

ORİJİNAL YAZI

## Temporal Lob Epilepsi'sinde L-Arginine ve CaEDTA'nın Etkileri\*

Behzat NOYAN

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

### ÖZET

Bu çalışmada, bir nitrik oksit (NO) prekürsörü olan L-Arginine ve bir ekstrasellüler çinko şelatörü olan CaEDTA'nın pilokarpine HCl ile oluşturulan kısa süreli epileptik nöbet üzerine etkileri araştırıldı. Deney, nöbet kontrol (serum fizyolojik 10  $\mu$ l, i.c.v., ve sonra 380 mg/kg pilokarpine HCl i.p.), L-Arginine (150  $\mu$ g/10  $\mu$ l, i.c.v.), CaEDTA (100 mM, 10  $\mu$ l, i.c.v.), L-Arginine+CaEDTA olmak üzere 4 gruptan oluştu. Enjeksiyonlardan sonra iki saat boyunca nöbet davranışları gözlemlenen sıçanlar bu süre sonunda sakrifiye edilerek immersion Autometallography (iZnS<sup>AMG</sup>, NeoTimm) ve N-6-methoxy-8-quinolyl-para-toluenesulfonamide (TSQ) boyamaları için beyinleri çıkarıldı. Nöbet kontrol, L-Arginine, CaEDTA ve L-Arginine+CaEDTA gruplarında nöbet davranışları şiddetli ve birbirleri ile eşit düzeyde bulundu. Bu gruplarda çinko histokimyası için yapılan hipokampal boyamalarda çinko translokasyonuna rastlanmadı. Bu bulgular bizi iki saatlik epileptik nöbet sırasında ve sonunda NO prekürsörü enjeksiyonunun, çinko şelasyonunun veya her ikisinin özellikle nöbet aktivitesine ve hipokampusda çinko depleksiyonuna etkili olmadığı sonucuna götürdü.

**Anahtar Kelimeler:** Epilepsi. Nitrik oksit. L-Arginine. CaEDTA. Çinko.

### Effects of L-Arginine and CaEDTA in Temporal Lobe Epilepsy

### ABSTRACT

This study aimed to assess the effect of L-Arginine, a nitric oxide (NO) precursor, and CaEDTA, an extracellular zinc chelator, on the short time epileptic seizure which was formed by pilocarpine HCl injection. The experiment was consist of 4 groups, including seizure control (saline 10  $\mu$ l, i.c.v., and then 380 mg/kg pilocarpine HCl i.p.), L-Arginine (150  $\mu$ g/10  $\mu$ l, i.c.v.), CaEDTA (100 mM, 10  $\mu$ l, i.c.v.), L-Arginine+CaEDTA groups. Seizure behaviour of the rats were observed for two hours following the injections and the animals were sacrificed at the end of the process and the brains were taken out for immersion Autometallography (iZnS<sup>AMG</sup>, NeoTimm) and N-6-methoxy-8-quinolyl-para-toluenesulfonamide (TSQ) staining processes. Seizure behaviour in the groups of seizure control, L-Arginine, CaEDTA and L-Arginine+CaEDTA was found to be strong and equal to each other. Moreover, in these groups no zinc translocation was spotted in hippocampal stainings which were performed by using zinc histochemistry. With these results, we concluded that the NO precursor injection alone, zinc chelation alone or together had no effects especially on seizure activity and zinc depletion in the hippocampus during and at the end of the two hour epileptic seizure.

**Key Words:** Epilepsy. Nitric Oxide. L-Arginine. CaEDTA. Zinc.

Merkezi sinir sisteminde potansiyel bir nörotransmitter ve retrograd haberci molekülü olduğu düşünülen nitrik oksit (NO), serbest ve diffüzyona uğrayabilen bir gazdır. NO, beyinde nitrik oksit sentaz (nNOS) enziminin etkinliği ile L-Arginine'den oluşur<sup>1</sup>. NO'in aynı zamanda nörotoksitesine ile ilişkisi vardır. Bu etkinin oksidatif stresle ilişkili olduğu düşünülmektedir. NO'in beyin bozuklukla-

rındaki rolü NO vericileri ya da NOS inhibitörleri kullanılarak araştırılmaktadır. Deneysel olarak oluşturulan epileptik nöbetlerde bu maddelerin bazılarının nöbetleri şiddetlendirdiği, bazılarının ise azalttığı bildirilmiştir<sup>2,3,4</sup>. NO'in epilepsinin patofizyolojisindeki rolü hala tam olarak bilinmemektedir.

