

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YAYINLARI
Supplementum No. 21

Sıçan Beyninde Benzodiazepin Reseptörlerinin Gelişimi



PROFESÖRLÜK TAKDİM TEZİ
DR. ÖZGEN ERALP
1982

Sıçan Beyninde Benzodiazepin Reseptörlerinin Gelişimi

Dr. Özgen ERALP*

ÖZET

Bu çalışmada sıçan yavrularında ve erişkinde beyinde benzodiazepin reseptörlerinin gelişimi incelenmiştir. ³H. Flunitrazepam kullanılarak yapılan çalışmada reseptörlerin yaşla orantılı olarak geliştikleri, en hızlı gelişmenin 3—5 günler arasında olduğu, 21. günde erişkin değerlerin çok yakın değerlere ulaştığı saptanmıştır.

SUMMARY

Development of the Benzodiazepin Receptors in Rat Brain

The ontogenesis of the ³H FNZ binding sites have been studied in whole rat brain at various ages. Specific binding were found in the first day 25 % of adult levels. The rapid increase in receptor density was significant at 5th day. Adult levels were noted at 21st day.

Bütün çocukların yaklaşık % 4'ünün 15 yaşına ulaşana kadar en az bir konvulsif nöbet geçirdikleri sanılmaktadır ¹. Bunların bir kısmı epileptik olmakta ya da diğer bir deyişle tekrarlayıcı nöbetler geçirmekte ve büyük oranda tedavi ile iyileştirilebilmektedir. Tedavi amacı ile çeşitli antikonvulzan ilaçlar kullanılmaktadır. Benzodiazepinler (BZD) 1960'lardan başlayarak kullanım alanına girmiş antikonvulzan etkilerinin yanında, anksiyete çözücü kas gevşetici ve yüksek dozlarda hipnotik etkileri de olan çok kullanılan ilaçlardır ². Bu kadar yaygın kullanılmalarına karşın uzun süre moleküller etkisinin nasıl olduğu anlaşılamamıştır.

Reseptör kavramı, bir ajanın bağlandığı yüksek oranda yapısal seçme yeteneği olan ve böylece ajanın karakteristik biyolojik etkisini sağlayan biyolojik makromole-

* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalı
Öğretim Üyesi

küller için kullanılmaktadır. Reseptörler hormonlara, nörotansmitterlere ait olabileceği gibi ilaçlara da ait olabilirler. Benzodiazepinlerin reseptörleri araştırılmış ve 1977 yılında çeşitli araştırmacılar ³⁻⁶ insan ve sıçan beyinde spesifik, yüksek affinitesi olan reseptörlerin varlığını göstermeyi başarmışlardır. Bu tarihten başlayarak benzodiazepin reseptörlerinin üzerinde araştırmalar büyük bir yoğunluk kazanmıştır. Gösterilmiştir ki, bu reseptörler santral sinir sisteminin en önemli inhibitör transmitteri olan γ -amino butirik asit (GABA) reseptörleri ile fonksiyonel olarak etkileşmekte ve benzodiazepinler GABA sistemini potansiye etmektedir ⁷. Çok kullanılan bir antikonvulzan ilaç olan difenilhidantion benzodiazepinlerin etkilerini artırmaktadır ⁸. Bütün bu çalışmalar benzodiazepin reseptörleri ile ilgili ilginç ve çok önemli gerçeklerin ortaya çıkmasını sağlayacak gibi görünmektedir. Bu çalışma benzodiazepin reseptörlerinin büyüme ve gelişme ile ilişkisini araştırmak amacı ile planlanmış ve yavru sıçanlarda reseptör gelişimi incelenmiştir.

ARAÇ ve YÖNTEM

Çalışmada değişik yaşlarda erkek ve dişi sıçan yavruları kullanılmıştır (Bursa Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi). Gebelikleri takip edilerek doğumları saptanan sıçanların yavruları doğum sonrası 0. (doğumdan sonraki ilk 2 saat içinde), 1., 3., 5., 10. ve 21. günlerde öldürüldüler. Beyinlerin süratle çıkarılarak donduruldu ve -20°C 'de, membran örnekleri hazırlanana kadar, saklandılar.

