

OKSİTOSİN FRAGMANLARINDAN OXT (4-9) ve OXT (5-8)'İN BELLEK ÜZERİNE ETKİSİ (II)*

Banu Ocakçioğlu**

Oksitosin'in iyi bilinen periferik etkilerine ek olarak öğrenme ve bellek olaylarında da bir role sahip olduğu görülmektedir (2). Hipotalamus'tan orijin alıp ekstrapotalamik beyin alanlarına projekte olan ve oksitosin yapan nöronların bu olaylarla ilgili mekanizmalara nörotransmitter ve/veya nöromodülatör olarak katılmaları söz konusudur (6,7,10).

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar, nörohipofizeal hormonların davranışla ilgili yerler olan limbik yapılara etki ettiklerini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca santral sinir sisteminde bulunan çeşitli nöropeptidlerin bazı fragmanlarının da ana peptidlerine benzer veya farklı etkiler ortaya çıkarabildikleri gösterilmiştir. Doğal yapısı dokuz aminoasitli bir nonapeptid olan oksitosinin de çeşitli fragmanlarının davranış üzerinde etkiler ortaya çıkarabildikleri gösterilmiştir (3,4,5).

Deneylerimiz, öğrenilmiş davranışın unutulması (sönme) üzerine amnezik bir peptid olarak kabul edilen oksitosinin fragmanlarından OXT (4-9) ve OXT (5-8)'in ne yönde etkili olabileceğinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Deneyler, ağırlıkları 25 - 40 gram olan erkek farelerde yapıldı. Hayvanlar, deney gününden önce toplu halde tutularak gıda ve su gereksinimleri kesintisiz olarak sağlandı. Deneyden bir saat önce tek başlarına birer kafese yerleştirildiler. Hayvanlar, kontrol grubunda 12, diğerlerinde ise herbirinde 8 tane fare olacak şekilde 4 ana gruba

* Dr. Banu Ocakçioğlu'nun Uzmanlık Tezi'nin bir parçasıdır.

** A. Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araş. Görevlisi.

ayrıldılar. Deneyler daima günün aynı saatlerinde, 9.30 - 17.00) yapıldı. Hayvanları şartlamak amacı ile, TKK otomatik «kaçışa koşullandırma» aleti (Takai and Co., Ltd. Japonya) kullanıldı. Deneyler dört aşamada gerçekleştirildi :

a) Koşullu Cevap Kazanma (acquisition) deneyi :

Daha önceki çalışmamızda kullandığımız yöntem kullanıldı (1). Son deney günü elde edilen cevaplar incelenerek bu hayvanların öğrenmesi gereken davranışı (koşullu kaçış cevabı) kazanmalarını saptandı.

b) Koşullu Cevapların Saklanması :

Koşullu cevap kazanma deneyinde uygulanan öğretimden sonra on gün normal koşullar altında bekletilen farelere tekrar aynı koşullarda 20 denemelik uygulama yapıldı ve kazanılan cevabın saklanıp saklanmadığı (retrieval) değerlendirildi. Sonuçlar şekillerimizde retansiyon (RET₁) olarak gösterildi.

c) Sönme Deneyi :

Kazanılan cevabın saklanıp saklanmadığını anlamak için yapılan retansiyon testinden (RET₁) 24 saat sonra sönme deneyine başlandı. Burada, koşulsuz stimulus olan elektrik şoku kesildi, sadece koşullu stimulus olarak ışık uygulandı. Yani koşullandırıcı uyarının (conditioned stimulus) verilmesi sürdürüldü, ancak temel stimulus kesildi. Deney sonunda kazanılan cevaplarda azalma (sönme) olup olmadığı incelendi. Sönme deneyi arka arkaya üç gün uygulandı ve hergün farelere deneyden bir saat önce planlanan enjeksiyon yapıldı.

d) Retansiyon 2 (RET₂) ve Retansiyon 3 (RET₃) Testleri :

