AG enjekte edildiğinde kısa süreli miyoklonik benzeri hareketler gözlenmiştir. Fakat 10 gün sonunda hayatta kalan altı sıçana 3.5 mg/kg/gün dozda AG enjekte edildiğinde hiç bir yan etkinin olmadığı tespit edilmiştir [125]. Başka bir çalışmada sığır serum albumininden elde edilen glikasyon son ürünlerinin 235 mg/kg dozu ile fokal serebral iskemi modeli oluşturulmuştur. Hayvanlara 450 mg/kg dozda AG verildiğinde, AG'nin glikasyon son ürünlerinin neden olduğu nörotoksik etkileri inhibe ettiği görülmüştür [126]. Yine sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada hayvanlara ağız yoluyla 50, 150 ve 300 mg/kg AG ve AG'den 60 dakika sonra da 100 mg/kg iminopropionitril (IDPN) verilerek Diskinetik Sendrom oluşturulmuştur. AG doza bağımlı olarak diskinetik baş hareketlerinin sıklığını ve şiddetini önemli derecede artırmıştır. İç kulağın histopatolojik incelenmesinde duyusal kıl hücrelerinin hasar gördüğü de tespit edilmiştir [119].

Sunulan çalışmada, GSE'den 10 dakika önce 40 mg/kg dozda 7-NI enjekte edildiğinde, yalnız 7-NI grubu ile karşılaştırıldığında epileptiform aktivitede amplitüd değişmeksizin ortalama frekansında benzer bir azalma ortaya çıktı. Yine 7-NI'ün 40 mg/kg dozda enjeksiyonun yapıldığı bir çalışmada 7-NI enjeksiyonundan 40 dakika sonra epileptiform aktivite de amplitüdün değişmediği ortalama frekansın azaldığı bildirilmiştir [127]. Benzer bir çalışmada 7-NI (25 ve 50 mg/kg) ve L-arjinin (500 mg/kg) birlikte kullanıldığında epileptiform aktivite de amplitüdün değişmediği ortalama frekansın anlamlı düzede azaldığı bildirilmiştir [103]. Başka bir çalışmada PTZ ile uyarılan epileptiform aktivitede 7-NI'nın 50 mg/kg dozunun klonik nöbetin sıklığına etkisi olmamıştır. Aynı çalışmada amigdala tutuşma modeli oluşturulan sıçanlarda 7-NI (50 mg/kg) + karbamazepin (10–20 mg/kg) birlikte uygulandığında nöbette önemli bir azalma olmuştur [128]. Maksimal elektroşok modelinde (MES) 7-NI'nın 100, 150, 200 mg/kg dozları uygulandığında elektrokonvülsif eşiği önemli derecede artırmıştır. Düşük dozlarda 7-NI (50 ve 75 mg/kg) elektrokonvulsif eşiği etkilememiştir [129].

Sunulan çalışmada NO öncüsü L-arjinin (500 mg/kg), GSE (200 mg/kg) ile birlikte kullanıldığında GSE'nin antikonvulsan etkisine ek bir katkı sağlamadı. Ayyıldız ve ark., [13] L-arjininin (500 mg/kg) enjeksiyondan 70 dakika sonra epileptiform aktivitenin frekansında azalma olduğunu ancak epileptiform aktivitenin amplitüdünde ise değişiklik olmadığını ifade etmişlerdir. Diğer bir çalışmada penisilinle uyarılan epileptiform aktivitede, penisilin

