



## AÇLIĞIN BEYİN KORTEKSİNİN FARKLI BÖLGELERİNDEKİ NÖTRAL PEPTİD HİDROLAZLARIN AKTİFLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ VE HİSTOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Atilla TEMUR<sup>a,\*</sup>, Fahrettin ASKEROV<sup>b</sup>, H.Bayram TEMUR<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Van, TÜRKİYE

<sup>b</sup>Institute of Physiology A.I. Karayev, Azerbaijan Academy of Sciences, Baku, AZERBAIJAN

### ÖZET

Bu çalışmada, bir hafta (7 gün) açlıktan sonra beyin korteksinin sensomotor, limbik ve orbital bölgelerindeki nötral peptid hidrolaz (NPH)'ların aktifliği ve histokimyasal değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada 40 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar bir hafta (7 gün) süreyle aç bırakıldı. Belirtilen günün sonunda usulüne uygun olarak öldürüldü. Bu hayvanların, beyin korteksinin sensomotor, limbik ve orbital bölgelerindeki nötral peptid hidrolaz aktivitesi biyokimyasal olarak belirlendi. Ayrıca, bu bölgelerde meydana gelen histokimyasal değişiklikler de incelendi.

Bir hafta açlıktan sonra sensomotor, limbik ve orbital bölge homojenatındaki NPH aktivitesi azalmıştı. Sensomotor, limbik ve orbital bölgelerde açlığa bağlı oluşan histolojik değişimler belirgin olarak artmıştı.

**Anahtar Kelimeler:** Açlık, Korteks, Nötral peptid hidrolaz.

## THE EFFECTS OF STARVATION ON NEUTRAL PEPTIDE HYDROLASE ACTIVITY AND HISTOCHEMICAL CHANGES IN THE DIFFERENT AREAS AT THE CORTEX OF BRAIN.

### ABSTRACT

The present study was designed to determine the histochemical changes and neutral peptide hydrolyse activity (NPH) in the sensorymotor (SC), limbic (LC) and orbital cortex (OC) of the brain after one week starvation. The study was performed forty Wistar-Albino rats. The rats were suffered starvation for seven days period. At the end of the starvation period, the rats were sacrificed. The activity of NPH was determined in the sensorymotor, limbic and orbital cortex. Histochemical changes which take place in these areas were also studied.

The activity of NPH in homojenat at sensorymotor, limbic and orbital areas were decreased after one week starvation. Histological changes which depend on starvation at sensorymotor, limbic and orbital areas were significantly increased.

**Keywords:** Starvation, Cortex, Neutral peptide hydrolase.

\*E-posta: [temurat@yahoo.com](mailto:temurat@yahoo.com)

## 1. GİRİŞ

Proteolitik fermentlerin ilk sınıflandırılması Haurowitz [1] tarafından yapılmıştır. Nöropeptidlerin proteolitik parçalanması diğer metabolitlerin proteolitik parçalanmasından farklı safhalar içermektedir. Nöropeptidlerin farklı fonksiyonel grupları vardır. Bu gruplar proteinle birleşmiş halde bulunurlar. Bu peptidlerin ekzopeptidazlar tarafından parçalanmasının nedeni peptidlerin halkalı yapıya sahip olmasındandır. Bu yüzden bu tür peptidlerin çoğunlukla nötral peptidhidrolazlar tarafından parçalandığı düşünülmektedir [2,3].

Brecher [4] memelilerin beyin dokusunda dihidrolaz ve trihidrolaz homojenatlarının dağılımının eşit olduğunu bildirmektedir. Aminopeptidazların mitokondrilerde fazla miktarda bulunması bu enzimlerin bazı fonksiyonlarla ilişkili olduğunu göstermektedir. Mitokondrilerde çok miktarda ekzopeptidaz ve endopeptidazlar bulunduğu bildirilmektedir [5].