Membran Örneklerinin Hazırlanması: Yavru sıçan beyinleri dondurulmuş olarak tartıldılar. Ağırlıkları dikkate alınarak 5 hacim izotonik, 0.32 M, sükröz solüsyonu içinde cam-teflon öğütücülerle öğütüldüler. Kaba partiküllerin çökertilmesi için beyin homojenatları düşük devirde (3000 devir-dakika; 900 g kadar) soğukta ($+4^{\circ}\text{C}$) santrifüje edildiler (Sorval RC-5 yüksek devirli ve soğutmalı santrifüj). Üstteki kısım ayrılarak yeniden santrifüje edildi (12.000 devir/dakika; 18.000 g, $+4^{\circ}\text{C}$). Dipteki çökelti 2 kez daha 10 hacim sükröz ile yıkanarak santrifüjasyon işlemi tekrarlandı. Son defasında üstteki berrak kısım tamamen atılarak dipteki çöküntü, başlangıçtaki beyin ağırlığı dikkate alınarak ve 25 mg yaş beyin ağırlığı 1 ml içinde olacak şekilde, Tris-HCl tomponu (50 mM, pH 7.4) içinde çözüldü. Radyoaktif benzodiazepin, ³H-Flunitrezepam (³H FNZ), bağlanmasının araştırılacağı membranlar bahsedilen ve Tris-HCl içinde çözülmüş çöküntü yeniden ve kısa süre (20-30 saniye kadar) homojenize edilerek (Ultra-Turrax) hazırlandı. Bu membran preparatları bağlanma çalışmaları yapılana kadar (2-3 gün süreyle) -20°C 'de saklandılar.

³H FNZ bağlanması: ³H FNZ bağlanması Regan ve arkadaşlarının ⁹ kullandıkları yöntem esas alınarak aşağıdaki şekilde yapılmıştır. Derin dondurucuda saklanan membran preparatları bağlanma öncesi 18-20 dakikalık süre buzdolabında tutularak erimeleri sağlandı. Takiben, her beyin membran preparatından 12 tüpe (6'şar tüplük 2 seri) 200'er ul konuldu. Serilerden birisine yüksek konsantrasyonda (10^{-5}M) radyoaktif olmayan diezepam konularak bütün benzodiazepin bağlanma yerleri işgal edildi. Bu seri tüpler non-spesifik ³H FNZ bağlanmasının saptanması için kullanılmıştır. İkinci seri tüplere ise diezepam eklenmemiştir. ³H FNZ 6 deği-

şik konsantrasyonda tüplere eklenilmiştir. Tüplerdeki son inkübasyon hacmi 250 ul ve ^3H FNZ'in konsantrasyonları da düşükten yukarı doğru logaritmik olarak artarak 10^{-10} , 3.2×10^{-9} , 10^{-9} , 3.2×10^{-9} , 10^{-8} ve 1.6×10^{-8} Molar olacak şekilde ayarlanmıştır. Radyoaktif FNZ eklenmiş her 2 seri tüp 60 dakika süre ile 0°C da inkübe edilmiştir. Takiben inkübasyon ortamı özel filtrelerden (Whatman Glass fiber, GF/B, 2.4 cm) özel cihaz (Millipore, Manifold) aracılığı ile ve vakum (Millipore) altında süzülmüşlerdir. Filtreler, süratle soğutulmuş Tris-HCl tamponu ile (3 ml ve 3 kez) yıkanmışlardır. Bu filtrelerin yapısı membran partiküllerinin süzülüp gitmesine imkân vermediğinden membran partikülleri ve bunlara bağlanmış olan ^3H -FNZ filtrelere takılı kalmaktadır. Bağlı olmayan serbest ^3H FNZ ise vakum altında süzülmemekte ve atılmaktadır. Filtreler, sizme cihazından alınarak radyoaktif sayım şişelerine konmuş ve radyoaktivite 3 ml toluen'e dayalı (1 litre toluen 4 gram PPO ve 100 mg POPOP) sayım ortamı içinde ölçülmüştür (Packarda, Tri Carv 3395 Liquid Scintillation Spectrometer).

Değerlendirmeler: Radyoaktiviteleri ölçülerek membranlara bağlanmalar saptandıktan sonra ^3H FNZ'in değişik 6 konsantrasyonuna karşı elde edilen spesifik (benzodiazepin reseptörlerine) bağlanma oranları, toplam bağlanmadan her konsantrasyondaki non-spesifik bağlanma (reseptör dışındaki makromoleküller, membran parçaları, vs.) çıkarılarak, hesaplanmıştır. Değerler konsantrasyon—bağlanma 10 ve Scathard eğrileri 11 çizilerek analiz edilmiştir. Hesaplamalarda ve istatistiki değerlendirmelerde Hewlett-Packard hesap makinası (HP 9810A) ve manyetik kartlara geçirilmiş hazır programlar (HP STAT PAC Vol 1, I-1 ve V-6) kullanılmıştır.

