

Penisilinle Epilepsi Oluşturulan Sıçanlarda Gyrus Dentatus Granüler Hücre Tabakasındaki Hacim Değişiklikleri ^[*]

Determination of Volume Changes in Dentate Gyrus Granulare Cell Layer in Penicillin-Induced Epileptic Rats

İlgaz AKDOĞAN, Esat ADIGÜZEL, Pınar AKYER

Epilepsi 2003;9(2):67-72

Amaç: Deneysel olarak penisilinle epilepsi oluşturulan sıçanlarda gyrus dentatus hacim değişiklikleri araştırıldı.

Çalışma Planı: Çalışmada 12 adet, 16-20 haftalık Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan (220-350 gr) iki gruba ayrıldı. Kontrol grubuna intrakortikal serum fizyolojik, diğer gruba aynı yolla penisilin-G (500 IU) verildi. Bir hafta sonra çıkarılan beyinler dondurmalı mikrotomda donduruldu ve 150 µm kalınlıkta kesildi. Elde edilen histolojik kesitler hematoxylen-eosin ile boyandı. Kesitlerdeki gyrus dentatus granüler hücre tabakasının mikroskop görüntüsü monitöre aktarıldı ve hacmi stereolojik bir yöntem olan Cavalieri prensibine göre hesaplandı.

Bulgular: Serum fizyolojik verilen sıçanlara göre, penisilinle epilepsi oluşturulan sıçanların gyrus dentatus hacimleri daha büyük bulunmasına rağmen, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Mann-Whitney U-testi, $p>0.05$).

Sonuç: Deneysel epileptik nöbetlerin beynin değişik bölgelerindeki etkilerini araştırmada nöron sayısı ile birlikte hacim değişikliklerinin değerlendirilmesi objektif sonuçlara ulaşmada katkı sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Dentate gyrus/sitoloji; hastalık modelleri, hayvan; elektroensefalografi; epilepsi/kimyasal yolla oluşturulan; hipokampus/fizyoloji/ilaç etkileri; mikroskopiy/yöntem; nöron/ilaç etkileri; penisilin G; sıçan.

Objectives: We investigated the changes in rat dentate gyrus volume in a penicillin-induced epilepsy model.

Study Design: The study included 12 adult female Sprague-Dawley rats (220-350 gr) of 16 to 20 weeks. The animals were assigned to receive either intracortical saline solution or penicillin G (500 IU). A week later, the brains were removed and frozen in a cryostat. All tissues were sectioned at 150 µm and stained with hematoxylen and eosin. The sections were visualized under light microscope and cell layer images of the dentate gyrus granulare were transferred to a monitor. The volumes were quantified stereologically using the Cavalieri 's principle.

Results: The mean dentate gyrus volume of penicillin administered rats was greater than that of the control rats. However, this increase was not statistically significant (Mann-Whitney U-test, $p>0.05$).

Conclusion: The effects of experimental epileptic seizure models on different areas of the brain may be more objectively evaluated both by the number of neurons and quantification of volume changes.

Key Words: Dentate gyrus/cytology; disease models, animal; electroencephalography; epilepsy/chemically induced; hippocampus/physiology/drug effects; microscopy/methods; neurons/drug effects; penicillin G; rats.

Dergiye geliş tarihi: 28 Şubat 2003 Düzeltme isteği: 1 Mayıs 2003 Yayın için kabul tarihi: 3 Haziran 2003

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı.

*1. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur (16-20 Mart 2002, Eskişehir).

İletişim adresi: Dr. İlgaz Akdoğan, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, 20070 Kınıklı, Denizli.
Tel: 0258 - 213 40 30 / 1388 Faks: 0258 - 213 28 74 e-posta: iakdogan@pamukkale.edu.tr

