

## Sıçan Hipokampusunda Çinkonun Sebep Olduğu Hücre Ölümüne Nikardipinin Etkisi\*

Araş.Gör. Şerif DEMİR<sup>1</sup>, Dr. Mustafa AYYILDIZ<sup>1</sup>, Dr. Osman GENÇ<sup>2</sup>,  
Dr. Cafer MARANGOZ<sup>1</sup>,

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı<sup>1</sup>, SAMSUN  
Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı<sup>2</sup>, DENİZLİ

- ✓ Çinkonun nöronal hiperaktiviteye yol açarak hücre ölümüne sebep olduğunu bildiren bir çok araştırma vardır. Bu çalışmada çinkonun sebep olduğu hücre ölümüne, kalsiyum antagonistlerinden nikardipinin etkisi araştırıldı.

Çinko sülfat (500 µg/kg) intrakortikal olarak bregmanın 2 mm lateraline verildi. Kontrol grubu sıçanlara aynı hacimde (2 µl) serum fizyolojik uygulandı. Çinko+nikardipin grubuna ise çinko sülfat (500 µg/kg) ve hemen yanına nikardipin (1 mg/kg) intrakortikal olarak verildi.

Hayvan grupları bir hafta süreyle gözlem altında tutuldu. Çinko+nikardipin grubuna diğerlerinden farklı olarak her gün intraperitoneal yoldan nikardipin (10 mg/kg) verildi. Hayvanlar bir hafta sonra intrakardiyal yoldan nötral formalinle perfüzyona alındı. Hipokampustan alınan kesitler hematoksilin-eozin ile boyandı. Piramidal hücreler ışık mikroskopunda x400 büyütme altında sayıldı.

Piramidal hücre yoğunluğu kontrol grubunda 126.48±1.8 hücre/mm, çinko grubunda 38.3±0.52 hücre/mm, çinko+nikardipin grubunda 88.4±1.4 hücre/mm olarak sayıldı. Gruplar arasındaki fark istatistikî açıdan anlamlı bulundu (p<0.001).

Sunulan çalışma ile elde edilen sonuçlara göre sıçan hipokampusunda, nikardipin çinkonun sebep olduğu hücre ölümünü önemli ölçüde azaltmaktadır. Nikardipin bu etkiyi kalsiyumun hücre içine girişini azaltarak yapıyor olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Hipokampus, hücre ölümü, çinko toksisitesi, nikardipin, sıçan

- ✓ **Effect of Nicardipine on Cell Death Caused by Zinc in the Rat Hippocampus**

There are lots of reports about zinc causes cell death due to neuronal hyperactivity. In this study, effect of nicardipine (a calcium antagonist) on cell death caused by zinc was investigated.

Zinc sulphate (500 µg/kg) was injected intracortically into 2 mm lateral of bregma. The same of volume of saline (2 µl) was given to the rats of control group. In the third group, zinc+nicardipine were injected into same place of the brain.

Animal groups were observed for a week. The zinc+nicardipine group received daily nicardipine (10 mg/kg) for seven days. After a week, the rats were perfused intracardially with neutral formaline. The hippocampal sections were stained with hematoxylen-eosine. Pyramidal cells were counted under light microscope (with 400x magnification).

The density of pyramidal cell was found in the control, zinc and zinc+nicardipine as 126.48±1.8 neuron/mm, 38.3±0.52 neuron/mm, 88.4±1.4 neuron/mm respectively. The differences between the groups were found to be statistically significant (p<0.001).

The results show that nicardipine considerably decreases cell death caused by zinc in the hippocampus of rat. Nicardipine an exert this effect by preventing the influx of calcium.

