

Özlem ŞAHİN<sup>1</sup>  
Ufuk VURGUN<sup>2</sup>  
Osman YILMAZ<sup>3</sup>  
Ataç SÖNMEZ<sup>4</sup>  
Ayfer DAYI<sup>4</sup>  
Görsev YENER<sup>1</sup>  
Şermin GENÇ<sup>2</sup>

\*2009 yılı  
“En iyi araştırma”  
ödülünü kazanmıştır.

#### İletişim (Correspondance)

Özlem ŞAHİN  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroloji Anabilim Dalı İZMİR  
TİF: 0232 412 40 50/4051  
e-posta: dr.ociftcioglu@gmail.com

Geliş Tarihi: 01/01/2010  
(Received)

Kabul Tarihi: 15/02/2010  
(Accepted)

<sup>1</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroloji Anabilim Dalı İZMİR

<sup>2</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Sinirbilimleri Anabilim Dalı İZMİR

<sup>3</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı İZMİR

<sup>4</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı İZMİR



## ARAŞTIRMA

# D-GALAKTOZ ENJEKSİYONU İLE İN VİVO OLARAK OLUŞTURULAN DENEYSEL ALZHEİMER HAYVAN MODELİNDE ERİTROPOETİNİN TERAPÖTİK ETKİSİ\*

## Öz

**Giriş:** Eritropoietin (Epo), stroke ve parkinsonizm gibi akut ve kronik bir çok santral sinir sistemi hastalığının hayvan modellerinde koruyucu etkinliği gösterilmiş bir moleküldür. In vitro nöral kültürde amiloid beta toksisitesinde koruyucu etki gösteren Epo'nun, bu çalışmada in vivo Alzheimer hastalığı hayvan modelinde koruyucu etkisi olup olmadığı incelenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya alınan 21 dişi rat, kontrol(sham) (n=7), overektomize ve 2 ml %0.9 izotonik + 20 mg/gün D-galaktoz uygulanan (n=7); overektomize, D-galaktoz uygulamasına ek olarak 40 mg/kg dozunda haftada 3 kez İP Epo enjeksiyonu yapılan(n=7) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Epo'nun hastalık modeli üzerine etkisi, hipokampus ve serebral kortekste asetilkolin esteraz aktivitesi ve Cell death ELISA plus yöntemi apoptozis analizi kullanılarak araştırılmıştır.

**Bulgular:** Asetilkolin esteraz düzeyi, Epo grubunda kontrol grubuna yakın ve düşük olarak saptanmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca apoptozis düzeyi açısından her 3 grup arasında istatistiksel açıdan farklılık bulunmamıştır.

**Sonuç:** Epo'nun bu hayvan modelinde nöroprotektif etkisi gösterilemedi. Ancak overektomi ve D-galaktoz grubunun da incelenen parametreleri kontrolden farklı değildi. Bu nedenle başka bir AH hayvan modelinde Epo'nun nöroprotektif etkisi incelenmelidir.

**Anahtar Sözcükler:** Alzheimer hastalığı; Hastalık hayvan modeli; D-galaktoz; Eritropoietin; Nöroproteksiyon; Apoptozis.



## RESEARCH

# THERAPEUTIC EFFECT OF ERYTHROPOIETIN IN AN EXPERIMENTAL IN VIVO ALZHEIMER'S DISEASE ANIMAL MODEL MODERATED BY D-GALACTOSE INJECTION AT OVARECTOMIZED RATS

## ABSTRACT

**Introduction:** Erythropoietin (Epo) is a molecule which has shown to have neuroprotective effects on animal models of chronic and acute central nervous system disorders like stroke and parkinsonism. Epo shows neuroprotective effect on amiloid beta toxicity in vitro neuronal cell culture. In this study we searched neuroprotective effect of Epo on in vivo animal model of Alzheimer's disease.

