

# Pentilentetrazol ile İndüklenen Kindlingin Matür ve İmmatür Sıçan Davranışları, Emosyonel Öğrenme, Beyin ve Serum Nitrik Oksit Seviyesine Etkisi



Dr. Mehmet Fatih GÖL

## Effects of Pentylene tetrazol-Induced Kindling on Mature and Immature Rat Behavior, Emotional Learning, and Nitric Oxide Level in Brain and Serum

✉ Mehmet Fatih GÖL, ✉ Füsün Ferda ERDOĞAN, ✉ Derya Deniz KANAN,  
✉ Murat KANBUR, ✉ Asuman GÖLGEİ, ✉ Ahmet ÖZTÜRK

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>2</sup>Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Niğde

<sup>3</sup>Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü, Kayseri

<sup>4</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>5</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Kayseri

### Özet

**Amaç:** Pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen kindling işlemini takiben, emosyonel hafıza-öğrenme ve davranışsal fonksiyonları ve bu fonksiyonların matür ve immatür sıçanların serum ve beyindeki nitrik oksit (NO) seviyeleri ile ilişkisi araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Otuz altı erkek Wistar albino sıçan çalışmaya alındı. Kindling gelişinceye kadar birbirini izleyen günlerde, subkonvülsif bir PTZ (30 mg/kg) dozunun tekrar tekrar enjekte edilmesiyle kindling modeli oluşturuldu. Sıçanlar, PTZ kindlinginden sonra yükseltilmiş bir T-labirent testi ve açık alan testi kullanılarak değerlendirildi. Beyin ve serum NO düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** Hem matür hem de immatür sıçanlar PTZ kaynaklı nöbetlere duyarlı olsalar da, matür sıçanlar immatür sıçanlara (infantlar dışında) göre daha uzun süren nöbet geçirdi. PTZ-kindlingin emosyonel bellek ve öğrenme işlevleri üzerinde herhangi bir etkisi görülmedi. Anksiyete düzeyleri matür deney grubundaki sıçanlarda düşük olarak izlenirken, immatür deney grubundaki sıçanlarda yüksek olarak izlendi. Matür sıçanlarda anksiyete reaksiyonları normalin altında olup, beyindeki NO düzeyleri yüksek olarak saptandı. Bununla birlikte, immatür sıçanlarda anksiyete reaksiyonları yüksekti, ancak NO seviyeleri normal olarak izlendi.

**Sonuç:** Nöbet duyarlılığı, emosyonel yanıtlar ve bu faktörler ile PTZ-kindling sonrası beyin NO düzeyleri arasındaki ilişki beyin matürasyon durumuna göre farklılık göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Davranış; emosyonel bellek-öğrenme; nitrik oksit; pentilentetrazol kindling.

### Summary

**Objectives:** This aim of this study was to investigate emotional memory-learning and behavioral functions, as well as the relationship between these functions and the nitric oxide (NO) level in the serum and brain of mature and immature rats following pentylene tetrazol (PTZ)-induced kindling.

**Methods:** A total of 36 male Wistar albino rats were included in the study. Kindling was induced by repeated injections of a subconvulsive dose of PTZ (30 mg/kg) on alternate days until kindling development. The rats were tested using an elevated T-maze and an open-field test after PTZ kindling. Brain and serum NO levels were assessed.

**Results:** Although both mature and immature rats were susceptible to PTZ-induced seizures, the mature rats had seizures of longer duration than the immature rats, with the exception of infants. There was no demonstrated effect of PTZ-kindling on emotional memory and learning functions in any of the rats. Anxiety levels were low in the mature-kindled rats but were high in the immature-kindled rats. NO levels in the brain were elevated and anxiety reactions were below normal in the mature rats. In immature rats, however, NO levels were normal, but anxiety reactions were elevated.

**Conclusion:** Seizure susceptibility, emotional responses, and the relationship between these factors and brain NO level after PTZ-kindling differed in rats based on brain maturity status.

Keywords: Behavior; emotional memory-learning; nitric oxide; pentylene tetrazol kindling.

**Geliş (Submitted):** 25.12.2017

**Kabul (Accepted):** 04.06.2018

**İletişim (Correspondence):** Dr. Mehmet Fatih GÖL

**e-posta (e-mail):** m-fatih-gol@hotmail.com



## Giriş

Epilepsiler, çeşitli beyin bölgelerindeki nöronların artmış eksitabilitesinden kaynaklanan kompleks nörodavranışsal bozukluklardır. Epilepsi hastalarında bilişsel ve davranışsal bozukluklar genel popülasyondan daha sık izlenir. Nöbetlerin tipi, etiolojisi ve başlangıç yaşı epilepsi hastalarında bellek, öğrenme ve davranış problemlerini etkileyen önemli biyolojik faktörlerdir.<sup>[1]</sup> Epilepsi gelişimi, uyarlanabilir bir süreçtir ve hayvan çalışmalarında kindling fenomeni kullanarak oluşturulabilir.<sup>[2]</sup> Kindling elektriksel ya da kimyasal uyarıların konvulziyon yapmayacak şiddette tekrarlayan uygulanması ile konvulziyon aktivitesinde progresif artış ile sonuçlanan bir durumdur. Hayvan kindling modelleri, epilepsi ile ilişkili değişiklikleri araştırmamıza olanak sağlar ve pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen kindling jeneralize epilepsi modelini temsil eder.<sup>[3]</sup> PTZ ile yapılan kimyasal kindling, kognitif bozuklukların, emosyonel davranış değişikliklerinin ve epileptik süreçlerle ilişkili nöronal değişikliklerin araştırılmasına olanak sağlar.<sup>[4,5]</sup>