**Key words:** Hippocampus, cell death, zinc toxicity, nicardipine, rat

\*: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Fonunca T.088 NO'lu proje olarak desteklenen bu çalışma, 08-12 Eylül 1996 tarihinde Bursa'da düzenlenen Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 22. Ulusal Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Epilepsi, aşırı nöron aktivitesinin en yaygın olduğu nörolojik hastalıklardan birisidir<sup>(1)</sup>. İnsan hipokampusunda hücre kaybının serebral iskemiden kaynaklandığı ve epileptik nöbetlerin iskemiye sebep olan etkenlerden biri olduğu ileri sürüldü<sup>(2)</sup>. Daha sonraki yıllarda epilepsinin fizyo-patolojik temellerinin anlaşılması ve tedavi edici ilaçların geliştirilebilmesi için "deneysel epilepsi modelleri" geliştirildi<sup>(3,4)</sup>. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, çinkonun verildiği beyin bölgesinde nöronal hiperaktiviteye sebep olduğu gösterilmiştir<sup>(5,6)</sup>. Çinko epilepsisinde hipokampus ve serebellumda da hücre ölümlü olduğu tesbit edildi<sup>(7-9)</sup>.

İskemi oluşumunda hücre içi  $Ca^{++}$  seviyesinin artışı çok önemlidir<sup>(10)</sup>. Bu nedenle son yıllarda iskeminin önlenmesi amacıyla kalsiyum antagonistleri kullanılmaya başlanmıştır. Kalsiyum antagonistleri hücre içerisine  $Ca^{++}$  akışını engellediğinden farmakolojik olarak iskeminin önlenmesinde önemlidir<sup>(11,12)</sup>.

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

## GEREÇ VE YÖNTEM

Deneylerde ağırlıkları 200-300 g olan albino sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki hayvanlara (n=10) 500 µg/kg çinkosülfat (i.c.), ikinci gruptaki hayvanlara (n=10) çinkosülfatın yanında 1 mg/kg nikardipin (i.c.) verildi. İntrakortikal uygulama sol hemisferde Bregmanın lateraline mikroenjektör (Hamilton) ile yapıldı. Daha sonra 7 gün süreyle intraperitoneal (i.p.) olarak nikardipin (10 mg/kg) verildi. Üçüncü gruptaki hayvanlara (n=7) ise 2 µl

serum fizyolojik uygulandı.

Hayvanlar 7 gün yaşatıldıktan sonra derin anestezi (100 mg/kg ketamin) altında intrakardiyal yoldan perfüzyona alındı. Dorsal hipokampus bölgesinden elde edilen frontal kesitler hematoksilen-eozin ile boyandı.

Kesit seviyeleri bir stereotaksik atlas yardımıyla tesbit edildi<sup>(13)</sup>. Farklı kesit seviyelerinde sağ ve sol dorsal hipokampusun CA1, CA2, CA3 bölgelerinde bulunan piramidal hücreler ışık mikroskobunda x400 büyütmeyle sayıldı. Üç ayrı gruptan elde edilen sonuçlar birbirleriyle 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  $126.2 \pm 4.5$  hücre/mm, CA2 bölgesinde;  $117.3 \pm 6.24$  hücre/mm, CA3 bölgesinde ise  $113.6 \pm 4$  hücre/mm olarak bulundu. Çinko grubunda ise sağ dorsal hipokampustaki piramidal hücrelerin yoğunluğu CA1 bölgesinde  $38.3 \pm 1.3$  hücre/mm; CA2 bölgesinde  $36.5 \pm 1.6$  hücre/mm; CA3 bölgesinde ise  $34.14 \pm 1.2$  hücre/mm idi. Çinko +nikardipin grubunda ise sağ dorsal hipokampusun CA1 bölgesinde  $87.9 \pm 1.4$  hücre/mm; CA2 bölgesinde  $89.9 \pm 3.7$  hücre/mm; CA3 bölgesinde ise  $82.2 \pm 2.8$  hücre/mm şekliydi.

Sağ dorsal hipokampusun CA1, CA2, CA3 bölgelerinde hücre sayısı bakımından kontrol grubuyla çinko grubu arasındaki farklılık istatistik açıdan anlamlıydı ( $p < 0.001$ , Tablo I). Kontrollere göre çinko grubunun CA1, CA2, CA3 bölgelerindeki piramidal hücre sayısı %68 oranında daha azdı.

