

# Streptozotosin ile Oluşturulan Deneysel Alzheimer Modelinde Agmatinin Etkilerinin Araştırılması

Müge Şirvancı Yalabık<sup>1</sup>, Özer Şehirli<sup>1</sup>, Tijen Utkan<sup>2</sup>, Feyza Arıcıoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı ve Psikofarmakoloji Araştırma Birimi, İstanbul - Türkiye

<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Kocaeli - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Feyza Arıcıoğlu

Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı ve Psikofarmakoloji Araştırma Birimi, Tıbbiye Cd. No: 49 Haydarpaşa, İstanbul - Türkiye

Elektronik posta adresi / E-mail address: feyza.aricioğlu@gmail.com

Kabul tarihi / Date of acceptance: 15 Haziran 2013 / June 15, 2013

## ÖZET

Streptozotosin ile oluşturulan deneysel alzheimer modelinde agmatinin etkilerinin araştırılması

**Amaç:** Alzheimer geri dönüşümsüz ve ilerleyici hafıza kaybını takiben tam demansla karakterize nörodejenaratif bir bozukluktur. Yaşlanmayla insanlarda en sık görülen demans formudur. Bu çalışmada sıçanlarda intraserebroventriküler (i.c.v) streptozotosin (STZ) ile oluşturulmuş Alzheimer modelinde agmatinin (Agm) öğrenme ve bellek fonksiyonlarına etkisi ve bu etkinin oksidatif hasar açısından mekanizması araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanılmış, kontrol, sham opere, STZ ve STZ+Agm olmak üzere 4 gruba ayrılmışlardır. Alzheimer modeli oluşturmak için stereotaksik yöntem ile sıçanlara i.c.v olarak bilateral STZ 3 mg/kg dozda 48 saat arayla 2 defa uygulanmış ve ilk uygulamayı takiben 14 gün beklenmiştir. On beşinci günde pasif sakinme tesisi ile öğrenme ve bellek fonksiyonları değerlendirilmiştir. Öğrenmesinin bozulduğu gösterilen sıçanlara 7 gün boyunca günde 2 defa 40mg/kg dozda Agm intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmış ve takiben aynı testler tekrarlanmıştır. Tüm gruplar davranış testleri bittikten sonra (21. günde) dekapite edilerek beyin dokuları toplanmış ve oksidatif hasarı değerlendirmek için malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH) seviyeleri ve myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümleri yapılmıştır.

**Bulgular:** İntraserebroventriküler STZ ile oluşturulmuş alzheimer modelinde kognitif fonksiyonlarında belirgin bozulma olduğu ve bu bozulmaya oksidatif hasarın eşlik ettiği gösterilmiştir. Agmatin tedavisi ile hem kognitif fonksiyon hem de oksidatif hasarı önlemiştir.

**Sonuç:** Bu bulgulara dayanarak endojen bir madde olan agmatinin alzheimer etyopatogenezinde önemli bir düzenleyici olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Agmatin, Alzheimer, intraserebroventriküler streptozotosin, oksidatif hasar, öğrenme ve bellek

## ABSTRACT

Effects of agmatine in streptozotocine induced experimental alzheimer model

**Objectives:** Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of memory followed by complete dementia. Furthermore it is the commonest form of dementia affecting older people. In this study we investigated the role of agmatine (Agm) on learning and memory and on parameters of oxidative stress in intracerebroventricular (i.c.v) streptozotocin (STZ) model of Alzheimer's disease in rats.

**Materials and Methods:** We grouped rats as: naive control, sham operated, STZ and STZ+agmatine. Rats were injected bilaterally i.c.v STZ (3mg/kg) using stereotaxic frame on day 1 and 3 to induce experimental Alzheimer's disease. After 14 days from 1<sup>st</sup> STZ injection, learning and memory impairment of rats were observed in passive avoidance. Following this test, agmatine administered intraperitoneal (i.p.) 40mg/kg twice daily for 7 days. These animals were again subjected to these behavioral tests after 7 days agmatine treatment. On the 21<sup>st</sup> day after 1<sup>st</sup> STZ injection all groups were sacrificed by decapitation and brain tissues were collected for oxidative stress measurement. Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels and myeloperoxidase (MPO) activity were measured for estimation of oxidative stress.

**Results:** In this study it has been demonstrated that i.c.v STZ in Alzheimer model can cause disorder in cognitive functions and oxidative damage. Agmatine treatment is found to be effective to prevent both cognitive deficits as well as the oxidative damage.

**Conclusion:** According to results of the current study agmatine, as an endogenous molecule, might be an important modulator in alzheimer's etiopathogenesis.

**Keywords:** Agmatine, Alzheimer's disease, intracerebroventricular streptozotocin, oxidative damage, learning and memory

## GİRİŞ

Ülkemiz gibi yaşlı nüfusun arttığı ülkelerde demans önemli bir sağlık problemidir. Alzheimer hastalığı, 65 yaşın üzerindeki insanlarda görülen en yaygın demans nedenidir

(1). Şu anda tahmin edilen Alzheimerli hasta sayısı 26 milyondan fazla iken 2050 yılında bu sayının 100 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (2). Nörodejenaratif bir hastalık olan Alzheimer geri dönüşsüz ve ilerleyicidir. Hafıza kaybı, kognitif fonksiyonlarda zayıflama, günlük aktivite perfor-

manslarında, konuşmada ve görsel-uzaysal algılamada bozukluklarla seyrederek (1). Amiloid beta (A $\beta$ ) plak ve nöro-fibriler yumaklar (NFY) hastalığın en önemli patolojik bulguları olarak kabul edilir (3). Ayrıca oksidatif stres (4,5), enf-lamasyon (6) ve glutamat eksitotoksitesi (7) gibi faktörle-rinde bu nörodejenerasyona katkıda bulunduğu düşünül-mektedir. Günümüzde hastalığın nöropatolojisi hala tam olarak aydınlatılmamıştır ve tedavisinde beklenen sonuç-lar alınamamaktadır. Dolayısıyla Alzheimer patolojisinde rolü olabileceği düşünülen tüm mekanizmalara yönelik yeni tedavi arayışları sürmektedir. Bu kapsamda son yıllarda çok araştırılan moleküllerden biri de nitrik oksit'dir (NO). Nitrik oksit sentazın (NOS) inhibitörleri ile yapılan çalış-malardan ümit verici sonuçlar alınmaktadır. Benzer şekilde eksitotoksiteyi engellemeye yönelik olarak glutamerjik sistem aktivitesinin baskılanmasına yönelik çalışmalarda özellikle N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonistleri ile ali-nan sonuçlar dikkat çekicidir.

