

Alzheimer Hastalığının Hayvan Modelleri

Doç. Dr. Asuman Gölgeli
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı,

İletişim:

Asuman Gölgeli
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
38039 KAYSERİ

Tel No:0352 4374901/23 303, 23 300

Faks No: 0352 4375285

e-mail: golgeli@erciyes.edu.tr

Deneysel çalışmalarda kullanılan hayvan modelleri, bir türde ortaya çıkan "fenomen"i araştırmak amacıyla başka bir türde geliştirilen "benzer bir oluşum" şeklinde tanımlanabilir. Hayvan modelleri, etik ve pratik sakıncalardan dolayı, insanlarda yapılamayan çalışmaların bir ölçüde gerçekleştirilmesini sağlar. Ancak etik kuralların hayvanlar içinde geçerli olduğu unutulmamalı, hayvana en az zarar vererek en çok bilgi elde edilmeye çalışılmalıdır. Hayvan modeli çalışmalarının başlıca üstünlüğü; klinik çalışmalara göre değişkenlerin araştırıcı tarafından iyi denetlenebilmesi, bu nedenle de araştırma sırasında daha az değişkenin bulunmasıdır.

Son yıllarda, deney hayvanlarında Alzheimer hastalık modeli oluşturularak; hastalığın etiyolojisini, patogenezi, fizyopatolojisini, biyokimyasını, histopatolojisini, araştırmak için kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hastalık modeli oluşturulan hayvanlar, en uygun terapötik ajanları belirlemek için kullanılabilir gibi immunolojik ve genetik araştırmalar için de tercih edilmektedir. Hayvanın organlarının (özellikle beyin dokusunun) araştırma amacıyla kullanılabilmesi, sağlanacak maliyet ve zaman kazancı, modelleri cazip kılar. Ancak, "incelenenin" bir "benzer" olduğu ve "asıl"ı tam yansıtmadığı göz ardı edilmemelidir.

Bu derlemede Alzheimer hastalığını deneysel olarak oluşturmak için geliştirilmiş hayvan modelleri bir arada sunulacaktır.

ALZHEİMER HASTALIĞI İÇİN MODEL OLUŞTURMA YÖNTEMLERİ

Alzheimer hastalığında; serebral kortekste, hipokampusta bazal ön beyindeki (Meynert bazal nükleus bölgesi) nöronların ölmesiyle kolinerjik innervasyonda dramatik bir kayıp gözlenir (5,11,23). Model oluşturma yöntemleri bu patolojilere veya hastalık durumunda ortaya çıkan semptomlara yönelik geliştirilmişlerdir. Bu yöntemleri, cerrahi yaklaşım, nörotoksik ajan kullanımı, elektriksel stimülasyon uygulaması, akut veya

kronik farmosötik ajan kullanımı, diyetle madde ilavesi ve transgenik hayvan hazırlama gibi başlıklar altında toplayabiliriz.

Cerrahi Yöntemle Lezyon Oluşturma:

Sterotaksik yöntemle belirlenen beyin bölgesinin aspirasyon gibi tekniklerle uzaklaştırılması, beyinde özel bağlantı bölgelerinin kesilmesi veya belirlenen beyin bölgesinin özel çözeltiler (elektrolitler) ya da radyo frekansları ile hasarlanması deney hayvanlarında Alzheimer hastalık modeli oluşturmak için kullanılmaktadır. Bıçakla kesme dışındaki bütün lezyon oluşturma yöntemleri hem bu bölgedeki hücre gövdelerinin, hem de buradan geçen aksonların hasarlanmasına sebep olur. Davranıştan sorumlu olduğu düşünülen bölgeler deneysel olarak lezyon oluşturma bölgeleri olarak seçilmişti (29). Mishkin (30), maymunlarda amigdala ve hipokampusun kombine lezyonlarını oluşturduğunda, tek tek lokalize lezyon oluşturulan hayvanlarda gözlenenden daha ciddi hafıza kaybı ortaya çıktığını göstermiştir.