Çinko grubu ile çinko+nikardipin grubunun sağ ve sol dorsal hipokampusunun CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde bulunan pi-

**Tablo I.** Çinko ve Kontrol Grubunda Sağ Dorsal Hipokampus Piramidal Hücre Yoğunluğunun Karşılaştırılması

Sayım yapılan bölgeler	Çinko Sağ (n=10)*	Kontrol Sağ (n=7)*	p
CA1	38.3±1.3	126.2±4.5	<0.001
CA2	36.5±1.6	117.3±6.2	<0.001
CA3	34.14±1.2	113.6±4	<0.001

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

ramidal hücre sayısı arasındaki fark istatistik açıdan anlamlıydı (p<0.001, Tablo III, IV).

Kontrol grubunun sol hipokampus CA1 bölgesinde piramidal hücrelerin yoğunluğu 1 mm'de 129.9±4 hücre/mm iken; CA2'de 129.8±5 hücre/mm, CA3'de de 122.7±3.3 hücre/mm olarak sayıldı (Tablo II). Çinko grubunda ise sol dorsal hipokampusta piramidal hücre yoğunluğu CA1 bölgesinde 35±1.4 hücre/mm, CA2 bölgesinde 33.9±1.5 hücre/mm, CA3 bölgesinde 32.85±1.2 hücre/mm olarak sayıldı (Tablo II). Çinko +nikardipin grubunda ise sol dorsal hipokampusun CA1 bölgesinde 91.2±3.8 hücre/mm, CA2'de 91.9±4.6 hücre/mm, CA3'de 84.3±4 hücre/mm olarak tespit edildi (Tablo IV).

Sol dorsal hipokampusun CA1, CA2, CA3 bölgelerinde hücre sayısı bakımından kontrol grubuyla çinko grubu arasındaki fark istatistik açıdan anlamlıydı (p<0.001). Kontrollere göre çinko grubunun CA1, CA2, CA3 bölge-

**Tablo II.** Çinko ve Kontrol Gruplarında Sol Dorsal Hipokampus Piramidal Hücre Yoğunluklarının Karşılaştırılması

Sayım yapılan bölgeler	Çinko Sol (n=10)*	Kontrol Sol (n=7)*	p
CA1	35.0±1.4	129.9±4	<0.001
CA2	33.9±1.5	129.8±5	<0.001
CA3	32.85±1.2	127.7±3.3	<0.001

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

**Tablo III.** Çinko ve Çinko+Nikardipin Gruplarında Sağ Dorsal Hipokampus Piramidal Hücre Yoğunluğunun Karşılaştırılması

Sayım yapılan bölgeler	Çinko Sağ (n=10)*	Çinko + nikardipin Sağ (n=10)*	p
CA1	38.3±1.3	87.9±1.4	<0.001
CA2	36.5±1.6	89.9±3.7	<0.001
CA3	34.14±1.2	82.2±2.8	<0.001

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

**Tablo IV.** Çinko ve Çinko+Nikardipin Gruplarında Sol Dorsal Hipokampus Piramidal Hücre Yoğunluğunun Karşılaştırılması

Sayım yapılan bölgeler	Çinko Sol (n=10)*	Çinko + nikardipin Sol (n=7)*	p
CA1	35±1.4	91.2±3.8	<0.001
CA2	33.9±1.5	91.9±4.6	<0.001
CA3	32.85±1.2	84.3±4	<0.001

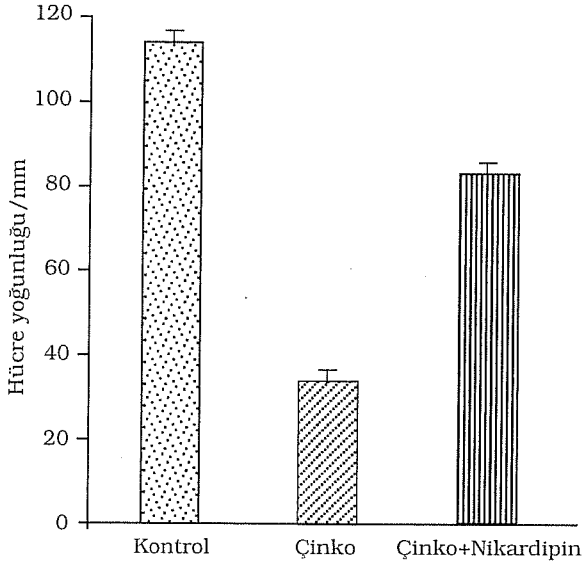
\*: Hücre yoğunluğu/mm±SEM, n= Hayvan sayısı

lerinde hücre sayısı %73 oranında daha azdı.

