

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ UNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE VAZOAKTİF İNTESTİNAL
PEPTİDİN STRİATUM DOPAMİN METABOLİZMASI, TALAMUS
GABA DÜZEYLERİ ve BEYİN MAST HÜCRESİ KİMYASINA
ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

ORHAN TANSEL KORKMAZ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. NEŞE TUNÇEL

ŞUBAT, 2009

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE VAZOAKTİF İNTESTİNAL
PEPTİDİN STRİATUM DOPAMİN METABOLİZMASI, VATH GABA
DÜZEYLERİ ve BEYİN MAST HÜCRESİ KİMYASINA ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

ORHAN TANSEL KORKMAZ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. NEŞE TUNÇEL

KABUL ve ONAY SAYFASI

Orhan Tansel KORKMAZ'ın **Doktora Tezi** olarak hazırladığı "**Deneysel Parkinson modelinde vazoaktif intestinal peptidin striatum dopamin etabolizması, talamus GABA düzeyleri ve beyin mast hücresi kimyasına etkileri**" başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Öğrenim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri çerçevesinde değerlendirilerek kabul edilmiştir.

ÜYE
Prof. Dr. Neşe TUNÇEL

ÜYE
Prof. Dr. Ziya KAYGISIZ

ÜYE
Prof. Dr. Gönül PEKER

ÜYE
Prof. Dr. Berrak YEĞEN

ÜYE
Prof. Dr. Yasemin AYDIN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11/03/2009 tarih ve 779/3620 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ferruh YÜCEL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Parkinson hastalığı bu gün henüz etkin bir tedavinin bulunamadığı, substantia nigra ve takibinde striatumda yoğun dopaminerjik nöron kaybına bağlı nörodejeneratif bir hastalıktır. Uygulanan tedavilerde sıklıkla önemli yan etkiler ortaya çıkmakta, nöron hasarının altında yatan olayları durdurma ve yavaşlatmada ise yarar sınırlı kalmaktadır. Yirmi sekiz amino asitli endojen bir peptit olan Vasoaktif intestinal peptit (VIP)'in Parkinson hastalığının tedavisi için umut verici bir molekül olduğu deneysel modeller üzerinde gösterilmiştir. VIP deneysel Parkinson modellerinde striatal dopamin düzeylerini artırmadan, motor fonksiyon bozukluklarını geri çevirmiş, nöron ölümünü engellemiştir. VIP koruyucu etkisini, çok çeşitli yollar üzerinden gösterebilmektedir. Etki mekanizmasındaki bir yolun da beyin mast hücreleri üzerinden olabileceği ileri sürülmektedir. VIP'in motor fonksiyonlardaki geri döndürücü etkisi bağlamında, bazal gangliyonların kortekse ana çıkış noktası olan ventral anterior talamusta (VATh) γ -aminobütirik asit (GABA) düzeylerine etkisi hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, sıçanlar üzerinde 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde, VIP'nin talamus ventralanterior nukleusundaki GABA düzeylerine, dopaminin metabolizmasına etkisi için, striatumdaki dopamin/DOPAC düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, beyin mast hücreleri içerikleri: NGF, RMCPII, serotonin ve heparin molekülleri için immünohistokimyasal işaretleme ile incelenmiştir. Sonuç olarak, VIPin dopamin metabolizmasını artırmadığı, VATh GABA düzeylerinde (6-OHDA) uygulaması sonucu gözlenen anlamlı azaltmayı geri döndürdüğü, NGF ile işaretlenen mast hücre oranını yükselttiği gözlenmiştir. VIP'in motor fonksiyonlar üzerinden gözlenen iyileştirici etkisinin, VATh GABA düzeyleri üzerinden, nöronları koruyucu etkisinin ise mast hücresi kaynaklı NGF üzerinden olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson, mikrodializ, vazoaktif intestinal peptit, mast hücresi, NGF, GABA, dopamin, DOPAC

SUMMARY

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder with no effective treatment, characterized by massive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the subsequent loss of their projecting nerve fibers in the striatum. Current available treatments, frequently inducing major side effects, have a limited beneficial effect in halting and slowing down the progression of the underlying neurodegenerative process. Vasoactive intestinal peptide (VIP), a 28-amino acid endogenous peptide, has been shown on animal models of PD as a promising candidate for the treatment of PD. VIP reduced neuronal death and reversed motor deficits without altering decreased dopamine levels in striatum. The mechanisms of protective effect of VIP may be miscellaneous. One of the mechanisms suggest that neurotrophic mediators of brain mast cells would be involved. In addition, there is no report that whether VIP changes γ -aminobutyric acid (GABA) levels in ventral anterior thalamus (VATh) while restoring motor function deficits. In the present study, effects of VIP on GABA levels of VATh, and dopamine/DOPAC levels in the striatum, to understand the role of VIP on dopamine metabolism, were examined in experimental rat PD model induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). The granular contents of brain mast cell such as NGF, RMCPII, serotonin and heparin were examined by using immunohistochemical staining techniques. The present results show that VIP significantly increases in VATh GABA levels reduced by 6-OHDA application, and increases the rate of NGF immunostaining mast cells, but does not alter dopamine metabolism. It is concluded that the protective effect of VIP on motor functions are possibly related with increased VATh GABA levels, and its neuroprotective actions may be via NGF released from brain mast cells.

Key Words: Parkinson's disease, microdialysis, vasoactive intestinal peptide, mast cells, NGF, GABA, dopamine, DOPAC

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Bazal Gangliyonlar.....	4
2.1.1. Bazal gangliyon devrelerinin kimyası	6
2.2. Parkinson Hastalığı.....	9
2.2.1. Parkinson Hastalığının Tedavisi.....	12
2.2.2. Deneysel Parkinson Modelleri	14
2.2.2.1. 6-Hidroksidopamin	15
2.3. Mast Hücreleri.....	16
2.3.1. Mast Hücre Heterojenitesi	18
2.3.2. Mast Hücrelerinin Fonksiyonları	20
2.4. Vazoaktif İntestinal Peptit (VIP)	21
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	24
3.1. Kullanılan Materyaller	24
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Deneysel Parkinson modeli oluşturulması.....	26
3.2.2. Rotasyonmetrik ölçüm.....	27
3.2.3. Mikrodiyaliz.....	27
3.2.4. Ekstrasellüler Dopamin,DOPAC ve GABA düzeylerinin ölçümü 28	
3.2.4.1. Dopamin-DOPAC analizinde yapılan işlemler.....	29
3.2.4.2. GABA analizinde yapılan işlemler	30
3.2.5. Histolojik incelemeler için yapılan işlemler	31
3.2.5.1. Perfüzyon fiksasyonu ve doku takibi.....	31

3.2.5.2. İmmünohistokimyasal işlemler	32
3.2.5.2.1. RMCP II işaretleme yöntemi	32
3.2.5.2.2. NGF işaretleme yöntemi	33
3.2.5.2.3. Serotonin işaretleme yöntemi.....	34
3.2.5.2.4. Heparin işaretleme yöntemi	35
3.2.6. İstatistiksel değerlendirme	35
4. BULGULAR	37
4.1. Rotasyonmetrik veriler	37
4.2. Mikrodiyaliz örneklerinde HPLC ölçümleri	38
4.2.1. Striatal dopamin düzeyleri	40
4.2.2. Striatal DOPAC düzeyleri.....	41
4.2.3. Striatal dopamin/DOPAC oranı	42
4.2.4. VATH GABA düzeyleri.....	43
4.3. Histolojik veriler.....	44
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6. KAYNAKÇA	58
7. ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** : Bazal gangliyonlar:
- Şekil 2.2.** : Bazal gangliyon devreleri
- Şekil 4.1.** : Rotasyonmetrik verilerin bar grafik görüntüsü
- Şekil 4.2.** : Dopamin-DOPAC standart numunelerinin HPLC analiz kromatogramı
- Şekil 4.3.** : Dopamin-DOPAC ölçümü yapılmış örnek bir mikrodiyaliz numunesinin HPLC analiz kromatogramı
- Şekil 4.4.** : GABA standart numunelerinin HPLC analiz kromatogramı
- Şekil 4.5.** : GABA ölçümü yapılmış örnek bir mikrodiyaliz numunesinin HPLC analiz kromatogramı
- Şekil 4.6.** : Striatum dopamin düzeyi sonuçları
- Şekil 4.7.** : Striatum DOPAC sonuçları
- Şekil 4.8.** : Dopamin/DOPAC oranları
- Şekil 4.9.** : VATH GABA düzeyleri
- Şekil 4.10.** : Prob izi
- Şekil 4.11.** : Toludin mavisi ile boyanmış mast hücreleri
- Şekil 4.12.** : RMCP II antikoruyla pozitif boyanan mast hücreleri
- Şekil 4.13.** : Heparin antikoruyla pozitif boyanan mast hücreleri
- Şekil 4.14.** : Serotonin antikoruyla pozitif boyanan mast hücreleri
- Şekil 4.15.** : NGF antikoruyla pozitif boyanan mast hücreleri

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 4.1.** : Rotasyonmetrik ölçüm sonuçları
- Çizelge 4.2.** : Striatal dopamin ölçümü sonuçları
- Çizelge 4.3.** : Striatal DOPAC ölçümü sonuçları
- Çizelge 4.4.** : Striatal dopamin/DOPAC oranı
- Çizelge 4.5.** : VATH GABA ölçümü sonuçları
- Çizelge 4.6.** : Mast İmmünohistokimyasal boyama sonuçları

SİMGE VE KISALTMALAR

ACN	: Asetonitril
BG	: Bazal gangliyonlar
COMT	: Katekol-O-metiltransferaz
DOPAC	: 3,4- dihydroxyphenylacetic acid
GDNF	: Glial nörotrofik faktör
GABA	: γ -amino bütirik asit
GPe	: Globus pallidus externus
GPi	: Globus pallidus internus
KCl	: Potasyum Klorür
MH	: Mast hücreleri
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
MAO	: Monoamin oksidaz
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MPP+	: 1-metil-4-fenilpiridinyum
MS	: Multiple skleroz
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHCO ₃	: Sodyum Bikarbonat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Fosfat
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NGF	: Nöronal büyüme faktörü
PH	: Parkinson hastalığı
PBS	: Fosfat buffer solüsyonu
RMCP-II	: Sıçan mast hücre proteazı 2
RMCP-I	: Sıçan mast hücre proteazı 1
SNpc	: Substansia nigra pars cospacta
SNpr	: Substansia nigra pars retikulata
STN	: Subtalamik nükleuslar
UCH-L-1	: Ubikütün C-terminal hidrolaz L1
VİP	: Vazoaktif intestinal peptit
6-OHDA	: 6-hidroksi dopamin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), beyinde Substantia nigra pars compacta'dan (SNpc) corpus striatum'a (CS) uzanan dopaminerjik nöronların kaybına bağlı olarak gelişen nörodegeneratif bir hastalıktır. Nörodejenarasyonun nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte genetik nedenler ya da oksidatif stres, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, hücre içi kalsiyum ve demir homeostazisinin bozulması, inflamasyon, nitrik oksite (NO) aşırı maruziyet , apoptozis ve mikroglial hücre aktivasyonu gibi faktörlerin önemli rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Günümüze kadar hastalığa karşı geliştirilen farklı birçok yöntem nörodejenarasyonun ilerleyişini geri çevirememiş yalnızca semptomatik etkilerine karşı sınırlı seviyede başarı sağlayabilmiştir. Ayrıca, mevcut tedavi yöntemlerinin uygulanması ile ortaya çıkan önemli yan etkilerin varlığı da Parkinson hastalığının tedavisinde çözüm bekleyen ayrı bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Granüllü mast hücreleri (MH) mikroglialara benzer hücreler olup birçok türde beyin dokusunda da bulunan, granüllerinde 20 den fazla maddeyi sentezleyip depo edebilen ve aktive olduklarında granüllerindeki mediatörleri farklı yollarla salgılayabilen hücrelerdir. MH genel olarak; çevresel, morfolojik ve içeriksel özelliklerine bağlı olarak bağ dokusu MH (CTMC) (tipik) ve mukozal MH (MMC) (atipik) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Proteazlar açısından da bu iki tip mast hücresinin farklı proteaz molekülleri içerdiği saptanmıştır. Sıçanlarda proteazlara bağlı olarak mast hücre alt tiplerinin kesin ayrımı yapılabilmektedir. CTMC'yi sıçan proteaz I (RMCP1) , MMC'i ise sıçan proteaz II (RMCP2) olarak tanımlanan proteaz molekülünü içermektedir. Beyin dokusunda bulunan MH ise histolojik boyanma özellikleri açısından CTMC'lerine, ultrasüruktürel yapıları ve madde salgılama özellikleri yönünden ise MMC'lere benzerler. Beyinde, MH'nin salgıladıkları proteoglikanlar, biyojenik aminler, NGF gibi büyüme faktörleri ve sitokinler ile sinir iletimi, nöron ve glia hücrelerinin gelişimi ve yaşamlarının devamında önemli roller üstlenebildiği ileri sürülmektedir. Beyin MH'nin çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik durumlarla ilişkili olabileceği birçok çalışmada rapor edilmekle birlikte PH'yla ilişkisi yönünde yapılan taramalarda yalnızca bir çalışmaya rastlanabilmiştir. Bu çalışmada, deneysel Parkinson modelinde VIP'in bozulan motor fonksiyonları geri getirdiği ve bu etkiyi mast hücreleri üzerinden yapmış olabileceği bildirilmektedir.

Vazoaktif intestinal peptid (VIP) MSS'de ve diğerk birçok dokuda nörotransmitter veya nöromodülatör olarak rol oynayan bir nöropeptid olarak karşımıza çıkmaktadır. VIP potansiyel bir anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-apoptotik ve nörotrofik moleköl özelliğindedir. Septik şok, romatoit artrit, iskemi-reperfüzyon gibi bazı inflamatuvar ve oksidatif hasarlarda sinir dokusu da dahil olmak üzere bir çok dokuda koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir. VIP ayrıca , çeşitli immün sistem hücreleri üzerinde modülatör etkiye sahiptir ve bunlar arasında mast hücreleri de yer alır. VIP 'in doku hasarına karşı koruyucu etkisini göstermesindeki bir yolağın da mast hücreleri üzerinden olabileceğı bazı çalışmalarda ileri sürölmektedir. Ayrıca, deneysel Parkinson modellerinde VIP'in PH'na karşı umut verici etkilerinden söz edilmektedir.

Daha önce yapılan bir çalışmada, sıçanlarda oluşturulan deneysel Parkinson modelinde VIP, nöron ölümünü azaltırken, corpus striatumda azalan dopamin düzeylerini artırmadan motor bozuklukları dramatik şekilde normale döndürmüştür. Aynı çalışmada, beyindeki mast hücreleri de histokimyasal ve elektron-mikroskopik olarak incelenmiştir. Elektron-mikroskopik verilerde, beyin mast hücrelerince salıverilen bir takım mediatörlerin, VIP'in iyileştirici etkisine olasılıkla aracılık ettiğı önerilmektedir. Ancak immünohistokimyasal bir işaretleme yapılmadığı için mast hücrelerinin olası mediatörleri ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca VIP uygulaması sonucu , corpus striatum'daki dopamin düzeylerinde bir artış görülmemekle birlikte motor fonksiyonlarda gözlenen çarpıcı düzelmedeki olası mekanizmaları aydınlatılabilmeye yönelik araştırmalara gereksinim bulunmaktadır.

Bu bağlamda sunulan tez çalışmasında, sıçanlarda oluşturulan deneysel Parkinson modelinde VIP 'in olası etki mekanizmalarına bir ölçüde açıklık getirmeye yönelik, aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir:

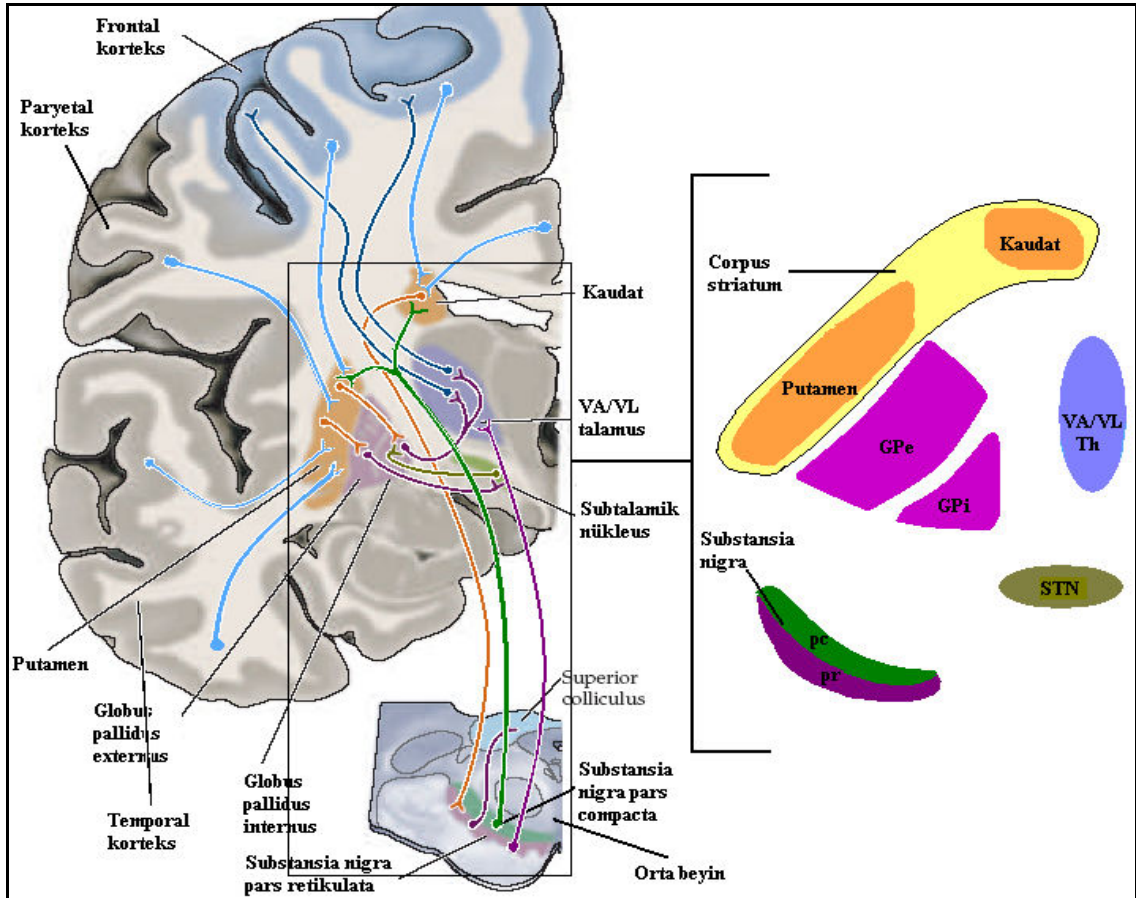
- 1) Beyin mast hücrelerinde; heparin, serotonin, NGF ve RMCP-II moleküllerinin immünohistokimyasal işaretleme yöntemi ile incelenmesi,
- 2) VIP'in dopamin metabolizmasını hızlandırıp hızlandırmadığını saptayabilmek için, corpus striatum'da dopaminle birlikte bir dopamin metaboliti olan 3,4-dihidroksifenil-asetikasit (DOPAC) ölçümü yaparak dopamin/DOPAC oranının belirlenmesi,

3) Nigrostriatal dopaminerjik sistemin, globus pallidus internus'dan talamusa gelen GABAerjik n6ronların aktivitesini düzenlemedeki 6nemi nedeniyle, VIP'in motor fonksiyonları iyileştirici etkisinde, talamusun ventral anterior (VATh) alanındaki GABA d6zeylerine bir etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BAZAL GANGLİYONLAR

Bazal gangliyonlar (BG) her iki beyin hemisferinin derinlerinde, talamusla komşuluğu bulunan kaudat nükleus, putamen ve globus pallidusun oluşturduğu üç nükleuslu bir yapıdır. Putamen ve kaudat nükleus, birlikte striatum adını alırken; putamen ve globus pallidus, birlikte lentiküler nükleus olarak adlandırılır. BG anatomik olarak bu üç nükleustan oluşmakla birlikte, fonksiyonel olarak çok sıkı bağlantıları olmaları nedeni bugün artık mezensefalonda bulunan substansia nigra ve subtalamik nükleuslarla birlikte ele alınıp beş nükleus olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.1) [78,120,137].



Şekil 2.1. Bazal gangliyonlar: lokalizasyonları, birbirleriyle bağlantıları, girdileri ve çıktıları (GPe: Globus pallidus externus, GPi: Globus pallidus internus, STN: Subtalamic nükleuslar, Th: Talamus)

BG'nin fonksiyonlarının ne olduğu bugün tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, BG hasarlarının belirgin motor fonksiyon hastalıklarına, bilişsel ve otonom bozukluklara neden olduğu günümüze kadar yapılan çalışmalarla görülmüştür. Özellikle motor fonksiyonlarla ilişkili işlevleri üzerine son derece yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda, ana görevi kontrol, ince ayar ve modülasyon olduğu düşünölen BG'nin bu işlevleri yerine getirebilmek için, kontrol ve ince ayarını yapacağı bölgelerden bilgi almak (afereant uyarılar) ve o bölgelere bilgi vermek (eferent uyarılar) durumundadır. BG'nin afereant girdilerinin büyük kısmı frontal korteksten (motor korteks, premotor alan, suplamanter motor alan, singulat korteks, dorso-lateral ve orbito-lateral frontal korteks) bir kısmı da pariyetal korteksten gelir. Bu afereant sinyallerin BG'lara giriş yaptığı tek bir kapı vardır, o da striatumdur [13,59,118,123]. BG'da işlem gören bilgilerin çıkış kapısı da globus pallidus internus (GPi) ve substantia nigra pars reticulata (SNpr) ile sınırlıdır. GPi çıktıları ise talamusun ventral anterior segmentine yapılmaktadır ve talamustan çıkan aksonlar motor korteksle bağlantı kurarak devreyi tamamlamaktadır. Serebral korteks ile BG arasındaki normal kapalı devreye ilave olarak striatumdan S. nigra'ya (SN), SN'dan da subtalamik nükleuslara ve buradan da globus pallidusa olmak üzere karşılıklı olarak nöronal devreler bulunmaktadır. Ancak, BG'ların eferent sinyallerinin büyük kısmı GPi üzerinden talamusa, küçük bir kısmı ise beyin sapındaki pedinkulopontin nükleusa giderler (Şekil 2.1) [13,118,123]. BG'nin motor işlevleriyle ilgili bilgiler, yapılan hayvan deneylerine ve bu yapıları tutan dejenerasyonların ortaya çıkardığı klinik semptomlara dayalı olarak elde edilmiştir. Ancak, önemli bir nokta da hayvan deneyleri sonuçlarının insanlara bire bir uygulanamayacağıdır. Bu durum büyük olasılıkla kısmen yapısal kısmen de işlevsel farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bütün bu bilgilerin ışığında BG'nin motor işlevleri: hareketlerin başlatılması ve planlanması, hareket hız ve büyüklüğünün ayarlanması, öğrenilmiş motor programların (yürüme, bisiklete binme gibi) otomatik olarak uygulanması, ardı sıra veya eş zamanlı hareketlerin uygulanması, kas tonusunun ayarlanması şeklinde özetlenebilir. BG ile ilgili hastalıklarda ortaya çıkan belirtiler bu işlevlerin değişik ağırlık ve dağılımda bozulması şeklindedir. BG'nin adı geçen fonksiyonları bir ölçekleme ve odaklama işlevi görerek gerçekleştirdiği

düşünülmektedir. Bu düşünceye göre, BG'dan talamusa iletilen sürekli inhibitör sinyallerle, hareketin hız ve büyüklüğünün skeloto-motor sistemin o anki durumuna ve amacına uygun olan sınırlar içinde kalması sağlanmakta, diğer bir ifadeyle ölçeklenmektedir. Hareketlerin ölçeklendirilmesi varsayımına ilave olarak, BG'ın korteks düzeyinde başlatılan hareketleri kolaylaştırarak, dolaylı yönden çelişen motor hareketleri baskıladığı düşünülmektedir [58,77,118,120,123, 137].

Yukarıda da söz edildiği gibi bazal gangliyon hasarları önemli motor fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. BG hasarları hareketleri hipokinetik ve hiperkinetik forma dönüştürmektedir. Hipokinetik hareketlerde harekete başlamada güçlük, hareketi gerçekleştirilmede yetersizlik vardır. Hiperkinetik durumlar ise kore, atetoz veya ballizim tipinde olmaktadır. Hareketlerin hipokinetik veya hiperkinetik olması bazal gangliyonların fonksiyonel olarak bağlı oldukları diğer nükleuslar, talamus ve korteks yapıları ile kurdukları nöronal devrelerdeki kimyasal ve elektriksel iletişimin yetersizliği ile ortaya çıkmaktadır. Bu devrelerin hangisinde hangi nörotransmitterlerin yetersizliğine bağlı olarak motor fonksiyon bozukluklarının ortaya çıktığı belli bazı durumlar için saptanabilmiş olsa da kat edilen mesafe ne yazık ki hala yetersizdir [10].

