

Bıldırcınlarda Akrilamid Toksikasyonunda Nörofilament Proteinlerdeki (NFP) Değişiklikler: İmmun Dokukimyasal Bir Çalışma

The Alternation of the Neurofilament Proteins in the Acrylamide Toxicity in Quails: An Immune Histochemical Study

Dr. H. Nesrin Bilgiç¹ Uzm. Dr. Şükrü Yıldırım² Dr. Ali Bilgiç¹
Dr. Tahsin Yeşildere¹ Prof. Dr. İbrahim Öztek²

¹İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Özet: Bu çalışmanın amacı bıldırcınların nörotoksik maddelere karşı hangi sürede, dejenerasyon ile yanıt vereceğini ve daha sonra deneysel periferik sinir dejenerasyonları çalışmalarında iyi bir laboratuvar modeli olup olamayacağını saptamaktır. Bu çalışmada yinelenen dozda akrilamid verilen bıldırcınların beyin, beyincik ve siyatik sinirlerinde nörofilament protein akümüasyonu immün dokukimyasal olarak streptavidine biotin peroksidaz yöntemi ile monoklonal anti nörofilament protein antikorunu kullanılarak belirlendi. Bıldırcınlara 0-30 gün süre ile, içme suyu ile, 400 ppm akrilamid verildi. Mikroskopik olarak, beyinde kontrol ve deney grupları arasında boyanma yönünden ayırım görülmedi. Beyincikte Purkinje hücrelerinin çevresindeki, sepet hücrelerine ilişkin aksonların, belirgin olarak boyandığı nörofilament protein akümüasyonları görüldü. Siyatik sinirde, nörofilament proteinlerin aşırı akümüasyonu belirlendi. Akrilamid intoksikasyonu ile bıldırcın periferik sinirlerinde, ve beyincikte 30 günde, özellikle orta boy nörofilament protein birikimi ile dejenerasyon oluşmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Akrilamid, nörofilament, bıldırcın

Summary: The object of this study is to observe the reaction time of degeneration in quails against neurotoxic substances and thereafter to investigate whether it is a favourable model in experimental peripheral nerve degenerations study. An immunohistochemical study on neurofilament protein accumulation in the cerebrum, cerebellum and sciatic nerve of quails after repeated treatment with acrylamide was done by the strept ABC complex method using monoclonal anti neurofilament protein antibody. The Japanese quails were given 400 ppm acrylamide for 0-30 days. Microscopically, no difference was detected in the cerebrum of the experimental and control group in stained slides. Neurofilament protein accumulation is seen strongly around the Purkinje cells which are connected with basket cells by means of axons. Neurofilament protein accumulation was strongly determined in sciatic nerve. In acrylamide intoxication degeneration occurs by accumulation of neurofilament proteins in peripheral nerves and cerebellum of quails in thirty days.

Key Words: Acrylamide, neurofilament, quails

Akrilamid ($CH_2=CHNONH_2$), yüksek molekül ağırlıklı suda eriyen, geniş endüstriyel kullanımı olan bir vinil monomerdur. Akrilamidin (AC) polimer sanayinde kullanımı ile birlikte insan ve hayvan sağlığı üzerinde, akut ve kronik toksik etkisi de görülmeye başlamıştır (1). Yapılan araştırmalarda kanserojenik ve teratojenik etkileri de belirtilmiştir (1, 2). Kümülatif bir nörotoksin olan akrilamidin (3-5) insan ve hayvan sentral ve periferal sinir sisteminin incinme bölgelerinin distalinden başlayarak, yukarı doğru ilerleyen santral periferal distal aksonopati de diğer adı ile "dying-back" oluşturduğu ve bu durumun Wallerian dejenerasyonuna benzediği de belirtilmiştir (3, 6-9).

DeneySEL AC nöropatisinde, ultrastrüktürel değişikliklerin daha çok sinir ipliklerinde dejenerasyon ile belirlidir ve nöropatili hayvanlarda sinir hücrelerinin mitokondriaları genişler ve intoksikasyonun ileri dönemlerinde, nörofilament proteinleri artar. Akrilamid ile ilgili nöropatilerde, nörofilament protein akümülyasyonlarının, diğer toksik nöropatilerden ayırimda çok önemlidir (10, 12).

