



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA BİLKENT ŞEHİR HASTANESİ**

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI KLİNİĞİ

**LAKOZAMİD KRONİK KULLANIMININ ERİTROSİT
DEFORMABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Dilan YEŞİLOĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2024



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA BİLKENT ŞEHİR HASTANESİ**

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI KLİNİĞİ

**LAKOZAMİD KRONİK KULLANIMININ ERİTROSİT
DEFORMABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Dilan YEŞİLOĞLU

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Hamit ÖZYÜREK**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2024

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve uzmanlık eğitimim sürecinde bilgisini, tecrübesini, desteğini ve anlayışını esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Hamit ÖZYÜREK’e,

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince en iyi şekilde yetişebilmem için mesleki bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, eğitimime değerli katkıları bulunan başta Prof. Dr. Emine Dibek MISIRLIOĞLU olmak üzere tüm hocalarıma,

Tezimin her aşamasında yardımlarını bir an bile esirgemeyen sayın Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Meltem SEVGİLİ hocama ve kıymetli asistanları Hakan DİNÇ ve Pelin ASLAN’a,

Lise yıllarında yollarımızın kesiştiği o günden beri acı tatlı her zaman yanımda oldukları gibi tez sürecimde de desteklerini hiç eksik etmeyen dostlarım Şebnem AYDOĞDU BOĞA ve Pınar ÖZUFACIK’a,

Yıllar sonra hayatıma giren ve her koşulda desteği ve çözüm önerileri ile yanımda olan canım arkadaşım, kardeşim Buket YEŞİLOĞLU’na,

Asistanlık sürecimin en güzel kazancı olan, bu süreci benim için güzelleştiren, zorlu şartları bile sayelerinde güzel hatırlayabildiğim sevgili arkadaşlarım Betül ARIKAN, Hande VARLIKLI KARAÇOBAN, Gözde ÖZÇELİK’e,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, koşulsuz ve sonsuz sevgileri ile kalbimi sarıp sarmalayan, her koşulda yanımda olan ve varlıklarından her zaman büyük bir gurur ve güven duyduğum canım annem Bedriye KARŞIYAKA ve canım babam Ali Necdet KARŞIYAKA’ya,

Bu süreçte ailemize katılan ve kalbimizi sevgisiyle doldurup taşıran, evimizin neşesi, dünyalar tatlısı canım oğlum Kaju’ya,

Hayatımdaki tüm zorları kolaylaştıran, sabrı ve şefkati ile tüm yaralarımı saran, içten sevgisi ile içimdeki neşe ve gözümdeki ışığın mimarı, bana tüm yolları güzelleştiren yol arkadaşım, dünyadaki en büyük mutluluğum, şansım, canım eşim Cem YEŞİLOĞLU’na

Sonsuz teşekkürler...

Dr. Dilan YEŞİLOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER.....	iv
TABLolar	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. HEMOREOLOJİ.....	3
2.1.1. Tam Kan Viskozitesi	3
2.1.2. Plazma Viskozitesi	4
2.1.3. Kayma Stresi ve Kayma Hızı	4
2.1.4. Hematokrit	5
2.1.5. Eritrosit Deformabilitesi	5
2.2. OSMOTİK FRAJİLİTE TESTİ	7
2.3. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMLERİ	7
2.4. KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRLERİ	9
2.5. LAKOZAMİD.....	11
2.6.1. Lakozamidin Yan Etkileri	12
3. GEREÇ YÖNTEM.....	13
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	13
3.2. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	15
4. BULGULAR	16
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	38
7. KAYNAKÇA	39
8. ÖZGEÇMİŞ	42
9. EKLER.....	43
EK-1: ETİK KURUL ONAYI	43

KISALTMALAR

3LAC	: 3 mg/kg/g lakozamid verilen deney grubu
10LAC	: 10 mg/kg/g lakozamid verilen deney grubu
30LAC	: 30 mg/kg/g lakozamid verilen deney grubu
CA	: Karbonik Anhidraz
CARP	: Karbonik Anhidraz İlişkili Protein
CO₂	: Karbondioksit
CRMP2	: Collapsine Response Mediator Protein 2
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
HCO₃	: Bikarbonat
NaCl	: Sodyum Klorür
OFT	: Osmotik Frajilite Testi

ŞEKİLLER

Şekil 1:	CA II kristal yapısı	9
Şekil 2:	Osmotik Frajilite Testi Hemoliz-Konsantrasyon Eğrisi.....	15
Şekil 3:	Osmotik Frajilite Testi Veri Seti	15
Şekil 4:	Çalışmaya dahil ediliş sırasında bakılan ilk ağırlıklar açısından grupların karşılaştırılması.....	17
Şekil 5:	Çalışmaya dahil ediliş sırasında bakılan ilk kan şekeri değerleri açısından grupların karşılaştırılması	18
Şekil 6:	Deney sonunda bakılan ağırlıklar açısından gruplar karşılaştırılması	19
Şekil 7:	Deney sonunda bakılan kan şekeri değerleri açısından grupların karşılaştırılması	20
Şekil 8:	Hematokrit değerleri açısından grupların karşılaştırılması	21
Şekil 9:	Tam kan viskozitesi değerleri açısından grupların karşılaştırılması	24
Şekil 10:	Plazma viskozitesi değerleri açısından grupların karşılaştırılması	25
Şekil 11:	Ozmotik frajilite katsayısı açısından grupların karşılaştırılması.....	26
Şekil 12:	Hemolizdeki maksimum değişim yüzdeleri açısından grupların karşılaştırılması	27
Şekil 13:	Hemolizdeki maksimum değişime sebep olan konsantrasyon değerleri açısından grupların karşılaştırılması	28
Şekil 14:	Maksimum hemolize sebep olan konsantrasyon değerleri açısından grupların karşılaştırılması	29
Şekil 15:	Eritrositlerin hemolizinin başladığı ilk konsantrasyon değerleri açısından grupların karşılaştırılması	30
Şekil 16:	%90'ın üzerinde hemolize sebep olan konsantrasyon değerleri açısından grupların karşılaştırılması	31
Şekil 17:	Grupların konsantrasyona göre hemoliz yüzdeleri farkının ortalamalarının dağılımı	32
Şekil 18:	Grupların konsantrasyona göre hemoliz yüzdeleri ortalamalarının dağılımı	32

TABLÖLAR

Tablo 1: Çalışma grubunun tanımlayıcı parametreleri	16
Tablo 2: Sürekli verilerin ortalama ve standart sapmaları	22
Tablo 3: Kesikli verilerin ortanca ve minimum-maksimum değerleri.....	22
Tablo 4: Çalışma grubunun istatistiksel analizi	23



ÖZET

Giriş ve Amaç: Nöronal hücre uyarılmasında etkisi bilinen karbonik anhidraz (CA) izoenzimleri, yeni antiepileptik ilaçların geliştirilmesindeki hedeflerden birisidir. Eritrositlerde CA izoenzimlerinden I ve II baskın olarak bulunur ve bu enzimler, hemoglobinin dışı proteinlerin %20'den fazlasını oluşturur. CA I, II ve IV, eritrosit membranındaki HCO_3^- taşıyıcısıyla fiziksel olarak ilişkilidir ve bu taşıyıcıların aktivitelerini düzenler. Lakozamid üçüncü kuşak bir antiepileptik ilaçtır ve CA inhibisyonu etkisine sahip olduğu ve bu etkisini enzimin çinko bağlanma bölgesine müdahale ederek gösterdiği kabul edilmektedir. Dolayısıyla bu inhibitör etki ile lakozamidin eritrosit deformabilitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olabileceği düşünülebilir. Literatürde bu konuda deneysel veya klinik bir çalışma bulunamamıştır. Bu çalışmada lakozamid kronik kullanımının, olası eritrosit CA enzim inhibisyonu üzerinden hemoreolojik etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Yöntem: Otuz adet prepubertal dişi Sprague Dawley cinsi sıçan kontrol grubu (n=6) ve ilaç gruplarına (üç doz grubu n=8) randomize dağıtılarak 4 gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol (distile su, 21 gün, oral), 3LAC (3 mg/kg/g, 21 gün, oral), 10LAC (10 mg/kg/g, 21 gün, oral), 30LAC (30 mg/kg/g, 21 gün, oral) şeklinde planlandı.

Literatürde lakozamidin deneysel epilepsi modellerinde tercih edilen kronik kullanım dozları (3, 10 ve 30mg/kg/g) bu çalışmada uygulanacak dozlar olarak belirlendi. Her hayvan için hesaplanan doz maksimum 0,6ml distile su içerisinde oral gavaj yöntemi ile 21 gün boyunca günde tek doz halinde verildi. Tedavi süresinin sonunda sıçanlardan alınan kandan hemoreolojik parametreler değerlendirildi.

Bulgular: 10LAC grubunda tam kan viskozitesi kontrol ve 3LAC'a göre arttığı saptandı (p=0,034 ve p= 0,021). Yine 10LAC grubunun plazma viskozitesinin 3LAC ve 30LAC'a göre arttığı görüldü (p=0,005 ve p= 0,012). Osmotik frajilite değerleri açısından tüm gruplar bir arada değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmasa da minimum hemolize sebep olan konsantrasyonlar açısından gruplar ikili kıyaslandığında 30LAC ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı (Mann Whitney-U p=0.014).

Sonuç: Çalışmamızda lakozamidin belli dozda tam kan ve plazma viskozitesini artırıcı etkisi olduğu ve yüksek dozda lakozamidin osmotik fragilite değişikliği ile hemolize yatkınlığı kolaylaştırıldığı saptandı. Eritrositin yapısal veya fonksiyonel hastalıklarında ek olarak antiepileptik ihtiyacı olması durumunda bu etkilerinin akılda tutulması önem arz edebilir.

Anahtar Kelimeler: Lakozamid, Eritrosit Deformabilitesi, Karbonik Anhidraz İnhibitörü



ABSTRACT

Introduction and Objective: Carbonic anhydrase (CA) isoenzymes, known for their role in neuronal cell excitation, are targets in the development of new antiepileptic drugs. CA isoenzymes I and II are predominantly found in erythrocytes and constitute over 20% of non-hemoglobin proteins. CA I, II, and IV are physically associated with bicarbonate (HCO_3^-) transporters in the erythrocyte membrane and regulate their activities. Lacosamide is a third-generation antiepileptic drug, believed to exert its CA inhibitory effect by interfering with the enzyme's zinc-binding site. Therefore, this inhibitory effect might negatively impact erythrocyte deformability. No experimental or clinical studies addressing this issue have been found in the literature. This study aims to determine the hemorheological effects of chronic lacosamide use, potentially through erythrocyte CA enzyme inhibition.

Method: Thirty prepubertal female Sprague Dawley rats were randomly divided into four groups: a control group (n=6) and three drug groups (n=8). The groups were planned as follows: control (distilled water, 21 days, oral), 3LAC (3 mg/kg/day, 21 days, oral), 10LAC (10 mg/kg/day, 21 days, oral), and 30LAC (30 mg/kg/day, 21 days, oral). The chronic usage doses of lacosamide (3, 10, and 30 mg/kg/day) reported in experimental epilepsy models were applied in this study. Each animal's calculated dose was administered via oral gavage in a maximum of 0.6 ml distilled water once daily for 21 days. At the end of the treatment period, hemorheological parameters were evaluated from the blood collected from the rats.

Results: Whole blood viscosity in the 10LAC group was found to be significantly higher than in the control and 3LAC groups ($p=0.034$ and $p=0.021$, respectively). Plasma viscosity in the 10LAC group was also significantly higher than in the 3LAC and 30LAC groups ($p=0.005$ and $p=0.012$, respectively). Although no statistically significant difference in osmotic fragility values was found between the groups, a significant difference was observed between the 30LAC and control groups in terms of minimal hemolysis concentrations (Mann-Whitney U $p=0.014$).

Conclusion: Our study found that lacosamide has a dose-dependent effect in increasing whole blood and plasma viscosity. Additionally, high doses of lacosamide were observed to facilitate a tendency towards hemolysis through changes in osmotic fragility. These effects should be taken into consideration when antiepileptic therapy is required in conditions where erythrocyte structural or functional abnormalities are present.

Keywords: Lacosamide, Erythrocyte Deformability, Carbonic Anhydrase Inhibitor



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eritrosit deformabilitesi, eritrositlerin hücre zarlarının esnek yapıları sayesinde dış etkenlerle şekil değiştirmesi ve bu etkenler ortadan kalktığında yeniden eski haline dönebilme yeteneğidir. Yaklaşık 8 µm çapındaki eritrositler, bu özellik sayesinde 3 µm çapındaki kılcal damarlardan geçebilirler. Çekirdeksiz yapıları, düşük iç viskoziteleri, yüksek yüzey-hacim oranları ve esnek zarları bu yeteneği destekler. Zar yapısında veya iç viskoziteyi belirleyen proteinlerde meydana gelen bozulmalar deformabilitenin zayıflamasına neden olur. Ortam pH'ındaki düşüş, tuz dengesizlikleri ve mekanik stres gibi faktörler de bu özelliği olumsuz etkiler. Deformabilitesi bozulan hücreler, kanın viskozitesini artırarak dolaşım sorunlarına yol açabilir (1).

Eritrositlerde karbonik anhidraz (CA) izoenzimlerinden I ve II baskın olarak bulunur ve bu enzimler, hemoglobin dışı proteinlerin %20'den fazlasını oluşturur. CA I, II ve IV, eritrosit membranındaki HCO₃⁻ taşıyıcılarıyla fiziksel olarak ilişkilidir ve bu taşıyıcıların aktivitelerini düzenler (2).

Lakozamid, (R)-2-asetamido-N-benzil-3-metoksipropiyonamid, üçüncü jenerasyon bir antiepileptik ilaç olup, Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008 ve 2014 yıllarında yetişkinlerde fokal epilepside ek ve monoterapi olarak kullanım için onaylanmıştır. Türkiye'de ise 2012 yılında 16 yaş ve üzeri hastalar için ruhsatlandırılmıştır. İlacın etkisi, aksiyon potansiyeli oluşumu ve yayılımından sorumlu voltaj kapılı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonu ile ilişkilidir. İkinci bir etki mekanizması ise nöronal farklılaşma ve aksonal filizlenmede görev alan collapsine response mediator protein 2 (CRMP-2)'nin inhibisyonudur. Lakozamid, yüksek oral biyoyararlanıma sahip olup, düşük oranda serum proteinlerine bağlanır ve mikrozomal P450 enzim sistemi ile minimal etkileşime girer (3,4). Ancak, farklı ülkelerde ruhsatlandırma koşulları farklı olduğu için çocuklarda etkinlik ve güvenliği konusunda yetişkinlere kıyasla daha sınırlı klinik veriler mevcuttur. Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir meta-analizde, çocuklarda (süt çocukluğu dahil) lakozamid kullanımına bağlı olarak %31,5 oranında tedavi gerektiren yan etkiler bildirilmiştir.

En yaygın yan etkiler arasında uyuşma, baş dönmesi, bulantı-kusma ve ataksi yer almaktadır (5).

