

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

**YAŞLI RATLARDA SELEKTİF VE NON SELEKTİF
COX İNHİBİTÖRLERİNİN NMDA RESEPTÖR
SUBÜNİTLERİNE ETKİSİ**

DR. ÖZLEM ÖZTÜRK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. İRFAN ALTUNTAŞ

2006-İSPARTA

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

**YAŞLI RATLARDA SELEKTİF VE NON SELEKTİF
COX İNHİBİTÖRLERİNİN NMDA RESEPTÖR
SUBÜNİTLERİNE ETKİSİ**

DR. ÖZLEM ÖZTÜRK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. İRFAN ALTUNTAŞ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 04-TU-833 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2006-İSPARTA

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetiŐmemde emeği geçen, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Namık DelibaŐ'a, Prof. Dr. Hüseyin Vural'a, Doç. Dr. İrfan Altuntaş'a, Doç. Dr. Fatih Gültekin'e, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akdođan'a, Yrd. Doç. Dr. Recep Sütçü'ye, Yrd. Doç. Dr. Duygu Kumbul Dođuç'a sonsuz Őükran ve saygılarımı sunarım. Tezimin her aşamasında bana yol gösteren, bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danıŐman hocam Doç. Dr. İrfan Altuntaş'a ayrıca teşekkür ederim.

Asistanlığım boyunca laboratuvar çalıŐmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve teknisyen arkadaşlarıma ve bana verdikleri emek ve gösterdikleri sevgileri ile her zaman yanımda olan anne ve babama teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
Kısaltmalar	iv
Şekil ve Tablo Listesi	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1. AH ve İnflamasyon	3
2.2. COX	5
2.2.1. Santral Sinir Sistemi (SSS) ve COX	7
2.3. Non Steroidal Antiinflatuar İlaçlar (NSAİİ)	8
2.3.1. Kimyasal Sınıflaması	9
2.3.2. Etki Mekanizması	9
2.3.3. Analjezik Etkileri	10
2.3.4. Antipiretik Etkileri	11
2.3.5. Antiinflatuar Etkileri	11
2.3.6. İbuprofen	12
2.3.7. Nimesulid	14
2.4. Hipokampüs	15
2.4.1. Anatomisi	15
2.4.2. Hipokampüsün Yapısı ve Fonksiyonları	15
2.5. Glutamat Reseptörleri	16
2.5.1. NMDA Reseptörleri	18
2.5.2. NMDA Reseptör Tipleri	21
2.5.3. NMDA Reseptörünün Yapısı	22
2.5.4. Nörolojik Hastalıklar ve Glutamat Reseptör Aktivasyonunda Artış	23
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Deney Hayvanları	24
3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	25

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler	26
3.2. Metod	28
3.2.1. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu	28
3.2.2. SDS-PAGE Yöntemi	28
3.2.3. Western Blot Yöntemi	28
3.3. İstatistiksel Analiz	29
4. SONUÇLAR	30
4.1. Western Blot analizi ile NR2A, NR2B reseptör düzeyleri	30
5. TARTIŞMA	33
ÖZET	41
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	44

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACPD	: <i>trans</i> -(1S, 3R) -1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit
AH	: Alzheimer Hastalığı
A β	: Amiloid β protein
AMPA	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat
AMPAR	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat reseptörü
APS	: Amonyum peroksodisulfat
COX-1	: Siklooksijenaz 1
COX-2	: Siklooksijenaz 2
COX-3	: Siklooksijenaz 3
cPLA2	: Sitozolik fosfolipaz A2
EGTA	: Etilen glikol-bis tetraasetik asit
iGluR	: İyonotropik glutamat reseptörü
KAR	: Kainat tercih eden reseptörler
LTP	: Long term potansiyalizasyon
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
NR 2A	: NMDAR 2A subuniti
NR 2B	: NMDAR 2B subuniti
mRNA	: Mesajcı RNA
NSAİİ	: Non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
PG	: Prostaglandinler
PKA	: Proteinkinaz A
PKC	: Proteinkinaz C
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TEMED	: N, N, N ¹ , N ¹ - Tetrametilen-diamin
TTBS	: Tris-Tween-Buffer Saline
TNF- α	: Tümör nekroz faktör- α

ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

- Şekil 1. Araşidonik asit metabolizması ve siklooksijenaz enzimlerinin etkisi.
- Şekil 2. İbuprofen kimyasal yapısı.
- Şekil 3. Nimesulid kimyasal yapısı.
- Şekil 4. Limbik sistem içerisinde incelenen yapılar arasındaki bağlantılar.
- Şekil 5. NR2A'ya ait Western Blot örneği.
- Şekil 6. NR2B'ye ait Western Blot örneği.
- Tablo 1. Tüm gruplarda NR2A, NR2B reseptör yoğunlukları ortalama ve \pm SEM değerleri

1.GİRİŞ

Yaşlılarda senil demansın en yaygın nedeni olan Alzheimer hastalığı (AH), kısa süreli hafızanın bozulmaya başlamasıyla karakterize, progresif nörolojik bir hastalıktır. Hastalarda zamanla şiddetli kognitif ve fiziksel yetersizlik meydana gelir. Orta şiddette kognitif bozulmaları olan yaşlı insanların günlük yaşamlarını sürdürebilme yeteneklerinde dramatik bir bozulma olmaz. Bununla beraber bu durum sıklıkla gelecekteki bir nörodejeneratif hastalığın (AH gibi) belirtisi olabilir (1,2).

İnflamasyon bir çok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rol oynar. Normal yaşlanma sürecinde hem sistematik olarak hem de santral sinir sisteminde inflamasyon prosesinde artma meydana gelmektedir (3).

AH'nin nedeni halen bilinmemekle beraber AH'ye götüren hücre dejenerasyonunun mekanizmaları arasında inflamasyonun yeri ile ilgili önemli bilgiler vardır (3). Ayrıca normal yaşlanma sürecinde de kronik bir inflamasyon meydana gelmektedir. İnflamasyonun kognitif fonksiyonlara etkisi bilinmemektedir. Fakat yapılan bazı çalışmalarda lipopolisakkaritlerin indüklemesiyle oluşan akut inflamasyonun genç ratlarda hafızayı zayıflattığı görülmüştür. Bu inflamasyon ile indüklenmiş hafıza bozukluğunun non steroid antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ) ile önlenildiği görülmüştür. NSAİİ'ler, siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek inflamasyonu azaltmaktadır ve sonuç olarak pro-inflatuar prostoglandinlerin üretimini sınırlandırmaktadır (4). AH'deki patolojik bulgular ile ilişkili olduğu görülen inflamatuar olayların NSAİİ kullanımı ile azaldığı, hastalığın ilerlemesinin yavaşladığı veya başlangıcının geciktiği görülmüştür. Ve yapılan birçok çalışmada uzun süreli antiinflatuar ilaç kullanımının AH'de olumlu etkileri olduğu görülmüştür (5,6).

Hipokampüste yaygın olarak bulunan, glutamat reseptörlerinin bir alt tipi olarak tanımlanan N-metil-D-aspartat reseptör'lerinin (NMDAR), hipokampüse bağımlı spatial ve non-spatial hafızaların oluşmasında rol oynayarak öğrenme ve hafızada etkili olduğunu düşünülmektedir (7,8,9). AH'nin karakteristik semptomlarından biri olarak bilinen progresif olarak kognitif fonksiyonların bozulmasında bir çok mekanizma suçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda da görülmüştür ki; AH'de NMDAR subunitlerinden özellikle NR2B ve NR1'deki azalma kognitif

bozulmaların temelinde yatan mekanizma olabilir (10). Yapılan retrospektif çalışmalarda, NSAİİ'lerin AH gelişme riskini azalttığı ya da başlama yaşını geciktirdiğine dair bulgular elde edilmiştir (4,6,11). AH'nin en önemli etyolojik nedenlerinden biri yaşlanmadır. Yaşa bağlı hafıza zayıflığı, 65 yaş üstü kişilerin % 40'ını etkileyen bir durumdur (2). Yaşlı ratlarla yapılan çalışmaların bir kısmında COX inhibitörü ilaçların kognitif bozukluklar üzerine olumlu etkisi, bir kısmında da olumsuz etkilerine rastlanmıştır. NSAİİ'lerin yaşlı bireylerde kognitif fonksiyonlar üzerine etkileri ve bunların mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (5).

Biz de bu bilgilerin ışığında, yaşlı ratlarda NSAİİ arasında yer alan selektif COX inhibitörü nimesulid ve non-selektif COX inhibitörü ibuprofenin subkronik uygulanmasıyla NMDAR subunitlerinden NR2A (N-metil-D-aspartat 2A subuniti) ve NR2B (N-metil-D-aspartat 2B subuniti) konsantrasyonlarının nasıl etkilendiğini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AH

Yaşlılarda senil demansın en yaygın nedeni AH' dir (1). Kısa süreli hafızanın bozulmaya başlamasıyla karakterize, progresif nörolojik bir hastalıktır. Hastalarda zamanla şiddetli kognitif ve fiziksel yetersizlik meydana gelmektedir. AH, hafıza ve konsantrasyon kaybı, entelektüel bozulma, bozulmuş dikkat ve dil becerisi, apraksi, konfüzyon, duygu durum değişiklikleri, zaman ve yer disorientasyonu ile karakterizedir. Entellektüel fonksiyonlardaki bozulma, Alzheimer hastalarını günlük işlerini yapamaz ve yakın aile bireyleri ile iletişim kuramaz hatta onları tanıyamaz hale getirir. Bu da, Alzheimer hastalarını tümünden başkalarına bağımlı hale getirir. Alzheimer hastalığının semptomları demansın diğer formlarına benzerdir. Fakat burada, nöronal kayba ek olarak korteks ve hipokampüste bulunan mikroskopik, Alzheimer hastalığının spesifik beyin lezyonları olarak bilinen senil plaklar ve nörofibriler yumakların varlığı ile karakterize nöropatolojik bulgular da mevcuttur (1,5,12,13).

Yaşa bağlı hafıza zayıflığı 65 yaş üstü kişilerin % 40'ını etkileyen bir durumdur. Orta şiddette kognitif bozulmaları olan yaşlı insanların günlük yaşamlarını sürdürebilme yeteneklerinde dramatik bir bozulma olmaz. Bununla beraber bu durum sıklıkla gelecekteki bir nörodejeneratif hastalığın (AH gibi) belirtisi olabilir (2).

Alzheimer hastalığının tedavisinde amiloid β ($A\beta$) depozitlerinin oluşmasının önlenmesi tedavinin ana hedeflerinden biridir. Hastalığın hangi aşamasında olursa olsun, canlı kalan nöronların korunması çok önemlidir. Kolinesteraz inhibitörleri, NMDA reseptör antagonistleri, antioksidan etkili ilaçlar, antiinflamatuvar ilaçlar, hormon replasman tedavisi, immunoterapi halen günümüzde kullanılmakta olan tedavi protokolleridir (5,12,13).

2.1.1. AH ve İnflamasyon

AH oluşumunda kesin bir neden bulunamamakla beraber AH' ye götüren hücre dejenerasyonunun mekanizmaları arasında inflamasyonun yeri ile ilgili önemli

bilgiler vardır. Akut faz proteinleri, proinflamatuvar sitokinler ve aktive olmuş kompleman ürünleri gibi çok sayıda inflamatuvar protein AH'nin beyin lezyonlarında tespit edilmiştir. İlginç olarak, bu inflamatuvar mediatörlerin sistemik inflamatuvar mekanizmalar olmadan lokal olarak üretildiği görülmüştür. AH'nin tedavisinde NSAİİ' lerin etkisini inceleyen epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, COX enzimlerinin AH'nin oluşum mekanizmalarında önemli rol oynadığı görüşünü desteklemiştir (1,4,6).

Hipokampal aktivasyondaki yaşa bağlı değişiklikler ve azalmış hipokampal volüm yaşlı populasyondaki hafıza zayıflığına katkıda bulunuyor olabilir. Ayrıca normal yaşlanma sürecinde de kronik bir inflamasyon meydana gelmektedir. Periferde, insanlarda, pro-inflamatuvar sitokinlerin artmış düzeyleri, inflamasyonun gecikmiş sonlandırılması ve uzamış ateş cevabı vardır (2,4,14).

Yaşlı ratlarda aktive olmuş mikroglialar ile uyumlu olarak inflamatuvar cevaplarda bir artış söz konusudur. Pro-inflamatuvar sitokin seviyeleri yaşlı beyinlerde artmış olarak tespit edilmiştir. İnflamasyonun kognitif fonksiyonlara etkisi bilinmemektedir. Fakat yapılan bazı çalışmalar lipopolisakkaritlerin indüklemesiyle oluşan akut inflamasyonun genç ratlarda hafızayı zayıflattığını göstermiştir. Bu inflamasyon ile indüklenmiş hafıza bozukluğunun NSAİİ' ler ile önlenemediği görülmüştür (4).

NSAİİ' ler, COX enzimini inhibe ederek inflamasyonu azaltmaktadır ve sonuç olarak pro-inflamatuvar prostoglandinlerin üretimini sınırlandırmaktadır (15,16). NSAİİ' lerin kronik kullanımı AH riskini azaltıyor gibi görünse de, yaşlı bireylerde NSAİİ' lerin kognitif fonksiyona etkisi halen tam olarak anlaşılammıştır (5,6). İndometazin (non spesifik COX inhibitörü) ile yapılan bir çalışmada, indometazinin yaşlı insanlarda sensorimotor koordinasyonu ve kısa süreli hafızayı güçlendirdiği görülmüştür (11). Diğer bir çalışmada ise aspirin veya selekoksibin kronik kullanımının yaşlı ratlarda öğrenmeyi arttırdığı gözlenmiştir (6).

