

MK-801 Verilen Ratların Cerebellumun'da Makromoleküler Oksidasyon ve Cape'nin Koruyucu Etkisi

The Macromoleculer Oxidation in Cerebellum of Rat Exposed To MK-801 and The Protective Effect of Cape

Birsen ÖZYURT¹, Hüseyin ÖZYURT², Fatih EKİCİ³,
Hasan ERDOĞAN³, Mustafa SARSILMAZ⁴

¹ Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi AD. Tokat,

² Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD. Tokat,

³ Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikoloji AD. Tokat,

⁴ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi AD., Elazığ.

ÖZET: Bu çalışmanın amacı MK-801 ile oluşan nörotoksistide oksidatif stresin etkisini incelemek, oksidatif stresin önlenmesi ile prognozun düzelebileceğinin gösterilmesidir. MK-801 en nörotoksik NMDA reseptör antagonistlerinden biridir. Wistar Albino ratlar 3 gruba ayrıldı: 1.grup: Kontrol, 2. grup: MK-80:1, 3. grup: MK-801+CAPE. MK-801 beş gün intraperitoneal verildi. Tedavi grubuna MK-801'e maruzken CAPE verildi. Kontrol grubuna aynı sürede serum fizyolojik intraperitoneal verildi. 7 gün sonra ratlar dekapitasyonla öldürüldü. Serebellumları biyokimyasal analizler için çıkarıldı. Oksidatif stres parametresi olan Nitrik oksit (NO) yanı sıra Malondialdehit (MDA) ve Protein karbonil (PC) seviyeleri kontrol ile karşılaştırıldığında MK-801 grubu serebellumunda anlamlı artmıştı. CAPE ile tedavi edilen grupta NO, MDA ve PC seviyesi MK-801 grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı azaldı. Bu çalışmanın sonuçları serebellumda MK-801 ile oluşan nörotoksistenin patogenesisinde oksidatif stresin önemli rolü olduğunu ortaya koydu. Bu deneysel çalışma aynı zamanda MK-801 ile oluşan nörotoksistite üzerine CAPE'nin koruyucu etkisi olabileceği yönünde bazı deliller sağlar.

Anahtar Kelimeler: MK-801, CAPE, MDA, PC, NO

ABSTRACT: The aims of this study were to investigate the contribution effect of oxidative stress in MK-801 induced neurotoxicity, and to show that prevention of oxidative stress may improve prognosis. MK-801 was shown to be one of the most neurotoxic NMDA receptor antagonists. Wistar Albino rats were divided into three groups: 1. group: control group, 2. group: MK-801, 3. group: MK-801+CAPE group. MK-801 was given intraperitoneally for five days. CAPE was given to the treatment group while exposed MK-801. In control group, saline was given intraperitoneally at the same time. After 7 days, rats were killed by decapitation. Cerebellums were removed for biochemical analyses. Malondialdehyde, protein carbonyl, as well as nitric oxide levels as oxidative parameters, levels was found to be increased significantly in cerebellum of MK-801 group compared to control group. In CAPE treated rats, cerebellum tissue malondialdehyde, protein carbonyl, nitric oxide levels were significantly decreased when compared to MK-801 groups. The results of this study revealed that oxidative stress in cerebellum may play an important role in the pathogenesis of MK-801-induced neuronal toxicity. This experimental study also provides some evidences for the protective effects of CAPE on MK-801-induced changes in cerebellum.

Key Words: MK-801, CAPE, MDA, PC, NO

GİRİŞ

Son yıllarda, NMDA (N-metil D-aspartat) glutamat reseptör sisteminin şizofrenide potansiyel rolü olduğuna yönelik artan çalışmalar mevcuttur. 1950'li yıllarda disosiyatif anestetik olarak kullanılan fensiklidin'in (PCP) insanlarda şizofreni benzeri

