

Dr. Meral YÜKSEL¹
Dr. Goncagül HAKLAR
Dr. A. Süha YALÇIN

DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ*

REACTIVE OXYGEN SPECIES AND NITRIC OXIDE IN EXPERIMENTAL ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

ÖZET

Yaşlı toplumu etkileyen önemli bir nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığının etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak, pek çok araştırmada Alzheimer hastalığının serbest radikal oluşumunu neden olduğu ileri sürülmüştür. Öte yandan, sinaptik organizasyonun korunduğu özel bir kültür yöntemi olan organotipik kesit kültürleri canlı beyin kesitlerinin özel filtreler üzerine yerleştirilmesi ile elde edilmektedir. Bir bitki alkaloidi olan kolşisin, mikrotübül depolimerizasyonuna neden olarak aksonal transportu inhibe eder. Kolşisin izomeri olan lumikolşisin ise bu etkiyi gerçekleştirmediğinden, deneysel modellerde kontrol amacıyla kullanılmaktadır. Çalışmamızda, organotipik hipokampal kesit kültürlerinin kolşisin ile muamele edilmesiyle oluşturulan *ex vivo* Alzheimer hastalığı modelinde, reaktif oksijen türleri (ROT) ile nitrik oksit (NO) düzeyleri ölçüldü. Sıçan beyninden elde edilen canlı hipokampal kesitler 20 gün süreyle kültür ortamında takip edildi. Ardından kültür ortamına kolşisin (10mM) ve lumikolşisin (10mM) eklenerek ROT ve NO düzeyleri kemilüminesans yöntemiyle ölçüldü. Kemilüminesans yöntemi için farklı serbest radikallere duyarlı olan luminol (0.2 mM) ve lusigenin (0.2 mM) problemlerinden faydalandı. NO ölçümü için luminol-H₂O₂ sistemi kullanıldı. Hücre hasarının tesbiti kültür ortamlarında laktat dehidrogenaz (LDH) ölçümü ile yapıldı. Ayrıca, kesitler trifeniltetrazolyum klorür (TTC) ile boyanarak hücre hasar oranı saptandı. Bulgularımız, oluşturulan *ex vivo* Alzheimer hastalığı modelinde ROT ve NO'nun kolşisin grubunda lumi-kolşisin grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığını gösterdi. Kültür ortamlarındaki LDH düzeyleri kolşisin grubunda 89.3 ± 23.3 U/mL, lumikolşisin grubunda 56.2 ± 13.4 U/mL olarak saptandı. Bunun yanı sıra, TTC yöntemiyle belirlenen hücre kaybının % 82.5 ± 4.9 olduğu hesaplandı. Kolşisinle oluşturulan deneysel Alzheimer hastalığı modelinde gözlenen serbest radikal düzeylerindeki artış, aksonal dejenerasyonla birlikte mitokondriyal enerji metabolizmasının bozulabileceğini, membran fosfolipitlerinin peroksidasyona açık hale gelebileceğini ve nöronal nitrik oksit sentaz ekspresyonunun artabileceğini düşündürmektedir. LDH ve TTC ölçümleriyle elde edilen sonuçlarımız serbest radikal artışı bulgularımızı desteklemektedir. Sonuç olarak, organotipik hipokampal kesit kültürlerinin deneysel Alzheimer hastalığı modelleme çalışmalarında kullanılabileceğini gösteren bu çalışmamız, kolşisinle oluşturulan modelde hem serbest radikallerin hem de NO'nun arttığını ve bu artışların Alzheimer hastalığındaki önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, Hipokampus, Kolşisin, Nitrik oksit, Organotipik kesit kültürü, Serbest radikaller.

