



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PENİSİLİN İLE OLUŞTURULAN
EPİLEPTİFORM AKTİVİTE MODELİNDE
OLEUROPEİN'İN OLASI ETKİSİ VE
NİTRERJİK SİSTEM İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Oğuzer USTA

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Sibel VELİOĞLU

TRABZON-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

06.02.2025
Oğuzer Usta

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilimsel bakış ve yaklaşımından faydalandığım, değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Sibel VELİOĞLU'na,

Eğitim sürem boyunca ve tez çalışmalarım sırasında kıymetli bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana her fırsatta yardımcı olan, rehberlik eden saygıdeğer hocam Doç. Dr. Mukadder OKUYAN'a,

Tez sürecim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Turan SET'e,

KTÜ Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet AYAR'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki laboratuvar çalışmalarını birlikte gerçekleştirdiğimiz Arş. Gör. Esra ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerini paylaşan, değerli katkılar sağlayan Doç. Dr. Gökhan ARSLAN'a,

Tez çalışmamız süresince ihtiyaç duyduğumuz her anda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Gülin RENDA'ya,

Tez çalışmamın planlanması ve çalışmamdan elde edilen verilerin biyokimyasal analizleri aşamasındaki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Ahmet ALVER ve Arş. Gör. Şeniz ERDEM'e,

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini sürdüren, bugünlere gelmemde en büyük fedakarlıkları göstermiş olan canım annem, babam, kardeşime, bu süreçte her zaman yanımda olup benimle hayatı paylaşan biricik eşime, doğduğu günden beri her gün bir mucizeye tanıklık etmemi sağlayan oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı **THD-2023-10803** nolu proje olarak destekleyen **Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine** de teşekkür ederim.

Oğuzer Usta

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Oleuropein	5
2.1.1. Oleuropeinin Antioksidan Özellikleri	6
2.1.2. Oleuropeinin Antiinflatuar ve Kardiyovasküler Hastalıklardan Koruyucu Etkisi	7
2.1.3. Oleuropeinin Otofaji İndükleyici Etkisi	8
2.1.4. Oleuropeinin Anti-Amiloid Etkileri	8
2.1.5. Ekstraksiyon Teknikleri	9
2.1.5.1. Likit-Likit Ekstraksiyon	10
2.1.5.2. Likit-Solid Ekstraksiyon	10
2.1.5.3. Soxhlet Ekstraksiyonu	10
2.1.5.4. Ultrason Aracılı Ekstraksiyon	11
2.1.5.5. Mikrodalga Aracılı Ekstraksiyon	11
2.1.5.6. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu	11
2.1.5.7. Gaz-Likit Ekstraksiyonu	11
2.2. Elektroensefalogram (EEG) ve Elektrokortikogram (ECoG)	12
2.2.1. EEG’de Görülen Dalga Tipleri	12
2.3. Epilepsi	14

2.3.1. Tanım	14
2.3.2. Epidemiyoloji	16
2.3.3. Sınıflandırma	16
2.3.4. Epilepsinin Patofizyolojisi	20
2.4. Deneysel Epilepsi Modelleri	21
2.4.1. Kimyasal Modeller	22
2.4.1.1. Pilocarpin Modeli	22
2.4.1.2. Kainik Asit Modeli	22
2.4.1.3. Flurotil Modeli	22
2.4.2. Elektriksel Stimülasyon Modelleri	23
2.4.2.1. Tetikleme	23
2.4.2.2. Maksimal Elektroşok (MES) Modeli	23
2.4.3. Genetik Modeller	24
2.4.4. Travma Modelleri	24
2.4.5. Penisilin Modeli	24
2.5. Nitrik Oksit	25
2.5.1. Nitrik Oksitin Sentezi	25
2.5.2. Nöronal Nitrik Oksit Sentaz	26
2.5.2.1. Nöronal Nitrik Oksit Sentazın Fizyolojik Fonksiyonları	26
2.5.2.2. Patofizyolojide Nöronal Nitrik Oksit Sentazın Rolü	27
2.5.3. Nitrik Oksit ve Epilepsi	27
2.6. Oksidan ve Antioksidan Sistem	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Deney Hayvanları	30
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Uygulanma Şekilleri	30
3.2.1. Penisilin G Potasyum	30
3.2.2. Üretan	31
3.2.3. Oleuropein	31
3.2.4. L-Arjinin	32
3.2.5. 7-Nitroindazol	32
3.2.6. L-NAME	33
3.2.7. Glutasyon Peroksidaz Kiti	33
3.2.8. Süperoksit Dismutaz Kiti	33

3.3. Deney Prosedürü	33
3.4. Cerrahi İşlem	35
3.5. Elektrofizyolojik Kayıt İşlemi	36
3.6. Elektrofizyolojik Kayıtların Değerlendirilmesi	38
3.7. Biyokimyasal Analizler	38
3.7.1. Beyin Dokusunda Homojenizasyon Aşaması	38
3.7.2. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü	39
3.7.2.1. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	39
3.7.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi	40
3.7.3.1. CAT Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	40
3.7.4. Beyin Dokusu MDA Seviyelerinin Belirlenmesi	42
3.7.4.1. Beyin Dokusu MDA Seviyelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	42
3.7.5. Beyin Dokusu GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü	43
3.7.5.1. Beyin Dokusu GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	43
3.8. Histopatolojik Analiz	45
3.9. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. Penisilinle Oluşturulan Epileptiform Aktivite	46
4.2. Oleuropeinin Epileptiform Aktiviteye Etkili Olan Dozunun Belirlenmesi	47
4.3. NO Agonist/Antagonistlerinin Epileptiform Aktiviteye Etkisi	52
4.4. Patolojik Analizler	65
4.5. Biyokimyasal Analizler	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
6. KAYNAKLAR	81
EKLER	96
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	97
ÖZGEÇMİŞ	98

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Sık kullanılan deneysel epilepsi modellerinin kullanım alanları	21
Tablo 2. SOD enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaktifler ve miktarları	39
Tablo 3. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi için yapılan reaksiyon karışımı	41
Tablo 4. MDA ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı	42
Tablo 5. Protein seviyesi ölçümünde kullanılan reaksiyon karışımı	44
Tablo 6. Birinci deney gruplarının spike frekansları	49
Tablo 7. OLE doz gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi	49
Tablo 8. Birinci deney gruplarının spike amplitüdləri (µV)	50
Tablo 9. OLE doz gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi	50
Tablo 10. Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının spike frekansları	54
Tablo 11. 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi	54
Tablo 12. Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının spike amplitüdləri (µV)	55
Tablo 13. 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi	55
Tablo 14. Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının spike frekansları	58
Tablo 15. 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi	58

Tablo 16. Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının spike amplitüdleri (μ V)	59
Tablo 17. 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi	59
Tablo 18. Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının spike frekansları	62
Tablo 19. 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi	62
Tablo 20. Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının spike amplitüdleri (μ V)	63
Tablo 21. 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi	63
Tablo 22. Birinci deney gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları	65
Tablo 23. SF, Pen G, 80 OLE, L-NAME, 80 OLE+L-NAME gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları	66
Tablo 24. SF, Pen G, 80 OLE, L-ARJ, 80 OLE+L-ARJ gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları	67
Tablo 25. SF, Pen G, 80 OLE, 7-NI, 80 OLE+7-NI gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları	67
Tablo 26. SF, Pen G, 20 OLE, 40 OLE ve 80 OLE gruplarında doku MDA, CAT, SOD ve GPx analiz bulguları	68
Tablo 27. SF, Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarında doku MDA, CAT, SOD ve GPx analiz bulguları	69
Tablo 28. SF, Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarında doku MDA, CAT, SOD ve GPx analiz bulguları	70
Tablo 29. SF, Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarında doku MDA, CAT, SOD ve GPx analiz bulguları	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Oleuropeinin kimyasal yapısı	5
Şekil 2. EEG dalgaları ve frekansları	13
Şekil 3. ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması genişletilmiş sürüm	17
Şekil 4. ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması kullanım algoritması	19
Şekil 5. NOS enzimlerinin yapısal alt birimleri	26
Şekil 6. İkinci çalışmada deney gruplarındaki her bir hayvana uygulanan işlemleri gösteren deney akış diyagramı	35
Şekil 7. Beyin dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği	40
Şekil 8. Beyin dokusu MDA standart grafiği	43
Şekil 9. MDA, GPX, SOD ve CAT seviyesini belirlemek için yapılan protein miktarını hesaplamada kullanılan standart grafiği	44
Şekil 10. Birinci deney gruplarına ait spike frekans ve amplitüd yüzde değişimleri	51
Şekil 11. Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarına ait spike frekans ve amplitüd yüzde değişimleri	56
Şekil 12. Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarına ait spike frekans ve amplitüd yüzde değişimleri	60
Şekil 13. Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarına ait spike frekans ve amplitüd yüzde değişimleri	64

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Deney hayvanlarına uygulanan cerrahi işlem prosedürü	36
Resim 2.	LabChart programında epileptiform aktivite kayıt örneği	37
Resim 3.	Spike frekansı ve amplitüdünü hesaplamak için kullanılan programın analiz modülü	37
Resim 4.	Pen G grubunda ECOG kaydı örneği	46
Resim 5.	Pen G (500 IU) ve OLE doz gruplarına ait ECoG kayıtlarından örnek görüntüler	48
Resim 6.	Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler	53
Resim 7.	Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler	57
Resim 8.	Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler	61

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

7-NI	7-Nitro Indazol
AH	Alzheimer hastalığı
AMPA	A-amino-3-hidroksi-5-metil 4-izoksazol propiyonik asit
AMP	Adenozin monofosfat
ARJ	Arjinin
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
BH4	Tetrahidrobiopterin
BSA	Serum sığır albümini
CaM	Kalmodulin
CAT	Katalaz
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
COX	Siklooksijenaz
CRP	C-reaktif protein
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsülfoksit
DOR	Delta-opioid reseptörleri
DTNB	Disülfid 5-5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit
ECoG	Elektrokortikogram
EEG	Elektroensefalogram
ESS	Enterik sinir sistemi
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FMN	Flavin mononükleotid
FR	Fraksiyon
GA	Güven aralığı
GABA	Gama-aminobütirik asit
GABA-A	Gama-amino bütirik asit tip A
GAERS	Strasbourg'dan genetik absans epilepsili rat
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
ICAM-1	Hücrelerarası adhezyon molekülü-1

ILAE	Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği
IU	Uluslararası ünite
İC	İntrakortikal
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İP	İntraperitoneal
İTK	İnce tabaka kromatografisi
KG	Kilogram
KTÜ	Karadeniz teknik üniversitesi
L-ARJ	L-arjinin
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
L-NAME	N ω -nitro-L-arginin metil ester
MCP	Monosit kemoatraktan proteinler
MDA	Malondialdehit
MES	Maksimal elektroşok
MG	Miligram
ML	Mililitre
MMP	Metaloproteinaz
MSS	Merkezi sinir sistemi
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MYR	Miristolasyon
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	Nitro blue tetrazolium
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NF-kβ	Nükleer faktör kappa β
NMDA	N-metil-d-aspartik asit
NNA	N ^G -nitro-L-Arjinin
nNOS	Nöral nitrik oksit sentaz
OLE	Oleuropein
OLEA	Oleuropein aglikon
OPR	Opioid reseptörü
PALM	Palmitolasyon
PARP	Poly-ADP-riboz polimeraz

PEN G	Penisilin G
PH	Parkinson hastalığı
PRXS	Peroksiredoksinler
PTZ	Pentilentetrazol
ROS	Reaktif oksijen radikalleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
SE	Status epilepticus
SF	Serum fizyolojik
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TLE	Temporal lob epilepsi
TTR	Transtiretin
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
WAG	Wistar albino glaxo

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
Cu	Bakır
Zn	Çinko
Δ	Delta
γ	Gama
Ca	Kalsiyum
μV	Mikrovolt
θ	Teta

Formüller

C₆H₁₄N₄O₂	L-Arjinin
C₇H₅N₃O₂	7-Nitroindazol
C₇H₁₅N₅O₄	L-NAME
C₁₆H₁₇KN₂O₄S	Penisilin G potasyum
C₂₅H₃₂O₁₃	Oleuropein
CuCl₂	Bakır klorür

HCL	Hidrojen klorür
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₃PO₄	Fosforik asit
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Mono potasyum fosfat
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
NaHPO₄.2H₂O	Mono sodyum fosfat monohidrat
NH₂COOC₂H₅	Üretan
(NH₄)₂SO₄	Amonyum sülfat
OH[•]	Hidroksil radikali
O₂	Oksijen
O₂⁻	Süperoksit radikali

ÖZET

Penisilin ile Oluşturulan Epileptiform Aktivite Modelinde Oleuropein'in Olası Etkisi ve Nitrerjik Sistem ile İlişkisinin Araştırılması

Epilepsi oldukça yaygın görülen, provoke edilmemiş ve spontan olarak tekrarlayan nöbetlerle karakterize nörolojik bir hastalıktır. Epileptik nöbet oluşum mekanizmasının altında nörotransmitterlerin de rolü olduğu düşünülmektedir. Beyinde nörotransmitter ve hedef hücrelerde ikincil mesajcı molekül olarak fonksiyon gösteren nitrik oksit epileptik aktivite üzerine etkisini inceleyen birçok çalışma mevcuttur. Deneysel epilepsi modelleri epileptogenez ve nöbet oluşum mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.

Çalışmamızda 88 adet yetişkin erkek Wistar rat 11 gruba ayrıldı. Ratlara ürean anestezisi altında intrakortikal yoldan 500 ünite penisilin uygulanarak epileptik aktivite oluşturulduktan 30 dakika sonra oleuropein intraperitoneal yolla 3 farklı dozda (20, 40, 80 mg/kg) uygulanarak etkin doz belirlenmiştir. İkinci aşamada nitrerjik sistem agonist (L-Arjinin) ve antagonist (7-NI, L-NAME) ajanları tek başlarına ve OLE etkin dozuyla birlikte intraperitoneal yoldan verilmiştir. 120 dakikalık interiktal spike aktivitesi kaydından sonra sıçanlar dekapite edilerek serebral doku örnekleri alındı. İstatistiksel analiz için değişkenlerin ortalamalarının, üç ve daha grup ile karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Değişkenlerin ortalamalarının, iki grup ile karşılaştırılmasında Mann Whitney U kullanılmıştır.

Pen G grubu ile kıyaslandığında 80 mg/kg oleuropein verilen grubun spike frekansındaki yüzde değişimlerin anlamlı olarak azaldığı saptanmış ve 80 mg/kg oleuropein etkin doz belirlenmiştir. Etkin doz verilen grup ile kombinasyon grupları karşılaştırıldığında oleuropeinin antikonvulzan etkisinin nitrerjik sistemle ilişkisi net olarak ortaya konulamamıştır.

Patolojik analizlerde deney grupları arasında inflamasyon ve konjesyon açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Biyokimyasal analizlerde OLE etkin doz grubu (80 mg/kg) Pen G grubuyla karşılaştırıldığında MDA değerleri etkin doz OLE grubunda anlamlı olarak düşük ($p=0.001$), SOD, CAT ve GPx değerleri ise anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.035$, $p=0.002$, $p=0.035$).

Bu çalışma sonucunda oleuropeinin penisilin ile oluşturulan epileptik aktivite modelinde antikonvulzan etki gösterdiği saptanmıştır. Oleuropeinin epilepsi tedavisinde kullanılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Epilepsi, Nitrik oksit, Oleuropein, Oksidan, Antioksidan

ABSTRACT

Evaluation of the Possible Effect of Oleuropein and Relationship with the Nitrgic System at Penicillin-Induced Epileptiform Activity Model

Epilepsy is a very common neurological disease characterized by unprovoked and spontaneously recurrent seizures. Along with many different factors underlying the epileptic seizure formation mechanism, neurotransmitters are also thought to play a role. There are many studies examining the effect of nitric oxide, which functions as a neurotransmitter in the brain and as a secondary Messenger molecule in target cells, on epileptic activity. Experimental epilepsy models help to understand the mechanism of epileptogenesis and seizure formation.

88 male Wistar albino rats were divided into 11 groups. The effective dose was determined by administering oleuropein intraperitoneally in 3 different doses (20, 40, 80 mg/kg) 30 minutes after epileptic activity was created by administering 500 units of penicillin intracortically to rats under urethane anesthesia. In the second stage, nitrgic system agonist (L-Arginine) and antagonist (7-NI, L-NAME) agents were administered intraperitoneally alone and together with the effective dose of oleuropein. After 120 minutes of recording of interictal spike activity, the rats were decapitated and cerebral tissues were extracted. For statistical analysis, Kruskal Wallis test was used to compare the means of variables with three or more groups. Mann Whitney U was used to compare the means of variables with two groups.

Compared to the Pen G group, it was determined that the percentage changes in the spike frequency of the group given 80 mg/kg oleuropein were significantly reduced and the effective dose of 80 mg/kg oleuropein was determined. When the effective dose group was compared with the combination groups, the relationship between the anticonvulsant effect of oleuropein and the nitrgic system could not be clearly demonstrated.

In pathological analyses, no significant difference was found between the experimental groups in terms of inflammation and congestion. In biochemical analyses, when the OLE effective dose group (80 mg/kg) was compared with the Pen G group, MDA values were significantly lower in the effective dose OLE group ($p=0.001$), while SOD, CAT and GPx values were significantly higher ($p=0.035$, $p=0.002$, $p=0.035$, respectively).

As a result of this study, it was determined that oleuropein had an anticonvulsant effect in the epileptic activity model created by penicillin. More comprehensive studies are needed for the use of oleuropein in the treatment of epilepsy.

Keywords: Epilepsy, Nitric oxide, Oleuropein, Oxidant, Antioxidant

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi oldukça yaygın görülen, provoke edilmemiş ve spontan olarak tekrarlayan nöbetlerle karakterize nörolojik bir hastalıktır. Popülasyonun %0.5-3'ünü etkileyen ve tedavi uygulanan hastaların %30-40'ında tam olarak nöbet kontrolünün sağlanamadığı bir hastalık olması epilepsi hastalığının önemini ve üzerinde yapılan deneysel çalışmaları artırmıştır (1). Epileptik nöbet; beyin fonksiyonlarını bozan anormal, aşırı ve hipersenkron elektriksel nöral aktivite nedeniyle ani gelişen semptomlar ve/veya klinik belirtilerdir. Bu anormal nöronal aktivite duygu ve davranış değişiklikleri, kasılmalar ve bilinç kaybına kadar değişen bir spektrumda yer alan fokal veya jeneralize olarak tanımlanan epileptik nöbetlere neden olmaktadır (2). Çocukluk çağında nöbetlerin en sık görülen nedenleri genetik, perinatal travmalardan kaynaklı hasar ve gelişimsel kortikal malformasyonlardır. Epilepsiye genetik yatkınlığı bulunmayan yetişkinlerde etiyolojik faktörler arasında menenjit/ensefalit, travmaya bağlı beyin hasarı ve serebral tümörler yer alır. Yaşlı hastalarda epilepsi, genellikle primer nörodejeneratif bozuklukların, kafa travması ve beyin tümörlerinin sonucudur (3).

Klinik ve preklinal epilepsi araştırmalarındaki hızlı ilerlemeye rağmen epilepsi patogenezi hala belirsizliğini korumaktadır. Epileptik nöbet oluşum mekanizmasının altında yatan ve beyin uyarılabilirliğini artıran farklı birçok faktörle birlikte nörotransmitterlerin de rolü olduğu düşünülmektedir. Nörotransmitterler, ilgili reseptörlerine bağlanarak sinaps boyunca sinyalleri ileten ve uyarıcı/inhibe edici nöronal fonksiyonları düzenleyen endojen kimyasallardır. Genellikle sinaptik veziküllerde, akson terminallerinde depolanır ve uygun sinyal sonrası sinaps içine salınır. Salınan nörotransmitterler sinaptik yarıktaki spesifik reseptörlerine bağlanma şeklinde fonksiyon gösterirler. Nöronlar arasındaki sinyal iletimi sağlayan nörotransmitterler epilepsi patogenezi üzerinde çok önemli etkiler gösterir (4). Sinir sistemindeki impuls iletimi, stimulan ve inhibitör nörotransmitterler tarafından modüle edilir. Nöbetler elektriksel stimülasyondaki rölatif bir dengesizliğin sonucunu temsil eder. Nöronlardaki ana stimulan glutamat ve ana supresör gama-aminobutirik asit (GABA) arasındaki değişiklikler hücre uyarılabilirliği dengesinde kritik bir rol oynar. Bir dizi in vitro ve in vivo preklinal nöbet modellerinde, GABA ve glutamat arasındaki dengenin uyarılma yönünde bozulmasının nöbetlerin ortaya çıkmasıyla sonuçlandığı iddia edilmektedir (5).

Nitrik oksit (NO) beyinde pek çok fizyolojik süreçte görev yapan bir transmittirdir. Beyinde nörotransmitter ve hedef hücrelerde ikincil mesajcı molekül olarak fonksiyon gösterir. Çözünür guanilat siklaz, NO için fizyolojik bir reseptör olarak kabul edilir. İkincil

mesajcı cGMP'nin (siklik guanozin monofosfat) sentezi NO'nun siklaza bağlanmasıyla indüklenir. Nöronlarda bulunan nöral NO sentaz (nNOS) intraselüler kalsiyum artışıyla stimüle olur ve NO sentezinde yer alır. Bir nöronun glutamat tarafından stimülasyonuna cevap olarak L-Arjininden (L-ARJ) nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile NO üretilir. Eksitotoksiste, glutamatın anormal hiperaktivitesi tarafından indüklenir ve epilepside nöbetlerle seyreden nöronal bozukluğun ana mekanizmasını oluşturur (6). Deneysel nöbet modelleri ile yapılan çalışmalarda, NOS inhibitörleri ve NO stimülanları, NO'nun prokonvülzan veya antikonvülzan aktivitesini değerlendirmek için kullanılmış olup, hala NO'nun kesin rolü belirsizliğini korumaktadır. NO'nun endojen antikonvülzan ve de prokonvülzan olduğuna dair farklı görüşleri ifade eden çok sayıda çalışma bulunmaktadır (7, 8). Siyanür kullanılarak oluşturulan tonik epilepsi modelinde yapılan bir çalışmada epilepsi grubunda farelerde N^G-nitro-L-Arjinin (NNA) verildiğinde nöbet eşiğinin yükseldiği saptanmıştır (9). Bu sonuç NO'nun prokonvülzan etkileri olduğunu göstermektedir ancak diğer yandan NOS inhibitörleri olan 7-Nitroindazol (7-NI) ve N-nitro-L-Arjinine metil esterinin (L-NAME) antikonvülzan ajanların etkinliğini azalttığını ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır (10). Penisilin ile indüklenen deneysel epilepside NOS inhibitörlerinin prokonvülzan etkisi olduğu rapor edilmiştir (11). NO yolağının aktivasyonunun ise antikonvülzan etki gösterdiği bildirilmiştir (12). Başka bir çalışmada pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen epileptik nöbet modelinde delta-opioid reseptörleri (DOR'lar) ile NO arasındaki ilişki opioid reseptörü (OPR'ler) agonistleri ve antagonistleri uygulanarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda delta opioid reseptör antagonisti olan naltrindol'un nNOS'un inhibisyonu ile hipokampal nitrit seviyelerini azaltarak antikonvülzan etki gösterdiği söylenmiştir (13).

Zeytin ağacı, özellikle oleuropein (OLE) adı verilen bir fenolik bileşik açısından zengin olup, bu bileşik, zeytinin önemli biyolojik özelliklerini belirleyen başlıca bileşendir (14–16). Oleuropein'in keşfi ilk olarak 1908'de Bourquelot ve Vintilesco tarafından gerçekleştirilmiş, ancak yapısı 1960 senesinde tam olarak tanımlanabilmiştir. Oleuropein, üç ana bileşenden oluşan bir moleküldür: Hidroksitirozol, elenolik asit ve glukoz molekülü olarak adlandırılan sekoiridoidler (17). Literatürde oleuropein maddesinin antimikrobiyal (18) antioksidan (19), antidiyabetik (20), antineoplastik (21), antiinflamatuar, hipokolesterolemik (22), kardiyovasküler sistemi koruyucu (23), obeziteyi önleyici (24) etkilerine yönelik çalışmalar mevcuttur.

Epilepsi (epileptogenez) gelişim sürecine müdahale edebilen etkili bir terapötik strateji geliştirebilmek için, beyinde bir yaralanmadan sonra ve epilepsi gelişmeden önce ortaya çıkan değişiklikler üzerinde çalışmak büyük öneme sahiptir. Yıllar boyunca deneysel epilepsi modelleri epileptogenez ve nöbet oluşum mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Epilepsi karakteristiklerinden en az birini replike eden birçok model geliştirilmiştir. Her modelin kendi avantajları ve dezavantajları vardır ve araştırmacılar çalışmaları için spesifik bir model seçerken bunları değerlendirmelidir (25). En sık çalışılan nöbet modelleri status epileptikus, basit ve kompleks fokal nöbetler, jeneralize absans ve tonik klonik nöbetler olarak sayılabilmektedir. Lokal uygulanan kimyasallar sıklıkla basit fokal akut nöbet veya basit fokal kronik nöbet modellerinde, sistemik yolla verilen kimyasallar ise kompleks fokal ya da jeneralize tonik klonik nöbet modellerinde kullanılmaktadır (26). Penisilin gibi kimyasal konvülzanların uygulanması epileptik aktiviteyi indüklemenin basit ve hızlı yollarından biridir. Deneysel epilepsinin penisilin modeli araştırmacılar tarafından kullanılan en yaygın akut modellerden biridir. Bu modelde, penisilin enjeksiyonundan sonra kortikal alanlar epileptik nöbetlerin kaynağı olur. Penisilin kortikal yüzeye topikal uygulanması epileptiform aktiviteyi indüklemek kapasitesine sahiptir ve akut parsiyel epilepsi modeli olarak kullanılır. Penisilin ile indüklenen epileptik aktivite fokal olarak başlar ve jeneralize epilepsiye sebep olacak şekilde yayılır (27).

Farelerde pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan epilepsi modelinde oleuropeinin nöbet üzerine terapötik etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada fareler dört gruba randomize edilmiştir. Bu gruplar 10 gün boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak PTZ alan kontrol grubu, PTZ uygulamasından 30 dakika önce oleuropein (20 mg/kg) alan oleuropein grubu, PTZ uygulamasından 30 dakika önce diazepam alan pozitif kontrol grubu ve PTZ uygulamasından 30 dakika önce flumazenil ve ardından oleuropein alan flumazenil grubu şeklinde oluşturulmuştur. Oleuropein tedavisinin PTZ alan farelerde nöbet latansında anlamlı bir artışa ve kafa tiklerinin, baş ve üst ekstremité nöbetlerinin, tüm vücut nöbetlerinin ve tonik nöbetlerin total sıklığında anlamlı azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (28). Oleuropeinin pentilentetrazol ile indüklenen epilepside nöbetler üzerindeki etkilerini inceleyen başka bir çalışmada, nöbet indüklenmesinden 60 dakika önce intraperitoneal oleuropein uygulanmasının nöbet eşiğini anlamlı olarak yükselttiği gösterilmiştir (29). Aynı çalışmada nitrik oksit prekürsörü olan L-Arjinin maddesinin, oleuropeinin antikonvülzan aktivitesini güçlendirdiği, nitrik oksit sentazın (NOS) nonspesifik inhibitörü olan N-nitro-L-

Arjinine metil ester (L-NAME) ve nöronal NOS spesifik inhibitörü olan 7-NI verildiğinde oleuropeinin antikonvülzan aktivitesinin bloke olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle oleuropeinin antikonvülzan özelliklerinde yapısal nöronal NOS'un rol oynayabileceği belirtilmiştir (29).

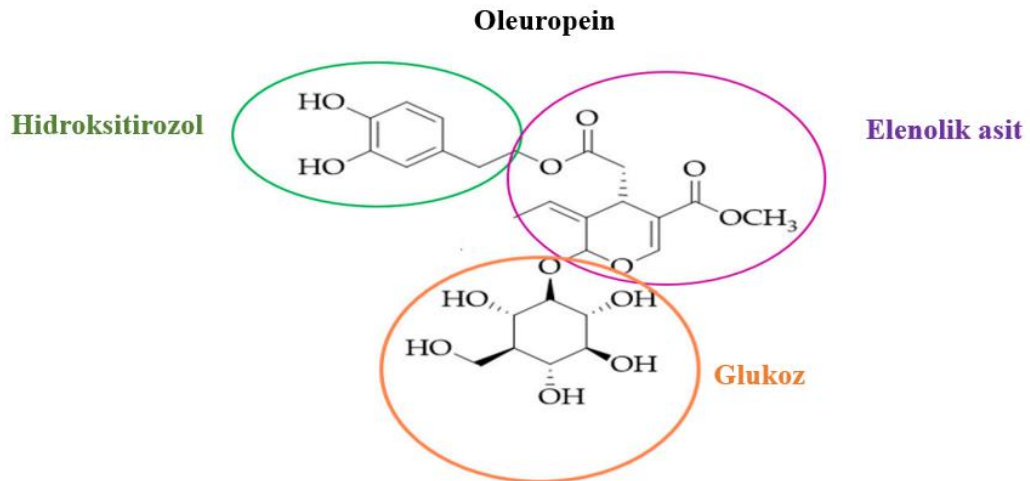
Bu tez çalışması kapsamında oleuropeinin penisilin G (Pen G) ile oluşturulan akut epileptiform aktivite üzerindeki olası etkisinin araştırılması ve olası etkinin nitrik oksit yolağı ile ilişkili olup-olmadığının elektrofizyolojik yöntem kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla erkek Wistar sıçanlarda penisilin ile oluşturulan epileptiform aktiviteye 20, 40 ve 80 mg/kg dozlarda uygulanan OLE ve 500 mg/kg L-ARJ, 60 mg/kg L-NAME ve 50 mg/kg 7-NI'nın etkisi elektrofizyolojik yöntemle araştırılmış ve etkin doz OLE grubu belirlenmiştir. Etkin doz belirlendikten sonra nitrerjik sistemle kombinasyon grupları oluşturulmuştur. Ayrıca sol hemisferde oksidatif stres değişimini tespit etmek için MDA düzeyi ile SOD, CAT ve GPx aktiviteleri ölçülmüş, inflamasyon skoru ve konjesyone damar yaygınlığı değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oleuropein

Oleuropein (OLE), zeytin ağacı *Olea europaea* L.'deki başlıca fenolik bileşiktir ve özellikle işlenmemiş zeytin meyvesi ve yapraklarında bol miktarda bulunur. Genç zeytinlerdeki kuru maddede 140 mg/g'a kadar, yapraklardaki kuru maddede 60–90 mg/g konsantrasyonunda bulunur. *Olea europaea*'da OLE, demetiloleuropein, ligstrosid ve oleosid 11-metil ester bol miktarda bulunan secoiridoidlerdir, ama verbaskozit zeytinlerin ana hidroksisinnamik türevidir (30).

Oleuropein, Oleaceae, Gentianales Cornales gibi birçok bitkide bol miktarda bulunan secoiridoidler grubuna aittir. İridoidler ve secoiridoidler genellikle glikosidik olarak bağlanan bileşiklerdir ve çeşitli indol alkaloidlerin prekürsörleri olan terpenlerin ikincil metabolizmasından üretilirler. Oleaceae'deki secoiridoidler genellikle elenolik asit ile glikozidik kalıntı kombinasyonu olan oleosit türü glikozitlerden türetilir. Oleuropein, elenolik asit ve hidroksitirozolun bir esteridir ve Oleaceae'nin secoiridoid glikozitlerinde yaygın olan oleosidik bir iskelete sahiptir (31). Oleuropeinin kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir. Oleuropein yeşil zeytinlerde bulunur, yağ ekstraksiyonu işlemi sırasında endojen beta glukozidaz aktivitesi ile ekstra virjin zeytin yağının acı ve keskin tadından sorumlu olan oleuropein aglikona (OleA) hidrolize edilir.



Şekil 1. Oleuropeinin kimyasal yapısı (Soler-Rivas'tan, 31)

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin yağ fenollerinin (5 g/gün) aterosklerotik plak oluşumunda ilk aşama olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu önlediğini açıklamasıyla ekstra virjin zeytin yağı içindeki biyoaktif bileşenlerin önemi artmıştır (32). Zeytin ağacı yaprakları Akdeniz bölgesi'nde geleneksel bitkisel tedavi olarak sağlığın geliştirilmesi ve kronik durumların tedavisinde kullanılmaktadır. OLE içeriğindeki farklılıklar çeşit, üretim alanı ve yaprak dokusu koşullarına (taze, dondurulmuş, kurutulmuş veya liyofilize) göre değişiklik göstermektedir. Spesifik biyolojik ve biyomedikal özellikler için gıda supplementi olarak kullanılan ticari zeytin yağı ekstraktlarının OLE içeriği standardize edilmiştir (33).

Son zamanlarda oleuropeinin glikozidik ve aglikon izoformlarının ikisi de antioksidan, anti-inflamatuar, kardiyovasküler ve nöroprotektif ve anti-kanser etkileri nedeniyle bilimsel dikkati çekmektedir. Bu farmakolojik etkiler temel olarak orto-difenolik grupları nedeniyle radikalleri temizleme özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Mekanistik çalışmalar bu bileşiklerin protein fonksiyonları ve gen ekspresyonuyla etkileşime girerek veya bulaşıcı olmayan hastalıkların patolojik süreçleri ile ilişkili hücresel yolakları modifiye ederek farklı bölgelerde de etki gösterebildiğini, oleuropeinin çeşitli bozukluklardaki etkilerinin paylaşılmış moleküler mekanizmalardan kaynaklandığını belirtmektedir (34). Disregüle otofaji bulaşıcı olmayan hastalıkların yaygın bir özelliğidir. Bu disregülasyon artmış oksidatif stresle ilişkili gözükmektedir. Bu mekanizmalar hücre otonomisi olarak görülse de, güncel kanıtlar otofaji ve oksidatif stres arasındaki geçişlerin, bulaşıcı olmayan hastalık gelişimi ile bağlantılı olarak dokuların inflammatuar durumları ile ilişkili olduğunu belirtmektedir (35).

2.1.1. Oleuropeinin Antioksidan Özellikleri

Oleuropeinin antioksidan özellikleri iyi bilinmektedir ve zeytin yaprakları ve zeytin yağında da mevcuttur. Oleuropeinin kimyasal yapısı hidrojen vererek reaktif oksijen türlerini temizleyebilen ve intramoleküler hidrojen bağlarını oksijen radikalleri ile stabilize edebilen orto-difenolik bir madde içerir. OLE in vitro bakır sülfatla indüklenmiş LDL oksidasyonunu doz bağımlı olarak inhibe edebilir. İn vivo OLE'den zengin diyetle beslenen tavşanlar, standart bir diyet alan hayvanlarla karşılaştırıldığında, LDL oksidasyonunu önleyebilen daha yüksek serum antioksidan seviyeleri ve total, serbest, esterifiye kolesterol düzeylerinde azalma görülmüştür (36). Ayrıca insanlarda Visioli ve arkadaşları sağlıklı gönüllülerde OLE takviyesinin doza bağlı bir şekilde 8-izo-prostaglandin F2 alfa'nın idrarla

atılımını azalttığını göstermişlerdir, bu da daha düşük bir lipid peroksidasyonunu düşündürmektedir (37). OLE'nin, askorbik asit ve a-tokoferole benzer temizleme etkisinin olduğu, inflamasyon bölgesinde nötrofil miyeloperoksidaz tarafından üretilen hipoklorik asiti temizleyici etki gösterdiği in vitro çalışmada gösterilmiştir (38). OLE'nin koroner oklüzyon sonrasında post-iskemik oksidatif patlamaya karşı antioksidan kardiyoprotektif etkisine ilişkin ilk deneysel kanıt Manna ve ark. tarafından gösterilmiştir. Global iskekiye maruz bırakılmış ve daha sonra yeniden perfüze edilmiş izole sıçan kalpleri kullanılarak perfüzatta kreatin kinazda ve glutatyon salınımında azalma gözlenmiştir (39).

2.1.2. Oleuropeinin Antiinflamatuvar ve Kardiyovasküler Hastalıklardan Koruyucu Etkisi

İnflamasyon doku hasarı veya enfeksiyon ile indüklenen önemli ve defansif bir cevaptır. Multifaktöriyel hastalıkların ortak noktasıdır ve ateroskleroz, diyabet, metabolik sendrom, kanser, kronik böbrek hastalığı ve nörodejeneratif hastalıklar gibi disabiliteye yol açan hastalıkların yönetilmesinde önemli rol oynar. Akut ve kronik olmak üzere iki türe ayrılabilir. Kronik inflamasyon, oksidatif hasara ve antioksidanların tükenmesine neden olabilen reaktif oksijen (ROS) üretimi ile ilişkilidir. İnflamatuvar yanıtta ana faktörlerden biri olan makrofajlar, ROS'un yanı sıra IL-1, IL-6, TNF-a ve IFN- γ dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler de üretir. IL-6, inflamatuvar yanıtın santral mediatörü olarak görünmektedir. Bu nedenle, çeşitli inflamatuvar sitokinlerin veya mediatörlerin salınımının yanı sıra, hasarlı dokular aynı zamanda monosit kemoatraktan proteinler (MCP-1), siklooksijenaz (COX), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), metalloproteinazlar (MMP) ve adezyon molekülleri de salgılar. Ek olarak, nükleer faktör Kappa β (NF- $\kappa\beta$) karmaşık bir sinyal iletim yolunda önemli bir üst pozisyona sahiptir ve sayısız pro-inflamatuvar aracının üretimini kontrol eder (40).

