

Tavşanlarda topikal penisilin uygulaması ile oluşturulan deneysel epilepsi sonucu beyin eser element değişiklikleri

*Ahmet Koyu, **Galip Akhan, **Hasan Rifat Koyuncuoğlu

* Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Isparta
**Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji AD, Isparta

Özet

Bu çalışmanın amacı çinko (Zn) ve bakırın (Cu) epilepsi fizyopatolojisindeki rollerini araştırmaktır. Bunun için, tavşanlarda topikal penisilin uygulaması ile deneysel epilepsi oluşturuldu. Çalışma 20'si deneysel epilepsi grubu ve 20'si kontrol grubu olmak üzere 40 adet tavşan üzerinde gerçekleştirildi. Tavşanların dört farklı korteks alanına vida elektrotlar yerleştirildi. Posterior sensorimotor alana 60 bin ünite potasyum penisilin G damlatılması sonrasında elektrofizyolojik ve klinik nöbet gözlemlendi ve elektrokortigogramları kaydedildi. Nöbet gözlemlendikten iki saat sonra tavşanlar dekapite edilerek beyinleri çıkarıldı. Beyinler nitrik asitle homojenize edildikten sonra Zn ve Cu düzeyleri atomik absorpsiyon aleti ile ölçüldü. Epilepsi oluşturulan gruptaki Zn miktarlarında düşüklük, Cu miktarlarında ise yükseklik tespit edildi. Fakat bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuç olarak tavşanlarda topikal penisilin uygulamasının beyin Zn ve Cu düzeylerini anlamlı düzeyde etkilemediği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, çinko, bakır, eser element, penisilin.

Abstract

The brain trace elements changes in experimental epilepsy induced by topical penicillin application in rabbits

The aim of this study was to investigate the role of zinc (Zn) and copper (Cu) on physiopathology of epilepsy. For this purpose, experimental epilepsy model was formed by penicillin application in rabbits. Forty rabbits were used and divided into equal two groups as experimental epilepsy group and control group. Screw electrodes were applied in four different cortical regions in rabbits. Electrophysiological and clinical seizures were observed after 60000 IU penicillin dropped in posterior sensory motor area, and their electrocortigograms were recorded. The animals were decapitated two hours later and their brains were evaluated. Brains were homogenized in nitric acid solution and the levels of Zn and Cu were measured using atomic absorption device. We found that Zn levels in rabbits induced epilepsy were lower and Cu levels were higher than control groups. But these differences were not statistically significant. In conclusion, topical penicillin application had no significant effect Zn and Cu levels in brain of rabbits.

Keywords: Epilepsy, zinc, copper, trace elements, penicillin.

Giriş

Epilepsi, en önemli nörolojik hastalıklardan birisidir. Deneysel epilepsi modellerinin geliştirilmesi, fizyopatolojiye ve tedaviye katkısı olacağından önemlidir. Hayvanlarda ve insanlarda epileptik nöbet oluşturabilecek bir çok madde bilinmektedir(1). Bu maddelerin bazıları topikal, bazıları ise sistemik olarak (parenteral vb.) verilince epileptik nöbet oluşturur. Epilepsi oluşturan maddeler arasında penisilin de vardır(2). Penisilin ile oluşturulan deneysel epilepsi modeli, insanda gözlenen nöbetlere kısmen benzerdir. Penisilin dendritleri etkileyip gama-amino bütirik asit (GABA) üzerinden epilepsiye neden olduğu sanılmaktadır(3).

Eser elementlerin çeşitli metabolik olaylarda rol oynadığı, özellikle çinko (Zn) ve bakır (Cu)'ın sinir

iletiminde, glutamat dekarboksilaz ve glutamat dehidrogenaz gibi bir çok enzimin fonksiyonlarını etkilediği bilinmektedir(4). Antiepileptik ilaç (AEİ) kullanmayan epileptik hastalarda, normallere göre Zn seviyesi yüksek, normal veya düşük bulunmuştur(5-10). Bunun yanında bazı AEİ'nin serum Cu ve Zn değerlerinde değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir (4,11,12). AEİ'lerin serum Zn seviyesini düşürerek etki ettiğini ileri süren yazarlarda vardır(5).

