



Parkinson Hastalarında L-Deprenilin Nitrik Oksit Metabolitlerine Etkisi⁺

Sibel Altınayar*, Feriha Özer***, Yusuf Türköz**, Handan Işın Özışık*, Sibel Çetin***, Eyüp Altınöz**, Cemal Özcan*

*İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Malatya

** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

***Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul

Amaç: L-deprenil, Parkinson hastalığı tedavisinde sıklıkla kullanılan, irreversibl bir mitokondriyal monoamin oksidaz tip-B (MAO-B) inhibitörüdür ve etkisini MAO-B enzim inhibisyonundan farklı bir mekanizma ile yaptığına inanılmaktadır. L-deprenilin serebral dokudaki nöroprotektif etkisini Nitrik oksit (NO) üretimi yoluyla yaptığı düşündüren, in vivo ve in vitro doku çalışmaları yayınlanmıştır. Bu çalışmanın amacı, Parkinson hastalığında L-Deprenil kullanımının NO metabolitlerine etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya L-deprenil kullanan (n=21) ve kullanmayan (n=16) olgular ile yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş sağlıklı kontrol grubu (n=24) dahil edildi. Serum total nitrit ve nitrat düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlendi.

Sonuçlar: L-Deprenil kullanmayan grupta; Total nitrit:62.6±16.2 µmol/L, Nitrat:59.5±16.2 µmol/L, L-Deprenil kullanan grupta; Total nitrit: 63.8±30.1 µmol/L, Nitrat: 67.3±29.0 µmol/L, kontrol grubunda; Total nitrit:66.2±21.8 µmol/L, Nitrat:62.4±21.2 µmol/L bulundu. Serum total nitrit ve nitrat düzeyleri üç grup arasında istatistiksel olarak farklı değildi.

Tartışma: Bu bulgular, L-deprenilin serebral dokudaki nöroprotektif etkisinin NO üretimi yoluyla olduğunu ileri süren görüşü desteklemiştir. L-deprenilin serebral doku ve NO metabolizmasına etkisini anlayabilmek için in vivo ve in vitro farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı; L-Deprenil; Nitrik oksit; Total nitrit; Nitrat.

Effect Of L-Deprenyl On Nitric Oxide Metabolites In Parkinson's Disease Patients

Objectives: L-deprenyl is an irreversible mitochondrial monoamine oxidase type-B (MAO-B) inhibitor and is mostly used in Parkinson's Disease (PD) treatment. However, it is believed that the effect of L-deprenyl in PD is by a different mechanism than MAO-B enzyme inhibition and may be due to several factors. Neuroprotective effect of L-deprenyl on cerebral tissue achieved by NO production has been shown by in vivo and in vitro tissue studies. The purpose of this study was to determine the level of nitric oxide (NO) metabolites, nitrite and nitrate in human serum and to assess whether there is any relationship among serum nitrate-nitrite levels and L-deprenyl in PD.

Patients and Methods: Twenty-one patients used L-Deprenil and 16 patients did not. Twenty-four healthy age- and sex matched control were included in the study. Serum total nitrite and nitrate levels were determined spectrophotometrically.

Results: The levels of Total nitrite and Nitrate in L-Deprenil using and L-Deprenil not using, and control groups were found to be 63.8±30.1 µmol/L and 67.3±29.0 µmol/L, 62.6±16.2 µmol/L and 59.5±16.2 µmol/L, 66.2±21.8 µmol/L and 62.4±21.2 µmol/L, respectively. Serum total nitrite and nitrate levels were not significantly different among the three groups.

Conclusion: These data do not support the concept that neuroprotective effect of L-deprenyl on cerebral tissue is achieved by NO production. Therefore, further in vivo and in vitro studies are needed to exactly clarify the cerebral effects of L-deprenyl and the role of NO in patients with PD.

Key Words: Parkinson's Disease; L-Deprenyl; Nitric Oxide; Total Nitrite; Nitrate.

