

## İntrahipokampal Kainik Asit Uygulanmış Sıçanlarda Işık Mikroskopi Çalışması\*

A Light Microscopy Study of the Intrahippocampal Kainic Acid-Treated Rats

Tangül ŞAN, Serap ŞİRVANCI, Emsal SALIK, Feriha ERCAN, Şule ÇETİNEL, Hasan YANANLI, Filiz ONAT

*Epilepsi 2001;7(1-2):9-16*

**Amaç:** Bu çalışmada, sıçanda oluşturulan kainik asit epilepsi modelinde hipokampusta nöron kaybı olup olmadığı incelendi.

**Çalışma Planı ve Yöntemler:** Erişkin Sprague-Dawley sıçanlara (250-300 gr) intrahipokampal serum fizyolojik veya kainik asit verildi. Enjeksiyondan 120 gün sonra intrakardiyak perfüzyon yapıp hipokampus izole edildi ve fiksatif içine alındı. Hazırlanan yarı-ince kesitler toluidin mavisi ile boyanıp ışık mikroskobu altında incelendi.

**Bulgular:** İntrahipokampal tek taraflı enjeksiyon yapılmış sıçanların hipokampusunda CA1 bölgesinde ipsilateral tarafta kontralaterale göre daha fazla nöron kaybı gözlemlendi. İpsilateral dentat girus moleküler tabakasında aksonal liflerde artış görüldü. Kontrol grubundaki sıçanlarda nöron kaybına ve aksonal lif artışı bulgularına rastlanmadı.

**Sonuç:** Kainik asit uygulanmış sıçan modeli, insan mesial temporal lob epilepsisi ile en çok benzerlik gösteren model olması açısından önemlidir.

**Anahtar Sözcükler:** Hipokampus/ilaç etkisi; epilepsi/kimyasal yolla oluşturulan; enjeksiyon; kainik asit; mikroskopi; sıçan.

**Objectives:** We examined whether there is neuronal loss in the hippocampus of kainic acid-treated rats.

**Study Design and Methods:** Adult Sprague-Dawley rats (250-300 g) were assigned to either intrahippocampal isotonic saline or kainic acid. Four months later, following intracardiac perfusion hippocampi of the rats were isolated and transferred to the fixative solution. Semi-thin sections were prepared and stained with toluidine blue for light microscopy.

**Results:** Neuronal loss was observed in the CA1 region of the hippocampus of the kainic acid-treated rats, being greater on the ipsilateral than the contralateral side. Axonal projections were increased in the molecular layer of the ipsilateral dentate gyrus. There was no evidence of neuronal loss and increased axonal projections in the control group.

**Conclusion:** Kainic acid-treated rat model is instrumental because it has similar characteristics with human mesial temporal lobe epilepsy.

**Key Words:** Hippocampus/drug effects; epilepsy/chemically induced; injections; kainic acid; microscopy; rats.

Dergiye geliş tarihi: 28.10.2000 Düzeltme isteği: 14.02.2001 Yayın için kabul tarihi: 29.03.2001

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Şan, Şırvancı, Salık, Ercan, Çetinel); Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı (Yananlı, Onat).

\*Bu çalışma Beyin Araştırmaları Derneği (BAD) tarafından desteklenmektedir.

İletişim adresi: Dr. Tangül Şan, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elektron Mikroskopi Ünitesi, Haydarpaşa, 81326 Kadıköy - İstanbul.  
Tel: 0216 - 348 05 58 Faks: 0216 - 414 47 31 e-posta: sirvanci@prizma.net.tr

Temporal lob epilepsisi insanda diğer epilepsilere göre daha sık ortaya çıkmaktadır. Temporal lob üzerine yapılan histopatoloji çalışmalarında olguların %65'inde hipokampal skleroz saptanmıştır.<sup>[1]</sup> Bu nedenler araştırmacıların ilgisini hipokampal bölgeye yoğunlaştırmıştır. Anterior hipokampal skleroz ile temporal lob epilepsileri arasında görülen yakın ilgi nedeniyle terminolojik olarak parsiyel epilepsilere hipokampal epilepsi adı verilmesi de benimsenmiştir.<sup>[2]</sup> Hipokampal skleroz ile temporal lob epilepsisi arasındaki yüksek korelasyona rağmen, nöbetlerin başlaması ve ilerlemesinde hipokampal nöron kaybının rolü henüz açık olarak anlaşılamamıştır. Epilepsinin ve nöbetlerin etyopatogenezini aydınlatmak amacıyla hayvanlarda çeşitli epilepsi ve nöbet modelleri oluşturulmaktadır. Temporal lob epilepsisinin oluşumunu açıklamak amacıyla kullanılan modellerden biri de, glutamat reseptör agonisti olan kainik asidin sistemik ya da lokal yoldan uygulanmasıdır.

