

Tek ve Tekrarlanan Pentilentetrazol Dozlarıyla Oluşturulan Konvulsiyonlarda Epileptik Aktivite ve Kan-Beyin Engeli Permeabilite Değişikliklerinin Araştırılması

Evaluation of Changes in the Convulsive Behavior and Blood-Brain Barrier Permeability Induced by Acute and Alternate Day Pentylene-tetrazole Administration

Gül İLBAY¹, Nurbay ATEŞ¹, Deniz ŞAHİN¹, Nilüfer ESEN¹, Ayşe KARSON¹

Epilepsi 1997;3(1-3):11-15

Çalışmamızda Wistar albino erkek sıçanlarda, akut ve günün başında tekrarlanan pentilentetrazol (PTZ) verilmesini takiben konvulsif davranış ve makromoleküllere karşı kan-beyin engelinin (KBE) geçirgenliği araştırıldı. Sıçanlar üç gruba ayrıldı: a) Tek doz (55 mg/kgx1) PTZ konvulsiyon grubu, b) Tekrarlanan dozlarda (55 mg/kgx6) PTZ konvulsiyon grubu, c) Kontrol grubu. Çalışma grubu sıçanlarına, KBE geçirgenliğini izleyebilmek için Evans blue verildi. Pentilentetrazol verilen tüm sıçanlarda tonik-klonik konvulsiyonlar oluştu. Ancak epileptik nöbet aktivitesinin toplam süresi, tek doz i.v. enjeksiyonundan sonra oluşana göre 6. i.v. enjeksiyondan sonra belirgin olarak kısalmıştı ($p < 0.05$). Tek doz hızlı i.v. enjeksiyona bağlı nöbetler tüm sıçanlarda preoptik alan, kaudat nükleus, putamen, talamus, hipotalamus, ortabeyin, kollikulus superiorıda bilateral Evans blue sızıntısına yol açtı. Buna karşın 55 mg/kg günün başında PTZ uyguladığımızı izleyerek verilen 6. doza bağlı nöbetler yedi sıçanın yalnızca üçünde KBE açılımına yol açtı ve bu açılım birkaç beyin sahasıyla sınırlı idi. Bu sonuçlar, tek doz PTZ alan sıçanlarda engelin açılımının, günün başında PTZ alan sıçanların KBE açılımına göre belirgin olarak farklı olduğunu göstermekte ve farklılığın PTZ toleransına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Epileptik nöbetler, kan-beyin engeli, pentilentetrazole.

Pentilentetrazol (PTZ) deneysel epilepsi modellerinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan sistemik konvulsif bir ajandır. Doza ve veriliş tarzına bağlı olarak klonik ya da tonik-klonik konvulsiyonlar oluşturur.^{1,2} Meydana gelen jeneralize tonik-klonik nöbetlerin serebrovasküler geçirgenliği arttırdığı ve normalde beyne geçemeyen makromoleküllerin hasarlanan kan-beyin engeli bölgelerinden geçişini sağladığı pek çok araştırmacı tarafından

This study investigated changes in the convulsive behavior and blood-brain barrier (BBB) permeability to macromolecules following acute and alternate day administration of pentylene-tetrazole (PTZ) in Wistar albino male rats. The rats were divided into three groups: a) acutely induced PTZ convulsion group (55 mg/kgx1); b) alternate day administration group (55 mg/kgx6); and c) the control group. Study animals were given Evans blue dye to serve as a marker of blood-brain barrier leakage. All pentylene-tetrazole-administered rats developed tonic-clonic convulsions. However, compared with that observed in the first group, total duration of epileptic seizure activity was significantly decreased after the last PTZ administration ($p < 0.05$). Seizures induced by acute administration resulted in bilateral EB leakage in the preoptic area, nucleus caudatus, putamen, thalamus, hypothalamus, midbrain, and the superior colliculus. However, seizures induced by the last dose of alternate day administration led to leakage in only two rats, which was confined only to a few brain areas. These results indicate that the barrier opening of rats receiving single dose of PTZ markedly differs from that found in rats receiving PTZ on alternate days and that the difference may be due to PTZ tolerance.

