



Pentilentetrazol ile Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Epilepsi Modelinde Oksolamin Sitratın Antikonvulsan Etkisi

Anticonvulsant Effect of Oxolamine Citrate in Pentylene-tetrazole Induced Experimental Epilepsy Model in Rats

Mümin Alper Erdoğan¹, Oytun Erbaş²

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye.
²Demiroğlu Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

Özet

Amaç: Dünya çapında milyonlarca kişi epilepsi hastası olarak sorun yaşamaktadır ve hastaların %25'inde şu anda mevcut bulunan antiepileptik ilaçlara karşı dirençli nöbetler gözlenmektedir. Bu nedenlerle, halen etkili ve tolere edilebilen daha fazla sayıda antiepileptik ilaca ihtiyaç duyulmaya devam edilmektedir. Oksolamin sitrat, pre-klinik verilere dayanarak antiepileptik aktiviteye sahip olabilen yaygın bir antitussif ilaçtır.

Materyal-Metot: Sıçanlar randomize bir şekilde intraperitoneal (i.p.) Oksolamin ile iki farklı dozda ve plasebo şeklinde tedavi edildi ve daha sonrasında güçlü bir nöbet indükleyici bileşik olan pentilentetrazole (PTZ) i.p. olarak maruz bırakıldı. Oksolaminin epilepsi için sıçan modelimizde antiepileptik özelliklere sahip olup olmadığını belirlemede sıçanların hemen sonrasındaki nöbet aktivitesi elektroensefalografi (EEG), Racine'nin konvülsiyon ölçeği (RCS) ve ilk miyoklonik jerk (TFMJ) zamanı ile değerlendirildi.

Bulgular: Plasebo ile karşılaştırıldığında, her iki dozda Oksolamin, nöbet aktivitesini önemli ölçüde inhibe etti. Ortalama EEG spike dalga yüzdesi % 75,3'ten (plasebo) % 35,8'e (düşük doz, $p<0,01$) ve %28,6'ya (yüksek doz, $p<0,0001$) azaldı. RCS, ortalama 5,7'den (plasebo) 4,7'ye (düşük doz, $p<0,001$) ve 3,3'e (yüksek doz, $p<0,0001$) düştü. TFMJ ortalama 62,5s'den (plasebo), 177,5s'ye (düşük doz, $p<0,001$) ve 223,3s'ye (yüksek doz, $p<0,0001$) yükseldi.

Sonuç: Yaygın bir antitussif ilaç olan Oksolamin sitrat, PTZ ile indüklenen status epileptikus sıçan modelinde nöbet aktivitesini baskılamaktadır. Refrakter epilepsi için devam eden etkili yeni tedaviler bulma gereksinimi göz önüne alındığında, oksolaminin antiepileptik olarak kullanılma olasılığı daha ileri düzeyde araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Nöbet, Epilepsi, Oksolamin, Pentilentetrazol, Sıçan.

Abstract

Objective: Millions of individuals worldwide suffer from epilepsy, and up to 25% of patients have seizures that are resistant to currently available antiepileptic drugs. Hence, there continues to be a need for more seizure medications that are effective yet tolerable. Oxolamine citrate is an established antitussive drug that, based on preclinical data, may also have antiepileptic activity.

Material-Method: We treated rats with either intraperitoneal (i.p.) Oxolamine citrate at two different doses or placebo in randomized fashion and then exposed them to i.p. pentylene-tetrazole (PTZ), a potent seizure-inducing compound. We measured the rats' subsequent seizure activity with electroencephalography (EEG), Racine's convulsion scale (RCS) and time to first myoclonic jerk (TFMJ) to determine whether Oxolamine citrate has antiepileptic properties in our rat model for epilepsy.

Results: When compared to placebo, Oxolamine at both doses significantly suppressed seizure activity. Mean EEG spike wave percentage score decreased from 75.3% (placebo) to 35.8% (lower dose, $p<0.01$) and 28.6% (higher dose, $p<0.0001$). RCS decreased from a mean of 5.7 (placebo) to 4.7 (lower dose, $p<0.001$) and 3.3 (higher dose, $p<0.0001$). TFMJ had increased from a mean of 62.5 s (placebo), to 177.5 s (lower dose, $p<0.001$) and 223.3 s (higher dose, $p<0.0001$).

Conclusions: Oxolamine citrate, a common antitussive drug, suppresses seizure activity in rats with PTZ-induced status epilepticus. Given the ongoing need to find effective therapies for refractory epilepsy, the possibility of using oxolamine as an antiepileptic should be further explored.

Keywords: Seizure, Epilepsy, Oxolamine, Pentylene-tetrazole, Rat.

Giriş

Epilepsi, beyindeki anormal elektriksel aktiviteden kaynaklanan tekrarlayan spontan nöbetler ile karakterize, yaygın ve sıklıkla yaşam kalitesini düşüren bir nörolojik hastalıktır. Dünya genelinde, genel popülasyonun %3 düzeyindeki bireylerin yaşamlarının belli bir döneminde epilepsi gözlenmektedir (1) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık iki milyon kişinin epilepsi tanısına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Epileptik nöbetler, genetik ve konjenitalden başlayıp, hipoksi, enfeksiyon ve inflamasyon gibi travmalardan kaynaklı nöronal anormalliklere kadar değişen düzeyde çeşitli etiyojilere sahiptir. Ayrıca yine altta yatan bir başka hastalıktan veya psikiyatrik semptomlar ile ilişkili olarak da kaynaklanabilmektedir (2-5). Son 50 yılda epilepsiyi anlamada ileri düzey gelişmeler olsa dahi, birçok epilepsi örneği belirsiz patofizyolojileri ile idiyopatik olarak kalmaktadır (6). Bazı epilepsi vakalarının altta yatan tanımlanabilir sebeplerinin, çoğu zaman yapısal anormallikler, metabolik bozukluklar veya genetik faktörler olarak sınıflandırılmasının tüm vakaların sadece %25-45'ini oluşturması şaşırtıcı olabilmektedir (7).