NO (Nitrik oksit), nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arjinin amino asidinden sentezlenir. Serbest radikal bir gaz olan NO, hem nöronal haberci hem de beyinde nörotransmitterlerin modülatörü olarak işlev görür.<sup>[6,7]</sup> NO, sinaptik plastisite, uzun süreli potansiyelizasyon, uzun süreli depresyon, dopamin gibi nörotransmitterlerin alımı ve salınımının düzenlenmesi, nosisepsiyon, öğrenme ve hafıza, nöbet aktivitesi, beslenme ve madde bağımlılığı gibi birçok beyin fonksiyonunda rol oynamaktadır.<sup>[8]</sup>

NO'nun, NO ile ilişkili kimyasal maddelere ve uyarıcılara bağlı olarak epileptogenezde bir antikonvülzan ve bir prokonvülzan görevi gördüğü bildirilmiştir.<sup>[8]</sup> Nöronal NOS tarafından üretilen NO'nun kindling gelişiminde önemli bir rol oynadığını, nöbetlerde rol oynamadığını gösterilmiştir. Ancak epileptik nöbetlerin NO üretiminde anlamlı bir artışa neden olabileceği belirtilmiştir ve bu nöbetle indüklenen nörogenezin güçlenmesi ile ilişkili olabilir.<sup>[9]</sup> NO, ayrıca kognitif fonksiyonlarla da ilişkilidir ve NO'nun hayvanlarda öğrenme ve hafızada yer aldığını gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır.<sup>[10]</sup> NO'nun bazı nörodavranışsal etkileri belgelenmiştir ve öğrenme (spasyal, koklama, motor ve kaçınma) ve hafıza sürecinde düzenleyici etkileri olduğu bildirilmiştir.<sup>[11,12]</sup> NO sentezi, öğrenme için motivasyon kaynağı olarak uyarıcı (elektrik çarpması ya da açık ve yükseltilmiş alanlar) kullanan deneysel paradigmalardaki korku ve öğrenmenin temelini oluşturabilir. Bu nedenle, korku ile motive edilmiş öğ-

renme örnekleri, NO sentezinin kemirgenlerde emosyonel öğrenmede önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.<sup>[13]</sup>

Bu çalışmanın amacı, jeneralize epilepsinin deneysel bir hayvan modelini temsil eden PTZ'ye bağlı kindling sonrası matür ve immatür sıçanlarda emosyonel hafıza-öğrenme ve davranışsal fonksiyonları ile serum ve beyindeki NO düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

## Gereç ve Yöntem

Üniversite Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi'nden elde edilen, erkek Wistar albino türü toplam 36 sıçan çalışmaya dahil edildi. 185–285 gr ağırlığında 18 matür sıçan (103 günlük) ve 20–25 gr ağırlığında 18 immatür sıçan (16 günlük) olmak üzere iki gruba ayrıldı. On matür ve 10 immatür sıçan kontrol grupları olarak, sekiz matür ve sekiz immatür sıçanda deney grupları olarak belirlendi. Tüm prosedürler, üniversitenin yerel etik komitesi tarafından onaylandı. Hayvanlar dörtlü veya beşli gruplar halinde ve 12 saat aydınlık-karanlık periyodunun olduğu bir döngüde, yiyecek ve su kısıtlaması olmadan, 22–24 °C'de sessiz bir odada barındırıldı. Tüm deneyler sabah 10 ile 12 arasında gerçekleştirildi. Deney grubu sıçanlara serum fizyolojik (SF) solüsyonunda çözünen 30 mg/kg PTZ (Sigma, ABD) intraperitoneal (İP), kontrol grubu sıçanlara aynı hacimde fizyolojik SF İP olarak verildi. Sıçanlara her gün saat 10'da olmak üzere toplam olarak 14 enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyondan hemen sonra nöbet aktivitesi, mat bir tabana sahip, saydam bir pleksiglas kutu içinde 30 dakika boyunca izlendi ve her bir nöbet evresinin toplam süresi kaydedildi. Kindling periyodu boyunca en az üç ardışık tonik-klonik nöbet varsa, hayvanlar tam kindling kabul edildi. PTZ-kindling enjeksiyondan on gün sonra, deney grubundaki sıçanlara, artmış konvülsan duyarlılığının devamını kontrol etmek için son bir kez daha PTZ (30 mg/kg) verildi. Kontrol grubundaki sıçanlara aynı hacimde SF enjeksiyonu yapıldı.