SUMMARY

Alzheimer's disease is an important neurodegenerative disease which affects the aging population. The etiology of Alzheimer's disease is still un-certain. However, a number of studies show that Alzheimer's disease is associated with free radical generation. On the other hand, organotypic slice culture technique is a specific method with the characteristics of synaptic organization. In this method, freshly isolated brain slices are carefully transferred to sterile membrane units and kept in a tissue culture incubator. Colchicine is a plant alkaloid which blocks axonal transport by microtubule depolymerization. Lumicolchicine, an isomer of colchicines, fails to mimic this effect and is used for control groups. In this study, we have determined the levels of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in an experimental model of Alzheimer's disease which was induced by adding colchicine to organotypic hippocampal slice cultures. Freshly isolated hippocampal slices were incubated in a culture flask for 20 days. At the end of this time, colchicine (10mM) or lumicolchicine (10mM) was added to the culture medium and chemiluminescence measurements were made using different probes for ROS and NO, Luminol (0.2 mM) and lucigenin (0.2 mM) were used as chemiluminescence probes for the detection of different free radical species. NO measurements were performed by luminol-H₂O₂ system. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture medium and triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining of hippocampal slices were used for determining neuronal cell loss. In our experimental Alzheimer's disease model, increased ROS and NO levels were determined in the colchicine group as compared with the lumicolchicine group. LDH activity in the culture medium was 89.3 ± 23.3 U/mL in the colchicine group and 56.2 ± 13.4 U/mL in lumicolchicine group. The neuronal cell loss was found to be 82.5 ± 4.9 % with the TTC method, in our experimental Alzheimer's disease model, we have shown increased free radical generation following axonal degeneration. Therefore, we conclude that colchicine can inhibit the mitochondrial energy metabolism, induce membrane phospholipid peroxidation and expression of neuronal nitric oxide synthase. Our results with LDH activity and TTC measurements supported the free radical generation in this system. In conclusion, treatment of organotypic hippocampal slice cultures with colchicine, which results in increased levels of ROS and NO, can be used to model Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's disease, Colchicine, Free radicals, Hippocampus Nitric oxide, Organotypic slice culture.

Geliş: 01/10/2001

Kabul: 14/02/2002

* Bu çalışma Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1998/SA-33

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 81326 Haydarpaşa İstanbul

İletişim: Prof. Dr. A. Süha Yalçın, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 81326 Haydarpaşa İstanbul

Tel: 0 (216) 414 47 33

Fax: 0 (216) 418 10 47

e-mail: asyalcin@superonline.com

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı, dikkat ve oryantasyon kaybı ile seyreden, kavranın, hafıza, motor ve sensör yeteneklerin yavaş yavaş kaybedildiği, progresif bir dejeneratif hastalıktır.^{23,24} Gelişmiş ülkelerde, yaşlı nüfusun fazlalığı nedeniyle, Alzheimer hastalarının tanı ve tedavisi büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Alzheimer hastalığı 65 yaş üstü kişilerde % 5 sıklıkla görülür ve 4-10 yıl içinde ölümlü sonuçlanır.³ Tanısı için etkin bir biyokimyasal yöntem yoktur. Ancak, postmortem beyin dokusunun patolojik incelemeleri ile Alzheimer hastalığına özgü plak ve oluşumlar saptanmaktadır.^{1,24} Alzheimer hastalığının ileri yaşlarda özel patolojik değişikliklerle görülmesi ve etiolojisinin aydınlatılamaması nedeniyle, hastalığa karşı etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi de zor olmaktadır.