Nöronal hipereksitabilite artışının, hücrel ve moleküler düzeyde değişiklikler meydana getirerek (a) eksitator sistemlerde aşırılaşma, (b) eksitator ve inhibitör fonksiyonlarda nöromodülasyon defekti, (c) inhibitör fonksiyon bozukluğu, (d) nöronal membranlarda veya iyon kanallarında transport defekti oluşturduğu konusunda değişik hipotezler ortaya atılmıştır.

Bir nörotoksin olan kainik asidin sıçanlara enjeksiyonu, akut ve doza bağlı olarak konvülsiyonlara, nörotoksik eksitasyona bağlı nöbete ve haftalar sonra da spontan reküren nöbetlere neden olmaktadır.<sup>[3]</sup> Kronik tablo, insan mesial temporal lob epilepsisindeki klinik değişikliklerle yakın benzerlikler gösterir. Medikal tedaviye yanıt vermeyen temporal lob epilepsili hastalardan alınan cerrahi materyalde, hipokampal CA3/CA4 ve CA1 bölgelerinde nöron kaybı ve reaktif gliozis olduğu gözlenmiştir.<sup>[1]</sup> Benzer bir lezyon ve glial yanıt, sıçanlarda intraperitoneal, intraserebroventriküler ve intrahipokampal kainik asit uygulamasından sonra da görülmüştür.<sup>[4]</sup> Bir başka çalışmada ise CA3 piramidal nöronlarının ve CA4 komissürel asosiasyonel liflerin kainik asit ile hasara uğratılmasından 1-3 ay sonra, ipsilateral dentat girusun iç moleküler tabakasında çinko yönünden zengin terminallerin işaretlenmesinde artış gözlenmiştir.<sup>[5]</sup>

Kainik asit enjeksiyonu, temporal lob epilepsisindeki hipereksitabilitenin altında yatan mekanizmaları araştırmak açısından oldukça uygun bir model olma özelliğini taşımaktadır; çünkü, bu epilepside görülen Ammon boynuzu sklerozu ve hipokampal hipereksitabilite kainik asit modelinde görülebilmektedir.<sup>[6-9]</sup>

Bu çalışmada, hayvanlarda oluşturulan kainik asit modeli ile insan temporal lob epilepsisinde görülen Ammon boynuzu sklerozunun nöropatolojik profilinin aydınlatılması amaçlandı.

