



ADÖLESAN SIÇAN BEYNİNDE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ VE LİPİD PEROKSİDASYON DÜZEYLERİ

ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES AND LIPID PEROXIDATION LEVELS IN ADOLESCENT RAT BRAIN

Nazan UYSAL Sevil GÖNENÇ Ataç SÖNMEZ İlkay AKSU Ayça TOPÇU
Berkant Muammer KAYATEKİN Osman AÇIKGÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir 35340, TÜRKİYE

Anahtar Kelimeler : Dopamin, Prefrontal korteks, Hipokampus, Striatum, Süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz, Lipit peroksidasyon, adölesans, sıçan.

Key words: Dopamine, Prefrontal cortex, Hippocampus, Striatum, Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, Lipid peroxidation, adolescence, rat

ÖZET

Şizofreni, madde bağımlılığı, anksiyete, depresyon gibi pek çok hastalığın adölesans döneminde ortaya çıktığı bilinmektedir. Adölesan beyni nörotransmitter sistem, dopaminerjik sistem, yapı ve fonksiyonu bakımından adölesandan önceki ve sonraki dönemden farklıdır. Adölesans döneminde prefrontal korteks ve hipokampusta dopamin metabolizması artarken striatumda azalır. Dopamin metabolizmasındaki artış reaktif oksijen türlerinde artışa neden olarak oksidatif stresi tetikleyebilir.

Bu çalışmanın amacı adölesan öncesi, adölesan ve erişkin sıçan prefrontal korteks, striatum ve hipokampusunda süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz enzim aktiviteleriyle lipit peroksidasyon göstergesi olan tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin düzeylerinin araştırılmasıdır. Çalışmada 21 günlük (adölesan öncesi), 38 günlük (adölesan) ve 6 aylık (adölesan sonrası) sıçanlar kullanılmıştır.

Bu çalışmada adölesan sıçanların prefrontal korteks ve hipokampusunda süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ve tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin düzeyleri artarken glutasyon peroksidaz aktivitesinin azalmış olduğu görüldü. Adölesan striatumunda ise süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin ve tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, adölesan sıçan beyninde prefrontal korteks ve hipokampus bölgelerinin diğer dönemlere göre oksidan strese karşı daha savunmasız olduğunu düşündürmektedir.

ABSTRACT

It is known that adolescence is a period in which symptoms mood disorders such as anxiety and depression or psychoses such as schizophrenia or behavioral abnormalities such as drug abuse mostly emerge in the individual. Adolescent brain differ from pre and post adolescence in regard to neurotransmitter systems such as the dopaminergic system, as well as in organization and function. In adolescence, dopamine metabolism increases in prefrontal cortex and hippocampus, while it decreases in striatum. Increased metabolism of dopamine may evoke an oxidative stress derived from increased production of reactive oxygen species.

The present study was designed to determine the superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activities and thiobarbituric acid reactive substances levels, an indicator of lipid peroxidation, in prefrontal cortex, hippocampus and striatum of 21 days old (pre-adolescents), 38 day old (adolescent) and 6 months old (post-adolescents) rats.

We demonstrated that superoxide dismutase activity and thiobarbituric acid reactive substances levels increased in, but glutathione peroxidase activity decreased in prefrontal cortex and hippocampus of adolescent rats compared with other ages. In striatum, superoxide dismutase activity and thiobarbituric acid reactive substances levels decreased in adolescents compared with pre and post-adolescents. These results suggest that prefrontal cortex and hippocampus of adolescent rats may be more defenseless to oxidative stress, compared to other ages.

Yazışma adresi: - Nazan UYSAL, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Fizyoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir 35340, TÜRKİYE

