



¹ Ertu rul KAYA

Dört Damar Oklüzyon Yöntemiyle Beyin İskemisi Olu turulan Sıçanlarda Nilvadipinin Bellek Bozuklu u Ve Hipokampus Malondialdehit Düzeylerine Etkileri

² Funda BÖLÜKBA I HAT P

Effect of Nilvadipine on Memory Impairment and Hippocampal Malondialdehyde in Rats with 4-Vessel Occlusion Ischemia

³ smail YILMAZ

² zzzettin HAT P-AL-KHAT P

ÖZET

Amaç: Nilvadipin, farklı nöronal hastalık modellerinde nöron koruyucu etki gösteren dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokeridir. Bu çalışmada, profilaktik olarak kullanılan nilvadipinin, sıçanlarda 4-damar oklüzyonu (4-DO) ile oluşturulan global beyin iskemisi modelinde bellek bozukluğu ve hipokampal malondialdehid (MDA) düzeyine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: 4-DO iskemisi modeli oluşturulmasında, Wistar sıçanların vertebral arterleri kalıcı olarak koterize edilip, ana karotis arterler ise iki taraflı olarak 60 dakika arayla 10 dakika süreyle 2 defa geçici olarak klemplendi. Bellek için iki sekiz kollu labirente doğru seçim ve yanlış seçimleri ölçerek değerlendirildi. İskemiden bir hafta sonra tiobarbitürik asit yöntemiyle hipokampusta MDA düzeyleri ölçüldü. Çalışmamızda sham, iskemisi-kontrol ve iskemisi-nilvadipin olmak üzere üç grup kullanıldı. Nilvadipin, iskemisi öncesi 7 gün boyunca intraperitoneal olarak 3,2 mg/kg/gün dozunda verildi.

Bulgular: İskemisi, doğru seçimleri (uzak-referans bellek) azaltıp yanlış seçimleri (yakın-çalışma bellek) artırarak ($p<0,001$) bellek bozukluğunu oluşturdu. Nilvadipin doğru seçimleri artırıp ($p<0,002$) yanlış seçimleri azaltarak ($p<0,05$) bellek bozukluğunu düzeltti. İskemisi ile artan ($p<0,001$) MDA düzeyi nilvadipin tarafından azaltıldı ($p<0,001$).

Sonuç: Nilvadipinin profilaktik olarak uygulanması 4-DO iskemisinin neden olduğu bellek bozukluğunu iyileştirip hipokampal MDA artışını azalttı. Nilvadipinin profilaktik kullanımını riskli hastalarda iskemiyeye bağlı bellek bozukluğunun engellenmesinde yararlı olabilir.

Anahtar Sözcükler: Dört-Damar Oklüzyon İskemisi, Hipokampus, Bellek Bozukluğu, Malondialdehid, Nilvadipin.

¹ Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, DÜZCE

¹ Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, DENİZLİ

¹ Zeynep Bozyaka Etilim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Farmakoloji, ZM R

Submitted/Başvuru tarihi:
20.03.2013
Accepted/Kabul tarihi:
31.03.2013
Registration/Kayıt no:
13 03 283

**Corresponding Address
/Yazma Adresi:**

Dr. Ertu rul KAYA, MD.

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 81620, DÜZCE.
e-posta: drekaya@yahoo.com

© 2013 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

SUMMARY

Purpose: Nilvadipine is a dihydropyridine-type calcium channel blocker with neuroprotective properties in various models of neuronal diseases. This study aimed at investigating the prophylactic effect of nilvadipine on memory impairment and hippocampal malondialdehyde (MDA) levels in global brain ischemia model induced by 4-vessel occlusion ischemia (4-VO) in rat.

Materials and methods: The 4-VO ischemia was induced in Wistar rats by occluding the vertebral arteries permanently by cauterization. The common carotid arteries were twice occluded bilaterally for 10 minute at 60 minute interval. One week after 4-VO the memory was evaluated measuring the correct and error choices in 8-armed radial maze. The ischemia-reperfusion-induced damage was evaluated measuring level of MDA in the hippocampus using thiobarbituric acid method. The study involved three groups: sham, ischemia-control and ischemia nilvadipin. Nilvadipine (3.2 mg/kg/day) was administered for 7 days prior to 4-VO.

Results: The 4-VO impaired memory performance by decreasing the correct choices (long term-reference memory) and increasing the error choices (short term-working memory) ($p<0,001$). Nilvadipine improved the performance by increasing the correct choices ($p<0,002$) and decreasing the error choices ($p<0,05$). Nilvadipine decreased ($p<0,001$) the elevated MDA induced by 4-VO.

Conclusion: The prophylactic treatment with nilvadipine improved memory impairment and reduced the elevated hippocampal MDA induced by 4-VO. The prophylactic use of nilvadipine could be beneficial for inhibiting the ischemia related memory impairment in risky patients.