Agmatin hem NOS inhibitörü hem de NMDA antago-nistidir ve güçlü antiinflamatuar etki potansiyeline sahip-tir (8). Ayrıca iskemide ve eksitotoksitede nöron kaybını azalttığı (9-12), endojen Agm üretiminin iskemik hasarın-dan sonra 20 kat arttığı gösterilmiştir (13). Agmatinin iske-mik hasar üzerindeki etkisini araştıran çalışmalarda, primer kortikal nöronlardan hazırlanan hücre kültüründe oksijen ve glikoz mahrumiyeti ile oluşturulan hasarı önlediği gös-terilmiştir (14). Ayrıca Agm'in, kalsiyum ile ortaya çıkan hücre ölümünde koruyucu etki göstermezken NMDA ile ortaya çıkan eksitotoksik etkiyi önlediği de gösterilmiştir (15).

Agmatinin öğrenme ve bellek fonksiyonları için önemli olabileceğini düşündüren çalışmalar yayınlanmıştır. Bir tür şartlı uyaran testinde Agm'in öğrenme belleği olumsuz yönde etkileyebileceğini, hatta amnezi oluşturduğunu göstermişlerdir (16). Uzaysal hafızanın değerlendirilmesin-de kullanılan Morris'in su tankı kullanılarak da benzer sonuçlar elde edilmiştir (17). İnhibitör sakınma testi kulla-nılarak Agm'in daha önce iddia edileninin aksine hatırla-mayı kolaylaştırdığı bu etkiyi  $\alpha$ 2 adreseptörler, imidazo-lin ve/veya NMDA reseptörleri ve NO inhibisyonu gibi fark-lı mekanizmalar üzerinden yapabileceği ileri sürülmüştür (18). Yaşlanmaya bağlı olarak hipokampal CA1, CA2/3 ve dentat girus bölgelerinde Agm düzeyleri incelenmiş ve yaşa bağlı olarak CA1 bölgesinde azalırken, CA2/3 ve den-tat girus bölgelerinde arttığı gösterilmiştir. Su tankı, zorun-

lu yüzmeye testi (forced swimming test) ve kafeste tutma modeli kullanılarak Agm'in etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ekzojen olarak verilen Agm'in uzaysal hafıza üzerine etkisi araştırılmıştır. Beynin 10 farklı bölgesinde (Hipokampal CA1, CA2/3, dentat girus, serebellum, vesti-büler nükleus, prefrontal, entorhinal, perirhinal, postrinal ve temporal korteks) Agm düzeyleri incelenmiştir. Bu çalış-manın sonuçlarına göre su tankı yöntemi gibi hayvanın uzaysal hafızasına ihtiyaç duyduğu testlerin uygulanma-sından sonra özellikle hipokampusta (CA1 ve dentat girus), entorhinal korteks ve vestibüler nükleusta Agm düzeyleri-nin anlamlı bir biçimde attığı, bu artışın zorunlu yüzmeye tabi tutulmak veya kafeste bekletilmek ile elde edilmediği gösterilmiştir. Buna göre Agm düzeyleri uzaysal hafıza ile ilişkili bölgelerde arttığını böylece Agm'in uzaysal öğren-me ve bellek proseseleri açısından önemli olduğunu söyle-mişlerdir (19). Bir diğer çalışmada i.c.v olarak infüze edilen Agm ile su tankı, yükseltilmiş artı labirent ve açık alan test-leri yapılmış (20), Agm uygulamasının referans hafıza üzeri-ne bir etkisi olmadan hafızayı güçlendirdiği (working memory) gösterilmiştir (21).

Günümüze dek yapılmış tüm bu çalışmalar Agm'in öğrenme ve bellek fonksiyonlarının düzenlenmesi açı-sından önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle Agm'nin Alzheimer modelinde kognitif fonksiyonlara etki-si ve bu süreçte oksidatif hasara etkisinin araştırılması plan-lanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kimyasal Maddeler

Agmatin sülfat (Sigma) ve STZ (Sigma) serum fizyolojik-te (SF) çözülerek kullanıldı. Agmatin 40 mg/kg i.p., STZ ise 3mg/kg dozda, 10  $\mu$ l hacimde bilateral ve i.c.v. olarak uygu-lanmıştır.

### Deney Hayvanları

Bu çalışmada kullanılan Sprague-Dawley suşu erkek sıçanlar (250-300 g) Marmara Üniversitesi Deney Hayvanı Yetiştirme Ünitesi'nden temin edildi. Deneyler süresince 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngü içerisinde yem ve su alımları serbest bırakılarak, sıcaklığı sabit tutulan (21 $\pm$ 3°C) hayvan saklama odasında, her kafeste operasyon öncesi 4

sıçan, operasyon sonrası toparlanma döneminde (4 gün) tek sıçan olacak şekilde barındırıldı. Tüm deneyler günün aydınlık periyodunda, sessiz ve sıcaklığı 22-24°C olan odada gerçekleştirilmiştir. Çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanı Etik Kurulu tarafından 16.04.2009 tarih ve 10.2009 sayı ile onaylanmıştır.

### **Kullanılan Modeller**

Deneysel alzheimer modelinin oluşturulması için STZ i.c.v olarak bilateral uygulanmıştır.

