



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE VAZOAKTİF
İNTESTİNAL PEPTİT (VIP)'İN NÖRON KORUYUCU
ETKİSİNE ASTROSİT HÜCRELERİNİN KATKISI**

DOKTORA TEZİ

Dr. İBRAHİM HALİL YELKENLİ

DANIŞMAN

PROF. DR. NEŞE TUNÇEL

2014



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE VAZOAKTİF
İNTESTİNAL PEPTİT (VIP)'İN NÖRON KORUYUCU
ETKİSİNE ASTROSİT HÜCRELERİNİN KATKISI**

DOKTORA TEZİ

Dt. İBRAHİM HALİL YELKENLİ

DANIŞMAN

PROF. DR. NEŞE TUNÇEL

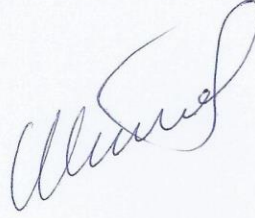
Proje No:201211028

KABUL VE ONAY SAYFASI

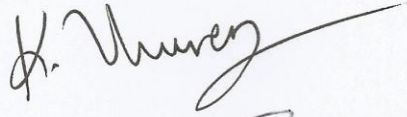
Dt.İbrahim Halil YELKENLİ'nin Doktora Tezi olarak hazırladığı “ **Deneysel Parkinson Modelinde Vazoaktif İntestinal Peptit (VIP)'in Nöron Koruyucu Etkisine Astrosit Hücrelerinin Katkısı** ” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek “**KABUL**” edilmiştir.

26/12/2014

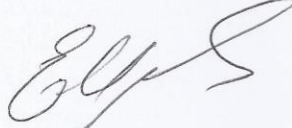
Üye : Prof.Dr.Neşe TUNÇEL (Danışman)



Üye : Prof.Dr.Kubilay UZUNER



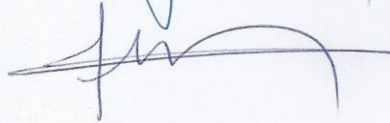
Üye : Prof.Dr.Emel ULUPINAR



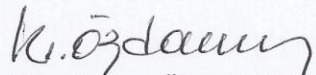
Üye : Prof.Dr.Bayram YILMAZ



Üye : Prof.Dr.Fatma TÖRE



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.12.2014 tarih ve 1028./4812... sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

Özet

Parkinson hastalığı, substantia nigradan striatuma gelen dopaminerjik nöron kayıplarına bağlı bazal ganglionların hastalığıdır ve halen etkin bir tedavisi bulunmamaktadır. Tedavi amaçlı uygulanan yöntemler, nöron hasarını durdurma ve yavaşlatmada kısıtlı bir fayda sağlarken, birçok yan etkiye neden olmaktadır. Vazoaktif İntestinal Peptid (VİP) çok yönlü doku koruyucu etkisi nedeniyle Parkinson hastalığının tedavisinde umut verici bir molekül olarak deneysel Parkinson modellerinde kullanılmıştır. VİP'in nörodejenerasyonu engellemedeki etki mekanizmasını açığa kavuşturmak için çalışmalar devam etmektedir. Nöron koruyucu etkisini gösterdiği yollardan birisinin de astrositler üzerinden olabileceği düşünülmektedir. Astrositler, nöron koruyucu özelliklerini beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nöron büyüme faktörü (NGF), aktiviteye bağlı nörotrofik protein (ADNP), hidrojen sülfür (H₂S), glutatyon (GSH), laktat ve gamma-aminobutirik asit (GABA) gibi bazı molekülleri salıvererek gerçekleştirmektedir. Bunlar arasında astrositlerden ADNP'nin salıverilmesini uyaran başlıca molekülün de VİP olduğu bildirilmiştir. VİP'in, parkinson modelinde, nöron koruyucu etkisinde, astrositlerden salıverilen moleküllerle ilişkili çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, sıçanlarda 6-hidroksidopamin (6-OHDA) verilerek oluşturulan parkinson modelinde VİP'in nöron koruyucu etki mekanizmasına astrosit hücrelerinin katkısı araştırılmıştır.

Deneyler, her iki cinsiyet grubundan Spraque-Dawley sıçanlar kullanılarak üç grupta gerçekleştirilmiştir. 1- Taklit grubu, 2- Parkinson modeli 3- Parkinson modeli oluşturulan ve VİP verilen grup.

Sıçanlara motor fonksiyon testini takiben mikrodiyaliz uygulanmıştır. Mikrodiyalizatlarda, GABA, glutamat, GSH ve laktat düzeyleri ölçülmüştür. Mikrodiyaliz işleminden sonra beyinler immunohistokimyasal olarak incelenmiştir.

VİP tedavisi, reaktif astrogliazisi etkilemezken, motor fonksiyon bozukluklarını düzeltmiş, GSH düzeylerini kontrol değerlerine geriletmiş, GABA ve glutamat düzeylerini artırmıştır. VİP, striatumda GAD(+) ve ADNP(+) nöron sayısını artırmıştır.

6-OHDA ile oluşturulan nörodejenerasyon sonrasında striatal astrositlerin öncelikle savunmaya yönelik olarak aktive oldukları, VİP'in nöronları direkt etkileyerek koruduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: 6-OHDA, Mikrodiyaliz, VİP, GABA, Astrosit, ADNP, GSH, glutamat, laktat

Summary

Parkinson's disease, still having no effective treatment, is a disorder of basal ganglia based on the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Current available treatments frequently induce major side effects and have limited beneficial effects in halting and slowing down the progression of underlying neurodegenerative process. Vasoactive Intestinal Peptid (VIP) has been found to be protective in experimental Parkinson models. VIP is able to show its neuroprotective effect via diverse pathways. Ongoing studies continue to clarify the mechanism of VIP against neurodegeneration. It has been thought that one of these pathways might occur via astrocytes. Astrocytes protect neurons by releasing certain molecules such as Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Nerve Growth Factor (NGF), Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP), Hydrogen Sulphur (H₂S), Glutathion (GSH), lactate and Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). It has been shown that the main molecule inducing the release of ADNP from astrocytes is VIP. As far as we know, there is no study investigating the neuroprotective effect of VIP in correlation with the activity of astrocytes in the experimental Parkinson models.

In this thesis study, contribution of astrocytes on the neuroprotective effects of VIP was investigated in the 6-OHDA Parkinson model of rats.

Adult Sprague-Dawley rats (both gender) were divided into three groups.

1- Sham operated 2- Unilaterally 6-OHDA lesioned (Parkinson model) and 3- Unilaterally 6-OHDA lesioned and i.p. VIP-injected (25 ng/kg).

Following the motor-function tests, brain microdialysis was applied. In the microdialysis samples; GABA, glutamate, GSH and lactate levels were measured by HPLC. After microdialysis, brains were examined by immunohistochemical methods.

VIP treatment did not influence the reactive astrogliosis, yet reversed the motor-function disorders and decreased the GSH levels to the control values. In addition, it increased the GABA and glutamate levels as well as the number of GAD (+) and ADNP (+) neurons in the striatum.

Our results show that in neurodegeneration induced by 6-OHDA, striatal astrocytes has been activated for defense at the beginning, and VIP protects neurons by directly influencing them.

Key Words: 6-OHDA, Microdialysis, VIP, GABA, Astrocyte, ADNP, GSH, glutamate, lactate

İçindekiler

Özet.....	i
Summary	ii
İçindekiler.....	iii
Tablo Dizini	iv
Şekil Dizini.....	v
Simge ve Kısaltmalar Dizini	vii
1.Giriş Ve Amaç.....	1
2.Genel Bilgiler	3
2.1. Bazal Ganglionlar (BG)	3
2.1.1. Direkt ve indirekt yol devresinin kimyası.....	6
2.2. Parkinson Hastalığı (PH)	10
2.2.1. Parkinson Hastalığındaki Nörodejenerasyonun Nedenleri.....	11
2.2.2. Parkinson Hastalığında Tedavi Yaklaşımları	14
2.3. Vazoaktif İntestinal Peptit (VIP).....	17
2.4. Astrositler.....	21
2.4.1. Astrosit hücrelerinin fonksiyonları	22
3- Gereç Ve Yöntemler	35
3.1. Kullanılan Materyaller.....	35
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	35
3.1.2. Kullanılan cihazlar	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Deneysel Parkinson modeli oluşturulması.....	37
3.2.2. Rotasyonmetrik Ölçüm	38
3.2.3. Mikrodiyaliz.....	38
3.2.4. Ekstraselluler GSH,Laktat,Glutamat ve GABA düzeylerinin ölçümü.....	39
3.2.4.1. GSH, Glutamat ve GABA' nın kromatografi analizi	40
3.2.4.2. Laktik asit'in kromatografi analizi	40
3.2.5. Histolojik incelemeler için yapılan işlemler.....	41
3.2.5.1. Perfüzyon Fiksasyonu	41
3.2.5.2. İmmünohistokimyasal İşlemler	41
3.2.5.2.1. İmmünohistokimyasal (İHK) Boyama.....	41
3.2.6. İstatistiksel değerlendirme	45
4- Bulgular.....	46
4.1. Rotasyonmetrik veriler	46
4.2. Mikrodiyaliz örneklerinden HPLC yöntemi ile yapılan ölçümler.....	46
4.3. Histolojik veriler	51
5- Tartışma	61
6- Sonuç ve Öneriler	68
Kaynaklar Dizini.....	69

Tablo Dizini

Tablo 1: İmmünohistokimyasal olarak tekli ve ikili işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları

Şekil Dizini

- Şekil 2.1.** : Bazal Ganglionlar ve Yerleşimleri
- Şekil 2.2.** : Normal Durumlarda Bazal Ganglion Devresi.
- Şekil 2.3.** : Parkinson Hastalığında Bazal Ganglion Devresi.
- Şekil 2.4.** : Glutamat-Glutamin Döngüsü.
- Şekil 2.5.** : Astrosit-Nöron Laktat Dolaşımı.
- Şekil 2.6.** : GSH Sentezi, GSH-GSSG-GSH Redoks Döngüsü
- Şekil 3.1.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde Korpus striatumda GFAP(+), ADNP(+) ve GAD(+) hücre sayımlarının yapıldığı bölgeler.
- Şekil 3.2.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde Korpus striatumda İmmünohistokimyasal olarak ikili işaretlenmiş hücreler.
- Şekil 3.3.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde Korpus striatumda immünohistokimyasal olarak ikili işaretlenmiş hücreler.
- Şekil 4.1.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde Rotasyonmetrik verilerin bar grafik görüntüsü.
- Şekil 4.2.** : GSH, glutamat, GABA standart numunelerinin HPLC yöntemiyle ölçülen analitik kromatogram sonuçları
- Şekil 4.3.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda GSH, glutamat, GABA örnek mikrodializ numunelerinin HPLC yöntemiyle ölçülen analitik kromatogram sonuçları.
- Şekil 4.4.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda ölçülen GABA sonuçları.
- Şekil 4.5.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda ölçülen glutamat sonuçları.
- Şekil 4.6.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda ölçülen GSH sonuçları
- Şekil 4.7A.** : HPLC yöntemiyle ölçülen Laktik asit standart numunelerinin analitik kromatogram sonuçları
- Şekil 4.7B.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatuma ait mikrodializ numunelerinde HPLC yöntemiyle ölçülen Laktik asit analitik kromatogram sonuçları

- Şekil 4.8.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda ölçülen laktat sonuçları.
- Şekil 4.9.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (μm^2) GFAP(+) hücre sayıları.
- Şekil 4.10.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumdaki GFAP(+) hücre görüntüleri.
- Şekil 4.11.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (μm^2) GAD(+) hücre sayıları.
- Şekil 4.12.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (μm^2) GFAP(+)/GAD(+) hücre sayıları.
- Şekil 4.13.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumdaki GFAP(+)/GAD(+) ikili işaretli hücre görüntüleri
- Şekil 4.14.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (μm^2) ADNP(+) hücre sayıları.
- Şekil 4.15.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (μm^2) GFAP(+)/ADNP(+) hücre sayıları.
- Şekil 4.16.** : Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumdaki GFAP(+)/ADNP(+) ikili işaretli hücre görüntüleri

Simge ve Kısaltmalar Dizini

3MST	:3-Merkaptopiruvate Sülfür Transferaz
6-OHDA	:6-hidroksi dopamin
ADNP	:Aktiviteye bağlı nöron koruyucu protein
ANLS	:Astrosit- nöron laktat mekiği
AP	:Alkalen fosfataz
BG	:Bazal ganglionlar
BOS	:Beyin-omurilik sıvısı
CBS	:Sistation β -Sentaz
CCW	:Saat Yönünün Tersisi
CGL	:Sistation γ -Lyaz
CO	:Karbon monoksit
COMT	:Katekol-O-metil-transferaz
DOPAC	:Dihidroksi fenilasetik asit
CW	:Saat Yönü
EAAT	:Eksitatör amino asit taşıyıcısı
GABA	: γ -amino butirik asit
GABA-T	:GABA-Transaminaz
GAD	:Glutamik asit dekarboksilaz
GAT	:GABA taşıyıcısı
GDNF	:Glial nörotrofik faktör
GFAP	:Glial fibriler asidik protein
GHRH	:Büyüme hormonu-salan hormon
GLUT	:Glukoz taşıyıcısı
GPe	:Globus pallidus externus
GPi	:Globus pallidus internus
GPx	:Glutasyon Peroksidaz
GR	:Glutasyon redüktaz
GS	:Glutasyon Sentaz
GSH	:Glutasyon
GSSG	:Okside glutasyon
H ₂ O ₂	:Hidrojen peroksit
H ₂ S	:Hidrojen sülfür
HPLC	:Yüksek basınçlı likit kromatografisi
IPSC	:İnhibe edici postsinaptik akım
KBB	:Kan-beyin bariyeri
LDH	:Laktat dehidrojenaz
L-DOPA	:Levodopa
MAO-B	:Monoamin-oksidad tip B
MCT	:Monokarboksilat taşıyıcısı
MDA	:Malondialdehit
MPP+	:1 Metil-4 Fenilpiridiyum

MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MRP1	:Multidrug Resistans Protein 1
MSN	:Medium spiny nöron
NFKB	:Nükleer transkripsiyon faktörü
NGF	:Nöron büyüme faktörü
NMDA	:N-metil-D-aspartat
NO	:Nitrik oksit
OH.	:Hidroksil radikali
OPA	:o-ftalaldehit
PBS	:Fosfat tampon solüsyonu
PCCW	:Yarı Saat Yönünün Tersine
PCW	:Yarı Saat Yönüne
PH	:Parkinson Hastalığı
ROS	:Reaktif oksijen türleri
SF	:Serum fizyolojik
SNc	:Substansia nigra pars kompakta
SNr	:Substansia nigra pars retikularis
SSS	:Santral Sinir Sistemi
STN	:Subtalamik nükleus
TBS	:Tris tamponlu solüsyonu
TH	:Tirozin Hidroksilaz
UPS	:Ubikülin-Proteozom sistemi
VATh	:Ventral anterior talamus
VİP	:Vazoaktif intestinal peptit
VLTh	:Ventral lateral talamus
βME	:β-merkaptoetanol
γGCS	:γGlutamil-Sistein Sentaz
γGT	:γGlutamil Transpeptidaz

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), substantia nigradan (SN) korpus striatuma gelen dopaminerjik nöron kayıplarına bağlı bazal ganglion hastalığıdır ve halen etkin bir tedavisi bulunmamaktadır. Tedavi amaçlı uygulanan yöntemler, nöron hasarını durdurma ve yavaşlatmada kısıtlı bir fayda sağlarken, birçok yan etkiye neden olmaktadır. PH'ndaki nöron ölümünün etiopatolojisi tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte, en önemli nedenler olarak oksidatif stres, inflamasyon, glutamat toksisitesi, apoptozis, aşırı nitrik oksit üretimi, mikroglial hücre aktivitesi, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, çevresel ve genetik faktörlerin olabileceği bildirilmektedir.

