



UZUN SÜRE SODYUM VALPROAT TEDAVİSİ ALAN EPİLEPTİK ÇOCUKLARDA PLAZMA VE ERİTROSİT NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ

PLASMA AND ERYTHROCYTE NITRIC OXIDE LEVELS IN EPILEPTIC CHILDREN RECEIVING LONG-TERM SODIUM VALPROATE THERAPY

Elif ÖZEROL¹ İbrahim ÖZEROL² Mehmet ASLAN³ Mukaddes GÜLEÇ¹ Cengiz YAKINCI³
Ömer AKYOL¹

¹İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

²İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

³İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Pediatri Anabilim Dalı, Malatya

Anahtar Sözcükler: epilepsi, nitrik oksit, valproat.

Key Words: epilepsy, nitric oxide, valproate.

ÖZET

Valproat (VPA), çocuklarda epilepsi tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nitrik oksit (NO), pek çok hücrel cevabı etkileyen önemli bir hücre içi fizyolojik mesajcıdır. Genellikle eritrosit membranının NO'ye son derece geçirgen olduğuna inanılmaktadır. Literatürde VPA'nın antiepileptik etkisini NO üzerinden gösterebileceği iddia edilmektedir. Bu çalışmada, uzun süre VPA tedavisi alan çocuklarda plazma ve eritrosit NO konsantrasyonlarının sağlıklı kontrol bireyleri ile karşılaştırılması yanında plazma ve eritrosit NO düzeyleri ile VPA dozajı ve plazma konsantrasyonları arasında olası muhtemel ilişkiyi tayin etmek amaçlanmıştır.

NO düzeyleri epilepsili 41 hasta ile 32 sağlıklı kontrolde ölçüldü. Total nitrit, endojen nitrik oksit üretiminin bir indeksi olarak Griess reaksiyonuyla ölçüldü ve sonuçların her biri diğeriyle karşılaştırıldı.

VPA tedavisi altındaki epileptik çocuklarda hem eritrosit hem de plazma nitrik oksit düzeyleri kontrollerle karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık olmadığı gözlemlendi.

Her ne kadar VPA'nın antiepileptik etkisini NO üzerinden gösterebileceği iddia edilse de, bizim çalışmamız epilepsi ve VPA ile uzun süre tedavinin plazma ve eritrosit NO konsantrasyonlarını etkilemediğini göstermiştir.

SUMMARY

Valproate (VPA) is a widely used drug as the first-line treatment for epilepsy in children. Nitric oxide (NO) is an important intercellular physiological messenger capable of evoking a number of cellular responses. It is generally believed that the erythrocyte membrane is highly permeable to NO. It has been claimed that VPA may show its antiepileptic effect throughout NO. Therefore, the aim of our study were to evaluate whether differences exist in the plasma and erythrocyte NO concentrations in children receiving long-term VPA in comparison with healthy control subjects and to determine the possible relationship between the plasma and erythrocyte NO levels and VPA dosage and their plasma concentrations.

Yazışma adresi: Elif Özerol, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

Makalenin geliş tarihi: 04. 03. 2003 ; kabul tarihi: 24. 04. 2003

Levels of NO were measured in 41 patients with epilepsy and 32 healthy controls. Total nitrite was measured by Griess reaction as an index of endogenous NO production and results were compared with each other.

The results showed that there were no differences both plasma and erythrocyte in nitric oxide levels in epileptic children on VPA therapy compared with the control group.

In conclusion, although VPA has been suggested to show its antiepileptic effect via NO, our study demonstrates that epilepsy and prolonged treatment with VPA do not affect the levels of the plasma and erythrocyte NO concentrations.