2.1.1. Bazal gangliyon devrelerinin kimyası:

SNpc —Dopamin→Striatum

Striatum —GABA→ SNpc

Striatum —GABA→ GPi

Striatum —GABA→ GPe

GPe —GABA→ Subtalamik Nükleuslar

Subtalamik Nükleuslar —Glutamat→ GPi

Korteksten —Glutamat + (?)

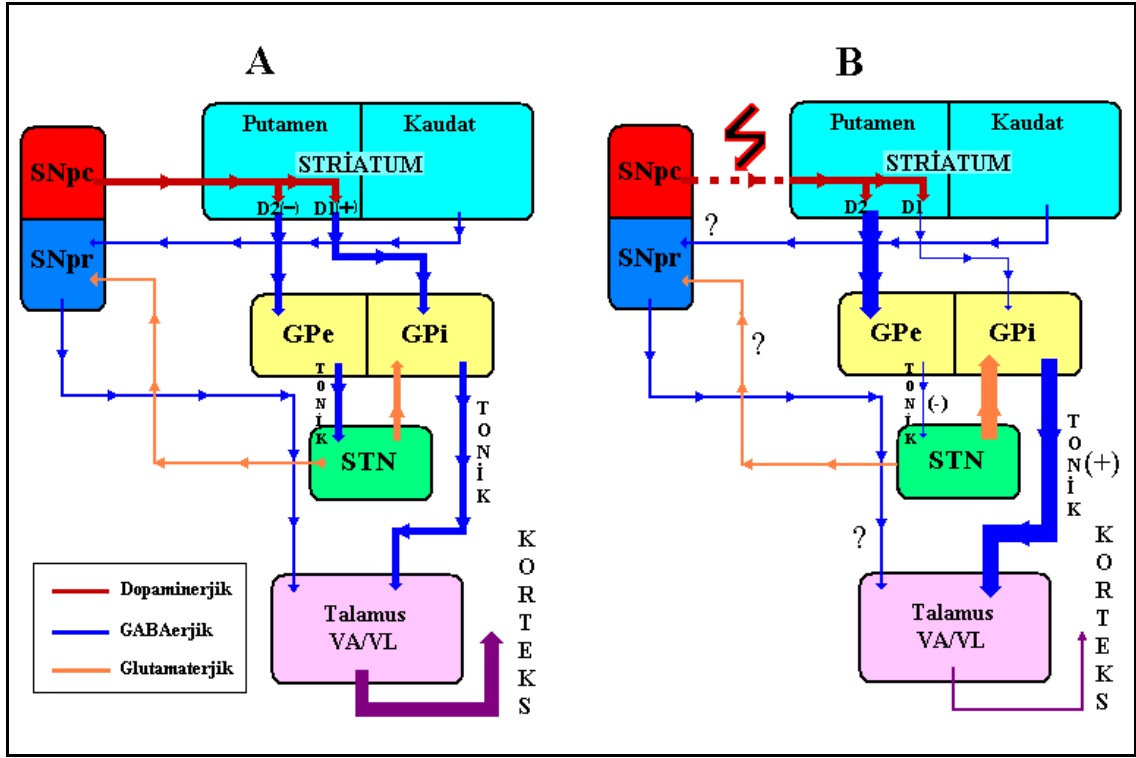
Striatum internöronları — Asetilkolin, GABA, VIP?

GPi —GABA→ Talamus

SNpr—GABA→ Talamus

Görüldüğü üzere gerek GPi gerekse SNpr'dan talamusa gelen nöronlar GABAerjik olup talamusun ventral anterior (VATH) nükleusu aracılığı ile kortekse bilgiyi iletmekte ve VATH bu çıktıyı denetlemektedir [58,86,120,143,158]. Kortekse

olan çıktıların düzenlenmesinde SN'dan striatuma gelen dopaminerjik nöronlar etkilerini D1 ve D2 reseptörleri üzerinden direkt ve indirekt olarak yaparlar [58,78,,92,123,138]. Direkt etki dopaminin D1 reseptörleriyle etkileşmesi sonucu gerçekleşir ve striatumdan GPi'a gelen GABAerjik nöronlar tarafından inhibe edilir. Böylece, GPi'dan VATH'a olan tonik GABAerjik deşarj inhibe edilmektedir. D2 reseptörleri aracılığı ile oluşan indirekt etki ise striatumdan GPe'a olan GABAerjik deşarjların inhibisyonu sonucunda GPe'un Subtalamik nükleuslar (STN)'a olan tonik inhibisyonunun engellenmesiyle oluşmaktadır. Böylelikle, STN'dan GPi'a olan glutamaterjik etki artmakta ve bunun sonucunda da GPi'dan VATH'a tonik GABAerjik etki artmaktadır. GPi'den talamusa olan çıkış bilgileri direkt yolla azaltılırken indirekt yolla artırılmaktadır [58,77,78,79,123,197]. Bu bağlamda dopamin GPi çıktıları için bir ayar molekülü gibi düşünülmektedir. Diğer bir ifadeyle, direkt yol aktif hale geldiğinde oluşan net etki BG'in çıkış sinyallerinin belirli bir kas grubu için azalmasıdır. Bu sinyaller nitelik itibarıyla baskılayıcı oldukları için azalmaları sonucunda talamus daha az inhibe olur ve kortekse talamustan giden uyarıcı etki artar. İndirekt yol aktif hale geldiğinde oluşan net etki BG'in çıkış sinyallerinin artması şeklindedir. Böylelikle talamus daha çok inhibe olur ve talamustan kortekse giden uyarıcı sinyaller azalır, kortekse bir negatif feed-back etki gider (Şekil 2.2.A) [58,115,120,123,197].



Şekil 2.2. A. Normal bazal gangliyon devresi; direkt (D_1) ve indirekt (D_2) yollar ile dengede, sonrasında kortekse giden normal inhibitör etki, B. Parkinson Hastalığındaki dopaminergic nörodejenerasyon sonrası bazal gangliyon devresi; azalmış direkt ve artmış indirekt etkiyle daha fazla pallidotalamik inhibitör etki, sonrasında kortekse olan inhibisyonun azalması (GPe: Globus pallidus externus, GPI: Globus pallidus internus, STN: Subtalamik nükleuslar, VA: Ventral-anterior talamus, VL: Ventro-lateral talamus, SNpc: Substantia nigra pars compacta, SNpr: Substantia nigra pars reticulata, ?: Ne şekilde etkilendiği bilinmiyor.)

Bazal gangliyonlardaki bu denge Parkinson ve Huntington gibi hastalıkların patolojisi için çok önemlidir. Parkinson hastalığında SNpc' dan striatuma uzanan dopaminergic etkinin nörodejenerasyon sonucu ortadan kalkması söz konusudur. Bu hasar gerek direkt gerekse indirekt yoldan GPI üzerindeki düzenleyici etkiyi bozmaktadır (Şekil 2.2.B). Parkinson hastalığının bu yolların kimyasını ne yönde bozduğuna dair yapılan kaynak taramalarında striatum dopamin düzeyleriyle ilgili çok sayıda kaynak mevcuttur. Striatum dopamin düzeyleri Parkinson hastalığında dopaminergic nöronal kayba bağlı olarak azalmaktadır [63,58,76]. Yine dopamin metaboliti olan DOPAC miktarlarıyla ilgili yapılan çalışmalarda da DOPAC miktarının da dopaminle paralel olarak düştüğü gözlenmiştir [76]. Bazal devrenin ana çıktısı olan VATH GABA düzeyleri ile ilgili kaynak bilgisine ulaşamadık. Sadece, dolaylı yoldan

bilgi verebilecek sınırlı sayıda kaynağa ulaşabildik. Dopaminerjik nöronlara karşı selektif bir nörotoksin olan 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) ile oluşturulan deneysel Parkinson modeli üzerinde yapılan bir çalışmada, globus pallidus GABA düzeyleri ölçülmüş ve kontrol grubuna göre Parkinsonlu grubun pallidal GABA düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı görülmüştür [76]. Aşırı mangan (Mn) ya da bileşiklerine maruziyet bir süre sonra “manganizm” olarak da adlandırılan motor/motor olmayan birçok bozukluğa yol açmakta ve bu semptomların çoğu Parkinson hastalığıyla örtüşmektedir [4,60]. Belirli bir süre aşırı dozlarda mangan sülfat ($MnSO_4$) inhalasyonuna maruz bırakılan maymunlarda mikrodializ yöntemi ile globus pallidus GABA düzeyleri ölçülmüş ve pallidal GABA düzeylerinin $MnSO_4$ doz düzeyleri ile doğru orantılı olarak anlamlı düzeyde düştüğü görülmüştür [168].

2.2. PAKINSON HASTALIĞI

Parkinson hastalığı (PH) ilk defa İngiliz bilim adamı James Parkinson'un 1817 yılında *The London Medical and Physical Journal* adlı dergide yayımlanan “Essay on the Shaking Palsy” başlıklı çalışmasında tanımlanmaktadır. Beyinde Substantia nigra'dan (pars compacta)(SNpc) corpus striatum'a (CS) uzanan dopaminerjik nöronların kaybına bağlı olarak gelişen nörodejeneratif bir hastalıktır (Şekil 2.2.B). Semptomatik olarak bradikinezi, tremor ve rijidite şeklindeki belirgin motor fonksiyon bozukluklarına ilaveten daha az belirgin olan bilişsel bozukluklar, depresyon, otonom ve uyku bozuklukları ile birlikte bazı duyuşsal kayıpların da gözlemlendiği bir klinik tablodur [26,43,65,44,122,192,193,199].

PH görülme sıklığı %0.2'ler civarında olup pre-klinik veya semptomların gözükmediği uzun bir periyot bulunmaktadır. PH'ndaki hücresel düzeyde ortaya çıkan patolojik değişiklikler SNpc'daki melanin içeren dopaminerjik hücrelerin kaybı, kalan hücrelerin içinde de Lewy cisimciği olarak adlandırılan, ağırlıklı olarak ubikütin denen bir protein içeren küresel inklüzyon cisimciklerinin saptanması şeklindedir [30]. Klinik belirtilerin ortaya çıkması için dopaminerjik hücre kaybının %70-80 seviyelerinde gerçekleşmesi ve striatal dopamin miktarının önemli ölçüde azalması gerekir. [17,192]. Klinik semptomlar yavaş yavaş ve çoğu zaman unilateral olarak gerçekleşir [139].

PH bir süreçtir ve bu süreç çoğu zaman yıllar alır. PH'nın neden veya nedenlerinin ne olduğu hala büyük oranda bilinmemekle birlikte kalıtsal veya idyopatik faktörlere bağlı olarak oluşabilir. Yapılan çalışmalarla PH oluşumuna neden olabilecek genetik faktörler dört farklı gendeki mutasyon/mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar, α -sinüklein, parkin, ubikütün C-terminal hidrolaz L1 ve DJ-1 genleridir. Ayrıca bu genlerle ilişkili olabileceği düşünülen on kadar gen lokusu da mevcuttur [15,97,133,145,154,]. İdyopatik parkinsonizmde nörodejenarasyonun nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte temelde; oksidatif stres, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, hücre içi kalsiyum ve demir homeostazisinin bozulması, inflamasyon, nitrik oksite (NO) aşırı maruziyet , apoptozis ve mikroglyal hücre aktivasyonu gibi faktörlerin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir [17,46,142,145,161,191]. Hastalık oluşumuyla ilgili ileri sürülen tüm faktörleri etkileyebilecek önemli bir etken de çevresel risk faktörlerdir. Çevresel risk faktörleri olarak pestisitler ve bazı metallere maruziyet, kuyu sularının içilmesi, kötü yaşam koşulları, bazı virüsler ve yaşlanmanın PH gelişiminde tetikleyici faktörler olabileceğine işaret edilmektedir [19,30,97,99,136,]. Bugün hakim olan görüş, hastalığın hem çevresel hem de genetik faktörlerin etkileşimi sonucu oluşabileceği yönündedir.

PH ile ilişkili olduğu düşünülen moleküler mekanizmalar:

Parkinson hastalığının oluşumuyla ilgili çeşitli moleküler mekanizmalar ileri sürülmüştür: Anormal protein üretim süreci, oksidatif stres, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, apoptoz, eksitotoksisite ve inflamasyon gibi nedenler PH'nda hücre ölümünü başlattığı düşünülen başlıca mekanizmalardır [97].

Ubikütün-proteozom sistemi (UPS) birçok hücrel proteinin degradasyonundan sorumludur. UPS ayrıca, yanlış eşleşmiş, mutant veya oksidatif hasara uğramış proteinlerin de degradasyonunu gerçekleştirir. Bu sistemde degradasyona uğrayacak hasarlı proteinler poliubikütün zinciriyle işaretlendikten sonra poliubikütün-substrat kompleksi proteazomlarda degradasyona uğratılır. Substratın işaretlenip proteazomlarda degrade edilmesiyle ilgili süreçte iş yapan önemli enzimler vardır (ubikütün aktive edici enzim: E₁, ubikütün konjugat enzimi: E₂, E₃ ligaz ve ubikütün karboksi-terminal hidrolaz L1: UCH-L1). E₃ ligaz enzimi hasarlı proteine bağlanıp poliubikütün zincirinin bağlanacağı yeri belirleyen yani substratı işaretleyen enzimdir. Bu enzim Parkin geninin

ürünüdür ve bu gendeki hasarın UPS ile hasarlı proteinlerin ortadan kaldırılmasını önlediği ve bu proteinlerin birikerek hücreyi ölüme götürdüğü düşünülmektedir [46,16,12,82,169]. Benzer mekanizmalar α -sinüklein ve UCH-L1 genleri içinde geçerlidir. Lewy cisimcikleri ailesel PH'nın en önemli patolojik göstergeleridir ve farklı proteinler, lipidler içeren bu agregatların majör komponenti α -sinüklein proteindir. α -sinüklein genindeki mutasyonlara bağlı olarak veya Parkin ve UCH-L1 ile ilgili olarak UPS'nin bozulmasına bağlı olarak bu proteinin biriktiği ve sonrasında nörodejenerasyona giden duruma yol açtığı düşünülmektedir. Parkin geni ile ilgili olan PH'da Lewy cisimciklerine rastlanmamış ve bu tipteki Parkinsonizme daha çok erken yaşlarda gelişen durumlarda rastlanmıştır [12,15,17,46,61,64,82,97,169,192].

PH patolojisinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun olası rolünü açıklayabilmek için MPTP ile oluşturulmuş Parkinsonlu modeller kullanılmıştır. Glial hücrelerce deaminizasyona uğrayan MPTP ürünü olan 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+) iyonunun dopaminerjik sinir terminalerince alınarak buralarda biriktiği; burada hem mitokondriyal solunumu bozan serbest radikallerin oluşumunu tetiklediği hem de mitokondriyal elektron transport sistemi enzimi olan Kompleks-I'i inhibe edip enerji metabolizmasını engelliyerek nöronu ölüme götürdüğü bildirilmiştir. Parkinson hastası insanların beyinde SN'ya spesifik kompleks-I defekti çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Ayrıca, kronik olarak bazı pestisitlere (rotenon, paraquat gibi) maruz kalmanın da yine kompleks-I üzerinden nigral nöronlarda ölüme neden olduğu da bilinmektedir [15,46,67].

Deneysel veya normal Parkinson hastaları üzerinde yapılan bazı çalışmalar hastaların nigral ve striatal alanlarında artmış demir ve reaktif oksijen radikalleri olduğu bildirmektedir. Bu çalışmalar oksidatif stresin PH patolojisine karışıyor olabileceğine dair göstergelerdir [15,46,145,191,169]. İnflamasyon nedenli nörodejenerasyonun ise artmış mikrogliyal aktivasyon üzerinden olabileceği ileri sürülmektedir [23,24,54,97,107].

Programlanmış hücre ölümü apoptozla ilişkili olduğu düşünülen pro-apoptotik genlerin artmış ekspresyonuyla PH arasında bir ilişki olabileceği de bildirilmiştir. Apoptozla ilişkilendirilen bazı enzimlerin Parkinson hastalarının ve deneysel modellerin beyinlerinde yapılan çalışmalarla artmış aktiviteleri gözlenmiş ve apoptozun

da nörodejenerasyonda bir mekanizma olabileceği bildirilmiştir [15,46,74,97,103,161,174].

Tüm bu gözlemlerin önemi hala kesin değildir, özellikle apoptozun PH'ndaki rolünü net şekilde destekleyen bir çalışma yoktur. Bu olası mekanizmanın açıklığa kavuşturulması ilave araştırmaları gerektirmektedir .

2.2.1. Parkinson Hastalığının Tedavisi

Günümüze kadar hastalığa karşı geliştirilen ilaçlar ve büyüme faktörleri ile tedavi, cerrahi yöntemler ve nöron implantasyonu gibi farklı birçok yöntem nörodejenerasyonun ilerleyişini geri çevirememiş yalnızca semptomatik etkilerine karşı sınırlı seviyede başarı sağlayabilmiştir [106,142].

Nigrostriatal dopaminerjik fonksiyonun kaybı PH patofizyolojisinin temeli olduğundan dopaminerjik fonksiyonu yerine koyabilme özelliği ilaçla tedavide esas hedeftir. Levodopa bu amaçla kullanılan hala en yaygın maddedir. Hastalarda kaybolan bazı fonksiyonları bir süre daha geri getirebiliyor olması bu maddenin tedavide tutulur olmasının en önemli nedenidir [130]. Dopamin agonistlerinin teorik olarak faydaları dejenere olmuş dopaminerjik sinir terminallerinden bağımsız olarak dopaminerjik reseptörleri uyarmak ve böylelikle diskinezi gibi durumları ortadan kaldırarak hastalardaki yaşam kalitesini daha da uzatmaktır [45,74,97,152]. Ancak, levodopa ve benzer dopamin agonistlerinin kullanımı beraberinde halüsinasyon, periferik ödem, uyku hali gibi yan etkileri getirmekle kalmayıp hastalığın ilerleyişini durduramadıklarından ve bir süre sonra yetersiz kaldıklarından dolayı yalnızca geçici birer çözüm olmaktan öteye gidememektedirler [97,145,152].

PH'nın tedavisi alanında levodopanın plazma düzeylerindeki kararlılığın muhafaza edilmesi yaklaşımına bağlı olarak dopamin metabolizması inhibitörleri de bu amaçla üzerinde durulan tedavi yöntemlerindedir. İki önemli enzim olan monoaminoksidaz (MAO) ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) da dopaminin katabolizması işlevini gerçekleştirirler. Bu maddelerin inhibe edilmesi dopaminin yarı ömrünü uzatacağından bu amaca uygun ilaçlar denenmiştir [193]. Bu tip ajanlar genellikle dopamin agonistleriyle kombine olarak kullanılmaktadır. Böylelikle bir

taraftan dopamin eksikliği yerine konmaya çalışılırken diğer taraftan mevcut dopaminin devamlılığını sağlamak amaçlanmaktadır. Ancak, bu tip yaklaşımlar da nörodejenerasyonun devamlılığına bağlı olarak zamanla etkisini yitirmektedir. Ayrıca dopamin agonistleri gibi bu inhibitör ajanlar da genellikle artmış plazma levodopa seviyelerine bağlı olarak gelişen artmış diskinezi ve nöro-psikiyatrik riskleri içerir. Ayrıca, bu maddelerin karaciğer gibi bazı organlara karşı aşırı toksik etkileri de bildirilmiştir [162].

Nöroprotektif ajanlar ise diğer farmakolojik yaklaşımlara göre daha umut verici sonuçlar vermişlerdir. Bu yaklaşımlar PH'ndaki nörodejenerasyonu durdurmak, yavaşlatmak veya tersine döndürmek üzerine yoğunlaşmıştır [97,162]. Dopaminerjik nöronlardaki glutamat aracılı eksitotoksik hücre hasarına karşı N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonistleriyle koruma sağlandığı Parkinsonlu hayvan modellerinde *in vitro* olarak gösterilmiştir. Yapılan bir çalışma zayıf bir NMDA antagonisti olan amantadinin nöroprotektif etkisinin olabileceğini ileri sürmüştür [97]. Bir pestisid olan rotenon, PH'yla ilgili olarak mitokondriyal kompleks-1'i inhibe eder. Geçmiş yıllarda biyoenerjetik ajan olan koenzimQ₁₀ ile yapılan bir çalışma göstermiştir ki, bu maddenin dozu belli bir düzeyin üzerinde verildiğinde klinik olarak rotenonun etkisine karşı gelişme sağlamıştır. Ancak, bu sonucu destekleyici çalışmalar sınırlı kalmıştır [46,97,162]. Glial nörotrofik faktör (GDNF)'ün dopaminerjik nöronları toksinlere karşı koruduğu ve nöronların dopaminerjik fonksiyonunu geri getirdiği MPTP lezyonlu primatlarda *in vitro* olarak gösterilmiştir. İnsan Parkinson vakasında intraventriküler GDNF ile yapılan bir çalışmada ise herhangi bir iyileşme görülmemiştir; bunun bir nedeni de GDNF'nin kan-beyin bariyerini geçemeyişi olarak bildirilmiştir. MPTP lezyonlu primatlarda yapılan bir başka çalışmada ise, GDNF striatuma lenti-virüs vektörü kullanılarak ulaştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır [97]. Endojen bir peptit olan vazoaktif intestinal peptit (VIP)'in de belli dozlarda verildiğinde nöroprotektif etki gösterebileceğine dair umut verici çalışmalar mevcuttur. Gerek *in vivo*, gerekse *in vitro* yapılan deneysel çalışmalarda VIP'in bazı pestisit ve nörotoksinlere karşı nörodejenerasyonu önlediği bildirilse de tedavi edici bir ajan olarak kullanılması yolunda ilave araştırmaların yapılması gerekmektedir [67,188].

2.2.2. Deneysel Parkinson Modelleri

PH için geliştirilmiş ve hastalığın insandaki durumunu anlamamıza olanak sağlayan birçok model mevcuttur. Bu modeller fare, sıçan, kedi, insan dışındaki primatlar ve hatta Drosophila'ya kadar çok geniş tür seçeneklerinde geliştirilmiştir ve oluşturulma teknikleri şu başlıklar altında sınıflandırılabilir:

- Cerrahi lezyon oluşturulması
- Transgenik hayvan geliştirilmesi
- Farmakolojik ajanların uygulanması
- Nörotoksinlerin uygulanması

Bu modellerin çoğu insan koşullarının davranışsal, anatomik veya hastalığın ilerleyişi ile ilgili özelliklerini birebir tanımlamasa da hastalığın mekanizmasının anlaşılabilmesi ve tedavisinin geliştirilebilmesi yönünden bir çok değerli katkılar sağlamıştır.

PH için birincil patolojik ve biyokimyasal özellikler nigrostriatal dopaminerjik nöronların kaybı, intrasellüler Lewy cisimciklerinin görülmesi ve striatum dopamin seviyesinin düşüşüdür. Klinik özellikler dopamin düşüşünün %80'lere varması ile ortaya çıkar. Bu nedenlerden dolayı, insan şartlarının modellenmesinde nigrostriatal sistemin hasara uğraması ve devamında striatum dopamin düzeyinin düşmesi anahtar özelliklerdir. Bu maksada uygun olarak da hayvan modelleri oluşturulurken cerrahi işlemler, farmakolojik veya nörotoksik ajanlar aracılığıyla ile insana analog anatomik bölgelerin bozulması amaçlanır [129].

Günümüzde PH ile ilgili çalışmalarda model oluşturulmak amacıyla en sık kullanılan ajanlar nörotoksinlerdir. 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ve 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP) gibi seçici özellikteki nörotoksinler rodentlere uygulandıktan bir müddet sonra nigrostriatal yolakta akut dopaminerjik nöron hasarı gerçekleşmektedir [15,21].

2.2.2.1. 6-Hidroksidopamin

6-OHDA kan beyin bariyerini geçemez. Bundan dolayı, beyinde toksisite oluşturabilmek için direkt yolla stereotaksik cerrahi ile beyne uygulanması gereklidir [91]. Sıçanlarda yüksek dozda bilateral olarak Substantia nigra veya lateral hipotalamusa 6-OHDA uygulanması katelepsi, inaktivite, afazi ve yüksek derecede morbidite ve mortaliteye neden olur. Unilateral olarak uygulanması sonucu ise minimal operasyon sonrası morbidite, davranışsal asimetri ve lezyon oluşturulmayan bölge tarafından kontrolün sağlandığı görülür [15,91,129]. 6-OHDA uygulanmasında modifiye bir yöntem ise striatal bölgeye kronik düşük doz uygulamasıdır. Bu uygulama insan şartlarıyla çok yakın olan ilerleyici dopaminerjik nöron ölümüne neden olur. Diğer nörotoksinlerle benzer şekilde (MPTP, metamfetamin, rotenon) 6-OHDA uygulanması da uygulanan madde miktarı, hedef bölge, rodent psikolojisi, cinsiyet ve yaş gibi birçok parametreye bağlı olarak değişik oranlarda lezyona neden olur. Örneğin, dişi sıçanların erkeklere oranla nörotoksositeye daha dayanıklı oldukları görülmüştür ve bunun nedeninin ise östrojenin nöroprotektif etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bir başka çalışmada ise deneysel model oluşturmada ortam sıcaklığının önemli olduğu, soğuk ortam şartlarında modelin oluşmayabileceği bildirilmiştir [3,91,129].