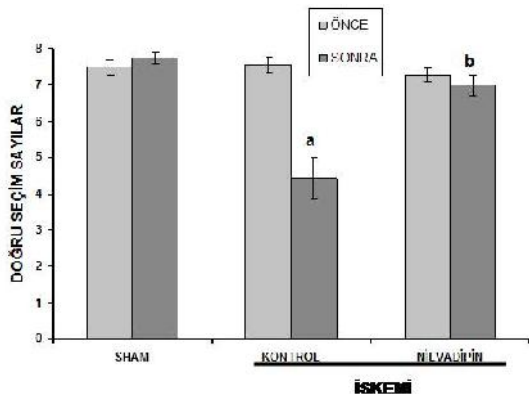
Keywords: Four-Vessel-Occlusion ischemia, Hippocampus, Memory impairment, Malondialdehyde, Nilvadipine.

G R

Bellek bozukluğu, demans ile karakterize olan hastalıklarda (Alzheimer's hastalığı-AH, damarsal demans ve damarsal kognitif bozukluk dahil) görülür (1, 2). İmmün ile bellek bozukluğu arasındaki ilişki açık biçimde ortaya konmuş değildir. İmmün neden sonra görülen bellek bozukluklarında iskemiye bağlı hücre zedelenmesi üzerinde durulmaktadır (3, 4).

Damarsal nedenlerden kaynaklanan kan akımı yetersizliği sonucu oluşan hipoksi, apoptozis veya nekroz ile sonuçlanan hücre harabiyete yol açar. Enerji hipoksi devam ederse geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Kemik dokulara kan akımının tekrar sağlanması, geri dönüşümlü zedelenmeye ve ramı hücrelerin iyilemesiyle sonuçlanırken, geri dönüşümsüz zedelenmeye ve ramı olanları etkilemez (5, 6). Reperfüzyon hasarından farklı mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. Bunlardan önemli bir kısmı reaktif oksijen türevleridir (reactive oxygen species: ROS). Dış yörüngelerinde elektron bulanan bu radikaller oldukça reaktiftir ve protein, lipid, karbohidrat gibi organik ve inorganik kimyasal maddelerle, özellikle hücrede nükleik asitler ve membranlarla tepkimeye girerler (5). ROS'lar termodinamik stabilite kazanmak için yakınında bulunan diğer moleküllerdeki elektron ya da hidrojen atomlarını serbestleştirmeye çalışarak bu molekülleri aktif radikal haline getirmektedir. Oluşan serbest radikaller, hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken hücre dışı kompartmana da geçerek uzak etkiler oluşturabilmektedirler (7). Hücrede ve dokularda hasara neden olan ROS'ların belirlenmesi amacıyla pek çok lipid türevleri ölçülebilmekle birlikte en sık malondialdehit (MDA) ölçümü kullanılmaktadır (8).

Nilvadipin, L-tipi kalsiyum kanallarını selektif olarak bloke eden dihidropiridin yapısında bir kalsiyum kanal blokeridir. Diğer kalsiyum kanal blokerleri gibi damar düz kaslarında vazodilatasyon yapar ve halen antihipertansif ilaç olarak kullanılmaktadır. Terapötik doz aralığında kalbin ileti sistemi üzerine belirgin bir etkisi yoktur. Deneysel çalışmalarda aterosklerozdan koruyucu özelliğinin olduğu gösterilmiştir (9). Damarsal etkilerinin dışında nilvadipinin nöroprotektif etkinliği hakkında bir süredir yoğun olarak deneysel çalışmalar yapılmaktadır. Nilvadipinin tek doz (10) ve kronik kullanımı ile (11) beyin kan damarları düz kaslarındaki kalsiyum kanallarını da inhibe ederek, beyin kan akımını artırdığı gözlemlenmiştir. Beyin iskemisi modellerinde, nilvadipin hipokampal apoptozisi (12) ve beyinde infarkt alanını ve ödemi (13) anlamlı derecede azaltmıştır. Nilvadipin, selektif olarak hipokampus CA1 bölgesi nöronlarının yavaş ve hızlı akımlı L-tipi kalsiyum kanallarını bloke etmiştir



ekil 1: Nilvadipinin 4-DO iskemisi modelinde sekiz kollu labirent do ru seçim sayılarına etkisi. İstatistiksel önemli fark (tek yönlü ANOVA): ^ap<0,0002 iskemi-kontrol sham'a karşı; ^bp<0,001 iskemi-nilvadipin iskemi-kontrol'a karşı.

(14) ve aynı etkiyi hipokampal nöron hücre kültürlerinde de göstermiştir (15). Nilvadipinin hipokampustaki yavaşlanmaya neden olan mekanizmaları bozarak, yavaşlanmaya bağlı gelişen bellek bozukluğunu düzelttiği de öne sürülmüştür (16).

İnsanlarda görülen bellek bozukluğunu deney hayvanlarında modellemek amacıyla özellikle son yıllarda AH için yeni deneysel modeller uygulanmaya başlanmıştır (17). Çalışmamızda deney hayvanlarında bellek bozukluğu modeli gerçekleştirilmek için tekrarlayıcı geçici global beyin iskemisi modeli olarak dört damar oklüzyon (4-DO) modeli uygulanmıştır. Bu modelde iskemi gelişimi; kan akımı, metabolizma ölçümü ve histopatolojik çabalarla malar ile kanıtlanmıştır (18, 19, 20).