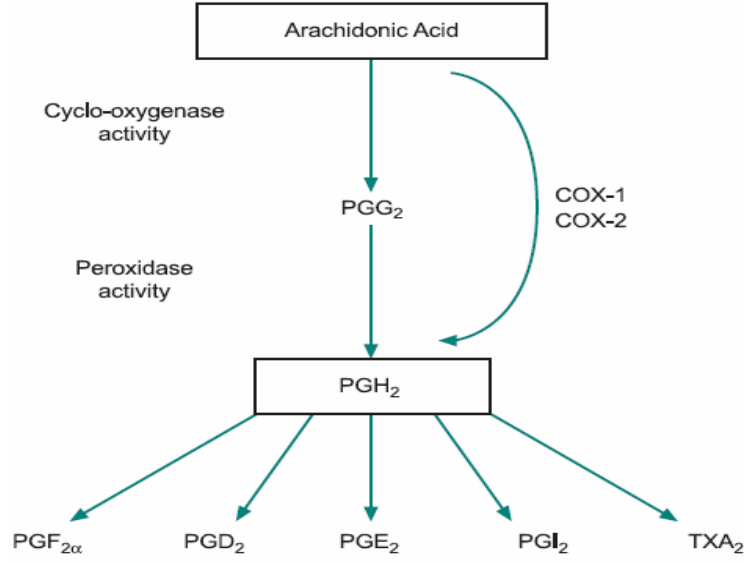
COX-2 (Siklooksijenaz 2) ekspresyonu birçok amiloid plakları olup nörofibriler yumakları olmayan demansın mevcut olmadığı beyinlerde artmıştır. Bu bulgu hastalığın ileri evrelerinde sitokin ekspresyonunun artması ile birlikte şu hipotezi destekler; COX-2 AH'nin erken evrelerinde rol oynuyor olabilir (1).

İnflamasyon bir çok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rol oynar. Normal yaşlanma sürecinde hem sistematik olarak hem de santral sinir sisteminde inflamasyon prosesinde artma meydana gelmektedir (4).

AH' deki patolojik bulgular ile ilişkili olduğu görülen inflamatuvar olayların NSAİİ kullanımı ile azaldığı, hastalığın ilerlemesinin yavaşladığı veya başlangıcının geciktiği görülmüştür. Ve yapılan birçok çalışmada uzun süreli antiinflamatuvar ilaç kullanımının AH' de yararlı olabileceği görülmüştür (5).

2.2. Siklooksijenaz (COX)

Araşidonik asit, tüm memeli hücre membranlarının lipid tabakası boyunca, fosfolipidler ile esterifiye halde bulunan 20 karbonlu doymamış yağ asitidir. Fosfolipaz enzimi, araşidonatı biyoaktif lipidlere dönüşümünü sağlayacak şekilde membranlardan koparır. Daha sonra araşidonik asit, siklooksijenaz, lipooksijenaz veya sitokrom P450 monoooksijenaz yollarından biri ile metabolize edilir. Araşidonik asit, genel olarak siklooksijenaz olarak bilinen diğer ismiyle prostaglandin G/H sentaz enziminin etkisine maruz kaldığında bunun sonucu olarak araşidonik asitten, siklik endoperoksidler olarak bilinen prostaglandin G₂ ve daha sonra prostaglandin H₂ oluşur. Siklooksijenaz enzimi, hem siklooksijenaz ve hem de peroksidaz etkinliği gösterir. Birinci etkisi, araşidonik asitten prostaglandin G₂ oluşmasını, ikinci etki ise PGH₂ oluşmasını katalize eder. PGH₂, hücre içinde meydana gelen bir dizi reaksiyonla prostaglandin E₂, prostaglandin D₂, prostaglandin F_{2α}, prostaglandin I₂ ve tromboksan A₂' ye dönüşür (Şekil 1). Oluşan ürünler hücre dışına çıkar ve otokrin ve parakrin etkilerde bulunur (1,15,17,18,19).



Şekil 1. Araşidonik asit metabolizması ve siklooksijenaz enzimlerinin etkisi

İlk olarak izole edilen COX izoformuna COX-1 (Siklooksijenaz 1) adı verildi. COX-1 yapısal olarak birçok doku ve hücrede sentezlenir. Aktivitesi için sadece substratın varolması yeterlidir. 1990' ların başına kadar siklooksijenazın tek bir tip enzim olduğu sanılırdı. Sonra farklı genler tarafından sentez ettirilen iki tipinin, yani iki izoformunun olduğu moleküler biyoloji teknikleri ile kanıtlanmış ve daha sonra COX-2 tanımlanmıştır. COX-2' nin sentezi transkripsiyon ve translasyon düzeyinde sıkı bir şekilde regüle edilir. Daha sonra üçüncü bir tip COX-3 tanımlanmıştır. COX-3 (Siklooksijenaz 3), COX-1 intron 1 kalıntısından meydana gelir ve asetaminofenin hedef aldığı bir enzimdir. COX sentezini kontrol eden genlerin uzunluğu çok farklı olmasına karşın COX-1 ve COX-2'nin her ikisi de 70 kilodalton molekül ağırlığındadır. İnsanlarda genleri sırasıyla, 9q32 ve 1q25 kromozomal pozisyonlarda lokalizedir. Aralarında % 60 aminoasit ardışım homolojisi vardır. Substrat bağlanma yerlerinin ve katalitik bölgelerinin aminoasit konformasyonu birbirine çok benzer. Ancak bu bölgelerdeki bir aminoasitin farklı olması, COX-2' de substrat bağlanma yerinin daha geniş ve daha esnek olmasına yol açar. Her iki enzim de hücrelerde membranlara yerleşmiştir (15,17,20,21). Membranda çeşitli faktörlerin etkisiyle fosfolipidlerden koparılan araşidonik asidi metabolize ederler. COX-1 ve COX-2 arasındaki en önemli fark COX-1' in esas olarak konstitütif (yapısal) olması yani üretildiği hücrelerde sürekli sentez edilmesi nedeniyle daima var olmasıdır. COX-2

ise bir çeşit reaktif protein sayılabilir. Üretildiği hücrelerde, ortamda sentezini stimüle eden bir uyarı yoksa sentezi duraklar. Bu nedenle COX-2 indüklenebilir bir enzim olarak bilinir. Başta endotoksin (bakteriyel lipopolisakkarid), interlökin-1 α ve interlökin-6, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) olmak üzere inflamasyon yapan etkenler, çeşitli büyüme faktörleri (PDGF ve EGF gibi), PAF, endotelin, koryonik gonadotropin, serotonin ve ayrıca mekanik bir uyarı olan sürtünme stresi tarafından indüklenir. COX-2 genin düzenleyici bölgesinde bu faktörlere özgül bağlanma yerleri veya özel deyimleriyle ‘cevap elementleri’ bulunur. Bütün bu faktörler genin, transkripsiyonu üzerinde artırıcı etki yaparlar. Prostaglandin ve diğer eikozanoidlerin salıverilmesinin artıran faktörler önce transkripsiyonu artırmak suretiyle COX’ ların ekspresyonunu artırarak eikozanoid sentezini artırır. İltihap dokusunda, iltihap hücrelerindeki COX-2 ekspresyonunun artması nedeniyle bol miktarda prostanooidler (eikozanoidler, prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar) oluşur ve sistemik enfeksiyon halinde ise bunların plazma düzeyi daha fazla yükselir. Özellikle indüklenebilir oksidoredüktaz COX-2 ve sitozolik fosfolipaz A2’ nin ekspresyonu serebral iskemi, travma, epilepsi ve AH süresince güçlü bir şekilde aktive olur, sonuç olarak proinflamatuvar gen yollarının indüksiyonunun beyin zedelenmesine karşı jeneralize bir cevap olabileceği düşünülmektedir (20,21).

Pek çok faktör COX-2’ yi indüklediği halde bu enzimin transkripsiyonunu inhibe eden tek faktör vardır. Bu da doğal hormon olan kortizol ve glukokortikoid ilaçlardır. Glukokortikoidler COX-1’ in transkripsiyonuna etki etmez (15).

2.2.1. Santral Sinir Sistemi (SSS) ve COX

Daha önce de belirtildiği gibi COX’un 3 izoenzimi tanımlanmıştır, fakat SSS’inde yapılan çalışmalarda COX-2 üzerine daha fazla dikkat çekilmiştir (22). Çünkü bu enzim indüklenebilir bir enzim olmasına rağmen, beyin dokusunda yapısal olarak ekprese edilmektedir. Beyinde COX-2 farklı populasyonlardaki nöronlarda ekprese edilir ama özellikle korteks ve hipokampus bu enzim açısından oldukça zengindir. Bundan dolayı beyin fonksiyonlarında ve inme, epilepsi ve AH gibi nörolojik hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir (21).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, beyinde COX-2 bazal ekspresyonun sinaptik aktivite ile düzenlendiğinin gözlemlenmiş olması dikkatleri COX’un beyindeki

fonksiyonuna çekmiştir. Sinaptik aktivite nöronal bağlantı ve fenotipte uzun süreli değişiklikler meydana getirir. Bu da SSS gelişimi esnasında öğrenme ve bellek, nöronal bağlantıların onarımı ve rejenerasyonunu etkilemektedir. Nöronal plastisitenin önemli bir formu NMDA tipi glutamat reseptörü üzerinden eksitatör glutamaterjik sinaptik transmisyon aracılığı ile yönlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, NMDA antagonisti MK-801 uygulanmasını takiben korteks ve hipokampüste COX-2 bazal ekspresyonunda downregülasyon görülmüştür. Bu da COX-2' nin bazal düzeylerde ekspresyonunun NMDAR aktivasyonuna bağlı olduğunu işaret etmiştir (22,23). Long term potansiyalizasyon (LTP) ve sinapsların kuvvetlenmesi ile sonuçlanan hipokampal nöronların yüksek frekanslı stimülasyon uygulanmasını takiben NMDA aracılığı ile COX-2 ekspresyonunda upregülasyon görülmüştür. Bütün bu bulgulara ek olarak COX-2' nin aktif sinapsların mevcut olduğu nöronal dendritik uzantılarda lokalize olması, COX-2' nin sinaptik plastisitede aktiviteye bağımlı bir rolü olduğunu düşündürmüştür. COX-2' nin ekspresyonu ateş, inme, yaygın depresyon ve epilepsi gibi davranışsal ve fiziksel stres durumlarında kortikal beyin bölgelerinde güçlü bir şekilde indüklenmektedir (20).

2.3. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)

Narkotik olmayan analjeziklere bu grup ilaçların farmakolojik etki profiline daha uygun düşen bir isimle non-steroidal (steroid olmayan) antiinflamatuvar ilaçlar denir. Değişik seviyelerde antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkileri olan heterojen bir grup ilaçtır. Bunların kimyasal yapıları genellikle birbirine benzememekle (çoğu organik asit türevi) beraber, benzer teröpatik ve yan etkileri paylaşırlar. Prototip olan ilaç aspirindir (15,16).

Bu grup analjeziklerin antiinflamatuvar etkinliği sentetik veya doğal en güçlü antiinflamatuvar steroid olan glukokortikoidlerinkine göre zayıftır. Analjezik etkinlikleri de, güçlü analjezikler olan fakat antiinflamatuvar etkisi bulunmayan narkotik analjeziklerinkine göre genellikle daha zayıftır. Ancak ilaç bağımlılığı yapmadıklarından ve uyuşukluk ve bilinç bulanıklığı şeklinde nitelenen narkoz hali oluşturmadıklarından ağrılı hastalıkların çoğunda kullanılırlar. Özellikle artrit, osteoartrit ve benzeri romatizmal hastalıklar gibi genellikle inflamasyona bağlı ve

uzun süre analjezik ilaç verilmesi gereken durumlarda yararlıdırlar; bağımlılık yapmamaları, antiinflamatuvar etkilerinin bulunması ve terapötik etkilerine karşı tolerans oluşmaması bu grup ilaçların terapötik değerini artırır (15,16).

2.3.1. Kimyasal Sınıflaması

Non selektif COX inhibitörleri

1. **Salisilik asid deriveleri** : Aspirin, sodyum salisilat, kolin magnezyum trisalisilat, salsalat, diflunisal, sulfosalazin, olsalazin
2. **Para-aminofenol deriveleri** : Asetaminofen
3. **İndol ve inden asetik asitler**: İndometazin, sulindak
4. **Heteroaril asetik asitler**: Tolmetin, diklofenak, ketorolak
5. **Arilpropiyonik asitler** : İbuprofen, naproksen, flurbiprofen, ketoprofen, fenoprofen, okzaprozin
6. **Antranilik asid (fenamatlar)** : Mefenamik asid, meklofenamik asid
7. **Enolik asitler** : Oksikamlar (piroksikam, meloksikam)
8. **Alkononlar** : Nabumeton

Selektif COX-2 inhibitörleri

1. **Diaril-substituted furanonlar** : Rofekoksib
2. **Diaril-substituted pirazollar** : Selekoksisib
3. **İndol asetik asitler** : Etodolak
4. **Sulfonanilidler** : Nimesulid (16)

2.3.2. Etki Mekanizması

COX-2' nin inflamasyon olayına yol açan çeşitli etkenler tarafından indüklenmesi proinflamatuvar etkili prostaglandinlerin oluşumuna yol açarken, fizyolojik stimuluslar, trombositlerde, damar endotelinde, mide mukozasında, böbrekte, pankreasın langerhans adacıklarında, seminal vezikülde ve beyinde COX-1 aracılığıyla genelde koruyucu işlev yapan çeşitli siklooksijenaz ürünleri oluşumuna yol açmaktadır. Prostaglandinlerin ve ilişkili otokoidlerin biyosentezinden sorumlu

COX enziminin inhibisyonu genellikle NSAİİ'lerin temel etki mekanizması olarak düşünülmektedir (15).