Benzer şekilde, epilepsi tedavisinde de halen büyük zorluklar yaşanmaya devam etmektedir. Anti-epileptik ilaçların artan çeşitliliğine rağmen, epilepsi hastalarının yaklaşık %30'u optimal anti-epileptik tedavilere karşın nöbetler yaşamaya devam etmektedir (8, 9) ve bu nedenle dirençli veya refrakter bir hastalığa sahip oldukları düşünülmektedir. Ayrıca, en sık kullanılanlar dahil olmak üzere birçok anti-epileptik ilaç, dar bir terapötik pencereye ve / veya düşük tolere edilebilirliğe sahiptir ve bu yüzden klinik olarak önemli yan etkiler sıklıkla gözlenmektedir (10). Bu nedenle, tedaviyle nöbetsiz statü kazanabilen hastalar bile, tedavinin süresi boyunca devam eden olumsuz yan etkilere sahip olabilmektedir (11). Tüm bu nedenlerden dolayı, epilepsi tedavisi için mükemmel anti-epileptik özelliklere, aynı zamanda daha geniş bir terapötik pencere ve daha az toksisiteye sahip yeni tedaviler bulmak, epileptologlar ve biyomedikal araştırma toplulukları için ilgi alanı olmaya devam etmelidir.

Epileptogenez, öncelikle normal beyin sinaptik aktivitesinin nöbete neden olan anormal elektriksel aktivite oluşumuna doğru yönelen bir şekilde değiştiği, hücrel ve moleküler seviyede gerçekleşen bir süreçtir. Epileptogenezin kesin mekanizmalarını ele alan, iyon kanallarının veya nörotransmitter reseptörlerinin düzensizliklerini/disregülasyonlarını, belirgin nöronal hücrelerde görülen anormallikleri ve mikro-çevredeki hasar veya inflamasyonu içeren, moleküler, anatomik ve sinaptik düzeyde çeşitli teoriler bulunmaktadır (12).

Epileptogenez için öne çıkan bir teori, insan ve memeli beyinde baskın ve iyi bilinen bir inhibitör nörotransmitter olan γ -aminobütirik asidin (GABA) değişmiş metabolizmasını içermektedir (13). Epileptogenez sırasında, azalmış GABA üretimi, düzeyi veya aktivitesinin, nöronal hipereksitabiliteye neden olduğu bilinmektedir ve bunun tersine GABA aktivitesini artıran ligandların, anti-epileptik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (14). Epileptogenezde önemli rol oynayan başka moleküller de vardır. Örneğin, beyindeki

en yaygın uyarıcı nörotransmitterlerden biri olan glutamat fazlalığı ve ayrıca Substans P (SP), nöbet riskini arttırmaktadır (15, 16). Bir çalışmada SP'nin, glutamat salınımının aracılık ettiği, kendi kendine devam eden status epileptikusa (SSSE) yol açan olaylar dizisini tetiklediği görülmüştür (17). Tersine, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin antagonistleri, nöroprotektif bir etkiye sahiptir (18). İlginç şekilde, yüksek nöbet aktivitesi ile ilişkili hücrel süreçler ve moleküller de öksürüğün merkezi ve çevresel mekanizmalarında sıklıkla önemli bir role sahiptirler.

Bir oksadiazol türevi olan Oksolamin (3-fenil-5, 8-dietilaminoetil-1, 2, 4-oksadiazol), 1960'lardan beri kullanımda olan periferik etkili nonopioid bir antitusiftir. Antitusif aktivitesi genel olarak, periferik bir mekanizma üzerinden şekillenmektedir. Anti-inflamatuvar özelliği üzerinden solunum yolları mukozasında inflamasyonu azaltmaktadır. Oksolamin bunlar yanı sıra analjezik, anti-inflamatuvar, lokal anestezi ve antispazmodik özellikler de taşımaktadır. İnflamasyon ve irritasyona bağlı şekilde meydana gelen bronkospazmı azaltmak suretiyle solunumu rahatlatılmaktadır (19). Bu çalışmada, klinik uygulamada etkin ve iyi tolere edilen bir antitusif ajan olarak yaygın şekilde kullanılan bir bileşik olan oksolaminin potansiyel anti-epileptik etkilerini araştırdık. Oksolaminin, hem çevresel hem de merkezi mekanizmalar vasıtasıyla antitusif etkiler ortaya koyduğuna inanılmaktadır. Öksürük ve epileptik nöbet aktiviteleri arasında örtüşen mekanizmalar ve hedeflerin varlığı sonucunda, bu çalışmada Oksolaminin nöbet aktivitesini antagonize edip edemediğini değerlendirdik.

Materyal-Metot

Deney Hayvanları

Bu çalışmada kullanılan deneysel prosedürler, deneylerin yapıldığı Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (No: 2011-187) onaylanmıştır. Tüm deneyler, ARRIVE yönergelerine, 1986 İngiltere Hayvanları (Bilimsel Prosedürler) Yasası ve ilgili yönergelere, hayvan deneyleri için Avrupa Birliği (AB) 2010/63/EU Direktifine ve ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri uyarınca Laboratuvar Hayvanları (NIH Publications No:8023, revize 1978) Bakım ve Kullanım Kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma için, her biri 200 ila 250 g ağırlığındaki 48 erkek Sprague Dawley sıçan kullanıldı, 24 sıçan elektroensefalogram (EEG) tabanlı deney için randomize edilirken, 24 sıçan da davranış temelli deneyler için randomize edildi. Sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, ışık 07.00 ila 19.00 saatleri arasında olacak şekilde, sessiz odalarda, ortam sıcaklığı 22 ila 24°C'ye ayarlı bir şekilde tutuldu. Sıçanlar standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile ad libitum olarak beslendi.

Deney Prosedürü

Çalışmada kemokonvulsan Pentilentetrazol (PTZ) ile nöbet indüklenen sıçanlarda Oksolaminin nöbet aktivitesi üzerine olan etkilerini elektroensefalogram (EEG) kayıtlarının analizi ve bir davranış skorlama sistemi yoluyla ölçen iki farklı deney prosedürü uygulandı. Toplam 48 sıçandan 24'ü

EEG tabanlı deney için Grup A'ya randomize edildi ve 24'ü davranış deneyi için Grup B'ye randomize edildi. Tüm EEG kayıtları ve davranışsal değerlendirmeler daha önce belirtilen protokollere uygun olarak gerçekleştirildi (20).