Key Words: Epileptic seizures, blood-brain barrier, pentylene-tetrazole.

gösterilmiştir. Pentilentetrazolun etki mekanizmasının direkt eksitatör etkisinin yanı sıra GABA reseptör blokajı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.³ Bazı çalışmalarda tekrarlanan subkonvulsif PTZ dozu uygulanmasına karşı bir toleransın geliştiği öne sürülmektedir. Klinik uygulamalarda en önemli sorunlardan biri kronik nöbet aktivitesinin serebrovasküler permeabiliteyi nasıl etkilediği ve anti-epileptik tedavinin bu uzun süreçteki etkisinin nasıl geliştiğidir.⁴ Epilepsi konusundaki yoğun çalışmalara rağmen, uzun süreli tekrarlayan nöbetlerin kan-beyin engeline etkisi ve bununla ilişkili olarak epileptik aktivite değişiklikleri tam olarak açıklığa

¹Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dah

kavuşturulmuş değildir. Bu çalışmamızda biz, tek doz PTZ nöbetleri ve nöbetlerin kan-beyin engeli ve epileptik nöbet aktivitesi üzerine etkilerini araştırmayı planladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 20-24 haftalık Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar kafeslerde dörtlü olarak, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık rejiminde tutuldu. Standart sıçan yemi ve çeşme suyunu ad libitum olarak alan hayvanlar üç gruba ayrıldı: a) Tek doz PTZ konvulsiyon grubu, b) Tekrarlanan dozlarda PTZ konvulsiyon grubu, c) Kontrol grubu.

Kontrol ve tek doz PTZ grubundaki hayvanlar eter anestezisi altında femoral venlerinden kanüle edildi. Kanülün ucu subkutan ilerletilip hayvanın sırtında boyuna yakın yerde çıkarılarak sabit hale getirildi. Yaklaşık iki saat hayvanın tamamen kendine gelmesi beklendikten sonra, 3 ml/kg %2'lik Evans blue (EB) i.v. olarak enjekte edildi. Beş dakikalık süreyi takiben akut konvulsiyon grubundaki hayvanlara i.v. 55 mg/kg PTZ enjeksiyonu yapıldı.² Toplam enjeksiyon volümü 1 ml olarak düzenlendi. Kontrol grubundaki hayvanlara aynı miktarda %0.9 NaCl verildi. Yaklaşık 30 dakika süresince hayvanlar epileptik aktivite açısından izlendikten sonra, aorta kanüle edilerek serum fizyolojik ile perfüzyon yapıldı ve beyinler çıkarılarak 24 saat formalin içinde fikse edildi.

Tekrarlanan dozlarda PTZ verilen gruptaki hayvanlara gınaşırı olarak toplam altı kez 55 mg/kg PTZ (intraperitoneal) enjeksiyonu uygulandı. Her enjeksiyon sonunda yaklaşık 30 dk nöbet aktivitesi gözlemlendi. Son enjeksiyondan önce hayvanlar eter anestezisi altında femoral venlerinden kanüle edildi ve tek doz PTZ grubunda uygulanan işlemler tekrarlandı. Perfüzyon ve fiksasyon EB geçişi ve dağılımı makroskobik olarak değerlendirildi.^{5,6}

Kan-beyin engeli geçirgenliği, EB varlığına göre anatomik beyin bölgelerinde stereotaksik atlas yar-

dımıyla saptandı ve değerlendirmeler 0=yok, += hafif mavi, ++=koyu mavi şeklinde yapıldı.

Epileptik nöbet aktivitesi ise, nöbet sıklığı, konvulsiyon süresi ve mortalite yüzdesi parametreleri kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca tekrarlanan enjeksiyonlara bağlı nöbet şekli değişiklikleri de izlenenek kaydedildi.