COX-1 ve COX-2 arasında çeşitli farklılıklar gösterildikten sonra NSAİİ'lerin her iki izoformu inhibe etme potansiyelleri arasında bir fark olup olmadığı da araştırılmıştır. Bu araştırmaların klinik uygulama ile ilgili önemli bir nedeni, başlangıçta NSAİİ'lerin yararlı antiinflamatuvar etkilerinin COX-2 inhibisyonuna, zararlı yan etkilerinin COX-1 inhibisyonuna bağlı olduğuna inanılmasıdır. COX-2'yi selektif veya özgül olarak inhibe eden bir ilacın bu iki izoformun ikisini de inhibe eden NSAİİ'lerden daha güvenli olacağı düşünülmesidir. Bu incelemelerin sonucu siklooksijenaz inhibitörleri iki izoform üzerindeki etki göz önüne alınarak dört gruba ayrılmıştır;

- 1.COX-1' e özgül
- 2.COX' lara özgül olmayan
- 3.COX-2' ye selektif
- 4.COX-2' ye özgül inhibitörler.

COX-2' ye selektif inhibitörler yüksek dozlarda COX-1'i inhibe edebilmelerine karşın düşük dozlarda COX-2'ye özgülük göstermektedirler. Bu grupta meloksikam, nimesulid gibi ilaçlar bulunmaktadır. Bunlara COX-2' yi tercih edenler adı da verilir. COX-2' nin özgül inhibitörleri ise klinikte kullanıldıkları maksimum dozlarda bile COX-1'i inhibe etmediği kabul edilen inhibitörleridir. COX-1 ve COX-2 moleküllerinde, aspirin ve benzeri COX inhibitörü NSAİİ'lerin bağlandığı inhibitör bağlanma yerlerinin genişliği ve konfigürasyonu farklıdır (15).

NSAİİ'lerin in vitro olarak geniş bir grup reaksiyonu inhibe ettiği bilinmesine rağmen bu ilaçların antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkileri ile ilgili 1971 yılına kadar kesin bir mekanizma bulunamamıştır. Vane, Smith ve Willis isimli bilim adamları 1971 yılında aspirin ve indometazinin düşük konsantrasyonlarının prostaglandinlerin enzimatik üretimini inhibe ettiğini gösterdiler. Aynı zamanlarda inflamasyon ve ateş patogenezinin prostaglandinlerin katıldığına dair bazı kanıtların bulunması ile beraber, bu ilaçların klinik etkileri ile ilgili, otokoidlerin biyosentezinin inhibisyonu hipotezi daha da önem kazanmıştır (15).

2.3.3. Analjezik Etkileri

Ağrı yapıcı kimyasal ya da mekanik etkenlerin periferde prostaglandinlerin sentezini artırdığı ve periferik afferent sinir uçlarının ağrı uyarılarına karşı duyarlılığını artırdıkları bilinmektedir. NSAİİ'lerin pek çoğunda bulunan ortak bir özellik dokularda araşidonik asitten prostaglandinlerin ve diğer bazı eikozanoidlerin oluşmasını kataliz eden COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe etmeleridir (15).

COX enzimi periferik dokularda bulunduğu gibi beyin ve omirilikte de bulunur. Nöronların eksitasyonu sonucu sinir uçlarına veya nöron gövdelerine Ca^{+2} girişinin artması bu yerlerde prostaglandinlerin sentezini ve salıverilmesini artırır. Prostaglandinler glia hücreleri tarafından da sentez edilip salıverilirler. Yapılan araştırmalar sonucunda NSAİİ'lerin analjezik etkilerini kısmen SSS' de ağrı ile ilgili sinapslarda prostaglandin etkinliğini azaltmak suretiyle yaptığı öne sürülmektedir (15).

2.3.4. Antipiretik Etkileri

Vücut sıcaklığının immünolojik olaylara bağlı olarak yükselmesi diye kısaca tanımlanan ateş, infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan iltihap olayları, kanser, graft reaksiyonu ve benzeri durumlarda salıverilen pirojen maddeler nedeniyle meydana gelir (15).

Vücut ısısının düzenlenmesi hipotalamusta preoptik bölgede bulunan termoregulator merkez tarafından yapılır. Endojen pirojen adı verilen maddeler, sitokinler preoptik bölgedeki nöronları, astrositleri ve mikroglia hücrelerini uyararak bunların prostaglandin özellikle de PGE_2 salıverilmesini artırır. Salınan prostaglandinler termoregulator merkezi, hipotalamik otonom merkezleri etkileyerek ateş oluşumuna yol açarlar. NSAİİ, prostaglandin sentezini inhibe ederek ateş oluşumunu önler (15).

2.3.5. Antiinflamatuvar Etkileri

İnflamatuvar prosesler, çeşitli stimuluslar (infeksiyöz ajanlar, iskemi, antijen-antikor ilişkileri, ısı veya diğer fiziksel hasarlanmalar, yaşlanma, v.s.) ile başlayabilen bir olaylar serisidir. Her tip stimulus, kendi aralarında küçük farklılıklar

gösterse de karakteristik bir cevap paterni oluşturur. Makroskopik olarak, inflamatuvar cevap genellikle ödem, eritem, hiperaljezi ve ağrı gibi klinik belirtilerden oluşur (15).

İnflamatuvar cevap farklı mekanizmalar aracılığı ile meydana gelen üç ayrı fazdan oluşur:

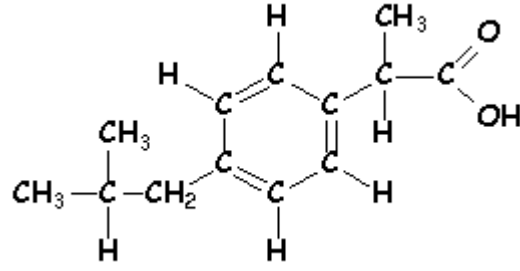
1. Akut faz : Lokal vazodilatasyon ve artmış kapiller permeabilite ile karakterizedir.
2. Uzamış, subakut faz : Daha çok lökosit ve fagositik hücrelerin infiltrasyonu ile karakterizedir.
3. Kronik proliferatif faz : Doku dejenerasyonu ve fibrozis olur (15).

PG'lerin, hücreler hasara uğradığında salındığı ve inflamatuvar eksudalarda mevcut olduğu tespit edildi. Ve bunun sonucu olarak NSAİİ'lerin tüm hücrelerde PG'lerin sentezini inhibe ettiği gözlemlendi. Bununla beraber NSAİİ, bu inflamasyona katılan lökotrienler veya diğer inflamatuvar mediatörler gibi eikozanoidlerin sentezini inhibe etmediği gözlemlendi (15).

Bunun sonucu olarak NSAİİ'lerin temel antiinflamatuvar etkilerinin siklooksijenaz enzimini inhibe etmelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür (15).

2.3.6. İbuprofen

Fenilpropionik asit türevleri içinde ilk bulunan ve en fazla kullanılan moleküldür (şekil 2). Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkinliği diğer fenilpropionik asit türevlerine oranla daha zayıftır. İnsanlarda günde 1200 mg dozunda, esas olarak analjezik etki yaptığı ve antiinflamatuvar etkisinin ancak 1600 mg hatta 2400 mg günlük doz düzeyinde belirgin duruma geldiği saptanmıştır. Genelde günlük total dozu 1200-1800 mg olduğu halde romatoid artrit veya osteoartritlerde günlük doz 3200 mg'a kadar çıkılabilmektedir. Fakat kullanım amacına göre dozu azaltılabilmektedir (15,16).



Şekil 2. İbuprofen kimyasal yapısı

Profenlerin merkezinde bir şiral merkez bulunduğu için S ve R enantiyomerleri vardır. Saf S şeklinden oluşan naproksen hariç profenler rasemat şeklindedir. S enantiyomerlerinin siklooksijenazı inhibe edici ve analjezik etki gücü R şekline göre daha fazladır. Karaciğerde R profenler tek yönlü olarak daha aktif olan S profenlere dönüştürülürler (inversiyon). En fazla inversiyona uğrayan moleküller ibuprofen ve fenoprofendir (%60). Gerek S- ve gerekse R- şekilleri karaciğerde oksidatif değişikliklere ve glukuronat konjugasyonuna maruz kalırlar (15).

Yapılan in vitro incelemelerde, ibuprofenin sadece S(+) enantiyomerinin prostaglandin sentez inhibitörü olduğu ve dolayısıyla sadece bu enantiyomerinin in vivo şartlarda antiinflamatuvar etki gösterdiği görülmüştür. Sıçan ve farelerde yapılan çalışmalar, yukarıda belirtildiği gibi rasemik ibuprofenin yarısını oluşturan inaktif R (-) izomerinin vücutta aktif izomere kısmen dönüşebildiğini göstermiştir. Bundan dolayı tıbbi amaçlı kullanımda, rasemik karışım şeklinde kullanılan ibuprofenin antiinflamatuvar dozu, analjezik dozundan daha yüksektir (15).

İbuprofen, oral alımından sonra hızla absorbe edilir ve 15-30 dakika sonra plazmada en yüksek konsantrasyonuna ulaşır. İbuprofenin analjezik etkisi ağızdan alınmasının ardından çabuk (1 saat) içinde başlar. Ancak genellikle 4 haftalık bir uygulamadan sonra etkisi belirgin hale gelir. Hastalar tarafından iyi tolere edilen bir ilaçtır (15).

Mide barsak kanalından yaklaşık % 80 oranında ve hızlı bir şekilde absorbe edilir. Plazma proteinlerine % 99 gibi oldukça yüksek bir oranda bağlanır. Fakat ibuprofen normal konsantrasyonlarda total ilaç bağlanma alanlarının oldukça küçük bir fraksiyonuna bağlanır (15,16).

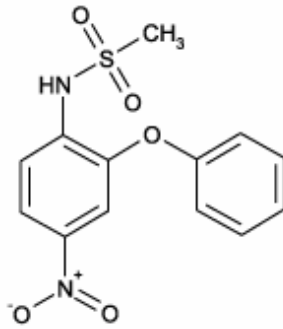
İbuprofenin ekskresyonu hızlı ve tam bir şekilde olmaktadır. Karaciğerde metabolize edilmek suretiyle inaktive edilir. Absorbe edilen dozun % 90'ından fazlası metabolitleri ve bunların konjugatları şeklinde idrarla atılır. Major metabolitleri hidrosillenmiş ve karboksillenmiş bileşiklerdir. Eliminasyon yarılanma ömrü 1.6-2.5 saattir. Metabolizması stereoselektiflik gösterir. Aktivitesi düşük olan R- enantiyomeri daha yavaş elimine edilir. Bu enantiyomer kısmen S-enantiyomerine dönüştürülür (inversiyon)(15).

İbuprofen ağrı kesici olarak başağrısı, dişağrısı, dismenore ve hafif ve orta şiddetteki postoperatif ağrıya karşı kullanılır. Romatoid artrit, osteoartrit antiinflatuar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (15,16).

En sık görülen yan etkileri gastrointestinal kanalla ilgili olanlarıdır. % 5-10 oranında görülür. En sık olarak bulantı, kusma, diyare veya kabızlık, epigastrik ağrı, mide yanması, midede dolgunluk hissidir. Daha seyrek olarak trombositopeni, cilt döküntüsü, sıvı retansiyonu ve ödem, başağrısı, baş dönmesi ve görme bulanıklığı yapabilir (15,16).

2.3.7. Nimesulid

Sülfonanilid bileşiğidir. Kimyasal formülü 4-nitro-2-fenoksimetan-sülfoksit'dir. Genellikle fonksiyonel grup olarak karboksil veya hidroksil grubu içerir (16).(şekil 3)



Şekil 3. Nimesulid kimyasal yapısı

Nimesulid antiinflatuar, analjezik ve antipiretik özellikleri olan bir ilaçtır. İnflatuar ve ağrılı durumların efektif ve güvenli semptomatik tedavisi gibi, oldukça geniş bir kullanım alanı vardır. Osteoartrit, ekstra artiküler hastalıklar ve primer dismenorede kullanılır. Antioksidan etkilerine ek olarak lökotrien ve lökosit

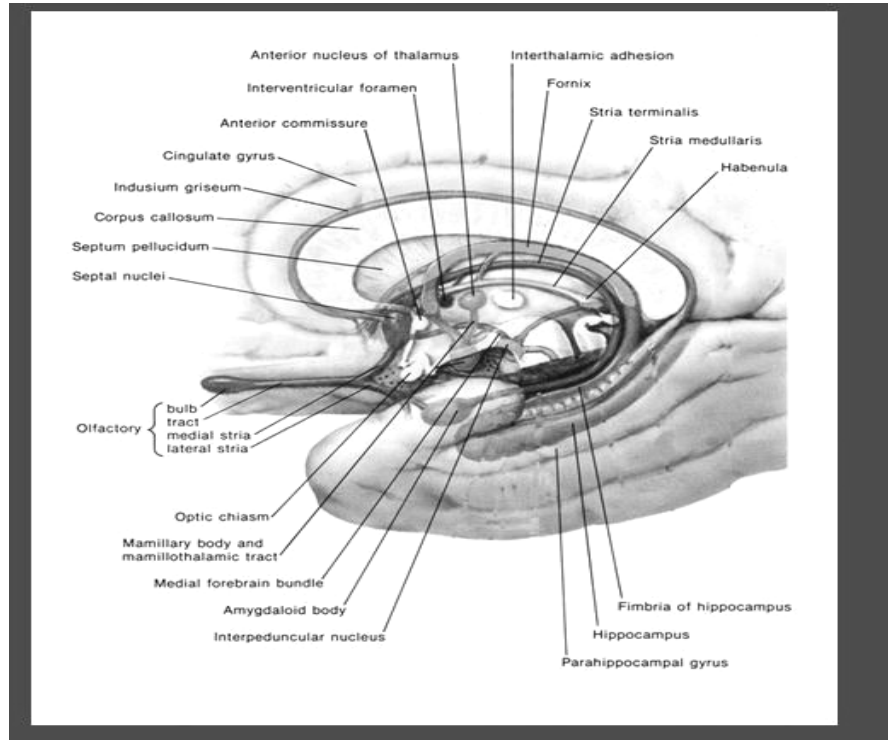
inhibisyonu üzerine etkileri vardır. İnflamatuar proseslerde rol oynayan, COX-2 aracılı PG' ler, serbest radikaller, proteolitik enzimler ve histamin gibi birçok mediatörü etkiler. Antioksidan etkiler gösterdiği de görülmüştür. COX-1' e kıyasla, COX-2' ye 5-16 kat daha selektiftir. Siklooksijenazı inhibe etmesine ek olarak, nötrofil aktivasyonunu da inhibe ederek, antiinflamatuvar etki gösterir. İnsanlarda klinik olarak önerilen dozlarda, in vivo olarak selektif COX-2 inhibitörü olduğu görülmüştür. Bu özelliğinden dolayı özellikle gastrointestinal traktusta oldukça az yan etkisinin olduğu görülmüştür (15,16).