Çinko ve Cu gibi 2 pozitif değerli eser elementlerin beyinde fazla miktarda olmasının epilepsiyi başlatan sebep olduğu ileri sürülmüştür (13). Ayrıca; bu elementlerin topikal uygulaması ile deney hayvanlarında epileptik nöbet oluşturulmaktadır (14). Epilepsiye dirençli rat beyinlerindeki eser element miktarlarının artırılması, bu hayvanların epilepsi eşiklerini düşürmektedir (15). Genetik olarak epilepsiye yatkın rat beyinlerinde normal ratlara oranla bu elementlerin daha fazla miktarda bulunduğu gözlenmiştir (13). Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda topikal olarak

Yazışma Adresi:

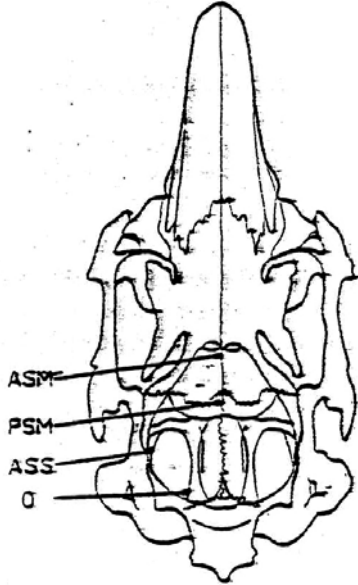
Yrd Doç Dr Ahmet KOYU
SDÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı 32000, Isparta
Tel: 0246 2113291 Fax: 0246 2371165
E-mail: ahmetkoyu@tnn.net

penisilin uygulaması sonucu epileptik nöbet geçiren tavşan beyinlerinde Zn ve Cu düzeylerinde değişiklik olup olmadığı araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışma, 20'si deneysel epilepsi grubu ve 20'si kontrol grubu olmak üzere 40 adet Yeni Zelanda tipi tavşan üzerinde yapıldı. Tavşanlar Ankara Hıfz-ı Sıhha Enstitüsünden temin edildi ve ortalama ağırlıkları 1000 ± 100 gramdı.

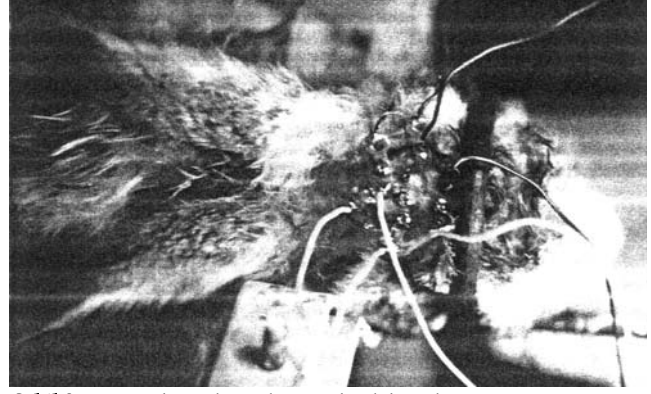
Operasyon için Manuer ve Gangkof'un tarif ettiği şekilde hazırlanan masaya tavşanlar bağlandı (16). Anestezi için 50 mgr/kg ketamin ve 0.5 mgr/kg diazepam intramüsküler olarak verildi. Anestezi altındaki hayvanların saçlı derisi temizlendi ve 5 cm'lik sagittal bir insizyonla saçlı deri kesilerek perikraniyumdan sıyrıldı. Tavşanların oksipital korteks, asosiyatif korteks, anterior ve posterior sensorimotor korteksine uyan bölgelerden delici alet ile 0.8 mm çapın-



Şekil 1. Tavşan kafatasında elektrotların yerleşimi

ASM: Anterior Sensorimotor Alan
PSM: Posterior Sensorimotor Alan
O: Oksipital Alan
ASS: Asosiyatif Alan

da duraya kadar birer delik açıldı (Şekil 1). İnce uçlu bistürü ile dural insizyon yapıldı ve 1 mm çapında vida elektrotlar bu deliklere yerleştirildi (Şekil 2). Elektrotların uçları Esoeto Biomedica Sirius dijital EEG cihazına bağlandı. Operasyon bittikten ve anestezi etkisi geçtikten iki saat sonra tavşanların normal elektrokortikogramları (ECoG) kaydedildi. Böylece operasyonun yada anestezi maddenin oluşturabileceği epileptik aktiviteden uzaklaşmış oldu. Daha sonra sol posterior sensorimotor alandaki vida elektrot çıkarıldı. Buraya yaklaşık olarak 60 bin ünite potasyum penisilin G damlatıldı. Vida elektrot hemen



Şekil 2. Tavşanda yerleştirilmiş vida elektrotlarının görünüşü

üstüne monte edildi. Elektrofizyolojik ve klinik nöbet gözlemlendi. İlaç verildikten ve nöbet gözlemlendikten iki saat sonra tavşanlar dekapite edildi.

