

Sıçan Hipokampusunda Çinkonun Sebep Olduğu Hücre Ölümüne Verapamilin Etkisi

Araş. Gör. Şerif DEMİR¹, Araş. Gör. Dr. Osman GENÇ¹, Araş. Gör. Dr. Faruk BAĞIRICI¹, Öğr. Gör. Dr. Mustafa AYYILDIZ¹, Araş. Gör. Adnan KORKMAZ², Dr. Niyazi TAŞÇI¹, Dr. Cafer MARANGOZ¹

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı SAMSUN

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı SAMSUN

✓ Sıçan hipokampusunda çinkonun nöronal hiperaktiviteye sebep olduğu bilinmektedir. Sunulan çalışma çinkonun sebep olduğu hücre ölümüne verapamilin etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Deneylede kullanılan sıçanlar üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki sıçanlara intrakortikal (i.c) 500 µg/kg çinkosülfat verildi. İkinci grup sıçanlara çinko ile beraber verapamil (1mg/kg, i.c) verildi. Üçüncü gruptaki sıçanlara ise 2µl serum fizyolojik verildi

Sıçanlar 7 gün sonra derin anestezi altında intrakardiyak yoldan perfüzyona alındı. Dorsal hipokampus bölgesinden hazırlanan kesitler hematoxylen-eosine ile boyandı. Stereotaksik bir atlas yardımıyla kesit seviyeleri tespit edildi. Hipokampustaki piramidal nöronlar ışık mikroskopuyla x400 büyütmeyle sayıldı. Çinko grubunda tüm kesit seviyelerinde milimetreye düşen hücre sayısı serum fizyolojik verilen kontrol grubunda 122.48±4.58/mm, çinko grubunda 35.12±1.35/mm, çinko + verapamil grubunda 93.90±2.06/mm olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlıydı (p<0.05).

Bu bulgular bize, çinkonun santral sinir sistemi nörotoksitesinde etkili olduğunu gösterdi. Ayrıca, kalsiyum antagonisti olan verapamilin hücre içine Ca⁺⁺ girişini durdurarak çinkosülfatin sebep olduğu hücre ölümünü azalttığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hipokampus, hücre ölümü, çinko toksitesisi, verapamil, sıçan.

✓ The neurotoxic and convulsant effects of zinc have been shown in several reports. In this study the density of piramidal neurons was investigated in hippocampus after intracortical injections of zinc sulfate.

Rats were divided into three groups. Zinc sulfate (500 µg/kg) was injected into the left hippocampus (near the Bregma) in first group. Zinc sulfate (500 µg/kg) and verapamil (1 mg/kg) were injected to the same region into the left hippocampus in the second group and an identical volume of saline (2 µl, %0.9) was given to the same region in third group as control group. After one-week observation, animals were perfused intracardially with neutral formaline (%10) under deep anaesthesia. The serial hippocampal sections were stained with the hematoxylen-eosine. The piramidal neurons in the dorsal hippocampus were counted under light microscope (with 400 x magnification). The density of piramidal cell was found in control, zinc and zinc + verapamil 112.48±4.58/mm, 35.12±1.35/mm, 93.90±2.06/mm as respectively.

The present results provide direct evidence that zinc might be a relatively potent neurotoxic in the central nervous system. Therefore it can be concluded that verapamil as a calcium antagonist decreased the central neural loss which is caused by zinc sulfate, by preventing calcium into the cell.

Key words: Hippocampus, cell death, zinc toxicity, verapamil, rat.

Epilepsi, aşırı nöron aktivitesinin görüldüğü en yaygın nörolojik hastalıklardan

birisidir⁽¹⁾ İnsan hipokampusunda nöron kaybının serebral iskemiden kaynaklandı-

ği epileptik nöbetlerin iskemiye sebep olan etkenlerden biri olduğu ileri sürülmüştür⁽²⁾. Daha sonraki yıllarda epilepsinin fizyopatolojik temellerinin anlaşılması ve tedavi edici ilaçların geliştirilebilmesi için "deneysel epilepsi modelleri" oluşturuldu^(3,4,5,6). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda; çinkonun, verildiği beyin bölgesinde nöronal hiperaktiviteye sebep olduğu gösterilmiştir^(7,8,17). Çinko epilepsisinde hipokampus ve serebellumda da hücre ölümü olduğu tesbit edildi⁽¹⁸⁾.