Topiramat, zonisamid ve sultiam gibi bazı antiepileptiklerin etkilerinden biri de CA aktivitesinin inhibisyonudur. Bununla birlikte, eski (valproik asit, fenitoin, karbamazepin) ve yeni jenerasyon (levetirasetam, okskarbazepin, pregabalin vb.) antiepileptiklerin CA enzim aktivitesi üzerindeki etkileri hakkında literatürde sınırlı bilgi mevcuttur. Literatür incelendiğinde yapılan deneysel çalışmalarla topiramat, levetirasetam ve zonisamidin eritrosit deformabilitesi üzerine etkilerinin incelendiği görülmüştür. Bu çalışmalarda, özellikle topiramatin eritrosit deformabilitesinde anlamlı bir bozulmaya yol açtığı, zonisamidin ve levetirasetamın ise bu konuda anlamlı bir etki göstermediği tespit edilmiştir (6,7)

Lakozamidin de CA inhibisyonu etkisine sahip olduğu ve bu etkisini enzimin çinko bağlanma bölgesine müdahale ederek gösterdiği kabul edilmektedir. Dolayısıyla bu inhibitör etki nedeni ile lakozamidin eritrosit deformabilitesini olumsuz etkileyebileceği düşünülebilir . Literatürde ulaşabildiğimiz kadarıyla bu konuda deneysel veya klinik bir çalışma bulunamamıştır. Bu çalışmada lakozamid kronik kullanımının, olası eritrosit CA enzim inhibisyonu üzerinden hemoreolojik parametrelere etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEMOREOLOJİ

Reoloji, sıvıların akışını inceleyen bir bilim dalıdır. Vasküler sistemdeki kan akışını açıklayan reolojinin alt dalı ise hemoreoloji olarak adlandırılır. Bu alanda, kanın damarlar içinde nasıl hareket ettiğini anlamak esastır (8,9).

Kanın vasküler sistemdeki akış özelliklerini etkileyen başlıca faktörler şunlardır:

- Tam kan viskozitesi
- Plazma viskozitesi
- Hematokrit seviyesi
- Eritrosit deformabilitesi
- Eritrosit agregasyonu
- Fibrinojen konsantrasyonu(8)

2.1.1. Tam Kan Viskozitesi

Tam kan viskozitesi, kanın vasküler sistem içindeki genel davranışını gösteren bir ölçümdür. Kan, şekilli elemanları nedeniyle dolaşım sisteminin çeşitli bölgelerinde farklı viskozite değerleri gösterebilir. Kanın viskozitesi arttıkça, akış hızı azalır (8,9).

Tam kan viskozitesini etkileyen başlıca faktörler şunlardır:

- Kayma gerilimi ve kayma hızı
- Plazma viskozitesi
- Hematokrit
- Eritrosit deformabilitesi
- Eritrosit agregasyonu
- Fibrinojen konsantrasyonu
- Vücut sıcaklığı (8).

2.1.2. Plazma Viskozitesi

Plazma viskozitesi, tam kan viskozitesini belirleyen temel faktörlerden biridir. Diğer tüm değişkenler sabit tutulduğunda, plazma viskozitesindeki artış tam kan viskozitesini de artırır. Protein konsantrasyonundaki artış, plazma viskozitesinin yükselmesine neden olur; ancak proteinlerin farklı şekil ve boyutlara sahip olması, plazma viskozitesi üzerindeki etkilerini de farklılaştıracaktır (8).

Plazma viskozitesi ile fibrinojen konsantrasyonu arasında güçlü bir doğrusal ilişki olduğu gösterilmiştir. Albümin ile ise bu ilişki daha zayıftır. Makroglobulinemi ve hiperfibrinojenemi gibi patolojik durumlar, plazma viskozitesinin yükselmesine neden olur. Bu rahatsızlıklarda yüksek plazma viskozitesi yaygın olarak gözlemlenmektedir (10,11).

2.1.3. Kayma Stresi ve Kayma Hızı

“Tam kanın viskozitesi, belli bir kayma hızında (shear rate) kanın akıma gösterdiği direnç (shearstress) olarak tanımlanır.” Kanın viskozitesi, kayma stresi ve kayma hızıyla değişir ve kanın doğal akış direncini belirler.(12)” Matematiksel olarak viskoziteyi tanımlamak gerekirse, kayma stresinin kayma hızına bölünmesiyle viskozite değeri elde edilir. Viskozitenin artması, belirli bir kayma hızını sağlamak için gereken kayma stresinin de artmasına neden olur. Viskozite kavramı, ilk kez Newton tarafından, bir sıvının uygulanan kuvvetle orantılı şekilde akacağını öne süren bir prensip ile tanıtılmıştır. Newtoniyeen sıvılarda, viskozite kayma hızından bağımsızdır. Su ve plazma Newtoniyeen sıvıların örneklerindendir, çünkü kayma hızları değişse bile viskoziteleri sabit kalır. Ancak, yüzyılın başlarında tam kanın Newtoniyeen bir sıvı gibi davranmadığı kanıtlanmıştır. Newtoniyeen olmayan sıvılar, örneğin tam kanın, vizkositesi akış hızına bağlı olarak değişiklik gösterir. Kanın damarlarımızda farklı bölgelerde farklı kayma hızlarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, kanın damarlarımızda nasıl aktığını anlamak için çeşitli kayma hızlarında viskoziteyi ölçmek ve değerlendirmek gerekebilir (8,13).

2.1.4. Hematokrit

Kırmızı kan hücrelerinin hacminin tam kan hacmine oranı hematokrit olarak adlandırılır ve yüzde olarak ifade edilir (8). Tam kan viskozitesi ile hematokrit arasında doğrusal bir ilişki olduğu rapor edilmiştir. Ancak, bu doğrusal ilişki sadece hematokrit seviyeleri %20 ile %60 arasında olduğunda geçerlidir. Bu durum, yüksek hematokrit seviyelerinde viskozitenin hızla artmasına neden olur (14). Düşük kayma hızlarında, artan eritrosit sayısı hücrelerin agregasyonunu artırarak hücrelerin hacmini ve kanın viskozitesini yükseltir (15).

2.1.5. Eritrosit Deformabilitesi

Deformabilite, bir eritrositin mekanik zorlanmalara karşı şekil değiştirme kapasitesini ifade eder. Normal eritrosit membranı son derece esnek bir yapıya sahiptir ve bu özellik, hücrenin dolaşım sırasında maruz kaldığı strese hızlı bir şekilde adapte olmasını mümkün kılar (2). Eritrositlerin deforme olabilme yeteneği, hücrenin geometrisi, zarının esnekliği ve iç viskozitesiyle bağlantılıdır(8).

İnsan eritrosit hücre zarının yapısal organizasyonu, 4 ay süresince yapısal bütünlüğünü korurken, dolaşımında geri dönüşümlü olarak büyük deformasyonlar geçirebilmesine olanak tanır. Hücre zarı oldukça elastik bir yapıya sahiptir ve uygulanan sıvı streslerine hızla yanıt verebilme yeteneğindedir. Normal bir eritrosit, doğrusal olarak yaklaşık %250 oranında boyutunu değiştirebilirken, yüzey alanında %3 ila %4'lük bir artış hücrenin parçalanmasına neden olur. Bu nedenle hem laboratuvar ortamında hem de canlı organizmalarda indüklenen eritrosit deformasyonlarında zar yüzey alanında kayda değer bir değişiklik gözlenmez. Hücre yaşlandıkça, eritrositlerin yüzey alanı ve hacmi büyük ölçüde azalırken, hemoglobin kaybı daha sınırlı olur. Sonuç olarak, eritrositlerin yoğunluğu, 120 günlük ömürleri boyunca kademeli olarak artış gösterir (2).

Eritrosit deformabilite yeteneğindeki birincil dış faktör, hücre yüzey alan/hacim oranıdır(16). İnsan eritrositleri, istirahat durumundayken geniş bikonkav bir disk formunda olup, çapları yaklaşık 8 µm, ortalama hücre hacimleri ise 90 fL

civarındadır. Kırmızı kan hücrelerinin yüzey alanı ortalama olarak $140 \mu\text{m}^2$ 'dir(1). Bu bikonkav yapı, eşit hacimde bir küreye kıyasla yaklaşık %40 daha fazla yüzey alanı sunar. Hücrelerin deformasyon yeteneği ise bu fazladan yüzey alanı/hacim oranına bağlıdır; eğer bu oran yeterli olmasaydı, hücreler şekil değiştirme yeteneğini kaybederdi (2). Bu yüzey alanı, eritrositlerin dar kılcal damarlar ve dalak sinüzoidlerinden geçerken tek eksenli olarak deforme olabilmesine olanak tanır (17). Eritrositlerin şekli, hücrelerin yaşına bağlı olarak değişiklik gösterir; yenidoğanların eritrositleri, yetişkinlere kıyasla daha büyük bir hacme ve ortalama yüzey alanına sahiptir (1).

Eritrositlerin deformabilite yeteneğinde önemli bir başka unsur, hücre içi hemoglobin konsantrasyonu tarafından belirlenen sitoplazmik viskozitedir (2). Eritrositlerin iç viskozitesinin belirlenmesinde hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) en önemli faktördür (18). Memelilerin çekirdeksiz eritrositlerde, ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonları belirli bir zaman diliminde dar bir aralıkta (30-35 g/dL) tutulurken, hücre hacmi oldukça geniş bir değişim gösterebilir (20-200 fL). Hemoglobin çözeltisinin viskozitesi, ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu 37 g/dL olduğunda hızlı bir artış gösterir. 27 g/dL hemoglobin konsantrasyonunda viskozite sadece 5 santipoise (cp) iken, bu değer 37 g/dL'ye çıktığında 15 cp'ye yükselir. Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu 40 g/dL'ye ulaştığında, viskozite de ani bir artışla 45 cp'ye çıkar. Konsantrasyon 45 g/dL olduğunda viskozite 170 cp'ye ulaşırken, 50 g/dL'de bu değer 650 cp'ye kadar yükselir (2).

Kırmızı kan hücreleri, şekil değişikliği sırasında hemoglobin konsantrasyonunu dar bir sınırdan titizlikle kontrol ederek sitoplazmik viskozitenin değişimini en aza indirir. Hemoglobin konsantrasyonunun 37 g/dL'yi aşması, hücrelerin esneme ya da kıvrılma sonrasında orijinal formunu geri kazanma hızını ciddi biçimde azaltır. Bu nedenle, artan iç viskozite, hücrelerin dar kılcal damarlara hızlıca uyum sağlama kapasitesini ve dolayısıyla dokulara oksijen taşınmasını tehlikeye sokar. Bunun yanı sıra, hücrenin su kaybına bağlı olarak sitoplazmik viskozitenin artması, eritrositlerin ömrünü çok az etkiler (2).

2.2. OSMOTİK FRAJİLİTE TESTİ

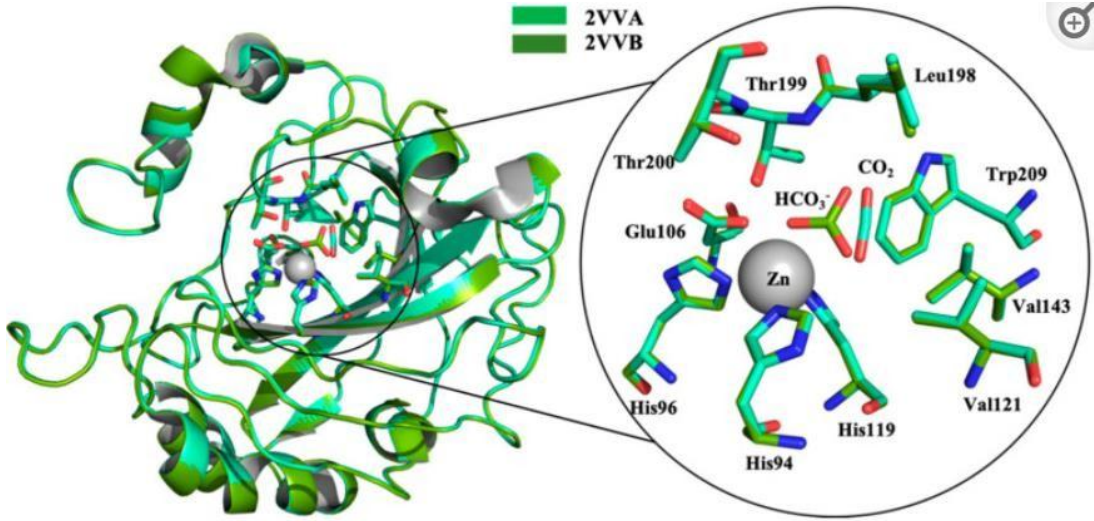
Hemoglobinin oluşturduğu osmotik etki nedeniyle eritrositlerin içlerindeki sıvı miktarını artırma eğilimi gösterirler. Hücre içine aşırı sıvı girişini engelleyen mekanizmalardan birisi Na^+/K^+ aktif transport pompasıdır. Bu pompada sodyum hücre dışına atılırken, hücre içine su girişini dengeler. Ancak, bu pompanın kapasitesi aşılsa, eritrositler şişer ve yuvarlak bir şekil alır. Hipotonik çözeltilerde su, hızla hücre zarını geçer ve hücreyi genişletir. Bu olgu "osmotik şişme" olarak bilinir. Hücre hacmi artarken yüzey alanı yetersiz kaldığı için zar parçalanır ve hemoglobin gibi büyük moleküller serbest kalır (19).

Farklı hipotonik tuz çözeltilerine eritrositler eklenerek, hücrelerin hemolize karşı direnci test edilir. Bu test "osmotik frajilite testi (OFT)" olarak adlandırılır. Hücrelerin çeşitli hipotonik derişimlerde parçalanma oranı, çözeltiliye salınan hemoglobinin kolorimetrik ölçümüyle hesaplanır. Elde edilen sonuçlar, eritrositlerin tamamen parçalandığı en düşük tuz derişimi ile karşılaştırılır. Örneğin, %0,85 NaCl çözeltilisinde eritrositler herhangi bir şekil değişikliği göstermezken, %0,50-0,45 çözeltililerinde hemoliz başlar. En düşük derişimlerde (%0,30-0,20 NaCl) ise tüm eritrositler hemolize uğrar.

2.3. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMLERİ

CA enzimleri, CO_2 'nin HCO_3^- ve protonlara dönüşümünü katalize eden önemli metalloenzimlerdir. Bugüne kadar alfa, beta, gama, sigma ve zeta olmak üzere beş farklı CA ailesi tanımlanmıştır. Alfa-CA'lar omurgalılarda, protozoa, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında bulunurken, beta-CA'lar çoğunlukla bazı bakterilerde mevcuttur. Gama-CA'lar arkea ve bazı bakterilerde görülürken, sigma ve zeta CA'lar yalnızca deniz diatomlarında bulunur. Bu enzimler solunum, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ dengesi, pH düzenlemesi, elektrolit salgısı, biyosentetik reaksiyonlar (örneğin glukoneogenez, lipogenez, üregenez), kemik rezorpsiyonu ve tümör oluşumu gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli roller üstlenir (20).