2006 yılında, PREDIMED çalışması 722 katılımcıdan oluşan bir grupta üç ay boyunca ekstra virjin zeytin yağı ile desteklenen Akdeniz Diyetinin anti-inflamatuvar etkisini (düşük yağlı diyetle karşılaştırıldığında), serum C-Reaktif Protein (CRP), IL-6, endotelial ve monositler adezyon moleküllerinde [hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1)] anlamlı bir azalma ile göstermiştir (41). PREDIMED çalışmasının diğer birçok alt çalışması, hücre yüzeyi inflamatuvar mediatörlerinin (adezyon molekülü ve T lenfositler ve monositlerde pro-inflamatuvar ligand CD40 ekspresyonu) periferik kan mononükleer hücre ekspresyonu gibi aterojenez ile ilişkili

biyobelirteçlerdeki değişiklikleri inceleyerek Akdeniz Diyeti'nin ekstra virjin zeytin yağı ile anti-inflamatuar özelliklerini doğrulamıştır (42).

2.1.3. Oleuropeinin Otofaji İndükleyici Etkisi

Otofaji, hücrelerin hasarlı organelleri, hatalı biçimlendirilmiş proteinleri veya amiloid agregat birikimini lizozomal degradasyon yoluyla ortadan kaldıran ve hücrel homeostazın korunması için gerekli bir süreçtir. Beclin-1 fagozom oluşumunun ilk adımlarında yer alan otofaji aktivasyonunun tipik belirteçlerindendir. Rapamisin kompleksi 1'in ve adenosin monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinazın hedefi, otofajiyi kontrol eden stres sensörleridir. Ancak rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi-1 (mTORC1) serum, besinler, büyüme faktörleri vb. tarafından aktive edilen bir otofaji inhibitörü iken AMP ile aktive edilen protein kinaz bunun yerine düşük enerji koşulları ve polifenoller tarafından aktive edilen bir otofaji indükleyicisidir (43). OLE'nin AMP ile aktive edilen protein kinaz aktive ederek ve mTOR'u inhibe ederek otofajiyi indüklediği, hasarlı mitokondrilerin temizlenmesi yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin azalmasını sağlayan lizozom asidifikasyonunu artırdığı belirtilmektedir (44).

2.1.4. Oleuropeinin Anti-Amiloid Etkileri

Aralarında en yaygın olanları Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığının (PH) yanı sıra Tip 2 Diabetes Mellitus (DM) olan birçok nörodejeneratif patoloji, amiloid hastalıklardır. Genel olarak amiloid hastalıklar, çeşitli organlarda yanlış katlanmış proteinlerden (amiloid) büyüyen, çözünmeyen fibriler polimerik malzemenin birikmesiyle tanımlanan, potansiyel olarak ölümcül olan hastalıklardır. Bu amiloidlerin çekirdeği, AH için A β peptidleri, PH için α -sinüklein, T2DM için amilin ve ailesel amiloid kardiyomiyopati için transtiretin (TTR) gibi her hastalık için tipik olan karakteristik protein veya peptidlerin dallanmamış polimerik fibrillerinden oluşmaktadır. Amiloidojenik proteinler β -tabaka konformasyonu ile karakterize edilir ve fibril oluşumunda ortak bir yolu paylaşır. Amiloidojenik proteinlerin sitotoksiteleri, kalsiyum homeostazisinin bozulmasını, membranların dengesizleşmesini, ROS üretimini ve apoptoz indüksiyonu gibi hücre ölümünü belirleyen faktörleri içerir. İlginç bir şekilde, nörodejeneratif hastalıklar merkezi sinir sisteminin (MSS) dışına yayılabilir ve ayrıca gastrointestinal sistemi de kapsayabilir. Aslında, aynı protein agregatlarının hem enterik sinir sisteminde (ESS) hem de MSS'de mevcut olması, hastalığın ESS'de başlayıp daha sonra retrograd olarak MSS'ye doğru yayılabileceği veya bunun tersi olabileceği hipotezine yol açmakta, otofaji sistemleri

tarafından üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengesizlik nedeniyle, yanlış katlanmış protein birikiminin prion benzeri bir difüzyonu yoluyla yayılabileceğini düşündürmektedir (45).

Amiloid proteinlerinin birikmesine engel olan bileşiklerin araştırılması, yeni terapötik moleküller oluşturmak için değerli bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Bu özellikle yaşlı insanlar (60 yaş ve üzeri) arasında demansla ilişkili nörodejeneratif hastalığın en yaygın şekli olan ve bilişsel işlevlerde ve hafızada ilerleyici bir düşüşle kendini gösteren AH için geçerlidir. Hipotalamik ve kortikal nöronlarda meydana gelen A β peptid kümeleri ve hiperfosforile tau proteinlerinin nörofibriler yumakları bu hastalığın tipik belirtileridir. PH ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır ve ana bileşeni a-sinüklein olan hücre içi inklüzyonların birikmesi nedeniyle substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterizedir. Bu hastalıkların klinik patolojileri uzun zaman önce tanımlanmış olmasına rağmen günümüzde bu hastalıkların yalnızca semptomlarını azaltmada etkili olan ilaçlar mevcuttur. Senil plakların nöronal hücrelerde birikmesi, oksidatif stres ve bu bozuklukların ana nedeni olan çeşitli pro-inflamatuar sitokinler, kemokinler ve ROS'un salınması için mikrogial hücrelerin aktivasyonu dahil olmak üzere kronik stresi indükler (46).

OleA'nın, A β peptidi ve a-sinüklein amiloid agregasyonunun in vitro deneylerinde toksik oligomer oluşumunu azalttığı, ayrıca fibril ve plak ayrışmasını yükselttiği gösterilmiştir. Bu aksiyonlar kültür hücrelerinde ve transgenik model organizmalarında amiloid toksisitesine karşı faydalı etkilerini yansıtmaktadır (47). İnsan A β peptidini eksprese eden basitleştirilmiş bir AH modelini kullanan Diomedea ve arkadaşları OleA ile beslenen bir nematod türü olan *Caenorhabditis elegans*'ın transgenik CL2006 soyunun larvalarının, vücut duvarındaki kas hücrelerinin sitoplazmasında A β plak birikintilerinde azalma, toksik A β oligomerlerinde daha düşük bir içerik, felç ve tedavi edilmeyen hayvanlarla karşılaştırıldığında yaşam beklentisinde artış olduğunu göstermişlerdir (48).

2.1.5. Ekstraksiyon Teknikleri

Solvent ekstraksiyon tekniği tarihsel süreçte en eski ve en yaygın kullanılan ekstraksiyon yöntemidir. Solvent ekstraksiyon tekniği, hedef bileşiği veya numuneyi içeren fazın daha ileri işlemlere tabi tutulmuş sıvı faz ortamına aktarılması (ayrılması) işlemi olarak bilinir. Solvent ekstraksiyonunda işlenmiş faz sıvı olarak tercih edilir ve numune bu fazda az çözünebilir gaz, likit veya solid materyaldir. Numuneler hedef bileşiklerden ve ayrılmak

istenen veya çözünmemiş matris gruplarından oluşur. Sonuçta solvent ekstraksiyonunun amacı hedef bileşiklerin istenmeyen matris yapılarından ayrılmasıdır (49).

2.1.5.1. Likit-Likit Ekstraksiyon

Genellikle, ayırma hunileri ve şişeler gibi malzemeler sıvı-sıvı ekstraksiyonlarında kullanılır. Bu ekipmana en küçük litre değerinden (mikrolitre) litre aralığına kadar farklı ölçekli hacimler yerleştirilir. Kullanılan tüm ekipmanların ayrı bir görevi vardır. Örneğin, mikserler fazları çöktirmek ve onları birbirinden ayırmak için kullanılır (49).

2.1.5.2. Likit-Solid Ekstraksiyon

Solid ürünler matrise tam olarak penetre olmayabilir, hedef ürünlerin ayrılması veya geri alımı yapılan işlemlere bağlıdır. İstenilen (hedef) bileşiklerin matristeki dağılımı, hedef bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özellikleri ve bunların yanında matrisin özellikleri, ekstraksiyon oranını etkileyen prosedürlerdir (50).

Vejetatif doku, duvarlarla çevrili hücrelerden oluşur. Kurutulmuş bitki materyalinin bir çözücü yardımıyla ekstrakte edilmesi temel olarak iki aşamada gerçekleşir. Bitkilerde bulunan porların (gözeneklerin) genişlemesine yardımcı olmak için, öncelikle seçilen çözücü ile temas ettirilir ve ısıtılarak bitki dokusu şişirilir, daha sonra difüzyonla genişlemiş gözeneklerden çözücüye geçiş sağlanır (51).

2.1.5.3. Soxhlet Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon, fenolik bileşikler ve antioksidanları bitki matrisinden ayırmak için önemli bir yöntemdir. Maserasyon, soxhlet, kaynatma ve ısıtma gibi işlemler, uzun zamandır kullanılan geleneksel yöntemler olarak bilinir ve düşük maliyetleri, kolay çalışma prensipleri ve yüksek ekstraksiyon verimlilikleri nedeniyle ekstraksiyon yöntemlerinde yaygın olarak kullanılır. Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü ısı kaynağı tarafından ısıtılır. Isıtılan çözücü zamanla buharlaşır ve yoğunlaşır. Yoğunlaştırılmış çözücü, ekstraksiyon haznesindeki katı numunenin üzerinden süzülür. Filtrelenen solüsyon yüksük içerisinde belirli bir seviyeye kadar birikir ve daha sonra çözücü kaynama kabına geri döndürülür. Soxhlet ekstraksiyonu için uygun ortam, oda sıcaklığında veya farklı örnek boyutları için kullanılan çözücünün kaynama noktasına yakın olmalıdır (52).

2.1.5.4. Ultrason Aracılı Ekstraksiyon

Ultrason aracılı ekstraksiyon, büyük taneli katıların ekstraksiyon sürecini hızlandırmak ve bu katı numunelerin hücre yapısını bozmak için kullanılır. Ekstraksiyonda kullanılan prob cihazı, yüksek enerjili su banyosunda katı numunenin daha iyi hedef alınmasını sağlar. Su banyosuna uygulanan ultrason dalgaları sıvıda belirli basınç dalgaları yaratır ve kabarcık oluşumuyla çökmeye neden olur. Bu baloncukların patlaması hedef bileşiklerin toplu halde taşınmasını hızlandırır. Sistemdeki sıcaklık ve basıncın artması kabarcık oluşumuna neden olur, çözünürlüğün daha da artmasını sağlar (53).

2.1.5.5. Mikrodalga Aracılı Ekstraksiyon

Prensip olarak mikrodalgalar, iyonların hareketi ve moleküllerin etkileşimleriyle etki eden radyasyondur. Mikrodalgada kullanılan numunenin ve çözücünün maddeleri, geçirgenliğiyle doğru orantılıdır. Mikrodalga fırının enerjisi sıcaklıkla artar. Düşük polariteli (düşük geçirgenlikli) bir çözücü ile, numunedeki istenen bileşikler (hedef bileşikler) sıcak numuneden soğuk çözücüye çıkarılabilir. Bu ekstraksiyon türünde iki farklı cihaz kullanılır. Bunlardan biri sıcaklığı ve basıncı kontrol edebilen kapalı ekstraksiyon kaplarıdır, diğeri ise atmosferik basınca duyarlı mikrodalga fırınlar olarak bilinir (54).

2.1.5.6. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu

Çalışma prensibinde katı fazdaki numune çelik kabın içerisine yerleştirilir. Bu kaba belirli bir seviyede çözücü pompalanır. Kap belirtilen sıcaklığa kadar ısıtılır ve çözücü başka bir kaba aktarılır. Gelen çözücü taze çözücü ile yıkanır ve azot gazı ile temizlenir. Bu çıkarmada, numune (hedef bileşik) ve çözücü daha uzun süre temas halindedir. Bu sebeplerden dolayı, çıkarma süresi önemlidir (55).

2.1.5.7. Gaz-Likit Ekstraksiyonu

Gaz-sıvı ekstraksiyonları, geri kazanılması zor olan gaz fazındaki katı adsorbanlardan uçucu organik bileşikleri ayırmak için kullanılır. Solvent bazlı çarpıştırıcılar ve kabarcıklar bu ekstraksiyona katılır. Çarpıştırıcılar, gaz ve çözücünün seçilen çözücünden geçerken tamamen karışmasını sağlamaz ancak çözücü, optimum reaktif bileşikler için büyük öneme sahip gazların ve buharların ayrılması için elverişli bir ortam yaratır. Kabarcıklar çözücünün gazla iyi karışmasına izin verse de gaz akış hızları çok düşüktür (56).

2.2. Elektroensefalogram (EEG) ve Elektrokortikogram (ECoG)

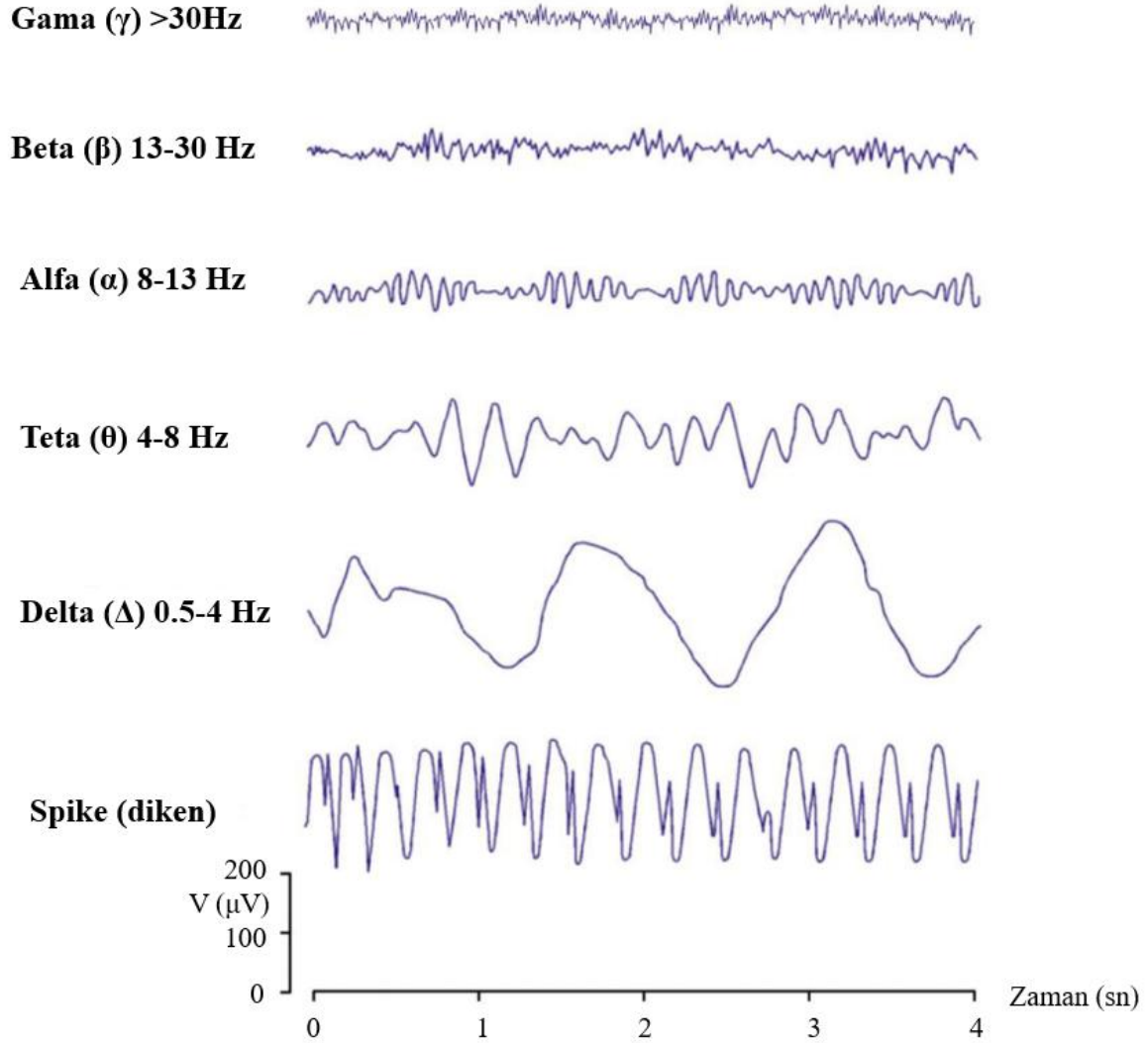
EEG beyindeki elektriksel aktivitenin kayıdır. EEG fokal diken dalgaları (fokal epilepsi ile uyumlu) veya diffüz diken dalgaları (jeneralize epilepsi ile uyumlu) gibi anormal elektriksel aktiviteleri tespit edebilir. Rutin EEG tercihen uyanıklık, uykuya geçiş ve uykuyu içermektedir, çünkü epileptiform anormalliklerin prevalansı bilinç durumlarının bu farklı bölgelerinde değişiklik göstermektedir. Hiperventilasyon ve fotik stimülasyon EEG sırasında epileptik aktivitenin etkinliğini artırmak için gerçekleştirilen aktivasyon prosedürleridir. Bir hastayı üç dakika boyunca hiperventilasyona tabi tutmak alkalozun nöbet provoke edici etkisi ile ilişkili olarak absans nöbetinin etkisini attırmaktadır. Fotik stimülasyon jeneralize epilepsiye yatkın bir kişide paroksizmal epileptiform aktiviteye ve hatta jeneralize bir nöbete neden olabilir. Saatler ve günler süren simültan video-EEG monitorizasyon diagnostik etkiyi arttırmakta ve epileptik nöbetin non-epileptik bir olaydan ayırt edilmesine destek sağlayabilmektedir. Tekrarlayan EEG kayıtları epilepsisi olan birinde, özellikle nöbetler frontal veya temporal lobda başlıyorsa, normal görülebilir. Böyle durumlarda cerrahi öncesi değerlendirmede nöbetin odağını belirlemek için intrakraniyal EEG gerekli olabilir. Epilepsi tanısı klinik bilgi temelinde yapılmalıdır ve EEG görüntüleme tanısal olarak değil destekleyici olarak düşünülmelidir. Standart yaklaşım “hastayı tedavi et, EEG’yi değil” şeklindedir. Bu yaklaşımın istisnası kısa jeneralize diken-dalga deşarjları ile giden absans epilepsidir, absans nöbet rekürrensleri klinik değişikliklerle ilişkili olmadan tanı almadan gidebilir (57).

Elektrokortikografi (ECoG), EEG’nin direkt olarak korteksten kaydedilmesi işlemi olarak tanımlanmaktadır. Tıbbi açıdan dirençli epilepsi mevcut hastalarda fokal epilepsi başlangıcının belirli uzaysal bölgelerini tanımlamak için kullanılan klinik bir kayıt yöntemidir. İnvaziv yolla izlem yapılarak, nöbetlerin odakları belirlenebilir ve bu belirlenen nöbet bölgesinin cerrahi olarak çıkarılması nöbetlerin sıklığının azalmasını veya ortadan kalkmasını sağlayabilir. Cerrahi rezeksiyon işleminden sonra verilen tedavi ile birlikte hastaların yaklaşık yarısının nöbet kontrolünde anlamlı iyileşme görülebilmektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda EEG yerine büyük oranda ECoG kullanılmaktadır. Bunun nedeni ise deney hayvanlarında EEG aktivitesi kaydının zor olmasıdır (58).

2.2.1. EEG’de Görülen Dalga Tipleri

Sağlıklı bireylerde saçlı deri üzerinden kaydedilen EEG dalgaları beyin faaliyetlerini ölçen elektriksel sinyallerdir. EEG dalgalarının frekansları genellikle 1-30 Hz arasında

değişir ve amplitüdları ise 20-100 mikrovolt (μV) aralığındadır (59). EEG dalgaları frekanslarına göre alfa, beta, delta, gama, teta ve delta olmak üzere beş gruba ayrılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. EEG dalgaları ve frekansları (Malmivuo'dan, 60)

Alfa dalgaları, 8-13 Hz/sn frekansa sahip, 20-60 μV yüksekliğinde ritmik dalgalardır. Sakin ve dinlenme durumundaki genç uyanık erişkinlerin hemen hemen tümünün EEG'sinde bulunmaktadır. Bu dalgalar en güçlü olarak oksipital bölgeden ölçülmekle birlikte, parietal ve frontal bölgelerde de görülmektedir. Gözler açıkken veya bir problem üzerine düşünüldüğünde alfa ritminin kaybolmasına alfa blokajı veya desenkronizasyon denilmektedir (61).

Beta dalgaları, saniyede 13-30 Hz frekansa sahip, düşük voltajlı 2-20 μ V amplitüd aralığında düzensiz dalgalardır. En iyi frontal bölgeden kaydedilen bu dalgalar zihinsel aktivite esnasında belirginleşirler. Beynin hasarlı bölgelerinde azalan veya kaybolan bu dalgaların çok fazla artışı stres ile ilişkilendirilmiştir (62).

Delta dalgaları, düşük frekanslı (0.5-4 Hz) ve amplitüdü 20-200 μ V olan dalgalardır. Bu dalgalar, genellikle derin uyku, bilinç kaybı veya anestezi gibi durumlarla ilişkilidir. Yetişkin bireylerde özellikle frontal bölgeden, çocukluk döneminde ise oksipital bölgeden kaydedilebilmektedir. Deney hayvanlarında subkortikal kesi oluşturularak talamusla korteks arasındaki bağlantı kesildiğinde de korteks yüzeyinden kaydedilebilmeleri nedeniyle delta dalgalarının sadece kortekste oluştuğu düşünülmektedir (63).

Gama dalgaları, EEG frekansı 30 Hz/saniye ve üzeri dalgalardır. 40 Hz düzeyindeki aktivitenin bilişsel fonksiyonlarda ve duyuşsal uyarılarla elde edilen bilginin işlenmesinde rolü olduğu belirtilmektedir. Gama dalgalarının yüksek düzeyde varlığının bellek fonksiyonu ve geçmiş olayları hatırlayabilme becerisi ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Deney hayvanları üzerinde yapılan deneylerde gama dalgalarının dikkate bağılı durağanlık, dikkat ve duyuşsal algılamayla bağlantılı olduğu belirtilmiştir (64).

Teta dalgaları, 4-7 Hz frekansında, 20-100 μ V amplitüdünde olan, çocuklarda parietal ve temporal bölgelerden alınan kayıtlarda görülebilmekle beraber bazı erişkinlerde duyuşsal stres durumlarında da görülebilen dalgalardır. Teta dalgaları dejeneratif beyin hastalıklarında sık görülmektedir (63).

2.3. Epilepsi

2.3.1. Tanım

Epilepsi, herhangi bir coğrafi, sosyal veya ırk sınırları olmayan, her yaşta insanı etkileyebilen rekürren epileptik nöbetler oluşturmaya uzun süreli predispozisyon ile karakterize yaygın bir kronik beyin hastalığıdır. Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği [International League Against Epilepsy (ILAE)] epilepsiyi şu tıbbi durumlardan herhangi birini karşılayan beyin hastalığı olarak tanımlamıştır: (1) 24 saatten uzun süre arayla en az iki provoke edilmemiş (veya refleks) nöbet; (2) tetiklenmemiş bir nöbet (veya refleks nöbet) ve önümüzdeki 10 yıl içinde tekrarlayan nöbet görülmesi olasılığının %60'tan fazla olması; (3) bir epilepsi sendromu tanısı. Ayrıca epilepsi tanısı ile takip edilen bir hastanın 10 yıldır epileptik nöbetinin olmaması ve bu sürenin son 5 yılında da antiepileptik ilaç kullanımı

olmaması durumunda ve de yaş ile ilişkili epilepsi sendromu değilse, artık epilepsi dinmiş olarak kabul edilir (65).

Epileptik nöbet; beyindeki anormal aşırı veya senkron nöral aktivite sonucu gelişen geçici işaretler ve/veya semptomlardır. Tetiklenmiş (provoke, uyarılmış, akut semptomatik) nöbet; metabolik, toksik, yapısal, infeksiyöz veya inflamasyon nedeniyle santral sinir sisteminde meydana gelen ve bu nedenlerle aralarında zamansal ilişki (ilk yedi günde) bulunan akut, geçici, düzeltilebilir olaylardır. Tetiklenmemiş (provoke olmamış, uyarılmamış) nöbet; herhangi bir uyarıcı olmadığında, potansiyel bir klinik durumun yokluğunda veya klinik durumla zamansal ilişkinin olmadığında kullanılabilen bir terimdir. Tetiklenmemiş nöbetler etyolojisi bilinmeyenler ve beyinde yapısal lezyonu, progresif santral sinir sistemi hastalığı veya epilepsiye neden olan metabolik bir bozukluğu olanlar olarak iki grupta incelenir. Refleks nöbet; ışık uyarıcı gibi herhangi bir uyarıcıyla tetiklenen nöbetler varlığında spesifik uyarıcıya karşı daima ortaya çıkan nöbetlerdir. Refleks epilepsi sendromu; bir uyarıcıyla ortaya çıkan tüm epileptik nöbetler olarak tanımlanmaktadır (66).

Nöbet başlangıcı fokal (beynin bir hemisferinden kaynaklanan nöbetler), jeneralize (eş zamanlı olarak beynin her iki hemisferinden kaynaklanan nöbetler) ve bilinmeyen şeklinde olabilir. Fokal nöbetler bilinç durumunun bir göstergesi olan uyanıklığın korunmuş veya bozulmuş olmasına göre sınıflandırılır. Fokal ve jeneralize nöbetler aynı zamanda motor ve non-motor olarak da ikiye ayrılır (67).

Aktif epilepsi, nöbetlerin düzenli antiepileptik ilaç tedavisi altında veya en son nöbetin son beş yıl içinde gerçekleşmiş olması durumu olarak tanımlanır. Status epilepticus (SE) süresi uzayan veya hasta eski nörolojik durumuna dönmeden çok sayıda nöbetin peş peşe tekrarladığı bir tablo olarak tanımlanmaktadır. SE nöbetlerin süresine ve tipine bağlı olarak nöronal hasar/ölüm ve nöronal bağlantılarda değişiklikler gibi uzun dönem sonuçlara yol açabilir. SE için yeni diagnostik sınıflandırma önerilmiştir. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Ligi'nin (ILAE) yeni önerisinde SE'nin tanımında 2 zaman noktası belirlenmesi gerektiği ifade edilmiştir. Bu yeni tanımda 1.zaman noktası olarak önerilen t1, bir nöbetin durması beklenen zaman dilimi içerisinde durmaması ve nöbeti durduracak mekanizmaların yetersiz kaldığını gösteren ve artık acil müdahalenin başlanması gereken zaman dilimini, 2. zaman noktası olarak önerilen t2 tıbbi müdahale başlanmaması durumunda geri dönüşümsüz uzun dönem sonuçların belirdiği süreyi göstermektedir. Bu tanıma göre SE, anormal uzamış

nöbetler ile karakterize, bu nöbetleri başlatan mekanizmaların neden olduğu veya nöbetleri sonlandıran mekanizmaların yetersizliği ile oluşan klinik durumdur (68).

2.3.2. Epidemiyoloji

Epilepsinin ortalama insidansı yılda 100 000 kişide 29-39 aralığındadır. Epilepsinin en genç yaş grubunda (1 yaş altı) ve yaşlılık döneminde görülme sıklığı artar. Ateş, travmatik beyin hasarı, serebrovasküler hastalıklar, ilaç bırakılması, enfeksiyon ve metabolik sebepler en yaygın presipite eden faktörlerdir (69).

İnsidans çalışmalarının sistematik derleme ve meta-analizinde epilepsinin insidans oranı 100 000 nüfus-yıl başına 61.4 [%95 güven aralığı (GA) 50.7–74.4] olarak belirtilmiştir. İnsidans düşük/orta gelirli ülkelerde 139.0 (%95 GA 69.4–278.2) iken yüksek gelirli ülkelerde 48.9 (%95 GA 39.0–61.1) olarak saptanmıştır. Düşük/orta gelirli ülkelerin daha yüksek epilepsi insidansına sahip olması risk altındaki popülasyonların farklı yapısı, perinatal risk faktörlerine daha fazla maruziyet, merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının daha fazla olması ve travmatik beyin hasarı görülmesi ile açıklanabilir. Epilepsi insidansı yüksek gelirli ülkelerdeki en düşük sosyoekonomik sınıflarda daha yüksektir (70).

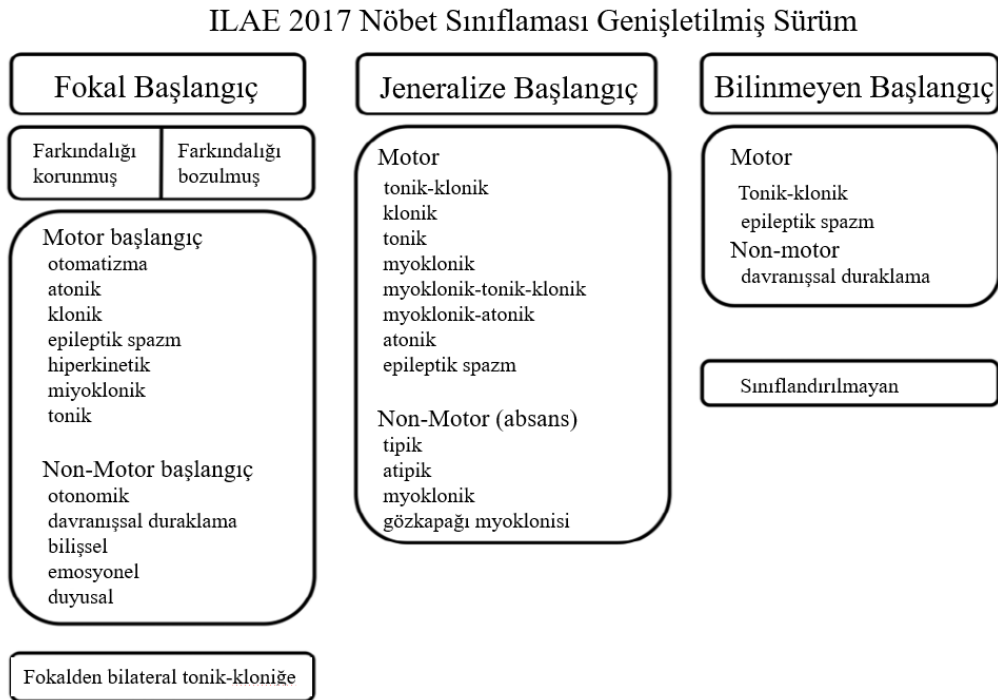
Epilepsi prevalansı riskin yerel dağılımına, etiyolojik faktörlere, tanı anındaki nöbet sayısına, sadece aktif epilepsi vakalarının (aktif prevalans) dikkate alınması veya remisyonadaki vakaların da dahil edilerek (yaşam boyu prevalans) hesaplanmasına bağlı olarak ülkeler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Fiest ve arkadaşları, epilepsinin yaşam boyu genel prevalansının 1000 nüfus başına 7.60 olduğunu (%95 GA 6.17-9.38) ve düşük/orta gelirli ülkelerde (1000'de 8.75), yüksek gelirli ülkelere (1.000'de 5.18) daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (71). Türkiye'de yapılan bölgesel çalışmalarda epilepsi sıklığının binde 5-10 arasında olduğu belirtilmiştir (72–74).

2.3.3. Sınıflandırma

Epilepsi sınıflandırması, nöbetle başvuran bir bireyin değerlendirilmesinde temel klinik araçtır. Epilepsi sınıflandırması her klinik konsültasyonu etkiler ancak etkisi klinik alanda kullanımının ötesine geçerek temel ve klinik epilepsi araştırmalarına ve yeni tedavilerin geliştirilmesine kadar uzanır. Sınıflandırma hastanın geçirdiği nöbetlerin tipini, o bireyde meydana gelme olasılığı daha yüksek olan diğer nöbet türlerini, nöbetlerin potansiyel tetikleyicilerini ve nöbetlerin prognozunu anlamak gibi birçok amaca hizmet eder. Sınıflandırma aynı zamanda şu riskler hakkında da bilgi verir: öğrenme güçlükleri,

entelektüel disabilite, otizm spektrum bozukluğu gibi psikiyatrik özellikler ve epilepside beklenmedik ani ölüm gibi mortalite riski. Sınıflandırma aynı zamanda antiepileptik tedavilerin seçimine de rehberlik eder (75).

Epilepsi sınıflandırması açısından klinisyen nöbet tipinin sınıflandırılması ile başlar, sonrasında hastanın epilepsi tipinin sınıflandırılması gerekir ve çoğu durumda spesifik bir epilepsi sendromu tanısı konulabilir. Nöbet tipi ve epilepsi tipi sınıflandırmasında elektroensefalografi (EEG) ve nörogörüntüleme gibi araştırmaların sonuçları epilepsinin altında yatan etiyolojinin araştırılması için yapılan diğer çalışmalarla birlikte dikkate alınır. Epilepsi sınıflandırmasının başlangıç noktası nöbet tipinin belirlenmesidir. Nöbetler fokal başlangıçlı, jeneralize başlangıçlı ve bilinmeyen başlangıçlı şeklinde sınıflandırılmaktadır. ILAE 2017 nöbet sınıflandırması Şekil 3'te gösterilmiştir. Fokal başlangıçlı nöbetler, odağı bir hemisfer veya bir bölge ile sınırlı, net olarak tanımlanan ya da yaygın bir dağılım gösteren, subkortikal yapılarla da bağlantı içine girerek daha geniş bir ağdan kaynaklanabilen nöbetleri tanımlamaktadır. Jeneralize başlangıçlı nöbetler ise beynin iki taraflı ağlarına hızla yayılan nöbetler için kullanılmaktadır.



Şekil 3. ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması genişletilmiş sürüm (Fisher'dan, 76)

Fokal başlangıçlı nöbetlerin sınıflandırmasında nöbet bittikten sonra hasta o nöbetin farkında olduğunu belirtiyorsa farkındalık korunmuş olarak değerlendirilir. Nöbet esnasında hasta muayene edilirken sorulan sorulara cevap alınamaması ya da hastanın verilen talimatları yerine getirememesi farkındalığın korunmadığı anlamına gelmemektedir. Nöbet süresi içinde hasta herhangi bir dönemde (ne kadar süre olursa olsun) farkındalığı kaybediyorsa, nöbet farkındalığı bozulmuş olarak sınıflandırılmalıdır. Fokal ve jeneralize nöbetler motor ve non-motor olarak ikiye ayrılırlar. Fokal motor başlangıçlı nöbetler, atonik (fokal tonus kaybı), klonik (fokal ritmik kasılma/atma), miyoklonik (düzensiz, kısa süreli fokal kasılma/atma), tonik (uzun süreli fokal kasılma) ve epileptik spazm (gövde fleksiyonu ile kollarda fokal ekstansiyon veya fleksiyon) gibi bulgularla kendini gösterebilir. Jeneralize başlangıçlı nöbetler ise motor ve non-motor (absans) olarak ikiye ayrılır. Bu nöbetlerde farkındalık bozulduğundan, sınıflandırmada farkındalık düzeyi kullanılmaz. Jeneralize nöbetlerin doğru şekilde sınıflandırılabilmesi için, ana semiyolojik özelliklerin tanımlarının doğru bilinmesi ve kullanılması önemlidir:

Miyoklonik kasılma: Ani ve kısa süreli (<250-300 ms) tek veya çoklu kas kasılmaları olarak tanımlanır. Bu kasılmalar aksiyal, proksimal ve distal kaslarda görülebilir. Klonik kasılmalara göre daha kısa süreli olup, tekrarlama sıklığı daha düzensizdir.

Klonik kasılma: Sıçrama şeklinde, simetrik veya asimetrik olarak gerçekleşen ve düzenli olarak tekrarlayan, aynı kas gruplarını içeren kasılmalardır.