BULGULAR

Maksimum bağlanma yerlerinin gelişimi: Scathard analizinden 11 yararlanılarak elde edilen değerler Tablo: I de gösterilmiştir.

Tablo: I
 ^3H FNZ Max Bağlanma Yerleri Değerleri

Gün	Max Bağlanma (p.mol/g. doku)	% Olarak Değişkenlik
0	4.6 \pm 1.2	100
1	4.9 \pm 1.0	107
3	5.5 \pm 0.9	120
5	11.6 \pm 1.1	252
10	14.0 \pm 1.8	304
21	15.6 \pm 3.1	339
E	22.4 \pm 2.7	487

Maksimal bağlanma p.mol/g. doku olarak ele alındığında en büyük farklılık 0 ve 5'ci günler arasında görülmektedir ($p < 0.001$). 0—1, 0—3 günleri arasında hafif bir artma gözlenmekle beraber anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. 3 ve 5 günler arasında çok anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0.01$). Beşinci günden itibaren maksimal ^3H FNZ bağlanmasında artış devam etmiştir. Fakat bu artış 3—5 günler arasındaki anlamlılığa ulaşamamıştır.

Değişiklik yüzde olarak incelendiğinde 0'cı gün değeri yüz kabul edilerek, artma üçüncü günde % 120, beşinci günde % 252, 21. günde % 339 ve erişkin sıçanda % 487 olarak bulunmuştur. Bulgularımız maksimal bağlanma yerlerinin gelişimi göze alındığında 21 günde erişkin sıçan değerlerine çok yaklaştığı görülmektedir. Erişkin sıçanın maksimal bağlama değeri % 100 kabul edildiğinde 0'cı günde % 25, 5. gün % 50, 10. gün % 60, 21. gün % 70 olarak bulunmuştur. ^3H FNZ maksimal bağlanma yerleri scatchard analizi ile hazırlanan şekilde daha açık olarak görülmektedir (Şekil 1).

Nonspesifik ve Spesifik Bağlanma:

^3H FNZ'nin beyin dokusuna nonspesifik bağlanması, ^3H FNZ'in konsantrasyonu ile orantılı olarak lineer bir artış göstermiştir. Buna ait değerler Tablo: II de gösterilmiştir.

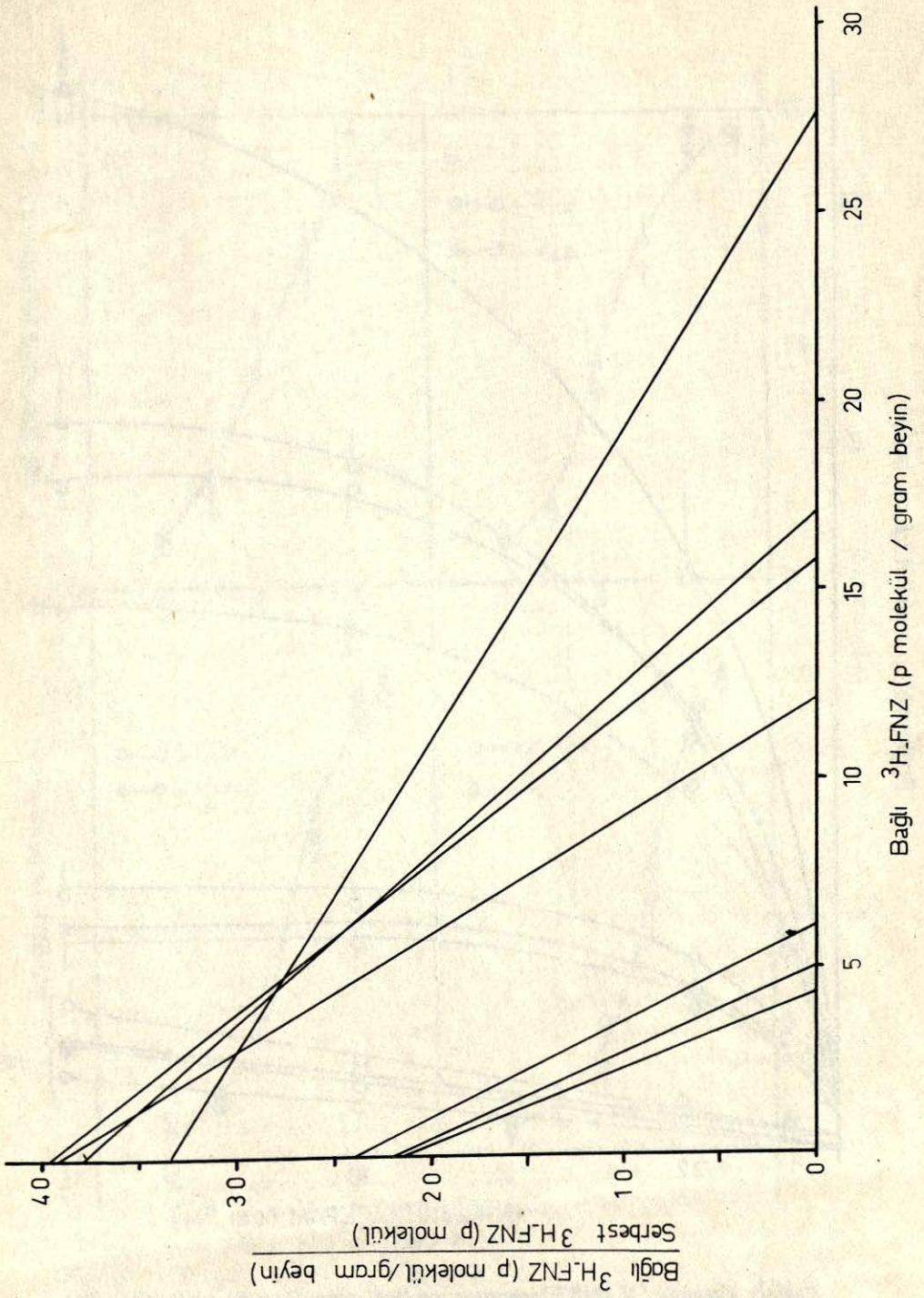
Tablo: II
Nonspesifik Bağlanma (p.mol/g.doku)