Memelilerin beyinlerinde büyük miktarda bulunan çinko, birçok biyolojik sistemlerle ilişki içerisindedir. Beyinde bulunan çinkonun yaklaşık % 85-95'lik bir kısmı metalloenzimlere bağlıdır ve ancak küçük bir kısmı (%5-15) bazı glutamaterjik nöronların sinaptik vezikülleri içerisinde, glutamat ile birlikte konsantre edilmiş halde bulunur<sup>5,6,7,8</sup>. Bu çinko, total beyin çinkosunun az bir kısmını oluştursa da histokimyasal açıdan %100 reaktif olan çinkodur. Bu iyonik çinko memelilerin korteksleri, limbik alanları ve en fazla olarak da hipokampal formasyonun yosunu liflerin-

Geliş Tarihi: 08.03.2005

Kabul Tarihi: 06.06.2005

\* Çalışma Aarhus Üniversitesi, Anatomi Enstitüsü, Nörobiyoloji Bölümü'nde yapılmıştır.

Dr. Behzat NOYAN  
U.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı  
16059, Görükle/BURSA  
Tel: 0 224 4429137  
e-mail: noyan@uludag.edu.tr

de bulunur. Veziküler çinkonun sinaptik nörotransmisyonunda endojen bir nöromodulator ve nörotransmitter olarak görev yaptığı düşünülmektedir<sup>6,7,8</sup>. Fakat sinaptik transmisyondaki rolü, fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda hala tam olarak aydınlatılmamıştır. Epileptik nöbetlerde fazla miktarda salınan çinkonun (veziküler çinko) postsinaptik nöronlarda, kalsiyum bağımlı AMPA/KA reseptörleri için eksitator, NMDA ve GABA<sub>A</sub> reseptörleri için de inhibitör bir ajan olarak rol oynadığı bildirilmiştir<sup>8,9,10,11</sup>. Ayrıca çinko içeren yollar status epileptikus (SE) ve tekrarlayan nöbetlerde sinaptik reorganizasyon içerisindedir<sup>12</sup>.

Nöbet oluşturularak<sup>13</sup> ya da perforan yol stimülasyonu<sup>14</sup> ile yapılmış bazı çalışmalarda presinaptik çinko deplasyonunun postsinaptik nöronlar üzerinde aynı zamanda eksitotoksik olduğu da bildirilmiştir.

Frederickson ve arkadaşları<sup>15</sup> ve Cuajungco ve arkadaşları<sup>16</sup> NO<sup>-</sup> in presinaptik butonlardan çinko salınımına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun aksine, çinkonun NOS aktivitesini inhibe ettiğini gösteren çalışmalarda vardır<sup>17</sup>. NO<sup>-</sup> ve çinko (veziküler çinko) arasında iyice bilinmeyen bir ilişkinin olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, pilokarpine HCl yoluyla oluşturulan kısa süreli epileptik nöbetlerde (2 saat) bir NO<sup>-</sup> prekürsörü olan L-Arginine'in, bir ekstrasellüler çinko şelatörü olan CaEDTA'nın nöbet üzerine etkisi ve birbirleri ile etkileşimleri epileptik nöbetlerin skorlanması ve hipokampal presinaptik ve postsinaptik nöronların boyanması yoluyla incelenmeye çalışılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Araştırmada ağırlıkları 300-320g arasında, erkek Sprague-Dawley türü sıçanlar kullanıldı (n=27). Sıçanlar, Møllegaard Hayvan Merkezi'nden (Ejby, Danimarka) sağlandı. Sıçanlar, sıcaklığı 21-22° C olan odalarda (12 saat aydınlık/12 saat karanlık) dört tanesi bir kafeste olacak şekilde tutuldular. Standart sıçan diyeti ile beslendiler, su ve yem alımları serbest bırakıldı.

Hayvanların bakımı ve kullanımında NIH rehberi takip edildi.

Deney 4 grup olarak planlandı;

**Nöbet Kontrol Grubu (n=5):** Pilokarpine HCl (380 mg/kg intraperitoneal i.p.) enjeksiyonundan 10 dakika önce intraserebroventriküler (i.c.v.) yolla 10 µl serum fizyolojik verilen grup.