EEG Analizi (Grup A)

Deneylemeden önce, Grup A'daki sıçanlara EEG kaydını kolaylaştırmak üzere elektrot implantasyonu yapıldı. Sıçanlar, intraperitoneal olarak (i.p.) uygulanan 80 mg/kg ketamin ve 4 mg/kg ksilazin ile derin anestezide alındı. Daha sonra, stereotaksik yöntemler ile elektrot yerleşimi için hayvanların kafatasında küçük delikler açıldı. Kullanılan EEG elektrotları, 0,1 mm çapında, 10 mm'de 1Ω'den daha az elektrik direncine sahip poliamid kaplı paslanmaz çelik tellerdi. Elektrotlar sol frontal korteks üzerindeki duraya, orta hattın 2,0 mm laterale ve bregma'nın 1,5 mm önüne yerleştirildi. Referans elektrot ise daha önce yayınlanan protokollere göre orta hatta lambdadan 1,5 mm arkaya doğru serebellum üzerinde bir noktaya yerleştirildi (21). Başarılı yerleştirmenin ardından elektrotlar, diş restorasyonunda kullanılan alaşım ve hidrokarbonların bir karışımı olan dental akrilik ile sabitlendi.

12 günlük bir iyileşme sürecinden sonra, A grubundaki 24 sıçan ayrıca 4 alt gruba eşit olarak randomize edildi (n=6). Grup A1, nöbet oluşturu kimyasallar veya diğer başka uygulamaları almayan kontrol grubu olarak seçildi. Grup A2, i.p. olarak salın tedavisi alan plasebo grubu olarak ayrıldı. Grup A3, i.p. 10 mg/kg düşük dozda oksolamin sitrat (Oksabron 10 mg/ml, Deva) ile tedavi edildi. Son olarak, Grup A4, yine i.p. olarak 20 mg/kg yüksek dozda oksolamin sitrat ile tedavi edildi.

A2, A3 ve A4 gruplarında nöbet indüklemek için, oksolamin veya plasebo salın uygulamasından 30 dakika sonra 35 mg/kg dozda i.p. pentilentetrazol (PTZ) uygulaması yapıldı. 35 mg/kg i.p. PTZ uygulaması, gözlenebilir davranış değişiklikleri olmadan EEG'de epileptiform aktivite ile sonuçlanırken, 70 mg/kg'lık daha yüksek bir dozda PTZ uygulaması ile, nöbet ile uyumlu EEG değişikliklerinin yanı sıra gözlenebilir davranış değişiklikleri de sürekli olarak görülebilmektedir. Bununla birlikte, bu yüksek dozda, EEG sinyal-gürültü oranı bozulabilmektedir.

EEG kayıtları PTZ uygulamasından 5 dakika sonra başlatıldı ve 60 dakika kadar sürdürüldü. Sıçanlar sedasyon olmadan uyanık bırakıldı ve BIOPAC MP150 Veri Toplama Sistemi ile yapılan EEG kayıtlarının tamamı boyunca özel konteynerlere yerleştirildi. 240 Hz örnekleme hızında her bir sıçanın EEG izlemi 60 dakika boyunca kaydedildi. Sinyal 10.000 kez amplifiye edildi ve 1-60 Hz aralığında filtrelendi. EEG kaydı yapıldıktan sonra test deneye ötenazi uygulandı.

Hayvan modelimizde nöbetlerin varlığı ve şiddeti, bu tür araştırmalarda epileptiform aktiviteyi değerlendirmede kabul görmüş ve tekrarlanabilir bir yol olan ve son zamanlarda benzer deneylerde kullanılan spike dalga yüzdesi yöntemi kullanılarak değerlendirildi (20). Spike dalga yüzdesinin nöbetlerin değerlendirilmesindeki geçerliliği araştırılmış ve önceki çalışmalarda tartışılmıştır (22, 23). Kantitatif değerlendirmede hataları en aza indirmek için, EEG verilerini skorlamada iki kör klinik nörofizyolog görevlendirildi.

Spike dalga yüzdesi skorunu oluşturmak için EEG kaydı birer saniyelik bölümlere ayrıldı ve nörofizyologlar her bir bölümü spike dalgalarının varlığı açısından değerlendirdi. Spike dalgası, EEG kaydı amplitüdündeki, baseline aktiviteden en az iki kat daha yüksek bir artış ile tanımlandı. Bir saniyelik bölümde en az bir spike dalga varsa, o bölüm spike dalgaların varlığı açısından pozitif olarak kabul edildi. Spike dalga yüzdesini elde etmek için 2 dakikalık aralıklarla (120 bölüm), tespit edilen pozitif bölüm sayısı, toplam bölüm sayısına (120) bölündü. Genel spike dalga yüzdesi, her 2 dakikalık kayıt bölümlerinde bulunan yüzdelerin ortalaması alınarak elde edildi.

Davranış Deneyi (Grup B)

Grup B'deki 24 sıçan görsel olarak gözlemlenebilir nöbet aktivitesi açısından değerlendirildi ("davranış deneyi"). Bu gruba beyin elektrotları yerleştirilmedi. EEG analizinde olduğu gibi, B grubundaki sıçanlar her alt grup 6 sıçan içerecek şekilde 4 alt gruba randomize edildi. Grup B1, herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu olarak ayrıldı. Grup B2, B3 ve B4'e, klinik olarak gözlemlenebilir nöbetleri indüklemek için 70 mg/kg i.p. yüksek doz PTZ uygulandı. EEG analizinde olduğu gibi, PTZ'nin uygulanmasından yaklaşık 30 dakika önce, B2 grubu i.p. plasebo salın alırken, B3 grubu 10 mg/kg i.p. düşük dozda oksolamin sitrat ve B4 grubu 20 mg/kg i.p. yüksek dozda oksolamin sitrat aldı.