Palladin [6] açlık zamanında proteolizlerin beyin dokusundaki ak maddenin boz maddeye oranla daha yoğun olduğunu vurgulamaktadır. Besinde yetersiz protein olması durumunda proteolizler daha yoğun bulunmaktadır. Beyin dokusunda protein yapısının bozulması ve besindeki protein azlığı organizmanın embriyonal gelişimini de ciddi oranda etkilemektedir [7,8]. Rosenberg ve ark., [9] metalloproteinazların nötral proteinazlar olup, hücre içi maddelerin parçalanmasında görev aldıklarını göstermişlerdir.

Auer [10] yaptığı bir çalışmada, beyin zedelenmesinden iki saat sonra stoplazmada nötral proteinazların aktifliğinin arttığını ve sonuçta dış etkiden dolayı beyin dokusunun şiştiğini gözlemlemiştir. Marks ve ark., [11] nın araştırmaları, bütün yaş gruplarında dipeptidazlar ve tripeptidazların asit proteinazlara oranla 7-15 kat daha fazla aktif olduğunu göstermiştir. Organizmada peptidlerin biyolojik aktivitesi bunların sentezi ve parçalanma hızı ile ilişkilidir [12].

Açlık dönemindeki gıda motivasyonu sensomotor, limbik ve orbital korteks tarafından kontrol edilmektedir [13]. Kotov [14] yaptığı çalışmada, tok hayvanlarda açlık merkezinin elektrikle uyarılması sonucu, sensomotorun korteks nöronlarında aktifliğin arttığını saptamıştır. Yine Kotov [15], Tempel ve ark., [16] açlık anında sensomotor korteks nöronlarında aktivitenin yükseldiğini de göstermişlerdir.

Bu çalışmada, açlığın beyin korteksinin farklı bölgelerindeki (sensomotor, limbik, orbital) nötral proteinlerin yenileşme intensifliği ile morfolojik değişiklikler arasındaki ilişkiyi saptamak amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada 40 adet yetişkin, Wistar albino sıçan kullanıldı. Bu hayvanlar 20'şerli iki gruba ayrıldı. Bunlardan biri kontrol, diğeri ise deney grubunu oluşturdu. Her gruptan 10 hayvan histokimyasal, 10 hayvan da biyokimyasal çalışmalar için kullanıldı.

**Kontrol grubu:** Bu grupta 20 sıçan kullanıldı. Bu hayvanlar ticari yem (VAN-YEM A.Ş., VAN) ve su *ad libitum* beslendi.

**Deney grubu:** Bu grupta 20 hayvan kullanıldı. Bu hayvanlar 7 gün süre ile aç bırakıldı. Fakat su *ad libitum* verildi.

**Biyokimyasal Metotlar:** Deneme süresi sonunda hayvanlar servikal dislokasyonla öldürüldü. Beyin korteksinin sensomotor, limbik ve orbital bölgelerinin homojenat ve nöronlarının fraksiyonlarında (çekirdek, mitokondri, sitosol) arginin düzeyleri belirlenerek nötral peptid hidrolazın (NPH) özel aktifliği tayin edildi [17]. Elde edilen bulgular, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldı.

**Histokimyasal Metotlar:** Beyin korteksinin sensomotor, limbik ve orbital bölgelerinden doku örnekleri alınarak Carnua çözeltisinde (6:3:1 alkol, kloroform ve asetik asit) bir saat bekletildi. Daha sonra alkol, alkol-kloroform, kloroform-parafin karışımlarından geçirilerek bloklar hazırlandı. 6 µm kalınlığında kesitler alınarak Nissl yöntemi (18) ile %0,1 cresyl-violet ile boyandı. Hazırlanan preparatlarda beyin korteksinin sensomotor, limbik ve orbital bölgelerinin III. ve V. katları incelenerek uygun bölgelerin resimleri çekildi (Nikon, Optiphot II).

**İstatistiki analiz:** Bütün verilerin varyans analizi SAS paket programı [19] kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farklar ise Duncan'ın "t" testi ile belirlendi [20].