**L-Arginine Grubu (n=7):** Pilokarpine HCl enjeksiyonundan 10 dakika önce L-Arginine (150 µg/10 µl, i.c.v.), enjeksiyonu yapılan grup.

**CaEDTA Grubu (n=7):** Pilokarpine HCl enjeksiyonundan 10 dakika önce CaEDTA (100 mM, 10 µl, i.c.v.) enjeksiyonu yapılan grup.

**L-Arginine + CaEDTA Grubu (n=7):** Pilokarpine HCl enjeksiyonundan 10 dakika önce L-Arginine (150 µg/10 µl, i.c.v.) ve CaEDTA (100 mM, 10 µl, i.c.v.) enjeksiyonu yapılan grup.

Epileptik nöbet sırasında periferik kolinerjik etkilerin azaltılması için, tüm sıçanlara pilokarpine HCl verilmemesinden 30 dakika önce methyl-scopolamine (1 mg/kg, s.c.) enjekte edildi.

İntraserebroventriküler enjeksiyonlar için tüm hayvanların Bregma'larının 1,5 mm sol laterale ve 1-1,5 mm posteriorüne uyan koordinat bir drill ile delindi ve 10 mm 20 gauge paslanmaz çelik hypodermic tüp bu delikten sol lateral ventriküle doğru yönlendirildi. Kafatasından itibaren 4,2-4,5 mm derinliğe ulaşan bir permanent kanül yerleştirildi. Kanül akrilik sement yardımı ile kafatasına sabitlendi. Bu işlemler isoflorane anestezisi altında gerçekleştirildi ve işlemden sonra anestezi etkisinin geçmesi için en az 4 saat beklendi.

İntraserebroventriküler enjeksiyonların sol lateral ventriküle gittiğinin görülebilmesi için, bir sıçana yukarıdaki yolla methyl blue enjekte edildi.

Bütün sıçanlar, pilokarpine HCl enjeksiyonundan sonra iki saat boyunca nöbet şiddetlerinin tesbiti ve nöbete giriş latansları için gözlemlendi. İki saatlik süre sonunda sıçanlar dekapite edilerek iZnS<sup>AMG</sup> ve TSQ boyamaları için beyinleri hızlı bir şekilde çıkarıldı.

## Davranışsal Nöbet Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Limbik nöbetlerin derecelendirilebilmesi için Racine<sup>18</sup> skalası kullanıldı;

0: Hareketsiz,

1: Fasial otomatizmalar

2: Baş sallama

3: Unilateral veya bilateral ön ekstremiter klonusu

4: Bilateral ön ekstremiter klonusu ve ayağa kalkma

5: Ayağa kalkma, düşme, yuvarlanma ve jenarelizasyon konvulsiyonlar

## İmmersion Autometallography (iZnS<sup>AMG</sup>, Modifiye NeoTimm) Boyaması

2 mm'lik hipokampus blokları 0.1 M fosfat tamponu içinde % 4 paraformaldehit ile bir gün perfüze edildikten sonra 4 °C'de üç gün boyunca NeoTimm solüsyonunda (0.12 M Millonig's buffer'da tamponlanmış 0.136 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.3) de %3 glutaraldehit ve %0.1 Na<sub>2</sub>S) bekletildiler. Bloklar 0.12 M Millonig's buffer ve 0.136 mM CaCl<sub>2</sub> içeren soğuk tampona transfer edildiler ve birçok kez bu solüsyonla yıkandılar. CO<sub>2</sub> gazı ile dondurulan bloklardan kryostat aracılığı ile 30 µm'lik kesitler alındı. Bu kesitler jelatin kaplı cam lamlara alındı ve şale içerisinde 26 °C de 1 saat boyunca AMG film banyosu ile [30 ml gum Arabic (%50)/5 ml citrate buffer (2 M, pH 3.7)/15 ml hydroquinone (%5.67)/0.25 ml AgNO<sub>3</sub> (%17)] banyo edildiler<sup>19,20</sup>. Kesitler Tolui-

## Temporal Lob Epilepsi'sinde L-Arginine...

dine blue ile zıt boyandı ve DEPEX ile kapatıldı (sabitlendi). Hazırlanan bu preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus Bx51) incelendi. Bir kamera (Olympus DP 50) kullanılarak fotoğrafları çekildi bilgisayar ortamında kayıtları ve incelemeleri yapıldı.