⁺Bu çalışma 19-22 Mayıs 2005 tarihlerinde 6.Ulusal Parkinson Hastalığı ve Hareket bozuklukları Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

Parkinson hastalığı (PH) progresif, nörodejeneratif bir hastalıktır. Klinik olarak rigidite, bradikinezi, istirahat tremoru ve postural dengesizlik ön plandadır. Mezensefalonda bulunan substantia nigranın dejenerasyonu sonucu dopamin sentez ve salgılanmasında azalma görülür.¹ Bir çok hipotez ortaya atılmasına rağmen nigral hücre ölümünün sebebi kesin olarak bilinmemektedir. Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar reaktif nitrojen türleri ve nitrik oksidin (NO) önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.²⁻⁴

Nitrik oksit oldukça reaktif bir serbest radikaldir. Yarı ömrü sadece bir kaç saniyedir ve kolayca diğer serbest radikallerle birleşir. Biyolojik sistemlerde hızla nitrit ve nitrata parçalanır. Nitrik oksidin çok kısa yarı ömrü ve reaktivitesi nedeniyle lokal bir mesenger olarak etki eder.⁵

Merkezi sinir sisteminde NO'nin, nörotransmitter salınımı ve geri alınımında, nöron gelişiminde, sinaptik plastisitede ve gen ekspresyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, NO'nin aşırı üretimi nörotoksositeye de yol açabilir.⁶

L-deprenil, PH tedavisinde sıklıkla kullanılan, irreversibl bir mitokondriyal monoamin oksidaz tip-B (MAO-B) inhibitörüdür⁷⁻⁹ ve etkisini MAO-B enzim inhibisyonundan farklı bir mekanizma ile yaptığını inanılmaktadır. Bu mekanizmalarla ilgili olarak; nörotoksik serbest radikal üretimi inhibisyonu, endojen amfetamin benzeri etki, NMDA reseptör antagonizmi, antioksidan enzimlerin üretimi üzerinde durulmaktadır. Son yıllarda L-Deprenilin nöroprotektif etkisi ile NO arasında ilişki olduğu öne sürülmektedir.⁸ L-Deprenilin NO üretimi üzerinden gerçekleştirdiği bu nöroprotektif etki beyin dokusu ve serebral kan damarlarında in vitro ve invivo hayvan deneyleriyle ve doku çalışmaları ile gösterilmiştir.^{8,9} Ancak Parkinson hastalarında L-Deprenil

kullanımının NO metabolizmasına ne şekilde etki ettiği bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, İdiopatik parkinson hastalarında L-Deprenil kullanımının, NO ve metabolitleri üzerine etkisini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya polikliniğimizde İdiopatik Parkinson Hastalığı tanısı ile takip edilen ve sadece L-Deprenil, L-dopa ve dopamin agonistleri kullanan olgular dahil edildi. Antiparkinsoniyen tedavi dışında ilaç kullanan, NO yıkım ürünlerini etkileyebilecek hipertansiyon, diabetes mellitus ve enfeksiyon vb. hastalığı olan olgular çalışma dışı bırakıldı.

Olgularımız L-Deprenil kullanan ve kullanmayan gruplar olarak iki gruba ayrıldı. Yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş, aynı özelliklere sahip kontrol grubu oluşturuldu (Tablo 1). Çalışma hakkında bilgilendirilen ve rızası alınan olgular ve kontrol grubu, 48 saat öncesinden sosis, salam, sucuk benzeri NO üretimini etkileyen yiyecekler açısından diyetle alındı. Tüm deneklerden günün aynı saatinde (saat:10.30) kan alındı ve serum ayrıştırılarak -18 derecede saklandı.

Nitrik Oksit Değerlendirme Metodu

Serum nitrik oksit düzeyleri, enzimatik Greiss yöntemiyle total nitrit olarak ölçülmüştür. Total nitrit düzeyleri; endojen NO üretiminin indeksi olarak kabul edilmektedir.^{10,11}

Total nitrit ölçümü, Özbek ve ark. tarif ettiği metoda göre yapılmıştır.¹² oniki saatlik açlığı mütakiben, sabah 8-10 arasında kan örnekleri alındı ve serumları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri, ZnSO₄ ve NaOH ile deproteinize edildi. Daha sonra deproteinize edilmiş serumdan 250 µl alınarak, içersinde 0.32 mol/L potasyum fosfattanponundan

Tablo 1. L-Deprenil alan (grup I) ve almayan (grup II) olgular ve kontrol grubunun ortalama değerleri ve istatistiki sonuçları.