#### ***Lateral serebral ventriküle kanül yerleştirilmesi***

Deneyden en az 3 gün önce sıçanlar ketamin (50 mg/kg, i.p.) + klorpromazin (1.0 mg/kg, i.p.) anestezisi altındaki hayvanların her iki lateral ventrikülüne kanül takılması amacıyla deney hayvanının kafatası dış kulak yolundan stereotaksi aletine (World Precision Instruments) yerleştirildi. Kafa derisi gözler hizasından esneye kadar kesilip üzerindeki periost sıyrıldı. Takılacak olan kanülün sağlamaştırılması amacı ile kafatasına (delinen noktanın yaklaşık 1 cm uzağına) dışçı turu ile kafatası üç noktadan daha delinerek vidalar yerleştirildi. Koordinatlar stereotaksi atlasına bakılarak (22) tespit edildi. Buna göre bregmadan 0.8 mm kaudal; sagittal sutturdan 1.5 mm lateral ve kafatası yüzeyinden 3.6 mm olacak şekilde sağ ve sol lateral ventrikülün yeri tespit edilerek bir kateter yerleştirildi. Kanülü sabitlemek için, kanülün çevresi akrilik ile sıvandı. Bu sıvama işlemi kafatası üzerine takılı olan vidaları ve kafatasının bir kısmını kapsayacak şekilde çevreye doğru genişletildi. Akrilik çimento kuruyup sertleşinceye kadar beklendi.

Kanül yerleşiminin her deneyden sonra doğrulandı. Bu amaçla deney sonunda lateral serebral ventriküle 200 µl metilen mavisi verildi. Hayvanlar sakrifiye edildi ve beyinleri çıkarıldı. Yerleşimi uygun olmayanlar çalışmaya dahil edilmedi.

#### ***STZ uygulanması***

Stereotaksik cerrahi ile kanüllerin yerleştirilmesini takiben sıçanların kendilerini toparlamaları için 3-4 gün beklendi. Bu süre içerisinde serum fizyolojikle sıçanlara sıvı replasman tedavisi uygulandı. Daha sonra her iki lateral ventriküle 3mg/kg STZ 10µl'lik hacimde Hamilton enjektörü aracılığıyla uygulandı. Aynı dozda STZ ilk uygulamadan 48 saat sonra tekrarlandı ve modelin oluşması için 12 gün beklendi.

#### ***Agmatin uygulaması***

İlk STZ uygulamasını takiben 14 gün sonra hayvanlar önce lokomotor aktivite testine tabi tutuldu ve herhangi bir nörolojik defekt gelişmediğinde emin olundu. Daha sonra sırasıyla Morris'in su tankı ve pasif sakinme testlerine alındı. Öğrenmesinin bozulduğu gösterilen sıçanlara 7 gün boyunca günde 2 defa i.p. olarak 40mg/kg Agm testlerden yarım saat önce olacak şekilde uygulandı. Agmatin uygulamasına davranış testleri süresince de devam edilir.

#### ***İlaç Gruplarının Oluşturulması***

Hayvanlar her grupta 7-12 hayvan olacak şekilde kontrol (sham opere), STZ ve STZ+Agm grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

Sham opere grup: Stereotaksik yöntemle kanüller yerleştirildikten sonra 1. ve 3. günlerde aynı hacimde SF verildi. İlk uygulamayı takiben 14 gün sonra davranış testlerine başlandı. Deney süresince Agm yerine SF uygulandı.

STZ grubu: Stereotaksik yöntemle kanüller yerleştirildikten sonra 1. ve 3. günlerde 3mg/kg STZ uygulandı. İlk STZ uygulamasını takiben 14 gün sonra davranış deneylerine başlandı. Deney süresince Agm yerine SF uygulandı.

STZ+Agm grubu: Stereotaksik yöntemle kanüller yerleştirildikten sonra 1. ve 3. günlerde 3mg/kg STZ uygulandı. İlk STZ uygulamasını takiben 14 gün sonra davranış deneylerine başlandı. (21. gün) hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları toplandı.

#### ***Pasif sakinme testi***

Bu testte kullanılan düzenek iki bölmelidir. Bölmelerden biri aydınlık, diğeri karanlıktır ve karanlık bölüm hayvana elektrik şoku uygulanmasına uygun şekilde tasarlanmıştır. Bölmeler otomatik giyotin bir kapı ile birbirinden ayrılmıştır (Ugo Basile, Type-7552, Italy). Sıçan aydınlık bölmeye bırakılır ve bir pedala yardımıyla test başlatılır. Hayvanın ortama alışması için 20 sn lik bir alışma periyodundan sonra giyotin kapı otomatik olarak açılır. Hayvan karanlık tarafa geçtiğinde kapı kapanır ve hayvana 3sn süreyle 0.5 mA ayak şoku verilir. Sıçanın aydınlık olan bölmeden karanlık tarafa geçmesi için geçen süre kaydedilir. Aynı test 24 saat sonra tekrarlanarak hayvanın karanlık bölgeye geçip geçmediğine bakılır. Testin sonlandırılma süresi 300 sn'dir. Bu süre içinde karanlık tarafa geçmezse yani elektrik şoku almaktan kaçınırsa sıçanın öğrenmesinin bozulmadığı kabul edilir (23).

### Kan glukoz düzeylerinin değerlendirilmesi

Sıçanların kan glukoz seviyeleri kuyruklarından alınan kandan glukometre (Accu-Chek active) ile ölçülerek değerlendirildi. Deney süresince hayvanların kan glukozları hiçbir işlem uygulanmadan önce yani 0. günde ve STZ ile öğrenmesinin bozulduğu kabul edildiği 14. günde ölçülerek karşılaştırıldı.

### Oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi

#### Glutatyon Tayini

Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan beyinler serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutuldu, tartıldı. Homojenizatörde (Ika Werk) buz üstünde 150 mM KCl çözeltisiyle %10'luk homojenatı hazırlandı. Dokuda GSH tayini Ellman yöntemine göre yapıldı (24).

#### Malondialdehit Tayini

Malondialdehit tayininde GSH tayini için hazırlanan %10'luk homojenatlar kullanıldı. Dokuda MDA tayini, Beuge yöntemine göre yapıldı (25).

#### Dokuda Myeloperoksidaz Aktivitesi Tayini

Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan beyinler, kan ve çevre artıklarından temizlenmesi için serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutuldu ve ağırlıkları alındı. Beyin dokusu 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6) ile homojenize edildi. %10'luk homojenat hazırlandı. Dokuda MPO tayini Hillegeas yöntemi ile yapıldı (26).