### TSQ Floresans Boyaması

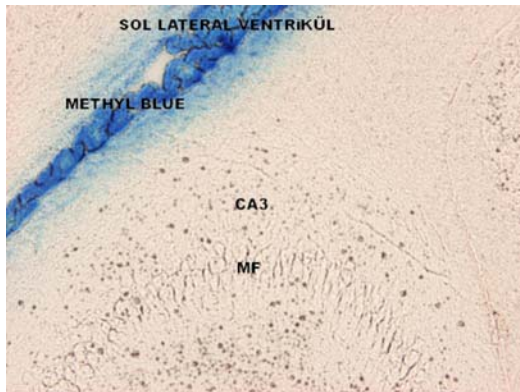
Çinkonun floresan görünümü için 30 µm'lik frozen kesitlere N-(6-methoxy-8-quinolyl)-para-toluenesulfonamide (TSQ) boyaması yapıldı. Kesitler 1 dakika boyunca TSQ (4,5 M) solüsyonunda (140 mM sodyum barbital ve 140 mM sodyum asetat tamponunda) bırakıldı. Sonra 1 dakika boyunca serum fizyolojik (NaCl, % 0.9) ile yıkandı<sup>21</sup> ve bir floresans mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi (360 nm eksitasyon, 460 nm emisyon filtreleri kullanıldı). Mikroskoba bağlı bir kamera (Olympus DP 50) ile çekilen görüntüler kayıt ve analizleri için bilgisayar ortamına aktarıldı.

Nöbet latansları ve skorlamalarının sonuçları, ortalama ± standart hata olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi,  $\alpha=0.05$  anlamlılık değeri olarak alındı.

CaEDTA, pilocarpine HCl ve methyl-scopolamine, Sigma'dan (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), L-Arginine Tocris'den (Tocris Co. UK) sağlandı.

### Bulgular ve Sonuçlar

İntraserebroventriküler enjeksiyonların sol lateral ventriküle doğru yapıldığının gösterilmesi için bir hayvana enjekte edilen methyl blue boyama sonucu, Şekil-1'de gösterilmiştir.



Şekil 1:

İntraserebroventriküler enjeksiyon sonrasında sol lateral ventrikülde methyl blue boyası ve onun çevre dokulara diffüzyonu görülmektedir.

### Nöbet Aktivitesinin Davranışsal İncelenmesi Sonuçları

Pilocarpine HCl enjeksiyonundan 2 saat sonra dekapite edilen sıçanların nöbet latansları ve davranışsal nöbet aktivitesi skorları Tablo-I'de gösterilmiştir.

Tablo I. Deney gruplarında ortalama nöbet latansı ve nöbet skorları.

Gruplar	Nöbet Latansı (dk) (ortalama±S.E.)	Nöbet Skoru (sayı-dereceleme) (ortalama±S.E.)
Nöbet Kontrol Grubu (n=5)	36.5±2.8	3.7±0.1
L-Arginine Grubu (n=7)	37.3±1.7	3.5±0.7
CaEDTA Grubu (n=7)	35.3±2.4	3.6±0.1
L-Arginine+CaEDTA Grubu (n=7)	36.4±1.3	3.7±0.4

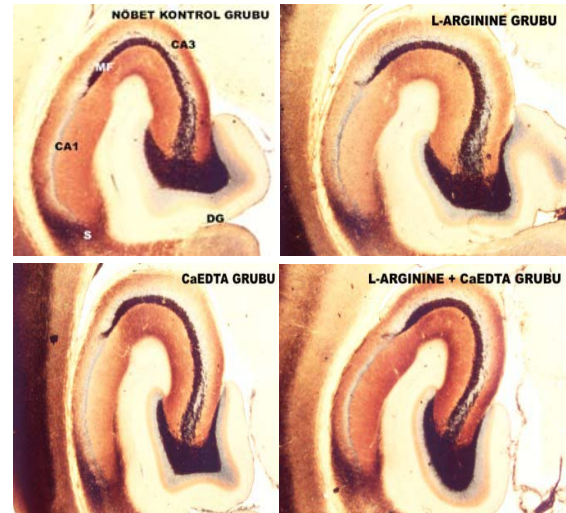
Gruplar arasında nöbet latansı ve nöbet skoru değerleri açısından anlamlı farklılıklar görülmedi.