psikotik semptomlara neden olduğu görülmüştür. Klinikte PCP ve diğer non-kompetitif reseptör antagonistlerinin sağlıklı gönüllülerde denenmesi, akut şizofreniden ayrılamayan, negatif semptomlarla, düşünce bozukluğu ve hallüsinasyonların olduğu psikoz tablosunu oluşturmuştur. Bu gözlemler şizofreni çalışmaları için ilginç bir ilaç modeli olarak PCP deneysel psikoz modelinin geliştirilmesine yol açmıştır (1). NMDA blokajı yapan diğer ilaçlarla ardışık yapılan çalışmalar akut psikotik reaksiyonları tetikler ve bu nedenle NMDA glutamat reseptör fonksiyonundaki bozukluğun şizofreni patofizyolojisinde model olabileceği görüldü. NMDA reseptör blokajının sonucu serebral kortekste eksitator

nörotransmitterlerin fazla salınımı ve postsinaptik nöronların ardışık stimülasyonu NMDA reseptör hipofonksiyon (NMDARHipo) durumunu oluştura- cağı ve görülen davranış değişikliklerini açıklayabi- leceği belirtildi (2).

NMDA antagonistlerinin uzun bir listesinin PCP psikozuna benzer şekilde insanda kusursuz psikotik reaksiyonu tetiklediği test edilmiştir (1). Uzamış NMDARHipo durumu irreversible dejene- rasyona ve çoğu kortikolimbik beyin nöronlarının ölümüne sebep olur (3). Tahminen nöronlardaki bu hiperstimülasyon psikotik semptom oluşmasına yar- dımcı olur. Böylelikle hayvan modelleri, NMDARHipo hiperstimülasyonu ve nöron zedelen- mesini önlemede farmakolojik yaklaşımlar için fırsat vermektedir (1).

NMDA reseptörleri, PCP ve MK-801 (dizocilpine) [(5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro- 5H-dibenzo (a,d)-cyclohepten-5, 10-imine hydrogen maleate)] tarafından inhibe edilmektedir (4,5). PCP ya da MK-801'in sistemik ya da lokal verilmesi, mezokortikal ve mezolimbik dopamin nöronlarında ciddi bozukluğa sebep olmuş, davranış değerlendirmelerinde ise kaçınma cevapları, lokomotor aktivasyon, ataksi ve stereotipik davranışlarda anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir (6,7). Andine ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, psikoz modeli olarak ratlarda MK-801 ile oluşan davranış değişiklikleri, 1100 Sprague Dawley cinsi rat üzerinde doz, yaş, cinsiyet farklılıkları ile gaz kromatografik metoduyla MK-801'in plazma ve beyin analizleri yapılarak tespit edilmiştir. Yine MK-801 ile psikoz oluşturulan gruplara verilen nöroleptiklerin insandaki antipsikotik etkilerine korele olarak oluşan davranışları bloke ettiği görülmüştür (7). Böylelikle yeni ve daha iyi antipsikotik ajanların denenmesi amacıyla psikoz modeli olabileceğine karar verilmiştir. Davranış çalışmalarında koordineli veya koordineli olmayan lokomotor aktivite artışı, iki ayak üzerine kalkma, havayı koklama, baş sallama, kaşınma, bir alandan öbür alana geçiş, kendi etrafında dönme, düşme, yuvarlanma, hayvanların kendine çeki düzen vermelerinde eksiklik, ataksik davranışlar tespit edilmiş ve şizofreni modeli olarak kullanılmıştır (8,9,10). Sıçan serebellum ve beyin sapında, PCP ve MK-801 ile oluş- an Fos immünoreaktivitesine bakılan bir çalışmada bu ilaçların serebellar eksitasyon meydana getirdiği gö- rülmüştür (11).

Biz yaptığımız bu çalışmada, MK-801 verilen ratlarda görülen ataksik davranışın temelinde oksidatif hasarı tespit etmeyi ve antioksidan bir madde olan Kaffeik asit fenetil ester (CAPE)'nin oksidatif parametreler üzerine düzeltici rolü olup olmadığını saptamayı planladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada yerel etik kurul onayı alınarak, 21 Wistar Albino rat, rastgele seçilen 3 gruba ayrıldı.

1. grup: %0,9'luk serum fizyolojik intraperitoneal (IP) yolla günde bir kez (1x1) 5 gün uygulandı.

2. grup: 0.5 mg/kg/gün dozunda MK-801 1x1 kez IP olarak 5 gün uygulandı.