Nöbetlerin varlığını ve şiddetini değerlendirmek için iki ölçüm yöntemi kullanıldı: (1) Racine'nin Konvülsiyon Ölçeği (RCS) (24) ve (2) ilk miyoklonik jerk zamanı (TFMJ). RCS, daha önce de tarif edildiği gibi, rodent epilepsisini değerlendirmek için basit ve tekrarlanabilir 6 basamaklı bir skorlama sistemidir. 0 puanı, gözle görünür bir konvülsiyon olmadığını ifade eder. 1 puan, bıyık ve kulakta seğirmeleri gösterir. 2 puan, daha belirgin seğirme ile motor tutukluğu gösterir. 3 puan, jeneralize miyoklonik jerkler ile motor tutukluğu göstermektedir. Bu deneyde, en az 3 puanın elde edilmesine kadar geçen süre (saniye cinsinden) sıçanın TFMJ'sini temsil eder (20). 4 skoru, tonik-klonik nöbet aktivitesini gösterirken, hayvan halen ayakları üzerinde kalabilmektedir. 5 skoru, düzleme refleksinde kayıp ile birlikte tonik-klonik nöbeti göstermekte ve son olarak 6 skoru da ölümcül düzeyde bir nöbeti ifade etmektedir.

TFMJ, PTZ'nin uygulanmasını takiben saniyeler içinde kaydedilir. Deneyimizde, tonik jeneralize nöbetler gösteren hemen hemen tüm hayvanlar nöbet aktivitesinden dolayı öldü. PTZ kaynaklı nöbetler için gözlem süresi literatürdeki bu türden önceki deneylere benzer şekilde 30 dakika ile sınırlıydı (20). Bu 30 dakikalık değerlendirmeden sonra hayatta kalan hayvanlara ötenazi uygulandı.

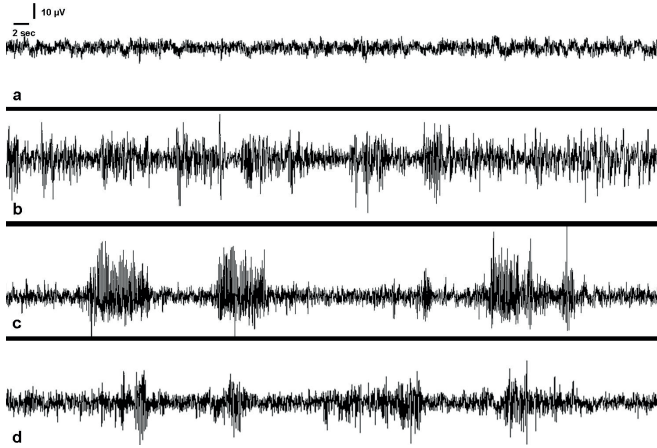
İstatistiksel Analiz

Verilerimiz SPSS sürüm 15.0 paket programı ile analiz edildi. Popülasyonun normalliğini belirlemek için Shapiro-Wilk testi uygulandı, RCS verileri Kruskal Wallis testi ile ve TFMJ verileri de tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Post hoc Bonferonni ve Mann Whitney U testlerini kullanarak deney gruplarımız arasındaki farklılıklar araştırıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı p<0,05 olarak belirlendi.

Bulgular

EEG Analiz Bulguları

Oksolamin sitratın 10 mg/kg'da uygulanmasının, plasebo salin uygulamasına kıyasla spike dalga yüzdesi ile değerlendirilen nöbet aktivitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edildi (% 35,8'e karşılık % 75,3, $p<0,01$). Daha yüksek Oksolamin sitrat dozu (20 mg/kg), yine daha yüksek bir etkinlik ile nöbet aktivitesini anlamlı düzeyde inhibe etti (% 28,6'ya karşılık % 75,3, $p<0,0001$). Bununla birlikte, düşük ve yüksek oksolamin sitrat dozları arasında nöbet inhibisyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 1). EEG analizine ait kayıt görüntüleri epileptiform aktivitenin daha iyi karakterizasyonu açısından her alt grup için Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. EEG deneyine ait kayıt görüntüleri

(a): A1-Kontrol, (b): A2-PTZ (35 mg/kg)+salin plasebo, (c): A3-PTZ (35 mg/kg)+10 mg/kg oksolamin sitrat, (d): A4-PTZ (35 mg/kg) + 20 mg/kg oksolamin sitrat

Tablo 1. EEG deney sonuçları

Grup	Spike Dalga Yüzdesi
A1-Kontrol	% 0
A2-PTZ (35 mg/kg) + salin plasebo	%75,3±5,02*
A3-PTZ (35 mg/kg) + 10 mg/kg oksolamin sitrat	%35,8±5,9 [#]
A4-PTZ (35 mg/kg) + 20 mg/kg oksolamin sitrat	%28,6±4,1 ^{##}

* $p<0,0001$, Grup A2, Grup A1 ile karşılaştırıldığında

[#] $p<0,01$, Grup A3, Grup A2 ile karşılaştırıldığında

^{##} $p<0,0001$, Grup A4, Grup A2 ile karşılaştırıldığında

Davranış Deneyi Bulguları

Davranış deneyinin sonuçları Oksolamin sitratın sıçan epilepsi modelinde antiepileptik etkiler gösterdiğini de ortaya koydu (Tablo 2 ve 3). Plasebo ile tedavi edilen gruba kıyasla Oksolamin sitrat, RCS skorlarını önemli ölçüde azalttı ve TFMJ süresinde gecikmeye sebep oldu.

Ortalama RCS skorunun 5,7'den (oldukça ağırdır, çünkü 6 skoru ölümcül nöbet aktivitesini gösterir), düşük Oksolamin sitrat dozu ile 4,2'ye ($p<0,001$) düştüğü tespit edildi. Ortalama RCS skoru, daha yüksek Oksolamin sitrat dozu ile de 3,3'e ($p<0,0001$) düştü. Daha düşük Oksolamin dozunun aksine daha yüksek dozdaki Oksolamin ile daha düşük RCS skorlarına yönelik bir eğilim olduğu gözlenmesine rağmen,

iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 2).

Benzer şekilde, Oksolamin hem düşük hem de yüksek dozlarda TFMJ'yi anlamlı düzeyde arttırdı ($p<0,001$, $p<0,0001$). Tedavi almayan salin plasebo B2 grubunda ortalama 62,5 s TFMJ değeri ile karşılaştırıldığında, düşük Oksolamin sitrat dozu ile tedavi gören B3 grubunda TFMJ ortalama değeri 177,5 saniyeye yükselmiştir ($p<0,001$). Yüksek Oksolamin dozu ile tedavi gören B4 grubunda ise, TFMJ ortalama 223,3 saniyeye yükselmiştir ($p<0,0001$). Oksolaminin yine düşük ve yüksek dozu arasındaki ortalama TFMJ süreleri açısından iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 3).