Nöbet skorları tüm gruplarda şiddetli düzeyde epileptik nöbetlerin oluştuğunu göstermektedir.

Sadece pilocarpine HCl enjekte edilen grupta nöbet latansı ortalama 36.5±2.8 dk. iken, L-Arginine, CaEDTA ve L-Arginine+CaEDTA enjekte edilen ve nöbet oluşturulan gruplarda sırasıyla 37.3±1.7, 35.3±2.4 ve 36.4±1.3 dk. olarak kaydedilmiştir. Nöbet latansı gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Nöbet kontrol grubunda ortalama 3.7±0.1 olan nöbet skoru L-Arginine, CaEDTA ve L-Arginine+CaEDTA gruplarında sırasıyla 3.5±0.7, 3.6±0.1 ve 3.7±0.4 olarak tesbit edilmiştir. Davranışsal skorlama, nöbet aktivitesi yönünden gruplar arasında anlamlı farklar olmadığını göstermektedir (Tablo-I).

### İmmersion Autometallography (iZnS<sup>AMG</sup>) boyaması sonuçları

Tüm gruplardan alınan örnek iZnS<sup>AMG</sup> boyaması görüntüleri Şekil-2'de gösterilmiştir.



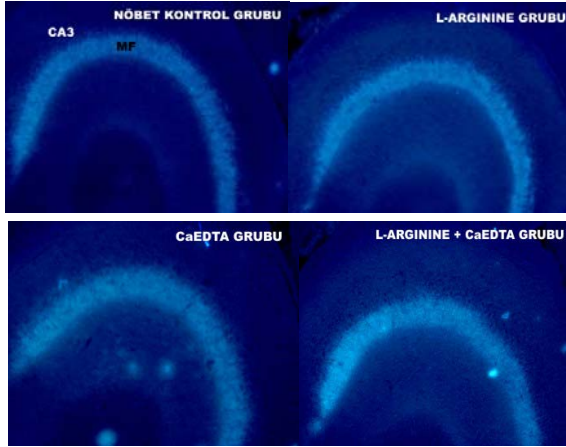
Şekil 2:

iZnS<sup>AMG</sup> (immersion autometallography) boyaması sonuçları. Tüm grupların yosunsu lifleri, CA3 ve CA1 alanlarının ışık mikroskopik incelenmesi sonucunda aralarında fark olmadığı, şekilde görülmektedir. DG: Dentate gyrus, S: Subiculum, MF: Mossy Fiber, CA1: Cornu ammonis 1, CA3: Cornu ammonis 3.

Bu grupların yosunsu lifleri, CA3 ve CA1 alanları ışık mikroskopik olarak incelenmiş, normal olarak değerlendirilmiş ve aralarında fark olmadığı görülmüştür (Şekil-2). Sonuçta pilokarpine HCl enjeksiyonundan 2 saat sonra dekapite edilen sıçanlar üzerinde L-Arginine enjeksiyonunun, çinko şelasyonunun veya her ikisinin uygulanmasının nöbet kontrol grubuna göre morfolojik olarak bir değişim oluşturmadığı görülmektedir.

### TSQ Floresan Boyaması Sonuçları

TSQ floresan boyaması görüntülerinden (yosunsu lifleri ve CA3 piramidal hücreleri) örnekler tüm gruplar için Şekil-3’de gösterilmiştir.



Şekil 3:

*TSQ floresan boyaması. Tüm grupların yosunsu lifleri ve CA3 alanlarının floresan mikroskopik incelenmesi sonucunda aralarında fark olmadığı, yosunsu liflerinde görülen çinko floresanının (beyaz) CA3 alanında görülmediği dolayısıyla çinko depleksiyonu olmadığı görülmektedir. Şekilde yosunsu lifler ve CA3 hücreleri gösterilmiştir. Çinko depleksiyonu bundan başka dentat gyrus ve CA1 alanında da saptanmamıştır.*

Bu floresan boyaması ile gruplar arasında çinko floresanı dentat gyrus, CA3 ve CA1 alanlarında incelenmiş, immersion autometallography sonuçlarına benzer şekilde nöbet kontrol grubu ile L-Arginine, CaEDTA ve L-Arginine+CaEDTA grupları arasında fark görülmemiştir (Şekil-3). Hem TSQ hem de  $iZnS^{AMG}$  boyama sonuçları birbirini destekler niteliktedir.