İnsanlarda bugüne kadar 16 farklı alfa-CA izoformu izole edilmiştir. Bu izoformlardan yalnızca 12'si katalitik olarak aktiftir, geri kalanlar ise enzimatik aktivite göstermez ve CA ile ilişkili proteinler olarak tanımlanır. CA izoformları, çeşitli hücre altı bölgelerinde farklı kinetik özellikler ve inhibitör duyarlılıklarıyla birlikte benzersiz doku ekspresyon paternlerine sahiptir. (21). CA VI, tükürük ve süt içinde salgılanan bir izoenzimdir. Bazı alfa-CA'lar sitoplazmada bulunur; bunlar arasında CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII sayılabilir. Diğerleri ise zarla bağlantılıdır ve CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ile CA XV'yi içerir. Mitokondri içinde yer alan izoenzimler ise CA VA ve CA VB'dir. Ayrıca, katalitik form olarak bilinen ve karbonik anhidraz ile ilişkili proteinler (CARP)'den olan CARP VIII, CARP X ve CARP XI de sitoplazmada bulunur (20). Bu izoenzimler, dokulardaki dağılımlarına ve katalitik kapasitelerine göre farklılık gösterir. Sitozolik izoenzimler arasında CA I, eritrositlerde ve sindirim sisteminde yaygınken, CA II esas olarak sindirim sistemi, göz, böbrek, kemik osteoklastları, beyin, akciğer, eritrositler ve testislerde bulunur (21). CA izoformları I, II ve IV, solunum süreci ve asit-baz dengesinin korunmasında işlev görürler. Bu izoenzimler, CO₂ ve HCO₃⁻ 'ün metabolize edildiği dokulardan atılımın gerçekleştiği alanlara (akciğerler ve böbrekler) taşınmasına yardımcı olurken, aynı zamanda kılcal damarlar ve akciğer mikrodamarlarından CO₂ atılımını kolaylaştırır (22). Aynı zamanda böbrek tübüllerinden H⁺ iyonlarının atılmasını ve Henle'nin çıkan kolundan HCO₃⁻ 'ün geri emilmesini destekler. İzoenzimler II ve VA, glukoneogenez, yağ asitlerinin biyosentezi veya pirimidin bazlarının üretimi gibi metabolik süreçler için HCO₃⁻ sağlarlar. Memelilerde CA I, CA III, CA VI ve katalitik CARP'lerin kesin işlevleri tam olarak anlaşılmassa da, bu enzimlerin hem normal fizyolojik süreçlerde hem de hastalıklarda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (20).



Şekil 1: CA II kristal yapısı

CO₂ (pdb 2VVA) ve HCO₃⁻ (pdb 2VVB) ile kompleks halinde CA II kristal yapısının süperpozisyonu

2.4. KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRLERİ

CA'lar, vücut içinde CO₂ ve HCO₃⁻ 'ün dokular ile akciğerler arasında taşınması, pH ve CO₂ dengesinin korunması, çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması gibi kritik işlevlere sahiptir. Ayrıca, glukoneogenez, yağ sentezi, üre üretimi, kemik yıkımı, kalsifikasyon ve tümör oluşumu gibi önemli biyokimyasal süreçlerde de görev alırlar (23).

Farklı hastalıkların uzun süreli tedavisinde CA inhibitörlerinin faydalı olduğu kanıtlanmış, diüretik, glokom karşıtı ve epilepsi tedavisinde kullanılan ajanlar arasında yer almışlardır. Bu inhibitörlere örnek olarak asetazolamid, brinzolamid, dorzolamid, tolsultazolamid, metazolamid, diklofenamid, zonisamid, topiramat ve etoksazolamid verilebilir. Ancak, bu ilaçların ciddi yan etkileri sebebiyle, farklı organizmalarda emilim, dağılım, metabolizma ve atılım süreçlerinin titizlikle incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (21).

Son araştırmalar, düşük CO₂ seviyeleri ve alkalozun, nöral uyarılabilirliği artırarak nöbet oluşumuna katkıda bulunduğunu açıkça göstermiştir. Bu bulgular,

CA'ların epilepsi patogeneğinde önemli roller oynayabileceğini ortaya koymaktadır(24). Yapılan çalışmalar, beyindeki CA izoformlarının nöbet oluşumuyla ilişkili patolojik süreçlerde yer aldığını işaret etmektedir. Epileptik beyinde CA II ve CA XII seviyelerinin yükseldiği, CA VII eksikliği olan farelerde ise deneysel nöbetlerin oluşturulamadığı görülmüştür. Özellikle CA II, VII ve XIV izoformlarının epilepsi ile bağlantılı olduğu düşünülerek, bu izoformlara yönelik seçici inhibitörler önerilmiştir. asetazolamid, zonisamid, metazolamid ve topiramat gibi ajanlar antiepileptik olarak kullanılmıştır. zonisamid ve topiramat, günümüzde klinik uygulamada yaygın olarak ek tedavi yöntemleri arasında yer almakta olan nöbet ilaçlarıdır. Bununla birlikte, CA izoformlarının geniş bir yelpazede inhibe edilmesi, bu ilaçların sadece CA inhibitörü olmaktan öte etkiler gösterdiğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu ajanların klinik kullanımları, hastalarda bazı istenmeyen yan etkilere yol açabilmektedir(24). Yakın dönemde epilepsi tedavisinde yeni nesil antiepileptik ilaçlar kullanılmaya başlanmış ve bu ilaçların, eski jenerasyon antiepileptik ilaçlara kıyasla daha etkili ve daha iyi tolere edilebilir olduğu rapor edilmiştir. Bilinen CA inhibitörü olan antiepileptik ilaçlar dışında, eski ve yeni nesil antiepileptik ilaçların insan eritrositlerinde CA enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmayı farklı çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalardan birinde karbamazepin, fenitoin sodyum, sodyum valproat (eski nesil) ile levetirasetam, pregabalin, gabapentin ve okskarbazepin'in (yeni nesil) CA enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon veya aktivasyon etkileri in vitro ortamda test edilmiştir. Çalışma sonucunda, levetirasetamın CA I ve II enzim aktiviteleri üzerinde en güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (17).

CA inhibitörlerinin antikonvülzan etkilerinin mekanizmalarından biri, HCO_3^- iyonlarının hareketi nedeniyle gama aminobütirik asit (GABA) A reseptörlerindeki iyon akımlarındaki değişikliklerle bağlantılı olarak membran voltajını etkilemesidir. GABA, beyindeki ana inhibitör nörotransmitterdir. Ancak bazı spesifik koşullarda, özellikle erken gelişim aşamalarında ve epilepsi gibi durumlarda, GABA'nın depolarize edici etkiler gösterebileceği bilinmektedir. GABA'ya bağlı uyarılmanın, özellikle CA II ve CA VII enzim aktiviteleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. CA inhibitörlerinin nöronal uyarılabilirlikte azalmaya yol açan bir başka olası mekanizma

ise, NMDA (N-Metil D-Aspartat) reseptörlerinin magnezyum tarafından sürekli olarak bloke edilmesinin artmasıdır (24).

Amerikan yiyecek ve ilaç dairesi (FDA) tarafından onaylanmış veya klinik aşamada deneme sürecinde olan 20'den fazla CA inhibitörü bulunmaktadır. Bu bileşiklerin çoğu sülfonamid bazlı olup, vücutta sistemik bir etki göstermektedir. Mevcut CA inhibitörlerinin izoformlara özgü olmayışından kaynaklanan mide bulantısı ve depresyona bağlı yorgunluk gibi çok çeşitli yan etkileri vardır. Ancak, insanlarda bulunan 16 CA izoformunun aktif bölgeleri dizi ve yapısal olarak benzerlikler gösterdiği için izoforma özgü inhibitörlerin tasarımı zor olmaktadır. Yapı tabanlı ilaç tasarım yöntemleri, belirli izoformlara özgü kalıntıları tanımlamayı ve bunları kullanmayı amaçlamaktadır. Ayrıca, kükürt bazlı bileşiklere alerjisi olan bireyler sülfonamid tedavisine uygun değildir. İzofoma özgü klasik olmayan CA inhibitörlerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir (25).

2.5. LAKOZAMİD

Lakozamid üçüncü kuşak bir antiepileptik ilaçtır ve kimyasal yapısı R-2-asetamido-N-benzil-3-metoksipropiyonamittir. Yetişkin fokal epilepsi hastalarında ek ve monoterapi kullanımı için 2008 ve 2014 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde onay almıştır. 2011 yılında Avrupa'da 6 yaş üstü çocuklarda, ülkemizde ise 2012 yılında 16 yaş üstü kullanımı için ruhsatlandırılmıştır(3,4).

Oral yoldan verilen lakozamid ile sağlıklı yetişkinlerde yapılan farmakokinetik çalışmalar, lakozamidin oral biyoyararlanımının neredeyse %100 olduğunu göstermektedir. Oral lakozamid uygulanmasından 1 ila 4 saat sonra ilaç plazmadaki en yüksek seviyesine ulaşmaktadır ve eliminasyon yarı ömrü ortalama 13 saattir. Lakozamid demetilasyon ile primer metaboliti olan bir O-desmetil metabolitine dönüşür; lakozamid ve majör metaboliti başlıca böbrekler yoluyla atılır. lakozamidin proteinlere bağlanma oranı da minimal olduğundan (%15), yer değiştirme ilaç-ilac etkileşimi riski düşüktür. Lakosamidin sitokrom P-450 izoenzimlerinin inhibitörü veya indükleyicisi olarak etki ettiğine dair bir gösterge yoktur(3).

Lakozamid antiepileptik etkisini başlıca iki mekanizma ile gösterir;

- 1- Aksiyon potansiyelinin oluşumu ve yayılımından sorumlu voltaj kapılı sodyum kanallarının yavaş inaktivasyonu
- 2- Nöronal farklılaşma, polarizasyon ve aksonal filizlenmede rol alan collapsine response mediator protein 2 (CRMP-2)inhibisyonu(3)

Antiepileptik etkileri dışında lakozamidin aynı zamanda CA inhibitör etkinliği olduğu ve bu etkisini enzimin çinko bağlanma bölgesi üzerinden gösterdiği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu inhibitör etkiye bağlı olarak lakozamidin eritrosit deformabilite yeteneği üzerine olumsuz etkisi olabileceği düşünülebilir. Literatürde bu konuda deneysel veya klinik bir çalışma bulunamamıştır (20).

2.6.1. Lakozamidin Yan Etkileri

Farklı ülkelerde ruhsatlandırılmasının farkı olması nedeniyle ilacın etkinlik ve güvenliği konusunda klinik çalışmalar çocuklarda yetişkinlere göre kısıtlı sayıdadır. Yang ve ark. bir meta- analiz çalışmasında süt çocukluğu da dahil olmak üzere çocukluklarda lakozamid kullanımına bağlı ortalama %31,5 tedavi gerektirebilecek yan etki bildirilmiştir. Diğer antiepileptiklerde olduğu gibi en sık uyuşma, baş dönmesi ve uyku hali görülmektedir (5).

2020 yılında yayınlanan bir derlemede ise lakozamidin yaygın yan etkileri olarak baş dönmesi, baş ağrısı, uyuşukluk, mide bulantısı/kusma ve diplopi görüldüğü, bulguların daha çok ilaç kullanımının ilk 3 ayında ortaya çıktığı ve çoğunlukla iyi tolere edildiği belirtilmiştir (4).

3. GEREÇ YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışma öncesi Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (No: G.Ü.ET24.055). Çalışmada ortalama ağırlıkları 60 ± 20 g olan 30 adet prepubertal dişi Sprague Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Deney hayvanları Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Sıçanlar 12 saat aydınlık karanlık döngüsünde, normal atmosfer koşullarında yaşatıldı. Kontrol grubu ilaçsız şekilde, ilaç grupları ise 3mg/kg/g, 10mg/kg/g, 30mg/kg/g dozlarında ilaç alacak şekilde planlandı (26). Sıçanlar kontrol grubu 6, ilaç grupları 8'er hayvan olacak şekilde randomize dağıtılarak 4 gruba ayrıldı.

Kontrol (distile su, 21 gün, oral)

3LAC (3 mg/kg/g, 21 gün, oral)

10LAC (10 mg/kg/g, 21 gün, oral)

30LAC (30 mg/kg/g, 21 gün, oral)

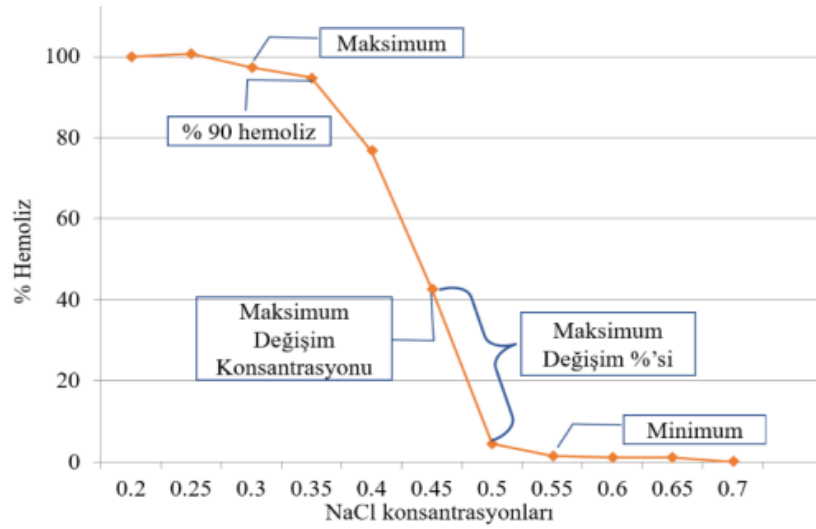
Deney protokolü: Lakozamidin ticari olarak eczanelerde satılan formu alınarak toz haline getirildi ve her hayvan için uygun olan doz hesaplanarak minimum 0,2 ml, maksimum 0,6ml olacak şekilde distile su içerisinde, oral gavaj yöntemi ile, 21 gün boyunca, her gün aynı saatte, günde tek doz halinde verildi. Tedavi süresinin sonunda sıçanlar ketamin ile anestezi altında intrakardiyak kan alınarak feda edildi. Kan alınırken kullanılan enjektörler heparinize edilerek pıhtılaşma engellendi. Sonrasında hızla kanın bir kısmı ile hematokrit ölçümü yapılırken bir kısmı sitratlı tüplere alınarak eritrosit deformabilitesini değerlendirmek için tam kan viskozitesi ile plazma viskozitesi tayini ve OFT'de kullanıldı.

Tam kan ve plazma viskozite tayini Vilastic Bioprofiler (Vilastic Scientific, Inc., Austin, Texas, United States) cihazı ile yapıldı. Öncelikle yaklaşık 0,5 ml kan ile tam kan viskozite tayini yapıldı daha sonra kalan kan 3500 rpm 'de 15 dakika santrifüj

edilerek plazma kısmı ayrıldı ve plazma viskozitesi ölçüldü. Ölçümler arasında tüm sistem koagüle materyal kalmadığından emin olunacak şekilde serum fizyolojik ile yıkandı. Viskozimetre olarak bilinen bu cihaz içine aldığı örneği ince bir zar üzerinde 12 farklı hızda kaydırarak akıma karşı örneğin gösterdiği direnci (vizkozitesini) ölçmektedir. Örnekler arasında karşılaştırmanın uygun şekilde yapılabilmesi için sonuçlar hematokrit düzeyine göre normalize edildi. Örneklerin hematokrit düzeyi ölçümü manuel olarak Gazi Üniversitesi Fizyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

OFT için konsantrasyonları %0,20 – 0,70 arasında değişen 11 farklı NaCl çözeltisi, fosfat tamponu kullanılarak pH 7,2 olacak şekilde hazırlandı ve standart santrifüj tüplerine yerleştirildi. Her tüpe 200µL taze heparinize kan eklendi, tüpler birkaç kez ters çevrilerek solüsyonun karışması sağlandıktan sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra tüpler 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Her örneğin hemoglobin konsantrasyonu spektrofotometre kullanılarak 540 nm de ölçüldü, %0,20'lik NaCl solüsyonundaki hemoglobin düzeyi %100 kabul edilerek diğer örneklerdeki hemoglobin konsantrasyonu yüzde olarak hesaplandı. Bu testte yüksek hemoglobin konsantrasyonu eritrosit fragilitésinin arttığını gösterir.