enjeksiyonundan 30 dakika sonra L-arjinin (1000 mg/kg) verilmiştir. L-arjinin uygulanmasından 70 dakika sonra epileptiform aktivitenin spike frekansı azalmış, spike amplitüdünde ise değişiklik gözlenmemiştir. Penisilin enjeksiyonundan 30 dakika sonra L-arjininin inaktif izomeri olan D-arjinin (1000 mg/kg) enjekte edilmiş, epileptiform aktivitenin spike frekansı ve amplitüdünde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir [130]. Farklı bir çalışmada Sıçanlarda pikrotoksin 5 mg/kg dozla uyarılan epileptiform aktivitede 7-NI'nin 50 ve 100 mg/kg dozlarının enjeksiyonundan 30 dakika sonra L-arjinin 500 ve 1000 mg/kg dozları enjekte edilmiştir. 7-NI, beyinde NOS aktivitesinde ve NO konsantrasyonunda önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. L-arjininin yüksek dozları NO konsantrasyonunu artırmış ve pikrotoksinin konvulsan etkisini inhibe etmiştir [131]. 5 mg/kg pikrotoksin ile sıçanlarda epileptiform aktivite oluşturulup beyinde NOS aktivitesi ve NO konsantrasyonu incelenmiştir [132]. Antikonvulsan diazepam 2 mg/kg, L-arjinin 2000 mg/kg ve L-NAME 50 mg/kg dozlarının uygulandığı çalışmada; L-arjinin tek başına uygulandığında, NO konsantrasyonunu ve NOS aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Diazepam tek başına uygulandığında ise NO konsantrasyonunu ve NOS aktivitesini değiştirmemiştir. Diazepam ve L-arjinin birlikte uygulandığında, NO konsantrasyonunu ve NOS aktivitesini artırmıştır. Diazepam ve L-arjinin birlikte kullanılması nöbetleri tamamen baskılamıştır. L-NAME tek başına uygulandığında nöbete hiçbir etkisi olmazken, NO konsantrasyonunu ve NOS aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır [132].

Sunulan çalışmada L-arjinin, AG ve GSE'nin birlikte uygulanmasında, L-arjinin GSE'nin antikonvulsan aktivitesi üzerine aminoguanidinin gösterdiği inhibitor etkiyi ortadan kaldırdı. Aminoguanidinin en etkin dozu (60 mg/kg) GSE'nin antikonvulsan etkisini 110. dakikaya kadar erteledi. Bu gözlemler, aminoguanidinin yapısal ve indüklenebilir NOS aktivitesi üzerine inhibitor etki göstermesinden dolayı penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitede GSE'nin antikonvulsan etkisine aracılık etmede yapısal ve indüklenebilir NOS'un her ikisininde potansiyel bir rolü olduğunu gösterebilir. Laszlo ve ark., [133] aminoguanidin sıçan ileum ve kolon doku homojenatlarında indüklenebilir izoform için iki kat daha fazla selektivite gösterdiğini belirttikleri çalışmayı desteklemektedir.

Çalışmamızdaki GSE'nin antikonvulsan etkisi kendisinin NO üretme yeteneğine sahip olabileceğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur [27, 89, 130]. Bu özellikle indüklenebilir NOS ile ilgilidir. Çünkü sunulan çalışmada aminoguanidin GSEnin antikonvulsan etkisini tersine çevirdi; L-arjinin de aminoguanidinin etkisini ortadan kaldırdı. Diğer taraftan bu çalışmada L-NAME GSE'nin antikonvulsan etkisini kısmen inhibe etti.

Bu durumda birlikte kullanıldıklarında L-arjinin GSE'nin antikonvulsan etkisini artırıcı ek bir artışı neden sağlamıyor sorusu ortaya çıkmaktadır. Bu soruya Shao ve arkadaşlarının [27, 89] çalışmalarına dayanarak bir açıklama getirebiliriz. Onlar çalışmalarında yüksek doz GSE'ye cevap olarak apoptotik hücre ölümündeki artışla ilişkili sitotoksisistede aşırı NO üretiminin anahtar bir rol oynayabileceğini belirttiler. Ayrıca 50 µl/ml dozdaki GSE'nin kardiyomiyositlerde oksidan hasara bağlı zedelenmelere karşı koruyucu NO seviyelerini sağlayan eNOS'u aktive ettiklerini de belirttiler. Eğer olay bu şekildeyse sunulan çalışmada L-arjinin +GSE varlığında daha fazla antikonvulsan etki beklememek makul görünmektedir.

Sunulan çalışmada; GSE düşük (50, 100 mg/kg) ve orta dozlarda (200 mg/kg) penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin amplitüdünü değiştirmezken ortalama frekansını anlamlı düzeyde azalttı. Yüksek doz GSE (400 mg/kg) epileptiform aktivitenin ne amplitüdünü ne de frekansını değiştirdi. Epileptiform aktivitenin frekansını azaltan en etkili doz 200 mg/kg idi. GSE'nin antikonvulsan etkisi selektif indüklenebilir NOS inhibitörü aminoguanidin tarafından azaltıldı; aminoguanidinin etkisi de L-arjinin tarafında inhibe edildi. Bundan başka nonspesifik NOS inhibitörü L-NAME GSE'nin antikonvulsan etkisini kısmen blokladı. Bu yüzden bulgularımız indüklenebilir NOS'un GSE'nin antikonvulsan etkisine katıldığını göstermektedir.