Birbirini izleyen üç günlük sönme deneyinin tamamlanmasından ve enjeksiyonların kesilmesinden 48 saat sonra retansiyon 2 (testi (RET₂)) uygulandı. Bu testte sadece koşullu stimulus olan ışık verilirken bundan 24 saat sonra yapılan retansiyon testinde (RET₃) ise koşullu stimulusun ardından koşulsuz stimulus olan elektrik şoku uygulandı. Yani RET₂'de sönme deneyi (c bendinde açıklanan), RET₃'de koşullu cevapların saklanması deneyi (b bendinde açıklanan) tekrarlanmış oldu.

Deneylerde, fizyolojik tuzlu su (% 0,9 NaCl solusyonu), oksitosin (4-9) - (PGlu⁴, Cyt⁶) Oxytocin (Organon) ve oksitosin (5-8) - (Cyt⁶), Oxytocin (Organon) preparatları kullanıldı.

Deneyin başlamasından 1 saat önce yapılan enjeksiyonlarda kullanılan ilaç farelere eşit hacim içinde 0,1 ml/10 gr.) ve deri altı olarak verildi.

Fareler, kontrol (serum fizyolojik verilen), oksitosin (4-9) ve oksitosin (5-8) verilen gruplar olmak üzere 3 ana gruba ayrıldı. Oksitosin fragmanları verilen gruplar verilen doza göre alt gruplara ayrıldılar.

Grup I : Kontrol - serum fizyolojik

Grup II : Oksitosin (4-9) : 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$

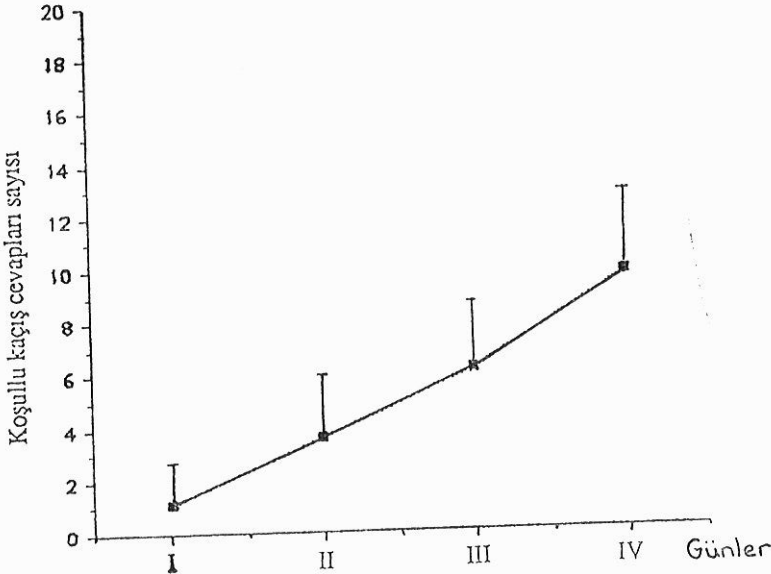
Grup III : Oksitosin (5-8) : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

İstatistiksel değerlendirmelerde iki yüzde arası farkın önem kontrolü «t testi» ve «Mann - Whitney U testi» kullanılmıştır.

BULGULAR

a) Koşullu Cevap Kazanma Deneyi :

Koşullu cevap kazanma (acquisition) deneyinin dördüncü yani son gününde 20 denemenin ortalama olarak 9,66'sında (% 48.3) koşullu kaçış cevabı gösterdikleri yani şokun geleceğini öğrendikleri saptandı (Şekil 1).



Şekil 1 - Koşullu kaçış cevaplarının öğrenilmesi.