**Materials and Method:** In this study female rats divided into 3 groups like control (sham), ovariectomized and injected 2 ml saline+ 20 mg/day D-galactose, and third group is injected intraperitoneal 40 mg/kg Epo 3 days per week addition to d-galactose injection. The effects of erythropoietin on the animal model is researched at the hippocampus and cerebral cortex by acetylcholine esterase activity, and apoptosis detection with Cell death ELISA plus kit.

**Results:** Acetylcholin esterase levels were low in grup Epo is similar to control grup but there is no statistical difference. And there was no statistical difference in 3 groups results about the apoptosis.

**Discussion:** Epo was not neuroprotective on this animal model of AD. But we did not find any difference at any parameter between control and overectomy+D-galactose group. For this reason, neuroprotective effect of Epo should researched other animal model of AD.

**Key Words:** Alzheimer's Disease; Disease model animal; D-galactose, Erythropoietin; Neuroprotection; Apoptosis.



## GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH), ileri yaştaki demansların en sık formudur. Kognitif fonksiyonlarda ilerleyici bozulma ile karakterizedir. Klinik pratikte, AH'nın kesin kriterlerine rağmen tanısı sekonder nedenlerin ve diğer demansif hastalıkların dışlanması ile konur. Beyin dokusunda çok sayıda nöritik plakların ve nörofibriler yumakların bulunması ile karakterize progresif ve nörodejeneratif bir hastalıktır. Tanıda altın standart klinik AH tanısı almış kişide ölüm sonrası yapılacak otopside beyinde tipik nöropatolojik değişikliklerin gözlenmesidir. Toplumdaki genel ölüm nedenleri sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır. Tıptaki gelişmeler neticesinde artan yaşam süresi ve yaşlanan nüfus nedeni ile prevalansı her yıl daha da artmaktadır. 60-64 yaş arası prevalans %1 iken, 85 yaş ve üzerinde prevalansı %10-40'lara ulaşmaktadır. Hasta sayısının 2047 yılında 8.64 milyona (4.37-15.4 milyon) ulaşması beklenmektedir. Bu nedenle AH günümüzde ve gelecekte sadece nörodejeneratif bir hastalık olmaktan da öte ciddi bir sosyal, ekonomik halk sağlığı sorunu haline gelmiştir.

Son yıllarda deneysel Alzheimer hayvan modelleri üzerine yapılan çalışmalar patogeneze mekanizmalarının aydınlatılması ve patogeneze yönelik yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesi konusunda önem kazanmıştır. Östrojen deprivasyonu ve d-galaktoz enjeksiyonu ile yaratılan oksidatif stresle dişi ratlarda oluşturulan hayvan modelinde, her iki faktörün sinerjistik bir şekilde AH benzeri histopatolojik görünüm yarattığı ve davranış testleri ile benzer bulguların elde edildiği gösterilmiştir (1).

Eritropoetin (Epo); sinir sisteminde de varlığı gösterilen mekanizmaları tam olarak saptanamamış olmakla beraber nöroprotektif etkileri gösterilmiş olan hematopoetik bir sitokinhormondur (2). Son yıllarda beyinde ve nöronal ve glial hücrelerde kendisinin ve reseptörünün varlığı ve çok sayıda değişik in vivo ve in vitro nöronal hasar modelinde nöroprotektif etkinliği gösterilmiş olan Eritropoetin (Epo) böyle bir moleküldür (3-10). Epo'in birçok diğer nöroprotektif maddeye göre avantajı uzun yıllardır anemi endikasyonu ile klinik kullanımda olması ve kan beyin bariyerini geçebilmesidir. Yeni çalışmalarda Epo'in anti-apoptotik, anti-oksidan ve anti-inflamatuvar etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Epo'in nöron koruyucu etkilerinin kesin mekanizması tam olarak bilinmese de hücre canlılığını arttırıcı yolları uyardığı, antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı, hücre içi kalsiyum metabolizmasını düzenlediği, nitrik oksid üretimini azalttığı, glutamat salınımını baskıladığı, anjiyojenezi ve nörojenezi uyardığı, nörotrofik faktör sentezini arttırdığı, antiapoptotik, antioksidatif ve anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (11-15). Ancak bu etkilerinin mekanizmaları tam olarak aydınlatılama-