Makalenin geliş tarihi : 24.03.2005 ; kabul tarihi : 27.04.2005

GİRİŞ

Beyin gelişimi intrauterin dönemde başlar ve adölesan dönemin sonuna kadar devam eder. Beyin, gelişimi sırasında çevresel etkenlere daha duyarlıdır (1). İnsanlarda görülen pek çok hastalık sıklıkla adölesans döneminde başlar (2). Preklinik çalışmalarda pek çok faktörün adölesans dönemde beyin yapısı ve fonksiyonunda uzun süreli değişikliklere yol açabileceği; bu değişikliklerin sıçan, fare ve primatlarda şizofreni, madde bağımlılığı, anksiyete ve depresyonun etiolojisiyle ilişkili olabileceğini göstermiştir (2, 3, 4). İnsanlarda görülen adölesana özel pek çok nöro-davranışsal değişiklikler aynı yaşlardaki sıçanlarda da görüldüğünden adölesans dönemi çalışmaları rahatlıkla sıçanlar üzerinde yapılabilmektedir. Spear ve Brake adölesan dönemini seksüel matürasyonun olduğu dönem olarak tanımlamışlar ve bu döneme özgü davranışsal ve psikofarmakolojik değişiklikler görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu kriter doğrultusunda sıçanlarda adölesan dönemi doğumdan sonra yaklaşık 30 ile 42. günler arasında uymaktadır (5). İnsanlarda ve diğer hayvanlarda adölesans dönemi boyunca fiziksel büyüme genelde pek çok kognitif yeteneği de içeren zihinsel kabiliyetlerde gelişimle birlikte gider (2, 3). Yüksek kognitif fonksiyonlarla ilişkili bir beyin bölgesi olan prefrontal korteks (PFC) adölesans dönemi boyunca önemli ölçüde değişime uğrar (6). Kemirgenlerde adölesans dönemi boyunca hipokampus ve striatum gibi diğer beyin bölgelerinde de değişiklikler olur (7, 8).

Merkezi sinir sisteminin çalışması sırasında ve fizyolojik metabolik reaksiyonlarda süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Süperoksit radikali süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksite dönüştürülür. Hidrojen peroksit ise glutatyon peroksidaz (GPx) veya katalaz enzimi tarafından suya dönüştürülür (9). Beyinde katalaz peroksizomlarda bulunur ve aktivitesi çok düşüktür (10). Bu nedenle sinir sisteminde oluşan hidrojen peroksitin zararsız hale getirilmesinden temel olarak GPx sorumludur (11). Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit, demir ve bakır gibi metallerle tepkimeye girerek hidroksil radikale dönüşür; bu tepkime Fe içeriği zengin olan sinir sistemi hücrelerinde oksidan stres oluşumu açısından önemlidir. Hidrojen peroksit tüm zarları kolaylıkla geçtiğinden kaynaklandığı bölgeden daha uzaklarda da hidroksil radikali oluşumuna neden olabilir. Hidroksil radikali bilinen en zararlı serbest radikal olup hücredeki tüm moleküllerle tepkimeye girerek, hücre ölümüne dek gidebilen zararlar verebilir. Hidroksil radikalının lipitlerle tepkimeye girmesi sonucu lipid peroksidasyonu oluşur. Lipid peroksidasyonu zarın ve hücrenin işlevini bozar. Beyin antioksidan enzim aktivitesinin düşük olması ve kolaylıkla peroksit olabileceği poliansatüre yağ asitlerinin fazla olması nedeniyle diğer dokulara göre oksidatif strese daha duyarlıdır (9). Dopaminerjik sistem adölesan dönemi süresince yeniden

organize olur. PFC ve striatal veya diğer mezolimbik terminal bölgeler arasında oluşan gelişimsel değişikliklerle dopaminerjik aktivitenin dengesinde görece olarak değişiklik meydana gelebilir. İnsan dışı primatlarda ve sıçanlarda PFC'ye dopamin girdisi adölesans süresince artarak daha önceki ve daha sonraki döneme göre pik yapar (7, 9). Dopaminin ootoksidasyonu ve monoamino oksidaz enzimi tarafından metabolizması sırasında ROS oluşur (13). Kuramsal olarak adölesans dönemindeki dopamin metabolizmasındaki artış, ROS üretimini çoğaltarak oksidan strese neden olabilir.

Bu çalışmanın amacı adölesan öncesi, adölesan ve erişkin sıçan beyininin hipokampus, prefrontal korteks ve striatum bölgelerinde SOD ve GPx enzim aktiviteleriyle lipit peroksidasyon göstergesi olan tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeleri TBARS düzeylerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış olan bu çalışmada 21 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Çalışmada üç deney grubu oluşturuldu: 1) 21 günlük (adölesan öncesi dönem) (n=7), 2) 38 günlük (adölesan) (n=7), 3) 6 aylık (adölesan sonrası dönem) (n=7).