Sentral ve periferal distal aksonopatilerde, sentral sinir sistemi ipliklerinde dejenerasyonların daha az kuvvetli olduğu, geniş çaptaki miyelinli sinirlerde, miyelinsiz ve küçük olanlara göre dejenerasyonun daha belirgin olduğu saptanmıştır (2, 8, 13-14).

Gold ve ark. (15) sıçanlarda, kronik AC intoksikasyonunda, nörofilament proteinlerin fosforlu epitoplalarının boyandığını, % 20-30 kadar hücrenin immunreaktivite gösterdiğini saptamışlardır. Hashimoto ve ark. (16) 8 gün süre ile 50 mg/kg intraperitoneal olarak AC verilen sıçanların beyinde, kontrol ve deney grupları arasında boyanma yönünden ayırım bulunmazken, beyincikte nörofilament protein akümülyasyonu olduğu serebellar medullada ise hücre nükleusları ve sinir ipliklerinin boyandığını bildirmişlerdir.

Çevresel kökenli toksinler, Alzheimer, diabet polinöropatisi, kronik alkolizm, kanser, multipl skleroz üremi gibi olaylarda birincil ya da ikincil olarak gelişen nöropatileri deneySEL olarak oluşturmakta AC yaygın olarak kullanılan bir madde olup, bu gibi dejenerasyonların tanımlanmasında iyi bir modeldir (4-9, 17-18).

Akrilamidin, aksonal transport üzerine etkilerini göstermek üzere, tavuklarda yapılmış çalışma dışında (9), ulaşabildiğimiz kaynaklarda, kanatlılarda sinir dejenerasyonlarına ilişkin patolojik çalışma saptanamamıştır. Bu araştırmada, bıldırcınlarda deneySEL AC intoksikasyo-

nunda oluşan sentroperiferal distal aksonopatilerin nörofilament proteinler düzeyindeki değişikliklerinin immun dokukimyasal (İDK) olarak araştırılması insan ve hayvan sağlığı ile ilgili merkezi ve periferal sinir sisteminde ortaya çıkan durumları, bilimsel olarak açıklamak amaç edinilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada 30 adedi deney grubu, 10 adedi kontrol grubu olmak üzere toplam 40 adet 4 aylık erkek Japon bıldırcını (*Coturnix coturnix Japonica*) "Principles of Laboratory Animal Care" ve NIH'in "Guide for the care and use of laboratory animals" esaslarına uyularak bakıldı ve kullanıldı. Deney grubundaki bıldırcınlara 0-30 gün süre ile içme suyu ile birlikte 400 ppm AC verilirken, kontrol grubu bıldırcınlara aynı süre içinde çeşme suyu içirildi. 30. gün deney ve kontrol grubundaki bıldırcınların otopsi yapıp beyin, beyincik ve siyatik sinirleri alındı.

İmmun dokukimyasal yöntem: %10'luk tamponlu nötral formalinde fikse edilmiş dokularda parafin blokları hazırlandı. 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilin-Eozin ve Toluidin mavisi ile boyandı. İmmun dokukimyasal olarak streptavidin biotin peroksidaz yöntemi ile nörofilament proteinlerin (5 Dako A/S Copenhagen, Denmark) tutulumuna bakıldı. İmmün işleme alınacak parafin blok kesitleri deparafinizasyon için önce 45 C lik etüvde 12 saat, sıcak ksilolde 15 dakika tutuldu. % 96'lık alkollerden sonra % 3'lük hidrojen peroksit ile endojen peroksidaz inhibisyonu yapıldı. Tris buffer ile yıkanıp nonimmün goat serum ile protein blok yapıldı. Ardından 20 dakika süre ile monoklonal mouse antinörofilament proteini inkübasyonuna bırakıldı. Sekonder antikor olarak streptavidinli rabbit anti mouse IgG kullanıldı. Biotinli peroksidaz inkübasyonundan sonra peroksidaz enzimi için substrat olarak 10 dakika hidrojen peroksit ile inkübe edilmiş 3_3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kullanıldı. Mayer hematoksileni ile zemin boyası yapıldı. Dehidratasyon ve saydamlaştırma işlemlerinden sonra preparatlar kapatıldı.