Karaciğerde ileri derecede ve hızlı bir şekilde metabolize edilir. Eliminasyon yarı ömrü 1.2-3.2 saat kadardır (15,16).

2.4. Hipokampüs

2.4.1. Anatomisi

Hipokampüs, temporal korteksin lateral ventrikülünün alt boynuzunun tabanı boyunca uzanan, kıvrılmış bir gri cevher kabartısıdır (şekil 4). Hipokampüse bu ad, koronal kesitte deniz atına benzediği için verilmiştir (24).



Şekil 4. Limbik sistem içerisinde incelenen yapılar arasındaki bağlantılar.

2.4.2.Hipokampüsün Yapısı ve Fonksiyonları

Hipokampüs, limbik sistem içerisinde önemli fonksiyonlarıyla odak noktasını oluşturmaktadır.

Hipokampüs ve ona bağlı temporal lop yapıları; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve "hipokampal formasyon" adını alır.

Hipokampüs, hipereksitabilite özelliğine sahiptir. Hafif elektriksel uyarılmasında, uyarı bittikten sonra saniyelerce süren bir epileptik nöbet gözlenir. Bu da hipokampüsün normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir.

Hareket, yürüme ve diğer motor işlerde major rol oynamaktadır. Öğrenme ve hafıza, limbik sistem de dahil olmak üzere, SSS'nin birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampüsü etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlemlenmiştir. Lezyonun sol hipokampüste olduğu zamanda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenmektedir. Hipokampüsün iki taraflı ablasyonunda kişi, hergün gördüğü insanların bile yüz ve isimlerini hatırlamayabilir. Ancak hiç ilgisiz, başka bir faaliyet sırasında bir anlık bir hatırlama olabilir (25).

2.5. Glutamat reseptörleri

Glutamat, memeli SSS' inde önde gelen eksitatör nörotransmitterdir (26). Kortikospinal motor nöronların spinal motor nöronlara yaptığı sinapslarda major nörotransmitter glutamattır. Normalde üst motor nöron eksitasyonu ile glutamat molekülleri sinaptik aralığa düşmekte ve spinal motor nöronlardaki (postsinaptik) reseptör yerlerine giderek spinal motor nöronları depolarize etmektedirler. Glutamat reseptörleri memelilerin SSS' deki çoğu uyarıcı sinir iletisini düzenlemektedirler. Glutamat reseptörleri hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına katkıda bulunan sinaptik iletide rol alırken, bir yandan da sinir sisteminin gelişimi esnasındaki nöronlar arası bağlantının da oluşturulmasına katkıda bulunmaktadırlar (26,27).

Glutamat reseptör ailesinin amino asit dizilişi asetilkolin, GABA ve glisin reseptörlerine çok az benzer. Glutamat ayrı bir ailenin üyesidir (28).

Glutamat reseptörleri, temelde postsinaptik membranda lokalizedir. Başlıca 2 tipi vardır.

I- İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR): Doğrudan iyon kanallarını kontrol eder.

II- Metabotropik glutamat reseptörleri: İkinci haberciler üzerinden dolaylı olarak iyon kanallarını kontrol eder (28,29,30).

Bugüne kadar memeli SSS' inde 16 adet iGluR cDNA'sı ve 8 adet metabotropik glutamat reseptör cDNA'sı tanımlanmıştır. Şimdiye kadar izole edilen 16 adet iGluR cDNA' sının; 4 tanesi Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat reseptör (AMPA) subüniti (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), 5 tanesi kainat reseptör subüniti (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2) ve 7 tanesi NMDA reseptör subunitidir (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, NR3B). İçinde bulunduğumuz yıllarda, glutamat reseptör genlerinin ekspresyonunu manipüle edici birçok değişik teknik kullanılarak, glutamat reseptörlerinin tüm fizyolojisi ve patolojisi geniş bir şekilde araştırılmıştır. Birçok olguda iGluR subunitleri değişik laboratuvarlar tarafından ayrı ayrı ve de eş zamanlı olarak klonlandığı için benzer subünitlere her biri farklı isimler vermişlerdir (26).

I- iGluR

Presinaptik sinir terminallerinden salınan glutamat molekülleri iGluR' e bağlandığında bir elektriksel olaya döndürülen kısa bir kimyasal sinyal meydana getirmektedir. Postsinaptik depolarizasyonla sonuçlanan net bir iç akıma izin veren bir integral katyon seçici kanal içeren iyonotropik glutamat reseptörleri 3 geniş gruba ayrılır :

1. α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozole propionat (AMPA) tercih eden reseptörler
2. Kainat tercih eden reseptörler (KAR)
3. N-metil D-aspartat (NMDA) tercih eden reseptörler (28,29,30)

II- Metabotropik glutamat reseptörleri

Metabotropik reseptörler GTP-bağlayıcı proteinlerle (G proteinleri) bağlantılıdır ve intraselüler mesajcılarının üretimini kontrol etmektedirler (22,142,143,144). *trans*-(1S, 3R) -1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit (ACPD) ile selektif olarak aktive olurlar (28,29,30).

Glutamat iyonotropik reseptörler üzerinden eksitasyon yaparken, metabotropik reseptörler üzerinden eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektir (28,29,30).

2.5.1. NMDA Reseptörleri

İyonotropik glutamat reseptörleri sentetik agonistlere göre isimlendirilmişlerdir. NMDA glutamat reseptörleri 2-amino-5-phaphono valerik asit ile selektif olarak bloke olurken, AMPA ve kainat reseptörleri bu ajanla bloke olmazlar. Her iki reseptör de 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3 dione ile bloke olurlar. Bu nedenlerde AMPAR ve KAR non-NMDA reseptörü olarak da isimlendirilmektedir (31).

NMDAR agonistleri olan glutamat ve aspartat tipik olarak kısa zincirli dikarboksilik aminoasitlerdir ve kuvvetli exitatör nörotransmitterlerdir. Aspartat da glutamat gibi NMDAR'lerine bağlanır ve aktivite gösterir. Ancak AMPAR'leri ve KAR'lerine bağlandığında oluşturduğu etkiden daha az bir etki gösterir. NMDAR'leri ile AMPAR'leri ve KAR'leri arasında benzerlik azdır. AMPAR'leri ve KAR'lerinin kendi aralarındaki benzerlikleri daha çoktur. Tüm NMDAR alt üniteleri nötral aminoasit içermektedir. Bir tek M2 bölgesinde polar asparajin rezidüsü bulunmaktadır (30,32).

Genelde postsinaptik bölgeler hem AMPAR' ü hem de NMDAR' ü içerirken; bazı bölgelerde sadece NMDAR' leri bulunur. Gelişimin erken evresinde sinapslar sadece NMDA tipi reseptörler içermektedir (33,35). Non-NMDA iyonotropik reseptörler motor nöronlarda ve beyinde eksitator postsinaptik potansiyel'in (EPSP) büyük erken komponentini oluşturmaktadır. Yani birçok sinapsta AMPAR' leri exitatör aşırım sırasında ana başlangıç; şarj edici gibi etki etmektedir. Bu reseptörler göreceli olarak düşük bir katyon iletkenliğine sahiptirler (< 20 pS). Na⁺ ve K⁺ a geçirgen iken Ca⁺² a geçirgen değildirler. Bu sırada NMDAR'leri, intrasellüler

enzimler ve ikincil mesajcılarının aktiverlerini modüle edebilen katı bir Ca^{+2} componenti ile birlikte daha yavaş bir akım sağlamaktadır (30,32).

EPSP' nin geç komponentini oluşturan NMDA reseptör kanallarının üç özelliği vardır.

- 1- Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler (50 pS) ve Na^+ ve K^+ un yanısıra Ca^{+2} a da geçirgendirler.
- 2- Kanalın açılması bir ko-faktör olarak glisin ekstrasellüler olarak bulunmasına bağlıdır. Kanal sadece glisin varlığında çalışır. Normal koşullarda ekstrasellüler glisin yoğunluğu NMDAR kanalının çalışabileceği miktarlarda bulunmaktadır. Kinürenik asit ve aminoksalenedikarboksilik asit'in her ikisinin çoğu türevleri glisin bölgesinin kompetitif antagonistleridir.
- 3- Açılması kimyasal haberciye bağlı olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu, NMDAR' ları diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir.

Voltaja bağımlılık diğer kanallarda olmayan farklı bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Diğer kanallarda, membran potansiyelindeki değişiklikler, intrinsek voltaj sensörünün sayesinde kanalda konformasyonel değişikliklere neden olurken NMDA ile aktive olan kanalda ekstrinsek bloker olan Mg^{+2} (ekstrasellüler Mg^{+2}) açık olan kanalı kapayan bir tıkaç gibi davranır ve iyon akışına engel olur. İstirahat membran potansiyelinde (-65 mV'da) Mg^{+2} kanala sıkıca bağlanır. Ancak membran depolarize olduğunda (örneğin, non-NMDA reseptörleri glutamat ile aktive olduğunda), Mg^{+2} elektrostatik etkiyle kanaldan uzaklaştırılır ve Na^+ ile Ca^{+2} un geçişine izin verir. Bu nedenle NMDAR' lerinde en yüksek iyon akımı her iki koşulun da gerçekleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle NMDAR' ü sinaptaki presinaptik aktivite ve postsinaptik depolarizasyonu eş zamanlı olarak saptayan bir araç gibi davranmakta ve postsinaptik hücreye yeterli miktarda ikincil haberci iyon olan Ca^{+2} 'un girişine imkan vermektedir . Bu da sinaptik bağlantının kuvvetindeki plastik değişiklikleri başlatmaktadır (26,30,32).

Birçok hücrede hem non-NMDAR' ler hem de NMDAR' ler bulunmaktadır. Mg^{+2} , istirahat membran potansiyelinde NMDAR kanalını bloke ettiği için, NMDAR' lerinin EPSP' lerin oluşmasında önemli bir katkısı yoktur. Bu nedenle istirahat durumunda oluşan EPSP' lerde büyük oranlarda non-NMDA reseptörlerinin katkısı bulunmaktadır. Depolarizasyon arttıkça Mg^{+2} NMDAR kanalından

uzaklaşmakta ve NMDAR' ü açılarak bu kanallardan iyon akışı gerçekleşmektedir (28,30).

NMDAR kanalının diğer bir farkı göreceli olarak daha yavaş açılıp yavaş kapanması ve bu özelliği nedeniyle EPSP' lerin geç fazına katkıda bulunmasıdır. EPSP' nin geç fazı, Mg^{+2} un kanalı bloke etmesi nedeniyle, tek bir presinaptik sinyalden sonra zayıf bir yanıt olarak karşımıza çıkmaktadır. Oysa presinaptik nöron ard arda sinyaller gönderirse postsinaptik hücrede EPSP' ler toplanarak 20 mV veya daha fazla bir depolarizasyon oluşturmaktadır. Bu durumda NMDAR'ü büyük ölçüde Ca^{+2} un katkısı ile daha büyük akımlara yol açmaktadır. NMDAR aktivasyonu sonucu, post-sinaptik hücrelerde, Ca^{+2} a bağımlı enzimler ve bazı ikincil haberciler devreye girmektedir. Bu biyokimyasal reaksiyonlar, sinapsta bazı uzun vadeli modifikasyonlara katkıda bulunan sinyal yollarını tetiklemektedir. Öğrenme ve bellekte sinapsta gerçekleşen değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir. NMDAR' lerinin aktivasyonu presinaptik aktiviteye bağlı olduğu için ve uzun süreli sinaptik modifikasyonlar ile ortaya çıktığı için çoğu kez bu duruma aktiviteye-bağımlı sinaptik modifikasyonlar denmektedir (28,30).

Gen knockout teknikleri kullanılarak öğrenme ve hafızada rolü olan NMDAR' üne bağlı sinaptik plastisite keşfedilmiştir. Yapılan bu deneyler CA1 hipokampal NMDAR' ünün hipokampusa bağımlı spatial ve non-spatial hafızaların oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (33). Öğrenmenin değişik formlarının meydana gelmesinde rolü olan hipokampusta sinaptik plastisitenin bir türü olan LTP öğrenme ve hafızanın nöronal mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (30,31). LTP sinaptik kuvvetteki aktiviteye bağımlı uzamış artış olarak tanımlanabilir (32). Daha önceki çalışmalar hipokampal sinaptik plastisitenin LTP benzeri formlarının spatial öğrenme ve hafıza ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (30). Hipokampusün CA1 bölgesindeki LTP' nin indüksiyonu bir dizi olayı içermektedir. İlk olarak NMDAR kanalının presinaptik glutamat salınımına cevap olarak açılması için postsinaptik membranın yeterince depolarize olması gerekmektedir. Kanalın açılması postsinaptik hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun önemli derecede yükselmesine olanak vermektedir. Ca^{+2} daki bu artış metabotropik glutamat reseptörünün aktivasyonuna bağlı fosfoinozitid düzeylerindeki yükselmeye birlikte PKC ve CAMKII' nin de dahil olduğu

proteinkinazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu proteinkinazlar daha sonra sinaptik kuvvette uzun süreli modifikasyonlara yol açacak proteinleri düzenlemektedirler (32).