### GEREÇ VE YÖNTEM

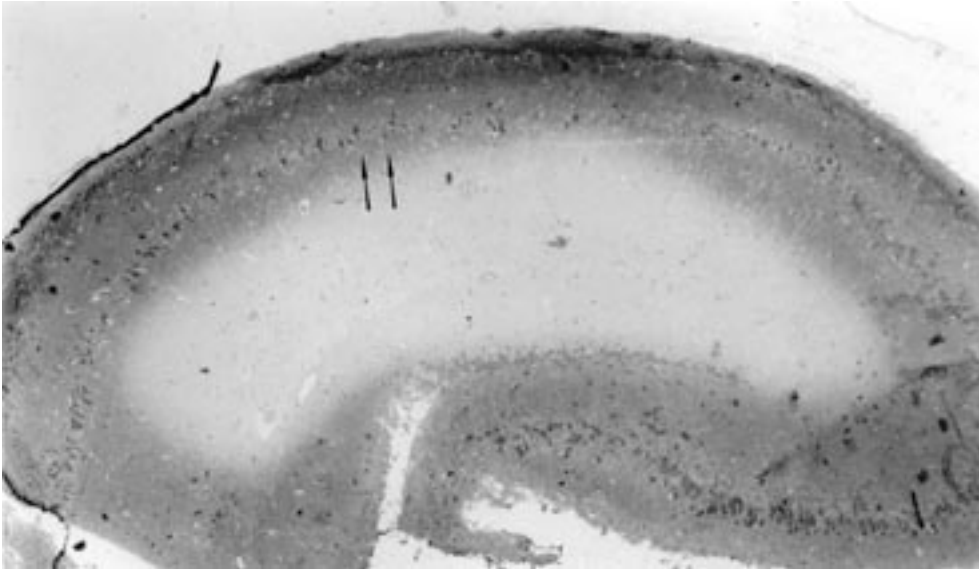
Erişkin 250-300 gr ağırlığındaki 10 adet Sprague-Dawley sıçan ketamin (50 mg/kg, intraperitoneal) ile uyutulduktan sonra, stereotaksik alet (Stoelting, Model 51600) yardımı ile kafa sabitlenip kafa derisi vertikal olarak açıldı. Hipokampus koordinatları bregmadan arkaya 6.0 mm, sağa 4.5 mm ve kafatası yüzeyinden aşağıya doğru 7.0 mm'dir. Hipokampusu madde uygulaması tek taraflı olarak yapıldı. Kontrol grubuna (n=5) serum fizyolojik, kainik asit grubuna (n=5) ise 0.2 µg/taf madde uygulandı. Daha sonra hayvanlar kendi ortamlarında yiyecek ve su alımları serbest olacak şekilde bekletildi. Enjeksiyondan 120 gün sonra sıçanlar eterle uyutulup perfüzyon pompası ile 50 ml/dk hızda intrakardiyak perfüzyon yapıldı. Perfüzyonda fiksatif olarak 0.1 M HEPES tamponu içinde %2.5 glutaraldehit, %0.5 paraformaldehit, %0.2 pikrik asit kullanıldı. Beyinlerden izole edilen hipokampus dokusu 24 saat boyunca 4°C'de bekletildi. HEPES tamponunda dokular yıkandıktan sonra takibe alındı. %1.5 osmium tetroksit/%1.5 potasyum ferrisiyanid ile 30 dk postfiksasyondan sonra deiyonize suyla yıkanan dokular, %0.5 uranil asetatla 30 dk bekletildi. Yükselen alkol serileri ve propilen oksit ile dehidratasyon yapıldı ve bloklar Epon 812'ye gömüldü. Kırk sekiz saat boyunca 60°C'de etüvde bekletilen doku bloklarından yarı-ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyama yapıldı.

### BULGULAR

Işık mikroskobu ile yapılan çalışmada, tek taraflı intrahipokampal kainik asit uygulanan sıçanların ipsilateral hipokampus doku kesitleri, kontralateral taraf ile ve serum fizyolojik uygulanan kontrol hipokampus bulguları ile

karşılaştırıldı. İpsilateral hipokampusun CA2 ve CA3 bölgelerinde nöron kaybı gözlenmedi. Kontrol hipokampusun CA1 bölgesindeki piramidal hücre tabakasında nöronlarda devamlılık izlenirken (Şekil 1), ipsilateral CA1 seviyesinde (Şekil 2, 3) kontralateral CA1 seviyesine (Şekil 4, 5) göre daha fazla nöron kaybı olduğu kalitatif olarak gözlemlendi. İpsila-

teral hipokampusta gliozis olduğu görüldü (Şekil 2, asterisk). İpsilateral hipokampusun dentat girus supragranüler tabakasında aksonal lif artışı saptandı (Şekil 7). Artış gösteren bu aksonal liflerin myelinli olduğu görüldü. Kontrol sıçanlarda (Şekil 6) ve kontralateral hipokampusta (Şekil 8) bu bulguya rastlanmadı.



ŞEKİL 1

Kontrol hipokampus. CA bölgelerinde nöronların devamlılığı görülüyor (oklar: CA1) (x 40).