	Kontrol N:24	Grup I N=21	Grup II N:16	P
Yaş	63,8±8,0	60,3±10,1 (32-74)	65,3±9,1	,1¶
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	12/12	8/13	10/6	.1*
Nitrat (µmol/L)	62,4±21,2	59,5±16,2	67,3±29,0	,5¶
Total Nitrit (µmol/L)	66,2±21,8	62,6±16,2	63,8±30,1	,9¶
Hastalık Başlangıç Yaşı		56,3±11,0	60,9±9,0	,2¶
Hastalık Süresi (Ay)		47,1±34,8	54,4±46,9	,9¶
L-Deprenil dozu (mg)		8,6±2,3		
L-Deprenil Kullanım Süresi (Ay)		22,0±22,4		
Total UPDRS Puanı		23,5±18,5	32,1±18,3	,08¶

¶ Mann Whitney U testi, * Ki-Kare

(pH'sı 7.5 olan) 200 µl, nitrat redüktazdan (10 U/ml, Sigma) 25 µl, koenzim olarak NADPH (50 µmol/L) ve FAD (5 µmol/L) ile bunlara ilaveten 525 µl distile su bulunan toplam 750 µl sıvı içersine ilave edildi ve 2 saat süreyle inkübasyona tabii tutuldu.

Nitratın, nitrat redüktaz tarafından nitrite indirgenmesinden sonra, bu indirgenmiş numunelerden ve Greiss reaktifinden (greiss reaktif; distile su içersinde çözünmüş % 0.1'lik α-naftilamin ve % 5'lik fosforik asit içersinde çözünmüş % 1'lik p-aminobenzen sülfamid'den 1:1 oranında alınarak hazırlanmıştır) eşit hacimler alınarak karıştırıldı. Örnekler 15 dakika daha inkübasyona bırakıldıktan sonra bir spektrofotometre yardımıyla 548 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. 0 ile 100 µmol/L'lik bir aralıkta nitrit standartları hazırlanarak absorbans değerleri ölçüldü ve bir standart grafiği hazırlandı. Serum örneklerinin absorbans değerleri, bu standart grafiğinden yararlanılarak µmol/L nitrite çevrildi.

Bu yöntem, 0.25 ile 100 µmol/L arasında lineerite göstermiştir. Numuneler iki defa çalışılmış ve ortalaması alınmıştır. Yöntemin gün içi ve günler arası varyasyon koefisiyenti sırasıyla, <% 4 ve <% 7 olarak bulunmuştur.

Veriler SPSS veri tabanına kaydedildi ve her üç grupta NO yıkım ürünleri (nitrat ve nitrit) ölçülerek istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İstatistiksel işlemlerde Mann-Whitney U-testi, Ki-Kare testi kullanıldı ve $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Çalışmaya yaş ortalaması 62.5 ± 9.9 olan 37 olgu (19 erkek, 18 kadın) dahil edildi. L-Deprenil kullanan grup (grup I) 21 olgu, L-Deprenil kullanmayan grup (grup II) 16 olgudan oluşuyordu.

Tüm olguların ve kontrol grubunun yaş, cinsiyet, nitrat ve total nitrit düzeyleri, hastalık başlangıç yaşı, hastalık süresi, L-Deprenil süresi ve dozu, total UPDRS puanları tablo 1 de belirtildi.

Grup I ve II arasında yaş, cinsiyet, hastalık başlangıç yaşı, hastalık süresi ve UPDRS Total puanları açısından fark yoktu.

Kontrol grubu değerleri ile grup I ve grup II arasında nitrat ve total nitrit değerleri açısından Mann-Whitney U testi ile anlamlı fark bulunamadı.

TARTIŞMA

Parkinson hastalığında, substantia nigradaki hücre ölümünde oksidatif stress, mitokondrial disfonksiyon, NO eksitotoksitesisi, glial ve inflamatuvar süreçlerin rol oynadığı düşünülmektedir.¹³

Bir MAO-B inhibitörü olan L-Deprenilin nöroprotektif etkisi daha önce çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.^{14,15} MAO-B inhibitörlerinin klinik progresyon üzerine belirgin yavaşlatıcı etkisi olduğu bilinmesine rağmen, bu etkinin nöronal hücre ölümünü yavaşlatma yoluyla mı, semptomatik etki ile mi olduğu belirsizdir.¹⁶ Son yıllarda L-Deprenilin nöroprotektif etkisini NO üretimi üzerinden gerçekleştirdiği yönünde hayvan ve doku çalışmaları ile güçlü kanıtlar elde edilmiştir.^{3, 9, 17}