Astrositler beyinde yüksek sayıda bulunan, nöronlara metabolik ve fonksiyonel destek veren, hücre dışı çevrenin dengesini koruyan hücrelerdir. Astrositlerin hücre iskeletini intermediet filament ailesinden bir protein olan glial fibriler asidik protein (GFAP) oluşturmaktadır. Astrositler çok sayıda molekül sentezleyip salıvererek nöronları destekleyici ve koruyucu etki gösterirler. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nöron büyüme faktörü (NGF), aktiviteye bağlı nörotrofik protein (ADNP), hidrojen Sülfür (H₂S), glutatyon (GSH), laktat ve gamma-aminobutirik asit (GABA) gibi moleküller astrositler tarafından salıverilen maddelere en önemli örneklerdir.

Vazoaktif intestinal peptit (VIP), kan-beyin bariyerinden (KBB) geçebilen nörotrofik, nörotransmitter, nöromodülatör, antioksidan, antienflamatuar ve antiapoptotik özelliklere sahip bir nöropeptittir. Yapılan bazı çalışmalarda sıçanlarda 6-hidroksi dopamin (6-OHDA) ile oluşturulan deneysel parkinson modelinde, VIP'in striatal dopamin düzeylerini artırmadan, motor fonksiyon bozuklukları geri çevirdiği, antioksidan ve antiapoptotik etkileri dolayısıyla Korpus Striatumdaki medium spiny nöronların (MSN) ölümünü ve demiyelinasyonunu engellediği, dendrit spinlerin ve SN'daki dopaminerjik nöronların sayısını artırdığı, ventral anterior talamus (VATH)'da azalmış olan GABA düzeylerini normale getirdiği ve beyin mast hücrelerindeki NGF ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca sistemik ve lokal 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) uygulamasıyla oluşturulan fare parkinson modelinde, VIP'in nöron koruyucu etkisi gösterilmiş ve bu etkisini mikroglial aktivasyonu inhibe ederek gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür. VIP gerek nöronlardan gerekse astrositlerden ADNP'nin salıverilmesini uyaran başlıca molekül olarak da bildirilmiştir.

Yapılan kaynak taramasında VIP'in, parkinson modelinde nöron koruyucu etkisinde, astrositlerden salıverilen moleküllerle ilişkili çalışmaya ise rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasının amacı, sıçanlarda 6-OHDA verilerek oluşturulan parkinson modelinde VIP'in etki mekanizmasına astrosit hücrelerinin

katkısının araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde:

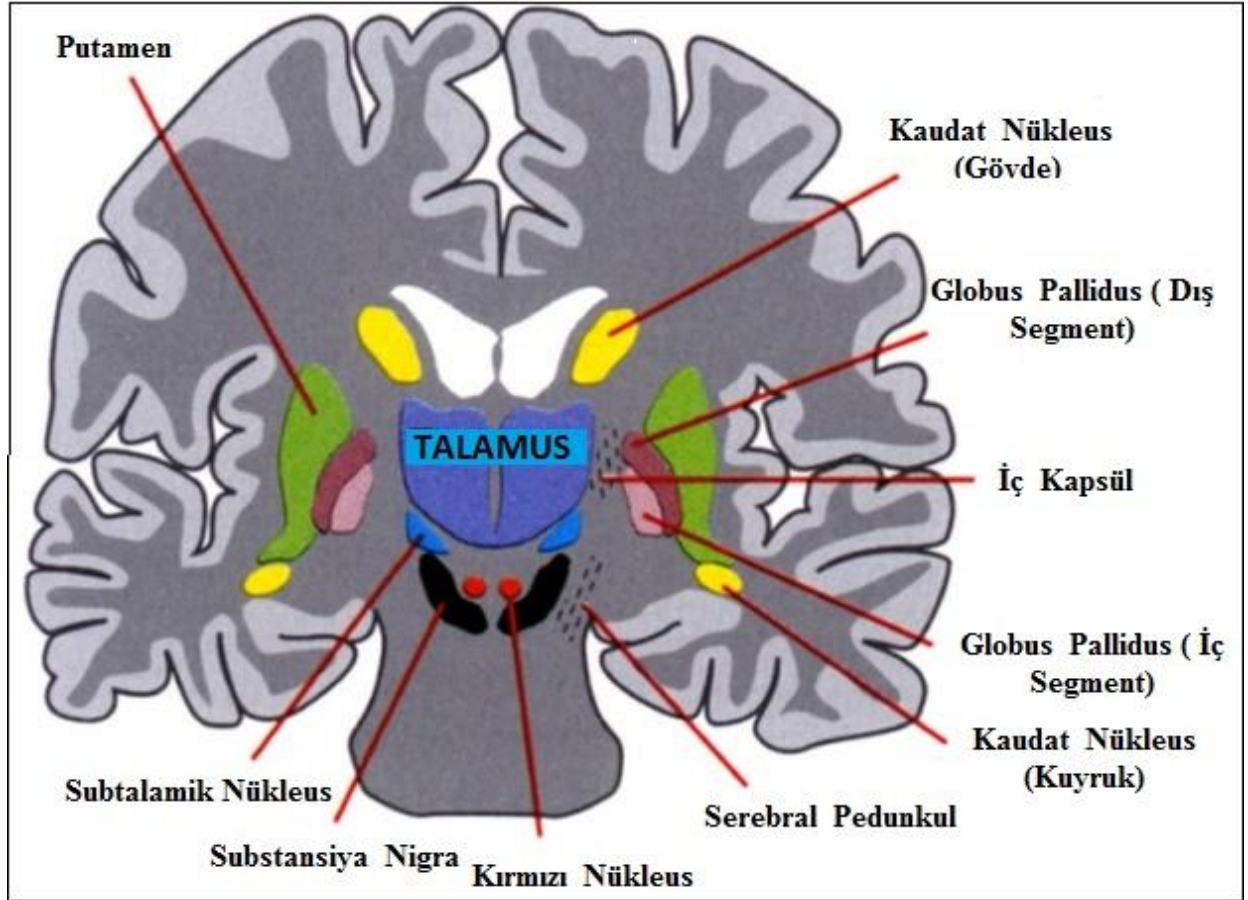
1. Stereotaksimetrik yöntemle beyinde mikrodializ işlemi yapılarak korpus striatumdan elde edilen mikrodializatlarda, yüksek basınçlı likit kromatografisi (HPLC) yöntemiyle GABA, glutamat, GSH ve laktatın ölçümleri,

2. Beyin histolojik kesitlerinde immünohistokimyasal olarak GFAP, glutamattan GABA sentezini gerçekleştiren glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi ve ADNP işaretlenmelerinin yapılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BAZAL GANGLİONLAR (BG):

BG, lokalizasyon olarak beyin hemisferlerinin tabanında, birbirleriyle bağlantıları olan, subkortikal bir grup nükleustan oluşmaktadır. Bu nükleuslar; Kaudat nükleus, Putamen, Globus Pallidus (GP), Subtalamik nükleus (STN) ve SN'dır. Bunlardan SN ve STN mezensefalonda bulunmaktadır (Yelnik J., 2002; Mora, Segovia & Del Arco, 2008; O'Connor William, 1998). Bu nükleuslardan GP; globus pallidus eksternus (GPe) ve globus pallidus internus (Gpi), SN; SN pars kompakta (SNc) ve SN pars retikularis (SNr) olmak üzere bölümlere ayrılır. Kaudat nükleus ve Putamen birlikte Korpus Striatum adını alırken; Putamen ve GP birlikte, lentiküler nükleus adını almaktadır (Leisman, Melillo & Carrick, 2013; Obeso, 2008; O'Connor, 1998; Yelnik, 2002) (Şekil 2.1).

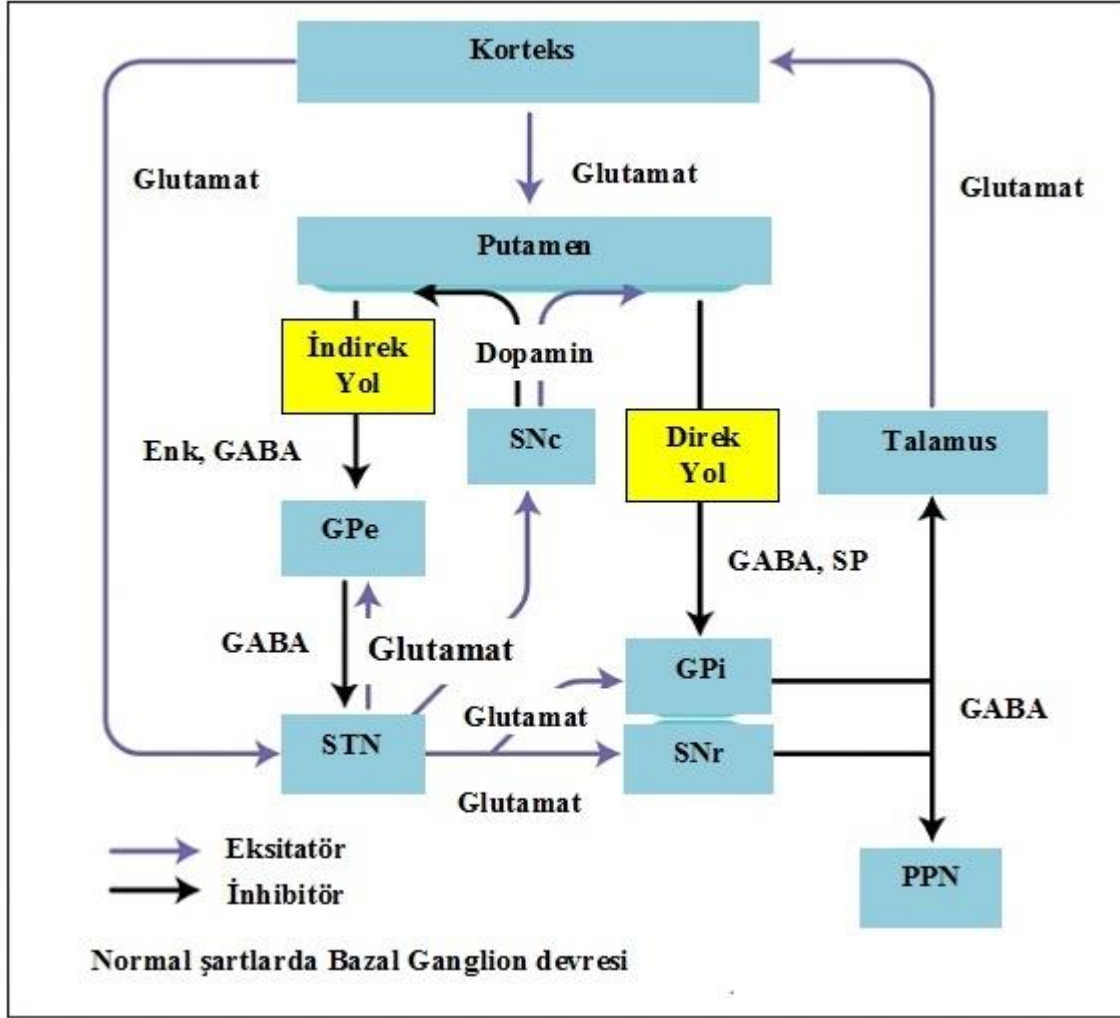


Şekil 2.1. Bazal Ganglionlar ve Yerleşimleri (Leisman, Melillo & Carrick, 2013'den modifiye edilerek alınmıştır).

BG'in fonksiyonları hakkında kesin bir bilgi olmasa da yapılan bazı çalışmalardan elde edilen bilgilere göre BG'in motor, bilişsel, çağrışımsal hareketlerle ve emosyonel durum ile ilgili fonksiyonları olduğu, hareketlerin kontrol, ince ayar ve modülasyonunda rol aldıkları, hareketlerin başlatılması ve planlanması, hız ve büyüklüğünün ayarlanması, mesafe ayarının yapılabilmesi, öğrenilmiş motor hareketlerin otomatik olarak yapılabilmesi, ardısıra veya simultan hareketlerin uygulanması, kas tonusunun ayarlanması gibi fonksiyonlarda önemli rol oynadıkları belirtilmiştir (Ganong, 2010; Guyton & Hall, 2006; Fahn, Jankovic & Hallet, 2011; Jankovic & Tolosa, 2007; Leisman vd., 2013; Obeso vd., 2008; Taner, 2007; Yelnik, 2002).

BG, afferentlerinin büyük çoğunluğunu frontal korteksten (primer motor alan, premotor alan, suplamanter motor alan, singulat korteks, dorso-lateral ve orbito-lateral frontal korteks) alırken; bir kısmını da parietal, temporal ve oksipital korteksten almaktadır. BG'in motor fonksiyonlarından sorumlu nöronal uzantılar, orijinlerini motor korteksten (primer motor korteks, suplamanter motor alan, premotor korteks) almakta ve putamene ulaşmakta; bilişsel ya da çağrışımsal fonksiyonlarından sorumlu nöronal uzantılar ise, korteksin çağrışımsal alanlarından (frontal, parietal, temporal ve occipital korteks) almakta ve kaudat nükleusa ulaşmaktadır (Galvan & Wichmann, 2008; Leisman vd., 2013; Yelnik, 2002).

BG'in afferentlerinin giriş yaptığı tek yer korpus striatum iken; efferentlerinin çıkış yerleri ise, GPi ve SNr'dir. BG çıktılarının çok büyük bir kısmı talamusa, küçük bir kısmı ise beyin sapındaki Pedunkulopontin nükleusa gitmektedir. SNc çıktılarının çok büyük bir kısmı striatuma giderken az bir miktarı da GPe, GPi ve STN'ye gitmektedir. Korteksten striatuma uzanan nöronlar glutamaterjik olup eksitatör niteliktedirler ve striatuma sürekli uyarıcı nitelikte deşarjlar yaparlar (Galvan & Wichmann, 2008; Simon, Maeve, Caldwell & Barker, 2003; Yelnik, 2002) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Normal Durumlarda Bazal Ganglion Devresi.

GABA: gama-aminobutirik asit SP: Substans P, Enk: Enkefalin, SNc: Substantia Nigra Pars Kompakta SNr: Substantia Nigra Pars Retikülata, GPi: Globus Pallidus internus, GPe: Globus Pallidus externus, STN: Subtalamik Nükleus, PPN: Pedunkulopontin Nükleus (Simon vd., 2003'den modifiye edilerek alınmıştır).