Unilateral lezyon modeliyle ilişkili bir davranış özelliği de spontane olarak veya dopamin iletimini etkileyici rol oynayan ajanlarla tetiklenen rotasyonel harekettir. Bu motor özellik, lezyonlu ve lezyonsuz bölgeler arasındaki dopaminerjik iletim açısından asimetriye bağlı olarak gerçekleşen bir durumdur. Hayvanlar spesifik biçimde motor aktivitenin daha fazla olduğu tarafa bağlı olarak dönüş gerçekleştirirler. Bu, lezyonlu bölgeye bağlı olarak ipsilateral veya kontralateral yön olarak gerçekleşir. Spontane rotasyon hareketi ipsilateral (lezyonlu bölgeye doğru) gerçekleşirken, farmakolojik tetiklemeli rotasyon kontralateral ya da ipsilateral olabilir [91]. Örneğin, apomorfın ve diğer dopamin agonistleri (amfetamin gibi) kontralateral (lezyonlu bölgenin tersine) rotasyonu tetiklerler. Bu, apomorfının lezyonlu bölgedeki süper-duyarlı dopaminerjik nöronlardaki aktivitesine bağlıdır. Bunun tersine, d-amfetamin fenil izo-propilamin (AMPH) lezyon oluşturulmayan alandaki dopamin geri alınımı bloke edip dopamin reseptör aktivitesini de artırarak ipsilateral rotasyonu tetikler. Rotasyon hareketinin gözlenebilmesi için dopamin miktarının striatumda %80 den daha fazla azalması

gereklidir. Rotasyon davranışı bu iş için özel tasarlanmış “rotasyonmetre”ler aracılığı ile gözlemlenebilir. Hayvanlarda rotasyon davranışına ilave davranışlar da görülebilir. Bunlar şu şekillerde test edilebilir: ön uzuv kullanımı, bilateral uzuv uyarımı, sıkma ve reaksiyon zamanı. Dopaminerjik sistem için geliştirilen yeni ilaçların farmakolojik rolü, motor komplikasyonların mekanizması, nigrostriatal hasara cevap olarak bazal gangliyonlardaki nöroplastisite ile nöronal transplantasyonun etkisi ve güvenilirliği gibi PH tedavisi için günümüzde üzerinde ısrarla durulan konuların araştırılmasında 6-OHDA lezyonlu sıçan modeli çok değerli bir malzemedir [129].

2.3. MAST HÜCRELERİ

Granüllü mast hücreleri (MH) ilk defa 1879 yılında Paul Ehrlich tarafından tanımlanmış ve adlandırılmıştır. Kemik iliğindeki CD34(+) hematopoetik kök hücrelerden köken alırlar, fakat kemik iliğini terk etmeden olgunlaşmaz ve dolaşıma progenitör hücreler olarak girerler. Periferik dokulara ulaşmaya kadar periferik kanda dolaşır, vaskülarize dokulara gider, mikro çevresel faktörlerin etkisi altında fenotipik ve işlevsel olarak olgun mast hücrelerine farklılaşırlar [47,75,88]. MH kan dolaşımına sahip tüm türlerde mevcut olan filogenetik olarak eski hücrelerdir. Bağdokularda özellikle mukozal yüzeylerde kan ve lenf damarları ile periferik sinirlere yakın yerleşimli olarak yer alırlar. Bu stratejik yerleşimlerinden ötürü, allerjenler ve mikroorganizmalar gibi çevresel uyarılara maruz kalırlar, dakikalar veya saatler sonrasında daha önceden hazırlanmış veya yeni sentezlenmiş mediatörlerini salgılayabilirler. Bugün MH ve içerdikleri çok sayıdaki mediatörlerin doğal ve kazanılmış immünite, enfeksiyonlar, alerji, bazı kardiyovasküler ve nörolojik hastalıkların yanı sıra, yara iyileşmesi, fibrozis, anjiyogenezis ve otoimmün hastalıklarda da rolleri oldukları da düşünülmektedir [47].

MH granüllerinde 20'den fazla maddeyi sentezleyip depo edebilirler. MH'nin mediyatörleri başlıca iki grup altında genellenebilir: 1) MH'inde uygun uyarılar sonucu sentezlenip granüllerde daha önceden depolanan çeşitli biyoaktif moleküller (kemotaktik maddeler, sitokinler, heparin, histamin, kininler, proteazlar ve peptitler), 2) IgE, antijen veya diğer uyarılardan sonra sentezlenip derhal serbest bırakılan moleküller

(de novo sentezlenen) (lökotrinler, prostaglandinler, platelet aktive edici faktör,... gibi) kısa ömürlü moleküller. MH ayrıca nitrik oksit (NO) ve vazoaaktif intestinal peptit (VİP) gibi çeşitli fizyolojik etkileri olan maddeleri de salgılar[29,176]. Bunlara ilaveten MH bir çok biyojenik amini alma, depolama ve salgılama özelliğine de sahiptirler [11,47,116,176,]. MH'nin granüllerindeki mediatörlerinin büyük bir kısmını histamin ve serotonin oluşturur. İnsanda bu yalnızca histamin iken rodentler de serotonin ile birlikte bulunur. Bunun yanında heparin ve kondriatin sülfat proteoglikanları da bulunur. Nötral proteazların (kimaz, triptaz, karboksipeptidaz-A gibi) miktarları ve tipleri türlere ve farklı mast hücre popülasyonlarına göre değişir. Aktive olan MH membranlarında bulunan öncül maddelerden lipit mediatörleri sentezlerler. Duruma göre değişen bu mediatörlerin bugün bilinenleri araşidonik asit türevleri, prostaglandin D₂, tromboksanlar, lökotrienler ve trombosit aktive edici faktör (PAF)'lerdir. Mast hücreleri fenotipine ve uyarıya göre çeşitli sitokinler ve kemokinler de sentezlerler (interlökün-1, 3, 4, 6, 9, 10, 13, TNF- α v.b.) ve bunlardan bazıları otokrin etkiye de sahiptirler [47,57,178].

MH granül içeriklerini farklı yollarla salgılayabilir. Bunlardan biri klasik ekzositoz dediğimiz yoldur. MH'nin bariz bir degranülasyon olmaksızın mediatör salgılayabilmeleri ise son yıllarda anlaşılan bir durumdur. Alerjik reaksiyonların aksine, otoimmün ve inflamatuvar olaylar sırasında MH 'nin degranüle oldukları nadiren görülmüştür. Elektron mikroskopik düzeyde yapılan çalışmalar, belirgin bir degranülasyon olmaksızın, mast hücresi granüllerinin elektron yoğun yapısında değişiklikler olduğunu göstermiştir. Bu değişiklikler degranülasyon olmaksızın bazı maddelerin salındığını düşündürmüştür. Bu olay çeşitli araştırmacılarca "piecemeal degranülasyon" veya "intragranüler aktivasyon" olarak adlandırılmıştır. Bu tür bir aktivasyon MH'nin bazı mediatörleri seçerek salgılayabilme yeteneğini gösterir. Örneğin, bu yönde yapılan araştırmalardan birinde IL-1'in MH'ni uyararak , degranülasyon olmaksızın IL-6 salgılanmasına neden olduğu bildirilmektedir [47,57]. Yine yakın zamanlarda bulunan olası bir yol ise transgranülasyondur. Wilhelm ve ark., kuğularda yaptıkları bir çalışmada, MH'nin granüllerinin nöronlarca alındığı elektron-mikroskopik olarak gösterilmiştir [195]. Mast hücre aktivasyonu bir çok faktöre bağlı olarak gerçekleşebilir. Bazı nöropeptitler (P maddesi, somatostatin, nörotensin v.b.), temel bileşikler (48/80 bileşiği, polymyxin B v.b.), kompleman anaflatoksinleri (C3a,

C4a, C5a), sitokinler IL-1, IL3, granülosit-makrofaj stimüle edici faktör (GM-CSF)) ile ilaçlar gibi immünolojik olmayan uyarılar da MH'ni aktive edebilirler [11,57].

2.3.1. Mast Hücre Heterojenitesi

Mast hücreleri, uygun koşullarda metakromazi gösteren intrasitoplazmik granüllere sahip bağdoku hücreleridir. Mast hücreleri bağdoku içerisinde özellikle kan damarları ile ilişkili olarak küçük gruplar halinde bulunurlar. Farklı yerleşim gösteren mast hücreleri farklı histokimyasal, sitokimyasal, ultrasütrüktürel ve fonksiyonel özelliklere de sahiptirler. Memeli mast hücreleri ve bazofillerin bir çok sitokimyasal ve fonksiyonel özellikleri benzer olmasına karşın birbirinin aynı hücreler değildir. Mast hücreleri orijinleri, yerleşim yerleri, kullanılan tespit solüsyonuna verilen cevap, taşıdığı glikozaminoglikanlarının türü, intragranüler serin proteinazın türü, histokimyasal farklılıklar, fonksiyonel kriterler ve hücrelerin morfolojik özellikleri gibi unsurlar göz önüne alındığında, bağdoku mast hücresi (connective tissue mast cell - CTMC) ve mukozal mast hücresi (mucosal mast cell - MMC) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Mast hücre popülasyonları arasındaki heterojenitenin tanımlanmasında Enerback'ın sıçan bağırsaklarında tanımladığı adlandırma yaygın olarak kullanılmaktadır. Mukozalarda, özellikle de sindirim ve solunum sistemi mukozalarında bulunan mast hücreleri, diğer bölgelerde bulunan mast hücrelerinden daha küçük ve daha az granül içermektedirler. Bu bölgelerde bulunan mast hücreleri “atipik ya da mukozal mast hücresi (MMC)” olarak adlandırılmaktadır. Diğer yandan deride, damar yakınlarında ve organ serozalarında yerleşen ve daha iri hücreler ise “tipik ya da bağdoku mast hücresi (CTMC)” olarak isimlendirilmektedir [53,70,153,170,176].

CTMC'lerine spesifik proteoglikan molekülü heparindir. MMC 'lerinde bulunan proteoglikan molekülü ise kondroitin sülfattır. Bu iki molekülün alcian blue-safranin boyalarına verdikleri reaksiyon farklıdır. Işık mikroskopik incelemelerde CTMC'leri içerdikleri heparine bağlı olarak safranin ile kırmızı boyanmaları ile ayırt edilirken, MMC'leri içerdikleri kondroitin sülfata bağlı olarak alcian blue ile mavi boyanmaktadırlar [126,170,176].

MH'ndeki bir başka durum ise bu iki tip mast hücresinin proteaz içeriklerinin

farklı oluşudur. Sıçanlarda bu farklılık mast hücre popülasyonlarının taşıdıkları intrasitoplazmik granüller biyokimyasal olarak incelendiğinde, sıçan mast hücrelerinin iki farklı kimotripsin benzeri mast hücre proteinazını içerdiği görülmektedir. Bunlar sıçan mast hücresi proteinaz I (RMCP I) ve sıçan mast hücresi proteinazı II (RMCP II) olarak adlandırılmaktadır. CTMC'yi sıçan proteaz I (RMCP I) , MMC'yi ise sıçan proteaz II (RMCP II) olarak tanımlanan proteaz molekülünü içermektedir. Proteaz moleküllerinin immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi tekniği ile mast hücrelerinin alt tip ayrımları yapılabilmektedir [75,88,100,113,128,153].

MH-Nöron etkileşimi anatomik ve moleküler düzeyde çeşitli hayvanlarda bulunmuş ve bu durumun fonksiyonel olarak nörojenik inflamasyon sürecinde, MH aracılıklı vazodilatasyonda, lökosit infiltrasyonunda ve proteaz aracılı doku hasarı gibi daha birçok durumda iş gördüğü düşünülmektedir [90,94,171,172]. Merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunan MH beyin mast hücreleri olarak ele alınmıştır ve bunlar diğer iki tipin dışında özellikler sergilerler. Beyinde bulunan mast hücreleri histolojik boyanma özellikleri açısından CTMC'lerine, ultrasüruktürel yapıları ve madde salgılama özellikleri yönünden ise MMC'lere benzerler [11]. Bu nedenle beyin mast hücreleri bazı araştırmacılar tarafından mast hücrelerinin üçüncü bir alt tipi olarak da kabul edilmektedir [11,147,176,179].

2.3.2. Mast hücrelerin fonksiyonları

Mast hücrelerin en iyi bilinen fonksiyonu IgE aracılı alerjik reaksiyonlara katılmasıdır. Anjiogenez ve yara iyileşmesi gibi olaylarda da rollerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca stres koşullarında mast hücrelerin aktive olarak degranülasyona uğradıkları ve granüler içerikleriyle farklı kaskatlara karıştıkları yine yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [170,179,187,190].

Mast hücrelerinin salgıladıkları proteoglikanlar, biyojenik aminler, NGF gibi büyüme faktörleri ve sitokinler ile beyinde; sinir iletimi, nöron ve glia hücrelerinin gelişimi ve yaşamlarının devamında önemli roller üstlenebildiği ileri sürülmektedir

[11,14,90,176,179]. Beyin mast hücrelerinin östrus siklusu, davranış, vasküler baş ağrısı ve multipl skleroz (MS) gibi çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik durumlarla ilişkili olabileceği birçok çalışmada bildirilmiştir [8,102,177,188]. Özellikle stres tarafından tetiklenebilen migrende serebral vazodilatasyon kaynaklı olduğu düşünülen bir baş ağrısı söz konusudur. MH'nin sahip oldukları çeşitli vazodilatör ajanlar ile bu sürece katıldığı düşünülmektedir. Dura mater MH'lerinin aktivasyonunun bloke edilmesiyle gerçekleştirilen bir çalışmada migrenin önlendiği görülmüştür [176]. Yine, MS'da erken fazda kan beyin bariyeri (BBB)'ndeki geçirgenlik artışı ve ileri fazda demiyelinasyonla sonuçlanan bir patoloji söz konusudur. MS hastalarının serbrospinal sıvılarında MH'nin granüler içeriğinde barındırdığı bir enzim olan triptazın arttığı gözlemlenmiştir. Bazı MH mediatörlerinin (özellikle histamin) BBB'nin geçirgenliğini etkileyerek vasküler geçirgenliği artırarak inflamatuvar hücrelerin ve enfekte ajanların penetrasyonunu sağlayarak MS patolojisine neden olabileceği yönünde çalışmalar vardır [176]. Beyindeki MH popülasyonunun ve aktivasyonunun da farklı fizyolojik ve davranışsal koşullarda değiştiği ve bu duruma bağlı olarak da MH'nin bazı durumlardaki davranışlar üzerinde etkili olabileceği yapılan çalışmalarla ileri sürülmüştür [159]. MH'nin beyinde en yoğun olduğu bölgelerden biri de bazal gangliyonların kortekse çıkış noktası olan talamustur [41,42,94,95,153,172]. Parkinson hastalığı üzerine yapılan bir çalışmada, deneysel bir rodent modelinde, VIP'in motor fonksiyonları geri getirdiği ve nöronların korunduğundan söz edilmiş; bu duruma beyin MH'nin aracılık edebileceği ileri sürülmüştür [188]. MH'nin nöroprotektif moleküller içeriyor olması ve bu moleküllerin farklı mekanizmalarla PH patolojisinin önüne geçmiş olması çalışmanın dayandığı temel nedenlerdir.

2.4. VAZOAKTİF İNTESTİNAL PEPTİT (VIP)

Vazoaktif intestinal peptit (VIP) ile ilgili ilk bilgi yaklaşık 40 yıl önce Said ve Mutt'un akciğer hasarlı hastalardaki sistemik hipotansiyon üzerine yaptıkları araştırmada vazodilatör etkisiyle rapor edilmiş ve hemen ardından yaptıkları çalışmayla domuz ince bağırsağından VIP'i izole edip tanımlamışlardır [53,149]. Daha sonra birçok organ ve dokuda yaygın olarak bulunduğu; sistemik vazodilatasyon, artmış

kardiak-output, bronkodilatasyon, hiperglisemi, düz kas gevşemesi, büyümenin düzenlenmesi, hormonal regülasyon, analjezi, hipertermi, öğrenme ve davranışta nörotrofik etki, kemik metabolizması ve gastrointestinal sistemin ve gastrik motilitenin sekretuar süreçleri gibi birçok biyolojik olaya karıştığı gösterilmiştir [35,55,62,71,85,101,134,141,155]. VIP, 28 amino asit dizisine sahiptir ve diğer gastrointestinal sistem hormonlarıyla (sekretin, glukagon, gastrik inhibitör peptid (GİP), büyüme hormonu serbestleştirici hormon (GHRH), PACAP,...gibi) yapısal olarak benzerdir. Tanımlanabilen iki reseptör alt tipine sahiptir: VPAC₁ ve VPAC₂ [38,98]. VIP reseptörleri ve VIP içeren nöronlar merkezi ve periferik sinir sisteminde de yaygın olarak bulunur [38,98,114,141,165].

Bugünkü bilgiler ışığında ise VIP potansiyel bir anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-apoptotik ve nörotrofik molekül olarak karşımıza çıkmaktadır [1,8,20,51,135,185]. Septik şok [141,181], hemorajik şok [180], romatoid artrit [71,84,85], iskemi-reperfüzyon gibi bazı inflamatuvar ve oksidatif hasarlarda [87,150,184] sinir dokusu da dahil olmak üzere bir çok dokuda koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir. VIP merkezi sinir sisteminde astrosit mitozu [110] ve sinir hücrelerindeki gelişmeyi uyarma [5], nöronal yaşamın devamı [131,175], eksitotoksik glutamat toksisitesine karşı koruma [18,156] ve erken dönemde embriyonik gelişmeyi düzenleme [69] gibi etkileriyle bir nöromodülatör, nörotransmitter, nöroprotektif bir ajan olarak iş görebilmektedir [5,33,104,131,151,175].

VIP'in nöroprotektif bir ajan olarak kullanıldığı *in vivo* ve *in vitro* olarak önemli çalışmalar yapılmıştır [5,33,104,131,151,175]. Ayrıca VIP'in kan-beyin bariyeri (KBB)'ni transmembran difüzyon sistemi ile geçebiliyor olması nörodejeneratif hastalıklarda tedavi edici ajan olarak kullanılmasının avantajlarından biridir [40]. Mekanizması tam olarak aydınlatılamamış ve çoklu faktörlere bağlı gibi görünen Parkinson hastalığındaki nörodejenerasyonda VIP'in koruyucu etkileri olduğunu gösteren çalışma sayısı sınırlıdır. Offen ve ark. [124], nöronal kültürde yaptıkları çalışmada nörotoksin olan 6-OHDA ve MPTP metaboliti MPP⁺'ye maruziyette VIP'in 6-OHDA'ya karşı koruma sağladığı ancak MPP⁺ de aynı etkiyi gösteremediği rapor edilmiştir. Delgado ve ark, ise sistemik ve lokal MPTP uygulamasıyla oluşturdukları fare Parkinson modelinde VIP'in nöroprotektif etkisini göstermiş ve bu etkiyi mikroglyal aktivasyonu inhibe ederek gerçekleştirdiğini ileri sürmüşlerdir [34].

Mikroglial aktivasyonun VIP ile inhibisyonu sonucu nöronal korunmanın gösterildiği başka bir çalışmada ise VIP Alzheimer hastalığına karşı denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır [36]. VIP aynı zamanda mikroglialara benzer hücreler olan mast hücreleri üzerinde de modülatör etkiye sahiptir. VIP'in mast hücreleri üzerindeki modülatör etkisinin fenotipleri, degranülasyon özellikleri ve granül içerikleri üzerinden olabileceği bazı çalışmalarla ileri sürülmektedir [20,181,187]. Tuncel ve ark.'nın [188] yaptığı bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan deneysel Parkinson modellerinde VIP, nöron ölümünü azaltırken, corpus striatumda azalan dopamin düzeylerini artırmadığı halde sıçanlardaki motor bozuklukları dramatik şekilde normale döndürmüştür. Aynı çalışmada, beyindeki mast hücreleri de histokimyasal ve elektron-mikroskopik olarak incelenmiştir. Elektron-mikroskopik verilerde, beyin mast hücrelerinin salgıladığı bir takım mediatörlerin, olasılıkla VIP'in iyileştirici etkisine aracılık ettiğine dair bir önerme bulunmaktadır. Ancak immünohistokimyasal bir işaretleme yapılmadığı için mast hücrelerinin olası mediatörleri ile ilgili bilgi sadece düşünce bazında tartışılmıştır.

Bu bağlamda sunulan tez çalışmasında, sıçanlarda oluşturulan deneysel Parkinson modelinde VIP 'in olası etki mekanizmalarına bir ölçüde açıklık getirmeye yönelik, aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir:

- 1) Beyin mast hücrelerinde; heparin, serotonin, NGF ve RMCP-II moleküllerinin immünohistokimyasal işaretleme yöntemi ile incelenmesi,
- 2) VIP'in dopamin metabolizmasını hızlandırıp hızlandırmadığını saptayabilmek için, corpus striatum'da dopaminle birlikte bir dopamin metaboliti olan 3,4-dihidroksifenil-asetikasit (DOPAC) ölçümü yaparak dopamin/DOPAC oranının belirlenmesi,
- 3) Nigrostriatal dopaminerjik sistemin, globus pallidus internus'dan talamusa gelen GABAerjik nöronların aktivitesini düzenlemedeki önemi nedeniyle, VIP'in motor fonksiyonları iyileştirici etkisinde, talamusun ventral anterior (VATH) alanındaki GABA düzeylerine bir etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

CaCl ₂	: Merck, Almanya
KCl	: Merck, Almanya
NaCl	: Riedel-de Haën, Almanya
Etanol	: Tekel, Türkiye
NaH ₂ PO ₄	: Sigma, A.B.D.
Metanol	: Merck, Almanya
GABA	: Acros Organics, Belçika
DOPAC	: Acros Organics, Belçika
Dopamin	: Sigma, A.B.D.
Üretan	: Sigma, A.B.D.
Ketamin	: Bayer, Almanya
Ksilazin	: Bayer, Almanya
Paraformaldehit	: Merck, Almanya
Glutaraldehit	: Merck, Almanya
PBS	: Santa Cruz, İspanya
ACN	: Merck, Almanya
6-OHDA	: Sigma, A.B.D.
Askorbik asit	: Merck, Almanya
Anti-Mouse IgG-TRIT C	: Sigma, A.B.D.
Atto 550 goat anti-rabbit IgG	: Sigma, A.B.D.
Anti NGF	: Luici Aloe'den bağış, Roma, İtalya
Anti-Serotonin 5-HT	: Sigma, A.B.D.
ExtrAvidin-FIT C Conjugate	: Sigma, A.B.D.
RMCP II Culture Supernatent	: Moredun, İskoçya
Apomorfin	: Sigma, A.B.D.
EDTA	: Sigma, A.B.D.
VİP	: Sigma, A.B.D.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik No-Frost, Türkiye
Hassas terazi	: E12140, Ohaus, İsviçre
Perfüzyon pompası	: KD Scientific, Amerika
Mikrodiyaliz pompası	: CMA 102, CMA Co., İsveç
Mikrodiyaliz probu	: CMA 12(PAES Memb.), CMA Co., İsveç
Diyalizat toplayıcı	: CMA 170, CMA Co., İsveç
Stereotaksimetric tabla	: Kopf 5600, David Kopf Ins., A.B.D.
Vorteks	: NM110, Nuvemix, Türkiye
Floresans mikroskop	: Olympus, Japonya
HPLC cihazı	: LC 10AT, Shimadzu, Japonya
HPLC cihazı	: Agilent 1100, GL Sciences Inc, Almanya
HPLC dedektörü (Florimetrik)	: RF-10A XL, Shimadzu, Japonya
HPLC dedektörü (Elektrokimyasal)	: CLC 100, Chromsystems, Almanya
HPLC kolonu	: C18-Luna, Phenomenex, A.B.D.
HPLC pompası	: LCV-10AL, Shimadzu, Japonya
HPLC data programı	: Class LC10A, Shimadzu, Japonya
Derin dondurucu	: Heraeus, Almanya
Isıtıcı ped	: CMA 150, CMA Co., İsveç
Rotasyonmetrik sistem	: Rota Count 8(PC based), Col., Inst.A.B.D.
Beyin Blokeri	: Kopf PA-001, David Kopf Inst., A.B.D.
İstatistik programı	: Graph-Pad Software, A.B.D.