Homosinaptik LTD ise sinaptik kuvvetin aktiviteye bağımlı uzamış zayıflaması olarak tanımlanır ve bir anlamda LTP'nin fonksiyonel karşıtıdır. CA1 alanındaki LTP gibi LTD'nin indüksiyonu da NMDAR' lerinin aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır (32,33).

Sinaptik aktivitenin regülasyonunda protein fosforilasyonu ve defosforilasyonunun önemli mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. NMDAR kanalının subünitleri farklı proteinkinazlar ve protein fosfatazlar tarafından doğrudan fosforile ve defosforile edilmektedir. NR1 , NR2A ve NR2B subünitleri hem cAMP bağımlı proteinkinaz A (PKA) hem de proteinkinaz C (PKC) tarafından farklı bölgelerden fosforile edilebilmektedir. CAMKII NR2B subünitinin karboksi terminal ucundaki spesifik bir kalıntıyı ve/veya onun NR2A subünitindeki karşılığını fosforile etmektedir. Protein tirozin kinaz da NR2A ve NR2B subünitlerini fosforile etmektedir(34).

2.5.2. NMDA Reseptör Tipleri:

NMDAR' lerinin şu ana kadar tanımlanan yedi tane subüniti vardır. Bunlar; NR1, NR2A-B-C-D ve NR3A-B (6,57). NMDAR'leri beyin tümünde yaygın olarak bulunmaktadır ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde buldukları yer ise hipokampusün CA1 bölgesidir (26).

NR1: Glisin bağlayıcı bölgeyi içerir. 938 aminoasitten'ten meydana gelmiştir. 105,5 kDA ağırlığındadır. NR1 reseptör subtip ekspresyonu SSS'de hemen hemen her yerde bulunmaktadır.

NR2: Glutamat bağlayıcı bölgeyi içerir. 4 grubu bulunur:

NR2A: Beyinde postnatal ekspresyon edilir.1464 aminoasitten meydana gelir ve 165.5 kDA ağırlığındadır. Ekspresyonu için yüzeyde NR1 N-terminalinin bulunması gereklidir. NR2A mRNA'sı tüm beyinde yaygın olarak bulunur; fakat serebral korteks, hipokampus ve serebellumda daha yoğun olarak bulunmaktadır.

NR2B: Tüm embriyonik beyinde ekspresyon edilir. Ayrıca embriyonik ve

neonatal kardiyak myositlerde exprese edilir. Postnatal olarak yalnız ön beyinde exprese edilir. 1482 aminoasitten oluşur ve ağırlığı 165,9 kDA'dır. NR2B'nin ekspresyonu önbeyinde, serebral korteks, hipokampus, septum, kaudat ve putamende seçici olarak yüksek düzeyde bulunmaktadır.

NR2C: Postnatal olarak cerebellumda exprese edilir. 1239 aminoasitten oluşur ve 135,4 kDA ağırlığındadır. NR2C'nin ekspresyonu ise serebellumda dominant olarak bulunurken, talamusda ve olfaktör bulbusda daha az olarak bulunmaktadır.

NR2D: Diencephalon ve beyinsapında embriyonal ve neonatal olarak exprese edilir. 1323 aminoasitten oluşur, 142,9 kDA ağırlığındadır. NR2D'nin ekspresyonu ortabeyin ve arkabeyinde yüksek iken; düşük düzeyleri talamusda, olfaktör bulbusda ve beyin sapında bulunmaktadır. NR2A ekspresyonunun tamamlayıcıdır.

NR3: Silik fonksiyon gösterir. NR3A ve NR3B olarak iki tiptir. Ca^{+2} permeabilitesi yavaş ve uzun sürer. NR3A; Serebellum hariç korteks, hipokampus (CA1), ortabeyin, arkabeyin ve spinal kordda exprese edilir. Neonatal ekspresyonları çok güçlüdür, sonra azalmaya başlamaktadır (29,30).

2.5.3. NMDA Reseptörünün Yapısı

Şu anda genellikle hem fikir olunan nokta; NMDAR'lerinin NR1 subüniteleri ve beraberinde NR2 subünitelerinin en azından bir tipinden oluşan heteromerik yapılar olduğu şeklindedir. NR2 subünitelerinden gelen domainler glisin bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. Membrana doğru dizilmiş her glutamat reseptör subünitesi, farklı yaklaşımların bir bileşkesinden ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalar kaçınılmaz bir kanıt ortaya koymuştur: NMDAR, AMPAR ve KAR subüniteleri 3 adet membrana uzanan domain içermektedir (M1, M3 ve M4). M2 domaini membrana sitoplazmik kenardan daldırılmış şekilde bir büküm oluşturmaktadır. Her NMDAR alt ünitesi geniş bir extrasellüler N-terminal domaini ve intrasellüler C-terminali sergilemektedir (29,30,32).

NMDAR poru Ca^{+2} 'a yüksek derecede geçirgenlik sağlar ve Mg^{+2} ile bloke olur:

NMDAR'ü voltaja bağımlı tek iyonotropik reseptördür. Normal miktarlarda Ca^{+2} bazı bellek tiplerinin oluşmasında gerekli sinyal yollarını tetiklemektedir.

NMDAR'lerinin aktivitesi Mg^{+2} ile voltaja hassas blokajı ve Ca^{+2} 'a geçirgenliği pora uzanmış olan M2 segmentindeki aminoasit rezidülerine dayanmaktadır. Katyon seçiciliği M2 segmentinin kritik bir alanına (N alanı) dayanmakta, bu alan NR1 ve NR2 alt ünitelerinde bulunan bir asparajin rezidüsü tarafından oluşturulmaktadır. NR2 alt ünitesi, membranın extrasellüler yüzünden gelen Mg^{+2} iyonları için temel bağlanma bölgesini içermektedir. Yani Mg^{+2} blokları M2'deki kritik asparajin rezidüleri veya onlara çok yakın olan aminoasit rezidülerinin etkileşimine dayanmaktadır. Bu bağlanma bölgesi; N bölgesi, yüksek Ca^{+2} geçirgenliği için kritiktir. NR1 rezidüleri kanalın dış vestibülünü oluşturmaktadır. Bu vestibül M3 (C-terminal ucunda) ve M4 (N-terminal ucunda) segmentlerinin M1'den önce gelen parçaları tarafından oluşturulmuştur (28,29,30,32).

2.5.4. Nörolojik Hastalıklar ve Glutamat Reseptör Aktivasyonunda Artış

Bazı koşullar altında glutamat gibi eksitator nörotransmitterlerin dengesizliği, bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Yüksek miktarlarda glutamat nöronlar için toksiktir. Beyindeki birçok hücrede L-glutamata yanıt veren reseptörler bulunmaktadır. Doku kültürlerinde ortama yüksek düzeyde glutamat eklenmesi bir çok nöronu öldürmektedir, buna glutamat eksitotoksitesisi adı verilmektedir. Bir çok hücrede bu tür toksisite NMDA tipi reseptörlerden Ca^{+2} 'un hücre içine girişi sorumlu tutulmaktadır. Yüksek intrasellüler Ca^{+2} , kalsiyuma bağlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücreye toksik olan serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. İnme sonrası hücre hasarından, status epilepsisinde tekrarlayan episodlarında ortaya çıkan hücre ölümünden, Huntington hastalığı, amiotrofik lateral skleroz'da (ALS) olivopontocerebellar atrofi gibi dejeneratif hastalıklarda kronik glutamat reseptör aktivasyonu ve glutamat toksisitesinin payı olduğu düşünülmektedir. Spesifik NMDAR blokerleri, glutamatın toksik etkisini engelleyebilmesi nedeniyle bugün kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır (28,30,32).

Enerji metabolizması ile özellikle uyduğu zaman glutamat ve aspartat eksotoksin olabilir. Dikkate değer olarak hipotalamusun arcuate nükleusunda kan-beyin bariyeriyle iyi korunmayan alanlarda akut nörodejenerasyon gösterilmiştir. İyonotropik glutamat reseptörlerinin çoğunun aktivasyonu çeşitli nörodejenerasyon mekanizmalarını içine almaktadır. Örneğin nörodejenerasyonu iskemik olay

izlemekte ve LTP benzeri fenomenin patolojik aşırılığı bağlanma mekanizmalarına benzeyebilmektedir. Ca^{+2} girişi ve eşlik eden NMDAR ilgisi ile özellikle AMPAR aktivasyonundan nöronal hasar ortaya çıkmaktadır (28,30,32).

Glutamat aracılı nörotoksisitede predispoze nöronlarda bozulmuş ATP üretimi metabolik inhibisyonuna yol açmaktadır. Hasarın şiddetlenmesi ile serbest O_2 radikalleri ortaya çıkmaktadır. Bozulmuş Ca^{+2} homeostazı ile sonuçta enerji metabolizması hasar görmekte ve bazı kronik nörodejeneratif hastalıklar belirginleşebilmektedir (28,30,32).

3.MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları:

Bu çalışmada Wistar Albino cinsi toplam 30 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, özel bir medikal kuruluş tarafından temin edildi. 16 aylık (yaşlı) sıçanlar kontrol (n=10), ibuprofen verilen grup (n=10) ve nimesulid verilen grup (n=10) şeklinde 3 gruba ayrıldı. Sıçanlar özel olarak hazırlanmış kafeslerde 8 hafta süreyle tutuldular. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (25° C)'da yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ile toplam 8 hafta süreyle beslendiler.

Kontrol ve nimesulid grubundan 1'er adet, ibuprofen grubundan 4 adet olmak üzere toplam 5 adet sıçan çeşitli nedenlerle farklı zamanlarda kaybedildi.

Yaşlı kontrol grubu, ağırlıkları 220±20 gr olan 15±1 aylık 10 adet sıçandan oluşturuldu. Bu gruptaki hayvanlara ibuprofen ve nimesulid grubundakilerle aynı hacimde, 8 hafta boyunca serum fizyolojik oral gavaj yoluyla verildi.

Yaşlı nimesulid grubu, ağırlıkları 250±16 gr olan 15±1 aylık 10 adet sıçandan oluşturuldu. Bu gruptaki hayvanlara 9mg/kg olacak şekilde günde 2 kez, 8 hafta süresince nimesulid (Sigma Chemical Company) oral gavaj yoluyla verildi (35,36,37,38).

Yaşlı ibuprofen grubu, ağırlıkları 235±13 gr olan 15 ±1 aylık 10 adet sıçandan oluşturuldu. Bu gruptaki hayvanlara 40 mg/kg olacak şekilde günde iki kez, 8 hafta süresince ibuprofen (sodyum tuzu, Sigma Chemical Company) oral gavaj yoluyla verildi (39,40).

Sıçanlar iki ay süreyle devam eden oral gavaj ile ilaç verilmesini takiben 8 hafta sonunda aynı gün içerisinde, im. olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin,

Alfasan IBV.)-% 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında dekapite edilerek deney sonlandırıldı.

Sıçanlar dekapite edilerek öldürüldükten sonra beyinleri ve kanları alındı. Filtre kağıtları soğuk fosfat tamponuyla ıslatılıp buz paketleri üzerine konarak hipokampus çıkartma düzeneği oluşturuldu. Dekapitasyondan hemen sonra bu düzenek üzerinde hipokampuslar çıkarılarak önceden hazırlanmış 50 mM fosfat tamponu içeren ependorf tüplerine konuldu ve toplanan tüm numuneler (plazma, beyin, hipokampus), analizin yapıldığı tarihe kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler:

1- Soğutmalı santrifüj	: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2- Santrifüj	: Jouan B4İ (Fransa)
3- Derin dondurucu	: Uğur (Türkiye)
4- Hassas terazi	: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5- Vorteks	: Nüve NM 100 (Türkiye)
6- Otomatik pipetler	: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7- Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8- pH metre	: Hanna Instruments (Portekiz)
9- Manyetik karıştırıcı	: Nüve (Türkiye)
10- Elektroforez cihazı	: EC Apparatus Corporation 250-90 (ABD)
11- Biyokimya analizörü	: Roche/Hitachi Modular P800 (Almanya)
12- Kodak Image Station 2000 MM	: USA
13- 8- Cam-Teflon homojenizatör	

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler:

SDS-PAGE ve Western Blot İçin Kullanılanlar:

- Akrilamid : bisakrilamid % 30 T, % 2.6 C; Sigma (Almanya)
- Tris, Merck (Almanya)
- Glisin, Merck (Almanya)
- SDS, Merck (Almanya)

- APS, Merck (Almanya)
- TEMED, Merck (Almanya)
- 2-Merkaptoetanol, Merck (Almanya)
- Brom Fenol Blue, Merck (Almanya)
- Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
- Tween 20, Merck (Almanya)
- Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
- EDTA, Merck (Almanya)
- EGTA, Merck (Almanya)
- Leupeptin, Sigma (Almanya)
- Aprotinin, Sigma (Almanya)
- Benzamidin, Sigma (Almanya)
- Triton X-100, Sigma (Almanya)
- Immobilon-P, Sigma (Almanya)
- Kromotografi filtre kağıdı, Whatman (İngiltere)
- Metanol, Merck (Almanya)
- Hidroklorik Asit, Merck (Almanya)
- Anti NR2A, Sigma (Amerika)
- Anti NR2B, Sigma (Amerika)
- Monoklonal anti-rabbit IgG, Sigma (Amerika)
- BCIP/NBT Phosphatase Substrate, Sigma (Almanya)
- Prestained Molecular Weight Marker, Sigma (Amerika)

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler:

SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılanlar:

1- 4 x Lower Buffer: 1.5 M Tris HCl, pH: 8.8

36.3 g Tris 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH'ı 8.8'e ayarlanır. Soğutulup pH'ı tekrar 8.8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

2- 4 x Upper Buffer: 0.5 M Tris HCl, pH: 6.8

12.1 g Tris, 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH'ı 6.8'e ayarlanır. Soğutulup pH'ı yeniden 6.8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

Lower jel: (% 7.5'luk)

Distile su	4450 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2.6 C	2500 µl
4 × lower buffer (tris HCl, pH: 8.8)	2500 µl
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	450 µl
TEMED	10 µl

Upper jel: (% 4'lük)

Distile su	2920 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2.6 C	670 µl
4 × Upper buffer (tris-HCl, pH: 6.8)	1250 µl
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	200 µl
TEMED	10 µl

3- Homojenizasyon buffer: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml Aprotinin, 10 µM benzamidin ve % 1'lik Triton X-100 bulunacak şekilde total hacim 30 ml'ye tamamlandı.