Evans blue ve PTZ (Sigma Co) serum fizyolojik içinde çözdürülerek uygulandı. Veriler ort. \pm SE (standart hata) olarak ifade edildi. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı; $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Epileptik nöbet aktivitesi:

Tüm hayvanlarda, 55 mg/kg PTZ jeneralize tonik-klonik nöbetlere yol açtı. Klonik nöbetler fasiyal ve ön üye kaslarının klonuslarına eşlik eden bıyık hareketlerini içermekteydi. Tonik-klonik nöbetler ise doğrulma reflekslerinin kaybı, hızlı koşu, baş-boyun kuyruk ekstansiyonu ve tüm vücut kaslarının tonik fleksiyonu ya da ekstansiyonunu kapsamaktaydı. Tek doz PTZ enjeksiyonu sonrası tonik-klonik nöbet süresi 737 ± 90 sn olarak saptandı. Günaşırı beş kez 55 mg/kg i.p. PTZ uygulananında her enjeksiyon sonrası hayvanlarda konvulsiyon gözlemlendi ve son i.v. enjeksiyonu arkasından nöbet süresi 430 ± 49 sn olarak ölçüldü. Akut doz PTZ grubu ile karşılaştırıldığında, son enjeksiyonun i.v. yapıldığı bu grupta ölçülen nöbet süresinin anlamlı derecede kısalmış olduğu saptandı ($p<0.05$) (Tablo 1). İlk enjeksiyon sırasında mortalite oranı %28.5, ikinci enjeksiyonda %30 idi. Daha sonraki enjeksiyonlarda ise ölüm gözlenmedi.

Kan-beyin engeli geçirgenliği:

Kontrol grubundaki hayvanların beyinlerinde EB geçişi gözlenmedi. Tek doz ve tekrarlanan dozların verildiği gruplarda ise kan-beyin engelini açılışını gösteren EB geçişi bilateral ve anatomik

TABLO 1

Tek Doz ve Tekrarlanan PTZ Dozları Sonrası Nöbet Sıklığı, Süresi ve KBE Yıkılımı

Grup	n	Tonik-klonik ^a nöbet	Nöbet süresi (saniye)	KBE yıkılımı ^b
Salin	7	7/0	-	7/0
Tek doz PTZ	7	7/7	737 ± 90	7/7
6. doz PTZ	7	7/7	$430\pm 49^*$	7/3

^a Değerler nöbet geçiren sıçan sayısını göstermektedir.

^b Makroskobik Evans blue ekstrasözasyonu görülen sıçan sayısı.

Değerler ort. \pm SE olarak gösterilmiştir. * $p<0.05$ (Tek enjeksiyona göre)

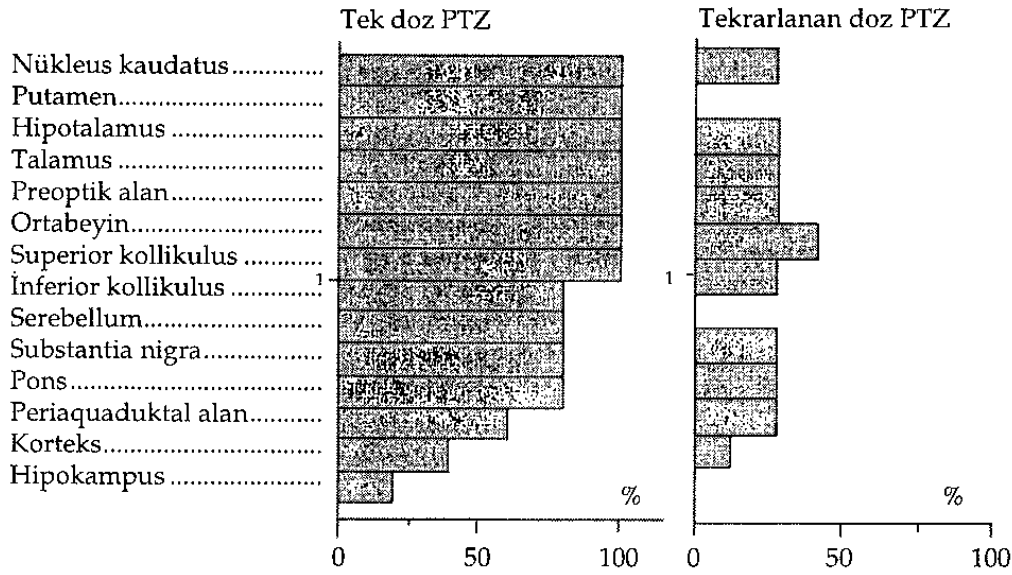
olarak sınırlı beyin bölgelerinde farklı bir dağılım göstermekteydi (Şekil 1). Tek doz PTZ'nin verildiği grupta kan-beyin engeli hasarına bağlı 1+ ve/veya 2+ şiddetindeki EB geçişleri tüm hayvanlarda mevcut idi (Şekil 2A). En yoğun şekilde preoptik alan, kaudat nükleus, putamen, talamus, hipotalamus, ortabeyin, kollikulus superior da gözlemlendi. Serebellum, kollikulus inferior, subtansia nigra ve pons da yaygın EB boyanması saptandı (Şekil 3A ve B).

