

Nikotinin ince yapı düzeyinde sıçanlarda beyin frontal korteksine etkisi

Ahmet Ergun*, E.Oğuzhan Oğuz**, M.Cengiz Güven***, Belgin Can***, Fuat Erten****, Yüksel Saran***

*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Ankara

**Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD

***Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD,

****Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin Cerrahi Kliniği,

Ozet

Amaç: Nikotin gelişmekte olan ülkelerde sigara içimiyle yaygın bir şekilde aktif ya da pasif olarak maruz kalınan multisistemik etkisi olan bir nöroteratojen ve nörotoksik bir ajandır. Daha önceleri nikotinin sinir dokusu ve çeşitli dokulara etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda nikotin maruziyetinin sıçan beyni frontal korteksi ince yapısı üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Materyal ve Metod:On erişkin Wistar Albino sıçana 10 gün boyunca günde 0.4mg/kg nikotin damar içi enjekte edildi. Benzer yaş ve kiloda on kontrol sıçana aynı sürede serum fizyolojik verildi. Elde edilen dokular transmisyon elektron mikroskobu için hazırlanarak incelendi. Bulgular: Nikotin verilen sıçanlarda kan damarlarının bazal membranlarında yer yer kalınlaşma ve incelme, endotel hücrelerinde dejenerasyonlar, nikotine maruz kalan sinir hücrelerinde lipit damlacıklarının arttığı ve bol miktarda nörofilaman ve nekroz odakları görüldü. Sonuç: İncelememizde beynin frontal bölgesinin damar endotelinde ve sinir hücrelerinde nikotinin zararlı etkilerini gösteren değişiklikler söz konusuydu.

Anahtar kelimeler: nikotin, sıçan, beyin korteksi, ultrastrüktür

Abstract

The ultrastructural effect of nicotine on rat frontal cortex.

Aim: Nicotine which is generally exposed by cigarette smoking is a neuroteratogen and neurotoxic agent. It has multisystemic effects. The effects of nicotine in different systems have been reported previously. In our study, we aimed to investigate the effect of nicotine on adult rat brain frontal cortex. Materials and Methods: Ten rats were injected intravenously with nicotine at a dose of 0,4 mg/kg body weight daily for 10 days; ten control rats matched for age and weight were injected with saline only for the same duration. The tissues were then harvested and examined by transmission electron microscopy. Results: Rats given nicotine showed thickening and thinning of the basillar membrane of blood vessels and endothelial cellular changes and degeneration. Increased number of lipid droplets and more abundant filaments were seen in nicotine exposed neurons. Conclusion: There were alterations in rats exposed to nicotine that could be attributed to the detrimental effects of nicotine upon vascular endothelium and neural structures of the frontal cortex of the rat brains.

Key words: nicotine, rat, brain cortex, ultrastructure

Giriş

Nikotin pekçok bitkide özellikle tütünde bulunan doğal kaynaklı bir alkaloidtir. Tütün kullanımı, pasif sigara dumanı alımı ve nikotin yerine koyma tedavileri nikotin maruziyetinin ana kaynaklarıdır. Nikotin piridin ve pirrolidin halkaından ibaret bir amindir. Vücutta absorbe edilen nikotinin kolayca biyolojik

membranları ve kan beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir (1). Nikotinin pek çok metabolik zararlı etkisi damar endotelinde hasar yaratarak kolaylıkla dokulara geçebilmesinden kaynaklanmaktadır (2). Literatürde nikotinin prenatal, adolesan ve erişkin çağda beyine olan etkilerinin incelendiği pek çok çalışma bildirilmektedir (3-11). Prenatal dönemde

Yazışma Adresi: Dr.E.Oğuzhan Oğuz
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
Dekanlık Binası, Kampüs 20070 Kınıklı - Denizli
Tel. 0505 7378750 Faks. 0258 2132874
Email: oguzemin@yahoo.com

nikotine maruz kalmış sıçanlarda juvenil ve adolesan hipokampus ve somatosensoryel kortekste hücre yapısı ve bölgesel yapı değerlendirilmiş ve hücre boyutunda azalma hücre sıklığında artma bulunmuştur. Prenatal nikotin maruziyetinde nörokimyasal ve fonksiyonel hasarlar ve beyin yapısında uzun süren değişikliklere yol açan nöronal maturasyon gösterilmiştir (11).