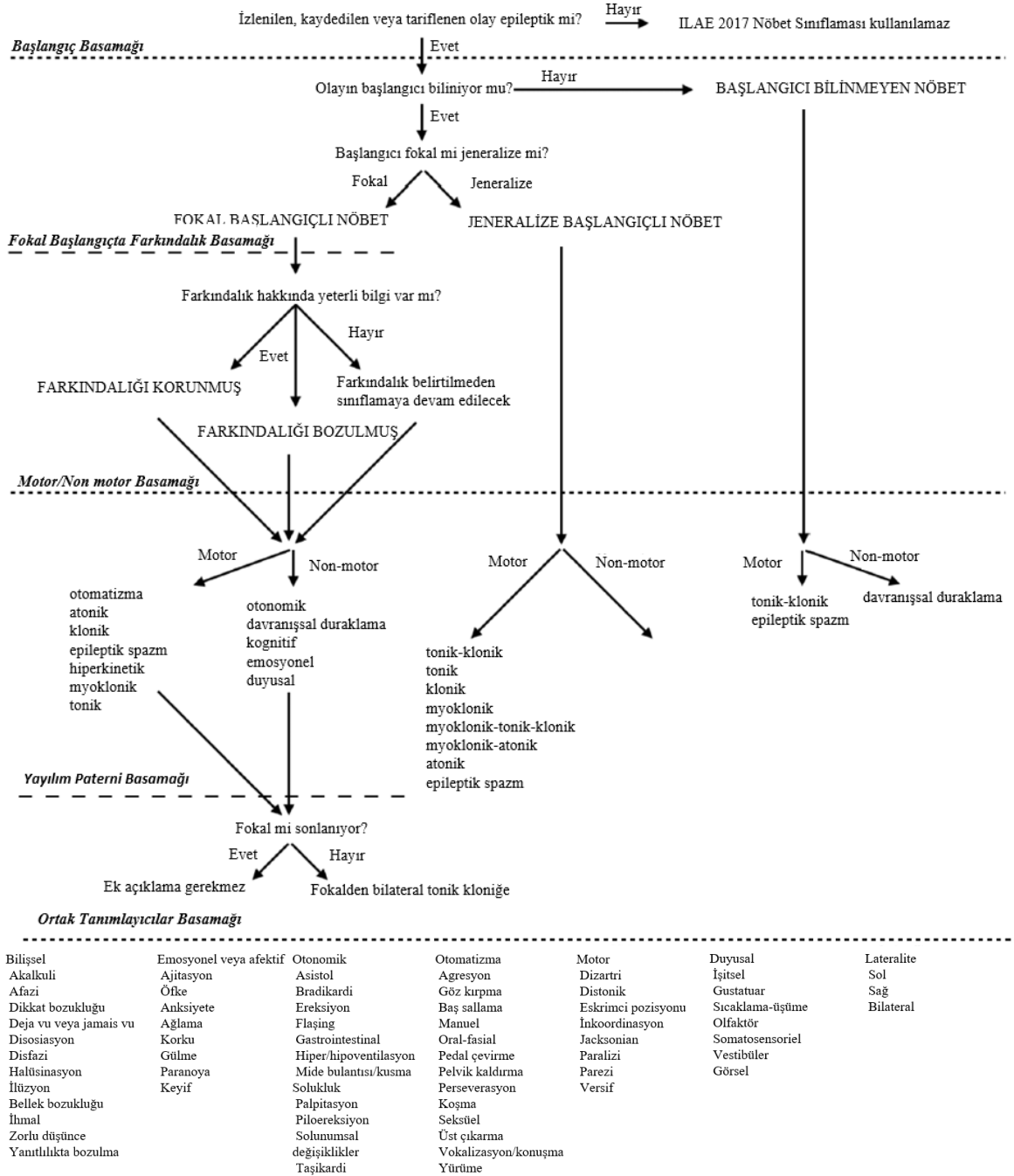
Atoni: Birkaç saniye süren, öncesinde miyoklonik veya tonik bir kasılma olmadan kas tonusunda ani bir kayıp veya azalma olarak tanımlanır. Bu durum baş, gövde, çene veya ekstremitte kaslarında görülebilir.

Tonik kasılma: Birkaç saniyeden dakikalara kadar sürebilen ve kaslarda sürekli artan bir kasılma olarak tanımlanır.

Epileptik spazm: Miyoklonik kasılmalardan daha uzun, ancak tonik kasılmalardan daha kısa (1-2 saniye) süren kasılmalardır. Bu özellikleri nedeniyle "spazm" olarak adlandırılır. Genellikle proksimal ve gövde kaslarında ani fleksiyon-ekstansiyon veya ekstansiyon-fleksiyon karışımı şeklinde görülür. Ayrıca, sırtıtma, baş sallama ve küçük göz hareketleri gibi sınırlı hareketlerle de ortaya çıkabilir (66).

Anamnez alırken kullanılan algoritmik yaklaşım nöbet sınıflamasında da kullanılabilir. ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması kullanım algoritması Şekil 4'te gösterilmiştir (66).

Sınıflandırmada ikinci aşama epilepsi tipinin belirlenmesidir. Epilepsi tipleri bilinmeyen, fokal, jeneralize, kombine jeneralize ve fokal kategorilerini içermektedir. Jeneralize epilepsi tanısı için hastada EEG'de jeneralize diken-dalga aktivitesi görülmelidir.



Şekil 4. ILAE 2017 işlevsel nöbet sınıflaması kullanım algoritması (Yeni'den, 66)

Jeneralize epilepsinin tanısı tipik interiktal EEG deşarjları bulgularıyla desteklenen klinik temellere dayalı olarak konur. Fokal epilepsiler unifokal ve multifokal bozuklukların yanı sıra bir hemisferi içeren nöbetleri de kapsar. İnteriktal EEG tipik olarak fokal epileptik deşarjları göstermektedir, ancak tanı EEG bulguları ile desteklenen klinik bulgularla konulur. Kombine jeneralize ve fokal epilepsi tanısı hem jeneralize hem de fokal nöbetler geçiren hastalarda EEG bulgularıyla desteklenen klinik ile konulur. İnteriktal EEG hem jeneralize dalga-diken hem de fokal epileptiform deşarjları gösterebilir, ama epileptiform aktivite tanı için gerekli değildir. Bilinmeyen epilepsi terimi hastanın epilepsi hastalığı olduğu fakat klinisyenin EEG'ye ulaşımın olmaması, EEG sonuçlarının informatif olmaması, yetersiz veri gibi nedenlerle epilepsi tipini fokal veya jeneralize olarak belirleyemediği durumlarda kullanılır (75).

2.3.4. Epilepsinin Patofizyolojisi

Epilepsinin biyokimyasal temeline ilişkin ana fikir, beyindeki inhibitör ve eksitatör etkilerin dengesinin eksitasyonda artma veya inhibisyonda azalma nedeniyle bozulmasından kaynaklandığı yönündedir. Epileptogenez tekrarlayan spontan nöbetlere neden olan, bir nöronal ağın yapısal ya da fizyolojik değişikliklere uğrayarak aşırı uyarılmış bir ağa dönüşüm süreci olarak tanımlanmaktadır. Eksitasyon/inhibisyon dengesizliği genler ve hücre altı sinyalleşme basamaklarından yaygın nöron devrelerine kadar beynin birçok seviyesindeki bir değişikliğin sonucu olarak görülebilir. Eksitasyon/inhibisyon dengesini değiştiren faktörler genetik veya kazanılmış olabilir. Epilepsiye yol açan genetik patolojiler nöronal gelişimsel bozulma düzeyinden (örn. kortikal displazide anormal sinaptik bağlantı reseptör düzeyine [örn. Angelman sendromunda anormal g-aminobütirik asit (GABA) reseptör alt birimleri] ve anormal iyon kanalı fonksiyonuna (örn. benign ailesel neonatal epilepside potasyum kanalı mutasyonları) kadar herhangi bir yerde ortaya çıkabilir. Benzer şekilde kazanılmış beyin hasarları (örn. uzun süreli febril konvulziyon veya kafa travmasını takiben hipokampal çevrede yapısal değişiklik) nöronal fonksiyonu değiştirebilir (57). Gelişmekte olan beyin, çeşitli fizyolojik nedenlerden dolayı nöbet geçirmeye eğilimlidir. Normal gelişme döneminde olan beyinde bile uyarıcı sinaptik fonksiyon, inhibitör sinaptik fonksiyondan önce gelişir, eksitasyonda ve nöbet oluşumunda artışa neden olur, ayrıca yaşamın erken yıllarında nörotransmitter GABA inhibisyondan ziyade eksitasyona neden olur. Bu bulgular genç beynin nöbetlere daha yatkın olduğunu kısmen açıklamaktadır, bununla birlikte nöbetler gelişmekte olan beyinde yetişkin beynine göre daha az yapısal hasara neden olmaktadır (77).

Mutasyonlar monogenik ya da poligenik olsun epilepsiye neden olabilir. Pek çok epilepsi tipinin altında hücrel eksitabilitenin değişmesine katkıda bulunan çoklu gen defekti içeren kompleks bir genetik temel vardır. Örneğin boyutu bir kilo baz çifti üzerinde olan de novo veya kalıtsal delesyonlar/duplikasyonlar şeklindeki kopya sayısı varyasyonları sıklıkla epilepsili hastalarda genetik mutasyonların kaynağı olarak tanımlanmaktadır. Genetik ile ilgili bilgi arttıkça sendroma spesifik terapötik müdahalelerin mümkün olacağı umudu artmaktadır (78).

2.4. Deneysel Epilepsi Modelleri

İnsandaki epilepsi ve/veya nöbetlerin bazı karakteristiklerini taklit eden in vivo ve in vitro birçok deneysel epilepsi modeli bulunmaktadır. En sık kullanılan modellerin tanımları ve taklit ettikleri klinik durumlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Sık kullanılan deneysel epilepsi modellerinin kullanım alanları (Raol’dan, 25)

Model	Klinik Durum	Yaygın Kullanım
Pilokarpin	Fokal (temporal lob)	Epileptogenezis mekanizmaları, kognitif defisitler ve epilepsi, tedavi geliştirilmesi
Kainik asit	Fokal (temporal lob)	Epileptogenezis mekanizmaları, kognitif defisitler ve epilepsi, tedavi geliştirilmesi
Pentilentetrazol	Jeneralize nöbetler	Nöbet mekanizması, ilaç taramaları
Flurotil	Multipl akut nöbetler, çocukluk çağı epilepsileri	Nöbetle indüklenen kognitif defisitler
Penisilin fokal uygulaması	Fokal (neokortikal) nöbetler	Nöbet oluşum ve yayılma mekanizması
Tetanos toksini	Fokal nöbetler	Nöbet oluşum ve yayılma mekanizması, epileptogenezis mekanizmaları
Tetrodoksine	İnfanıl spasmlar	Nöbetlerin uzun dönem sonuçları, tedavi geliştirilmesi
Doksorubisin+ Lipopolisakkaritler+ klorfenilamin	İnfanıl spasmlar	Nöbetlerin uzun dönem sonuçları, tedavi geliştirilmesi
Elektriksel ve kimyasal tetikleme	Fokal (temporal lob) epilepsi	Epileptogenezis mekanizmaları, antikonvülzan ve antiepileptogenetik ilaç taramaları, kognitif defisit
Maksimal elektroşok (MES)	Fokal epilepsi	İlaç taramaları
Travma	Fokal epilepsi	Epileptogenezis mekanizmaları, kognitif defisitler ve hücre ölümü, tedavi geliştirilmesi
Hipoksi/iskemi	Hipoksik iskemik ensefalopati	Epileptogenezis mekanizmaları, kognitif defisitler ve hücre ölümü, tedavi geliştirilmesi
Sıcaklık	Febril nöbetler	Nöbetlerin uzun dönem sonuçları, tedavi geliştirilmesi
Genetik modeller	Mutasyonlarla ilişkili epilepsiler	Nöbet ve epilepsi mekanizması
İn vitro modeller	Nöbetler	Nöbet mekanizması, ön ilaç taramaları

2.4.1. Kimyasal Modeller

2.4.1.1. Pilokarpin Modeli

Sıçanlarda pilokarpin ile oluşturulan epilepsi modeli, temporal lob epilepsi (TLE) üzerinde çalışmak için sıklıkla kullanılır. TLE insanlarda epilepsinin en yaygın tipidir ve başlatıcı bir hasar (hayatın erken döneminde febril nöbetler, travma) ile karakterizedir. Latent bir dönemden sonra spontan rekürren nöbetler (epilepsi) gelişebilmekte ve hipokampal skleroz görülebilmektedir. Pilokarpin bir asetilkolin reseptör agonistidir. M1 muskarinik reseptörlerin nöbetlerin başlatılmasında, N-metil-d-aspartik asit (NMDA) glutamat reseptörlerin ise nöbetlerin sürdürülmesinde rol oynadığı ifade edilmektedir. Tipik protokol 350–385 mg/kg pilokarpin (i.p.) uygulanmasından 30 dakika önce 1 mg/kg (i.p.) skopolamin metilnitrat uygulanmasını içermektedir. Skopolamin metilnitrat, kolinerjik uyarının periferik etkilerini baskılamak amacıyla verilmektedir. Pilokarpin uygulamasından yaklaşık 45 dk sonra sıçanlarda elektrografik ve davranışsal nöbetler başlamakta ve birkaç saat sürebilmektedir. Nöbetlerin süresi benzodiazepin veya fenobarbital tedavisiyle kontrol edilebilmektedir (79).

2.4.1.2. Kainik Asit Modeli

Kainik asit a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) ve kainat glutamat reseptörleri için agonist etki gösteren bir glutamat analogudur. Status epileptikus oluşturmak için sistemik olarak, intraserebroventrikül yoldan veya direk olarak spesifik beyin bölgesine uygulanabilmektedir. Tek bir yüksek doz (10-18 mg/kg) kainik asit enjeksiyonu stereotipik davranışsal nöbetleri indükler. Kainik asit uygulanmasından yaklaşık bir saat sonra sıçanda mastikasyon, fasyal klonus, ön ayaklarda titreme, ayağa kalkma hareketi gibi rekürren motor nöbetler görülebilmekte ve status epileptikusa girmeden önce birkaç saat sürebilmektedir. Tek bir yüksek doz yerine hayvanda status epileptikus gelişene kadar multipl daha küçük dozlarda (5 mg/kg) enjeksiyonu da birçok laboratuvar tarafından uygulanmaktadır. Bu yaklaşım status süresince hayvanın mortalitesini anlamlı olarak azaltmaktadır. Pilokarpin modeli ile benzer şekilde kainik asit modeli de insan TLE'sinin önemli özelliklerini taklit etmektedir (80).

2.4.1.3. Flurotil Modeli

Flurotil uçucu bir sıvıdır ve buharı güçlü konvulzan etki göstermektedir. Flurotil GABA-A reseptörlerinin non-kompetitif antagonistidir ve sıklıkla rekürren neonatal jeneralize tonik-klonik nöbetler için bir model olarak kullanılır. Nöbetleri indüklemek için

sıçan yavruları bir kafes içindeki hava geçirmez plastik silindirik bir bölmeye yerleştirilir. Bir şırınga pompası kullanılarak flurotil 40 µL/dak hızında enjekte edilir. Flurotil iki farklı tür primer jeneralize nöbetleri indükler: korunmuş doğrulma yeteneğiyle birlikte yüz ve ön ayakların klonik nöbetleri ve doğrulma yeteneği kaybolduktan sonra dört ekstremitenin tonik-klonik nöbetleri. Flurotil'in sürekli uygulanması uzun süreli nöbet ve SE'ye neden olmaktadır (81).

2.4.2. Elektriksel Stimülasyon Modelleri

2.4.2.1. Tetikleme

Düşük yoğunlukta elektriksel stimülasyonun (veya düşük doz pentilentetrazol gibi kimyasal konvulzan) epileptik bir nöbet tetiklenene kadar tekrarlayan şekilde bir beyin bölgesine uygulanması şeklindedir. Elektriksel olarak bir deney hayvanında ateşleme yapmak için ilk olarak stimulan elektrot stereotaksik olarak beyinde ilgilenilen bölgeye implante edilir. Ateşleme oranı farklı beyin bölgeleri arasında ve farklı rat türleri arasında farklılık göstermektedir. İlk olarak deşarj sonrası eşik karakteristikleri belirlenir (örneğin 8 saniye ve daha uzun süren deşarj, stimülasyon öncesine göre üç kat EEG amplitüd yüksekliği). Belirlenen deşarj sonrası eşik karakteristiklerini oluşturan stimulus yoğunluğu deşarj sonrası eşik noktası olarak belirlenir, daha sonra hayvan evre 5 nöbetler oluşana kadar her gün, günde bir kez deşarj sonrası eşik ile uyarılır. Ateşleme yoluyla davranışsal nöbetlerin oluşumu 5 evrede sınıflandırılmıştır: (1) ağızda ve fasyal klonus, (2) kafa sallama, (3) ön ayak klonusu, (4) yükselme hareketi, (5) yükselme ve düşme. Ateşleme ile indüklenmiş nöbetler, stimülasyon bölgesinden köken alır ve tekrarlayan stimülasyonla diğer bölgelere yayılır, sekonder jeneralizasyonu olan parsiyel nöbetlerin klinik fenotipini taklit eder (81, 82).

2.4.2.2. Maksimal Elektroşok (MES) Modeli

Jeneralize tonik-klonik nöbetlerin bir modelidir. Bu model korneal elektrotlar, transkranyal elektrotlar veya kulak klipsleri aracılığıyla elektroşok verilerek indüklenir. Korneal stimülasyon için gözlere elektrotlar yerleştirilmeden önce lokal %0.5 tetrakain ile anestezi verilir. Gözler daha sonra fizyolojik salin damlası ile nemlendirilir ve 60 Hz frekansta 0.2 saniyelik alternatif akım serisi farelerde 50 mA yoğunlukta ve sıçanlarda 150 mA yoğunlukta elektrotlar aracılığıyla korneaya uygulanır (83). Stimülasyon ön ve arka ekstremitelerin tonik ekstansiyonunu içeren nöbetleri indükler. Kullanım kolaylığı nedeniyle

MES testi potansiyel antiepileptik ilaçların taramasında kullanılmaktadır. Fenitoinin antikonvülzan etkisi MES modeli kullanılarak gösterilmiştir (84).

2.4.3. Genetik Modeller

Genetik mutasyonlar epilepsiye neden olmaktadır. İyon kanallarında, reseptörlerde ve transportlarda disfonksiyona yol açan gen mutasyonlarının epilepsiye neden olduğu belirtilmiştir (85). Bazı sıçan türlerinde herediter absans tipi nöbetler görülmektedir. GAERS (Strasbourg'dan genetik absans epilepsili rat) ve Wistar Albino Glaxo/Rijswijk türlerinde spontan olarak absans epilepsi geliştirmektedir. Bu sıçanlardan alınan EEG kayıtları immobilite ile uyumlu dalga-diken deşarjları göstermektedir. İnsan absans nöbetlerine karşı etkili olan etosüksimid ve valproat gibi ilaçlar GAERS ve Wistar Albino Glaxo/Rijswijk sıçanlarda da nöbetleri önlemede etkilidir. Sonuçta, bu sıçanlar absans tipi nöbetleri tedavi etmek için geliştirilen yeni ilaçların etkinliğinin test edilmesinde çok kullanışlıdır (86).

2.4.4. Travma Modelleri

Travmatik beyin hasarı kazanılmış epilepsinin yaygın bir sebebidir. Travmatik beyin hasarını takiben epilepsi görülme sıklığı, travmanın şiddetiyle korelasyon göstermektedir. Klinik çalışmalar travmatik beyin hasarı sonrası hipokampus, talamus, bazal ganglionlar gibi birden çok beyin bölgesinin nörodejenerasyona gittiğini belirtmektedir. Hayvanlarda travmatik beyin hasarını indüklemek için kortikal kesi, ağırlık düşürülmesi, kontrollü kortikal etki ve sıvı perküsyonu gibi metodlar kullanılmaktadır. Kontrollü kortikal etki metodu kapalı beyin hasarı için geliştirilmiş bir modeldir. İlk olarak anestezi altındaki hayvanlara korteksi açığa çıkarmak için kraniotomi uygulanır. Havayla çalışan, bilgisayar ile kontrol edilen bir piston hasar oluşturmak için beyni komprese eder. Pistonun hızı ve kortikal penetrasyonun derinliği hasarın genişliğini belirler. Klinik çalışmalarda görülenlere benzer şekilde travmanın şiddetiyle, travma sonrası epilepsi insidansı arasında korelasyon mevcuttur, kortikal kesi hasarı ile indüklenen travma sonrası farelerde epilepsi gelişme yüzdesi hasarın şiddetine bağlıdır. Hafif hasar oluşturulan farelerin sadece %20'sinde spontan nöbetler gelişirken, şiddetli hasar oluşturulan farelerin %36'sı epileptik olmaktadır (87).

2.4.5. Penisilin Modeli

Penisilin ile oluşturulan epileptiform aktivite modeli, deney hayvanı ile yapılan çalışmalarda en sık kullanılan modellerden birisidir. Penisilinler, sistemik olarak yüksek

dozda verildiğinde veya intraserebral yoldan kortekse doğrudan uygulandıklarında epileptiform aktiviteye yol açmaktadırlar (88). İntrakortikal Pen G uygulanması, insan fokal interiktal epileptik deşarjlarına elektrofizyolojik olarak yakın olan senkron nöronal deşarjla sonuçlanır. Penisilin modeli fokal olarak başlayıp daha sonra yayılarak jeneralize epileptik aktiviteye neden olur. (88, 89).

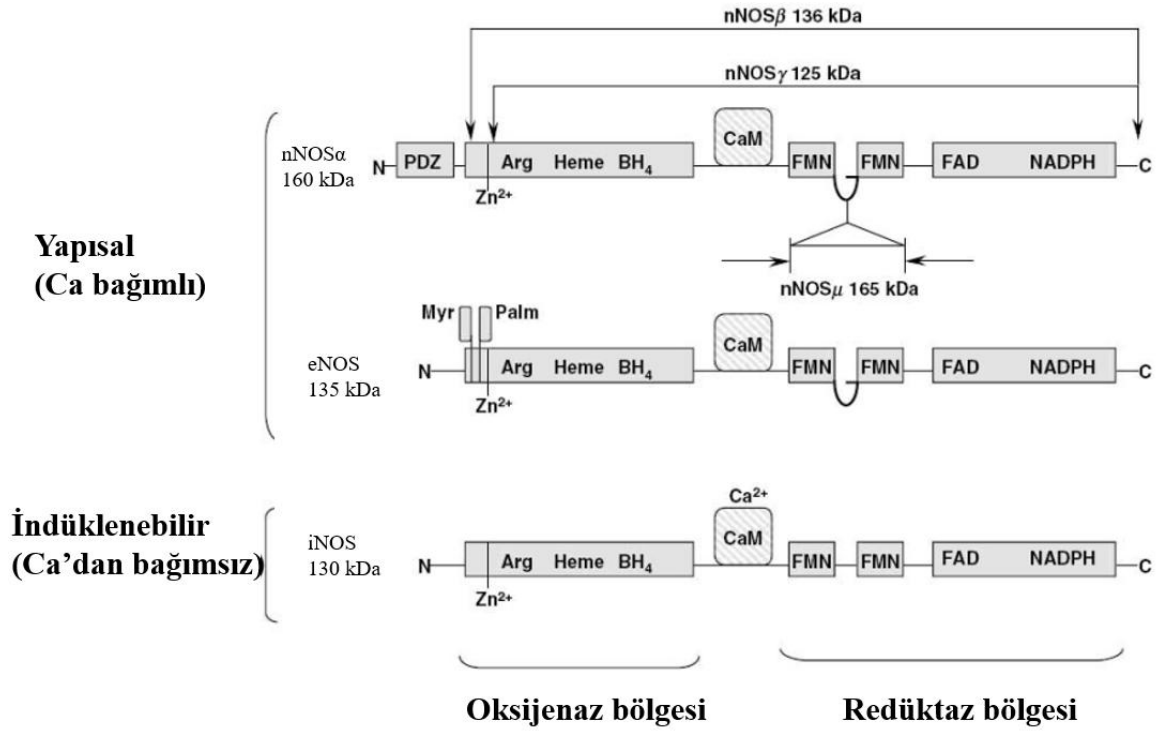
β -laktam antibiyotiklerinden olan penisilinin intraventriküler yoldan uygulandığında konvulziyonu tetiklediği ve nöbetlere neden olduğu ilk olarak 1945'te Walker ve Johnson tarafından gösterilmiştir (90). β -laktam antibiyotiklerin konvülzan etkisinin, gama-amino bütirik asit tip A reseptörlerinin (GABA-A) inhibisyonu ve bunun sonucu olarak inhibitör postsinaptik tepkilerin baskılanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. GABA-A inhibisyonu ile intraselüler alana klor girişi azalacağından hücre depolarizasyonu, uyarılabilirlikte artış ve aynı zamanda spontan aksiyon potansiyellerinin oluşumu gözlenmektedir (91). Penisilinin neokortekse uygulanmasının, in vivo veya in vitro epileptiform aktiviteyi indükleyen glutamat salınımını artırdığı da bildirilmiştir (92).

2.5. Nitrik Oksit

2.5.1. Nitrik Oksit Sentezi

NO endotel, makrofaj ve nöron gibi hücrelerde nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla sentezlenir. NOS'un üç farklı tipi vardır. Yapısal ve kalsiyuma bağımlı NOS tipi (eNOS) endotelyal hücrelerde, hipokampus ve diğer beyin bölgelerinde bulunmaktadır. Nöronlarda bulunan nNOS aktivitesi kalsiyum (Ca^{+2}) ile düzenlenmektedir. İndüklenebilen NOS ise (iNOS), kalsiyumdan bağımsız, sitokinlerin etkisiyle üretilebilen ve makrofajlarda bulunan tipidir (93). NOS enzimlerinin yapısal alt birimleri Şekil 5'te gösterilmiştir (94).

Üç nitrik oksit sentaz izoenzimin her biri NADPH ve moleküler oksijeni ko-substrat olarak kullanarak L-Arjininden NO üretirler. Nöronlarda NO sentezi glutamat NMDA reseptör aktivasyonu sonucu intraselüler alana kalsiyum (Ca^{+2}) girişi ile stimüle olur. NO cGMP aracılığıyla etki göstermekte ve hücreler arası mesajcı olarak fonksiyon göstermektedir (95).



Şekil 5. NOS enzimlerinin yapısal alt birimleri (Mungrue'dan, 94). Arg: L-arjinin; BH4: tetrahydrobiopiterin; Kalmodylin (CaM) kofaktör ve substrat bağlanma bölgesidir. FAD: flavin adenin dinükleotid; FMN: flavin mononükleotid; Myr: Miristolasyon; NADPH: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; Palm: palmitolasyon

2.5.2. Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

Nöronal NOS, beyindeki spesifik nöronlarda sentezlenmektedir. Ca^{+2} ve kalmodylin aracılığıyla aktivitesi düzenlenir. Hücrelerde partikül ve çözünür formlarda bulunur ve nNOS'un ayırıcı subseleler lokalizasyonu, onun çeşitli fonksiyonlarına katkıda bulunabilir. Nöronal NOS, diğer proteinler ile doğrudan etkileşime girerek hücre içi dağılımını ve enzimin aktivitesini belirler. Beyin dokusuna ek olarak nNOS'un omurilikte, sempatik ganglionlarda, adrenal bezlerde, periferik nitretrjik sinirlerde, çeşitli organların epitel hücrelerinde, böbrek makula densa hücrelerinde, pankreas adacık hücrelerinde ve damar düz kasında bulunduğu immünohistokimya ile gösterilmiştir (95).

2.5.2.1. Nöronal Nitrik Oksit Sentazın Fizyolojik Fonksiyonları

nNOS'un öğrenme, hafıza ve nörogenez gibi fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Santral sinir sisteminde sinaptik iletimin düzenlenmesine aracılık eder (uzun dönem güçlenme, uzun dönem inhibisyon), ancak akut nörotransmisyonun nNOS'tan türetilmiş NO'yu içerdiğine dair kanıt mevcut değildir. Sinaptik kavşaklar

arasındaki retrograd iletişimin hafıza oluşumunda rol oynadığı varsayılmaktadır ve NOS inhibitörlerinin öğrenmeyi bozduğuna ve hayvan modellerinde amnezi ürettiğine dair bulgular mevcuttur (95). Ayrıca nNOS tarafından MSS'de oluşturulan NO'nun, kan basıncının merkezi düzenlenmesinde rol oynadığı ve hipotalamusta nNOS aktivitesinin bloke edilmesinin sistemik hipertansiyona neden olduğu belirtilmektedir (96).

2.5.2.2. Patofizyolojide Nöronal Nitrik Oksit Sentazın Rolü

Anormal NO sinyalleşmesinin inme, multipl skleroz, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları sonrası eksitotoksosite gibi çeşitli nörodejeneratif patolojilere katkıda bulunması muhtemeldir. Nöronal hücrelere yoğun Ca^{+2} akışıyla uyarılan hiperaktif nNOS'un, serebrovasküler felçte NMDA reseptörünün aracılık ettiği nöron ölümünde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu koşullar altında NO, muhtemelen poly-ADP-riboz polimerazın (PARP) peroksinitrit aktivasyonu ve/veya mitokondriyal geçirgenlik geçişi yoluyla eksitotoksositeye katkıda bulunmaktadır. Yüksek NO seviyeleri, mitokondriyal solunumun inhibisyonu ve glikolizin inhibisyonu nedeniyle enerji tükenmesine de neden olabilir (97).

2.5.3. Nitrik Oksit ve Epilepsi

Epilepsi çalışmalarının pek çoğunda NO'nun prokonvülzan (98, 99) ve antikonvülzan (100, 101) olduğu iddia edilmektedir. Nitrik oksitin epileptik nöbetlerdeki rolü hakkındaki çalışmalar farklı ve çelişkili sonuçlar vermiştir. Yapılacak çalışmaların bu konuya ışık tutması beklenmektedir. De Sarro ve arkadaşları tarafından NMDA reseptör stimülasyonundan önce NO üretiminin azaltılmasının epileptiform aktiviteyi azalttığı belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar, L-Arjinin'in, NMDA veya kainik asit tarafından üretilen epileptiform aktiviteyi arttırdığını ve NOS inhibitörü L-NAME ile birleştirildiğinde L-Arjinin'in prokonvülzan etkisinin kaybolduğunu bulmuşlardır (99). Spesifik bir NOS inhibitörü olan 7-NI ile yapılan ön tedavi, NO üretimini ve kainik asit tarafından indüklenen epileptiform aktiviteyi azaltmıştır (98). Pek çok çalışma ise deneysel epilepside NO üretiminin arttığını ortaya koymuştur (102, 103). Bu çalışmalar NO'nun prokonvülzan olduğunu göstermektedir.

2.6. Oksidan ve Antioksidan Sistem

Aşırı serbest radikal salınımı kaynaklı oksidatif stresin, epilepsinin başlaması ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu yüzden epilepsi hastalığının tedavisinde oksidatif stresi azaltma amacı taşıyan antioksidan tedaviler büyük ilgi görmektedir. Bunun

yanında çeşitli kanıtlar, oksidatif stresin bütün nöbet modellerinde her zaman aynı ideal koşullara sahip olmadığını göstermektedir. Süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\bullet$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tekli oksijen (O_2) ile birlikte ROS (reaktif oksijen radikalleri), normal hücresel metabolizma sırasında üretilir. Fizyolojik ROS seviyeleri enzimatik [örn., katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), ve peroksiredoksinler (Prxs)] ve non-enzimatik [örn., E vitamini, C vitamini ve indirgenmiş glutatyon (GSH)] antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılır. Bununla birlikte, artmış reaktif oksijen radikalleri üretimi, azalmış antioksidan savunma becerisi ya da her ikisi nedeniyle aşırı reaktif oksijen radikalleri seviyeleri oksidatif strese neden olur. Ek olarak, fazla reaktif oksijen radikalleri ayrıca peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türleri (RNS) oluşturmak için nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girer (104).

Hipoklorik asitle oksitlenmiş proteinler, özellikle albümin, disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlantısı yoluyla protein agregatları dahil olmak üzere gelişmiş oksidasyon protein ürünleri üretir. Epileptik ensefalopatisi olan ve antiepileptik ilaç kullanan hastalarla yapılan bir çalışmada gelişmiş oksidasyon protein ürünleri düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu belirtilmiştir (105).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) hücrelerdeki oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Lipitler, hücre zarının önemli bileşenleridir. Lipid peroksidasyonu; diyabet, yetişkin respiratuar stres sendromu, Alzheimer hastalığı, iskemi, epilepsi gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Serbest radikaller nöronal dejenerasyona neden olabilir ve bu da lipid peroksidasyonunu artırmaktadır. Beyin, yüksek multipl doymamış yağ asit içeriği nedeniyle lipid peroksidasyonuna çok duyarlıdır. Bu sebeple beyindeki hücresel ölümler nedeniyle MDA düzeylerinde artış görülmesi normaldir (106).

Epilepsinin patogenezinde antioksidan enzimler de rol oynamaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşmesini katalize eden bir enzimdir ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Bakır-çinko SOD (CuZnSOD) sitoplazma ve peroksizomlarda etki gösterirken, mitokondride manganiz oluşur. SOD1 genindeki mutasyonlar beyin, beyin sapı ve omurilikteki nöronal yaralanmalara, oksidatif reaksiyonun artmasına ve bundan dolayı proteinlerin yanlış katlanmasına katkıda bulunur ve ek olarak SOD apoptoza da katılır. Bu nedenle, SOD1 nöronal apoptozda önemli bir faktördür.

Apoptoz ve oksidatif stres epilepsi gelişiminde önemli patofizyolojik faktörlerdir. SOD1'in azalmasının anti-oksidatif ve anti-apoptotik aktivitelerin zayıflamasını gösterdiği ve epilepsi gelişimine katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir. Bir antioksidan enzim olan katalaz H_2O_2 'yi su ve oksijene ayrıştırmaktadır, katalaz enzimi yokluğunda SOD aracılığıyla süperoksitten dönüştürülen aşırı H_2O_2 , metal iyonları ile reaksiyona girerek zararlı hidroksil radikalini oluşturabilir. Epilepsi çalışmaları birbiriyle çelişen bulgular içerse de epileptik nöbet sırasında katalaz düzeylerinin büyük oranda düştüğü gösterilmiştir (107).

Bu tez çalışmasında sıçanlarda penisilinle uyarılan epileptiform aktivite üzerine zeytin ağacının temel fenolik bileşiği olan oleuropeinin olası etkisi ve bu etki üzerindeki nitrik oksit (NO) yolağının rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilen 88 tane 3-4 aylık ortalama 320-360 g ağırlığında Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi'nde üretildikten sonra ulaşabildikleri miktarda yem ve su temin edilerek, %45-55 nem koşulları ve 22±3°C ortam sıcaklığında, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü ile yetiştirilmeleri sağlandı. Hayvan deneyleri KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Elektrofizyoloji ve Deneysel Epilepsi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu çalışma öncesinde KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvuru yapılarak, tüm deney prosedürleri için gerekli etik kurul izni alındı (Onay kodu: 2022/19). Etik kurul onay belgesi Ek 1'de sunulmuştur. Deneyler süresince Avrupa Birliği Konseyi'nin deney hayvanlarının kullanımına dair direktiflerine (86/609/EEC) uyuldu. Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: THD-2023-10803

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Uygulanma Şekilleri

Çalışma kapsamında kullanılan Penisilin-G Pfizer'dan (Pfizer İlaçları Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye), izotonik sodyum klorür çözeltisi 500 ml Koçak Farma firmasından (Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. İstanbul, Türkiye), L-ARJ, 7-NI ve L-NAME Sigma'dan (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), glutatyon peroksidaz kiti ve süperoksit dismutaz kiti Cayman'dan (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) temin edildi. Oleuropein Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarında izole edilerek temin edilmiştir. Penisilin intrakortikal (i.c) yoldan, diğer ilaçlar ise intraperitoneal (i.p) yoldan uygulanmıştır.

3.2.1. Penisilin G Potasyum

Moleküler formülü: $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$

Moleküler ağırlığı: 372.48 g/mol

Çözücü: Steril fizyolojik tuzlu su (SF)

İnsanlarda görülen epileptik nöbetlere benzer deşarjlar ratlara yüksek doz Pen G uygulandığında görülebilmektedir. Pen G ile oluşturulan epileptik aktivite modeli sıklıkla tercih edilen deneysel epilepsi modellerinden birisidir. Pen G potasyum sulandırılmadan önce hassas terazi kullanılarak tartıldı, uygulamalardan hemen önce serum fizyolojik (SF)

ile 2,5 µl hacimde 500 IU (uluslararası ünite) Pen G olacak şekilde sulandırıldı ve intrakortikal olarak uygulandı. İntrakortikal yoldan uygulanan yüksek doz Pen G (500 IU) anestezi altındaki sıçanlarda 3-5 dakika içinde bilateral senkron, jeneralize diken-dalga aktivitesinin oluşmasına yol açmaktadır. Diken-dalga aktivitesi 2-4 saat süreyle devam etmektedir. Pen G'nin bu etkisinin GABA'nın etkisini bloke etmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda penisilinin hipokampal bölgede inhibitör postsinaptik potansiyelleri engellediği; presinaptik bölgeden asetilkolin salgısını, asetilkolinin uyarıcı etkisini ve korteks dilimlerinden glutamat salınımını artırdığı belirtilmiştir (108).

3.2.2. Üretan

Moleküler formülü: $\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$

Moleküler ağırlığı: 89.09 g/mol

Çözücü: Distile su

Deney hayvanlarında uzun süreli elektrofizyolojik kayıt almak ve anestezi oluşturmak amacıyla üretan uygulanmıştır. Deneyler sırasında üretanın 1 gramı 4 cc distile su içerisinde çözöldü. Elde edilen çözöltü 1.25 g/kg dozda deney hayvanına cerrahi işlem öncesinde intraperitoneal (i.p.) yol ile uygulandı.

