



Pentilentetrazol ile Oluşturulan Akut Nöbet Modelinde Diazepamın Nitrik Oksit Sentaz ve Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör Üzerine Etkisinin Araştırılması

Bilal ŞAHİN^{1*}, Handan GÜNEŞ¹

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Bölümü, Sivas, Türkiye

Bilal ŞAHİN ORCID No: 0000-0002-4419-1385

Handan GÜNEŞ ORCID No: 0000-0003-3660-8264

*Sorumlu yazar: bilalsahin@cumhuriyet.edu.tr

(Alınış: 29.09.2021, Kabul: 29.04.2022, Online Yayınlanma: 29.06.2022)

Anahtar Kelimeler

Nöbet,
 Pentilentetrazol
 Diazepam,
 Nitrik Oksit
 Sentaz,
 Beyin Kaynaklı
 Nörotrofik Faktör

Öz: Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan nöbetlerde diazepamın antikonvülzan etkinliğinde nitrik oksit sentaz (NOS) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) üzerine etkisini araştırmaktır. Çalışmada 24 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar kontrol grubu, salin (1 mL kg⁻¹) +PTZ, diazepam (0,5 mg kg⁻¹)+PTZ ve diazepam (2 mg kg⁻¹)+PTZ grubu olarak 4 gruba ayrılmıştır (n=6). İntraperitoneal ilaç uygulamalarından 24 saat sonra biyokimyasal incelemeler için tüm sıçanların beyin dokuları çıkarılıp, korteks ve hipokampus bölgeleri ayrılmıştır. Korteks ve hipokampüsteki NOS ve BDNF düzeyleri enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Diazepam, salin+PTZ uygulanan grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde nöbet evresini azalttı ve ilk miyoklonik jerk (İMJ) süresini uzattı (p<0.001). Salin+PTZ, kontrol grubuna kıyasla hipokampüste NOS seviyelerini anlamlı olarak azalttı (p<0.05). Bununla birlikte diazepam+PTZ grupları, salin+PTZ grubuyla karşılaştırıldığında hipokampal NOS seviyesini anlamlı olarak artırdı (p<0.001). Ayrıca, salin+PTZ grubu kontrolle karşılaştırıldığında korteks ve hipokampüste BDNF seviyesini artırırken (p<0.05), diazepam+PTZ uygulanan gruplarda BDNF seviyesi salin+PTZ grubuna kıyasla düşüktü (p<0.001). Diazepam hipokampüste NOS seviyesini artırmış, korteks ve hipokampüste ise BDNF seviyelerini düşürmüştür. Sonuç olarak, diazepamın NOS ve BDNF üzerine düzenleyici etkisi antikonvülzan etkisiyle ilişkili olabilir.

Investigation of the Effect of Diazepam on Nitric Oxide Synthase and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Pentylene-tetrazole-Induced Acute Seizure Model

Keywords

Seizure,
 Pentylene-tetrazole
 Diazepam,
 Nitric Oxide
 Synthase,
 Brain Derived
 Neurotrophic
 Factor

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of diazepam on nitric oxide synthase (NOS) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the anti-convulsant activity of diazepam on pentylene-tetrazole (PTZ) induced seizures in rats. 24 male Wistar Albino rats were used in the study. Rats were divided into 4 groups as control group, saline (1 mL kg⁻¹) +PTZ, diazepam (0.5 mg kg⁻¹) +PTZ and diazepam (2 mg kg⁻¹) +PTZ group (n=6). For biochemical studies, 24 hours after PTZ application, brain tissues of all rats were removed and cortex and hippocampus regions were isolated. NOS and BDNF levels in the cortex and hippocampus were measured using ELISA kits. Diazepam significantly decreased the seizure stage and prolonged the first myoclonic jerk (IMJ) time compared to the saline group (p<0.001). Saline+PTZ significantly decreased NOS levels in the hippocampus when compared to the control group (p<0.05). However, the diazepam+PTZ groups significantly increased the hippocampal NOS level compared to the saline+PTZ group (p<0.001). In addition, the saline + PTZ group increased the BDNF level in the cortex and hippocampus compared to the control (p<0.05), while the BDNF level was lower in the diazepam+PTZ group compared to the saline+PTZ group (p<0.001). Diazepam increased NOS levels in the hippocampus and decreased BDNF levels in the cortex and hippocampus. In conclusion, the regulatory effect of diazepam on NOS and BDNF may be related to its anti-convulsant mechanisms.