### 3. BULGULAR

**Biyokimyasal bulgular:** Bu araştırmada elde edilen homojenatlara ait NPH aktifliği değerleri tablo1'de, subfraksiyonlara ait değerler ise tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Açlığın farklı dönemlerinde beyin korteksinin sensomotor, limbik ve orbital bölgelerinin homojenatlarında nötral peptid hidrolazların özel aktifliği (saatte 1 mg proteinden  $\mu\text{g}$  arginin oluşumu).

Gruplar	Beyin korteksi bölgeleri		
	Sensomotor bölge ( $\mu\text{g}$ )	Limbik bölge ( $\mu\text{g}$ )	Orbital bölge ( $\mu\text{g}$ )
Kontrol grubu	5,9 $\pm$ 0,5	7,1 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,6
Deney grubu	4,2 $\pm$ 0,65***	4,2 $\pm$ 0,38*	4,9 $\pm$ 0,13***

Kontrol grubu ile arasındaki fark önemlidir. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

**Tablo 2.** Açlığın farklı dönemlerinde beyin korteksinin sensomotor, limbik ve orbital bölgelerindeki hücrelerin subfraksiyonlarındaki nötral peptid hidrolazların özel aktifliği (saatte 1 mg proteinden  $\mu\text{g}$  arginin oluşumu).

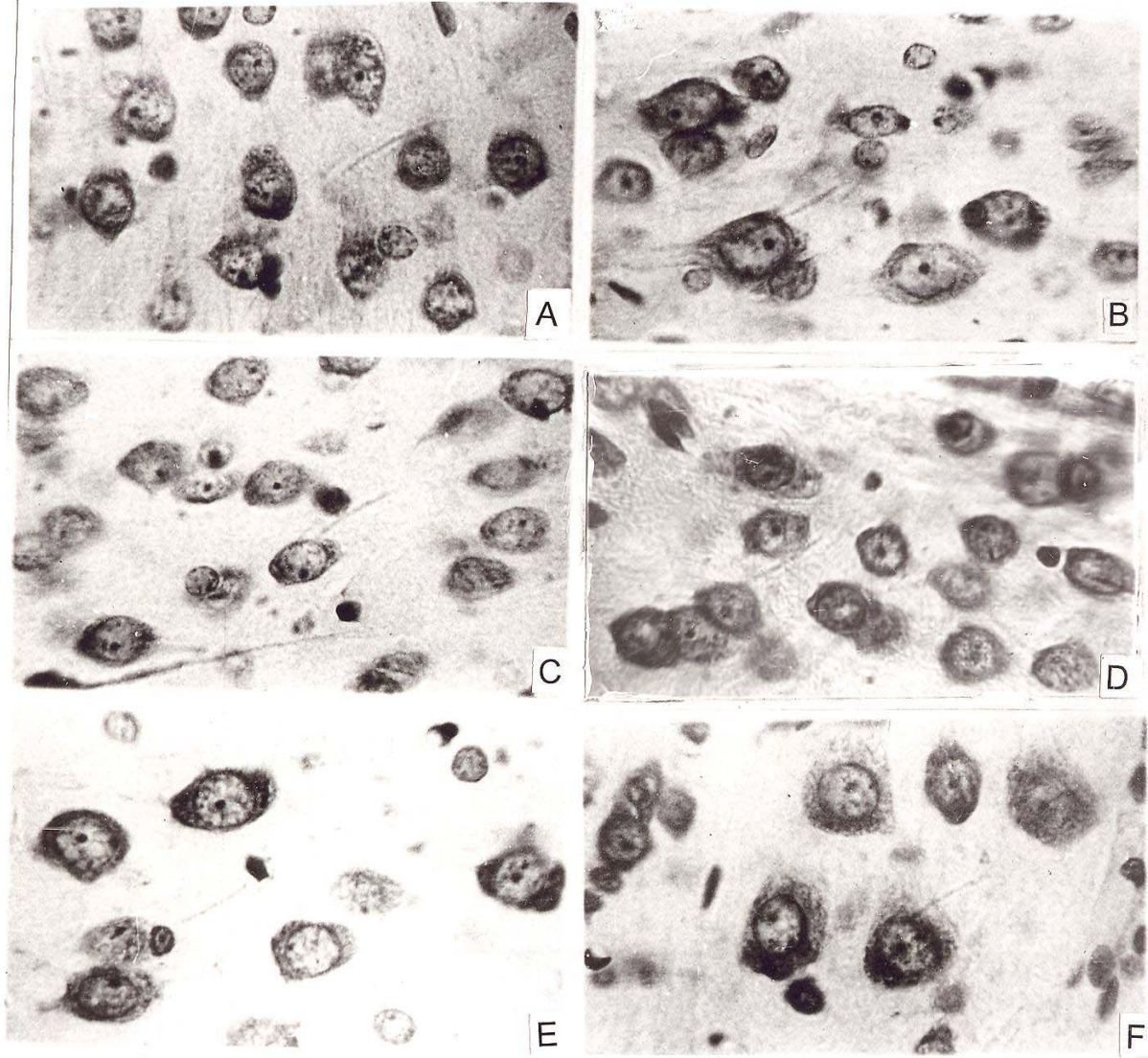
Gruplar	Hücre fraksiyonları		
	Çekirdek ( $\mu\text{g}$ )	Mitokondriyon ( $\mu\text{g}$ )	Sitosol ( $\mu\text{g}$ )
<b>Sensomotor Bölge</b>			
Kontrol grubu	42,3 $\pm$ 3,0	8,6 $\pm$ 2,0	131,4 $\pm$ 6,0
Deney grubu	17,1 $\pm$ 4,0***	22,4 $\pm$ 3,0***	134,0 $\pm$ 1,0
<b>Limbik Bölge</b>			
Kontrol grubu	85,0 $\pm$ 1,0	27,7 $\pm$ 2,0	68,9 $\pm$ 3,0
Deney grubu	12,1 $\pm$ 2,0***	35,2 $\pm$ 1,0***	115,0 $\pm$ 4,0***
<b>Orbital Bölge</b>			
Kontrol grubu	57,5 $\pm$ 3,0	92,9 $\pm$ 2,0	110,2 $\pm$ 10,0
Deney grubu	16,6 $\pm$ 2,0***	61,2 $\pm$ 2,0*	97,9 $\pm$ 3,0**