3.2.3. Oleuropein

Moleküler formülü: $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$

Moleküler ağırlığı: 540.51 g/mol

Çözücü: Steril fizyolojik tuzlu su (SF)

Oleuropein bileşiğinin izolasyonu aşamasında Olea europea (zeytin) bitkisinin yaprakları (350 gram) gölgede kurutuldu ve bitki değirmeni kullanılarak toz edildi. Cam balona alınan toz bitki numunesinin üzerine 2 L %70 metanol eklendi ve rotary evaporator kullanılarak 40°C'de ekstre edildi. 4 saat sonunda ekstre süzgeç kağıdından süzöldü. Ekstraksiyon işlemi her seferinde taze çözücü eklenerek 4 defa tekrar edildi. Süzöntüler birleştirildi ve rotary evaporator kullanılarak kuruluğa kadar uçuruldu. Elde edilen ham ekstre 69.9 g tartıldı (verim: %19.8). Ekstre su:metanol (9:1) karışımında çözüldü ve ayırma hunisi yardımıyla sırasıyla *n*-hekzan ve etil asetat ile ekstre edildi (109, 110). Elde edilen *n*-hekzan, etil asetat ve su alt ekstreleri rotary evaporatörde 40 °C'de kuruluğa kadar uçuruldu.

Etil asetat alt ekstresi (26.7 g) ters faz silikajel (LiChroprep C18) kullanılarak vakum sıvı kromatografisine tabi tutuldu. Kolon, su içerisinde artan oranlarda metanol kullanılarak elüe edildi ve toplanan fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. Benzer fraksiyonlar bileştirilerek toplam 5 fraksiyon (fr. A-E) elde edildi. Fraksiyon E (11.3 g) silikajel kolona (100 g) tatbik edildi. Hareketli faz olarak artan polaritede $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ karışımı (100:0 → 90:10) kullanılan kolon İTK ile izlendi. Kolondan alınan 22-40 numaralı fraksiyonlardan OLE (6.35 g) bileşiği saf olarak izole edildi. OLE kodlu bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektral değerleri ile literatür verileri karşılaştırıldı ve bileşiğin yapısı oleuropein olarak aydınlatıldı (111).

Elenolik asit ve hidrokситirozolun bir esteri olan OLE, etkin doz belirleme aşamasında deney hayvanlarında penisilin ile epileptik aktivite oluşturulduktan 30 dakika sonra 20 mg/kg, 40 mg/kg ve 80 mg/kg dozlarında i.p. yoldan uygulanmıştır. Etkin doz 80 mg/kg olarak belirlendikten sonra ikinci çalışmada deney hayvanlarında penisilin ile epileptik aktivite oluşturulduktan 30 dakika sonra 80 mg/kg doz i.p. yoldan uygulanmıştır.

3.2.4. L-Arjinin

Moleküler formülü: $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$

Moleküler ağırlığı: 174.2 g/mol

Çözücü: Steril fizyolojik tuzlu su (SF)

L-Arjinin NO prekürsörüdür. OLE'nin epileptik aktivite üzerindeki etkisinin nitrejik sistem ile ilişkisinin araştırılması için 500 mg/kg dozda, SF ile çözülerek ve intraperitoneal yoldan uygulanmıştır.

3.2.5. 7-Nitroindazol

Moleküler formülü: $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$

Moleküler ağırlığı: 163.1 g/mol

Çözücü: DMSO/SF: 3/7

Moleküler formülü ve moleküler ağırlığı olan 7-NI spesifik nNOS inhibitörüdür. OLE'nin epileptik aktivite üzerindeki etkisinin nitrejik sistem ile ilişkisinin araştırılması için Dimetilsülfoksit (DMSO)/Salin: 7/3 ile çözülerek, 50 mg/kg dozda intraperitoneal yoldan uygulanmıştır.

3.2.6. L-NAME

Moleküler formülü: $C_7H_{15}N_5O_4$

Moleküler ağırlığı: 233.23 g/mol

Çözücü: Steril fizyolojik tuzlu su (SF)

Bir arjinin analogudur ve NOS enzimleri üzerine etki göstererek NO sentezini bloke eden non-spesifik antagonist ajandır. OLE'nin epileptik aktivite üzerindeki etkisinin nitrejik sistem ile ilişkisinin araştırılması için 60 mg/kg dozda, SF ile çözülerek ve intraperitoneal yoldan uygulanmıştır.

3.2.7. Glutatyon peroksidaz kiti

GPx enzimi, peroksit radikallerini substrat olarak kullanarak alkole indirgenmesini, glutatyonu substrat olarak kullanarak H_2O_2 'nin indirgenmesini veya glutatyonun yükseltgenmesini sağlamaktadır. Deney hayvanlarından elde edilen serebral doku örnekleri eppendorf tüplerinde $-80^{\circ}C$ 'de saklanmış ve deney grupları arasında karşılaştırma yapmak için kit ile GPx aktivite düzeyleri incelenmiştir.

3.2.8. Süperoksit dismutaz kiti

Ksantin ile ksantin oksidaz enzim reaksiyonu sonucu oluşan süperoksit anyonları, SOD enzimi tarafından inhibe edilir ve bu inhibisyon Nitro Blue Tetrazoliumun indirgenmesini sağlar. Deney hayvanlarından elde edilen serebral doku örnekleri eppendorf tüplerinde $-80^{\circ}C$ 'de saklanmış ve deney grupları arasında karşılaştırma yapmak için kit ile SOD aktivite düzeyleri incelenmiştir.

3.3. Deney Prosedürü

Epileptiform aktivite 30 dakika monitörize edildikten ve kaydedildikten sonra diğer ajanlar OLE, L-NAME, 7-NI, L-ARJ intraperitoneal yoldan uygulanarak 120 dakika daha ECoG kaydına devam edilmiştir.

I. Deney dizaynı: Pen G ile oluşturulan epileptiform aktivite üzerine OLE'nin etkisinin araştırılması için üç grup doz çalışması yapılmıştır. Sıçanlarda epileptiform aktivite oluşturmak amacıyla 500 IU (i.c.) Pen G potasyum kullanıldı. Pen G uygulanmasından 30 dk sonra OLE 20, 40 ve 80 mg/kg dozlarında i.p. yoldan uygulandı.

1. SF grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada SF (2,5 µl, i.p.) enjeksiyonu yapılmıştır.

2. Pen G grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonu ve yarım saat sonra SF (2,5 µl, i.p.) enjeksiyonu yapılmıştır.

3. 20 OLE grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 20 mg/kg OLE (i.p.) enjeksiyonu yapılmıştır.

4. 40 OLE grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 40 mg/kg OLE (i.p.) enjeksiyonu yapılmıştır.

5. 80 OLE grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 80 mg/kg OLE (i.p.) enjeksiyonu yapılmıştır.

II. Deney Dizaynı: OLE doz grupları analizi sonucunda 80 mg/kg dozda epileptik aktiviteyi azalttığı tespit edildikten sonra OLE 80 mg/kg etkin doz olarak belirlenmiş, OLE'nin epileptiform aktivite üzerine etkisinin nitrerjik sistem ile ilişkisi araştırılması için nitrik oksit sentaz için esansiyel substrat olan L-ARJ, nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME ve 7-NI kullanılmıştır. İlaç dozları literatüre dayalı olarak belirlenmiştir. Sıçanlarda epileptiform aktivite oluşturmak için 500 IU (i.c.) Pen G potasyum kullanıldı. Pen G uygulanmasından 30 dakika sonra 80 mg/kg OLE i.p. yoldan uygulandı. OLE enjeksiyonundan 15 dakika sonra nitrerjik sistem ile ilişkili ajanlar L-NAME, 7-NI ve L-ARJ i.p. yoldan uygulandı.

6. L-NAME grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 60 mg/kg L-NAME (i.p) enjeksiyonu yapılmıştır.

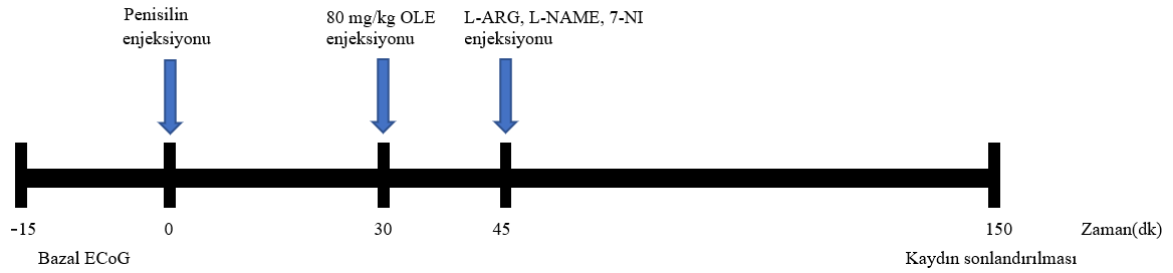
7. 7-NI grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 50 mg/kg 7-NI (i.p) enjeksiyonu yapılmıştır.

8. L-Arjinin grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 500 mg/kg L-ARJ (i.p) enjeksiyonu yapılmıştır.

9. 80 OLE+L-NAME grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 80 mg/kg OLE (i.p) enjeksiyonu, bu enjeksiyondan 15 dakika sonra 60 mg/kg L-NAME (i.p) enjeksiyonu yapılmıştır.

10. 80 OLE+7-NI grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 80 mg/kg OLE (i.p) enjeksiyonu, bu enjeksiyondan 15 dakika sonra 50 mg/kg 7-NI (i.p) enjeksiyonu yapılmıştır.

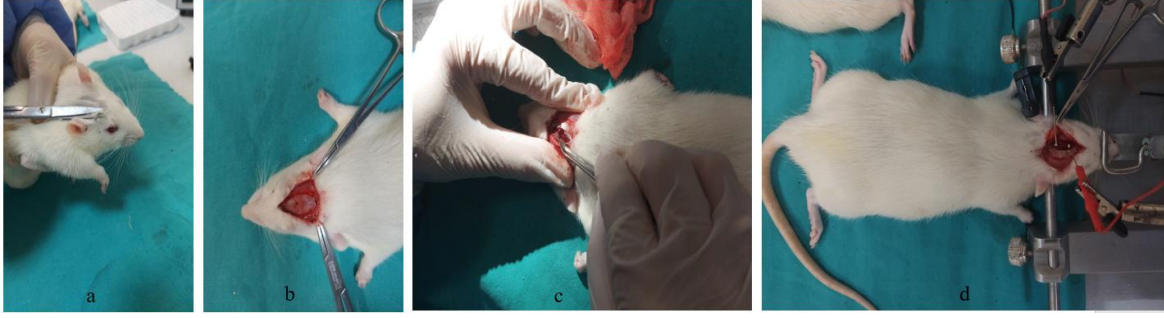
11. 80 OLE+L-Arjinin grubu (n=8): Deney günü bazal kayıt sonrası 30.dakikada yapılan 500 IU Pen G i.c. enjeksiyonundan 30 dakika sonra 80 mg/kg OLE (i.p) enjeksiyonu, bu enjeksiyondan 15 dakika sonra 500 mg/kg L-ARJ (i.p) enjeksiyonu yapılmıştır.



Şekil 6. İkinci deney dizaynında deney gruplarındaki her bir hayvana uygulanan işlemleri gösteren deney akış diyagramı

3.4. Cerrahi İşlem

Cerrahi işlem öncesi 24 saat aç bırakılan Wistar tipi ratlara, üretan (1.25 g/kg) i.p. uygulanarak anestezi sağlandı. Sonrasında ratların kafa tüyleri temizlenerek kafa derisi rostro-kaudal yönde 3 cm'lik bir insizyonla açıldı ve yumuşak doku ekartasyonu gerçekleştirildi. Sol sensörimotor korteks üstündeki kafatası kemiği Marathon multi 600 mikromotoru kullanılarak kaldırıldı. Kafatası kemiğinin kesilmesi sırasında görülen kanamalar kemik mumu (Bonewax, Clinmax, Türkiye) kullanılarak engellendi. Kemiğin kaldırılması aşamasında ısınmayı önlemek amacıyla işlem alanlarına SF uygulandı. Sonrasında stereotaksi cihazına sabitlendi. Deney hayvanlarına uygulanan cerrahi işlem prosedürü Resim 1'de gösterilmiştir.

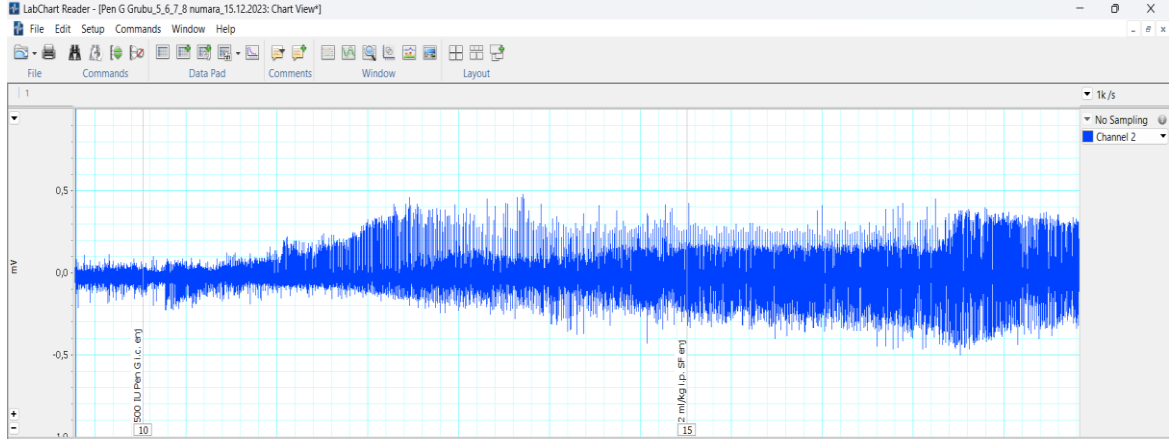


Resim 1. Deney hayvanlarına uygulanan cerrahi işlem prosedürü. **(a)** Deney hayvanının kafa tüylerinin temizlenmesi **(b)** Deney hayvanının kafa derisinde yumuşak dokunun ekarte edilmesi **(c)** Sol sensöromotor korteks üzerindeki kafatası kemiğinin kaldırılması **(d)** Deney hayvanının stereotaksi cihazına sabitlenmesi ve elektrotların yerleştirilmesi

3.5. Elektrofizyolojik Kayıt İşlemi

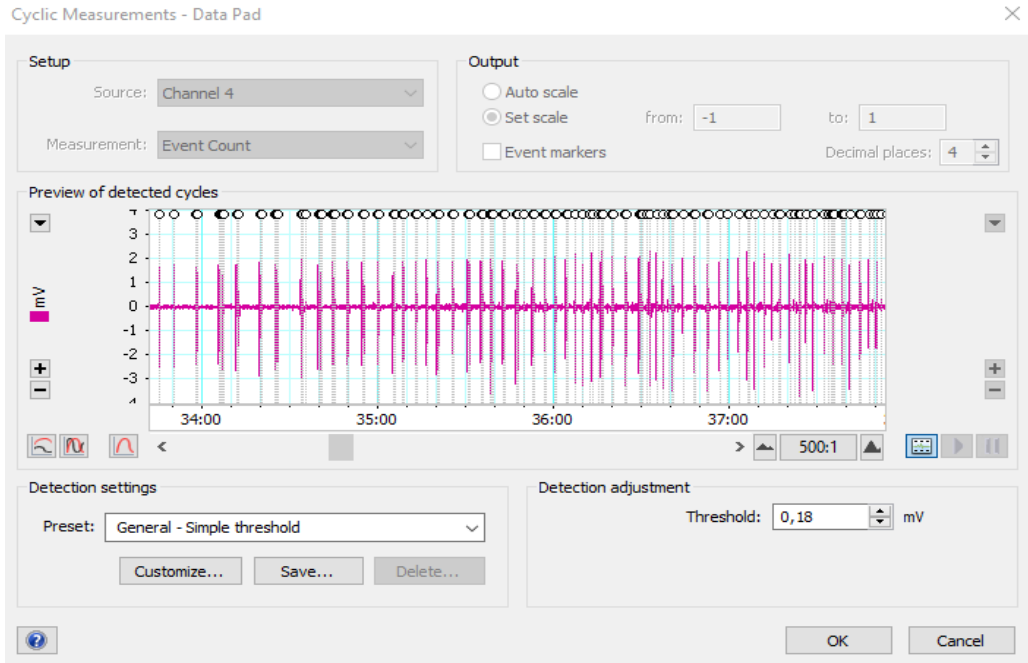
Cerrahi işlem sonrası deney hayvanları stereotaksi cihazına sabitlendi. Sıçanın kafa derisi iki kenardan pens kullanılarak sabitlendi. 37°C sıcaklığında sıvı vazelin uygulanarak serabral ve çevre dokuları sıvı kaybindan korumak, sıcaklığı korumak ve çevresel faktörler kaynaklı sinyal artefaktlarını engellemek hedeflendi. Rektal prob bağlanmış bir homeotermik battaniye (Harvard Instrument, ABD) kullanılarak sıçanların vücut sıcaklıkları 37°C’de tutularak izlendi. ECoG kaydı almak amacıyla 2 adet top ve 1 adet klemp Ag/AgCl elektrot (referans) kullanıldı. Negatif olan top elektrot ise bregmanın 5 mm posterior ve 3 mm lateraline, pozitif olan top elektrot bregmanın 2 mm anterior ve 2 mm lateraline, referans elektrot ise sol kulak cildi üzerine yerleştirildi (Resim 1d).

Elektrotlar aracılığıyla alınan ECoG aktivite kaydının güçlendirilmesi için bir amplifikatör (BioAmp ADInstruments, Avustralya) kullanıldı. Kayıtlar PowerLab 16/SP (ADInstruments, Australia) veri kayıt sistemine transfer edildi. Kaydedilen biyolojik sinyaller LabChart 8.1.27 (ADInstruments, Australia) yazılım programı ile bilgisayara aktarıldı (Resim 2). ECoG kayıtları sonlandırıldıktan sonra LabChart 8.1.27 yazılımının analiz modülleri ile kayıtlar sayısal verilere çevrildi (Resim 3).



Resim 2. LabChart programında epileptiform aktivite kayıt örneği

Tüm i.c. Pen G enjeksiyonları, bregma noktası referans alınarak bu noktanın 3 mm laterali, 2 mm ventrali ve 2 mm posterioruna gidilerek belirlenen noktaya bir Hamilton mikroenjektörü kullanılarak yapıldı. Bütün i.c. enjeksiyonlar sırasında mikroenjektörün damarlara zarar vermemesi amacıyla bir stereo cerrahi mikroskop (World Precision Instruments) kullanıldı. Penisilin uygulamasından önce deney hayvanlarından 15 dk bazal aktivite kaydı alındı. Deney hayvanlarına uygulanan SF ve oleuropein enjeksiyonları sonrası toplamda 120 dk kayıt alındı.



Resim 3. Spike frekansı ve amplitüdünü hesaplamak için kullanılan programın analiz modülü. Hesaplamaya katılan spike'lar diken dalgaların tepe kısmında içi boş noktalar olarak görülmektedir.

3.6. Elektrofizyolojik Kayıtların Değerlendirilmesi

Hayvan deneyleri sonucunda kaydedilen epileptiform aktivite spike frekansı ve amplitüdü yönünden değerlendirildi. Elde edilen interiktal spike aktivitelerinin frekansları, LabChart 8.1.27 Pro yazılımındaki Cyclic Measurements-Event Count-Simple Threshold basamakları kullanılarak analiz edildi. Amplitüd ise, yazılımın Average Cyclic Height özelliği sayesinde hesaplandı. Programın Multiple Add to Datapad özelliği ile penisilin enjeksiyonundan sonraki 150 dakika, 10 dakikalık dilimlere bölünerek hesaplandı ve veriler Microsoft Excel programına aktarıldı. Kimyasal enjeksiyonundan önceki 10 dakikalık spike aktivitesi yüzde yüz olarak kabul edilerek, yüzde değişim hesaplanması için kimyasal enjeksiyonundan sonraki 120 dakika boyunca kaydedilen spike aktiviteleri “Eşitlik 1” denkleminde gösterilen formül ile kimyasal öncesi 10 dakika ile kıyaslandı:

$$\begin{array}{lcl} \text{Frekans (Amplitüd)} & \text{Kimyasal verildikten sonra} & \\ \text{Değeri \%} & \text{frekans (amplitüd) ortalaması} & \\ = & \frac{\text{-----}}{\text{Kimyasal verilmeden önce}} & \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1}) \\ & \text{frekans (amplitüd) ortalaması} & \end{array}$$

3.7. Biyokimyasal Analizler

3.7.1. Beyin Dokusunda Homojenizasyon Aşaması

Yaklaşık 70-100 mg beyin dokusu 1 mL soğuk homojenizasyon tamponu ile deney tüpünde dokular tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 20 sn buz içerisinde homojenize edildikten sonra 10 dk süreyle 3 000 rpm'de santrifüj edildi. Ortaya çıkan süpernatantta katalaz (CAT) aktivitesi ölçüldü. 1.5 mL'lik ependorfa 750 µL süpernatant koyuldu. Üzerine 600 µL etanol- kloroform (2:3) olan karışımdan ilave edildi. +4°C'de 10 000 x g'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında ependorfun üst kısmındaki protein fazlarda protein tayini, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçüldü.

Homojenizasyon tamponu (50 mM Tris/Hidroklorür Tamponu) hazırlanırken 1 514 g Tris yaklaşık 220 mL saf suda çözüldü. Karışımın pH'sı 2 M hidroklorik asit (HCl) eklenerek 7.4 seviyesine getirildi. Homojenizasyona başlamadan hemen önce 125 µL Triton X100 ilave edilerek son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

3.7.2. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

Enzim aktivitesi Sun ve Oberley tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek ölçüldü (112). Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle elde edilen $O_2^{\cdot-}$ lerinin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi ile ortaya çıkan mor renkte formazan molekülünün absorbansının 560 nm’de ölçülmesi esasına dayalıdır.

3.7.2.1. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

SOD Reaktif Karışımı: 8.93 mg etilendiamintetraasetik asit, 3.65 mg ksantin, 1.01 g Na_2CO_3 , 12 mg sıgır serum albümini (BSA) tartılarak hacmi 156 mL’ye tamamlandı.

0.8 mM $CuCl_2$ Çözeltisi: Spektrofotometrik ölçüm öncesinde oluşan reaksiyonu önlemek için 6.82 mg çözelti 50 mL deiyonize su içerisinde çözülerek kullanıldı.

2 M $(NH_4)_2SO_4$ Çözeltisi: Ksantin oksidaz enziminin hazırlanma aşamasında 2.64 g $(NH_4)_2SO_4$ 10 mL saf suda çözülerek kullanıldı.

150 μ M NBT Çözeltisi: 4.9 mg NBT’nin 40 mL deiyonize suda çözülmesiyle elde edildi. Işıktan korunması sağlandı.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 4.59 U/ mL’lik orijinal şişeden 72.6 μ L alınarak $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi ile 2 mL’ye tamamlandı.

SOD Standart Çözeltileri: Stoktaki 100 U/mL’lik SOD standardından 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 U/mL konsantrasyonlarında SOD standart çözeltileri hazırlandı. Serebral doku örneklerinde 5 kat seyreltme yapıldı. SOD aktivitesi Tablo 2’ye göre ölçüldü.

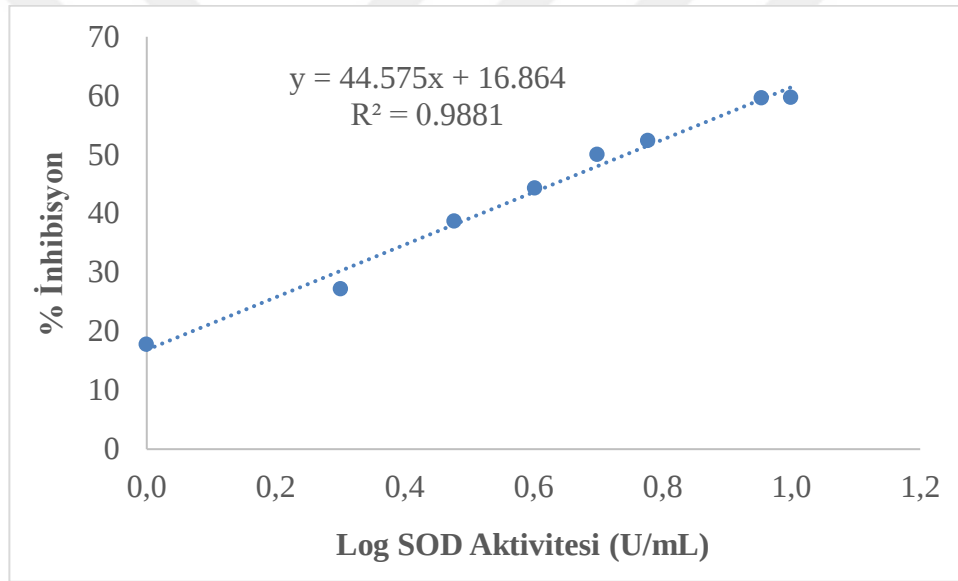
Tablo 2. SOD enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (μ L)
Numune, Standart, Kör	200
Ksantin Oksidaz	20
SOD Reaktif Karışımı	796
Nitroblue Tetrazolium	204
25 °C’de 20 dk inkübasyon	
$CuCl_2$	400
560 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

SOD aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan % inhibisyonu belirlemek için “Eşitlik 2” denklemindeki formül kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = (Abs \text{ Kör} - Abs \text{ Numune}) \div (Abs \text{ Kör}) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması kullanılarak oluşturuldu (Şekil 7). Standart grafiğinde belirlenen denklem aracılığıyla örneklerin % inhibisyonlarına denk gelen SOD konsantrasyonlarının logaritmik değerleri hesaplandı. Bu değerlerin anti logaritmaları alınarak örneklerin SOD konsantrasyonu hesaplandı. Seyreltme faktörü ile çarpıldı. Belirlenen SOD konsantrasyonu, total protein miktarına bölündü ve SOD aktivitesi belirlendi. Sonuçlar U/mg protein türünden hesaplandı.



Şekil 7. Beyin dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği

3.7.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Beyin dokusunda CAT enziminin aktivitesinin belirlenmesinde Aebi metodu kullanıldı (113). Bu metod H₂O₂'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'deki absorbans azalmasının izlenmesine dayanmaktadır.

3.7.3.1. CAT Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

H₂O₂: Hazırlanırken 360 µL %30'luk H₂O₂ alındı ve fosfat tamponu eklenerek son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti günlük olarak hazırlandı.

Fosfat Tamponu (pH:7.0; 50 mM): 3.41 g KH₂PO₄ alınarak deiyonize suda çözüldükten sonra son hacim 500 mL'ye tamamlandı. Ardından, 4.45 g NaHPO₄.2H₂O deiyonize suda çözüldü ve hacim 500 mL'ye tamamlandı. Bu iki çözelti sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırılarak pH:7.0'a ayarlandı.

Fosfat tamponu kullanılarak doku homojenatları 20 kat seyreltildi ve ölçüm için kullanılacak örnekler elde edildi. Pipetlemeler kuartz küvetlere numune ve kör karışımları için ayrı ayrı Tablo 3'te belirtilen şekilde yapıldı.

H₂O₂ eklendikten hemen sonra kuartz küvetler altüst edilerek karıştırıldı. Absorbans ölçümleri 240 nm'de 30 saniye boyunca, her 10 saniyede bir alındı ve absorbanslardaki düşme miktarları izlendi. Düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına özen gösterildi.

Tablo 3. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (µL)	Numune (µL)
Numune	1000	1000
Fosfat Tamponu	500	-
H ₂ O ₂	-	500

240 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

CAT aktivitesinin belirlenmesinde birinci dereceden reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslarda görülen 10 s'lik düşüş için "Eşitlik 3" denkleminde belirtilen hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2.3/10) \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Burada;

A₁= Başlangıç absorbansı

A₂= 10 sn sonraki absorbanstır.

"Eşitlik 3" denkleminde göre hesaplanan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Sonrasında serebral doku örneklerinde g protein başına CAT aktivitesi hesaplanarak sonuçlar k/g protein cinsinden verildi.

3.7.4. Beyin Dokusu MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Beyin dokularının homojenizasyonu için yaklaşık 50 mg beyin dokusu 1 mL soğuk homojenizasyon tamponu ile deney tüpünde dokular tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 30 sn buz içerisinde homojenize edildikten sonra 3 000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve MDA seviyesi belirlendi. Bu yöntem MDA’nın tiyobarbitürik asit ile asidik ortamda oluşturduğu kompleksin 532 nm’deki absorbans ölçümü esasına dayanan metod modifiye edilerek yapıldı (114).

3.7.4.1. Beyin Dokusu MDA Seviyelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi: 50 mL saf su içerisinde 0.67 g TBA manyetik bar kullanılarak 30°C’de 20 dk boyunca karıştırıldı. TBA çözeltisinin soğumasının ardından üstüne 50 mL asetik asit eklenerek iyice karıştırıldı ve çalışma için gerekli çözelti hazırlandı.

Homojenizasyon Tamponu: Hazırlanması için %1.15’lik KCl çözeltisi içine %0.05’lik Triton X100 eklendi.

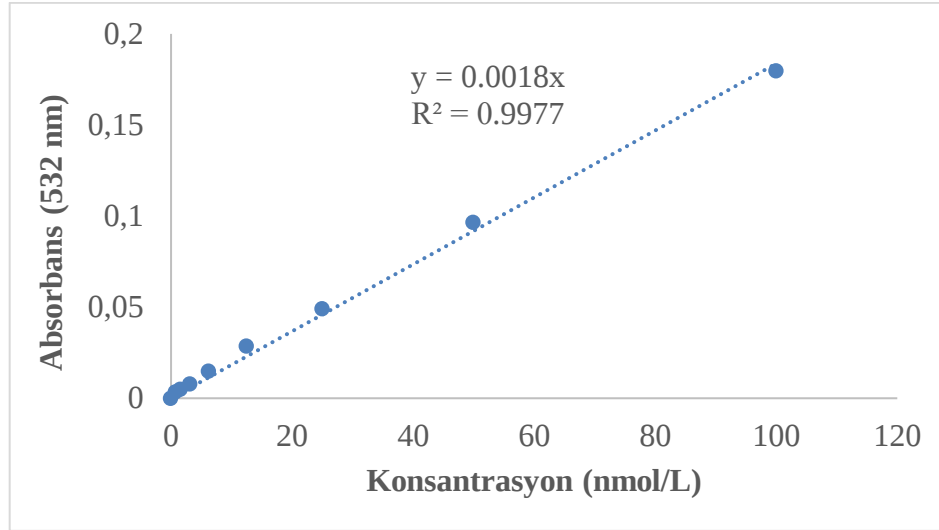
Standart Çözeltiler: 82.5 µL tetrametoksipropan, 50 mL 0.01 M HCl çözeltisine ilave edilip, 50°C sıcaklıkta 1 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonucu elde edilen 10 000 nmol/mL MDA stok standardı kullanılarak, 100 nmol/mL konsantrasyonda bir ara stok çözeltisi oluşturuldu. Seri seyreltmeler yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nmol/mL’lik standart çözeltiler elde edildi.

%1’lik H₃PO₄ Çözeltisi: Bir miktar saf suya 2.94 mL %85’lik H₃PO₄ ilave edilip, ardından saf su eklenerek toplam hacim 250 mL’ye tamamlandı.

Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 4’te verilmiştir. Şekil 8’deki standart grafik kullanılarak MDA düzeyi ölçüldü. Ölçüm sonuçları nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Tablo 4. MDA ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Hacim (mL)
Numune, Standart, Kör	0.5
%1’lik H ₃ PO ₄ Çözeltisi	3
Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi	1
100°C’de 45 dakika inkübasyon	
532 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	



Şekil 8. Beyin dokusu MDA standart grafiği

3.7.5. Beyin Dokusu GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Serebral doku örneklerinde GPx aktiviteleri Cayman Chemical (Michigan, ABD) firması tarafından üretilen 703102 numaralı kit prosedürüne göre belirlenmiştir. GPx aktivitesinin ölçümünün temeli Paglia ve Valentine tarafından geliştirilen yöntemeye dayanmaktadır (115). Bu yöntemde GPx ve GR enzimleri kullanılmaktadır. Numunede hidroperoksitlerin varlığı durumunda, indirgenmiş glutatyon GPx enzimi ile yükseltgenmektedir. Yükseltgenmiş glutatyon, NADPH varlığı durumunda glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar indirgenmiş glutatyona dönüştürülür ve aynı zamanda $NADP^+$ oluşur. NADPH'ın $NADP^+$ 'ya yükseltgenmesiyle absorbansta 340 nm'de görülen düşüş, GPx enziminin aktivitesiyle orantılıdır. GPx aktiviteleri nmol/dakika/mg protein cinsinden belirtildi.

Beyin dokusu örneklerindeki protein tayini aşamasında protein düzeyi modifiye Bradford yöntemi ile hesaplandı (116). Yöntem proteinlerin asidik ve bazik gruplarının organik boyalar ile etkileşerek mavi renk oluşturması temeline dayanmaktadır.

3.7.5.1. Beyin Dokusu GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Bradford reaktifi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-25, 5 mL %95'lik etanol içerisinde çözülerek üstüne %85'lik H_3PO_4 eklendi ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

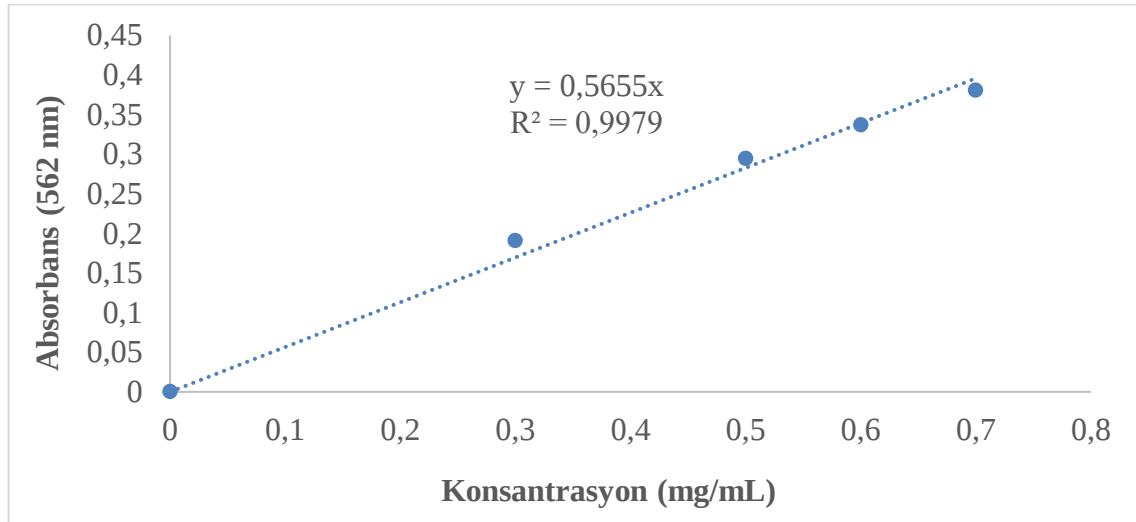
%20'lik HCl çözeltisi: 27.03 mL %37'lik HCl saf su içine eklendi ve hacmi saf su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı. Yıkama çözeltisi olarak analizler sırasında kullanılan cam malzemelerde oluşan protein kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla kullanıldı.

Standart çözeltiler: 20 mg BSA bir miktar saf su içerisinde karıştırıldıktan sonra hacmi 20 mL'ye tamamlandı. Ortaya çıkan 2 mg/mL konsantrasyonundaki ana stoktan 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 ve 0 mg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlandı.

Doku homojenatları kendi tamponlarıyla 15 kat seyreltilerek Tablo 5'e göre pipetlemeler gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında on dakika inkübasyon uygulandı. İnkübasyon sonrası 600 nm'de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi. Standart grafik kullanılarak konsantrasyonlar ölçüldü (Şekil 9). Değerler mg/mL protein cinsinden belirtildi.

Tablo 5. Protein seviyesi ölçümünde kullanılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Numune (µL)	Standart (µL)
Numune	10	-
Standart	-	10
Bradford reaktifi	100	100
Karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon uygulandı. İnkübasyon sonrası 600 nm'de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi.		



Şekil 9. MDA, GPX, SOD ve CAT seviyesini belirlemek için yapılan protein miktarını hesaplamada kullanılan standart grafiği

3.8. Histopatolojik Analiz

ECoG kayıtlarının bitiminde anestezi altında olan hayvanlar dekapite edilerek hayvanların beyinleri (hemisferler) çıkarıldı. Sağ ve sol hemisferden alınan doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde 48 saat fikse edildikten sonra rutin takip yöntemleri uygulanarak parafin bloklar elde edildi. Bloklardan mikrotom yardımıyla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı ve bu kesitler hematoxilen-eozin boyası ile boyandı. Elde edilen preparatlarda 3 üzerinden inflamasyon skoru ve konjesyone damar yaygınlığı hesaplandı. Bu skorelama sistemine göre inflamasyon; 0: Hiç yok, 1: Hafif şiddette, 2: Orta şiddette, 3: Şiddetli olarak değerlendirildi. Konjesyone damar yaygınlığı 0: Hiç yok, 1: Az sayıda, 2: Birkaç alanda dağınık, 3: Yaygın olarak değerlendirildi.

3.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen ECoG kayıtların istatistiksel analizinde GraphPad InStat (v3.1) yazılımı kullanıldı (San Diego, CA, USA). Yapılan çalışmada, verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk (W) testi ile değerlendirilmiştir. Veriler normal dağılıma uymadığı için non-parametrik testler kullanılmıştır. Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama±standart hata (SEM) olarak, yüzde spike ve amplitüd değerleri Median (İnterquartil range) olarak belirtilmiştir. Değişkenlerin ortalamalarının, üç ve daha grup ile karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlı farkın post-hoc analizinde değişkenlerin ortalamalarının iki grup ile karşılaştırılmasında Mann Whitney U kullanılmıştır.