Bununla birlikte yine de değişik nöbet modelleri kullanılarak GSE'nin etkisi altında yatan moleküler mekanizmayı ortaya çıkaracak daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR


1. Dichter, M. A., The Epilepsies and Convulsive Disorders, Harrison's Principles of Internal Medicine, p.2229, McGraw-Hill, 1994.
2. Brailowsky, S. and Garcia, O. Ethanol, GABA and Epilepsy, Archives of Medical Research, 30, 3–9, 1999.
3. Avanzini, G, Franceschetti, S., Cellular biology of epileptogenesis. Lancet, 2, 33-42, 2003.
4. Hamed, S., Abdullah, M., Trace elements and electrolytes homeostasis and their relation to antioxidant enzyme activity in brain hyperexcitability of epileptic patients. Journal of Pharmacological Sciences, 96, 349–359, 2004,
5. Arzimanoglou, A. et al., Epilepsy and neuroprotection : An illustrated review. Epileptic Disorders, 3, 173-182, 2002.
6. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: An overview, Methods Enzymol., 186, 1-86, 1990.
7. Niki, E., Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals, American Journal of Clinical Nutrition, 54, 1119–1124, 1991.
8. Frei, B., Stocker, R., Ames, B.N., Small molecule antioxidant defences in human extracellular fluids, Current Communications in Cell & Molecular Biology, 5, 23–45, 1992.
9. Fighera, M.R. et al., Ascorbic acid and α-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions, Neuroreport, 10, 2039–2003, 1999.
10. Yamamoto, N. et al., α-Tocopheryl-L-ascorbate-2-O-phosphate diester, a hydroxyl radical scavenger, prevents the occurrence of epileptic foci in a rat model of post-traumatic epilepsy, Pathophysiology, 8, 205–214, 2002.
11. Oliveira, M.S. et al., Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically, Neuroscience 128, 721–728, 2004.
12. Ayyıldız, M., Yıldırım, M., Ağar, E., The effect of vitamin E on penicillin-induced epileptiform activity in rats, Exp. Brain Res., 174, 109—113, 2006.
13. Ayyıldız, M., Yıldırım, M., Ağar, E., The involvement of nitric oxide in the anticonvulsant effects of α-tocopherol on penicillin-induced epileptiform activity in rats, Epilepsy Research, 73, 166 – 172, 2007.
14. Ayyıldız, M., Coşkun Ş., Yıldırım, M., Ağar, E., The effects of ascorbic acid on penicillin-induced epileptiform activity in rats, Epilepsia, 48(7), 1388–1395,

2007.

15. Shao, Z.H. et al., Grape seed proanthocyanidins induce pro-oxidant toxicity in cardiomyocytes, Cardiovasc. Toxicol., 3, 331–339, 2003.
16. Shao, J. et al., Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice, Biochem Biophys Res Commun. 344, 1224–1233, 2006.
17. Yamakoshi, J. et al., Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats, J. Agric. Food Chem., 50, 4983–4988, 2002**.**
18. Bagchi, D. et al., Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*, Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 95(2), 179-189, 1997.
19. Bagchi D. et al., Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology, 148**,** 187–197, 2000.
20. Hwang, I.K. et al., Neuroprotective effects of grape seed extract on neuronal injury by inhibiting DNA damage in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia, Life Sci., 75, 1989–2001, 2004.
21. Balu, M. et al., Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract, Int. J. Dev. Neurosci., 23(6), 501-507, 2005a.
22. Balu, M. et al., Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract, Neurosci. Lett., 383, 295–300, 2005b.
23. Balu, M. et al., Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats, Brain Res. Bull., 68, 469–473, 2006.
24. Devi, L. et al., Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction, J. Neurosci., 26, 9057–9068, 2006.
25. Yıldırım, M., Deneysel Epilepside Nitrerjik ve Purinerjik Sistemlerim Etkileşimi, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2005.
26. Roychowdhury, S. et al., Protection of primary glial cells by grape seed proanthocyanidin extract against nitrosative / oxidative stres, Nitric Oxide, 5, 137–49, 2001.
27. Shao, Z. H. et al., Cytotoxicity induced by grape seed proanthocyanidins: Role of

nitric oxide, Cell Biology and Toxicology, 3, 159–158, 2006.