Kontrol grubu ile arasındaki fark önemlidir. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Açlığın 7. gününde kontrol grubuna göre; sensomotor ve orbital bölgedeki çekirdek ve mitokondri fraksiyonlarında azalma, limbik bölgede ise önemli bir artış ( $p<0,001$ ) gözlemlendi. Limbik bölgedeki sitosol fraksiyonunda açlık periyodunda kontrol grubuna göre önemli oranlarda ( $P<0.003$ ) artış gözlemlendi. Sensomotor ve orbital bölgelerde ise azalma olduğu saptandı.

**Histolojik bulgular:** Kontrol grubunda sensomotor, limbik ve orbital bölgelerin 3. katlarının (afferent sinir hücreleri bölgesi) çoğunlukla orta büyüklükteki piramit nöronlardan oluştuğu gözlemlendi. Nöronların çekirdekleri sentrik

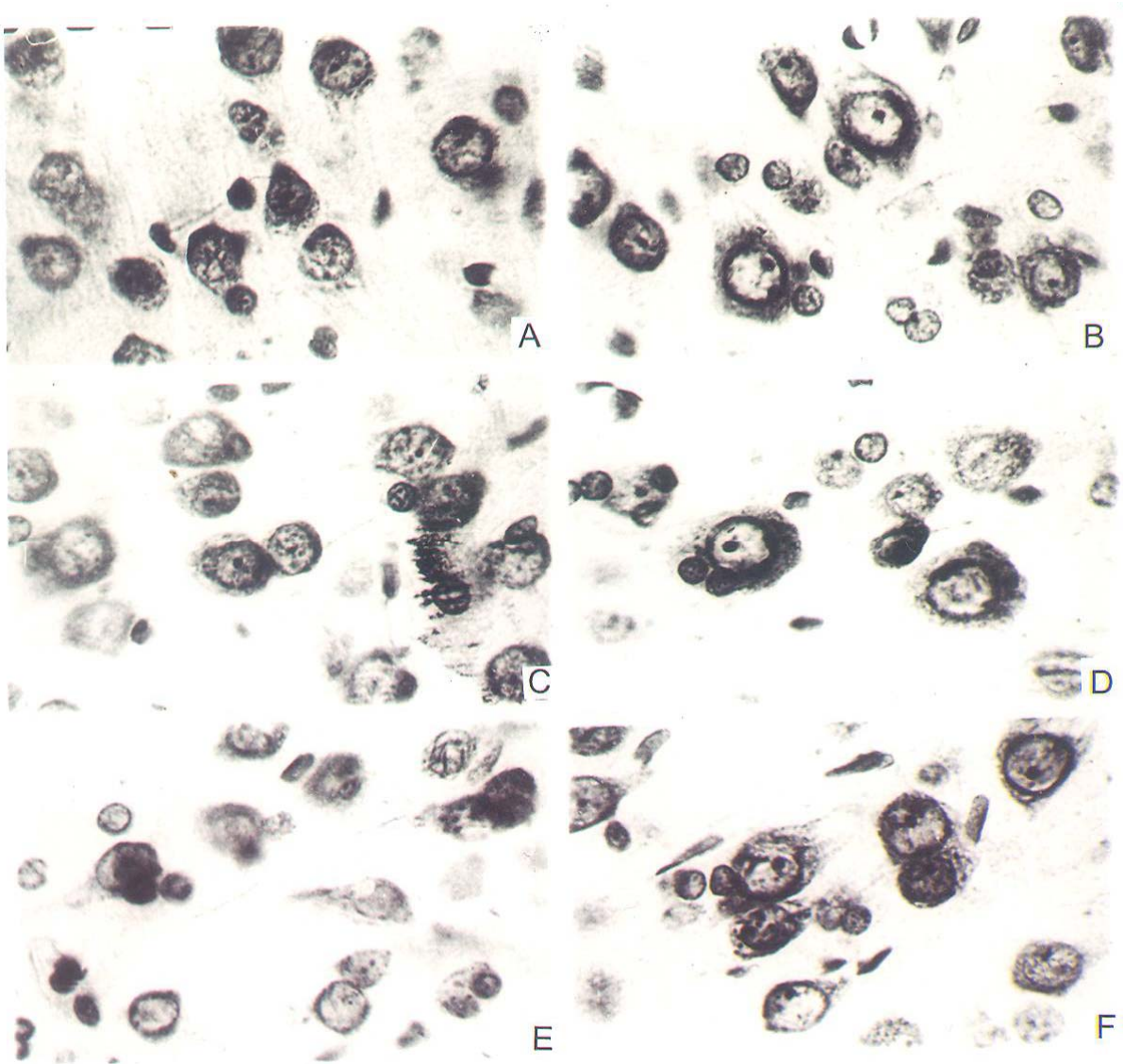
yerleşimliydi. Nissl cisimciği orta hacimli parçacıklardan oluşmuştu. Karyoplazma esasen çekirdeğin periferinde yerleştiği görülmüştür. Çekirdekçik nokta şeklinde ve çekirdeğin merkezinde bulunmaktaydı (Şekil 1. A,C,E). Bu bölgelerin 5. katları büyük piramidal nöronlardan oluştuğu tesbit edilmiştir. Bu nöronlar 2,3'er büyük, 3-5' er adet küçük piramit nöronlardan oluşan gruplar yapmışlardı. Büyük nöronların çevresinde yer yer astrositler ve oligodendrositler bulunuyordu, oligodendrositler limbik ve orbital bölgede sensomotor bölgeye göre daha çok olduğu gözlemlendi (Şekil 1. B,D,E).