Pek çok araştırmada, Alzheimer hastalığının serbest radikal oluşumuna neden olduğu ileri sürülmüştür.^{13,17,24} Aralarında, canlılarda yaşamsal önemi olan, oksijenin bazı ara bileşiklerinin de bulunduğu serbest radikaller hücre düzeyde toksik etki gösterirler. Reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan bu bileşikler farklı yöntemlerle tesbit edilebilirler. Kemilüminesans yöntemi ROT'un ölçümü için kullanılan direkt ve noninvazif bir yöntemdir. Kemilüminesans ekzotermik oksidatif reaksiyon gösteren organik bileşiklerin genel bir özelliğidir ve ışık yayılmasını ifade eder Luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione) ve lusigenin (bis-N-methylacridinium nitrate) ROT gibi oksidanlarla tepkimeye girerek, sırasıyla '3-aminophthalate' ve 'N-methylacridone' oluşturarak ışık yayarlar.⁹

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalığı'na uygun histopatoloji ve davranış özellikleri gösteren bir hayvan modeli geliştirilememiştir. Vickers²⁵ kortikal aksonlara uygulanan fiziksel hasarların erken Alzheimer hastalığı benzeri nöronal patolojiler oluşturduğunu belirtmiştir. Fiziksel olarak hasarlandırılan bu aksonların stereotipik görünümde lezyon oluşturdukları saptanmıştır. Hasar bölgesinin distal ucunda, akson terminallerinde nörofilamentlerin anormal polimerizasyonu ile halka şeklinde oluşumlar ' *Wallerian dejenerasyonu*' olarak tanımlanmıştır.¹² Ginn ve Peterson,^{7,8} akson mikrotübüllerinin işlevini bloke eden ve kolinerjik hücre ölümüne neden olan kolşisin uygulamalarını, kimyasal bir hasar etkeni olarak, Alzheimer hastalığı benzeri model oluşturmak üzere önermiştir.

Aksonal transport, mikrotübül depolimerize edici bir ajan olan kolşisin ile bloke edilebilmektedir.^{2,7,8,18} Bu bitki alkaloidi, sinir hücrelerinin fonksiyonel etkilerini azaltarak, özellikle sempatik sinirlerde, aminlerin depolandığı veziküllerin transportunu engellemektedir. Nörondaki bağlanma, sinir terminalleri ile kendi aksonları arasındaki cevapsızlığa neden olarak, sinaptik transmisyonu presinaptik alanda engellemektedir. Lumikolşisin ise tu-buline bağlanmamakta ve mikrotübüllerle etkileşime girmemektedir.¹⁸ Böylece kolşisinin, aksonal tranportu engellemeyen, bir

izomeri olarak kontrol gruplarının oluşturulmasına katkıda bulunmaktadır.

Organotipik hipokampal kesit kültürleri, nöronlar arası sinap-tik yapının korunduğu özel bir kültür tekniğidir. Kesitlerin yapısal organizasyonunda bir değişiklik yapılmadığından, sürekli kesit gereken elektrofizyolojik, farmakolojik v.b. çalışmaların yapılabilmesi için geliştirilmiş bir *ex vivo* yöntemdir.^{6,19} Bu model nöronal rejenerasyonu incelemek için çok uygundur.