OFT verilerini değerlendirmek için kullanılan parametreler şekil 2'de örnek olarak gösterilmiştir (Şekil, Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Meltem Sevgili'den izin alınarak TGA proje sonuç raporundan alınmıştır) (27). Şekilde gösterilen maksimum değeri; eritrositin hemolizinin tamamlanmadan hemen önceki konsantrasyonu temsil etmektedir. %90 hemoliz, %90'ın üzerinde hemolize sebep olan ilk konsantrasyonu; maksimum değişim konsantrasyonu bir önceki tampon solüsyonda görülen hemolize göre en büyük farkın görüldüğü konsantrasyonu, maksimum değişim yüzdesi; maksimum değişim konsantrasyonu ile bir önceki konsantrasyon arasındaki yüzde hemoliz farkını ve minimum ise hemolizin başladığı konsantrasyonu ifade eder. Osmotik Fragilite Katsayısı (OFK) ise minimum hemoliz görülen konsantrasyon ile maksimum hemoliz görülen konsantrasyon değerlerinin birbirine oranını ifade eder. İstatistiksel analizde kullanılacak veriler Şekil 3'te örneklendirilmiştir.



Şekil 2: Osmotik Frajilite Testi Hemoliz-Konsantrasyon Eğrisi

Maksimum	Minimum	OFK	% 90	Maks. Değişim %	Maks. Değişim Konsantrasyonu
0.3	0.55	1.833	0.35	38.1	0.45

Şekil 3: Osmotik Frajilite Testi Veri Seti

3.2. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Deneyler sonucu elde edilen veriler Jamovi istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirtildi. Tüm grupların beraber değerlendirilmesinde non-parametrik tek yönlü ANOVA (Kruskal-Wallis) testi kullanıldı. İkili gruplar Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Veriler %95 güven düzeyinde incelenecek p değeri 0,05'ten küçük ise testler anlamlı kabul edildi.

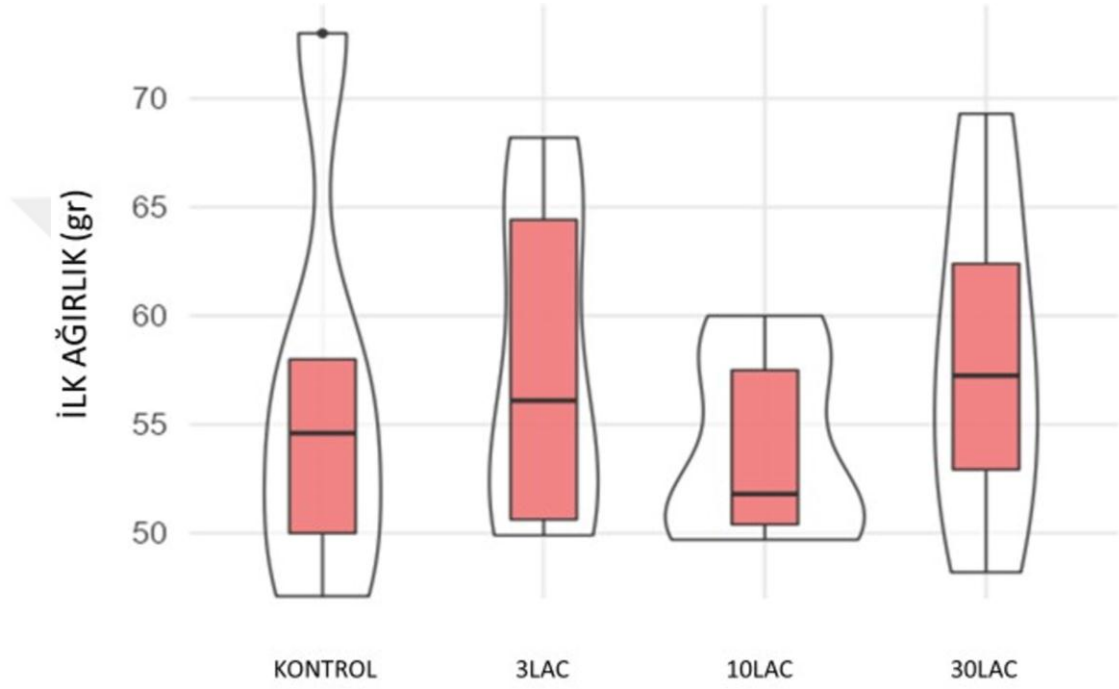
4. BULGULAR

Çalışmaya kontrol grubunda 6, ilaç gruplarında 8'er hayvan ile başlanılmıştır. Kontrol grubundaki 1 hayvandan sakrifikasyon sırasında alınan kanın pıhtılı gelmesi nedeniyle vizkozite ve osmotik frajiilite çalışılamamış ve hayvan çalışma dışı bırakılarak kontrol grubu n=5 sayısı ile devam edilmiştir. 10LAC grubunda 1 hayvandan alınan kanın hemolizli olması sebebiyle ölçümler yapılamamış olup hayvan çalışma dışı bırakılmış ve n:7 ile çalışmaya devam edilmiştir. 30LAC grubunda çalışmanın 16. gününde 1 hayvanın exitus olması, 1 hayvandan da sakrifikasyon sırasında kan alınamaması sebebiyle n=6 sayısı ile çalışmaya devam edilmiştir. Çalışma grubunun bazı tanımlayıcı parametreleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Çalışma grubunun tanımlayıcı parametreleri

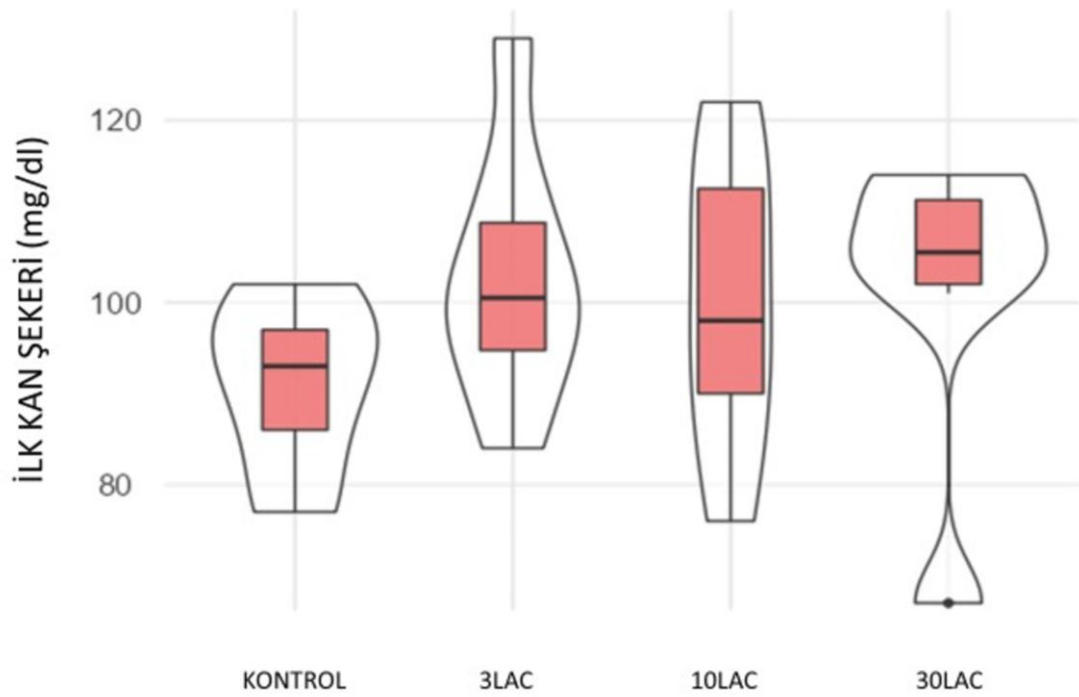
GRUP	KONTROL(n=5)		3LAC(n=8)		10LAC(n=7)		30LAC(n=6)	
	Ortalama	SS (±)	Ortalama	SS(±)	Ortalama	SS(±)	Ortalama	SS (±)
İlk Ağırlık (gr)	56,5	10,1	57,7	7,44	53,9	4,33	57,9	7,71
İlk Kan Şekeri (mg/dl)	91	9,77	103	14	100	16,4	101	17,4
Son Ağırlık (gr)	104	16,4	110	16,9	104	8,47	108	18,1
Son Kan Şekeri (mg/dl)	97,8	7,85	97,3	15,3	92,7	10	84,5	13,6
Hematokrit (%)	39,3	3,01	38,9	1,77	41,7	3,16	38,6	2,72
*Tablo 1 verilerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır								

Grupların çalışmaya dahil ediliş sırasında ölçülen ilk ağırlık ortalamaları; kontrol grubunda $56,5 \pm 10,1$ gr, 3LAC grubunda $57,7 \pm 7,44$ gr, 10LAC grubunda $53,9 \pm 4,33$ gr, son olarak 30LAC grubunda $57,9 \pm 7,71$ gr olarak ölçülmüştür. Çalışmaya dahil ediliş sırasında bakılan ilk ağırlıklar açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Kruskal Wallis $p=0,749$) (Şekil 4).



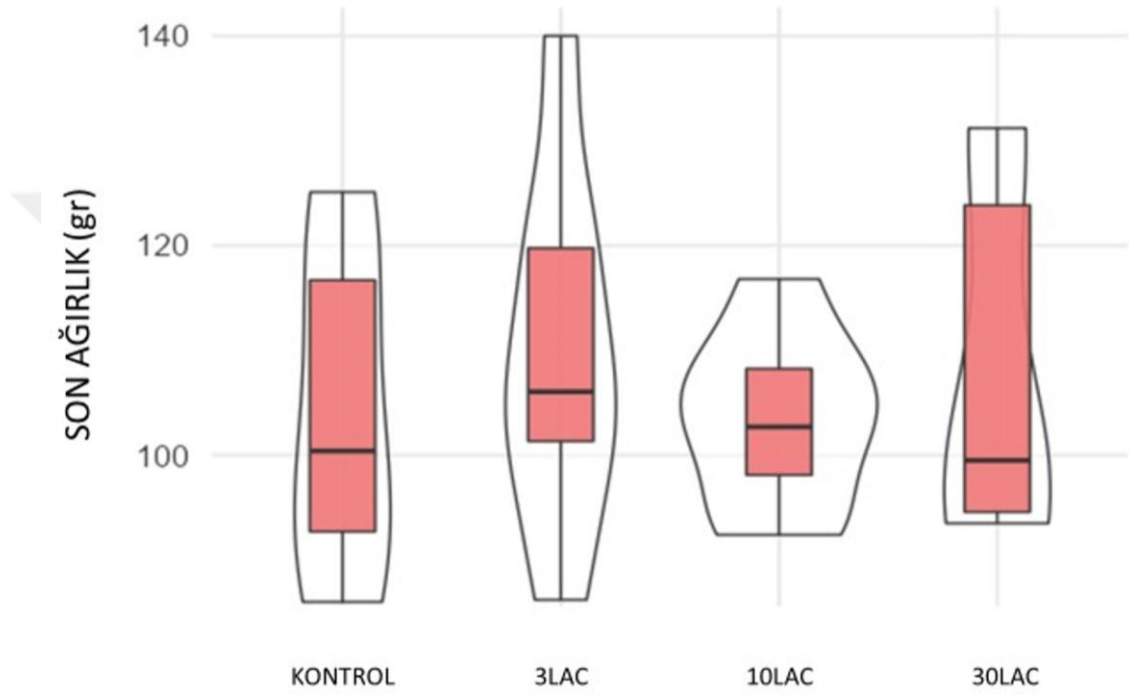
Şekil 4: Çalışmaya dahil ediliş sırasında bakılan ilk ağırlıklar açısından grupların karşılaştırılması

Grupların çalışmaya dahil ediliş sırasında ölçülen ilk kan şekeri ortalamaları; kontrol grubunda $91 \pm 9,77$ mg/dl, 3LAC grubunda 103 ± 14 mg/dl, 10LAC grubunda $100 \pm 16,4$ mg/dl, son olarak 30LAC grubunda $101 \pm 17,4$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Çalışmaya dahil ediliş sırasında bakılan ilk kan şekeri açısından gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Kruskal Wallis $p=0,455$) (Şekil 5). Gruplar ilk ağırlık ve kan glukoz konsantrasyonu açısından değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamış olması hayvanların gruplara homojen dağıldığını göstermektedir.



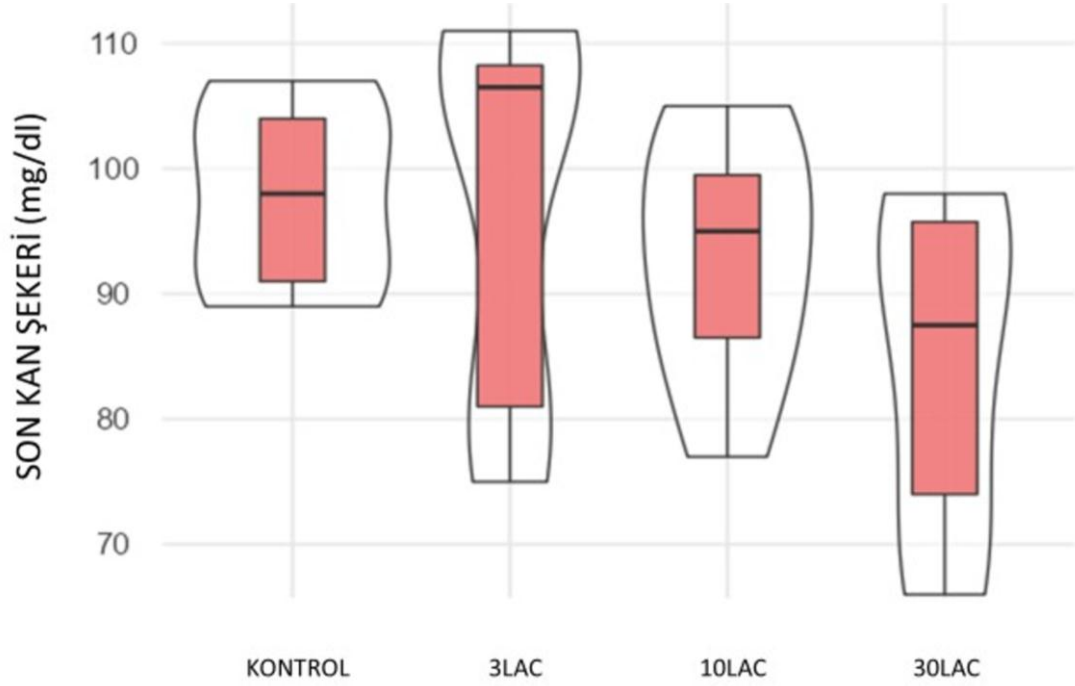
Şekil 5: Çalışmaya dahil ediliş sırasında bakılan ilk kan şekeri değerleri açısından grupların karşılaştırılması

Grupların çalışmanın sonlandırılması sırasında bakılan son ağırlıklarının ortalamaları; kontrol grubunda $104 \pm 16,4$ gr, 3LAC grubunda $110 \pm 16,9$ gr, 10LAC grubunda $104 \pm 8,47$ gr, son olarak 30LAC grubunda $108,9 \pm 18,1$ gr olarak ölçülmüştür. Çalışmanın sonlandırılması sırasında, sakrifikasyon öncesinde bakılan ağırlıklar açısından gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Kruskal Wallis $p=0,798$) (Şekil 6).