İmmün hastalığından kaynaklanan bilişsel bozuklukların tanı ve tedavi olasılığı bulunmaktadır (21). Bu çalışmada, profilaktik olarak kullanılan nilvadipinin 4-DO modelinde hipokampal MDA düzeyine ve bellek bozukluğuna olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul onayı alınmıştır ve tüm çalışmamız süresince deney hayvanları çalışmaya etikine uyulmuştur.

Deney Hayvanları

Çalışmamızda 4-6 aylık, 220-300g ağırlığında 30 Wistar erkek sıçan kullanılmıştır (Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi), ancak seçim ve operasyonlar sonrasında toplam 22 sıçan deneye alınmıştır. Deney hayvanlarının tamamı çalışmamız boyunca 22±2 °C oda ısısında, %50±5 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü bulunan bir ortamda takip edilmiştir.

Deneye alınacak her sıçana sekiz kollu labirent yöntemi uygulanarak, sıçanlar rastgele olarak üç gruba ayrılmıştır:

1) Sham grubu (n=8): Operasyon öncesi 7 gün boyunca salin (%0,9 NaCl) verilip vertebral arter koterizasyonu yapılarak, iki taraflı ana karotis arterleri etrafında gevşek bir düm atılan ancak arter klempini kullanılmayan grup.

2) İskemi-kontrol grubu (n=7): Operasyon öncesi 7 gün boyunca salin verilerek bu süre sonunda operasyon günü deneysel 4-DO yöntemiyle global beyin iskemisi modeli uygulanan grup.

3) İskemi-nilvadipin grubu (n=7): Operasyon öncesi 7 gün boyunca nilvadipin 3,2 mg/kg/gün dozunda profilaktik olarak 7 gün boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanarak, süre sonunda operasyon günü deneysel 4-DO yöntemiyle global beyin iskemisi modeli uygulanan grup.

Sekiz Kollu Labirent Çalışması

Deneyde kullanılan sıçanların tamamına, tüm işlemlerden önce sekiz kollu labirent çalışması uygulanmıştır. Çalışmaya için kullanılan aygıt daha önce belirtilen şekilde yapılmıştır (12). Bu aygıt yerden 50 cm yükseklikte bir tabela üzerinde konulan 24 cm çapında ve sekizgen şekilde merkezi bölümden yayılan sekiz adet kola sahiptir (her kol 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde ve etrafı 50 cm yükseklikte saydam duvarla çevrilmiştir). Her kolun sonunda 1 cm derinlikte ve 3 cm çapında bir yem (30-50 mg ağırlıkta) tabakası yer almaktadır. Çalışmanın yapıldığı odaya, sıçanların görebileceği şekilde, sınama aygıtının kenarlarından 50 cm uzakta, görsel cisimler yerleştirilmiştir. Tüm çalışmalar boyunca çevre düzeni ve aydınlatma hiç değiştirilmemiştir. Tüm çalışmalar saat 09:00-13:00 arası yapılmıştır. Sınama süresince sıçanlara kısıtlı yem verme yöntemi uygulanmıştır. Deney boyunca su kısıtlaması yapılmamıştır. Cihazdan 2 metre yukarıya, bir kamera yerleştirilerek, tüm çalışmalar görüntüleri bilgisayara aktarılmıştır ve sıçanların her kolu ziyaretlerini "zaman-seçim sayısı-girilen kol numarası" üçlüsü olarak kayıt yapan bir yazılım (Amonra Stop Watch) kullanılarak veriler kaydedilmiştir.

Sıçanların her kola girişleri bir seçim olarak kaydedilmiştir. Her

kola ilk giri leri do ru seçim (DS), herhangi bir kola ikinci ve daha sonraki tekrar giri leri ise yanlı seçim (YS) olarak de erlendirilmi tir. Her çalı ma turu bir sıçan her 8 kolu ziyaret etti inde veya 10 dakika tamamladı nda sonlandırılmı tir. Sıçanların ilk 8 seçimi bu yöntemle de erlendirilmi tir. Sekiz kollu labirent uygulaması, ön alı tırma, ö renme/seçim ve post operatif de erlendirme bölümleri olmak üzere toplam 3 bölüm olarak yapılmı tir.

1. Ön alı tırma bölümünde sıçanlar grup halinde (5 sıçan/grup) üç gün boyunca günde 10 dakika süreli üç tur olmak üzere ve turlar arası 60 dakika ara ile aygıt ve yeme alı tırılmı tir.

2. Ö renme/Seçim bölümünün amacı sıçanların çalı mayı ö renmesidir. Bu amaçla 14 gün boyunca her sıçana tek tek, hergün turlar arası 60 dakika olacak ekilde günde 3 tur uygulanmı tir. Öndördüncü gün sıçanların seçimi yapılmı tir. Seçim günü herhangi bir turda ilk sekiz seçim içinde 7 veya 8 DS yapan hayvanlar ö renmi olarak deneye seçilmi tir. Bu özelli i sa layamayan hayvanlar deneye alınmamamı tir. Seçim günü verileri operasyon sonrası veriler ile kar ıla tırılarak de erlendirme yapılmı tir.