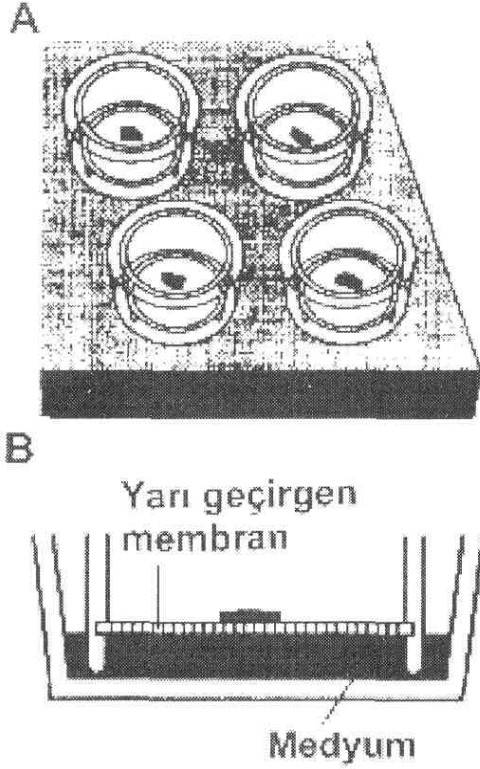
Çalışmamızda deneysel Alzheimer hastalığı modeli olarak, organotipik hipokampal kesit kültürlerine kolşisin uygulandı ve bu modelde ROT ile nitrik oksit (NO) düzeylerindeki değişiklikler araştırıldı. Ayrıca, sonuçlar nörodejeneratif hasarın gösterilmesi için önerilen trifeniltetrazolyum klorür r boyaması ve kültür ortamına laktat dehidrogenaz enziminin salınımı ile karşılaştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasal Maddeler: Çalışmamızda kullanılan çözeltiler için gerekli kimyasallar MERCK (Almanya) firmasından temin edildi. Luminol, lusigenin, horse serum, Hank's solution, trifeniltetrazolyum klorür (TTC), kolşisin ve lumikolşisin Sigma (A.B.D.)'den; laktat dehidrogenaz kiti Medi Sis (Fransa)'den; MEM-Hepes Gibco BRL (A.B.D.)'den; Millicell kültür filtreleri ('pore' aralığı 0. 4 mm ve 12 mm çaplı) ile Millex GP ('pore' aralığı 0, 22 mm) filtreleri Millipore (A. B. D.)'den temin edildi.

Hipokampal Kesitlerin Elde Edilmesi: Çalışmamızda 7-15 günlük dişi Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar dekapite edildikten sonra çıkarılan beyin dokusu ön ve arka beyin bölgelerinden 1-2 mm kalınlığında kesildi. Elde edilen bloklar özel yapıştırıcılarla doku kesitleyicisine (Campden Instruments, İngiltere) yerleştirildi. Daha sonra üzerlerine yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS: 12.5 mM NaCl.3. 75 mM KCl. 1.2 mM NaH₂PO₄.1. 3 mM MgCl₂.2.0mM CaCl₂. 10.0 mM D-glukoz. 26. 0 mM NaHCO₃) eklendi, doku kesitleyicisi ile 400 mm kalınlığında hipokampal kesitler alındı ve yBOS'da karbojen (% 95 O₂ ve % 5 CO₂) ile aere edildi. Kesitleme işleminin ardından hipokampal bölgeler korteksinden ayrıldı ve transversal hipokampal kesitler dinlenme durumuna geçmeleri amacıyla 45 dakika aere edildi.

Kesit Kültürleri: Elde edilen kesitler 24 kuyulu kültür kaplarına yerleştirilmek üzere steril ortama aktarıldı. Kültür kaplarına önce transparan ve düşük ağırlıklı proteinleri bağlama özelliğine sahip membranlar ve ardından özel fırçalarla alınan kesitler yerleştirildi^{6,19} (Şekil 1). Her filtreye bir kesit olacak şekilde dağıtım tamamlandıktan sonra 300 mL kültür ortamı (MEM-HEPES: Horse Serum: Hank's solution; 2:1:1. v/v) filtre ile kültür kuyucuğu arasında kalacak şekilde eklendi ve kesitler karbondioksitti etüvde saklandı. Kesit kültürleri 3 hafta süreyle yakın takibe alınarak her gün mikroskop altında incelendi ve medyumları 3 günde bir olmak üzere değiştirildi.



ŞEKİL 1. Organotipik Kesit Kültürünün Şematik Gösterimi.
 (A) Kesitlerin kültür kaplarındaki görünümü
 (B) Kesitin yarı geçirgen membran üzerindeki yerleşimi.

Kolşisin ve Lumikolşisin Uygulaması: Bu amaçla kesit kültürlerinin medyumları tazelenildi ve kültür ortamı içerisine final konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde kolşisin veya lumikolşisin eklendi,^{2,10,18} inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi. İnkübasyon sonunda kesit kültürlerinin medyumları saklandı ve kesitler filtreleriyle birlikte kemilüminesans ölçümleri yapılmak üzere steril ortamdan çıkarıldı.