Bulgular

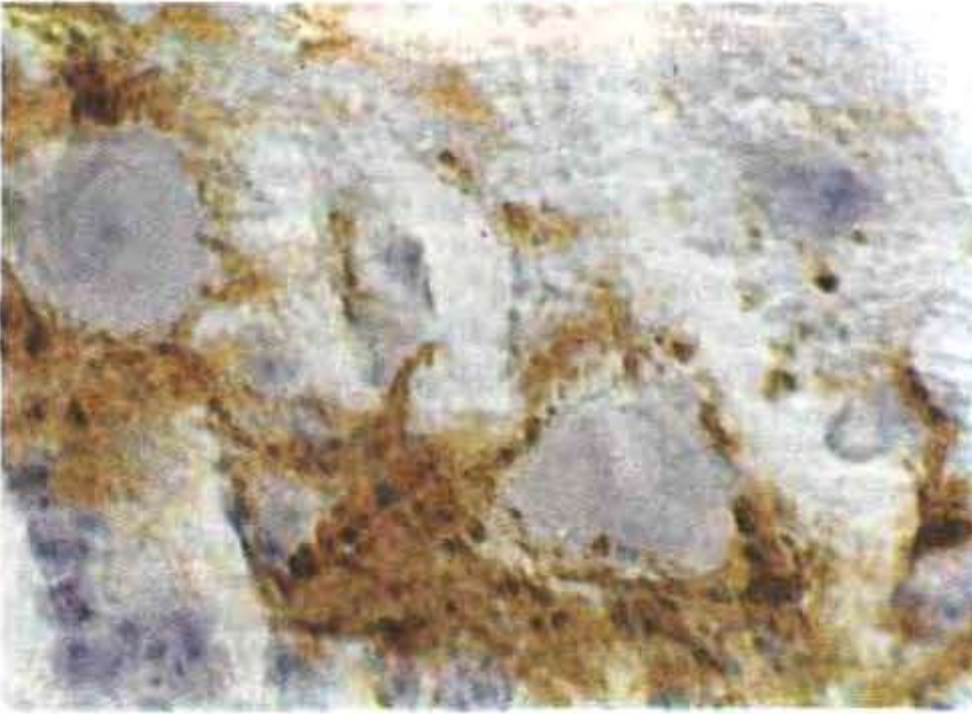
Deney ve kontrol grubu bıldırcınlarının beyin, beyincik ve siyatik sinirlerinin İDK'sal olarak incelendiği bu araştırmada bulgular aşağıdaki gibidir.

Klinik Bulgular: Araştırmanın 20. gününden başlayarak bıldırcınlarda motor ve duyusal yetersizlikler görülmeye başlandı. 30.günde bıldırcınların tamamında felçler oluştu.

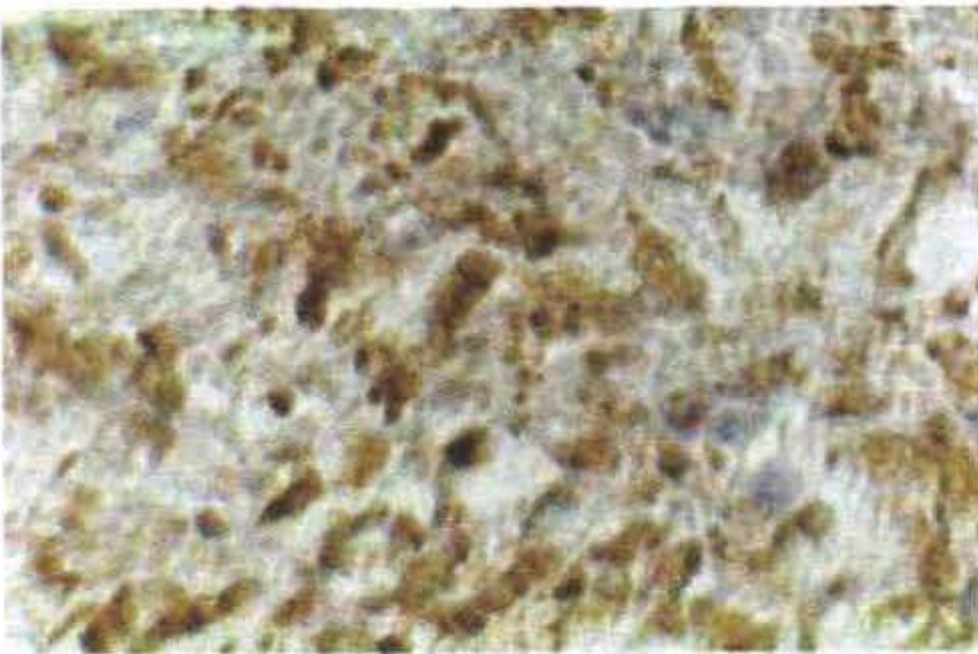
Mikroskopik Bulgular: Beyinde kontrol ve deney gruplarında sinir hücrelerinin perikaryasındaki nörofilament proteinlerin boyandığı gözlemlendi. Kontrol ve deney grupları arasında boyanma açısından ayırım görülmedi.