mıştır. Epo'in beyin dokusunda glutatyon peroksidaz ekspresyonunu arttırıcı etkisi ise etanol, hipoksi ve MPTP hasar modellerinde gösterilmiştir. Bu bulgular Epo'in anti-oksidan ve anti-inflamatuvar etkili bu moleküllerin ekspresyonunu eşgüdümlü olarak uyurabildiğini düşündürmektedir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli onay ve izinler alınarak başlanan çalışmada 21 adet Sprague Dawley cinsi dişi rat kullanılmıştır. Ratlar doğumdan itibaren santral sinir sistemi gelişiminin tamamlandığı 20. haftadan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Ratlar standart rat yemi ve su ile beslenerek, laboratuvar koşullarında 12 saat gece 12 saat gündüz fotoperiyodi uygulanmıştır. Randomize olarak 3 gruba ayrılan ratlardan 1. grup olan sham grubuna cerrahi uygulanmış ancak ovaryumlar eksize edilmemiş diğer 2 gruptaki ratlara bilateral overektomi yapılmıştır.

3 gruba ayrılan ratlardan overektomi uygulanmayan 1. gruba (sham) eş miktarda izotonik sıvı, 2. ve 3. gruba ise 2 ml %0.9 izotonik + 20 mg D-galaktoz her gün günde bir kez intraperitoneal (ip) olarak 5 hafta boyunca uygulanmıştır. 3. gruba D-galaktoz ile birlikte 40 mg/kg dozunda haftada 3 kez ip olarak Eritropoetin enjeksiyonu yapılmıştır (16).

Çalışma sırasında kontrol ve D-galaktoz grubundan 2 rat, eritropoetin grubundan 1 rat operasyon komplikasyonları ve enfeksiyon gibi nedenlerle kaybedilerek çalışma dışında bırakıldı. 5 hafta sonunda 5 adet kontrol, 5 adet overektomize + d-galaktoz uygulanan, 6 adet overektomize + d-galaktoz + Epo uygulanan rat deneyi tamamladı.

Çalışmada kullanılan ratlar 5 hafta sonunda 100 mg/kg sodyum tiopental ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen hayvanlardan serebral doku örnekleri alınırken hipokampus ve serebral korteks ayrı olarak -80 ° C' de dondurularak saklanmıştır. Tüm analizler hem hipokampus hem serebral korteks örneklerinde ve çift olarak çalışılmıştır. Analiz öncesi beyin dokuları sonikasyonla parçalanmıştır. Protein örneklerinde Asetil kolin esteraz aktivitesi ve apoptoz değerlendirilmiştir. Apoptoz için Cell death ELISA plus kiti (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Kiti talimatlarına uygun yapılan analiz gr protein başına absorban olarak verilmiştir. Asetil Kolin esteraz (Ach E) aktivite ölçümü için Detex X (Arbo Assay, Amerika) kiti kullanılmıştır. Floresan bir yöntem kullanan kit ile kitin talimatlarına uygun olarak çalışılmıştır. Sonuçlar gr protein başına verilmiştir.

İstatistiksel analizlerde SPSS programının 15.0 versiyonu kullanılmıştır. Gruplar arası anlamlılığın belirlenmesinde Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için p < 0.05 değeri kullanılmıştır.