3. Post operatif de erlendirme bölümünde seçim sonrası bir gün ara verilerek iskemi modeli uygulanmı tir ve yedi gün sonra tüm hayvanlara tek tur olarak sınama uygulanmı tir. Bu sınama ö renme bölümündeki aynı özelliklere göre uygulanıp, ilk sekiz seçimleri de erlendirilmi tir.

Dört Damar Oklüzyon Modeli ve skemi Uygulaması

Deneydeki sham grubu dı ndaki tüm sıçanlara dört damar oklüzyon yöntemiyle yapılan deneysel tekrarlayıcı geçici global beyin iskemisi modeli, daha önceden belirlenmi protokole uygun olarak yapılmı tir (12). Bu modelde tüm hayvanlara operasyon öncesi inhale anestezi uygulanmı tir. nhale anestezi için izofluran (Isoflurane, Rhodia Organique Fine Ltd., Baltimore, ngiltere) % 2-3 oranında kullanılmı tir.

skemi modeli için öncelikle vertebral arter bipolar koagülatör kullanılarak koterlenmi tir. Bu i lem her iki tarafta yapılarak baziller arteri besleyen her iki vertebral arterin kalıcı olarak kapatılması sa lanmı tir. Operasyonun ikinci a masında, sıçanların bilateral karotis arterleri pamuk iplikle askıya alınarak iplik cilt altına yerle tirilip cilt dikilmi tir. Operasyondan bir gün sonra, karotis arterler yüzeye çıkarılmı ve 100 g'lık arter klempleri kullanılarak 10 dakika boyunca her iki arteria karotis kommunisler kapatılmı tir. On dakika sonunda klempler çıkarılmı tir ve 60 dakika ara verilerek aynı klempleme i lemi tekrarlanmı tir. Tüm sıçanlara operasyon sonrası sıvı kaybını yerine koymak amacıyla 4 mL saline cilt altından verilmi tir. Operasyon sonrası yedinci gün tüm sıçanlara sekiz kollu labirent

sınaması uygulandıktan sonra, derin eter anestezisi uygulanmı ve anestezi altındaki bu sıçanlar dekapite edilmi tir. Sıçanların hızlı bir ekilde beyinleri çıkarılmı , bir lam üzerine alınarak hemen -20 °C'de donmaya bırakılmı tir.

Malondialdehid (MDA) Ölçümü

Hipokampus örneklerinde MDA düzeyi ölçümü, asidik ortamda tiobarbitürik asitle olu turdu u rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanan, Ohkawa ve arkada larınca belirlenen yöntem uygulanarak yapılmı tir (22). Bu yöntemde kısaca; 0,5 mL doku homojenatı üzerine %8,1 sodyum dodesil sülfat 0,2 mL, pH'sı 3,5 olan %20 asetik asit 1,5 mL ve %0,8 tiobarbitürik asit solüsyonu 1,5 mL eklenerek 95 °C'de 60 dakika boyunca ısıtılmı tir. So utulduktan sonra 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilmi ve üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçülmü tür. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak çizilen ölçümleme grafi inde numunedeki MDA miktarı hesaplanmı ve nmol/g-doku olarak ifade edilmi tir (23).

laç uygulamaları

Bu çalı mada kullanılan Nilvadipin Astellas Pharma Inc. Osaka, Japonya firmasından sa lanmı tir. Nilvadipin önce birkaç damla etil alkolde çözündürülüp distile su ile seyreltilerek solüsyon ekinde hazırlanmı tir.

statistiksel analiz

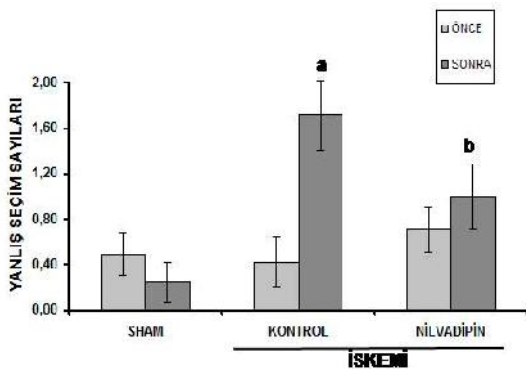
Sıçanların sekiz kollu labirent ba arıları iskemi öncesi ve sonrası gruplar arasında kar ıla tırılmı tir. skemi-kontrol grubu sham grubuyla kar ıla tırılırken, Nilvadipin grubu ise iskemi-kontrol grubu ile kar ıla tırılmı tir. Ayrıca her grupta, grup içi iskemi öncesi ve sonrası kar ıla tırması da yapılmı tir. MDA verileri ise operasyon sonrası gruplar arası olarak kar ıla tırılmı tir. Çalı mada istatistiksel de erlendirme, tek yönlü ANOVA analizi kullanılarak yapılmı tir.