ŞEKİL 2

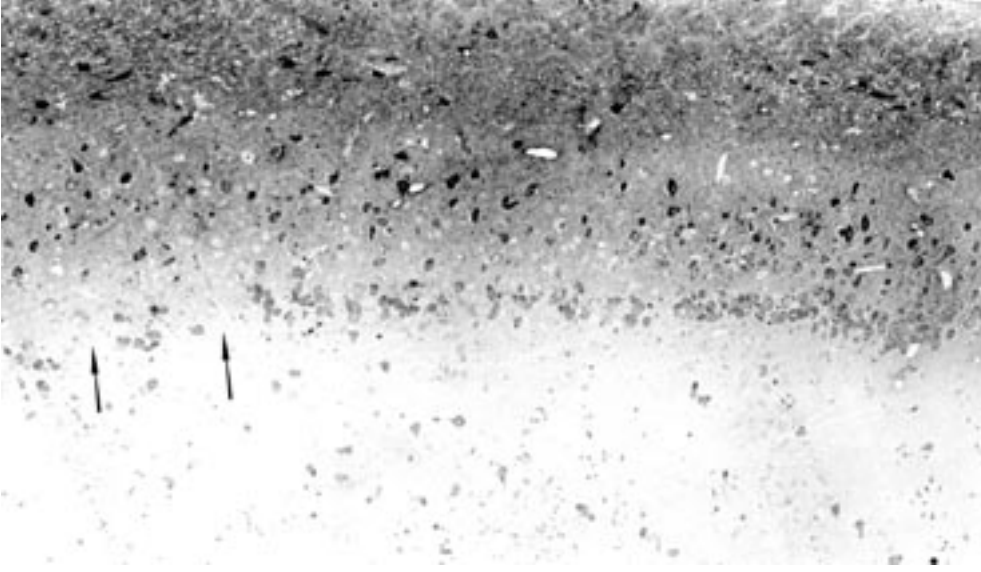
Tek taraflı intrahipokampal kainik asit enjeksiyonu uygulanmış sıçanda ipsilateral hipokampus. CA1 bölgesinde nöron kaybı gözleniyor (oklar). Asterisk: Reaktif gliozis bölgesi (x 40).

### TARTIŞMA

Daha önceki önçalışmamızda amigdalohipokampektomi yapılmış hastaların hipokampuslarında Ammon boynuzunda bulunan piramidal hücrelerde kayıp olduğunu gözlemiştik.<sup>[10]</sup> Ammon boynuzu sklerozu oluşturabilme özelliğine sahip olan kainik asit modelinde de benzer bir bulguya rastlanması, daha önceki

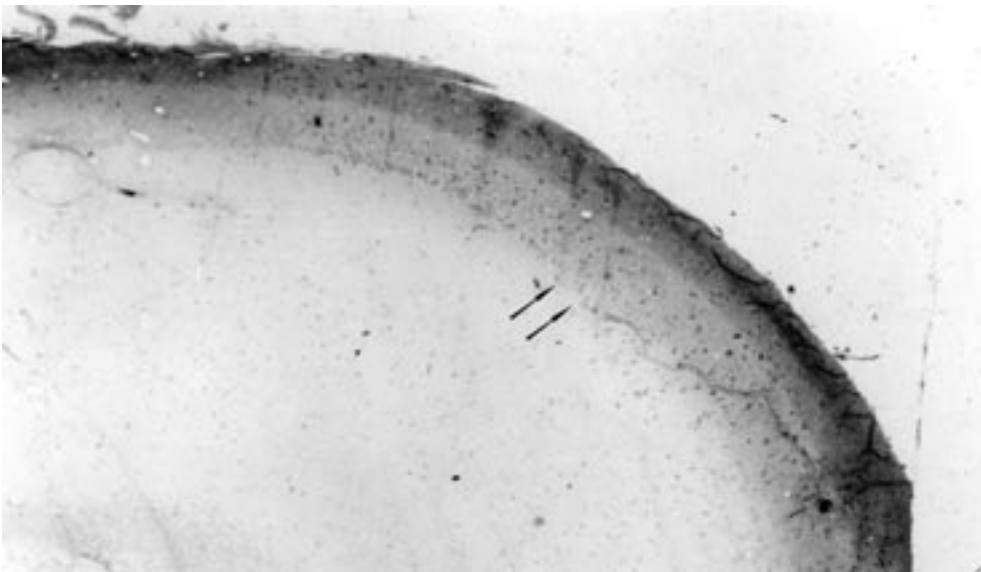
çalışmamızla histolojik bakımdan paralellik göstermektedir. Dolayısıyla deney, kainik asit uygulamasının sonucunu doğrulayacak biçimde beyin hasarını ortaya koyan bir sonuç göstermiştir.

Bouilleret ve ark.<sup>[11]</sup> erişkin farelere intrahipokampal kainik asit enjeksiyonundan iki saat sonra CA1, CA3c ve hilusta piknotik piramidal



ŞEKİL 3

Tek taraflı enjeksiyon, ipsilateral hipokampusta nöron kaybı (oklar) (x100).