1. GİRİŞ

Nöbet, merkezi sinir sisteminde belirli bir işlevi olan nöron topluluğunun ani, anormal ve hipersenkron deşarjları sonucu ortaya çıkmaktadır [1]. Nöbet oluşumu motor aktivitede, davranışlarda ve bilinç düzeyinde değişimlere yol açabilmektedir [2]. Epileptik nöbet için oluşturulan hayvan modelleri, nöbetlerin temel mekanizmalarının anlaşılması için önem arz etmektedir [3].

Pentilentetrazol (PTZ), GABA_A klorür iyonofor kompleksinin seçici bir antagonistidir. PTZ, GABA aracılı transmisyonu bloke ederek nöbet aktivitesini stimüle etmektedir [4]. PTZ ile oluşturulan farklı nöbet modelleri, anti-epileptik ilaç geliştirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [5]. Benzodiazepinler epileptik nöbetlerin tedavisinde kullanılan önemli bir ilaç grubudur [6]. Klasik olarak, benzodiazepinler GABA_A reseptörü/kanalındaki benzodiazepin bağlama bölgesi aracılığıyla etki ederler ve klorür akışının artmasına ve nöronal membran potansiyelinin ve uyarılabilirliğinin (eksitabilite) azalmasına neden olurlar [7]. Benzodiazepinlerin GABA_A reseptörü üzerindeki bağlanma yeri iyi bilinmesine rağmen [8], bu ilaç gruplarının antikonvülzan etki mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır.

Nitrik oksit (NO), bir enzim ailesi olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arginin'den sentezlenen ve guanilil siklazı güçlü bir şekilde uyarıcı, ikinci haberci cGMP seviyelerinin artmasına neden olan ve serbest radikale dönüşebilen bir gazdır. NO/cGMP sinyal yolağı, merkezi sinir sisteminde nörotransmitter/nöromodülatör olarak kilit rol oynar [9]. Literatürde, nitrik oksitin nöbetlerin türüne ve ilgili diğer nörotransmitter sistemlerine bağlı olarak antikonvülzan [10,11] ve prokonvülzan [3,12,13] etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, benzodiazepinlerin hipnotik [14], antinosiseptif [15] ve antikonvülzan [16] etkilerini NO'ı modüle ederek gösterebileceği öngörülmüştür.

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin ailesinin bir üyesidir ve nöronal gelişim ve sinaptik plastisitede önemli rol oynamaktadır [17]. Epilepsi ve BDNF arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalarda, limbik nöbetlere katılan beyin bölgelerinde nöbet sonrası BDNF ekspresyonunun büyük ölçüde arttığı gösterilmiştir [18,19]. Ayrıca, nöbetlerden sonra hipokampal piramidal hücrelerde BDNF artışı tespit edilmiştir [20]. Buna ek olarak, BDNF'nin eksitabiliteyi artırdığı ve epileptogenezde rol oynadığı [21], BDNF sinyal transdüksiyonunun engellenmesinin ise epilepsi odağının gelişmesini inhibe ettiği gösterilmiştir [22].

Diazepamın antikonvülzan etkinliği ve olası mekanizmaları üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır [23,24]. Fakat PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde diazepamın NOS ve BDNF düzenlenmesi üzerine etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada amacımız, sıçanlarda PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde diazepamın kortikal ve hipokampal NOS ve BDNF üzerine etkisini araştırmaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Deneysel Hayvanları

Bu çalışmada erişkin 24 adet erkek Wistar Albino sıçan (220-240 g) kullanıldı. Sıçanlar 22±1 °C oda sıcaklığında 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusunun sağlandığı, sestem yalıtılmış odada ve %55±6 oranda nemli ortamda tutuldu ve uygun oranda beslenmeleri sağlandı. Deneysel uygulaması 09.00-15.00 saatleri arasında gerçekleştirildi ve deney ortamının ışık ile ses düzeyi sürekli kontrol altında tutuldu. Bu çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının onayı ile yapıldı (Karar No: 65202830-050.04.04-512).

2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Pentilentetrazol ve diazepam (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, ABD) üretici firmadan temin edildi. Kimyasallar serum fizyolojik (1 ml kg⁻¹) içinde çözülerek sıçanlara enjekte edildi.