BG devresinde; korteksten striatuma, STN' den GPe ve GPi'ye, talamustan kortekse uzanan nöronlar glutamaterjik (Swanson, Kettenmann, & Ransom, 2005; Yelnik, 2002), SNc'dan striatuma uzanan nöronlar dopaminerjik iken, devrenin diğer bölümlerindeki nöronların hepsi GABAerjiktir (Galvan & Wichmann, 2008; Yelnik, 2002). BG devresindeki son çıktılar talamus üzerinde inhibitör nitelikte iken, talamus ise korteks üzerinde sürekli uyarıcı nitelikte deşarjlar yapar (Galvan & Wichmann, 2008; Yelnik, 2002; O'connor, 1998; Simon vd., 2003; Swanson vd., 2005) (Şekil 2.2).

Striatum afferentlerini serebral korteksten ve SNc'den almaktadır. Striatumdaki nöronların % 96'sı MSN olup, GABAerjiktirler ve kotransmitter olarak substans P, dinorfin veya enkefalinleri bulundurabilmektedirler. Striatumdaki diğer nöronlar ise % 2'si kolinerjik, % 1'i GABAerjik olan internöronlardır (Yelnik, 2002).

Striatumda MSN üzerinde toplanan ve integre edilen bilgilerin çıktısı, MSN tarafından GPi'ye iki farklı yoldan gider. Bu yollar direkt ve indirekt yollar olarak tanımlanmaktadır (Galvan & Wichmann, 2008; Yelnik, 2002)

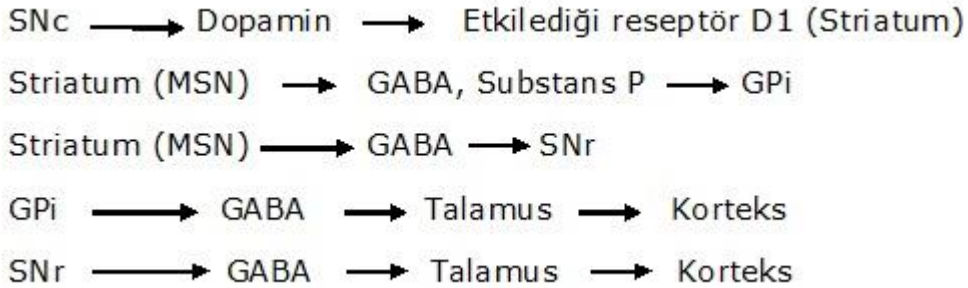
Direkt yolda, striatumdaki MSN'ların aksonları doğrudan GPi de sonlanmaktadır (Obeso, 2008; O'connor, 1998; Simon, 2003; Yelnik, 2002) (Şekil 2.2).

İndirekt yolda, striatumdaki MSN'ların aksonları GPe de sonlanmaktadır. GPe deki nöronlar aksonlarını STN'a gönderirler. GPi ye bilgi STN tarafından iletilmektedir (O'connor, 1998; Simon, 2003; Yelnik, 2002) (Şekil 2.2).

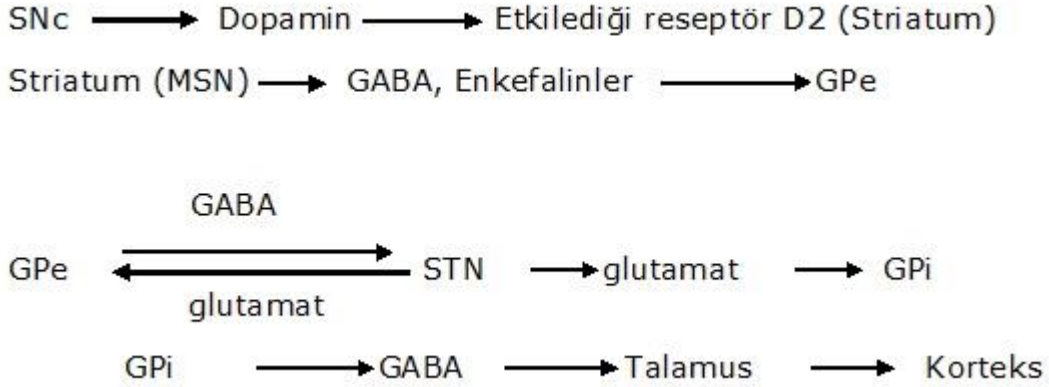
GPi deki nöronların aksonları, talamusun venral anterior ve lateral nukleuslarına uzanarak (VATH /VLTh), BG'larda integre edilmiş olan bilgiyi talamusa gönderir. Böylece BG'ların bilgi çıktıları talamus aracılı motor kortekse gönderilmektedir. Diğer bir deyişle, her iki yolun kesiştiği yer olan GPi'deki net bilgi, talamus ve devamında motor korteks üzerinde etkisini göstermektedir (Obeso, 2008; O'connor, 1998; Simon, 2003; Yelnik, 2002).

2.1.1. Direkt ve indirekt yol devresinin kimyası:

Direkt Yol;

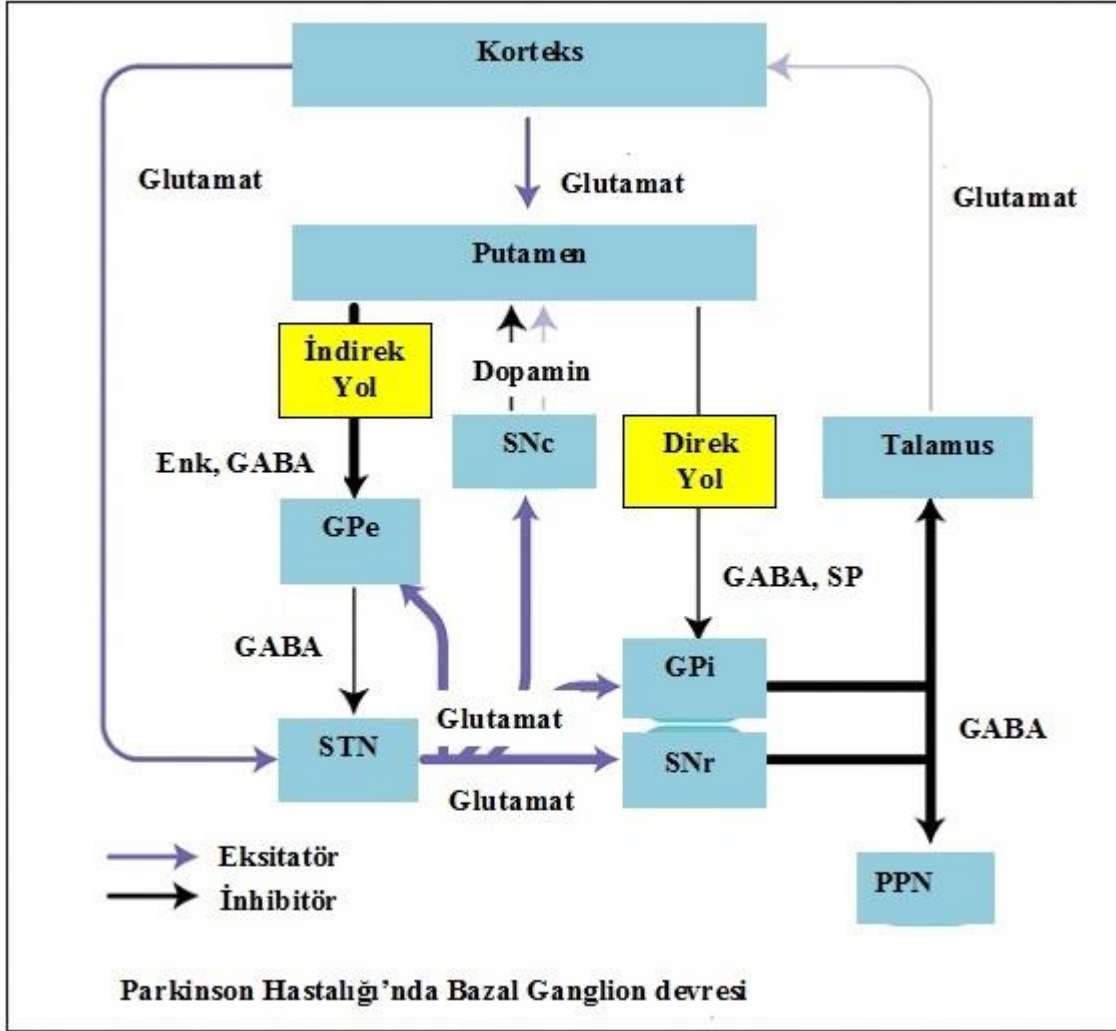


İndirekt Yol;



Her iki yolun aktif olması için öncelikle korteksten gelen glutamaterjik nöronların sürekliliği gerekmektedir. Striatumdaki dopamin terminallerinin dağılımı oldukça heterojendir. Striatumdaki dopaminerjik nöronlardan kotransmitter olarak substans P'yi taşıyanlar direkt yol üzerinden GPI ve SNr'ye giderlerken; enkefalinleri taşıyanlar ise, indirekt yol üzerinden GPe'ye gitmektedirler (Obeso, 2008; O'Connor, 1998; Simon, 2003; Yelnik, 2002). SNc'dan striatuma gelen dopaminerjik nöronlar striatumdaki MSN'ler üzerindeki etkilerini D1 ve D2 reseptörlerini uyararak gerçekleştirmektedirler. GPI'ye bilgilerin direkt ve indirekt yoldan gönderilmesinin temelinde de bu iki farklı reseptörün uyarılması bulunmaktadır. Dopamin tarafından MSN üzerindeki D1 reseptörlerinin aktive olması MSN'yi uyarır, MSN'in aksonu da direkt olarak GPI de sonlanarak GABA aracılı direk bir inhibisyon oluşturur. Dolayısıyla MSN'in GABAerjik etkileri, GPI'deki tonik GABAerjik nöronları inhibe etmektedir. Böylece GPI'nin talamus üzerindeki tonik GABAerjik deşarjları inhibe olmakta ve bunun devamında talamusun kortekse olan uyarıcı etkisi daha da artmaktadır (inhibisyonun inhibisyonu). İndirekt etki; dopaminin, MSN'deki D2 reseptörleriyle etkileşmesi sonucunda gerçekleşmektedir. D2 reseptörlerinin uyarılması ile striatumdan GPe'ye uzanan MSN'ler inhibe olmaktadır. Bunu takiben GPe'den STN'a olan tonik GABAerjik deşarjlar artmaktadır. Bunun sonucunda STN'ın GPI'ye olan glutamaterjik çıktılarının inhibisyonunda artış olmaktadır. Bu inhibisyonun artmasıyla da GPI'den talamusa olan tonik GABAerjik deşarjlar azalmaktadır. Direkt ve indirekt yol birbirlerinin tersine çalışıyorlarmış gibi görünseler de aslında GPI üzerinde sinerjistik etki göstermektedirler. Direkt yol ile etkileşim sonucunda GPI'den talamusa olan tonik GABAerjik deşarjlar inhibe olur, talamus üzerine olması beklenen inhibisyon büyük oranda kalkar, indirekt yolda ise bu inhibisyon azalır (Galvan & Wichmann, 2008; Obeso, 2008; O'connor, 1998; Simon, 2003; Yelnik, 2002). Sonuçta, direkt yol ile talamusun motor kortekse gönderdiği uyarıcı bilgiler artırılırken, indirekt

yol ile talamusun uyarıcı etkisi bir miktar azaltılmaktadır. İndirekt yolun oluşturduğu bu etki bir çeşit negatif geri besleme şeklinde yorumlanmaktadır (Galvan & Wichmann, 2008; Obeso, 2008; O'connor, 1998). Bundan da striatumdaki dopaminin, talamus ve dolayısıyla kortekse gönderilen bilgileri düzenleyen bir nörotransmitter olduğu anlaşılmaktadır. SN'daki dopaminerjik nöron kayıpları, bu işlevlerin değişik ağırlık ve dağılımda bozulmasına, bunun sonucunda özellikle hipokinetik (bradikinezi veya akinezi) ve hiperkinetik (atetoz, kore, ballizm) motor hareket bozukluklarının yanı sıra, bir takım psikolojik (bilişsel ve demans) bozuklukların da görüldüğü önemli bir nörodejeneratif hastalık olan PH'nin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Galvan & Wichmann, 2008; Leisman vd., 2013; Obeso, 2008; Yelnik, 2002; Dickson, 2012; Goetz, 2011; McKeith vd., 2004; Simon, 2003; Mora, Segovia & Del Arco, 2008). (Şekil 2.2, 2.3).



Şekil 2.3. Parkinson Hastalığında Bazal Ganglion Devresi.

Parkinson Hastalığı, Substantia Nigra'nın pars kompaktasındaki (SNc) dopaminerjik nöronların kaybı ve buna bağlı olarak Striatumdaki dopaminin azalması sonucunda ortaya çıkan nörodejeneratif bir hastalıktır. Kısaltmalar: GABA: gamma-aminobutirik asit SP: Substans P, Enk: Enkefalin, SNc: Substantia Nigra Pars Compacta, SNr: Substantia Nigra Pars Retikülata, GPi: Globus Pallidus internus, GPe: Globus Pallidus eksternus, STN: Subtalamik Nükleus, PPN: Pedunkulopontin Nükleus (Simon vd., 2003'den modifiye edilerek alınmıştır).

2.2. PARKİNSON HASTALIĞI (PH) :

PH ilk olarak İngiliz bir bilim adamı olan James Parkinson tarafından 1807 yılında "shaking palsy (titrek felç)" adıyla tanımlanmıştır. Daha sonraları birçok bilim adamı tarafından hastalığın farklı özelliklerinden de bahsedilmiş olmakla beraber Fransız bilim adamı Jean Marie Charcot, James Parkinson'un belirttiği klinik semptomlara bir miktar eklemelerle hastalığın orijinal tanımını yapmış ve hastalığa onu ilk tarif eden kişi olan James Parkinson'un adını vererek "Parkinson Hastalığı" olarak tanımlamıştır (Goetz, 2011). PH, parkinsonian hastalıkların başında gelen, beyinde BG'dan, SNC'daki melanin pigmenti içeren dopaminerjik nöronların büyük oranda (%70-80) kaybı ve buna bağlı olarak striatumda dopamin azalması sonucunda ortaya çıkan, kronik ve progresif nitelikte nörodejeneratif bir hastalıktır.