Beyincik: Purkinje hücrelerinin çevresindeki sepet hücrelerine ait aksonların belirgin olarak boyandığı, nörofilament protein akümülyasyonları saptandı (Resim 1). Serebellar medullada da bu boyanma alanları izlendi (Resim 2).

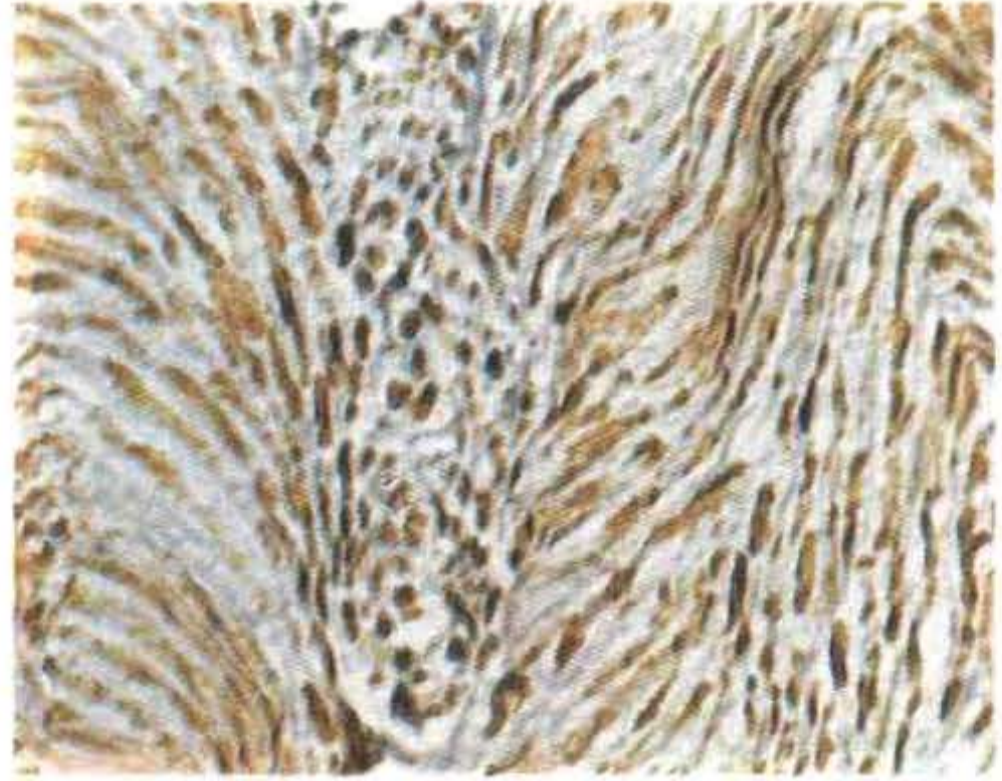
Siyatik Sinir: Siyatik sinirde, nörofilament proteinlerin, kontrol grubuna oranla aşırı derecede akümülyasyon gösterdiği belirlendi (Resim 3).