Kemilüminesans Ölçümleri: İnkübasyon süresini tamamlayan kesitler 3 mL Hank's ve HEPES tamponu (200 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 10 mM D-glukoz, 15 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, pH 7.2) içeren sayım şişelerine aktarıldı. Kemilüminesans ölçümleri luminol ve lusigenin probrları kullanılarak yapıldı (9.26). Bu yöntemde lusigenin aracılı ölçüm ile süperoksit radikali (O₂⁻) saptanırken, luminol aracılı ölçüm ile hidroksil (OH₂) hidrojen peroksit (H₂O₂), hipoklorik asit (HOCl) ve hidroperoksil (HO₂) radikalleri saptanabilmektedir (5). Luminol (0.2 mM) ve lusigenin (0.2 mM) probu eklenen sayım şişeleri sıvı sintilasyon sayacında 15 dakikalık aralıklarla iki saat süreyle okutuldu.²⁶ Nitrik oksit (NO) ölçümü için saflaştırılmış lüminol-H₂O₂ sistemi kullanıldı.¹¹ Bu amaçla, 6 mL Hank's + HEPES tamponu içine alınan kesitler üzerine sırasıyla K₂CO₃ (400

mM), desferal (60 mM), H₂O₂ (2 mM) ve saflaştırılmış luminol (3.6 mM) eklendi. Sayımlar sıvı sintilasyon sayacında (TRI-CARB 1500, Packard, A. B. D.) 'out of coincidence' programında gerçekleştirildi. Sayımlardan sonra kesitler sayım şişelerinden alındı, filtre kağıdına emdirildikten sonra kuru ağırlıkları belirlendi. Sonuçlar AUC cpm/mg doku cinsinden ifade edildi.

Laktat Dehidrogenaz Aktivitesinin (LDH) Ölçümü: Kesitlerde kolşisin veya lumikolşisin uygulaması sonucu oluşan hasarın biyokimyasal belirteci olarak kültür ortamında LDH aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu yöntem ile pirüvattan laktat oluşurken azalan NADH'nin absorpsansı 340 nm dalga boyunda 3 dakika süreyle takip edildi, ortalama absorpsans farkı faktör ile çarpılarak sonuçlar (U/mL) hesaplandı.

Trifeniltetrazolyüm klorür (TTC) ile Hasar Tesbiti: Tetrazolyüm tuzları *in vitro* koşullarda nöronal doku kültürlerinde canlılık ve büyümenin görüntülenmesinde kullanılmaktadır.²² Çalışmamızda, organotipik kesit kültürlerindeki hasarın tesbit amacıyla, TTC yöntemi uygulandı.

Organotipik hipokampal kesit kültürleri kolşisin veya lumikolşisin ile indüklendikten sonra filtreleriyle birlikte sayım şişelerine yerleştirildi. Her örnek üzerine 5 mL TTC çözeltisi (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 3 mM D-glukoz: % 2 TTC. w/v) eklenerek, çalkalayıcı su banyosunda 90 dakika süreyle 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası filtreler alındı, üzerlerine DMSO/etanol (1:1) eklenerek, 24 saat süreyle karanlıkta saklandı. Oluşan formazan bileşiği 485 nm dalga boyunda ölçüldü.

İstatistiksel Değerlendirmeler: İstatistiksel değerlendirme IBM uyumlu bilgisayarda, Instat programında ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Tüm sonuçlar Tukey-Kramer çoklu testi ile karşılaştırıldı, p<0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± SD olarak gösterildi.

BULGULAR

Kemilüminesans Ölçümleri

Organotipik hipokampal kesit kültürleri lumikolşisin ve kolşisin ile indüklendikten sonra yapılan kemilüminesans ölçümlerinde anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 1).

Laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçümü

Organotipik hipokampal kesit kültürleri lumikolşisin ve kolşisin ile uyarıldıktan sonra elde edilen kültür medyumlarında LDH aktivitesi ölçüldü. Kolşisin grubunun LDH düzeyi (89.3 ± 23.3 U/mL) ile lumikolşisin grubunun LDH düzeyi (56.2 ± 13.4 U/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı (p < 0.01).

Trifeniltetrazolyüm klorür (TTC) ile Hasar Tesbiti

TTC ile boyanan kesit kültürlerinin DMSO/etanol ile muamelesi sonunda elde edilen sıvıların absorpsansı spektrofotometrik olarak ölçüldüğünde, kolşisin ile indüklenen kesitlerin saldığı for-

TABLO 1.

Organotipik hipokampal kesit kültürlerinde lumikolşisin ve kolşisin uygulamasından sonra lüminol ve lüsjenin kemilüminesansı ile nitrik oksit düzeyleri.

	Lumikolşisin	Kolşisin
Lüminol (cpm/mg doku)	429.498 ± 92.457 (n=7)	605.858 ± 79.852* (n=12)
Lüsjenin (cpm/mg doku)	475.972 ± 79.261 (n=6)	762.790 ± 306.223** (n=13)
Nitrik Oksit (cpm/mg doku)	990.550 ± 29.475 (n=6)	1.794.709 ± 590.713*** (n=8)

Lumikolşisin ile karşılaştırıldığında *p<0.001, **p<0.05, ***p<0.01.

mazan bileşiğinin lumikolşisin ile indüklenenlerden daha yüksek absorbans verdiği belirlendi.

Sonuçlar, % Kayıp = $100 \times [1 - (A_{\text{kolşisin}} / A_{\text{lumikolşisin}})]$ formülü uygulanarak değerlendirildi ve yapılan hesaplamada, kolşisin ile oluşan hücre kaybının % 82.5 ± 4.9 olduğu saptandı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Alzheimer hastalığının serbest radikal oluşumuna neden olduğu postmortem beyin dokularında yapılan incelemelerde gösterilmiş ve pek çok patolojik değişiklik tanımlanmıştır.^{13,17,24} Bunlar arasında lipit peroksidasyonu, karbonillenmiş nörofilament proteinleri, serbest karboniller, nitrasyon, ileri glikasyon ve son ürünleri yer almaktadır.^{1,17,24}

Postnatal retinal ganglion hücre kültürlerine, ROT oluşturabilen sydnonimine ve demir kombinasyonları (Fe⁺²/Fe⁺³) eklenerek, aksonal rejenerasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir.¹⁴ Sydnoni-

Mine, NO ve O₂ aracılığıyla, aksonal dejenerasyon oluşturur. Benzer sonuçlar demir kombinasyonlarının kültür ortamına eklenmesiyle de elde edilmiştir. Fare beyin kesitlerinde yapılan bir çalışmada amiloid-b'nin oksidatif stres belirteçlerinden hem-oksjenaz-1 ve 8-hidroguanozin düzeylerini arttırdığı ve morfolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir.⁴ Çalışmamızda, lüminol ve lüsjenin aracılı KL ölçümleri, kolşisin ile indüklenen organotipik kesit kültürlerinde OH, H₂O₂ ve HOCl ile O₂ arttığını göstermiştir. Böyle bir durumda, aksonal dejenerasyonla birlikte mitokondriyal enerji metabolizmasının bozulabileceği, fosfolipitlerin peroksidasyona açık hale gelebileceği ve inflamasyona yol açabilecek bir hasar oluşacağı düşünülebilir. Kolşisin grubunda aksonal dejenerasyonla birlikte kültür ortamına salınan LDH düzeyinin de lumikolşisinle kıyasla arttığı, ayrıca hasar belirteci olarak kullanılan TTC ile belirlenen nöronal hücre kaybının % 82.5 gibi önemli bir orana çıktığı saptanmıştır. Nitekim, retinal ganglion hücrelerine, E vitamini ve C vitamini gibi antioksidan etkili moleküllerle birlikte astrositler eklendiğinde, serbest radikal oluş-