Aynı grubun CA1, CA2, CA3 bölgeleri arasında istatistik açıdan fark tespit edilemedi (p>0.001). Hipokampus bir bütün olarak ele alındığında kontrol ve deney gruplarındaki piramidal hücre yoğunluğu şekil 1'de görülmektedir.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan çalışmaya göre, sıçanda beyin korteksine verilen çinkosülfat (500 µg/kg) hipokampustaki piramidal hücrelerde ölüme sebep olmaktadır. Kalsiyum kanal blokleri nikardipin ise çinkonun nörotoksik etkisini önemli ölçüde azaltmaktadır. Çinkonun nörotoksik etkisini konu edinen çok az çalışma vardır. Doku kültürü ortamında çinkoya



**Şekil 1.** Kontrol ve deney gruplarında tüm hipokampusta piramidal hücre yoğunluğu görülmektedir ( $p < 0.001$ ).

maruz kalan beyin korteksi hücrelerinin dejenere olduğu, dejenerasyonun hem çinko konsantrasyonuna hem de çinkonun etki süresine bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir<sup>(9)</sup>. Gelişmesini tamamlamamış hücrelerde ve glia hücrelerinde ise çinkoya bağlı dejenerasyonun daha az etkili olduğu bilinmektedir<sup>(14)</sup>. Beyin korteksine verilen çinkonun sıçanda nöronal hiperaktiviteye ve hipokampus piramidal hücreleri ile beyinciğin purkinje hücrelerinde de dejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir<sup>(13)</sup>. Çinko enjeksiyonu ile perfüzyon arasındaki süre uzadıkça hücre kaybının arttığı bulunmuştur<sup>(9)</sup>.

Çinko glutamat salınımına ve buna bağlı olarak hücre içine su ve klorür girişine sebep olmaktadır. Bu durum akut safhada hücrenin şişmesiyle karakterizedir<sup>(15)</sup>. Glutamatın nörotoksik etkisi ekstraselüler kalsiyum seviyesine bağlıdır. Pentilenetetrazol ile oluşturulmuş nöbetlerde sıçan beyin sinaptozomlarında serbest kalsiyum konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir. Kalsiyum kanal bloker-

lerinden verapamil ve ryodipinin bu artışı anlamlı bir şekilde azalttığı bilinmektedir<sup>(16)</sup>. Flunarizinin kobay hipokampus ve neokorteks dilimlerinde pikrotoksin ile oluşturulan epileptik alan potansiyellerini paroksizmal hücre depolarizasyon değişikliklerini dönüşümsüz olarak blokladığı bildirilmiştir<sup>(17)</sup>. Beyin dilimi preparasyonlarından alınan intrasellüler kayıtlara göre 1 nM nikardipin spontan epileptik sıçanların hipokampus CA3 nöronlarındaki  $Ca^{+2}$  spike'larını inhibe etmiştir. Aynı çalışmada normal (spontan, epileptik olmayan) Wistar sıçanlarında  $Ca^{+2}$  spike'larının inhibe edilmeleri için gereken nikardipin konsantrasyonunun 10 nM olduğu bulundu. Spontan epileptik sıçanlarda CA3 piramidal hücrelerinin aşırı uyarılmasının  $Ca^{+2}$  kanallarında anormal derecede geçirgenlik meydana getirebileceği ve bu etkinin nikardipin tarafından ortadan kaldırılacağı bildirilmektedir<sup>(18)</sup>. Oklüzyonla oluşturulan iskemide hücre ölümünü 0.01-10 mg/kg (i.p) dozlarda uygulanan nikardipin geciktirmiştir<sup>(19,20)</sup>. Başka bir çalışmaya göre çinkoya, bağlı hücre ölümü verapamil tarafından azaltılmaktadır<sup>(21)</sup>.

Daha önceki bulgulara ve elde edilen sonuçlara göre bir kalsiyum kanal blokleri olan nikardipinin, muhtemelen hücre içine kalsiyum ve su girişini engellemek yoluyla nöron ölümünü azalttığı sonucuna varıldı.