Tekrarlanan dozlarda PTZ uygulanmasını izleyerek EB verilen grupta ise, kan beyin engeli yıkımının oldukça az olduğu görüldü. Bu grupta çalışılan hayvanların dördünün beyinlerinde herhangi bir engel açılımı saptanamadı (Tablo 1). Engel ha-

sarı saptanan diğer hayvanlarda ise EB geçişi kaudat nükleus, hipotalamus, talamus, kollikulus inferior ve superior, ortabeyin, serebellum, substantia nigra, pons ve sadece 1+ derecesinde oldukça hafif olarak gözlemlendi (Şekil 2B). Akut grupla karşılaştırıldığında bu grubun kan-beyin engeli yıkımının daha az ve yıkım şiddetinin de daha hafif olduğu ortaya çıkmaktadır.

TARTIŞMA

Pentilentetrazol, bicuculin ya da elektriksel uyarılar ile kan-beyin engeli permeabilitesinin arttığı birçok çalışmada bildirilmiştir.^{3,7} Konvulsif nöbetlerde gözlenen serebrovasküler permeabilite artışı-

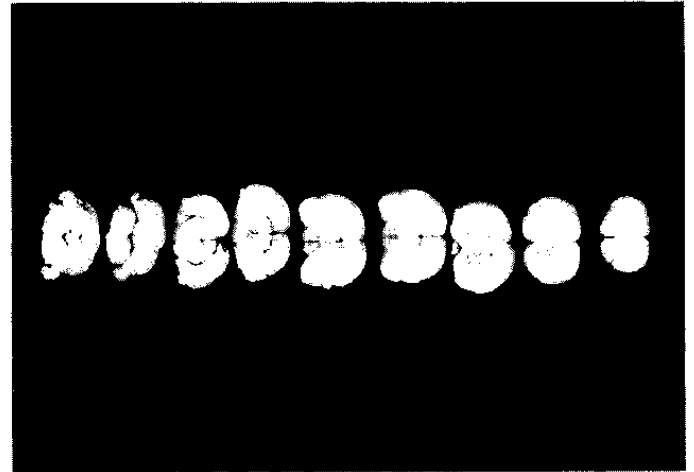


ŞEKİL 1

Nöbetle oluşan kan-beyin engeli bozukluğunun yüzde (%) dağılım frekansı.