turucu ajanların nörotoksik/nörodejeneratif hasar oluşturmadığı gözlenmiştir.¹⁴ Bu araştırmacılar ROT'un aksonal rejenerasyonu engellediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışma grubu postnatal retinal ganglion hücrelerinde riboflavin aracılı aksonal dejenerasyonun serbest radikalleri arttırdığını bildirmiştir.¹⁵ Riboflavin içeren bileşik, *in vitro* koşullarda aralarında ROT'un da yer aldığı ve aksonal rejenerasyona da neden olan fototoksik ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. E vitamini ve C vitamini gibi serbest radikal tutucu maddelerin ortama eklenmesinin nörodejeneratif etkiyi azalttığı belirlenmiştir. Riboflavin aracılı ROT oluşumunun sito-toksik hücre hasarına ve buna bağlı olarak nörit dejenerasyonuna neden olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda kolşisin uygulanan organotipik kesit kültürlerinden NO salınımının, lumikolşisin grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tesbit edildi. Kolşisinin aksonal transportu engellemesiyle birlikte nöronlarda nitrik oksit sentaz (NOS) akti-vasyonuna bağlı olarak NO salınımının arttığı söylenebilir. Nitekim Lumme ve arkadaşları,¹⁶ hipotalamik nukleusta, NOS ekspresyonunu aksotomi ve kolşisin uygulaması sonrasında incelemiştir. Aksonal hasar oluşturulduktan sonra, hipotalamik majör nörosekretuar nukleusta noronal NOS (nNOS) ekspresyonunun arttığı tesbit edilmiştir. Kolşisin uygulamasının da benzer bir etkiye neden olduğu ve nNOS ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Aksotomi ve kolşisin uygulamasıyla aynı sonucun elde edilmiş olması, hücresel sitoskeletal yapının ve aksonal transportun bloke edilmesiyle NOS ekspresyonunun arttığını düşündürmektedir. Başka bir çalışma grubunda ise, tavuk embriyosu istmo-optik nukleusunda elektriksel uyarı verilerek aksonlarda retrograd bir sinyal oluşması sağlandığında, sinaptik terminalde oluşan aksiyon potansiyeli değişikliği nedeniyle, Ca⁺²'un hücre içine girişinin arttığı bildirilmiştir.²⁰ Aynı deney sisteminde NO antagonistlerinin uygulanmasıyla, istmo-optik nöronların öldüğü ve dendritik reor-ganizasyonun yavaşladığı gösterilmiş; NO agonistlerinin de benzer şekilde noronal hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır.²⁴