Gyrus dentatus, formatio hippocampalis'i oluşturan yapılarıdır.^[1] Formatio hippocampalis'i oluşturan yapıları entorhinal korteks ile afferent, hipokampus CA₃ alt bölgesi ile efferent bağlantıları vardır.^[1] Hipokampus ile anatomik komfluğuna karşılık histolojik açıdan farklılık gösterir. Hipokampus esas olarak piramidal nöronlardan oluşurken, *gyrus dentatus*un asıl yapısını granüler hücreler oluşturur.^[1] *Gyrus dentatus* ve hipokampus histolojik olarak üç tabakadan oluşmaktadır. Üç tabakalı yapılarından dolayı, bu bölgelerin hipereksitabilite gösterdiği ve epileptik nöbetlerde kolaylıkla uyarılabildiği ileri sürülmüştür.^[2] Böylece, zayıf bir stimülasyon bile epileptiform aktiviteye neden olmaktadır. Bu yüzden epilepside ve deneysel epilepsi modellerinde formatio hippocampalis ile ilgili çok sayıda çalışma vardır.^[3,4]

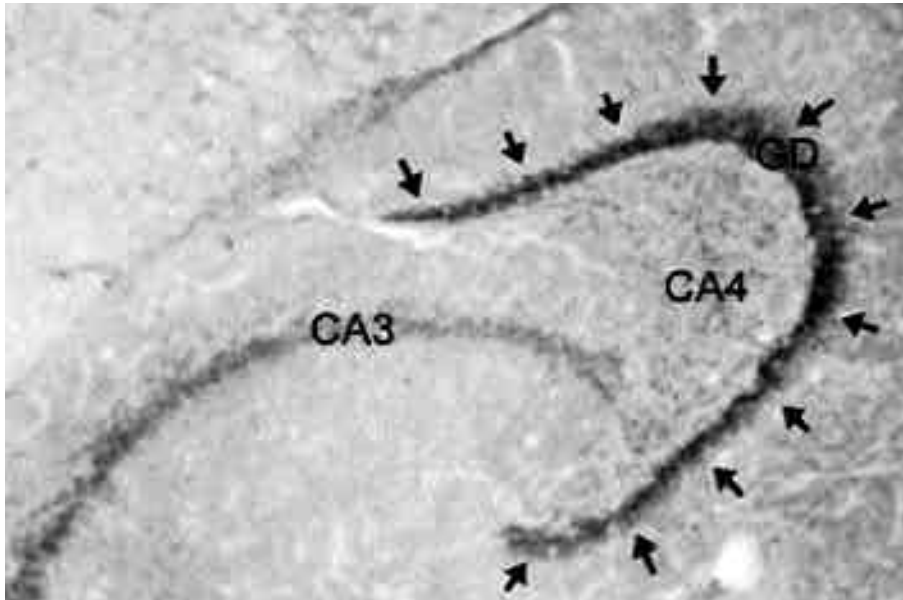
Günümüzde epilepsinin ve epileptik nöbetlerin fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması için deneysel epilepsi modelleri geliştirilmiştir.^[5] Çalışmamızda, deneysel epilepsi oluşturmak için kullandığımız penisilin, epileptojenik bir odak oluşturmakta ve fokal bağılayıcı yayılarak jeneralize tipe dönüşen epileptik nöbetler ortaya çıkarmaktadır.^[6]

Daha önce yaptığımız bir çalışmada, penisilin ile deneysel epilepsi oluşturulan sıçanlarda *gyrus dentatus* nöron sayıları hesaplanmıştır.^[7]

Ancak, penisilin epilepsi modelinin *gyrus dentatus* granüler hücre tabakası hacmini nasıl etkilediği bilinmiyordu. Bu çalışmada, penisilin ile meydana getirilen deneysel epilepsi sonucu oluşan nöbetlerin *gyrus dentatus* granüler tabaka hacmine olan etkisinin araştırılması amaçlandı. Hacimler, objektif ve etkin bir stereolojik yöntem olan Cavalieri prensibine göre hesaplandı.^[8,9]

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından elde edilen 12 adet, 16-20 haftalık, Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Çalışma düzeneği ile ilgili olarak Etik Kurul onayının alınması ardından sıçanlar standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık 22 °C, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu) beslendi ve hayvanlara yapılan tüm işlemler hijyenik kurallara uygun olarak, yarı steril şartlarda gerçekleştirildi. Sıçanlar rastgele olarak kontrol (n=6) ve penisilin (n=6) gruplarına ayrıldı. Hayvanlar, intraperitoneal uygulanan xylazine (10 mg/kg, Rhompun®, Bayer, Türkiye) ve ketamin (90 mg/kg, Ketalar®, Parker Davis, Türkiye) ile uyutulduktan sonra, stereotaksi aletine yerleştirildi. Kafa derisi vertikal olarak kesildikten sonra bregma noktası bulundu. Kontrol grubuna intrakortikal olarak, bregmanın sağından, 2 mm posterior, 2 mm lateral ve 2