2.3. Deneysel Protokolü

Çalışmada yer alan 24 sıçan her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu: Sıçanlara 1 ml kg⁻¹ dozda serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.

Salin+PTZ grubu: Sıçanlara PTZ (45 mg kg⁻¹, i.p) ile nöbet indüklenmesinden 30 dakika önce 1 ml kg⁻¹ dozda serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.

Diazepam (0,5 mg kg⁻¹+PTZ grubu: Sıçanlara PTZ (45 mg kg⁻¹, i.p) ile nöbet indüklenmesinden 30 dakika önce 0,5 mg kg⁻¹ diazepam i.p olarak uygulandı [25].

Diazepam (2 mg kg⁻¹) +PTZ grubu: Sıçanlara PTZ (45 mg kg⁻¹, i.p) ile nöbet indüklenmesinden 30 dakika önce 2 mg kg⁻¹ diazepam i.p olarak uygulandı [25].

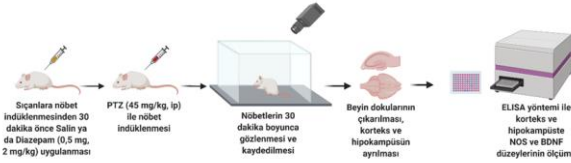
Nöbet modeli oluşturmak için sıçanlara önceki çalışmalardan referans alınarak 45 mg kg⁻¹ 'lık (1 mL kg⁻¹ hacim içerisinde) tek doz PTZ i.p olarak uygulandı [26]. Enjeksiyon sonrası hayvanlar üstü açık şeffaf pleksiglas (50x40x40 cm boyutlarında) kafeslere konuldu ve hayvanların davranışları 30 dakika boyunca gözlemlendi. Nöbet evresi modifiye Racine konvülsiyon ölçeğine (RS) göre belirlendi. Nöbet aşamaları RS'a göre şu şekilde tanımlandı: 0=konvülsiyon yok; 1=bıyık seğirmesi; 2=daha belirgin seğirme ile motor arrest; 3=miyoklonik seğirmeler; 4=düşme olmaksızın tonik-klonik nöbet; 5=düşme ile tonik-klonik nöbet; 6=vahşi sıçramalar ile tonik-klonik nöbet ve 7=ölümcül nöbet. [26]. Bununla birlikte, sıçanların PTZ sonrası ilk miyoklonik jerk (İMJ) süreleri belirlendi (Şekil 1).

2.4. NOS ve BDNF Düzeylerinin Ölçümü

Hayvanların beyin dokusu örnekleri (korteks ve hipokampus bölgesi) soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi (pH 7.4) içinde homojenize edildi ve 12000 g'de 10 dakika boyunca 4 °C de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar NOS ve BDNF düzeylerinin ölçülmesi için -80 °C saklandı. Beyin süpernatantlarından NOS ve BDNF düzeylerinin belirlenmesinde ELISA ticari kiti (Sunredbio, Çin) kullanıldı. İşlem protokolleri, üreticinin talimatlarına göre yapıldı. Örneklerdeki toplam protein seviyelerini belirlemek için bir Bradford total protein ölçüm kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı [27].

2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm deneysel sonuçlar ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SH) olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz için SPSS istatistik programı (SPSS 23.0 for windows) kullanıldı. Veriler normal dağılıma uygunluk gösterdiğinden dolayı verilerin gruplar arası karşılaştırılması için varyans analizi (One way ANOVA), gruplar arası farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Tukey HSD (post-hoc test) ile tespit edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde tanımlandı.

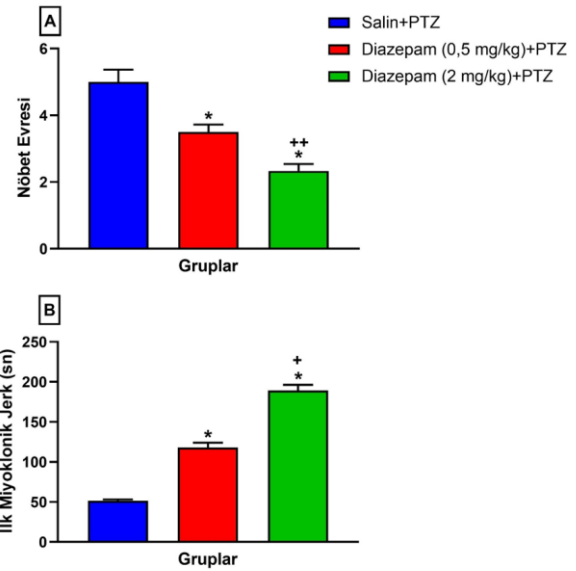


Şekil 1. Deney protokolü (BioRender.com lisanslı uygulaması kullanılarak oluşturulmuştur)