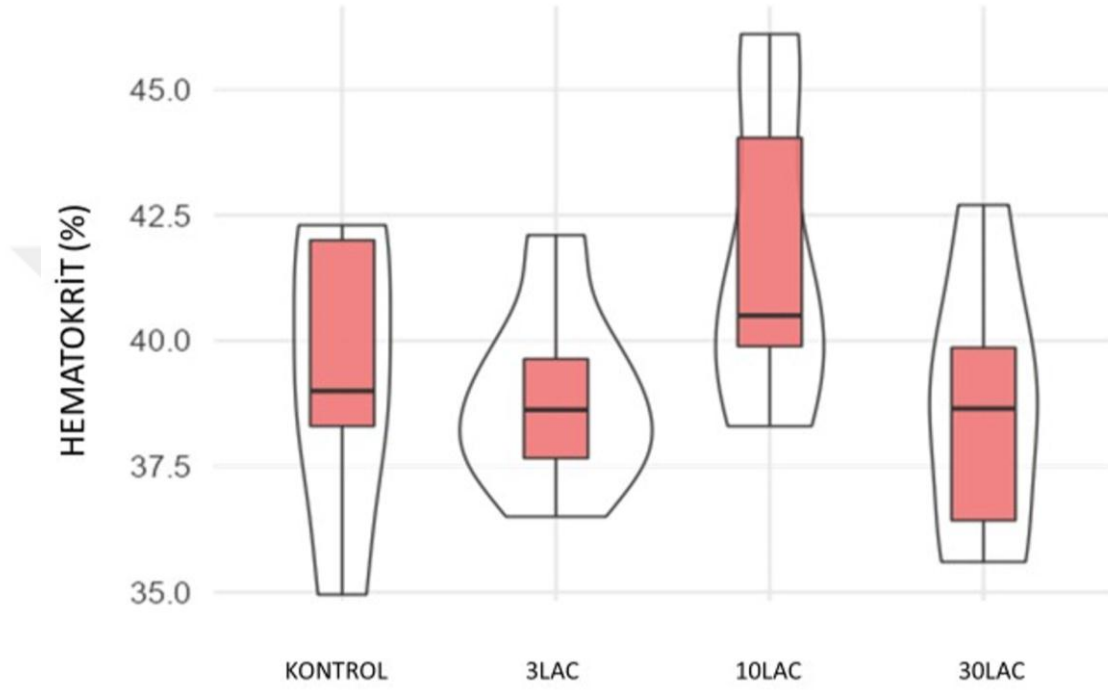
Şekil 6: Deney sonunda bakılan ağırlıklar açısından gruplar karşılaştırılması

Grupların çalışmanın sonlandırılması sırasında bakılan son kan şekeri ortalamaları; kontrol grubunda $97,8 \pm 7,85$ mg/dl, 3LAC grubunda $97,3 \pm 15,3$ mg/dl, 10LAC grubunda $92,7 \pm 10$ mg/dl, son olarak 30LAC grubunda $84,5 \pm 13,6$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Çalışmanın sonlandırılması sırasında, sakrifikasyon öncesinde bakılan kan şekeri değerleri açısından gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Kruskal Wallis $p=0,254$) (Şekil 7).



Şekil 7: Deney sonunda bakılan kan şekeri değerleri açısından grupların karşılaştırılması

Hematokrit değerlerinin ortalamalarına bakıldığında kontrol grubunda $39,3 \pm 3,01$ %, 3LAC grubunda $38,9 \pm 1,77$ %, 10LAC grubunda $41,7 \pm 3,16$ %, son olarak 30LAC grubunda $38,6 \pm 2,72$ % olarak ölçülmüştür. Hematokrit değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Kruskal Wallis $p=0,245$) (Şekil 8).



Şekil 8: Hematokrit değerleri açısından grupların karşılaştırılması

Tablo 2: Sürekli verilerin ortalama ve standart sapmaları

GRUP	KONTROL(n=5)		3LAC(n=8)		10LAC(n=7)		30LAC(n=6)	
	Ortalama	SS (±)	Ortalama	SS (±)	Ortalama	SS (±)	Ortalama	SS (±)
Tam Kan Viskozitesi (cP)*	4,16	0,25	4,09	0,31	4,76[#]	0,37	4,47	0,42
Plazma Viskozitesi (cP)*	1,16	0,05	1,1	0,04	1,36[#]	0,29	1,11	0,02
Ozmotik Frajilite Katsayısı	1,88	0,65	1,91	0,54	2,27	0,36	2,13	0,27
Maximum Değişim Yüzdesi (%)	60,6	10	55,3	9,04	55,7	15,9	57,3	15,8

cP:santipoise

* Kruskal Wallis testinde $P<0,05$ # İkili karşılaştırmada kontrol grubundan farklı $P<0,05$ □ İkili karşılaştırmada 3LAC grubundan farklı $P<0,05$ Ω İkili karşılaştırmada 30LAC grubundan farklı $P<0,05$ **Tablo 3:** Kesikli verilerin ortanca ve minimum-maksimum değerleri

GRUP	KONTROL(n=5)		3LAC(n=8)		10LAC(n=7)		30LAC(n=6)	
	Ortanca	Min-Max	Ortanca	Min-Max	Ortanca	Min-Max	Ortanca	Min-Max
Maximum Hemoliz Konsantrasyonu (%) *	0,3	0.25-0.5	0,325	0.25-0.45	0,25	0.25-0.35	0,3	0.25-0.35
Minimum Hemoliz Konsantrasyonu (%) *	0,6	0.55-0.65	0,625	0.55-0.7	0,65	0.5-0.7	0,65[#]	0.65-0.65
%90'ın Üzerinde Hemolize Sebep Olan Konsantrasyon (%) *	0,45	0.35-0.5	0,45	0.35-0.5	0,40	0.35-0.5	0,425	0.4-0.5
Maximum Değişim Konsantrasyonu (%) *	0,5	0.5-0.5	0,5	0.45-0.55	0,525	0.5-0.6	0,5	0.5-0.55

*Kesikli sayısal veriler kullanıldığı için ortalama değil ortanca hesaplanmıştır

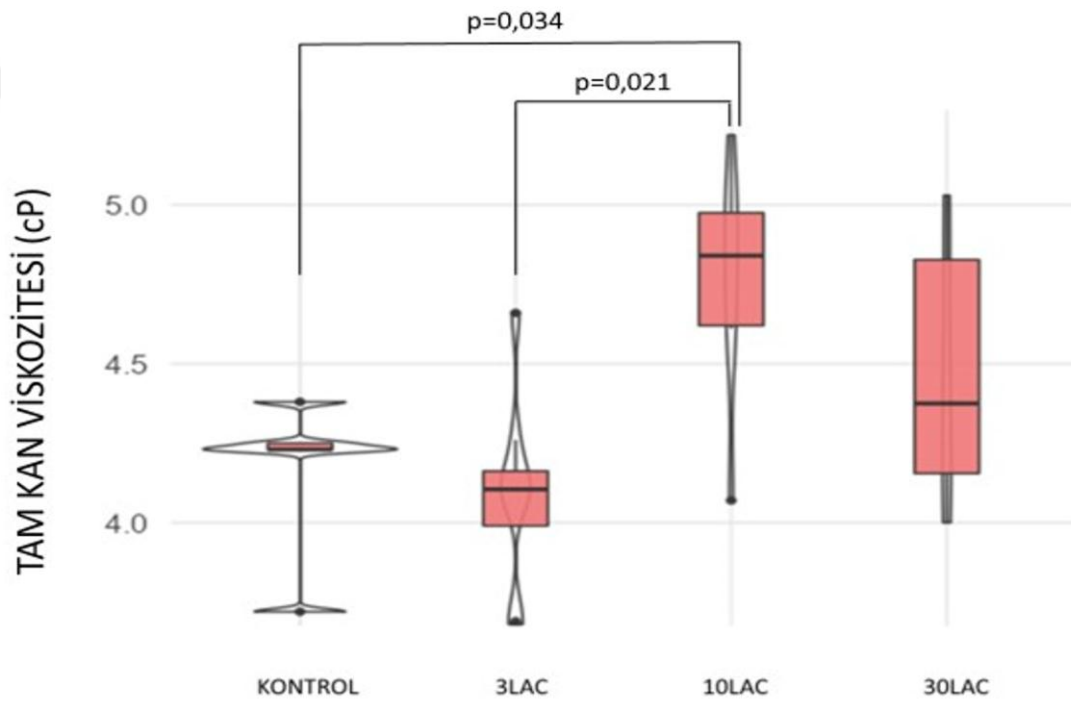
İkili karşılaştırmada kontrol grubundan farklı $P<0,05$

Tablo 4: Çalışma grubunun istatistiksel analizi

	χ^2	df	p
İlk Ağırlık	1.218	3	0.749
İlk Kan Şekeri	2.612	3	0.455
Son Ağırlık	1.013	3	0.798
Son Kan Şekeri	4.070	3	0.254
Hematokrit	4.154	3	0.245
Kan Viskozitesi	8.136	3	0.043
Plazma Viskozitesi	11.715	3	0.008
Maximum Hemoliz Konsantrasyonu	2.581	3	0.461
Minimum Hemoliz Konsantrasyonu	3.777	3	0.287
Ozmotik Frajilite Katsayısı	1.464	3	0.691
%90'ın Üzerinde Hemolize Sebep Olan Konsantrasyon	0.702	3	0.873
Maximum Değişim Yüzdesi	0.930	3	0.818
Maximum Değişim Konsantrasyonu	5.454	3	0.141

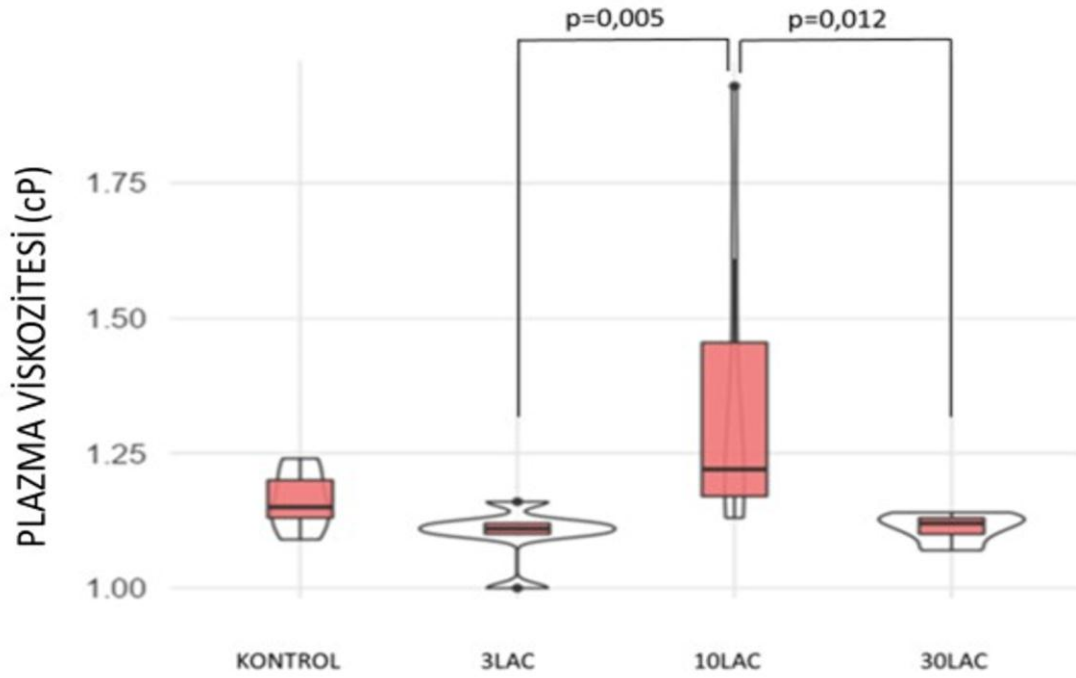
*Kruskal-Wallis analizi kullanılarak hesaplanmıştır, $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tam kan viskozitesi ortalamaları kontrol grubunda $4,16 \pm 0,25$ cP, 3LAC grubunda $4,09 \pm 0,31$ cP, 10LAC grubunda $4,76 \pm 0,37$ cP, 30LAC grubunda $4,47 \pm 0,42$ cP olarak ölçülmüştür. Gruplar tam kan viskoziteleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Kruskal Wallis $p=0,043$). Gruplar Mann Whitney-U testi ile ikili olarak karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile 10LAC grubu (Mann Whitney-U $p=0,034$) ve 3LAC grubu ile 10 LAC grubu (Mann Whitney-U $p=0,021$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (Şekil 9).



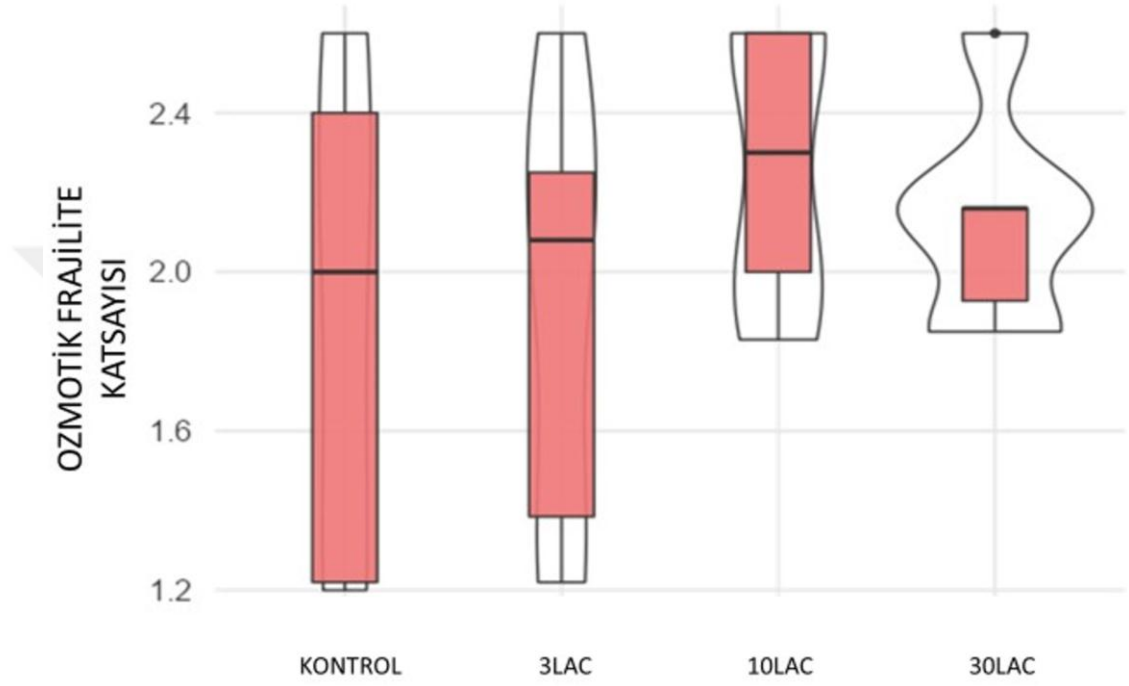
Şekil 9: Tam kan viskozitesi değerleri açısından grupların karşılaştırılması

Plazma viskozitesi ortalamaları kontrol grubunda $1,16 \pm 0,05$ cP 3LAC grubunda $1,1 \pm 0,04$ cP 10LAC grubunda $1,36 \pm 0,29$ cP, 30LAC grubunda $1,11 \pm 0,02$ cP olarak ölçülmüştür. Gruplar plazma viskoziteleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Kruskal Wallis $p=0,008$). Gruplar Mann Whitney-U testi ile ikili olarak karşılaştırıldı. 3LAC ile 10LAC grubu (Mann Whitney-U $p=0,005$) ve 10LAC grubu ile 30 LAC grubu (Mann Whitney-U $p=0,012$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (Şekil 10).