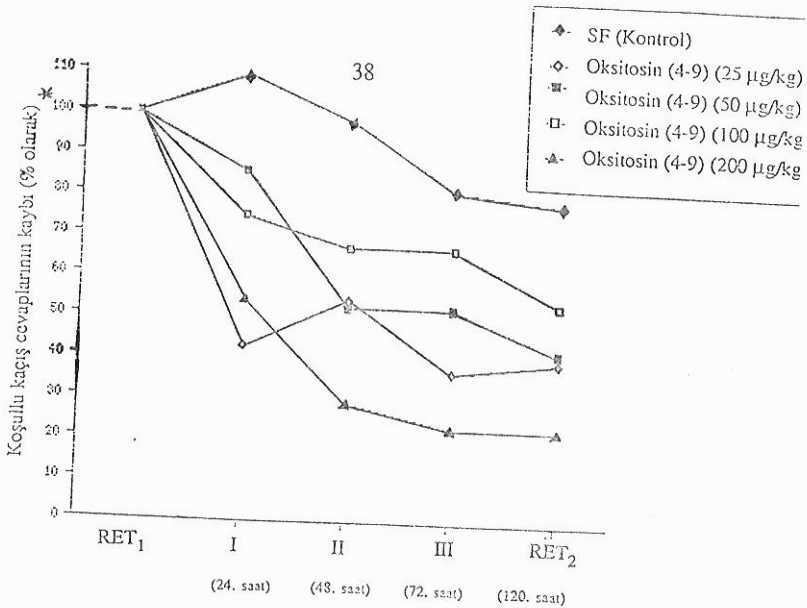
b) Koşullu Cevapların Saklanması :

Koşullu cevapların saklanması incelenen deneylerde 20 demelik dönemlerde farelerin ortalama 9,08 koşullu kaçış cevabı gösterdikleri yani kazandıkları cevabı korudukları, unuttukları ve 10 gün önceye göre bir azalma olmadığı saptandı.

Deneylerimizin bundan sonraki değerlendirilmesinde 9,08 ortalama cevap 100 kabul edildi ve değerlendirmeler bu cevaba göre yüzde değer olarak gösterildi.

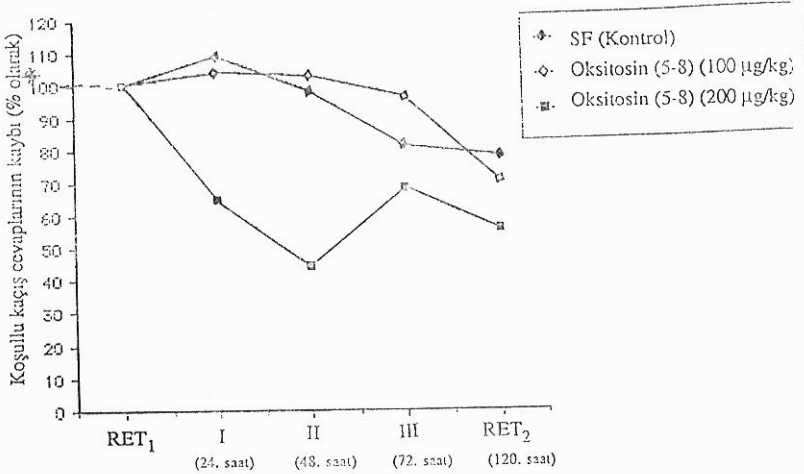
c) Sönme Deneyi :

Sönme deneyi sonuçları incelendiğinde, fizyolojik tuzlu su (S.F.) verilen kontrol grubu farelerin koşullu kaçış cevaplarının birbirini izleyen üç günlük deney dönemlerinde (I, II. ve III. günler) devamlı olarak azaldığı saptandı. Ancak azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 2,3).



Şekil 2 - Oksitosin (4-9)'un farklı dozlarının kazanılan davranışın kaybedilmesi (sönme, extinction) üzerine etkileri. (* kazanılmış ve saklanmış maksimal cevap).