3. BULGULAR

3.1. Diazepamın Nöbet Parametreleri Üzerine Etkisi

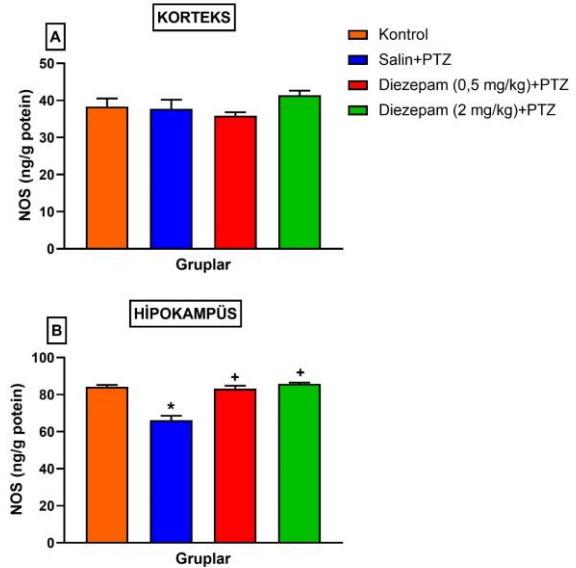
Bu çalışmada, nöbet parametreleri, sıçanlara PTZ enjeksiyonundan sonra video kayıtları kullanılarak belirlendi. Şekil 2A'da gösterildiği gibi, diazepam+PTZ gruplarında nöbet evreleri salin+PTZ grubundaki hayvanlara göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.001$; Şekil 2A). Ayrıca, İMJ süreleri diazepam uygulanan sıçanlarda salin+PTZ grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.001$; Şekil 2B).



Şekil 2. Diazepamın sıçanlarda (n = 6) RS (A) ve İMJ (B) üzerine etkileri. Değerler ortalama \pm SH olarak verilmiştir. * $p < 0.001$, salin+PTZ grubu ile karşılaştırıldığında; + $p < 0.01$, ++ $p < 0.001$ Diazepam (0,5 mg kg⁻¹) +PTZ grubu ile karşılaştırıldığında.

3.2. Diazepamın Korteks ve Hipokampüste NOS ve BDNF Seviyeleri Üzerine Etkisi

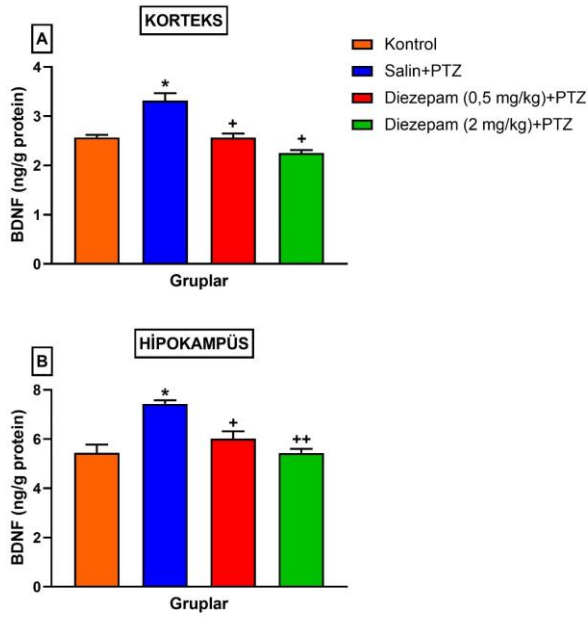
Diazepamın nöbet sonrası kortikal NOS seviyeleri üzerine etkisi incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$; Şekil 3A). Hipokampüste ise salin+PTZ grubunda kontrol grubuna göre NOS seviyeleri azaldı ($p < 0.001$; Şekil 3B). Diazepam+PTZ gruplarında ise salin+PTZ grubuna göre NOS seviyeleri arttı ($p < 0.001$; Şekil 3B).