3.2. Yöntem

Çalışmada her iki cinsiyetten toplam 36 adet, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyotlarda büyütülmüş, 200-250 gr ağırlığında, genç yetişkin sıçan (Sprague Dawley) kullanıldı. Hayvanlar 6 gruba ayrıldı:

Grup 1(n=16): Kontrol grubu, intrastriatal alana askorbik asit(0.3%) ,i.p serum fizyolojik (SF)(0.9%NaCl) enjekte edilen grup (bu grup ikiye bölünüp yarısında dopamin/DOPAC ölçümü, diğer yarısında GABA ölçümü ve thalamusta immünohistokimyasal işlemler gerçekleştirildi).

Grup 2(n=16): İntrastriatal alana 6-OHDA enjekte edilen, i.p. SF verilen grup (bu grup ikiye bölünüp yarısında dopamin/DOPAC ölçümü, diğer yarısında GABA ölçümü ve thalamusta immünohistokimyasal işlemler gerçekleştirildi).

Grup 3(n=16): İntrastriatal alana 6-OHDA enjekte edilen, i.p. VİP verilen (25 ng/kg) grup (bu grup ikiye bölünüp yarısında dopamin/DOPAC ölçümü, diğer yarısında GABA ölçümü ve thalamusta immünohistokimyasal işlemler gerçekleştirildi)

3.2.1. Deneysel Parkinson modeli oluşturulması

Kullanılacak çözeltilerin hazırlanması: Parkinson modeli oluşturulacak sıçanlarda kullanılmak üzere (2. ve 3. gruplar) 6-OHDA hidroklorit % 0.9'luk NaCl çözeltisi (Serum fizyolojik (SF)) içerisinde çözülmüş % 0.3'lük askorbik asit çözeltisi içerisinde 12µg/sıçan olacak şekilde hazırlandı. Kontrol grupları (1. grup) için ise SF içerisinde çözülmüş % 0.3'lük askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Mikrodiyaliz işleminde perfüzyon sıvısı olarak yapay beyin-omurilik sıvısı (BOS) (Ringer) hazırlandı (148 mM NaCl, 1.4 mM CaCl₂, 4.0 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.2 mM Na₂HPO₄, 0.3 mM NaH₂PO₄).

Striatumda Lezyon oluşturulması: Lezyon oluşturma aşamasından önce sıçanlar ketamin (75 mg/kg i.m.) + xylazine, (38 mg/kg i.m.) kombinasyonu ile anestezi altına alındı. Yeterli anestezi derinliğine ulaşan sıçanlarda lezyon oluşturma aşamasına geçildi. Bu işlem sırasında stereotaksimetric sistem yardımıyla sıçan beyinde Corpus striatuma girilip (Stereotaksimetric koordinatlar striatum için: Anterior-Posterior (AP):1.60; Lateral (L):2.6; Vertikal (V):5.1, Bregmaya göre, Watson-Paxinos sıçan beyni atlası kullanıldı [117]) Hamilton mikroenjeksiyon enjektörü aracılığı ile Sham grupları için 2µL askorbik asit çözeltisi, Parkinson modeli oluşturulacak gruplar için 2µL 6-OHDA çözeltisi enjekte edildi. Enjektörün CS'a yerleştirilmesi dokuya daha az zarar vermek için yavaşça 2 dk.'lık bir sürede, 6-OHDA ve askorbik asit enjeksiyonu verilen maddelerin emiliminin daha iyi sağlanması için 3 dk.'lık sürede, enjektörün

çıkarılması bu esnadaki vakumlama etkisinin önüne geçmek için 2dk.'lık sürede gerçekleştirilmiştir. Çözeltiler enjekte edildikten sonra enjektör iğnesi çıkarılmadan önce 3 dk. CS'da bekletildi. Sıçanların vücut ısıları operasyon sırasında rektal termometre ve ısıtıcı ped aracılığı ile sıçanların vücut ısıları sabit tutuldu ($37\pm 0.5\text{ C}^\circ$). *In vivo* işlemler hayvanlardaki gün içi ritim değişiklikleri göz önünde bulundurularak her sıçan için günün aynı saatlerine denk getirilerek yapıldı. Operasyon sonrası kafatası üzerindeki kesi steril koşullarda dikkatlice dikilip, sıçanlar özel koşullarda farklı kafeslerde bakıma alındı. İlk işlemden 1 saat sonra sıçanlara i.p. olarak 3. gruplar için VIP çözeltisi (25 ng/kg, SF içerisinde), 1. ve 2. gruplar için ise aynı miktarda yalnızca SF enjekte edildi. Daha sonra VIP ve SF verilme işlemi 2 günde bir 14 gün süreyle tekrarlandı.

3.2.2. Rotasyonmetrik ölçüm

Sıçanlarda striatuma 6-OHDA ve SF enjekte edilmesinden sonraki 14. günde, SF içerisinde çözülen 0.05 mg/kg apomorfın intraperitoneal olarak enjekte edildi. Apomorfın enjeksiyonundan 10 dk. sonra bilgisayar destekli rotasyonmetri cihazına bağlanarak motor fonksiyonları 90 dk. süresince kaydedildi. Rotasyonmetrik veriler: saat yönü (CW), saat yönünün tersine (CCW), yarı saat yönüne (PCW) ve yarı saat yönünün tersine (PCCW) dönümler şeklinde kaydedildi. Hesaplamalar saat yönünün tersine olan dönümlerden saat yönüne olan dönümler çıkarılarak yapıldı. Negatif değerler sıfır olarak değerlendirildi.

3.2.3. Mikrodiyaliz

Rotasyonmetrik ölçümden 1 gün sonra, sıçanlar üretan anestezisi (1.5 g/kg i.p.) altında stereotaksimetri cihazına yerleştirilerek mikrodiyaliz işlemine alındı. 1., 3. ve 5. gruplarda dopamin ve DOPAC ölçümü için Corpus striatum'dan (Stereotaksimetrik koordinatlar: AP:1.60; L:2.6; V:5.1, Bregmaya göre, Watson-Paxinos sıçan beyni atlası kullanılarak [117]) mikrodiyaliz numuneleri toplanırken, 2., 4. ve 6. Gruplarda GABA

ölçümleri için Ventral-anterior talamus'tan (Stereotaksimetric koordinatlar AP:-2.12 ;L:1.4 ; V:6.2, Bregmaya göre [117]) mikrodiyaliz numuneleri toplanmıştır. Mikrodiyaliz işlemi için CMA/12 PAES membranlı (20.000 dalton maksimum por çapı, 3 mm membran uzunluğu, 1mm membran çapı) problar kullanıldı. Prop ilgili alana yerleştirildikten sonra prob içerisinden perfüzyon pompası aracılığıyla yapay BOS çözeltisi ile perfüzyona başlandı (Dopamin-DOPAC numuneleri için 2µL/dk, GABA numuneleri için 1µL/dk hızda perfüze edildi). İlk 90 dk. boyunca toplanan mikrodiyaliz numuneleri atıldı, sonraki 80 dk. boyunca mikrodiyaliz numuneleri (2-4 numune halinde) ölçüm için ayrıldı. Mikrodiyaliz numunesi toplama işi soğutuculu oto-diyalizat toplayıcı ile +4 derecede kapaklı polipropilen tüplere yapıldı ve toplanan numuneler -70 ° C 'de saklandı.

3.2.4. Ekstrasellüler Dopamin, DOPAC ve GABA düzeylerinin ölçümü

Kullanılan cihazlar:

Deneyler otomatik enjektör sistemli Agilent 1100 (Agilent, GL Sciences Inc, Waldbronn, Germany) ve kuaterner LC pompalı (G1311A) model HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Sinyaller CLC 100 (Electrochemical Detector Chromsystems, Almanya) model elektrokimyasal detektör ile kaydedilmiştir.

Bütün çözeltilerdeki çözünmüş gazlar Sonorex (Bandelin, Berlin, Almanya) marka ultrasonik banyo kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Çözeltilerin pH'sı, Hanna 301 model pH/İyon metre ve Hanna HI 1131 model kombine cam elektrot (Sarmeola di Rubano, İtalya) kullanılarak ölçülmüştür.

Ayrırma işlemlerinde Luna model C18 (150 mm, 3 mm ID, 3 µm partikül çapı) Phenomenex, kolon kullanılmıştır.

Kullanılan kimyasallar:

3,4- dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) ve 3-hydroxytyramine HCl (Dopamin HCl); NaH₂PO₄.2H₂O, 1-Heptan sülfonik asit sodyum tuzu, Na₂EDTA, metanol Merck (Darmstadt, Almanya); Gama-amino bütirik asit, 4-aminobütirik acid (GABA) Acros Organics (New Jersey, NY, USA); NaH₂PO₄.2H₂O, boraks (Na₂B₄O₇.10H₂O), 4-amino 3 hidroksi benzoik asit, asetonitril Merck Firması (Darmstad, Almanya), fluorescamine Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmalarından satın alınmıştır. Kullanılan kimyasalların tümü analitik saflıktadır.

Çalışmalarda Milli-Q distile su aletinden elde edilen su kullanılmıştır. Tüm çözeltiler bu su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.4.1. Dopamin–DOPAC analizinde yapılan işlemler

Hareketli fazın hazırlanışı

Tampon: 0,075 M NaH₂PO₄.2H₂O, 0,006 M 1-Heptan sülfonik asit sodyum tuzu ve 0,00015 M Na₂EDTA olacak şekilde 300 mL tampon çözeltisi hazırlanmıştır.

A: Yukarıdaki şekilde hazırlanan 300 mL tampon çözeltiliye 168,8 mL metanol eklenerek (toplam 468,8 mL çözelti) bu çözeltiliden 300 mL alınarak üzerine 450 mL (100/250 oranında) su ilave edilerek dopamin-DOPAC tayininde bu A çözeltisi kullanılmıştır.

B: metanol: su (70:100; V:V) çözeltisi.

Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

9,4 mg-standart dopamin ve DOPAC tartılarak 100 mL 0,1 M HClO₄ çözeltisi içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra dopamin ve DOPAC miktarları son derişimleri 44,3 ve 53,2 ng/mL olacak şekilde stok çözeltiliden gerekli seyrelmeler yapılmıştır.

Bu çözeltilerin hazırlanması sırasında içerisinde parçacık bulunmaması için çözeltiler süzölmüş ve içindeki çözönmüş gazlar uzaklaştırılmıştır.

HPLC koşulları:

Dopamin-DOPAC tayini için çalışmalar elektrokimyasal detektörü ile +0,600 V ve hareketli faz olarak A: B (v:v) [(0. dk B: 0; 5. dk B: 100; 13. dk B: 100; 18. dk B: 0; 20. dk B: 0)] karışımı kullanılarak 0,5 mL/dk akış hızında gradient program kullanarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin kolona verilmesi 10 µL hacimde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2. GABA analizinde yapılan işlemler

Hareketli fazın hazırlanışı

Başlangıçta 100 mM NaH₂PO₄.2H₂O stok tampon çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiden gerekli seyrelme yapılarak 20 mM'lık NaH₂PO₄.2H₂O pH: 2,5 (A mobil fazı) hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 2,5'e pH metre kullanılarak ayarlanmıştır.

Türevleme çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti için, 0,9534 g Na₂B₄O₇.10H₂O (boraks) tartılmış, suda çözülerek 25 mL 100 mM çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltinin pH'ı 9 olacak şekilde gerekli miktarda NaOH ve HCl çözeltileri katılarak pH metre kullanılarak ayarlanmıştır.

Türev ajanı olarak 2 mg fluorescamine 1 mL asetonitrilde çözülerek çözelti günlük olarak hazırlandıktan sonra, kullanımına kadar karanlıkta saklanmıştır. B çalışmada IS olarak 4-amino 3 hidroksi benzoik asit kullanılmıştır.

GABA çözeltisi için 10 mg GABA tartılarak 10 mL'ye su ile seyreltilerek 1 mg. mL⁻¹ 'lik çözelti elde edilmiştir.

HPLC koşulları:

Çalışmalar floresans detektörü ile $\lambda_{ex}=390$ nm ve $\lambda_{em}=475$ nm dalga boylarında ve mobil faz olarak **A:** 20 mM NaH₂PO₄.2H₂O pH: 2,5 **B:** asetonitril karışımı kullanılarak 0,6 mL/dk akış hızında gradiyent olarak gerçekleştirilmiştir. Gradiyent program 0,1. dk B: 22; 20. dk B: 75; 25. dk B: 75; 27. dk B: 22; 35. dk B: 22 şeklindedir. Örneklerin C18 kolona enjeksiyonu 5 µL hacimde gerçekleştirilmiştir.

Standart ve örneğin HPLC ye verilışı (Türevlendirme)

Türevlendirme; 15 µL örnek + 15 µL pH 9 borat tamponu + 15 µL fluorescamine (2mg/mL asetonitril de hazırlanmış) + 15 µl IS (4-amino 3 hidroksi benzoik asit)+ 40 µl ACN seyrelmesi kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5. Histolojik incelemeler için yapılan işlemler

3.2.5.1. Perfüzyon fiksasyonu ve doku takibi

Mikrodiyaliz işleminden sonra prob beyinden çıkarılıp, sıçan stereotaksimetric düzenekten alındıktan sonra bir küvetin içerisine sırt üstü yatırılıp ekstremitelerinden bantla sabitlendi. Anestezi derinliği kontrol edilip ksiphoid kıkırdaktan itibaren göğüs kafesi dikkatlice açıldı. Bu işlem sırasında göğüs kafesi içerisindeki organlara zarar vermemeye dikkat edildi. Kalbin etrafındaki dokular uzaklaştırılıp kalp yeterince açığa çıkarıldı. Peristaltik bir pompaya bağlı olan intra-cat kateter kalbin sol ventrikülüne yerleştirildi. Kalbin sağ atriumuna kesi atılarak perfüzyon sıvısının çıkmasına olanak sağlayacak yol açıldı. Bu işlemden sonra perfüzyon işlemine başlandı.

Perfüzyon işlemi için 37,5 C°'de fosfat tamponu ve fiksatif (%4 Paraformaldehit + % 1 Gulutaraldehit) çözeltileri kullanıldı. Tampon çözelti vücuttaki kan boşalınca kadar (1-2 dk.) verildi. Fiksatif çözelti ise tüm vücut istenen sertliğe ulaşınca kadar (80-100 mL) uygulandı. Fiksasyonun hemen ardından sıçanın baş kısmı vücuttan ayrılarak kafatası içerisindeki beyin dokusu bir bütün olarak dikkatlice çıkarıldı. Blokere yerleştirilen beyin dokusundan bir jilet yardımıyla striatal ve talamik bölgelerine 2mm'lik dilimler halinde kesilerek yine fiksatif çözeltiliye alındı. Fiksatif içerisinde 1 gün bekletildikten sonra tampon çözeltisi içerisinde yıkayıp yine aynı çözeltiye alınıp doku takibi işlemine kadar bu solüsyonda bekletildi. Doku takibi işlemi tampon çözeltide 1 gün bekletildikten sonra gerçekleştirildi ve dokular parafin bloklara gömülene kadar standart doku takibi prosedürü uygulandı.

3.2.5.2. İmmünohistokimyasal işlemler

Parafin bloklardan mikrotom ile 5µm'lik kesitler alınıp poli-L-lisinli lamalar üzerine konuldu. Aynı sıçan dokusunda farklı işaretlemeler için seri kesitler kullanıldı. İmmünohistokimyasal işaretlemeler için şu yöntemler kullanıldı:

3.2.5.2.1. RMCP II işaretleme yöntemi

- Deparafinizasyon işlemi:
- Ksilol 2x10 dk
- % 95 alkol 1x5 dk
- % 70 alkol 1x5 dk
- % 30 alkol 1x3 dk
- Distile su 1x3 dk
- % 10 Goat Serum İçeren Pbs'de 30dk tutuldu.
- Serumun fazlası atıldı
- PBS 2X5 dk. bekletildi
- Primer antikör (RMCP II) preparatta 1 saat bekletildi

Primer antikordan toplam 300 µL RMCP II stok madde her bir ependorf tüpüne 30 µL olacak şekilde 10 parçaya paylaştırıldı . 1/100 oranında primer antikör elde etmek için 30µL 'lik ependurf tüpü 3mL 'ye tamamlandı.

- PBS 2X5 dk bekletildi
- Sekonder antikör preparatta 45 dk bekletildi

Keçiden elde edilmiş Anti Mouse IgG (TRITC) Sekonder antiköründen toplam 1 mL stok madde her bir ependorf tüpüne 50 µL olacak şekilde paylaştırıldı . 1/100 oranında sekonder antikör elde etmek için 50 µL ependorf tüpünü 5mL tamamlandı.

PDF Eraser Free

- PBS 2X5 dk bekletildi
- Kapatma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5.2.2. NGF işaretleme yöntemi

- Deparafinizasyon işlemi:
- Ksilol 2x10 dk
- % 95 alkol 1x5 dk
- % 70 alkol 1x5 dk
- % 30 alkol 1x3 dk
- Distile su 1x3 dk
- % 10 Goat Serum İçeren PBS'de 30dk tutuldu.
- Serumun fazlası atıldı
- PBS 2X5 dk . bekletildi
- Primer antikör (tavşandan elde edilmiş NGF) preparatta 1saat bekletildi

Primer antikordan toplam 1 mg katı halde NGF var. Bu 1mL distile su yada PBS'de çözüldü . 1/100 oranında primer antikör elde etmek için çözüldüden 30µL alındı ve 3mL'ye tamamlandı.

- PBS 2X5 dk bekletildi
- Sekonder antikör (Anti tavşan IgG Atto 550) preparatta 45 dk bekletildi

Sekonder antikörün toplam 1 mL stok çözeltisi. 1/100 oranında sekonder antikör elde etmek için 50 µL alınıp 5mL tamamlandı.

- PBS 2X5 dk bekletildi
- Kapatma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5.2.3. Serotonin işaretleme yöntemi

- Deparafinizasyon işlemi:
- Ksilol 2x10 dk
- % 95 alkol 1x5 dk
- % 70 alkol 1x5 dk
- % 30 alkol 1x3 dk
- Distile su 1x3 dk
- % 10 Goat Serum İçeren Pbs'de 30dk Tutuldu.
- Serumun fazlası atıldı
- PBS 2X5 dk . bekletildi
- Primer antikör (Anti-serotonin (5-hydroxytrptamine) 5-HT) preparatta 1 saat bekletildi

Primer antikordan toplam 2mL stok çözeltisi 1/100 oranında da primer antikör elde etmek için 10µL 'lik primer antikör 10mL 'ye PBS ile tamamlandı.

- PBS 2X5 dk
- Sekonder antikör 45 dk keçiden üretilmiş Anti tavşan IgG Atto 550

Sekonder antikordan toplam 1 mL mevcuttur. 1/100 oranında sekonder antikör elde etmek için 100 µl al 10mL tamamla elde ettiğimiz sekonder antikör 1/100 oranında olur .

- PBS 2X5 dk
- Kapatma işlemi gerçekleştirildi

3.2.5.2.4 Heparin işaretleme yöntemi

Tekli bir boyama yöntemi (Direkt yöntem)

- Deparafinizasyon işlemi:
- Ksilol 2x10 dk
- % 95 alkol 1x5 dk
- % 70 alkol 1x5dk
- % 30 alkol 1x3dk
- Distile su 1x3 dk
- % 10 Goat Serum İçeren PBS'de 30dk Tutuldu.
- Serumun fazlası atıldı
- Primer antikor (ExtrAvidin-FitC Conjugate) preparatta 2 saat bekletilir

Primer antikordan 10 µL alınıp 10 mL PBS'ye ilave edilerek 1/100 oranında dilüe edildi.

- PBS 2X5 dk bekletildi
- Kapatma işlem gerçekleştirildi

Tüm işaretlemelerin hemen ardından floresans maddelerin solma ihtimaline karşı floresans mikroskop altında histolojik inceleme gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Rotasyonmetrik verilere ANOVA testi uygulanıp sonrasında gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis testiyle karşılaştırılmıştır. Dopamin, DOPAC, GABA sonuçlarına ANOVA testi uygulanıp, gruplar arası farklılıklar Dunnet's multiple range test ile karşılaştırılmıştır. İmmünohistokimyasal işaretleme verileri Random bloc design (ANOVA) ile değerlendirilip, gruplar arası farklılıklar Tukey's multiple comparisons

PDF Eraser Free

testi ile karşılaştırılmıştır. Tüm sonuçlar ortalama değerler \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Rotasyonmetrik veriler

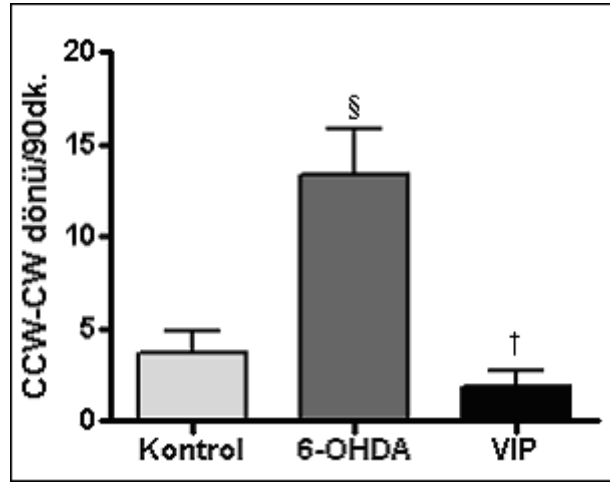
Ön protokol işleminden sonraki 14. günde apomorfın enjeksiyonunu takiben kaydedilen rotasyonmetri verileri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Rotasyonmetrik ölçüm sonuçları

	Kontrol (n=16)	6-OHDA (n=16)	VIP (n=16)
CCW-CW dönümler (dönü/90dk.)	3,62±1,18	13,38±2,51 ^a	1,81±0,91 ^b

a: Kontrol grubundan 6-OHDA grubunun farkı (P<0,01)

b: Kontrol grubundan VIP’li grubun farkı (P>0,05)



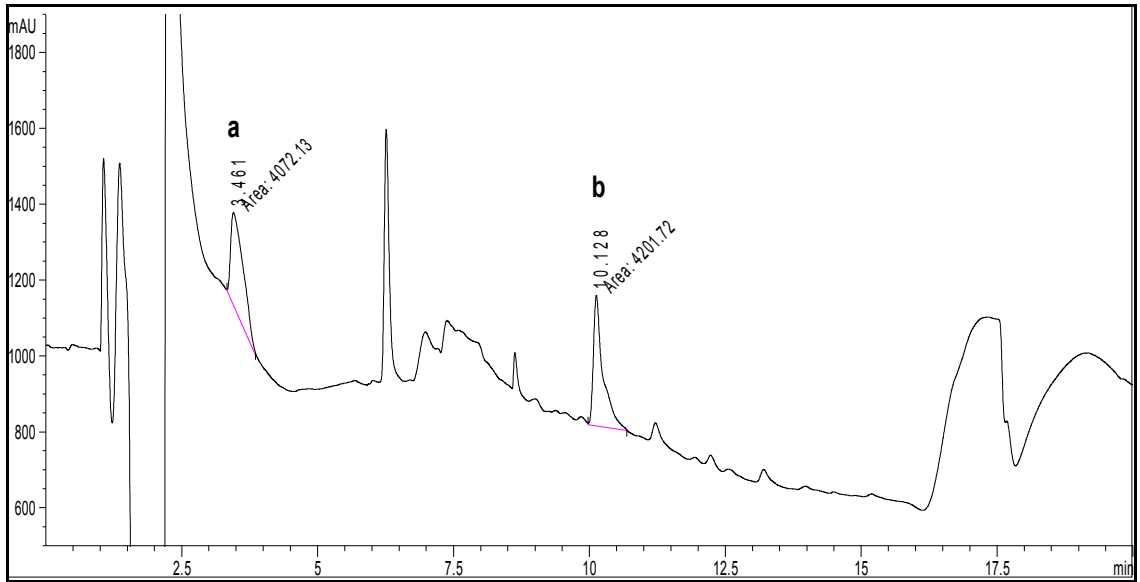
Şekil 4.1. Rotasyonmetrik verilerin bar grafik görüntüsü (§: P < 0,01, †: P > 0,05, Kruskal-Wallis test)

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi 14. günde apomorfın uygulanmasından sonra rotasyonmetri testinde Parkinson grubunun CCW-CW dönümlerinin Kontrol grubuna göre (P<0,01) ve VIP grubuna göre (P<0,001) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu ve VIP’li grup arasında ise istatistiksel olarak bir

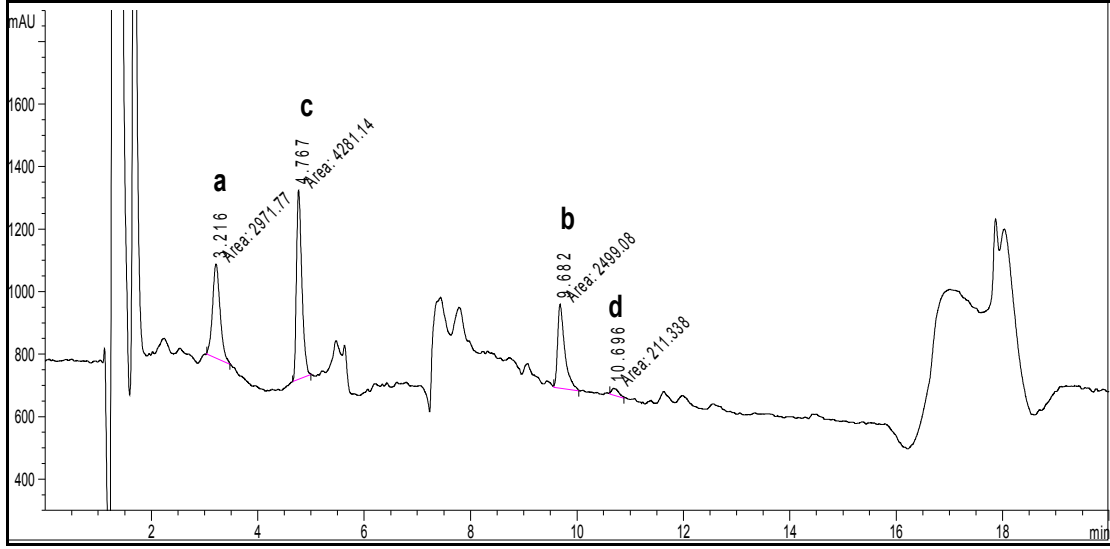
fark bulunmamaktadır. VIP ile tedavi motor yanıtlarda görülen anomaliyi geriye döndürmüştür.