Nörotoksik Ajan Kullanımı:

Bu amaçla kullanılan ajanları; eksitotoksik amino asitler (ibotenik asit), katekolamin toksinleri (6-hidroksidopamin), indolamin toksinleri (5-7-dihidroksitriptamin), kolinerjik toksinler (AF64A), tübilin-bağlayan toksinler (kolşisin) diye beş grupta toplayabiliriz. Eksitotoksinlerden ilk kullanılan kainik asittir. Kainik asit; çok basamaklı bir doz-cevap eğrisine sahiptir, spesifik olmayan hasar meydana getirir, ayrıca nereye enjekte edilirse edilsin hipokampusun CA1 ve CA3 bölgesinde hasar meydana gelir. Dolayısı ile kainik asit hayvanlarda Alzheimer modeli oluşturmak için tercih edilen bir ajan değildir (15). Guinolinik asit endojen bir eksitator olup, araştırmalarda da nörotoksik ajan olarak kullanılmasının daha ümit verici olduğu bildirilmiştir (38). İbotenik asit, doğal eksitatorüdür, kainik asitten daha büyük selektiviteye sahiptir, NBM'e (Nükleus basalis magnocellülaris) büyük selektivite gösterir

(25). 0.5-1.0 µl intraserebral uygulaması (0.06 M solusyondan) kortekste CAT (kolin asetiltransferaz) aktivitesinde azalmaya neden olur (12). Bu ajanlarla oluşturulan Alzheimer modellerinde kognitif fonksiyonlar incelenmiş, NBM-kortikal yolların uzun süreli hafızadan (referance memory), septohipokampal yolların ise kısa süreli hafızadan (working memeory) sorumlu olduğu gösterilmiştir (14,21). Kolinerjik nöronlara selektif AF64A'nın (etil kolin mustard aziridinium iyonu) intraventriküler uygulanması sonucunda (2-3 nmol) hipokampusta kolinerjik nöron kaybını takiben hafıza ve öğrenme fonksiyonlarında azalma ortaya çıktığı bildirilmiştir (16,3). AF64A, selektif kolinotoksindir, presinaptik kolinerjik nöronları etkiler, stereotaksik yöntemle lateral ventriküle uygulandığında, hipokampusta CAT aktivitesi azalır, hipokolinerjik etki oluşur, arekolin AF64A etkisini ortadan kaldırır (4). İntraventriküle AF64A uygulanarak hazırlanan ratlarda, hafıza kaybına paralel olarak pasif sakınma ve labirent testlerinde yetersizlik görülmüştür (44).

Elektriksel Stimulasyon Uygulama:

Psikiyatri hastalarında ECT (elektrokonvulsif tedavi) uygulaması yaygın olarak geçici hafıza kaybına sebep olur. ECT sırasında amigdala, hipokampus, dentat gyrus gibi temporal lob bölgeleri kolayca etkilenebilir (10). Bu bilgiler ışığında, bir kısım araştırmacı antidepresanların etkisini araştırmak için hayvanlara elektrokonvulsif şok (ECS) uygulamışlardır. ECT ve ECS herikisi de aynı mekanizmalarla etki gösterir. Elektriksel stimülasyon uygulama sonucu, nörotransmitter ilişkili değişiklikler ortaya çıkar. Muskarinik asetil kolin, (-adrenerjik, serotonin S2 reseptör sayılarında azalma olur (20). Deneysel olarak, muskarinik asetil kolin reseptör (mAChR) konsantrasyonu artışı ile hafızanın kuvvetlendiği gösterilmiştir (28). Bu bulgulara göre Alzheimer hastalığında ortaya çıkan hafızadaki azalmadan mAChR konsantrasyonundaki azalma sorumlu

tutulmaktadır.

Diyete Madde İlavesi Yöntemi:

Alzheimer hastalarının beyinde gözlenen karakteristik senil plakların çekirdeklerinde alüminyum silikat çökeleklerinin birikmesinin rapor edilmesi sonucunda deney hayvanlarında alüminyum intoksikasyonu ile Alzheimer modeli oluşturulması yoluna gidilmiştir (45). Farelerin içme suyuna bir ay boyunca alüminyum ilave edildiğinde sitokinlerden tümör nekroz faktör (TNF) ekspresyonu artmıştır (42). Altı ay süre ile kronik olarak diyetlerine alüminyum slikaat ilave edilen ratların altı ayın sonunda beyinlerinde transferrin reseptör yoğunluğu fazla olan bölgelerde alüminyum biriktiği gösterilmiştir (17). Bu hayvanların astrosit ve nöronlarında sitoplazmik büyük vakuollere rastlanmıştır (17). Alüminyum intoksikasyonu oluşturulan tavşanlarda şartlı göz kırpmaya refleksi Alzheimer hastalarında gözlemlendiği gibi yavaşlamış, öğrenme güçlüğü gelişmiştir (46). Diyete, kolin türevi olan N-aminodeanol (NADE) yalancı prekürsörü ilave edilerek asetil kolin yetersizliği oluşturulması; Alzheimer modeli için kullanılabilir başka yöntemdir. Bu durumda asetil kolin yerine O-asetil N-aminodeanol (AcNADE) yalancı nörotransmitter olarak sentezlenip, presinaptik veziküller içinde depolanır (9). Stimulasyonla salınan yalancı transmitter hem muskarinik hem nikotinik reseptörlere bağlanır ve asetilkolinesteraz (AChE) ile hidroliz olur. Asetil kolinin yetersiz sentezlenmesi hipokolinerjik etki oluşturur (32). Alzheimer hastalık modeli için NADE ilk kez 1983 de Newton tarafından kullanılmıştır (31). Diyete NADE ilave edildiğinde, plazma, karaciğer ve beyindeki fosfolipidlere kolin yerine NADE bağlanır, serbest kolinin % 85-95'i, bağlı kolinin %65-75'i NADE ile yer değiştirir. İleum ve benzeri periferik dokularda olduğu gibi, striatum, hipokampus ve korteksde de CAT aktivitesi azalır. Kolinerjik sistemde meydana gelen hipofonksiyon, davranış ve fizyolojik fonksiyonların da değişmesine neden olur