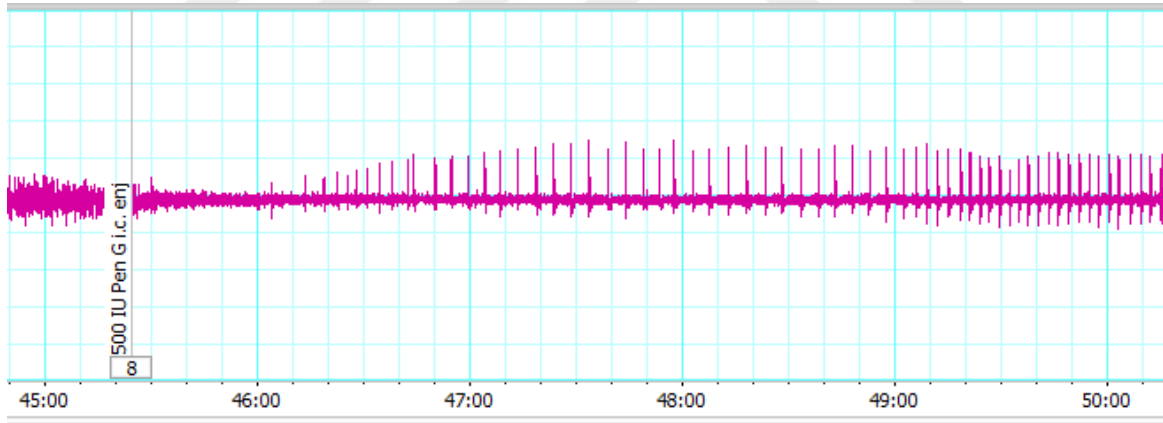
İstatistiksel analizler sonucunda elde edilen p değerleri, $\alpha=0.05$ anlamlılık seviyesinde %95 güven aralığında değerlendirilmiş ve p değerleri 0.05'den küçük bulunduğunda karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veri seti IBM SPSS 22.0 (Lisans: KTÜ) paket programı ortamında analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

Penisilin G 500 IU intraserebral (i.c.) verildikten sonra ortaya çıkan interiktal dikensi dalgalar yaklaşık 3-4 saat devam etmektedir. Kullanılan kimyasalların etkisinin 120. dakikadan sonra azalması nedeniyle deney 120. dakikada sonlandırılarak analizler gerçekleştirildi. Sunulan çalışmada oleuropeinin farklı dozlarının Pen G aracılı epileptiform aktivitenin üzerindeki etkisi incelenerek etkin doz belirlendi. Ayrıca epileptiform aktivite üzerindeki NO agonisti (L-ARJ) ve antagonistlerinin (L-NAME, 7-NI) etkileri ile bu bileşiklerin OLE ile etkileşimi araştırılmıştır. Deney hayvanlarının ortalama ağırlığı 350.75 ± 34.74 gram olarak bulunmuştur.

4.1. Penisilinle Oluşturulan Epileptiform Aktivite

Epileptiform aktivitenin oluşması için Pen G (500 IU) i.c. yoldan verildi. Pen G uygulanmasından 3-5 dk sonra ECoG'da diken-dalga kompleksleri şeklinde epileptiform aktivite görüldü. Bu diken-dalga komplekslerinin kararlı bir düzeye ulaşarak olgunlaşması beklendi ve sonrasında iki saat boyunca ECoG kaydı alınmaya devam etti (Resim 4).



Resim 4. Pen G grubunda ECoG kaydı örneği

Bütün deneylerde ilaç Pen G grubu için SF, diğer gruplar için OLE uygulamasının yapıldığı dakikadan önceki 10 dakikalık aralıktaki spike frekansı ve spike amplitüdü ortalamaları sıfır noktası olarak kabul edildi ve bu değerler %100 olarak kabul edildi. İlaç uygulamasının yapıldığı dakikadan sonraki ilk 10 dakikanın ortalaması 10.dakika, ikinci 10 dakikanın ortalaması 20.dakika olarak kabul edildi ve böyle devam edilerek 120 dakikalık ECoG kaydının analizi tamamlandı. İstatistiksel analiz ise, yüzde spike ve yüzde amplitüd değerlerinin analizine göre yapıldı.

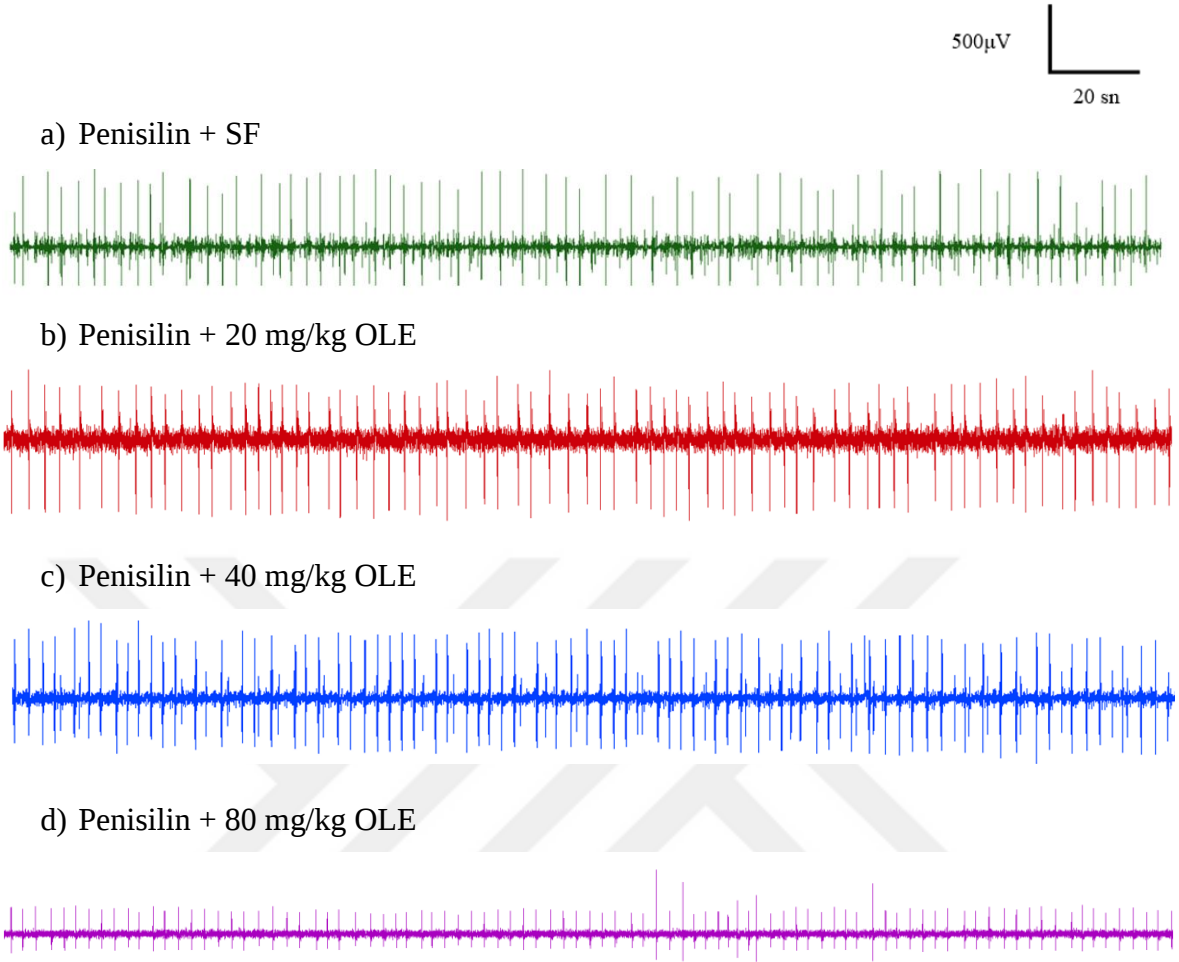
4.2. Oleuropeinin Epileptiform Aktiviteye Etkili Olan Dozunun Belirlenmesi

Pen G (500 IU, i.c.) uygulanmasından 30 dk sonra 3 ayrı deney grubuna sırasıyla 20, 40 ve 80 mg/kg dozlarda (i.p.) OLE uygulanarak epileptiform aktivite üzerine etkisi incelendi. Pen G (500 IU) ve Pen G+OLE (20-40-80 mg/kg) gruplarına ait ECoG kayıtlarından örnek görüntüler Resim 5'te gösterilmiştir. Birinci deney gruplarına ait spike frekansları yüzde değişimleri Şekil 10-A'da, spike amplitüdü yüzde değişimleri Şekil 10-B'de gösterilmiştir.

Birinci deney gruplarının spike frekansları Tablo 6'da gösterilmiştir, spike frekansları yüzde değişimleri Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında 40.dakikadan itibaren gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır (Tablo 7). Mann Whitney U testi yapıldığında bu farklılığın Pen G grubu ve 80 mg/kg OLE grupları arasındaki anlamlı farktan kaynaklandığı belirlenmiştir.

Birinci deney gruplarının spike amplitüdü yüzde değişimleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Birinci deney gruplarının spike amplitüdü Tablo 8'de, spike amplitüdü yüzde değişimleri Tablo 9'da gösterilmiştir.

Bu bulgular ile OLE'nin epileptiform aktiviteye etkili olan dozu 80 mg/kg olarak belirlenmiş, ikinci aşamadaki hayvan deneylerinde kombinasyon gruplarında 80 mg/kg OLE etkin doz olarak kullanılmıştır.



Resim 5. Pen G (500 IU) ve OLE doz gruplarına ait ECoG kayıtlarından örnek görüntüler
(a) Pen G (500 IU) (b) Pen G+OLE (20 mg/kg) (c) Pen G+OLE (40 mg/kg) (d)
Pen G+OLE (80 mg/kg) gruplarından elde edilen 90-120 dakikalar arasında alınan
ECoG kayıtlarından örnek görüntüler

Tablo 6. Birinci deney gruplarının spike frekansları

Zaman (dk)	Pen G	20 OLE	40 OLE	80 OLE
(Ortalama±SEM)				
0	55.07±9.15	57.48±8.35	48.26±5.45	53.06±6.17
10	55.94±10.06	57.39±8.90	46.87±5.05	51.62±6.09
20	55.42±12.28	57.60±9.55	45.39±4.99	47.85±5.68
30	52.92±11.08	55.82±9.03	45.22±4.93	42.52±6.13
40	52.82±10.24	55.01±9.07	44.58±4.80	40.28±4.38
50	54.07±9.87	54.02±9.05	43.75±4.74	38.08±4.36
60	52.53±9.89	52.29±9.25	42.88±5.01	34.84±3.97
70	50.26±9.32	50.74±9.20	41.91±5.01	33.88±4.48
80	49.13±8.52	48.87±9.16	40.52±5.45	32.37±5.55
90	48.52±8.02	47.69±9.11	38.73±5.36	30.01±4.59
100	46.87±8.07	47.12±9.02	37.99±5.42	29.21±6.12
110	46.52±7.89	45.85±8.99	35.83±5.76	27.80±5.42
120	45.99±7.54	45.98±8.99	34.37±5.72	26.87±4.97

Tablo 7. OLE doz gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi

Zaman (dk)	Pen G	20 OLE	40 OLE	80 OLE	p
Median (İnterquartil range)					
0	100	100	100	100	-
10	101.5 (89.6-115.3)	99.8 (99.7-108.7)	97.1 (88.1-100.8)	97.2 (87.7-105.0)	0.549
20	100.6 (82.3-115.3)	100.2 (96.1-105.0)	94.0 (85.7-99.8)	90.1 (74.6-103.1)	0.561
30	96.1 (90.2-102.9)	97.1 (94.0-108.0)	93.7 (84.1-98.5)	80.1 (72.1-89.9)	0.074
40	95.9 (89.6-115.3)	95.7 (91.7-106.1)	92.3 (82.6-99.8)	75.9 (66.9-87.2)	0.039¹
50	98.1 (85.9-123.6)	93.9 (90.9-103.4)	90.6 (81.1-102.3)	70.3 (52.1-93.5)	0.038²
60	95.3 (81.9-123.3)	90.9 (80.2-104.2)	88.8 (81.2-101.3)	65.6 (50.8-79.2)	0.004³
70	91.2 (83.6-115.9)	88.2 (79.8-103.2)	86.8 (79.6-97.4)	63.8 (46.5-75.9)	0.004⁴
80	89.2 (83.3-106.3)	85.0 (78.8-99.1)	83.9 (72.2-95.5)	61.0 (39.2-73.0)	0.018⁵
90	88.1 (80.8-107.4)	82.9 (74.9-95.2)	80.2 (70.3-93.3)	56.5 (38.8-70.3)	0.003⁶
100	85.1 (78.7-105.1)	81.9 (73.2-94.1)	78.7 (68.8-89.3)	55.1 (35.1-68.8)	0.018⁷
110	84.4 (75.2-103.5)	79.7 (70.5-94.0)	74.2 (66.3-88.9)	52.4 (30.8-66.9)	0.003⁸
120	83.5 (72.8-99.2)	80.0 (68.1-93.2)	71.2 (62.7-86.9)	50.6 (28.5-69.4)	0.001⁹

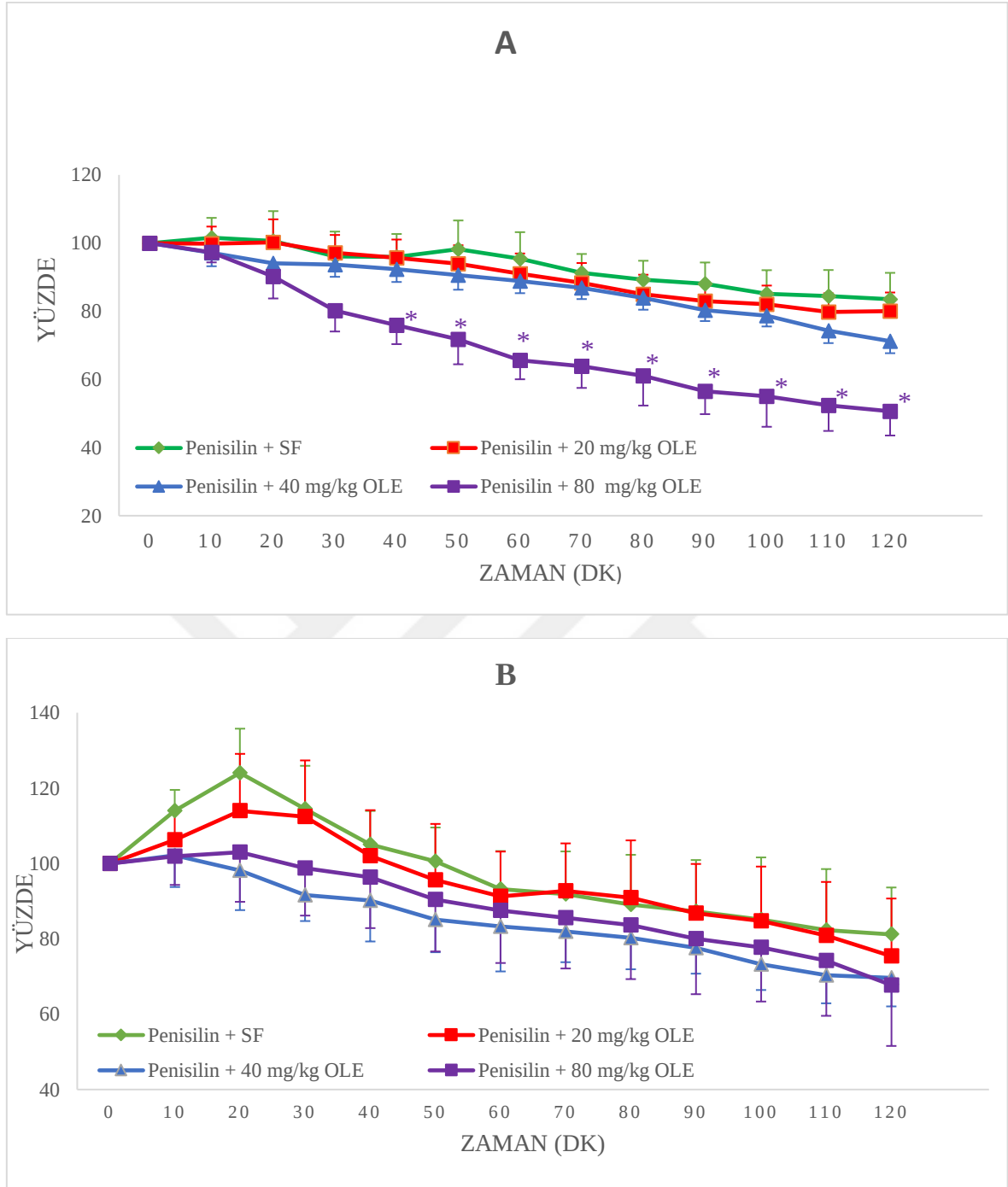
¹OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.027²OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.027³OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.004⁴OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.003⁵OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.006⁶OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.003⁷OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.006⁸OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.003⁹OLE 80 grubu Pen G ile karşılaştırıldığında p=0.002

Tablo 8. Birinci deney gruplarının spike amplitüdleri (μV)

Zaman (dk)	Pen G	20 OLE	40 OLE	80 OLE
(Ortalama $\pm$ SEM)				
0	721.6 $\pm$ 76.2	662.3 $\pm$ 68.3	835.6 $\pm$ 180.6	629.1 $\pm$ 100.4
10	822.5 $\pm$ 93.6	703.6 $\pm$ 75.5	853.5 $\pm$ 293.6	641.3 $\pm$ 112.9
20	868.1 $\pm$ 80.8	754.6 $\pm$ 81.3	820.2 $\pm$ 307.9	647.8 $\pm$ 101.7
30	826.3 $\pm$ 86.4	744.6 $\pm$ 68.1	765.9 $\pm$ 229.9	621.1 $\pm$ 96.5
40	757.5 $\pm$ 73.1	675.9 $\pm$ 64.6	753.1 $\pm$ 305.2	605.9 $\pm$ 87.2
50	726.9 $\pm$ 66.1	632.7 $\pm$ 76.7	710.5 $\pm$ 252.4	568.7 $\pm$ 77.7
60	672.3 $\pm$ 47.4	604.6 $\pm$ 59.8	695.4 $\pm$ 299.8	550.6 $\pm$ 72.2
70	662.5 $\pm$ 35.8	613.8 $\pm$ 64.3	684.5 $\pm$ 144.6	537.9 $\pm$ 61.1
80	642.8 $\pm$ 39.3	602.1 $\pm$ 80.3	670.8 $\pm$ 151.2	526.1 $\pm$ 60.3
90	629.8 $\pm$ 42.3	574.9 $\pm$ 62.1	648.5 $\pm$ 119.3	503.6 $\pm$ 58.9
100	613.5 $\pm$ 60.3	561.5 $\pm$ 63.9	611.7 $\pm$ 110.7	489.2 $\pm$ 55.9
110	593.6 $\pm$ 58.9	535.3 $\pm$ 65.7	587.5 $\pm$ 105.7	466.6 $\pm$ 57.3
120	585.5 $\pm$ 45.7	499.3 $\pm$ 71.6	581.8 $\pm$ 98.2	426.1 $\pm$ 67.4

Tablo 9. OLE doz gruplarının penisilinde oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi

Zaman (dk)	Pen G	20 OLE	40 OLE	80 OLE	p
Median (İnterquartil range)					
0	100	100	100	100	-
10	113.9 (102.4-119.7)	106.2 (92.8-112.7)	102.1 (85.2-116.1)	101.9 (90.2-126.9)	0.407
20	124.0 (101.3-137.0)	113.9 (76.6-144.5)	98.1 (75.1-118.4)	102.9 (79.8-129.6)	0.465
30	114.5 (90.3-136.4)	112.4 (75.9-146.2)	91.6 (74.4-119.7)	98.7 (76.5-113.9)	0.415
40	105.0 (86.8-118.9)	102.1 (68.6-134.7)	90.1 (71.8-109.2)	96.3 (69.4-112.3)	0.402
50	100.6 (81.7-121.0)	95.5 (58.2-134.8)	85.0 (68.4-106.8)	90.4 (68.5-108.9)	0.210
60	93.1 (72.5-122.1)	91.3 (56.0-123.5)	83.2 (55.5-104.2)	87.5 (73.2-117.9)	0.713
70	91.8 (70.6-123.3)	92.6 (55.9-119.7)	81.9 (54.0-101.8)	85.5 (64.8-106.9)	0.627
80	89.1 (66.9-123.9)	90.9 (53.9-134.6)	80.2 (53.5-99.8)	83.6 (59.8-107.8)	0.594
90	87.2 (60.4-121.8)	86.8 (54.3-105.7)	77.6 (52.6-98.0)	80.1 (63.6-106.4)	0.704
100	85.0 (54.1-121.1)	84.7 (53.9-109.5)	73.2 (49.5-92.2)	77.7 (59.3-105.4)	0.849
110	82.2 (50.4-119.3)	80.8 (51.9-111.6)	70.3 (47.5-91.0)	74.1 (52.7-94.5)	0.644
120	81.1 (49.9-107.2)	75.4 (50.5-103.9)	69.6 (46.5-83.5)	67.7 (50.5-92.1)	0.571



Şekil 10. Birinci deney gruplarına ait spike frekans ve amplitüd yüzde değişimleri **(A)** OLE doz gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, **(B)** OLE doz gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi, *Penisilin+SF grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

4.3. NO Agonist/Antagonistlerinin Epileptiform Aktiviteye Etkisi

İkinci deney dizaynında 60 L-NAME, 500 L-ARJ ve 50 7-NI gruplarında penisilin enjeksiyonundan 30 dk sonra sırasıyla 60 mg/kg L-NAME, 500 mg/kg L-ARJ ve 50 mg/kg 7-NI intraperitoneal yoldan uygulandı. Nitrik oksit agonist ve antagonistlerinin uygulandığı dakikadan önceki 10 dakikalık aralıktaki spike frekansı ve spike amplitüdü ortalamaları sıfır noktası olarak kabul edildi ve bu değerler %100 olarak kabul edildi. Nitrik oksit agonist ve antagonistlerinin uygulandığı dakikadan sonraki ilk 10 dakikanın ortalaması 10.dakika, ikinci 10 dakikanın ortalaması 20.dakika olarak kabul edildi ve bu şekilde devam edilerek 120 dakikalık ECoG kayıt analizi tamamlandı. İstatistiksel analiz ise, yüzde spike ve yüzde amplitüd değerleri analizine göre yapıldı.

Tek başına uygulanan 80 mg/kg OLE, penisilin+SF grubuna göre 40. dakikadan itibaren spike frekansında anlamlı bir azalma oluştururken, tek başına uygulanan 60 mg/kg L-NAME, penisilin+SF grubuna göre 90. dakikadan itibaren spike frekansını anlamlı düzeyde azalttı. 80 mg/kg OLE+60 mg/kg L-NAME kombinasyonu ise spike frekansını penisilin+SF grubuna göre 70. dakikadan itibaren azalttı ($p<0.05$). Kombinasyon grubu ile tek başına uygulanan 80 mg/kg OLE ve 60 mg/kg L-NAME grupları karşılaştırıldığında spike frekansında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Spike amplitüdlere açısından hiçbir grupta anlamlı bir değişim bulunmadı ($p>0.05$).

Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler Resim 6'da, spike frekansları Tablo 10'da ve spike frekansları yüzde değişimleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının spike amplitüdlere Tablo 12'de ve spike amplitüdlere yüzde değişimleri Tablo 13'te gösterilmiştir.

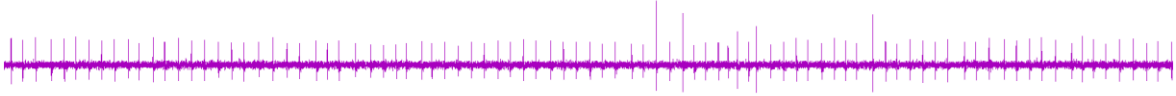
Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarına ait spike frekansları yüzde değişimleri Şekil 11-A'da, spike amplitüdü yüzde değişimleri Şekil 11-B'de gösterilmiştir.

500 μ V
20 sn

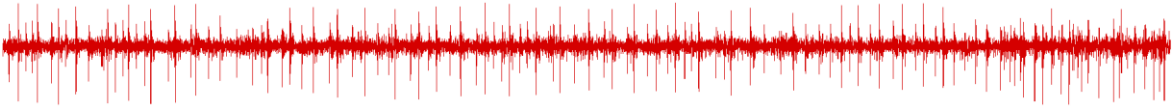
a) Penisilin + SF



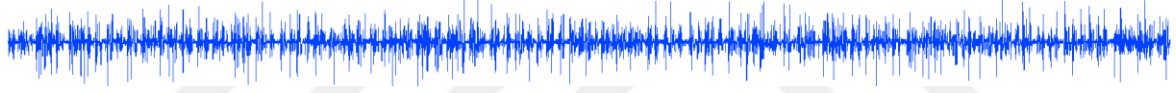
b) Penisilin + 80 mg/kg OLE



c) Penisilin + 60 mg/kg L-NAME



d) Penisilin + 80 mg/kg OLE + 60 mg/kg L-NAME



Resim 6. Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler **(a)** Pen G **(b)** Pen G+80 OLE **(c)** Pen G+L-NAME **(d)** Pen G+80 OLE+L-NAME gruplarından elde edilen 90-120 dakikalar arasında alınan ECoG kayıtlarından örnek görüntüler

Tablo 10. Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının spike frekansları

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	L-NAME	80 OLE+L-NAME
(Ortalama±SEM)				
0	55.07±9.15	53.06±6.17	54.85±7.44	54.22±6.73
10	55.94±10.06	51.62±6.09	53.41±6.40	56.08±8.18
20	55.42±12.28	47.85±5.68	52.53±9.78	56.57±9.69
30	52.92±11.08	42.52±6.13	55.27±11.66	56.54±9.33
40	52.82±10.24	40.28±4.38	52.82±9.60	50.06±8.72
50	54.07±9.87	38.08±4.36	49.98±9.15	45.98±8.55
60	52.53±9.89	34.84±3.97	47.46±8.94	40.76±6.63
70	50.26±9.32	33.88±4.48	41.52±5.90	31.60±7.06
80	49.13±8.52	32.37±5.55	40.01±6.48	27.57±6.98
90	48.52±8.02	30.01±4.59	36.81±6.77	25.71±5.65
100	46.87±8.07	29.21±6.12	32.95±6.58	23.43±5.31
110	46.52±7.89	27.80±5.42	29.81±6.58	24.36±7.87
120	45.99±7.54	26.87±4.97	27.70±6.31	22.48±7.52

Tablo 11. 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	L-NAME	80 OLE+L-NAME	p
Median (İnterquartil range)					
0	100	100	100	100	-
10	101.5 (89.6-115.3)	97.2 (87.7-105.0)	99.3 (92.6-108.8)	101.0 (91.1-106.3)	0.927
20	100.6 (82.3-115.3)	90.1 (74.6-103.1)	95.0 (89.6-115.3)	100.4 (78.2-118.5)	0.753
30	96.1 (90.2-102.9)	80.1 (72.1-89.9)	101.4 (69.2-136.3)	101.2 (76.9-118.6)	0.201
40	95.9 (89.6-115.3)	75.9 (66.9-87.2)	97.3 (69.3-121.2)	91.3 (60.7-121.1)	0.025 ¹
50	98.1 (85.9-123.6)	70.3 (52.1-93.5)	92.1 (71.2-115.7)	81.9 (57.1-103.4)	0.074 ²
60	95.3 (81.9-123.3)	65.6 (50.8-79.2)	85.8 (67.1-106.5)	74.2 (50.2-93.4)	0.029 ³
70	91.2 (83.6-115.9)	63.8 (46.5-75.9)	77.1 (63.0-84.3)	55.9 (30.6-72.7)	0.002 ⁴
80	89.2 (83.3-106.3)	61.0 (39.2-73.0)	75.7 (50.0-101.1)	48.5 (27.0-63.2)	0.005 ⁵
90	88.1 (80.8-107.4)	56.5 (38.8-70.3)	69.2 (42.1-89.5)	46.5 (24.1-64.3)	0.002 ⁶
100	85.1 (78.7-105.1)	55.1 (35.1-68.8)	61.6 (36.1-79.6)	42.6 (23.32-63.2)	0.001 ⁷
110	84.4 (75.2-103.5)	52.4 (30.8-66.9)	55.1 (29.8-75.1)	43.1 (21.4-59.6)	0.002 ⁸
120	83.5 (72.8-99.2)	50.6 (28.5-69.4)	51.1 (26.1-69.6)	40.1 (18.8-59.2)	0.002 ⁹

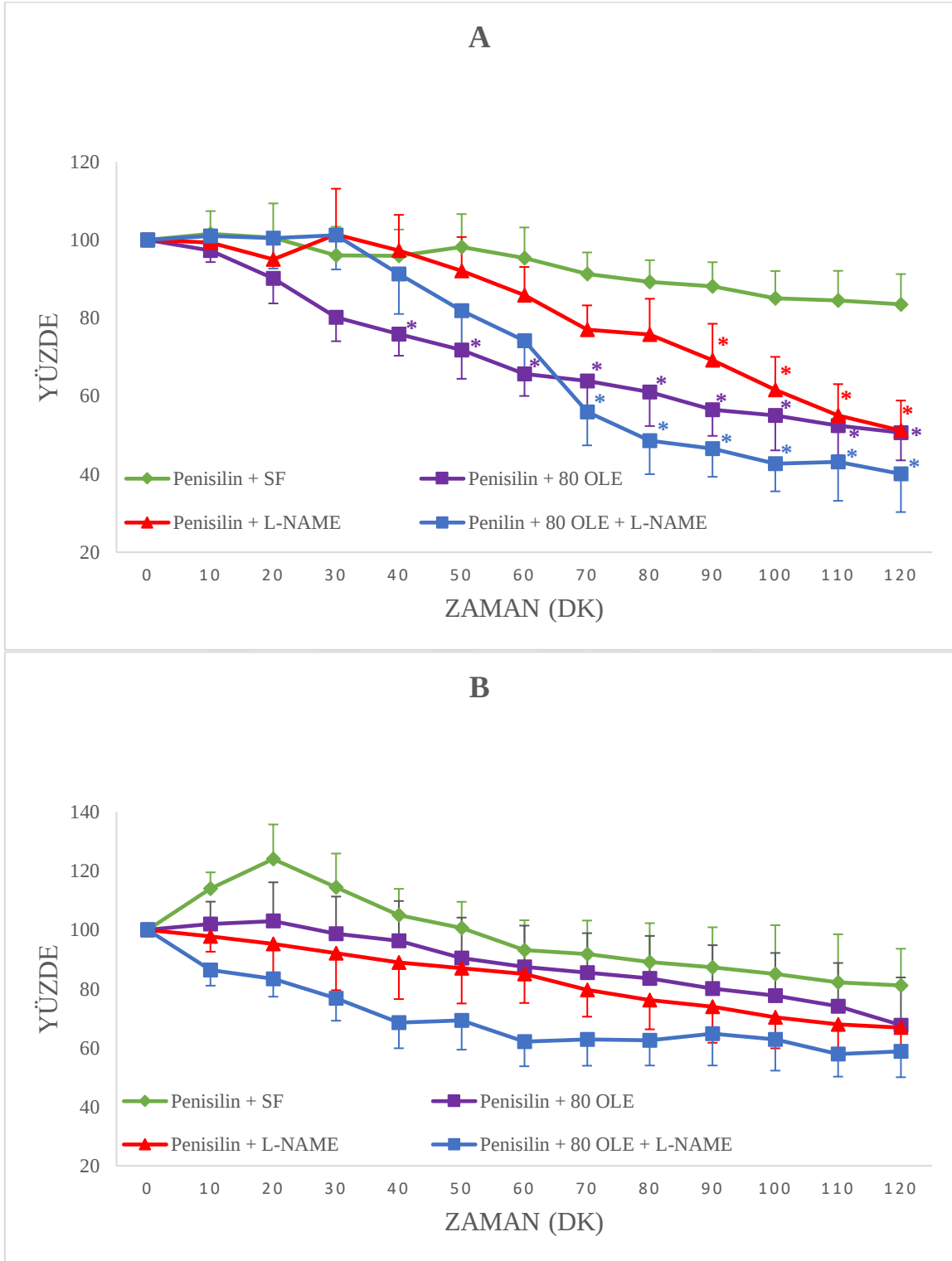
¹Pen G ile OLE 80 arasında p=0.027²Pen G ile OLE 80 arasında p=0.027³Pen G ile OLE 80 arasında p=0.004⁴Pen G ile OLE 80 ve OLE+L-NAME arasında p=0.003, p=0.001⁵Pen G ile OLE 80 ve OLE+L-NAME arasında p=0.006, p<0.001⁶Pen G ile OLE 80, L-NAME ve OLE+L-NAME arasında p=0.003, p=0.002, p<0.001⁷Pen G ile OLE 80, L-NAME ve OLE+L-NAME arasında p=0.006, p=0.018, p<0.001⁸Pen G ile OLE 80, L-NAME ve OLE+L-NAME arasında p=0.003, p=0.007, p=0.001⁹Pen G ile OLE 80, L-NAME ve OLE+L-NAME arasında p=0.002, p=0.001, p=0.001

Tablo 12. Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının spike amplitüdleri (μV)

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	L-NAME	80 OLE+ L-NAME
(Ortalama $\pm$ SEM)				
0	721.6 $\pm$ 76.2	629.1 $\pm$ 100.4	738.3 $\pm$ 153.8	768.5 $\pm$ 125.7
10	822.5 $\pm$ 93.6	641.3 $\pm$ 112.9	721.9 $\pm$ 113.4	650.5 $\pm$ 92.7
20	868.1 $\pm$ 80.8	647.8 $\pm$ 101.7	703.4 $\pm$ 95.4	625.9 $\pm$ 89.1
30	826.3 $\pm$ 86.4	621.1 $\pm$ 96.5	680.4 $\pm$ 98.9	553.9 $\pm$ 59.1
40	757.5 $\pm$ 73.1	605.9 $\pm$ 87.2	657.1 $\pm$ 105.3	476.2 $\pm$ 42.2
50	726.9 $\pm$ 66.1	568.7 $\pm$ 77.7	642.4 $\pm$ 99.0	471.6 $\pm$ 45.0
60	672.3 $\pm$ 47.4	550.6 $\pm$ 72.2	628.5 $\pm$ 100.3	420.7 $\pm$ 32.8
70	662.5 $\pm$ 35.8	537.9 $\pm$ 61.1	587.7 $\pm$ 98.1	421.1 $\pm$ 34.6
80	642.8 $\pm$ 39.3	526.1 $\pm$ 60.3	562.8 $\pm$ 97.1	418.3 $\pm$ 31.4
90	629.8 $\pm$ 42.3	503.6 $\pm$ 58.9	545.9 $\pm$ 99.7	423.6 $\pm$ 36.1
100	613.5 $\pm$ 60.3	489.2 $\pm$ 55.9	519.2 $\pm$ 98.1	411.7 $\pm$ 34.1
110	593.6 $\pm$ 58.9	466.6 $\pm$ 57.3	502.1 $\pm$ 99.0	387.2 $\pm$ 23.1
120	585.5 $\pm$ 45.7	426.1 $\pm$ 67.4	493.5 $\pm$ 96.1	389.8 $\pm$ 30.1

Tablo 13. 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi

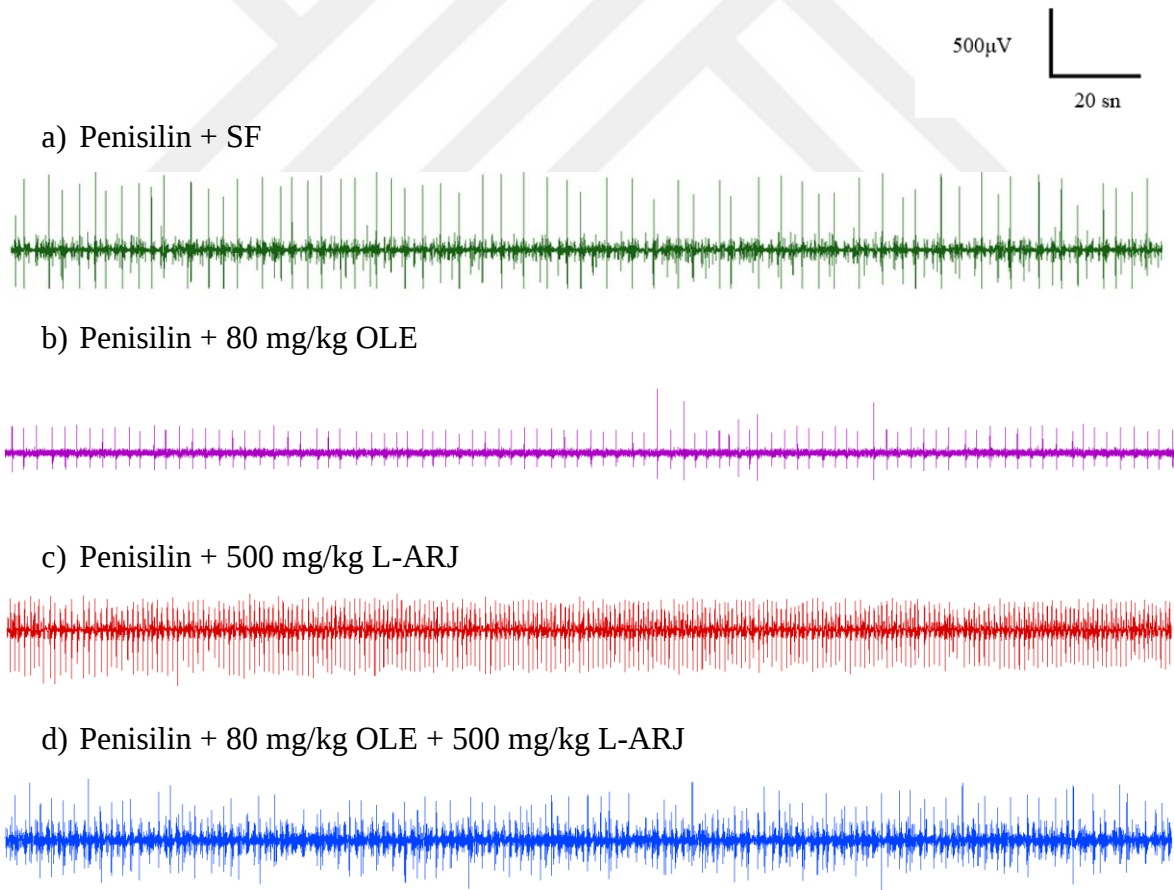
Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	L-NAME	80 OLE+ L-NAME	p
Median (İnterquartil range)					
0	100	100	100	100	-
10	113.9 (102.4-119.7)	101.9 (90.2-126.9)	99.3 (92.6-108.8)	86.4 (76.5-97.8)	0.407
20	124.0 (101.3-137.0)	102.9 (79.8-129.6)	95.0 (89.6-115.3)	83.3 (72.4-89.4)	0.465
30	114.5 (90.3-136.4)	98.7 (76.5-113.9)	101.4 (69.2-136.3)	76.7 (59.9-84.8)	0.415
40	105.0 (86.8-118.9)	96.3 (69.4-112.3)	97.3 (69.3-121.2)	68.5 (53.4-85.1)	0.402
50	100.6 (81.7-121.0)	90.4 (68.5-108.9)	92.1 (71.2-115.7)	69.3 (48.3-97.6)	0.210
60	93.1 (72.5-122.1)	87.5 (73.2-117.9)	85.8 (67.1-106.5)	62.1 (45.6-83.2)	0.713
70	91.8 (70.6-123.3)	85.5 (64.8-106.9)	77.1 (63.0-84.3)	62.9 (47.1-87.6)	0.627
80	89.1 (66.9-123.9)	83.6 (59.8-107.8)	75.7 (50.0-101.1)	62.5 (44.7-85.7)	0.594
90	87.2 (60.4-121.8)	80.1 (63.6-106.4)	69.2 (42.1-89.5)	64.7 (41.8-87.9)	0.704
100	85.0 (54.1-121.1)	77.7 (59.3-105.4)	61.6 (36.1-79.6)	62.8 (40.6-84.2)	0.849
110	82.2 (50.4-119.3)	74.1 (52.7-94.5)	55.1 (29.8-75.1)	57.8 (43.1-75.5)	0.644
120	81.1 (49.9-107.2)	67.7 (50.5-92.1)	51.1 (26.1-69.6)	58.8 (38.8-80.6)	0.571



Şekil 11. Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarına ait spike frekans ve amplitüd yüzde değişimleri **(A)** 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, **(B)** 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi, *Pen G+SF grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tek başına uygulanan 80 mg/kg OLE, penisilin+SF grubuna göre 40. dakikadan itibaren spike frekansında anlamlı bir azalma oluştururken, tek başına uygulanan 500 mg/kg L-ARJ grubu ve 80 mg/kg OLE+500 mg/kg L-ARJ kombinasyon grubu ile penisilin+SF grubu arasında spike frekansı açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Spike amplitüdüleri açısından hiçbir grupta anlamlı bir değişim bulunmadı ($p>0.05$).