Şekil 3. Diazepamın sıçanlarda (n = 6) nöbet sonrası kortikal (A) ve hipokampal (B) NOS seviyeleri üzerine etkileri. Değerler ortalama \pm SH olarak verilmiştir. * $p < 0.001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. + $p < 0.001$ salin+PTZ grubu ile karşılaştırıldığında.

PTZ ile nöbet indüklenen grupta kontrol grubuna göre hipokampus ve kortekste BDNF seviyesinde anlamlı olarak artış görüldü ($p < 0.001$). Diğer yandan, diazepamın farklı dozları PTZ grubuna kıyasla kortekste BDNF seviyesinin düşmesine neden oldu ($p < 0.001$; Şekil 4A). Benzer şekilde diazepamın 0,5 mg kg⁻¹ ve 2 mg kg⁻¹

dozları hipokampüste BDNF seviyelerini anlamlı olarak azalttığı görüldü ($p<0.01$, $p<0.001$; Şekil 4B).



Şekil 4. Diazepamın sıçanlarda (n = 6) nöbet sonrası kortikal (A) ve hipokampal (B) BDNF seviyeleri üzerindeki etkileri. Değerler ortalama \pm SH olarak verilmiştir. * $p<0.001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. + $p<0.01$ ve ** $p<0.001$ salin+PTZ grubu ile karşılaştırıldığında.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde diazepamın korteks ve hipokampüste NOS ve BDNF üzerine etkileri araştırılmıştır. Diazepam nöbet sonrası kortikal NOS düzeylerine etki etmezken, hipokampal NOS seviyesini düşürmüştür. Buna ek olarak, diazepam uygulaması nöbet sonrası korteks ve hipokampüste artış gösteren BDNF seviyelerini düşürmüştür.

Sıçanlarda PTZ ile oluşturulan deneysel nöbet modellerinde PTZ'nin 45 mg kg^{-1} akut enjeksiyonu miyoklonik jerk, klonus ve tonik-klonik kasılmalara neden olarak jeneralize nöbetlere yol açmaktadır [26,28]. Gholipour ve arkadaşları intravenöz PTZ enjeksiyonu ile oluşturdukları nöbet modelinde diazepamın klonik nöbete giriş süresini artırdığını belirtmişlerdir [29]. Benzer şekilde diazepam; sıçanlarda pilokarpinle indüklenen status epilepticus modelinde toplam nöbet süresini azaltırken nöbete giriş süresini artırmıştır [30]. Mevcut çalışmada antikonvülzan özelliği bilinen diazepam, PTZ (45 mg kg^{-1}) ile oluşturulan nöbet modelinde nöbet evrelerinin azalmasına ve İMJ süresinin uzamasına neden olmuştur. NO sinir sistemi için önemli bir nöromedyatördür, hipokampus başta olmak üzere beyin birçok bölgesinde nöronal hücrelerde NOS tarafından L-arjininin L-sitrüline dönüştürülmesi sırasında oluşmaktadır [31]. PTZ ile oluşturulan nöbetlerde farklı beyin bölgelerinde NO miktarının arttığı gösterilmiştir [32]. NO ve epilepsi arasındaki ilişkiyi açıklayan çok sayıda farklı çalışmada NO hem prokonvülsan hem de antikonvülzan özellik göstermektedir [3, 33]. PTZ ile oluşturulan nöbet modellerinde nöbet sonrası korteks ve hipokampüsteki NO düzeylerindeki değişimler ile ilgili farklı sonuçlar bulunmaktadır. Naziroğlu ve arkadaşları