Sonuç olarak, çalışmamızda organotipik hipokampal kesit kültürlerinin kolşisinle inkübe edilmesiyle ROT'un ve NO'nun arttığı saptandı ve Alzheimer hastalığı etyolojisinde rol oynadığı düşünülen serbest radikallerin bu sistemde de etkin olduğu görüldü. Benzer çalışmalarla serbest radikallere özgü farklı inhibitör ve tutuculardan faydalanarak, hastalığın mekanizması konusunda daha fazla bilgi edinilebileceğini ve geliştirilen organotipik kesit kültürü yönteminin. Alzheimer hastalığının oluşum mekanizmasının açıklanmasına katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Bonilla E, Tanji K, Hirano M, Vu TH, DiMauro S, Schon EA: Mitochondrial involvement in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1410: 171-182.
2. Bouron A; Colchicine affects protein kinase C-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal cells. *FEBS Letters* 1997; 404: 221-226.
3. Carr DB, Goate A, Phil D, Morris JC: Current concepts in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Am. J. Med.* 1997; 103: 3S-10S.
4. Clapp-Lilly KL, Smith MA, Perry G, Harris PL, Zhu X, Duffy LK: Melatonin acts as antioxidant and prooxidant in a organotypic slice culture model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2001; 12: 1277-1280.
5. Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TRJ, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS: Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut* 1994; 35: 179-185.
6. Gâirsviler BU, Capogann M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM: Ürganotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 471-477.
7. Ginn SR, Peterson GM: Colchicine-induced cholinergic denervation of the hippocampus elicits sympathetic ingrowth. *Brain Res.* 1991; 554: 257-263.
8. Ginn SR, Peterson GM: Studies related to the use of colchicine as a neurotoxin in the septohippocampal cholinergic system. *Brain Res.* 1992; 590: 144-152.
9. Haklar G, Yüksel M, Yalçın AS: Chemiluminescence in the measurement of free radicals: Theory and application on a tissue injury model. *Marmara Med. J.* 1998; 11: 56-60.
10. Heiwall PO, Larsson PA, Dahlstrom A: Further evidence for the involvement of microtubules in the proximo-distal intra-axonal transport of acetylcholine and related enzymes in rat sciatic nerve. *Acta Physiol. Scand.* 1978; 104: 156-166.
11. Kikuchi K, Nagano T, Hayakavva U, Hirata Y, Hirobe M: Real time measurement of nitric oxide produced ex vivo by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method. *J. Biol. Chem* 1993; 268: 23106-23110.
12. King CE, Jacobs I, Dickson TC, Vickers JC: Physical damage to rat cortical axons mimics early Alzheimer's neuronal pathology-*NeuroReport* 1997; 8: 1663-1665.
13. Lovell MA, Ehmman WD, Butler SM, Markesbery WR: Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45: 1594-1601.
14. Lucius R, Sievers J: Postnatal retinal ganglion cells in vitro: protection against reactive oxygen species (ROS)-induced axonal degeneration by cocultured astrocytes. *Brain Res.* 1996; 743: 56-62.
15. Lucius R, Mentlein R, Sievers J: Riboflavin-mediated axonal degeneration of postnatal retinal ganglion cells in vitro is related to the formation of free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24: 798-808.
16. Lumme A, Vanhatalo S, Sadeniemi M, Soinila S; Expression of nitric oxide synthase in hypothalamic nuclei following axonal injury or colchicine treatment. *Exp. Neurol.* 1997; 144: 248-257.
17. Markesbery WR: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad. Biol. Med.* 1997; 23: 134-147.
18. McKay DB, Cobjianchi MJ, Schneider AS: Comparison of the effects of colchicine and beta-lumicolchicine on cultured adrenal chromaffin cells: Lack of evidence for an action of colchicine on receptor-associated microtubules. *Pharmacology* 1987; 35: 155-162.
19. Norberg J, Kristensen B W, Zimmer J: Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures, *Brain Res. Prot.* 1999; 3: 278-290.
20. Posada A, Clarke PGH: Fast retrograde effects on neuronal death and dendritic organization in development: The role of calcium influx. *Neuroscience* 1999; 89: 399-408
21. Posada A, Clarke PGH: Role of nitric oxide in a fast retrograde signal during development. *Dev. Brain Res.* 1999; 114: 37-42.
22. Preston E, Webster J: Spectrophotometric measurement of experimental brain injury. *J. Neurosci. Meth.* 2000; 94: 187-192.
23. Roloff EV, Platt B: Biochemical dysfunction and memory loss: the case of Alzheimer's dementia. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999; 55: 601-616.
24. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G: Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1502: 139-144.
25. Vickers JC: A cellular mechanism for the neuronal changes underlying Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1997; 78: 629-639.
26. Yalçın AS, Haklar G, Küçükkaya B, Yüksel M, Dalaman G: Chemiluminescence measurements for the detection of free radical species. Ozben T. (Ed.): *Free Radicals. Oxidative Stress. and Antioxidants.* Vol. 296, Plenum Press. New York. 1998. s 385-390.