^3H FNZ Konsantrasyonu (M)	Günler						
	0	1	3	5	10	21	E
0.1×10^{-8}	0.11	0.15	0.17	0.15	0.14	0.15	0.14
$0.3.2 \times 10^{-8}$	0.13	0.14	0.18	0.19	0.18	0.17	0.14
1.0×10^{-8}	0.19	0.22	0.21	0.23	0.20	0.30	0.52
3.2×10^{-8}	0.73	0.51	0.50	0.68	0.72	1.10	1.23
10×10^{-8}	1.01	1.28	1.53	1.62	1.17	1.88	1.47
16×10^{-8}	2.35	1.74	2.51	2.50	2.23	3.29	2.30

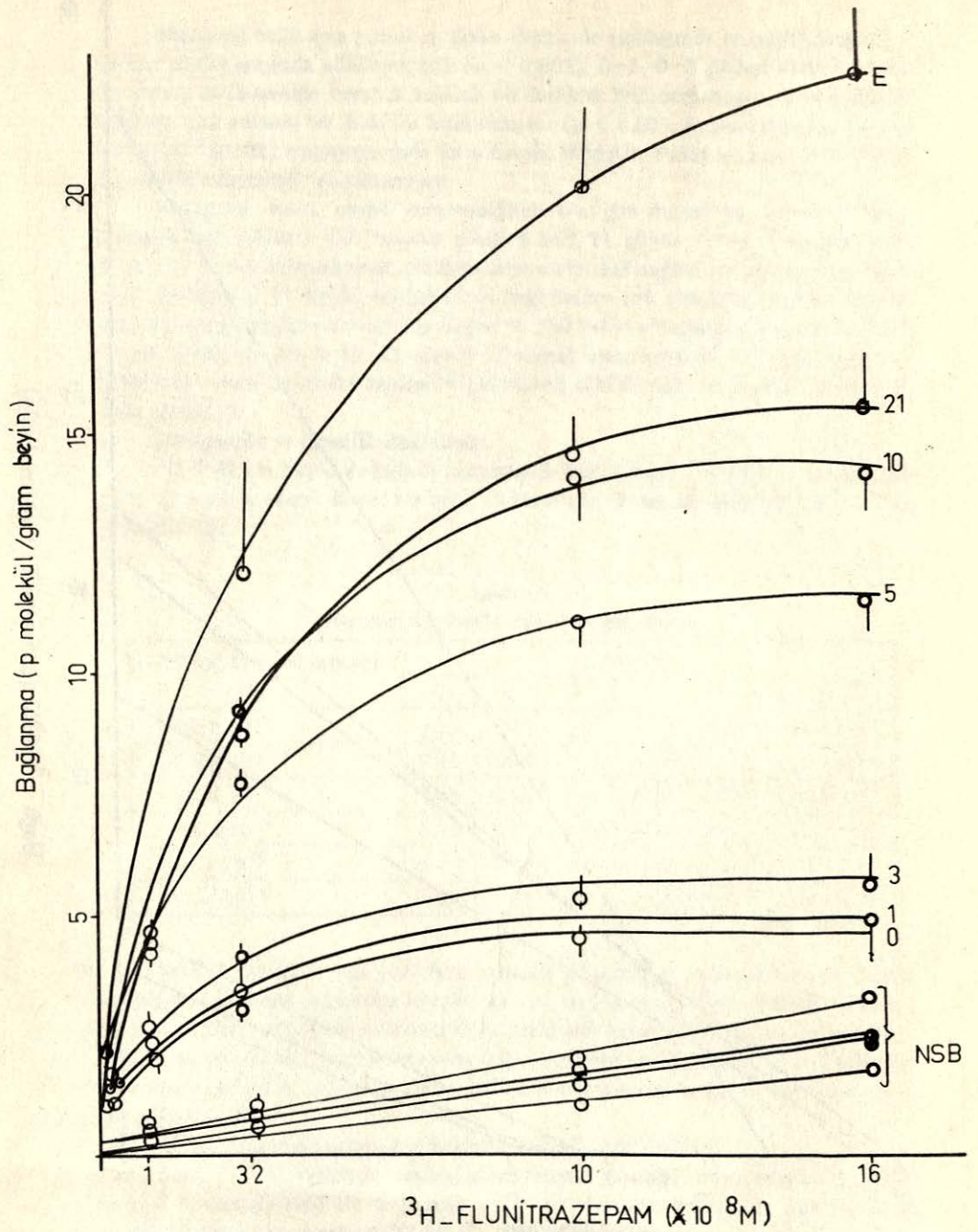
Şekil 2 de görüldüğü gibi non. spesifik bağlantının konsantrasyonla ilişkili şekilde lineer olarak artmasına karşın, spesifik bağlanma yüksek afiniteli ve kolayca doyurulabilir olduğunu gösteren tipik parabolik bir eğri özelliği göstermektedir. Bütün yaş gruplarında konsantrasyona bağlı nonspesifik bağlanma az çok sabit değerlerdedir. Spesifik bağlanma ise yaşlara göre değişmekte ve ilk 10 gün içinde 3—4 kat artmaktadır.

^3H FNZ Bağlanmasının Kinetiğinde Yaşla Değişiklikler:

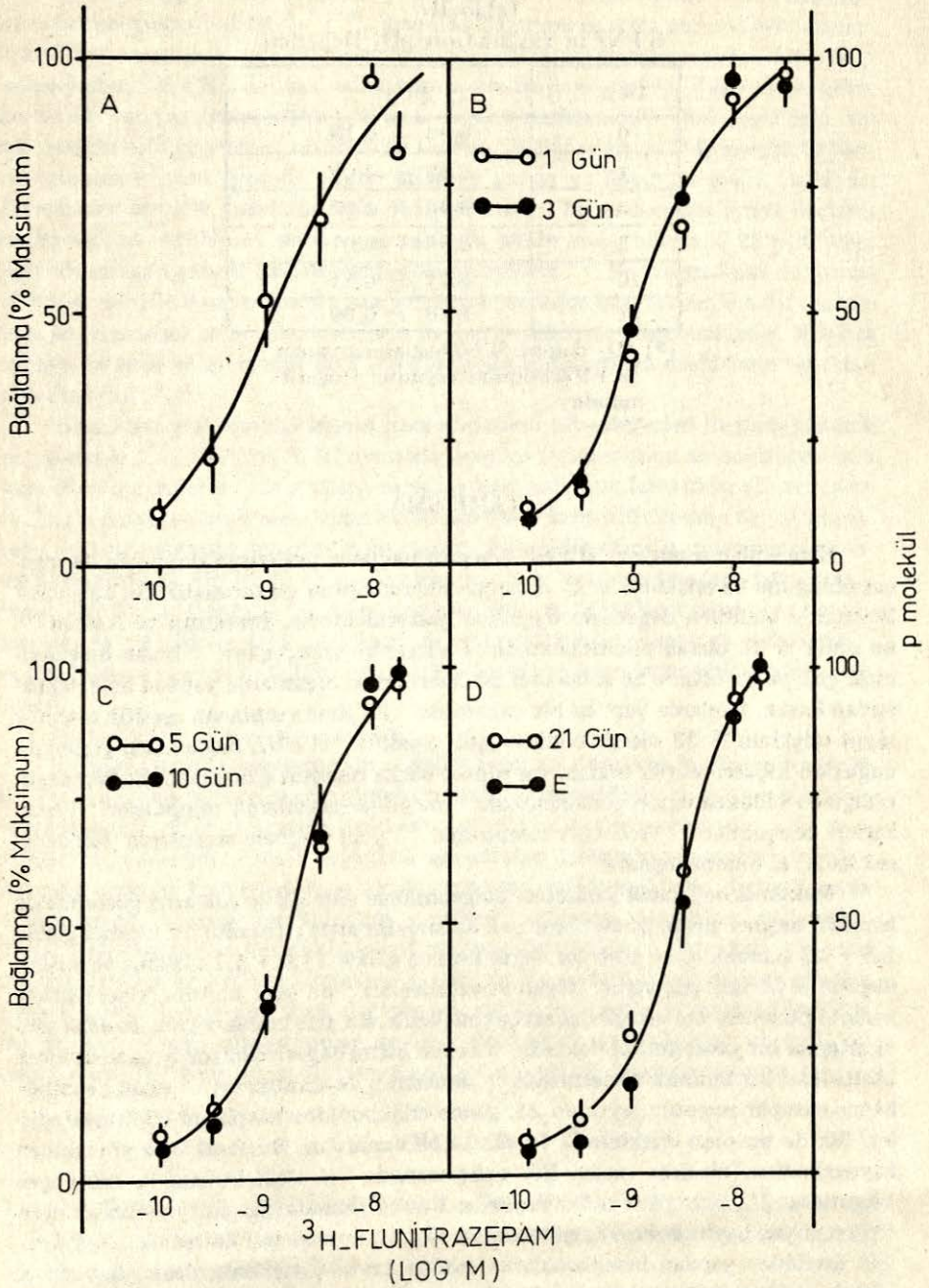
Reseptörlerin sayısında yaşla görülen artışlar yanında, reseptörlerin ilaç karşısındaki davranışlarında bir değişiklik olup olmadığı araştırılmıştır. Şekil 3 de de görüldüğü gibi konsantrasyon bağlanma eğrileri birbirine paraleldir. Şekilleri birbirine çok benzerdir. Bağlanma kinetiği yönünden önemli bir değer olan pD_2 ler hesaplandığında yaş grupları arasındaki değişiklikler çok sınırlı ve istatistiki olarak farklı değildir (Tablo: III).



Şekil: 1
Scatchard Eğrileri



Şekil: 2
Değişik Yaşlarda ^3H FNZ Konsantrasyon Bağlanma (Spesifik ve Nonspesifik) Eğrileri



Şekil: 3

Konsantrasyon Yüzde Bağlanma Eğrileri A-0 gün; B 1 ve 3. Günler; C 5 ve 10. Günler; D 21. Gün ve Erişkin

Tablo: III
³H FNZ'in Yaşlara Göre pD₂ Değerleri

Gün	pD ₂ *
0	8.93 ± 0.18
1	8.85 ± 0.05
3	8.93 ± 0.07
5	8.87 ± 0.07
10	8.71 ± 0.11
21	8.66 ± 0.09