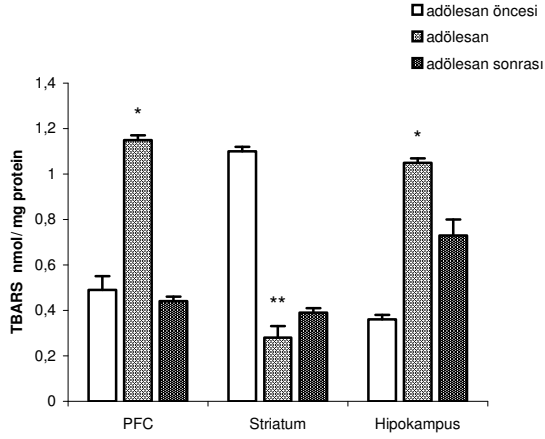
Sıçanlar eter anestezisinin ardından servikal dislokasyonla öldürülerek hızla beyinleri çıkarıldı. Buzla soğutulmuş zeminde hipokampus, striatum ve prefrontal korteks dokuları ayrıldı. Dokular soğuk homojenat sıvısıyla yıkanarak kanla bulaşmaları en aza indirildi. Doku homojenatları ve süpernatantlar hazırlandı (14). Homojenat ve süpernatantlar TBARS düzeyleri, SOD ve GPx enzim aktiviteleri ölçülene dek -85 °C'de saklandı. Tüm ölçümler 10 gün içinde yapıldı.

Süpernatantların SOD aktivitesi RANSOD kiti (Randox Labs., Crumlin, UK) kullanılarak saptandı. Süpernatantların GPx aktivitesi RANSEL kiti (Randox Labs., Crumlin, UK) kullanılarak saptandı (15). SOD ve GPx enzim aktiviteleri U/mg protein olarak gösterildi. Homojenatların TBARS düzeyleri Rechnera ve ark.'na göre saptandı (16). TBARS düzeyleri nmol/mg protein olarak gösterildi. Süpernatant ve homojenatların protein konsantrasyonları U/CSF protein kiti (Randox Labs., Crumlin, UK) kullanılarak saptandı.

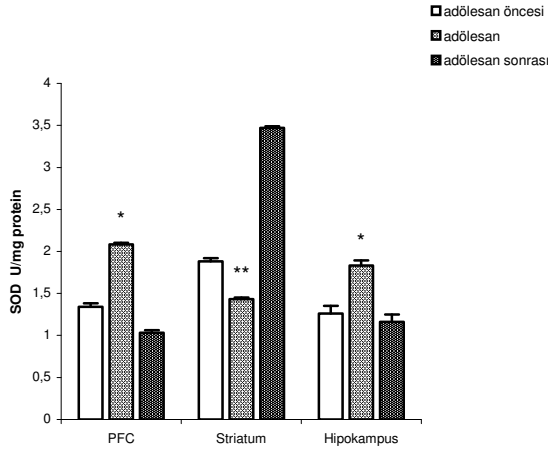
Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. Verilerin istatistik analizi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Varyans analizinden sonra gruplar arasındaki farklılıklar Scheffe testi ile saptandı.

BULGULAR

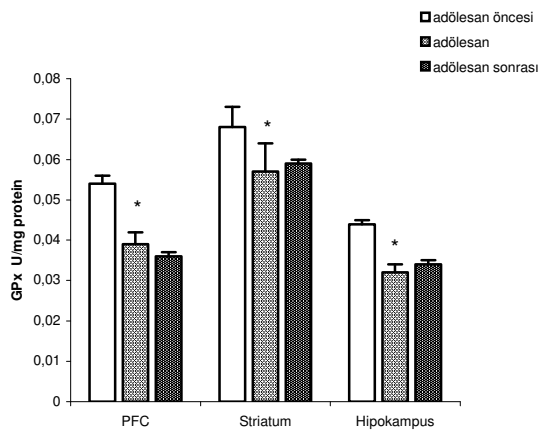
Bu çalışmada lipid peroksidasyonun göstergesi olan TBARS düzeyleri PFC ve hipokampusta adölesans döneminde diğer dönemlere göre daha yüksek bulunurken striatumda daha düşük bulundu.



Şekil 1. Grupların TBARS düzeyleri. * $p < 0.001$ diğer gruplara göre yüksek, ** $p < 0.001$ diğer gruplara göre düşük.



Şekil 2. Grupların SOD enzim aktivitesi. * $p < 0.001$ diğer gruplara göre yüksek, ** $p < 0.001$ diğer gruplara göre düşük.