PH'ndaki nöron ölümünün etiyopatolojisi tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte en çok bilinen sebepler arasında oksidatif stres, inflamasyon, glutamat toksisitesi, apoptozis, aşırı nitrik oksit üretimi, yetersiz nörotrofinler ve aşırı mikroglial hücre aktivitesi, yaşlılık, postensefalitik enfeksiyon, MPTP ve kronik manganez intoksikasyonu, hücre içi kalsiyum ve demir homeostazisinin bozulması, çevresel ve genetik faktörler sayılmaktadır (Casetta, Govoni & Granieri, 2005; Dickson, 2012; Dipasquale, Marini & Youle, 1991; Lim & Jeanne, 2007; Rappold & Tieu, 2010; Rebecca vd., 2009; Venderova & Park, 2012). PH görülme sıklığı genel populasyonda % 0.3 iken, 60-65 yaşlarından sonra ise % 1-2'dir ve erkeklerde 1,5 kat daha fazla görülmektedir. 40 Yaşın altındaki hastalarda daha çok genetik sebepler düşünülmektedir (De Lau & Breteler, 2006; Massano & Kailash, 2012). İnsan epidemiyolojik çalışmaları, kırsal bölgede yaşamın, herbisitler, pestisitler ve ağır metallere maruz kalmanın PH olma riskini arttırdığını göstermiştir (Bove, Delphine, Perier & Przedborski, 2005; Casetta vd., 2005; Rappold & Tieu, 2010). PH'da, nöronlarda bazen hücre içi Lewy cisimcikleri olarak bilinen protein agregatları görülmektedir. Daha çok ailesel PH'nda görülen Lewy cisimciklerinin içeriği tam olarak bilinmese de, yoğun granüler özellik gösterdiği, iskeletsel olarak düz ve yaklaşık olarak 10-15 nm uzunluğunda filamentlerden oluştuğu ve yapısında α -sinüklein, ubikülin ve ubikülin bağlayıcı protein p62'yi bulundurduğu bildirilmektedir (Dickson, 2012). PH'nın genetik yönünün araştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda bazı genlerde meydana gelen mutasyonlar sebebiyle bu genlerin PH'da rolleri olduğu düşünülmüştür. PH ile ilgili olduğu düşünülen genler;

otozomal dominant; α -sinüklein (SNCA), LRRK2, PARK 8,

otozomal resesif; PARK 2 (PARKİN), PARK6 (PINK1), PARK 7 (DJ1), PARK9 genleridir.

Bu genlerdeki anomaliler sonucunda SN'daki dopaminerjik nöronlarda mitokondrial fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres, inflamasyon ve yetersiz proteozomal protein degradasyonu gibi dejenerasyonla sonuçlanan patojenik durumlar ortaya çıkmaktadır (Massano & Kailash, 2012; Polymeropoulos vd., 1996; Rappold & Tieu, 2010).

PH'nın ana klinik belirtileri bradikinezi, istirahat tremoru, dişli çark rijiditesi ve postural instabilite olup semptomlar çoğunlukla tek taraflı başlamaktadır (Dickson, 2012; Goetz, 2011; Massano & Kailash, 2012). PH temel olarak bir hareket bozukluğu hastalığı olmasına rağmen, hastalığa sıklıkla, kognitif bozukluklar, demans ve depresyon gibi psikolojik bozukluklar da eşlik etmektedir (Dickson, 2012; McKeith VD., 2004). Hastalığın erken dönemlerinde otonom sinir sistemindeki ganglionların ve periferik sinirlerin etkilenmesi nedeniyle otonomik fonksiyon bozukluğunun, somatik motor tutulumundan daha önce görüldüğü bazı çalışmalarda gözlenmiş olup, PH'nın klinik belirtilerinin bu otonomik hasarların görülmesinden 10 yıl veya daha fazla zaman geçtikten sonra ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (Dickson, 2012; Lang, 2007).

2.2.1. Parkinson Hastalığındaki Nörodejenerasyonun Nedenleri:

PH'da nörodejenerasyonun nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte ileri sürülen en önemli nedenler arasında; dopaminerjik nöronlarda anormal protein birikimi, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres, apoptozis, inflamasyon, glutamat toksisitesi, aşırı nitrik oksit üretimi, mikroglyal hücre aktivitesi, çevresel ve genetik faktörler sayılmaktadır. (Casetta vd., 2005; Delgado & Ganea, 2003a; Dipasquale vd.,1991; Kathleen, Timothy & Federoff, 2008; Keane, Kurzawa, Blain & Morris, 2011; Lim & Jeanne, 2007; Martin & Teismann, 2009; Massano & Kailash, 2012; Rappold & Tieu, 2010; Rebecca vd., 2009; Schapira, Cooper, Dexter, Jenner & Mardsen, 1990; Schapira, 2008; Tunçel vd., 2005).

Ubikütin-Proteozom sistemi (UPS) ile yanlış eşleşmiş, oksidatif hasara veya mutasyona uğramış istenmeyen hücre proteinleri, degradasyonu sağlanmaktadır. Bu sistemde degradasyon işlemi iki aşamada gerçekleşmektedir. Önce degrade edilecek hatalı hedef protein, poliubikutin zinciri tarafından kovalent bağ ile işaretlenmekte, sonra poliubikutin-substrat kompleksi proteozomlarda degradasyona uğratılmaktadır. Bu sistemdeki herhangi bir fonksiyon bozukluğu sonucunda UPS ile hasarlı protein ortadan kaldırılamamakta ve oluşan hasar hücreyi ölüme götürmektedir. α -sinüklein genindeki bir hasar sonucu oluşan Lewy cisimcikleri, ailesel PH'nın en önemli patolojik göstergesidir. PH'nda UPS'deki fonksiyon bozukluğu nedeniyle dopaminerjik nöronlarda α -sinükleinin biriktiği hasarlı proteinlerin ortadan

kaldırılmadığı ve sonrasında nörodejenerasyona yol açtığı düşünülmektedir (Ciechanover, 1998; Lim & Jeanne, 2007; Martin & Teismann, 2009).

Mitokondri aerobik metabolizmayla, hücreye enerji sağlarken, tüketilen oksijenin yaklaşık %1 ya da %2'si sudan ziyade reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüşmektedir. PH'da nigrostriatal dopaminerjik nöron kaybının sebepleri arasında mitokondrial fonksiyon bozukluğunun da rolünün olduğu ileri sürülerek MPTP ve 6-OHDA ile deneysel Parkinson modelleri oluşturulmuş ve yapılan çalışmalarla bu gösterilmiştir (Delgado & Ganea, 2003a; Delgado & Ganea, 2003b; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz, Ay, Ulupınar & Tunçel, 2012; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012). MPTP, KBB'den hızla geçen lipofilik bir prototoksindir. Glialarda MPTP, monoamin oksidaz-B (MAO-B) tarafından metabolize edilir ve son olarak 1 Metil-4 Fenilpiridinyum (MPP^+) aktif toksik katyonuna dönüştürülür. MPP^+ 'nin dopaminerjik nöron terminallerince alınmasıyla, burada biriktiği ve yine burada hem serbest radikallerin oluşumunu tetikleyerek, mitokondrial solunumun bozulmasına sebep olduğu, hem de mitokondrial elektron zincirindeki kompleks I enzimini inhibe ederek nörotoksositeye yol açtığı bildirilmiştir (Casetta vd., 2005; Halliwell, 2006; Rappold & Tieu, 2010; Rebecca vd., 2009; Venderova & Park, 2012). MPP^+ , nöronların oksidatif strese karşı korunmasında önemli görevi olan GSH'ın sentez enzimlerinden olan γ Glutamil-Sistein Sentez (γ GCS) enziminin inhibisyonuna sebep olmakta ve GSH sentezinde kullanılmak üzere dolaşımdaki sisteinin nöronlara taşınmasını sağlayan uyarıcı aminoasit taşıyıcılarının (EAAT) fonksiyonlarını engellemektedir (Martin & Teismann, 2009). PH patolojisinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda rolünün olduğu düşünülen diğer bir nörotoksin 6-OHDA'dır. 6-OHDA, dopaminerjik nöronlara dopamin taşıyıcılar tarafından alınır ve burada birikerek nöronların yapısını hasara uğratar. PH'nda nöronlarda 6-OHDA birikimi görülmüştür (Blum vd., 2001; Halliwell, 2006). 6-OHDA, nöronlara taşındığında dopamin gibi okside olarak serbest radikaller ve kininleri meydana getirir. 6-OHDA de, MPTP gibi mitokondrial kompleks I'ı inhibe etmekte ve Fenton reaksiyonu ile süperoksit ve hidroksil radikalleri üreterek, nöronu ölüme götürmektedir (Blum vd., 2001; Rebecca vd., 2009). Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde, hidrojen peroksitin (H_2O_2) detoksifikasyonunu sağlayan Glutatyon Peroksidaz (GPx) enziminin seviyesinde azalma görülmüştür. Böylece ortamda metal iyonları varlığında H_2O_2 , çok daha fazla zararlı olan hidroksil (OH) radikaline dönüşmektedir (Martin & Teismann, 2009). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda 6-OHDA nörotoksik molekülü ile unilateral lezyon oluşturulan striatumda çok güçlü bir antienflamatuar ve antioksidan özellik gösteren H_2S 'in üretimini azaldığı rapor edilmiştir (Hu vd., 2010; Zhou & Tang, 2011). Pestisit (rotenon vb.) ve herbisitlerin de (paraquat vb.), kronik maruziyete bağlı olarak, dopaminerjik nöronlarda mitokondrial kompleks-I inhibisyonu ile

ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Martin & Teismann, 2009; Rebecca vd.,2009).

Mikroglialar, beyinde makrofaj özelliği gösteren bir çeşit glia hücresi olup başlıca işlevleri, enfeksiyonla savaşmak ve enfekte bölgedeki enfeksiyon artıklarını ortadan kaldırmaktır. Bu nedenle santral sinir sistemindeki (SSS) primer immün hücrelerdir. Mikroglialar SSS'ndeki bu koruyucu özelliklerinin yanısıra aşırı aktivasyonları sonucu IL-1 β , IL-6, IL-12 gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinler, ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üreterek, PH gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasında ve ilerlemelerinde önemli roller oynarlar. MPTP, 6-OHDA ve rotenon gibi nörotoksinlerle oluşturulan Parkinson modellerinde SN'da, aşırı mikroglial aktivite olduğu ve bu nedenle ROS üretimine ve dopamin sentezinin azalmasına neden olduğu bildirilmektedir (Delgado & Ganea, 2003a; Delgado & Ganea, 2003b). PH'nın patogeneğinde önemli olan mekanizmalardan birisi olan MPTP maruziyeti sonucunda, mikroglialardan kaynaklanan ROS ve RNS'nin neden olduğu GSH kaybı, dopaminerjik nöronlarda kayıplara ve PH'nın ortaya çıkmasına önemli katkıda bulunmaktadır (Delgado & Ganea, 2003a; Delgado & Ganea, 2003b).

Nitrik Oksit (NO), L-arjininden nitrik oksit sentaz enzimi katalizörlüğünde elde edilmektedir. NO vazodilatör etkili bir gaz olup beyin hasarlarından sonra dokuların korunmasında rol alırken aşırı üretimi PH gibi nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. NO, mitokondrial enzimleri inhibe ederek mitokondrial fonksiyon bozukluğuna yol açmakta, OH radikali ve peroksinitrit oluşumu ile oksidatif strese ve demir metabolizmasının bozulmasına da neden olmaktadır (Halliwell, 2006; Said, 2000; Töre vd., 2002).

Beyindeki ana eksitatör nörotransmitter olan glutamatın, çeşitli patolojik durumlarda sinaptik aralıkta birikerek özellikle postsinaptik nöronlardaki iyonotropik reseptörü N-metil-D-aspartatı (NMDA) sürekli olarak uyarması sonucunda, hücre içi Ca⁺⁺ konsantrasyonunda artışa ve hücreleri nekroz ve apoptozise götürecektir bir dizi reaksiyonun başlamasına neden olmaktadır. Bu durum daha çok travmatik beyin hasarı, iskemi reperfüzyonu gibi durumlar neticesinde gerçekleşmektedir. PH'nda SN'daki dopaminerjik nöronlarda meydana gelen nörodejenerasyonda glutamat eksitotoksitesinin önemli rolünün olduğu ileri sürülmektedir (Bélanger & Magistretti, 2009; Chase & Oh, 2000; Giaume, Kirchhoff, Matute, Reichenbach & Verkhratsky, 2007; Jankovic & Aguilar,2008; Verkhratsky & Kirchhoff, 2007).

Bugün "Programlanmış hücre ölümü"nın bir türü olarak kabul edilen apoptozisin PH'nın patolojisinde rolü olduğu gösterilmiştir. MPTP ve MPP⁺ ile farelerde ve 6-OHDA ile sıçanlarda yapılan birçok deneysel Parkinson modellerinde apoptoz bulgularına rastlanmıştır (Korkmaz vd., 2012; Massano

& Kailash, 2012; Tunçel vd.,2005; Tunçel vd., 2012; Venderova & Park, 2012). PH'nda oksidatif stres sonucunda nigrostriatal nöronlarda apoptozis nedeniyle kayıpların olduğu bildirilmektedir. PH ile ilişkili bazı genlerin nöronlarda meydana gelen apoptoz ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Bunlardan patojenik mutant LRRK'nın fazlalığı ve DJ-1 geni eksikliği, nöronlarda ve nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres sonucu apoptoza neden olmaktadır. PARKİN geninin 6-OHDA uygulanan dopaminerjik nöronlarda apoptozise karşı koruyucu rol oynadığı, PINK1 geninin eksikliğinin ya da mutasyonunun apoptotik ölüme duyarlılığı artırdığı bildirilmektedir (Massano & Kailash, 2012; Rappold & Tieu, 2010; Venderova & Park, 2012).

2.2.2. Parkinson Hastalığında Tedavi Yaklaşımları:

Bugün, PH'nın tedavisinde henüz etkin bir yöntem bulunamamış olmakla birlikte, hastalığın semptomlarının azaltılması amacıyla yönelik çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmakta, fakat uygulanan bu yöntemler birçok yan etkilere neden olarak nöron hasarının altında yatan olayları durdurma ve yavaşlatmada kısıtlı fayda sağlamaktadır (Kathleen vd., 2008; Leung, Shek & Lo, 2007; Luginger, Wenning & Bösch, 2000; Massano & Kailash, 2012). Bu nedenle PH'nın tedavisinde asıl amaç, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak, semptomatik tedavilerle hastalığın sebep olduğu ve ilerlemesiyle artacak olan fonksiyon bozukluklarını gidermeye çalışmaktır. Bu nedenle nigrostriatal dopaminerjik nöron kaybına bağlı olarak meydana gelen PH'nın tedavisinde dopamin replasmanı ile hastalığın semptomlarının ortadan kaldırılması hedeflenmektedir. Dopamin, KBB'nden geçemediği için merkezi sinir sistemini doğrudan etkileyememekte ve tedavide dopamin prekürsörü olan ve KBB'den geçebilen Levodopa (L-DOPA) molekülü kullanılmaktadır. L-DOPA hastalarda kaybolan bazı fonksiyonlarda geçici bir süre düzelme sağlamaktadır. PH'nın tedavisinde L-DOPA'nın yanı sıra dopamin agonistleri, Katekol-O-metil-transferaz (COMT) inhibitörleri, MAO-B inhibitörleri ve Antikolinergikler de kullanılmaktadır (Hisahara & Shimohama, 2011; Jankovic & Aguilar, 2008; Leung vd., 2007).

L-DOPA/Karbidopa: L-DOPA beyinde ve periferel dokularda dekarboksilasyonla dopamine dönüştürülmektedir. Bir periferel dekarboksilaz inhibitörü olan karbidopanin levodopa ile kombine verilmesi ve böylece periferel dönüşümün bloke edilmesiyle daha çok ilacın beyne ulaşması sağlanmaktadır. Bu iki ilacın kombine verilmesi ile PH'nın semptomatik tedavisinde daha etkili sonuç elde edildiği ileri sürülmektedir. Ancak bu tedavinin ilk başlarda çok etkili olduğu fakat zamanla yetersiz kaldığı ve bu tedavide yan etki olarak diskinezi ortaya çıktığı bildirilmektedir (Leung vd., 2007; Verhagen, Dotto & Le, 1999).