ŞEKİL 4

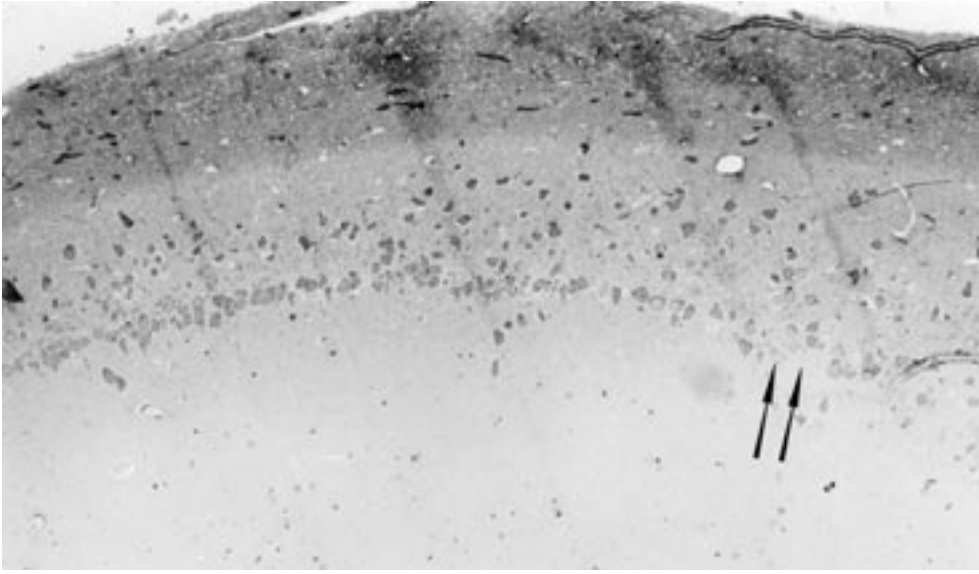
Tek taraflı enjeksiyon, kontralateral hipokampusta ipsilaterale göre daha az olduğu görülen nöron kaybı (oklar) (x40).



hücreler; bir hafta sonra aynı bölgelerde hücre kaybı gözlemlenmiş; bir ay sonra da CA1 ve CA3c bölgelerinin tamamına yakın bir bölümünün dejenerasyona uğradığını ve granül hücre tabakasının yaygınlaştığını saptamışlardır. Yaptığımız çalışmada da kainik asit intrahipokampal uygulanmış ve dört aylık bir bekleme süresinden sonra histolojik inceleme yapılmıştır. Dola-

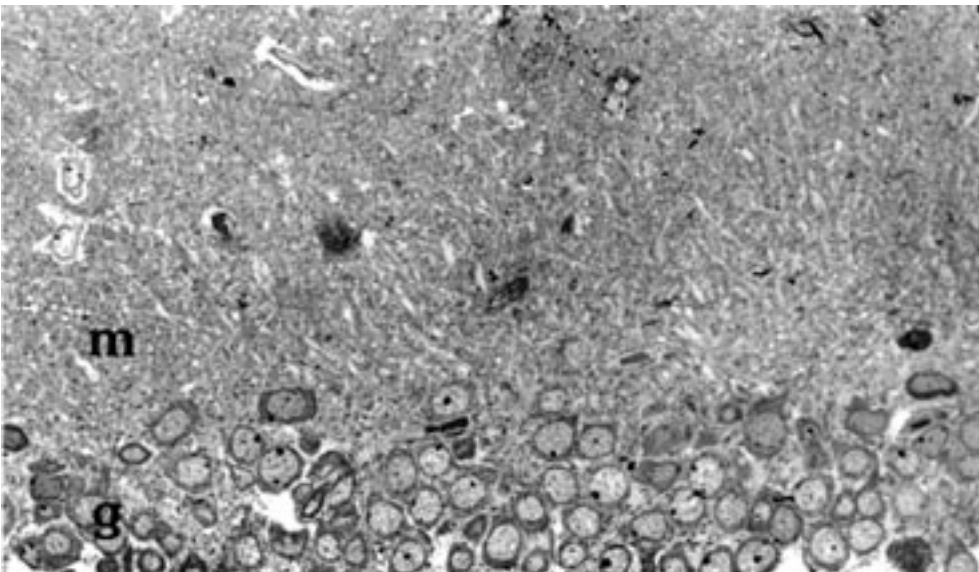
yısıyla, yukarıda belirtilen çalışmadakine uygun bir şekilde oluşan hücre kaybı bir aylık bir sürede gerçekleşmiş, daha sonraki zaman sürecinde bir değişiklik izlenmemiştir.