28. Wink, D.A. et al., Antioxidant effects of nitric oxidei, Methods Enzymol., 301, 413–424, 1999.
29. Wink, D. A. et al., Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O2 reaction, Chem. Res. Toxicol., 7, 519-525, 1994.
30. Buisson A. et al., Nitric oxide: an endogenous anticonvulsant substance, Neuroreport, 4, 444–446, 1993.
31. Penix, L.P., Davis, W., Subramanian, S., Inhibition of NO synthase increases the severity of kainic acid-induced seizures in rodents, Epilepsy Res., 18, 177–184, 1994.
32. Marangoz, C., Ayyıldız, M., Ağar, E, Evidence that sodium nitroprusside possesses anticonvulsant effects mediated through nitric oxide, NeuroReport, 5, 2454–2456, 1994.
33. Ferraro, L., et al., Differential effects of intrastriatal neurotensin(1-13) and neurotensin(8–13) on striatal dopamine and pallidal GABA release. A dual-probe microdialysis study in the awake rat, Eur. J. Neurosci., 9, 1838-1846, 1997.
34. Mulsch, A. et al., Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. Neuroreport, 5, 2325– 2328, 1994.
35. Smith, M.A. et al., Oxidative damage in Alzheimer's, Nature, 382, 120-121, 1996.
36. Yasuda, K, et al., Modulation of hypoglossal motoneuron excitability by NK1 receptor activation in neonatal mice in vitro, J. Physiol, 534, 447–464, 2001.
37. Yılmaz, T., Canlıda Organik Yapı, s. 613, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2007.
38. Özgüneş, H., Atasayar, S., Aminoguanidin ve Hastalıklardaki Önemi, Türkiye Klinikleri, J. Med. Sci., 29 (4), 876-986, 2009.
39. Southan, G.J., Szabó, C., Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms, Biochem. Pharmacol., 51 (4), 383–394,1996.
40. Jarogniew, J.K. et al., 7-Nitroindazole enhances dose-dependently the anticonvulsant activities of conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model, Pharmacological Reports, 58, 660-671, 2006.

41. Bozbuğa, M., Nörobilim renkli Atlası., s. 444, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004.
42. Dere, F., Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji, s. 356, Okullar Pazarı Kitabevi, Adana, 1990.
43. Noyan, A., Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, s. 1157, Meteksan, Ankara, 1999.
44. Marangoz, C., Sinir Fizyolojisine Giriş, s. 370, Basılmamış Ders Notu, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2004.
45. Çakıl, D., Memantin ve Kanabinoidlerin Etkileşiminin Penisilin ile Oluşturulan Deneysel Epilepsideki Rolü, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2009.
46. Mountcastle, V.B., The columnar organization of the neocortex, Brain, 120, 701-722, 1997.
47. Brain Facts, The Society for Neuroscience, Washington, 2002. http://www.sfn.org/skins/main/pdf/brainfacts/2008/brain_facts.pdf., Temmuz 2010.
48. O'Donohoe N.V., Epilepsises of childhood, 2nd ed. London Butterworth-Heinemann, 1985.
49. Engel, J.J., ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology, Epilepsia, 42, 796 -803, 2001.
50. Per, H., Dirençli Epilepsili Çocuklarda Selenyum ve Bor Düzeylerinin Serum ve İdrarda Değerlendirilmesi, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 2010.
51. Griffin, J., Wyles, M., Epilepsy Towards Tomorrow, Office of Health Economics, London, 1991.
52. Naderi, S., Acar, F., Mertol, T., Arda, M.N., Functional anatomy of the spine by Avicenna in his eleventh century treatise "Al-Qanun fial-Tibb" (The Canons of Medicine), Neurosurgery, 52, 1449–1453, 2003.
53. Jackson, J.H., On a particular variety of epilepsy (Intellectual aura): One Case with Symptoms of Organic Brain Disease. In: Taylor J, ed. Selected writing of JH. Jakson, Hodder and stroughton, London Vol 1, 400–405, 1958.
54. Berger, H., Über das Elektrenkephalogramm des Menschen, 1st report, Arch. Psychiat. Nervenkr., 87, 527-570, 1929.
55. Gibbs, F.A., Lennox, W.C., Cibbs, E.L., The electro-encephalogram in

diagnosis and in localization of epileptic seizures, Arch. Neurot. Psychiatry 36, 1225–1235, 1936.