L-DOPA/Dopamin agonistleri: Dopamin agonistlerinin L-DOPA ile kombine kullanımında dopamin agonistlerinin yarı ömrü uzamakta ve motor komplikasyonların düzeltilmesinde daha fazla fayda sağlanmaktadır. Ancak

dopamin agonistlerinin kullanımı ile bir süre sonra hallüsinasyon, psikoz, periferik ödem, kontrolsüz hareketler, uyku hali, tiksime, bulantı ve konfüzyon gibi sistemik ve nöropsikiyatrik yan etkiler görülmekle birlikte hastalığın ilerleyişi de durdurulamamaktadır. Bu sebeple bu kombinasyon geçici bir çözüm olmaktan öteye gidememektedir (Jankovic & Aguilar, 2008; Leung vd.,2007).

Dopamin metabolizması inhibitörleri: PH'nın tedavisinde L-DOPA'nın etkin plazma seviyesinin korunması amacıyla dopamin metabolizması inhibitörleri kullanılmaktadır. Dopamin katabolizması iki önemli enzim olan MAO ve COMT tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimlerin inhibe edilerek dopaminin yarı ömrünün uzatılması amacıyla COMT ve MAO inhibitörü ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar genellikle dopamin agonistleriyle kombine olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu yaklaşım da nörodejenerasyonu durduramadığı gibi, bu tedavide artmış plazma L-DOPA seviyelerine bağlı olarak, diskinezi ve nöropsikiyatrik yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bu maddelerin karaciğer üzerinde ciddi toksik etkileri olduğu da bildirilmiştir (Jankovic & Aguilar, 2008; Leung vd.,2007).

Antikolinergikler: PH'nın tedavisinde özellikle genç hastalarda istirahat tremorunu azaltmak amacıyla kullanılırlar. Bu ilaçlar da dopamin agonistleriyle kombine olarak kullanılmaktadır. Fakat bu ilaçların halüsinasyon, konfüzyon, hafıza zayıflığı gibi özellikle yaşlı hastalarda görülebilen birçok yan etkileri bulunmaktadır. Ayrıca özellikle prostat hipertrofisi ve dar açılı glokomu olan hastalarda hastalığın şiddetini artırmasından dolayı kullanılmaları uygun görülmemektedir (Leung vd.,2007).

Nöron koruyucu ajanlar: Nöron koruyucu ajanların tedavideki etkileri zamanla azalsa da, diğer farmakolojik yaklaşımlara göre daha umut verici sonuçlar vermişlerdir. Bu yaklaşımlarla PH'ndaki nörodejenerasyonu durdurmak, yavaşlatmak veya tersine döndürmek üzerine yoğunlaşmıştır. Ayrıca dopamin replasmanına başlanmasını geciktirmesi açısından da önem arzederler (Leung vd.,2007). Bu amaç doğrultusunda, NMDA reseptör antagonistleri, koenzim Q10, glial nörotrofik faktör (GDNF) kullanılarak yapılmış çalışmalar mevcuttur (Jankovic & Aguilar, 2008; Lang, 2007; Leung vd.,2007; Nakao, Nakai & Nakai, 1999; Verhagen vd., 1999). Koenzim Q10, mitokondrial elektron transport sisteminde kompleks-I'in aktivitesini arttırmakta ve nöronlarda oksidatif stresi azaltmaktadır. Parkinson hastalarının mitokondrilerinde koenzim Q10 seviyelerinin düşük olduğu görülmüştür (Leung vd.,2007). GDNF, nörotrofik özelliğinden dolayı PH için umut verici bir nöron koruyucu molekül olarak görülmüştür. GDNF'nin in vitro olarak mezensefalondaki dopaminergik nöronların yaşamlarını desteklerken, in vivo olarak da nörodejenerasyona karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir (Jankovic & Aguilar, 2008; Lang, 2007). Striatumda önemli

fonksiyonu olan MSN'lerin gerek dopaminerjik gerekse glutamaterjik sonlanmalarla etkileşimi çok önemlidir. PH'nda yetersiz dopaminerjik etki sonucunda glutamat fazlalığı ile ortaya çıkabilecek nöron hasarı, NMDA reseptör antagonistleri kullanılarak azaltılmaya çalışılmıştır (Jankovic & Aguilar, 2008; Leung vd.,2007; Nakao vd.,1999; Verhagen vd.,1999). Bir NMDA reseptör antagonisti olan amantadinin bu bağlamda nöron koruyucu etkisinden söz edilmektedir (Jankovic & Aguilar, 2008; Leung vd.,2007, Nakao vd.,1999; Verhagen vd.,1999). Ayrıca bazı araştırmacılar tarafından amantadinin sadece Parkinson semptomlarını iyileştirmekle kalmayıp, L-DOPA'nın tetiklediği diskineziyi de iyileştirdiği ileri sürülmüştür (Jankovic & Aguilar, 2008; Luginger vd., 2000; Verhagen vd.,1999). Bazı çalışmalarla NMDA antagonistlerinin MPP⁺'ye karşı da nöron koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Jankovic & Aguilar, 2008; Nakao vd.,1999).

Cerrahi girişim: PH'nın tedavisinde Talatotomi, Pallidotomi, Talamusa elektrotlar yerleştirilerek derin beyin uyarımları sağlamak gibi, çeşitli cerrahi yöntemler de uygulanmaktadır (Jankovic & Aguilar, 2008). Ayrıca nöron implantasyonu ve gen terapileri PH'nın tedavisinde yapılması hedeflenen, fakat bugün henüz fikir bazında olan ve geleceğe dair umut veren tedavi stratejileridir (Jankovic & Aguilar, 2008; Kathleen vd.,2008).

Görülüyor ki; PH'nın tedavisinde problemleri gidermeye ve yaşam kalitesini arttırmaya katkıda bulunabilecek ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, nörodejenerasyonu engelleyebilecek kesin bir tedavi henüz bulunamamıştır, fakat bu konudaki araştırmalar devam etmektedir (Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd.,2012; Leung vd.,2007; Tunçel vd, 2005; Tunçel vd., 2012).

PH'nın tedavisinde nöron hasarının geri döndürülmesindeki başarısızlıkla birlikte kullanılan tedavilerin önemli yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla, son yıllarda antienflamatuar, antioksidan, antiapoptotik ve antiglutamaterjik özellik gösteren bir molekül veya bu etkileri tek tek içeren maddelerin kombine kullanılmasına yönelik tedavi yaklaşımı gündeme gelmiştir. PH'nın tedavisine yönelik arayışlar da, bu yaklaşım üzerine yoğunluk göstermektedir (Antonawich & Said, 2002; Bandyopadhyay, Dickman, Mathew & Said, 1998; Delgado & Ganea, 2003a; Delgado & Ganea, 2003b; Gressens vd., 1997; Harmar, 2012; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd.,2012; Tunçel vd., 1996a; Tunçel, Erden, Uzuner, Altiokka & Tuncel, 1996b; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd., 2000; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012).

Endojen bir nöropeptid olan VIP, antienflamatuar (Delgado & Ganea, 2003a; Delgado & Ganea, 2003b; Said, 2000), antioksidan (Offen vd., 2000; Said, 2000, Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b; Tunçel vd., 2012) antiapoptotik (Antonawich & Said, 2002; Korkmaz vd., 2012; Rangon vd.,

2005; Said, 2000; Tunçel vd., 2012) ve antiglutamaterjik (Brenneman & Douglas, 2007; Rangon vd., 2005; Said, Berisha, Pakbaz, 1995; Said, 2000) özelliklere sahip nörotrofik (Gozes vd., 2000; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd.,2012; Offen vd., 2000) bir moleküldür ve VİP ile Parkinson modellerinde yapılan gerek in vivo gerekse in vitro çalışmalar son derece umut verici sonuçlar içermektedir (Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd.,2012; Tunçel vd, 2005; Tunçel vd., 2012).

2.3. VAZOAKTİF İNTESTİNAL PEPTİT (VİP):

VİP, 28 aminoasitten meydana gelen, yapısal olarak glukagon, sekretin, gastrik inhibitör peptit (GIP) ve büyüme hormonu-serbestleştirici hormon (GHRH) gibi gastrointestinal sistem peptit hormonları ailesinden olan bir peptittir (Harmar, 2012; Tatemoto & Mutt, 1981). İlk olarak 1970'li yıllarda Said ve Mutt tarafından domuz ince bağırsağından izole edilerek tanımlanmıştır (Said & Mutt, 1970; Said & Mutt,1972; Tatemoto & Mutt, 1981). VİP, prepro-VİP prekürsör molekülünden sentezlenmektedir (Harmar, 2012). Nörohormon, nörotransmitter ve sitokin olarak birçok özellik göstermekte (Abad, Niewiadomski, Loh & Waschek, 2006; Dogrukol-Ak, Tore & Tunçel, 2004; Fahrenkrug, 1993; Said & Mutt, 1970; Said & Mutt,1972; Said vd.,1995; Said, 2000) ve KBB'den rahatlıkla geçebilmektedir (Dogrukol-Ak, Banks, Tunçel & Tunçel 2003; Dogrukol-Ak vd., 2004). VİP'in VPAC1 (VİP1), VPAC2 (VİP2) ve PAC 1 olmak üzere üç çeşit reseptörü bulunmaktadır (Abad vd., 2006; Gomariz, Martinez, Abad, Leceta & Delgado, 2001; Harmar, 2012). VİP'in affinitesi VPAC1 ve VPAC2 reseptörüne bağlanma yönünde çok yüksektir. VPAC1 reseptörleri daha çok akciğer, ince bağırsak, timus, kalp, aort, karaciğer, pankreas, böbrekler, böbrek üstü bezleri, uterus ile beyinde serebral korteks, kaudat nükleus, putamen, dentate gyrus, anteroventral talamik nükleus ve supraoptik nükleusta bulunurken, VPAC2 reseptörleri iskelet kası, kalp, pankreas, plasenta ve beyinde bulunmaktadır (Brenneman & Douglas 2007; Dogrukol-Ak vd., 2004; Gozes, 2012; Harmar, 2012). Her üç tip reseptör de serpentin tipi olup G proteini ile çalışmakta, VPAC1/VPAC2 hücre içinde c-AMP konsantrasyonunu artırırken, PAC1 fosfolipaz C üzerinden hücre içinde IP3 ve DAG yollarını aktive etmektedir (Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd.,2012; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd., 2000; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012). VİP geniş bir biyolojik aktiviteye sahip olup, dolaşım, solunum, gastrointestinal, endokrin ve immün sistem gibi çok geniş bir yelpazede fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesine katılmaktadır (Abad vd.,2003; Abad vd., 2006; Antonawich & Said, 2002; Brenneman, Phillips, Festoff & Gozes, 1997; Brenneman, 2007; Dogrukol-Ak vd., 2003; Dogrukol-Ak vd., 2004; Gozes & Brenneman, 1989; Harmar, 2012; Kalfin vd., 1994; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd., 2012; Said & Mutt, 1970; Said & Mutt,1972; Said vd.,1995; Said, 2000; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd.,

2000; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012). Beyinde özellikle serebral korteks, hipokampus ve hipotalamustaki nöronlarda bulunmaktadır (Dogrukol-Ak vd., 2004; Harmar, 2012). VİP'in insan ve sıçan beyinde yüksek affinite gösterdiği bölgeler frontal korteks, temporal korteks, amigdala, serebellum, kaudat, SN, hipotalamus ve hipokampus olarak rapor edilmiştir (Dogrukol-Ak vd., 2004). VİP'in, nörotransmitter, nöromodülatör, nörotrofik, antienflamatuar, antioksidan ve antiapoptotik özellikleri ile beyindeki ana nöropeptit olduğu (Delgado & Ganea, 2003a; Delgado & Ganea, 2003b; Kalfin vd., 1994; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd., 2012; Offen vd., 2000; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd., 2000; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012), SSS'nde astrosit mitozunu ve nöronal büyümeyi stimüle ettiği (Antonawich & Said, 2002; Kouki vd., 2007; Tunçel vd., 2012), nöronal canlılığı sağladığı ve glutamat eksitotoksitesine karşı hücre ölümünü engellediği bildirilmektedir (Dogrukol-Ak vd., 2004; Gressens, 1997; Said vd., 1995; Said., 2000). VİP doku ve hücre koruyucu özelliğe sahip bir moleküldür. Çeşitli çalışmalarla dokuları septik şok (Revhaug, Lygren, Jenssen, Giercksky & Burhol, 1988; Töre vd., 2002; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd., 2000), hemorajik şok (Tıkız, Tunçel, Akın & Gurer, 1992), Chron's hastalığı (Abad vd., 2003), iskemi reperfüzyonu (Kalfin vd., 1994; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b) ve romatoid artrit (Juarranz, 2003; Juarranz, 2005) istenmeyen hasarlarına karşı koruduğu, nöronal yaşam süresini artırdığı (Tunçel vd., 2005) gösterilmiştir.

VİP ayrıca immün yanıtlarda ve inflamasyonun kontrolünde de önemli etkiye sahiptir. T hücre farklılaşmasında ve göçünde önemli rol oynamakla birlikte, klasik geç tip hücresel bağışıklıkta rol alan yardımcı T1(Th1) hücrelerinin, alerji gibi aşırı duyarlık reaksiyonlarında rol alan yardımcı T2(Th2) hücrelerinin ve sitokin üretiminin modülasyonunda da etkili olduğu bildirilmektedir (Abad vd., 2006; Gomariz vd., 2001; Harmar, 2012; Said, 2000; Tunçel vd., 2005). VİP, inflammatuar kaskattaki birçok aşamayı inhibe ederek inflammatuar hücrelerin yaptıkları doku hasarlarını azaltmakta, temel inflammatuar sitokinler olan TNF- α , IL-6 ve IL-12'nin üretimini inhibe etmekte ve antienflamatuar bir sitokin olan IL-10'un üretimini artırmaktadır (Abad vd., 2006; Delgado & Ganea, 2003a; Gomariz vd., 2001; Lee, Schwab & McGeer, 2011). VİP inflammatuar sitokinlerin oluşumunu düzenleyen nükleer transkripsiyon faktör-b'nin (NF κ B) ekspresyonunu inhibe etmektedir. Böylece, VİP'in birçok alandaki aktivitesiyle inflammatuar yanıtların farklı aşamalarında kontrolü sağladığı ve inflammatuar reaksiyonları geriletmediği anlaşılmaktadır (Abad vd., 2003; Abad vd., 2006; Delgado & Ganea, 2003a; Delgado & Ganea, 2003b; Gomariz vd., 2001; Said, 2000).