(*) pD₂ değeri: % 50 bağlanma yapan ³H FNZ konsantrasyonunun \mp logaritmasıdır.

TARTIŞMA

Elde edilen sonuçlar ³H FNZ reseptör bağlama yerlerinin doğumda da mevcut olduğunu ve erişkinin % 25 oranında bulunduğunu göstermiştir. Bu bulgumuz literatürde bildirilen değerlerle uygunluk göstermektedir. Braestrup ve Nielsen ¹² bu oranı % 35 olarak bildirmiştir. Gallager ve arkadaşları ¹³ bizim bulgularımıza çok yakın olan % 26 sonucunu bildirmişlerdir. Sıçanlarda yapılan bu çalışmalardan başka, farelerde yapılan bir çalışmada ⁹ ilk günde saptanan spesifik reseptör sayısı erişkinin % 23 olarak bildirilmiştir. Spesifik ³H FNZ bağlanması yerlerinin doğuştan itibaren büyük oranda var olması başka reseptör çalışmaları ile karşılaştırıldığında oldukça ilginç görülmektedir. Örneğin β -adrenajik reseptörler ¹⁴ muskarinik reseptörler ¹⁵ ve GABA reseptörleri ¹⁶ yeni doğmuş sıçanlarda yok denecek kadar az bulunmuşlardır.