Nikotinin beynin çeşitli bölümlerine etkileri daha önceleri elektron mikroskopi (EM) düzeyinde çalışılmıştır (12, 13). Bu çalışmanın amacı sıçan beyninin frontal bölgesinin damarsal ve sinirsel ince yapısı üzerine nikotin uygulamasının etkisini ince yapı düzeyinde araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma 20 erişkin erkek Wistar sıçanı (4-6 aylık, 200-250 gr vücut ağırlığında) içermektedir. Sıçanlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan Bakımı Talimatlarına göre 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusunda, sürekli oda sıcaklığında, olağan diyetle beslendi ve serbestçe su içmelerine izinverildi. Tüm hayvan deneyleri Ulusal Sağlık enstitüsünün laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı rehberine göre (NIH Publications No. 86 -23, revised 1985) yürütüldü. On sıçana 10 gün günlük 0.4mg/kg nikotin damar içi enjekte edildi. Benzer yaş ve kiloda on kontrol sıçana aynı sürede serum fizyolojik verildi. Onbirinci günde sıçanlar halotanla uyutuldu ve dekapite edildi. Beyin dokusu çıkarıldı, küçük parçalara ayrıldı ve 2 -4 saat pH7.2 fosfat tamponunda % 2.5'lük gluteraldehitte tespit edildi ve %1'lik osmium tetroksitte post fikse edildi (9). Daha sonra dokular aşamalı alkollerde dehidrate edilip Araldite CY 212'ye gömüldü. Ultra ince kesitler (50nm) Leica Ultracut R ultramikrotomunda kesildi, uranil asetat ve kurşun sıratla boyandı ve LEO 906 E transmisyon elektron mikroskobunda incelendi.

Bulgular

Kontrol grubunda kan damarlarının lümeni, hücrelerin çekirdek içeren kısmı dışında ince bir tabaka endotel hücreleri ile çevriliydi (Şekil 1). Buna ilaveten lizozoma benzer yapılarla birlikte sitoplazma boyunca küçük pinositik veziküller dağılmış durumdaydı.

Sinir hücreleri belirgin bir çekirdekçikle oldukça geniş bir çekirdeğe sahipti. Çekirdek zarına yakın kromatin yoğunlaşması görülebiliyordu. Çekirdek çevresindeki sitoplazma (perikaryon) paralel kaba endoplazma retikulumu keseleri ve aradaki sitoplazmik matrikste poliribozom demetleri içeriyordu. Mitokondriyon ve Golgi kompleksleri de



Şekil1. Kontrol grubunun elektronmikrografı. İnce endotel hücreleri tabakası ince bir bazal membranla çevrili. Uranil Asetat-kurşun sırat. Bar: 2.60 μm

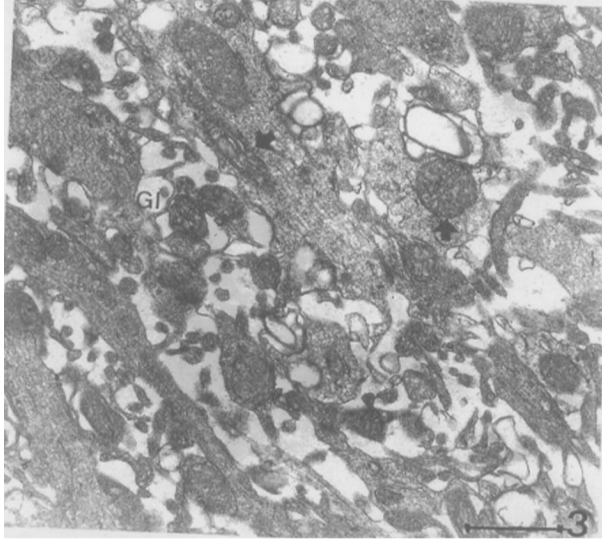
yaygın olarak gözleniyordu. Mitokondriyonlar küçüktü, oldukça homojen dağılımıydı ve yoğun matriks içine giren birkaç kristayla şekilleri yuvarlaklıktan uzamışa değişiyordu. Sitoplazmada mikrotubuller ve nörofilamanlar boldu. Enine kesitte hemen sinir hücresi gövdesi dışında pekçok sinir lifi görülebiliyordu (Şekil 2).