yaptıkları çalışmada PTZ ile indüklenen akut nöbet modelinde nöbetten sonra kortikal NO seviyesinin değişmediğini belirtmişlerdir [34]. Buna karşılık, Taşkıran ve arkadaşları ise PTZ ile oluşturulan nöbet sonrası hipokampus ve kortekste PTZ uygulamasının nNOS, iNOS ve NO seviyelerini yükselttiğini, diazepamın ise bu değerleri düşürdüğünü tespit etmişlerdir [26]. Farklı bir çalışmada ise PTZ ile oluşturulan tonik klonik nöbetler sonrasında frontal kortekste nNOS düzeyi artmış, iNOS ve eNOS değişiklik göstermemiş; hipokampal nNOS, iNOS ve eNOS ekspresyonu ise azalmıştır [35]. Benzer şekilde Mazhar ve arkadaşları PTZ ile oluşturulan tutuşma modelinde nöbet sonrası NOS ekspresyonunun arttığını, diazepam uygulamasının ise NOS seviyesini düşürdüğünü belirtmişlerdir [36]. Öte yandan, diazepamın anksiyolitik etkilerini gösteren çalışmada kortikal ve hipokampal NOS üzerine etkisi olmadığı bulunmuştur [37]. Çalışmamızda ise PTZ ile oluşturulan nöbetler sonrası kortekste gruplar arası NOS seviyesinde değişiklik görülmemiştir. Bununla birlikte hipokampüste PTZ grubunda NOS seviyesinin düştüğü görülmüştür. Bunun nedeni epileptik nöbetlere bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres olabilir. Hipokampüste yer alan NMDA reseptörlerinin kortekse göre aşırı aktivasyonu sonucu hücre içine aşırı kalsiyum girişi reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu oksidatif ürünlerin hipokampüste NOS ile reaksiyonu sonucu oksidatif peroksit ürünleri oluşturarak [38] NOS seviyesinin düşmesine neden olmuş olabilir. Diazepam ise hipokampüste nöbete bağlı azalan NOS seviyelerini artırmıştır. Diazepam oksidatif stres belirteçlerinin azalmasına neden olarak hipokampüste NOS seviyesini artırmış olabilir.

BDNF, merkezi sinir sisteminde görev alan büyüme faktörlerinden biridir [39] ve beyin plastisitesinde önemli yere sahiptir [40]. Yapılan deneysel çalışmalar BDNF'nin nöbet oluşumu ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur [41]. Farklı epilepsi modellerinde BDNF ekspresyonunun arttığı görülmüştür [42-44]. Benzer şekilde farelerde PTZ ile oluşturulan nöbet modelinde nöbet sonrası BDNF seviyesi yüksek bulunmuştur [45]. Bunun aksine Şahin ve arkadaşları kainik asid ve PTZ ile oluşturdukları nöbet modellerinde nöbet sonrası BDNF seviyesinin azaldığını göstermişlerdir [46]. Benzer şekilde benzodiazepinlerin hipokampüste etki mekanizmasını araştıran bir çalışmada diazepamın BDNF seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir [47]. Bu çalışmadan farklı olarak Regner ve arkadaşları PTZ ile oluşturulan tutuşma modelinde nöbet sonrası diazepam uygulan grubun PTZ grubuna göre kortikal ve hipokampal BDNF seviyeleri üzerine etki etmediğini belirtmişlerdir [48]. Çalışmamızda ise PTZ ile oluşturulan nöbet sonrasında korteks ve hipokampüste BDNF seviyesinin arttığı tespit edildi. Diazepam uygulaması ise hipokampal ve kortikal BDNF seviyelerini düşürdü.