Parkinson hastalığında NO'nun rolü ile ilişkili olarak farklı görüşler sözkonusudur. Parkinsonda NO artışı ile sitotoksite arasında bir ilişki olduğu belirtilmesine karşın bazı çalışmalarda PH da NO üretiminde azalma olduğu öne sürülmüştür. Bu durum, olasılıkla farklı kompartmanlardaki NO aktiviteleri ile ilgili bir durum gibi görünmektedir.^{8, 17, 18} Maruyama ve ark.ları çalışmalarında NO düzeyindeki artışla sitotoksite arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada L-Deprenilin dopaminergic neuroblastoma hücrelerini nitrik oksit yada peroksinitrit ile induklene DNA hasarından koruduğu hatta L-deprenil hücrelerde kaybolduğu zaman bile koruyucu etkisinin devam ettiği saptanmıştır. Bu da L-Deprenilin apoptoza karşı hücre içi sistemleri harekete geçirdiğini düşündürmektedir.¹⁷

Buna karşın 1994te Kuiper ve ark. yaptıkları çalışmada, PH da merkezi sinir sisteminde NO üretiminde azalma olduğunu saptamış ve nörodejeneratif hastalıklarda NO üretiminin çeşitli yollarla artırılmasının faydalı olabileceğini önermiştir.¹⁸ Thomas ve ark. sığır beyninin çeşitli bölgelerinde ve izole medial serebral arterde L-deprenilin NO üretimini uyardığını göstermişlerdir.⁸ Bu çalışma, PH da azalmış NO düzeylerinin L-Deprenil ile artırılabilceğini düşündürmüştür.

Nitrik oksitin sitotoksik etkisi yalnızca serbest radikal özelliği ile açıklanamaz. Oksidatif stres altında superoksit ile reaksiyona girer ve peroksinitrit üretilir. Peroksinitrit ise hidroksil radikallerine dönüşür.¹⁹ Peroksinitrit ve hidroksil radikalleri hücre membran lipidlerinin peroksidasyonuna, DNA ve çok sayıda enzim proteininin oksidasyonuna neden olur.

Membran lipidlerinin peroksidasyonu, hücre membranının akışkanlığını; elastikiyetini ve geçirgenliğini azaltarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Ayrıca bu radikaller, hücre içi iyonize kalsiyum düzeylerini sürekli artırarak mitokondri fonksiyonlarının inhibisyonuna, ATP üretiminin azalmasına ve radikal üreten enzimlerin aktivasyonuna bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki meydana getirirler.^{20, 21}

Nörodejeneratif hastalıkların, muhtemelen NO/süperoksit dengesindeki bozulmanın sonucu olduğu ve tedavide bu mekanizmadan yararlanılabileceği düşünülmektedir. Nitrik oksidin oksijene göre relatif artışı dokuda koruyucu etki gösterir ve MAO-B inhibitörleri, oksidatif stresi azaltacak şekilde, dengeli NO yönüne kaydırabilir.¹⁹

Çalışmamızda L-Deprenil kullanan hasta grubuyla kullanmayan hasta grubu arasında NO yıkım ürünleri açısından fark bulamadık. Sonuçlarımız, hayvan çalışmaları ile gösterilen L-Deprenilin NO düzeyini artırıcı etkisini desteklemedi. Bu sonuç, bizi iki olasılık üzerinde yoğunlaştırdı.

1-PH da hayvan modelleri hastalığı tam olarak yansıtmamaktadır. Böylece gerçek hastalarda hayvan modelleri ile elde edilen sonuçlara ulaşamıyor olabilir.