İskemi oluşumunda hücre içi Ca^{++} seviyesinin artışı çok önemlidir⁽¹²⁾. Bu nedenle son yıllarda iskeminin önlenmesi amacıyla kalsiyum antagonistleri kullanılmaya başlanmıştır. Kalsiyum antagonistleri hücre içerisinde Ca^{++} akışını engellediğinden farmakolojik olarak iskeminin önlenmesinde önemlidir⁽¹³⁾.

Literatür taramalarında çinkonun sebep olduğu hücre ölümü ve verapamil ilişkisine rastlanamamıştır. Sunulan çalışmanın amacı, beyin korteksine verilen çinkonun meydana getirdiği piramidal hücre ölümünün verapamil tarafından nasıl etkilediğini tespit etmektir.

MATERYAL VE METOD:

Deneylerde ağırlıkları 200-300 g olan albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki sıçanlara (n=10) 500 µg/kg çinkosülfat (i.c.), ikinci gruptaki sıçanlara (n=10) çinkosülfatın yanında 1 mg/kg verapamil (i.c.) verildi. İntrakortikal uygulama sol hemisferde Bregmanın laterale mikroyenjektör (Hamilton) ile yapıldı. Daha sonra 7 gün süre ile intraperitoneal (i.p.) olarak verapamil (20 mg/kg) verildi. Üçüncü gruptaki hayvanlara (n=7) ise 2 µl serum fizyolojik uygulandı.

Sıçanlar 7 gün yaşadıktan sonra derin anestezi (100 mg/kg ketalar) altında intra-

kardiyak yoldan perfüzyona alındı. Dorsal hipokampus bölgesinden elde edilen frontal kesitler hematoxylen-eosine ile boyandı.

Kesit seviyeleri bir stereotaksik atlas yardımıyla tespit edildi⁽¹⁴⁾. Farklı kesit seviyelerinde sağ ve sol dorsal hipokampusun CA1, CA2, CA3 bölgelerinde bulunan piramidal hücreler ışık mikroskopunda x400 büyütmeyle sayıldı. Üç ayrı gruptan elde edilen sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde Mann Whitney U testi kullanıldı.

BULGULAR:

Serum fizyolojik verildikten 7 gün sonra perfüzyona alınan kontrol grubunda sağ dorsal hipokampusun CA1 bölgesinde piramidal hücrelerin yoğunluğu 123.4±5.46/mm, CA2 bölgesinde; 117.17±6.24/mm, CA3 bölgesinde ise 113.56±3.90/mm olarak bulundu. Çinko grubunda ise sağ dorsal hipokampustaki piramidal hücrelerin yoğunluğu CA1 bölgesinde 38.28±1.27/mm; CA2 bölgesinde 34.47±1.62/mm; CA3 bölgesinde ise 34.19±1.21/mm idi. Çinko + verapamil grubunda ise sağ dorsal hipokampusun CA1 bölgesinde 101.41±12.60/mm; CA2 bölgesinde 89.89±2.07/mm, CA3 bölgesinde ise 92.98±1.54/mm şeklindeydi.

Sağ dorsal hipokampusun CA1, CA2, CA3 bölgelerinde hücre sayısı bakımından kontrol grubuyla çinko grubu arasındaki farklılık istatistik açıdan anlamlıydı (p<0.05, Tablo I). Kontrollere göre çinko grubunun CA1, CA2, CA3 bölgelerindeki piramidal hücre sayısı %68 oranında daha azdı.

Çinko + verapamil grubuyla kontrol grubunun sağ ve sol dorsal hipokampusunda CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri arasında hücre sayısı bakımından anlamlı bir farklılık yoktu (p>0.05, Tablo III, IV). Çinko grubu ile çinko + verapamil grubunun sağ ve sol dorsal hipokampusunun CA1,

CA2 ve CA3 bölgelerinde bulunan piramidal hücrelerin sayısı arasındaki fark istatistik açıdan anlamlıydı ($p < 0.05$, Tablo V, VI).

Kontrol grubunun sol hipokampus CA1 bölgesinde piramidal hücrelerin yoğunluğu $129.14 \pm 4.02/\text{mm}$, CA2'de $117.17 \pm 6.24/\text{mm}$, CA3'de $113.56 \pm 3.90/\text{mm}$ olarak sayıldı (Tablo II). Çinko grubunda ise sol dorsal hipokampusta piramidal hücre yoğunluğu CA1 bölgesinde $35.64 \pm 1.37/\text{mm}$, CA2 bölgesinde $33.93 \pm 1.50/\text{mm}$, CA3 bölgesinde $32.84 \pm 1.16/\text{mm}$ olarak sayıldı (Tablo II). Çinko+verapamil grubunda ise sol dorsal hipokampusun CA1 bölgesinde $98.84 \pm 2.82/\text{mm}$, CA2'de $88.48 \pm 1.94/\text{mm}$, CA3'de $91.80 \pm 1.39/\text{mm}$ olarak tespit edildi (Tablo VI).