ŞEKİL 1

Sıçanda *gyrus dentatus* granüler tabakasının mikroskop görüntüsü (H-E x 4).
GD: *Gyrus dentatus*; CA₃-CA₄: Hipokampus alt bölgeleri.

mm derine uyacak koordinatlarda 0.1 ml serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ve penisilin grubuna ayrı yolla ve aynı koordinatlarda penisilin-G (500 IU, 0.1 ml) verildi. Her iki grubun elektriksel deflarları EEG aleti ile kaydedildi. Bipolar EEG kayıtları, genel anestezi altında, iki yüzeyel gümüş elektrodu kafa derisinde sağ paryetal ve mid-okcipital bölgeye ve bir referans (toprak) elektrodu hayvanın kuyruğına konarak elde edildi (kayıt duyarlılığı=20 $\mu\text{V}/\text{mm}$; kayıt hızı 15 mm/sn.; TC=0.3 Hz, HF=70 Hz). Her iki grup için, yedi günlük bekleme süresi sonunda çıkarılan beyinler dondurulmuş mikrotomda (Leica CM3050) -50°C'de donduruldu. Dondurulmuş mikrotom -15°C'ye ayarlandı ve beyinlerden 150 μm kalınlıkta yatay kesitler elde edildi. Kesitler, hematoksilin-eosin ile boyandı.

Cavalieri prensibi ve hacim hesaplamaları

Kesitler önce mikroskobuna (Nicon Eclipse E 600, N.A.=1.25) yerleştirildi ve gyrus dentatus granüler hücre tabakasının x 4 büyütmedeki mikroskop görüntüsü bir video kamera (Hitachi OSP Color Video Camera VK-C22OE) kullanılarak monitöre (Sony Trinitron Color Video Monitor PVM-14N1MDE) aktarıldı (fiğil 1). Her kesit için gyrus dentatus granüler tabakası-

nın monitör ekranındaki izdüşümü, uygun büyüklükteki parflomen kağıdına çizildi. Bu çizimler üzerine, noktalar arası uzaklığı önceden belirlenen "nokta sayım cetveli"^[10,11] rastgele konularak gyrus dentatusun granüler tabakası üzerine düflen nokta sayısı belirlendi. Bu işlem her kesitteki çizim için üç kez tekrarlandı ve üç sayımın ortalaması alındı. Böylece, her beyinden alınan kesitlerden elde edilen toplam nokta sayısı (Q) belirlendi. Kesitler arasındaki uzaklığı belirlenmesi için her bir kesitin kalınlığı ölçüldü.^[12] Daha sonra, kesitlerden elde edilen toplam nokta sayısı (Q), nokta sayım cetvelinde bir noktanın temsil ettiği alan ve kesitler arasındaki uzaklık çarpılarak, gyrus dentatus granüler tabaka hacmi hesaplandı.

Cavalieri prensibine göre hacim hesaplamaları için aşağıdaki formül kullanıldı;^[8,9,13]