GİRİŞ

Oksijen metabolizması yaşam için esas olmakla beraber hücreler için potansiyel bir tehdit de olabilmektedir, çünkü reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesinde çıkış noktasını oluşturmaktadır. ROS ciddi hücre hasarına yol açabilir. Valproat (VPA) çocuklarda epilepsinin başlangıç tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antiepileptik olup çeşitli mekanizmalarla oksijene bağımlı doku yaralanmalarını başlatabileceği iddia edilmektedir (1-3). Üstelik, uzun süre antiepileptik ilaç kullanımının serbest radikal oluşumunu arttırdığı ve nöronlarda oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir (4).

Serbest radikal bir gaz olan nitrik oksit (NO) nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-arjinin amino asitinden sentezlenen nöronal bir mesajcıdır. Beyinde N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonu NO üretimine yol açar (5). NO eritrositleri de içine alan pek çok hücrede bulunan (6), aynı zamanda oksijen radikali olarak da kabul edilen bir moleküldür. NO pek çok reaksiyona katılarak hücre bileşenlerini etkileyebilir, fakat en önemlisi ise heme proteinleriyle gerçekleştirilen reaksiyonlardır.

Patolojik şartlarda olduğu gibi sinir sisteminin fizyolojisinde de NO ve metabolitlerinin fonksiyonuna karşı artan bir ilgi vardır (7,8). Daha önceden yapılan çalışmalar (9-12), merkezi sinir sisteminde NO'nun konvülsiyonun patolojisinde yer alma olasılığını desteklemektedir. Diğer taraftan, NO'nun aslında VPA gibi antiepileptik ilaçların bu etkisini göstermek için aracı olarak kullandığı bir molekül olarak görülmektedir (13). Merkezi sinir sisteminde VPA'nın NO üretimine olan etkisi araştırılmasına karşın (14), pek az araştırmacı VPA'nın NO'ya etkisini ortaya çıkarmıştır ve eritrosit NO düzeyleri ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bizim çalışmamızın amacı, uzun süre VPA tedavisi alan çocuklarda plazma ve eritrosit NO konsantrasyonlarının sağlıklı kontrol bireylerle karşılaştırıldığında farklılık olup olmadığını değerlendirmek, ve plazma ve eritrosit NO düzeyleri ile VPA dozajı ve plazma konsantrasyonları arasında mümkün ilişkiyi ortaya koymaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bireyler

0 ile 13 yaşlarında 41 hasta (16 kız, 25 erkek) ve 0 ile 15 yaşları arasındaki 32 sağlıklı birey (13 kız, 19 erkek)'de eritrosit ve plazma NO konsantrasyonları çalışıldı. Sağlıklı gruptaki bireylerin herhangi bir hastalığı yoktu. Rutin laboratuvar testleri, plazma ve eritrosit numuneleriyle aynı anda gerçekleştirildi.

Hastalar İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Hastahanesi Pediatri Anabilim Dalında tedavi alan hastalardı. Hastaların ilacı (VPA) normal dozdaydı ve plazma düzeyleri çalışma zamanı esnasında terapötik sınırlar içindeydi. Kontrol grubunu oluşturan bireyler hiçbir uzun süreli ilaç kullanmamaktaydı.

Kan numuneleri: Sabahleyin bireylerden alınan açlık kan numuneleri eritrosit sedimentini hazırlamak için heparinize tüplere konuldu. Kan numuneleri aşağıda tanımlandığı şekilde NO deneyi için hazırlandı. Eritrosit sedimenti üzerindeki buffy coat, plazma alındıktan sonra dikkatli bir şekilde ayrıldı. Eritrosit sedimenti plazma kalıntılarını kaldırmak için 10-kat izotonik NaCl solüsyonuyla üç kez yıkandı. Her prosedürden sonra, eritrosit-izotonik karışımı 10°C'de 10 dakika 1000xg'de santrifüj edildi. Eritrosit sedimentleri hemolizat elde etmek için 20-kat hemolizat edici solüsyonla muamele edildi.