Hücre kaybının sektör üzerinde hangi bölgede olduğu konusunda çeşitli tartışmalar vardır. Davenport ve ark.,<sup>[12]</sup> intrahipokampal kainik asit enjeksiyonundan sonra, hücre sayımı



ŞEKİL 5

Tek taraflı enjeksiyon, kontralateral hipokampusta nöron kaybı (oklar) (x100).



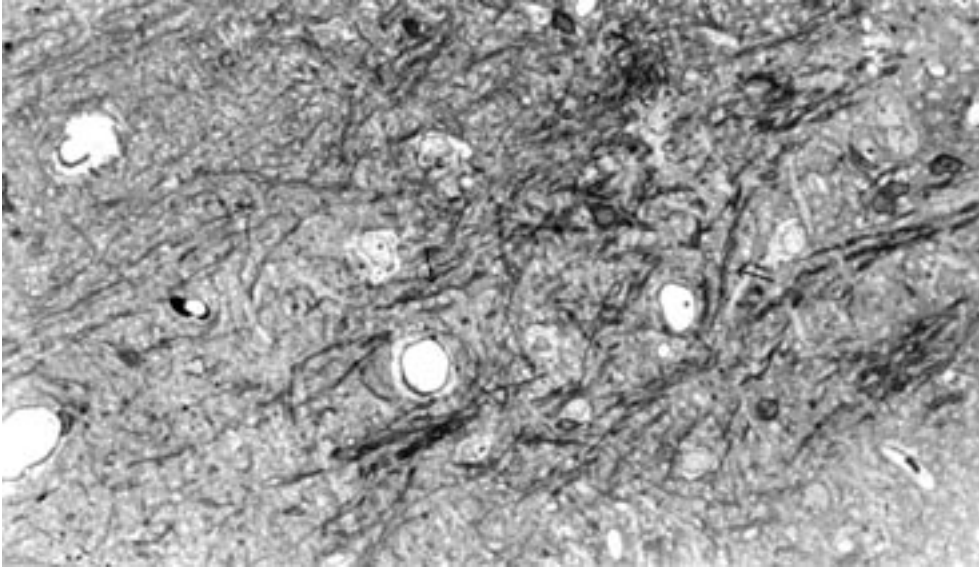
ŞEKİL 6

Kontrol hipokampus. Dentat girus moleküler tabakada aksonal lif artışı gözlenmemektedir (g: Granüler tabaka; m: Moleküler tabaka) (x400).

sonucu CA3 piramidal tabakasında ve hilar bölgede hücre kaybı olduğunu göstermişlerdir. Nadler ve ark.<sup>[13]</sup> kainik asidin tek taraflı intrahipokampal uygulamasından sonra CA3 bölgesindeki nöronların hasarlandığını gözlemişlerdir. Özellikle CA2 bölgesi hücre kaybı bakımından etkilenmemektedir ve insan temporal lob epilepsisinde tanımlanan "dirençli sektör"

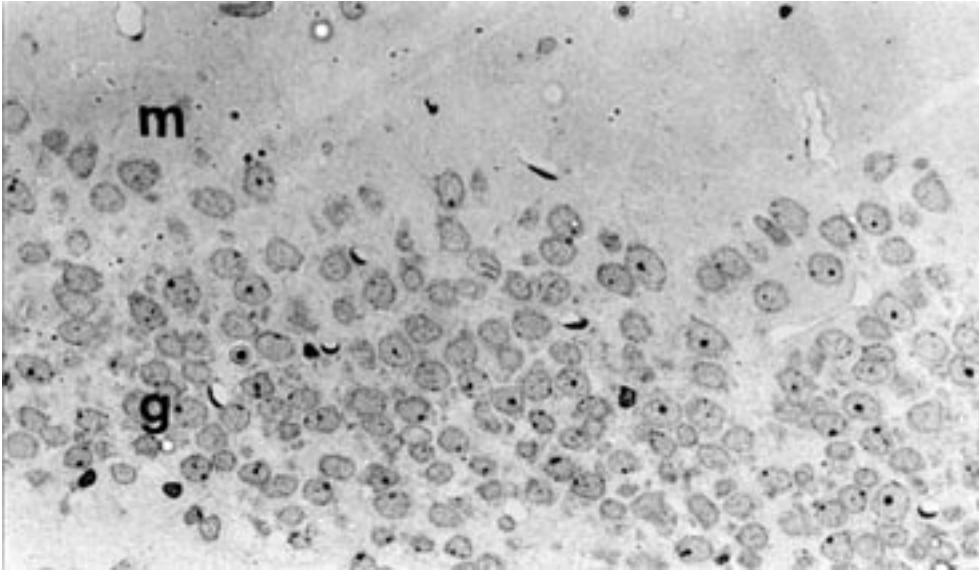
olma özelliğini göstermektedir.<sup>[14]</sup> Bu çalışmamız da aynı bölgenin kainik asit uygulamasında direnç gösterdiğini ortaya koymuştur.