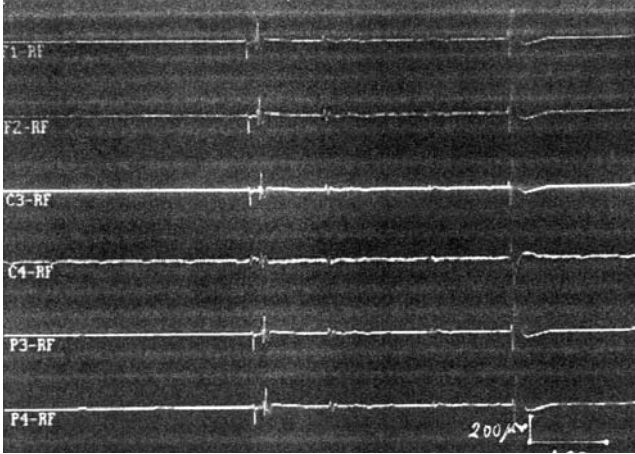
Kontrol grubundaki yirmi tavşana da aynı cerrahi işlem ve anestezi madde kullanıldı. Kristalize penisilin yerine serum fizyolojik damlatıldı. Geniş bir kraniotomi ile plastik malzeme kullanılarak beyinler çıkarıldı. Sağ ve sol hemisferler ayrıldı. Hassas terazi ile tartıldıktan sonra tüm materyal toplanana kadar -70 oC de derin dondurucuda bırakıldı. Çalışma bittikten sonra tüm materyaller 100 oC de otoklavda iki gün kurutuldu. Porselen kaplar içinde 500 oC de yakılan materyaller 2 ml 3 normal nitrik asitle hemojenize edildi.

Eser element düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Hitachi marka atomik absorpsiyon aleti ile ölçüldü. Çalışmaya başlamadan önce 5 standart solüsyon ölçüldü ve korelasyon koeffisienti 0.998 olarak saptandı. Topical penisilin uygulanan hemisferden elde edilen sonuçlar, karşı hemisferi ve kontrol grubu olarak normal tavşanlardan elde edilen değerler ile karşılaştırıldı. İstatistiksel değerlendirmeler, "SPSS 9.00 for Windows" istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Bağımsız iki grup arasındaki fark Student-t testi ile değerlendirildi. Sonuçlar aritmetik ortalama standart hata (SEM) olarak verildi.

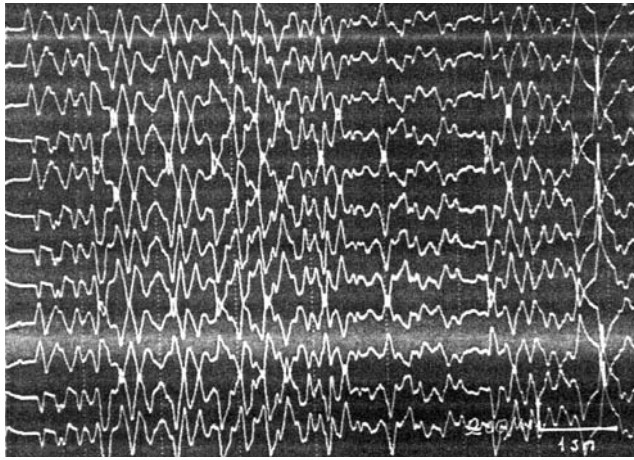
Bulgular

Topikal penisilin uygulanan tavşanlar ilaç verildikten ortalama 6.9 ± 4 dakika sonra fokal, 11.8 ± 6 dakika sonra jeneralize nöbet geçirdiler. Topikal penisilin uygulaması sonucunda nöbet geçirmeyen tavşan yoktu. En erken 2 dakika içinde, en geç 10 dakika içinde fokal başlayıp jeneralize olan nöbet gözlemlendi ve nöbet anında ECoG da epileptik aktivite ortaya çıktı (Şekil 3-4). Tavşanların %80 inde status epileptikus gelişti. Kontrol grubunda elektrofizyolojik ve klinik olarak hiçbir nöbet gözlenmedi.