(33). Hipokolinerjik şartlarda hafıza progresif olarak belirgin bir şekilde azalır (36).

Akut ve Kronik Olarak Farmasötik Ajan Kullanımı

Bir çok ilacın ve alkolün hafıza süreçlerini etkilediği bilinmesine rağmen, Alzheimer hayvan modeli olarak oluşturulmasında kullanımları çok yaygın değildir (24). Kolinerjik bir antagonist olan skopolamin deney hayvanlarında bu amaçla kullanılmıştır (39). Korsakoff hastalığında primer etyolojik ajan olarak tiamin eksikliği kabul edilmiştir. Korsakoff hastalığı semptomlarına sahip olmayan alkoliklerin hafıza bozukluklarından şikayetçi oldukları bildirilmiştir (7). Freud ve Ballinger (18), alkol suistimalcilerinde beyin çeşitli bölgelerinde mAChR ve benzodiazepin bağlanma yerlerinde kayıp olduğunu bildirmişlerdir. Kronik alkoliklerde hipokampusta çok fazla kolinerjik hücre kaybı olduğu da belirtilmiştir (34). Kronik etanolün hayvanlarda uygulandığı çok fazla sayıda çalışma olmasına rağmen, alkole bağlı olarak gelişen demansın mekanizmaları hakkında bilgi veren birkaç tane çalışma vardır. Arendt (1) ratlara %20'lik etanolü 12 hafta boyunca uygulamış ve daha sonra bu hayvanların beyinlerini incelemiştir. NBM'de kolinerjik nöronlarda kayıp olduğunu ve bazal ön beyinde CAT ve AchE aktivitesinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Etanol uygulanan hayvanlarda radial labirent testinde performansta azalma gözlenmiş ancak fetal kolinerjik hücrelerin transplante edilmesi ile labirent testlerindeki performans azalması düzeltilmiştir (2).

Levin ve Rodnitzky (26) kan AchE aktivitesini düşürmeye yetecek kadar uzun süre organofosfat pestisitlere maruz kalan erkeklerde bilgi üretimi, hafıza ve konuşma performansında azalma, uykusuzluk, depresyon, anksiyete ve irritabilite gibi davranışta bir takım değişiklikler saptamışlardır. Organofosfatlara maruz kalımdan aylar sonra dahi bu davranışsal bozukluklar devam etmektedir (22). Organofosfat maruziyeti ile özel klinik

semptomlar arasındaki ilişki insanlarda gösterilemeyeceğinden hayvan modelleri geliştirilmiştir. Schellenberg ve grubu (37), ratlara organofosfat olan diisopropilflorofosfat (DFP) kronik uygulandığı zaman pasif sakinme testlerinde bozulma meydana geldiğini göstermiştir. Loullis (28), hafızadaki değişmelerin ilacın tipine bağlı olduğunu belirtmiştir. Örneğin, organofosfat uygulanan ratlarda, kolinerjik antagonist olan scopolamin kronik infüzyonu hafızada gelişmeye, antikolinesteraz olan fizostigmin kronik uygulaması, hafızada bozulmaya sebep olmuştur (35). Bu sonuçlar; organofosfatların hayvanlara kronik olarak uygulanmasının mAChR sayısını azaltarak hafıza kaybına neden olduğunu düşündürmektedir (43).