Sol dorsal hipokampusun CA1, CA2,

CA3 bölgelerinde hücre sayısı bakımından kontrol grubuyla çinko grubu arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlıydı ($p < 0.05$). Kontrollere göre çinko grubunun CA1, CA2, CA3 bölgelerinde hücre sayısı %73 oranında daha azdı.

Sol hipokampusta hücre kaybının daha fazla olması, çinkonun sol hemisfere verilmesiyle ilişkili olabilir. Aynı grubun CA1, CA2, CA3 bölgeleri arasında istatistiki açıdan fark tespit adilemedi ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, sıçanda beyin korteksine verilen $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ çinkosülfat hipokampus-taki piramidal hücrelerde ölüme sebep ol-

Tablo I: Çinko ve kontrol gruplarında Sağ dorsal hipokampus piramidal hücrelerinin karşılaştırılması:

Sayım yapılan bölge	Çinko Sağ (n=10)*	Kontrol Sağ (n=7)*	% Hücre farkı	p
CA1	38.28 ± 1.27	123.48 ± 5.46	69.02	< 0.05
CA2	36.47 ± 1.62	117.17 ± 6.24	65.35	< 0.05
CA3	34.19 ± 1.21	113.56 ± 3.90	69.89	< 0.05

* Hücre yoğunluğu/ $\text{mm} \pm \text{SEM}$, n= Hayvan sayısı

Tablo II: Çinko ve kontrol gruplarında Sol dorsal hipokampus piramidal hücrelerin karşılaştırılması:

Sayım yapılan bölge	Çinko Sol (n=10)*	Kontrol Sol (n=7)*	% Hücre farkı	p
CA1	35.04 ± 1.37	129.94 ± 4.02	73.03	< 0.05
CA2	33.93 ± 1.50	128.34 ± 4.56	73.56	< 0.05
CA3	32.84 ± 1.16	122.42 ± 3.29	73.17	< 0.05

* Hücre yoğunluğu/ $\text{mm} \pm \text{SEM}$, n= Hayvan sayısı

Tablo III: Kontrol ve çinko + verapamil gruplarında sağ dorsal hipokampusta piramidal hücre yoğunluklarının karşılaştırılması

Sayım yapılan bölge	Kontrol Sağ (n=7)*	Çinko+verapamil Sağ (n=10)*	% Hücre farkı	p
CA1	123.48±5.46	101.41±2.6	17.87	> 0.05
CA2	117.17±6.24	89.89±2.07	23.28	> 0.05
CA3	113.56±3.90	92.98±1.55	18.12	>0.05

* Hücre yoğunluğu/mm±SEM, n= Hayvan sayısı

Tablo IV: Kontrol ve çinko+verapamil gruplarında sol dorsal hipokampusun piramidal hücre yoğunluklarının karşılaştırılması