## BULGULAR

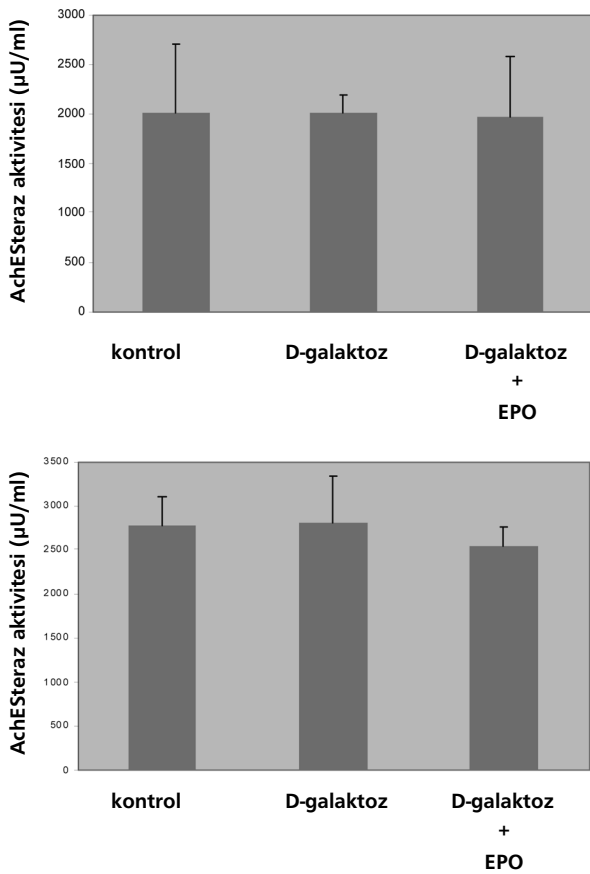
Ach E aktivitesi beyinde gr başına kontrol grubunda  $2009.3 \pm 705.0$ , overektomi + D-galaktoz grubunda  $2009.4 \pm 177.0$ , overektomi + Epo grubunda  $1976.2 \pm 597.0$  olarak bulunmuştur. Ach E aktivitesi hipokampusta gr başına kontrol grubunda  $2765.7 \pm 341.9$ , overektomi + D-galaktoz grubunda  $2801.1 \pm 530.9$ , overektomi + Epo grubunda  $2545.6 \pm 211.9$  olarak bulunmuştur. Her üç deney grubu Asetil kolin esterase aktivitesi açısından karşılaştırıldığında hem serebral kortekste hem hipokampusta tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlılıkta fark bulunmamıştır (Şekil 1A,B).

Apoptoz için beyinde gr başına absorbans sonucu, kontrol grubunda  $0.137 \pm 0.005$ , overektomi + D-galaktoz grubunda  $0.140 \pm 0.004$ , overektomi + Epo grubunda  $0.141 \pm$

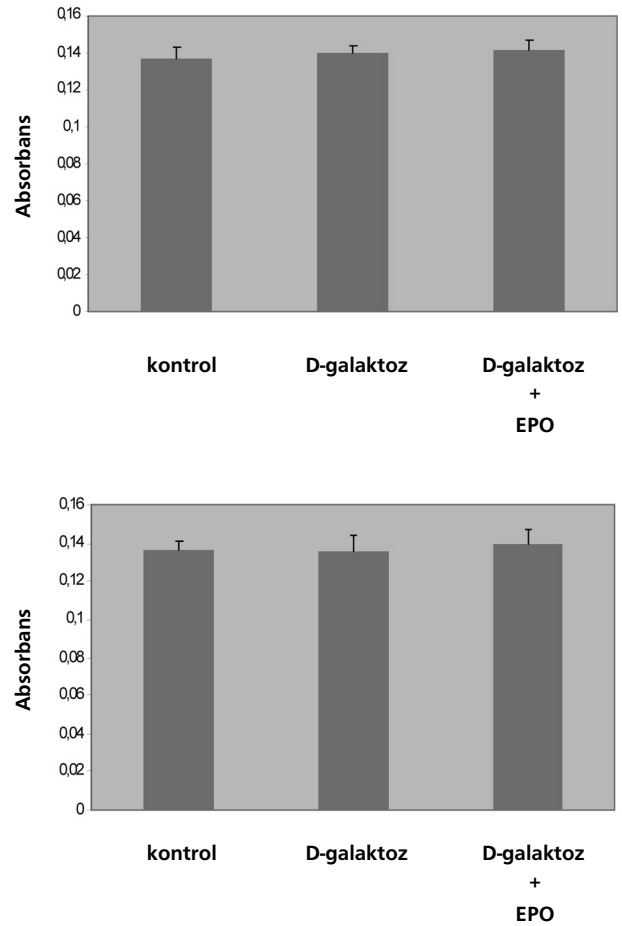
$0.005$  olarak bulunmuştur. Hipokampusta gr başına absorbans kontrol grubunda  $0.136 \pm 0.006$ , overektomi + D-galaktoz grubunda  $0.136 \pm 0.009$ , overektomi + Epo grubunda  $0.140 \pm 0.008$  olarak bulunmuştur. Her üç deney grubu apoptoz açısından karşılaştırıldığında hem serebral kortekste hem hipokampusta tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlılıkta fark bulunmamıştır (Şekil 2A,B).