Pen G, 80 mg/kg OLE, 500 mg/kg L-ARJ ve 80 mg/kg OLE+500 mg/kg L-ARJ gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler Resim 7’de, spike frekansları Tablo 14’te ve spike frekansları yüzde değişimleri Tablo 15’te gösterilmiştir. Pen G, 80 mg/kg OLE, 500 mg/kg L-ARJ ve 80 mg/kg OLE+500 mg/kg L-ARJ gruplarının spike amplitüdüleri Tablo 16’da ve spike amplitüdüleri yüzde değişimleri Tablo 17’de gösterilmiştir. Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarına ait spike frekansları yüzde değişimleri Şekil 12-A’da, spike amplitüdü yüzde değişimleri Şekil 12-B’de gösterilmiştir.



Resim 7. Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler **(a)** Pen G **(b)** Pen G+80 OLE **(c)** Pen G+L-ARJ **(d)** Pen G+80 OLE+L-ARJ gruplarından elde edilen 90-120 dakikalar arasında alınan ECoG kayıtlarından örnek görüntüler

Tablo 14. Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının spike frekansları

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	L-ARJ	80 OLE+L-ARJ
(Ortalama±SEM)				
0	55.07±9.15	53.06±6.17	63.75±7.15	57.66±7.83
10	55.94±10.06	51.62±6.09	59.87±6.35	58.57±8.96
20	55.42±12.28	47.85±5.68	65.50±6.93	60.41±7.83
30	52.92±11.08	42.52±6.13	62.21±6.30	57.89±7.62
40	52.82±10.24	40.28±4.38	55.13±8.29	56.11±6.49
50	54.07±9.87	38.08±4.36	55.02±8.29	51.64±6.38
60	52.53±9.89	34.84±3.97	50.26±6.99	47.57±6.42
70	50.26±9.32	33.88±4.48	54.72±5.74	46.47±7.03
80	49.13±8.52	32.37±5.55	53.61±5.33	41.84±7.74
90	48.52±8.02	30.01±4.59	53.31±5.83	41.54±8.02
100	46.87±8.07	29.21±6.12	51.35±5.40	40.81±7.38
110	46.52±7.89	27.80±5.42	50.41±5.05	39.28±6.24
120	45.99±7.54	26.87±4.97	49.95±4.65	37.98±5.84

Tablo 15. 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	L-ARJ	80 OLE+L-ARJ	p
Median (İnterquartil range)					
0	100	100	100	100	-
10	101.5 (89.6-115.3)	97.2 (87.7-105.0)	96.8 (85.6-111.9)	102.1 (89.9-119.8)	0.882
20	100.6 (82.3-115.3)	90.1 (74.6-103.1)	108.5 (78.9-120.6)	104.8 (80.7-137.9)	0.728
30	96.1 (90.2-102.9)	80.1 (72.1-89.9)	107.0 (69.1-156.7)	100.5 (69.9-146.1)	0.426
40	95.9 (89.6-115.3)	75.9 (66.9-87.2)	97.1 (60.4-147.2)	97.4 (70.1-134.5)	0.043¹
50	98.1 (85.9-123.6)	70.3 (52.1-93.5)	99.7 (61.1-163.3)	89.6 (63.3-128.7)	0.031²
60	95.3 (81.9-123.3)	65.6 (50.8-79.2)	92.1 (54.5-144.9)	82.5 (55.7-117.5)	0.049³
70	91.2 (83.6-115.9)	63.8 (46.5-75.9)	96.6 (57.3-143.8)	80.6 (47.4-112.2)	0.047⁴
80	89.2 (83.3-106.3)	61.0 (39.2-73.0)	92.4 (54.2-136.9)	72.6 (40.1-95.3)	0.045⁵
90	88.1 (80.8-107.4)	56.5 (38.8-70.3)	92.0 (58.2-132.7)	72.1 (42.1-86.3)	0.020⁶
100	85.1 (78.7-105.1)	55.1 (35.1-68.8)	88.6 (56.4-119.3)	70.8 (37.3-73.7)	0.015⁷
110	84.4 (75.2-103.5)	52.4 (30.8-66.9)	86.6 (59.5-114.1)	68.2 (33.7-67.3)	0.005⁸
120	83.5 (72.8-99.2)	50.6 (28.5-69.4)	85.9 (66.3-112.4)	65.9 (31.9-62.9)	0.003⁹

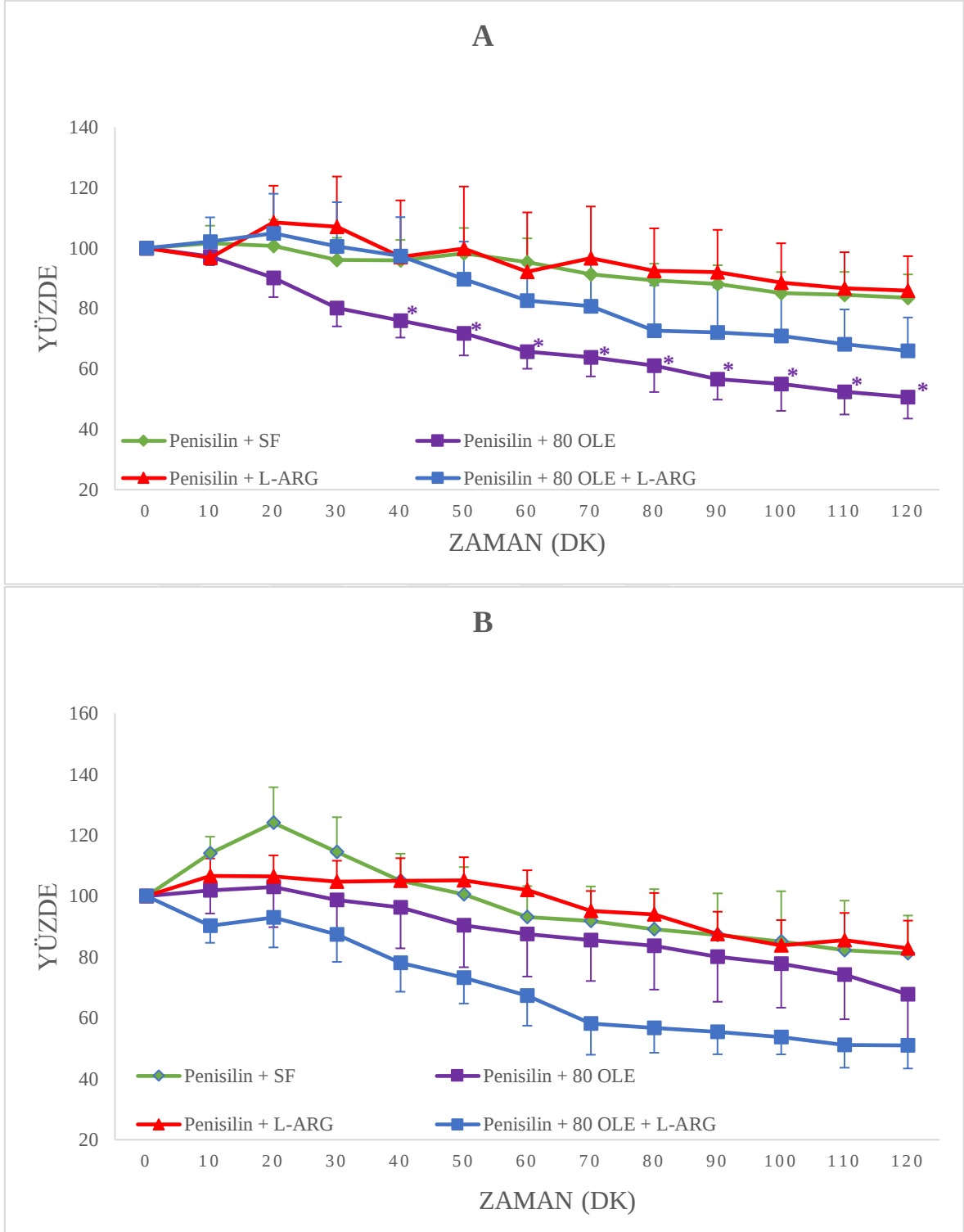
¹Pen G ile OLE 80 arasında p=0.027²Pen G ile OLE 80 arasında p=0.027³Pen G ile OLE 80 arasında p=0.004⁴Pen G ile OLE 80 arasında p=0.003⁵Pen G ile OLE 80 arasında p=0.006⁶Pen G ile OLE 80 arasında p=0.003⁷Pen G ile OLE 80 arasında p=0.006⁸Pen G ile OLE 80 arasında p=0.003⁹Pen G ile OLE 80 arasında p=0.002

Tablo 16. Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının spike amplitüdlere (µV)

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	L-ARJ	80 OLE+ L-ARJ
(Ortalama±SEM)				
0	721.6±76.2	629.1±100.4	605.1±67.1	684.6±75.6
10	822.5±93.6	641.3±112.9	645.1±88.6	605.6±71.6
20	868.1±80.8	647.8±101.7	643.8±93.4	605.2± 70.2
30	826.3±86.4	621.1±96.5	633.7±96.4	566.3±63.5
40	757.5±73.1	605.9±87.2	635.4±86.5	529.9±85.7
50	726.9±66.1	568.7±77.7	636.7±81.8	495.9±75.2
60	672.3±47.4	550.6±72.2	617.1±91.1	469.6±78.6
70	662.5±35.8	537.9±61.1	576.7±94.4	413.0±69.1
80	642.8±39.3	526.1±60.3	568.6±88.7	392.4±58.8
90	629.8±42.3	503.6±58.9	529.8±83.6	379.8±53.2
100	613.5±60.3	489.2±55.9	507.4±79.6	367.4±39.8
110	593.6±58.9	466.6±57.3	517.2±85.1	350.3±45.6
120	585.5±45.7	426.1±67.4	501.3±83.1	348.9±48.7

Tablo 17. 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi

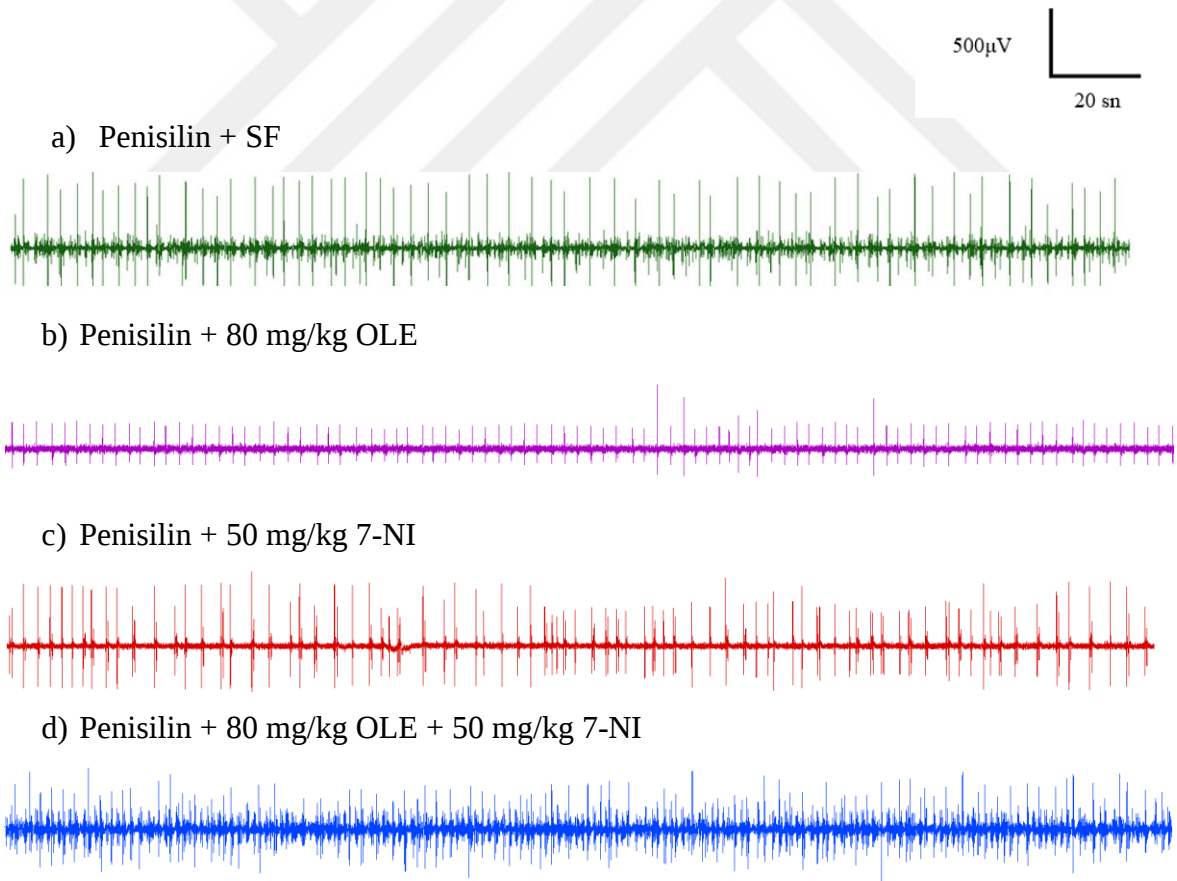
Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	L-ARJ	80 OLE+ L-ARJ	p
Median (İnterquartil range)					
0	100	100	100	100	-
10	113.9 (102.4-119.7)	101.9 (90.2-126.9)	106.6 (91.1-121.9)	90.2 (80.2-102.9)	0.358
20	124.0 (101.3-137.0)	102.9 (79.8-129.6)	106.4 (86.6-122.3)	92.9 (68.9-120.3)	0.327
30	114.5 (90.3-136.4)	98.7 (76.5-113.9)	104.7 (82.5-122.4)	87.3 (67.0-110.3)	0.338
40	105.0 (86.8-118.9)	96.3 (69.4-112.3)	105.0 (82.5-122.8)	78.1 (59.8-96.7)	0.155
50	100.6 (81.7-121.0)	90.4 (68.5-108.9)	105.2 (85.2-118.5)	73.1 (54.1-93.4)	0.115
60	93.1 (72.5-122.1)	87.5 (73.2-117.9)	101.9 (83.2-121.1)	67.3 (44.3-91.7)	0.144
70	91.8 (70.6-123.3)	85.5 (64.8-106.9)	95.2 (77.7-111.1)	58.1 (40.1-85.9)	0.094
80	89.1 (66.9-123.9)	83.6 (59.8-107.8)	93.9 (74.1-112.0)	56.6 (39.1-81.4)	0.078
90	87.2 (60.4-121.8)	80.1 (63.6-106.4)	87.5 (67.6-101.2)	55.4 (38.8-72.3)	0.061
100	85.0 (54.1-121.1)	77.7 (59.3-105.4)	83.8 (63.1-99.9)	53.6 (34.7-51.9)	0.072
110	82.2 (50.4-119.3)	74.1 (52.7-94.5)	85.4 (67.2-108.1)	51.1 (37.1-52.2)	0.065
120	81.1 (49.9-107.2)	67.7 (50.5-92.1)	82.8 (63.8-107.1)	50.9 (36.2-58.8)	0.106



Şekil 12. Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarına ait spike frekans ve amplitüd yüzde değişimleri **(A)** 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, **(B)** 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi, *Pen G+SF grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tek başına uygulanan 80 mg/kg OLE, penisilin+SF grubuna göre 40. dakikadan itibaren, tek başına uygulanan 50 mg/kg 7-NI ve 80 OLE+7-NI kombinasyonu 70. dakikadan itibaren spike frekansında anlamlı bir azalma oluşturdu ($p<0.05$). Kombinasyon grubu ile tek başına uygulanan 80 mg/kg OLE ve 50 mg/kg 7-NI grupları karşılaştırıldığında spike frekansında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Spike amplitüdləri açısından hiçbir grupta anlamlı bir değişim bulunmadı ($p>0.05$).

Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler Resim 8’de, spike frekansları Tablo 18’de, spike frekansları yüzde değişimleri Tablo 19’da, spike amplitüdləri Tablo 20’de ve spike amplitüdləri yüzde değişimleri Tablo 21’de gösterilmiştir. Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarına ait spike frekansları yüzde değişimleri Şekil 13-A’da, spike amplitüdü yüzde değişimleri Şekil 13-B’de gösterilmiştir.



Resim 8. Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının ECoG kayıtlarından örnek görüntüler **(a)** Pen G **(b)** Pen G+80 OLE **(c)** Pen G+7-NI **(d)** Pen G+80 OLE+7-NI gruplarından elde edilen 90-120 dakikalar arasında alınan ECoG kayıtlarından örnek görüntüler

Tablo 18. Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının spike frekansları

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	7-NI	80 OLE+7-NI
(Ortalama±SEM)				
0	55.07±9.15	53.06±6.17	52.61±4.18	57.70±7.14
10	55.94±10.06	51.62±6.09	50.46±4.07	52.99±7.39
20	55.42±12.28	47.85±5.68	46.62±4.38	52.09±6.52
30	52.92±11.08	42.52±6.13	44.53±4.97	50.26±6.51
40	52.82±10.24	40.28±4.38	43.16±4.91	48.64±6.24
50	54.07±9.87	38.08±4.36	40.52±5.20	46.83±5.60
60	52.53±9.89	34.84±3.97	38.75±4.82	43.35±5.49
70	50.26±9.32	33.88±4.48	36.56±4.72	41.93±6.06
80	49.13±8.52	32.37±5.55	35.07±5.15	39.89±7.14
90	48.52±8.02	30.01±4.59	32.28±4.67	36.96±7.09
100	46.87±8.07	29.21±6.12	29.61±4.78	33.16±7.38
110	46.52±7.89	27.80±5.42	29.30±5.68	30.81±7.84
120	45.99±7.54	26.87±4.97	27.78±6.21	27.83±8.11

Tablo 19. 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	7-NI	80 OLE+7-NI	p
Median (İnterquartil range)					
0	100	100	100	100	-
10	101.5 (89.6-115.3)	97.2 (87.7-105.0)	95.9 (92.8-96.9)	81.5 (73.5-96.0)	0.108
20	100.6 (82.3-115.3)	90.1 (74.6-103.1)	88.4 (83.7-95.0)	81.9 (76.9-93.6)	0.621
30	96.1 (90.2-102.9)	80.1 (72.1-89.9)	83.8 (74.1-89.6)	78.5 (71.8-91.0)	0.119
40	95.9 (89.6-115.3)	75.9 (66.9-87.2)	81.1 (76.2-85.5)	76.5 (66.8-89.5)	0.042¹
50	98.1 (85.9-123.6)	70.3 (52.1-93.5)	75.7 (70.6-82.3)	74.4 (62.1-95.5)	0.030²
60	95.3 (81.9-123.3)	65.6 (50.8-79.2)	72.5 (65.3-80.8)	68.4 (57.1-86.7)	0.016³
70	91.2 (83.6-115.9)	63.8 (46.5-75.9)	68.3 (58.1-78.3)	64.7 (56.1-87.1)	0.004⁴
80	89.2 (83.3-106.3)	61.0 (39.2-73.0)	65.1 (51.5-76.1)	59.1 (49.2-78.2)	0.004⁵
90	88.1 (80.8-107.4)	56.5 (38.8-70.3)	60.0 (89.6-115.3)	54.4 (40.9-68.2)	0.002⁶
100	85.1 (78.7-105.1)	55.1 (35.1-61.8)	54.7 (42.3-70.3)	48.0 (33.1-56.6)	0.003⁷
110	84.4 (75.2-103.5)	52.4 (30.8-54.9)	53.4 (41.9-66.3)	45.8 (25.9-53.8)	0.004⁸
120	83.5 (72.8-99.2)	50.6 (28.5-52.4)	50.1 (39.4-62.4)	40.1 (22.4-54.4)	0.003⁹

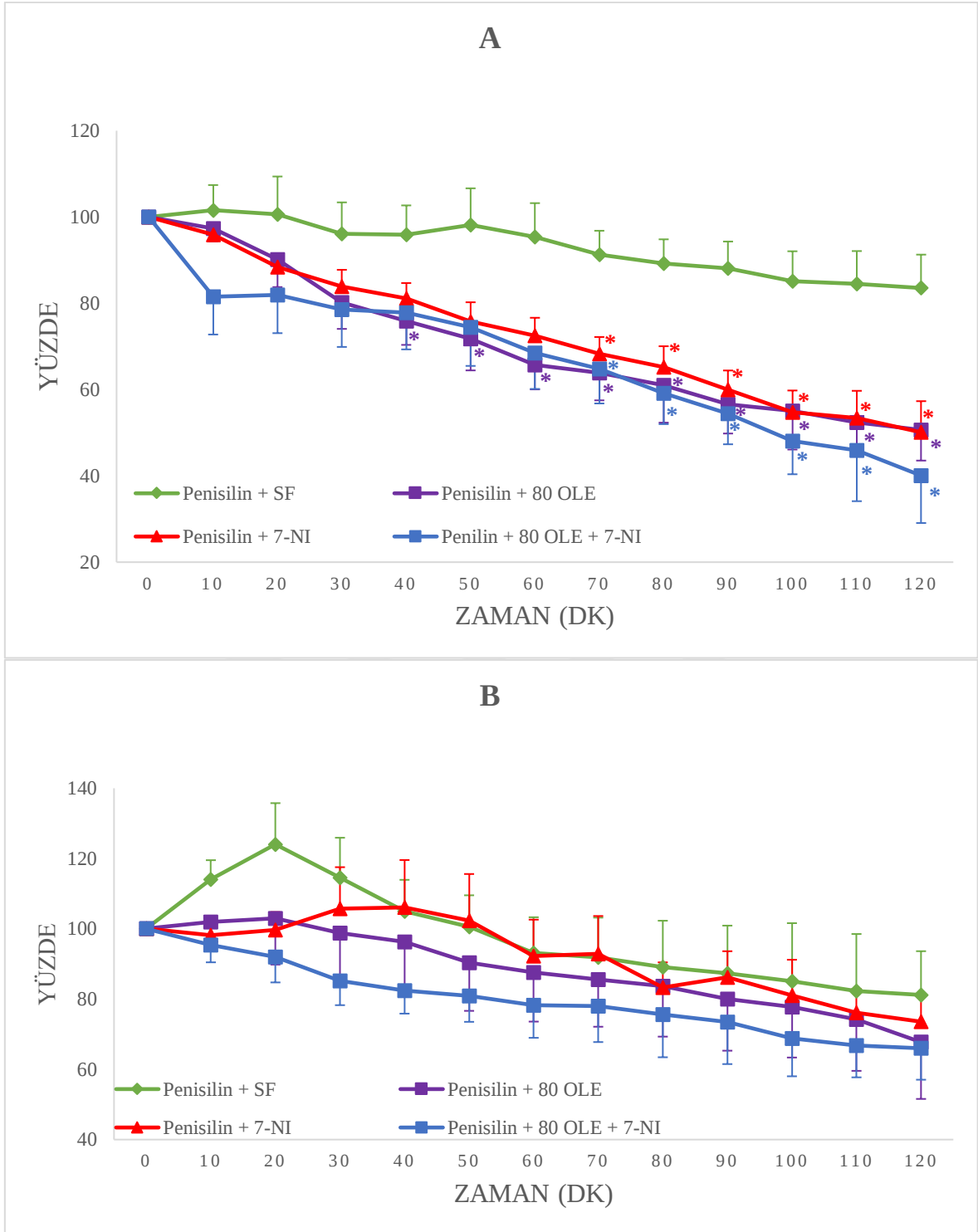
¹Pen G ile OLE 80 arasında p=0.027²Pen G ile OLE 80 arasında p=0.027³Pen G ile OLE 80 arasında p=0.004⁴Pen G ile OLE 80, 7-NI ve OLE+7-NI arasında p=0.003, p=0.004, p=0.004⁵Pen G ile OLE 80, 7-NI ve OLE+7-NI arasında p=0.006, p=0.003, p=0.001⁶Pen G ile OLE 80, 7-NI ve OLE+7-NI arasında p=0.003, p=0.043, p<0.001⁷Pen G ile OLE 80, 7-NI ve OLE+7-NI arasında p=0.006, p=0.002, p<0.001⁸Pen G ile OLE 80, 7-NI ve OLE+7-NI arasında p=0.003, p=0.006, p=0.004⁹Pen G ile OLE 80, 7-NI ve OLE+7-NI arasında p=0.002, p=0.005, p=0.005

Tablo 20. Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının spike amplitüdleri (µV)

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	7-NI	80 OLE+7-NI
(Ortalama±SEM)				
0	721.6±76.2	629.1±100.4	657.9±111.2	603.9±100.0
10	822.5±93.6	641.3±112.9	646.1±107.6	576.1±90.1
20	868.1±80.8	647.8±101.7	655.9±128.7	555.7±78.3
30	826.3±86.4	621.1±96.5	695.8±171.4	514.6±79.3
40	757.5±73.1	605.9±87.2	697.9±164.2	497.3±71.9
50	726.9±66.1	568.7±77.7	673.5±150.2	488.9±75.8
60	672.3±47.4	550.6±72.2	606.5±87.6	472.3±80.7
70	662.5±35.8	537.9±61.1	611.2±113.9	470.6±83.2
80	642.8±39.3	526.1±60.3	548.3±70.7	456.7±85.9
90	629.8±42.3	503.6±58.9	566.6±69.2	443.4±81.4
100	613.5±60.3	489.2±55.9	533.2±80.7	415.7±81.5
110	593.6±58.9	466.6±57.3	500.1±68.3	403.1±76.5
120	585.5±45.7	426.1±67.4	483.9±54.1	398.4±75.8

Tablo 21. 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi

Zaman (dk)	Pen G	80 OLE	7-NI	80 OLE+7-NI	p
Median (İnterquartil range)					
0	100	100	100	100	-
10	113.9 (102.4-119.7)	101.9 (90.2-126.9)	98.2 (88.1-106.5)	95.3 (82.8-109.4)	0.121
20	124.0 (101.3-137.0)	102.9 (79.8-129.6)	99.7 (85.6-110.1)	92.0 (80.5-109.2)	0.150
30	114.5 (90.3-136.4)	98.7 (76.5-113.9)	105.7 (80.7-133.7)	85.2 (69.7-99.0)	0.249
40	105.0 (86.8-118.9)	96.3 (69.4-112.3)	106.1 (78.6-132.1)	82.3 (71.5-101.4)	0.308
50	100.6 (81.7-121.0)	90.4 (68.5-108.9)	102.3 (68.1-123.1)	80.9 (63.4-98.3)	0.278
60	93.1 (72.5-122.1)	87.5 (73.2-117.9)	92.1 (64.1-111.6)	78.2 (59.4-103.1)	0.471
70	91.8 (70.6-123.3)	85.5 (64.8-106.9)	92.9 (63.1-117.5)	77.9 (55.5-101.7)	0.875
80	89.1 (66.9-123.9)	83.6 (59.8-107.8)	83.3 (63.0-102.9)	75.6 (54.9-97.1)	0.947
90	87.2 (60.4-121.8)	80.1 (63.6-106.4)	86.1 (67.6-109.7)	73.4 (62.1-95.3)	0.588
100	85.0 (54.1-121.1)	77.7 (59.3-105.4)	81.0 (68.6-97.2)	68.8 (46.3-89.7)	0.453
110	82.2 (50.4-119.3)	74.1 (52.7-94.5)	76.1 (61.1-92.6)	66.7 (45.7-86.1)	0.529
120	81.1 (49.9-107.2)	67.7 (50.5-92.1)	73.5 (56.5-90.6)	65.9 (41.1-82.9)	0.400



Şekil 13. Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarına ait spike frekans ve amplitüd yüzde değişimleri **(A)** 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike frekansına etkisi, **(B)** 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarının penisilinle oluşturulan epileptiform aktivitenin ortalama spike amplitüdüne etkisi, *Pen G+SF grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

4.4. Patolojik Analizler

Deney hayvanlarından elde edilen preparatlarda 3 üzerinden inflamasyon skoru ve konjesyone damar yaygınlığı hesaplandı. Bu skorlama sistemine göre inflamasyon; 0: Hiç yok, 1: Hafif şiddette, 2: Orta şiddette, 3: Şiddetli olarak değerlendirildi. Konjesyone damar yaygınlığı 0: Hiç yok, 1: Az sayıda, 2: Birkaç alanda dağınık, 3: Yaygın olarak değerlendirildi. SF, Pen G, 20 OLE, 40 OLE ve 80 OLE grupları arasında inflamasyon ve konjesyon açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Birinci deney gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları Tablo 22’de gösterilmiştir.

SF, Pen G, 80 OLE, L-NAME, 80 OLE+L-NAME grupları arasında inflamasyon ve konjesyon açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). SF, Pen G, 80 OLE, L-NAME, 80 OLE+L-NAME gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları Tablo 23’te gösterilmiştir.

Tablo 22. Birinci deney gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları

Grup	KONJESYON SKOR (SAĞ HEMİSFER)				KONJESYON SKOR (SOL HEMİSFER)			
	n (%)							
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
SF	0 (0)	6 (75)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	5 (62.5)	2 (25)	0 (0)
Pen G	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)	4 (50)	4 (50)	0 (0)	0 (0)
20 OLE	0 (0)	5 (71.4)	2 (28.6)	0 (0)	0 (0)	3 (42.8)	3 (42.8)	1 (14.2)
40 OLE	1 (14.2)	5 (71.4)	1 (14.2)	0 (0)	2 (28.6)	2 (28.6)	3 (42.8)	0 (0)
80 OLE	1 (14.2)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)	1 (14.2)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)

Grup	İNFLAMASYON SKOR (SAĞ HEMİSFER)				İNFLAMASYON SKOR (SOL HEMİSFER)			
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
SF	3 (37.5)	5 (62.5)	0 (0)	0 (0)	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)
Pen G	2 (25)	6 (75)	0 (0)	0 (0)	6 (75)	2 (25)	0 (0)	0 (0)
20 OLE	6 (85.7)	1 (14.3)	0 (0)	0 (0)	2 (28.5)	4 (57.1)	1 (14.3)	0 (0)
40 OLE	6 (85.7)	1 (14.3)	0 (0)	0 (0)	3 (42.9)	2 (28.5)	1 (14.3)	1 (14.3)
80 OLE	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)	0 (0)	2 (28.5)	5 (71.4)	0 (0)	0 (0)

Tablo 23. SF, Pen G, 80 OLE, L-NAME, 80 OLE+L-NAME gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları

Grup	KONJESYON SKOR (SAĞ HEMİSFER)				KONJESYON SKOR (SOL HEMİSFER)			
	n (%)							
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
SF	0 (0)	6 (75)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	5 (62.5)	2 (25)	0 (0)
Pen G	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)	4 (50)	4 (50)	0 (0)	0 (0)
80 OLE	1 (14.2)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)	1 (14.2)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)
L-NAME	0 (0)	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0)
80 OLE+ L-NAME	0 (0)	8 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (75)	2 (25)	0 (0)

Grup	İNFLAMASYON SKOR (SAĞ HEMİSFER)				İNFLAMASYON SKOR (SOL HEMİSFER)			
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
SF	3 (37.5)	5 (62.5)	0 (0)	0 (0)	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)
Pen G	2 (25)	6 (75)	0 (0)	0 (0)	6 (75)	2 (25)	0 (0)	0 (0)
80 OLE	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)	0 (0)	2 (28.5)	5 (71.4)	0 (0)	0 (0)
L-NAME	3 (50)	2 (33.3)	1 (16.7)	0 (0)	3 (50)	3 (50)	0 (0)	0 (0)
80 OLE+ L-NAME	5 (62.5)	3 (37.5)	0 (0)	0 (0)	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)

SF, Pen G, 80 OLE, L-ARJ, 80 OLE+L-ARJ grupları arasında inflamasyon ve konjesyon açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). SF, Pen G, 80 OLE, L-ARJ, 80 OLE+L-ARJ gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları Tablo 24’te gösterilmiştir.

SF, Pen G, 80 OLE, 7-NI, 80 OLE+7-NI grupları arasında inflamasyon ve konjesyon açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). SF, Pen G, 80 OLE, 7-NI, 80 OLE+7-NI gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları Tablo 25’te gösterilmiştir.