Epileptik nöbet oluşturulan grupta beyin Zn değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 3. Periyodik spike boşalmaları



Şekil 4. Yüksek amplitüdü, keskin karakterli yavaş dalga boşalmaları

olmayan bir düşüklük gösterdi ($p>0.05$). Penisilin uygulanan hemisferdeki Zn değeri karşı hemisferdekine oranla bir miktar yüksek olmasına rağmen, bu değerler de istatistiksel olarak anlamlı değildi

Tablo : Epilepsi ve kontrol grubunun Zn ve Cu değerleri (Ortalama \pm SEM)

Materyal	Zn ($\mu\text{g}/\text{gr}$) \pm SEM	Cu ($\mu\text{g}/\text{gr}$) \pm SEM
Topikal penisilin uygulanan hemisfer	21.3 \pm 3.5	4.5 \pm 0.2
Epilepsi grubu karşı hemisfer	20.5 \pm 2.6	3.4 \pm 1.3
Kontrol grubu sol hemisfer	24.3 \pm 4	3.6 \pm 0.9
Kontrol grubu sağ hemisfer	24.4 \pm 4	3.2 \pm 0.5

($p>0.05$) (Tablo).

Epileptik nöbet oluşturulan gruptaki beyin Cu değerleri de, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükseklik gösterdi ($p>0.05$). Diğer taraftan topikal penisilin uygulanan hemisferdeki Cu seviyesi de karşı hemisferinkine göre bir miktar yüksek bulundu, fakat bu değerler de istatistiksel olarak anlamlı değildi($p>0.05$) (Tablo).

Tartışma

Beyin korteksine direk olarak uygulanan penisilin epileptik nöbet oluşturması; inhibitör postsinaptik potansiyeli (IPSP) bloke ederek meydana gelmektedir. Bir kortikal bölgede, inhibisyon miktarının azalması, nöron gruplarının davranışı üzerinde çok önemli etkiye sahiptir. Bu nedenle konvülsan bir ilacın uygulanması, hücrede morfolojik değişikliklere sebep olmaksızın akut fokal epilepsi oluşturabilir(17). Sullivan ve Osorio intraperitoneal yolla penisilin G vererek ratlarda epileptik aktivite oluşturmuşlardır(18). Walden ve ark. korteks yüzeyine lokal penisilin uygulamışlar ve 4-5 dakika sonra ECoG'da epileptiform potansiyeller görüldüğünü bildirmişlerdir(19). Bizim çalışmamızda da, intrakortikal penisilin uygulanmasından sonra 6.9 ± 4 dakika içinde diken dalgalar ortaya çıkmıştır.

Chung ve Johnson'nun yapmış oldukları çalışmada, Zn ve Cu'nun beyinde fazla miktarda olması epileptiyi başlatan sebep olarak gösterilmiştir(13). Bu eser elementler GABA sentezi için gerekli birçok koenzimin yapısında bulunmaktadır. Ayrıca Zn, Cu, kadmilyum, kobalt, manganez ve nikel GABA'nın reseptörlere bağlanmasını engeller. GABA'nın α , β ve δ olmak üzere üç tip reseptörü vardır. Bunlardan α ve β reseptörleri Zn'ya karşı duyarlıdır(2). Pei ve ark. intraserebral Zn enjeksiyonu ile epileptik nöbetlerin oluştuğunu, intravenöz verilmesi halinde ise nöbetlerin oluşmadığını belirtmişlerdir(14).

Kedilerde kindling modeli ile oluşturulan epilepsilerde hipokampal bölgede Zn miktarının arttığı gösterilmiştir(20). Kedilere Zn'den zengin diyet verildiğinde nöbet oluşturabilmek için daha yüksek uyarıların verilmesi gerektiği gözlenmiştir (20). Ayrıca fotosensitif ve odyosensitif yol ile oluşturulan deneysel epileptik nöbetlerinde hipokampal Zn seviyesinin arttığı bildirilmiştir (21). Marangoz ve ark.rı ratlarda intraperitoneal olarak 3 milyon IU/kg penisilin uygulaması sonrasında beyindeki Zn düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gösterdiğini rapor etmişlerdir(21). Bu da penisilin, lokal veya sistemik uygulaması sonrası Zn düzeyleri üzerine farklı etkiler yapabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızdaki beyin Cu düzeyleri, daha önceki araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bulundu(4,13).