Davenport ve ark.<sup>[15]</sup> başka bir çalışmada ise tek taraflı intrahipokampal kainik asit enjeksiyonunun supragranüler mossy lifi filizlenmesine neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Normalde dentat giristan çıkan mossy liflerinin



ŞEKİL 7

Tek taraflı enjeksiyon, ipsilateral hipokampus. Dentat girusun moleküler tabakasında aksonal liflerde artış (oklar) (x400).



ŞEKİL 8

Tek taraflı enjeksiyon, kontralateral hipokampus. İpsilateral hipokampus ile karşılaştırıldığında dentat girus moleküler tabakada aksonal lif artışı gözlenmemektedir (g: Granüler tabaka; m: Moleküler tabaka) (x400).

myelinsiz projeksiyonlar oluşturmaya karşı,<sup>[16]</sup> çalışmamızda moleküler tabakada artış gösteren aksonal liflerin myelinli oluşunun gözlenmesi dikkat çekicidir. Bu bulgular, kainik asit etkisiyle dentat girus moleküler tabakasında mossy lifi filizlenmesi meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Enjeksiyon sonrası beklenen sürecin uzunluğu bu sonucu ortaya çıkarmış olabilir.

Hipokampal skleroz, özellikle CA1'de piramidal hücre kaybı, reaktif gliosis, dentat girusta granül hücre yaygınlaşması ve mossy fibril reorganizasyonu ile karakterizedir.<sup>[17]</sup> Bu çalışmamızda ipsilateral hipokampusta saptadığımız gliosis de daha önceki çalışmalarla uyum göstermektedir.

Kainik asit enjeksiyonundan sonra dentat girusun iç moleküler tabakasında görülen mossy lif kollaterallerinin filizlenmesine neden olan etkiler kesin olarak bilinmemektedir. Hipokampal yolların deneysel olarak hasara uğratılması reaktif plastisiteye neden olmaktadır. İpsilateral ve komissürel afferentler, inervasyonu ortadan kalkan dendritik bölgeleri yeniden uyarmak için filizlenme göstermektedirler.<sup>[18]</sup> Nadler ve ark.<sup>[4]</sup> CA3/CA4 nöronlarının kainik asit ile hasara uğratılmasından sonra, hipokampal mossy lif kollaterallerinin, dejenerasyon olan assosiasyonel-komissürel afferent liflerin yerini aldıklarını göstermişlerdir. Komissürel assosiasyonel lifler normalde granüler hücre dendritlerinin iç moleküler tabakasını uyarılmaktadırlar. Dejenerasyon sonucu, anormal bir şekilde filizlenen rekürren granüler hücre kollateralleri bu liflerin yerini almaktadır. Bu rekürren kollaterallerin bazılarının eksitator olduğu,<sup>[19]</sup> bunun da kronik epileptik bir odak ortaya çıkmasında önemli etkisi olabileceği düşünülmektedir.<sup>[5]</sup>

Milgram ve ark.,<sup>[20]</sup> kainik asit uygulanmış hayvanlarda CA1 piramidal nöronlarında kayıp gözlemişlerdir. Epileptiklerde görülen nöbet tetiklenmesi ve nöronal yanıtın artışında, inhibisyon mekanizmalarının işlemeyişinin önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Dentat girusta bu inhibisyonun, moleküler tabakadaki GABAerjik internöronları uyaran rekürren kollateraller tarafından gerçekleştirildiği öne sürülmektedir. Cornish ve Wheal,<sup>[21]</sup> tek bir intraserebroventriküler kainik asit enjeksiyonundan 16 hafta sonra, CA1 bölgesindeki inhi-