Tablo 2. Oksolamin sitrat ile RCS skoru sonuçları

Grup	Racine'nin Konvülsiyon Skoru (RCS)
B1-Kontrol	0
B2-PTZ (70 mg/kg) + salin plasebo	5,7±0,22*
B3-PTZ (70 mg/kg) + 10 mg/kg oksolamin sitrat	4,2±0,34 [#]
B4-PTZ (70 mg/kg) + 20 mg/kg oksolamin sitrat	3,3±0,25 ^{##}

* $p<0,0001$, Grup B2, Grup B1 ile karşılaştırıldığında

[#] $p<0,001$, Grup B3, Grup B2 ile karşılaştırıldığında

^{##} $p<0,0001$, Grup B4, Grup B2 ile karşılaştırıldığında

Tablo 3. Oksolamin sitrat ile TFMJ süre sonuçları

Grup	İlk miyoklonik jerk zamanı (TFMJ) (saniye)
B1-Kontrol	0
B2-PTZ (70 mg/kg) + salin plasebo	62,5±4,7*
B3-PTZ (70 mg/kg) + 10 mg/kg oksolamin sitrat	177,5±19,03 [#]
B4-PTZ (70 mg/kg) + 20 mg/kg oksolamin sitrat	223,3±31,4 ^{##}

* $p<0,0001$, Grup B2, Grup B1 ile karşılaştırıldığında

[#] $p<0,001$, Grup B3, Grup B2 ile karşılaştırıldığında

^{##} $p<0,0001$, Grup B4, Grup B2 ile karşılaştırıldığında

Tartışma

Bu çalışmada, hem çocuklar hem de yetişkinler için klasik öksürük giderici bir ilaç olarak kullanılan Oksolamin sitrat'ın antiepileptik potansiyelini PTZ ile indüklenen sıçan epilepsi modelinde araştırdık. Nöbet ve öksürük patofizyolojilerinin örtüşen hücrel ve nörokimyasal yollara sahip olduğuna dair var olan ve yeni elde edilen kanıtların varlığı bu çalışmanın temel hedeflerinden birisi oldu (25, 26).

Epilepsi, tıp tarihinde karakterize edilmiş en eski medikal hastalık durumlarından birisidir (27) ve her yaşta bireyi etkileyen en yaygın nörolojik hastalık olmaya da devam etmektedir. Hücrel düzeyde, epilepsinin patogenezi karmaşıktır ve birçok mekanizmayı ihtiva etmektedir (28). Mutasyona uğramış iyon kanalları, eksitator ve inhibitör nörotransmisyon arasındaki hassas dengeyi arttırabildikleri ve böylece nöronların genel uyarılabilirliğini değiştirebildikleri için nöbetlere neden olabilmektedir (29).

Kanallopatilere ek olarak, çeşitli nörotransmitterlerin, özellikle GABA ve glutamatın düzeylerindeki ve

(veya) aktivitelerindeki değişiklikler nöbet eşiğini değiştirebilmektedir. GABA'daki bir azalma veya değişmiş kalsiyum, sodyum, klorür ve potasyum akımlarının yanında GABAerjik presinaptik inhibisyonda bir azalmanın, nöbet başlangıcının yaygın bir nedeni olduğu bilinmektedir (30). N-metil-D-aspartat (NMDA) ve diğer reseptörler aracılığıyla gerçekleşen presinaptik ve postsinaptik glutamat aktivitesi de epileptogenezde önemli rol oynamaktadır (31). Bu nedenlerden ötürü, beynin ana inhibitör nörotransmitteri olan GABA ile ilişkili yollar ve glutamat, antiepileptiklerin ortak hedefleri haline gelmiştir. Örneğin, GABA aracılı inhibisyonu arttıran ilaçlar, klinik olarak bu tür tedavilerle şiddetlenen absans nöbetleri hariç fokal ve genel epilepsinin çeşitli sendromlarını tedavi etmek için kullanılan antiepileptikler olarak işlev görebilmektedir. Hem NMDA hem de non-NMDA Glutamat reseptör antagonistleri aynı zamanda birçok hayvan epilepsi modelinde kullanılan güçlü antiepileptiklerdir (32).

Daha önce de belirtildiği gibi, öksürük ve nöbetler arasında örtüşen hücrel ve nörokimyasal yolların varlığı gözlenmektedir. Öksürük bronkopulmoner refleksler arasında kendine özgü özelliktedir, çünkü eşik düzey düzenlenmesine oldukça bağımlıdır ve refleksin kompresyon fazı sırasında glottisin kapatılmasıyla ayrılan karakteristik olarak artmış inspiratuar ve ekspiratuar efor ortaya koyabilmek adına solunum motor nöronlarında epileptiform benzeri değişimlere gereksinim göstermektedir (25, 33). Yüksek derecede senkronize bir biçimde gerçekleşen bu proses, merkezi ve çevresel olarak meydana gelen etkileşimler tarafından kontrol edilmektedir.

Fizyolojik olarak, öksürük refleksi arkı, vagus siniri içinde sıklıkla üst solunum yolundaki siliyer epitelde başlayan duyuşal sinir liflerinden oluşan afferent yolla başlar. O bölgeden kaynaklanan zararlı bir uyarı, vagus siniri üzerinden, üst beyin sapı ve pons için merkezi bir koordinasyon bölgesi olan merkezi yolağa (öksürük merkezine) doğru hareket eder. Eşik değere ulaşırsa, efferent yolak etkinleştirilir. Öksürük merkezinden koordine edilen impulslar, öksürüğü oluşturmak üzere gırtlak, diyafram, torasik ve abdominal duvarın kaslarını innerve etmek için vagus, frenik ve spinal motor sinirleri içeren birçok sinir vasıtasıyla aşağı yönde hareket etmektedir (34).