Transgenik Hayvan Oluşturmak:

Bazı vakalarda, Alzheimer hastalığı kalıtsal olabilmektedir (41). Birinci derece akrabalarında Alzheimer hastalığı bulunanlarda, hastalık riski önemli derecede artmaktadır. Ailesel Alzheimer hastalığı ile ilişkili olabilecek üç kromozom mutasyonu (kromozom 21,14,1) belirlenmiştir. Bu genler amiloid denilen bir proteini etkilemektedir. Alzheimer hastalığında beyindeki amiloid konsantrasyonu artmaktadır. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile ilişkili olarak da 19. kromozomda ApoE4 (Apolipoprotein E) geni sorumlu tutulmaktadır (37). Alzheimer hastalığı riskini artıran genetik durumların daha iyi anlaşılması sayesinde, en azından bazı bireylerde, gen terapisi ve presemptomatik tanı olanağı doğacaktır. APP transgenik farelerde plak oluşumu gözlenmiş, PS-1 transgenik farelerde ise gözlenmemiştir (40). Genetik mutasyon oluşturulmuş deney hayvanları Alzheimer hastalık modeli için değişik amaçlarla hazırlanmışlardır (6, 8,13,27). Ancak her merkezde bu tür hayvan hazırlamak gerekli teknoloji sağlanamayacağı için mümkün olmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Arendt T, Hennig D, Gray JA, et al. Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol. *Brain Res Bull*-1988;21:563-570.
2. Arendt T, Allen Y, Sinden J, et al. Cholinergic-rich brain transplants reverse alcohol-induced memory deficits. *Nature*-1988;332:448-450.
3. Bailey EL, Overstreet DH, Crocker AD. Effects of intrahippocampal injections of the cholinergic neurotoxin AF64A on open field activity and avoidance learning in the rat. *Behav Neural Biol*-1986;45:263-274.
4. Bartolomeo AC, Morris H, Boast CA. Arecoline via miniosmotic pump improves AF64A-impaired radial maze performance in rats: a possible model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*-1997;68:333-342.
5. Bartus RT, Dean RL, Beer B, et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*-1982;217:408-417.
6. Brusa R. Genetically modified mice in neuropharmacology. *Pharmacol Res* -1999;39:405-19.
7. Butters N. Alcoholic Korsakoff's syndrome: Some unresolved issues concerning etiology, neuropathology, and cognitive deficits. *J Clin Exp Neuropsychol*-1985;7:181-210.
8. Campbell IL, Krucker T, Steffensen S, et al. Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN-alpha. *Brain Res*-1999;17:46-61.
9. Collier B, Boska P, Loviat S. False cholinergic transmitters. *Prog brain res* 1979;49:107-125.
10. Collier TJ, Miller JS, Travis J, et al. Dentate gyrus granula cells and memory: electrical stimulation disrupts memory for places rewarded. *Behav Neural Biol* -1982;34:227-239.
11. Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*-1983;219:1184-1190.
12. Coyle J, Singer H, McKinney M, et al. Neurotransmitter specific alterations in dementing disorders: insights from animal models. *J Psychiat Res*-1984;18:501-512.
13. Dickson DW. Microglia in Alzheimer's disease and transgenic models. How close the fit? *Am J Pathol* -1999;154:1627-31.
14. Dunnett SB, Rogers DC, Jones GH. Effects of nucleus basalis magnocellularis lesions on delayed matching and non-matching to position tasks: Disruption of conditional discrimination learning but not of short-term memory. *Eur J Neurosci*-1989;1:395-406.
15. Ermakova IV, Loseva EV, Valouskova V, et al. The effects of embryonal amygdala grafts on the impairment of spatial working memory elicited in rats by kainate-induced amygdaloid damage. *Physiol Behav* 1989;45:235-241.
16. Fisher A, Hanin I. Potential animal models for senile dementia of Alzheimer's type, with emphasis on AF64A-induced cholinotoxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*-1986;26:161-184.
17. Florence AL, Gauthier A, Ponsar C, et al. An experimental animal model of aluminium overload. *Neurodegeneration*-1994;3:315-323.
18. Freund G, Ballinger WEJ. Loss of muscarinic and benzodiazepine neuroreceptors from hippocampus of alcohol abusers. *Alcohol*-1989;6:23-31.
19. Gardner R, Ray R, Frankenheim J, et al. A possible mechanism for diisopropyl fluorophosphate-induced memory loss in rats. *Pharmacol Biochem Behav*-1984;21:43-46.
20. Gleiter H, Nutt DJ. Chronic electroconvulsive shock and neurotransmitter receptors- An update. *Life Sci*-1989;44:985-1006.
21. Hepler DJ, Olton DS, Wenk GL, et al. Lesions in nucleus basalis magnocellularis and medial septal area of rats produce qualitatively similar memory impairments. *J Neurosci*-1985;5:866-873.
22. Karczmar AG. Acute and long-lasting central actions of organophosphorus agents. *Fund Appl Pharmacol*-1984;4:51-57.
23. Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*-1985;42:1097-1105.
24. King MB. Alcohol abuse and dementia. *Int J Geriatr Psychiat*-1986;1:31-36.
25. Kohler C, Schwarcz R. Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in the rat brain. a histological study. *Neuroscience*-1983;8:819-835.
26. Levin Hs, Rodnitzky RL. Behavioural effects of organophosphate insecticides in man. *Clin Toxicol*-1976;9:391-405.
27. Licastro F, Campbell IL, Kincaid C, et al. A role for apoE in regulating the levels of alpha-1-antichymotrypsin in the aging mouse brain and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*-1999;155:869-875.
28. Loullis C, Dean R, Lippa A, et al. Chronic administration of cholinergic agents: Effects on behavior and calmodulin. *Pharmacol Biochem Behav*-1983;18:601-604.
29. Markowska Al, Olton DS, Murray EA, et al. A comparative analysis of the role of fornix and cingulate cortex in memory: rats. *Exp Brain Res*-1989;74:187-201.
30. Mishkin M. Memory severely impaired by combined but not by separate removal of amigdala and hippocampus. *Nature*-1978;273:297-298.
31. Newton MW, Ringdahl B, Jenden DJ. Estimation of N-amino N,N-dimethyl-aminoethanol, choline and their acetate esters by gas chromatography mass spectrometry. *Anal Biochem*- 1983;130:88-94.
32. Newton MW, Jenden DJ. False transmitters as