3. grup: 10 µmol/kg dozunda CAPE 1x1 kez IP olarak 6 gün uygulandı. MK-801'de uygulanan bu ratlara CAPE tedavisi 1 gün önce uygulanmaya baş- landı. Deneyin 7. gününde tüm ratlar dekapite edile- rek beyin dokuları çıkartıldı ve serebellumları ayrıla- rak biyokimyasal işlemler için donduruldu. Serebellum dokusunda NO, MDA ve PC düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

Nitrik oksit miktarının tayini: Vücutta üreti- len NO saniyeler içinde okside olarak önce azot dioksit (NO₂) sonra NO₂⁻ ve NO₃⁻ dönüşür. Doku homojenatındaki spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelmesini önlemek için homojenatları önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat konsan- rasyonları Griess reaksiyonu ile belirlendi (12). To- tal nitrit (nitrit+nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirildi. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmi- yum granülleri deproteinize örnek süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Sulfanilamid ve buna bağlı N- naphthylethylene diamin (NDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile indirek NO ölçümü yapıldı. Sonuçlar µmol/g yaş doku ola- rak ifade edildi.

Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) miktarının tayini: Esterbauer ve Cheeseman'nin metodu ile çalışıldı (13). Asidik or- tamdaki tiyobarbitürik asit ile 90-95°C'de reaksiyo- na giren malondialdehit (MDA) ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana getirir. Onbeş da- kika sonra hızla soğutulan örneklerin absorbansları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Sonuç- lar nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

Protein karbonil (PC) miktarı tayini: Metod; karbonil grubunun 2,4-dinitrofenil hidrazin ile reak- siyona girerek 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturması prensibine dayanır (14,15). 2,4-dinitrofenilhidrazin oksidasyona maruz kalmış proteinlerde açığa çıkan karbonil gruplarının gösterilmesinde kullanılan ajandır. 2M HCl içerisinde hazırlanan 2,4- dinitrofenilhidrazin solüsyonunun homojenattaki

karbonil içeriği ile reaksiyona girmesi sağlandı, etanol/etil asetat karışımı ile yıkanan çökelti bir sonraki aşamada 100 mM NaOH çözeltisi içerisinde çözülmesinden sonra 360 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Sonuçlar; nmol/mg protein olarak ifade edildi.

İstatistik: Sonuçlar Windows uyumlu SPSS programı ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Tüm parametrelerde normal dağılım göstermesinden dolayı parametrik testler kullanıldı. Parametrik testlerden One-Way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD uygulandı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. p değeri 0.05 den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

MK-801 verilmesinden sonra biyokimyasal olarak incelenen serebellumda, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA ($p < 0.001$), protein oksidasyonunun göstergesi olan PC (0.045) ve NO ($p < 0.0001$) düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda CAPE'nin bu parametreler üzerinde düzeltici etkisi olduğu ($p < 0.004$ MDA için, $p < 0.0001$ PC için, $p < 0.008$ NO için MK-801 grubu ile karşılaştırıldığında) ve kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir. CAPE verilen grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında CAPE'li grupta PC seviyesinin anlamlı olarak düştüğü görülmüştür ($p < 0.003$).

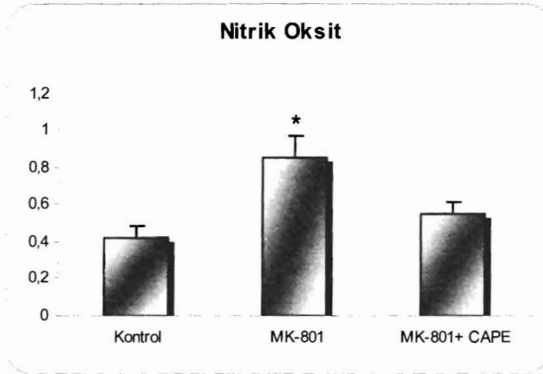
TARTIŞMA

Reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) artması ve/veya antioksidan savunma sisteminin azalması ile oluşan oksidatif stres, membran fosfolipidleri özellikle esansiyel çoklu doymamış yağ asitlerinin esterleşmesine, membran fosfolipidlerinin peroksidasyonuna, protein ve DNA hasarına sebep olmaktadır (16). Sinir hücreleri ve beyin dokusu oksidatif hasara vücudun diğer dokularından daha fazla yatkındır. Beyinde oksidatif stresin ROS atağının sebep olduğu akut dönemdeki en önemli olay lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan yıkım ürünleri olan MDA, tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girebilen bileşikler aracılığı ile ölçülmektedir. Bu bileşiklerin ortamda bulunması oksidatif stres olduğu öngörülmektedir (17).