Analizler:

Eritrosit ve plazmadaki total nitrit düzeyleri NO'nun bir indeksi olarak kabul edilerek ölçüldü. Total nitrit tespiti için lizat pH 9,7'de glisin buffer içinde nitratı (NO₃) nitrite (NO₂) indirmek için kadmiyumla muamele edildi (4 ml reaksiyon karışımı içinde 2,5-3 g kadmiyum granülü).

Total nitrit miktarı Griess reaksiyonu ile belirlendi. Bu reaksiyona göre, naftiletilediamin ve sülfanilamid karışımıyla elde edilen nitrit reaksiyonu 540 nm'de kuvvetli bir absorpsiyon verir (15). Sodyum nitritin bir seri dilüsyonlarıyla (10⁻⁸- 10⁻³ mol/l) standart bir eğri oluşturuldu. Sonuçlar eritrositte her gram hemoglobin için mikrogram olarak ve plazmada ise litre başına mikromol olarak ifade edildi. Ayrıca elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamanın standard hatası (SEM) olarak verildi. Bütün numuneler iki kez çalışıldı ve ortalama değer alındı.

İstatistik analiz

Veriler Windows kompüter programı için SPSS kullanılarak analiz edildi. Paired t-testi gruplar arasındaki karşılaştırmaları tespit etmek için kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı olarak düşünüldü.

BULGULAR

Tablo 1'de epilepsi ve kontrol grubuna ait yaş ortalaması (yıl) ve cinsiyet (K/E) ile epilepsili hastaların hastalık süresi (yıl), tedavi süresi (yıl) ve tedavi dozları (mg/kg/gün) verildi.

Tablo 2'de epilepsili hastalar ve sağlıklı kontrol bireylerindeki eritrosit ve plazma NO konsantrasyonları ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) olarak gösterildi. Epilepsili hastalar sağlıklı kontrol bireylerle karşılaştırıldığında hem eritrosit ($p > 0,05$) hem de plazma ($p > 0,05$) NO konsantrasyonlarında istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Eritrosit ve plazmadaki NO'nun ortalama \pm SEM değerlerinin epilepsili hastalar ve sağlıklı kontrollerdeki cinsiyete göre dağılımı Tablo 3'de gösterilmiştir. Hem plazma hem de eritrositte; her iki grup kendi içinde cinsiyete göre kıyaslandığında ($p > 0,05$) ve kontrol grubuyla VPA tedavisi altındaki epilepsili hastalarda cinsiyete göre yapılan istatistik analizlerde anlamlı farklılıklar bulunamadı ($p > 0,05$).

Tablo 1. Hasta ve kontrollerin demografik özellikleri.

	Yaş ortalaması (yıl)	Cinsiyet K/E	Hastalık süresi (yıl)	Tedavi süresi (yıl)	Tedavi dozu (mg/kg gün)
Epilepsi (n=41)	7.07	1.56	3.7	2.34	33.3
Kontrol (n=32)	8.4	0.68	--	--	--

Tablo 2. Epilepsili hastalar ve sağlıklı kontrol bireylerindeki eritrosit ve plazma NO konsantrasyonları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

	Eritrosit nitrik oksit ($\mu\text{mol/g Hb}$)	Plazma nitrik oksit ($\mu\text{mol/L}$)
Epilepsi (n=41)	18.1 \pm 1.1	48.7 \pm 2.4
Kontrol (n=32)	15.4 \pm 1.7	49.1 \pm 2.4
P değerleri	0.08	0.35

Tablo 3. Epilepsili hastalarda ve kontrol bireylerinde cinsiyete göre eritrosit ve plazma nitrik oksit düzeyleri. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

	Eritrosit ($\mu\text{mol/gHb}$)	Plazma ($\mu\text{mol/L}$)
Epilepsi		
1) E (n=25)	18.5 \pm 1.5	49.2 \pm 3.2
2) K(n=16)	17.4 \pm 1.3	47.8 \pm 3.8
Kontrol		
3) E (n=19)	15.1 \pm 2.2	56.8 \pm 6.2
4) K(n=13)	15.8 \pm 2.9	50.1 \pm 2.9
P değeri (1-2)	0.32	0.27
P değeri (3-4)	0.69	0.28
P değeri (1-3)	0.56	0.19
P değeri (2-4)	0.74	0.53