### İstatistiksel Değerlendirme

Alzheimer ile ortaya çıkan davranış değişikliklerinin

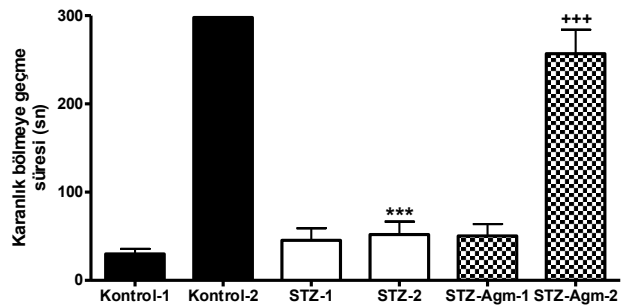
değerlendirilmesi ve biyokimyasal deney sonuçları "ortalama±standart hata" olarak ifade edildi. Verilerin istatistiksel analizinde gruplar arasındaki farklılık gösterilirken tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Gruplar arası farklılıklar "Post-hoc Dunnett testi" uygulanarak incelendi. Tüm istatistik analizlerinde ve şekil çizimlerinde "Prism 4-Graph Pad" istatistik ve grafik yazılım programı kullanıldı. P<0,05'den küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### Pasif Sakınma testi

Bu deneyin sonuçları öğrenmenin sağlandığı birinci gün ve 24 saat sonra hem öğrenme hem de kısa süreli belleğin değerlendirildiği ikinci gün sonuçları şeklinde sunulmuştur.

Birinci gün değerleri kontrol için 30,04±5,778, STZ grubu için 45,43±13,73 ve STZ-Agm grubu için 50,43±13,52 idi. Asıl değerlendirmenin yapıldığı ikinci gün ise kontrol 298,0±0,0, STZ 52,06±14,54 ve STZ-Agm 256,9±27,16 idi (Şekil 1).



**Şekil 1:** Pasif sakınma testinde 1.ve 2.gün sonuçları. Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. \*\*\*, p<0.001 Kontrol grubuna göre. +++, p<0.001 STZ grubuna göre

**Tablo 1:** Kan glukoz değerleri

Gruplar	n	Kan glukoz değerleri (mg/dl)	
		0. gün	14. gün
Kontrol	10	158±10.22	167.56±12.3
STZ	10	138.67±7.27	147.31±10.2
Agm 40 mg/kg	10	165.17±13.01	158.30±11.6
STZ-Agm 40 mg/kg	10	155.00±6.17	160.10±11.8

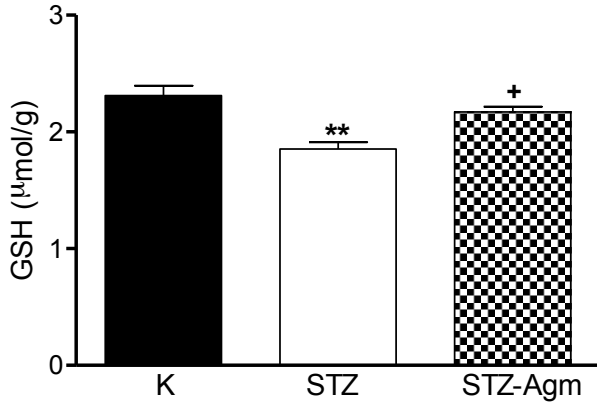
### Kan glukoz düzeylerinin değerlendirilmesinin sonuçları

Kan glukoz düzeyleri hiçbir işlem yapmadan önce ve davranış deneylerinden bir gün önce olmak üzere iki kez ölçülmüştür. Gruplar arası veya zamana bağlı herhangi değişiklik oluşmamıştır (Tablo 1).

### Oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesinin sonuçları

#### Glutasyon Sonuçları

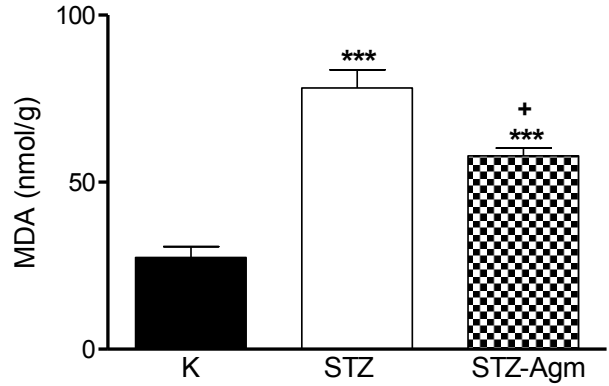
Beyin dokusunda GSH düzeyleri STZ uygulanan grupta  $1.86 \pm 0.04$ , kontrol grubunda  $2.31 \pm 0.08$  idi. Dolayısıyla STZ uygulaması GSH düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde düşürmüştür ( $p < 0,01$ ). Agm uygulaması ile GSH düzeyleri  $2.17 \pm 0.05$ 'ye gerilemiştir ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 2).



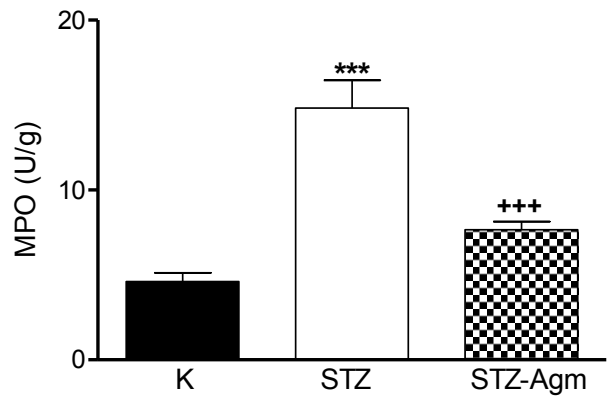
**Şekil 2:** Beyin dokusunda GSH düzeyleri. Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. \*\*,  $p < 0,01$  Kontrol grubuna göre. +,  $p < 0,01$  STZ grubuna göre

#### Malondialdehit Sonuçları

Beyin dokusunda MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubunda  $27.50 \pm 3.18$  dir. STZ uygulanan grupta bu değer  $78.18 \pm 5.45$  bulunmuştur ve kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). STZ ile oluşan bu artış Agm uygulaması ile  $57.88 \pm 2.35$ 'e düşmesine neden olmuştur ( $p < 0,05$ ). MDA düzeyindeki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen kontrol grubuna göre yüksektir (Şekil 3).