56. Lennox, W.G., Epilepsy and related disorders, Little, Brown and Company, Vol 1, pp.532–574, Boston, 1960.
57. Lennox, W.G., Davis, J.P., Clinical correlates of the fast and slow spike-wave Electroencephalogram, Pediatrics, 5, 626–644, 1950.
58. Blume, W.T. et al., Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology, Epilepsia, 42(9), 1212–1218, 2001.
59. Engel, J.J., International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology, Epilepsia, 42(6), 796–803, 2001.
60. Baulac, S., et al., Fever, genes, and epilepsy, Lancet Neurol, 3, 421-430, 2004.
61. DiMario, F.J.J., Paroxysmal nonepileptic events of childhood, Semin. Pediatr. Neurol., 13, 208-221, 2006.
62. Rodriguez, A.J., Pediatric sleep and epilepsy, Curr. Neurol. Neurosci. Rep., 7, 342–347, 2007.
63. Mac, T.L. et al., Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a systematic review, Lancet Neurol., 6, 533-543, 2007.
64. Raspall-Chaure, M, et al., The epidemiology of convulsive status epilepticus in children: a critical review, Epilepsia, 48, 1652–1663, 2007.
65. Wirrell, E., Farrell, K., Whiting, S., The epileptic encephalopathies of infancy and childhood, Can. J. Neurol. Sci., 32, 409-418, 2005.
66. Gardiner, M., Genetics of idiopathic generalized epilepsies, Epilepsia, 46 Suppl 9, 15–20, 2005.
67. Hirsch, E., Childhood epilepsy syndromes with both focal and generalized seizures, Acta Neurol. Scand. Suppl., 181, 52-56, 2005.
68. Silverstein, F.S., Jensen, F.E., Neonatal seizures, Ann. Neurol., 62, 112-120, 2007.
69. Wright, N.B., Imaging in epilepsy: a pediatric perspective, Br. J. Radiol., 74, 575-589, 2001.
70. Aarli, J.A., Epilepsy and the immune system, Arch. Neurol., 57, 1689-1692, 2000.
71. Schwartzkroin, P.A., Walsh, C.A., Cortical malformations and epilepsy. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev., 6, 268-280, 2000.

72. Thiele, E.A., Gonzalez-Heydrich, J., Riviello, J.J.J., Epilepsy in children and adolescents, Child Adolesc Psychiatr Clin N Am, 8, 671–694, 1999.
73. Gastaut, H., Clinical and electroencephalographical classification of epileptic Seizures, Epilepsia, 11, 102–113, 1969.
74. Anonim, Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy1981, Proposal for revised clinical and electroencephalographic classsification of epileptic seizures, Epilepsia, 22, 489-501, 1981.
75. Anonim, Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy 1989. Proposal for revised classsification of epilepsy and Epileptic syndromes, Epilepsia, 30, 389–399, 1989.
76. Marangoz, C., Deneysel epilepsi modelleri, O.M.Ü. Tıp dergisi, 14(3), 147-186, 1997.
77. Özkara, Ç., Ataklı, D., Epilepsi 2, s. 116, 5US yayınları, İstanbul. 2002.
78. Sanei, S., Chambers, J.A., EEG Signal Processing**,** p. 289, John Wiley & Sons Ltd, , England, 2007.
79. Marangoz, C., Bağırıcı, F., Proconvulsant effects of central and peripheral administration of L-NAME on penicillin-induced epilepsy in rats. Neurosci. Res. Commun, 28: 107 – 114, 2001.
80. Toprak, İ.B., EEG Sinyallerinin Dalgacık Dönüşümü ve Yapay Sinir Ağları ile Analizi, Yüksek lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2007.
81. Fox, I. S., A Laboratory Guide to Human Physiology: Concepts and Clinical Applications, p. 410, McGraw-Hill, Ohio, 2002.
82. Al-Qudah, A., Tahmimi, A.F., Ghanem, S., Electroencephalography in the managemennt of surgically treated epileptic patients, Neuroscience, 5(1), 22-25, 2000.
83. Niedermeyer, E., da Silva, F.L., Electroencephalography, p.1309, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005.
84. Berköz, M. ve ark., Akut Lösemilerde Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi, Erciyes Tıp Dergisi, 30(3), 157–162, 2008.
85. McElroy, J.S., Kopsell, D.A., Physiological role of carotenoids and other antioxidants in plants and application to turfgrass stres management, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 37, 327–333, 2009.