BULGULAR

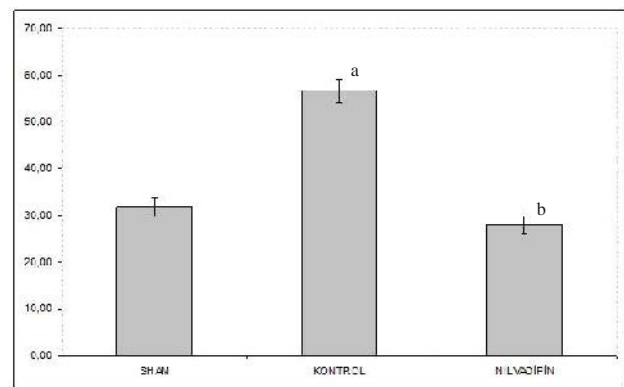
Bellek Üzerine Olan Etkiler

Operasyon öncesindeki DS sayısı sham grubunda $7,50 \pm 0,20$; iskemi-kontrol grubunda $7,57 \pm 0,22$; nilvadipin grubunda $7,29 \pm 0,20$ olarak bulundu. Bu de erler kar ıla tırıldı nda tüm gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık görülmedi.

Operasyon sonrası bütün grupların DS sayıları kar ıla tırıldı nda, aralarında anlamlı fark bulundu ($p < 0,001$). Sham grubunda DS $7,75 \pm 0,17$ de erindeydi. Bu de er operasyon öncesindekinden farklı de ildi. skemi-kontrol grubunda uygulanan iskemi DS'yi anlamlı olarak ($p < 0,0002$) aynı grup iskemi öncesine göre $4,43 \pm 0,57$ 'ye dü ürdü. Öte yandan nilvadipin, iskemi-kontrol grubunda görülen azalmayı düzelterek DS sayısını $7,00 \pm 0,24$ 'e kadar yükseltti ($p < 0,002$) (ekil 1).



ekil 2: Nilvadipinin 4-DO iskemisi modelinde sekiz kollu labirent yanlı seçim sayılarına etkisi. statistiksel önemli fark (tek yönlü ANOVA): ^a $p < 0,001$ iskemi-kontrol sham'a kar ı; ^b $p < 0,04$ iskemi-nilvadipin iskemi-kontrol'a kar ı.



ekil 3: Nilvadipinin 4-DO iskemisi modelinde hipokampus malondialdehid (nmol/g-doku) düzeylerine etkisi. statistiksel önemli fark (tek yönlü ANOVA): ^a $p < 0,0004$ iskemi-kontrol sham'a kar ı; ^b $p < 0,0001$ iskemi-nilvadipin iskemi-kontrol'a kar ı.

Operasyon öncesindeki YS sayısı sham grubunda $0,50 \pm 0,19$; iskemi-kontrol grubunda $0,43 \pm 0,22$ ve nilvadipin grubunda $0,71 \pm 0,20$ olarak bulundu. Bütün grupların operasyon öncesi YS sayıları karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir anlamlı farklılık görülmedi.

Operasyon sonrası bütün grupların YS sayıları karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı fark bulundu ($p < 0,006$). Sham grubunda YS sayısı $0,25 \pm 0,17$ oldu. Bu değer operasyon öncesindeki kadar farklı değildi. İskemi-kontrol grubunda uygulanan iskemi YS'yi anlamlı olarak ($p < 0,001$) aynı grup iskemi öncesine göre $1,71 \pm 0,31$ 'e yükseltti. Öte yandan nilvadipin iskemi-kontrol grubunda görülen YS artımını anlamlı olarak ($p < 0,05$) $1,00 \pm 0,24$ 'e düşürdü (ekil 2).

Malondialdehid (MDA) Üzerine Olan Etkiler

Tüm gruplar arasında MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı derecede fark bulundu ($p < 0,001$). Sham grubu ile iskemi-kontrol grubunun MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, sham grubunda $31,77 \pm 2,05$ nmol/g olan değerlerin iskemi-kontrol grubunda $56,70 \pm 2,49$ nmol/g'a yükselerek anlamlı derecede ($p < 0,0004$) arttı gözlemlendi. Nilvadipin, iskemi-kontrol grubundaki MDA düzeyi artımını anlamlı olarak ($p < 0,0001$) azaltarak $27,88 \pm 1,86$ nmol/g düzeyine indirdi (ekil 3).