VİP, genellikle kolinerjik ve GABAerjik nöronlarda kotransmitter olarak bulunmaktadır (Fahrenkrug, 1993). NO ve karbon monoksit (CO) ise VİP ile nonadrenerjik ve nonkolinerjik sistemde kotransmitter olarak bulunmaktadır

(Said & Rattan, 2004). Fizyolojik durumlarda VİP ve NO, birçok fonksiyonda birbirlerini destekleyici etki gösterirken, herhangi bir doku hasarı durumunda ise zıt etki oluşturlar. NO'nun aşırı üretimi hücre ve doku hasarına neden olmakta, VİP ise hücre ve dokuyu koruyucu etki göstermektedir (Gomariz vd., 2001; Said, 2000).

VİP, antiapoptotik etki özelliğine sahip bir moleküldür (Antonawich & Said, 2002; Bandyopadhyay vd. 1998; Dickman, Mathew, Berisha, Bratut & Said, 2000; Korkmaz vd., 2012; Tunçel vd., 2012). VİP, antiapoptotik bir molekül olan b-cell lymphoma 2'nin (bcl-2) düzeylerini artırırken, apoptotik hücre ölümünün meydana gelmesinde ana enzim olan kaspaz 3'ü inhibe ederek apoptozu geriletmektedir (Bandyopadhyay vd. 1998; Dickman vd., 2000). Bir başka çalışmada ise, VİP'in sıçan hippokampal kök hücrelerindeki nöronal apoptozu, sitokrom-c nin mitokondriden salıverilmesini inhibe ederek engellediği bildirilmektedir (Antonawich & Said, 2002).

VİP, güçlü antioksidan özelliğe sahip endojen bir nöropeptiddir ve bu etkisini gerek serbest radikal oluşumunu engelleme, gerekse oluşan radikalleri süpürme ile göstermektedir. VİP antioksidan etkisini direkt ve indirekt olarak gerçekleştirmektedir. İndirekt etkisini ksantin/ksantin oksidaz enzimini inhibe ederek ve böylece süperoksit radikal oluşumunu engelleyerek gösterirken, direkt etkisini singlet oksijen ve hidroksil gibi son derece toksik radikalleri süpürerek göstermektedir (Misra & Misra, 1990; Said & Mutt, 1970; Said, 2000; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b; Tunçel vd., 2012).

VİP'in beyinde meydana gelen travmatik durumlarda nöronların korunmasında ve gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Bassan vd., 1999; Brenneman vd., 1997; Delgado & Ganea, 2003b). Yapılan bazı çalışmalarda VİP'in, neonatal farelerde eksitotoksin kaynaklı beyaz madde lezyonlarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Brenneman vd., 2007; Gressens vd., 1997; Rangon vd., 2005). VİP astrositlerden, çok güçlü bir nöron koruyucu molekül olan ADNP'nin salıverilmesinde uyarıcı rol oynamaktadır (Bassan vd., 1999; Zamostiano vd. 2001; Zusev & Gozes, 2004).

Bu bulgular neticesinde VİP antienflamatuar, antiapoptotik, nörotrofik ve antioksidan özellikleri sebebiyle Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut verici bir molekül olarak görülmekte ve bu konuda yoğun araştırmalar devam etmektedir (Delgado & Ganea, 2003a; Harmar, 2012; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd. 2012; Said, 2000; Song vd., 2012; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012).

VİP, KBB'den geçebilen nörotrofik, nörotransmitter, nöromodülator, antioksidan, antienflamatuar ve antiapoptotik özelliklere sahip bir nöropeptittir. Yapılan bazı çalışmalarda sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan deneysel parkinson modelinde, VİP'in striatal dopamin düzeylerini

artırmadan, motor fonksiyon bozuklukları geri çevirdiği, antioksidan ve antiapoptotik etkileri dolayısıyla korpus striatumdaki MSN'lerin ölümünü ve demiyelinasyonunu engellediği, dendrit spinlerin ve SN'daki dopaminerjik nöronların sayısını artırdığı, VATH'da azalmış olan GABA düzeylerini normale getirdiği ve beyin mast hücrelerindeki NGF ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd. 2012; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012). Offen ve ark. nöron kültüründe yaptıkları çalışmada, nöronların 6-OHDA ve bir MPTP metaboliti olan MPP⁺ nörotoksinlerine maruz bırakıldıklarında VİP'in 6-OHDA'ya karşı etkili bir koruma sağlarken, MPP⁺ ye karşı aynı etkiyi gösteremediğini rapor etmişlerdir (Offen, 2000). Sistemik ve lokal MPTP uygulamasıyla oluşturulan fare parkinson modelinde VİP'in nöron koruyucu etkisi gösterilmiş ve bu etkisini mikroglial aktivasyonu inhibe ederek gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (Delgado & Ganea, 2003a). VİP gerek nöronlardan gerekse astrositlerden ADNP'nin salıverilmesini uyarıcı başlıca molekül olarak da bildirilmiştir (Bassan, 1999; Brenneman vd., 1997; Brenneman vd., 2007; Delgado & Ganea, 2003b; Gozes vd., 2000; Gozes, 2012; Zamostiano vd., 2001; Zusev & Gozes, 2004).

Delgado ve ark. farelerde yaptıkları bir çalışmada cam mikropipetlerle periventriküler alanda oluşturdukları beyin travması neticesinde, VİP'in hasarlı bölgede oluşan mikroglial TNF- α , IL-1 β ve NO gibi proinflatuar mediatörlerin üretim ve salınımını azalttığını, mononükleer fagositleri arttırdığını ve böylece nörodejenerasyonu belirgin bir şekilde azalttığını ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada VİP'in travmaya bağlı olarak gelişen astroglıyozisi azalttığı ve yine travma ile oluşan nörodejenerasyonun azaltılmasında, VİP tarafından astrositlerden salınımı uyarılan ADNP gibi nöron koruyucu faktörlerin de etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Delgado & Ganea, 2003b).

VİP aynı zamanda mikroglialara benzer hücreler olan mast hücreleri üzerinde de modulator etkiye sahiptir (Korkmaz vd., 2010; Tunçel vd., 2000; Tunçel vd., 2005). Korkmaz ve ark. sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada VİP'in, 6-OHDA ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde azalmış olan VATH GABA düzeylerini normale getirdiğini ve beyin mast hücrelerindeki NGF seviyelerini artırdığını göstermişlerdir (Korkmaz vd., 2010). Korkmaz ve ark. yaptıkları bir başka çalışmada, 6-OHDA ile oluşturdukları deneysel Parkinson modelinde VİP'in Tirozin Hidroksilaz (TH) enzimi içeren nöron sayısında ve MSN'lerin dendrit spinlerinde artma olduğunu göstermişlerdir (Korkmaz vd. 2012).

2.4. ASTROSİTLER:

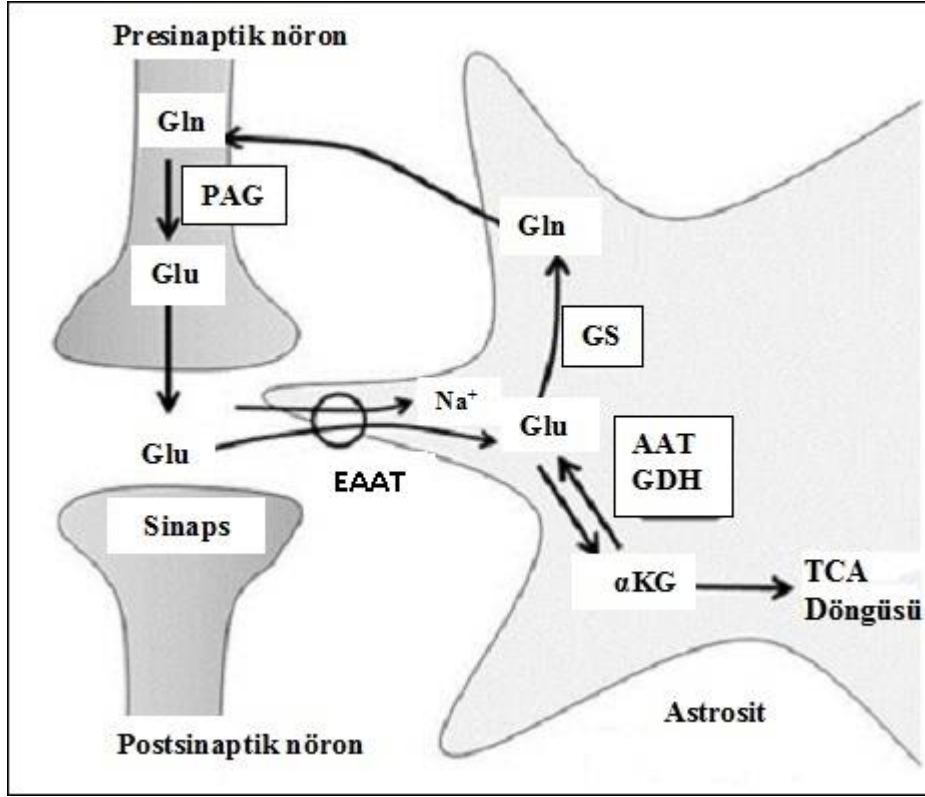
Sinir sisteminde nöron ve glia hücreleri olmak üzere iki tip hücre vardır. Glia hücreleri sayıları nöronlardan çok fazla olan, sinir dokusuna metabolik ve yapısal destek sağlayan hücrelerdir. Bu nedenle glia hücreleri sinir sistemi için özelleşmiş bağ dokusu hücreleri olarak kabul edilebilir. Glia hücreleri; mikrogliya, astrositler, oligodendrositler ve ependim hücrelerinden oluşmaktadır (Taner D, 2007). Glia hücreleri, çok sayıda molekül sentezleyip salıvermektedir. Bu moleküller, mikro çevre yapısının, nöronun yapısının ve metabolizmasının kontrolünde önemli rol oynadığı kadar nöronların elektriksel aktivitesinin düzenlenmesine de katkıda bulunmaktadır. Glia hücrelerinin sentezleyip salıverdiği bu moleküllere "gliotransmitter" adı verilmektedir (Angulo, Le, Kozlov, Charpak & Audinat, 2008; Orellana & Stehberg, 2014; Verkhratsky, Olabarria, Noristani, Yeh & Rodriguez, 2010).

Astrositler, uzantıları nedeniyle yıldız şeklinde hücreler olup, SSS'nde çok muntazam bir şekilde dağılım göstererek sistemin içini adeta döşerler. Astrositlerin, protoplazmik ve fibröz astrositler olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır. Bu iki grup arasındaki temel farklılıklar, yapıları ve yerleşimlerinden kaynaklanmaktadır. Protoplazmik astrositler, gri madde (substantia grisea) içinde yerleşmiş olup, ince dallanmalar ve küresel dağılım gösterirken fibröz astrositler, beyaz madde (substantia alba) içinde yerleşmiş ve çok uzun lif şeklinde morfolojik yapıya sahiptirler (Ramon & Cajal, 1909; Sofroniew & Vinters, 2010). Elektron mikroskopik çalışmalar, protoplazmik astrositlerin sinapsların etrafını tamamen sardığını fibröz astrositlerin ise, nöronların ranvier boğumları ile temas halinde olduğunu ve her iki tip astrositin de komşu astrositler ile "gap junction" larla bağlantılı olduğunu göstermiştir (Peters, Palay & Webster, 1991; Sofroniew & Vinters, 2010). Nöroanatomik çalışmalar, her iki tip astrosit grubunun, kan damarlarıyla temas halinde olduklarını ve kendi aralarında olduğu gibi nöronlarla da "gap junction"lar aracılığı ile bağlantı halinde olduklarını bildirmektedir. Bir başka deyişle astrositler bir taraftan kan damarlarıyla diğer taraftan da nöronlar ile temas halindedirler (Iadecola & Nedergaard, 2007; Peters vd., 1991; Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky vd., 2010;). Astrositlerin sinaptik alanlarda pre ve postsinaptik nöronlarla gap junctionlar aracılığı ile kurdukları bağlantılara "üçlü sinaps" adı verilmektedir (Araque, Parpura, Sanzgiri & Haydon 1999; Halassa, Fellin & Haydon, 2007; Perea, Navvarette & Araque, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky vd., 2010). GFAP, intermediet filament ailesinden bir protein olup, astrositlerin hücre iskeletini oluşturmaktadır. GFAP, immünohistokimyasal çalışmalarda astrositlerin tanınmasında güvenilir bir belirteç olarak büyük önem taşır (Li, Liu, Xin & Chopp, 2014; Pekny & Pekna, 2004).

2.4.1. Astrosit hücrelerinin fonksiyonları:

Astrosit hücrelerinin, beyin homeostazisinde önemli görevleri vardır. Hücre dışı sıvıdaki iyon konsantrasyonlarını, suyun hareketini ve birçok transmitterin hücre dışı sıvıdan alımını kontrol ederek, hücre dışı sıvının yapısını ve hacmini düzenlerler. Astrosit hücreleri uzantıları ile damar endotel hücrelerinin etrafını çevreleyerek KBB'nin yapısının korunmasına katkıda bulunurlar (Barres, Chunn & Corey, 1989; Barres, 2008; Bélanger & Magistretti, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky, 2010).

Astrositler, beyinde nörotransmitterlerin homeostazisinde önem taşırlar. Birçok nörotransmitterin sinaptik boşluktan uzaklaştırılması ve metabolize edilmelerine katkıda bulunurlar. Özellikle önemli bir eksitator nörotransmitter olan glutamatın beyinde birikimini ve toksisitesini engellemek açısından büyük önem arz ederler. Sinaptik taşıma esnasında salıverilen glutamatın % 20'si nöronlara geri alınırken, kalan % 80'i perisinaptik astrositler tarafından geri alınmaktadır (Bélanger & Magistretti, 2009; Coulter & Tore, 2012; Verkhratsky & Kirchhoff, 2007). Glutamatın hücre dışı bölgeden kaldırılması, eksitotoksiteden korunma açısından hayati önem taşıdığı gibi, nöronlarda yeniden sentez edilebilmesi için önemli bir döngü olan glutamat-glutamin döngüsünü de başlatır. Glutamat EAAT'ları ile astrosite alındıktan sonra, glutamin sentetaz tarafından glutamine dönüştürülür. Nontoksik glutamin daha sonra tekrar hücre dışı boşluğa taşınır ve oradan presinaptik nöron tarafından alınır. Nöronun sitoplazmasında glutamin tekrar glutamata dönüştürülür ve sinaptik veziküllerde biriktirilir. Böylece glutamat-glutamin döngüsü tamamlanmış olur (Angulo vd., 2008; Bélanger & Magistretti, 2009; Hernandez, Bell & Norenberg, 1977; Stobart & Anderson, 2013; Verkhratsky vd., 2010) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Glutamat-Glutamin Döngüsü.

Glu: Glutamat, Gln: Glutamin, EAAT: Eksitator amino asit taşıyıcısı, α -KG: alfa-ketoglutarat, GDH: Glutamat Dehidrojenaz, AAT: Aspartat aminotransferaz, PAG: Fosfat-aktiviteli glutaminaz, TCA siklusu: Trikarboksilik asit (Krebs) döngüsü, GS: Glutamin Sentaz (Stobart & Anderson, 2013'den modifiye edilerek alınmıştır).