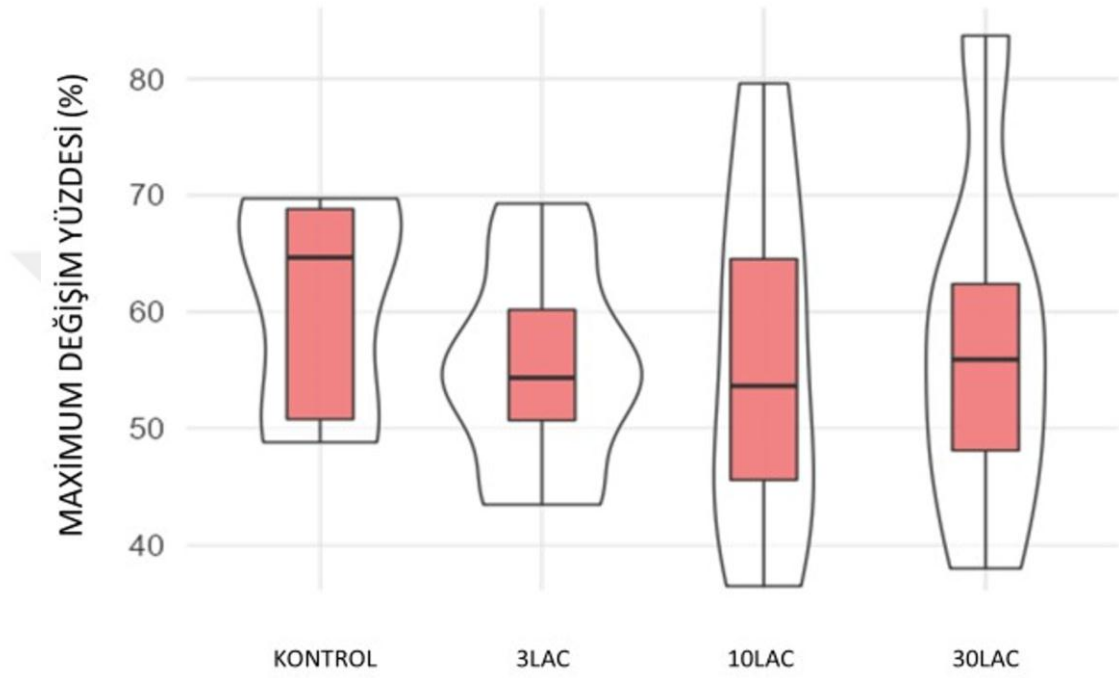
Şekil 10: Plazma viskozitesi değerleri açısından grupların karşılaştırılması

Osmotik fragilite katsayısı ortalamaları kontrol grubunda $1,88 \pm 0,65$, 3LAC grubunda $1,91 \pm 0,54$, 10LAC grubunda $2,27 \pm 0,36$, 30LAC grubunda $2,13 \pm 0,27$ olarak ölçülmüştür. Gruplar ozmotik fragilite katsayısı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Kruskal Wallis $p=0,691$) (Şekil 11).



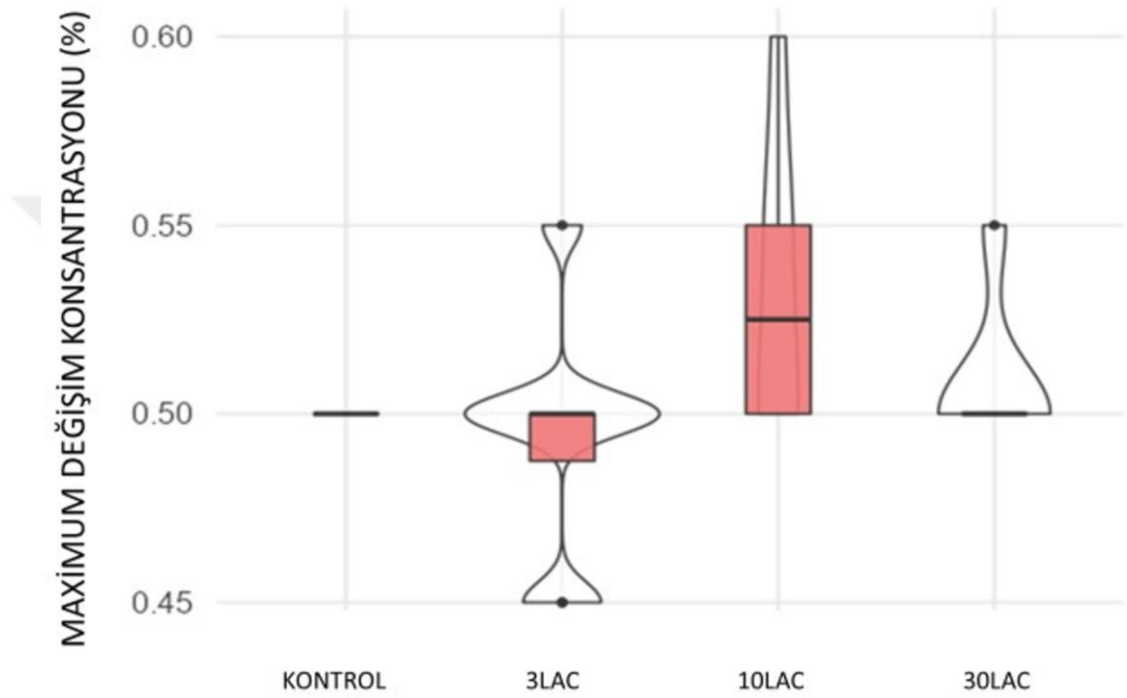
Şekil 11: Ozmotik fragilite katsayısı açısından grupların karşılaştırılması

Maksimum değişim yüzdesinin ortalamaları kontrol grubunda $60,6 \pm 10$ %, 3LAC grubunda $55,3 \pm 9,04$ %, 10LAC grubunda $55,7 \pm 15,9$ %, 30LAC grubunda $57,3 \pm 15,8$ % olarak ölçölmüştür. Gruplar maksimum değişim yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Kruskal Wallis $p=0,818$) (Şekil 12).



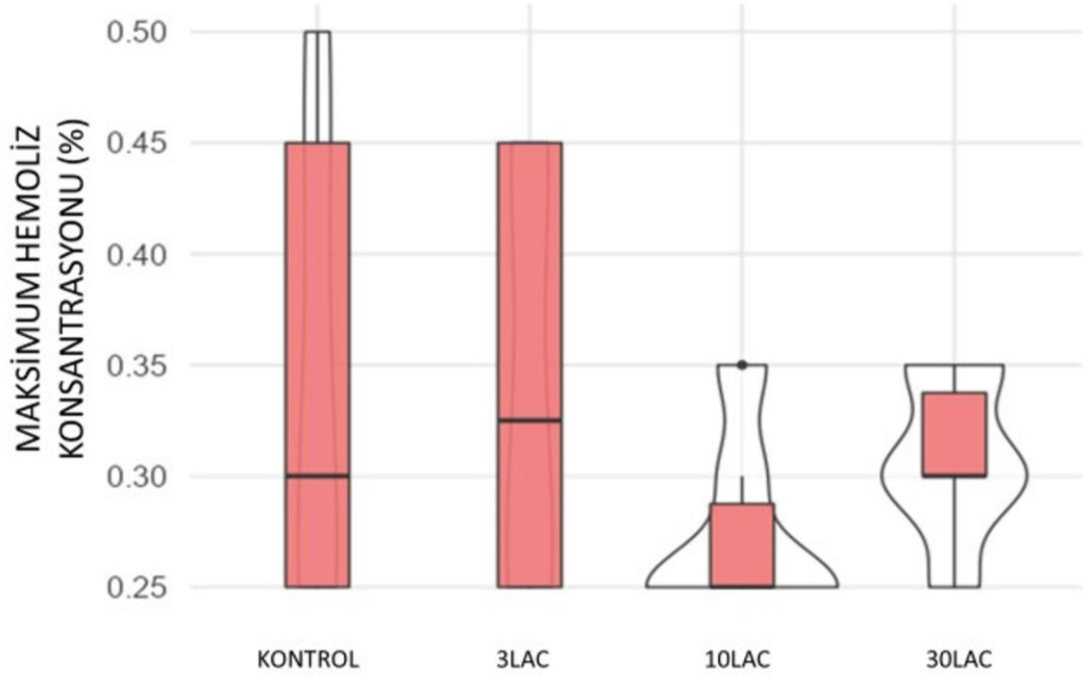
Şekil 12: Hemolizdeki maksimum değişim yüzdeleri açısından grupların karşılaştırılması

Maksimum değişim konsantrasyon değerleri incelendiğinde kontrol grubunun ortancası 0,5 (0,5-0,5) %NaCl(w/v), 3LAC grubunun ortancası 0,5 (0,45-0,55) %NaCl(w/v), 10LAC grubunun ortancası 0,525(0,5-0,6) %NaCl(w/v), 30LAC grubunun ortancası 0,5(0,5-0,55) %NaCl(w/v) olarak ölçölmüştür. Gruplar maksimum değişim konsantrasyonlarının açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Kruskal Wallis $p=0,141$) (Şekil 13).



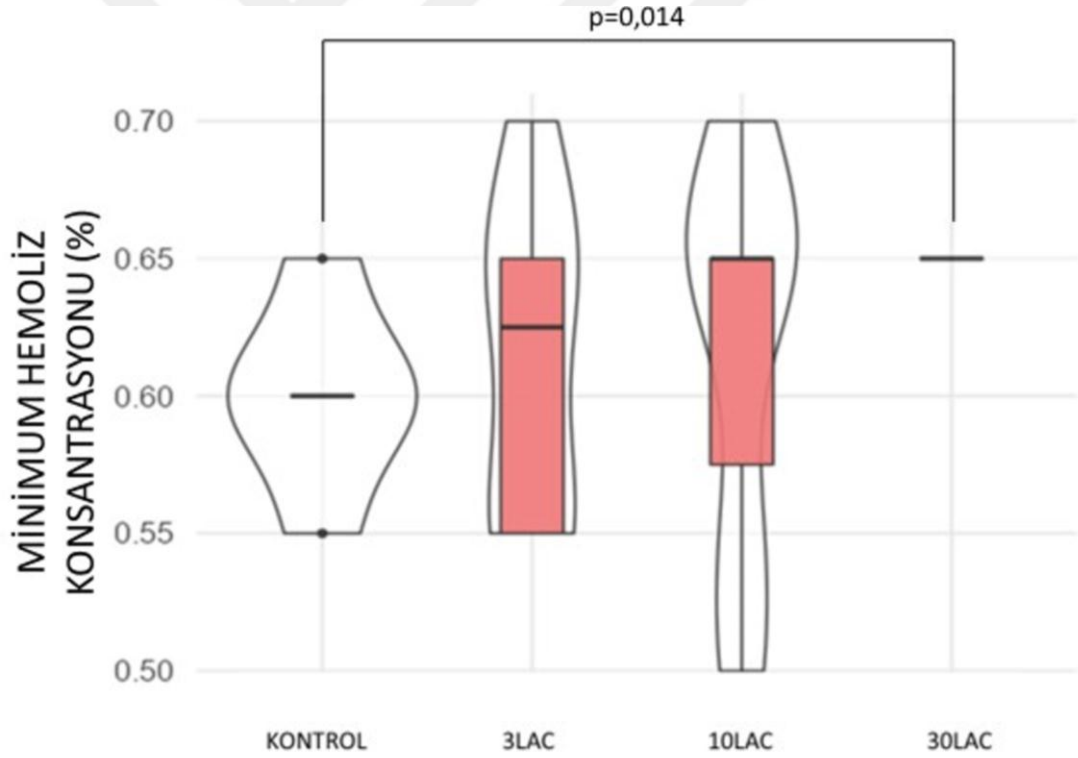
Şekil 13: Hemolizdeki maksimum değişime sebep olan konsantrasyon değerleri açısından grupların karşılaştırılması

Maksimum hemoliz konsantrasyon değerleri ortancaları incelendiğinde kontrol grubunun ortancası 0,3 (0,25-0,5) %NaCl(w/v), 3LAC grubunun ortancası 0,325 (0,25-0,45) %NaCl(w/v), 10LAC grubunun ortancası 0,25 (0,25-0,35) %NaCl(w/v), 30LAC grubunun ortancası 0,3 (0,25-0,35) %NaCl(w/v) olarak ölçülmüştür. Gruplar maksimum hemoliz konsantrasyonları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Kruskal Wallis $p=0,461$) (Şekil 14).