## TARTIŞMA

Epo, pek çok nörolojik hastalığın hayvan modelinde tedavi amacıyla denenmiş ve nöroprotektif etkisi gösterilmiş bir moleküldür (11). AH'nın patogenezinin bir parçasında so-



Şekil 1— Serebral kortekste (A) ve Hipokampusta (B) Asetil kolin esterase aktivitesi: D-Galaktoz ve overektomi uygulanan grupta Ach E aktivitesinde değişiklik saptanmamıştır. Epo uygulanan grubun Ach E aktivitesi kontrol grubundan ve D-Galaktoz ve overektomi uygulanan gruptan farklı bulunmamıştır.



Şekil 2— Serebral kortekste (A) ve Hipokampusta (B) apoptoz: D-Galaktoz ve overektomi uygulanan grupta apoptozda kontrole göre değişiklik saptanmamıştır. Epo uygulanan grubun apoptoz düzeyi de kontrol grubundan ve D-Galaktoz ve overektomi uygulanan gruptan farklı bulunmamıştır.



rumlu tutulan amiloid beta nörotoksisitesinde in vitro nöron kültüründe Epo koruyucu etki göstermiştir (17). Bu bulgulardan yola çıkarak AH'nın in vivo hayvan modelinde Epo'nun etkisini incelemeyi amaçladık. AH'nın hayvan modelinin seçiminde hastalığın tüm bulgularını yansıtabilecek, sporadik AH modeli seçtik. Sporadik AH'nın in vivo modeli olabilecek üç hayvan modeli sözkonusudur. Bunlar: yüksek kolesterolle besleme, streptozotosin enjeksiyonu, D-galaktoz uygulaması ile birlikte yada tek başına overektomidir (18). Biz çalışmamızda D-galaktoz uygulaması ile birlikte overektomi AH modeli olarak kullanılmıştır. Bu model Hua ve ark tarafından 2006 yılında ilk kez tanımlanmıştır (1). Hua ve ark. Overektomi sonrası 6 hafta D-galaktoz uyguladıklarını bildirdiler. Ancak biz çalışmamızı araya giren enfeksiyonlar nedeniyle 5 haftada sonlandırmak zorunda kaldık. Bu nedenle overektomi uygulaması AH'nın hayvan modelinde ilk seçenek olmamalıdır.