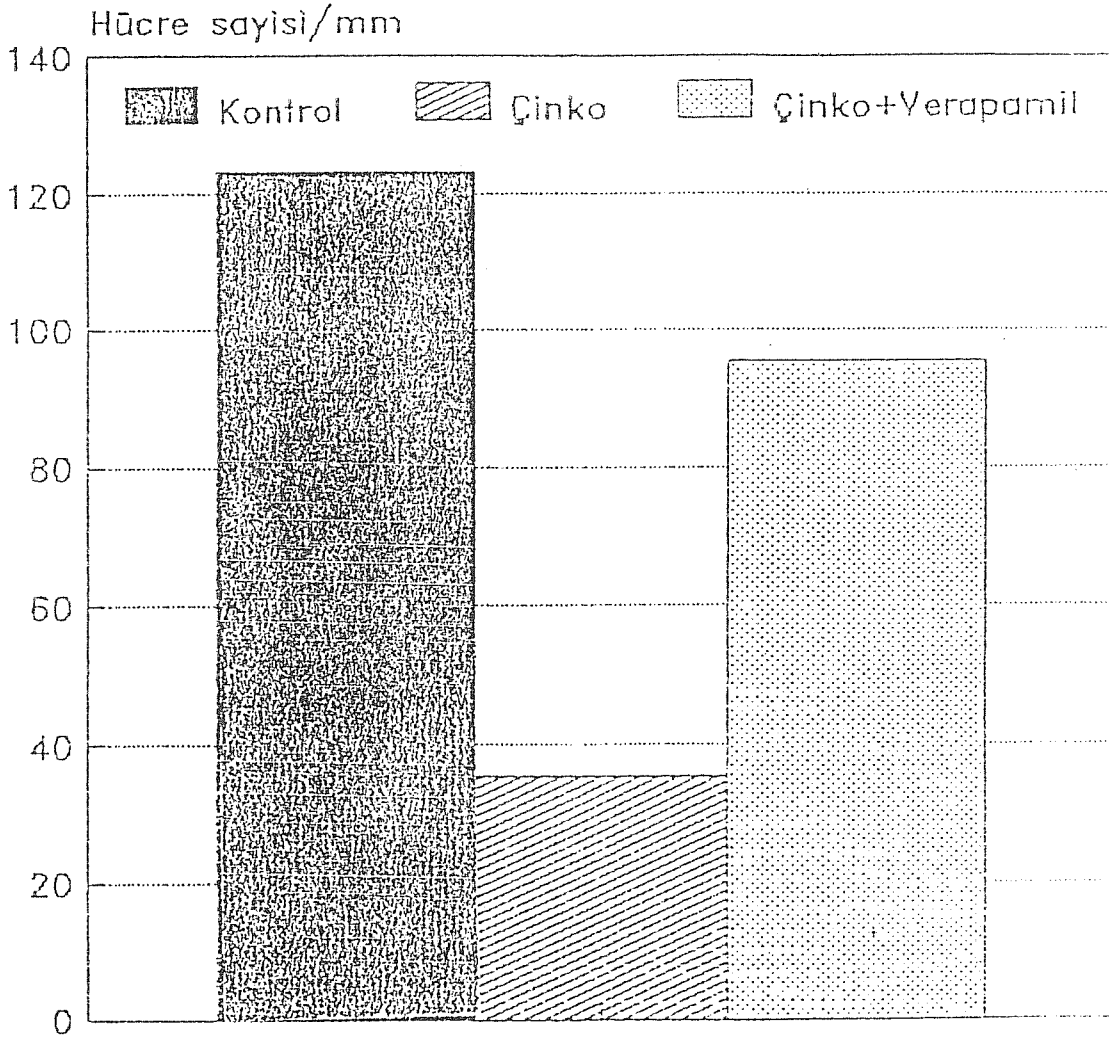
Sayım yapılan bölge	Kontrol Sol (n=7)*	Çinko+verapamil Sol (n=10)*	t	% Hücre farkı	p
CA1	129.94±4.02	98.84±2.82	6.32	29.23	> 0.05
CA2	128.34±4.56	88.49±1.94	8.01	31.05	> 0.05
CA3	122.42±3.29	91.80±1.39	8.56	25.01	> 0.05

* Hücre yoğunluğu/mm±SEM, n= Hayvan sayısı

Tablo V: Çinko+verapamil gruplarında sağ dorsal hipokampusun piramidal hücre yoğunluklarının karşılaştırılması

Sayım yapılan bölge	Çinko Sağ (n=10)*	Çinko+verapamil Sağ (n=10)*	t	% Hücre farkı	p
CA1	38.28±1.27	101.41±2.60	21.78	62.25	< 0.05
CA2	36.47±1.62	89.89±2.07	20.28	59.42	< 0.05
CA3	34.19±1.21	92.98±1.54	29.94	63.22	< 0.05

* Hücre yoğunluğu/mm±SEM, n= Hayvan sayısı



Şekil 1: Kontrol ve deney gruplarında tüm hipokampusta primidal hücre yoğunluğu.

Tablo VI: Çinko ve çinko+verapamil gruplarında sol dorsal hipokampusun piramidal hücre yoğunluklarının karşılaştırılması

Sayım yapılan bölge	Çinko Sol (n=10)*	Çinko+verapamil Sol (n=10)*	t	% Hücre farkı	p
CA1	35.04±1.37	98.84±2.82	20.31	64.54	< 0.05
CA2	33.93±1.50	88.49±1.94	22.21	61.65	< 0.05
CA3	32.84±1.16	91.80±1.39	32.38	64.22	< 0.05