- presynaptic probes for cholinergic mechanisms and functions. *Trends Pharmacol Sci*-1986;7:316-320.
33. Newton MW, Crosland RD, Jenden DJ. Effects of chronic dietary administration of the cholinergic false precursor N-amino-N,N-dimethyl-aminoethanol on behavior and cholinergic parameters in rats. *Brain Res*-1986;373:197-204.
 34. Nordberg A, Larsson C, Perdahl E, et al. Changes in cholinergic activity in human hippocampus following chronic alcohol abuse. *Pharmacol Biochem Behav*-1983;18:397-400.
 35. Raffaele K, Hunghey D, Wenk G, et al. Long-term behavioral changes in rats following organophosphate exposure. *Pharmacol Biochem Behav*-1987;27:407-412.
 36. Russell RW, Jenden DJ, Booth RA, et al. Global in vivo replacement of choline by N-aminodeanol-testing a hypothesis about progressive degenerative dementia-physiological and behavioral effects. *Pharmacol Biochem Behav*-1990;37:811-820.
 37. Schellenberg GD. Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8552-8559.
 38. Schwarcz R, Meldrum B. Excitatory amino acid antagonists provide a therapeutic approach to neurological disorders. *Lancet*-1985;2:140-143.
 39. Smith G. Animal models of Alzheimer's disease: Experimental cholinergic denervation. *Brain Res Rev*-1988;13:103-118.
 40. Sturchler-Pierrat C, Sommer B. Transgenic animals in Alzheimer's disease research. *Rev Neurosci* -1999;10:15-24.
 41. Tanzi R, Gaston S, Bush A, et al. Genetic heterogeneity of gene defects responsible for familial Alzheimer Disease. *Genetica*-1993;91:255-263.
 42. Tsunoda M, Sharma RP. Modulation of tumor necrosis factor alpha expression in mouse brain after exposure to aluminum in drinking water. *Arch Toxicol*-1999;73:419-426.
 43. Upchurch M, Wehner JM. Effects of chronic diisopropylfluorophosphate treatment on spatial learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav*-1987;27:143-151.
 44. Walsh TJ, Tilson HA, DeHaven DL, et al. AF64A, a cholinergic neurotoxin, selectively, depletes acetylcholine in hippocampus and cortex, and produces long-term passive avoidance and radial-arm maze deficits in rat. *Brain Res*-1984;321:91-102.
 45. Yokel RA, Provan SD, Meyer JJ, et al. Aluminum intoxication and the victim of Alzheimer's disease: similarities and differences. *Neurotoxicology*-1988;9:429-442.
 46. Yokel RA, Allen DD, Meyer JJ. Studies of aluminum neurobehavioral toxicity in the intact mammal. *Cell Mol Neurobiol*-1994;14:791-808.