4.2. Mikrodiyaliz örneklerinde HPLC ölçümleri

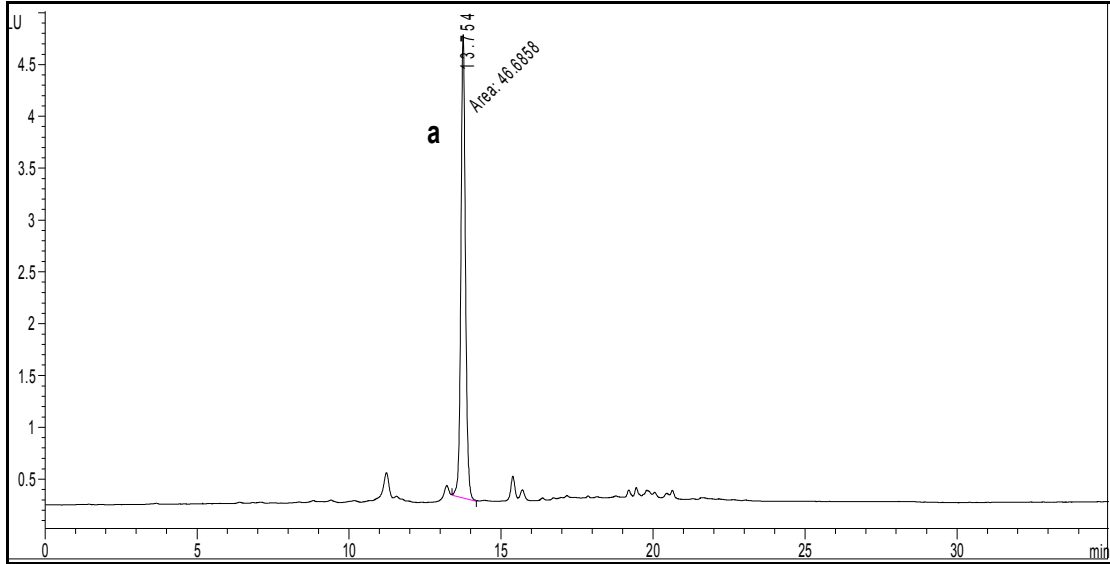
Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5'te Dopamin, DOPAC ve GABA mikrodiyaliz numuneleri ve standart numunelerinin HPLC analiziyle elde edilen örnek kromatogramları gösterilmiştir.



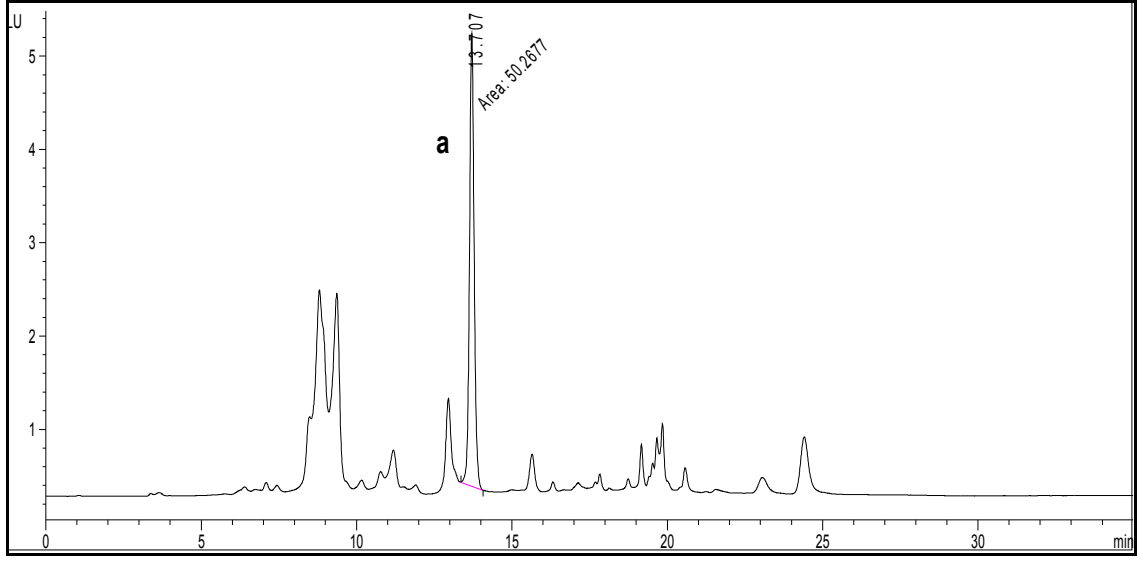
Şekil 4.2. Dopamin-DOPAC standart numunelerinin HPLC analiz kromatogramı; a:DOPAC, b: Dopamin.



Şekil 4.3. Dopamin-DOPAC ölçümü yapılmış örnek bir mikrodiyaliz numunesinin HPLC analiz kromatogramı; a:DOPAC, b: Dopamin, c,d: İnternal standart.



Şekil 4.4. GABA standart numunelerinin HPLC analiz kromatogramı; a:GABA.



Şekil 4.5. GABA ölçümü yapılmış örnek bir mikrodiyaliz numunesinin HPLC analiz kromatogramı; a:GABA.

4.2.1. Striatal dopamin düzeyleri

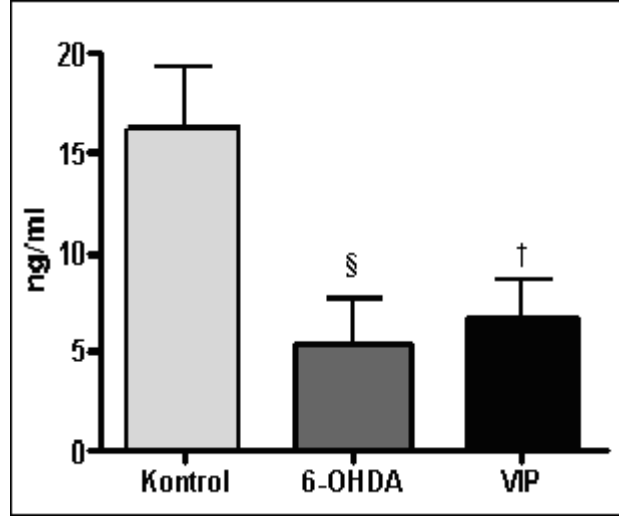
Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6 Corpus striatumdan elde edilen mikrodiyalizatlardaki dopamin düzeylerini göstermektedir.

Çizelge 4.2. Striatal dopamin ölçümü sonuçları

	Kontrol (n=8)	6-OHDA (n=8)	VIP (n=8)
Striatum dopamin düzeyleri (ng/ml)	16,32±2,95	5,38±2,23 ^a	6,67±1,91 ^b

a: Kontrol grubundan 6-OHDA grubunun farkı (P < 0,05)

b: Kontrol grubundan VIP'li grubun farkı (P < 0,05)



Şekil 4.6. Striatum dopamin düzeyi sonuçları (§: $P < 0,05$, †: $P < 0,05$, ANOVA test).

Şekil 4.6’de görüldüğü gibi, deneysel olarak Parkinson oluşturulmuş sıçanların mikrodiyalizatlarındaki dopamin düzeyleri kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($P < 0,05$). VİP ile tedavi edilen grubun dopamin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır.

4.2.2. Striatal DOPAC düzeyleri

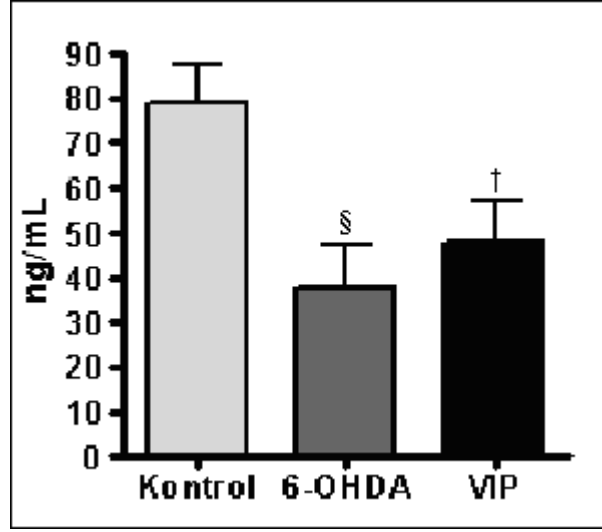
Çizelge 4.3 ve Şekil 4.7 Corpus striatumdan elde edilen mikrodiyalizatlardaki DOPAC düzeylerini göstermektedir.

Çizelge 4.3. Striatal DOPAC ölçümü sonuçları

	Kontrol (n=8)	6-OHDA (n=8)	VIP (n=8)
Striatum DOPAC düzeyleri (ng/ml)	79,32±8,11	37,72±9,56 ^a	48,03±8,97 ^b

a: Kontrol grubundan 6-OHDA grubunun farkı ($P < 0.01$)

b: Kontrol grubundan VIP’li grubun farkı ($P < 0.05$)



Şekil 4.7. Striatum DOPAC sonuçları (§: $P < 0,01$, †: $P < 0,05$, ANOVA test)

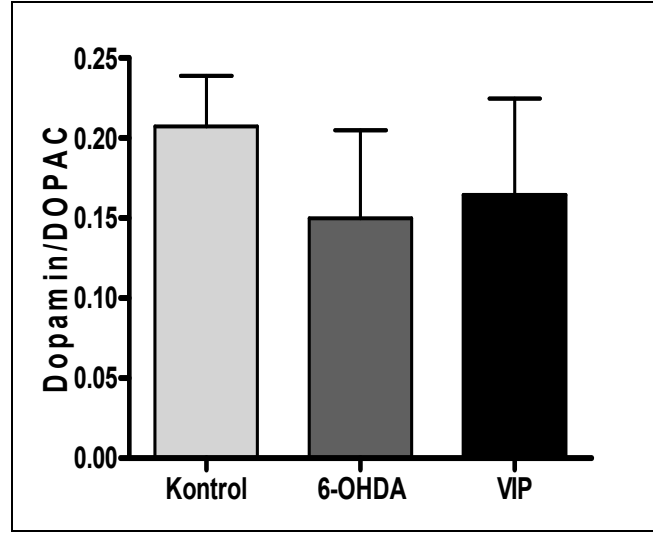
Şekil 4.7’te görüldüğü gibi, deneysel olarak Parkinson oluşturulmuş sıçanların mikrodiyalizatlarındaki DOPAC düzeyleri kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($P < 0,01$). VIP’li grubun DOPAC düzeyleri de istatistiksel olarak kontrol grubunun DOPAC düzeylerinden anlamlı ($P < 0,05$) derecede düşüktür. VIP ile tedavi edilen grubun DOPAC düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır.

4.2.3. Striatal dopamin/DOPAC oranı

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.8 Corpus striatumdan elde edilen mikrodiyalizatlardaki dopamin/DOPAC oranlarını göstermektedir.

Çizelge 4.4. Striatal dopamin/DOPAC oranı

	Kontrol (n=8)	6-OHDA (n=8)	VIP (n=8)
Dopamin/DOPAC oranı	0,207±0,031	0,149±0,055	0,164±0,060



Şekil 4.8. Dopamin/DOPAC oranları (ANOVA test, $P > 0,05$)

Şekil 4.8'te görüldüğü gibi Dopamin/DOPAC oranlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar, VIP'in dopamin metabolizması üzerinde bir değişiklik oluşturmadığına işaret etmektedir.

4.2.4. VATH GABA düzeyleri

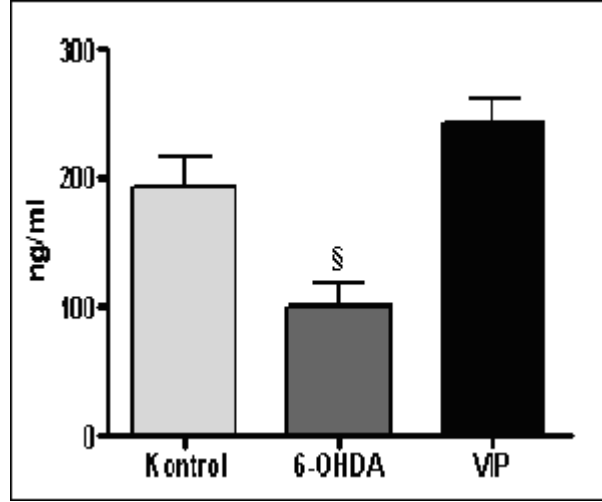
Çizelge 4.5 ve Şekil 4.9 ventral-anterior talamustan elde edilen mikrodiyalizatlardaki GABA düzeylerini göstermektedir.

Çizelge 4.5. VATH GABA ölçümü sonuçları

	Kontrol (n=6)	6-OHDA (n=6)	VIP (n=6)
VATH GABA düzeyleri \pm SH (ng/ml)	192,8 \pm 24,05	100,8 \pm 17,87 ^a	243,5 \pm 17,64 ^b

a: Kontrol grubundan 6-OHDA grubunun farkı ($P < 0,05$)

b: Kontrol grubundan VIP'li grubun farkı ($P > 0,05$)



Şekil 4.9. VATH GABA düzeyleri (§: $P < 0,001$, ANOVA test)

Şekil 4.9'te görüldüğü gibi, VATH'dan toplanan diyalizatlarda yapılan ölçümlerde Parkinson'lu grubunun GABA düzeyleri kontrol grubunun GABA düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0,05$) şekilde düşmüştür. VIP ile tedavi edilen grubun GABA düzeyleri ise, istatistiksel olarak Parkinson'lu grubunun GABA düzeylerinden anlamlı ($P < 0,001$) derecede yüksek bulunmuştur. VIP ile tedavi edilen grubunun yükselmiş GABA düzeyleri, kontrol grubunun değerlerinden ortalama olarak daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen kontrol ve VIP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4.3. Histolojik veriler

Toluidin mavisi ile boyanan mast hücrelerinin saptandığı thalamusa ait seri preparat örneklerinde (5-150 μm arası); NGF, heparin, RMCP-II ve serotonin için, immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş mast hücrelerinin, ardışık işaretlenmiş toplam hücre içerisindeki % oransal dağılımı Tablo 4.6'da verilmiştir. İstatistiksel analiz için ise, her grup için iki hayvana ait kesitlerdeki işaretlenmiş hücre sayısı üzerinden Random Bloc Design (ANOVA)-Tukey testleri uygulanmış ve bu test sonucunda; NGF ve RMCP-II ile işaretlenmiş mast hücre sayısının 6-OHDA ve VIP ile tedavi edilen

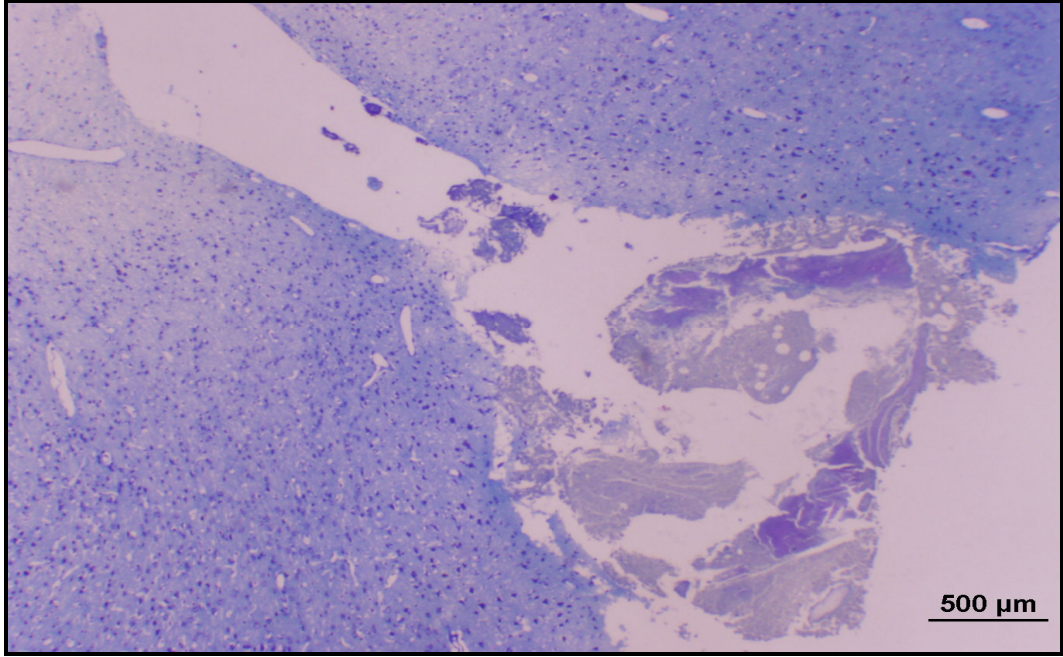
gruplarda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı ($P<0.01$) olduğu bulunmuştur. Serotonin ve heparin pozitif işaretlenmiş hücreler için böyle bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca, bu testin sonucunda, NGF ve RMCP-II işaretli mast hücrelerinin birlikte, serotonin ve heparin işaretli mast hücrelerinin birlikte davrandığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. Mast İmmünohistokimyasal boyama sonuçları

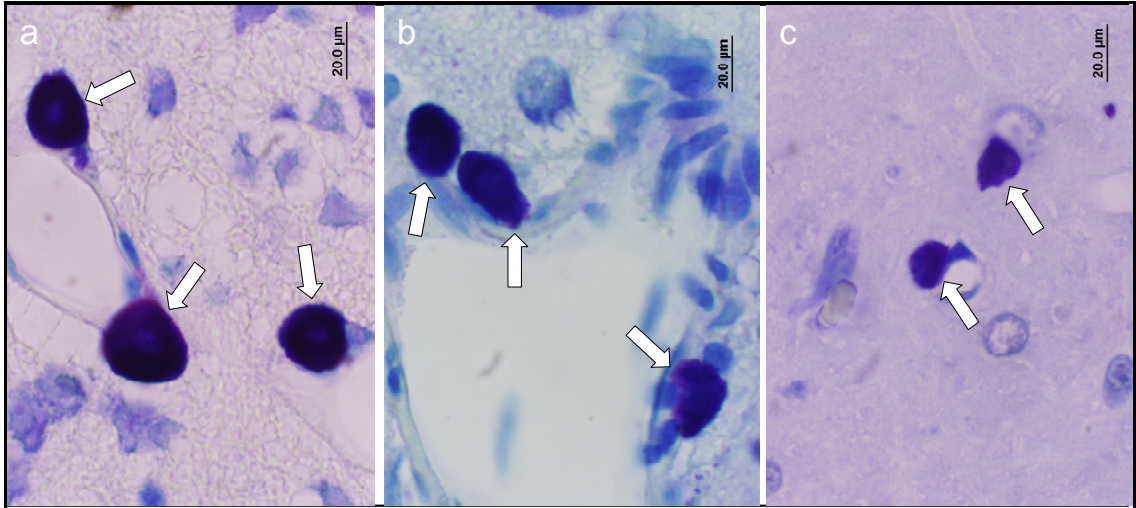
	Kontrol (İşaretlenmiş hücre sayısı:39)	6-OHDA, toplam (İşaretlenmiş hücre sayısı:17)	VIP, toplam mast (İşaretlenmiş hücre sayısı:20)
RMCP-II (+) mast hücre sayısı	%12	%5	%20
Heparin (+) mast hücre sayısı	%43	%41	%30
Serotonin (+) mast hücre sayısı	%28	%47	%30
NGF(+) mast hücre sayısı	%15	%5	%20

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi, Parkinson grubundaki NGF ve RMCP-II ile işaretlenen mast hücre oranı kontrol ve VIP ile tedavi edilen gruba göre göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur. VIP ile tedavi edilen grupta NGF ve RMCP-II ile işaretlenen mast hücre oranlarında Parkinson'lu gruba göre bir artış olduğu gözlenmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı gibi VIP, 6-OHDA uygulamasıyla azalan NGF VE RMCP-II ile pozitif işaretlenen mast hücre oranını kontrol değerlerinin de üzerinde artırmış gözükmektedir. Serotonin ve heparin pozitif hücre oranı ise gruplar arasında küçük farklılıklar göz ardı edilerek değişmediği söylenebilir.

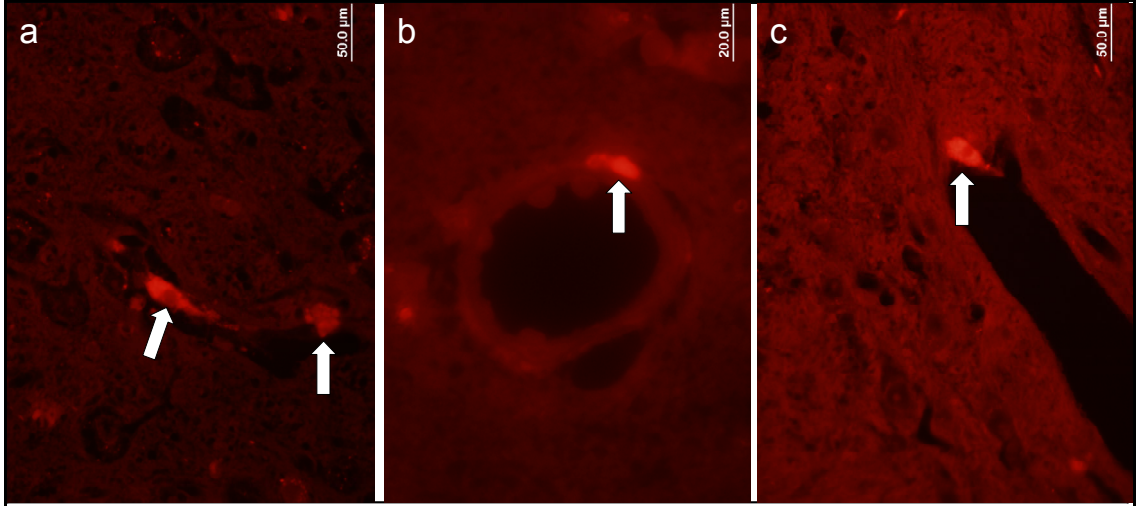
Şekil 4.10'da mikrodializ probunun beyin yüzeyinden girişte oluşturduğu iz gösterilmektedir. Her grup için mast hücrelerinin Toluidine mavisi, RMCP II, heparin, serotonin ve NGF boyamaları Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15'te gösterilmiştir.