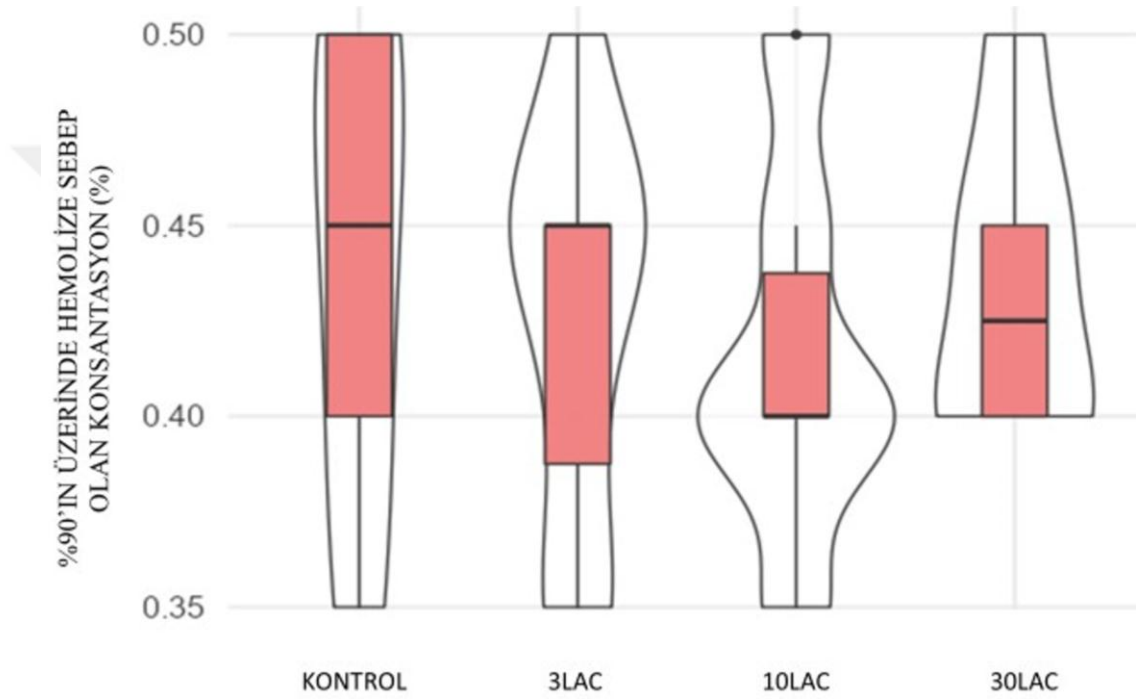
Şekil 14: Maksimum hemolize sebep olan konsantrasyon değerleri açısından grupların karşılaştırılması

Minimum hemoliz konsantrasyon değeri ortancaları incelendiğinde kontrol grubunun ortancası 0,6 (0,55-0,65) %NaCl(w/v), 3LAC grubunun ortancası 0,625 (0,55-0,7) %NaCl(w/v), 10LAC grubunun ortancası 0,65 (0,5-0,7) %NaCl(w/v), 30LAC grubunun ortancası 0,65(0,65-0,65) %NaCl(w/v) olarak ölçülmüştür. Gruplar minimum hemoliz konsantrasyonları (eritrositlerin hemolizinin başladığı ilk konsantrasyon değerleri) açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Kruskal Wallis $p=0,287$). Ancak minimum hemolize sebep olan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında grafiklerde 30 L grubunda farklılık olabileceği düşünülerek gruplar arasında ikili karşılaştırmalar yapıldı ve kontrol grubu ile 30LAC grubu arasında minimum hemolize sebep olan konsantrasyonlar açısından anlamlı bir fark saptandı. (Mann Whitney-U $p=0,014$) (Şekil 15).

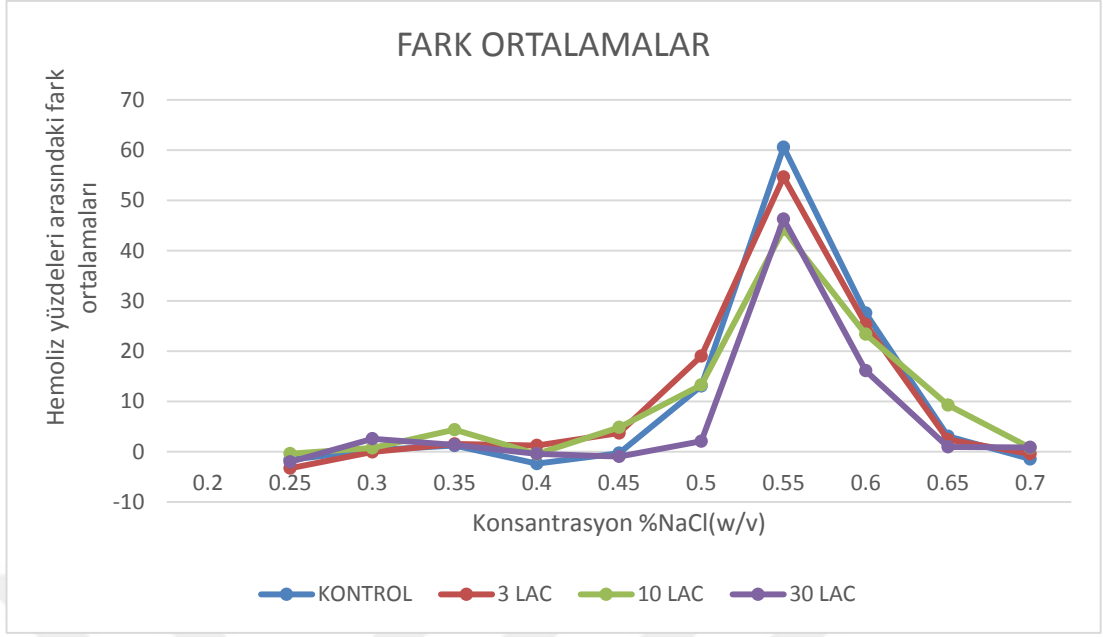


Şekil 15: Eritrositlerin hemolizinin başladığı ilk konsantrasyon değerleri açısından grupların karşılaştırılması

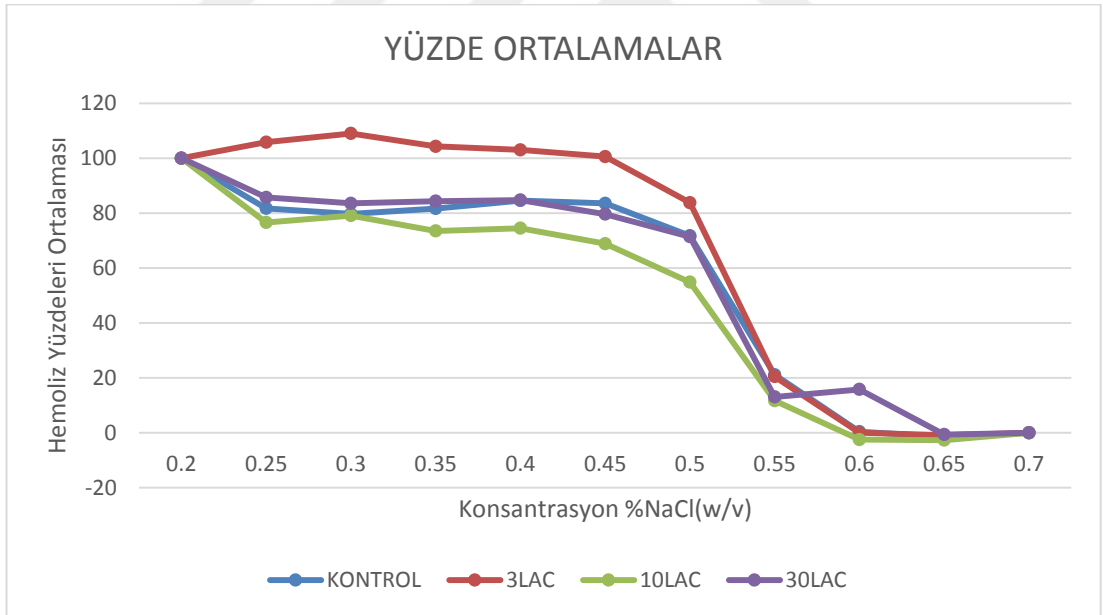
%90'ın üzerinde hemolize sebep olan konsantrasyon değerinin ortancaları incelendiğinde kontrol grubunun ortancası 0,45 (0,35-0,50) %NaCl(w/v), 3LAC ortancası 0,45 (0,35-0,50) %NaCl(w/v), 10LAC grubunun ortancası 0,40 (0,35-0,50) %NaCl(w/v), 30LAC grubunun ortancası 0,425 (0,4- 0,5) %NaCl(w/v) olarak ölçülmüştür. Gruplar %90'ın üzerinde hemolize sebep olan konsantrasyonları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Kruskal Wallis p=0,873) (Şekil 16).



Şekil 16: %90'ın üzerinde hemolize sebep olan konsantrasyon değerleri açısından grupların karşılaştırılması



Şekil 17: Grupların konsantrasyona göre hemoliz yüzdeleri farkının ortalamalarının dağılımı



Şekil 18: Grupların konsantrasyona göre hemoliz yüzdeleri ortalamalarının dağılımı

5. TARTIŞMA

Bu deneysel çalışma ile karbonik anhidraz enzim inhibitör etkinliği olan lakozamidin olası hemoreolojik yan etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Tam kan, plazma viskozitesi ve eritrosit osmotik frajilite bu amaca yönelik olarak çalışıldı. Özellikle orta doz olarak kabul edilen 10mg/kg/g grubunda hem kontrol hem de 3mg/kg/g grubuna göre tam kan viskozite değeri anlamlı düzeyde yükseldi. Plazma viskozitesinde gruplar karşılaştırıldığında yine 10mg/kg/g grubu 3 ve 30mg/kg/g gruplarına göre anlamlı yüksek viskozite değerine sahipti. Çalışmamız lakozamidin tam kan ve plazma viskozitesi üzerine doz ilişkili etkisi olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla antiepileptik ilaç tercihinde lakozamidin bu özelliğinin dikkate alınması gerektiği akılda tutulmalıdır.

Antiepileptik ilaç kullanımına bağlı nötropeni, trombositopeni, kemik iliği yetmezliği gibi hematolojik yan etkiler fazla çalışılmasına rağmen hemoreolojik yan etkiler ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Levetirasetam, topiramet ve zonisamid kronik kullanımının hemoreolojik yan etkileri deneysel olarak çalışılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir (6,7,28). Hematolojik yan etkilerin patogenezi tam olarak aydınlatılamamakla beraber ağırlıklı olarak immünolojik mekanizmaların sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca antiepileptik ilaçların farmakokinetik ve dinamik özelliklerinin rolü üzerinde de durulmaktadır. Çalışmamızda sadece hematokrit bakılmış olup gruplar hem kendi içinde hem de aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Tam kan sayımının yapılamamış olmasına bağlı çekirdekli kan hücrelerinde olası bir sayısal değişiklik hakkında yorum yapılamadı.

Antiepileptik ilaçların kantitatif hematolojik yan etkileri yanı sıra özellikle eritrosit morfolojileri üzerine etkisi de çalışılmıştır. Altı epilepsi hastası ve 1 sağlıklı kontrolün dahil edildiği klinik çalışmada eritrosit morfolojileri atomik forse mikroskopi ile incelenmiştir. Hastalar sodyum ve kalsiyum kanal blokajı veya GABA inhibisyonu üzerinden etki gösteren antiepileptik ilaçların çoklu kombinasyonunu almakta idi. Özellikle sodyum ve kalsiyum gibi iyon kanalları üzerinden etkili olan

antiepileptiklerin eritrosit membran yüzeyinde değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Bu morfolojik değişikliklerin de eritrosit fonksiyonları üzerine zamanla etkisi olabileceği düşünülmüştür (29). Çalışmada kullandığımız lakozamidin sodyum kanal üzerinden etkisi dikkate alındığında eritrosit morfolojisi üzerinde etkisi olabileceği kabul edilebilir. Bir başka çalışmada da fenobarbital ve karbamazepin tekli tedavisinin eritrosit osmotik frajilitesi üzerine etkisi epileptik ve sağlıklı çocuklarda incelenmiştir. Antiepileptik ilaç kullanan çocuklarda osmotik frajilitede bozulma ve yüksek tuz konsantrasyonlarında eritrositlerin halen lizise uğradığı görülmüştür. Hastalarda hemoliz riskindeki bu artışın klinik bir yansımasının olmadığı ifade edilmekle beraber başka bir ilaç ile kombinasyon veya hematolojik hastalık durumunda ilaç seçiminde dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir (30). Çalışmamızda da 30LAC grubunda diğer gruplara göre osmotik frajilitenin etkilendiği ve daha yüksek tuz konsantrasyonlarında hemolizin devam ettiği görüldü. Dolayısıyla yüksek doz lakozamidin eritrosit membran yapısında değişikliklere neden olarak hemolizi kolaylaştırabileceği de akılda tutulmalıdır. Buna karşılık 30LAC grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında hematokrit değerlerinde anlamlı bir farklılık izlenmedi. Bu da önceki çalışmanın sonuçlarını destekler şekilde osmotik frajilitedeki bozulmanın klinik bir yansıması olmasa da bu açıdan dikkatli olunması gerektiğini düşündürülebilir.

Suvalsky ve ark. da elektron mikroskop ile eritrositin membran yapısı üzerine sodyum kanal blokörü olan karbamazepinin etkisini sağlıklı kişilerden alınan kan örneklerinden çalışmışlardır. Karbamazepine maruziyet sonrası eritrositlerin, ekinosit ve daha az miktarda da stomatosit şekline dönüşüm gösterdikleri tespit edilmiştir. Karbamazepinin eritrosit dış membranda birikmesi ekinosit oluşumuna neden olmakta, iç membranda biriktiğinde de eritrositler stomatosit formuna değişim göstermektedir. Karbamazepine bağlı ciddi klinik yan etkiler, terapötik düzeyin üzerindeki değerlerde görülmesine rağmen, eritrosit morfolojisindeki değişiklikler terapötik aralıkta izlenmiştir (31). Karbamazepin kullanımının eritrosit morfolojisinde neden olduğu değişikliklere bağlı olarak özellikle kapiller dolaşım ve dokuların oksijenizasyonunda problemlere neden olabileceği düşünülebilir. Suvalsky ve ark. bir başka çalışmada, benzer şekilde sodyum kanalı üzerinden etkili olan fenitoinin

eritrosit membran yapısı üzerine etkisi çalışılmıştır. Fenitoin ile in vitro inkübe edildiğinde eritrositlerin elektron mikroskopik incelemesinde eritrositlerin yarısının ekinosit tipte değişikliğe uğradığı görülmüştür. Bu etkisini gösterirken eritrosit membran fosfolipidleri ile etkileşime girdiği, bunu yaparken de eritrosit üzerinde yer alan Na-kanalına bağlanarak dış membrana insersiyon yaptırdığı görülmüştür. Bu etkisinin terapötik düzeylerin çok üzerindeki konsantrasyonlarda ortaya çıktığı dolayısıyla fenitoinin hücre membranı üzerine sitotoksik etkisinin klinik uygulamada önemli olamayacağı kabul edilmektedir (32). Bizim çalışmamızda eritrosit morfolojisi değerlendirilmemekle beraber lakozamid gibi sodyum kanal üzerinden etkili karbamazepin ve fenitoinin etkisi dikkate alındığında benzer morfolojik etki beklenebilir. 30LAC grubumuzdaki osmotik frajilitenin bozulması, lakozamidin eritrosit morfoloji üzerinde bir etkisi olduğunu da destekleyebilir.

Reinhardt ve ark. çalışmasında etki mekanizması farklı çok sayıda ilacın (klorpromazin, klomipramin, sitalopram, klonazepam, diazepam, valproik asit, levetirasetam, fenitoin ve fenobarbital) eritrosit morfolojisi üzerine etkisi hem kantitatif hem de elektron mikroskopide değerlendirilmiştir. Antiepileptiklerden levetirasetam, valproik asit ve fenobarbitalin eritrosit morfolojisi üzerinde etkisi olmadığı, kalan diğer ilaçların farklı morfolojik değişikliklere (ekinosit, stomatosit) neden oldukları görülmüştür (33). İn vitro ortamda yapılmakla beraber, bu etkileşimin in vivo da gerçekleşebileceği düşünüldüğünde eritrosit morfolojik değişikliklerinin kan akımını özellikle mikrosirkülasyonu olumsuz etkileyebileceği akılda tutulmalıdır.