Şekil2. Kontrol grubunun elektronmikrografı. Sinir hücresi çekirdeği (N), mitokondriyonlar (kalın oklar), granüllü endoplazma retikulumu (ince oklar). Uranil Asetat-kurşun sırat. Bar: 2.01 μm

Sinir hücreleri arasında aksonlar, nöroglial elementler ve kan damarları doluydu. Bu bölgelerde aksonlar genellikle miyelin kılıftan yoksundu. İnce yapı incelemelerinde sinir hücrelerinin akson ve dendritleri ve glia hücrelerinin uzantıları fazla miktarda dallanma gösteriyordu. Aksoplazmada mikrotubullerin

Uzunlamasına görüntüleri nörofilamanlar, uzamış mitokondriyonlar ve veziküller görülüyordu (Şekil 3).



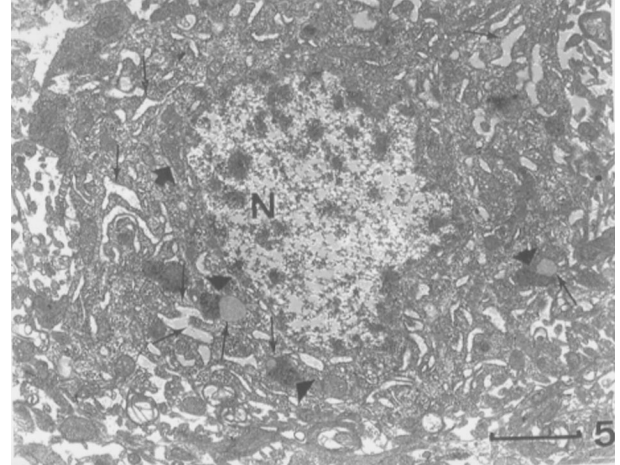
Şekil3. Kontrol grubunun elektronmikrografı. Sinir hücresi uzantıları ve nöroglial elementlerin ağ şeklinde ultra yapısal görünümü. Glial uzantılar (Gf), mitokondriyonlar (ok başı). Uranil Asetat-kurşun sitrat. Bar: 0.93 µm

Nikotin grubunda, kan damarları bir endotel tabakası ve bazal membranla döşeliydi. Endotel sitoplazması hafif derecede kalınlaşmaya sahipti ve hücrenin üst yüzeyinde düzensiz mikrovilluslara benzer uzantılar vardı. Bazı endotel hücrelerinde sitoplazmada dejenerasyon gözlemlendi. Bazal membranın kalınlığı ve yoğunluğu bölgeden bölgeye değişiyordu (Şekil 4).