Sonuç olarak, tavşanlarda topikal penisilin uygulamasının beyin Zn ve Cu düzeylerini anlamlı düzeyde etkilemediği kanaatine vardık. Bulgulardaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olmaması, hemisferlerin total olarak değerlendirilmiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Bazı araştırmalar Zn'nin amigdaloit bölgede yoğunlaştığını göstermektedir(13). İleride

yapılacak çalışmalarda, değişik uyarım yöntemleri ile özellikle beynin belli bölgelerindeki eser element değişikliklerinin incelenmesinin daha yararlı olacağı düşünceyiz.

Kaynaklar

1. Long VG. Electroencephalographic atlas for pharmacological research. Rabbit Brain Research. Volume II. Newyork, Elsevier 1962;1-13
2. Curtis DR, Game CJA, Mc Culloch MR, Maclachalan RM. Convulsive action of penicillin. Brain Research 1972;43:242-5
3. Harris GL, Harris AB, Wick C. Penicillin effects on cortex synaptic vesicle uptake of horseradish peroxidase. Brain Res 1979;161:361-6.
4. Kuzuya T, Hasegawa T, Shimizu K, Nabeshima T. Effect of antiepileptic drugs on serum zinc and copper concentrations in epileptic patients. International Journal of Clinical Pharmacology. Therapy and Toxicology 1993;31(2):61-5
5. Dawidson DLW, Ward NI. Abnormal aluminium, cobalt, manganese, selenium and zinc concentrations in untreated epilepsy. Epilepsy Res 1988;2:323-30
6. Hiyashi A, Ikeda T, Matsukara M, Matudo I. Serum Zinc and vitamin E concentrations in handicapped children treated with anticonvulsants. Dev Pharmacol Ther 1982;5:109-13
7. İlhan A, Özerol E, Güleç M, Işık B, İlhan N, İlhan N et al. The comparison of nail and serum trace elements in patients with epilepsy and healthy subjects. Progression Neuro-Psychopharmacology and Biologica Psychiatry 2004;28:99-104
8. Barbean A, Donaldson J. Zinc, taurin and epilepsy. Arch Neurol 1974; 30:52-8
9. Verrotti A, Basciani F, Trotta D, Pomilio MP, Morgese G, Chiarelli F. Serum copper, zinc, selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in epileptic children before and after 1 year of sodium valproate and carbamazepine therapy. Epilepsy Res. 2002;48(1-2) :71-5.
10. Burhanoglu M, Tutuncuoglu S, Coker C, Tekgul H, Ozgur T. Hypozincaemia in febrile convulsion. Eur J Pediatr. 1996;155(6):498-501
11. Kaji M, Ito M, Okuno T, Momoi T, Sasaki H, Yamanaka C et al. Serum copper and zinc levels in epileptic children with valproate treatment. Epilepsia 1992;33(3):555-7
12. Sozuer DT, Barutcu UB, Karakoc Y, Yalcin E, Onen S. The effects of antiepileptic drugs on serum zinc and copper levels in children. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 1995;6(3-4):265-9
13. Chung SO, Johnson MS. Divalent transition metal ions in brains of epileptogenic and normal mice. Brain Research 1983;280: 323-34
14. Pei Y, Zhao D, Huang J, Cao L. Zinc induced seizures: A new experimental model of epilepsy. Epilepsia. 1983;24(2):169-76.
15. Le Quesne PM. Toxic substances and the nervous system: the role of clinical observation. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1981;44(1):1-8.
16. Monier M, Gangloff H. Atlas for Stereotaxic brain research. Rabbit Brain Research Volume I. Newyork Elsevier Publishing 1961:8-26
17. Martin HJ. The collective electrical behaviour of cortical neurons: the electroencephalogram and the mechanism of epilepsy. In: Kandel ER, Schwartz JH, and Jessell TM. Eds. Principles of Neural Science. 3rd Ed., New York, Amsterdam, Elsevier Science Publishing 1991:77-791.
18. Sullivan HC, Osorio I. Aggravation of penicillin-induced epilepsy in rats with locus ceruleus lesions. Epilepsia 1991;32:591-6.
19. Walden J, Straub H, Speckmann EJ. Epileptogenesis: Contributions of calcium ions and antiepileptic calcium antagonists. Acta Neurologica Scandinavica (Suppl.) 1992;150:41-6.
20. Strerman MB, Shouse MN, Fairchild MD, Belsito O. Kindled seizure induction alters and is altered by zinc absorption. Brain Research 1986,1:382-6
21. Marangoz C, Aęar E, Ayyıldız M, Taşcı N. Levels of zinc in the cerebral hemispheres following parenteral penicillin in rats. Journal of Islamic Academy of Science 1989;2:62-4