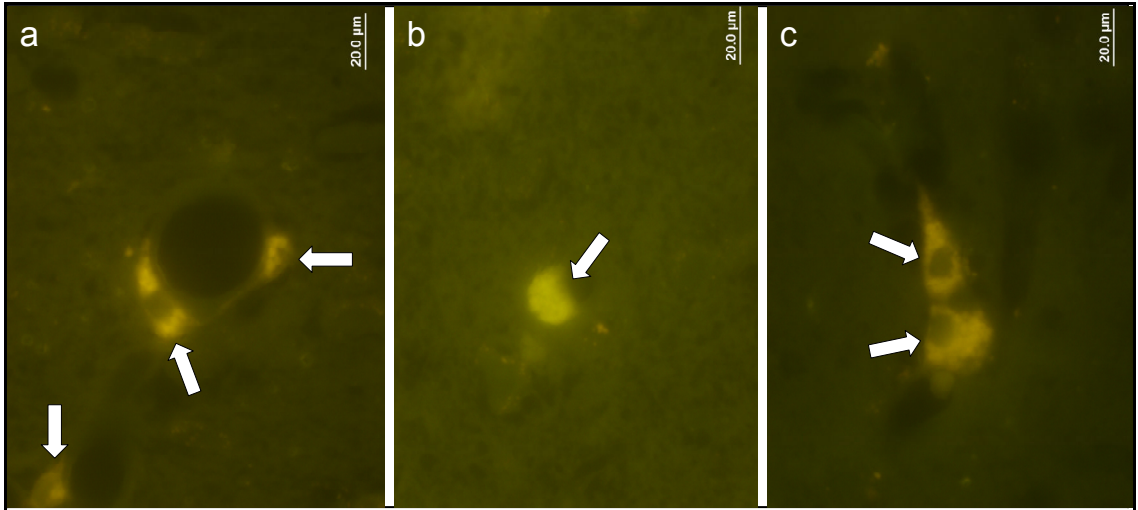
Şekil 4.10. Deneyde kullandığımız mikrodializ probunun beyin yüzeyinden girişte oluşturduğu iz; bar= 500 µm.



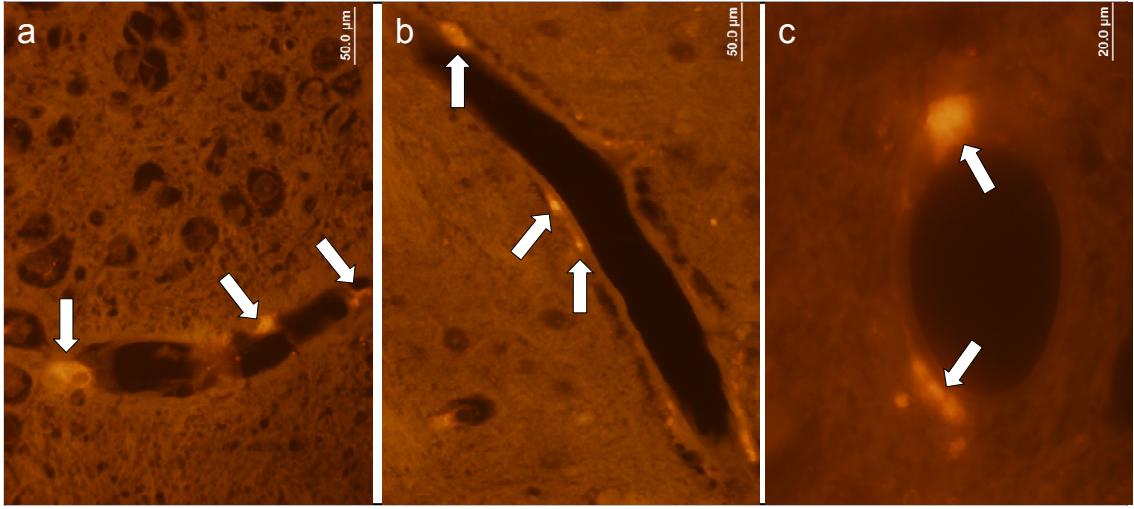
Şekil 4.11. Toludin mavisi ile boyanmış mast hücreleri (⇨); bar=20µm; a: Kontrol, b: 6-OHDA, c: VIP ile tedavi edilen.



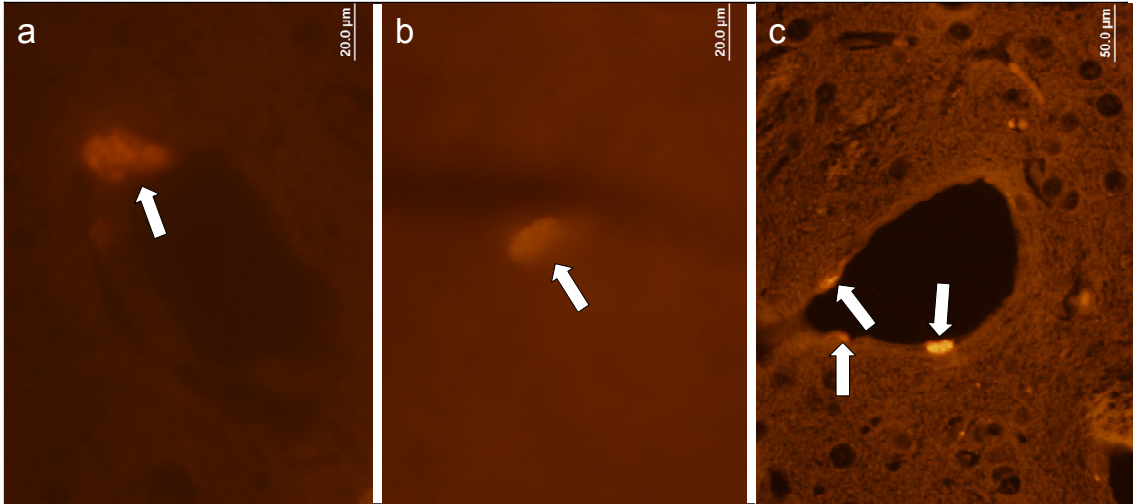
Şekil 4.12. RMCP II antikoruyla pozitif boyanan mast hücreleri (⇒); bar= 50μm (a,c), 20μm (b); a: Kontrol, b: 6-OHDA, c: VIP ile tedavi edilen.



Şekil 4.13. Heparin antikoruyla pozitif boyanan mast hücreleri (⇒); bar= 20μm; a: Kontrol, b: 6-OHDA, c: VIP ile tedavi edilen.



Şekil 4.14. Serotonin antikoruyla pozitif boyanan mast hücreleri (⇒); bar= 50μm; a: Kontrol, b: 6-OHDA, c: VİP ile tedavi edilen.



Şekil 4.15. NGF antikoruyla pozitif boyanan mast hücreleri (⇒), bar=20μm (a,b), 50μm (c); a: Kontrol, b: 6-OHDA, c: VİP ile tedavi edilen.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, 6-OHDA ile deneysel Parkinson modeli oluşturulmuş sıçanlarda, VIP'in bozulmuş motor fonksiyonlardaki düzeltici etkisini, corpus striatumdaki dopamin metabolizmasını artırmadan, VATH GABA düzeylerinde anlamlı değişiklik yaparak gerçekleştirdiği gözlenmiştir. VIP'in nöron hasarını geri döndürmedeki etkisi de, bir ölçüde mast hücresi kaynaklı NGF molekülüne bağlanabilmektedir. Yapılan kaynak taraması doğrultusunda, bu çalışmada, VIP'in VATH GABA seviyelerine ve beyinde NGF ile işaretlenen mast hücre oranına etkisi ile ilgili sunulan sonuçlar bir ilki oluşturmaktadır.

6-OHDA lezyonlu sıçanlarda, aralarında apomorfinin de bulunduğu farklı dopamin agonistlerinin uygulanmasıyla gözlemlenen kontralateral rotasyon hareketi çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir [63,76,91,138,182,188]. Oluşturulan unilateralezyonun sonucu görülen bu davranış deneysel Parkinson modellerindeki motor fonksiyon bozukluklarının incelenmesinde önemli bir göstergedir. Gelişen rotasyonel motor bozukluklar, 6-OHDA, ve MPTP gibi nörotoksik ajanların striatumdaki dopamin düzeylerini dramatik olarak azaltmasına bağlı olarak gelişmektedir [34,50,63,76,109,188]. Yapılan bir çalışmada VIP ile tedavinin rotasyonel davranışa etki ettiği ve motor bozuklukları geri döndürdüğü, ancak bunu dopamin düzeylerini artırmadan yaptığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, dopamin /DOPAC oranı ile ilgili bir sonuç verilmemesine karşın, motor fonksiyonlardaki düzelmeye rağmen striatumdaki dopamin düzeylerinin düşük bulunması VIP'in dopamin metabolizmasını hızlandırmış olabileceği ile ilişkilendirilmiştir [188]. Dopamin metabolizmasının hızlanmış olabileceğinin bir göstergesi dopamin/DOPAC oranının anlamlı derecede azalmasıdır. Bizim çalışmamızda da dopamin düzeyleri değişmeden motor fonksiyonlarda düzelmegörölmüştür. Çalışmamızda dopaminin metaboliti olan DOPAC düzeylerinin de dopamin düzeylerine paralel bir seyir izlemesi nedenli dopamin/DOPAC oranı VIP'in dopamin metabolizmasını artırdığına işaret edecek bir şekilde değişmemiştir. Diğer bir deyişle, VIP'in motor fonksiyonları geri getirirken striatal dopamin metabolizmasını artırıcı bir etkisinin olmadığı izlenimi doğmaktadır.

Normal bazal gangliyon devresinde, SNpc'dan striatuma gelen dopaminerjik etki striatumda dopaminin D₁ ve D₂ reseptörleriyle gerçekleşir. Bu iki reseptör üzerinden

dopamin aracılı oluşturulan etki GPi'dan talamusa giden tonik GABAerjik çıktılarının tonik deşarjlarını bir taraftan indirekt yolla eksite ederken diğertaraftan direkt yolla inhibe ederek dengede tutmaktadır. Eksitator D₁ reseptör aracılı etki striatumdan GPi'ya giden GABAerjik nöronları uyararak, GPi'dan talamusa gelen tonik GABAerjik çıktılarının direkt (doğrudan) inhibisyonuna neden olur. Böylelikle, VATH GABA düzeylerinde bir azalma söz konusu olabilir. Dopaminin D₁ reseptörlerince başlatılan bu devre striatumdan talamusa olan direkt yoldur. Dopaminin D₂ reseptör aracılı etkisi ise striatumdan GPe'ya giden GABAerjik nöronların inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu baskılanma, GPe'dan STN'a giden GABAerjik inhibisyonun artmasına, dolayısıyla da STN'dan GPi'ya giden glutamaterjik eksitasyonun baskılanmasına neden olmaktadır. Böylelikle, GPi üzerindeki baskılanmış glutamaterjik eksitasyon GPi'dan talamusa olan tonik GABAerjik inhibisyonun azalmasına neden olur ve VATH GABA düzeyleri azalabilir. Dopaminin D₂ reseptörlerince başlatılan bu devre striatumdan talamusa olan indirekt yoldur (Bkz. Şekil 2.2.A) [72]. Normal şartlar altında striatumdan talamusa olan bu yollar dopaminin D₁ ve D₂ reseptörleri aracılığı ile belli bir dengede tutuluyor olmasına rağmen, PH'nda SNpc'daki dopaminerjik nörodejenerasyona bağlı olarak eksitator D₁ reseptör aracılı ve inhibitör D₂ reseptör aracılı etki ortadan kalkmaktadır. Bunun net etkisi olarak, direkt ve indirekt yollar üzerinden VATH GABA düzeylerinin artması beklenmektedir (Bkz. Şekil 2.2.B) [72]. Ancak, bizim çalışmamızda, 6-OHDA uygulamasıyla oluşturulmuş deneysel Parkinson modeli sıçanlarda VATH GABA düzeylerinin kontrol grubuna göre dramatik şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bugünkü bilgiler ışığında VATH'un GPi'ya göre zayıfda olsa GABAerjik girdi aldığı bir başka nükleus da SNpr'dır (Bkz. Şekil 2.2) [9,52,173]. Bu bağlamda bizim bulgumuz, VATH GABA düzeylerine etki etmede SNpr'dan talamusa gelen olası zayıf GABAerjik yolağın nörodejenerasyon sonucu bozulmuş bazal devrede talamusun GABA düzeylerini değıştirmede daha da baskın bir yol olup olmadığı sorusunu da akla getirmektedir. Ancak, deneysel modeller üzerinde GABA ölçümleri yapılmış benzer sınırlı sayıda çalışmaları incelendiğinde bizim çalışmamızın yorumlanmasına önemli katkıları getirmektedir. Kronik mangenez uygulaması nörotoksisteye neden olup, baskın şekilde GP, STN, ve SN'da oluşturduğu lezyonlar sonucu, bir parkinsonizm formu oluşturmaktadır [13,60,168]. Struve ve ark.'nın [168] yaptıkları bir çalışmada kronik olarak yüksek dozlarda mangan sülfat inhalasyonuna maruz bırakılan maymunların

mikrodiyaliz numunelerinde pallidal GABA düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Aynı çalışmada, ölçülen pallidal glutamat düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. Garcia ve ark.'larının [60] yaptıkları başka bir çalışmada ise, mangan ilave edilmiş diyetle beslenen yeni doğmuş sıçanların tüm beyin dokusunda GABA ve glutamat miktarları ölçülmüş ve GABA miktarlarının anlamlı düzeyde arttığı ancak, glutamat düzeylerinin değişmemesi nedeniyle olarak GABA/glutamat oranının anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Benzer bir sonuçta, 6-OHDA lezyonlu sıçanlarda yapılan bir çalışmayla bildirilmiştir. Bianchi ve ark. [13], dopaminerjik 6-OHDA lezyonu oluşturdıkları sıçanlardan mikrodiyaliz numunelerinde globus pallidus GABA ve glutamat düzeylerini ölçmüş ve GABA düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığını glutamat düzeylerinin değişmediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar bizim 6-OHDA lezyonlu sıçanlarda bulduğumuz azalmış VATH GABA düzeylerinin yorumu açısından büyük önem arz etmektedir. 6-OHDA lezyonlu sıçanlarda bulduğumuz azalmış VATH GABA düzeyleri bu bölgenin innervasyonunun büyük kısmını tonik olarak sağlayan GPi segmenti üzerindeki artmış GABAerjik etkiye işaret etmektedir. GPi üzerindeki GABAerjik etki ise striatumda dopaminin D₁ reseptörlerince başlatılıp direkt yola GPi segmentine gelen deşarjlardır. GPi segmentinin talamusa olan tonik GABAerjik deşarjları indirekt yolla STN'dan gelen glutamaterjik ve striatumdan direkt yolla gelen GABA'erjik deşarjlarla dengede iken 6-OHDA lezyonu sonrası bu dengenin direkt yola kaymış gözüküyor olması indirekt yolla üzerinden gelen striatopallidal GABAerjik etkinin azaldığına işaret eder. Yani, 6-OHDA aracılı dopaminerjik nöron hasarı sonucu bozulan dengede D₁ reseptörleri yönüne kaymış ve net etki olarak da VATH GABA düzeyleri azalmış gözükmektedir. Bizim elde ettiğimiz bu sonuç gerek Struve ve ark.'nın [168], gerekse Garcia ve ark.'nın [60] yapmış oldukları çalışmalarla örtüşmektedir. Şöyle ki: Globus pallidusa gelen GABAerjik uyarı arttığında GPi'dan VATH'a olan tonik GABAerjik uyarım baskılanacaktır. Dolayısıyla, bu bulgulardan da dolaylı da olsa Parkinson hastalığında VATH GABA düzeylerinin azaldığı sonucuna varılır. Normal bazal gangliyon devreleri prensibine göre, 6-OHDA lezyonuyla ortadan kalkan dopaminin D₁ reseptörleri aracılı eksitator ve D₂ reseptörleri aracılı inhibitör etki sonucunda VATH GABA düzeylerinin yükselmesi beklenir. Ancak, bizim bulgularımız ve bulgularımızı destekler nitelikteki diğer çalışmalara [13,168] göre VATH GABA düzeylerinin azalmış olması bilinenin aksine bir durum oluşturmaktadır.

Buradan yola çıkarak, bazal gangliyon devrelerinde bugün bilinenlerin dışında aydınlatılmayı bekleyen farklı kompleks bağlantıların olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda, VİP tedavisi sonucunda GABA düzeylerinin kontrol grubu düzeylerine yükseldiğini bulduk. Yükselmiş VATH GABA düzeylerinden, STN'dan GPi'a gelen glutamaterjik etkinin arttığı ,dolayısıyla da D₂ reseptör aracılı indirekt yolağın baskın hale gelmesi gibi bir sonuca varılabilir. Yani, VİP ile tedavi 6-OHDA lezyonu sonucu direkt yolağa kayan durumu indirekt etkiyle dengeliyor olabilir. Normal motor kontrolün sağlanabilmesi için merkezi sinir sisteminin çeşitli alanlarında GABA düzeylerinin dengesi çok önem arz etmektedir. Gerek beyincikte gerekse bazal gangliyonlarda motor fonksiyonların kontrolü ile ilgili çıktılar GABAerjik nöronlarca yapılmaktadır [137]. GABA düzeylerinin çok fazla artması veya anormal azalmasının motor fonksiyon anomalileri yarattığı gözlenmektedir. Bu nedenle GABA düzeylerinin bir denge halinde olması gerektiği bildirilmiştir [25]. Bu bağlamda, VİP'in VATH'un GABA düzeylerini optimum seviyede, kontrol değerlerine yükseltmiş olmasının, VİP'in GABA dengesine etkisi açısından ayrı bir önem arz ettiği kanısındayız.

VİP'in etki mekanizmasını açıklamaya yönelik olarak, göz ardı edilemeyecek bir durum da striatumda bulunan ara nöronlarının nörotransmitter içerikleridir. Bugünkü bilgiler ışığında striatum ara nöronlarının kolinerjik, GABAerjik nöronlar oldukları bilinmektedir [78]. Kolinerjik ara nöronlardan salıverilen asetilkolin M₁ ve M₄ reseptörleri aracılığıyla direkt ve indirekt yolakların düzenlenmesinde çok önemli rol oynadığı bildirilmektedir [78,123,197]. Dahası, striatal ara nöronlardan salıverilen GABA da aferent kortikal sinyallerin integrasyonunda görev almaktadır. [50,78,110,197]. VİPerjik nöronlar ve VİP reseptörleri merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunmaktadır [38,98,114,146,165] Ayrıca VİP, asetilkolin ve GABA ile birlikte birçok nöron grubunda ko-transmitterdir ve VİP pozitif nöronlar striatumda da bulunur [83]. MSS'de kortikal GABAerjik nöronların en az %30'unda, kolinerjik nöronların ise %80'den fazlasında VİP'in ko-transmitter olarak salıverildiği bildirilmiştir [49,117]. VİP'in striatal ara nöronlardaki nörotransmitterler ile ko-transmitter ilişkisi ile nöromodülatör etkisi de birlikte ele alındığında, dopaminerjik eksiklikle ortaya çıkan striatal dengesizlikte sistemik VİP tedavisi ile direkt ve indirekt yolaklardaki bozulmuş denge VİP tarafından düzeltiliyor olabilir. Ancak, bu önerme ilave çalışmaları gerektirmektedir.

Bu güne kadar PH patolojisinin oluşumunu oksidatif stres, inflamasyon, glutamat toksisitesi, apoptoz gibi çeşitli olası mekanizmaların tetiklediği ileri sürülmüştür. Ayrıca, mikroglial aktivasyon ve mikroglia kaynaklı sitotoksik ürünler sonucu kontrol dışı inflamatuvar cevaplarında hastalığın patolojisinde kritik rol oynayabileceği ileri sürülmektedir [24,33,54,107,169,196]. 6-OHDA'nın dopaminerjik nöronlara olan seçici etkisi katekolaminler ile olan yapısal benzerliğinden kaynaklanmaktadır. 6-OHDA'nın bu özelliğinden dolayı, dopaminerjik terminallerden alınarak oksidatif stresi tetiklediği ve nöronal ölüme neden olduğu bildirilmiştir [37]. VIP potansiyel bir anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-apoptotik moleküldür [1,20,48,51,73,135,185]. VIP'in hemorajik şok [94], septik şok [141,181], iskemi-reperfüzyon hasarı [87,184,185], akciğer hasarı [150], romatoid artrit [71,84,85] gibi çeşitli patolojik durulara karşı iyileştirici etkisinin yanı sıra nöronal hasara karşı da koruyucu etkilerinin olduğu *in vivo* ve *in vitro* birçok çalışmayla gösterilmiştir. Pilzer ve ark., kortikal nöron ve astrosit kültürlerinde serbest oksijen radikallerine karşı [131], Tanaka ve ark., sempatik gangliyonik kültürlerde NGF yoksunluğuna bağlı nöronal ölüme karşı [175], Fernandez-Martin ve ark., deneysel MS modelinde inflamasyona karşı [51], Offen ve ark., hücre kültürlerinde MPTP ve 6-OHDA toksisitesine karşı [124] VIP'in nöronal hasarı önlediği ve nöronal devamlılığı sağladığını bildirmişlerdir. Tuncel ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, 6-OHDA lezyonlu sıçanlarda, VIP'in nöronları korumasına ve motor fonksiyonları düzeltmesine rağmen, dopamin düzeylerini artıramaması, tedavi süresinin kısalığıyla ilişkilendirilmiştir [188]. Bizim çalışmamızda da azalan dopamin düzeylerinin VIP ile tedaviden sonra değişmemesi tedavi süresiyle ilişkilendirilebilir. Delgado ve ark., fareler üzerinde MPTP ile oluşturulmuş parkinson modelinde, VIP'in intra-kranial (i.c.) olarak kullanılmasında, dopaminerjik nöron hasarının engellendiği, dopamin ve DOPAC seviyelerinin de azalmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, VIP'in sistemik (i.p.) olarak uygulanmasında nöroprotektif etkisinin i.c. uygulamaya göre önemli oranda azaldığı görülmüş ve bunun nedeni, VIP'in normal şartlarda KBB'ini geçebiliyor olmasına rağmen inflamatuvar koşullarda BBB'indeki geçirgenliğin azalmasına bağlanmıştır [34]. Ayrıca, Delgado ve ark., VIP'in TNF- α , interlökin 1- β ve nitrik oksit gibi mikroglial aracılı proinflamatuvar faktörleri inhibe ederek kafa travmalarında ve β -amiloid patolojili nörodejenerasyonda (Alzheimer hastalığı) tedavi edici bir ajan olabileceğini bildirmişlerdir [31,33,36,68]. VIP, PACAP ile yapısal ve fonksiyonel

olarak benzer özelliklere sahiptir ve farklı afiniteler göstererek reseptörleri ortak kullanabilirler [38,98]. Shoge ve ark. [156], retinal nöron kültüründe glutamat toksisitesine karşı, Reglodi ve ark. [140], sıçanlarda stiatumda 6-OHDA ile oluşturulan toksisiteye karşı PACAP'ın nöron koruyucu etkilerini bildirilmişlerdir. Castorina ve ark. [22] ise, shwan hücre kültüründe hem VIP hem de PACAP'ın nöroprotektif ve nöronal devamlılıkla ilgili olumlu etkilerini göstermişlerdir. Armstrong ve ark. [7] ise, PACAP geni defektli farelerde periferik sinir hasarından sonra rejenerasyon özelliklerini incelemiş ve kontrol hayvanlarına göre bir değişiklik olmadığını gözlemlemişler, ancak, bu durumu PACAP'la büyük oranda homolog olan VIP tarafından sağlanan kompensasyonla sağlanmış olabileceğine dair bir önermede bulunmuşlardır. Tüm bu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bizim elde ettiğimiz PH'nın multi-faktöriyel patolojisine karşı VIP'in koruyucu etkisini destekler niteliktedir. VIP'in doku koruyucu etkisi için söz konusu olan anti inflamatuva, anti oksidan, anti apoptotik ve mikroglial hücre fonksiyonlarını düzenleyici etkisine ilaveten; bir çok çalışmada, farklı dokularda, mast hücrelerinin aktivitelerini ve mediatör içeriklerini değiştirerek koruyucu etki gösterebileceği ileri sürülmektedir [20,181,186,187,188]. Çalışmamızdaki diğer bir önemli bulgu da, VIP'in NGF pozitif beyin mast hücre immünoreaktivite oranını artırmış olmasıdır. NGF mast hücreleri tarafından sentezlenip salgılan nörotrofik bir moleküldür [39,108,147,163,194]. NGF ve benzeri nörotrofinlerin fare ve sıçanlarda mast hücreleri ve bazofillerin gelişim ve aktivasyonunu etkileyebildiği bildirilmiştir [163]. Neonatal sıçanlarda, subkutan NGF uygulamasının birçok doku ve organda mast hücre hiperplazisi ve hipertrofini tetiklediği gösterilmiştir [108]. NGF, BDNF, nörotrofin-3, nörotrofin-4 gibi nörotrofik proteinlerin sinir sisteminde nöron gelişimi, korunması, farklılaşması ve devamlılığı gibi olaylarda rol oynadıkları bilinmektedir [157]. Nörotrofinler aynı zamanda nöron uyarılabilirliğini ve nörotransmitter sentezini de artırabilirler [163]. NGF, nöronlar üzerine yaptığı koruyucu ve devamlılığı sağlayıcı etkiyi mast hücreleri üzerinde de gösterir. NGF'in apoptozu baskılayarak peritonel mast hücrelerinin devamlılığını sağladığı [89], bu hücrelerin degranülasyonunu ve mediatör salınımlarını düzenlediği [39], NGF'in mast hücreleri üzerine otokrin ve parakrin etki gösterebileceği bildirilmiştir [163]. Morfolojik olarak mast hücre-nöron ilişkisi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir [14,94,95,111,148,159,179,195]. Mast hücreleri degranüle olduklarında serotonin, histamin, heparin, TNF- α , gibi çeşitli sitokinlerle