**Şekil 3:** Beyin dokusunda MDA düzeyleri. Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. \*\*\*,  $p < 0,001$  Kontrol grubuna göre. +,  $p < 0,05$  STZ grubuna göre



**Şekil 4:** Beyin dokusunda MPO aktivitesi. Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. \*,  $p < 0,05$  Kontrol grubuna göre. ++,  $p < 0,01$  STZ grubuna göre

#### Myeloperoksidaz Aktivitesi Sonuçları

MPO aktivitesi kontrol grubunda  $4.61 \pm 0.51$ , STZ uygulanan grupta  $14.83 \pm 1.63$ 'dir. STZ uygulanması ile MPO aktivitesi istatistiksel olarak ileri derecede artmış ( $p < 0,001$ ) ve bu Agm tedavisi ile  $7.67 \pm 0.48$ 'e inmiştir. Dolayısıyla Agm tedavisi STZ'ye bağlı MPO aktivite artışını istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir biçimde baskılamıştır ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4).

## TARTIŞMA

İntraserebroventriküler STZ ile oluşturulmuş Alzheimer modelinde öğrenme ve bellek fonksiyonlarında belirgin bozulma olduğu ve bu bozulmaya oksidatif hasarın eşlik ettiği gösterilmiştir. Agmatin tedavisinin hem kognitif fonksiyon testlerinde hem de paralel olarak oksidatif hasarda azalmaya neden

olarak bozulmuş fonksiyonları düzeltbildiği gösterilmiştir.

Aslında Agm'in öğrenme ve bellek fonksiyonları için önemli olabileceğini düşündüren ilk çalışma 2000 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada bir tür şartlı uyaran testi (contextual conditioned stimuli) kullanılarak sistemik olarak uygulanan Agm'in öğrenme ve belleği olumsuz yönde etkileyebileceğini, hatta amnezi oluşturduğunu göstermişlerdir (16). Daha sonra hem aynı testi hem de uzaysal hafızanın değerlendirilmesinde kullanılan Morris'in su tankı kullanılarak benzer sonuçlar elde edilmiştir (17). Benzer bir çalışmada inhibitör sakınma testi (inhibitory avoidance task) kullanılarak Agm'in daha önce iddia edilenin aksine hatırlamayı kolaylaştırdığı, bu etkiyi alfa2 adreseptörler, imidazolin ve/veya NMDA reseptörleri ve NO inhibisyonu gibi farklı mekanizmalar üzerinden yapabileceği ileri sürülmüştür (18). Yaşlanmaya bağlı olarak hipokampal CA1, CA2/3 ve dentat girus bölgelerinde Agm düzeyleri incelenmiş ve yaşa bağlı olarak CA1 bölgesinde azalırken, CA2/3 ve dentat girus bölgelerinde arttığı gösterilmiştir. Agmatinin entorhinal kortekste özellikle genç ve orta yaş sıçanlarda, postrhinal ve temporal kortekste yaşlanmayla arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda Agm miktarlarının beyin bölgesine ve yaşa bağlı olarak değiştiğini söylemişlerdir (27). Su tankı, zorunlu yüzme testi (forced swimming test) ve kafeste tutma modeli kullanılarak Agm'in etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ekzojen olarak verilen Agm'in uzaysal hafıza üzerine etkisi araştırılmıştır. Beynin 10 farklı bölgesinde (Hipokampal CA1, CA2/3, dentat girus, serebellum, vestibüler nükleus, prefrontal, entorhinal, perirhinal, postrhinal ve temporal korteks) Agm düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre su tankı yöntemi gibi hayvanın uzaysal hafızasına ihtiyaç duyduğu testlerin uygulanmasından sonra özellikle hipokampusta (CA1 ve dentat girus), entorhinal korteks ve vestibüler nükleusta Agm düzeylerinin anlamlı bir biçimde arttığı, bu artışın zorunlu yüzmeye tabi tutulmak veya kafeste bekletilmek ile elde edilmediği gösterilmiştir. Buna göre Agm düzeylerinin uzaysal hafıza ile ilişkili bölgelerde arttığını böylece Agm'in uzaysal öğrenme ve bellek proseseleri açısından önemli olduğunu söylemişlerdir (18). Bir diğer çalışmada su tankı, yükseltilmiş artı labirent ve açık alan testleri yapılmış ve Agm i.c.v olarak infüze edilmiştir (19). Bu çalışmanın sonuçları Agm uygulamasının referans hafıza üzerine bir etkisi olmadan hafızayı güçlendirdiğini (working memory) göstermiştir (20). Bu bulgulara dayanarak biz de Alzheimer modeli kullanarak Agm'in etkisini araştırmayı planlamıştık. Çalışmamızın bul-

gularına göre su tankı ve pasif sakınma testlerinde icv olarak uygulanan STZ ile öğrenme ve bellek ileri derecede bozulmuş, Agm tedavisi ile de büyük oranda düzelmiştir. Bizim bulgularımız günümüze dek yapılmış yukarıda sözü edilen diğer çalışmalardaki modellerdeki gibi Agm'in öğrenme ve bellek fonksiyonlarının düzenlenmesi açısından önemli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, bu çalışma Agm'in deneysel Alzheimer modelinde etkinliğini araştıran ilk çalışmadır.