Geliş tarihi : 30.05.1997

Yayına kabul tarihi : 28.07.1997

Yazışma adresi:

Araş. Gör. Şerif DEMİR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Fizyoloji Anabilim Dalı

55139 SAMSUN

## KAYNAKLAR

1. Peedley TA. Epilepsy and human electroencephalogram. In: Schwartzkroin, PA, Wheal, H

- (Eds.) *Electrophysiology of Epilepsy* (London), Academic Press, 1984; 1-30.
2. Chung SH, Johnson MS. Studies on sound-induced epilepsy in mice. *Proc Roy Soc (London)* 1984; 221: 145-168.
  3. Chung SH, Johnson MS. Divalent transition metal ions (Ca<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>) in the brain of epileptogenic and normal mice. *Brain Res.* 1983; 280: 323-334.
  4. Donaldson J, Pierre T, Minnich J, Barbeau A. Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATP'ase. *Can J Biochem* 1971; 49: 1212-1224.
  5. Pei Y, Zhao D, Haung J, Cao L. Zinc-induced seizures a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia* 1983; 24: 169-176.
  6. Reid SA, Sybert GW. Acute FeCl<sub>3</sub>-induced epileptogenic foci in cats: Electrophysiological analyses. *Brain Res* 1980; 188: 531-542.
  7. Marangoz C, Ayyıldız M, Taşçı N. Fenobarbital, nöronları intrakortikal çinkonun toksik etkisinden korumaktadır. *Doğa Tr J of Medical Science* 1991; 15: 378-383.
  8. Tonder N, Johansen FF, Fredericson CJ, Zimmer and Diemer NH. Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat. *Neuroscience Letters.* 1990; 109: 247-252.
  9. Marangoz C, Genç H. Tavşanda intrakortikal çinkosülfattan sonra Purkinje hücrelerinde azalma. *T KL Tıp Bil Araş Der.* 1990; 8: 67-74.
  10. Açar E, Taşçı N, Marangoz C. Sığanda korteks içine verilen çinko sülfatın Purkinje hücreleri sayısına etkisi. *DOĞA Tr J of Medical Sciences* 1990; 14: 238-247.
  11. Choi DW, Yokoyama M, Koh J. Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience* 1988; 24: 67-79.
  12. 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.
  13. Pellegrino LJ, Cushman AJ. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain.* New York, Plenum press, 1981.
  14. Weiner DA. Calcium channel blockers. *Med Clin North America* 1988; 72: 83.
  15. Lees GJ, Lehmann A, Sandberg M, Hamberger A. The neurotoxicity of zinc in the rat hippocampus *Neuroscience Letters* 1990; 120: 155-158.
  16. Karpova MN, Antonikov NM, Pankov OLV, Glebov RN. Organic calcium antagonists verapamil and nifedipine prevent increase of free calcium in synaptosomes of the rat brain during corasol kindling. *Biulliten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny* 1992; 114: 252-254.
  17. Straub H, Speckman EJ. Picrotoxin-induced epileptic activity in hippocampal and neocortical slices (guinea pig): Suppression by organic calcium channel blockers. *Brain Research*, 1994; 658: 119-126.
  18. Momiyama T, Ishihara K, Serikawa T, Moritake K, Sasa M. Effect of nifedipine on abnormal excitability of CA3 pyramidal cells in hippocampal slices of spontaneously epileptic rats. *European Journal of Pharmacology.* 1995; 280: 119-123.
  19. Tomimoto H, Wakita H, Akiguchi I, Kimura J. Protective effect of nifedipine hydrochloride on the evolution of delayed neuronal death-an immunohistochemical study. *Brain & Nerve.* 1994; 46: 251-256.
  20. Funato H, Katsuki Y, Yano T, Kawano H, Akada Y, Sato M, Uemura A. Effects of nifedipine, a new dihydropyridine derivative, on various cerebral ischemia models. *Folia Pharmacologica Japonica.* 1996; 108: 243-257.
  21. Demir Ş, Genç O, Bağırıcı F, Ayyıldız M, Korkmaz A, Taşçı N, Marangoz C. Sığan hipokampusunda çinkonun sebep olduğu hücre ölümüne verapamilin etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi* 1996; 13: 19-25.