Şekil 3. Grupların GPx enzim aktiviteyi. * $p < 0.001$ adölesan öncesi döneme göre düşük.

(Şekil 1). SOD aktiviteleri PFC ve hipokampusta adölesans döneminde diğer dönemlere göre daha yüksek bulunurken striatumda daha düşük bulundu (Şekil 2). GPx aktiviteleri adölesans dönemde her üç bölgede de adölesans öncesi döneme göre düşük bulundu. GPx aktivitelerinde adölesans dönemi ve sonrası arasında fark saptanmadı (Şekil 3).

TARTIŞMA

Bu çalışmada PFC ve hipokampusta adölesans döneminde SOD enzim aktivitesi diğer dönemlere göre daha yüksek düzeylerde bulunmuştur. SOD aktivitesindeki artış süperoksit radikallerinin konsantrasyonundaki artışı savunmaya yönelik olarak ortaya çıkabilir. SOD süperoksit radikallerini hidrojen peroksit indirger. Hidrojen peroksit GPx tarafından indirgenmezse bakır ve demir gibi metallerle reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur. SOD aktivitesindeki artışın adaptif olarak GPx aktivitesinde de artışa neden olduğu bilinmektedir (17, 18). Bununla birlikte insan beyni (19) ve fare beyinde yapılan çalışmalarda SOD aktivitesindeki artışın GPx aktivitesinde artışa neden olmadığı gösterilmiştir (20). GPx aktivitesinde artış olmaksızın SOD aktivitesindeki artışın lipid peroksidasyonuna neden olduğu aynı çalışmalarla gösterilmiştir (19, 20). Bu çalışmada elde edilen PFC ve hipokampusta SOD aktivitesinde artış, GPx aktivitesinde azalma ve TBARS düzeylerinde artış, belirtilen mekanizma ile uyum göstermektedir. Adölesanların nörobiyolojik açıdan erişkinlerden farklı olduğu bilinmektedir. PFC adölesans dönemi boyunca hacmi azalarak yeniden şekillenir. İnsan dışındaki primatlarda adölesans dönemi boyunca PFC'ye dopamin girdisi daha önceki ve daha sonraki döneme göre artarak pik yapar (2). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar adölesan sıçanlarda antioksidan savunma sisteminin adaptif yanıtının yetersiz olabileceğini göstermektedir, bu nedenle adölesan PFC ve hipokampusu dış veya iç etkenlerden kolaylıkla etkilenebilir. Araştırmalar adölesan dönemde PFC, hipokampus veya diğer limbik bölgelerde gelişim dönemindeki çeşitli etkilerle şizofreni, alkol ve madde bağımlılığı gibi hastalıkların başlamasının mümkün olduğunu göstermektedir (8, 21, 22).

Bu çalışmada PFC ve hipokampusta adölesans döneminde SOD enzim aktivitesi diğer dönemlere göre daha yüksek düzeylerde bulunurken, GPx düzeyleri tam tersi olarak düşük bulunmuştur. Süperoksit radikallerinin aşırı artışı GPx aktivitesinde düşmeye neden olabilir. Blum ve Fridovich in vitro bir çalışmada süperoksit radikallerinin GPx' i inaktive ettiğini göstermişlerdir (23). Striatumun nöral organizasyonu ve matürasyonu adölesans dönemi boyunca devam eder. Sıçan striatumunda bazal dopamin sentezi, dopamin metabolizması adölesanlarda erişkinlere göre daha düşüktür (2). Bilindiği gibi memeli sinir sisteminde bulunan uyarıcı aminoasitlerden olan glutamatın reseptörlerinden biri N-methyl-D-aspartate (NMDA)' dir. Sıçanlarda NMDA glutamat reseptörleri erken adölesanda (doğumdan sonra 28. günde) pik yapar, erişkinlerde bu reseptörlerin yaklaşık üçte biri yok olur (24). NMDA resept-

törlerinin uyarılması hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırarak mitokondrial süperoksit radikali oluşumunu artırır (25, 26, 27). Ayrıca glutamatın striatumda dopamin salınımını engelleyici etkisi gösterilmiştir (27). Süperoksit radikallerinin artışı mitokondrial hasara neden olabileceğinden savunma olarak SOD aktivitesini uyarımlı olabilir. Bu çalışmadaki adölesan sıçan striatumundaki SOD aktivitesindeki azalma, dopamin metabolizmasındaki azalmaya bağılı olarak daha az serbest radikal üretilmesinden kaynaklanabilir.