4- Sample buffer:

Upper buffer (0.5 M Tris-HCl, Ph: 6.8)	2.0 ml
Gliserol	1.6 ml
% 10 SDS	3.2 ml
2-Merkaptoetanol	0.8 ml
% 0.1(w/v) Brom fenol blue	0.4 ml

5- Running buffer: 15 gr Tris, 72 gr Glisin, 5 gr SDS, pH 8.3'e ayarlanıp distile su ile 1 lt'ye tamamlanır. 5 kat sulandırılarak kullanılır.

6- Transfer buffer: 0.606 gr Tris, 2.882 gr Glisin ve 1 ml % 10 SDS, distile su ile 160 ml'ye pH: 8.2-8.4 olacak şekilde tamamlanır. 40 ml metanol eklenir.

7- TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 12.1 gr Tris, 17.5 gr NaCl, 2 ml Tween 20 (pipetle yavaşça çekilir, yoğun bir madde olduğu için) pH: 7.5 olarak ayarlanıp 2 litreye distile suyla tamamlanır.

8- Primer antikolar: NR2A 1/3000 ve NR2B 1/5000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

9- Sekonder antikor: Antirabbit IgG (Alkalen fosfataz konjuge) 1:10.000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu:

Hipokampusler tartılıp, SDS-PAGE ve Western Blot prosedürü uygulanmak üzere ayrıldı. Aynı gruptaki farklı sıçanlara ait hipokampus örnekleri tartıldıktan sonra kontrol ve nimesulid grupları 3'erli gruplar, ibuprofen grubu 2'şerli gruplar halinde birleştirildi ve ardından 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edildi. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbeye homojenizasyon yapıldı. Homojenize edilen örnekler 10000 g'de +4°C'da soğutmalı santrifüjde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlarda SDS-PAGE ve Western Blot çalışıldı.

3.2.2. SDS-PAGE Yöntemi:

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışıldı (152). % 7.5'lik lower jel ve % 4'lük upper jel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein olacak şekilde, doku homojenatı sample buffer'la 1/1 oranında karıştırılarak uygulandı.

3.2.3. Western Blot Yöntemi:

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldı ve daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer prosedürü sonrası anti NR2A ve anti NR2B içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar, taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda

yeterli boyanma sağlanana kadar bekletildi. Oluşan bantlar Kodak İmage Station 2000 MM cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör subüniti için kendi arasında karşılaştırıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 11.0 for Windows” paket programı kullanılarak yapıldı. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analiziyle değerlendirildi. Western Blot sonuçları ortalama \pm SEM olarak verildi. P değerinin 0.05’den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Western Blot analizi ile NR2A, NR2B reseptör düzeyleri:

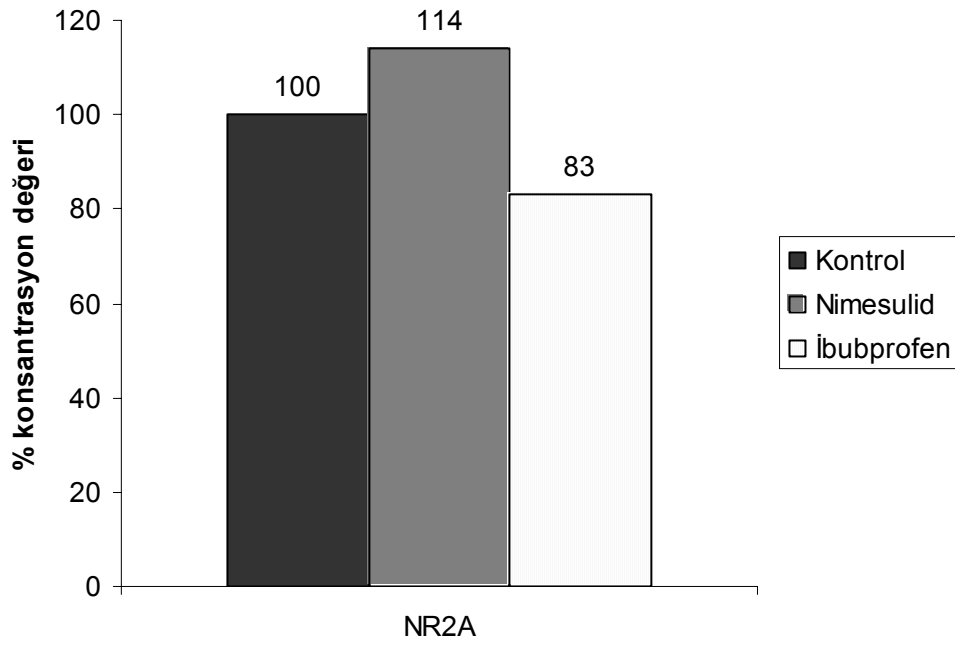
NR2A reseptör analizi sonucu kontrol grubuna göre, nimesulid grubunda %14'lük bir artış, ibuprofen grubunda ise %17'lik bir azalma görüldü, fakat her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$). (Tablo 1) (Şekil 5)

NR2B reseptör analizi sonucu kontrol grubuna göre, nimesulid grubunda %18'lük bir artış, ibuprofen grubunda ise %5'lik bir azalma görüldü, fakat her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$). (Tablo 1) (Şekil 6)

Gruplar	NR2A (optik dansite)	NR2B (optik dansite)
Kontrol n=9	100	100
Nimesulid n=9	114,18± 7,2	118,26±9,2
İbuprofen n=6	83±6,6	95±8,5

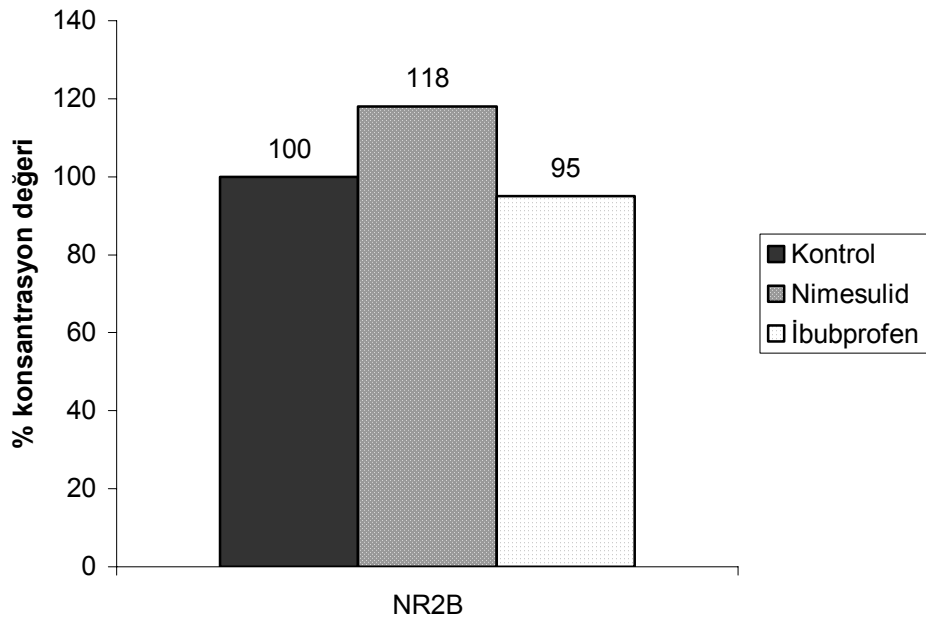
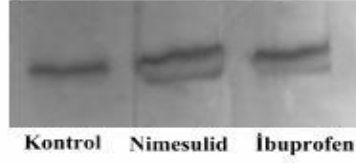
Tablo 1: Tüm gruplarda NR2A, NR2B reseptör yoğunlukları ortalama ve \pm SEM değerleri

NR2A



Şekil 5: NR2A'ya ait Western Blot örneği. Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir. Kontrol grubuna göre nimesulid grubunda % 14'lük bir artış ($p>0.05$), ibuprofen grubunda ise % 17'lik bir azalma görüldü ($p>0.05$).

NR2B



Şekil 6: NR2B'ye ait Western Blot örneği. Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir. Kontrol grubuna göre nimesulid grubunda % 18'luk bir artış ($p>0.05$), ibuprofen grubunda ise %5'lik bir azalma görüldü ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Yaşlılarda senil demansın en yaygın nedeni AH' dir (1). Kısa süreli hafızanın bozulmaya başlamasıyla karakterize, progresif nörolojik bir hastalıktır. Hastalarda zamanla şiddetli kognitif ve fiziksel yetersizlik meydana gelmektedir (5). AH, hafıza ve konsantrasyon kaybı, entelektüel bozulma, bozulmuş dikkat ve dil becerisi, apraksi, konfüzyon, duygu durum değişiklikleri, zaman ve yer disorientasyonu ile karakterizedir (12,13).

Yaşa bağlı hafıza zayıflığı 65 yaş üstü kişilerin % 40' ını etkileyen bir durumdur. Orta şiddette kognitif bozulmaları olan yaşlı insanların günlük yaşamlarını sürdürebilme yeteneklerinde dramatik bir bozulma olmaz. Bununla beraber bu durum sıklıkla gelecekteki bir nörodejeneratif hastalığın (AH gibi) belirtisi olabilir (2). AH oluşumunda kesin bir neden bulunamamakla beraber AH'ye götüren hücre dejenerasyonunun mekanizmaları arasında inflamasyonun yeri ile ilgili önemli bilgiler vardır. Akut faz proteinleri, proinflamatuvar sitokinler ve aktive olmuş kompleman ürünleri gibi çok sayıda inflamatuvar protein AH'nin beyin lezyonlarında tespit edilmiştir (1,4).

İnflamasyon bir çok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde rol oynar. Normal yaşlanma sürecinde hem sistematik olarak hem de santral sinir sisteminde inflamasyon prosesinde artma meydana gelmektedir (4). Yapılan bir çok çalışmada AH ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların altında inflamasyonun yattığı görülmüştür (4,54,55,56). AH'de inflamatuvar mikrogial ve astroglial aktivasyonun tüm işaretleri, amiloid depositlerin içinde ve dışında, ayrıca nörofibriler yumakların birlikte bulunduğu nöronların aksonları boyunca mevcuttur (41). Hücre kültürü ve hayvan modellerinde glial hücrelerin inflamatuvar aktivasyonu ile amiloid birikiminin korele olduğu görülmüştür (41). AH'de hangi farklı patofizyolojik olayların özgün semptomların gelişmesini sağladığı bilinmemektedir. İnflamatuvar aktivasyonun kognitif bozulmanın hızını arttırdığı düşünülmektedir (41).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda AH'deki patolojik bulgular ile ilişkili olduğu görülen inflamatuvar olayların NSAİİ kullanımı ile azaldığı, hastalığın ilerlemesinin yavaşladığı veya başlangıcının geciktiği görülmüştür (41,43,44). Ve yapılan birçok çalışmada uzun süreli antiinflamatuvar ilaç kullanımının AH'de yararlı

olabileceği görülmüştür (5,43,44,45).Daha sonra NSAİİ, yeni tedavi stratejilerinin gelişmesinde kullanılmıştır. İndomethazin ile yapılan klinik çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilirken steroidler ile yapılan çalışmalarda yararlı bir etki görülememiştir. Daha sonra selektif ve non selektif COX inhibitörleri ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. COX inhibitörleri mikroglial ve astroglial hücreler üzerindeki etkilerine ek olarak nöronal prostaglandin üretimini azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda PG'lerin nörotoksisiteyi arttırdığı veya astroglial hücrelerde proinflamatuvar sitokin sentezini indüklediği düşünülmüştür. İntraselüler yolları etkileyerek mikroglia veya monosit aktivasyonunu azaltan yeni stratejilerin efektif olabileceği çeşitli hücre kültür veya hayvan modellerinde görülmüştür fakat henüz yeterince klinik çalışma yapılmamıştır (41).

Beyin, COX-1 ve COX-2 izoformlarının her ikisini de içerir. Diğer dokulardan farklı olarak beyinde normal fizyolojik durumlarda da COX-2 ekspresyonu olur. Beyinde COX-2 düzeyleri inflamatuvar sinyaller ve fizyolojik nöronal plastisite ile dinamik bir şekilde regüle edilir. COX-2, serebral korteks, hipokampus ve amigdaladaki eksitator nöronlarda mevcuttur ve bu da COX-2'nin nörotransmisyon ve postsinaptik sinyalizasyonda rol oynadığını düşündürmektedir (20,23). COX-2 ürünleri olan PG'lerin adrenerjik, noradrenerjik ve glutaminerjik transmisyon üzerinde modülatör etkileri vardır. Nörotransmisyonun modülasyonuna ek olarak, PG'lerin kolinerjik reseptör aktivitesinin regülasyonunda da yer aldığı görülmüştür. Bu gözlemler ve diğer çalışmalardan elde edilen bulgular bize COX-2'nin nöronal plastisite, sinaptik aktivite ve hafızanın işlenmesi sırasında önemli rol oynadığını göstermektedir (23).