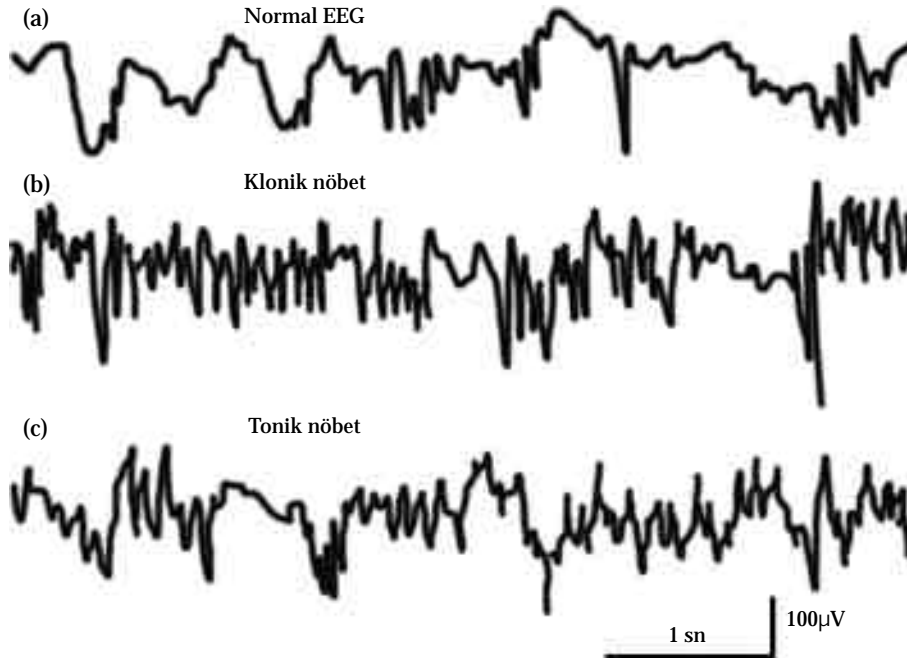
$$V = (Q) \times (a) \times (h)$$

$$V = \text{Hacim (gyrus dentatus toplam hacmi).}$$

$$Q = \text{Nokta sayım cetvelinde sayılan toplam nokta sayısı.}$$

$$a = \text{Alan (Nokta sayım cetvelindeki her noktanın temsil ettiği alan) (0.09 mm}^2\text{).}$$

$$h = \text{Yükseklik veya kalınlık (iki kesit arasındaki uzaklık).}$$



fiğil 2

(a) intrakortikal serum fizyolojik verilen şanlardan ve (b, c) penisilin ile epilepsi oluşturulan şanlardan elde edilen EEG kayıt örnekleri.

TABLO 1

‹nttrakortikal serum fizyolojik verilen (kontrol) ve penisilin ile deneysel epilepsi oluşturulan s›çanlar›n s›çanlar›n sol gyrus dentatus granüler tabaka hacimleri ve kullanılan parametreler

S›çan	Kontrol grubu						Penisilin grubu					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Q (Sayılan nokta say›s›)	201	92	163	229	178	189	229	109	169	231	167	104
a (Noktal› say›m cetvelinde bir noktan›n temsil ettiği alan, mm ²)	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
V (Hacim, mm ³)	2.17	1.99	1.76	2.88	2.24	2.38	2.27	2.35	1.97	2.91	2.1	2.71

BULGULAR

‹nttrakortikal serum fizyolojik verilen kontrol grubundaki s›çanlar›n EEG kay›tlar›nda elektriksel aktivitede bir değifliklik gözlenmedi (fiakil 2a). ‹nttrakortikal penisilin verilen s›çanlarda ise enjeksiyondan 2-3 dakika sonra nöbetler gözlendi (fiakil 2b, c).

Serum fizyolojik verilen s›çanlar›n sol gyrus dentatus hacmine (ort. hacim=2.24±0.38 mm³) göre penisilin epilepsi modeli oluşturulan s›çanlar›n sol gyrus dentatus hacmi (ort. hacim=2.38±0.36 mm³) (Tablo 1) daha büyük görünmesine rağmen, aradaki fark istatistiksel olarak anlaml› değildi (Mann-Whitney U testi, p>0.05).

TARTIşMA

Gyrus dentatus ve hipokampus, filogenetik olarak ‐archiocortex”in esas k›sm›n› oluştururlar. Histolojik olarak, diğer korteks yapılar› alt› tabakalı olmasına karşın, bu korteks bölgesi üç tabakalıdır.^[1] Üç tabakalı yapı›ndan dolayı bu bölgenin hipereksitabilite gösterdiği ve epileptik nöbetlerde kolaylıkla uyar›labildiği belirtilmiştir.^[2] Epileptik nöbetler, hipokampusta geri dönüşü olmayan nöron kayb›na neden olmaktadır.^[14-16] Geri dönüşü olmayan hücre kayb›, CA₁ ve CA₃ piramidal hücrelerinde yaygındır. Ancak, gyrus dentatusun granüler hücreleri ve CA₂ piramidal hücreleri, bu hücre kayb›na rölatif olarak dayanıklıdır.^[16,17] Buna uyumlu olarak, daha önce yapt›đ›m›z çalışmada, penisilin ile oluşturulan deneysel epilepsi sonucu gyrus dentatus granüler hücre say›s›nda önemli bir değifliklik bulunmamıştır.^[7] Ancak, penisilin epilepsi modelinde, gyrus dentatustaki değiflikliklerin tanımlanmas›nda nöron say›lar›n›n yan› sıra hacim değifliklikleri