Birçok proenflamatuvar sitokin etkilerini iNOS aracılığıyla NO oluşumunu arttırarak yaparlar. Agmatin de iNOS inhibisyonu ile hiperalejiyi engelleyebildiği şeklinde açıklanmıştır. Makrofajlarda imidazolin reseptörleri eksprese olmadığı halde, bazı imidazolinlerin iNOS'u inhibe ettiği, ayrıca Agm'in de iNOS'u baskılayarak NO oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (27). İndüklenebilir NOS ve agmatinaz ekspresyonunu uyaran makrofajlar LPS ile aktive edildiklerinde, arjininin hem transportunu hem de sentezini stimüle ederler. Agmatinin LPS enjeksiyonuna bağlı olarak meydana gelen hipertermiyi baskıladığı, nispeten düşük dozda (20 mg/kg) uygulanan Agm'in artmış vücut sıcaklığını plazma nitrit/nitrat miktarını azalttırarak nitriderjik sistem aracılığı ile yaptığı gösterilmiştir (28). Agmatin, inflamasyon süresince makrofaj aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Hem sentezinden sorumlu enzim arjinin dekarboksilaz hem de yıkımından sorumlu agmatinaz makrofajlarda sentezlenir. Makrofajlarda bu enzimlerin aktiviteleri LPS ve sitokinler tarafından düzenlenir. İndüklenebilir NOS oluşumunu tetikleyen LPS, doza bağımlı olarak, geri dönüşümlü bir şekilde ADC ve agmatinaz aktivitesini modüle eder. İndüklenebilir NOS ve agmatinaz ekspresyonunu uyaran makrofajlar LPS ile aktive edildiklerinde, arjininin hem transportunu hem de sentezini stimüle ederler. Buna bağlı olarak intraselüler arjinin ve dolayısıyla NO miktarı artar. Lipopolisakkarit, ADC aktivitesini azaltır. Agmatinaz aktivitesi ise biriken Agm'in hidrolizini gerçekleştirmek için artar. Ayrıca LPS varlığında iNOS inhibitörlerinin hidrolizi stimüle edilir. İnterlökin-10, TGF- $\beta$  ve IL-4, makrofajların enflamatuvar aktivasyonunu baskılayarak NO üretimini inhibe IL-10 ve TGF- $\beta$ , stimüle edilemeyen hücrelerde ADC ve agmatinaz aktivasyonunu azaltır. İnterlökin-4 ise ADC aktivitesini değiştirmeksizin, LPS'in agmatinaz üzerindeki etkisini geri çevirebilir (29). Dolayısıyla Agmin gerek nitriderjik sistem gerekse sitokin oluşumunda rolü vardır. Bu şekilde inflamasyon sürecinin modülasyonunda rolü olduğu bilinen Agmin Alzheimer etyopatogenezinde önemli bilinen inflamasyon bileşeni üzerine etkili olabile-

ceğini öngördük. Bu nedenle hayvanların beyin dokularında serbest radikal oluşumuna bağlı hasarı değerlendirmek için indirgenmiş glutatyon (GSH), MDA ve MPO aktivitesi ölçtük. Öğrenme ve bellek fonksiyonları bozulmuş olan STZ grubunda beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu gösteren yüksek MDA düzeyi, dokuya nötrofil göçünün arttığını gösteren yüksek miyeloperoksidaz aktivitesi ve endojen antioksidan GSH düzeyinin azaldığı görüldü. Özellikle STZ uygulamasıyla artan MDA düzeyleri ve miyeloperoksidaz aktivitesinin Agm tedavisiyle anlamlı bir biçimde baskılandığı görülmüştür. Yine STZ uygulamasıyla azalan GSH düzeylerinde Agm tedavisiyle sınırda fakat anlamlı bir artış görülmüştür. Dolayısıyla bulgularımız Agm'in bozulmuş kognitif fonksiyonlar üzerindeki düzenltici etkisinin serbest radikal oluşumuna bağlı hasarı engelleyerek yaptığı düşünülmüştür.

Intraplantar karregen aneksiyonundan önce i.t. Agm tedavisi uygulanan farelerde, Agm'in termal hiperalejiyi önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (30). Agmatin dışında klonidin gibi alfa2 adreno reseptörlere bağlanan ilaçların da aynı etkiyi göstermesi Agm'in bu potansiyelizasyonu alfa2 adreno reseptörler aracılığıyla oluşturduğunu düşündürmektedir. Ancak Agm'in alfa2 adreno reseptörler üzerinde agonist etkili olduğunu gösteren bir bulgu olmadığı için, bu etkinin imidazolin reseptörleri aracılığıyla meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir (30). Vücutta endojen olarak bulunan Agm'in, nöropatik ağrı modellerinde koruyucu olduğu, bu etkiyi NOS gibi proenflamatuar moleküllerin artışının engellenmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Agmatinin anti-enflamatuar etkisinin moleküler temeline ışık tutan bir çalışmada, makrofajlarda iNOS aktivitesindeki azalmanın imidazolin reseptörleri aracılığı ile meydana gelmediği savunulmuştur. Astrositlerde etkili olan idazoksanin iNOS ekspresyonunu baskılamaması bu hipotezi doğrular niteliktedir (31). Agmatinin anti-enflamatuar etki potansiyeli olduğunu destekleyen bir başka çalışmada, sıçanlara sistemik olarak LPS verilmiştir. Agmatin tedavisi uygulanan grupta, endotoksemiye bağlı kan basıncı düşünün engellenmesi ve sepsise bağlı olarak meydana gelen renal fonksiyon bozukluğunun düzeltilmesi, endotoksik şok modelinde Agm'in koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (32). Sepsise bağlı olarak bütün immün sistem hücrelerinin aktive olduğu ve çok şiddetli bir inflammatuar yanıt kabul edilebilecek bu deneyde Agm'in sistemik inflammatuar yanıtı anlamlı bir şekilde baskılaması, güçlü bir anti-inflamatuar etki potansiyeline sahip olduğunun bir göstergesi olabilir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre

Agm'in analjezik/antihiperaljezik ve antiinflammatuar etki potansiyeli vardır. Endojen bir madde olarak Agm akut ağrı, nöropatik ağrı ve inflamasyon gibi durumlarda düzenleyici role sahiptir. Bizim çalışmamızın sonuçları da Agm'in Alzheimer gelişimine katkıda bulunan inflammatuar süreç üzerinde baskılayıcı bir role sahip olduğunu ve bu etkiyi serbest radikal oluşumunu baskılayarak yapabileceğini göstermiştir.