TARTI MA

4-DO iskemi modelinin başarılarının değerlendirilmesi deneyde kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda ana karotis arterlere klemp takılmasından hemen sonra bazı sıçanlarda yarım dakika kadar süren aktivasyon (zıplama, yuvarlanma, düzensiz vücut ve kıvrık hareketleri gibi) görülmüştür. Arterlerin kapatılmasından bir dakika sonra tüm sıçanlarda denge kaybı ve düzerek yana yatma görülmüştür. On dakikalık süre sonunda klemp çıkarıldıktan yarım dakika içinde sıçanlar tekrar aya kalkarak normal postürlerini kazanmışlardır. Bu durum iskemi uygulamasının başarılarının bir göstergesi olarak görülmektedir. Aynı modelin uygulandığı başka çalışmalarda da aynı davranışlar gözlemlenmiştir. Bu açıdan deneyimiz bu çalışmalarla uyumludur (12, 24). Ayrıca çalışmamızda uyguladığımız iskemi modeli, sekiz kollu labirent testinde DS sayılarını azaltmıştır. Bu durum, sıçanların referans belleklerinin bozulduğunu bir göstergesidir. Aynı modelin uygulandığı benzer çalışmalarda iskemiyle birlikte DS sayıları azalmıştır. Bu çalışmalarda ortalama olarak DS sayıları 5 ± 1 dolayındadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalarda elde edilen rakamların alt sınırındadır ve söz konusu çalışmalarla uyumludur (12, 24, 25). Çalışmamızda YS sayılarını iskemi uygulamasıyla birlikte arttırmıştır. Bu durum da sıçanların yakın belleklerinin bozulduğunu bir göstergesidir. Diğer çalışmalarda YS sayıları 7 ± 2 olarak kaydedilmiştir. Çalışmamızdaki YS sayısı artışı ise bu sayıya oranla oldukça düşüktür. Bunun nedeni; bu yayınlarda on dakika içindeki tüm YS'lerin dikkate alınmasıdır (12, 24, 25). Çalışmamızda ise sadece ilk sekiz seçimdeki YS'ler dikkate alınmıştır. Her iki sonuç da birbirini desteklemekle birlikte, ilk sekiz seçimdeki YS sayısı artımının değerlendirilmesi deneyin daha sağlıklı sonuçlandırılması açısından uygun bir yöntem olabilir. Bu yöntemim olumsuz yanı ise, sayılar çok küçük kaldığından bazı durumlarda YS sayısı artımının fark edilemeyeceğidir. Ancak deneyimizde böyle bir durumla karşılaşmamız, gruplar arasındaki YS sayısı artımının anlamlı olduğunu göstermiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, çalışmamızda uyguladığımız dört damar iskemi modelinin başarıları olduysa, sıçanlarda bellek bozukluğu geliştirmesi kesinlik kazanmıştır. İskemide en fazla ve seçici şekilde etkilenen beyin bölgelerinden birisi bellekte önemli rolü olan hipokampustur (18, 24, 26). Hipokampusta nöron ölümünün görüldüğü hemen her durumda bellekte bozulma görülmektedir. İskemi sonrası görülen nöron

ölümünde temel nedenlerden birisi ROS'la bağlantılıdır. MDA, ROS'lar ile oluşan lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkar. Bu nedenle dokudaki MDA düzeyi oluşan hücre ölümünün bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda iskemi uygulamasıyla hipokampustaki MDA düzeyinde, sham grubuna göre belirgin bir artış görülmüştür. Benzer bir çalışmada da hipokampal MDA düzeylerinin artışı görülmüştür. Ancak sham grubundaki düzeyler ve ayrıca iskemi nedeniyle gözlenen artışlar benzer oranlarda değildir (27). Tüm bu çalışmaların sonuçları incelendiğinde hipokampus MDA düzeylerinin 10–120 nmol/g-doku arasında değişen seviyelerde olduğunu görülmektedir. Çalışmamızda bu değerler 30-60 nmol/g-doku arasındadır. Bu farklılık, farklı iskemi modelinin uygulanması veya MDA ile ilgili farklı yöntem ve standartların kullanılması veya MDA düzeyinin nmol/mL, µmol/mg-protein, nmol/g-doku gibi farklı birimlerde ifade edilmesine bağlı olabilir (23,28, 29).

Sonuçlarımız, iskemiye bağlantılı özellikle ROS'tan kaynaklanan hipokampus hücre ölümünün, bellek bozukluğuna neden olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada uygulanan tekrarlayıcı geçici global beyin iskemisi modelinde başarıları olunmuş ve yeterli derecede yakın bellek bozukluğu sağlanmıştır.

Nilvadipin antihipertansif olarak klinikte kullanım alanı olan kalsiyum kanal blokleri bir ilaçtır. Son yıllarda bu ilacın nöroprotektif etkisi üzerine durulmaktadır. Orta serebral arter oklüzyonu yöntemiyle bölgesel beyin iskemisi oluşturulan sıçanlarda nilvadipin profilaktik olarak 3 mg/kg/gün dozunda 7 ve 14 gün boyunca kullanıldı. İskemi alanının küçüldüğü ve iskemi alanındaki ödemin azaldığı kaydedilmiştir (13). Ayrıca geçici beyin iskemisi çalışması sırasında nilvadipin 1 ve 10 mg/kg/gün dozunda uygulandı. İskemi, mikrotübül associated protein-2 düzeyindeki azalmayı inhibe ederek, anlamlı derecede nöroprotektif etkinlik göstermiştir (30).