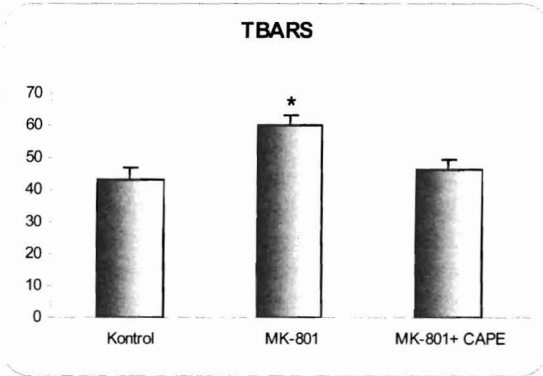
Şizofrenide oksidatif stresin araştırıldığı klinik çalışmalarda, oksidatif hasarı göstermede önemli bir parametre olarak MDA düzeyinin artmış olduğu saptanmıştır (16,18,19). Bizim bu çalışmamızda, MK-801 verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmektedir. Yaptığımız literatür taramalarında, deneysel hayvan psikoz modelinde oksidatif hasarın araştırıldığı az sayıda makale vardır (20). Bu çalışma ile sonuçta lipid peroksidasyonunun önemli bir bulgusu olan MDA düzeylerinin deneysel şizofreni modelinde arttığı, CAPE verilen grupta ise azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Yine son yıllarda lipidlerin peroksidatif son yıkım ürünü olan MDA dışında, proteinlerin oksidatif hasarı sonucu açığa çıkan protein karbonil ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Ancak oksidatif hasarı saptamak için kullanılan bu markırlar şizofreniye özgü olmayıp bütün serbest radikal hasarının incelendiği çalışmalarda parametre olarak kullanılmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada ise psikoz grubuna ait beyin dokusunda oksidatif hasarın göstergesi olarak MDA düzeyindeki anlamlı değişikliklerle beraber protein karbonil düzeyi ve nitrik oksit seviyesinin de kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu tespit edilmiştir. NO ise L-arginin'den NO sentaz enzimi aracılığıyla sentezlenir. NO biyolojik nöral messenger molekülü olarak bilinmesi yanında santral sinir sisteminde toksik reaktif serbest radikal olarak da bilinmektedir. Peroksinitrit ve onun ileri ürünleri hücre hasarına sebep olmaktadır. Şizofreni hastalarında yapılan çalışmalarda NO seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (21).

CAPE flavonoid yapısında propolisin aktif bir komponentidir. CAPE'nin lipid peroksidasyonunu baskıladığı, antioksidan aktivite gösterdiği ve lipooksijenaz aktiviteyi inhibe ettiği rapor edilmiştir (22). CAPE ile ilgili yapılan çalışmalarda nöroprotektif etkisinden bahsedilmektedir (23). Bu çalışmada da görülmüştür ki CAPE, MK-801 ile oluşan oksidatif hasarı önlemiş ve oksidatif stres parametrelerini kontrol grubu seviyelerine çekebilmiştir.

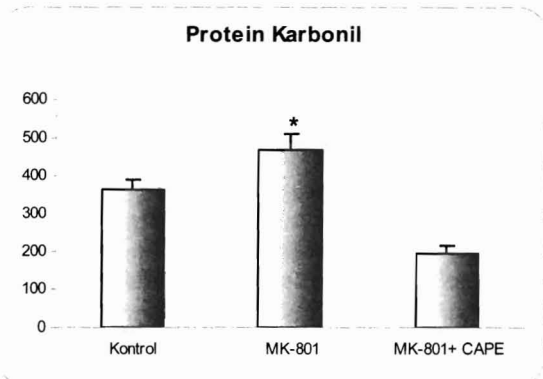
Bu çalışma ile MK-801 ile oluşturulan serebellum hasarında oksidatif stresin katkısı olabileceği ortaya konmuştur. Bu konuda ileri başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Aynı zamanda bir antioksidan olan CAPE'nin düzeltici rolü bu görüşü desteklemektedir.