**Şekil 1.** Kontrol grubunda sensomotor (A: 3. kat, B: 5. kat), limbik (C: 3. kat, D: 5. kat) ve orbital (E: 3. kat, F: 5. kat) bölgelerin histolojik görünümü. Cresyl-violet, X560.

Açlığın 7. gününde sensomotor ve limbik bölgelerin 3. katındaki histolojik değişikliklerin derinleştiği görüldü. Nöronlarda hiperkromatoz, ektopia ve hidropia belirlendi (Şekil 2. A,C). Orbital bölgede meydana gelen değişimler sensomotor ve limbik bölgenin 3. katındaki histolojik değişimlerden daha az olduğu tesbit edildi (Şekil 2. E). Sensomotor ve limbik bölgelerin 5. katında bazı nöronlarda hidropia, ökromatik çekirdek ve ektopia gözlemlendi. Bu katta da yine nörofaji gözlemlendi (Şekil 2. B,D). Orbital bölgede de aynı değişiklikler gözlemlendi fakat diğer bölgelere göre daha az olduğu saptandı (Şekil 2. F).





**Şekil 2.** Deney grubunda beyin korteksi bölümleri (Sensomotor, A,B; limbik, C,D; orbital, E,F). Cresyl violet, X560.

Ayrıca, açlığın 1-3 gününde şartlı refleks faaliyetinin arttığı görülmüştür. Açlığın 4. gününden itibaren refleks zayıflamaya başladı. 5-7. günlerinde refleks tamamen durdu. Bu durum hayvanların davranışında açıkça görülmüştür. Kendini aktif koruma refleksine karşı eğitim almış hayvanlarda açlığın 5-7. günlerinden sonra güçlü elektrik uyarıları verildiği zaman bile, hayvanlar sert bir şekilde hıçkırımlarına rağmen, bu durumdan kurtulma yönünde herhangi bir gayret göstermedikleri tesbit edilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hayvanların maksatlı davranışlarını (açlık, tokluk, susuzluk, cinsel dürtüler v.b.) sağlamak için, iç organlardan somato-visceral yollarla beyindeki özel merkezlere gelen farklı kodla kodlanmış bilgi uyarıları nörokimyasal sistemler aracılığı ile beyin korteksinin ön lobuna (frontal kabuk) gönderilir. Beyin korteksi, gelen uyarılar doğrultusunda maksatlı davranışları oluşturur [21]. Bu davranışlar lateral hipotalamustaki sensomotor ve limbik bölgeler arasında oluşan geçici ilişkilerle düzenlenir. Açlığın farklı dönemlerinde peptid hidrolazların, hipotalamusun çekirdeklerinde bulunan nöronların protein değişimini kontrol ettiği ileri sürülmüştür [22].

Rossi [23], rhombencephalon ve mesencephalon'un retikular merkezlerinden orbital kortekse daima inhibitör etkili sinyallerin geldiğini bildirmiştir. Bu inhibitör etkili anabolik faaliyetlerin arttığı ve NPH'ların katılımı ile proteinlerin bazik yenilenmeleri, normale göre daha yüksek olacağı kanısına varılmıştır.

Bir hafta açlıktan sonra sensomotor, limbik ve orbital bölge homojenitindeki NPH aktivitesi azalmıştı. Limbik, sensomotor ve orbital bölgelerin bütün fraksiyonlarında azalma gözlenmiştir. Ancak, kontrol grubuna kıyasla limbik bölgenin sitosölü ile orbital bölgenin çekirdek ve sitosölünde NPH aktivitesi artmıştı. Bu bulgulara göre, nötral proteinlerin yenileşme intensifliği ile bu bölgelerin morfo-fonksiyonları arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Qerşteyne göre de [24] sensomotor ve limbik bölgede nötral proteinlerin yenileşme intensifliği orbital bölgeye göre daha hızlıdır.