A



B

ŞEKİL 2

A. Tek doz PTZ uygulaması sonrası kan-beyin engeli bozukluğunun görüldüğü çeşitli alanlar.

B. Günaşırı tekrarlanan PTZ uygulamaları sonrası daha az alanda ve daha hafif kan-beyin engeli açılımı.



A



B

ŞEKİL 3

Akut tek doz 55 mg/kg PTZ ile oluşan kan-beyin engeli yıkımı: A. Talamus ve hipotalamusta yaygın EB geçişi, B. Serebellum ve ponsta yoğun EB boyanması.

nun daha çok nöronal hiperaktivite ile ilişkili olduğu, daha önceki bir çalışmamızda gösterilmiştir.⁸ Bu çalışmada 55 mg/kg PTZ'nin tek doz uygulanması ile tüm hayvanlarda jeneralize tonik klonik nöbetlerin geliştiği ve buna bağlı olarak serebrovasküler permeabilitenin arttığı gösterilmiştir. Pentilen-tetrazol ile oluşturulan tonik-klonik nöbetlerin beyin sapı yapılarıyla yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir.⁹ Bu gözlem bulgularımız ile uyum halindedir. Gözlenen nöbet sıklığı, süresi ile etkilenen beyin bölgelerinin de farklı olduğu net olarak gösterilmiştir. Çalışmamızda özellikle tek ve tekrarlanan PTZ uygulamalarının gerek nöbet süresi, gerekse kan beyin engeli açılımında farklılıklara yol açtığı gösterilmektedir. Epileptik nöbet aktivitesi süresi, tekrarlanan enjeksiyonlardan sonra akut PTZ nöbetlerine oranla kısalmış olarak bulunmuştur. Bu sonuç, Parades ve ark.'nın gösterdiği tekrarlanan doz PTZ uygulanmasının epileptik aktivite gelişiminde bir toleransa yol açtığı bulgusunu doğrulamaktadır. Tolerans gelişimi, kan-beyin engelinin permeabilitesindeki geçici değişiklikler ve tekrarlanan enjeksiyonlar sonucu ilacın biyoyararlanımındaki farklılıkların oluşumu ile açıklanabilir.¹⁰ Ayrıca, tekrarlanan PTZ enjeksiyonları sonucu benzodiazepin reseptör sayısında artış olduğu da bildirilmiştir.^{11,12} Tekrarlanan PTZ nöbetleri sonucu epileptik aktivitede gözlenen kısalmaya, kan-beyin engeli yıkımında bir azalmanın eşlik etmesi, merkezi sinir sistemindeki bazı enzim ve nörotransmitterlerin sentezi, serbestleme ve re-uptake mekanizmalarında da modifikasyonların etkili olduğunu düşündürmektedir.¹⁰ Serebral damar endotel hücrelerinin serotonin, GABA, histamin ve P maddesi gibi nörotransmitterler için reseptörlere sahip olması bu modülasyonu olası kılmaktadır.¹³ Tek doz

PTZ uygulaması preoptik alan, kaudat nükleus, putamen, talamus, hipotalamus, ortabeyin, pons gibi birçok beyinsapı ve diğer bazı diensefalon yapılarında engel yıkımına yol açarken, tekrarlanan enjeksiyonların yalnızca bazı sıçanlarda hipotalamus, talamus, kollikulus inferior ve superior, kaudat nükleus, ortabeyin, serebellum, substantia nigra gibi bölgelerde oldukça hafif oranda yıkıma yol açması tolerans gelişimi ile açıklanabilir.

Konvulziyonlar sırasında artan nöronal aktivasyona bağlı olarak eksitatör ve inhibitör nörotransmitter salınımındaki aşırı artış serebral metabolizmada bir artışa yol açar. Bu artış da, konvulziyonlar sırasında sempatik sinirlerin vazokonstriktör cevabını azaltarak kan-beyin engeli üzerine potansiyel koruyucu etkisini maskeler.¹⁴ Serebral kan akımında otoregülasyonun kaybı, kontrolsüz vazodilatasyon, interstisyel sıvıdaki vazoaktif metabolitlerin konsantrasyonundaki değişimler ayrı ayrı ya da birlikte, serebrovasküler permeabilite değişimlerinde önemli olabilirler.^{15,16} Tekrarlanan PTZ uygulamasını takiben, inhibitör ve eksitatör nörotransmitter salınımındaki değişiklikler, GABA-benzodiazepin reseptör kompleksindeki değişiklikler ve etkilenen beyin bölgelerinin duyarlılığında gözlenen farklılıklar nöbet süresinin azalmasına ve kan-beyin engeli yıkımının belirli beyin bölgelerinde sınırlı kalmasına yol açan sebepler olabilir.¹⁷