Tablo 24. SF, Pen G, 80 OLE, L-ARJ, 80 OLE+L-ARJ gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları

KONJESYON SKOR (SAĞ HEMİSFER)					KONJESYON SKOR (SOL HEMİSFER)			
Grup	n (%)							
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
SF	0 (0)	6 (75)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	5 (62.5)	2 (25)	0 (0)
Pen G	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)	4 (50)	4 (50)	0 (0)	0 (0)
80 OLE	1 (14.2)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)	1 (14.2)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)
L-ARJ	0 (0)	6 (75)	1 (12.5)	1 (12.5)	0 (0)	5 (62.5)	2 (25)	1 (12.5)
80 OLE+ L-ARJ	2 (33.3)	3 (50)	1 (16.7)	0 (0)	4 (66.7)	2 (33.3)	0 (0)	0 (0)
İNFLAMASYON SKOR (SAĞ HEMİSFER)					İNFLAMASYON SKOR (SOL HEMİSFER)			
Grup								
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
SF	3 (37.5)	5 (62.5)	0 (0)	0 (0)	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)
Pen G	2 (25)	6 (75)	0 (0)	0 (0)	6 (75)	2 (25)	0 (0)	0 (0)
80 OLE	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)	0 (0)	2 (28.5)	5 (71.4)	0 (0)	0 (0)
L-ARJ	3 (37.5)	5 (62.5)	0 (0)	0 (0)	4 (50)	3 (37.5)	1 (12.5)	0 (0)
80 OLE+ L-ARJ	4 (50)	4 (50)	0 (0)	0 (0)	4 (50)	4 (50)	0 (0)	0 (0)

Tablo 25. SF, Pen G, 80 OLE, 7-NI, 80 OLE+7-NI gruplarının inflamasyon ve konjesyon skorları

KONJESYON SKOR (SAĞ HEMİSFER)					KONJESYON SKOR (SOL HEMİSFER)			
Grup	n (%)							
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
SF	0 (0)	6 (75)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	5 (62.5)	2 (25)	0 (0)
Pen G	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)	4 (50)	4 (50)	0 (0)	0 (0)
80 OLE	1 (14.2)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)	1 (14.2)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)
7-NI	0 (0)	4 (57.1)	3 (42.8)	0 (0)	0 (0)	4 (57.1)	2 (28.6)	1 (14.2)
80 OLE+ 7-NI	1 (12,5)	6 (75)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	7 (87.5)	0 (0)	1 (12.5)

İNFLAMASYON SKOR (SAĞ HEMİSFER)					İNFLAMASYON SKOR (SOL HEMİSFER)			
Grup	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
	Yok	+1	+2	+3	Yok	+1	+2	+3
SF	3 (37.5)	5 (62.5)	0 (0)	0 (0)	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	0 (0)
Pen G	2 (25)	6 (75)	0 (0)	0 (0)	6 (75)	2 (25)	0 (0)	0 (0)
80 OLE	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)	0 (0)	2 (28.5)	5 (71.4)	0 (0)	0 (0)
7-NI	5 (62.5)	3 (37.5)	0 (0)	0 (0)	4 (50)	3 (37.5)	1 (12.5)	0 (0)
80 OLE+ 7-NI	4 (50)	4 (50)	0 (0)	0 (0)	4 (50)	4 (50)	0 (0)	0 (0)

4.5. Biyokimyasal Analizler

SF grubu penisilin grubuyla kıyaslandığında Pen G grubunda sol hemisferde, MDA değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0.001$), CAT, SOD ve GPx değerleri ise anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla $p=0.013$, $p=0.004$ ve $p=0.034$).

OLE etkin doz grubu (80 mg/kg) SF grubuyla karşılaştırıldığında MDA değerleri etkin doz OLE grubunda anlamlı olarak düşük ($p=0.025$), SOD değerleri ise anlamlı olarak yüksekti ($p=0.035$). CAT ve GPx değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu (sırasıyla $p=0.902$, $p=0.805$). OLE etkin doz grubu (80 mg/kg) Pen G grubuyla karşılaştırıldığında MDA değerleri etkin doz OLE grubunda anlamlı olarak düşük ($p=0.001$), SOD, CAT ve GPx değerleri ise anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.035$, $p=0.002$, $p=0.035$). SF, Pen G, 20 OLE, 40 OLE ve 80 OLE gruplarında MDA, CAT, SOD ve GPx düzeyi analiz bulguları tablo 26'da gösterilmiştir.

Tablo 26. SF, Pen G, 20 OLE, 40 OLE ve 80 OLE gruplarında doku MDA, CAT, SOD ve GPx analiz bulguları

	MDA (nmol/mg protein)	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	GPx (nmol/min/mg protein)
Median (İnterquartil range)				
SF	20.3 (15.9-31.4)	0.35 (0.25-0.51)	5.1 (4.1-5.8)	56.3 (49.4-70.8)
Pen G	60.0 ^a (45.7-76.4)	0.24 ^a (0.15-0.25)	3.4 ^a (2.6-4.1)	48.2 ^a (44.1-53.4)
20 OLE	14.51 ^b (12.74-18.91)	0.35 ^b (0.27-0.42)	4.6 ^b (3.6-5.2)	48.9 ^a (44.6-53.8)
40 OLE	13.9 ^{a,b} (12.67-17.03)	0.38 ^b (0.28-0.48)	5.7 ^b (4.5-6.2)	49.8 ^a (46.1-53.5)
80 OLE	14.2 ^{a,b} (12.4-16.1)	0.36 ^b (0.24-0.47)	7.2 ^{a,b} (5.6-10.1)	54.9 ^b (49.8-59.1)

^a: SF, ^b: Pen G grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

L-NAME grubunda SF grubuna göre SOD düzeyi anlamlı olarak yüksekti ($p=0.018$), MDA, CAT ve GPx düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

L-NAME grubunda Pen G grubuna göre MDA düzeyi anlamlı olarak düşük ($p=0.027$), CAT ve SOD düzeyleri anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.016$, $p=0.017$), GPx düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

80 OLE+L-NAME grubunda SF grubuna göre SOD düzeyi anlamlı olarak yüksekti ($p=0.045$), MDA, CAT ve GPx düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

80 OLE+L-NAME grubunda Pen G grubuna göre MDA düzeyi anlamlı olarak düşük ($p=0.015$), CAT, SOD ve GPx düzeyleri anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.014$, $p=0.002$, $p=0.046$).

SF, Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarında MDA, CAT, SOD ve GPx düzeyi analiz bulguları tablo 27’de gösterilmiştir.

Tablo 27. SF, Pen G, 80 OLE, L-NAME ve 80 OLE+L-NAME gruplarında doku MDA, CAT, SOD ve GPx analiz bulguları

	MDA (nmol/mg protein)	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	GPx (nmol/min/mg protein)
	Median (İnterquartil range)			
SF	20.3 (15.9-31.4)	0.35 (0.25-0.51)	5.1 (4.1-5.8)	56.3 (49.4-70.8)
Pen G	60.0 ^a (45.7-76.4)	0.24 ^a (0.15-0.25)	3.4 ^a (2.6-4.1)	48.2 ^a (44.1-53.4)
80 OLE	14.2 ^{a,b} (12.4-16.1)	0.36 ^b (0.24-0.47)	7.2 ^{a,b} (5.6-10.1)	54.9 ^b (49.8-59.1)
L-NAME	17.1 ^b (16.3-18.2)	0.46 ^b (0.40-0.61)	7.1 ^{a,b} (5.7-8.5)	55.0 (46.9-61.2)
80 OLE+ L-NAME	22.4 ^b (20.9-21.7)	0.42 ^b (0.32-0.62)	6.6 ^{a,b} (6.2-8.7)	58.1 ^b (49.9-73.5)

^a: SF, ^b: Pen G grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

L-ARJ grubunda SF grubuna göre SOD düzeyi anlamlı olarak yüksekti ($p=0.019$), MDA, CAT ve GPx düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

L-ARJ grubunda Pen G grubuna göre MDA düzeyi anlamlı olarak düşük ($p=0.040$), CAT ve SOD düzeyleri anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.009$, $p=0.028$), GPx düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

80 OLE+L-ARJ grubunda SF grubuna göre SOD düzeyi anlamlı olarak yüksekti ($p=0.008$), MDA, CAT ve GPx düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

80 OLE+L-ARJ grubunda Pen G grubuna göre MDA düzeyi anlamlı olarak düşük ($p=0.036$), CAT, SOD ve GPx düzeyleri anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.012$, $p=0.034$, $p=0.005$).

SF, Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarında MDA, CAT, SOD ve GPx düzeyi analiz bulguları tablo 28’de gösterilmiştir.

Tablo 28. SF, Pen G, 80 OLE, L-ARJ ve 80 OLE+L-ARJ gruplarında doku MDA, CAT, SOD ve GPx analiz bulguları

	MDA (nmol/mg protein)	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	GPx (nmol/min/mg protein)
	Median (İnterquartil range)			
SF	20.3 (15.9-31.4)	0.35 (0.25-0.51)	5.1 (4.1-5.8)	56.3 (49.4-70.8)
Pen G	60.0 ^a (45.7-76.4)	0.24 ^a (0.15-0.25)	3.4 ^a (2.6-4.1)	48.2 ^a (44.1-53.4)
80 OLE	14.2 ^{a,b} (12.4-16.1)	0.36 ^b (0.24-0.47)	7.2 ^{a,b} (5.6-10.1)	54.9 ^b (49.8-59.1)
L-ARJ	19.1 ^b (15.9-31.4)	0.45 ^b (0.35-0.56)	6.6 ^{a,b} (5.7-9.5)	49.9 (45.7-59.5)
80 OLE+ L-ARJ	21.7 ^b (20.5-24.3)	0.29 ^b (0.26-0.38)	6.6 ^{a,b} (5.5-7.0)	68.3 ^b (56.8-76.1)

^a: SF, ^b: Pen G grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

7-NI grubunda SF grubuna göre SOD düzeyi anlamlı olarak yüksekti ($p=0.004$), MDA, CAT ve GPx düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

7-NI grubunda Pen G grubuna göre MDA düzeyi anlamlı olarak düşük ($p<0.001$), CAT, SOD ve GPx düzeyleri anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.039$, $p<0.001$, $p=0.021$).

80 OLE+7-NI grubunda SF grubuna göre SOD, MDA, CAT ve GPx düzeyleri açısından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

80 OLE+7-NI grubunda Pen G grubuna göre MDA düzeyi anlamlı olarak düşük ($p<0.001$), CAT, SOD ve GPx düzeyleri anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.036$, $p=0.002$, $p=0.008$).

SF, Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarında MDA, CAT, SOD ve GPx düzeyi analiz bulguları tablo 29’da gösterilmiştir.

Tablo 29. SF, Pen G, 80 OLE, 7-NI ve 80 OLE+7-NI gruplarında doku MDA, CAT, SOD ve GPx analiz bulguları

	MDA (nmol/mg protein)	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	GPx (nmol/min/mg protein)
	Median (İnterquartil range)			
SF	20.3 (15.9-31.4)	0.35 (0.25-0.51)	5.1 (4.1-5.8)	56.3 (49.4-70.8)
Pen G	60.0 ^a (45.7-76.4)	0.24 ^a (0.15-0.25)	3.4 ^a (2.6-4.1)	48.2 ^a (44.1-53.4)
80 OLE	14.2 ^{a, b} (12.4-16.1)	0.36 ^b (0.24-0.47)	7.2 ^{a, b} (5.6-10.1)	54.9 ^b (49.8-59.1)
7-NI	19.2 ^b (18.0-20.5)	0.29 ^b (0.26-0.55)	7.2 ^{a, b} (6.3-9.3)	57.8 ^b (53.5-63.9)
80 OLE+ 7-NI	19.8 ^b (18.1-22.7)	0.31 ^b (0.22-0.38)	5.6 ^b (4.61-7.1)	64.9 ^b (56.4-78.2)

^a: SF, ^b: Pen G grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda oleuropeinin penisilin G ile oluşturulan deneysel epileptik aktivite üzerine olan etkisi ve nitrerjik sistem ile olası ilişkisi araştırmaya değer bulunarak çalışıldı.

Epilepsi, beyindeki yaygın bozukluklardan biridir ve spontan tekrarlayan nöbetlerle karakterizedir. Ancak tüm nöbetler epilepsiden kaynaklanmaz, örneğin ateşli nöbetler veya ilaçların neden olduğu nöbetler epilepsi kaynaklı değildir (117). Bu durumlarda duruma bağlı reaktif epilepsi nöbetinden bahsedilir. Yani beynin uyarılabilirliğini eksitasyon yönünde değiştiren her türlü akut durum bir epilepsi nöbeti oluşturabilir. Bu durumda epilepsi hastalığından bahsedilmez. Bu durumlarda ortaya çıkan epilepsi nöbetleri akut reaktif epilepsi nöbetleri olarak kabul edilir.

Epilepsi hastalarının yaklaşık %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır. Epilepsi dünyanın birçok yerinde damgalanmakta ve bireyler tedavi arayışına girmemektedir. Aktif epilepsi hastalarının %75'inden fazlası tedavi edilmemekte ve bu durum özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde sağlık hizmetlerinde önemli bir eşitsizliğe işaret etmektedir (118).

Tanı az olmayan sayıdaki hasta gruplarında zor olabilmektedir. Çünkü pratikte epilepsinin elektriksel tanısal özellikleri nöbetler arası dönemde mevcut olmayabilir, nöbetler nadir olabilir veya nöbetleri olmayan kişilerde nöbetler arası epileptiform deşarjlar meydana gelebilir (117). İnsan epilepsisiyle ilişkili temel fizyolojik ve davranışsal değişikliklerin anlaşılmasında, nöbetler ve epileptiform aktivite için hayvan modelleri, daha etkili nöbet önleyici ilaçlar geliştirmek için önemli bir rol oynamaktadır. Bu alanda pek çok çalışma yapılmış ve de yapılmaya devam edecek görünmektedir (119).

Çalışmamızda deney hayvanlarına 500 IU Pen G i.c. olarak uygulandı ve enjeksiyon sonrasında 3-5 dakika içinde spike'lar ve diken-dalga kompleksleri oluşmaya başladı. Epileptiform aktivite 30 dk içinde kararlı hale geldi. Pen G'den sonra uygulanan ilk maddelerin (OLE, SF) enjeksiyonları 30. dakikada yapıldı. Kombinasyon gruplarında daha sonra uygulanan maddeler ise OLE'den 30 dk sonra intraperitoneal yoldan verildi.

Bu araştırmada epileptiform aktivite için penisilin modeli tercih edildi. Deneysel epilepsi modelleri arasında tercih edilenlerinden biri penisilin modelidir ve birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (120, 121). İntrakortikal Pen G uygulanması, insan fokal interiktal epileptik deşarjlarına elektrofizyolojik olarak yakın olan senkron nöronal

deşarjla sonuçlanır. Fokal olarak başlayıp daha sonra yayılarak jeneralize epilepsiye neden olan deneysel penisilin modeli, insanlarda bulunan klinik epilepsi vakalarıyla birebir aynı olmasa da, temel mekanizma açısından korelasyonlara sahiptir (89). Kortekse uygulanan Pen G, GABA reseptör inhibisyonuna neden olur ve bu nedenle GABA aktivitesini baskılayarak fokal epileptiform aktiviteye neden olur (122). Penisilinin neokortekse uygulanmasının, in vivo veya in vitro epileptiform aktiviteyi indükleyen glutamat salınımını artırdığı da bildirilmiştir (92).

Nöroproteksiyon, beyin disfonksiyonunu iyileştirmek, nöronal ağın yenilenmesini sağlamak ve hastalığı modifiye eden terapiler geliştirmek amacıyla sinir hücresi ölümünü önlemek için tasarlanmıştır. Araştırmacıların ve bilim insanlarının geçmiş dönemde nöral koruyucu ilaçların geliştirilmesine yönelik büyük çabalarına rağmen, epileptik atakları ve onların olumsuz etkilerini durduracak başarılı ve etkili bir ilaç henüz keşfedilmemiştir (123). Örneğin, Alzheimer hastalığında memantin, kinürenik asit, izofluran gibi ajanların, epilepsi tedavisinde fenitoin, lamotrijin, topiramet gibi ajanların nöroprotektif etkisi araştırılmış ancak henüz nöron hasarını tamamen engelleyecek etkisi kanıtlanmış bir ajan gösterilememiştir (124). Kullanım onayı bulunan fluoksetin, essitalopram ve sitalopram gibi antidepresan ilaçların hepatotoksisite, oksidatif stres, iltihaplanma ve hepatositlerin apoptozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur ve bunlar zeytinyağı ve biyoaktif bileşenleri gibi doğal gıda bileşenleri tarafından pozitif olarak azaltılabilir (125). Çok sayıda çalışma, Akdeniz diyetinin gıdalardaki fenolik bileşik yoğun bileşenleri nedeniyle nöroproteksiyondaki olası yararlı rolünü desteklemektedir (126).

OLE, zeytin ağaçlarında bulunan başlıca biyoaktif bileşendir ve yapraklarında, olgunlaşmamış ve işlenmemiş meyvelerinde daha fazla miktarda bulunur (127). Olgunlaşma aşamasına, ekstraksiyon yöntemlerine ve depolama amacıyla kullanılan koruma yöntemlerine bağlı olarak zeytin yaprağı ekstraktındaki miktarı değişebilmektedir. OLE'nin antiiskemik (128), antioksidant (129) ve nöroprotektif (130) gibi birçok farmakolojik ve biyolojik etki gösterdiği bulunmuştur.

Bazı deneysel epilepsi modellerinde yapılan kısıtlı sayıdaki araştırmalarda OLE'nin antikonvülzan aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Farelerde pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan epileptik aktivite modelinde oleuropeinin nöbet üzerine terapötik etkisini araştırmak amacıyla Asgharzade ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada fareler dört gruba randomize edilmiştir. Bu gruplar 10 gün boyunca intraperitoneal olarak PTZ alan

kontrol grubu, PTZ uygulamasından 30 dakika önce OLE (20 mg/kg) alan OLE grubu, PTZ uygulamasından 30 dakika önce diazepam alan pozitif kontrol grubu ve PTZ uygulamasından 30 dakika önce flumazenil ve ardından OLE alan flumazenil grubu şeklinde oluşturulmuştur. OLE tedavisinin PTZ alan farelerde nöbet latansında anlamlı bir artışa ve kafa tiklerinin, baş ve üst ekstremitte nöbetlerinin, tüm vücut nöbetlerinin, tonik nöbetlerin total sıklığında anlamlı azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (28).

Rahimi ve arkadaşları tarafından yapılan OLE'nin pentilentetrazol ile indüklenen epilepside nöbetler üzerindeki etkilerini inceleyen başka bir çalışmada, nöbet indüklenmesinden 60 dakika önce 10, 20 ve 30 mg/kg intraperitoneal OLE uygulanmasının nöbet eşiğini doz bağımlı şekilde anlamlı olarak yükselttiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada nitrik oksit prekürsörü olan L-ARJ maddesinin, OLE'nin antikonvülzan aktivitesini güçlendirdiği, NOS nonspesifik inhibitörü olan L-NAME ve nöronal NOS spesifik inhibitörü olan 7-NI verildiğinde OLE'nin antikonvülzan aktivitesinin bloke olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle OLE'nin antikonvülzan özelliklerinde yapısal nöronal NOS'un rol oynayabileceği belirtilmiştir (29).

Hosseini ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada 40 adet rat 10'ar hayvandan oluşan 4 gruba (normal salin verilen negatif kontrol grubu, diazepam 1 mg/kg verilen pozitif kontrol grubu, 10 mg/kg OLE tedavi grubu ve 20 mg/kg OLE tedavi grubu) ayrılmıştır. Tedavi gruplarına 10 ve 20 mg/kg OLE dozları, negatif kontrol grubuna salin ve pozitif kontrol grubuna diazepam verildikten 30 dakika sonra pentilentetrazol (PTZ) 85 mg/kg dozda intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. Deney gruplarına hafıza testleri uygulandığında 10 mg/kg OLE verilen grupta periyodik davranış ölçümlerinde anlamlı artış, 10 mg/kg ve 20 mg/kg OLE verilen gruplarda pasif kaçınma hafızasında anlamlı artış görülmüştür. OLE'nin uygun bir antikonvülzan etkiye sahip olduğu, epileptik sıçanlarda çalışma belleğini ve pasif kaçınmayı geliştirdiği belirtilmiştir (131).

Çalışmamızda Pen G enjeksiyonundan 30 dakika sonra OLE 20, 40 ve 80 mg/kg dozlarında i.p. olarak uygulandı, spike sayısı ve amplitüdü ölçüldü. OLE (80 mg/kg) 40. dakikadan itibaren spike frekansını istatistiksel açıdan anlamlı oranda azalttı, OLE (40 mg/kg) ve OLE (20 mg/kg) gruplarında anlamlı bir azalma olmadı. OLE 80 mg/kg dozu, etkin doz kabul edilerek nitrerjik sistem kombinasyon gruplarında kullanıldı.

NO beyinde pek çok fizyolojik süreçte görev yapan bir transmitterdir. Beyinde nörotransmitter ve hedef hücrelerde ikincil mesajcı molekül olarak fonksiyon gösterir.

Çözünür guanilat siklaz NO için fizyolojik bir reseptör olarak kabul edilir. İkincil mesajcı cGMP'nin (siklik guanozin monofosfat) sentezi NO'nun siklaza bağlanmasıyla indüklenir. Nöronlarda bulunan nNOS intraselüler kalsiyum artışıyla stimüle olur ve NO sentezinde yer alır. Bir nöronun glutamat tarafından stimülasyonuna cevap olarak L-Arjininden NOS enzimi ile NO üretilir. Eksitotoksisite, glutamatın anormal hiperaktivitesi tarafından indüklenir ve epilepside nöbetlerle seyreden nöronal bozukluğun ana mekanizmasını oluşturur (6). Deneysel nöbet modelleri ile yapılan çalışmalarda, NOS inhibitörleri ve NO stimülanları, NO'nun pro- veya antikonvülzan aktivitesini değerlendirmek için kullanılmıştır, ancak NO'nun kesin rolü hala belirsizliğini korumaktadır. Nitrik oksitin endojen antikonvülzan ve de prokonvülzan olduğuna dair farklı görüşleri ifade eden çok sayıda çalışma bulunmaktadır (7, 8). Siyanür kullanılarak oluşturulan tonik epilepsi modelinde yapılan bir çalışmada epilepsi grubunda farelerde NG-nitro-L-Arjinin (NNA) verildiğinde nöbet eşiğinin yükseldiği saptanmıştır (9). Bu sonuç NO'nun prokonvülzan etkileri olduğunu göstermektedir ancak diğer yandan NOS inhibitörleri olan 7-NI ve L-NAME'in antikonvülzan ajanların etkinliğini azalttığını ifade eden çalışmalar bulunmaktadır (10). Penisilin deneysel epilepsisinde NOS inhibitörlerinin prokonvülzan etkisi olduğu rapor edilmiştir (11). NO yolağının aktivasyonunun ise antikonvülzan etki gösterdiği bildirilmiştir (12). Başka bir çalışmada PTZ ile indüklenen epileptik nöbet modelinde delta-opioid reseptörleri (DOR'lar) ile NO arasındaki ilişki opioid reseptörü (OPR'ler) agonistleri ve antagonistleri uygulanarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda delta opioid reseptör antagonisti olan naltrindol'un nNOS'un inhibisyonu ile hipokampal nitrit seviyelerini azaltarak antikonvülzan etki gösterdiği söylenmiştir (13). Literatürde NO ile ilgili çalışmalarda çelişkilerin olası nedenleri olarak kullanılan epileptik aktivite modeli, maddelerin uygulama yolu, kullanılan sıçan türü ve uygulanan maddelerin dozu gösterilmektedir. Çalışmamızda NO agonisti L-ARJ 500 mg/kg; NO antagonistleri L-NAME 60 mg/kg, 7-NI 50 mg/kg dozlarında uygulanarak epileptiform aktivite üzerine etkileri ayrı ayrı değerlendirildi.

Mohamud ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada penisilin uygulamasından 30 dakika sonra farklı deney gruplarına L-NAME 60 mg/kg, L-ARJ 500 mg/kg, aminoguanidin 100 mg/kg ve 7-Nitroindazol 40 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada bir NOS inhibitörü olan L-NAME, penisilinden 30 dakika sonra verilmiştir ve sıçanlarda penisilin kaynaklı epileptiform aktivitenin ne amplitüdü ne de frekansı üzerinde bir etkisi gösterilememiştir. Aynı çalışmada seçici nöronal NOS inhibitörü 7-NI, kontrol

grubuna kıyasla spike frekansını azaltmış ve bu önemli azalma, çalışmanın 60. dakikasından 180. dakikasına kadar gözlenmiştir. L-ARJ 500 mg/kg grubunda ise, 80. dakikadan çalışmanın sonuna kadar epileptiform aktivitede anlamlı azalma gösterilmiştir (132).

Hrnčić ve arkadaşları, ratlarda homosistein tiyolakton (HcT) tarafından tetiklenen diken dalga deşarjlarının sayısını L-NAME uygulamasının önemli ölçüde artırdığını, 7-NI (75 mg/kg) uygulamasının ise diken dalga deşarjlarının sayısı üzerinde etkili olmadığını belirtmiştir (133).

Literatürde mevcut başka bir çalışmada leptinin prokonvülzan etkisi, etkili leptin dozundan (1 µg, i.c.) 30 dakika önce L-NAME (60 mg/kg, i.p.) uygulanmasıyla etkilenmemiştir. Penisilin+leptin ve Penisilin+L-NAME+leptin grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu çalışmada penisilin grubuyla karşılaştırıldığında, 7-NI (40 mg/kg, i.p.) uygulaması, leptin enjeksiyonundan sonraki 100 dakika içinde epileptiform aktivitenin frekansını önemli ölçüde azaltmıştır. Penisilin grubuyla karşılaştırıldığında, leptinin etkili dozundan (1 µg, i.c.) 30 dakika önce L-ARJ (1000 mg/kg, i.p.) uygulanması, leptin enjeksiyonundan sonraki 70 dakika içinde epileptiform aktivitenin frekansını önemli ölçüde azaltmış, ancak amplitüdünü değiştirmemiştir (134).

Per ve arkadaşları tarafında sıçanlarda yapılan bir çalışmada penisilin modelinde, 25 ve 50 mg/kg dozlarında 7-NI ve L-ARJ (500 mg/kg, i.p.), amplitüdü değiştirmeden ortalama frekansı önemli ölçüde azaltmıştır. 7-NI ve L-ARJ, sırasıyla uygulamadan sonra 40. ve 70. dakikalarda antikonvülzan aktivite göstermiştir. 60 ve 100 mg/kg dozlarında aminoguanidin uygulamasının epileptiform aktivitenin ortalama sıklığını azalttığını rapor etmişlerdir (135).

Paul ve arkadaşları non-spesifik NOS inhibitörü L-NAME'in sıçanlarda pikrotoksin kaynaklı nöbetleri engellemediğini, buna karşın NO öncüsü olan L-Arjininin fenobarbital ve diazepam gibi antikonvülzan ilaçların tedavi edici potansiyelini güçlendirdiğini belirtmişlerdir (136). Aslan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 7-NI (40 mg/kg i.p.) uygulamasında penisilin gruplarıyla karşılaştırıldığında ghrelin enjekte edilen grubun amplitüdünde bir değişiklik olmazken epileptiform aktivitenin frekansının ghrelin enjekte edildikten sonraki 60 dakika içinde önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (137). Zhu ve arkadaşlarının PTZ modeli ile yaptıkları bir çalışmada L-NAME veya 7-NI ile ön tedavi uygulamasının, kurkuminin nöbet önleyici etkisini önemli ölçüde artırdığını göstermişlerdir (138). Mülsch ve arkadaşları, sıçanların ilk 60 dakika boyunca 7-NI (40 mg/kg, i.p.) ile ön tedavisinin, epileptiform aktiviteyi önemli ölçüde azalttığını ifade etmektedirler (98).

Adabi Mohazab ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada PTZ indüksiyonundan 4 saat önce verilen pioglitazonun antikonvülzan etkisinin, pioglitazon (20 mg/kg) ile birlikte L-ARJ (100, 200 mg/kg) uygulandığında büyük ölçüde güçlendirildiği belirtilmiştir (139).

PTZ modeli ile deney yapılan bir çalışmada kombine düşük doz morfin (0.25 mg/kg) ve talidomidin (5 mg/kg) nöbet önleyici etkileri, NO prekürsörü L-ARJ 60 mg/kg i.p. dozuyla ön tedavi uygulanarak önemli ölçüde azalmıştır. Karşılaştırıldığında, non-selektif (L-NAME, 5 mg/kg, i.p.) veya selektif nöronal (7-NI, 30 mg/kg, i.p.) NOS inhibitörleri ile ön tedavinin, düşük talidomid ve morfin kombinasyon dozlarının antikonvülzan etkilerini önemli ölçüde iyileştirdiği vurgulanmıştır (140).

Bizim çalışmamızda da L-ARJ, L-NAME ve 7-NI grupları amplitüd üzerinde anlamlı etki göstermezken, L-NAME (60 mg/kg) grubunda 90. dakikadan itibaren, 7-NI grubunda 70. dakikadan itibaren spike frekansı anlamlı olarak azalarak antikonvülzan aktivite görülmüştür. L-Arjinin grubunda spike frekansı üzerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Mevcut çalışmada aynı zamanda penisilinle oluşturulan epileptiform aktivite üzerinde oleuropein ile nitrerjik sistem agonist ve antagonistlerinin etkileşiminin etkisi de araştırılmıştır.

Çalışmamızda NO ile ilgili ajanların penisilin ile oluşturulan epileptik aktivite modeli üzerine etkilerini değerlendirmek için NO agonist ve antagonist ajanları kullanılmıştır. 500 IU Pen G enjeksiyonundan 30 dk sonra ayrı gruplarda L-ARJ (500 mg/kg), L-NAME (60 mg/kg), 7-NI (50 mg/kg) intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. Yüzde spike değişimleri incelendiğinde 80 OLE+L-NAME (60 mg/kg) grubunda 70.dk'dan itibaren Pen G grubuna göre anlamlı fark görülmüştür. L-NAME'in 80 OLE ile birlikte verilmesinin, antikonvülzan etkinin 20 dk önce başlamasını sağladığı tespit edildi.

Yüzde spike değişimleri incelendiğinde 7-NI (50 mg/kg) grubunda 70. dakikadan itibaren Pen G grubuna göre antikonvülzan etkisi anlamlı fark gösterirken 7-NI'nın 80 OLE ile birlikte verilmesi antikonvülzan etkinin başlama süresini değiştirmemiştir.

Nitrerjik sistem agonist ve antagonistleri tek başına verildiğinde Pen G grubuna ve 80 OLE grubuna göre spike amplitüdünde anlamlı etki görülmemiştir.

Nitrik oksit sentaz inhibitörleri OLE ile birlikte verildiğinde OLE'nin antikonvülzan etkinliğini geciktirdiği görülmüştür. Bu bulgular muhtemelen OLE ile nitrerjik sistemin

etkileşim içinde olabileceğini düşündürmektedir. OLE'nin antikonvülzan etkinliğinin nitrejik sistemle ilişkisini net olarak ortaya koyacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Oksidatif stres ve epilepsi arasındaki ilişkiye dair ilk kanıt, 1989 yılında Armstead ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada hayvanlarda bikukulin uygulanmasıyla SOD'un arttığının keşfedilmesiyle ortaya çıkmıştır (141). Devamında yapılan çalışmalar, hayvanlarda tekrarlayan nöbet aktivitesinin, artmış reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olup olmadığını veya oksidatif hasarın, nöbet kaynaklı beyin hasarı oluşma sürecinde etkisinin olup olmadığını açıklamaya odaklanmıştır (142).

Deneyisel epilepsi modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, epileptik aktivite oluşum sürecinde oksidatif stresin rolü olduğunu göstermektedir (143, 144). Literatürde mevcut diğer çalışmalarda ise epileptik nöbetlere sebep olan nöronlarda, aşırı ve tekrarlayan senkron deşarjlar sonucu serbest radikal konsantrasyonunda artış olduğu görülmüştür (145, 146).

OLE'nin antioksidan ve antiinflamatuvar rolü, çeşitli uyaranlara karşı nöral savunmayı artıran çeşitli mekanizmalar tarafından gerçekleştirilir. Morfinin beyin farklı bölgelerinde, özellikle hipokampusta, oksidatif stresi ve apoptozu indüklediği bilinmektedir (147). Shibani ve arkadaşları tarafından, erkek Wistar ratlarda morfinin neden olduğu hipokampal nörotoksisiteye ve hafıza bozukluklarına karşı oleuropeinin koruyucu etkisi araştırıldı. OLE (15 ve 30 mg/kg) ile tedavinin antioksidan aktivitesini, yani nörotoksik sıçanlarda SOD ve GPx'i, hafıza eksikliklerini ve uzaysal öğrenmeyi iyileştirdiğini gözlemlediler. OLE'nin ayrıca Bcl2/Bax proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek beyin hücrelerinde lipid peroksidasyonunu ve apoptozu azalttığı sonucuna ulaşmışlardır (148). OLE, protein kinaz A aracılı fosforilasyonu, GluA1'in yüzey ekspresyonunu güçlendirerek nöroprotektif bir rol oynar ve dolayısıyla farelerin hipokampal bölgelerinde hücre içi kalsiyum akışını artırır, böylece yaşa bağlı hafıza bozukluklarıyla mücadelede faydalı etkiler gösterir (149). Benzer şekilde OLE, insan glioblastoma hücrelerinde hidrojen peroksitin neden olduğu stresi etkili bir şekilde önlemekte ve hücre canlılığını korumaktadır. OLE ayrıca hücresel total antioksidan kapasitesini ve hidrojen peroksitten etkilenen glutatyon içeriğini önemli ölçüde yenilemektedir (150). Sentetik bir piretroid insektisit olan deltametrin, oksidatif stres ve inflamasyon dahil olmak üzere hücresel ve moleküler basamaklar yoluyla nörotoksik etkiler ortaya çıkarır. OLE'nin deltametrin kaynaklı nöral stresi iyileştirmedeki koruyucu etkisinin, Bcl-2/Bax proteinlerinin immünohistokimyasal ekspresyonunu düzenleyerek ve histopatolojik değişiklikleri azaltarak nöral dejenerasyonu

azaltması olduğu ortaya konmuştur (151). Lee ve arkadaşları tarafından, sıçanlarda tek uzun süreli stres ve travma sonrası stres modelinin olumsuz etkilerine karşı OLE'nin terapötik potansiyeli doza bağlı bir şekilde araştırıldı. Rat beyninin hipokampal bölgesinde stres kaynaklı hafıza bozuklukları ve azalan BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör) seviyeleri, OLE uygulamasıyla önemli ölçüde tersine çevrildi. OLE uygulamasından sonra pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunda azalma gözlemlendiğinden, OLE'nin bu etkisinin anti-inflamatuar özelliklerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (152).

Çalışmamızda penisilinle oluşturulan epileptik aktivite, sol hemisferde, MDA değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede artmasına, antioksidan enzimlerden CAT, SOD ve GPx değerlerinin anlamlı derecede azalmasına neden oldu. Bu veriler literatürde mevcut verilerle uyumluydu. PTZ ile oluşturulmuş bir epileptik aktivite modeliyle yapılan bir çalışmada beyinde MDA düzeylerinin arttığı belirtilmiştir (153). Pedre ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise ilaçlara dirençli olan kompleks parsiyel epilepsi tanılı hastalarda sağlıklı bireylere oranla MDA seviyelerinin arttığı ortaya konmuştur (154).

Literatürde epileptik aktivite oluşturulan çalışmalarda SOD, CAT ve GPx gibi oksidatif stres göstergeleri için elde edilen veriler birbirinden farklı ve çelişen bulgular içermektedir (155, 156). Temporal lob epilepsisinde SOD, CAT düzeylerinde artış oluştuğu, aksine GPx düzeylerinin azaldığı belirtilmiştir (155). Epilepsili pediatrik hastalarda ve bu hastalara antiepileptik ajanlarla bir yıl tedavi verildikten sonra serum SOD ve GPx enzim miktarlarında bir farklılık saptanmamıştır (156). Penisilinle oluşturulan deneysel epileptik aktivite modelinde, epilepsili gerbillerde serum CAT ve GPx düzeyleri azalırken, SOD seviyesinde fark saptanmamıştır (157). Güneş ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada çocuklarda febril nöbetlerden sonra serum GPx seviyesi artarken SOD enzim seviyesinin azaldığı saptanmıştır (158).

Kronik inflamasyonun beyin nöronal membran potansiyellerini destabilize eden patolojik etkisinin epilepsi gelişimindeki mekanizmalardan biri olduğu ifade edilmektedir (159). Status epileptikus indüksiyonundan sonra rodent beyinleri üzerindeki immünohistokimyasal çalışmalar epileptojenik süreç sırasında ortaya çıkan inflamasyon dalgalarını göstermektedir. Proinflamatuar sitokinler (IL-1 β , TNF ve IL-6) ilk olarak aktive mikroglia ve astrositlerde eksprese olmakta ve mikroglia, astrositler ve nöronlarda sitokin reseptörü ekspresyonunda upregülasyon görülmektedir (160). Kemokinler ve reseptörleri status epileptik sonrası özellikle nöronlarda ve aktive astrositlerde günlerden haftalara kadar

üretilmektedir (161). Büyük arteriovenöz malformasyonların (AVM) venöz konjesyon, hipoksi aracılı sinyalleşme yollarının indüksiyonu ve perinidal korteksin nöronal ve glial bileşenlerinde patojenik değişikliklere yol açma eğilimi nedeniyle küçük olanlara göre epilepsi ile daha ilişkili olabileceği belirtilmektedir (162). Bizim çalışmamızda deney hayvanlarının sağ ve sol hemisferlerinden alınan doku örneklerinden yapılan patolojik analizlerde inflamasyon ve konjesyon açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu bulgu çalışmamızda akut bir deneysel epileptik aktivite modeli kullanılmış olması ve ECoG kaydı sonrası hayvanlardan doku örnekleri alınmış olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu durum, çalışmamızın akut nöbet modelinde yapılması sebebi ile epilepsi modelleri ile yapılan bu çalışmalarla uyumsuzluğunu açıklayabilir. Pediatrik ve adolesan hastalarda status epileptikus tedavisinde ketaminin yararlarının ve yan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada inflamatuvar durumların ketaminin etkinliğini zayıflatabileceği ifade edilmiştir (163).