bisyonun azaldığını bulmuşlardır. Milgram ve ark.<sup>[20]</sup> tarafından bu değişikliklerin internöron kaybından dolayı olabileceği ileri sürülmüştür. Sloviter,<sup>[22]</sup> perforan yolun tekrarlanan uyarılardan sonra hılar bölgedeki somatostatin içeren internöronlarda selektif bir kayıp olduğunu gözlemişlerdir. Scharfman ve Schwartzkroin<sup>[23]</sup> dentat girus afferentlerinin uyarılmasından sonra, kalsiyum bağlayıcı proteinlerin olmadığı hücrelerde dejenerasyon bulgusuna rastlamışlardır. Status epileptikus modellerinde hasar profili değişken olmasına rağmen, CA1 ve hılar bölgelerde birbirleriyle uyumlu hücre kaybı gözlenmektedir.

Sonuç olarak, kainik asit uygulanmış sıçan modeli, insan mesial temporal lob epilepsisine diğer temporal lob epilepsi modellerinden daha çok benzerlik göstermektedir. Başlıca nöron kaybı olan bölgeler (dentat girusun hilusu ve CA1) aynıdır. Gliosis ve mossy lifi filizlenmesi de insan mesial temporal lob epilepsisinde ve deneysel kainik asit modelinde görülen ortak bulgulardır. Yaptığımız bu çalışmada, kainik asit modelinde hipokampal sklerozun karakteristik özellikleri olan CA1 piramidal hücrelerinin kaybı, reaktif gliosis ve mossy lifi filizlenmesi meydana gelmiş olabileceğini düşündüren myelinli lif artışı bulgularıyla, bu modelin insan mesial temporal lob epilepsisini çalışmak için uygun bir model olma özelliği taşıdığını saptadık.

#### KAYNAKLAR

1. Babb TL, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel J Jr, editor. Surgical treatment of epilepsies. New York: Raven Press; 1987. p. 511-40.
2. Babb TL. Research on the anatomy and pathology of epileptic tissues. In: Lüders H, editor. Epilepsy surgery. New York: Raven Press; 1991. p. 719-27.
3. Kofler N, Kirchmair E, Schwarzer C, Sperk G. Altered expression of NPY-Y1 receptors in kainic acid induced epilepsy in rats. Neurosci Lett 1997; 230:129-32.
4. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. Brain Res 1980;182:1-9.
5. Sundstrom LE, Mitchell J, Wheal HV. Bilateral reorganisation of mossy fibres in the rat hippocampus after a unilateral intracerebroventricular kainic acid injection. Brain Res 1993;609:321-6.
6. Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. Epilepsia 1984;25:721-8.
7. Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH.

- Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 1989;9:2562-74.
8. Engel J Jr. The Hans Berger lecture. Functional explorations of the human epileptic brain and their therapeutic implications. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1990;76:296-316.
  9. Sutula TP. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia* 1990; 31 Suppl 3; S45-54.
  10. Şan T, Onat F, Özkara Ç, Öztürk E, Şanlı S, Ercan F. Immunocytochemical study in hippocampus of patient with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1999;40 Suppl 2:205.
  11. Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1999;89:717-29.
  12. Davenport CJ, Brown WJ, Babb TL. GABAergic neurons are spared after intrahippocampal kainate in the rat. *Epilepsy Res* 1990;5:28-42.
  13. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res* 1980;182:1-9.
  14. Margerison JH, Corsellis JA. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* 1966; 89:499-530.
  15. Davenport CJ, Brown WJ, Babb TL. Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat. *Exp Neurol* 1990;109:180-90.
  16. Frotscher M, Zimmer J. Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. *J Comp Neurol* 1983;215:299-311.
  17. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 1991;42:351-63.
  18. Laurberg S, Zimmer J. Lesion-induced sprouting of hippocampal mossy fiber collaterals to the fascia dentata in developing and adult rats. *J Comp Neurol* 1981;200:433-59.
  19. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 1985;5:1016-22.
  20. Milgram NW, Yearwood T, Khurgel M, Ivy GO, Racine R. Changes in inhibitory processes in the hippocampus following recurrent seizures induced by systemic administration of kainic acid. *Brain Res* 1991;551:236-46.
  21. Cornish SM, Wheal HV. Long-term loss of paired pulse inhibition in the kainic acid-lesioned hippocampus of the rat. *Neuroscience* 1989;28:563-71.
  22. Sloviter RS. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 1987;235:73-6.
  23. Scharfman HE, Schwartzkroin PA. Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science* 1989;246: 257-60.