86. Sivritepe, N., Doğada Oksidatif Stres; Asma, Üzüm ve Şarapta Antioksidantlar. Anadolu, J. of AARI, 11(2), 180–135, 2001.

87. Nizamlıoğlu, N.M, Nas, S., Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 20–35, 2010.

88. Uylaşer, V., İnce, K., Şaraptaki antioksidanlar ve fenolik bileşikler, Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21–23 Mayıs, Erzurum, 2008.

89. Shao, Z.H., et al., Grape seed proanthocyanidins protect cardiomyocytes from ischemia and reperfusion injury via Akt-NOS signaling, J. Cell Biochem., 107(4), 697-705, 2009.

90. Feng, Y. et al., Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. Brain Res Bull., 66(2), 120-127, 2005.

91. Feng, Y., et al., Grape seed extract given three hours after injury suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats, Pediatr. Res., 61(3), 295-300, 2007.

92. Wang, Q., et al., Dietary grape supplement ameliorates cerebral ischemia-induced neuronal death in gerbils, Mol. Nutr. Food Res., 49(5), 443-451, 2005.

93. Wang, Q., et al., Oral administration of grape polyphenol extract ameliorates cerebral ischemia/reperfusion-induced neuronal damage and behavioral deficits in gerbils: comparison of pre- and post-ischemic administration, J. Nutr. Biochem., 20(5), 369-377, 2009.

94. Yılmaz, İ., Farelerde Dipirona Karsı Gelisen Analjezik Toleransta Nitrik Oksidin Rolü, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 2008.

95. Türköz, Y., Özerol, E., Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Rolleri, Journal of Turgut Özal Medical Center, 4(4), 453–461, 1997.

96. Davies, M.G., Fulton, G.J., Hagen, P.O., Clinical biology of nitric oxide. Br. J. Surg., 82, 1598-610, 1995.

97. Atalık, K.E., Doğan, N., Nitrik oksit ve fizyolojik etkileri, Genel Tıp Derg., 7(3), 167–169, 1997.

98. Toda, N., Nitric Oxide and Dietary Factors: Part I-Nitric Oxide Synthesis and Action, Vascular Disease Prevention, 4, 39-44, 2007.

99. Tutar, Y., Geçkil, H., Karataş M., Biyokimya, s. 438, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2010.

100. Bulut, R., Alkol ile Uyarılan Mide Hasarına Cevapta Nitrik Oksit (NO)'in Rolü, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 1997.
101. Crawfoed, N.M., Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants, Journal of Experimental Botany, 57(3), 471–478, 2006.
102. Marangoz, C. Nitrik oksit ve deneysel epilepsi, O.M.Ü. Tıp Dergisi, 13**,** 165-183, 1996.
103. Boşnak, M. et al., The role of nitric oxide in the anticonvulsant effects of pyridoxine on penicillin-induced epileptiform activity in rats, Epilepsy Res., 76 (1), 49–59, 2007.
104. Punathil, T., Katiyar, S.K., Inhibition of non-small cell lung cancer cell migration by grape seed proanthocyanidins is mediated through the inhibition of nitric oxide, guanylate cyclase, and ERK1/2, Mol. Carcinog., 48(3), 232-242, 2009.
105. Feng, Y. et al., Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats, Brain Research Bulletin, 66, 120-127, 2005.
106. Moreno, D. A. et al., Inhibitory effects of grape seed extract on lipases, Nutrition, 19, 876–879, 2003.
107. Garwal, C. et al., Anti-angiogenic efficacy of grape seed extract in endothelial cells, Oncology Reports, 11, 681–685, 2004.
108. Sivaprakasapillai, B. et al., Effect of grape seed extract on blood pressure in subjects with the metabolic syndrome**,** Metabolism, 58(12), 1743–1746, 2009.
109. Badavi, M., et al., Effect of grape seed extract of lead induced hypertension and heart rate in rat, Pakistan Journal of Biological Sciences, 11 (6), 882–887, 2008.
110. El-Wahab, A. E. A., El-Adawi, H., Kasem, H.S., Towards understanding the hepatoprotective effect of grape seeds extract on cholesterol-fed rats, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2(3), 412–417, 2008
111. Park, S., Park, T. and Cha, Y., Grape seed extract (*Vitis vinifera*) partially reverses high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice, Nutrition Research and Practice, 2(4), 227–233, 2008.
112. Yamakoshi, J. et al., Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, Food and Chemical Toxicology, 40, 599–607, 2002.
113. Mattoo, T.K., Kovacevic, L., Effect of grape seed extract on puromycin-

aminonucleoside-induced nephrosis in rats, Pediatr. Nephrol., 18, 872–877, 2003.