Maksimal bağlanma kapasitesi bulgularımıza göre ilk üç gün artış göstermekle beraber, beşinci günde birden bire çok anlamlı bir artış göstermiştir. Üçüncü günde 5.5 ± 0.9 p.mol/g doku olan bu değer beşinci günde 11.6 ± 1.1 ulaşmış ve erişkin değerinin % 50'sine erişmiştir. Regan ve arkadaşları ⁹ da post partum ikinci haftaya kadarki dönemde ani artışa dikkati çekmişlerdir. Bu araştırmacılara göre de daha sonra artış da bir yavaşlama olmaktadır. Nitekim bizim değerlerimizde 5. günden sonra istatistiksel bir farklılık göstermemiştir. Braestrup ve arkadaşları ¹² sıçan beyinde benzodiazepin reseptör sayısının 21. günde erişkininkine ulaştığını bildirmişlerdir. Biz de bu oran erişkinin % 70 olarak bulunmuştur. Bu farklılığın yöntemden kaynaklanması olasılığı vardır. Biz çalışmamızda ³H FNZ kullandık. Adı geçen araştırmacılar ³H Diazepam kullanmışlardır. Bunun yanında, biz çalışmamızda değerleri gram/yaş beyin dokusuna göre verdik ve tüm homejenatı kullandık. Gram/protein üzerinden yapılan hesaplamalarda madde kaybı olmaktadır. Doku tartmanın, protein miktarının hesaplanmasından daha sağlıklı olduğu ve beyin büyüme süreci içinde artan doku miktarından ötürü bu tip hesaplamalarda hata payının daha yüksek olabileceği bildirilmiştir ⁹.

Benzodiazepin reseptörlerinin yüksek afiniteli, doyurulabilir spesifik reseptörler oldukları gösterilmiştir ^{4.5.17}. Bizim bulgularımızda aynı durum teyid etmektedir. Her konsantrasyonda bu reseptörler aynı davranışı göstermişlerdir. Bütün bağlanma yerleri ³H FNZ ile işgal edildikten sonra bağlanma eğrisi yataylaşmaktadır. Bu durum her yaş grubu sıçan için aynı şekilde gözlenmiştir. Yani, yaşla ilgili olarak reseptörlerin doyurucu olabilirlik vasıfları değişmemiştir. Nonspesifik bağlanma ortamda mevcut protein miktar arttıkça artmış ve lineer bir grafik çizmiştir. Araştırmacılar spesifik benzodiazepin reseptörlerinin, benzodiazepin türevi ilaçların antikonvulzan etkilerinin ortaya çıkması için bütün reseptörlerin % 25 -30'unun işgal edilmesinin yeterli olabileceğini göstermişlerdir ¹⁸. Bu durum tümü doyurulabilir olan spesifik benzodiazepin reseptörlerinin endojen bazı biyolojik aktif maddelerin bağlanmaları amacı ile membran da bulduklarını göstermektedir. Nitekim endojen kökenli ve benzodiazepin reseptörlerine bağlanabilen maddelerin varlıkları gösterilmiştir ¹⁹.

Benzodiazepin reseptörlerinin ilaca afiniteleri pD₂ değerleri ile ifade edilerek incelenmiştir. ³H FNZ'nin % 50 oranında reseptör saturasyonun konsantrasyonunu ifade eden bu değerler yaş grupları arasında bazı anlamsız farklılıklar göstermişlerdir. Yaşla orantılı olarak reseptörün benzodiazepine karşı affinitesinin değiştiği şeklinde yorumlanabilecek bu durum bu çalışma ile açıklığa kavuşturulamamıştır. Ancak literatürde de birbiri ile çelişen yayınlar vardır. Bazı araştırmacılar yaşla orantılı olarak affinitenin arttığını ^{3.9} ve bunun bazı endojen ligandların gelişimi ve membran yıkama tekniği ile ilgili olduğunu ileri sürmektedirler. Regan ve arkadaşları ⁹ mevcut bulunan bu değişikliğin çok düşük olduğunu önem taşımadığını bildirmektedirler.