Hücrel düzeyde, çoğunlukla miyelinsiz C liflerinden oluşan bronkopulmoner vagal afferentler öksürük refleksini başlatmak üzere akciğerlerde ve hava yolundaki öksürük reseptörleri ile sinerjistik olarak çalışmaktadır. Bu C liflerinin hücre gövdelerinin juguler ganglionda bulunduğu inanılmaktadır (35, 36). Bu vagal afferent lifler, medulla oblongata'nın ventrolateral bölgesinde bulunan ve öksürük için ana kontrol merkezi olarak düşünülebilen nükleus traktus solitarius'ta (NTS) beyin sapı ve ara yüzüne giriş yapar (37, 38). Beyin sapındaki bu özel bölge afferent bilgiyi işler ve öksürük refleksini koordine eder. Bilinçli (istemli) öksürüğü kolaylaştırmak için, bu bölgeyle de ara yüz oluşturan kortikal ve subkortikal yollar vardır (39). NTS'deki nöronların, γ -aminobutirik asit (GABA), N-metil-D-aspartat (NMDA) ve AMPA / KA için reseptörleri ekspres ettikleri bilinmektedir. Bu bölgede, GABA'nın artmış varlığı ve reseptörüne olan bağlanmasının, sinyal iletiminin

inhibisyonu ile sonuçlandığı bilinmektedir, buna karşılık L-glutamat, NMDA ve AMPA / KA reseptörlerine bağlanarak uyarıcı bir rol oynamaktadır (26).

Daha yakın tarihli çalışmalar, NTS ile nöbet aktivitesinin yayılması arasında potansiyel bir ilişki ortaya koymuştur. Epileptik aktivitenin, NTS'ye gömülü glutamaterjik eksitator yollar ve NTS ile çeşitli ön beyin yapıları arasındaki fizyolojik bağlantılar yoluyla NTS üzerinden beynin tamamı boyunca yayılabileceği tespit edilmiştir (40, 41). Daha sonrasında, GABA aktivitesini arttırarak veya NTS'de glutamat bağlanmasını antagonize ederek, fokal veya sistemik stimülasyonla uyarılan limbik motor nöbetlerin baskılandığı gösterilmiştir (26). Başka bir çalışma da, NTS'ye giren afferent liflerin antiepileptik ilaçlarla baskılanabileceğini göstermiştir (40).

Bir Oksadiazol türevi olan Oksolamin (3-fenil-5,8-dietilaminoetil-1,2,4-oksadiazol) antitusif olarak uzun yıllardır kullanılan bir ajandır. Antitusif aktivitesi ağırlıklı şekilde periferik mekanizma üzerinden ortaya çıkmaktadır. Yapılan bazı çalışmaların sonuçları, oksolaminin, bronş ağacındaki inflamatuvar değişikliklerle ilişkili öksürüğü baskılamada, larenksteki duyuşal sinirlerin uyarılmasından kaynaklanan öksürükten daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu görüşlere göre, antitusif etki esas olarak ilacın akciğerdeki yapılar üzerindeki anti-inflamatuvar ve spazmolitik etkisine ve daha az düzeyde de öksürük merkezinin depresyonuna bağlı gerçekleşmektedir. Bu hipotezi doğrulamak için hem klinik hem de farmakolojik daha ileri düzey kanıtlar halen aranmaktadır (19).

Oksadiazol türevlerinin biyolojik aktiviteleri: Oksadiazol çekirdeği, hipnotik, sedatif, antiviral, anti-inflamatuvar, analjezik, anti-konvulsan, anti-bakteriyel, hipoglisemik, antioksidan, genotoksik, antifungal ve insektisit aktiviteler gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyebilen çok yönlü bir farmakofordur (42-50).

Oksadiazol derivelerinin antitusif etkisini esas olarak periferik sinir yapıları üzerinde hafif merkezi sedatif etkileri ile ortaya koyduğu öne sürülmüştür ve öksürük refleksinde yer alan Substans P (SP) aktivitesini modüle etmek suretiyle periferik duyuşal C sinir liflerinin aktivasyonunu regüle ederek öksürüğü önlediğine inanılmaktadır (51). Yapılan başka çalışmalara göre de, mevcut veriler, hem selektif GABA güçlendirici ilaçlar olarak görev yapan oksadiazollerin çift yönlü olarak hem GABA arttırıcı hem de sodyum kanal inhibisyonu mekanizmalarına sahip olmaları nedeniyle güçlü antikonvülzanlar olabileceğini göstermektedir (52). Sadaf Jamal Gilani ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 1,3,4-oksadiazollerin dahil olduğu yeni bir dizi Izoninikotinik asit hidrazitin (INH) anti-konvulsan aktivitesi, farelerde maksimal elektroşok kaynaklı nöbetler (MES) ve subkutan PTZ kaynaklı nöbet modellerinde değerlendirilmiştir. Tüm bileşiklerin standart ilaç olan fenitoinden daha az nörotoksik olduğu ve antikonvülzan etkiler ortaya koydukları gösterilmiştir (53). Afshin Zarghi ve ark. tarafından sentezlenen yeni bir dizi 2-substituted-5-{2-[(2-halobenzyl)thio]phenyl}-1,3,4-oksadiazol türevlerinin

PTZ'ye bağlı ölümcül konvüziyon testleri, sentezlenen bileşiklerin bazılarının önemli antikonvülzan aktiviteye sahip olduklarını ortaya koymuştur (54). Dolayısıyla, antikonvülzan aktivite gösteren tüm türevleri inceleyerek oksadiazol halkasının geçmiş yıllarda araştırıldığını ve epilepsiye karşı kullanılacak yeni ilaçların gelecekteki gelişimi için halen kullanılabileceğini söyleyebilmekteyiz.