Açlığın süresi uzadıkça sensomotor bölgeden sonra ilk olarak limbik bölgede ve daha sonraki açlık günlerinde de orbital bölgede histolojik değişiklikler meydana gelmektedir.

Bu morfolojik değişimlerin beyin kabuğu nöronlarının sensomotor, orbital kortekste ve hipotalamusta düzenlenmesi ile ilgili olduğu bildirilmektedir [25,26]. Sensomotor bölgenin 5. katındaki büyük piramit nöronların çekirdeğinde görülen aktifleşme, glia hücrelerinin apikal dendritlere yakınlaşmasındandır. Bu sensomotor bölgenin bir integratif merkez olarak hayvanların maksatlı davranışların ve gıda motivasyonunun oluşmasından sorumlu olduğunu göstermektedir [21].

Açlığın 7. gününde sensomotor, limbik ve orbital bölgelerde açlığa bağlı oluşan histolojik değişimler derinleşerek devam etmektedir. Ancak, orbital bölgenin diğer iki bölgeye göre daha az etkilendiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bir hafta açlıktan sonra hayvanların beyin kabuğu kontrolü altındaki enerji merkezi daha yavaş iş yapma pozisyonuna geçmektedir. Dışardan gelen uyarılara refleks göstermeyerek ve daha az hareket ederek kendi varlığını devam ettirmek istedikleri anlaşılmıştır. Ayrıca, elde edilen verilere dayanarak peptidhidrolazların sinir dokusunda ve Merkezi Sinir Sisteminin fonksiyonel faaliyetlerinde önemli rol oynadığı, hücre içi sinaptik ve yapısal esnekliğin düzenlenmesinde görev yaptığı söylenilebilir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Haurowitz, F., The Chemistry and Function of Proteins Academic Press, New York and London, p.503, 1974.
2. Katiyar, G.P., Agarwal, K.N., Nagehaudhuri, J., Effect of protein energy malnutrition on neutral proteinase in devoloping rat brain., Indian, J. Exp. Biol., 16 (3): 365-6, 1978.
3. Nushiura, J., Tanaka, K., Murachi, T., A high molekular weight inhibitor of  $Ca^{2+}$ -dependent neutral protease in brain. Experienta, 15, 35 (8): 1006-7, 1979.
4. Brecher, A.S., The distribution and activity of calf brain peptidases. J. Neurochem, V. 10, No: 1, p. 1-6, 1963.
5. Marks, N., Datta, R.R., Lajtha, A., Distribution of amino acid and exo- and endopeptidases vertebrate and invertebrate nerves. J. Neurochem., 17, (1): 53-63, 1970.
6. Palladin, A.V., İzbrannie trudi. Naukova Dumka, Kiyev, s. 425, 1975.
7. Reddy, P.V., Sastry, P.S., Effect of undernutrition on the metabolism of phospholipids and gangliosides rat brain. - Brit. J., Nutr., V. 40, No:3, p.403-411, 1978.
8. Waswani, K.K., Sharma, M., Effect of neonatal undernutrition on rat brain gangliosides. Inst. J. Vitamin a. Nutr. Res., V. 55, No:3, p. 323-329, 1985.
9. Rosenberq, G.A., Navratil, M., Barone, F., Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. J. Cereb. Blood. Flow Metab, 16 (3): 360-6, 1996.
10. Auer, L., Brain protease activity after expeiimental head injury, J.Neurosurg. Sci., Jan-Mar; 23 (1): 23-8, 1979.
11. Marks, N., Stern, E., Lajtha, A., Chances in proteolytic enzymes and proteins during maturation of the brain. Brain Res., 21:86 (2): 307-22, 1975.
12. Khanna, A.S., Waisman, D.M., Hormones and their Actions. Part I (Ed Cooke B.A., King R.J.B., Molen N.U. Amsterdam: Elsevier Sci. Publishers B.V., p. 117-132, 1981.
13. Morgane, P.Z., Wayner, M., Neuronal regulation of food and water intake meeting report. Physiol. Behaviour, 3 (5): 803-807, 1968.