Agmatinin i.t. veya sistemik verilmesi iskemide ve eksitotoksitede nöron kaybını azaltabileceği, bu etkinin, voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının blokajı, NMDA reseptörlerinin bloke edilmesi ve indüklenebilir NOS (iNOS) oluşumunu inhibe etmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür (10-12). Sıçanlarda iskemik hasarıdan sonra Agm miktarının 20 kat arttığı gösterilmiştir (14). Agmatinin iskemik hasar üzerindeki etkisini araştıran bir başka çalışmada, primer kortikal nöronlardan hazırlanan hücre kültüründe oksijen ve glikoz mahrumiyeti ile oluşturulan hasarın Agm ile önlediği gösterilmiştir. Agmatinin bu koruyucu etkisinin nNOS aracılığıyla olabileceği, orta serebral arter oklüzyon modeli kullanılarak gösterilmiştir. Bu modelde oklüzyondan önce ve oklüzyon anında verilen Agm'in iskemik hasarı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Agmatinin bu etkisinde nNOS kadar iNOS'unda rolü olabileceği de düşünülmektedir. Agmatin sıçan hipokampusunda voltaja bağımlı iyon kanallarında etkisini araştıran bir çalışmada voltaja bağımlı sodyum, potasyum ve kalsiyum kanallarını içeren hücrelerde kayıt yapılmış Agm'in sodyum ve potasyum kanallarında bir değişikliğe yol açmazken voltaja bağımlı kalsiyum kanallarında reversibl blokaj oluşturduğu gösterilmiştir (15). Bir diğer çalışmada neonatal sıçan korteksi, NMDA veya staurosporin (protein kinaz inhibitörü) veya kalsimisin (kalsiyum ionofor) ile enkübe edilmiş, Agm'in, protein kinaz blokajı ve kalsiyum ile ortaya çıkan hücre ölümünde koruyucu etki göstermezken NMDA ile ortaya çıkan eksitotoksik etkiyi önlediği gösterilmiştir (33). Aslında eksitotoksititeye bağlı nöron kaybı Alzheimer etyopatogenezinde en çok sorumlu tutulan mekanizmalardan bir diğeridir. Büyük olasılıkla bu çalışmada Agm ile kognitif fonksiyon bozukluğunun tedavi edilebilmesi NMDA reseptörlerini bloke etmesi ve Ca<sup>+2</sup>'un nörona girişi frenleyerek nöron hasarını azaltmasına bağlıdır.

Hayvanların hareketsiz bırakılması esasına dayanan bir stres modelinde (restraint stress) kronik stresin (21 gün) prefrontal korteks ve hipokampusta yapısal değişikliklere neden olduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiş, paralel olarak endojen Agm düzeylerinin azaldığı, Agm'in

(50 mg/kg/gün) ise bu bölgelerdeki nöronları koruduğu gösterilmiştir (34,35). Travmatik hasar modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada histopatolojik olarak Agm'in beyin hasarını azalttığı benzer bir çalışmada hipoksiye bağlı TNF- $\alpha$  salımını inhibe ederek retinal hücreleri koruduğu gösterilmiştir (36,37). Retinal gangliyon hücrelerini TNF- $\alpha$ 'ya bağlı apoptozisi baskılayarak engellediği gösterilmiştir (38,39). İskemik hasar üzerindeki etkisini araştıran bir başka çalışmada, primer kortikal nöronlardan hazırlanan hücre kültüründe oksijen glikoz deprivasyonu ile oluşturulan hasarı önlediği gösterilmiştir. İndüklenebilir NOS ekspresyonunun Agm tedavisi uygulanan grupta belirgin bir şekilde azalması bu düşüncüyü doğrulamaktadır (11). İskemiye bağlı akut böbrek hasarını engellediği, bu etkiyi kısmen alfa2 adrenoseptörler kısmen de imidazolin reseptörleri aracılığı ile yaptığı gösterilmiştir (40). Agmatinin retinal gangliyon hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğu (41), yine oksijen-glikoz eksikliğine bağlı olarak kortikal astrosit hücrelerinde meydana gelen hasarı engellediği ve bunu özellikle nükleer faktör kapa B üzerinden yaptığı gösterilmiştir (42). İskemi ve reperfüzyona bağlı olarak gelişen hasarda Agm tedavisinin bu hasarı serbest radikal oluşumunu ve NO miktarlarını azaltarak engellediği gösterilmiştir (43). Glukokortikoidlerin kronik kullanımının (21 gün) beyinde bazı morfolojik değişikliklere neden olabileceğinin gösterildiği bir çalışmada eş zamanlı kullanılan Agm'in (50 mg/kg/gün) bu değişiklikleri engellediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada glukokortikoid uygulamasının bir-

çok beyin bölgesinde Agm'in sentezinden sorumlu olan enzim ADC'nin miktarını artırdığını da göstermişlerdir. Bu nedenle Agm'in nöronları korumak üzere sentezinin artırılmaya çalışıldığı yorumu yapılmıştır (44).

Yukarıdaki çalışmalardan elde edilen bulgulara göre Agm iNOS'u ve/veya nNOS'u inhibe ederek, inflamatuvar sitokinleri baskılayarak, NMDA reseptörlerini bloke ederek dolaşımıyla kalsiyumun hücre içine girişini azaltarak nöroprotektif etki yapar. Bu çalışmadan elde edilen bulgular Agm'in bozulmuş öğrenme ve bellek fonksiyonlarını düzelttiğini göstermiştir. Elde ettiğimiz sonucun ne yazık ki direkt olarak nöroprotektif etki ile olduğunu söyleyebileceğimiz bir parametremiz olmamakla beraber dokularda serbest radikal oluşumunu baskılayarak oksidan hasarı engellediğini söyleyebiliriz. Gerek Alzheimer modelinde yapılan ilk Agm çalışması olması gerekse mekanizmaya en azından bir açıdan açıklık getirmesi nedeniyle çalışmanın sonuçları heyecan vericidir. Şüphesiz ki endojen bir madde olan Agm'in öğrenme ve bellek fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rolü vardır. Bu konuda çalışmaların devam ettirilmesi hem hastalığın daha iyi anlaşılmasına hem de yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

### Teşekkür

Bu çalışma SAG-E 140312-0039 nolu Marmara Üniversitesi BAPKO projesi ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope. *Pharmacol Res.* 2005;51(1):1–17.
2. Hooijmans CR, Kiliaan AJ. Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology. *Eur J Pharmacol.* 2008;585(1):176–196.
3. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8 (2):101-112.
4. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Stress in the brain: Novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 49(1):1-21.
5. Pratico D. (2008). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: A reappraisal. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;29(12):609-615.
6. Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. (2009). Inflammation in Alzheimer's disease: Amyloid- $\beta$  oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Prog Neurobiol.* 87(3):181-184.
7. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2004;45(5):583-595.
8. Arıcıoğlu F, Regunathan S. Agmatine attenuates stress- and lipopolysaccharide-induced fever in rats. *Physiol Behav.* 85:370-375.
9. Gilad GM, Salame K, Rabey JM, Gilad VH. (1996). Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models. *Life Sci.* 2005;58:41-46.
10. Gil-Bea FJ, García-Alloza M, Domínguez J, Marcos B, Ramírez MJ. Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit. *Neurosci Lett.* 2005;375(1):37-41.
11. Kim JH, Yenari MA, Giffard RG, Cho SW, Park KA, Lee JE. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. *Exp. Neurol.* 2004;189:122-130.
12. Qiu WW, Zheng RY. Neuroprotective effects of receptor imidazoline 2 and its 109. endogenous ligand agmatine. *Neurosci Bull.* 2006;22(3):187-191.



13. Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J*. 1996;316: 247-249.
14. Wang WP, Iyo AH, Miguel-Hidalgo J, Regunathan S, Zhu MY. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*. 2006;1084(1):210-216.
15. Zhu MY, Piletz JE, Halaris A, Regunathan S. Effect of agmatine against cell death induced by NMDA and glutamate in neurons and PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2003;23(4-5):865-872.
16. Stewart LS, McKay BE. Acquisition deficit and time-dependent retrograde amnesia for contextual fear conditioning in agmatine-treated rats. *Behav Pharmacol*. 2000;11(1):93-97.
17. McKay BE, Lado WE, Martin LJ, Galic MA, Fournier NM. Learning and memory in agmatine-treated rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;72(3):551-557.
18. Arteni NS, Lavinsky D, Rodrigues AL, Frison VB, Netto CA. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2002;78(2):465-469.
19. Liu P, Collie ND, Chary S, Jing Y, Zhang H. Spatial learning results in elevated agmatine levels in the rat brain. *Hippocampus*. 2008;18(11):1094-1098.
20. Liu P, Bergin DH. Differential effects of i.c.v. microinfusion of agmatine on spatial working and reference memory in the rat. *Neuroscience*. 2009;159(3):951-961.
21. Liu P, Collie ND. Behavioral effects of agmatine in naive rats are task- and delay-dependent. *Neurosci*. 2009;122(3):557-569.
22. Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods*. 1980;3(2):129-49
23. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Life Sci*. 2005;77(1):1-14.
24. Beutler E. Glutathione in red blood cell metabolism. A manual of biochemical methods, Grune&Stratton, New York, 1975;112-114.
25. Beuge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-310.
26. Hillegas LM, Griswold DE, Brickson B, Albrghtson-Winslow C. Assesment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J Pharmacol Methods*. 1990;24:285-295.
27. Liu P, Chary S, Devaraj R, Jing Y, Darlington CL, Smith PF, Tucker IG, Zhang H. Effects of aging on agmatine levels in memory-associated brain structures. *Hippocampus*. 2008;18(9):853-856.
28. Regunathan S, Feinstein DL, Reis DJ. Anti-proliferative and anti-inflammatory actions of imidazoline agents. Are imidazoline receptors involved? *Ann NY Acad Sci*. 1999;881:410-419.
29. Sastre M, Galea E, Feinstein D, Reis DJ, Regunathan S. Metabolism of agmatine in macrophages: Modulation by lipopolysaccharide and inhibitory cytokines. *Biochem J*. 1998;330:1405-1409.
30. Horvath G, Kekesi G, Dobos I, Szikszay M, Klimscha W, Benedek G. Effect of agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 1999;368:197-204.
31. Regunathan S, Piletz JE. Regulation of inducible nitric oxide synthesis in macrophages and astrocytes. *Ann. NY. Acad Sci*. 2003;1009:20-29.
32. Satriano J, Schwartz D, Ishizuka S, Lortie MJ, Thomson SC, Gabbai F, Kelly CJ, Blantz RC. Supression of inducible nitric oxide generation by agmatine aldehyde: Beneficial effects in sepsis. *J Cell Physiol*. 2001;188:313-320.
33. Zhu MY, Wang WP, Cai ZW, Regunathan S, Ordway G. Exogenous agmatine has neuroprotective effects against restraint-induced structural changes in the rat brain. *Eur J Neurosci*. 2008;27(6):1320-1332.
34. Zhu MY, Wang WP, Huang J, Feng YZ, Regunathan S, Bissette G. Repeated immobilization stress alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. *Neurochem Int*. 2008;53(6-8):346-354.
35. Kuo JR, Lo CJ, Chio CC, Chang CP, Lin MT. Resuscitation from experimental traumatic brain injury by agmatine therapy. *Resuscitation*. 2007;75(3):506-514.
36. Sengul G, Takci E, Malcok UA, Akar A, Erdogan F, Kadioglu HH, Aydin IH. A preliminary histopathological study of the effect of agmatine on diffuse brain injury in rats. *J Clin Neurosci*. 2008;15(10):1125-1129.
37. Hong S, Kim CY, Lee JE, Seong GJ. Agmatine protects cultured retinal ganglion cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Life Sci*. 2009;84(1-2):28-32.
38. Hong S, Park K, Kim CY, Seong GJ. Agmatine inhibits hypoxia-induced TNF-alpha release from cultured retinal ganglion cells. *Biocell*. 2008;32(2):201-205.
39. Sugiura T, Kobuchi S, Tsutsui H, Takaoka M, Fujii T, Hayashi K, Matsumura Y. Preventive mechanisms of agmatine against ischemic acute kidney injury in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009;603(1-3):108-113.
40. Sugiura T, Tsutsui H, Takaoka M, Kobuchi S, Hayashi K, Fujii T, Matsumura Y. Protective effect of agmatine on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;51(3):223-230.
41. Lizuka Y, Hong S, Kim CY, Kim SK, Seong GJ. Agmatine pretreatment protects retinal ganglion cells (RGC-5 cell line) from oxidative stress in vitro. *Biocell*. 2008;32(3):245-250.
42. Lee WT, Hong S, Yoon SH, Kim JH, Park KA, Seong GJ, Lee JE. Neuroprotective effects of agmatine on oxygen-glucose deprived primary-cultured astrocytes and nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Brain Res*. 2009;1281:64-70.
43. Battaglia V, Rossi CA, Colombatto S, Grillo MA, Toninello A. Different behavior of agmatine in liver mitochondria: inducer of oxidative stress or scavenger of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(5):1147-1153.
44. Zhu MY, Wang WP, Huang J, Regunathan S. Chronic treatment with glucocorticoids alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. *J Neurochem*. 2007;103(5):1811-1820.