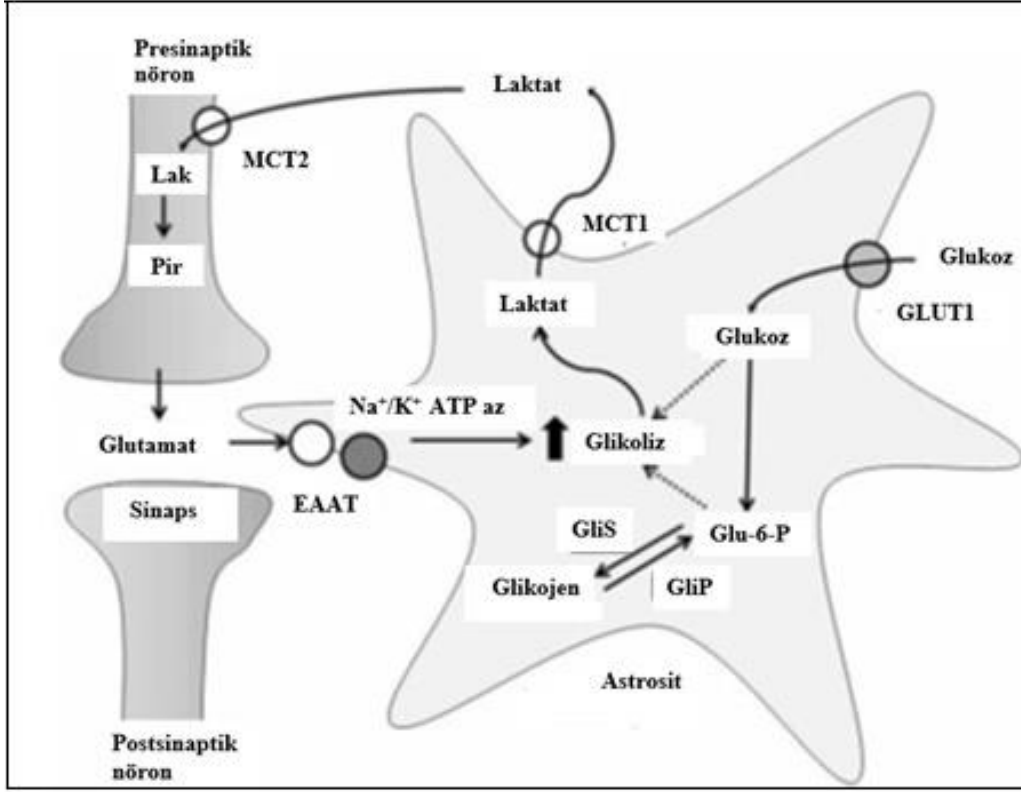
Astrofitler nöronların korunmasında önemli bir takım işlevler gerçekleştirirler. Nöronları korumaları sırasında, koruyucu özellik gösteren çeşitli molekülleri, hücre dışı alana salıverirler. Veya hücre dışı alanda yığılan birçok toksik molekülü içlerine alıp etkisizleştirerek, nöronun mikroçevresinden uzaklaştırırlar. Astrofitler bazı patolojik durumlarda TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 gibi proinflatuar sitokinleri de salıverirler. Başlangıçta savunmaya yönelik olarak ortama verilen bu moleküllerin astrofitlerden salıverilmesi kronikleştiğinde nörodejenerasyona veya var olan nörodejenerasyonun ilerlemesine neden olabilmektedir. Astrofitler bu iki yönlü etkileri nedeniyle koruyucu oldukları gibi zarar verici de olabilirler. Astrofitlerden salıverilen en önemli nöron koruyucu gliotransmitterler BDNF, NGF, ADNP, H₂S, GSH, laktat ve GABA olarak bildirilmektedir (Angulo vd., 2008; Bélanger & Magistretti, 2009; Orellana & Stehberg, 2014; Rappold & Tieu 2010; Sofroniew & Vinters, 2010; Zhou & Tang, 2011). Ayrıca astrofitler glutamat, ATP, adenozin ve GABA gibi nöronların elektriksel aktivitesinde aktif rol oynayan molekülleri salıvererek, sinaptik bilgi taşınmasının düzenlenmesinde direkt rol oynarlar ve nöronların uyarılmasını

modüle ederler (Barres, 2008; Bélanger & Magistretti, 2009; Rappold & Tieu, 2010).

Astrositler salıverdikleri gliotransmitterler aracılı sinaptik bilgi taşınması üzerinde güçlü, uzun süreli ve kalıcı etkiler gösterebilmektedirler. Bu etkiler arasında, sinapsların oluşması, devamlılığı ve sınırlandırılması sayılabilmektedir (Araque vd., 1999; Barres, 2008; Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky vd., 2010). Astrositlerin sinaptik modülasyon üzerindeki bu güçlü etkileri sinir sisteminin gerek fizyolojik gerekse patolojik durumları için geçerlidir.

Astrositler, yüzey membranlarında birçok nörotransmitter, sitokin, büyüme faktörü reseptörlerini ve çeşitli iyon kanallarını bulundurmaktadırlar. Ayrıca, pre ve postsinaptik nöronlarla gap junctionlarla bağlantı halindedirler. İyon kanalları ve gap junctionlar nedeni, astrositlerin membranındaki iyon akımları, aksiyon potansiyeline dönüşmeyen, yayılımcı olmayan lokal potansiyel değişikliklerine neden olmaktadır. (Barres, 1989; Charles, Merrill, Dirksen & Sanderson, 1991; Nedergaard, Ransom & Goldman, 2003, Sofroniew & Vinters, 2010). Bu lokal potansiyel değişiklikleri ile astrositler nöronların elektriksel aktivitelerini de düzenleyebilmektedirler.

Astrositler, nöronlar için hayati önem arz eden ve önemli bir enerji kaynağı konumunda olan laktat molekülünün nöronlara temininde başlıca rolü oynayan hücrelerdir. Astrositler beyinde kan damarlarını sararak nöronlara uygun metabolik desteği sağlarlar (Bélanger & Magistretti, 2009, Pellerin & Magistretti, 1994; Pellerin, Bouzier-Sore & Aubert, 2007; Pellerin & Magistretti, 2012; Schurr, Payne, Miller, Tseng & Rigor, 2001; Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky vd., 2010). Nöronlar hücre dışı alandan glukozu doğrudan alabilmelerine rağmen, aşırı nöronal aktivite esnasında artan enerji ihtiyacının karşılanması için astrositlerden gelen laktata ihtiyaç duymaktadır. Nöronların enerji gereksiniminin arttığı durumlarda astrositlerin, astrosit-nöron laktat mekiği (ANLS) olarak belirtilen mekanizma ile enerji ihtiyacının karşılanmasında önemli rolü bulunmaktadır (Bélanger & Magistretti, 2009; Berthet, 2009; Pellerin & Magistretti, 1994; Pellerin vd., 2007; Pellerin & Magistretti, 2012).



Şekil 2.5. Astrosit-Nöron Laktat Dolaşımı.

GLUT1:Glukoz taşıyıcısı 1, (Glc-6-P): glukoz-6-fosfat, Glis: Glikojen Sentaz, GliP: Glikojen Fosforilaz, MCT1: Monokarboksilat taşıyıcısı1, MCT2: Monokarboksilat taşıyıcısı 2, Lak: Laktat, Pir: Piruvat. (Stobart & Anderson, 2013'den modifiye edilerek alınmıştır)

ANLS'nin çalışmaya başlaması, beraberinde, glukoz taşıyıcısı 1 (GLUT 1) yoluyla dolaşımdan glukozun ve glutamatin astrositlere hızla alımını ve anaerobik glikolizin uyarılmasını da tetiklemektedir. Glikolizin son ürünü olan laktat, astrositler tarafından hücre dışı boşluğa salıverilir. Astrostitlerce salıverilen laktat, nöronlarda bulunan monokarboksilat taşıyıcılar (MCTs) ile nöronlara taşınır ve nöronlarda laktat dehidrojenaz (LDH) ile pirüvata yıkılarak mitokrondiyal krebs siklusuna gönderilir ve enerji kaynağı olarak kullanılır (Bélanger & Magistretti, 2009; Maus, Marin, Israel, Glowinski & Premont, 1999; Pellerin & Magistretti, 1994; Simpson, Carruthers & Vannucci, 2007; Stobart & Anderson, 2013) (Şekil 2.5). Astrositler ve nöronlar arasındaki laktat mekiğinin varlığı birçok çalışma tarafından desteklenmiştir (Pellerin & Magistretti, 1994; Pellerin vd., 2007; Pellerin & Magistretti, 2012; Schurr, Payne, Miller & Rigor, 1997; Schurr, Payne, Miller, Tseng & Rigor, 2001; Simpson vd., 2007). Deneysel eksitotoksosite modellerinde nöronun korunmasında (Berthet, 2009; Maus vd., 1999), posthipoksik iyileşmede (Schurr vd., 1997), serebral iskemide (Berthet, 2009), nöronal enerji kaybında (Cater, Benham & Sundstrom, 2001), nöronların normal fonksiyon ve yaşamının devamlılığında astrosit kaynaklı

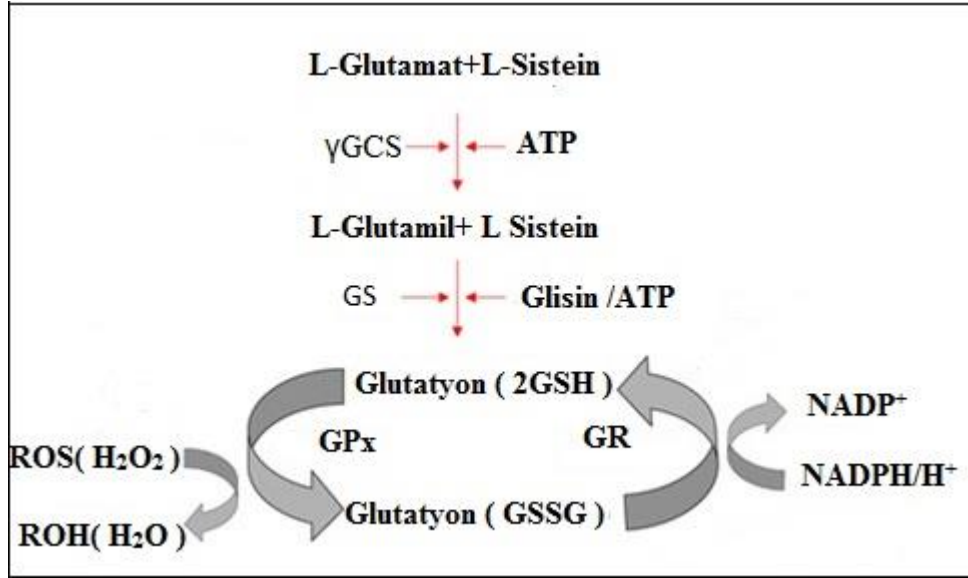
laktatın önemi gösterilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda glutamat toksisitesi durumunda sıçan beyinde laktat seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Berthet, 2009; Schurr vd., 1997; Schurr vd., 2001; Stobart & Anderson, 2013). Ros ve ark.nın sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada intrakortikal glutamat infüzyonu sonucunda elde ettikleri mikrodializatlarda glukoz ve laktat ölçümleri yapılmış ve ölçüm sonucunda glukoz seviyesinde azalma, laktat seviyesinde ise artış gözlemlenmiştir (Ros, Pecinska, Alessandri, Landolt & Fillenz, 2001). Laktatın glutamat eksitotoksitesinde meydana gelen nöron içi Ca^{++} artışı sonucunda oluşan hücre hasarını, NMDA reseptörlerini inhibe etmek suretiyle engellediği, böylece nöron koruyucu rol oynadığı da bildirilmektedir. Buna ilaveten eksitotoksiste sırasında nöronlarda oluşan enerji ihtiyacının karşılanmasında da önemli rol oynamaktadır (Ros, 2000; Ros vd., 2001).

Astrofitlerin anahtar bir diğer özelliği, glikozu glikojen şeklinde depolama kapasiteleridir. Aslında SSS glikojeninin hemen hemen tamamının, sadece astrofitlerde depo edildiği ileri sürülmektedir (Bélanger & Magistretti, 2009; Pellerin & Magistretti, 2012; Sofroniew & Vinters, 2010). Nöronların glikojen sentezi için gerekli enzimlere sahip oldukları fakat bu enzim aktivitesinin normalde sıkı bir şekilde baskı altında tutulduğu bildirilmektedir. Nöronlarda bu enzimler UPS enzimleri ile yıkılıp parçalanmaktadır. Bu baskılanmanın aksaması ile artan hücre içi glikojen, nöron için toksik olup, apoptoza neden olmaktadır (DiNuzzo, Maraviglia & Giove, 2011; Herrero-Mendez vd., 2009). Nöronlarda enzimlerin baskılanması nedeniyle glukoz, glikojen şeklinde depo edilememekte ve okside edilmektedir. Glukozun oksidasyonu, pentoz fosfat yolağında yapılmaktadır ve böylece nöronlar kendilerini oksidatif strese karşı koruyacak moleküllerin sentezini hızlandırmaktadır (Bélanger & Magistretti, 2009; DiNuzzo vd., 2011; Herrero-Mendez vd., 2009). Astrofitlerdeki glikojen ise, nöronların enerji ihtiyaçlarını karşılamak için hızlı bir şekilde mobilize olmaktadır. Glikojen yıkımından oluşan laktat, nöronların enerji ihtiyaçlarını karşılamak üzere hücre dışı alana bırakılır. Enerjinin glikojen şeklinde astrofitlerde depolanması, glikozun sınırlı olduğu durumlarda nöronun yaşayabilmesi için gereklidir (Bélanger & Magistretti, 2009; Herrero-Mendez vd., 2009).

Astrofitler oksidatif strese karşı nöronların korunmasında çok önemli işlevleri gerçekleştirmektedirler (Dringen, 2000; Rappold & Tieu, 2010; Verkhatsky vd., 2010). Oksidatif stres, ROS üretimi ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlikten meydana gelmektedir. Beyin yüksek metabolik hızı nedeniyle oksidatif strese oldukça açıktır. Nörodejeneratif hastalıklar, travmatik beyin hasarları ve inme gibi durumlarda oksidatif stres gözlenmektedir. Nöronlarla kıyaslandığında astrofitlerin ROS'a karşı savunmaları çok daha güçlüdür. Astrofitlerin oksidatif strese karşı olan güçlü antioksidatif etkileri; GSH, askorbat ve vitamin E gibi antioksidan moleküller ile, GPx ve katalaz (CAT) gibi ROS

detoksifikasyon enzimlerinin çok fazla miktarda olmasından kaynaklanmaktadır (Bélanger & Magistretti, 2009; Dringen, 2000; Rappold & Tieu, 2010).