### Tartışma

Çalışmamız, pilokarpine HCl enjeksiyonunu takiben oluşan epileptik nöbetler üzerine iki saat içerisinde, nöbet öncesi yapılan L-Arginine, çinko şelasyonu ya da her ikisinin nöbet aktivitesi ve hipokampus çinko histokimyası açısından etkili olmadığını gösterdi. Yine bu çalışmaya paralel olacak şekilde pretedavi olarak çeşitli dozlarda L-Arginine verdiğimiz ve

sonra nöbet oluşturduğumuz bir elektrokortikografik (ECoG) çalışmada L-Arginine’in oluşan nöbetler ve SE üzerine koruyucu ya da aktive edici etkisinin olmadığını, ancak 300 mg/kg dozda SE’ya girme oranını düşürdüğünü görmüştük<sup>22</sup>. Bu bulgular bizi NOS inhibisyonunun epileptik nöbetler üzerine antikonsülsant ya da prokonsülsant olduğunu bildiren çalışmalarla birlikte aynı karmaşık noktaya getirdi<sup>2-4,10 23,24</sup>.

Cuajungco ve Lees<sup>16</sup> NO<sup>-</sup> jeneratörü infüzyonunun hipokampuste intrasellüler çinko akümülyasyonunu indüklediğini ve sodyum nitroprusside verilmesinden sonra nöbetlerinde oluştuğunu bildirdiler. Benzer şekilde Frederickson ve arkadaşları<sup>15</sup> nitrik oksit verilmesiyle yosunsu liflerin presinaptik uçlarından çinko salındığını gösterdiler. Del-Bel ve arkadaşları<sup>4</sup> da yaptıkları çalışma sonucunda, NO<sup>-</sup>’in nöbetlerde hem antikonsülsant hem de prokonsülsant bir rol oynadığını, bu etkisinin epilepsi modeline, droglara ve doza bağlı olabileceğini bildirdiler.

Suh ve arkadaşları<sup>24</sup> pilokarpine HCl enjeksiyonu yoluyla nöbet oluşturdukları sıçanlardan 24 saat sonra aldıkları hipokampal kesitlerinde neuropil floresansının azaldığını ve postsinaptik nöronlarda TSQ boyanması görüldüğünü dolayısıyla çinko translokasyonunun olduğunu gösterdiler. Sonuçta SE ya da kronik rekurrent nöbetler olan bir epileptik nöbetin başlangıcında tesbit edilebilecek değişimlerin önemli olabileceği düşüncesi ile yaptığımız bu çalışmada pilokarpine HCl enjeksiyonundan iki saat sonra çinko translokasyonunun olup olmadığını test ettik. Fakat nöbet oluşmasına rağmen çinko postsinaptik nöronlar içerisinde görülmedi. Kullanılan pilokarpine HCl dozajı deney hayvanlarında büyük oranda SE oluşturabilen bir dozajdı. Bundan başka, ekstrasellüler çinko şelasyonu ile birlikte nöbet oluşturduğumuz grupta da nöbet skorlarında bir azalma yoktu. Benzer şekilde Lee ve arkadaşları<sup>23</sup> da ekstrasellüler çinko şelatörü CaEDTA’nın “ZnT3-null mice” larda kainatla oluşturulan ve iki saatte sona erdirilen nöbet şiddetine hemen hemen etkisinin olmadığını belirttiler.

Kronik tekrarlayan nöbetlerden veya SE’den sonra çinkonun translokasyonu yani postnöronal hücre gövdeleri içerisine taşındığı daha önce gösterildi. Bu çinko girişinin de çeşitli beyin bozukluklarında (epilepsi<sup>13</sup>, iskemi<sup>26</sup>, travmatik beyin hasarı<sup>25</sup>) nörodejeneratif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Biz bu sürecin erken safhalarında, pilokarpine HCl enjeksiyonunu takiben ikinci saat sonunda, NO<sup>-</sup> prekürsörü L-Arginine enjeksiyonunun, çinko şelasyonunun ve her ikisinin nöbet aktivitesine azaltıcı ya da arttırıcı yönde etkisi olmadığını ve benzer şekilde hipokampusda çinko histokimyasında da değişiklik oluşturmadığını gözlemledik.