Oksolamin sitratın epileptik nöbetler üzerindeki etkisi literatürde daha önce detaylı olarak araştırılmamıştır, ancak bazı oksadiazol türevleri ile az sayıda sınırlı çalışma mevcuttur. Bu az sayıdaki çalışmalara göre, oksadiazollerin GABA arttırıcı etkileri, sodyum kanal inhibisyonu ve substans P aktivitesini baskılamak suretiyle antikonvülzan etkiler ortaya koyabilecekleri gösterilmiştir (52). Çalışmamızda, TFMJ'nin oksolamin uygulamasıyla anlamlı derecede uzadığı benzer antikonvülzan bulgular bildirmekteyiz. EEG verilerimiz, Oksolaminin geçmiş çalışmalar ile karşılaştırıldığında ilk konvülsiyona kadar geçen süreyi doza bağlı bir şekilde artırdığını kanıtlayan yeni bir bulgudur (52). Deneylerimizin bulguları sadece bu önceki veriler için onay sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda dozaj, EEG üzerindeki etkileri ve oksolaminin özellikle PTZ tarafından indüklenen nöbetler üzerindeki etkisi hakkındaki mevcut bilgilerimizi de genişletmektedir. Özetle, bilgimiz dahilinde, çalışmamız hayvan epilepsi modelinde Oksolaminin antiepileptik etkilerine ilişkin ilk ayrıntılı prelinik ve elektrofizyolojik araştırmayı temsil etmektedir. Oksolaminin antiepileptik etkilerine, NTS ve belki de merkezi sinir sisteminin diğer bölgelerindeki SP, GABA ve glutamat nörotransmisyonunun aktivitesini değiştirme kabiliyetinin aracılık ettiğine inanıyoruz.

Sonuç

Çalışmamızda Oksolaminin 10 mg/kg ve 20 mg/kg i.p. dozunda sıçanlarda PTZ ile indüklenen epileptik nöbetleri, EEG analizindeki nöbet aktivitesini ölçülebilir bir şekilde inhibe etmesi, ortalama RCS'de bir azalma ve TFMJ'de uzama gerçekleştirmesi ile birlikte önemli ölçüde azalttığını gösterdik. Düşük Oksolamin dozuna karşın daha yüksek doz uygulaması ile birlikte daha iyi nöbet inhibisyonuna yönelik görülen eğilim, bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmedi. Bulgularımızda Oksadiazol türevi olarak Oksolaminin ortaya konan bu etkileri EEG ve davranış deneyleri düzeyinde kalmakla birlikte gelecek süreçte bu etkilere ilişkin olarak daha detaylı mekanistik çalışmaların da yapılması gerekmektedir. Bu kapsamda ilişkili yolların ortaya tam olarak çıkartılabilmesi adına moleküler düzeyde rol olan genetik süreçlerin ve proteinlerin de değerlendirilmesi kliniğe giden yolda elde edilen bulguları daha da güçlendirecektir. Bununla birlikte farklı Oksadiazol türevlerinin de geliştirilmesi konusunda çalışarak daha spesifik ve güçlü etkiye sahip ajanların kliniğe sunulabilmesi mümkün olabilecektir. Sonuç olarak çalışmamız, Oksadiazol türevlerinin epilepsi için başka hayvan modellerinde nöbet aktivitesinin başlangıcını geciktirebileceğini gösteren önceki kanıtları doğrulamakta ve Oksolaminin antiepileptik bir ilaç olarak işlev görebileceğine dair bulguları desteklemektedir.

Kaynaklar

1. Wyllie E. *Wyllie's Treatment of Epilepsy: Principles and Practice*, sixth edition. Wolters Kluwer Health; 2015.
2. Motamedi G, Meador K. Epilepsy and cognition. *Epilepsy Behav* 2003; 4 (Suppl. 2): 25–38.
3. Schmidt D. Drug treatment of epilepsy: options and limitations. *Epilepsy Behav* 2009; 15: 56–65.
4. Eddy CM, Rickards HE, Cavanna AE. The cognitive impact of antiepileptic drugs. *Ther Adv Neurol Disord* 2011; 4: 385–407.
5. Kanner AM, Schachter SC, Barry JJ, Hesdorffer DC, Mula M, Trimble M, et al. Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence. *Epilepsy Behav*. 2012; 24: 156–168.
6. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. *N Engl J Med* 2003; 349: 1257–66.
7. Cowan LD. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8: 171–181.
8. Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 18284–318.
9. Shin EJ, Jeong JH, Chung YH, Kim WK, Ko KH, Bach JH, et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int* 2011; 59: 122–37.
10. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 345–50.
11. Elger CE, Helmstaedter C, Kurthen M. Chronic epilepsy and cognition. *Lancet Neurol* 2004; 3: 663–72.
12. Curia G, Lucchi C, Vinet J, Gualtieri F, Marinelli C, Torsello A, et al. Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr Med Chem* 2014; 21: 663–88.
13. Kang JQ, Macdonald RL. Making sense of nonsense GABA(A) receptor mutations associated with genetic epilepsies. *Trends Mol Med* 2009; 15: 430–8.
14. Olsen RW, DeLorey TM, Gordey M, Kang MH. GABA receptor function and epilepsy. *Adv Neurol* 1999; 79: 499–510.
15. McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Science Signaling* 2006; 356: re12.
16. Nalivaiko E, Michaud JC, Soubrié P, Le Fur G, Feltz P. Tachykinin neurokinin-1 and neurokinin-3 receptor-mediated responses in guinea-pig substantia nigra: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 1997; 78: 745–57.
17. Liu H, Mazarati AM, Katsumori H, Sankar R, Wasterlain CG. Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5286–91.
18. Penix LP, Thompson KW, Wasterlain CG. Selective vulnerability to perforant path stimulation: role of NMDA and