5. SONUÇ

Diazepam, PTZ ile oluşturulan nöbet sonrası nöbet evrelerinin azalmasına ve ilk miyoklonik jerk süresinin artmasına neden olmuştur. Ayrıca diazepam, nöbet sonrası kortikal NOS seviyesi üzerine etki göstermezken hipokampal NOS seviyesini artırmıştır. Hipokampüste ve kortekste nöbet sonrası artan BDNF seviyeleri diazepam uygulaması sonrası düşmüştür. Diazepamın, NOS ve BDNF üzerine düzenleyici etkisi antikonvülzan etkisi ile bağlantılı olabilir. Ancak, bu hipotezin kanıtlanabilmesi için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- [1] Thomas R. Browne, Gregory L. Holmes. Epilepsy: Definitions and Background. Hanbook of Epilepsy. Third edition. USA; 2004. p. 6-7.
- [2] Baykan B, Bebek N, Candan Gürses, Gökyiğit A. Epilepsi. Ed: Öge AE, Baykan B. Nöroloji. 2.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. s. 279-309.
- [3] Gunes H, Ozdemir E, Arslan. Coenzyme Q10 increases absence seizures in WAG/Rij rats: The role of the nitric oxide pathway. Epilepsy Res. 2019 Aug; 154:69-73.
- [4] Zienowicz M, Wisłowska A, Lehner M. The effect of fluoxetine in a model of chemically induced seizures behavioral and immunocytochemical study. NeurosciLett. 2005; 373(3):226-231.
- [5] E. Erkeç, O. Arihan. Pentylene-tetrazole kindling epilepsy model, Epilepsi. 2015; 21 (1): 6-12.
- [6] Meierkord H, Boon P, Engelsens B, Gocke K, Shorvon S, Tinuper Holtkamp M. EFNS guideline on the management of status epilepticus. Eur. J. Neurol. 2006;13: 445-450.
- [7] Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Mohler H, Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid (A) receptor subtypes. Nature.1999; 401:796-800.
- [8] Hanson SM, Czajkowski C. Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. J. Neurosci. 2008; 28:3490-3499.
- [9] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 1991; 43: 109-142.
- [10] Nidhi G, Balakrishnan S, Pandhi P. Role of nitric oxide in electroshock and pentylene-tetrazole seizure threshold in rats. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 1999;21: 609-612.
- [11] Rajasekaran K, Jayakumar R, Venkatachalam K. Increased neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity triggers picrotoxin-induced seizures in rats and evidence for participation of nNOS mechanism in the action of antiepileptic drugs. Brain Res. 2003; 979: 85-97.
- [12] Lizasoain I, Knowles RG, Moncada S. Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in rat forebrain slices. J. Neurochem.1995; 64: 636-642.
- [13] Nidhi G, Balakrishnan S, Pandhi P. Role of nitric oxide in electroshock and pentylene-tetrazole seizure threshold in rats. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.1999; 21: 609-612.
- [14] Talarek S, Fidecka S. Involvement of nitricoxidergic system in the hypnotic effects of benzodiazepines in mice. Pol. J. Pharmacol. 2004;56: 719-726.
- [15] Jimenez-Velazquez G, Lopez-Munoz FJ, Fernandez-Guasti A. Participation of the GABA/benzodiazepine receptor and the NO-cyclicGMP pathway in the "antinociceptive-like effects" of diazepam. Pharmacol. Biochem. Behav. 2008; 91:128-133.
- [16] Talarek S, Fidecka S. Role of nitric oxide in anticonvulsant effects of benzodiazepines in mice. Pol. J. Pharmacol. 2003; 55: 181-191.
- [17] Lee FS, Chao MV. Neurotrophic factors. Neural Sciences. 2008; 1: 96-102.
- [18] Dugich-Djordjevic MM, Peterson C, Isono F, Widmer HR, Denton TL, Bennett GL, Hefti F. Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. European Journal of Neuroscience. 1995; 7: 1831-1839.
- [19] Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, Rosenthal A, Winslow JW. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. Science. 1990; 250: 290- 294.
- [20] Huntley GW, Benson DL, Jones EG, Isackson PJ. Developmental expression of brain derived neurotrophic factor mRNA by neurons of fetal and adult monkey prefrontal cortex. Brain Research Developmental Brain Research. 1992;70: 53-63.
- [21] Nawa H, Carnahan J, Gail C. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. European Journal of Neuroscience. 1995; 7: 1527- 1535.
- [22] Wetmore C, Cao Y, Pettersson RF, Olson L. Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and interneuronal transfer as visualised with antipeptide antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991;88: 9843-9847.
- [23] Ochoa JG, Kilgo WA. The Role of Benzodiazepines in the Treatment of Epilepsy. CurrTreat Options Neurol 2016; 18:1-11. <https://doi.org/10.1007/S11940-016-0401-X>.
- [24] Pitkänen A, Kharatishvili I, Narkilahti S, Lukasiuk K, Nissinen J. Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat. Epilepsy Res 2005; 63:27-42. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2004.10.003>.
- [25] Albertson TE, Peterson SL, Stark LG. The anticonvulsant effects of diazepam and phenobarbital in prekindled and kindled seizures in rats. Neuropharmacology 1981; 20:597-603.
- [26] Taskiran AS, Tastemur Y. The role of nitric oxide in anticonvulsant effects of lycopene supplementation on pentylene-tetrazole-induced epileptic seizures in rats. Exp Brain Res. 2021;239(2):591-599.
- [27] Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. J Vis Exp. 2010; 12(38):1918.
- [28] Sefil F, Kahraman I, Dokuyucu R, Gokce H, Ozturk A, Tutuk O, Aydin M, Ozkan U, Pinar N.