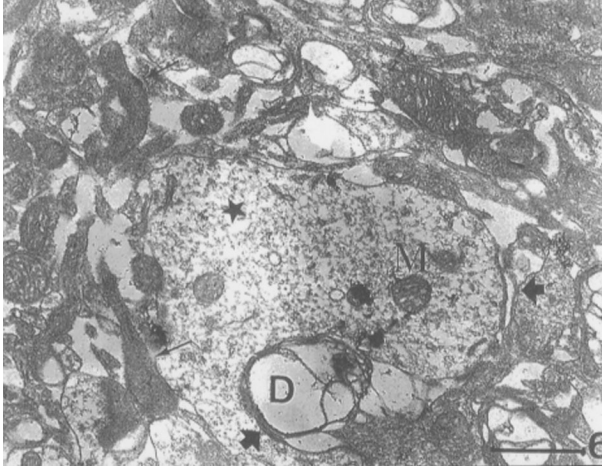
Şekil4. Nikotin grubunun elektronmikrografı. Beyin korteksinden bir damarın enine kesiti. Yüzey düzensizlikleri, mikrovillus benzeri uzantılar (ince ok) ve endotelial hücrenin yoğun lamellar materyalini içeren sitoplazmik dejenerasyonlar(*) ve kalınlaşmış bazal membran (kalın ok) görülmektedir. Uranil Asetat-kurşun sitrat. Bar: 2.01 µm

Sinir hücresi gövdesinde soluk görünen büyük bir çekirdek gözleniyordu. Kromatin materyali fazla yoğun değildi ancak çekirdek zarının iç yüzünde küçük heterokromatin kümeleri gösteriyordu. Çekirdek şekli düzensizdi. Granüllü endoplazma retikulumunda ribozomların degranulasyonu ve sitoplazmik şişmesi gözlemlendi. Yassılaştırmış sisternalar bazı yerlerde düzgün olmakla beraber bazı yerlerde genişlemişti ve düzensizdi. Ribozomlar genelde serbestti ve sitoplazmanın bütününde ve sisternalar arasında dağılmıştı. Golgi kompleksi belirgindi. Artmış sayıda lipit damlacıkları görüldü. Orta düzeyde yoğun materyal içeren veya heterojen içeriğe sahip lizozomlar perikaryonda çok sayıda vardı. Mitokondriyonlar bol miktarda krista içeriyordu, bazıları bozulmuştu, orta ve yüksek yoğunlukta matriksli az miktarda pekçok normal görünümlü mitokondri de gözleniyordu. Mitokondriyonlar ile granüllü endoplazma retikulumu yakın olarak gözlemlendi (Şekil 5).



Şekil5. Nikotin grubunun elektronmikrografı. Nekroz ve apoptozis özellikleri gösteren sinir hücresi. Sinir hücresi nükleusu (N), mitokondriyonlar (kalın oklar), genişlemiş granüllü endoplazma retikulumu (ince oklar) lizozomlarla yakından ilişkili lipit damlacıkları (ok başları). Uranil Asetat-kurşun sitrat. Bar: 2.01 µm

Nikotine maruz sinir hücrelerinde normal sinir hücrelerindeki nörofilamanlardan farklı olarak daha yoğun nörofilaman izleniyordu. Sinaps bölgelerinde nörofilamanlar, nörotübüller ve mitokondriyonları içeren postsinaptik sitoplazma iyi korunmuşken sonlanma ayağındaki mitokondriyonlar ve ipliksi ve tanecik içerikli görünümüyle düzensizdi (Şekil 6).



Şekil6. Nikotin grubunun elektronmikrografı. Yoğun matriksli mitokondriyonlar sinir hücrelerinde dejeneratif değişiklikleri temsil etmektedir (ince ok). Dilate terminal uzantı, amorf matriks (yıldız), dentritik tomurcuk (D), pre ve postsinaptik membranlar (kalın oklar), mitokondriyon (M). Bar: 0.93 µm