birlikte NGF'i de içeren granüllerini boşaltarak; sinir, endokrin ve immün sistemin arasında iletişim hücreleri olarak önemli roller üstlenebilirler [11,29,47,116,176]. Tuncel ve ark. [188] yaptıkları elektron-mikroskopik çalışmada sıçanlara 6-OHDA uygulamasıyla striatal mast hücrelerinin granüllerinin kontrol grubuna göre daha şişkinleşip içeriklerinin yoğunlaştığını, VIP ile tedavi edilen lezyonlu sıçanlarda ise mast hücre granüllerinin yine şişkin ve belirgin olduğu ancak granüler yoğunluklarının azaldıklarını bildirmektedirler. Bu durumu, mast hücrelerinin granül içeriklerini klasik degranülasyon göstermeksizin piece-meal granülasyonla boşaltmalarına, VIP'in etkisini bu şekilde gösterdiğine bağlayıp; nöroprotektif etkisini de MH granüler içeriğindeki NGF, sitokinler, TGF β 1 gibi nöroprotektif maddeler özellikle de heparin ve kondriotin sülfat gibi proteoglikanlar aracılığı ile yapabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda, heparin pozitif immünoaktif mast hücre sayısında gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Ancak, heparin ve serotoninin birlikte, NGF ile RMCP-II'nin de birlikte ayrı bir ikili gibi davrandığı görülmüştür. Bu ikili davranma biçimi farklı mast hücre alt tiplerindeki farklı granüler içeriklerin bulunduğu dair kaynak bilgileriyle de doğrusaldır. Rouleau ve ark. [147] yaptıkları çalışmada, deneysel bir MS modeli olan alerjik ensefalomyelitte NGF'in mast hücre hiperplazisini artırdığı ve RMCP-II immünoaktif mast hücre sayılarının anlamlı derecede yükseldiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada, NGF uygulamasının sıçanlarda dalaktaki mast hücre hiperplazisi ve RMCP-II pozitif immünoaktivitesini anlamlı derecede artırdığı bildirilmiştir [108]. Bu çalışmalar bizim bulduğumuz NGF-RMCP-II bağlantısını desteklemektedir. Sıçanlarda mast hücre granüler içerikleri CTMC ve MMC'lerde farklılıklar gösterir. MMC'lerde RMCP-II ve kondriatin sülfat spesifik iken, CTMC'lerde serotonin, heparin ve RMCP-I spesifiktir [127,178,194]. Pejler ve ark., heparinin sadece RMCP-I aktivitesini potansiyelize etmekle kalmayıp inflamatuvar şartlarda bu molekülün inhibe edilmesini de engellediğini, RMCP-I ile heparin molekülleri arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir [127]. Bu çalışmada ileri sürülen ilişkiye benzer bir ilişki de NGF ve RMCP-II molekülleri arasında olabilir. Yani NGF ve RMCP-II molekülleri bir şekilde birbirlerinin fonksiyonlarını potansiyelize ediyor olabilirler. Ayrıca, mast hücre proteaz içeriklerinin koruyucu etkiler gösterdiğine dair bilgiler mevcuttur [194]. Bu güne kadar fonksiyonları hakkında çok az bilgi bulunan ve genellikle mast hücre tiplmesinde karşımıza çıkan proteazlar,

belkide mast hücrelerinin doku korunmasındaki rollerini düzenleyen önemli moleküller olabilir. Bu bağlamda , mast hücrelerin farklı ortam ve şartlara göre yapısal ve fonksiyonel özelliklerini değiştirebildiklerini ve proteaz içeriklerinin de bu değişimden etkilenmesini birlikte ele aldığımızda, RMCP-II gibi moleküllerin fizyolojik ya da patolojik şartlarda kilit roller üstlenebileceği çıkarımına varabiliriz. Yani, bugün sözü edilen mast hücre tipleri ve bunlar arasındaki morfolojik farklılıklar aslında mast hücresinin fonksiyonel olacağı görev için ve görev süresince farklılaşmış durumları olabilir. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak, bizim çalışmamızda bulduğumuz VİP tedavisiyle artmış NGF pozitif immünoaktivitesi, RMCP-II ve NGF in birlikte hareket ediyor olması mukozal tipteki mast hücrelerinin NGF aracılı nöroprotektif etki gösterebileceği; VİP'in modülatör özelliğiyle MH'i etkileyip hem NGF aracılığı ile hem de RMCP-II aracılığı ile ikili bir nöroprotektif etkiye neden olduğu sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada 6-OHDA ile oluşturulmuş nöronal dejenerasyonda VİP'in ikili bir etki sağladığını gözlemledik:

- 1) Azalmış olan VATH GABA düzeylerini geri getirerek,
- 2) Beyin mast hücrelerine etki edip onların nöroprotektif bir molekül olan NGF içeriklerini artırarak.

Bu ikili etki 6-OHDA aracılı deneysel Parkinson modelinde kaybedilen motor özelliklerin tekrar sağlanmasında etkili bir tedavi sağlamış olabilir. Ayrıca, lezyon sonrası ve tedavi sonrası görülen değişmiş VATH GABA düzeylerinin hastalık patolojisinin ve bazal gangliyonların mekanizmalarıyla ilgili yeni fikirler vereceği düşüncesindeyiz. Ancak, bulgularımızdan yola çıkarak kurduğumuz hipotezlerin doğruluğu gelecekte ilave çalışmaları gerektirmektedir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abad, C., Niewiadomski, P., Loh, D.H.-W., Waschek, J.A., 2006, Neurotransmitter and immunomodulatory actions of VIP and PACAP: lessons from knockout mice, *Int. J. of Peptide Research and Therapeutics*, Vol. 12, No. 3, 297-310 p.
2. Alexia, T., Borlongand, C.V., Faullb, R.L.M., Williamsa, C.E., Clarka, R.G., Gluckmana, P.D., Hughes, P.E., 2000, Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases, *Progress in Neurobiology*, 60, 409-470 p.
3. Ali, S.F., Newport, G.D., Holson, R.R., Slikker, W., Bowyer, J.F., 1994, Low environmental temperatures or pharmacological agents that produce hypothermia decrease methamphetamine neurotoxicity in mice, *Brain Research*, 658, 33-38 p.
4. Anderson, J.G., et al., 2008, Manganese exposure alters extracellular GABA, GABA receptor and transporter protein and mRNA levels in the developing rat brain, *Neurotoxicology*.
5. Antonawicha, F.J., Said, S.I., 2002, Vasoactive intestinal peptide attenuates cytochrome-C translocation, and apoptosis, in rat hippocampal stem cells, *Neuroscience Letters*, 325, 151-154 p.
6. Arcelli, P., Frassoni, C., Regondi, M.C., De Biasi, S., Spreafico, R., 1996, GABAergic neurons in mammalian Thalamus: a marker of thalamic complexity?, *Brain Research Bulletin*, 42 (1), 27-37 p.
7. Armstrong, B.D., Abad, C., Chhith, S., Cheung-Lau, G., Hajji, O.E., Nobuta, H., Waschek, J.A., 2008, Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylyl cyclase activating peptide, *Neuroscience*, 151, 63-73 p.
8. Aydın, Y., Tunçel, N., Gürer, F., 1998, Ovarian, uterine and brain mast cells in female rats: cyclic changes and contribution to tissue histamine, *Comp. Biochem. Physiol.*, 120, 255-262 p.
9. Barroso-Chinea, P., Rico, A.J., Pérez-Manso, M., Roda, E., López, I.P., Luis-Ravelo, D., Lanciego, J.L., 2008, Glutamatergic pallidothalamic projections and their implications in the pathophysiology of Parkinson's disease, *Neurobiology of Disease*, 31, 422-432 p.
10. Başar, E., Güntekin, B., 2008, A review of brain oscillations in cognitive disorders and the role of neurotransmitters, *Brain Research*, 1235, 172-193 p.
11. Bauer, O., Razin, E., 200, Mast cell-nerve interactions, *News Physiol. Sci.*, 15, 213-218 p.
12. Betarbet, R., Sherer, T.B., Greenamyre, J.T., 2005, Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases, *Experimental Neurology*, 191, 17-27 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

13. Bianchi, L., Galefiti, F., Bolam, J.P., Della Corte, L., 2003, The effect of 6-OHDA lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a microdialysis probe analysis, *Eu. J. of Neuroscience*, 18, 856-868 p.
14. Bienenstock, J., 2002, Relationships between mast cells and the nervous system, *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 42, 11-15 p.
15. Blum, D., Torch, S., Lamben, N., Nissou, M.-F., Benabid, A.-L., Sadoul, R., Verna, J.-M., 2001, Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease, *Progress in Neurobiology*, 65, 135–172 p.
16. Boland, B., Nixon, R.A., 2006, Neuronal macroautophagy, From development to degeneration, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 503-519 p.
17. Bonifati, D.M., Kishore, U., 2007, Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation, *Molecular Immunology*, 44, 999–1010 p.
18. Breneman, D.E., 2007, Neuroprotection: A comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, *Peptides*, 28, 1720-1726 p.
19. Brown, T.P., Rumsby, P.C., Capleton, A.C., Rushton, L., Levy, L.S., 2006, Pesticides and Parkinson's Disease-Is There a Link?, *Environmental Health Perspectives*, 114, 2.
20. Can, C., Töre, F., Tunçel, N., Uysal, O., Gürer, F., Ak, D., Tunçel, M., 2004, Protective effect of vasoactive intestinal peptide on testicular torsion-detorsion injury: association with heparin-containing mast cells, *Urology*, 63, 195–200 p.
21. Casteels, C., Lauwers, E., Bormans, G., Baekelandt, V., Van Laere, K., 2008, Metabolic-dopaminergic mapping of the 6-OHDA rat model for Parkinson's disease, *Eur J Med Mol Imaging*, 35, 124-134 p.
22. Castorina, A., Tiralongo, A., Giunta, S., Carnazza, M.L., Rasic, G., D'Agata, V., 2008, PACAP and VIP prevent apoptosis in schwannoma cells, *Brain Research*, 1241, 29-35 p.
23. Centonze, D., Finazzi-Agro, A., Bernardi, G., Maccarrone, M., 2007, The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases, *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.28 No.4.
24. Chavarria, A., Alcocer-Varelab, J., 2004, Is damage in central nervous system due to inflammation?, *Autoimmunity Reviews*, 3, 251–260 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

25. Chiu, C.-S., Brickley, S., Jensen, K., Southwell, A., Mckinney, S., Cull-Candy, S., Mody, I., Lester, H.A., 2005, GABA Transporter Deficiency Causes Tremor, Ataxia, Nervousness, and Increased GABA-Induced Tonic Conductance in Cerebellum, *The Journal of Neuroscience*, 25(12), 3234–3245 p.
26. Colea, K., Vaughan F.L., 2005, The feasibility of using cognitive behaviour therapy for depression associated with Parkinson's disease: A literature review, *Parkinsonism and Related Disorders*, 11, 269–276 p.
27. Costa-Pinto, F.A., Basso, A.S., Russo, M., 2007, Role of mast cell degranulation in the neural correlates of the immediate allergic reaction in a murine model of asthma, *Brain, Behavior, and Immunity*, 21, 783–790 p.
28. Couturier, N., Zappula, J.P., Lauwers-Cances, V., Uro-Coste, E., Delilse, M.-B., Clanet, M., Montagne, L., Van der Valk, P., bö., L., Libnau, R.S., 2008, Mast cell transcripts are increased within and outside multiple sclerosis lesions, *J. of Neuroimmunology*, 195, 176-185 p.
29. Cutz, E., Chan, W., Track, N.S., Goth, A., Said, S.I., 1978, Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators, *Nature*, 275, 661-662 p.
30. De Lau, L.M.L, Breteler, M.M.B., 2006, Epidemiology of Parkinson's disease, <http://neurology.thelancet.com>, Vol: 5.
31. Delgado, M., 2002, Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the MEKK1/MEK4/JNK signaling pathway in endotoxin-activated microglia, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 771–776 p.
32. Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Juarranz, M.G., Arranz, A., Gomariz, R.P., Leceta, J., 2002, Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential yherapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases, *J. Mol. Med.*, 80, 16-24 p.
33. Delgado, M., Ganea D., 2003, Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma, *The FASEB Journal*.
34. Delgado, M., Ganea, D., 2003, Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mause model of Parkinson's disease by blocking microglial activation, *The Faseb Journal*.
35. Delgado, M., Pozo, D., Ganea, D., 2004, The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation, *Pharmacol. Rev.*, 56, 249-290 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyör)

36. Delgado, M., Varela, N., Gonzalez-Rey, E., 2008, Vasoactive Intestinal Peptide Protects Against β -Amyloid-Induced Neurodegeneration by Inhibiting Microglia Activation at Multiple Levels, *Glia*, 56, 1091-1103 p.
37. Di Matteo, V., Pieruccia, M., Di Giovanni, G., Di Santoa, A., Poggia, A., Benignob, A., Esposito, E., 2006, Aspirin protects striatal dopaminergic neurons from neurotoxin-induced degeneration: An in vivo microdialysis study, *Brain Research*, 1095, 167-177 p.
38. Dickson, L., Finlayson, K., 2008, VPAC and PAC receptors: From ligands to function, *Pharmacology and Therapeutics*, in press.
39. Dimitriadou, V., Pang, X., Theoharides, T.C., 2000, Hydroxyzine inhibits experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and associet brain mast cell activation, *Int. J. of Immunopharmacology*, 22, 673-684 p.
40. Dogrukol-Ak, D., Banks, W.A., Tuncel, N., Tuncel, M., 2003, Passage of vasoactive intestinal peptide across the blood-brain barrier, *Peptides*, 24, 437-444 p.
41. Dubayle, D., Servière, J., Menétrey D., 2007, The effects of viscerö-somatic interactions on thalamic mast cell recruitment in cystitic rats, *Journal of Neuroimmunology*, 190, 18-27 p.
42. Dubayle, D., Serviere, J., Menetrey, D., 2005, Evidence for serotonin influencing the thalamic infiltration of mast cells in rat, *J. of Neuroimmunology*, 159, 20-30 p.
43. Duval, C., Panisset, M., Strafella, A.P., Sadikot, A.F., 2006, The impact of ventrolateral thalamotomy on tremor and voluntary motor behavior in patients with Parkinson's disease, *Exp. Brain Res.*, 170, 160-171 p.
44. Elmer, L., 2005, Chapter 2: Paralysis agitans-refining the diagnosis and treatment, *Parkinson's Disease*, CRC Press, U.S.A.
45. Ercan, F., Çetinel, Ş., 2008, Mast hücrelerinin enflamasyondaki rolü: İnsan ve deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmaların değerlendirilmesi, *Marmara Medical Journal*, 21(2), 179-186 p.
46. Eriksen, J.L., Petrucelli, L., 2004, Parkinson's disease-molecular mechanisms of disease, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, Vol. 1, No. 4, 399-405 p.
47. Erpek, S., 2004, Mast hücreleri, *İnönü Ün. Tıp Fak. Dergisi*, 2, 109-120 s.
48. Fahrenkrug, J., 2001, Gut/brain peptides in the genital tract: VIP and PACAP , *Scand. J. Clin. Invest.*, 61 (Suppl. 234), 35-39 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

49. Fahrenkrug, J., Hannibal, J., 2004, Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP, *Peptides*, 25, 393–401 p.
50. Fantin, M., Auberson, Y.P., Morari, M., 2008, Differential effect of NR2A and NR2B subunit selective NMDA receptor antagonists on striato-pallidal neurons: relationship to motor response in the 6-hydroxydopamine model of parkinsonism, *J. of Neurochemistry*, 106, 957-968 p.
51. Fernandez-Martin, A., Gonzales-Rey, E., Chrony, A., Martin, J., Pozo, D., Ganea, D., Delgado, M., 2006, VIP Prevents Experimental Multiple Sclerosis by Downregulating Both Inflammatory and Autoimmune Components of the Disease, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1070, 276–281 p.
52. Ferraro, L., Tomasini, M.C., Fernandez, M., Bebe, B.W., O'Connor, W.T., Fuxe, K., Glennon, J.C., Tanganelli, S., Antonella, T., 2001, Nigral neurotensin receptor regulation of nigral glutamate and nigroventral thalamic gaba transmission: a dual-probe microdialysis study in intact conscious rat brain, *Neuroscience*, Vol. 102, No. 1, 113-120 p.
53. Forsythe, P., and Enis, M., 2000, Clinical consequences of mast cell heterogeneity, *Inflamm. res.*, 49, 147–154 p.
54. Fuxea, K.G., Tarakanovb, A.O., Goncharovac, L.B., Agnatid, L.F., 2008, A new road to neuroinflammation in Parkinson's disease?, *Brain Reserch*, 58, 453-458 p.
55. Gagnon, A.W., Aiyar, N., Elshourbagy, N.A., 1993, Molecular cloning and functional characterization of a human liver vasoactive intestinal peptide receptor, *Cellular Signalling*, Vol. 6, No. 3, 321-333 p.
56. Gali, S.J., Maurer, M., Lantz, C.S., 1999, Mast cells as sentinels of innate immunity, *Current Opinion in Immunology*, 11, 53-59 p.
57. Gali, S.J., Tsai, M., 2008, Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defence and homeostasis, *J. of Dermatological Science*, 49, 7-19 p.
58. Galvan, A., Wichmann, T., 2008, Pathophysiology of Parkinsonism, *Clinical Neuro-physiology*, 119, 1459–1474 p.
59. Ganong, W.F., 2002, *Tıbbi fizyoloji*, 20. Baskı, (Çev.: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
60. Garcia, S.J., Gellein, K., Syversen, T., Aschner, M., 2006, A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat, *Toxicological Sciences*, 92, 516-525 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

61. Gasser, T., 2005, Chapter 13: Parkin and its role in Parkinson's disease, Parkinson's Disease, CRC Press, U.S.A.
62. Gerhold, L.M., Rosewell, K.L., Wise, P.M., 2005, Suppression of VIP in the suprachiasmatic nucleus leads to aging-like alterations in cAMP rhythms and activation of gonadotropin-releasing hormone neurons, *The J. of Neuroscience*, 25 (1), 62-67 p.
63. Gerin, C., 2002, Behavioral improvement and dopamine release in a Parkinsonian rat model, *Neuroscience Letters*, 330, 5-8 p.
64. Golbe, L.I., 2005, Chapter 12: Alpha-synuclein and Parkinson's disease, Parkinson's Disease, CRC Press, U.S.A.
65. Goldman, J.G., Goetz, C.G., 2005, Chapter 1: James Parkinson, Parkinson's Disease, CRC Press, U.S.A.
66. Gonzales, C., Barroso, C., Martín, C., Gulbenkian, C., Estrada, C., 1997, Neuronal nitric oxide synthase activation by vasoactive intestinal peptide in bovine cerebral arteries, *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17, 977-984 p.
67. Gonzales-Rey, E., Chorny, A., Fernandez-Martin, A., Varela, N., Delgado, M., 2005, Vasoactive intestinal peptide family as a therapeutic target for Parkinson's disease, *Expert Opinion Ther. Targets*, 9 (5), 923-929 p.
68. Gonzalez-Rey, E., Delgado, M., 2008, Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells, *Brain, Behavior, and Immunity*, 22, 35-41 p.
69. Gressens, P., Hill, J.M., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E., 1993, Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured Mouse embryos, *Nature*, 362, 155-158 p.
70. Gurish, M.F., Boyce, J.A., 2006, Mast cells: Ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell, *J. of Allergy Clin. Immunol.*, 117, 1285-1291 p.
71. Gutierrez-Canas, I., Juarranz, Y., Santiago, B., Arranz, A., Martinez, C., Galindo, M., Paya, M., Gomariz, R.P., Pablos, J.L., 2005, VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts, *Rheumatology*, 45, 527-532 p.
72. Haber, S.N., Calzavara, R., 2008, The cortico-basal ganglia integrative network: the role of the thalamus, *Brain Research Bulletin*, in press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

73. Hamidi, S.A., Szema, A.M., Lyubsky, S., Dickman, k.g., Degene, A., Mathew, S.M., Waschek, J.A., Said, S.I., 2006, Clues to VIP function from konckout mice, *Ann. N.Y. Acad.*, 1070, 5-9 p.
74. Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, y., Miyazaki, I., Tanaka, K.-I., Ogawa, N., 2003, Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1619, 39-52 p.
75. Harem-Koçak, M., 2005, Mast Hücre Proteazları Ve Biyolojik Önemi, *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 14(1), 61-67 s.
76. Hashitani, T., Mizukawa, K., Kumazaki, M., Nishino, H., 1998, Dopamine metabolism in the striatum of hemiparkinsonian model rats with dopaminergic grafts, *Neuroscience Research*, 30, 43-52 p.
77. Hatzipetros, T., Yamamoto, B.K., 2006, Dopaminergic and GABAergic modulation of glutamate release from rat subthalamic nucleus efferents to the substantia nigra, *Brain Research*, 1076, 60-67 p.
78. Hauber, W., 1998, Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation, *Progress in Neurobiology Vol.*, 56, 507-540 p.
79. Hiller, A., Loeffler, S., Haupt, C., Litza, M., Hofmann, U., Moser, A., 2007, Electrical high frequency stimulation of the caudate nucleus induces local GABA outflow in freely moving rats, *J. of Neuroscience Methods*, 159, 286-290 p.
80. Hu, W., Xu, L., Pan, Jie, Zheng, X., Chen, Z., 2004, Effect of cerebral ischemia on brain mast cells in rats, *Brain Research*, 1019, 275-280 p.
81. Hua, W., Fan, Y., Shen, Y., Yang, Y., Dai, H., Fua, Q., Chena, Z., 2007, Mast cell-derived mediators protect against oxygen-glucose deprivation-induced injury in PC12 cells and neurons, *Neuroscience Letters*, 423, 35-40 p.
82. Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Takahashi, R., 2001, *Cell*, 105, 891-902 p.
83. Jegou, S., Javoy-Agid, F., Delbende, C., Tranchand-Bunel, D., Coy, D.H., Agid, Y., Vaudry, H., 1988, Regional distribution of vasoactive intestinal peptide in brains from normal and parkinsonian subjects, *Peptides*, 9, 787-793 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

84. Juarranz, M.G., Santiago, B., Torroba, M., Gutierrez-Canas, I., Palao, G., Galindo, M., Abad, C., Martinez, Leceta, J., Pablos, J.L., Gomariz, R.P., 2003, VIP modulates proinflammatory mediators synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells, *Rheumatology*, 43, 416-422 p.
85. Juarranz, Y., Abad, C., Martinez, C., Arranz, A., Gutierrez-Canas, I., Rosignoli, F., Gomariz, R.P., Leceta, J., 2005, Protective effect of VIP on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy*, 7, 1034-1045 p.
86. Juhasz, G., Katalin, A., Nyitrai, G., Dobolyi, A., Krogsgaard-Larsen, P., Schousboe, A., 1997, Differential effects of nipecotic acid and 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo 4,5-*c* pyridin-3-ol on extracellular γ -aminobutyrate levels in rat thalamus, *European Journal of Pharmacology*, 331 139-144 p.
87. Kaflin, R., Maulik, N., Engelman, R.M., Cordis, G.A., Milenov, K., Kasakov, L., Das, D.K., 1993, Protective rol of intracoronary VIP in ischemic and reperfused myocardium, *The J. of Pharm. and Exp. Therap.*, 268, 952-968 p.
88. Karacadağlı, T. Yörük, M., 2005, Mast Hücre Heterojenitesi, *YYÜ Vet Fak Derg.*, 16(2), 57-60 s.
89. Kawamoto, K., Okada, T., Kanan, Y., Ushio, H., Matsumoto, M., Matsuda, h., 1995, NGF prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the *trk* proto-oncogene receptor, *Blood*, 86 (12), 4638-4644 p.
90. Ke, Z.-J., Gibson, G.E., 2004, Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism, *Neurochemistry International*, 45, 361-369 p.
91. Kirik, D., Rosenblad, C., Björklund, A., 1998, Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6-OHDA in the rat, *Ex. Neurology*, 152, 259-277 p.
92. Kitta, T., Matsumoto, M., Hiroshi T., Mitsui, T., Yoshioka, M., Nonomura, K., 2008, GABAergic mechanism mediated via D1 receptors in the rat periaqueductal gray participates in the micturition reflex: an in vivo microdialysis study, *European Journal of Neuroscience*, 27, 3216-3225 p.
93. Korell, M., Taner, C.M., 2005, Chapter 5: Epidemiology of Parkinson's disease: an overview, *Parkinson's Disease*, CRC Press, U.S.A.
94. Kovacs, P., Hernadi, I., Wilhelm, M., 2006, Mast cells modulate maintained neuronal activity in the thalamus in vivo, *J. of Neuroimmunology*, 171, 1-7 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