Sonuç olarak şunlar söylenebilir:

Benzodiazepin reseptörlerinin gelişimi büyüme fiziyojisi ile doğrudan ilgilidir. Bu bakımdan bu reseptörler diğer tranismitter reseptörlerden ayrılmaktadırlar. Benzodiazepinlere özgü spesifik bağlantı yerleri vardır. Gelişme süreci içinde ilaca afiniteleri yönünden yapısal değişiklik geçirdikleri izlenimin alınmakta ancak bu durumun açıklığa kavuşturulması ek araştırmaları gerektirmektedir. Benzodiazepin reseptörlerinin başlıca niteliklerinin açıklığa çıkmasını sağlayacak çalışmalar, santral sinir sisteminin hastalıklarında fonksiyon bozukluğunun bioşimik nedenini ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Gelişmenin ve büyümenin en hızlı olduğu, özellikle beyin dokusunun hızla değişime uğradığı pre, peri ve postnatal dönemlerde, hipoksi, stress enfeksiyonlar ve ilaç alınımının benzodiazepin reseptörleri üzerine olan etkilerinin araştırılmasının çok yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. RODSON, W.E., PERENSKY, A.L., DE VIVO, D.C., GOLDRING, S., DODGE, P.R.: Management of seizure disorders: Selected aspects. Part I. Jour. Pediat. 89: 527, 1976.
2. MULLER, W.: Benzodiazepine receptor. Pharmacology. 22: 153, 1981.
3. BRAESTRUP, C., R. ALBRECHTSEN, SOUIRES, R.: High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. Nature. 269: 702, 1977.

4. MOHLER, H. and OKADA, T.: Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 198: 849, 1977.
5. SOUIRES, R.F., BRAESTRUP, C.: Benzodiazepine receptor in rat brain. *Nature*. 266: 732, 1977.
6. WILLIAMSON, M.J., PAUL, S.M., SKOLNICK, P.: Demonstration of ³H diazepam binding to benzodiazepine receptors in vivo. *Life Sci.* 23: 1935, 1978.
7. COSTA, E., GUIDOTTI, A., TOFFANO, G.: Molecular mechanisms mediating the action of diazepam on GABA receptors. *Br. J. Psychiatry* 133: 239, 1978.
8. GALLAGER, D.W., MALLORGA, P., TALLMAN, J.F.: Interaction of diphenylhydantion and benzodiazepines in the CNS. *Brain Research*, 189: 209, 1980.
9. REGAN, J.W., ROESKE, W.R., YAMAMURA, H.I.: The benzodiazepine receptor: Its development and its modulation by γ -aminobutyric acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212: 137, 1980.
10. KIRAN, B.K., ULUS, I.H.: Reseptör stimüle ve bloke edici ilaçların agonistik ve antogonistik kuvvetlerinin kantitatif değeriendirilmesi. *Bursa Tıp Fakültesi Dergisi* 2: 31, 1975.
11. BERNETT, J.P.: *Methods in Binding Studies in Neurotransmitter Receptor Binding* Ed. H. I. Yamamura, S.J. Enna and M.J. Kuhar Raven Press. Newyork 1978. pp. 71-74.
12. BRAESTRUP, C., NIELSEN, M.: Ontogenetic development of benzodiazepine receptors in the rat brain. *Brain Res.* 147: 170, 1978.
13. GALLAGER, D.W., MALLORGAR, P., THOMAS, J.W., TALLMAN, J.F.: GABA - benzodiazepine interactions: Physiological, pharmacological and developmental aspects. *Federation Proc.* 39: 3043, 1980.
14. HARDEN, T.K., WOLFE, B.B., SPORN, J.R., PERKINS, J.P., MOLINOFF, P.B.: Ontogeny of β -adrenergic receptors in rat cerebral cortex. *Brain Res.* 125: 99, 1977.
15. COYLE, J.T., YAMAMURA, H.I.: Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res.* 118: 429, 1976.
16. COYLE, J.T., ENNA, S.J.: Neurochemical aspects of the ontogenesis of gabanergic neurons in the rat brain. *Brain Res.* 111: 119, 1976.
17. MULLER, W.E.: Der Benzodiazepinrezeptor. *Dt. med. Wsch.* 105: 69, 1980.
18. PAUL, S.M., SYAPIN, P.J., PAUGH, B.A., MONCADA, V., SKOLNICK, P.: Correlation between benzodiazepine receptor occupation and the anticonvulsant effects of diazepam. *Nature.* 281: 688, 1979.
19. SKOLNICK, P., PAUL, S.M., MARANGOS, P.J.: Purines as endogenous ligands of the benzodiazepine receptor. *Federation Proc.* 39: 3050, 1980.

Not: Reseptör bağlanması ile ilgili bütün deneyler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmanın yapılması esnasında gösterdiği yardım ve yakınlık için Sayın Doç. Dr. İ.H. ULUS'a teşekkürü bir borç bilirim.