Tartışma ve sonuç

Nikotin in vivo kan beyin bariyeri geçirgenliğini artırır ve serebral mikrovasküler sıkı bağlantı kompleksi proteinlerinin yapısını bozar. Nikotin organizmaya değişik yollardan ve değişen miktarlarda verildikten ve kan beyin bariyerini geçtikten sonra erişkin beyninde hem olumlu hem de olumsuz etkiler oluşturmaktadır (14). Siniri sistemine olumsuz bir etki olarak örnek verilirse, nikotin uygulanmasından sonra hipofiz nöral lobunda nörosekretuar granüllerin azaldığı ortaya çıkarılmıştır. Nikotin uygulamasından sonra bu bezin hormon içerikleri ve ince yapısı arasında kesin paralellik gösterilmiştir (3). Halbuki nikotinin faydalı görüldüğü çalışmalarda mevcuttur, kronik nikotin uygulaması frontoparietal kortekste “Sinir Geliştirme Faktörü” benzeri immunoreaktiviteyi ve telensefalonda “Basit Fibroblast Büyüme Faktörü”nü arttırmış ve Alzheimer’lı hastaların tedavisinde uygulama alanı bulmuştur (15-19) Kronik nikotin verilmesi hücre iskeletinde farklı organizasyonlar gösterir ve azalmış aksonal transporta neden olur (5) Bu çalışmamızda izlenen sinaps bölgelerinde azalmış mitokondriyon popülasyonu paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda, nikotine maruz hayvanların sinir hücreleri sitoplazmalarında metabolik aktivitelerinin deprese olmasından sorumlu olabilecek lipit benzeri inklüzyon cisimleri ve mitokondriyon matriks ve kristallerinde değişiklikler gözlemlendi. Nikotine kronik maruziyet uzun süreli biyokimyasal değişiklikleri indükleyebilir. Nörofilaman proteinlerinde nikotinle indüklenmiş etkiler kronik kokain, etanol ve morfin

için tanımlanmış etkilere benzerlik göstermekte olduğu belirtilmiştir (7). Elektrofizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik araştırmalar kemiricilerde bu benzerlikleri onayladığı belirlenmiştir (20,21). Akson sitoplazmasının ince yapısının analizi nörofibril protein modifikasyonunun sadece nörofibrilin kalitatif değişikliği olmadığını fakat aynı zamanda fibril demeti kompozisyonunda da olabileceği gösterilmiştir (22). Nörofilamanlarda bir artış dejeneratif bir değişikliktir ve endojen ve ekzojen faktörler sorumlu olabilir (7). Bu çalışmada aksoplazmada filamanların düzensiz birikimi çoğu incelenen kesitlerde gözlemlendi.

Çalışmamızdaki bulguları destekler nitelikte olarak damarsal açıdan, bazı çalışmalarda nikotin verilmesini takiben damarlarda intimada endotel hasarı, mikrovillus formasyonu, trombosit adhezyonu ve bazı hücrelerin ayrışmasından ibaret sınırlı endotel hasarı ayırt edilmiştir (2, 23,24).

Sonuç olarak, bu çalışmada nikotine maruz sıçanların beyin frontal bölgelerinde sinir hücresi sitoplazmasında lipit damlacıkları, düzensiz kristal mitokondriyonlar, genişlemiş ve düzensiz granüllü endoplazma retikulumu, endotel hücrelerinin sitoplazma çıkıntıları, mikrovillus oluşumları ve yüzey düzensizlikleri gibi dejeneratif yapısal değişiklikler gözlemlenmiştir.

Kaynaklar

1. Yıldız D Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* 2004; 43(6): 619-32.
2. D Wang T, Gu Y, Wu G Injury effects of nicotine on isolated rat common carotid artery. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1997; 77(2): 115-8.
3. Maitra SC, Chakraverty K, Shipstone AC, Kar K Ultrastructural changes in the neural lobe of the rat pituitary following nicotine pretreatment. *Exp Clin Endocrinol* 1983; 82(3): 376 – 379.
4. Roy TS, Seidler FJ, Slotkin TA Prenatal nicotine exposure evokes alterations of cell structure in hippocampus and somatosensory cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(1): 124 -133.
5. Sbarbati A, Bunneman B, Cristofori P, Terron A, Chiamulera C, Mergio F, Berati D, Bernardi P, Osculati F Chronic nicotine treatment changes the axonal distribution of 68 kDa neurofilaments in the rat ventral tegmental area. *Euro J Neurosci* 2002; 16:877-882.
6. Meshul CK, Kamel D, Moore C, Kay TS, Krentz L Nicotine alters striatal glutamate function and