AH'nin tedavisinde NSAİİ'lerin etkisini inceleyen epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, COX enzimlerinin AH'nin oluşum mekanizmalarında önemli rol oynadığı görüşünü desteklemiştir (1). Fakat, AH'de, COX-1 ve COX-2 enzimlerinin ve inflamatuvar süreçlerin rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Hastaların non selektif COX inhibitörlerine karşı verdiği klinik cevap sonrası COX enzimlerinin her iki formuna dikkat çekilmiştir. COX-1 izoformu demansı olan ve olmayan hastaların nöronlarında ve mikroglial hücrelerinde tespit edilmiştir (1). Demanslı hastalarda COX-1 ekspresyonunun frontal ve temporal kortekste arttığı ve mikroglial hücrelerde COX-1'in varlığının amiloid plak oluşumu ile ilgili olabileceği

düşünülmektedir. Alzheimer' lı hastalarda frontal korteks, talamus ve hipokampal alanlardaki büyük nöron gruplarında COX-2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Ayrıca, nörofibriler yumakları olmayıp amiloid plakları artmış henüz demans gelişmemiş bireylerde de COX-2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu bulgular COX-2' nin AH'nin erken evrelerinde rol oynadığını düşündürmektedir (1).

AH olan bireylerde, nörofibriler yumakları olan nöronlar COX-2' yi eksprese ettikleri ve nöronal COX-2 ekspresyonundaki ve nörofibriler yumaktaki artışın, yaşla korele olduğu görülmüştür. COX-2'nin A β peptidinin üretimini stimüle ettiği ve nöronal COX-2 ekspresyonunun arttığı transgenik farelerden alınan nöronların, COX-2' nin A β toksisitesine daha yatkın olduğu görülmüştür. Dolayısıyla COX-2'nin AH'nin oluşum sürecinde önemli bir rol oynadığı açıktır fakat nöronal dejenerasyon ve COX-2 arasındaki mekanizma çok iyi anlaşılammıştır (1).

NSAİİ'ler, COX enzimini inhibe ederek inflamasyonu azaltmaktadır ve sonuç olarak pro-inflamatuar prostoglandinlerin üretimini sınırlandırmaktadır. NSAİİ'lerin kronik kullanımı AH riskini azaltıyor gibi görünse de, yaşlı bireylerde NSAİİ'lerin kognitif fonksiyona etkisi halen tam olarak anlaşılammıştır (4). İndometazin ile yapılan bir çalışmada, indometazinin yaşlı insanlarda sensorimotor koordinasyonu ve kısa süreli hafızayı güçlendirdiği görülmüştür. Diğer bir çalışmada ise aspirin veya selekoksibin kronik kullanımının yaşlı ratlarda öğrenmeyi arttırdığı gözlenmiştir (4).

Yapılan epidemiyolojik çalışmaların bir kısmında AH başlangıcı ve NSAİİ kullanımı arasında pozitif bir ilişki görülmemiştir (46,47). Fakat ilacın kullanım süresi, dozu, hastaların kullanım şekli veya klinikte uygun izlemin yapıp yapılamaması gibi faktörlerin bu sonucu etkilemiş olabileceği düşünülmüştür. Bu faktörler dikkate alındığında 85 yaşın altında bir önceki yıl içinde en az 6 ay NSAİİ kullanmış kişilerde AH gelişim riskinin relatif olarak düşük olduğu gösterilmiştir. AH'lerden alınan beyin dokusu örneklerinde proinflamatuar sitokinlerin aşırı derecede salındığı ve NSAİİ'lerin düzenli kullanımının, nöroinflamasyonda rol alan, astrosit ve aktive mikroglia sayısını azalttığı gösterilmiştir (6).

Smith ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada genç ve yaşlı grup ratlara oral yolla aspirin vermişler (6). Çalışmanın sonucunda ratlarda aspirin uygulamasının öğrenme hızında belirgin bir iyileşmeyi indüklemek için yeterli olduğu görülmüştür. Çalışmada ratların ilaç öncesi ve sonrasındaki performansları Morris Water Maze

sistemiyle değerlendirilmiş ve kognitif yetenekteki iyileşme yaşlı ratlarda en belirgin olarak gözlenmiştir. İlaç öncesi yaşlı grup genç gruba göre daha başarısız bulunmuş fakat aspirinle tedavi sonrasında yaşlı grupta öğrenme konusunda anlamlı bir fark meydana gelmiştir. Fakat genç grubun performansında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu makalede de gözlenen aspirinin yaşa özgül etkileri, insanlarda yapılan bazı ön çalışmalara da yansımıştır. NSAİİ'lerin demansı olmayan orta yaşlı bireylerde kognitif iyileştirme özelliğinin olmadığı bildirilmiştir. Fakat geriatik bireylerde mental yetenekleri artırdığı görülmüştür. Ayrıca yaşlı bireylerdeki NSAİİ kullanımının kognitif bozulmaya karşı koruyucu bir etkisi olduğu görülmüştür (6).

Yaşlı hayvanlarda yapılan standart testlerde, hafıza ve spatial öğrenmede bozukluklar olduğu görülmüştür. Bu bozuklukların hücrel ve moleküler mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır. Fakat bu defisitlerin temelinde özellikle hipokampüste yoğun olarak bulunan NMDAR'nin büyük rol oynadığı düşünülmektedir. NMDAR'ın, öğrenme ve belleğin hücrel substratı varsayılan LTP'nin bazı formlarının indüksiyonunda esas rolü oynadığı düşünülmektedir. Yaşlı ratlarda yapılan bazı çalışmalarda NR1 ve özellikle NR2B subunitlerinin ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bunun sonucunda öğrenme, bellek ve LTP'deki yaşa bağlı defisitlerin altında yatan mekanizmanın NR1 ve özellikle de NR2B subunitlerindeki azalma olduğu düşünülmüştür (9). Alzheimer hastalarının beyinlerinde hem nöronal nikotik ACh reseptörlerinin hem de NMDA reseptörlerinin down regülasyona uğradığı görülmüştür (10). AH'nin nöropatolojisinin ilerlemesi ile birlikte NR1/2B subunitlerinin mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı fakat NR2A subunit ekspresyonunun değişmediği görülmüştür (42). Alzheimer hastalarında NMDA reseptörlerinin, özellikle de NR1 ve NR2B subunitlerinin azalmasının, hafıza bozukluğuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (10). NMDAR aktivasyonu Ca^{+2} iyonlarına geçirgen olan katyon kanallarını açar. İntraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunda artış, sinaptik aktivitede artmaya yol açan olaylar kaskadını başlatır. Aktiviteye bağımlı sinaptik artış, LTP olarak isimlendirilir. Bununla beraber, NMDAR inme ve travma gibi akut SSS olaylarında olduğu gibi, endojen glutamat ile tekrarlayan şekilde aktive edilirse aşırı Ca^{+2} akışı meydana gelir. Bu da hücre disfonksiyonu ve ölümü ile sonuçlanan intraselüler olaylar kaskadını başlatır. Sonuç olarak, çok fazla reseptör fonksiyonu

da, yetersiz reseptör fonksiyonu da çeşitli bozukluklara yol açmaktadır. Alzheimer hastalarında azalmış NMDAR fonksiyonu hafıza bozukluğunu kötüleştirirken, bir yandan da Ca^{+2} akışını azaltarak eksitotoksisiteyi azaltmaktadır (10).

COX-2 nöronal dendritik uçlarda yapısal olarak mevcuttur ve sinaptik bir stimulusa cevap olarak hızla eksprese olur. Öğrenme ve hafıza sürecinin temelinde sinaptik aktivite vardır ve AH patolojisinin selektif olarak hedef aldığı nokta da burasıdır. COX-2'nin sinaptik regülasyonu ve bazal düzeyde ekspresyonu NMDAR'e bağlıdır (1). NMDAR'nin MK-801 adlı NMDAR antagonisti uygulaması ile blokajı sonrası COX-2 ekspresyonunun tamamen inhibe olduğu saptanmıştır. Bu da nöronlarda NMDAR aktivasyonunun COX-2 upregülasyonunda yer aldığını göstermektedir. İn vitro bir çalışmada NMDA'ye maruz bırakılan kortikal hücrelerde NMDAR aktivasyonu ile zaman içinde COX-2 mRNA indüksiyonuna neden olmuş ve bunun sonucunda ile PG birikimi meydana gelmiş ve bu da nöronal ölümle sonuçlanmıştır. NMDA ile stimüle olan PG üretimi ve sonrasındaki nöronal ölüm selektif COX-1 inhibitörüyle değil fakat selektif COX-2 inhibitörü uygulanarak azaltılmıştır. Bu çalışma glutamat aktivitesi, sonrasında COX-2 indüksiyonu ve son olarak nöronal ölüm arasında bir bağlantı ortaya koymaktadır (18). Eksitotoksik nöronal dejenerasyon AH patolojisinde de yer almaktadır ve COX aktivitesi eksitotoksisite ile ilişkilidir (1). NSAİİ'lerin AH' deki etkinliği nöronal ölümü azaltarak kognitif fonksiyonlarda iyileşme ve Alzheimer hastalığının ortaya çıkışını geciktirme şeklinde olabilir (1).

Mesches ve ark. (4) NSAİİ'lerin diyetel uygulamasının yaşa bağlı hafıza bozukluklarına etkisini tespit etmek amacıyla sulindak (non selektif COX inhibitörü) ile bir çalışma yapmışlardır. Yaşlı ratlara, 2 ay süre ile oral yolla sulindak verilmiştir. Öğrenme ve hafıza performansının test edildiği 2 ayrı sistem olan, radial arm water maze ve 'contextual fear conditioning'de sulindakın hipokampüse bağlı hafızadaki yaşa bağlı defisitleri azalttığı görülmüştür.

Aynı çalışmada NSAİİ uygulanmasının, hem NR1 hem de NR2B subunitlerinde yaşa bağlı defisitleri iyileştirdiği görülmüştür. Daha ötesi, hem radial arm water maze hem de 'contextual fear conditioning' performansları ile NR1 ve NR2B arasında zayıf ama önemli bir korelasyon saptanmıştır. Bu çalışmada yaşlanmanın NR2A subuniti üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. Farelerde

NMDA NR2B subunitinin fazla ekspresyonunun spatial öğrenme ve hafızayı, NMDAR fonksiyonunu ve LTP' yi arttırdığı görülmüştür. Dolayısıyla yaşlı ratlarda NR2B subunitindeki azalmalar bozulmuş hafıza ile koreledir. Tüm bunlar sulindakin subkronik uygulamasının yaşa bağlı glutamaterjik hipofonksiyonu ve hafıza bozukluklarını NR1 ve NR2B düzeylerini artırarak düzelttiğini düşündürmektedir (4).

Jones ve ark. (11) yaptığı bir çalışmada sağlıklı yaşlı hastalara tek doz ve multipl doz olmak üzere iki şekilde indometazin uygulanmış. Sensorimotor koordinasyon ve kısa süreli hafıza değerlendirmesinde indometazinin yararlı etkileri görülmüş fakat dikkat ve psikomotor testlerde önemli bir değişiklik saptanamamıştır.

Diğer taraftan Jenkinson ve ark. (46) ve Mcgeer ve ark. (47) yaptıkları çalışmalarda NSAİİ kullanımı ile AH başlangıcının gecikmesi arasında olumlu bir ilişki tespit edememişlerdir.

Yapılan çalışmalarda COX-2'nin, hafıza kazanımı, bilginin bir araya getirilmesi ve edinilen bilginin kaybının önlenmesi gibi olaylarda yer aldığı görülmüştür (48). Daha önce maze ile yapılan bir çalışmada egzersiz dönemi sonrası selekoksibin (selektif COX-2 inhibitörü) intrahipokampal infüzyonu ile ratlarda spatial hafıza birikiminin bozulduğu gösterilmiştir (23).

Teather ve ark. (49) yaptığı bir çalışmada selektif ve non selektif COX inhibitörü uygulanmış ve Morris water maze'de değerlendirilmiş. Çalışmanın sonucunda spatial hafızanın bozulduğu görülmüştür (49).

Yapılan çalışmalarda özellikle COX-2'nin kognitif fonksiyonlar ile ilgili olduğu görülmüş, COX-1'in nöronal plastisite ve LTP ile bir ilgisi olduğuna dair veriler elde edilememiştir (1,20,21,23). Dolayısıyla COX-1 inhibisyonunun şu andaki bilgiler ışığında kognitif fonksiyonlar üzerine bir etkisi beklenmemektedir (52). Diğer taraftan yapılan bir çalışmada, sulindak, ibuprofen ve indomethazinin AH' nin patogeneğinde yer aldığı düşünülen A β 42' nin düzeylerini azalttığı görülmüştür (50). Fakat aspirin, selekoksib, naproksen ve rofekoksibin (selektif COX-2 inhibitörü) böyle bir etkisine rastlanmamıştır (51). Yani COX-2 selektif ilaçların COX inhibisyonu dışında başka etki mekanizmalarının da olabileceği düşünülmelidir (4).