2-Normal insanlarda görülen dopaminerjik nöron kaybı her dekada %3-5 oranındadır ve Parkinson hastalarında bu oranın daha yüksek olduğu bilinmektedir. Otopsi çalışmalarında PH'nda tanı konduğu anda dopamin içeren nöronların %70-75 inin dejenere olduğu görülmüştür.²² Bu durumda Parkinson hastalarında L-Deprenilin nöroprotektif etkisini gerçekleştirebileceği dopaminerjik hücre sayısının yetersizliği nedeniyle, hayvan ve doku çalışmalarında gösterilen NO düzeyini artırıcı etkisi görülmeyebilir. Ancak L-Deprenilin etkisi tüm nöronal hücrelerde (hipokampus dışında) görüldüğü için bu ikinci sav daha az olası görünmektedir.²⁰

Sonuç olarak L-Deprenil ve NO ilişkisinin insanlar üzerindeki etkisini açıklayabilmek için daha çok sayıda olgu ile ve farklı biyolojik yapılardan alınacak örneklerle (örneğin BOS) çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Alexia T, Borlongand CV, Faull RLM, Williams CE, Clarka RG, Gluckmana PD, Hughes PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology* 2000;60:409-470.
- Bonfoco E, Leist M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, and Nicotera P. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J. Neurochem* 1996;67:2484-2493.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokohama R, Shibata T, Dawson VL, and Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad Sci* 1996;93:4565-4571.
- Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews R, and Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nature Med* 1996;2:1017-1021.
- Vallance P, Collier J. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *British Medical Journal* 1994;Aug 13:453-462.
- Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 1998;118:215-229.
- Gerlach M, Desser H, Youdim MB, Riederer P. New horizons in molecular mechanisms underlying Parkinson's disease and in our understanding of the neuroprotective effects of L-Deprenil. *J Neural Transm Suppl* 1996;48:7-21.
- Thomas T, McLendon C, Thomas G. L-deprenyl: nitric oxide production and dilation of cerebral blood vessels. *Neuroreport* 1998;Aug 3:9(11):2595-2600.
- Naoi M, Maruyama W, Yagi K, Youdim M. Anti-apoptotic function of L-(-) deprenyl (L-Deprenil) and related compounds. *Neurobiology (Bp)* 2000;8(1):69-80.
- Jungersten L, Edlund A, Petersson AS, Wennmalm A. Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and confounding factors. *Clin Physiol* 1996;16:369-379.
- Zeballos GA, Bernstein RD, Thompson CI, *et al.* Pharmacodynamics of plasma nitrate/nitrite as an indication of nitric oxide formation in conscious dogs. *Circulation* 1995;91:2982-2988.
- Ozbek E, Turkoz Y, Gokdeniz R, Davarci M, Ozugurlu F. Increased nitric oxide production in the spermatic vein of patients with varicocele. *Eur Urol* 2000;37(2):172-175.
- Marsden CD, Olanow CW. The causes of Parkinson's disease are being unraveled and rational neuroprotective therapy is close to reality. *Ann Neurol* 1998; Sep:44(3 Suppl 1):S189-196.
- Tatton WG, Greenwood CE. Rescue of dying neurons: a new action for deprenyl in MPTP parkinsonism. *J Neurosci Res* 1991; Dec:30(4):666-672.
- Koller WC. Neuroprotective Therapy For Parkinson's Disease. *Experimental Neurology* 1997;144:24-28.
- Tatton BW, Chalmers-Redman R, and Tatton N. Neuroprotection by deprenyl and other propargylamines: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase rather than monoamine oxidase J *Neural Transm* 2003;110: 509-515.
- Maruyama W, Takahashi T, Naoi M. (-)-Deprenyl protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells from apoptosis induced by peroxynitrite and nitric oxide. *J Neurochem* 1998;Jun:70(6):2510-2515.
- Kuiper MA, Visser JJ, Bergmans PLM, Scheltens P, Wolters EC. Decreased cerebral fluid nitrate levels in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple system atrophy patients. *J Neurol Sci* 1994;121:46-49.
- Thomas T. Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2000;21:343-348.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: MPP implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad Sci.* 1990;87:1620-1624.
- Dawson LV, Dawson TM. Physiologic and Toxicologic Actions of Nitric Oxide in the Central Nervous System. In: Ignarro L, Murad F (eds). *Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications*. San Diego, California: Academic Press Inc 1995:323-342.
- Mandel S, Unblatt EGr, Riederer P, Gerlach M, Levites Y, and Youdim MBH. Neuroprotective Strategies in Parkinson's Disease An Update on Progress. *CNS Drugs* 2003;17(10):729-762.

Yazışma Adresi:

Yrd.Doç.Dr. Sibel Altınayar
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı
44160 Malatya.
Tel : 422 341 06 60-4906
Fax : 422 341 06 19 – 422 341 07 28
E-Posta : skizkin@inonu.edu.tr