TARTIŞMA

Birçok görev ve fonksiyonlarının yanında NO'nun merkezi sinir sisteminde mesajcı bir molekül olarak görev yaptığı da bilinmektedir. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin uyarılması NO oluşumuna yol açmaktadır. Fazlalığı ya da eksikliğinde, NO patolojik sinir doku hasarının önemli bir mediatörü olarak rol alabilmektedir. NO, NMDA reseptörünün redoks modülatörleri üzerindeki bir feedback etkisi ile NMDA reseptör aktivasyonunu düzenleyebilir (16), sonuçta NMDA reseptör aktivasyonu azalır ve reseptörün aşırı sitümülyasyonundan nöronları korur (17). Pek çok araştırmacı NMDA reseptörleri ve antiepileptik ilaçların etki mekanizması arasındaki ilişkiyi incelerken (9, 18, 19), antiepileptik tedaviden sonra NO üretimini araştıran pek az araştırma vardır (14).

Nöroleptik ilaçların prooksidan ve/veya antioksidan etkiler gösterdiği (20) ve özellikle bazı mekanizmalarla oksijene bağımlı doku hasarını artırdığı belirtilmiştir. (2,3). Bundan daha da önemlisi bazı araştırmacılar VPA gibi bazı antiepileptik ilaçların bu etkilerini, aslında fazla miktarda üretildiğinde dokuya toksik etki yapabilen NO molekülü üzerinden gerçekleştirdiğini iddia etmektedirler (13, 21). Bu açıdan VPA metabolize edildiğinde, vücutta serbest radikallerin arttığı bildirilmiştir. VPA tedavisi altındaki epileptik çocuklarda NO metabolitlerinin rolünü daha iyi anlamak için NO sentezinin bir göstergesi olarak hem eritrosit ve hem de plazma total nitrit konsantrasyonlarını ölçtük. Bu çalışmadan elde edilen veriler, epileptik çocuklar ve kontroller arasında hem eritrosit hem de plazma nitrik oksit konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık bulunmadığını göstermektedir.

VPA tek başına kullanılabilir gibi, diğer antiepileptiklerin kombinasyonu da kullanılmaktadır. İlaç etkileşiminden sakınmak için, sadece VPA tedavisi alan hastalar bizim çalışmamız için seçilmiştir. Mevcut çalışma VPA alımının

NO üretimini etkilemediğini göstermektedir. Bu bulgular son zamanlarda deneysel epilepsi modellerinde normal NO değerleri bulan bir araştırmanın sonuçlarına benzerlik göstermektedir (22).

Bu sonuçlar VPA alımıyla ortaya çıkan antikonvulsiv etkilerin NO metabolitlerinde bir değişikliğe yol açmayacağını göstermektedir. Dolayısıyla VPA'nın antiepileptik etkisini NO üzerinden gösterdiği tezini desteklememektedir. VPA'nın günlük dozu ve plazma konsantrasyonlarıyla NO değerleri arasında doza bağımlı bir ilişki yoktu. Özellikle altını çizerek belirtmek istediğimiz önemli bir nokta şudur: bizim çalışmamız dahilinde olan ve VPA ile tedavi olan bütün hastalarda VPA normal dozda verilmişti ve VPA'nın

bütün hastalardaki plazma düzeyleri terapötik düzeylerdeydi.