Ünal ve ark. da benzer şekilde antiepileptik ilaçların eritrosit morfolojisi üzerine etkisini klinik bir çalışma ile değerlendirdiler. Yetişkin 50 epilepsi hastası ile 30 sağlıklı yetişkin karşılaştırıldı. Epilepsi grubundaki hastaların 24 tanesi çoğunluğu levetirasetam olmak üzere tekli, 26 tanesi de çoklu ilaç alıyordu. Elektron mikroskopik incelemede antiepileptik ilaçlara maruz kalmanın eritrosit morfolojisinde belirgin bozulmaya neden olduğu görülmüştür. İlaçların tekli veya çoklu alınmasının eritrosit morfolojisindeki etkileri anlamlı farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte eritrosit morfolojisindeki belirgin bozulmaya rağmen hastaların hiçbirinde bu değişikliğin neden olabileceği klinik izlenmemiştir (34).

Çanakçı ve ark. tarafından farmakokinetik ve dinamik özellikleri nedeniyle çok tercih edilen bir antiepileptik olan levetirasetamın hemoreolojik yan etkileri deneysel olarak çalışıldı. Osmotik frajilite, tam kan ve plazma viskozitesi düşük, orta ve yüksek doz (50, 150, 300mg/kg/g) levetirasamın kronik kullanımı (14 gün) sonrası değerlendirildi. Levetirasetamın tüm dozlarda osmotik frajilite, tam kan ve plazma viskozitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gösterildi. Karbonik anhidraz enzim inhibisyon özelliği de olmasına rağmen levetirasetamın hemoreolojik bir etkisinin olmaması, çoğu antiepileptik ilaçtan farklı olarak etki mekanizmasının iyon kanalları üzerinden olmaması ile açıklanmaya çalışıldı (6). Öztepeli ve ark., bir diğer antiepileptik ilaç olan zonisamidin hemoreolojik yan etkileri deneysel bir çalışma ile incelendi. Olası hemoreolojik yan etkilerin neden olabileceği hipoksi-iskemiye ikincil oksidatif stresin belirlenmesi için de tiyol-disülfid dengesi ve eritosit içi glutatyon çalışıldı. Zonisamid 50 ve 100 mg/kg dozlarında hiçbir parametrede anlamlı değişikliğe neden olmazken 150 mg/kg dozda hematokrit değerini diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artırdığı görüldü. Ayrıca 150 mg/kg zonisamid kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tam kan viskozitesini artırdığı tespit edildi. Osmotik frajilite ve oksidatif stres parametreleri üzerine ise zonisamidin hiçbir dozda anlamlı düzeyde etkisi gösterilemedi (28). Hematokrit ve tam kan viskozitesindeki artışa rağmen hemoreolojik yan etkinin belirgin bir klinik tabloya neden olmadığını düşündürmektedir. Bu iki çalışmada da olduğu gibi çalışmamız planlanırken lakozamidin karbonik anhidraz enzim inhibisyon özelliği dikkate alındı. Çalışmamızda hem tam kan viskozite hem de plazma viskozitesinde anlamlı değişikliklerin olması, eritrosit karbonik anhidraz aktivitesi dışında başka faktörlerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte çalışmanın kısıtlılıklarından birisi eritrosit karbonik anhidraz enzim düzey ve/veya aktivitesinin çalışılmamış olmasıdır. Ayrıca tam kan vizkosite yanında plazma viskozitesinde de anlamlı artışın serum proteinleri ile ilişkili olabileceği düşünüldüğünde serum protein düzeylerinin çalışılmamış olması da bir diğer kısıtlılıktır. Sodyum kanal blokör özelliği olan antiepileptiklerin eritrosit morfolojisi üzerinde etkilerinin biliniyor olması ve bizim bu açıdan eritrosit morfolojik değerlendirme yapmamış olmamız da bir diğer kısıtlılık olabilir.

Sonuç olarak lakozamidin kronik kullanımının olası hemoreolojik yan etkileri belirlenmeye çalışıldı ve doz ilişkili tam kan ve plazma viskozitesi üzerine artırıcı bir etkisi olduğu gösterildi. Ayrıca yine doz ilişkili olarak eritrositlerin hemoliz direncinde bir azalma olduğu tespit edildi. Lakozamidin bu etkilerinin kliniğe bir yansımasının olup olmadığı konusunda yorum yapılamamakla beraber antiepileptik seçiminde ilacın bu etkilerinin dikkate alınması gerekebilir. Doz ilişkisinin gösterilmesi özellikle ilaç doz belirlenmesinin önemli olduğu çocuk hastalarda daha dikkatli olunması ve bu açılardan takip edilmeleri önemli olabilir. Ayrıca olası hemoreolojik yan etkileri olan antiepileptik ilaçların hematolojik hastalığın eşlik ettiği epilepsi hastalarında kullanılmaları konusunda da çok dikkatli olunmasını önerilir. Bununla birlikte bu deneysel çalışmaların, yukarıda bahsedilen kısıtlılıkları aşacak şekilde yenilenmesi ve yapılacak yeni çalışmalarda bulunan farklılıkların klinik anlamlılığının değerlendirilebilmesi için fonksiyonel testlerin çalışmalara dahil edilmesi anlamlı olabilir. Devamında klinik çalışmalar ile alınan sonuçların desteklenmesi ve elde edilecek verilerin antiepileptik ilaç seçiminde dikkate alınmasını sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR

1. Tam kan viskozitesi açısından verilerimiz değerlendirildiğinde 10LAC grubu ile kontrol ve 3LAC grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.
2. Plazma viskozitesi açısından verilerimiz değerlendirildiğinde 10LAC grubu ile 3LAC ve 30LAC grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.
3. Osmotik fragilite testi parametrelerinden sadece minimum hemoliz konsantrasyon değerlendirildiğinde 30LAC grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptandı.
4. Çalışmamızda lakozamidin;
 - i. Tam kan viskozitesini belirli dozlarda arttırdığı
 - ii. Plazma viskozitesini belirli dozlarda arttırdığı
 - iii. Osmotik fragiliteyi belirli dozlarda arttırdığıgözlemlendi.
5. Lakozamidin, özellikle antiepileptik ilaç doz ayarlamasının önemli olduğu çocuk hastalarda kullanımında dikkatli olunması gerekebilir. Ayrıca eritrositin yapısal veya fonksiyonel hastalıklarında antiepileptik ihtiyacı durumunda bu etkilerinin akılda tutulması önem arz edebilir.

7. KAYNAKÇA

1. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol.* 1987;49(1):177–92.
2. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood, J Am Soc Hematol.* 2008;112(10):3939–48.
3. Doty P, Rudd GD, Stoehr T, Thomas D. Lacosamide. *Neurotherapeutics.* 2007;4(1):145–8.
4. Li J, Sun M, Wang X. The adverse-effect profile of lacosamide. *Expert Opin Drug Saf.* 2020;19(2):131–8.
5. Yang C, Yang Y, Peng Y, Zhang L, Yu D. Efficacy and safety of lacosamide in pediatric patients with epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Epilepsy Behav.* 2022;134:108781.
6. Çanakci PK, Şahin P, Kılınç S, Sevgili AM, Özyürek H. The Effect of Chronic Levetiracetam Use on Erythrocyte Deformability. *Neurol Sci Neurophysiol.* 2024;41(2):90–4.
7. Sevgili AM, Şahin P, Kılınç S, Yığman Z, Özyürek H. Effects of Topiramate, a Carbonic Anhydrase Inhibitor, on Erythrocyte Osmotic Fragility and Whole Blood Viscosity. *Acta Physiol.* 2023;237.
8. El-Sayed MS. Effects of exercise and training on blood rheology. *Sport Med.* 1998;26:281–92.
9. Dodds AJ, O'Reilly MJ, Yates CJ, Cotton LT, Flute PT, Dormandy JA. Haemorheological response to plasma exchange in Raynaud's syndrome. *Br Med J.* 1979;2(6199):1186–7.
10. Rand PW, Barker N, Lacombe E. Effects of plasma viscosity and aggregation on whole-blood viscosity. *Am J Physiol Content.* 1970;218(3):681–8.
11. Somer T. The viscosity of blood, plasma and serum in dys-and paraproteinemias. *Acta Med Scand Suppl.* 1966;456:1–97.
12. Sinan M. Hemoreoloji ve Patofizyolojik Önemi. *Tıp Fakültesi Klin Derg.* 2018;1(2):37–44.
13. El-Sayed MS, Ali N, Ali ZES. Haemorheology in exercise and training. *Sport Med.* 2005;35:649–70.
14. Chien S, Usami S, Taylor HM, Lundberg JL, Gregersen MI. Effects of hematocrit and plasma proteins on human blood rheology at low shear rates. *J Appl Physiol.* 1966;21(1):81–7.

15. Chien S, Usami S, Dellenback RJ, Gregersen MI. Shear-dependent deformation of erythrocytes in rheology of human blood. *Am J Physiol Content*. 1970;219(1):136–42.
16. Evans EA. [1] Structure and deformation properties of red blood cells: Concepts and quantitative methods. *Methods Enzymol*. 1989;173:3–35.
17. Koç ER, Erken G, Bilen C, Sackes Z, Gencer N. The effects of anti-epileptic drugs on human erythrocyte carbonic anhydrase I and II isozymes. *Arch Physiol Biochem*. 2014;120(4):131–5.
18. Kuo MS, Chuang CH, Cheng HC, Lin HR, Wang JS, Hsu K. Different involvement of band 3 in red cell deformability and osmotic fragility—a comparative GP. Mur erythrocyte study. *Cells*. 2021;10(12):3369.
19. Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, et al. *Wintrobe's clinical hematology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
20. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*. 2003;23(2):146–89.
21. Buabeng ER, Henary M. Developments of small molecules as inhibitors for carbonic anhydrase isoforms. *Bioorg Med Chem*. 2021;39:116140.
22. Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(13):4336–50.
23. Akin S, Ayaloglu H, Gultekin E, Colak A, Bekircan O, Akatin MY. Synthesis of 1, 2, 4-triazole-5-on derivatives and determination of carbonic anhydrase II isoenzyme inhibition effects. *Bioorg Chem*. 2019;83:170–9.
24. Ciccone L, Cerri C, Nencetti S, Orlandini E. Carbonic anhydrase inhibitors and epilepsy: State of the art and future perspectives. *Molecules*. 2021;26(21):6380.
25. Lomelino C, McKenna R. Carbonic anhydrase inhibitors: a review on the progress of patent literature (2011–2016). *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26(8):947–56.
26. Shishmanova-Doseva M, Peychev L, Koeva Y, Terzieva D, Georgieva K, Peychev Z. Chronic treatment with the new anticonvulsant drug lacosamide impairs learning and memory processes in rats: A possible role of BDNF/TrkB ligand receptor system. *Pharmacol Biochem Behav*. 2018;169:1–9.
27. Topiramatin Eritrosit Deformabilite Kan Vizkositesi ve Dalak Yapısı Üzerine Etkileri | AVESİS [Internet]. [cited 2024 Sep 19].

28. Öztepeli R, GÖK G, KILINÇ S, Aslan P, SEVGİLİ A, NEŞELİOĞLU S, et al. Zonisamid kullanımının eritrosit deformabilite ve oksidan sistem üzerine etkisi.
29. Oprisan B, Stoica I, Avadanei MI. Morphological changes induced in erythrocyte membrane by the antiepileptic treatment: An atomic force microscopy study. *Microsc Res Tech.* 2017;80(4):364–73.
30. Yalçın AD, Onaran İ, Yalçın AS. Effect of antiepileptic drugs on erythrocyte osmotic fragility and lipid peroxidation. *Epilepsy Res.* 1994;19(3):249–52.
31. Suwalsky M, Mennickent S, Norris B, Villena F, Sotomayor CP. Effects of the antiepileptic drug carbamazepine on human erythrocytes. *Toxicol Vit.* 2006;20(8):1363–9.
32. Suwalsky M, Mennickent S, Norris B, Villena F, Cuevas F, Sotomayor CP. The antiepileptic drug diphenylhydantoin affects the structure of the human erythrocyte membrane. *Zeitschrift für Naturforsch C.* 2004;59(5–6):427–31.
33. Reinhart WH, Lubzky S, Thöny S, Schulzki T. Interaction of injectable neurotropic drugs with the red cell membrane. *Toxicol Vit.* 2014;28(7):1274–9.
34. Ünal A, Kocahan Ö, Altun B, Aksoy Gündoğdu A, Uyanık M, Özder S. Quantitative phase imaging of erythrocyte in epilepsy patients. *Microsc Res Tech.* 2021;84(6):1172–80.

8. ÖZGEÇMİŞ

A. KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı			Dilan YEŞİLOĞLU
Akademik unvan/pozisyon			
Görev yeri			
Telefon numarası			
E-posta adresi			

B. EĞİTİM BİLGİLERİ

Yıl	Bölüm	Kurum	Derece
2010-2018	Tıp Fakültesi	Mersin Üniversitesi	Lisans
2020-	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Bilkent Şehir Hastanesi	

C. İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

Tarih Aralığı	Kurum	Görev
2019- 2019	Hakkâri Yüksekova Devlet Hastanesi	Pratisyen hekim
2020-	Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Asistan doktor

D. KLİNİK ARAŞTIRMALARLA İLGİLİ GENEL BİLGİLER

1. İyi Klinik Uygulamaları (İKU) ve klinik araştırma konularında alınan eğitim/sertifika bilgileri:		
Eğitim/sertifika adı ve eğitim yeri		Tarih
Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Gazi Üniversitesi HADYEK		01/11/2023-09/11/2023
2. Görev alınan klinik araştırma bilgileri:		
Klinik araştırma	Tarih Aralığı	Görev

9. EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

Evrak Tarih ve Sayısı: 13.08.2024-E.1016071



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : E-66332047-604.01-1016071
Konu : Değerlendirme ve Onay

13.08.2024

Doç.Dr.Hamit AKYÜREK
T.C. Sağlık Bakanlığı
Bilkent Şehir Hastanesi
Çocuk Nöroloji Ana Bilim Dalı

Daha önce 30.05.2024 tarih ve E.961865 sayılı yazımız ile onay alan, G.Ü.ET-24.055 kod numaralı ve **"Lakozamid Kronik Kullanımının Eritrosit Deformabilitesi Üzerine Etkisi"** başlıklı araştırma önerisi ile ilgili alınan 16.07.2024 tarihli dilekçe konusu Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun **09.08.2024** tarih ve **08** sayılı toplantısında incelenmiş olup,

Dilekçede; onay alınan çalışmanın Wistar Albino Sıçanlar ile yapılmasının planlandığı ancak; Üniversitemiz Labotuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) bu tür sıçanın sağlanmasının uzun süreceği bildirildiğinden, araştırmanın bir tez çalışması olması ve içerik açısından bu iki sıçan cinsinin arasında fark bulunmaması nedeni ile çalışmaya Sprague Dawley sıçanlar ile devam edilmesi ile ilgili talebinizin uygun görülmesine oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Fazlı POLAT
Rektör Yardımcısı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BSU1LYLFV3

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>



Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi :gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Gtner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57



Bu belge güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 09/08/2024	TOPLANTI SAYISI : 08
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)	
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.İpek SÜNTAR	
Prof.Dr.Serkan YAVUZ	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER	
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN	
Prof.Dr.Elvan ANADOL	
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ	
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN	
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ	
Doç.Dr. Abdullah ÖZER	
Doç.Dr. Sühan GÜRBÜZ	
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ	
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIĞMAN	
Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

— Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.