95. Kószegei, Z., Kovács, P., Wilhelm, M., Atlasz, T., Babai, N., Kállai, V., Hernádi, I., 2006, The application of in vivo microiontophoresis for the investigation of mast cell–neuron interactions in the rat brain, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 69, 227–231 p.
96. Kukla, M., Sheen, C.H., Tancowny, B.P., Gramer, L.C., Schleimer, R.P., 2007, Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production, *Immunology*, 123, 398-410 p.
97. Kumar, A., Huang, Z., Calne, D.B., 2005, Chapter 4: Parkinson's disease: where are we?, *Parkinson's Disease*, CRC Press, U.S.A.
98. Laburthe, M., Couvineau, A., 2002, Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP, *Regulatory Peptides*, 108, 165–173 p.
99. Lai, B.C.L., Marion, S.A., Teschke, K., Tsui, J.K.C., 2002, Occupational and environmental risk factors Parkinson's disease, *Parkinsonism and Related Disorders*, 8, 297-309 p.
100. Lee-Rueckert, M., Kovanen, P.T., 2006, Mast cell proteases: Physiological tools to study functional significance of high density lipoproteins in the initiation of reverse cholesterol transport, *Atherosclerosis*, 189, 8–18 p.
101. Lelievre, V., Favrais, G., Abad, C., Adle-Biassette, H., Lu, Y., Germano, P.M., Cheung-Lau, G., Piseigna, J.R., Gressens, P., Lawson, G., Waschek, J.A., 2007, Gastrointestinal dysfunction in mice with a targeted mutation in the gene encoding vasoactive intestinal polypeptide: a model for study of intestinal ileus and Hirschsprung's disease, *Peptides*.
102. Letourneau, R., Rozniecki, J.J., Dimitriadou, V., Theoharides, T.C., 2003, Ultrastructural evidence of brain mast cell activation without degranulation in monkey experimental allergic encephalomyelitis, *J. of Neuroimmunology*, 145, 18-26 p.
103. Lev, N., Melamed, E., Offen, D., 2003, Apoptosis and Parkinson's disease, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27, 245-250 p.
104. Luo, Y., Henricksen, L.A., Giuliano, R.E., Prifti, L., Callahan, L.M., Federoff, H.J., 2007, VIP is a transcriptional target of Nurr 1 in dopaminergic cells, *Experimental Neurology*, 203, 221-232 p.
105. Maccarrone, M., Battista, N., Centonze D., 2007, The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: A comparison with other neurodegenerative diseases, *Progress in Neurobiology*, 81, 349–379 p.
106. Maguire-Zeiss, K.A., Mhyre, T.R., Federoff, H.J., 2008, Gazing into the future: Parkinson's disease gene therapeutics to modify natural history, *Experimental Neurology*, 209, 101–113 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

107. Marchetti, B., Abbracchio, M.P., 2005, To be or not to be (inflamed)-is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?, *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 26, No. 10, 517-525 p.
108. Marshall, J.S., Stead, R.H., McSharry, c., Nielsem, L., Bienenstock, J., 1990, The role of mast cell degranulation products in mast cell hyperplasia, *The J. of Immunology*, 144, 1886-1892 p.
109. Marti, M., Trapella, C., Morari, M., 2008, The novel nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist Trap-101 alleviates experimental parkinsonism through inhibition of the nigro-thalamic pathway: positive interaction with L-DOPA, *J. of Neurochemistry*, 107, 1683-1696 p.
110. Masmoudi-Kouki, O., Gandolfo, P., Castel, H., Leprince, J., Fournier, A., Dejda, A., Vaundry, H., Tonom, M.-C., 2007, Role of PACAP and VIP in astroglial functions, *Peptides*, 28, 1753-1760 p.
111. Maurer, M., Theoharides T., Granstein, R.D., Bischoff, S.C., Bienenstock, J., Henz, B., Kovanen, P., Piliponsky, A.M., Kambe, N., Vliagoftis, H., Levi-Schaffer, F., Metz, M., Miyachi, Y., Befus, D., Forsythe, P., Kitamura, Y., Gall, S., 2003, What is the physiological function of mast cells?, *Experimental Dermatology*, 12, 886-910 p.
112. McCauley, S.D., Gilchrist, M., Befus, A.D., 2005, Nitric oxide: a major determinant of mast cell phenotype and function, *Mem Inst Cruz*, 100 (Suppl.), 11-14 p.
113. McMenamin, C., Haig, D.M., Gibson, S., Newlands, G.F.J., Miller, H.R.P., 1987, Phenotypic analysis of mast cell granule proteinases in normal rat bone marrow cultures, *Immunology*, 60, 147-149 p.
114. Megistretti, P.J., 1990, VIP neurons in the cerebral cortex, *TIPS*, Vol. 11, 250-254 p.
115. Mélik-Parsadaniantz, S., Rostène, W., 2008, Chemokines and neuromodulation, *Journal of Neuroimmunology*, 198, 62-68 p.
116. Metz, M., Maurer, M., 2007, Mast cells – key effector cells in immune responses, *Trends in Immunol*, in press.
117. Miklic, S., Juric, D.M., Carman-Krzan, M., 2004, Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes, *Int. J. Devl Neuroscience*, 22, 119-130 p.
118. Mink, J.W., 1999, Chapter 34: Basal ganglia, *Fundamental Neuroscience*, Academic press, U.S.A.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

119. Moalem, G., Tracey, D.J., 2006, Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain, *Brain Research*, 51, 240-262 p.
120. Mora, F., Segovia, G., Arco A., 2008, Glutamate–dopamine–GABA interactions in the aging basal ganglia, *Brain Research Reviews*, 58, 340–353 p.
121. Mukaetova-Ladinska, E.B., McKeith, I.G., 2006, Pathophysiology of synuclein aggregation in Lewy body disease, *Mechanisms of Ageing and Development*, 127, 188–202 p.
122. Murrin, L.C., 2005, Chapter 3: The role of dopamine in Parkinson's disease: a historical review, *Parkinson's Disease*, CRC Press, U.S.A.
123. O'Connor, W.T., 1998, Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia as Studied by *Dual-Probe* Microdialysis, *Nuclear Medicine & Biology*, 25, 743–746 p.
124. Offen, D., Sherki, Y., Melamed, E., Fridkin, M., Brenneman, D.E., Gozes, I., 2000, VIP prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease, *Brain Research*, 854, 257-262 p.
125. Özdemir, Ö., 2004, Mast Hücreleri ve Kanseri: Tümör Dokusunda Mast Hücre Yoğunluğu, Etkileyen Faktörler ve Mast Hücre-Tümör Etkileşimleri, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 1- 8 s.
126. Pakbaz, H., Berisha, H., Foda, H.D., Absood, A., Said, S.I., 1994, Vasoactive intestinal peptide (VIP) and related peptides: a new class of anti-inflammatory agents?, Singapore: World Scientific Publishing, 597-605 p.
127. Pejler, G., Berg, L., 1995, Regulation of rat mast cell protease 1 activity, *Eur. J. Biochem.*, 233, 192-199 p.
128. Pemberton, A.D., Brown, J.K., Wright, S.H., Knight, P.A., McPhee, M.L., McEuen, A.R., Forse, P.A., Miller, H.R.P., 2003, Purification and characterization of mouse mast cell proteinase-2 and the differential expression and release of mouse mast cell proteinase-1 and -2 in vivo, *Clin Exp Allergy*; 33, 1005–1012 p.
129. Petzinger, G.M., Jakowec, M.W., 2005, Chapter 34: Animal models of basal ganglia injury and degeneration and their application to Parkinson's disease research, *Parkinson's Disease*, CRC Press, U.S.A.
130. Phylinda L. S., Nutt, J.G., Holford, N.H.G., 2007, Levodopa Slows Progression of Parkinson's Disease: External Validation by Clinical Trial Simulation, *Pharmaceutical Research*, 24, No: 4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

131. Pilzer, I., Gozes, I., 2006, VIP provides cellular protection through a specific splice variant of the PACAP receptor: A new neuroprotection target, *Peptides*, 27, 2867-2876 p.
132. Plaha, P., Filipovic, S., Gill, S.S., 2008, Induction of parkinsonian resting tremor by stimulation of the caudal zona incerta nucleus: a clinical study, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 514–521 p.
133. Polymeropoulos, M.H., Genetics of Parkinson's Disease, *Annals New York Academy Of Sciences*.
134. Poncet, J., Denoroy, L., Pequignot, L., Lagercrantz, J.M., Dalmaz, H., 1999, Plasticity in the phenotypic expression of catecholamines and vasoactive intestinal peptide in adult rat superior cervical and stellate ganglia after long-term hypoxia *in vivo* Peyronnet, *Neuroscience Vol. 91*, No. 3, 1183–1194 p.
135. Pozo, D., Delgado, M., 2004, The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide?, *FASEB J.*, 18, 1325-1334 p.
136. Priyadarshi, A., Khuder, S.A., Schaub, E.A., Priyadarshi, S.S., 2001, Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: A Metaanalysis, *Environmental Research*, 86, 122-127 p.
137. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.-S., Mcnamara, J.O., Williams, S.M., 2004, Modulation of movement by the basal ganglia, *Neuroscience*, 3.th Ed., 417-434 p.
138. Rangel-Barajas, C., Silva, I., Garcia-Ramirez, M., Sanchez-Lemus, E., Floran, L., Aceves, J., Erij, D., Florana B., 2008, 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated [3H]-GABA release and [3H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat, *Neuropharmacology*, 55, 704-711 p.
139. Ratner, M.H., Feldman, R.G., 2005, Chapter 6: Environmental toxins and Parkinson's disease, *Parkinson's Disease*, CRC Press, U.S.A.
140. Reglodi, D., Lubics, A., Tamás, A., Szalontay, L., Lengvári, I., 2003, Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease, *Behavioural Brain Research*.
141. Revhaug, A., Lygren, I., Jenssen, T.G., Giercksky, K.-E., Burhol, P.G., 1988, Vasoactive intestinal peptide in sepsis and shock, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 527, 536-545 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

142. Riaz, S.S., Bradford, H.F., 2005, Factors involved in the determination of the neurotransmitter phenotype of developing neurons of the CNS: Applications in cell replacement treatment for Parkinson's disease, *Progress in Neurobiology*, 76, 257–278 p.
143. Richards, D. A., Lemos, T., Whitton, P. S., 1995, Bowery, N. G., Extracellular GABA in the Ventrolateral Thalamus of Rats Exhibiting Spontaneous Absence Epilepsy : A Microdialysis Study, *J. Neurochem.*, 65, 1674-1680 p.
144. Rivera, J., Gilfillan, A.M., 2006, Molecular regulation of mast cell activation, *J Allergy Clin Immunol*, 117, 1214-1225 p.
145. Rommelfanger KS, Weinshenker D., 2007, Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease, *Biochem Pharmacol*.
146. Rostene, W.H., 1984, Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (VIP), *Progress in Neurobiology*, 22, 103-129 P.
147. Rouleau, A., Dimitriadou, V., Tuong M.D.T., Newlands, G.F.J., Miller, H.R.P., Schwartz, J. C., Garbarg, M., 1997, Mast cell specific proteases in rat brain: Changes in rats with experimental allergic encephalomyelitis, *J Neural Transm*, 104, 399-417 p.
148. Rozniecki, J.J., Dimitriadou, V., Lambracht-Hall, M., Pang, X., Theoharides, T.C., 1999, Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell–neuron interactions in vitro and in vivo, *Brain Research*, 849, 1–15 p.
149. Said, S.I., 1995, Vasoactive intestinal peptide, Airways smooth muscle: Peptide Receptors, Ion Channels and Signal Transduction, Chapter:4.
150. Said, S.I., Berishka, H.I., Pakbaz, H., 1995, NMDA receptors outside the central nervous system: activation causes acute lung injury that is mediated by nitric oxide synthesis and prevented by vasoactive intestinal peptide, *Neuroscience*, Vol. 65, No. 4, 493-496 p.
151. Sand, E., et al., 2008, Mast cells reduce survival of myenteric neurons in culture, *Neuropharmacology*.
152. Syed, N., Murphy, J., Zimmerman, T., Mark, M.H., Sage, J.I., 1998, Ten Years' Experience With Enteral Levodopa Infusions for Motor Fluctuations in Parkinson's Disease, *Movement Disorders*, Vol. 13, No. 2, 336-338.
153. Sedgwick D.M., Ferguson, A., 1994, Dose-response studies of depletion and repopulation of rat intestinal mucosal mast cells after irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 65, No. 4, 483-495 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

154. Sellbach, A.N., Boyle, R.S., Silburn, P.A., Mellick, G.D., 2006, Parkinson's disease and family history, *Parkinsonism and Related Disorders*, 12, 399–409 p.
155. Sheward, W.J., Lutz, E.M., Copp, A.J., Harmar, A.J., 1998, Expression of PACAP, and PACAP type 1 PAC receptor mRNA 1 during development of the mouse embryo, *Developmental Brain Research*, 109, 245–253 p.
156. Shoge, K., Mishima, H.K., Saitoh, T., Ishihara, K., Tamura, Y., Shiomi, H., Sasa, M., 1999, Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons, *Brain Research*, 839, 66-73 p.
157. Siegel, G.J., Chauhan, N.B., 2000, Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain, *Brain Research Reviews*, 33, 199–227 p.
158. Silva, D., Ferraz, V. P., 2008, Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and Glutamate determination in regions of the rodent brain, *Journal of Neuroscience Methods*, in press. 198
159. Silver, R., Silverman, A.-J., Lederhendler, I.I., 1996, Mast cells in the brain: evidence and functional significance, *Trends in Neuroscience*, 19, 25-31 p.
160. Sim, A.T.R., Ludowyke, R.I., Verrills, N.M., 2006, Mast cell function: Regulation of degranulation by serine/threonine phosphatases, *Pharmacology & Therapeutics*, 112, 425-439 p.
161. Singh, S., Dikshit, M., 2007, Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: Involvement of nitric oxide, *Brain Res. Rev.*, in pres.
162. Singh, N., Pillay, V., Choonara, Y.E., 2007, Advances in the treatment of Parkinson's disease, *Progress in Neurobiology*, 81, 29–44 p.
163. Skaper, D.S., Pollock, M., Facci, Laura, 2001, Mast cells differentially Express and release active high molecular weight neurotrophins, *Molecular Brain Research*, 97, 177-185 p.
164. Staines, D.R., 2006, Postulated vasoactive neuropeptide autoimmunity in fatigue-related conditions: A brief review and hypothesis, *Clinical & Developmental Immunology*, 13, 25-39 p.
165. Staines, D.R., 2007, Is Parkinson's disease an autoimmune disorder of endogenous vasoactive neuropeptides?, *Medical Hypotheses*, 69, 1208–1211 p.
166. Stanis, A.M., Befus, D., Bienenstock, J., 1986, Differential effects of VIP, substance p, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- patches, mesenteric lymph nodes, and spleen, *The Journal of Immunology*, Vol. 136, No. 1, 152-156 p.
167. Stead, R.H., Colley, E.C., Wang, B., Partosoedarso, E., Lin, J., Stanisz, A., Hillsley K., 2006, Vagal influences over mast cells, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 125, 53–61 p.
168. Struve, M.F., McManus, B.E., Wong, B.A., Dorman, D.C., 2007, Basal ganglia neurotransmitter concentrations in rhesus monkeys following subchronic manganese sulfate inhalation, *Am. J. of Industrial Medicine*, 50, 772–778 p.
169. Sun, F., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G., 2007, Environmental neurotoxic chemicals-induced ubiquitin proteasome system dysfunction in the pathogenesis and progression of Parkinson's disease, *Pharmacology & Therapeutics*, 114, 327–344 p.
170. Sur, R., Cavender, D., Malaviya R., 2007, Different approaches to study mast cell functions, *Int Immunopharmacol.*
171. Suzuki, R., Furuno, T., Okamoto, K., Teshima, R., Nakanishi, M., 2007, ATP plays a role in neurite stimulation with activated mast cells, *Journal of Neuroimmunology*, 192, 49–56 p.
172. Taiwo, O.B., Kovacs, K.J., Sun, Y., Larson, A.A., 2005, Unilateral spinal nerve ligation leads to an asymmetrical distribution of mast cells in the thalamus of female but not male mice, *Pain*, 114, 131–140 p.
173. Tan, C.O., Bullock, D., 2008, Neuropeptide co-release with GABA may explain functional non-monotonic uncertainty responses in dopamine neurons, *Neuroscience Letters*, 430, 218–223 p.
174. Tanaka, K., Ogawa, N., 2005, Dopamine agonist cabergoline inhibits levodopa-induced caspase activation in 6-OHDA-lesioned mice, *Neuroscience Research*, 51, 9-13 p.
175. Tanaka, S., Koike, T., 1994, VIP suppresses neuronal cell death induced by NGF deprivation in rat sympathetic ganglion cells in vitro, *Neuropeptides*, 26, 103-111 p.
176. Theoharides, T.C., 1996, The mast cell: A neuroimmunoendocrine master player, *Int. J. Tiss. Reac.*, 18 (1), 1-21 p.
177. Theoharides, T.C., Donelan, J., Kandere-Grzybowska, K., Konstantinidou, A., 2005, The role of mast cells in migraine pathophysiology, *Brain Research Reviews*, 49, 65– 76 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 178.Theoharides, T.C., Kempuraj, D., Tagen, M., Conti, P., Kalogeromitros, D., 2007, Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation, *Immunological Reviews*, 217, 65-78 p.
- 179.Theoharides, T.C., Mast cells: The immune gate to the brain, *Life Sciences*, 46, 607-617 p.
- 180.Tıkız, H., Tunçel, N., Akın, M.Z., Gürer, F., 1992, The effect of VIP and Naloxone combination on survival rates an rats exposed to severe hemorrhage, *Peptides*, 12, 83-89 p.
- 181.Tore, F., Reynier-Rebuffel, A.M., Tunçel, N., Aubineau, P., Callebert, J., 2002, Effects of sepsis on mast cells in rat dura mater: influence of L-NAME and VIP, *British Journal of Pharmacology*, 134, 1367-1374 p.
- 182.Touchona, J.C., Holmera, H.K., Moorea, C., McKeeb, B.L., Fredericksona, J., Meshu, C.K., 2005, Apomorphine-induced alterations in striatal and substantia nigra pars reticulata glutamate following unilateral loss of striatal dopamine, *Experimental Neurology*, 193, 131– 140 p.
- 183.Tunçel, N., 1993Mast cells, VIP, and the hemorrhagic shock: a possible relationship?, *Biomedical Reviews*, 2, 37-46 p.
- 184.Tunçel, N., Başmak, H., Uzuner, K., Tunçel, M., Altiokka, G., Zaimoglu, V., et al., 1996, Protection of rat retina from ischemia–reperfusion injury by vasoactive intestinal peptide (VIP): the effect of VIP on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of retina and choroid, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*,805, 489–98 p.
- 185.Tunçel, N., Erden, S., Uzuner, K., Altiokka, G., Tunçel, M., 1996, Ischemic-Reperfused rat skeletal muscle: the effect of VIP on contractile force, oxygenation ond antioxidant enzyme systems, *Peptides*, Vol. 18, No. 2, 269-275 p.
- 186.Tunçel, N., Gürer, F., Aral, E., Aral, E., Uzuner, K., Aydın, Y., Bayçu, C., 1996, The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on mast cell invasion/degranulation in testicular interstitium of immobilized + cold stressed and beta endorphin-treated rats, *Peptides*,17, 817–824 p.
- 187.Tunçel, N., Töre, F., Şahintürk, V., Ak, D., Tunçel, M., 2000, Vazoactive intestinal peptide inhibits degranulation and changes granular content of mast cells: a potential therapeutic strategy in controlling septic shock, *Peptides*, 21, 81-89 p.
- 188.Tunçel, N.,Sener, E., Cerit, C., Karasu, U., Gürer, F., Sahinturk, V., Baycu, C., Ak, D., Filiz, Z., 2005, Brain mast cells and therapeutic potential of vasoactive intestinal peptide in a Parkinson’s disease model in rats: Brain microdialysis, behavior, and microscopy; *Peptides*, 26, 827–836 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

189. Uberti, D., Carsna, T., Francisconi, S., Toninelli, G.F., Canonico, P.L., Memo, M., 2004, A novel mechanism for pergolide-induced neuroprotection: inhibition of NF- κ B nuclear translocation, *Biochemical Pharmacology*, 67, 1743-1750 p.
190. Valent, P., 1994, The riddle of the mast cell: kit (CD117)-ligand as the missing link?, *Immunology Today*, Vol.15, No. 3, 111-113 p.
191. Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84 p.
192. Wakabayashi, K., Takahashi, H., Ohama, E., Ikuta, F., 1990, Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system, *Acta Neuropathol*, 79 : 581 – 583 p.
193. Ward, R.J., Lallemand, F., De Witte, P., Dexter, D.T., 2008, Neurochemical pathways involved in the protective effects of nicotine and ethanol in preventing the development of Parkinson's disease: Potential targets for the development of new therapeutic agents, *Progress in Neurobiology*, 85, 135-147 p.
194. Welle, M., 1997, Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase, *J. of Leukocyte Biology*, 61, 233-245 p.
195. Wilhelm, M., Silver, R., Silverman, A.J., 2005, Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation, *Eu. J. of Neuroscience*, 22, 2238-2248 p.
196. Wright, A.K., Miller, C., Williams, M., Arbuthnott, G., 2008, Microglial activation is not prevented by tacrolimus but dopamine neuron damage is reduced in a rat model of Parkinson's disease progression, *Brain Research*, 1216, 78-86 p.
197. Zackhaim, J., Abercrombie, E.D., 2005, Thalamic regulation of striatal acetylcholine efflux is both direct and indirect and qualitatively altered in the dopamine-depleted striatum, *Neuroscience*, 131, 423-436 p.
198. Zeyden, M., Oldenzel, W.H., Rea, K., Cremers, T.I., Westerink, B.H., 2008, Microdialysis of GABA and glutamate: Analysis, interpretation and comparison with microsensors, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 90, 135-147 p.

PDF Eraser Free

199. Ziemssen T., Reichmann H., 2007, Non-motor dysfunction in Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.*, in press.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel

Adı ve soyadı : Orhan Tansel KORKMAZ
Doğum tarihi v eyeri : 1979, Erzincan
Medeni durumu : Bekar
İletişim Bilgileri : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fak.

FizyolojiAb.Dalı,

26480 Meşelik/ESKİŞEHİR

E-mail: tanselhan@gmail.com,

Eğitim

2004 – **Doktora** Fizyoloji Anabilim Dalı., Eskişehir Osmangazi
Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Eskişehir

Y.Lisans --

2004 **Lisans** Biyoloji, Fen-Edebiyat Fakültesi, ESOGÜ,
Eskişehir

1996 **Lise** Samsun Ondokuzmayıs Lisesi, Samsun

Yayınlar (SCI indeks)

E. Sener, **O.T. Korkmaz**, D. Yeniceci, D. Dogrukol-Ak, M. Tuncel, N. Tuncel ,
Determination of Carbamazepine and Its Main Metabolite Carbamazepine 10, 11-
Epoxide in Rat Brain Microdialysate and Blood Using ESI- LC/MS (Ion Trap).,
Chromatographia , 2007

Poster,Sunum, v.b.

E. Sener, **O.T. Korkmaz**, D. Yeniceci, D. Dogrukol-Ak, M. Tuncel, N. Tuncel ,
Determination of Carbamazepine and Its Main Metabolite Carbamazepine 10, 11-
Epoxide in Rat Brain Microdialysate and Blood Using ESI- LC/MS (Ion Trap).,
Pharmaceutical Science World Congress 3. PSWC, Poster Bildiri, Amsterdam,
Hollanda, 2007

Kurs,Kongre, v.b.

- “Optofizyoloji ve konfokal mikroskopi” kurs, Hacettepe Üniveristesi,
Ankara/Türkiye,2005

PDF Eraser Free

- “Biosensörler” kurs, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir/Türkiye,2004
- “Davranış ve Beyin” (Watson-Paxinos)” Sempozyum,Kurs, Ege Üniversitesi, İzmir/Türkiye,2005
- “Beyin mikrodializi-Stereotaksimetre” Kurs, Uludağ Üniversitesi, Bursa/Türkiye, 2006
- “TICAM- Deneysel hayvan çalışmaları” Kurs, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir/Türkiye, 2004
- “TICAM- Deneysel hayvan çalışmaları, beyin mikro cerrahisi” Kurs, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir/Türkiye, 2006