Çalışmamızda nilvadipin global beyin iskemisi modelinde ilk defa profilaktik olarak kullanılmıştır. Nilvadipin kullanımıyla sekiz kollu labirent sınavında iskemi grubuna göre DS sayıları artmış, YS sayıları da azalmıştır. Bu durum, bellek bozukluğunun nilvadipin ile düzeldiğini anlamına gelmektedir. Çalışmamızda ayrıca ilaç uygulamasıyla hipokampusta MDA düzeyi iskemi grubuna göre azalmıştır. Bu durum nilvadipin kullanımı ile hipokampustaki ROS'la bağlantılı hücre ölümünün azaldığını düşündürmektedir.

İskemi modelinde yapılan bir çalışmada nilvadipin (3,2 mg/kg) iskemiden hemen sonra verildiğinde DS'yi belirgin derecede arttırmış ve YS sayıları azalmıştır. Bu çalışmada ilaç uygulamasıyla hipokampusta apoptotik nöron ölümünün azaldığı ve apoptozise bağlantılı mRNA, bax ve kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (12). Aynı çalışmadaki nilvadipin kullanımı ile DS sayısı artışı çalışmamızdaki bulgularla uyumlu olmakla birlikte, YS sayısı azalması çalışmamızda daha az olarak görülmektedir. Bunun nedeni YS sayısının bizim çalışmamızda sadece ilk sekiz seçimden değerlendirilmesinden olabilir.

Nilvadipin hipokampal CA1 bölgesi nöronlarında seçici olarak, yavaş ve hızlı akımlı L-tipi kalsiyum kanallarını bloke etmektedir. Bu etkiye serebral vazodilatör etkisi de eklenince, ilacın iskemide belirgin hipokampal nöroprotektif etkisini gösterdiği ve bellek bozulmasını düzelttiği bildirilmiştir (14). Nilvadipinin aynı etkisi hipokampal nöron hücre kültürlerinde de çalışılmış ve yine bu hücrelerde de L-tipi kalsiyum kanallarını seçici olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (15). Nilvadipin serebral kan damarlarındaki kalsiyum kanallarını da inhibe ederek serebral kan akımını artırır. Klinik bir çalışmada, kronik serebral infarktli 7 hastada tek doz 4 mg oral nilvadipin ile serebral kan akımının artışı gözlemlenmiştir (10). Başka bir klinik denemede ise hipertansiyona ek olarak kronik major serebral arter oklüzyonu olan hastalarda nilvadipin kronik olarak 3 ay kullanılmış ve serebral kan akımını anlamlı

dercede artırmı tır (11). Yapılan tüm bu çalı malar sonucunda nilvadipinin L tipi kalsiyum kanallarını inhibe ederek iskemi sırasında geli en hücre ölümünü önledi i (15); beyin damarlarında vazodilatasyon yaparak iskemiden hücreleri korudu u (11), apoptozisi engelleyerek geç hücre ölümünü azalttı ı (12) görülmektedir. Nilvadipin bu mekanizmalar ile nöroprotektif etkinlik göstermektedir. ROS'a ba lı hücre ölümünü nilvadipinin engelledi ine yönelik herhangi bir çalı ma yoktur. Benzer ba ka çalı malara ihtiyaç vardır. Ancak hücre ölümünde tek bir mekanizmadan söz etmek kesin olarak olası de ildir. Genel olarak tüm mekanizmaların hücre sel zedelenmeye katkısı oldu u dü ünülür. Bu açıdan bakıldı nda, di er mekanizmaların yanı sıra nilvadipinin ROS'a ba lı nöron ölümünü de azalttı ı deney sonuçlarımıza göre dü ünülebilir. skemi uygulanmasıyla hipokampusta MDA düzeyi arttı tır, nilvadipin bu düzeyi azaltarak iyile tirici etki göstermi tir. Nilvadipinin bu etkisinde hücre içindeki artan kalsiyum nedeniyle görülen hücre zedelenmesini, kalsiyum kanallarını inhibe ederek engellemesi ve ek olarak beyin damarlarında vazodilatasyon yaparak hücreleri iskemiden ve ROS'a ba lı zedelenmeden koruması dü ünülebilir.

Sonuç olarak: Uygulanan iskemi modeli sıçanların sekiz kollu labirent testinde, çalı an ve referans belle i bozmu tur. Uyguladı ımız iskemi modelinde bir hafta profilaktik olarak kullanılan nilvadipin, hipokampusta hücre ölümü üzerine koruyucu etki göstererek bellek bozuklu unu düzeltmi tir. Aralarında inmenin de bulundu u bellek bozuklu u yapan birçok nöronal hastalıkta, nilvadipinin nöroprotektif bir ilaç olarak profilaktik ekilde kullanımı önerilebilir. Ancak bu amaca yönelik olarak daha fazla deneysel ve klinik çalı ma yapılmasına ihtiyaç oldu unu dü ünülmektedir.