- rotations in 6-OHDA-lesioned rats. *Exp Neurol* 2002; 175:257 – 274.
7. Bunneman B, Terron A, Zantedeschi V Chronic nicotine treatment decrease neurofilament immunoreactivity in the rat ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol* 2000; 393:249-253.
 8. Gonzalez CL , Gharbawie OA , Whishaw IQ , Kolb B Nicotine stimulates dendritic arborization in motor cortex and improves concurrent motor skill but impairs subsequent motor learning. *Synapse* 2005; 55(3): 183-191.
 9. Aramakis VB , Hsieh CY , Leslie FM , Metherate R A critical period for nicotine-induced disruption of synaptic development in rat auditory cortex. *J Neurosci* 2000; 20(16): 6106-6116.
 10. Xu Z , Seidler FJ , Ali SF , Slikker W , Slotkin TA Fetal and adolescent nicotine administration effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res* 2001;914(1-2): 166-178.
 11. Roy TS , Sabherwal U Effects of prenatal nicotine exposure on the morphogenesis of somatosensory cortex. *Neurotoxicol Teratol* 1994; 16(4): 411-21.
 12. Uzum G , Diler AS , Bahcekapili N , Tasyurekli M , Ziylan YZ Nicotine improves learning and memory in rats: morphological evidence for acetylcholine involvement. *Int J Neurosci* 2004; 114(9): 1163-1179.
 13. Onal A , Uysal A , Ulker S , Delen Y , Yurtseven ME, Evin A Alterations of brain tissue in fetal rats exposed to nicotine in utero: possible involvement of nitric oxide and catecholamines. *Neurotoxicol Teratol* , 2004; 26(1): 103-12.
 14. Hawkins BT , Abbruscato TJ , Egleton RD , Brown RC , Huber JD , Campos CR , Davis TP Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. *Brain Res* 2004; 1027(1-2): 48-58.
 15. Martınez-Rodrıguez R, Toledano A , Alvarez MI, Turıgano L, Colman O, Rosıos P, Gımez de Segura I , De Miguel E Chronic nicotine administration increases NGF-like immunoreactivity in frontoparietal cerebral cortex. *J Neurosci Res* 2003; 73(5): 708-716.
 16. Cormier A , Morin C , Zini R, Tillement JP, Lagrue G In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation. *Brain Res* 2001; 900(1): 72-79.
 17. Martinez-Rodriguez R, Toledano A , Alvarez MI , Turiogano L , Colman O , Rosios P , , Gımez de Segura I , Chronic nicotine administration increases 716.
 18. Salminen O , Seppı T , Gıddnı H , Ahtee L The effects of acute nicotine on the metabolism of dopamine and the expression of Fos protein in striatal and limbic brain areas of rats during chronic nicotine infusion and its withdrawal. *J Neurosci* 1999; 19(18): 8145-8151.
 19. Belluardo N , Blum M , Mudo G , Andbjør B , Fuxe K. Acute intermittent nicotine treatment produces regional increases of basic fibroblast growth factor messenger RNA and protein in the tel- and diencephalon of the rat. *Neuroscience* 1998; Apr;83(3):723-40.
 20. Altman J, Everitt BJ, Glautier S, Morkou A, Nutt B, Oretti R, Phillips GD The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. *Psychopharmacol* 1996; 125:285-345.
 21. Kreek MJ, Koob GF Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 1998; 51:23-47.
 22. Xu Z, Dong DL, Cleveland DW Neuronal intermediate filaments: new progress on an old subject. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4:655-661.
 23. Zimmerman M, McGeachie J, The effect of nicotine on aortic endothelium. A quantitative ultrastructural study. *Atherosclerosis* 1987; 63(1): 33-41.
 24. Cucina A , Sapienza P, Borrelli V , Corvino V , Foresi G , Randone B , Cavallaro A , Santoro-D'Angelo L Nicotine reorganizes cytoskeleton of vascular endothelial cell through platelet-derived growth factor BB. *J Surg Res* 2000; 92(2): 233-238.