Otuz dakikalık gözlem boyunca nöbet yoğunluğu şu şekilde skorlandı: Evre 0, yanıt yok; Evre 1, kulak ve yüzde seğirme; Evre 2, vücuda yayılan konvulzif seğirme; Evre 3, miyoklonik jerkler ya da arka ayaklar üzerinde şahlanma; 4. evre, sıçanın yan pozisyonda düşmesi ile birlikte vahşi koşu ve vahşi sıçrama; ve evre 5, jeneralize tonik-klonik veya ölümcül nöbetler.<sup>[8]</sup>

Deney ve kontrol gruplarına açık alan ve yükseltilmiş T-labirent testleri, son PTZ enjeksiyonu ve SF enjeksiyonundan iki gün sonra gerçekleştirildi.

### Açık Alan Testi

Kare şeklinde 100x100 cm ölçütlerinde tabanı ve 30 cm yüksekliğinde plastik kenarları olan, üzeri açık, tabanı 16 eşit kareye bölünmüş açık alanda sıçanlar bir köşeden bırakılır ve bu açık alanda serbestçe dolaşmalarına izin verilir. Sıçanın lokomotor aktivite seviyesi beş dakikalık zaman süresince geçtiği kare sayısı ile araştırma aktivitesi ise arka ayaklarında şahlanarak etrafı inceleme (rearing) sayısı ölçülerek değerlendirilir. Korku seviyesini değerlendirmek için beş dakika içerisinde bu alan içerisinde yaptığı defekasyon sayısı ölçülür.<sup>[14]</sup> Açık alan aparatı, önceki sıçanların bıraktığı koku olası işaretleme etkilerini önlemek için bir sonraki hayvanı koymadan önce alkol ile temizlenir.<sup>[15]</sup>

Araştırmanın başında alanın ortasına üç küçük nesne (kalem kapağı, şişe kapağı ve anahtar) yerleştirildi. Sıçanlar, açık alanın bir köşesinden sırayla bırakıldı ve sıçanların alanı, nesnelere serbestçe keşfetmelerine izin verildi. Geçilen karelerin toplam sayısı, yeni nesnelere araştırılması için harcanan zaman (diğer bir deyişle, nesnelere 1 cm etrafında harcanan zaman), arka ayakları üzerinde şahlanarak etrafı inceleme hareketinin(rearing) sayısı ve defekasyon sayısı ölçüldü.<sup>[14]</sup>

Emosyonel aktivite azaldığında, sıçanın lokomotor yanıtı ve araştırma aktivitesi artarken defekasyon sayısı azalır. Anksiyete varlığında yani emosyonel aktivitenin arttığı durumlarda bunların tam tersi gerçekleşir.<sup>[16,17]</sup>

### Yükseltilmiş T-labirent testi

Yükseltilmiş T-labirenti, 50x12 cm ölçüsünde ve zeminden 50 cm yükseltilmiş üç plastik koldan oluşur. Bu kollardan birisi plastik yan duvarlarla (40 cm yükseklik) çevrelenmiştir ve diğer iki açık kola dik olarak yerleştirilmiştir. Sıçan kapatılan kolun ucuna konulduğunda, kapalı kolun diğer ucuna gidip başını çıkarana kadar açık kolları göremez. Kapalı koldan çıkması için geçen süre kaydedilir (baseline latansı). Hayvan daha sonra labirentten çıkarılır ve aynı test iki kez daha (30 saniyelik aralıklarla) yapılır; hayvan dışarı çıkmazsa 300 saniyelik bir süre boyunca beklenir (inhibitör sakınma 1 ve 2). Bu tekrarlar sıçanın labirent araştırmasına olanak sağlar ve inhibitör sakınma davranışını öğrenmesine izin verir. İnhibitör sakınma, beklentisel anksiyete ile ilişkilidir ve koşullu davranışa örnektir. Sıçanlar, bu öngörülebilir endişe nedeniyle inaktif olmayı öğrenir; bu koşullandırılmış davranışa pasif kaçınma(inhibitör sakınma) denir. Bu üç denemeden 30 saniye sonra sıçan sağdaki açık kolun sonuna yerleştirilir ve böylece sıçan kapalı kola doğru hareket eder (tek yönlü ka-

çış, kaçmayı öğrenme). Sıçanın açık koldan çıkıp kapalı kola girmesi için geçen zaman, kaçma latansı olarak adlandırılır.<sup>[18]</sup> Sıçanlar yükseklik ve açık alanda bulunmaktan doğaları gereği hoşlanmazlar. Açık kolda bulunmaları korku reaksiyonuna neden olmaktadır. Bu doğuştan gelen korkudan dolayı sıçanlar, açık kolda tek yönlü bir kaçış gerçekleştirir; aktif davranışları öğrenir ve sergilerler. Sıçanı belli bir süre sonra aynı duruma tekrar maruz bırakmak, bu emosyonla ilişkili davranışların hafızasını değerlendirir.<sup>[18]</sup>

### NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ölçümleri

Sıçanlar, davranış testlerinden beş gün sonra ketamin hidroklorid (50 mg/kg)/xylazine hidroklorid (10 mg/kg) ile derin anesteziye alındı. 2 cc intrakardiyak olarak kan geri çekildi ve perfüzyon işlemi sonrası beyin çıkarıldı. Bu basamakları takiben beyin ve serum NO düzeyleri belirlendi.

Plazma ve beyin NO (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) konsantrasyonları Griess reaksiyonu kullanılarak belirlendi.<sup>[19]</sup> İlk olarak numuneler, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarını NO<sub>2</sub><sup>-</sup> iyonlarına dönüştürmek için bir reaksiyon karışımı (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD) ve nitrat redüktaz) ile inkübe edildi. Sonrasında Griess reaktifi numunelere ilave edildi ve 10 dakika inkübe edildi. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> absorbansı spektrofotometrik olarak 540 nm'de ölçüldü. Numunelerdeki toplam NO konsantrasyonları bir sodyum nitrit kalibrasyon eğrisinden hesaplandı.

### İstatistiksel analiz

Tüm veri setleri bir Shapiro-Wilk testi kullanılarak normallik testlerine tabi tutuldu ve veriler ortalama ± standart sapma (SS) (normal dağılımlı veriler için) veya %25–75 persentil ile medyan olarak (çarpık veriler için) rapor edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırma, Mann-Whitney U-testi ve tek yönlü varyans analizi (Tukey'nin çoklu karşılaştırma prosedürü) kullanıldı. P<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler, SPSS 15.0 (Statistical analyses were performed by the Statistical Package for the Social Sciences version 15.0, Chicago, IL, ABD) programı ile değerlendirildi.

### Bulgular

Pentilentetrazol enjeksiyonlarından sonra gözlemlenen nöbetlerin toplam süresi Tablo 1'de gösterilmektedir. İmmatür sıçanlarda ilk üç enjeksiyonun ardından nöbet süreleri anlamlı derecede uzadı. Matür sıçanlarda ise nöbetlerin süreleri, dördüncü enjeksiyondan sonra istatistiksel olarak an-

**Tablo 1.** PTZ-kindling işlemi sırasında her bir enjeksiyondan (toplam 15) sonra nöbetlerin toplam süresi (saniye olarak)

Gruplar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)	Median (Min-Maks)
İmmatür sıçan	890 120-1980	857 420-1320	1030 0-1320	0 0-60	100 0-160	0 0-1460	900 720-1500	480 0-1016	484 244-910	0 0-655	0 0-340	240 0-5020	955 0-2545	1089 0-2160	699 424-1816
Matür sıçan	0 0-190	350 90-1050	600 180-1200	0.00 0.00-130	975 0-3780	630 0-3000	521 0-1284	1200 720-1200	900 600-1200	780 240-2000	520 150-1996	1320 280-2110	1870 240-3770	1456 160-3000	915 406-2140
P	<0.05	0.004	0.01	0.208	0.003	0.021	0.057	<0.05	0.003	<0.05	<0.05	0.012	0.042	0.648	0.976

Nöbetlerin toplam süresi (saniye olarak) tüm nöbet evrelerinin toplam süresini ifade etmektedir. \*PTZ doz sayısını göstermektedir. PTZ: Pentilentetrazol; Min: Minimum; Maks: Maksimum.

lamalı olacak şekilde daha uzundu. İlk iki enjeksiyonu takiben, 16-20 günlük (bebeklik dönemi ve erken çocukluk dönemi) immatür sıçanlarda, 2., 3. ve 4. evre nöbetler matür sıçanlara göre daha sıklıkla; ancak üçüncü enjeksiyon sonrasında, matür sıçanlarda bu nöbetler daha sık olarak izlendi. Altıncı enjeksiyondan sonra evre 5 nöbetler matür sıçanlarda, immatür sıçanlara göre daha sıklıkla. Enjeksiyondan sonra mortalite, immatür sıçan kontrol grubunda %20, immatür deney grubunda %38.8 olarak izlenirken matür sıçan kontrol grubunda %10 ve matür deney grubunda %38.8 olarak izlendi.

Açık alan testinde, matür PTZ-kindling sıçanlarda rearing (şahlanma) sayısı, matür kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p < 0.019$ ) ve defekasyon sayısı, immatür PTZ-kindling sıçanlarda immatür kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek olarak izlendi ( $p < 0.008$ ). Açık alan testiyle ilgili bulgular Tablo 2 ile Tablo 3'de gösterilmektedir.

Yükseltilmiş T-labirent testinde matür, immatür deney ve kontrol gruplarında sakinme 1 ve 2 süresi, başlangıç süresi (baseline latans), kaçma süresi (kaçma latansı) benzer olarak saptandı ( $p > 0.05$ ).

Serum NO düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi, ancak matür epileptik sıçanlarda beyin NO düzeyleri, matür kontrol grubundaki ve immatür deney grubundaki sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı (Tablo 4).

## Tartışma

Bu çalışmada, matür ve immatür sıçanlarda PTZ ile indüklenen kindling, davranış değişiklikleri ve serum ve beyindeki NO düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi.

Bulgularımız PTZ kaynaklı nöbet eşiklerinin yaşla değiştiğini göstermektedir. Çalışmamızdaki immatür sıçanlar, insanlarda bebeklik dönemine karşılık gelen bir evre olan 14-20 günlüktür,<sup>[20]</sup> immatür sıçanlarda nöbet eşiği daha düşüktür ve bu nedenle nöbetler, erişkin bireylerden daha kolay gerçekleşir. Bununla birlikte, bu bebeklik evresi hariç, matür sıçanların PTZ kaynaklı nöbetlere duyarlılığı, immatür sıçanlara göre daha yüksektir. Postnatal ilk 15-17. güne kadar nöbete yatkınlıkları yüksek ve tedaviye duyarlılıkları yüksektir. Ancak immatür beyinlerin olgun beyinlere göre epileptogeneze karşı daha hassas olduğunu göstermiştir.

<sup>[21]</sup> Bulgularımız literatür ile uyumludur.

**Tablo 2.** İmmatür deney ve kontrol grubundaki açık alan parametrelerinin karşılaştırılması

	İmmatür kontrol	İmmatür kindling	p
	Median (25P–75P)	Median (25P–75P)	
Şahlanma sayısı	29.00 (26.00–39.50)	27.50 (26.00–33.00)	0.573
Geçilen kare sayısı	26.00 (17.00–35.00)	33.50 (25.25–37.50)	0.274
Defekasyon sayısı*	0.00 (0.00–1.00)	3.00 (1.00–5.00)	0.004
Merkezde geçirilen süre	0.00 (0.00–1.00)	0.00 (0.00–0.00)	0.965

\*Gruplar arasında defekasyon sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

**Tablo 3.** Matür deney ve kontrol gruplarındaki açık alan parametrelerinin karşılaştırılması

	Matür kontrol	Matür kindling	p
	Median (25P–75P)	Median (25P–75P)	
Şahlanma sayısı*	14.00 (8.00-18.75)	23.00 (19.75-36.25)	0.010
Geçilen kare sayısı	20.00 (10.00-34.00)	40.00 (18.50-51.50)	0.082
Defekasyon sayısı	3.00 (0.75-4.25)	1.00 (0.00-2.25)	0.164
Merkezde geçirilen süre	0.00 (0.00-1.25)	1.00 (0.00-2.00)	0.431

\*Gruplar arasında şahlanma sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

**Tablo 4.** Beyin ve serum NO düzeylerinin karşılaştırmaları

	İmmatür kontrol	İmmatür kindling	Matür kontrol	Matür kindling	p
	Ortalama±SS	Ortalama±SS	Ortalama±SS	Ortalama±SS	
NO-beyin (nmol/mg)	42.62±1.38 <sup>ac</sup>	41.91±1.65 <sup>a</sup>	41.88±1.18 <sup>a</sup>	45.14±3.36 <sup>bc</sup>	0.004
NO-serum (nmol/mL)	50.75±7.95	54.37±13.90	54.33±12.87	59.72±14.90	0.478

Gruplar arasındaki farklılıklar farklı harflerle etiketlenmiştir. Çoklu karşılaştırma testi 'Tukey' sonucuna göre alfabetik üst simgelerinden en az biri aynı olan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır. Beyin NO düzeyleri nmol/mg, serum NO düzeyleri nmol/mL ile ifade edilmiştir. NO: Nitrik oksit; SS: Standart sapma.

a: İmmatür kindling ile immatür kontrol ve matür kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

bc: Matür kindling ile matür kontrol ve immatür kindling arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

ac: İmmatür kontrol ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

Araştırmacılar, immatür sıçan grubunda tekrarlayan PTZ enjeksiyonlarıyla konvulzif etkinliğin şiddetlenmediğini saptamışlardır. Çalışmamızda, immatür deney grubundaki nöbet yoğunluğu, matür sıçan grubuna göre azda olsa artmış olarak izlendi. Çalışmamızda, her enjeksiyon için 30 mg/kg PTZ kullanırken, Kudryashov ve ark.nın<sup>[21]</sup> (2007) çalışmasında 25 mg/kg PTZ kullanıldı. Sonuçlardaki farklılık, kullanılan PTZ miktarındaki farklılığa bağlı olabilir. Holmes ve ark.<sup>[22]</sup> (2005) postnatal erken ontogenez sırasında sıçan yavrularında konvulziyonlara duyarlılığın arttığını göstermiştir.

Çalışmamızda, PTZ-kindlingi takiben, duygusal öğrenmede ve hafızada herhangi bir değişiklik izlenmedi. Mao ve ark.<sup>[23]</sup> (2009) PTZ ile indüklenen kısa süreli konvulzif nöbetlerin,

korku belleğinin konsolidasyonunu etkilemediğini ancak korku belleğini zayıflattığını göstermişlerdir. Literatürde PTZ-kindlingin emosyonel bellek ve öğrenme üzerine etkileri hakkında bilgilerimiz yetersizdir. Bulgularımız PTZ-kindlingin hem matür hem de immatür sıçanlarda emosyonel bellek ve öğrenme işlevleri üzerine etkisi olmadığını göstermektedir.

Sıçanlarda, PTZ kaynaklı nöbetler davranış değişikliklerine neden olabilir, ancak özellikle immatür sıçanlarda PTZ-kindling sonrasında emosyonel davranış değişiklikleriyle ilgili sınırlı veri bulunmaktadır. PTZ-kindling'in anksiyete semptomlarına neden olduğu gösterilmiştir.<sup>[24]</sup> Bir çalışmada, PTZ ile indüklenen kindling sonrası olgun sıçanlarda saldırganlık,

kaygı ve depresyon semptomlarının ortaya çıktığı göstermiştir.<sup>[14]</sup> Başka bir çalışmada, PTZ-kindling sonrası depresyon benzeri yorumlanabilecek uzun vadeli emosyonel davranış değişikliklerinin eşlik edebileceği, ancak immatür sıçanlar hakkında yeterli veri olmadığı belirtilmiştir.<sup>[5]</sup> Çalışmamızda, açık alan testinde rearing sayısı matür deney grubundaki sıçanlarda matür kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek ( $p < 0.019$ ) saptandı ve defekasyon sayısı immatür deney grubundaki sıçanlarda immatür kontrol grubundaki sıçanlardan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0.008$ ). Bu bulgular, matür grubun emosyonel reaktivitesinin azaldığını gösterirken, immatür grubun emosyonel reaktivitesinin arttığını göstermektedir. Bulgularımız, PTZ ile indüklenen kindling sonrası duygusal işlevler üzerindeki etkilenmenin immatür ve matür beyinde farklı olduğunu göstermiştir. Mortazavi ve ark.nın<sup>[14]</sup> (2005) yaptığı bir çalışmada, olgun sıçanlarda PTZ-kindling ardından emosyonel aktivitenin arttığı gösterilmiştir; bizim çalışmamız emosyonel reaktivitenin azaldığını gösterdi. Bu farklı sonuçlar, sıçan türlerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

NO, merkezi sinir sistemi kan akışının modülasyonuna ve eksitotoksik kaskad aracılığı ardından gelen nöronal hasarın oluşumunda rol oynar ve epileptik nöbetlerin birkaç moleküler mekanizmasıyla ilişkilendirilmiştir.<sup>[25]</sup> NO, PTZ ile indüklenen kindling gelişmesinde rol oynar.<sup>[8]</sup> Itoh ve ark.<sup>[26]</sup> (2009) NO'nun PTZ kaynaklı nöbet duyarlılığının pozitif ve negatif regülasyonuna katıldığını göstermiştir; bu nedenle, epileptogenezdeki NO rolü çelişkilidir. Çalışmamız, NO'nun prokonvulzan veya antikonvulzan olup olmadığı sorusuna bir cevap vermedi. Verilerimiz, matür ve immatür PTZ ile indüklenen kindling sıçanlarda serum NO düzeylerinin farklı olmadığını, ancak beyin NO düzeylerinin matür deney sıçan grubunda immatür deney ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu gösterdi. Bu verilere göre, PTZ ile indüklenen kindling beyin matür seviyesine bağlı olarak farklı etkilere yol açmaktadır.

NO, öğrenme ve hafıza biçimlerinde önemli rol oynar. Bununla birlikte, NO'nun öğrenme ve hafıza süreçleri boyunca hangi mekanizmalarda ve nasıl rol oynadığı tam olarak anlaşılammıştır.<sup>[26]</sup> NO, öğrenmenin temelinde rol alıyor olabilir, ancak yükseltilmiş T-labirent ile değerlendirebileceğimiz doğuştan gelen korku ile öğrenmede rol oynamaz.<sup>[27]</sup> Çalışmamızda, PTZ ile indüklenen kindling sonrası matür ve immatür sıçan beyinlerinde NO düzeyleri farklı olmakla birlikte, yükseltilmiş T-labirent testinde matür, immatür de-

ney ve kontrol gruplarında doğuştan gelen ve öğrenilmiş korku performanslarında fark bulunmamıştır. Bu veriler, PTZ ile indüklenen kindlingin matür beyindeki NO düzeylerini etkilediğini, ancak matür sıçanda doğuştan veya öğrenilen korkuyu etkilemediğini göstermektedir; bu nedenle, doğuştan gelen ve öğrenilen korku, PTZ ile indüklenen kindling işleminden sonra sadece NO'ya bağlı mekanizmalardan etkilenmeyebilir diğer mekanizmalarda araştırılmalıdır.

NO'nun bazı nörodavranışsal etkileri belgelenmiştir ve NO anksiyete ile ilişkilendirilmiştir.<sup>[28,29]</sup> Literatürde, NO'nun merkezi sinir sisteminde bir endojen anti-stres faktörü/adaptöjen gibi davranabileceğini ve NO-erjik mekanizmaların stres kaynaklı nörodavranışsal etkilerde önemli bir modülatör rol oynayabileceğini gösterilmiştir.<sup>[11]</sup> Çalışmamızda, matür grupta beyin NO düzeyleri artarken emosyonel reaktivite azalmış olarak izlendi. İmmatür grupta ise emosyonel reaktivite artmış olarak izlendi ve PTZ ile indüklenen kindling sonrası beyin NO düzeyleri immatür kontrol grubundan farklı değildi. Bu veriler, matür sıçanlarda beyindeki artmış NO düzeylerinin düşük anksiyete veya stres seviyeleri ile ilişkili olduğunu, ancak immatür sıçanlarda bu mekanizmanın çalışmadığını ve emosyonel reaktivitenin ve stres düzeyinin yüksek olduğunu göstermektedir.

ER (endoplazmik retikulum) stresi, normal ER yapısının ve işlevinin bozulduğu bir durumdur. ER stresinin, epilepsiyi de içeren çeşitli nörolojik hastalıklarda rol aldığı öne sürülmüştür. Bununla birlikte, ER stresine epilepsinin spesifik katkısı büyük ölçüde kaçınılmazdır ve ER stresinin epileptik beyinde nörodejenerasyonda önemli rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>[30]</sup>

Zhu ve ark.<sup>[31]</sup> (2017) nöronal NOS, PTZ-kindling ile indüklenen epilepside ER stresini ve oksidatif hasarı tetikleyen bir sinyal molekülü olarak tanımlanmaya çalışmış, nöronal NOS'un hipokampal ER stresini ve oksidatif hasarı tetiklemek için reaktif azot türlerinin önemli bir üyesi olan peroksinitrit yoluyla etki ettiğini göstermişlerdir. Kronik epilepsinin neden olduğu ER stres ve oksidatif hasar için özel bir mekanizma ve kronik epilepsi hastalarında potansiyel bir terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir. Zhu ve ark.nın<sup>[32]</sup> (2016) yaptığı diğer bir çalışmada, PTZ-kindling farelerin hipokampusunda, nöronal NOS ekspresyonunun ve bunun enzimatik aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamız ER stresi ile epilepsi bağlantısını desteklemektedir.

Özetle, PTZ-kindling prosedürü esnasında, nöbet duyarlılığı bebeklik ve yetişkinlikte yüksektir ve PTZ-kindlingin, matür



ve immatür sıçanlarda emosyonel hafıza ve öğrenme işlevleri üzerinde etkisi yoktur. Buna ek olarak, emosyonel reaksiyonlar ve beyin NO düzeyleri matür ve immatür sıçanlarda farklıdır. PTZ ile indüklenen kindling işleminden sonra beyindeki NO seviyeleri artar ve matür sıçanlarda anksiyete reaksiyonları normalin altında olur. İmmatür sıçanlarda, NO seviyeleri normaldir ancak kaygı reaksiyonları artar. Emosyonel cevabın tipi ve beyin NO düzeyleri arasındaki ilişki ile nöbet duyarlılığı, PTZ ile indüklenen kindling işlemi sırasında beyin matürasyonuna bağlı olarak farklılık göstermektedir.

### Etik Komite Onayı

Etik kurul onayı alındı.

### Hakem Değerlendirmesi

Dış bağımsız.

### Çıkar Çatışması

Yoktur.

### Yazarlık Katkıları

Konsept: F.F.E., A.G., M.K.; Dizayn: F.F.E., A.G., D.D.K., A.Ö.; Veri Toplama veya İşleme: M.F.G., D.D.K., A.Ö.; Analiz ve Yorumlama: M.F.G., F.F.E., D.D.K., A.Ö.; Literatür Arama: M.F.G., F.F.E.; Yazan: M.F.G., F.F.E.

### Kaynaklar

1. Erdoğan F. The effects of Status Epilepticus on the memory, learning and behaviors. In: Takahashi K, editor. Epilepsy research progress. New York: Nova Science Publishers; 2008. p. 1–22.
2. Rauca C, Wiswedel I, Zerbe R, Keilhoff G, Krug M. The role of superoxide dismutase and alpha-tocopherol in the development of seizures and kindling induced by pentylene-tetrazol - influence of the radical scavenger alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. Brain Res 2004;1009(1-2):203–12. [CrossRef]
3. Rossi J 3rd. Sensitization induced by kindling and kindling-related phenomena as a model for multiple chemical sensitivity. Toxicology 1996;111(1-3):87–100. [CrossRef]
4. Pavlova T, Stepanichev M, Gulyaeva N. Pentylene-tetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. Neurosci Lett 2006;392(1-2):154–8. [CrossRef]
5. Franke H, Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylene-tetrazol-kindled rats. Pharmacol Biochem Behav 2001;70(2-3):291–303. [CrossRef]
6. Diler AS, Üzüm G, Dar KA, Aksu U, Atukeren P, Ziyilan YZ. Sex differences in modulating blood brain barrier permeability by NO in pentylene-tetrazol-induced epileptic seizures. Life Sci 2007;80(14):1274–81. [CrossRef]
7. Ray A, Chakraborti A, Gulati K. Current trends in nitric oxide research. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France) 2006;53(1):3–14.
8. Han D, Yamada K, Senzaki K, Xiong H, Nawa H, Nabeshima T. Involvement of nitric oxide in pentylene-tetrazole-induced kindling in rats. J Neurochem 2000;74(2):792–8. [CrossRef]
9. Yahyavi-Firouz-Abadi N, Tahsili-Fahadan P, Riazi K, Ghahremani MH, Dehpour AR. Involvement of nitric oxide pathway in the acute anticonvulsant effect of melatonin in mice. Epilepsy Res 2006;68(2):103–13. [CrossRef]
10. Kanit L, Koylu E, Yazarbas G, Furedy JJ, Pogun S. The effect of nitric oxide synthase inhibition on cognitive ability and strategies employed for place learning in the water maze: sex differences. Brain Res Bull 2003;62(2):151–9. [CrossRef]
11. Masood A, Banerjee B, Vijayan V, Ray A. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. Eur J Pharmacol 2003;458(1):135–9. [CrossRef]
12. Kendrick KM, Guevara-Guzman R, Zorrilla J, Hinton MR, Broad KD, Mimmack M, et al. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. Nature 1997;388(6643):670–4. [CrossRef]
13. Da Cunha IC, José RF, Orlandi Pereira L, Pimenta JA, Oliveira de Souza IA, Reiser R, et al. The role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus-maze. Physiol Behav 2005;84(3):351–8. [CrossRef]
14. Mortazavi F, Ericson M, Story D, Hulce VD, Dunbar GL. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylene-tetrazole-kindled rats. Epilepsy Behav 2005;7(4):629–38. [CrossRef]
15. Phillips KM. Effects of time and administration of ethanol on open field behavior in hamsters. Physiol Behav 1982;29(5):785–7.
16. Barone FC, Barton ME, White RF, Legos JJ, Kikkawa H, Shimamura M, et al. Inhibition of phosphodiesterase type 4 decreases stress-induced defecation in rats and mice. Pharmacology 2007;81(1):11–7. [CrossRef]
17. Mehan AO, Moran PM, Elliott MJ, Young AM, Joseph MH, Green RA. A study of the effect of a single neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy") on the subsequent long-term behaviour of rats in the plus maze and open field. Psychopharmacology (Berl) 2002;159(2):167–75. [CrossRef]
18. Conde CA, Costa V, Tomaz C. Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. Pharmacol Biochem Behav 1999;63(1):63–9. [CrossRef]
19. Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. J Pharmacol Exp Ther 1995;272(3):1011–5.
20. Cilio MR, Sogawa Y, Cha BH, Liu X, Huang LT, Holmes GL. Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model. Epilepsia 2003;44(4):518–28. [CrossRef]
21. Kudryashov I, Pavlova T, Kudryashova I, Egorova L, Gulyaeva N. Kindling in the early postnatal period: Effects on the dynamics of age-related changes in electrophysiological characteristics of hippocampal neurons. Neurosci Behav Physiol 2007;37(8):765–72. [CrossRef]
22. Holmes GL. Effects of seizures on brain development: lessons

- from the laboratory. *Pediatr Neurol* 2005;33(1):1–11. [\[CrossRef\]](#)
23. Mao RR, Tian M, Yang YX, Zhou QX, Xu L, Cao J. Effects of pentylenetetrazol-induced brief convulsive seizures on spatial memory and fear memory. *Epilepsy Behav* 2009;15(4):441–4.
  24. Lamberty Y, Klitgaard H. Consequences of pentylenetetrazole kindling on spatial memory and emotional responding in the rat. *Epilepsy Behav* 2000;1(4):256–61. [\[CrossRef\]](#)
  25. Theard MA, Baughman VL, Wang Q, Pelligrino DA, Albrecht RF. The role of nitric oxide in modulating brain activity and blood flow during seizure. *Neuroreport* 1995;6(6):921–4. [\[CrossRef\]](#)
  26. Itoh K, Watanabe M. Paradoxical facilitation of pentylenetetrazole-induced convulsion susceptibility in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* 2009;159(2):735–43.
  27. Harooni HE, Naghdi N, Sepehri H, Rohani AH. The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short- and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats. *Behav Brain Res* 2009;201(1):166–72. [\[CrossRef\]](#)
  28. Calixto A, Duarte F, Moraes C, Faria M, De Lima T. Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. *Behav Brain Res* 2008;189(2):341–9. [\[CrossRef\]](#)
  29. Bouladakis A, Georgiadou G, Pitsikas N. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on different memory components as assessed in the object recognition task in the rat. *Behav Brain Res* 2010;207(1):208–14. [\[CrossRef\]](#)
  30. Ko AR, Kim J, Hyun HW, Kim JE. Endoplasmic reticulum (ER) stress protein responses in relation to spatio-temporal dynamics of astroglial responses to status epilepticus in rats. *Neuroscience* 2015;307:199–214. [\[CrossRef\]](#)
  31. Zhu X, Dong J, Han B, Huang R, Zhang A, Xia Z, et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to PTZ kindling epilepsy-induced hippocampal endoplasmic reticulum stress and oxidative damage. *Front Cell Neurosci* 2017;11:377. [\[CrossRef\]](#)
  32. Zhu X, Dong J, Shen K, Bai Y, Chao J, Yao H. Neuronal nitric oxide synthase contributes to pentylenetetrazole-kindling-induced hippocampal neurogenesis. *Brain Res Bull* 2016;121:138–47.