Sonuç olarak, bizim bulgularımız VPA tedavisinin epileptik çocuklarda plazma ve eritrosit NO konsantrasyonlarında anlamlı değişikliklere yol açmadığını göstermektedir. Antiepileptik bir ilaç olarak VPA eğer normal dozda verilirse uzun süreli tedavilerde bile NO değerlerinde bir değişikliğe yol açmayabilir. Ayrıca daha önceki çalışmalarda iddia edilen VPA'nın antiepileptik etkisini NO üzerinden gerçekleştirilebileceği tezi, bizim plazma ve eritrosit bulgularımız gözönüne alındığında belki NO'nun ikincil veya üçüncül bazı ürünleri (peroksinitrit veya diğer NO ürünleri) için geçerli olabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Baillie TA. Metabolic activation of valproic acid and drug mediated hepatotoxicity. Role of the terminal olefin, 2-n-propyl-4-pentenoic acid. *Chem Res Toxicol* 1998; 1: 195-199.
2. Keller BI, Yamanaka G, Thurman RG. Inhibition of mitochondrial respiration and oxygen-dependent hepatotoxicity by six structurally dissimilar peroxisomal proliferating agents. *Toxicology* 1992; 71: 49-61.
3. Kerr BM, Rettie AE, Eddy AC, et al. Inhibition of human liver microsomal epoxide hydrolase by valproate and valpromide: In vitro/in vivo correlation. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46: 82-93.
4. Maertens P, Dyken P, Graf W, et al. Free radicals, anticonvulsants, and the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Am J Med Genet* 1995; 57: 225-228.
5. Mollace V, Bargetta G, Nistico G. Evidence that L-arginine poseses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuroreport* 1991; 2: 269-272.
6. Chen LY, Mehta JL. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: 57-61.
7. Dawson TM. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of action and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6: 299-324.
8. Gartwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 683-706.
9. Bussion A, Lakhmeche N, Verrecchia C, et al. Nitric oxide: An endogenous anticonvulsant substance. *Neuroreport* 1993; 4: 444-446.
10. Jayakumar AR, Sujatha R, Paul K, et al. Involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase activity in anticonvulsive action. *Brain Res Bull* 1999; 48: 387-394.
11. Nagatomo I, Akasaki Y, Kuchiwa S, et al. Sparse distribution of NADPH diaphorase neurons in the hippocampal formation of the inbred mutant strain EL Mouse. *Brain Res* 1996; 730: 223-226.
12. Penix LP, Davis W, Subramaniam S. Inhibition of NO synthase increases the severity of kainic acid-induced seizures in rodents. *Epilepsy Res* 1994; 18: 177-184.
13. Faradji H, Rousset C, Debilly G, et al. Sleep and epilepsy: A key role for nitric oxide? *Epilepsia* 2000; 41: 794-801.
14. Lizasoain I, Knowles RG, Moncada S. Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in rats forebrain slices. *J Neurochem* 1995; 64: 636-642.
15. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
16. Uzumi Y, Clifford DB, Zorumski CF. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science* 1992; 257: 1273-1276.
17. Lipton SA. Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: Open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* 1993; 16: 527-532.
18. Cai Z, McCaslin PP. Acute, chronic and differential effects of several anesthetic barbiturates on glutamate receptor activation in neuronal culture. *Brain Res* 1993; 611: 181-186.
19. Tanaka S, Kiuchi Y, Numazawa S, et al. Changes in glutamate receptors, c-fos mRNA expression and activator protein-1 (AP-1) DNA binding activity in the brain of phenobarbital-dependent and-withdrawn rats. *Brain Res* 1997; 756:35-45.
20. Jeding I, Evans PJ, Akanmu D, et al. Characterization of the potential antioxidant and prooxidant actions of some neuroleptic drugs. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 359-65.
21. Tutka P, Luszczki J, Kleinrok Z, et al. Molsidomine enhances the protective activity of valproate against pentylentetrazole-induced seizures in mice. *J Neural Transm* 2002; 109: 455-466.

22. Nagatomo I, Akasaki Y, Uchida M, et al. Effects of combined administration of zonisamide and valproic acid or phenytoin to nitric oxide production, monoamines and zonisamide concentrations in the brain of seizure-susceptible EL mice. *Brain Res Bull* 2000; 53; 211-218.