AH hayvan modellerinde hastalığın bir göstergesi olarak kolinerjik nöron kaybı söz konusudur. Kolinerjik nöron kaybını göstermek için AchE ve Kolin asetil transferaz antikoları ile immunohistokimya ve biyokimyasal yöntemlerle AchE aktivitesini değerlendirilmektedir (1). Çalışmamızda kolinerjik nöron kaybını değerlendirmek amacıyla biyokimyasal floresan bir yöntemle AchE aktivitesini değerlendirdik. AH'nın hayvan modelinde AchE aktivitesinde azalma beklenir (1,18). Çalışmamızda ne beyinde ne de hipokampusta AchE aktivitesinde azalma saptanamamıştır. Bunun nedeni AchE aktivitesinin değerlendirilmesinde beyinden protein eldesinde nöron harici hücrelerinde varlığı olabilir. Bu bizim AchE aktivitesindeki değişikliği tespit edememizin bir nedeni olabilir. Bu nedenle immunohistokimya yöntemiyle AchE düzeyinin belirlenmesi hücresel değişiklikleri daha iyi ayırt etmemizi sağlayabilir. Aynı modeli kullanan bir çalışmada hipokampusta AchE aktivitesinde azalma saptanmıştır. Ancak yine bu çalışmada kullanılan yöntem bizim kullandığımız yöntemle benzer olmakla birlikte aynı değildir. Bizim kullandığımız kit floresan deteksiyon yapar iken, diğer çalışmadaki kit kolorimetrik deteksiyon yapmaktadır (19).

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz parametre apoptozdur. Nörodejeneratif hastalıklarda nöronal ölümün en bilinen formudur. Çalışmamızda ne beyin örneklerinde ne de hipokampus örneklerinde kontrole göre apoptoz artışı gösterilememiştir. Bunun nedeni apoptoz değerlendirilmesinde beyinden protein eldesinde nöron harici hücrelerinde varlığı olabilir. Bu bizim apoptoz değişikliği tespit edememizin bir nedeni olabilir. Bu nedenle immunohistokimya yöntemiyle apoptozun belirlenmesi hücresel değişiklikleri daha iyi ayırt etmemizi sağlayabilir.

Çalışmamızda D-galaktoz ve overektomi ile oluşturulan AH hayvan modelinde Epo'nun etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. D-galaktoz + overektomi +Epo uygulanan grup, D-galaktoz ve overektomi uygulanan gruba göre AchE aktivitesinde ve apoptoz göstergesinde bir fark göstermemiştir. Sonuçlarımız Epo'nun bu modelde nöroprotektif olmadığını göstermektedir. Ancak modelde gözlenen enfeksiyon gibi sorunlar bu sonucun doğmasında etkili olabilir. Bu nedenle Epo'nun başka bir AH hayvan modelinde etkisini inceleyen çalışmalar yapılması gereklidir.

## KAYNAKLAR

1. Hua X, Lei M, Zhang Y, et al. Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life Sci* 2007 Apr 24;80(20):1897-905.
2. Dame C, Juui SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 2001; 79(3-4):228-35.
3. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow and Metab* 1999; 19(6):643-51.
4. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(19):10526-31.
5. Buemi M, Grasso G, Corica F, et al. In vivo evidence that erythropoietin has a neuroprotective effect during subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* 2000;392(1-2):31-4.
6. Calapai G, Marciano MC, Corica F, et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 2000; 401(3):349-56.
7. Genc S, Kuralay F, Gene K, et al. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3, 6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett* 2001; 298(2):139-41.
8. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(1):26-32.
9. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(8):4635-40.
10. Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(7):4044-49.
11. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res* 2004;1000:19-31.
12. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 2005;293:90-5.



13. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:577-83.
14. Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, et al. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 2005;93:412-21.
15. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 2004;35:1732-7.
16. Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *P. Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jan 20;101(3):823-8.
17. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Curr Neurovasc Res* 2005 Dec;2(5):387-99.
18. Woodruff-Pak DS. Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *J Alzheimers Dis.* 2008 Dec;15(4):507-21.
19. Hua X, Lei M, Ding J, Han Q, Hu G, Xiao M. Pathological and biochemical alterations of astrocytes in ovariectomized rats injected with D-galactose: a potential contribution to Alzheimer's disease processes. *Exp Neurol* 2008 Apr;210(2):709-18.