Deneyden 1 saat önce oksitosin fragmanları olan oksitosin (4-9) ve oksitosin (5-8) enjekte edildiğinde şu sonuçlar elde edildi. : OXT (4-9) (25, 50, 100, 200 µg/kg) verilen hayvanların cevaplarının kont-



Şekil 3 - Oksitosin (5-8)'in farklı dozlarının kazanılan davranışın kaybedilmesi (sönme, extinction) üzerine etkileri. (* kazanılmış ve saklanmış maksimal cevap).

role göre düşük olduğu gösterildi. 25 ve 50 µg/kg OXT (4-9) verilen gruplarda birbirini izleyen tüm günlerde azalmanın anlamlı olduğu bulundu. 200 µg/kg OXT (4-9) uygulanan grupta ise ikinci üçüncü günlerdeki azalmanın istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı olduğu saptandı. Bu durum kazanılan cevapların kontrole göre giderek kaybolduğunu yani sönme olduğunu göstermektedir (Tablo 1) (Şekil 2).

Oksitosin (5-8) (100, 200 µg/kg) verilen hayvan gruplarında ise 100 µg/kg OXT (5-8) enjekte edilen farelerden elde edilen cevaplar kontrolden farklı bulunmadı ancak 200 mg/kg OXT (5-8) enjeksiyonu yapılanlarda cevaplar kontrolden daha düşüktü ve bu gruptaki cevapların, birbirini izleyen deney günlerinin hepsinde de istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptandı (Şekil 3) (Tablo 1).

d) Retansiyon 2 (RET₂) ve Retansiyon 3 (RET₃) Testleri :

RET₂ ve RET₃ gruplarında elde edilen cevaplar karşılaştırıldığında S.F. verilen kontrol gruplarında cevabın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$) bir şekilde arttığı saptandı (Şekil 4,5).

Tablo 1 : Oksitosin ve fragmanlarının farklı dozlarının sönme üzerine etkileri (ortalama \pm standart sapma)

Maddeler	Dozları	*Sönmenin I. gün sonuçları (24 saat)	*Sönmenin II. gün sonuçları (48 saat)	*Sönmenin III. gün sonuçları (72 saat)	* RET 2 (120 saat)
Serum Fizyolojik (SF)		9,917 \pm 5.931	8.917 \pm 5.195	7.333 \pm 4.735	7.083 \pm 5.834
Oksitosin (4-9)	25 μ g/kg	3.625 \pm 4.104 b	4.625 \pm 3.962 c	3.125 \pm 3.4 b	3.375 \pm 4.069
	50 μ g/kg	5.125 \pm 3.226 b	3.125 \pm 2.295 a	3.125 \pm 3.563 b	2.5 \pm 2.507 b
	100 μ g/kg	8.375 \pm 5.344	7.5 \pm 7.290	7.5 \pm 5.425	6.0 \pm 6.525
	200 μ g/kg	5.875 \pm 6.813	3.125 \pm 2.748 b	2.5 \pm 2.070 a	2.5 \pm 2.268
Oksitosin (5-8)	100 μ g/kg	9.625 \pm 5.097	9.5 \pm 6.782	8.875 \pm 3.907	6.5 \pm 3.220
	200 μ g/kg	4.375 \pm 3.503 b	3.0 \pm 2.619 b	4.625 \pm 3.543 d	3.75 \pm 3.808 d

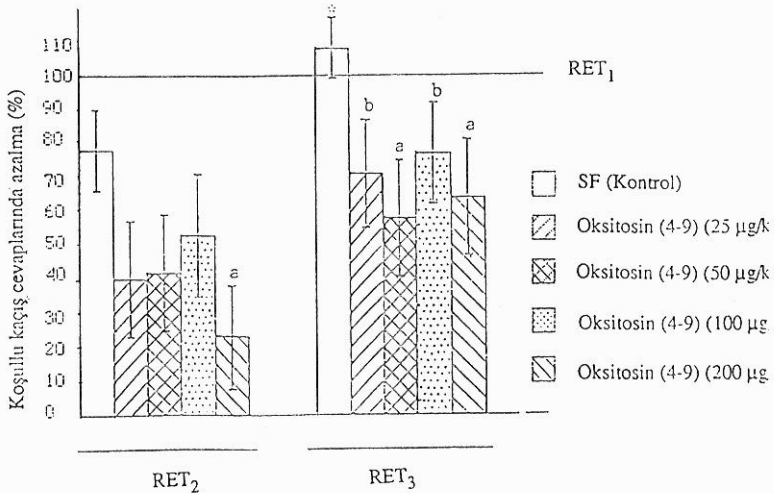
* Deneyden 1 saat önce enjeksiyon yapıldı.