- non-NMDA receptors. *Epilepsy Res* 1996; Suppl. 12: 63–73.
19. Silvestrini B, Pozzatti C. Pharmacological properties of 3-phenyl-5 β diethylaminoethyl-1, 2, 4-oxadiazole. *Br J Pharmacol Chemother* 1961; 16: 209–17.
20. Erbaş O, Solmaz V, Aksoy D. Inhibitor effect of dexketoprofen in rat model of pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurol Res* 2015; 37: 1096–1101.
21. Kubin L, Alheid GF, Zuperku EJ, McCrimmon DR. Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *J Appl Physiol* 2006; 101: 618–27.
22. Aeby A, Poznanski N, Verheulpen D, Wetzburger C, Van Bogaert P. Levetiracetam efficacy in epileptic syndromes with continuous spikes and waves during slow sleep: experience in 12 cases. *Epilepsia* 2005; 46: 1937–42.
23. Fernández IS, Peters JM, Hadjiloizou S, Prabhu SP, Zarowski M, Stannard KM, et al. Clinical staging and electroencephalographic evolution of continuous spikes and waves during sleep. *Epilepsia* 2012; 53: 1185–95.
24. Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009; 98: 579–86.
25. Canning BJ. Encoding of the cough reflex. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20: 396–401.
26. Walker BR, Easton A, Gale K. Regulation of limbic motor seizures by GABA and glutamate transmission in nucleus tractus solitarius. *Epilepsia* 1999; 40: 1051–7.
27. Epilepsy. World Health Organization. [cited 2019 December 10]. Available from: <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/epilepsy>.
28. Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Köhling R, Biagini G, Pumain R, et al. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol* 2002; 68: 167–207.
29. Mantegazza M, Curia G, Biagini G, Ragsdale DS, Avoli M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 2010; 9: 413–24.
30. Badawy RAB, Harvey AS, Macdonell RAL. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy - part 1. *J Clin Neurosci* 2009; 16: 355–65.
31. Werner FM, Coveñas R. Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy: a focus on antiepileptic drugs. *Curr Med Chem* 2011; 18: 4933–48.
32. Meldrum BS. Neurotransmission in epilepsy. *Epilepsia* 1995; 36 (Suppl. 1): 30–5.
33. Bolser DC, Poliacek I, Jakus J, Fuller DD, Davenport PW. Neurogenesis of cough, other airway defensive behaviors and breathing: A holarchical system? *Respir Physiol Neurobiol* 2006; 152: 255–65.
34. Polverino M, Polverino F, Fasolino M, Andò F, Alfieri A, De Blasio F. Anatomy and neuro-pathophysiology of the cough reflex arc. *Multidiscip Respir Med* 2012; 7(1): 5.
35. Canning BJ, Mori N. Encoding of the cough reflex in anesthetized guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300: 369–77.
36. Coleridge JC, Coleridge HM. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1984; 99: 1–110.
37. Shannon R, Baekey DM, Morris KF, Lindsey BG. Ventrolateral medullary respiratory network and a model of cough motor pattern generation. *J Appl Physiol* 1998; 84: 2020–35.
38. Shannon R, Baekey DM, Morris KF, Li Z, Lindsey BG. Functional connectivity among ventrolateral medullary respiratory neurones and responses during fictive cough in the cat. *J Physiol* 2000; 525(1): 207–24.
39. Canning BJ, Chang AB, Bolser DC, Smith JA, Mazzone SB, McGarvey L, et al. Anatomy and neurophysiology of cough: CHEST Guideline and Expert Panel report. *Chest* 2014; 146(6): 1633–48.
40. Jhamandas JH, Harris KH. Excitatory amino acids may mediate nucleus tractus solitarius input to rat parabrachial neurons. *Am J Physiol* 1992; 263: 324–30.
41. Rutecki P. Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 1990; 31(Suppl 2): 1–6.
42. Havaladar FH, Patil AR. Synthesis of biologically active 3-[4-(4-substituted amino-4-yl-methyl-5-thione[1,3,4]-oxadiazole-2-yl-methoxy)-phenyl]-2-phenyl-3H-quinazolin-4-ones. *Asian J Chem* 2009; 21: 5267–72.
43. Mehta DK, Das R, Dua K. Synthesis, antimicrobial and anti-inflammatory activity of some new 1,3,4-oxadiazoles and 1,3,4-oxadiazole-2-thione derivatives as mannich bases containing furan moiety. *Int J Chem Sci* 2009; 7: 225–34.
44. Nagalakshmi G. Synthesis, antimicrobial and anti-inflammatory activity of 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazoles. *Indian J Pharm Sci* 2008; 70: 49–55.
45. Husaini A, Ahmad FJ, Ajmal M, Ahuja P. Synthesis of 1-(4-phenoxyphenyl)-3-[5-(substituted aryl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]propan-1-ones as safer anti-inflammatory and analgesic agents. *J Serb Chem Soc* 2008; 73: 781–91.
46. George S, Parameswaran MK, Chakraborty AR, Ravi TK. Synthesis and evaluation of the biological activities of some 3-{{[5-(6-methyl-4-aryl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-imino}-1,3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. *Acta Pharm* 2008; 58: 119–29.
47. Mishra AR, Singh DV, Mishra RM. Synthesis and antifungal activity of new 1,3,4-oxadiazolo[3,2-b]-s-triazine-5-ones and their thiones analogues. *Indian J Heterocycl Chem* 2005; 14: 289–92.
48. Girges MM. Synthesis and pharmacological evaluation of novel series of sulfonate ester-containing 1,3,4-oxadiazole derivatives with anticipated hypoglycemic activity. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 490–5.
49. Revanasiddappa BC, Subrahmanyam EVS. Chloramine-T

mediated synthesis of 1,3,4-oxadiazoles. *Orient J Chem* 2009; 25: 707–710.

50. Maslat AO, Abussaud M, Tashtoush H, Al-Taalib M. Synthesis, antibacterial, antifungal and genotoxic activity of bis-1,3,4-oxadiazole derivatives. *Pol J Pharmacol* 2002; 54: 55–9.

51. Borg S, Luthman K, Nyberg F, Terenius L, Hacksell U. 1, 2, 4-Oxadiazole derivatives of phenylalanine: potential inhibitors of substance P endopeptidase. *European journal of medicinal chemistry* 1993; 28(10): 801-10.

52. Lankau HJ, Unverferth K, Grunwald C, Hartenhauer H, Heinecke K, Bernöster K, et al. New GABA-modulating 1,

2, 4-oxadiazole derivatives and their anticonvulsant activity. *European journal of medicinal chemistry* 2007; 42(6): 873-9.

53. Gilani SJ, Alam O, Khan SA, Siddiqui N, Kumar H. Synthesis of some derived thiazolidin-4-one, azetidin-2-one and 1, 3, 4-oxadiazole ring system from isonicotinic acid hydrazide: A novel class of potential anticonvulsant agent. *Der Pharmacia Letter* 2009; 1(2): 1-8.

54. Zarghi A, Hamed S, Tootooni F, Amini B, Sharifi B, Faizi M, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of new 2-substituted-5-{2-[(2-halobenzyl) thio] phenyl}-1, 3, 4-oxadiazoles as anticonvulsant agents. *Scientia Pharmaceutica* 2008; 76(2): 185-202.