nin de bilinmesi önemlidir. Bu çalışmalar› göz önüne alarak, çalışmam›zda penisilin epilepsi modeli sonucu oluşan nöbetlerin gyrus dentatus hacim değiflikliklerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Epilepside gyrus dentatus granüler hücre yay›lması (dispersion) ve mossy liflerin filizlenmesinin (mossy fibre sprouting) gözlendiği bildirilmiştir.^[18] Granüler hücre yay›lması, genellikle bir granüler tabaka (stratum granulosum) ile karakterizedir.^[18] Bu olay›n mekanizması tam olarak ayd›nlatılamamıştır. Bir hipoteze göre, nöron göçü sonucu anormal düzenlenme ve granüler hücrelerin ektojik pozisyona gelmesi bu genifilemede rol oynamaktadır.^[18] Çalışmam›zda, penisilin verilen s›çanlar›n gyrus dentatus hacminde bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç, granüler hücre yay›lması nedeniyle ortaya çıkm›fl olabilir. Ancak, penisilin ve kontrol gruplar› arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlaml› bulunmamıştır.

Bizim çalışmam›zda, deneysel epilepsi oluşturmak için penisilin kullanılmıştır. Penisilin kimyasal olarak konvulsiv bir ajandır.^[5,19] Parsiyel nöbetlerin oluşturulmas›nda, topikal olarak kullanılan penisilinden yararlan›labilir. Kortikal yüzeye uygulanan penisilin ile akut parsiyel (akut fokal) epilepsidekine benzer EEG’ler kaydedilebilir.^[19-21] Merkezi sinir sisteminde GABA inhibitör, glutamat eksitator özellikteki nörotransmitterlerdir. GABA aracılı inhibisyonun zayıflamas›, epileptik nöbetin yay›lmas›nda önemli bir etkidir.^[22] Fokal epilepsi, beyin korteksindeki azalm›fl GABA aracılı inhibisyon ve glutamata bağlı eksitasyon etkisiyle oluşur.^[22] Penisiline bağlı epileptik nöbet, korteksdeki GABA inhibisyonunun azalması ve gluta-

mat salgsnn artmasıyla oluşmaktadır.^[17,19,22-24] Ayrıca, penisilin, GABA etkisini bloke ettiği, non-spesifik bir GABA antagonisti olabileceği ve GABAerjik etkiyi zayıflatarak konvulsiv etki oluşturabileceği dffnlmektedir.^[25,26] Penisilin oluşturduğu epileptiform aktivite, fokal başlayış yayılarak jeneralize olması flekliyle klinikteki grand mal epilepsiye benzer bir tablo oluşturmaktadır.^[6]

Çalışmamızda, penisilin ile deneysel epilepsi oluşturulan sanlarn gyrus dentatus granüler hücre tabakasında anlamlı bir hacim artışı bulunmamıştır. Penisilin grubu sıçanlarda hacimde artışı görülmesi, ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması penisilin ile oluşturulan epileptik nöbetlerin tipine bağlı olabilir. Ayrıca, bu sonuç, gyrus dentatusun histolojik yapsndan dolayı epileptik nöbetlerde kolay uyarılabilmesine rağmen, granüler hücrelerin geri dnfl olmayan hücre kaybına diğer formatio hippocampalis bölgelerine göre daha dayanıklı olması ile açıklanabilir. Deneysel epileptik nöbetlerin beynin değiflik bölgele-
rindeki etkilerinin araştırılmasında nöron sayımı ile hacim değiflikliklerinin birlikte ele alınması objektif değerlendirmelerin yapılmasına yaradıc olacaktır.