114. Çetin, A., et al., Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver, The American Journal of Chinese Medicine, 36(5), 861–872, 2008.
115. Farbood, Y., Sarkaki, A., Badavi, M., Preventive effect of grape seed hydroalcholic extract on dementia type of Alzheimer's disease in aged male rats, International Journal of Pharmacology, 5(4), 257–262, 2009.
116. Yıldırım, M., Ayyıldız, M., Ağar, E., Endothelial nitric oxide synthase activity involves in the protective effect of ascorbic acid against penicillin-induced epileptiform activity, Seizure, 19(2), 102-108, 2010.
117. Bredt, D.S., et al., Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. Neuron, 7 (4), 615–624, 1991.
118. Moncada, S., Higgs, A., Fruchgott, R., XIV International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. Pharmacol. Rev., 49, 137-142, 1997.
119. Tariq, M. et al., Nitric oxide synthase inhibitor aminoguanidine potentiates iminodipropionitrile-induced neurotoxicity in rats, Neuroscience Letters, 276, 49-52, 1999.
120. Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B., Tissa Kappagoda, C., Mechanism of the endothelium-dependent relaxation evoked by a grape seed extract. Clin Sci (Lond). 114(4), 331-337, 2008.
121. Rehni, A.K. et al., Pharmacological inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates the development of seizures in mice, Nitric Oxide, 21(2), 120-125, 2009.
122. Byun, J.S., et al., Kainic acid-induced neuronal death is attenuated by aminoguanidine but aggravated by L-NAME in mouse hippocampus. Korean J Physiol. Pharmacol., 13(4), 265-271, 2009.
123. Tutka, P., et al., Different effects of nitric oxide synthase inhibitors on convulsions induced by nicotine in mice. Pharmacol Rep. 59(3), 259-267, 2007.
124. Homayoun, H., Khavandgar, S., Dehpour, A.R., Anticonvulsant effects of cyclosporine A on pentylenetetrazole-induced seizure and kindling: modulation by nitricoxidergic system, Brain Res., 939, 1-10, 2002.
125. Okuda, Y. et al., Aminoguanidine, a selective inhibitor of the inducible nitric oxide

synthase, has different effects on experimental allergic encephalomyelitis in the induction and progression phase, Journal of Neuroimmunology, 81, 201–210, 1998.

126. Zimmerman, G.A. et al., Neurotoxicity of advanced glycation endproducts during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine, Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 3744–3748, 1995.
127. Jerrett, S.A., Jefferson, D., Mengel, C.E., Seizures, $H_2O_2$ formation and lipid peroxides in brain during exposure to oxygen under high pressure, Aerosp. Med. 44(1), 40-44, 1973.
128. Borowicz, K.K., Kleinrok, Z. and Czuczwar, S.J., 7-Nitroindazole differently affects the antoconvulsant activity of antiepileptic drugs against amygdala-kindled seizures in rats, Epilepsia, 41(9), 1112-1118, 2000.
129. Łuszczki, J.J., et al., 7-Nitroindazole enhances dose-dependently the anticonculsant activities of conventional antiepileptic drugs in the Mouse maximal electroshock-induced seizure model, Pharmacological Reports, 58, 660-671, 2006.
130. Aslan, A., Penisilin Modeli Deneysel Epilepside Leptin ve Ghrelinin Etkileri: Elektrofizyolojik Bir Çalışma, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2008.
131. Vanaja, P., Ekambaram, P., Demonstrating the dose- and time-related effects of 7-nitroindazole on picrotoxin-induced convulsions, memory formation, brain nitric oxide synthase activity, and nitric oxide concentration in rats, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 77, 1 –8, 2004.
132. Jayakumar, A.R., et al., Involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase activity in anticonvulsive action, Brain Research Bulletin, 48(4), 387–394, 1999.
133. Laszlo, F., Evans, S.M., Whittle, B.J., Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature *in vivo*. Eur. J. Pharmacol., 272(2-3), 169-175, 1995.