● 48 saat beklendikten sonra ilaç verilmeden deneye alındılar.

Serum fizyolojikle (S.F.) karşılaştırılan değerlerin anlamlılık dereceleri :

a. $P < 0.001$ b $P < 0.01$ c $P < 0.02$ d $P < 0.05$

İstatistiksel değerlendirme Mann-Whitney U-testi ile yapıldı.

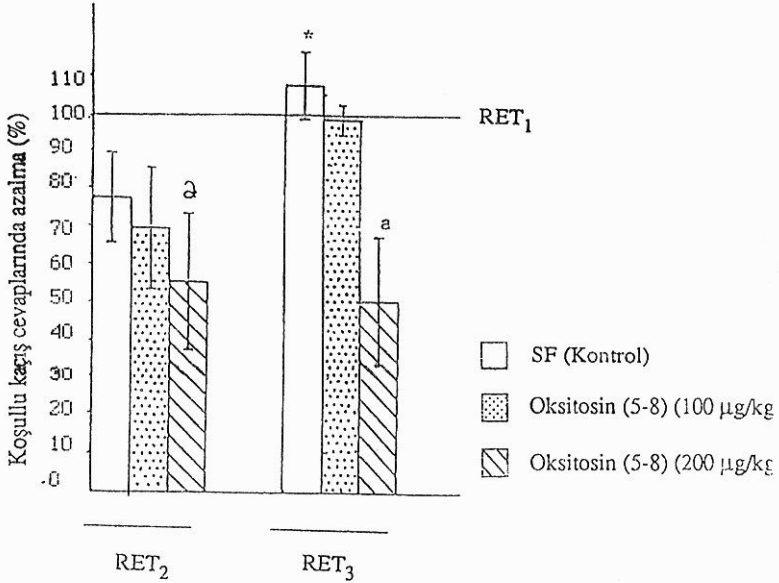


Şekil 4 - Oksitosin (4 - 9) uygulanan grupta sönme deneyini takiben kalan cevabın saklanması.

İstatistiksel değerlendirme, yüzdeler arası farkın önem kontrolüne göre «t testi» ile yapıldı.

(a) : $P < 0.01$ (b) : $P < 0.02$ (c) : $P < 0.05$

(*) : RET₂ ve RET₃ mukayesesi yapıldığında anlamlı artma $P < 0.01$ olanlar.



Şekil 5 : Oksitosin (5-8) uygulanan grupta sönme deneyini takiben kalan cevabın saklanması.

İstatistiksel değerlendirme, yüzdeler arası farkın önem kontrolüne göre «t testi» ile yapıldı.

(a) : $P < 0.01$ (b) : $P < 0.02$ (c) : $P < 0.05$

(*) : RET₂ ve RET₃ mukayesesi yapıldığında anlamlı artma $P < 0.01$ olanlar.

Oksitosin (4-9) verilen hayvanlarda retansiyon 3 testlerinden elde edilen cevaplar tüm dozlarda kontrole göre anlamlı olarak düşüktü (Şekil 4).

Oksitosin (5-8) uygulanan farelerden sadece 200 µg/kg doz kullananlarda cevapta anlamlı ($p < 0,01$) bir azalma saptandı (Şekil 5).

Tüm sonuçlarda, cevaplarda azalma saptanmasına karşın doz-cevap eğrisi lineer değildi.