Sonuçlarımız, tek doz ve tekrarlanan dozlarda PTZ uygulamasının kan-beyin engeli permeabilitesinde farklı açılıma yol açtığını, tek doz sonrası oluşan nöbetlerde epileptik aktivitenin çok sayıda beyin bölgesinde şiddetli engel yıkımına neden olmasına karşın, tekrarlanan PTZ uygulamasını takiben oluşan nöbetlerin ise daha az sayıda beyin bölgesinde hafif bir yıkıma yol açtığını göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Fisher RS. Animal models of epilepsie. *Brain Res Rev* 1989;14:245-78.
2. Goldman H, Berman RF, Hazlett J, Murphy S. Cerebrovascular responses to pentylenetetrazol: time and dose dependent effects. *Epilepsy Res* 1992;12:227-42.
3. Üzüm G, Ateş N, Ziylan YZ. Epileptik aktivite ve kan beyin bariyeri. *Tıp Fak Mec* 1993;58:48-51.
4. Reynolds EH. The prevention of chronic epilepsy. *Epilepsia* 1988;29(Suppl 1):S25-8.
5. McCaughran JA Jr, Manetto C. Changes in convulsive threshold in the developing rat following chronic administration of pentylenetetrazol. *Epilepsia* 1989;23:619-27.
6. Ziylan YZ, Lefauconnier JM, Ateş N, et al. Age-dependent alteration in regional cerebrovascular permeability during drug-induced epilepsy. *Mech Ageing Dev* 1992;62:319-27.
7. Ziylan YZ, Ateş N. Age-related changes in regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by pentylenetetrazol. *Neurosci Lett* 1989;96:179-84.
8. Ateş N, Üzüm G, Diler AS, et al. The cerebrovascular permeability and epilepsy. The role of blood pressure. *Neurosci Res Comm* 1992;10:163-9.
9. Veliskova J, Velisek L, Moshe SL. Age-specific effects of baclofen on pentylenetetrazole-induced seizures in developing rats. *Epilepsia* 1996;37:718-22.
10. Paredes GS, Orero RS, Alvarez EM, et al. Experimental spike-and-wave discharges induced by pentylenetetrazol and tolerance to repeated injections: an electrophysiological and biochemical study. *Epilepsy Res* 1989;4:139-146.
11. Lal H, Mann PA Jr, Shearman GT, Lippa AS. Effect of acute and chronic pentylenetetrazole treatment on benzodiazepine and cholinergic receptor binding in rat brain. *Eur J Pharmacol* 1981;75:115-9.
12. Syapin PJ, Rickman DW. Benzodiazepine receptor increase following repeated pentylenetetrazole injections. *Eur J Pharmacol* 1981;72:117-120.
13. Nitsch C, Klatzo I. Regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. *J Neurol Sci* 1983;59:305-22.
14. Mueller SM, Heistad DD, Marcus ML. Effect of sympathetic nerves on cerebral vessels during seizures. *Am J Physiol* 1979;237:178-84.
15. Soderfeldt B, Kalimo H, Olsson Y, Siesjo BK. Biccuculline-induced epileptic brain injury. Transient and persistent cell changes in rat cerebral cortex in the early recovery period. *Acta Neuropathol* 1983;62:87-95.
16. Brown WJ, Mitchell AG Jr, Babb TL, Crandall PH. Structural and physiologic studies in experimentally induced epilepsy. *Exp Neurol* 1980;69:543-562.
17. Hantraye P, Brouillet E, Guibert B, et al. Pentylenetetrazol-induced seizure is not mediated by benzodiazepine receptors in vivo. *Neuropharmacology* 1987;26:1509-12.