AH' nin en önemli etyolojik nedenlerinden biri yaşlanmadır. Yaşa bağlı hafıza zayıflığı, 65 yaş üstü kişilerin % 40' ını etkileyen bir durumdur (2). Yaşlı ratlarla yapılan çalışmaların bir kısmında COX inhibitörü ilaçların kognitif bozukluklar üzerine olumlu etkileri, bir kısmında da olumsuz etkilerine rastlanmıştır (5). NSAİİ'lerin hangi mekanizmayla kognitif fonksiyon üzerine etki gösterdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu mekanizmalar arasında COX-2 inhibisyonu ile nöroinflamasyonun azaltılması, PG üretiminin azaltılarak nöron ölümünün ve oksidan ürünlerin oluşumunun kısıtlanması vardır (4,18,23). Bu tez çalışmasında NSAİİ'lerin kognitif fonksiyon üzerine etkilerinin NMDAR'larla ilişkili olabileceği hipotezi üzerinden yola çıkarak NMDAR subunitlerinden NR2A ve NR2B western blot yöntemi ile incelendi. Yaşlı ratlara 8 hafta süre ile ibuprofen ve nimesulid, kontrol grubuna da serum fizyolojik oral yolla verildi. İbuprofen non selektif olarak, hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe etmektedir. Nimesulid ise COX-1'e kıyasla, COX-2'ye 5-16 kat daha selektiftir (15). Non selektif COX inhibitörü olan ibuprofen ile NR2A düzeylerinde %17, NR2B düzeylerinde %5 azalma saptandı. Selektif COX-2 inhibitörü olan nimesulid ile NR2A düzeylerinde %14, NR2B düzeylerinde %18 artış saptandı. Ancak NMDAR konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Öğrenme ve hafıza süreçlerinde özellikle NR2B subunitinin rolü olduğu gösterilmiştir (4). Bizim çalışmamızda selektif COX-2 inhibitörüyle istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptanmış hatta non selektif COX inhibitörü ile yine istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptanmıştır. Bu verilerin ışığında NSAİİ'lerin yaşlı bireylerde kognitif fonksiyonda sağladığı iyileşmenin mekanizmasını NMDAR artışına bağlamak mümkün değildir. Ancak bu sonuç NSAİİ kullanım süresi, dozu ve kullanılan ajanın özellikleriyle ilişkili olabilir. Bu çalışma, NSAİİ'lerin daha yüksek dozlarda ve daha uzun süre uygulanması ile tekrarlanırsa farklı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca bu çalışmada Alzheimer'lı bir beyin ile değil yaşlı bir beyin ile çalışıldı. dolayısıyla amiloid plaklar ve nörofibriller yumaklar ve büyük olasılıkla artmış COX-2 ekspresyonu yoktu. NSAİİ'lerin AH'de kognitif fonksiyona etkisi göz önüne alınırsa bu çalışmanın Alzheimer'lı ratlarla tekrarlanması çalışmanın bir ileri basamağı olarak aydınlatıcı olabilir.

ÖZET

Yaşlı Ratlarda Selektif ve Non Selektif COX İnhibitörlerinin NMDA Reseptörlerinin Subtiplerine Etkisi

Senil demansın en yaygın nedeni olan Alzheimer hastalığı (AH), kısa süreli hafızanın bozulmaya başlamasıyla karakterize, progresif nörolojik bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda NSAİİ'lerin (Non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar) AH'nin oluşumunu ve ilerlemesini önlemede olumlu etkileri görülmüş fakat etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. AH'nin oluşmasında en önemli etyolojik faktörlerden birisi yaştır. Biz de bu bilgilerin ışığında, yaşlı ratlarda NSAİİ arasında yer alan selektif COX (siklooksijenaz) inhibitörü nimesulid ve non-selektif COX inhibitörü ibuprofenin subkronik uygulanmasıyla NMDAR (N-metil-D-aspartat reseptörü) subunitlerinden NR2A (N-metil-D-aspartat 2A subuniti) ve NR2B (N-metil-D-aspartat 2B subuniti) konsantrasyonlarının nasıl etkilendiğini incelemeyi amaçladık.

Yaşlı ratlar (16 aylık) kontrol, nimesulid verilen grup ve ibuprofen verilen grup olmak üzere 3 gruba ayrıldı. 8 hafta süre ile kontrol grubuna serum fizyolojik, diğer gruplara nimesulid ve ibuprofen verildi. Bu sürenin sonunda hayvanlar dekapite edilerek hipokampusleri çıkarıldı ve NR2A ve NR2B subunitleri Western Blot yöntemi ile çalışıldı.

NR2A reseptör konsantrasyonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nimesulid grubunda %14'lük bir artış, ibuprofen grubunda ise %17'lik bir azalma görüldü, fakat her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$). NR2B reseptör konsantrasyonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nimesulid grubunda %18'lük bir artış, ibuprofen grubunda ise %5'lik bir azalma görüldü, fakat her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$).

Bu verilerin ışığında NSAİİ'lerin yaşlı bireylerde kognitif fonksiyonda sağladığı iyileşmenin mekanizmasını NMDAR konsantrasyon değişimine bağlamak mümkün olmamıştır. Ancak bu sonuç NSAİİ kullanım süresi, dozu ve kullanılan ajanın özellikleriyle ilişkili olabilir. Bu çalışma, NSAİİ'lerin daha yüksek dozda ve daha uzun süre uygulanması ile tekrarlanırsa farklı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca bu çalışmada Alzheimer'lı bir beyin ile değil yaşlı bir beyin ile çalışıldı. Dolayısıyla amiloid plaklar ve nörofibriller yumaklar ve büyük olasılıkla artmış COX-2 ekspresyonu yoktu. NSAİİ'lerin AH'nda kognitif fonksiyona etkisi göz önüne alınırsa, bu çalışmanın Alzheimer'lı ratlarla tekrarlanmasının aydınlatıcı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: COX, NMDA reseptörleri, NSAİİ, COX inhibitörleri, kognitif fonksiyon

SUMMARY

Effects of Selective and non selective COX inhibitors on NMDA receptor subtypes in aged rats

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of senile dementia. It is a progressive neurological condition characterized at the beginning by short-term memory impairment. Some previous studies showed that NSAID's (Non steroidal antiinflammatory drugs) may prevent establishment and progression of AD, but the mechanism of action is still unclear. One of the most important ethological factors is ageing. The aim of our study was to determine how does subchronic administration of nimesulid which is a selective COX inhibitor drug and ibuprofen which is a non selective COX inhibitor drug effect concentrations of NR2A and NR2B which are NMDAR subtypes.

The aged rats were divided into three groups as control group, nimesulid group and ibuprofen group. For an eight week period the control group was given saline and the other groups were given nimesulid and ibuprofen orally. At the end of this period the rats were decapitated and their hippocampuses were extracted. Then NR2A and NR2B subunits were assessed by Western Blotting analysis.

NR2A receptor concentrations were found to be increased by % 14 in the nimesulide group and reduced by % 17 in the ibuprofen group compared to the control group. NR2B receptor concentrations were found to be increased by % 18 in the nimesulide group compared to the control group. But, the differences between three groups were not statistically significant ($p>0.05$)

According to our results we can not conclude that the mechanism of action of NSAID's on the improvement of cognitive functions in the elderly people is the changes in the concentration of NMDAR. If the study is rearranged with higher dose and long term administration of NSAID or with another NSAID different results might be found. Moreover, in this study we studied an aged brain but not a brain with AD, so amyloid plaques, neurofibrillary tangles and probably increased COX-2 expression were not present. Considering the effects of NSAIDs on the cognitive functions in AD, this study can be reorganized by using rats with AD, may be more illustrative.

Key words: COX, NMDA receptors, NSAID's, COX inhibitors, cognitive function

KAYNAKLAR

1. Nicolas G, Bazen V. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer 's disease. **Prostaglandins and other lipid mediators**. 68-69:197-210, 2002.
2. Thomas J, Olivia R. Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamin treatment. **Behavioural Brain Research**. 165: 160-171, 2005.
3. Miller DB, O'Callaghan JP. Aging, stres and the hippocampus. **Aging research reviews**. 4: 123-140, 2005.
4. Mesches H, Gemma C. Sulindac improves memory and increases NMDA receptor subunits in aged Fischer 344 rats. **Neurobiology of aging**. 25: 315-324, 2004
5. Scarpini E, Scheltens P. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. **The Lancet Neurology**. 2: 539-546, 2003.
6. Smith JW, Al-Khamees O. Chronic aspirin ingestion improves spatial learning in adult anda ged rats. **Pharmacology biochemistry and behavior**. 71:233-238, 2002.
7. Ozawa S, Kamiya H and Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Neurobiology**. 54: 581-618, 1998.
8. Candy S, Brickley SG. NMDA receptors. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001.
9. Clayton DA, Browning MD. Deficits in the expression of NR2B subunit in the hippocampus of aged Fischer 344 rats. **Neurobiology og aging**. 22: 165-168, 2001.
10. Narahashi T, Marszalec W. Unique mechanism of action of Alzheimer's drugs on brain nicotinic acetylcholine receptors and NMDA receptors. **Life Sciences**. 74:281-291, 2003.
11. Crome P, Karla L. İndomethazin and cognitive function in healty elderly volunteers. **Br J Clinical Pharmacology**. 38(1): 45-51, 1994.
12. Topçuoğlu ES, Selekler K. Alzheimer Hastalığı. Geriatri. 1(2):63-67, 1998.
13. Selekler K. Alzheimer Hastalığı: patoloji, klinik, tanı ve ayırıcı tanı. Selekler K. (ed.) Modern Tıp Seminerleri:26 Alzheimer ve Diğer Demanslar. Ankara, Güneş Kitapevi, 2003.
14. Miller DB, O'Callaghan JP. Aging, stres and the hippocampus. **Aging research reviews**. 4: 123-140, 2005.
15. Kayaalp SO. Tıbbi farmakoloji, Hacettepe taş kitabevi, 2000.
16. Hardman JG, Limbird LE. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics., International Editon, 9. baskı.

17. Stack E, Dubois RN. Regulation of cyclo-oxygenase-2. **Clinical Gastroenterology**. 15:787-800, 2001.
18. Consilvio C, Vincent AM. Neuroinflammation, COX-2 and ALS a dual role. **Experimental neurology**. 187:1-10, 2004.
19. Manev H, Uz T. 5-lipoxygenase and cyclooxygenase mRNA expression in rat hippocampus:early response to glutamate receptor activation by kainate. **Experimental gerontology**. 35:1201-1209, 2000.
20. Kaufmann WE, Andreasson KI. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins*. 54:601-624, 1997.
21. Chen C, Bazen NG. Lipid signaling:sleep, synaptic plasticity and neuroprotection. **Prostaglandins and other lipid mediators**. 77:65-76, 2005.
22. Sharifzadeh M, Naghdi N. Post-training intrahippocampal infusion of the COX-2 inhibitor celecoxib impaired spatial memory retention in rats. **European journal of pharmacology**. 511:159-166, 2005.
23. Sharifzadeh M, Tavasoli M. A time course analysis of cyclooxygenase-2 suggests a role in spatial memory retrieval in rats. **Neuroscience Research**. 54:171-179, 2006.
24. Yıldırım M. Tıp Öğrencileri İçin Klinik Nöroanatomı, 4. basımdan çeviri. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2000.
25. Dere F. Nöroanatomı ve Fonksiyonel Nöroloji, Okullar Pazarı Kitabevi, 1990.
26. Ozawa S., Haruyuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 54: 581-618, 1987.
27. Heresco U. Glutamatergic neurotransmission modulation mechanisms of antipsychotic atypicality. **Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**. 23: 1113-1123, 2003.
28. Goebel DJ., Pooch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. **Molecular Brain Research**. 69:164-170, 1999.
29. Cull-Candy S., Brickley SG. NMDA receptors. **Encyclopedia of Life Sciences**. 2001.
30. Carroll RC., Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targeting: Implications for synaptic transmission and plasticity. **Trends in Neuroscience**. 25:571-577, 2002.
31. Petrie RXA., Reid IC., Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. **Pharmacology and therapeutics**. 87:11-25, 2000.

32. Wittenberg GM., Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. **Trends in Neurosciences**. 25:571-77, 2002.
33. Yakamura T., Shimoji K. Subunit and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Progress in Neurobiology**. 59:279-298, 1999.
34. Khanduja KL, Sohi KK. Nimesulide inhibits lipopolysaccharide-induced production of superoxide anions and nitric oxide and iNOS expression in alveolar macrophages. **Life Sciences**. 78: 1662-1669, 2006.
35. Candelario-Jalila E, Gonza'lez-Falco'na E. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Research**. 1007 :98–108, 2004.
36. Pal Singh V, Chandrashekhar SP. Effect of nimesulide on acetic acid- and leukotriene induced inflammatory bowel disease in rats. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. 71:163–175, 2005.
37. Kunz T, Oliw EH. Effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on kainate-induced seizures in the rat brain. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. 59 :220-235, 1999.
38. Bonabello A, Galmozzi MR. Dexibuprofen (S+-isomer ibuprofen) reduces gastric damage and improves analgesic and antiinflammatory effects in rodents. **Anesth Analg**. 97(2):402-408, 2003.
39. Richardson RL, Kim EM. Behavioural and histopathological analyses of ibuprofen treatment on the effect of aggregated Abeta(1-42) injections in the rat. **Brain Res**. 954(1):1-10, 2002
40. Hull M, Lieb K, Fiebich BL. Anti-inflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease? **Expert opin investig Drugs**. 9(4):671-683, 2000.
41. Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. **Neurobiology of disease**. 15:80– 92, 2004.
42. McGeer PL, Schulzer M. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease. **Neurology**. 47:425-432, 1996.
43. Stewart WF, Kawas C. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. **Neurology**. 48:626-632, 1997.
44. In t'Veld BA, Ruitenber A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. **N Eng J Med**. 345:1515-1521, 2001.

45. Jenkinson ML, Bliss MR. Rheumatoid arthritis and senile dementia of the Alzheimer's type. **Br J Rheumatol.** 28:86-88, 1989.
46. McGeer PL, Akiyama H. Immune system response in Alzheimer's disease. 816:516-527, 1989.
47. Rall JM, Mach SA. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. **Brain Res.** 968:273-276, 2003.
48. Teather LA, Packard MG. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. **Learn Memory.** 9:41-47, 2002.
49. Younkin SG. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. **J Physiol.** 92(34):289-292, 1998.
50. Weggen S, Eriksen JL. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. **Nature.** 414(6860):212-216, 2001.
51. Chen C, Magee CJ. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. **J Neurophysiol.** 87:2851, 2002.
52. Akiyama H, Barger S. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging.** 21(3):383-421, 2000.
53. Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. **Proc Natl Acad Sci.** 90(17):7915-7922, 1993.
54. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. **Exp Gerontology.** 33(5):371-378, 1998.