Teflekkr

Makalenin yazarlar olarak, yaptıkları katkılardan dolayı Doç. Dr. Türker fiahirer ve Doç. Dr. Atilla Oğuzhanoğlu'na (Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Denizli) teflekkr ediyoruz.

KAYNAKLAR

- Berry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous system. In: Williams PL, editor. Gray's anatomy. 38th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 901-1399.
- Guyton AC. The central nervous system. In: Basic neuroscience anatomy and physiology. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1991. p. 262-3.
- Mouritze Dam A. Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures. Acta Neurol Scand 1982;66:601-42.
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, et al. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. Epilepsia 1993; 34:985-95.
- Biziere K, Chambon JP. Animal models of epilepsy and experimental seizures. Rev Neurol 1987;143: 329-40.
- Sagrately S, Niglio T, Scotti de Carolis A. An investigation on the mechanism of anticonvulsant action of ketamine and phencyclidine on convulsions due to cortical application of penicillin in rabbits. Pharmacol Res Commun 1985;17:773-86.
- Adıgzel E, Akdoğan I, Dzcan SE, Tufan C. Effect of penicillin induced epilepsy seizure on granule cell layer of the dentate gyms in rat: a stereological study. Neuroscience Research Communications 2002;31:101-9.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 1988; 96:379-94.
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc 1987;147(Pt 3):229-63.
- Roberts N, Cruz-Orive LM, Reid NM, Brodie DA, Bourne M, Edwards RH. Unbiased estimation of human body composition by the Cavalieri method using magnetic resonance imaging. J Microsc 1993; 171(Pt 3):239-53.
- fiahirer B, Aslan H, nal B, Canan S, Bilgi S, Kaplan S, et al. Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: a stereological study. Image Anal Stereol 2001;20:9-13.
- Korkmaz A, Tmkaya L. Estimation of the section thickness and optical disector height with a simple calibration method. J Microsc 1997;187:104-9.
- Howard CV, Reed MG (editors). Estimation of reference volume using the Cavalieri method. In: Unbiased stereology- three-dimensional measurement in microscopy. 1st ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1998. p. 39-54.
- Dam M, Bolwig T, Hertz M, Bajorec J, Lomax P, Dam AM. Does seizure activity produce Purkinje cell loss? Epilepsia 1984;25:747-51.
- Esiri MM, Oppenheimer DR (editors). Epilepsy. In: Diagnostic neuropathology. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1989. p. 280-5.
- Sloviter RS. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. Science 1987;235:73-6.
- Schwartzkroin PA, McIntyre DC. Limbic anatomy and physiology. In: Pedley TA, editor. Epilepsy: a comprehensive textbook. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers; 1997. p. 323-37.
- Proper EA, Hoogland G, Van Veelen CW, Grann PN. Morphological changes in the human epileptogenic hippocampus. Neuroscience Research Communications 2001;29:129-46.
- Fisher RS. Animal models of the epilepsies. Brain Res Brain Res Rev 1989;14:245-78.
- Purpura DP, Penry JK, Tower DB, Woodbury DM, Walter RD (editors). Experimental models of epilepsy. A manual for the laboratory worker. 1st ed. New York: Raven Press; 1972.
- Schwartzkroin PA, Mody I. Acute seizures models (intact animals). In: Pedley TA, editor. Epilepsy: a comprehensive textbook. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers; 1997. p. 397-403.
- Bağrı F, Gke FM, Marangoz C. Depressive effect of nicardipine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. Neuroscience Research Communications

- 1999;24:149-54.
23. Domann R, Uhlig S, Dorn T, Witte OW. Participation of interneurons in penicillin-induced epileptic discharges. *Exp Brain Res* 1991;83:683-6.
24. Pedley TA, Meldrum BS (editors). Cellular mechanism of focal epileptogenesis. In: *Recent advances in epilepsy*. Number two. 1st ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985. p. 1-63.
25. Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 2001;42 Suppl 3:8-12.
26. Engel J. *Seizures and epilepsy*. Philadelphia: F.A. Davis Co.; 1989.