TARTIŞMA

Oksitosinin son 3 aminoasitini oluşturan bir tripeptidin (H - Pro - Leu - Gly - NH₂) gerek davranış gerekse diğer santral sinir sistemi fonksiyonları üzerinde etkileri konusunda yoğun bulgular mevcuttur (5,8,9). Bunun dışındaki daha uzun zincirli diğer oksitosin fragmanları ile yapılan çeşitli çalışmalarda da gerek oksitosinin benzeri, gerekse fragmana özgü çeşitli santral etkiler saptanabilmektedir. Ko-

şullu kaçış davranışının çeşitli modelleri kullanılarak yapılan değişik öğrenme ve bellek fonksiyonu deneylerinde de bu farklı fragmanların bazılarının oksitosine benzer, bazılarının ise oksitosinden farklı cevaplar oluşturabildikleri saptanabilmektedir (3,5).

Diğer taraftan, santral sinir sisteminin çeşitli bölgelerinde bulunan peptidazların ana nonapeptid oksitosini, zincirin farklı yerlerden parçalayarak çeşitli fragmanların lokal olarak oluşabilmelerine yol açabildiği de gösterilmiştir (3,4). Bu durumda santral sinir sisteminde komplike fonksiyonların modülasyonunda ,oksitosinin tek başına ortaya çıkaracağı daha kaba çeşitli farklı etkinliklerin toplamının bir sonucu olan etkiden ziyade daha spesifik ve potent etkili küçük moleküllerin katkıda bulunabilmesi olasılığı gerçeğe daha yakın görülmektedir. Bununla beraber çeşitli oksitosin fragmanları ile yapılan deneyler koşullu kaçış davranışının çeşitli tipleri üzerinde her zaman aynı sonucu vermemektedir. Örneđin : OXT (1-8), OXT (4-9), OXT (4-8), OXT (5-8), OXT (5-9) fragmanlarının öğrenme periyodundan sonra verilşleri ile «passive avoidance» modeli kullanıldığında konsolidasyon ve hatırlama cevaplarının oksitosin ile ortaya çıkan cevaplara benzer şekilde azaldıkları saptanmıştır (3,4,5). Buna karşılık «active avoidance» modeli kullanıldığında ise OXT (4-9), OXT (5-9) fragmanlarının yüksek dozlarda sönmeyi inhibe ettikleri, küçük dozlarda ise hızlandırdıkları gösterilmiştir (5). Bizim bulgularımız da yukarıdaki çalışmalarda elde edilen sonuçları kısmen desteklemektedir. Bulgular bölümünde gözlenebileceği gibi OXT (4-9) fragmanı bütün dozlarda, sönmeyi (extinction) anlamlı olarak hızlandırmaktadır. Ayrıca hatırlamanın test edildiği RET₃ deneylerinde de cevapların SF kontrollerine göre anlamlı olarak düşük bulunuşu hatırlama fonksiyonunun da bozulmuş olduğunu göstermektedir.

Buna karşılık OXT (5-8)'in kullanıldığı deneylerde bizim kullandığımız 100 µg/kg dozlarında sönmeye herhangi bir hızlanma oluşmamış, buna karşılık hatırlamanın da bozulmamış olduğu saptanmıştır.

OXT (5-8)'in yüksek dozda (200 µg/kg) kullanılmasında ise cevapların diğer fragmana (OXT 4-9) benzer şekilde olduğunun görülmeye oksitosinin belirtilen etkisinin güçlenmesinde 9 numaralı aminoasidin oldukça önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir. Diğer bir deyimle 9 numaralı aminocidinin (glisin) kaldırılması etki gücünün azalmasına yol açmaktadır (5,9).