* Hücre yoğunluğu/mm±SEM, n= Hayvan sayısı

makta; verapamil çinkonun nörotoksik etkisini önemli ölçüde azaltmaktadır. Çinkonun nörotoksik etkisini konu edinen çok az çalışma vardır. Doku kültürü ortamında çinkoya maruz kalan beyin korteksi nöronlarının dejenere olduğu, dejenerasyonun hem çinko konsantrasyonuna hem de çinkonun etki süresine bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir⁽¹⁹⁾. Gelişmesini tamamlamamış nöronlarda ve glia hücrelerinde ise çinkoya bağlı dejenerasyonun daha az etkili olduğu bilinmektedir⁽¹⁵⁾. İntrakortikal olarak verilen çinko sıçanda nöronal hiperaktiviteye⁽¹⁶⁾ve hipokampus piramidal hücreleri ile beyinciğin purkinje hücrelerinde de dejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir.⁽¹⁰⁾ Çinko enjeksiyonu ile perfüzyon arasındaki süre uzadıkça nöron kaybı artmaktadır⁽¹⁹⁾.

Çinko glutamat salınımına ve buna bağlı olarak nöron içine su ve klorür girişine sebep olmaktadır. Bu durum akut safhada hücrenin şişmesiyle karakterizedir⁽¹⁷⁾. Glutamatın nörotoksik etkisi ekstraselüler kalsiyum seviyesine bağlıdır.

Sunulan çalışmada kalsiyum kanal blokeri verapamilin hücre içine kalsiyum ve su girişini engelleyerek hücre ölümünü azalttığı düşünülmektedir.

Geliş Tarihi: 28.12.1995

Yayına Kabul Tarihi: 04.04.1996

KAYNAKLAR

1. Peedley TA. Epilepsy and electroencephalogram . In: Schwartzkroin P. A., Wheal, H. (Eds.). Electrophysiology of Epilepsy (London), Academic Press, 1984; 1-30.
2. Spielmeyer W. Die pathogenese des epileptischen Krampfsfes Z. ges. Neurol Psychiat 1927; 109:501-520.
3. Barbeau A., Donaldson J. Zinc, taurine and epilepsy. Arch Neurol 1974;52-58.
4. Chung SH., Johnson MS. Divalent transition metal ions (Cu⁺⁺, Zn⁺⁺) in the brains of epileptogenic and normal mice. Brain Res 1983; 280:323-334.
5. Chung SH., Johnson MS. Studies on sound-induced epilepsy in mice. Proc Roy Soc (London) 1984; 221:145-168.
6. Donaldson J., Pierre T., Minnich J., Barbearu A. Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of Na⁺-K⁺-ATP' ase. Can J Biochem 1971; 49:1212-1224.
7. Pei Y., Zhao D., Haung J., Cao L. Zinc-

- induced seizures a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia* 1983; 24:169-176.
8. Reid SA., Sybert GW. Acute FeCl₃-induced epileptogenic foci in cats: Electrophysiological analyses. *Brain Res* 1980; 188:531-542.
 9. Wilimore LJ., Sybert GW., Munson JB. Recurrent seizures induced by cortical iron injections a model of posttraumatic epilepsy. *Ann Neurol* 1978; 4:329-336.
 10. Kopeloff LM. Experimental epilepsy in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960; 104:500-504.
 11. Marangoz C., Ağar E., Ayyıldız M., Taşçı N. intrakortikal çinko sülfattan sonra sıçan hipokampusunda Piramidal hücrelerin azalması, *Doğa Tr J Medical Sciences* 1990; 14:231-237.
 12. Ağar E., Taşçı N., Marangoz C. Sıçanda korteks içine verilen çinko sülfatın Purkinje hücreleri sayısına etkisi. *DOĞA Tr J of Medical Sciences* 1990; 14:238-247.
 13. Choi DW., Yokoyama M., Koh J., Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience* 1988; 24:67-79.
 14. Flayn CJ., Farooqui AA., Horocks LA. Ischemia and hipoxia. In: Siegel GJ. et al (Eds.). *Basic Neurochemistry, Molecular Cellular and Medical Aspects* New York, Raven Press, 1989; 783.
 15. Weiner DA. Calcium channel blockers. *Med Clin North America* 1988; 72:83.
 16. Pellegrino LJ., Cushman AJ. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain* New York, Plenum press, 1981.
 17. Lees GJ., Lehmann A., Sandberg M., Hamberger A. The neurotoxicity of zinc in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 1990; 120:155-158.
 18. Marangoz C., Ayyıldız M., Taşçı N. Fenobarbital, nöronları intrakortikal çinkonun toksit etkisinden korumaktadır. *DOĞA Tr J Medical Science* 1991; 15:378-383.
 19. Marangoz C., Genç H. Tavşanda intrakortikal çinkosülfattan sonra Purkinje hücrelerinde azalma. *T KL Tıp. Bil. Araş. Der.* 1990; 8:67-74.