Grafik 1: Rat serebellumunda; Kontrol, MK-801 ve MK-801+CAPE grubundaki NO seviyeleri. * $P < 0.008$ MK-801 grubu MK-801+CAPE grubu ile karşılaştırıldığında



Grafik 2: Rat serebellumunda; Kontrol, MK-801 ve MK-801+CAPE grubundaki TBARS seviyeleri. * $p < 0.004$ MK-801 grubu MK-801+CAPE grubu ile karşılaştırıldığında



Grafik 3: Rat serebellumunda; Kontrol, MK-801 ve MK-801+CAPE grubundaki PC seviyeleri. * $p < 0.0001$ MK-801 grubu MK-801+CAPE grubu ile karşılaştırıldığında

KAYNAKLAR

1. Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. J Psychiatr Res, 1999; 33:523-33.
2. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. Am J Psychiatry, 1991; 148:1301-8.
3. Corso TD, Sesma MA, Tenkova TI, Der TC, Wozniak DF, Farber NB, Olney JW. Multifocal brain damage induced by phencyclidine is augmented by pilocarpine. Brain Res, 1997; 752:1-14.
4. Haring R, Pellegrini-Giampietro DE, Zukin SR, Zukin RS, Scheideler MA. High efficiency reconstitution of a phencyclidine/MK-801 receptor binding site solubilized from rat forebrain membranes. Mol Pharmacol. 1991; 40:666-73.
5. Ferrer-Montiel AV, Sun W, Montal M. Molecular design of the N-methyl-D-aspartate receptor binding site for phencyclidine and dizolcipine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:8021-5.
6. Hoffman DC. Typical and atypical neuroleptics antagonize MK-801-induced locomotion and stereotypy in rats. J Neural Transm Gen Sect. 1992;89:1-10.
7. Andine P, Widermark N, Axelsson R et al.. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of pschosis. JPET. 1999;290: 1393-1408.
8. Mastropaolo J, Rosse RB, Deutsch SI. Anabesine, a selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, antagonizes MK-801-elicited mouse popping behavior, an animal model of schizophrenia. Behav Brain Res. 2004. 31;153:419-22.
9. Deutsch SI, Rosse RB, Billingslea EN, Bellack AS, Mastropaolo J. Modulation of MK-801-elicited mouse popping behavior by galantamine is complex and dose-dependent. Life Sci. 2003. 7318:2355-61.
10. Rung JP, Carlsson A, Ryden Markinhuhta K, Carlsson ML. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2005. 29:827-32.
11. Nakki R, Sharp F., Sagar SM. FOS expression in the brainstem and cerebellum following phencyclidine and MK801. J Neurosci Res. 1996; 43:203-12.
12. Cortas, N. K., Wakid, N. W.:Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem 1990;36:1440-1443.
13. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In Methods in

- Enzymology, V 186, Oxygen radicals in biological systems edited by Packer L, Glazer AN. Academic Press, California, 1990, pp 407-421.
14. Packer L, Glazer NA. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins, Methods in Enzymology. California. 1990;186:464-479.
 15. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Rondall R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951;183:265-275.
 16. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2001; 25: 463-93.
 17. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. Biol Psychiatry. 1998; 43:674-9.
 18. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochemistry. 1999; 32: 595-603.
 19. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H, Savas HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2002; 26:995-1005.
 20. Ozyurt B, Sarsilmaz M, Akpolat N, Ozyurt H, Akyol O, Herken H, Kus I. The protective effects of omega-3 fatty acids against MK-801-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rat. Neurochem Int. 2007; 50:196-202.
 21. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Akyol O. Red blood cell nitric oxide levels in patients with schizophrenia. Schizophr Res. 2001; 52:289-90.
 22. Özyurt B, Güleç M, Özyurt H, Ekici F, Atış Ö, Akbaş A. The effect of antioxidant caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on some enzyme activities in cisplatin-induced neurotoxicity in rats. Eur J Gen Med. 2006; 3:167-172.
 23. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxigenase inhibitor with antioxidant properties. FEBS Lett. 1993; 329:21-24.