- Ameliorating effect of quercetin on acute pentylenetetrazole induced seizures in rats. *Int J Clin Exp Med.* 2014 Sep 15;7(9):2471-7.
- [29] Gholipour T, Rasouli A, Jabbarzadeh A, Nezami BG, Riazi K, Sharifzadeh M, Dehpour AR. The interaction of sildenafil with the anticonvulsant effect of diazepam. *Eur J Pharmacol.* 2009 Sep 1;617(1-3):79-83.
- [30] Mante PK, Adongo DW, Woode E. Anticonvulsant effects of antiaris toxicaria aqueous extract: investigation using animal models of temporal lobe epilepsy. *BMC Res Notes.* 2017; 10: 167.
- [31] Ferraro G, Sardo P. Nitric oxide and brain hyperexcitability. *In Vivo.* 2004; 18:357–36615.
- [32] Watanabe M, Miyai A, Danjo S, Nakamura Y, Itoh K. The threshold of pentylenetetrazole-induced convulsive seizures, but not that of nonconvulsive seizures, is controlled by the nitric oxide levels in murine brains. *Exp Neurol.* 2013; 247:645-52.
- [33] Gotti S, Sica M, Viglietti-Panzica C, Panzica G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the Mouse brain. *Microsc Res Tech.* 2005;68(1):13-35.
- [34] Naziroğlu M, Kutluhan S, Yilmaz M. Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *J Membr Biol.* 2008 Sep-Oct;225(1-3):39-49.
- [35] Kapucu A. Effect of erythropoietin on nitric oxide synthase types in the hippocampus and frontal cortex in ptz induced seizure in rats. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine.* 2019;82(2):107-115.
- [36] Mazhar F, Malhi SM, Simjee SU. Comparative studies on the effects of clinically used anticonvulsants on the oxidative stress biomarkers in pentylenetetrazole-induced kindling model of epileptogenesis in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2017 Jan 1;28(1):31-42.
- [37] Volke V, Soosaar A, Kõks S, Vasar E, Männistö PT. L-Arginine abolishes the anxiolytic-like effect of diazepam in the elevated plus-maze test in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998 Jun 26;351(3):287-90.
- [38] Standaert DG. NMDA receptors and nitric oxide synthase. *Nature.* 1999; 4:13-14.
- [39] Lucini C, D'Angelo L, Cacialli P, Palladino A, de Girolamo P. BDNF, brain, and regeneration: Insights from zebrafish. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(10): 3155.
- [40] Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev.* 2012;64(2):238-58.
- [41] Hong Z, Li W, Qu B, Zou X, Chen J, Sander J, et al. Serum brain derived neurotrophic factor levels in epilepsy. *Eur J Neurol* 2014;21(1): 57-64.
- [42] Altar CA, Whitehead RE, Chen R, Wörtwein G, Madsen TM. Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol Psychiatry.* 2003; 54(7): 703-9.
- [43] Falcicchia C, Paolone G, Emerich DF, Lovisari F, Bell WJ, Fradet T, et al. Seizure-suppressant and neuroprotective effects of encapsulated BDNF-producing cells in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018; 9: 211-24.
- [44] Porcher C, Medina I, Gaiarsa J-L. Mechanism of BDNF modulation in GABAergic synaptic transmission in healthy and disease brains. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 273.
- [45] Malhi SM, Jawed H, Hanif F, Ashraf N, Zubair F, Siddiqui BS, Begum S, Kabir N, Simjee SU. Modulation of c-Fos and BDNF protein expression in pentylenetetrazole-kindled mice following the treatment with novel antiepileptic compound HHL-6. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:876712.
- [46] Şahin S, Gürgen SG, Yazar U, İnce İ, Kamaşak T, Acar Arslan E, Diler Durgut B, Dilber B, Cansu A. Vitamin D protects against hippocampal apoptosis related with seizures induced by kainic acid and pentylenetetrazol in rats. *Epilepsy Res.* 2019 Jan; 149:107-116.
- [47] Licata SC, Shinday NM, Huizenga MN, Darnell SB, Sangrey GR, Rudolph U, Rowlett JK, Sadri-Vakili G. Alterations in brain-derived neurotrophic factor in the mouse hippocampus following acute but not repeated benzodiazepine treatment. *PloS One.* 2013 Dec; 19:8(12): e84806.
- [48] Regner GG, Torres ILS, de Oliveira C, Pflüger P da Silva LS, Scarabelot VL, Ströher R, de Souza A, Fregni F, Pereira P. Transcranial direct current stimulation (tDCS) affects neuroinflammation parameters and behavioral seizure activity in pentylenetetrazole-induced kindling in rats. *Neurosci Lett.* 2020 Sep 14; 735:135162.