Takip eden çalışmamız ön tedavi olarak NOS inhibisyonunun ve NO<sup>-</sup> donor ve prekürsörünün

## Temporal Lob Epilepsi'sinde L-Arginine...

enjeksiyonunun değişik dozlarının da deneneceği nöbet, tekrarlayan nöbetler ve status epileptikus üzerine olacaktır. Ayrıca epileptik nöbetler sırasında, NO<sup>-</sup> ve çinko ilişkisi de araştırılması önemli bir konu olarak durmaktadır.

### Kaynaklar

1. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
2. Bagetta G, Paoletti AM, Leta A, Duca CD, Nistico R, Rotiroti D, Corasaniti MT. Abnormal expression of neuronal nitric oxide synthase triggers limbic seizures and hippocampal damage in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 255-60.
3. Boda B, Szenté M. Nitric oxide synthase inhibitor facilitates focal seizures induced by aminopyridine in rat. *Neurosci Lett* 1996; 209: 37-40.
4. Del-Bel EA, Oliveira PR, Oliveira JAC, Mishra PK, Jobe PC, Garcia-Cairasco N. Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 971-9.
5. Colvin RA, Davis N, Nipper RW, Carter PA. Zinc transport in the brain: Routes of zinc influx and efflux in neurons. *J Nutr* 2000; 130: 1484S-7S.
6. Frederickson CJ, Bush AI. Synaptically released zinc: Physiological functions and pathological effects. *Biometals* 2001; 14: 353-66.
7. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson Cathy J, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr* 2000; 130: 1471S-83S.
8. Weiss JH, Sensi SL, Koh JY. Zn<sup>2+</sup>: A novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 395-401.
9. Gibbs JW, Shumate MD, Coulter DA. Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptor function in dentate granule and CA1 neurons. *J Neurophysiol* 1997; 77: 1924-38.
10. Molnar P, Nadler V. Synaptically-released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. *Brain Res* 2001; 910: 205-7.
11. Weiss JH, Sensi SL. Ca<sup>2+</sup>-Zn<sup>2+</sup> permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2000; 23: 365-71.
12. Ben-Ari Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* 2001; 42(suppl-3): 5-7.
13. Frederickson CJ, Hernandez MD, McGinty JF. Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res* 1989; 480: 317-21.
14. Sloviter RS. A selective loss of hippocampal mossy fiber Timm stain accompanies granule cell seizure activity induced by perforant path stimulation. *Brain Res* 1985; 330: 150-3.
15. Frederickson CJ, Cuajungco MP, Labuda CJ, Suh SW. Nitric oxide cause apparent release of zinc from presynaptic boutons. *Neuroscience* 2002; 115: 471-4.
16. Cuajungco MP, Lees GJ. Nitric oxide generators produce accumulation of chelatable zinc in hippocampal neuronal perikarya. *Brain Res* 1998; 799: 118-29.
17. Persechini A, McMillan K, Masters BS. Inhibition of nitric oxide synthase activity by Zn<sup>2+</sup> ion. *Biochemistry* 1995; 34: 15091-5.
18. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32: 281-94.
19. Danscher G. Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry* 1981; 71: 1-16.
20. Danscher G, Stoltenberg M, Bruhn M, Sondergaard C, Jensen D. Immersion autometallography: histochemical in situ capturing of zinc ions in catalytic zinc-sulphur nanocrystals. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 1619-25.
21. Frederickson CJ, Kasarskis EJ, Ringo D, Frederickson RE. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J Neurosci Methods* 1987; 20: 91-103.
22. Noyan B, Gulec G. Effects of L-arginine on the prevention and treatment of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Physiol Res* 2000; 49: 379-85.
23. Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, Koh JY. Accumulation of zinc in degenerating hippocampal neurons of ZnT3-null mice after seizures: Evidence against synaptic vesicle origin. *J Neurosci* 2000; 20: RC 79, 1-5.
24. Suh SW, Thompson RB, Frederickson CJ. Loss of vesicular zinc and appearance of perikaryal zinc after seizures induced by pilocarpine. *Neuroreport* 2001; 12: 1523-5.
25. Suh SW, Chen JW, Motamedi M, Bell B, Listiak K, Pons NF, Danscher G, Frederickson CJ. Evidence that synaptically released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res* 2000; 852: 268-73.
26. Lee JM, Zipfel GJ, Park KH, He YY, Hsu CY, Choi DW. Zinc translocation accelerates infarction after mild transient focal ischemia. *Neuroscience* 2002; 115: 871-8.