Özetle, bu çalışmada adölesan PFC ve hipokampusunda SOD aktivitesi ve TBARS düzeyleri artarken GPx aktivite-

sinin azalmış olduğu görüldü. Adölesan striatumunda ise SOD ve GPx enzim aktivitelerinin düşük olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar adölesan sıçan beyrinde PFC ve hipokampus bölgelerinin diğer dönemlere göre oksidan strese karşı daha savunmasız olduğunu göstermektedir. Bizim bilgilerimize göre bu çalışma adölesan sıçan beyrinin oksidan savunma durumunun adölesan öncesi ve sonrası dönemle karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Antioksidan enzimlerdeki yaşa bağılı oluşan değişiklikler karışık bir konu olup, içerdiği mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca cinsiyete bağılı farklılıklarda araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. D. Rice and B.J. Stan, Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 2000; 108: 511-533.
2. Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci and Biobehav Rev* 2000; 24: 417-463.
3. Graber JA, Petersen AC. Cognitive changes in adolescence: biological perspectives. In: Gibson KR, Petersen AC (eds), *Brain maturation and cognitive development: comparative and cross cultural perspectives*, New York, 1991.
4. James D. Belluzzi, Alex G. Lee, Heather S. Oliff, et al. Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology* 2004; 174: 389 - 395
5. Spear LP, Brake SC. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol* 1983; 16: 83-109.
6. Diamond A. Evidence for the importance of dopamine for prefrontal cortex functions early in life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; 351: 1483-1493.
7. Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC Jr. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Dev Brain Res* 1995; 89: 167-172.
8. Wolfer DP, Lipp HP. Evidence for physiological growth of hippocampal mossy fiber collaterals in the guinea pig during puberty and adulthood. *Hippocampus* 1995; 5: 329-40.
9. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-1623.
10. Gaunt GL, de Duve C. Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain. *J Neurochem* 1976; 26: 749-59.
11. Sinet PM, Heikkilä RE, Cohen G. Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. *J Neurochem* 1980; 34: 1421-1428.
12. Kalsbeek A, Voorn P, Buijs RM, et al. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol* 1988; 269: 58-72.
13. Graham, DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 1978; 14: 633-643.
14. Carrillo MC, Kanai S, Nokubo M, Kitani K. (-) deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci* 1991; 48: 517-521.
15. Paglia, De, Valentine, WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
16. Rehnrota S, Smith DS, Akesson B, et al. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1980; 34: 1630-1638.
17. Ceballos I, Delabar JM, Nicole A, et al. Expression of transfected human CuZn superoxide dismutase gene in mouse L cells and NS20Y neuroblastoma cells induces enhancement of glutathione peroxidase activity. *Biochim Biophys Acta* 1988; 949: 58-64
18. Kelner MJ, Bagnell R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. Explanation for variations in paraquat resistance. *J Biol Chem.* 1990; 265: 10872-5.
19. Brooksbank BW, Balazs R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Brain Res.* 1984; 318:37-44.
20. de Haan JB, Newman JD, Kola I. Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992; 13: 179-87.
21. Lipska BK, Weinberger DR. Cortical regulation of the mesolimbic dopamine system: implications for schizophrenia. In: Kalivas PW, Barnes CD, editors. *Limbic motor circuits and neuropsychiatry*, Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.

22. White AM, Swartzwelder HS. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1021: 206-20.
23. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* 1985; 240: 500-8.
24. T.R. Guilarte, The N-methyl-D-aspartate receptor: physiology and neurotoxicology in the developing brain. In: W. Slikker, Jr. and L.W. Chang, Editors, *Handbook of developmental neurotoxicology*, Academic Press, San Diego, CA 1998; 285–304.
25. Shahraki A, Stone TW. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci.* 2004; 24: 6049-56.
26. Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, Akaike A, and Shimohama S. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca²⁺ overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca²⁺ influx. *J Neurosci Res.* 2001; 63: 377-387.
27. Vergun O, Sobolevsky AI, Yelshansky MV, Keelan J, Khodorov BI, and Duchon MR. Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture. *J Physiol (Lond)* 2001; 531: 147-163.