GSH, beyinde bulunan önemli bir antioksidan moleküldür (Bélanger & Magistretti, 2009; Dringen, 2000; Martin & Teismann, 2009; Rappold & Tieu, 2010; Rice & Russo-Menna, 1998). GSH glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan (L-glutamil-L-sistein-glisin) bir tripeptittir. Nöronlar ve astrositler GSH sentezleyebilmektedirler. Ancak nöronların kendi GSH'larını sentezleyebilmeleri için gerekli olan sistein temininde astrositlere bağımlıdırlar (Bélanger & Magistretti, 2009; Dringen, 2000; Rappold & Tieu, 2010). GSH sentezi nöronlarda ve astrositlerde iki aşamada ve iki enzim katalizörlüğünde gerçekleşmektedir. Önce γ Glutamil-Sistein-Sentetaz (γ GCS) katalizörlüğünde glutamat ve sisteinden γ Glutamil-Sistein oluşurken, daha sonraki aşamada ise Glutatyon Sentaz (GS) katalizörlüğünde γ Glutamil-Sisteine, glisin eklenmesi ile GSH oluşur (Dringen, 2000; Haddad, 2002) (Şekil 2.6). Astrositler, GSH'larını taşıyıcı bir protein olan Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1) ile hücre dışı alana gönderirler. Nöronlar, mikroglialar ve oligodendrositler düşük MRP1 seviyeleri nedeniyle hücre dışı alana GSH salınımı yapamazlar. Bu yüzden astrositler hücre dışı GSH seviyelerine büyük katkıda bulunurlar. Astrositlerin hücre dışı alana salıverdikleri GSH, burada bir astrositik ektoenzim olan γ Glutamil Transpeptidaz (γ GT) tarafından katalize edilir ve ortaya çıkan sistein-glisin, ya direkt olarak ya da nöronal bir enzim olan Aminopeptidaz-N tarafından hücre dışında glisin ve sistein şeklinde ayrıldıktan sonra nöronlar tarafından alınır ve GSH sentezi yapılır (Bélanger & Magistretti, 2009; Dringen, 2000; Orwar vd., 1994; Rappold & Tieu, 2010). Astrositlerdeki GSH konsantrasyonunun ($\sim 3,8$ mmol/L) γ GCS'in yüksek aktivitesi nedeniyle nöronlardakinden ($\sim 2,5$ mmol/L) daha fazla olduğu ileri sürülmektedir.



Şekil 2.6: GSH Sentezi, GSH-GSSG-GSH Redoks Döngüsü

GSH: Glutatyon, GSSG: Disülfid Glutatyon, γ-GCS: γ-glutamil sistein sentaz, GS: Glutatyon Sentaz. GPx: glutatyon-peroksidaz, ROS: Reaktif Oksijen Türleri, H₂O₂: Hidrojen Peroksit, GR: Glutatyon Redüktaz, NADPH/H⁺: Nikotinamid (Haddad, 2002'den modifiye edilerek alınmıştır).

GSH, hücreleri ROS ve RNS'e karşı korumaktadır. GSH kolaylıkla okside ve redükte olabilen bir moleküldür. Bu özellikleri nedeniyle birçok farmakolojik ve biyokimyasal reaksiyonlarda önemli roller gerçekleştirmektedir. GSH, nöron ve astrositlerde daha çok indirgenmiş (redükte) halde bulunurken, yükseltgenmiş (okside) şekilde de bulunabilmektedir. GSH bazı serbest radikalleri direkt olarak kaldırabilirken, hidroperoksitleri ortadan kaldırabilmesi için GPx enziminin katalizörlüğüne ihtiyaç duymaktadır. Oksidatif stres sırasında GSH, GPx katalizörlüğünde yükseltgenerek okside GSH'a (GSSG) dönüşmektedir. Bu sırada iki molekül GSH arasında disülfid bağı kurularak GSSG meydana gelirken; ROS, GSH tarafından indirgenmiş olur. Normal koşullarda GSSG, GSH redüktaz (GR) katalizörlüğünde GSH'ya indirgenir ve böylece bir redoks döngüsü meydana gelmiş olur (Dringen, 2000; Haddad, 2002; Martin & Teismann, 2009) (Şekil 2.6).

PH da dahil olmak üzere, birçok nörodejeneratif hastalıklarda GSH/GSSG oranında azalmalar görülmüş, PH'nda GSH oranında % 40 civarında azalma olurken, GSSG miktarında ise artış olduğu bildirilmiştir (Dringen, 2000; Martin & Teismann, 2009; Rappold & Tieu, 2010). MPTP ile oluşturulan Parkinson modelinde, GSH/GSSG oranındaki azalmanın nedeni; γ GCS enziminin eksikliğine bağlanmıştır. MPTP metaboliti olan MPP⁺, γ GCS enziminin inhibisyonuna sebep olmaktadır. MPP⁺, dolaşımdaki sisteinin nöronlara taşınmasını sağlayan EAAT'lerinin fonksiyonlarını da

engellemektedir (Dringen, 2000; Martin & Teismann, 2009; Rappold & Tieu, 2010). Ayrıca MPTP maruziyeti sonucunda mikrogliyalardan kaynaklanan ROS ve RNS'nin neden olduğu GSH kaybı, dopaminerjik nöronlarda kayıplara sebep olmakta ve PH'nın ortaya çıkmasına önemli katkıda bulunmaktadır (Delgado & Ganea, 2003a, Delgado & Ganea, 2003b). PH vakalarında oksidatif stres nedeniyle GR enzim aktivitesinin azalması sonucunda, yükseltmiş GSH'ın indirgenmesi yeterince yapılamamaktadır (Dringen, 2000; Martin & Teismann, 2009). Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan deneysel PH'nda H₂O₂'in detoksifikasyonunu sağlayan GPx enziminin seviyesinde azalma görülmüştür (Martin & Teismann, 2009). Böylece ortamda metal iyonları varlığında H₂O₂, çok daha fazla toksik olan OH radikaline dönüşmekte ve nörodejenerasyonun artışına neden olmaktadır (Martin & Teismann, 2009).

Astrofitler tarafından sentezlenen ve saliverilen çok güçlü antioksidan, antiapoptotik, antienflamatuar ve nöromodülatör özellik gösteren moleküllerden birisi de Hidrojen Sülfür (H₂S)'dür. H₂S, çürük yumurta kokusu ile karakterize, zehirli bir moleküldür (Zhou & Tang, 2011). Bununla birlikte birçok çalışma göstermiştir ki H₂S, vücudun çeşitli yerlerinde üretilmekte ve özellikle sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemin çeşitli fizyolojik fonksiyonlarında önemli roller oynamaktadır (Wang R., 2002). H₂S, insan vücudunda Cistation β-Senthaz (CBS), Cistation γ-Lyaz (CGL) ve 3-Merkaptopiruvat Sülfür Transferaz (3MST) tarafından üretilmektedir (Abe & Kimura, 1996; Zhou & Tang, 2011). Bunlardan CBS daha çok astrofitlerde 3MST ise nöronlarda bulunurken, CGL kardiyovasküler sistemde bulunmaktadır (Enokido vd., 2005). H₂S'in nöronları oksidatif strese karşı koruduğu ilk olarak Y. Kimura ve H. Kimura tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılar çalışmalarında nöron kültürlerinde, glutamat eksitotoksitesi sonucu oluşan oksidatif strese karşı H₂S'in nöronları ölümden kurtardığını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada H₂S'in bir tür insan nöroblastoma hücresi olan SH-SY5Y hücrelerini, peroksinitrit ve hipokloröz asit tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiştir (Kimura & Kimura, 2004). Lu ve ark. yaptıkları bir çalışmada H₂S'in astrofitleri, H₂O₂'nin neden olduğu nöronal hasarlara karşı koruduğunu göstermişlerdir (Lu, Hu, Hu & Bian, 2008). H₂S'in çok güçlü bir antioksidan olan GSH seviyesini artırarak, nöronları oksidatif strese karşı koruduğu ve GSH sentezinde kullanılan sistemin hücre içi konsantrasyonunu ve γ GCS enziminin aktivitesini artırdığı bildirilmektedir (Kimura & Kimura, 2004). H₂S, ROS'un ve RNS'in istenmeyen etkilerini ortadan kaldırarak nöronları oksidatif strese karşı korumaktadır (Zhou & Tang, 2011). Kida ve ark., farelerde MPTP ile oluşturulan deneysel Parkinson modellerinde H₂S inhalasyonunun nigrostriatal bölgedeki dopaminerjik nöronları ve gliaları apoptozise karşı koruduğunu göstermişlerdir (Kida vd., 2011). H₂S mitokondrial fonksiyonu koruyarak antiapoptotik etkiler göstermektedir. H₂S mitokondrial porların

geçirgenliğini inhibe ederek, kaspaz kaskatının aktivasyonunu sağlayan ve dolayısıyla apoptozise neden olan sitokrom C'nin mitokondriden hücrenin sitozolüne geçişini engellemektedir (Hu, Lu, Wu, Wong & Bian, 2009). H₂S'in, SH-SY5Y hücrelerini MPP⁺, 6-OHDA, rotenon gibi nörotoksinlerin apoptotik etkilerine karşı koruduğu rapor edilmiştir (Hu vd.,2009). Lee ve ark. NaHS ve H₂S salgılatan nonsteroidal antiinflamatuvarların (NSAID), mikroglia ve astrositlerde NF κ B yolağıyla proinflamatuvar mediatörler olan TNF- α , IL-6 ve nitrit iyonlarının salgılanmaları ile oluşan inflamasyonu geriye dönüştürerek SH-SY5Y hücrelerini nörotoksiteden kurtardıklarını göstermişlerdir (Lee, Sparatore, Del, McGeer & McGeer, 2010). Ayrıca SH-SY5Y hücreleri mikroglialarla birlikte kültüre edildiklerinde ve mikroglialara rotenon uygulanması sonucunda SH-SY5Y hücreleri canlılıklarını devam ettiremezlerken mikroglialara NaHS uygulanması ile durumun tersine döndüğü görülmüştür (Hu, Wong, Moore & Bian, 2007). Bu bilgilerden anlaşıldığı üzere H₂S, mikroglia aktivasyonu sırasında mikroglialardan proinflamatuvar faktörlerin saliverilmesini inhibe ederek, nöroinflamasyonu engellemekte ve nöron koruyucu etki göstermektedir (Hu, Lu, Hon & Bian, 2011). H₂S, nöron ve glia arasındaki sinyal iletimine etki ederek sinaptik aktivitenin regüle edilmesinde de rol almaktadır. Yapılan bir takım çalışmalar, H₂S'in glialarda Ca²⁺ homeostazisinde etkili olduklarını göstermiştir. Mikroglialarda hücre dışı Ca²⁺'un hücre içerisine alımında rol alırlarken, Nagai ve ark. H₂S'in astrositlerde hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunu yükselterek, kalsiyum dalgalanmalarını arttırdıklarını göstermişlerdir (Nagai, Tsugane, Oka & Kimura, 2004). Bu bulgular H₂S'in nöron ve glialar arasındaki iletimi kolaylaştırdığının ve nöromodülatör etkilerinin olduğunun göstergesidir (Zhou & Tang, 2011). Sıçanlarda nörotoksik bir molekül olan 6-OHDA ile oluşturulan PH modelinde korpus striatumda H₂S üretiminin % 25 oranında azaldığı rapor edilmiştir (Hu vd., 2010; Zhou & Tang, 2011). H₂S, mikroglia ve astrositlerde NO ve TNF- α salınımını azaltarak antiinflamatuvar etki göstermektedir. Bu yönüyle de PH gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavilerinde rol alabilecekleri iddia edilmektedir. Yapılan literatür taramasında PH modellerinde striatal H₂S düzeyinin ölçüldüğü çok az sayıda literatüre rastlanmıştır (Hu vd., 2010).

Astrositlerden saliverilen, nöron koruyucu ve nörotrofik özellik gösteren diğer bir molekül, ADNP'dir. ADNP, beyin gelişiminde rol oynayan çok önemli bir peptittir ve ilk olarak, klonlanmış fare kanser hücrelerinde VIP ile aktif hale gelen gen olarak tanımlanmıştır (Bassan vd., 1999; Montesinos vd., 2010). ADNP, bir transkripsiyon faktörüdür (Gozes vd., 2000) ve ADNP geninin insan, sıçan ve fare genomlarında bulunduğu, insan ve fare beyinde en çok serebellum, hipokampus ve serebral kortekste yer aldığı bildirilmiştir (Gozes vd., 2007; Montesinos vd., 2010). ADNP nöron ve glial hücrelerin hem nükleus hem de sitoplazmalarında bulunmaktadır (Furman vd., 2004; Mandel, Spivak-Pohis & Gozes, 2008). ADNP'nin nöron koruyucu peptitlerin

üretiminde önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Özellikle nöronların farklılaşma dönemlerinde strese maruz kalmaları durumunda ADNP önemli nöron koruyucu etki göstermektedir. ADNP'nin, hücre mikrotübüllerinin reorganizasyonunda ve hücrelerin morfolojik değişikliklerinde rol oynadığı ve hücre içindeki dağılımının hücre hareketleri açısından önemli olduğu bildirilmektedir. ADNP'nin, nükleer ve sitoplazmik çift yönlü sinyallerin alınması ve gönderilmesinde rolünün olduğu düşünülmektedir (Mandel vd., 2008; Zamostiano vd., 2001). ADNP'nin, sinir sistemi yapılarını güçlendirdiği (Bassan vd., 1999; Mandel vd., 2008; Zamostiano vd., 2001), nöronların farklılaşması ve aksonal gelişim için önemli olduğu belirtilmektedir (Montesinos vd., 2010; Quintana vd., 2006). NAP, ADNP'den türeyen sekiz amino grup asitli bir peptid olup çok güçlü nöron koruyucu etkiye sahiptir. NAP ADNP'nin bir metaboliti olarak kabul edilmekte ve klinikte nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Bassan vd., 1999; Gozes, 2007; Montesinos vd., 2010; Zamostiano vd., 2001). Prenatal dönemde etanole maruz bırakılan fötüslerden izole edilen astrositler, kontrol fötüslerinden izole edilen nöronlarla birlikte kültüre edildiklerinde, nöronal büyümede, farklılaşmada ve sinaptik bağlantılarda kontrol astrositleri ile birlikte kültüre edilenlere kıyasla belirgin şekilde azalma görülmüş ve ortama NAP'ın ilave edilmesiyle durum tersine dönerek düzelmeye gözlenmiştir (Mandel vd., 2008; Pascual & Guerri, 2007). NAP'ın yeni doğmuş sıçanlara ait serebral korteks nöron kültürlerinde, bir nörotoksin olan tetradotoksinin nöronlarda yapmış olduğu elektriksel uyarı blokajını ve apoptozisi engellediği ve Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan β -amiloid peptid kaynaklı nöron ölümlerini azalttığı ileri sürülmektedir (Montesinos vd., 2010). NAP'ın nöronal mikrotübül affiniteli bir ajan molekül olduğu bildirilmektedir (Cochav Holtser, Divinski & Gozes, 2006; Matsuoka vd., 2007; Montesinos vd., 2010). Sıçan hippokampal nöron hücre kültürlerinde Kainik Asit eksitotoksitesine karşı NAP'ın nöron koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Cosgrave, McKay, Morris, Quinn & Thippeswamy 2010). Makrofajlarda ADNP nin VIP'e yanıt veren bir gen olduğu gösterilmiştir. LPS ile aktive edilen makrofajlardan salıverilmesi artan TNF- α , IL-6 ve IL-12 gibi proinflatuar sitokinler kültür ortamına ilave edilen NAP ile azaltılmıştır (Quintana vd., 2006). Mandel ve ark. organogenez ve nörogenezde ADNP geninin rolünün olduğunu bildirmektedirler (Mandel, Rechavi & Gozes, 2007). