

Investigation of the Effects of MK-801 on Oxidative Stress, Inflammation and Ghrelin Levels in Brain Tissue in Convulsions Caused by Scopolamine Administration and Feeding in Starving Mice

Mehmet Berkoz (Corresponding author)
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Van Yuzuncu Yil University,
Zeve Campus, 65090 Tusba, Van, Turkey
E-mail: mehmet_berkoz@yahoo.com

Yakup Akkus
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Van Yuzuncu Yil University,
Zeve Campus, 65090 Tusba, Van, Turkey
E-mail: eczanemeryem@gmail.com

Oruc Yunusoglu
Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine,
Bolu Abant Izzet Baysal University, Golkoy Campus, 14030 Bolu, Turkey
E-mail: orucfarm@yahoo.com

This research was supported by Van Yuzuncu Yil University Scientific Research Projects Coordinator ship as project number TYL-2019-7854.

Abstract

In this study, the effect of MK-801, one of the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists, on convulsions that occurred in mice that were given scopolamine and then fed experimentally after 48 hours of fasting was investigated. In our study, 36 Balb/C adult male mice weighing 25-30 g were used. Mice were randomly selected and divided into 6 groups. These are control, scopolamine (3 mg/kg/*i.p.*), low dose MK-801 (0.17 mg/kg/*i.p.*), high dose MK-801 (0.51 mg/kg/*i.p.*), scopolamine + low dose MK-801 and scopolamine+ high dose MK-801 groups. After the injections, the animals in all groups were taken to the monitoring cages and fed 20 minutes after the injections. Convulsion onset times and severity of animals in all groups were measured. At the end of the follow-up period, animals in all groups, including the control group, were sacrificed under anesthesia with ketamine (50 g/kg/*i.p.*) and xylazine (10 mg/kg/*i.p.*), their blood was drawn and brain tissues were isolated. Blood ghrelin levels of all animals and some oxidative stress and inflammation markers and ghrelin levels in brain tissue were measured. Analysis of the study was done using SPSS v16.0 statistical program. The statistical significance level was taken as $p < 0.05$ in the calculations. It was observed that scopolamine administration caused a decrease in catalase and superoxide dismutase activities and ghrelin levels, and increased protein oxidation and inflammatory response. MK-801 treatment has been found to both delay the incidence of convulsions and suppress oxidative stress and inflammation ($p < 0.05$). We think that these effects of MK-801 are due to the increased ghrelin level, as the application of MK-801 also causes an increase in the level of ghrelin.

Keywords: Convulsion, Scopolamine, MK-801, Oxidative Stress, Ghrelin

DOI: 10.7176/JSTR/7-10-01

Aç Farelere Skopolamin Uygulanması ve Yem Verilmesi ile Oluşan Konvülsiyonlarda MK-801'in Beyin Dokusundaki Oksidatif Stres, İnflamasyon ve Ghrelin Düzeylerine Etkilerinin Araştırılması

Bu araştırma Van Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TYL-2019-7854 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Özet

Bu çalışmada deneysel olarak 48 saat aç bırakıldıktan sonra skopolamin uygulanıp ardından yem verilen farelerde meydana gelen konvülsiyonlarda, nonkompetitif N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistlerinden MK-801'in etkisi incelendi. Çalışmamızda 36 adet, 25-30 gr ağırlığında Balb/C cinsi erişkin erkek fare kullanıldı. Fareler rastgele seçilerek 6 gruba ayrıldı. Bunlar kontrol, skopolamin (3 mg/kg/i.p.), düşük doz MK-801 (0,17 mg/kg/i.p.), yüksek doz MK-801 (0,51 mg/kg/i.p.), skopolamin+ düşük doz MK-801 ve skopolamin+ yüksek doz MK-801 gruplarıydı. Hayvanlara enjeksiyonlar yapıldıktan sonra tüm gruplardaki hayvanlar izleme kafeslerine alındı ve enjeksiyonlardan 20 dakika sonra yem verildi. Tüm gruplardaki hayvanların konvülsiyon başlama süreleri ve şiddetleri ölçüldü. İzleme süresinin sonunda ketamin (50 g/kg/i.p.) ve ksilazin (10 mg/kg/i.p.) anestesizi altında kontrol grubu dahil tüm gruplardaki hayvanlar sakrifiye edilerek kanları alındı ve beyin dokuları izole edildi. Tüm hayvanların kan ghrelin düzeyleri, beyin dokusunda ise bazı oksidatif stres ve enflamasyon belirteçleri ile ghrelin düzeyleri ölçüldü. Çalışmanın analizi SPSS v16.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alındı. Skopolamin uygulamasının katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde ve ghrelin seviyelerinde düşüşe neden olduğu, protein oksidasyonunda ve enflamatuvar yanıtta artışa yol açtığı görülmüştür. MK-801 tedavisi ise hem konvülsiyonların görülme sıklığını geciktirdiği hem de oksidatif stresi ve enflamasyonu baskıladığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). MK-801 uygulamasının aynı zamanda ghrelin seviyesinde de artışa neden olması MK-801'in bu etkilerinin artan ghrelin seviyesi sayesinde gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Konvülsiyon, Skopolamin, MK-801, Oksidatif Stres, Ghrelin

1. Giriş

Epilepsi hastalığı, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından serebral nöronların aşırı deşarjına bağlı olarak ortaya çıkan ani ve tekrarlayıcı nöbetlerle karakterize, farklı sebepler ile meydana gelebilen kronik beyin hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Epilepsi nöbeti ise beyindeki bir grup nöronun ani, geçici veya kısa süreli, anormal deşarjı sonucu ortaya çıkan duyuşsal, motor, otonom ve psişik belirtilerle şekillenen bir semptomdur (Ghit ve ark., 2021). Her yaşta görülebilen epilepsi ile ilgili son zamanlarda yapılan bir araştırmaya göre, Dünya genelinde 70 milyon kişinin epilepsi hastası olduğu ve bunların neredeyse %90'ının gelişmekte olan ülkelerde olduğu tespit edilmiştir (Singh ve Trevick, 2016). Yapılan çeşitli çalışmalarda hastaların yalnızca %25-30'unda epilepsi etiyojisi saptanabilmektedir. İnme, genetik yatkınlık, çeşitli enfeksiyonlar, travmatik beyin hasarı, serebrovasküler hastalıklar, yüksek ateş gibi durumlar epilepsinin bilinen nedenleri olarak gösterilmektedir (Werhahn, 2009; Ba-Diop ve ark., 2014).

Epileptik nöbet ile konvülsiyon kimi zaman eş anlamlı olarak kullanılmakta olup merkezi sinir sisteminin (MSS) ani, aşırı ve paroksizmal uyarılmasına konvülsiyon denilmektedir (Fischer, 1989). Bazı çalışmalarda 48 saat ve daha kısa süre aç bırakılan fare ve sıçanlara skopolamin, atropin veya biperiden gibi antimuskariniklerin/antikolinergiklerin uygulanması ve ardından yem verilmesinin konvülsiyonlara neden olduğu görülmüştür (Enginar ve ark., 2003; Enginar ve ark., 2005; Enginar ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda nöbetlerin oluşmasında açlık sonrası yeniden yemenin ve skopolamin uygulamasının önemli rol oynadığı saptanmıştır. Antikolinergik bir ilaç olan skopolamin uygulamasının kolinerjik konvülsiyonları önlediği bilindiğinden dolayı bu bulgular oldukça ilgi çekici özellik taşımaktadır. Konvülsiyon oluşmasının skopolamine özgü olmadığı, diğer antikolinergik ilaçlardan olan atropin ve biperiden uygulamalarının da nöbetlere neden olduğu gösterilmiştir (Enginar ve ark., 2003).

Konvülsiyonların oluşumuna yeme davranışının etkisi incelendiğinde sıvı yiyeceklerin değil de, katı yem yemenin ana etken olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan bir çalışma çığneme hareketlerinin konvülsiyonların oluşması üzerine etkili olduğunu göstermektedir (Nurten ve Enginar, 2006). Açlık süresi ile konvülsiyonlar arasındaki ilişki incelendiğinde 6, 18, 24 ve 52 saat süren açlık sonrasında da konvülsiyonların ortaya çıkabildiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar ile sürenin değil, yemden yoksun kalmanın konvülsiyonların meydana gelmesinde ana etken olabileceğini göstermektedir (Enginar ve ark., 2005). Açlık sırasında glukoz verilerek hipogliseminin önlenmesinin konvülsiyonları engellemediği ve 48 saat süren açlığın beyin sinaptik membranlarına glutamat bağlanmasında, yem alımı ve skopolamin uygulanması ile kısmen geriye döndürülebilen değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir (Enginar ve ark., 1997; Enginar ve ark., 2003). Skopolamin uygulanmasından önce nonkompetitif N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistlerinden MK-801'in, dopaminerjik reseptör antagonistlerinden klorpromazin ve haloperidolun, α 2-adrenerjik reseptör agonistlerinden klonidin ve tizanidin'in uygulanması konvülsiyon oluşumunu tamamen önlemiş veya azaltmıştır (Enginar ve ark., 1997; Nurten ve ark., 2009; Enginar ve Nurten, 2010).

MSS'nin önemli nörotransmitterlerden glutamat, epilepsi patogeneğinde önemli bir rol üstlenmekte olup etkisini hem iyonotropik hem de metabotropik glutamat reseptörlerini uyararak gösterir (Büget ve ark., 2016; Özdemir ve Özdemir Güzel, 2016). Glutamerjik sistemin iyonotropik reseptörlerinden olan NMDA reseptörünün nonkompetitif antagonisti olan MK-801'in (Dizosilpin) antikonvülsan etkisinin olduğu gösterilmiştir (Enginar ve ark., 1997).

Yaptığımız çalışmada aç farelere skopolamin uygulanması ve ardından yem verilmesi ile oluşan konvülsiyonlarda MK-801 uygulanması ile konvülsiyonları ne ölçüde baskıladığı veya sonlandırdığı gösterilmeye çalışılmıştır. Ayrıca oluşan konvülsiyonlarda MK-801 tedavisinin oksidatif stres, inflamasyon ve serum ve beyin dokusundaki ghrelin düzeyleri üzerindeki etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Gereç

2.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamız, 27.09.2018 tarih ve 09 karar sayılı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğü'nde gerçekleştirildi. Çalışmamızda 6-8 haftalık Balb/C cinsi, 36 adet erişkin erkek fare (25-30 g) kullanıldı. Fareler, her grup ayrı kafeslerde yer alacak şekilde, özel kafesler içinde bakıldı ve standart fare yemi ile ad libitum olarak beslendi. Fareler 12 saat ışık/karanlık periyodunda ve 18-22°C'de muamele edildi. Fareler uygulama yapılmadan 10 gün önce adaptasyon amacıyla karantina altına alındı. Deney süresince gün aşırı içme suları değiştirildi ve kafes temizliği yapıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hayvanlara Uygulanan Maddelerin Hazırlanması

Deney günü, skopolamin hidroklorid (3 mg/kg) serum fizyolojik (SF) içinde, MK-801 ise (0,17 mg/kg ve 0,51 mg/kg) (Hiramatsu ve ark., 1998) distile su içinde çözülerek hazırlandı.

2.2.2. Hayvan Gruplarının Oluşturulması

Fareler rastgele seçilerek 6 gruba ayrıldı. Grupların kendi içinde homojen olmasına ve gruplardaki farelerin ağırlık toplamalarının yaklaşık aynı değerde olmasına dikkat edilerek gruplar oluşturuldu. Toplam 6 deney grubu şu şekilde oluşturuldu;

Kontrol grubu (n=6): 48 saat süresince aç bırakılan hayvanlara *i.p.* olarak SF enjeksiyonu yapıldı ve hayvanlar izleme kafeslerine alındı. Enjeksiyondan 20 dakika sonra yem verildi.

Skopolamin grubu (n=6): 48 saat süresince aç bırakılan hayvanlara *i.p.* olarak skopolamin enjeksiyonu (3 mg/kg) yapıldı ve hayvanlar izleme kafeslerine alındı. Enjeksiyondan 20 dakika sonra yem verildi (Zengin Türkmen ve ark., 2019).

Düşük doz MK-801 grubu (n=6): 48 saat süresince aç bırakılan hayvanlara *i.p.* olarak MK-801 (0,17 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı ve hayvanlar izleme kafeslerine alındı. Enjeksiyonlardan 20 dakika sonra yem verildi.

Yüksek doz MK-801 grubu (n=6): 48 saat süresince aç bırakılan hayvanlara *i.p.* olarak MK-801 (0,51 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı ve hayvanlar izleme kafeslerine alındı. Enjeksiyonlardan 20 dakika sonra yem verildi.

Skopolamin + Düşük doz MK-801 grubu (n=6): 48 saat süresince aç bırakılan hayvanlara *i.p.* olarak

skopolamin (3 mg/kg) ve MK-801 (0,17 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı ve hayvanlar izleme kafeslerine alındı. Enjeksiyonlardan 20 dakika sonra yem verildi.

Skopolamin + Yüksek doz MK-801 grubu (n=6): 48 saat süresince aç bırakılan hayvanlara *i.p.* olarak skopolamin (3 mg/kg) ve MK-801 (0,51 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı ve hayvanlar izleme kafeslerine alındı. Enjeksiyonlardan 20 dakika sonra yem verildi.

2.2.3. Hayvanların Konvülsiyon Başlama Süresi ve Sıklığı Bakımından Değerlendirilmesi

Tüm gruplardaki hayvanlar yem verildikten sonra 30 dakika boyunca konvülsiyon sıklığı ve konvülsiyon başlama süresi açısından izlendi. Konvülsiyon evreleri 0-5 arasında skor verilerek değerlendirildi. Evre 1 ve üstü konvülsiyon yanıtı olarak kabul edildi. Konvülsiyon evreleri;

Evre 0: Fark yok,

Evre 1: Donma ve çene hareketleri,

Evre 2: Ön ayaklarda klonus,

Evre 3: Şahlanma ile ön ayaklarda klonus,

Evre 4: Şahlanma ile ön ayaklarda klonus ve düşme,

Evre 5: Şahlanma ile jeneralize konvülsiyon, düşme ve sıçrama olarak değerlendirildi (Chen ve ark., 2003).

2.2.4. Hayvanların Anesteziye Alınması, Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Konvülsiyonların değerlendirilmesinden sonra 10 mg/kg/*i.p.* ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 50 mg/kg/*i.p.* ketamin (Ketalor, Eczacıbaşı, Türkiye) anestezisi altında farelerin kardiyak punctum ile kanları alınarak, beyin dokuları çıkartıldı. Alınan kanlar vakit geçirilmeden santrifüj edilerek serumları elde edildi. Çalışma günü serumlar doğrudan veya dilüe edilerek kullanıldı. Beyin dokuları ise önce % 0,9'luk sodyum klorür çözeltisi ile yıkanarak üzerindeki kanların gitmesi sağlandı, daha sonra kurutma kağıdı ile ıslaklığı giderilerek çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.5. Biyokimyasal Analizler

Yaş ağırlıkları 100 mg olarak ayarlanan beyin dokularının üzerine 900 mg fosfat tamponu (1 mmol/L EDTA ve 50 mM potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) (pH: 7.4) içeren) eklendi ve 16000 devir/dakika hızda 3 dakika süre boyunca mekanik homojenizatör yardımıyla homojenize edildi (Dogan ve ark., 2018). Cam tüplere aktarılan doku örnekleri 3.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantta biyokimyasal parametrelere bakıldı.

Beyin dokularında lipid peroksidasyonunun belirteci olarak malondialdehit (MDA) düzeyine (Ohkawa ve ark., 1979), protein oksidasyonunun belirteci olarak protein karbonil düzeyine (Levine ve ark., 1990), antioksidan durumunun belirlenebilmesi için süperoksit dismutaz (SOD) (Sun ve ark., 1988), katalaz (Aebi, 1984), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (Paglia ve Valentine, 1967), paraoksonaz (PON) (Eckerson, 1983) ve arilesteraz (ARE) (Eckerson, 1983) aktiviteleri ile redükte glutatyon (GSH) düzeyine (Beutler ve ark., 1963), enflamatuvar yanıtın gözlenmesi için ise nitric oksit (NOx) (Miranda ve ark., 2001) ve prostaglandin E₂ (PGE₂) düzeylerine bakıldı. Serum ghrelin düzeyi ile beyin dokusu PGE₂ ve ghrelin düzeyleri ELISA kit yardımıyla (Lifespan Biosciences) ve üretici firmanın direktifleri doğrultusunda ölçüldü. Doku protein düzeyleri ise Lowry ve ark.'nın (1951) geliştirdiği yöntem kullanılarak tayin edildi.

2.2.6. İstatistik Analiz

Çalışma sonunda elde edilen gruplara ait tüm veriler SPSS (versiyon 16.0) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirildi. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemede Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Tüm analizlerden elde edilen ham değerler, grupların ortalaması ± standart hata şeklinde sunuldu. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak alındı.

3. Bulgular

3.1. Konvülsiyonların Ortaya Çıkma Süreleri ve Ölüm Oranları

Tüm gruplardaki hayvanların konvülsiyon ortaya çıkma süreleri ve ölüm oranları Tablo 1'de gösterildi. Kontrol, düşük ve yüksek doz MK-801 gruplarında konvülsiyon görülmedi. Skopolamin + Düşük doz MK-801 grubundaki hayvanlarda konvülsiyonların başlama süresi skopolamin grubundakilere kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ($p < 0,05$). Skopolamin + Yüksek doz MK-801 grubunda ise konvülsiyonların başlama süresi skopolamin grubuna kıyasla düşük bulundu ancak bu fark istatistiksel

olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$). Tüm gruptaki hayvanlarda konvülsiyonlar sırasında ölüm gözlenmedi.

Tablo 1. Konvülsiyonların ortaya çıkma süreleri ve ölüm oranı

Gruplar	Konvülsiyonların Ortaya Çıkma Süreleri (sn)	Ölüm Oranları (%)
Kontrol	0	0
Skopolamin	227.17±76.05	0
Düşük doz MK-801	0	0
Yüksek doz MK-801	0	0
Skopolamin + Düşük doz MK-801	442.33±165.74*	0
Skopolamin + Yüksek doz MK-801	197±70.83	0

*Skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

3.2. Konvülsiyonların Evreleri

Tablo 2'de konvülsiyonların evreleri ve her gruptaki konvülsiyon geçiren hayvanların sayıları gösterildi. Kontrol, düşük ve yüksek doz MK-801 gruplarında konvülsiyon görülmediğinden dolayı konvülsiyonların evrelendirilmesi yapılmadı. Skopolamin grubundaki hayvanlarda görülen konvülsiyonlar çoğunlukla şaşlanma ile ön ayaklarda klonus şeklinde görülürken, bir hayvanda şaşlanma ile ön ayaklarda klonus ve düşme, bir hayvanda ise şaşlanma ile jeneralize konvülsiyon, düşme ve sıçrama şeklinde görüldü.

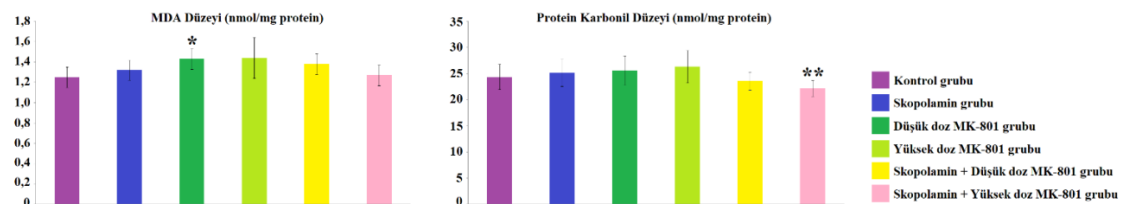
Tablo 2. Konvülsiyon geçiren hayvanların sayıları ve konvülsiyonların evreleri

Gruplar	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4	Evre 5
Kontrol (n=6)	0	0	0	0	0	0
Skopolamin (n=6)	0	0	0	4	1	1
Düşük doz MK-801 (n=6)	0	0	0	0	0	0
Yüksek doz MK-801 (n=6)	0	0	0	0	0	0
Skopolamin + Düşük doz MK-801 (n=6)	0	6	0	0	0	0
Skopolamin + Yüksek doz MK-801 (n=6)	1	5	0	0	0	0

n: gruptaki hayvan sayısı

3.3. Biyokimyasal Analizler

Tüm grupların beyin dokusu MDA ve protein karbonil düzeyleri Şekil 1'de gösterildi. Düşük doz MK-801 grubunun MDA düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Skopolamin ve yüksek doz MK-801 gruplarının ise MDA düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu, ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$). Ayrıca skopolamin + düşük doz MK-801 ve skopolamin + yüksek doz MK-801 gruplarının MDA düzeyleri, skopolamin grubuna kıyasla yüksek bulundu, ancak bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$). Skopolamin + yüksek doz MK-801 grubunun protein karbonil düzeyi skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0,05$). Skopolamin, düşük ve yüksek doz MK-801 gruplarının protein karbonil düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$).



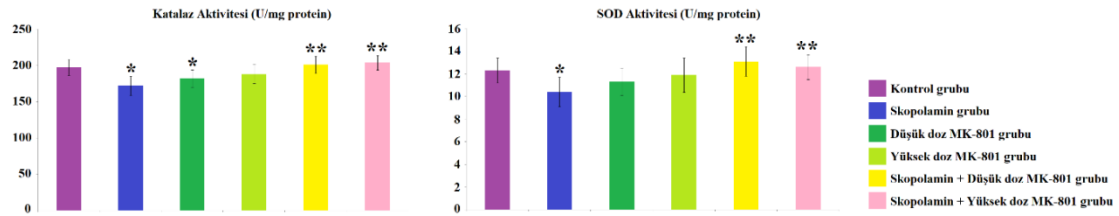
Şekil 1. Beyin dokusu MDA ve protein karbonil düzeyleri

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$)

**Skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$)

(MDA: Malondialdehit)

Tüm grupların beyin dokusu katalaz ve SOD aktiviteleri Şekil 2’de gösterildi. Skopolamin ve düşük doz MK-801 gruplarının katalaz aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Skopolamin + düşük doz MK-801 ve skopolamin + yüksek doz MK-801 gruplarının ise katalaz aktiviteleri, skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Skopolamin grubunun SOD aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Skopolamin + düşük doz MK-801 ve skopolamin + yüksek doz MK-801 gruplarının SOD aktiviteleri, skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Düşük doz MK-801 grubunun SOD aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla düşük bulundu, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0.05$).

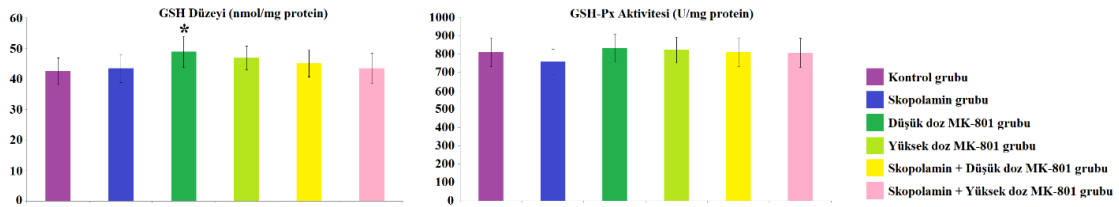


Şekil 2. Beyin dokusu katalaz ve SOD aktiviteleri

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$)

**Skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$)
(SOD: Süperoksit dismutaz)

Tüm grupların beyin dokusu GSH düzeyleri ve GSH-Px aktiviteleri Şekil 3’de gösterildi. Düşük doz MK-801 grubunun GSH düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Yüksek doz MK-801 grubunun ise GSH düzeyi, kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0.05$). Skopolamin grubunun GSH-Px aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla düşük bulundu, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0.05$).

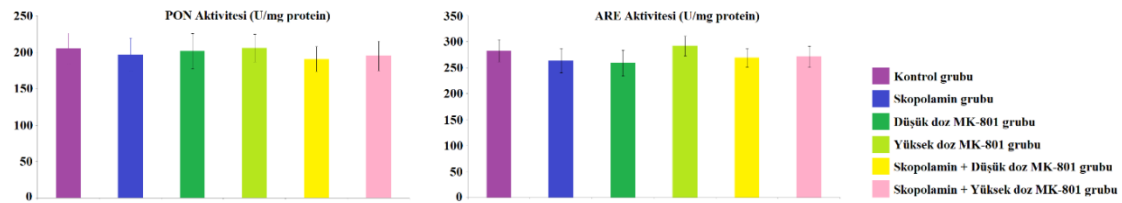


Şekil 3. Beyin dokusu GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesi

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$)

(GSH: Redükte glutatyon, GSH-Px: Glutatyon peroksidaz)

Tüm grupların beyin dokusu PON ve ARE aktiviteleri Şekil 4’te gösterildi. Skopolamin grubunun PON aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla düşük bulundu, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0.05$). Skopolamin ve düşük doz MK-801 gruplarının ARE aktiviteleri, Grup 1’e kıyasla düşük bulundu, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0.05$).

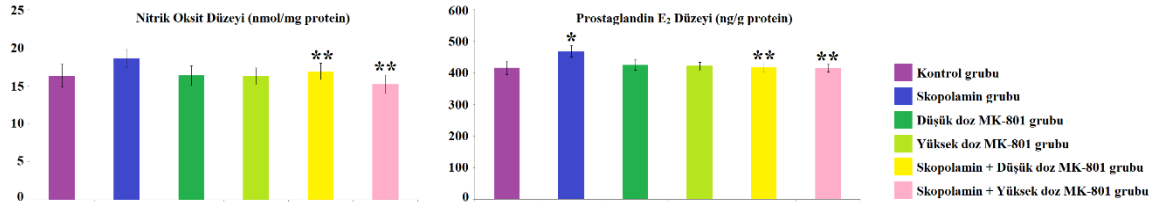


Şekil 4. Beyin dokusu PON ve ARE aktiviteleri

(PON: Paraoksonaz, ARE: Arilesteraz)

Tüm grupların beyin dokusu NOx ve PGE₂ düzeyleri Şekil 5’de gösterildi. Skopolamin + düşük doz MK-801 ve skopolamin + yüksek doz MK-801 gruplarının NOx düzeyi skopolamin grubuna kıyasla

istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Skopolamin grubunun NOx düzeyi ise, kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0.05$). Skopolamin grubunun PGE₂ düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Skopolamin + düşük doz MK-801 ve skopolamin + yüksek doz MK-801 gruplarının PGE₂ düzeyleri ise, skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.05$).



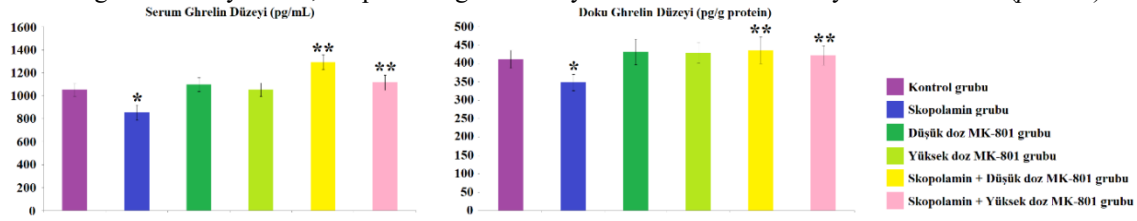
Şekil 5. Beyin dokusu nitrik oksit ve prostaglandin E₂ düzeyleri

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$)

**Skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$)

(NOx: Nitrik oksit, PGE₂: Prostaglandin E₂)

Tüm grupların serum ve doku ghrelin düzeyleri Şekil 6'da gösterildi. Skopolamin grubunun serum ve beyin dokusu ghrelin düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Skopolamin + düşük doz MK-801 ve skopolamin + yüksek doz MK-801 gruplarının serum ve beyin dokusu ghrelin düzeyleri ise, skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$).



Şekil 6. Serum ve beyin dokusu ghrelin düzeyleri

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$)

**Skopolamin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$)

4. Tartışma ve Sonuç

Yapılan bazı araştırmalarda kırk sekiz saat ve daha kısa süre aç bırakılan fare ve sıçanlara skopolamin, atropin veya biperiden gibi antimuskarinik veya antikolinerjik uygulanması ve ardından yem verilmesi ile konvülsiyonların meydana geldiği görülmüştür (Enginar ve ark., 1997; Enginar ve ark., 2003; Enginar ve ark., 2005; Enginar ve Nurten, 2010). Antikolinerjik bir ilaç olan skopolaminin kolinerjik konvülsiyonları önlediği bilindiğinden bu bulgular oldukça ilgi çekicidir (Enginar ve ark., 2003). Çeşitli süre zarflarında aç bırakılıp skopolamin uygulanan ve ardından yemek verilen farelerde konvülsiyonların oluştuğu gözlenmiştir. Bu da açlık süresinin aksine, yem kısıtlamasının konvülsiyon oluşumunda ana etken olduğunu göstermektedir (Enginar ve ark., 2005).

Yaptığımız çalışmada kırk sekiz saat aç bırakıldıktan sonra skopolamin uygulanan ve sonrasında yem verilen hayvanlarda ortaya çıkan konvülsiyonlarda NMDA reseptörünün nonkompetitif antagonisti olan MK-801'in konvülsiyonları ne ölçüde baskıladığı ve/veya sonlandırdığı ve beyin dokusundaki oksidatif stres, enflamasyon ve ghrelin düzeylerine etkileri gösterilmeye çalışılmıştır. Kainik asit ile oluşturulan status epileptikus deneysel modelinde MK-801'in, limbik sistemin bazı bölgeleri hariç diğerlerinde nöroprotektif etkide bulunduğu gösterilmiştir (Kobylarek ve ark., 2019). MK-801'in ayrıca antikolülsan etki oluşturduğu da bilinmektedir (Enginar ve ark., 1997).

Yaptığımız çalışmada kontrol, düşük ve yüksek MK-801 gruplarında konvülsiyonlar görülmemiştir. Skopolamin uygulanmasıyla görülen konvülsiyonların başlama süreleri literatürle benzerlik göstermekteydi (Enginar ve ark., 1997; Enginar ve ark., 2003; Enginar ve ark., 2005; Enginar ve Nurten, 2010). MK-801 tedavisinin skopolamin uygulanan farelerde konvülsiyonların başlama süresini geciktirdiği görülmüştür. Skopolamin grubundaki hayvanlarda yem yemelerine izin verilmeden önce herhangi bir konvülsiyon gözlenmemiştir. Hayvanlar yem yemeye başladıktan belli bir süre sonra konvülsiyonlar görülmüştür. Bu sonuç skopolamin ve yeniden yemek yemenin konvülsiyonları tetiklediğini düşündürmektedir. Skopolamin, atropin ve biperidenin heteroreseptör olarak görev yapan

M1 ve M2 reseptörlerini bloke etmesi dopamin salıverilmesinde azalmaya ve glutamat salıverilmesinde artışa yol açmaktadır. Reseptörlerden ikisinin veya seçici olarak birinin bloke edilmesi sonucunda kolinerjik etkinliğin azalması, asetilkolin salıverilmesinin artışı veya glutamaterjik ve dopaminerjik sistemlerdeki değişiklikler konvülsiyonların oluşumuna yol açabilmektedir (Bacanak, 2019). Uzun süreli açlığın, beyindeki çeşitli reseptörlerin ekspresyonunu veya bağlanma özelliklerini değiştirdiği gösterilmiştir. Kırk sekiz saatlik açlığın glutamaterjik reseptörlerde değişikliklere neden olduğu ve 120 saatlik açlığın ise serebellumdaki GABA reseptörlerini azalttığı bildirilmiştir (Bacanak, 2019). Kırk sekiz saatlik açlık beyinde glutamaterjik reseptörlerde skopolamin ve yem alımı ile kısmen geriye dönebilen bazı değişikliklere yol açtığından, açlık sırasında glutamaterjik sistemde yemden yoksun kalmanın gereksinimlerini karşılama ya da aşırı glutamat salıverilmesi ile başa çıkma şeklinde uyumsal değişikliklerin olabileceği öne sürülmüştür (Enginar ve ark. 2003).

Epilepsi ile ilgili çok yönlü araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, epilepsinin çeşitli türlerinin patogenezi hakkındaki bilgilerin yetersizliği ve bunların altında yatan temel bozukluklar henüz açıkça ortaya konulmamıştır. Ancak tüm epilepsi nöbet tiplerinde artmış eksitabilite söz konusudur. Beyindeki nöronlarda eksitabilite düzeyi eksitator ve inhibitör etkiler arasındaki dengeye bağlıdır. Eksitator etkinliğin artması ya da inhibitör etkinliğin azalması eksitabilitenin artmasına yol açmaktadır. Beyindeki en önemli eksitator nörotransmitter olan glutamatın iyonotropik reseptörlerinden olan NMDA reseptörleri epileptogenezde etkin rol oynamaktadır (Gardoni ve ark., 2021). Ren ve ark. (2016), yüksek glutamat seviyelerinin NMDA reseptörlerini aktive ederek oluşan sinaptik hipereksitabilitenin büyük miktarda Ca^{2+} akışına yol açtığını ve Ca^{2+} miktarının aşırı yüklenmesi sonucunda nöbetlerin tetiklendiğini göstermiştir.

Skopolamin uygulaması sonrasında düşük ve yüksek doz MK-801 verilen farelerde konvülsiyonların donma ve çene hareketleri şeklinde olduğu gözlenmiş ve konvülsiyonların sadece skopolamin verilen farelere göre daha geç bir sürede başladığı görülmüştür. Bu sonuç, MK-801 enjeksiyonunun konvülsiyonları tamamen engellemediğini ancak baskıladığını göstermektedir. Artmış hipereksitabiliteye karşı MK-801'in NMDA reseptörlerini bloke ederek bu etkiyi oluşturması muhtemeldir (Enginar ve ark., 1997; Ren ve ark., 2016).

Birçok deneysel çalışmada, çeşitli epilepsi türlerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) arttığı tespit edilmiştir. Nöbet aktivitelerinden sonra artan oksidatif stres, proteinler, lipitler ve DNA gibi hücrenel makromoleküllerin oksidasyonuna yol açabilmektedir. Bu değişiklikler genel olarak hücresel işlevi zayıflatmakta ve birçok önemli enzimlerin yapısını ve aktivitesini değiştirebilmektedir. ROS ile indüklenen sodyum-potasyum ATPaz'ın yapı ve aktivitesinin değiştirilmesi, nöronal depolarizasyonla indüklenen elektrokimyasal gradyanların etkin bir şekilde ters çevrilmesine yol açarak eksitotoksisteye neden olabilmektedir. Ek olarak, lipid peroksidasyonu, membran geçirgenliğini ve membran proteinlerinin aktivitesini etkileyebilmektedir. Bununla birlikte, nöbetler tarafından indüklenen oksidatif stres, nöronal hipereksitabiliteye yol açabilmektedir. Edinilmiş epilepside, nöbetlerin beyinde aşırı ROS oluşumuna bağlı olarak oksidatif hasara neden olduğu birçok kez gösterilmiştir. Yapılan postmortal incelemelerde, temporal lob epilepside doku oksidatif stres parametrelerinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca hayvan çalışmalarında hipokampustaki proteinlerde, lipitlerde ve mitokondriyal DNA'da oksidatif hasar ile bağlantılı olarak artan ROS üretiminin olduğu gösterilmiştir (Yuen ve ark., 2018; Kim ve Cho, 2019).

Oksidatif stresin sadece epilepsi başlangıcının bir sonucu olmadığı, aynı zamanda epilepsi oluşumunda rol oynayabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, oksidatif stresi azaltan antioksidanlar son zamanlarda epilepsi tedavisinde dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, tüm epilepsi nöbet modellerinde oksidatif stres hasarının meydana geldiği gösterilmiştir. Yapılan bir araştırmada pilokarpin ile epilepsi oluşturulan sıçanlarda oksidatif stres ve enflamasyon parametrelerinde artış, antioksidan seviyelerinde ise düşüş gösterilmiştir. Bunun yanısıra antioksidan özellikteki piperin ile yapılan tedavinin bu sonucu tersine çevirdiği gösterilmiştir (Mao ve ark., 2016). Liu ve ark. (2019), pentilentetrazol (PTZ) uygulaması ile oluşturulan epilepsi modelinde lipid peroksidasyonunun arttığını, antioksidan seviyelerinin ise önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. İlaça direçli temporal lob epilepsili hastalarda SOD ve katalaz aktiviteleri ve lipid peroksidasyonunun arttığı, GSH-Px aktivitesinin ise azaldığı gösterilmiştir (Lorigados Pedre ve ark., 2018). Çalışmamızda skopolamin uygulamasının fare beyin dokularında katalaz ve SOD aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir. Diğer antioksidan parametrelerinde, MDA ve protein karbonil düzeyinde bir değişiklik tespit edilememiştir. Lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonundaki değişikliklerin daha geç bir süre zarfında gözlemlenebileceğini düşünmekteyiz. Diğer antioksidanların ise lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonundaki artış ile birlikte değişikliğe uğrayabileceği kanaatindeyiz.

Çeşitli deneysel nöbet modellerinde bir takım antioksidanların hem nöbet belirtilerine hem de eşlik eden biyokimyasal değişikliklere karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir (Devi ve ark., 2008). Yaptığımız çalışmada düşük ve yüksek doz MK-801 tedavisinin skopolamin uygulanan farelerin beyin dokusu SOD ve katalaz aktivitelerini düşürdüğü, ayrıca yüksek doz MK-801 tedavisinin skopolamin uygulanan farelerin beyin dokusu protein karbonil düzeyini azalttığı görülmüştür. Bu sonuca dayanarak MK-801 uygulamasının skopolamin ile indüklenmiş konvülsiyonlarda beyin dokusunda antioksidan seviyelerini artırıp protein oksidasyonuna karşı koruyucu bir rol üstlendiğini söylemek mümkündür.

Epileptogenezin hücresele ve moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olsa da, fokal veya sistemik düzensiz enflamatuvar süreçlerin, epilepsinin başlangıcına aracılık eden anormal sinirsel bağlantıya ve hipereksitabl nöronal ağa yol açtığı ileri sürülmektedir (Rana ve Musto, 2018). Hem epileptik hastalarda hem de hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda epileptik nöbetlerin enflamatuvar maddeleri uyardığı görülmektedir. Bunun sonucu olarak nöronal dejenerasyon gelişmekte ve beynin eksitabilitesinde artış meydana gelmektedir. Son on yılda yapılan deneysel ve klinik çalışmalar beyindeki enflamatuvar süreçlerin, nöbet ve epilepsinin patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (Vezzani ve ark., 2011).

İnflamatuvar mediyatörlerden NOx'in ve PGE₂'nin epilepsi ile ilişkisini ortaya koymaya çalışan bir takım çalışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalar NOx'in prokonvulsan etkisinin olduğunu gösterirken bazı çalışmalar ise antikonvulsan etkisinin olduğunu göstermektedir (Kapucu, 2019). Wang ve ark. (2019), hipokampustaki NOx seviyesinin ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ekspresyonunun nöbetlerden sonra arttığını ve nöbetlerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Öte yandan PGE₂ da enflamasyonda önemli bir modülatördür. PGE₂, epileptik nöbet ve serebral iskemi gibi patolojik süreçlerde rol oynadığından dolayı nöroenflamasyonla ilişkili olduğu bilinmektedir (Takemiya, 2017). Ayrıca PGE₂'nin, nöroenflamasyon, nöronal hipertoksiste ve eksitotoksiste, lokal vazodilatasyon ve immün hücrelerin infiltrasyonu üzerindeki önemi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Dey ve ark., 2016). Paudel ve ark. (2018), lityum-pilokarpin ile indüklenmiş sıçan status epileptikus modelinde, hipokampal dokuda enflamasyon ve PGE₂ seviyesinde artış tespit etmiştir. Yaptığımız çalışmada skopolamin uygulaması beyin dokusundaki PGE₂ seviyesini arttırdığını, ancak NOx seviyesini değiştirmediğini, düşük ve yüksek doz MK-801 tedavisinin ise hem PGE₂ hem de NOx seviyesinde düşüşe neden olduğu görülmüştür. Bu bulgulara dayanarak skopolamin uygulamasının beyinde enflamatuvar yanıtı arttırdığını, MK-801 tedavisinin ise skopolamin ile indüklenmiş konvülsiyonlarda beyin dokusundaki enflamasyonu baskılayabileceğini ve bu etkinin dozdan bağımsız olduğunu söylemek mümkündür.

Gastrik mukozanın endokrin hücreleri tarafından sentezlenen bir oreksijenik peptid olan ghrelin ile epilepsi arasındaki bağlantıyı araştıran çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, bu çalışmalardan elde edilen bulgular oldukça farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalarda serum ghrelin düzeyinin epilepsili hastalarda arttığı gösterilmişken bazı çalışmalarda ise bunun tam tersi sonuçlar elde edilmiştir (Ataie ve ark., 2011; Ge ve ark., 2017). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, ghrelinin epileptik nöbetleri engellediği, dolayısıyla antikonvulsan özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. İntraperitoneal yolla ghrelin uygulamasının sıçanlarda PTZ ile indüklenen epileptik nöbetlerin oluşumunu büyük ölçüde geciktirdiği veya önlediği belirtilmiştir. Ghrelinin epileptik nöbetlerde antioksidan aktivitedeki azalmayı önleyerek oksidatif stresi engellediği ve nöroprotektif rol oynadığı bildirilmiştir (Ge ve ark., 2017). Bazı çalışmalar, ghrelinin mikroglia ve astrositlerin aktivasyonunu önleyebileceğini ve enflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunu azaltarak antienflamatuvar etkinlik göstereceğini ortaya koymaktadır (Ge ve ark., 2017). Yaptığımız çalışma skopolamin uygulamasının hem serumdaki hem de beyin dokusundaki ghrelin seviyesini azalttığını, düşük ve yüksek doz MK-801 tedavisinin ise ghrelin seviyesini azalttığını göstermektedir. Skopolamin ile indüklenmiş konvülsiyonlarda MK-801 uygulamasının aynı zamanda enflamatuvar yanıtta da inhibisyona neden olması, MK-801'in antienflamatuvar aktivitesinin ghrelin üzerinden gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada skopolamin uygulamasının bazı antioksidanların aktivitelerinde ve ghrelin seviyelerinde düşüşe neden olduğu, protein oksidasyonunda ve enflamatuvar yanıtta artışa yol açtığı görülmüştür. MK-801 tedavisi ise hem konvülsiyonların görülme sıklığını geciktirdiği hem de oksidatif stresi ve enflamasyonu baskıladığı tespit edilmiştir. MK-801 uygulamasının aynı zamanda ghrelin seviyesinde de artışa neden olması MK-801'in bu etkilerinin artan ghrelin seviyesi sayesinde gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte MK-801'in muhtemel nöroprotektif etkinliğinin hangi mekanizmalar üzerinden meydana geldiğini söyleyebilmek için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür: Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TYL-2019-7854 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar bulunmamaktadır.

Referanslar

- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ataie, Z., Golzar, M. G., Babri, S. h., Ebrahimi, H., & Mohaddes, G. (2011). Does ghrelin level change after epileptic seizure in rats?. *Seizure*, 20(4), 347–349. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.001>
- Ba-Diop, A., Marin, B., Druet-Cabanac, M., Ngoungou, E. B., Newton, C. R., & Preux, P. M. (2014). Epidemiology, causes, and treatment of epilepsy in sub-Saharan Africa. *The Lancet. Neurology*, 13(10), 1029–1044. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70114-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70114-0)
- Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 61, 882–888.
- Büget, B., Türkmen, A. Z., Allahverdiyev, O., & Enginar, N. (2016). Antimuscarinic-induced convulsions in fasted animals after food intake: evaluation of the effects of levetiracetam, topiramate and different doses of atropine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 389(1), 57–62. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1175-5>
- Chen, Z., Li, Z., Sakurai, E., Izadi Mobarakeh, J., Ohtsu, H., Watanabe, T., Watanabe, T., Iinuma, K., & Yanai, K. (2003). Chemical kindling induced by pentylene tetrazol in histamine H(1) receptor gene knockout mice (H(1)KO), histidine decarboxylase-deficient mice (HDC(-/-)) and mast cell-deficient W/W(v) mice. *Brain research*, 968(1), 162–166. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02229-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02229-7)
- Devi, P. U., Manocha, A., & Vohora, D. (2008). Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 9(18), 3169–3177. <https://doi.org/10.1517/14656560802568230>
- Dey, A., Kang, X., Qiu, J., Du, Y., & Jiang, J. (2016). Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends in pharmacological sciences*, 37(6), 463–484. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.03.001>
- Dogan, A., Dalar, A., Sadullahoglu, C., Battal, A., Uzun, Y., Celik, I., & Demirel, K. (2018). Investigation of the protective effects of horse mushroom (*Agaricus arvensis* Schaeff.) against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Molecular biology reports*, 45(5), 787–797. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4218-4>
- Eckerson, H. W., Romson, J., Wyte, C., & La Du, B. N. (1983). The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *American journal of human genetics*, 35(2), 214–227.
- Enginar, N., & Nurten, A. (2010). Seizures triggered by food intake in antimuscarinic-treated fasted animals: evaluation of the experimental findings in terms of similarities to eating-triggered epilepsy. *Epilepsia*, 51 Suppl 3, 80–84. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02616.x>
- Enginar, N., Nurten, A., Celik, P. Y., & Açıkmeşe, B. (2005). Scopolamine-induced convulsions in fasted mice after food intake: effects of glucose intake, antimuscarinic activity and anticonvulsant drugs. *Neuropharmacology*, 49(3), 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.01.032>

- Enginar, N., Nurten, A., Yamantürk, P., & Koyuncuoğlu, H. (1997). Scopolamine-induced convulsions in food given fasted mice: effects of physostigmine and MK-801. *Epilepsy research*, 28(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(97\)00041-7](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(97)00041-7)
- Enginar, N., Yamantürk, P., Nurten, A., Nurten, R., & Koyuncuoğlu, H. (2003). Scopolamine-induced convulsions in fasted mice after food intake: determination of blood glucose levels, [3H]glutamate binding kinetics and antidopaminergic drug effects. *Neuropharmacology*, 44(2), 199–205. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00365-9](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00365-9)
- Fisher R. S. (1989). Animal models of the epilepsies. *Brain research. Brain research reviews*, 14(3), 245–278. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(89\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0165-0173(89)90003-9)
- Gardoni, F., Stanic, J., Scheggia, D., Benussi, A., Borroni, B., & Di Luca, M. (2021). NMDA and AMPA Receptor Autoantibodies in Brain Disorders: From Molecular Mechanisms to Clinical Features. *Cells*, 10(1), 77. <https://doi.org/10.3390/cells10010077>
- Ge, T., Yang, W., Fan, J., & Li, B. (2017). Preclinical evidence of ghrelin as a therapeutic target in epilepsy. *Oncotarget*, 8(35), 59929–59939. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18349>
- Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S., & Hussein, D. (2021). GABA_A receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 19(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0>
- Hiramatsu, M., Murasawa, H., Nabeshima, T., & Kameyama, T. (1998). Effects of U-50,488H on scopolamine-, mecamylamine- and dizocilpine-induced learning and memory impairment in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 284(3), 858–867.
- Kapucu, A. (2019). Sıçanlarda PTZ-kaynaklı nöbetlerde eritropoietinin hipokampus ve frontal kortekste nitrik oksit sentaz türleri üzerine etkileri. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 82(2), 107–115. <https://doi.org/10.26650/IUITFD.416053>
- Kim, J. E., & Cho, K. O. (2019). Functional Nutrients for Epilepsy. *Nutrients*, 11(6), 1309. <https://doi.org/10.3390/nu11061309>
- Kobylarek, D., Iwanowski, P., Lewandowska, Z., Limphaibool, N., Szafranek, S., Labrzycka, A., & Kozubski, W. (2019). Advances in the Potential Biomarkers of Epilepsy. *Frontiers in neurology*, 10, 685. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00685>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*, 186, 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)
- Liu, L. M., Wang, N., Lu, Y., & Wang, W. P. (2019). Edaravone acts as a potential therapeutic drug against pentylenetetrazole-induced epilepsy in male albino rats by downregulating cyclooxygenase-II. *Brain and behavior*, 9(1), e01156. <https://doi.org/10.1002/brb3.1156>
- Lorigados Pedre, L., Gallardo, J. M., Morales Chacón, L. M., Vega García, A., Flores-Mendoza, M., Neri-Gómez, T., Estupiñán Díaz, B., Cruz-Xenes, R. M., Pavón Fuentes, N., & Orozco-Suárez, S. (2018). Oxidative Stress in Patients with Drug Resistant Partial Complex Seizure. *Behavioral sciences (Basel, Switzerland)*, 8(6), 59. <https://doi.org/10.3390/bs8060059>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.

- Mao, K., Lei, D., Zhang, H., & You, C. (2017). Anticonvulsant effect of piperine ameliorates memory impairment, inflammation and oxidative stress in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(2), 695–700. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.4001>
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 5(1), 62–71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>
- Nurten, A., & Enginar, N. (2006). The evaluation of antimuscarinic-induced convulsions in fasted rats after food intake. *Epilepsy research*, 72(2-3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.07.018>
- Nurten, A., Ozerman, B., Ozen, I., & Kara, I. (2009). The role of solid food intake in antimuscarinic-induced convulsions in fasted mice. *Epilepsy & behavior: E&B*, 15(2), 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.03.025>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Özdemir, O., & Özdemir, G. P. (2016). Glutamat sistemi ve şizofreni. *Psikiyatride güncel yaklaşımlar*, 8(4), 394-405. <https://doi.org/10.18863/pgy.253445>
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 70(1), 158–169.
- Paudel, Y. N., Shaikh, M. F., Chakraborti, A., Kumari, Y., Aledo-Serrano, Á., Aleksovska, K., Alvim, M., & Othman, I. (2018). HMGB1: A Common Biomarker and Potential Target for TBI, Neuroinflammation, Epilepsy, and Cognitive Dysfunction. *Frontiers in neuroscience*, 12, 628. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00628>
- Rana, A., & Musto, A. E. (2018). The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-7>
- Ren, X. Q., Ma, R., Yang, C. Q., Liu, Q. H., Jiao, J., Zhang, X. L., & Rong, P. (2016). Kangxian capsules: Effects on convulsive injuries, N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor subunit expression, and free Ca²⁺ concentration in a rat hippocampal neuron epileptic discharge model. *Seizure*, 40, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.05.003>
- Saygı Bacanak, M., Aydın, B., Cabadak, H., Nurten, A., Gören, M. Z., & Enginar, N. (2019). Contribution of M₁ and M₂ muscarinic receptor subtypes to convulsions in fasted mice treated with scopolamine and given food. *Behavioural brain research*, 364, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.018>
- Singh, A., & Trevick, S. (2016). The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurologic clinics*, 34(4), 837–847. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.015>
- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497–500.
- Takemiya, T., & Yamagata, K. (2013). Intercellular signaling pathway among Endothelia, astrocytes and neurons in excitatory neuronal damage. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 8345–8357. <https://doi.org/10.3390/ijms14048345>

- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature reviews. Neurology*, 7(1), 31–40. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.178>
- Wang, A., Si, Z., Li, X., Lu, L., Pan, Y., & Liu, J. (2019). FK506 Attenuated Pilocarpine-Induced Epilepsy by Reducing Inflammation in Rats. *Frontiers in neurology*, 10, 971. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00971>
- Werhahn K. J. (2009). Epilepsy in the elderly. *Deutsches Arzteblatt international*, 106(9), 135–142. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0135>
- Yuen, A., Keezer, M. R., & Sander, J. W. (2018). Epilepsy is a neurological and a systemic disorder. *Epilepsy & behavior : E&B*, 78, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.10.010>
- Zengin Türkmen, A. , Nurten, A. & Enginar, N. (2019). Scopolamine-induced convulsions in fasted rats after food intake: the effect of duration of food deprivation. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 82(1), 47-51. <https://doi.org/10.26650/IUITFD.411169>