Te ekkür: MDA analizlerinde yardımlarından dolayı Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Dr. Selahattin Sert'e te ekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Roman GC, Sachdev P, Royall DR, Bullock RA, Orgogozo JM, Lopez-Pousa S, Arizaga R, Wallin A. Vascular cognitive disorder: A new diagnostic category updating vascular cognitive impairment and vascular dementia. *J Neurol Sci* 2004; 226:81–87.
- Pohjasvaara T, Erkinjuntti T, Vataja R, Kaste M. Dementia three months after stroke. Baseline frequency and effect of different definitions of dementia in the Helsinki Stroke Aging Memory Study (SAM) cohort. *Stroke* 1997; 28: 785–792.
- Truelsen T, Piechowski-Jozwiak B, Bonita R, Mathers C, Bogousslavsky J, Boysen G. Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *Eur J Neurol* 2006; 13:581–598.
- Bakar M. Post strok demans (epidemioloji ve risk faktörleri). *Demans* 2003; 1:15–20.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins S. Çeviri editörü: Çevikba U: Temel Patoloji. Nobel Tıp Kitabevleri & Yüce Yayınları, stanbul. Sayfa:3-25, 1994.
- Van Wijk SJ, Hageman GJ. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2005; 39:81–90.
- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1–15.
- Freitas I, Griffini P, Bertone V, et al. In situ detection of reactive oxygen species and nitric oxide production in normal and pathological tissues: improvement by differential interference contrast. *Exp Gerontol* 2002; 37:591–602.
- Rosenthal J. Nilvadipine: Profile of a new calcium antagonist. An overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:92–107.
- Kobayashi S, Yamaguchi S, Okada K, Suyama N, Bokura K, Muraio M, Tsunematsu T. Effect of single oral administration of nilvadipine on cerebral blood flow in chronic cerebral infarction. *Angiology* 1992; 43:801–809.
- Ogasawara K, Noda A, Yasuda S, Kobayashi M, Yukawa H, Ogawa A. Effect of calcium antagonist on cerebral blood flow and oxygen metabolism in patients with hypertension and chronic major cerebral artery occlusion: a positron emission tomography study. *Nucl Med Commun* 2003; 24:71–76.
- Iwasaki K, Mishima K, Egashira N, et al. Effect of nilvadipine on the cerebral ischemia-induced impairment of spatial memory and hippocampal apoptosis in rats. *J Pharmacol Sci* 2003; 93:188–196.
- Kawamura S, Li Y, Shirasawa M, Yasui N, Fukasawa H. Effects of treatment with nilvadipine on cerebral ischemia in rats. *Tohoku J Exp Med* 1998; 185:239–246.
- Ishibashi H, Murai Y, Akaike N. Effect of nilvadipine on the voltage-dependent Ca²⁺ channels in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Res* 1998; 813:121–127.
- Tsukuda E, Matsuda Y. Effect of benidipine on depolarizing stimulation-induced increase of intracellular calcium concentration in cultured mouse hippocampal neurons. *Jpn J Pharmacol* 1999; 81:401–403.
- Himeda T, Kanbara S, Oki C, Kato H, Araki T. Effects of chronic administration with nilvadipine against immunohistochemical changes related to aging in the mouse hippocampus. *Metab Brain Dis* 2005; 20:141–153.
- Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther* 2000; 88:93–113.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982; 11:491–498.
- Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 1984; 69:385–401.
- Duhaime AC, Ross DT. Degeneration of hippocampal CA1 neurons following transient ischemia due to raised intracranial pressure: Evidence for a temperature-dependent excitotoxic process. *Brain Res* 1990; 512:169–174.
- Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, et al. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: Association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 1995; 6985:970–973.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351–358.
- Demir S, Özkurt S, Köseo lu M, Enli Y, Aslan D, Gümü su N. Sigara içenlerde plazma lipid peroksidasyonu. *Solunum* 2001; 3:57–59.
- Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, et al. Non-NMDA mechanism in the inhibition of cellular apoptosis and memory impairment induced by repeated ischemia in rats. *Brain Res* 2004; 995:131–139.
- Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, Mishima K, Fujiwara M. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase and caspase-3, but not caspase-1, prevents apoptosis and improves spatial memory of rats with twice-repeated cerebral ischemia. *Life Sci* 2004; 75:1967–1978.
- Block F. Global ischemia and behavioral deficits. *Prog Neurobio*. 1999; 58:279–295.
- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Safranin, a constituent of *crocus sativus* (saffron), attenuated cerebral ischemia induced

- oxidative damage in rat hippocampus. *J Pharm Pharm Sci* 2005; 22:394–399.
- 28 Maia FD, Pitombeira BS, Araujo DT, Cunha GM, Viana GS. l-Deprenyl prevents lipid peroxidation and memory deficits produced by cerebral ischemia in rats. *Cell Mol Neurobiol* 2004; 24:87–100.
- 29 Gupta S, Sharma SS. Neuroprotective effects of trolox in global cerebral ischemia in gerbils. *Biol Pharm Bull* 2006; 29:957–961.
- 30 Kuwaki T, Satoh H, Ono T, Shibayama F, Yamashita T, Nishimura T. Nilvadipine attenuates ischemic degradation of gerbil brain cytoskeletal proteins. *Stroke* 1989; 20:78–83.