Resim 1. Deney kümesinde serebellar kortekste purkinje hücrelerinde aşırı NFP birikimi (ABC method X810 DAB Kromojen).



Resim 2. Deney kümesinde serebellar medullanın görünümü (ABC X810 DAB Kromojen).



Resim 3. Deney kümesinde siyatik sinirde aşırı NFP birikimi (ABC method DAB Kromojen).

Tartışma

AC intoksikasyonu oluşan sıçanlarda motor ve duyusal yetersizlikler, ataksi, tendon refleksinin kaybı ve felçler görüldüğü bildirilmiştir (19, 20). Bu çalışmada, bıldırcınlarda 20.günden itibaren bu semptomlar görülmeye başlamış, 30. günde bıldırcınların tamamında felçler oluşmuştur.

Gold ve ark. (15) ile Hashimoto ve ark. (5), sıçanlarda oluşturdukları AC intoksikasyonu sonucunda, beyinde sinir hücrelerinin perikardiyasındaki nörofilament proteinlerin boyandığını, ancak kontrol ve deney grupları arasında ayırım bulunmadığını bildirmişlerdir. Bu araştırmada da bıldırcınların beyinlerindeki sinir hücreleri kontrol ve deney gruplarında aynı düzeyde boyanmış olup, kontrol ve deney kümeleri arasında ayırım bulunmamıştır.

Hashimoto ve ark. (5) sıçanlarda, AC intoksikasyonu sonucu Purkinje hücreleri ile ilişkili sepet hücrelerinin aksonlarına ait nörofilament proteinlerin boyandığını, özellikle 68 kD'a ait antikorun bu alanı daha da belirgin boyadığını saptamışlardır. Bu araştırmada ise bıldırcınlarda beyincikte Pürkinje hücreleri çevresinde belirgin olarak nörofilament protein akümülyasyonları saptanmıştır.

Hashimoto ve ark. (5) AC intoksikasyonu oluşturulan sıçanlarda, beyincikte moleküler tabakada kimi nükleus ve sinir ipliklerinin de boyandığını bildirmişlerdir. AC intoksikasyonu oluşturulan bıldırcınlarda ise bu boyanma daha çok sinir ipliklerini kapsamaktadır.

Deneysel AC nöropatisinde, ultrastrüktürel değişikliklerin daha çok periferik sinirlerde görüldüğü ve intoksikasyonun ileri dönemlerinde nörofilament proteinlerin arttığı bildirilmiştir (10-12). Hashimoto ve ark. (5) AC intoksikasyonu oluşturulan sıçanlarda deney grubuna ait tibial sinirlerdeki nörofilament proteinlerin, kontrollere göre, belirgin olarak boyandığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise bildircinlerin siyatik sinirlerinde nörofilament proteinlerdeki akümülyasyon belirgin olarak saptanmıştır.

Sinir hücrelerinde, nörofilament proteinlerinin sayısının, normal düzeyde tutulması, kalsiyumun aktive ettiği nötral proteaz enzimi ile sağlandığı bildirilmiştir (21). AC

intoksikasyonu oluşturulmuş bildircinlerde, nörofilament proteinlerinin, sayıca artarak, sinirsel dejenerasyonları oluşturması öne sürüldüğü gibi, nötral proteaz enziminin mekanizmasının bozulmasından kaynaklanmış olabileceği düşüncesindeyiz (20-23).

Ayrıca, kimi araştırmacılar, melanokortin peptidlerin, sinir rejenerasyonu üzerine iyileşmeyi kolaylaştırıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir (1). Bundan sonraki çalışmalarda AC toksikasyonu oluşturulan bildircinlerde, melanokortin peptidlerin uygulanmasının, sinir rejenerasyonuna ne ölçüde katkıda bulunup bulunmayacağını araştırılmasının yerinde olacağını görüşüyoruz.