ÖZET

Santral sinir sisteminde çeşitli nöropeptidlerin fragmanlarının, esas nöropeptidinkilere benzer veya farklı etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, oksitosinin fragmanları olan OXT (4-9) ve OXT (5-8)'in bir koşullu kaçış cevabının sönmesi üzerine etkileri sunulmuştur. OXT (4-9) bütün dozlarda sönmeyi fasilite eder, hatırlamayı bozarken, OXT (5-8) kullanıldığında aynı sonuçlar sadece yüksek dozlarda elde edilmiştir. Bu sonuçlar, muhtemelen, dokuz pozisyonundaki glisin aminoasidinin özellikle bellek pekişmesi ve hatırlama olaylarında önemli olabileceğini göstermektedir.

SUMMARY

The Effects Of The Fragments Of Oxytocin OXT (4-9) And OXT (5-9) On Memory

It was demonstrated that in the central nervous system, fragments of various neuropeptides showed effects that were similar to or different from the effects of the main neuropeptide.

Similarly, the effects of certain fragments of oxytocin on behaviour was shown. In this report we presented the effects of the fragments of oxytocin, OXT (4-9) and OXT (5-8) on extinction of a conditioned avoidance response (E.C.A.R). In extinction test that the fragment of oxytocin, OXT (4-9) have been injected 1hr before the sessions, decreased responses (E.C.A.R.) were observed in comparison to saline injected control group. It was observed that the results of 100 µg/kg doses of OXT (5-8) administered animals were not different from the controls while responses (E.C.A.R.) of 200 µg/kg doses of OXT (5-8) injected animals were decreased. In retention tesis, administration of OXT (4-9) disturbed retrieval process in all doses. When OXT (5-8) was injected, it was not effected by the doses of 100 µg/kg, but attenuated by higher doses, 200 µg/kg. In conclusion, the fragment of oxytocin, OXT (4-9), facilitated extinction and disturbed retrieval in all doses but OXT (5-8) caused same results only at higher doses. These results probably suggested that glycine aminoacid in position nine may be important especially in memory consolidation and retrieval.

Key words : Amnesia, avoidance, extinction, memory, oxytocin (4-9), oxytocin (5-8).

KAYNAKLAR

1. Ayhan S : Sentetik met-enkefalın benzeri FK. 33824'ün sıçanlarda şartlı kaçış cevapları kazanılmasına etkisi. Ankara Tıp Bülteni 6 : 177-188, 1984.
2. Ayhan S Ocakçioğlu B : Oksitosinin bellek üzerine etkisi. Journal of Ankara Medical School (baskıda).
3. Burbach J Peter H Bohus B Kovács GL Van Nispen JW Greven MH : Oxytocin is a precursor of potent behaviourally active neuropeptides. European Journal of Pharmacology 54 : 125-131, 1983.
4. De Wied D Gaffari D Burbach PH Kovács GL Van Ree JM : Structure activity relationship studies with c-terminal fragments of vasopressin and oxytocin on avoidance behaviors of rats. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 241 : 268-274, 1987.
3. Gaffari DJW De Wied D : Bimodal effect of oxytocin on avoidance behavior may be caused by the presence of two peptide sequences with opposite action in the same molecule. European Journal of Pharmacology, 147 : 157-162, 1988.
6. Hashimoto H Fukui K Moto T Makajima T Kato N : Distribution of vasopressin and oxytocin in rat brain. Endocrinol. Japon. 32 : 89-97, 1985.
7. Valiquette G Haldar J Abrams GM Nilaver G Zimmerman EA : Extrahypothalamic neurohypophysial peptides in the rat central nervous system. Brain Research 331 : 176-179, 1985.
8. Walter R Hoffman PL Flexner LB : Neurohypophysial hormones, analogs and fragments : Their effect on puromycin induced amnesia. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72 : 4180-4184, 1975.
9. Walter R Van Ree JM De Wied D : Modification of conditioned behavior of rats by neurohypophysial hormones and analogues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 : 2493, 1978.
10. Zimmerman EA Nilaver G Hou-Yu A Silverman AS : Vasopressinergic and oxytocinergic pathways in the central nervous system. Federation Proc. 43 : 91-96, 1984.