Bu çalışma bilindiği kadarıyla penisilin ile oluşturulan epileptik aktivite modelinde OLE'nin antikonvülzan etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Sonuçlar oleuropeinin antikonvülzan etkisini desteklemektedir. Penisilin modelinde OLE'nin antikonvülzan etkisi açısından sonuçlarımız kıymetlidir. OLE'nin antikonvülzan etkisi üzerine nitrerjik sistem agonist ve antagonistleri, farklı sürede etkili olmuşlardır. Nitrerjik sistemin agonisti L-ARJ tek başına etkisi görülmemiştir, spesifik antagonisti 7-NI 70. dk'dan itibaren antikonvülzan etki göstermiştir. Bir diğer antagonisti L-NAME ise daha geç, 90. dk'dan itibaren antikonvülzan etki sergilemiştir. Nitrik oksit sentaz inhibitörleri OLE ile birlikte verildiğinde OLE'nin antikonvülzan etkinliğini geciktirmesi muhtemelen OLE ile nitrerjik sistem arasında bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir. OLE'nin antikonvülzan etkinliğinin nitrerjik sistemle ilişkisini net olarak ortaya koyacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Wistar sıçanlarda penisilin kaynaklı epileptiform ECoG aktivitesinde OLE 40.dk'dan itibaren spike frekansında önemli düşüşe neden olup antikonvülzan etkisi tespit edilmiştir. OLE nin antikonvülzan etkinliğinin NO yolağının rolü ile ilgili mevcut yayınlanmış bir veri yoktur. Bu yüzden çalışmamız ilk olması nedeni ile dikkate değerdir. Bu konuda daha fazla çalışma yapılmasının, önemli bir sağlık sorunu olan epilepsi tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine ışık tutacağı umulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Annegers JF, Rocca WA, Hauser WA (1996). Causes of epilepsy: contributions of the Rochester epidemiology project. In Mayo Clinic Proceedings Elsevier 71(6): 570-575
2. Fisher RS, Van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J (2005). Response: definitions proposed by the international league against epilepsy (ILAE) and the international bureau for epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46(10): 1701-1702.
3. Bosak M, Słowik A, Kacprzyk R, Turaj W (2019). Implementation of the new ILAE classification of epilepsies into clinical practice — A cohort study. *Epilepsy and Behavior* 96: 28–32.
4. Lascano AM, Korff CM, Picard F (2016). Seizures and epilepsies due to channelopathies and neurotransmitter receptor dysfunction: A parallel between genetic and immune aspects. *Molecular Syndromology* 7(4): 197-209.
5. Sánchez Fernández I, Loddenkemper T (2014). Subunit Composition of Neurotransmitter Receptors in the Immature and in the Epileptic Brain. *BioMed Research International* 2014:301950.
6. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D (2019). Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the cns by controlling the balance between glutamate uptake and release. *Cells* 8(2): 184.
7. Herberg LJ, Grottick A, Rose IC (1995). Nitric oxide synthesis, epileptic seizures and kindling. *Psychopharmacology* 119: 115-123
8. De Sarro G, Gareri P, Falconi U, De Sarro A (2000). 7-Nitroindazole potentiates the antiseizure activity of some anticonvulsants in DBAr2 mice. *European Journal of Pharmacology* 394(2-3): 275-288
9. Yamamoto HA (1995). A hypothesis for cyanide-induced tonic seizures with supporting evidence. *Toxicology* 95(1-3): 19-26.
10. Homayoun H, Khavandgar S, Namiranian K, Gaskari A, Dehpour AR (2002). The role of nitric oxide in anticonvulsant and proconvulsant effects of morphine in mice. *Epilepsy Research* 48(1-2): 33-41.
11. Yildirim M, Ayyildiz M, Agar E (2010). Endothelial nitric oxide synthase activity involves in the protective effect of ascorbic acid against penicillin-induced epileptiform activity. *Seizure* 19(2): 102–108.
12. Ayyıldız M, Yıldırım M, Agar E (2006). The effects of vitamin E on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Experimental Brain Research* 174: 109–113.

13. Nikbakhsh R, Nikbakhsh R, Radmard M, Tafazolimoghadam A, Haj-Mirzaian A, Pirri F, Noormohammady P, Sabouri M, Shababi N, Ziai SA et al. (2020). The possible role of nitric oxide in anti-convulsant effects of Naltrindole in seizure-induced by social isolation stress in male mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 129: 110453
14. Malik NSA, Bradford JM (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina” olives. *Scientia Horticulturae* 110(3): 274–278
15. Japón-Luján R, Luque-Rodríguez JM, Luque De Castro MD (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A* 1108(1): 76–82.
16. Bouaziz M, Bouallagui Z, Jemai H, Sayadi S (2008). Production of antioxidants from olive processing by-products. *EJEAFChe* 7(8): 3231-3236.
17. Boudhrioua N, Bahloul N, Ben Slimen I, Kechaou N (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products* 29(2-3): 412–419.
18. Casas-Sanchez J, Alsina AM, Herrlein MK, Mestres C (2007). Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *Colloid and Polymer Science* 285: 1351–1360.
19. Dua S, Bhat ZF, Kumar S (2015). Effect of oleuropein on the oxidative stability and storage quality of Tabaq-Maz, fried mutton ribs. *Food Bioscience* 12: 84–92.
20. Qadir NM, Ali KA, Qader SW (2016). Antidiabetic Effect of Oleuropein from *Olea europaea* Leaf against Alloxan Induced Type 1 Diabetic in Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59: e16150116.
21. Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, Gerothanassis IP (2009). Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 53(5): 600–608.
22. Hadrich F, Mahmoudi A, Bouallagui Z, Feki I, Isoda H, Feve B, Sayadi S (2016). Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. *Chemico-Biological Interactions* 252: 54–60.
23. Janahmadi Z, Nekooeian AA, Moaref AR, Emamghoreishi M (2015). Oleuropein offers cardioprotection in rats with acute myocardial infarction. *Cardiovascular toxicology* 15: 61-68.

24. Vogel P, Machado IK, Garavaglia J, Zani VT, de Souza D, Dal Bosco SM (2015). Beneficios polifenoles hoja de olivo (*Olea europaea* L) para la salud humana. *Nutricion Hospitalaria* 31(3): 1427–1433.
25. Raol YH, Brooks-Kayal AR (2012). Experimental models of seizures and epilepsies. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 105: 57-82.
26. McCandless DW, FineSmith RB (1992). Chemically Induced Models of Seizures. *Animal Models of Neurological Disease, II: Metabolic Encephalopathies and the Epilepsies*, 133-151.
27. Ankaralı S, Beyazçiçek E, Ankaralı H, Demir Ş (2016). The effect of rapamycin on penicillin-induced epileptiform activity in rats: an electrophysiological study. *Anatolian Clinic the Journal of Medical Sciences* 21(3): 197-206.
28. Asgharzade S, Rabiei Z, Rabiei S, Bijad E, Rafieian-Kopaei M (2020). Therapeutic effects of oleuropein in improving seizure, oxidative stress and cognitive disorder in pentylenetetrazole kindling model of epilepsy in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 19(1): 98.
29. Rahimi N, Delfan B, Motamed-Gorji N, Dehpour AR (2017). Effects of oleuropein on pentylenetetrazol-induced seizures in mice: involvement of opioidergic and nitrenergic systems. *Journal of Natural Medicines* 71: 389–396.
30. Servili M, Esposto S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF (2009, April). Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* 17: 76-84.
31. Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7): 1013-1023.
32. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2011). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 31), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (3467). *EFSA journal* 9(4): 2033.

33. Romani A, Mulas S, Heimler D (2017). Polyphenols and secoiridoids in raw material (*Olea europaea* L. leaves) and commercial food supplements. *European Food Research and Technology* 243: 429–435.
34. Menendez JA, Joven J, Aragonès G, Barrajon-Catalán E, Beltrán-Debón R, Borrás-Linares I, Camps J, Corominas-Faja B, Cufí S, Fernández-Arroyo S et al. (2013). Xenohormetic and anti-aging activity of secoiridoid polyphenols present in extra virgin olive oil: A new family of gerosuppressant agents. *Cell Cycle* 12(4): 555-578.
35. Peña-Oyarzun D, Bravo-Sagua R, Diaz-Vega A, Aleman L, Chiong M, Garcia L, Bambs C, Troncoso R, Cifuentes M, Morselli E, et al (2018). Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: A matter of the inflammatory state? *Free Radical Biology and Medicine* 124: 61-78.
36. Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R, Carlini EA (2000). Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* 35(1): 45–54.
37. Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A (2000). Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278(3): 797-799.
38. Visioli F, Bellomo G, Galli C (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and biophysical research communications*, 247(1): 60-64.
39. Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M, Zappia V (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15(8): 461–466.
40. Hassen I, Casabianca H, Hosni K (2015). Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation—A mini-review. *Journal of Functional Foods* 18: 926-940.
41. Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, PREDIMED Study Investigators (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 145(1): 1-11.
42. Estruch R (2010). Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *Proceedings of the Nutrition Society* 69(3): 333-340.

43. Stefani M, Rigacci S (2014). Beneficial properties of natural phenols: highlight on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation. *BioFactors* 40(5): 482-493.
44. Blanco-Benítez M, Calderón-Fernández A, Canales-Cortés S, Alegre-Cortés E, Uribe-Carretero E, Paredes-Barquero M, ... & Yakhine-Diop SM (2022). Biological effects of olive oil phenolic compounds on mitochondria. *Molecular & Cellular Oncology* 9(1): 2044263.
45. Ngougoure VLN, Schluesener J, Moundipa PF, Schluesener H (2015). Natural polyphenols binding to amyloid: A broad class of compounds to treat different human amyloid diseases. *Molecular Nutrition & Food Research* 59(1): 8-20.
46. Dinda B, Dinda M, Kulsi G, Chakraborty A, Dinda S (2019). Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 169: 185-199.
47. Mohammad-Beigi H, Aliakbari F, Sahin C, Lomax C, Tawfike A, Schafer NP, Amiri-Nowdijeh A, Eskandari H, Møller IM, Hosseini-Mazinani M, et al. (2019). Oleuropein derivatives from olive fruit extracts reduce α -synuclein fibrillation and oligomer toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 294(11): 4215–4232.
48. Diomedea L, Rigacci S, Romeo M, Stefani M, Salmona M (2013). Oleuropein Aglycone Protects Transgenic *C. elegans* Strains Expressing A β 42 by Reducing Plaque Load and Motor Deficit. *PLoS ONE* 8(3): e58893.
49. Alexović M, Dotsikas Y, Bober P, Sabo J (2018). Achievements in robotic automation of solvent extraction and related approaches for bioanalysis of pharmaceuticals. *Journal of Chromatography B* 1092: 402-421.
50. Poole C, Mester Z, Miró M, Pedersen-Bjergaard S, Pawliszyn J (2016). Extraction for analytical scale sample preparation (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry* 88(7): 649-687.
51. Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics sonochemistry* 8(2): 137-142.
52. Azmin SNHM, Manan ZA, Alwi SRW, Chua LS, Mustaffa AA, Yunus NA (2016). Herbal processing and extraction technologies. *Separation & Purification Reviews* 45(4): 305-320.

53. Picó Y (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 43: 84-99
54. Flórez N, Conde E, Domínguez H (2015). Microwave assisted water extraction of plant compounds. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90(4): 590-607.
55. Subedi B, Aguilar L, Robinson EM, Hageman KJ, Björklund E, Sheesley RJ, Usenko S (2015). Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 68: 119-132.
56. Zheng Y, Yao M (2017). Liquid impinger BioSampler's performance for size-resolved viable bioaerosol particles. *Journal of Aerosol Science* 106: 34-42.
57. Stafstrom CE, Carmant L (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5(6): a022426.
58. Englot DJ, Chang EF (2014). Rates and predictors of seizure freedom in resective epilepsy surgery: an update. *Neurosurgical review* 37: 389-405
59. Plummer GS, Ibala R, Hahm E, An J, Gitlin J, Deng H, Shelton KT, Solt K, Qu JZ, Akeju O (2019). Electroencephalogram dynamics during general anesthesia predict the later incidence and duration of burst-suppression during cardiopulmonary bypass. *Clinical Neurophysiology* 130(1): 55–60.
60. Malmivuo J, Plonsey R (1995). *Bioelectromagnetism: principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields*. Oxford University Press, USA.
61. Liley DTJ, Muthukumaraswamy SD (2020). Evidence that alpha blocking is due to increases in system-level oscillatory damping not neuronal population desynchronisation. *NeuroImage* 208: 116408.
62. Mari-Acevedo J, Yelvington K, Tatum WO (2019). Normal EEG variants. *Handbook of clinical neurology* 160: 143-160.
63. Timofeeva OA, Gordon CJ (2001). Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine. *Brain research* 893(1-2): 165-177.
64. Ferri R, Cosentino FI, Elia M, Musumeci SA, Marinig R, Bergonzi P (2001). Relationship between Delta, Sigma, Beta, and Gamma EEG bands at REM sleep onset and REM sleep end. *Clinical Neurophysiology* 112(11): 2046-2052.

65. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M, et al. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55(4): 475-482
66. Yeni NS, Gürses C (2015). Epilepsi çalışma grubu tanı ve tedavi rehberi. Galenos Yayınevi, İstanbul.
67. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, et al. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58(4): 522–530.
68. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein DH (2015). A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 56(10): 1515–1523.
69. Hauser WA, Beghi E (2008). First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia* 49: 8–12.
70. Beghi E, Hesdorffer D (2014). Prevalence of epilepsy - An unknown quantity. *Epilepsia* 55(7): 963–967.
71. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N (2017). Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology* 88(3): 296–303.
72. Balal M, Demir T, Aslan K, Bozdemir H (2017). The determination of epilepsy prevalence in Adana City Center and relationship with sociodemographical factors. *Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care* 11(1): 20-28.
73. Karaağaç N, Yeni SN, Şenocak M, Bozluoğlu M, Savrun FK, Özdemir H, Çağatay P (1999). Prevalence of epilepsy in Silivri, a rural area of Turkey. *Epilepsia* 40(5): 637–642.
74. Velioglu SK, Bakirdemir M, Can G, Topbas M (2010). Prevalence of epilepsy in northeast Turkey. *Epileptic Disorders* 12: 22–37.
75. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, et al. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58(4): 512–521.

76. Fisher RS, Cross JH, D'Souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, et al. (2017). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia* 58(4): 531–542.
77. Pitkänen A, Lukasiuk K, Edward Dudek F, Staley KJ (2015). Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5(10): a022822.
78. Thomas RH, Berkovic SF (2014). The hidden genetics of epilepsy - A clinically important new paradigm. *Nature Reviews Neurology* 10(5): 283-292.
79. Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, Mcknight GS, Idzerda RL, Nathanson NM (1997). Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(24): 13311-13316.
80. Drysdale ND, Matthews E, Schuetz E, Pan E, McNamara JO (2021). Intravenous kainic acid induces status epilepticus and late onset seizures in mice. *Epilepsy research* 178: 106816.
81. Reddy DS, Kuruba R (2013). Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *International journal of molecular sciences* 14(9): 18284-18318.
82. Sprengers M, Raedt R, Larsen LE, Delbeke J, Wadman WJ, Boon P, Vonck K (2020). Deep brain stimulation reduces evoked potentials with a dual time course in freely moving rats: Potential neurophysiological basis for intermittent as an alternative to continuous stimulation. *Epilepsia* 61(5): 903–913.
83. Mareš P, Kubová H (2006). Electrical stimulation-induced models of seizures. In *Models of seizures and epilepsy*. Academic Press 153-159.
84. Putnam TJ, Merritt HH (1937). Experimental Determination of the Anticonvulsant Properties of Some Phenyl Derivatives. *Science* 85(2213): 525–526.
85. Reid CA, Berkovic SF, Petrou S (2009). Mechanisms of human inherited epilepsies. *Progress in Neurobiology* 87(1): 41-57.
86. Dedeurwaerdere S, Van Raay L, Morris MJ, Reed RC, Hogan RE, O'Brien TJ (2011). Fluctuating and constant valproate administration gives equivalent seizure control in rats with genetic and acquired epilepsy. *Seizure* 20(1): 72–79.
87. Hunt RF, Scheff SW, Smith BN (2009). Posttraumatic epilepsy after controlled cortical impact injury in mice. *Experimental Neurology* 215(2): 243-252.

88. Antoniadis A, Müller WE, Wollert U (1980). Inhibition of GABA and benzodiazepine receptor binding by penicillins. *Neuroscience Letters* 18(3): 309–312.
89. Wu Y, Liu D, Song Z (2015). Neuronal networks and energy bursts in epilepsy. *Neuroscience* 287: 175-186.
90. Walker AE (1945). Convulsive Factor in Commercial Penicillin. *Archives of Surgery* 50(2): 69-73
91. Sugimoto M, Fukami S, Kayakiri H, Yamazaki S, Matsuoka N, Uchida I, Mashimo T (2002). The β -lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of action at GABAA receptors. *British journal of pharmacology* 135(2): 427-432.
92. De Boer Th, Stoof JC, van Duijn H (1982). The effects of convulsant and anticonvulsant drugs on the release of radiolabeled GABA, glutamate, noradrenaline, serotonin and acetylcholine from rat cortical slices. *Brain Research* 253(1-2): 153–160.
93. Förstermann U, Sessa WC (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 33(7): 829-837.
94. Mungrue IN, Bredt DS, Stewart D.J, Husain M (2003). From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?. *Acta Physiologica Scandinavica* 179(2): 123-135.
95. Martínez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S (2011). Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free radical biology and medicine* 51(1): 17-29.
96. Toda N, Ayajiki K, Okamura T (2009). Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Hypertension* 27(10): 1929–1940.
97. Brown GC (2010). Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23(3): 153-165.
98. Mülsch A, Busse R, Mordvintcev PI, Vanin AF, Nielsen EO, Scheel-Krüger J, Olesen SP (1994). Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *Neuroreport* 5(17): 2325-2328.
99. De Sarro G, Di Paola ED, De Sarro A, Vidal MJ (1993). L-Arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep prepiriform cortex. *European journal of pharmacology* 230(2): 151-158.

100. Maggio R, Fumagalli F, Donati E, Barbier P, Racagni G, Corsini GU, Riva M (1995). Inhibition of nitric oxide synthase dramatically potentiates seizures induced by kainic acid and pilocarpine in rats. *Brain Research* 679(1): 184–187.
101. Bagetta G, Iannone M, Palma E, Rodinò P, Granato T, Nisticò G (1995). Lack of Involvement of Nitric Oxide in the Mechanisms of Seizures and Hippocampal Damage Produced by Kainate and Ouabain in Rats. *Neurodegeneration* 4(1): 43–49.
102. Kato N, Sato S, Yokoyama H, Kayama T, Yoshimura T (2005). Sequential changes of nitric oxide levels in the temporal lobes of kainic acid-treated mice following application of nitric oxide synthase inhibitors and phenobarbital. *Epilepsy Research* 65(1-2): 81–91.
103. Gupta RC, Dettbarn WD (2003). Prevention of kainic acid seizures-induced changes in levels of nitric oxide and high-energy phosphates by 7-nitroindazole in rat brain regions. *Brain Research* 981(1-2): 184–192.
104. Winyard PG, Moody CJ, Jacob C (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends in Biochemical Sciences* 30(8): 453–461.
105. Grosso S, Longini M, Rodriguez A, Proietti F, Piccini B, Balestri P, Buonocore G (2011). Oxidative stress in children affected by epileptic encephalopathies. *Journal of the neurological sciences* 300(1-2): 103-106.
106. Angelova PR, Esteras N, Abramov AY (2021). Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Medicinal Research Reviews* 41(2): 770-784
107. Menon B, Ramalingam K, Kumar RV (2014). Low plasma antioxidant status in patients with epilepsy and the role of antiepileptic drugs on oxidative stress. *Annals of Indian Academy of Neurology* 17(4): 398–404.
108. Dingledine R, Gjerstad L (1980). Reduced inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. *The Journal of Physiology* 305(1): 297–313.
109. Cifá D, Skrt M, Pittia P, Di Mattia C, Poklar Ulrih N (2018). Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition* 6(4): 1128–1137.
110. Otero DM, Oliveira FM, Lorini A, Antunes B da F, Oliveira RM, Zambiazzi RC (2020). Oleuropein: Methods for extraction, purifying and applying. *Revista Ceres* 67: 315-329.

111. Zun-Qiu W, Gui-Zhou Y, Qing-Ping Z, You-Jun J, Kai-Yu T, Hua-Ping C, Ze-Shen Y, Qian-Ming H (2015). Purification, dynamic changes and antioxidant activities of oleuropein in olive (*Olea Europaea* L.) leaves. *Journal of Food Biochemistry* 39(5): 566-574.
112. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry* 34(3): 497–500.
113. Aebi H (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* Academic press 105: 121-126.
114. Uchiyama M, Mihara M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86(1): 271–278.
115. Paglia DE, Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 70(1): 158-169.
116. Bradford M (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248–254.
117. Manford M (2017). Recent advances in epilepsy. *Journal of Neurology* 264(8): 1811–1824.
118. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet* 393(10172): 689-701
119. Grone BP, Baraban SC (2015). Animal models in epilepsy research: Legacies and new directions. *Nature Neuroscience* 18(3): 339-343.
120. Arslan G, Avci B, Kocacan SE, Rzayev E, Ayyildiz M, Agar E (2019). The interaction between P2X7Rs and T-type calcium ion channels in penicillin-induced epileptiform activity. *Neuropharmacology* 149: 1–12.
121. Aygun H, Arslan G, Sen E, Ayyildiz M, Agar E (2020). Hemopressin increases penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Bratislava Medical Journal* 121(1): 37–42.
122. Wanleenuwat P, Suntharampillai N, Iwanowski P (2020). Antibiotic-induced epileptic seizures: mechanisms of action and clinical considerations. *Seizure* 81: 167-174.
123. Schmidt D, Schachter SC (2014). Drug treatment of epilepsy in adults. *Bmj* 348.
124. Kurul S, Gülmez Ö, Nörolojisi Ç, Dalı B (2007). Nöroproteksiyon ve Nöron Koruyucu Ajanlar. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 21(2): 119-129.

125. Elgebaly HA, Mosa NM, Allach M, El-massry KF, El-Ghorab AH, Al Hroob AM, Mahmoud AM (2018). Olive oil and leaf extract prevent fluoxetine-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 98: 446–453.
126. Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, Hrelia S (2017). Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences* 18(11): 2230.
127. Santini SJ, Porcu C, Tarantino G, Amicarelli F, Balsano C (2020). Oleuropein overrides liver damage in steatotic mice. *Journal of Functional Foods* 65: 103756.
128. Esmailidehaj M, Bajoovand S, Rezvani ME, Sherifidehaj M, Hafezimoghadam Z, Hafizibarjin Z (2016). Effect of oleuropein on myocardial dysfunction and oxidative stress induced by ischemic-reperfusion injury in isolated rat heart. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* 7(4): 224–230.
129. Ivanov M, Vajic UJ, Mihailovic-Stanojevic N, Miloradovic Z, Jovovic D, Grujic-Milanovic J, Karanovic D, Dekanski D (2018). Highly potent antioxidant *Olea europaea* l. Leaf extract affects carotid and renal haemodynamics in experimental hypertension: The role of oleuropein. *EXCLI Journal* 17: 29–44.
130. Benlarbi M, Jemai H, Hajri K, Mbarek S, Amri E, Jebbari M, Hammoun I, Baccouche B, Boudhrioua Mihoubi N, Zemmal A, et al. (2022). Neuroprotective effects of oleuropein on retina photoreceptors cells primary culture and olive leaf extract and oleuropein inhibitory effects on aldose reductase in a diabetic model: *Meriones shawi*. *Archives of Physiology and Biochemistry* 128(3): 593–600.
131. Hosseini PS, Rafieirad M, Esmaeili S (2019). The effect of oleuropein on working and passive avoidance memory in the pentylenetetrazole-induced seizure animal model. *J Bas Res Med Sci* 6(1): 41-48.
132. Mohamud MH (2021). Effects of resveratrol and nitric oxide interaction on penicillin induced epileptiform activity.
133. Hrnčić D, Rašić – Marković A, Šutulović N, Grubač Ž, Vorkapić M, Macut Đ, Šušić V, Đurić D, Stanojlović O (2015). Modulation of no signaling pathways in an experimental model of epilepsy: Focus on ictal EEG. *Clinical Neurophysiology* 126(9): e180-e181.
134. Aslan A, Yildirim M, Ayyildiz M, Güven A, Agar E (2010). Interaction of leptin and nitric oxide pathway on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain Research* 1321: 117–124.

135. Per S, Tasdemir A, Yildirim M, Ayyildiz M, Ayyildiz N, Agar E (2013). The involvement of iNOS activity in the anticonvulsant effect of grape seed extract on the penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Acta Physiologica Hungarica* 100(2): 224–236.
136. Paul V, Ekambaram P (2003). Effect of 7-Nitroindazole alone and in combination with Phenobarbitone and Diazepam on Picrotoxin-Induced Convulsions in Rats. *Indian journal of physiology and pharmacology* 47: 400-406.
137. Aslan A, Yildirim M, Ayyildiz M, Güven A, Agar E (2009). The role of nitric oxide in the inhibitory effect of ghrelin against penicillin-induced epileptiform activity in rat. *Neuropeptides* 43(4): 295–302.
138. Zhu W, Su J, Liu J, Jiang C (2015). The involvement of neuronal nitric oxide synthase in the anti-epileptic action of curcumin on pentylenetetrazol-kindled rats. *Bio-Medical Materials and Engineering* 26(s1): S841-S850.
139. Adabi Mohazab R, Javadi-Paydar M, Delfan B, Dehpour AR (2012). Possible involvement of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway in the anticonvulsant effect of acute pioglitazone on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Epilepsy Research* 101(1-2): 28–35.
140. Pourshadi N, Rahimi N, Ghasemi M, Faghir-Ghanesefat H, Sharifzadeh M, Dehpour AR (2020). Anticonvulsant Effects of Thalidomide on Pentylenetetrazole-Induced Seizure in Mice: A Role for Opioidergic and Nitrergic Transmissions. *Epilepsy Research* 164: 106362.
141. Armstead WM, Mirro R, Leffler CW, Busija DW (1989). Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism Cerebral Superoxide Anion Generation during Seizures in Newborn Pigs. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 9(2): 175-179.
142. Méndez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Juárez-Rebollar D, Rodríguez-Martínez E, Yescas Gómez P (2014). Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014(1): 293689.
143. Ferdinandusse S, Waterham HR, Jr Heales S, Brown GK, Hargreaves IP, Taanman J-W, Gunny R, Abulhoul L, Wanders RJ, Clayton PT, et al. (2013). HIBCH mutations can cause Leigh-like disease with combined deficiency of multiple mitochondrial respiratory chain enzymes and pyruvate dehydrogenase. *Orphanet journal of rare diseases* 8: 1-11.

144. Kovac S, Kostova ATD, Herrmann AM, Melzer N, Meuth SG, Gorji A (2017). Metabolic and homeostatic changes in seizures and acquired epilepsy—mitochondria, calcium dynamics and reactive oxygen species. *International Journal of Molecular Sciences* 18(9): 1935.
145. Ryan K, Liang LP, Rivard C, Patel M (2014). Temporal and spatial increase of reactive nitrogen species in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* 64: 8–15.
146. Rowley S, Patel M (2013). Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radical Biology and Medicine* 62: 121-131.
147. Osmanlioğlu HÖ, Yıldırım MK, Akyuva Y, Yıldızhan K, Nazıroğlu M (2020). Morphine induces apoptosis, inflammation, and mitochondrial oxidative stress via activation of TRPM2 channel and nitric oxide signaling pathways in the hippocampus. *Molecular Neurobiology* 57(8): 3376-3389.
148. Shibani F, Sahamsizadeh A, Fatemi I, Allahtavakoli M, Hasanshahi J, Rahmani M, Azin M, Hassanipour M, Mozafari N, Kaeidi A (2019). Effect of oleuropein on morphine-induced hippocampus neurotoxicity and memory impairments in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 392: 1383–1391.
149. Wang M, Ramasamy VS, Kang HK, Jo J (2020). Oleuropein promotes hippocampal LTP via intracellular calcium mobilization and Ca²⁺-permeable AMPA receptor surface recruitment. *Neuropharmacology* 176: 108196.
150. Kucukgul A, Isgor MM, Duzguner V, Atabay MN, Kucukgul A (2019). Antioxidant Effects of Oleuropein on Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Stress- An In Vitro Study. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 19(1): 74–84.
151. Khalatbary AR, Ghaffari E, Mohammadnegad B (2015). Protective role of oleuropein against acute deltamethrin-induced neurotoxicity in rat brain. *Iranian Biomedical Journal* 19(4): 247–253.
152. Lee B, Shim I, Lee H, Hahm DH (2018). Effect of oleuropein on cognitive deficits and changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and cytokine expression in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Journal of Natural Medicines* 72: 44–56.
153. Reddy A, Dubey AK, Handu S, Sharma P, Mediratta P, Ahmed Q, Jain S (2018). Anticonvulsant and Antioxidant Effects of *Musa sapientum* Stem Extract on Acute

and Chronic Experimental Models of Epilepsy. *Pharmacognosy Research* 10(1): 49–54.

154. Pedre LL, Gallardo JM, Chacón LMM, García AV, Flores-Mendoza M, Neri-Gómez T, Díaz BE, Cruz-Xenes RM, Fuentes NP, Orozco-Suárez S (2018). Oxidative stress in patients with drug resistant partial complex seizure. *Behavioral Sciences* 8(6): 59.
155. Yiş U, Seçkin E, Kurul SH, Kuralay F, Dirik E (2009). Effects of epilepsy and valproic acid on oxidant status in children with idiopathic epilepsy. *Epilepsy Research* 84(2-3): 232–237.
156. Verrotti A, Basciani F, Trotta D, Pomilio MP, Morgese G, Chiarelli F (2002). 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 Research* 48(1-2): 71-75.
157. Demir S, Orallar H, Kayacan Y, Beyazcicek E, Cetinkaya A (2018). The effects of treadmill exercise on oxidative stress in Mongolian gerbils with penicillin-induced epilepsy. *Experimental Biomedical Research* 1(1): 10–16.
158. Güneş S, Dirik E, Yiş U, Seçkin E, Kuralay F, Köse S, Ünalp A (2009). Oxidant Status in Children After Febrile Seizures. *Pediatric Neurology* 40(1): 47–49.
159. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology* 7(1): 31–40.
160. Vezzani A, Granata T (2005). Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. *Epilepsia* 46(11): 1724–1743.
161. Fabene PF, Bramanti P, Constantin G (2010). The emerging role for chemokines in epilepsy. *Journal of Neuroimmunology* 224(1-2): 22–27.
162. Fierstra J, Conklin J, Krings T, Slessarev M, Han JS, Fisher JA, terBrugge K, Wallace MC, Tymianski M, Mikulis DJ (2011). Impaired peri-nidal cerebrovascular reserve in seizure patients with brain arteriovenous malformations. *Brain* 134(1): 100–109.
163. Kuki I, Inoue T, Fukuoka M, Nukui M, Okuno H, Amo K, Otsuka Y, Ishikawa J, Rinka H, Ujira A, et al. (2024). Efficacy and safety of ketamine for pediatric and adolescent super-refractory status epilepticus and the effect of cerebral inflammatory conditions. *Journal of the Neurological Sciences* 459: 122950.



EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Oğuzer Usta
Uyruğu : Türkiye
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (İngilizce)	2015
Lise	Trabzon Yomra Fen Lisesi	2009

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Arş. Gör. Dr.	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2016-2016
2. Arş. Gör. Dr.	Rize Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi	2017-2019
3. Uzm. Dr.	Bozcayır Aile Sağlığı Merkezi	2019-2021
4. Dr. Öğr. Üyesi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2021-

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Aile Hekimliği

YAYINLAR

1. Ardiç C, Usta O, Omar E, Yıldız C (2019). The effect of antibiotic use within the first year of life on 3-year childhood obesity. *Ankara Medical Journal* 18(3): 505–512.
2. Ardic C, Usta O, Omar E, Yıldız C, Memis E (2019). Effects of infant feeding practices and maternal characteristics on early childhood obesity. *Archivos Argentinos de Pediatría* 117(1): 26–33.
3. Ardic C, Usta O, Omar E, Yıldız C, Memis E (2021). Cesarean delivery increases the risk of overweight or obesity in 2-year-old children. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 41(3): 374–379.
4. Ardic C, Usta O, Omar E, Yıldız C, Memis E, Zeren Öztürk G (2019). Relationship between anaemia during pregnancy and preterm delivery. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 39(7): 903–906.
5. Ardic C, Zeren Ozturk G, Usta O (2018). The Relationship between the Situation of Being Exposed to Violence and the Burnout in Security Guards Working in the Hospital. *Konuralp Tıp Dergisi* 10(2): 153–159.
6. Ardiç C, Şahin A, Yazan Arslan A, Telatar TG, Memiş E, Yıldız C, Omar E, Uzun S, Adanur H, Topak A, Karakullukçu S, Kara M, Usta O (2020). Changes in Early Childhood Obesity from 2016 to 2019 and Effective Factors. *Konuralp Tıp Dergisi* 12(3): 435–442.
7. Usta O, Ardic C (2020). Effect of Obesity on Cognitive Functions in Elderly People. *Eurasian Journal of Family Medicine* 9(1): 1–8.
8. Usta O, Ardiç C, Telatar TG (2020). Evaluation Of Obesity At Second And Third Age In Premature Children. *Ankara Medical Journal* 20(3): 567–577.
9. Bilginer MC, Tüfekçi D, Günay YE, Usta O, Coşkun H, Üçüncü O, ... & Koçak M (2022). Evaluation of insulin resistance measurement methods in patients with polycystic ovary syndrome. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi* 6(1): 24-31

BİLDİRİLER

1. 2016- 2017 Eğitim Öğretim Yılında Rize İlinde Yapılan Öğrenci-Öğretmen Sağlık Kontrolü Sonuçları (2017)
2. Obezite ve Hiperinsülineminin Bilişsel Fonksiyonlar Üzerindeki etkisi (2018)
3. Preterm Doğum ve İlişkili Faktörler (2018)
4. Hastanede Çalışan Güvenlik Görevlilerinde Şiddete Uğrama ve Tükenmişliğin İlişkisi (2017)
5. Bir Üniversite Hastanesinde Görev Yapan Araştırma Görevlisi Hekimlerin Farmakovijilans Hakkında Bilgi, Tutum, Davranışlarının ve Eğitimin Etkisinin Değerlendirmesi (2023)
6. Evaluation of Hypertension Patients Applying to the Family Medicine Outpatient Clinic with SCORE-2 (2024)
7. Kadına Şiddet (2018)
8. Rize İlindeki 2010-2016 Yılları Arasındaki Yenidoğan Topuk Kanı Testi Sonuçları (2017)
9. Rize İlinde 2016-2017 Yılları Arasında Meme Kanseri Tarama Sonuçlarının Değerlendirilmesi (2018)
10. Trabzon İli Ortahisar İlçesi 91 nolu Aile Hekimliği Birimine Kayıtlı 65 yaş ve Üzeri Hastalarda Kronik Hastalık Sıklığı (2019)
11. Preterm Doğan Çocuklarda 36. Ay Persentil Eğrilerinin Değerlendirilmesi (2019)
12. Bilgi Toplumu (2018)
13. 2019 Yılında Aile Sağlığı Biriminde Takip Edilen Gebelerde Risk Analizi (2020)
14. Sadece Anne Sütü Alma Süresinin Çocukluk Çağı Kilo Fazlalığı yada Obezitesi Üzerine Etkisi - 3 Yıllık Prospektif Kohort Çalışması (2018)
15. Relationship Between Anaemia During Pregnancy and Preterm Delivery (2018)
16. The Effect Of Antibiotic Use Within First Year Of Life On 3-Year Childhood Obesity (2019)
17. Kumadin Kullanan Evde Sağlık Hastalarında İnır Düzeylerinin Değerlendirilmesi (2018)

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Türkiye Aile Hekimliği Vakfı (TAHEV) en iyi Aile Hekimliği tez ödülü yarışması 2.lık ödülü
2. Uluslararası kongre sözlü bildiri 3.lük ödülü: 7. Uluslararası Karadeniz Aile Hekimliği Kongresi, 11-14 Ekim 2018, Trabzon
3. Uluslararası kongre sözlü bildiri 3.lük ödülü: 18th International Eastern Mediterranean Family Medicine Congress 25 – 28 April, 2019 – Adana Divan Hotel, Turkey
4. Uluslararası kongre poster bildiri 1.lık ödülü: 8. Uluslararası Karadeniz Aile Hekimliği Kongresi KAHEKON, 10-13 Ekim 2019
5. Uluslararası kongre poster bildiri 3.lük ödülü: 3. Uluslararası Acil Tıp ve Aile Hekimliği Sempozyumu, 29 Kasım – 2 Aralık 2018, Kıbrıs
6. Uluslararası kongre poster bildiri 3.lük ödülü: 17th International Eastern Mediterranean Family Medicine Congress 10 – 13 May 2018, Adana Sheraton Grand Hotel
7. Uluslararası kongre poster bildiri 3.lük ödülü: 6. Uluslararası Karadeniz Aile Hekimliği Kongresi, 14-17 Eylül 2017, Bakü / Azerbaycan