Kaynaklar

1. Goldstein BD. Acrylamide neurotoxicity altered spinal monosynaptic responses Quipazine, a serotonin agonist in cats. *Toxicol App Pharmacol* 1985; 78: 436-44.
2. Edwards PM. The distribution and metabolism of acrylamide and its neurotoxic analogues in rats. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 1277-82.
3. Howland RD, Lowndes HE. Peripheral nerve phospholipids in acrylamide neuropathy. *Arch Toxicol* 1984; 55: 178-181.
4. Souyri F, Chretien M, Droz B. Acrylamide induced neuropathy and impairment of axonal transport of proteins I. Multifocal retention of axons as revealed by light microscope radioautography. *Brain Res* 1981; 205: 1-13.
5. Hashimoto K, Kurosaka Y, Tanii H, Hayashi M. Immunochemical studies of acrylamide-associated neuropathology. *Toxicol* 1988; 49: 65-9.
6. Sriwastawa SP, Seth P. Acide hydrolases in brain, spinal cord and sciatic nerves of acrylamide intoxicated rats. *Toxicol Let* 1995; 22: 211-15.
7. Prineas JP. The pathogenesis of dying back polyneuropathies Part II An ultrastructural study of experimental acrylamide intoxication in the rat. *J Neuropath Exp Neurol* 1969; 28: 571-97.
8. Spencer PS, Schaumburg HH. A review of acrylamide neurotoxicity Part II Experimental animal neurotoxicity and pathologic mechanism. *Canadien J Neurol Sci* 1974; 152-69.
9. Schaeffer WW. Neurofilaments. Structure, metabolism and implications in disease. *J Neuropath Exp Neurol* 1987; 46(2): 117-29.
10. Spencer PS, Schaumburg HH. Ultrastructural studies of the dying back process IV Differential vulnerability of PNS and CNS fibers in experimental central peripheral distal axonopathies. *J Neuropath Exp Neurol* 1977; 36: 300-20.
11. Sporel-Özkat RE. Peripheral nerve damage and repair A pharmacological therapeutical approach (PHD thesis) Division of Molecular Biology, University of Utrecht, Holand, 1990.
12. Quesne PM. Acrylamide in Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds PS Spencer, HH Schaumburg. Berlin Springer Verlag, 1979; 309-25.
13. Tanii H, Hashimoto K. Neurotoxicity of acrylamide and related compounds in rats. Effect on rotarod performance morphology of nerves and neurotubulin. *Arch Toxicol* 1983; 54: 203-13.
14. Watassery GT, Angerhafer CK, Robertson RC, Sabri MI. Vitamin E concentrations in different regions of the spinal cord and sciatic nerve of the rat. *Neurochem Res Vol* 1986, 11(10): 1419-24.
15. Gold BG, Price DL, Griffin JW, Jeffrey R, Hoffman PN, Sternberger LA. Neurofilament antigens in acrylamide neuropathy. *J Neuropath Exp Neurol* 1988; 47(2): 145-57.
16. Edwards PM. The intensity of the developing rat fetus to the toxic effects of acrylamide. *Chem Biol Interactions* 1976; 12: 13-18.
17. Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM Campbell RA, Wolf CH, Friedman MN, Mast RW. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol App Pharmacol* 1986; 85: 154-68.
18. Tanii H, Hayashi M, Hashimoto K. Neurofilament degradation in the nervous system of rats intoxicated with acrylamide related compounds or 2-5 hexadione. *Arch Toxicol* 1988; 62: 70-5.
19. Bull RD, Robinson M, Laurie RD, Stoner GD, Freisiger E, Meier JR. Carcinogenic effect of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res* 1984; 44: 107-1120. Tanii H, Hashimoto K. Effect of acrylamide and related compounds on glycolytic enzymes in rat brain. *Toxicol Let* 1985; 26: 76-84.
20. Tanii H, Hashimoto K. Effect of acrylamide and related compounds on glycolytic enzymes in rat brain. *Toxicol Let* 1985; 26: 76-84.
21. Fullerton PM, Barnes JM. Peripheral neuropathy in rats induced by acrylamide. *British J Indust Med* 1966; 23: 210-21.
22. Rajas T, Goldstein BD. Primary afferent terminal function following acrylamide alterations in the dorsal root potential and reflex. *Toxicol App Pharmacol* 1987; 88: 175-82.
23. Bilgiç A. Bildircinlerde sinir hasarına nörofilament proteinlerinin yanıtı (Doktora tezi) İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biokimya ve Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 1990.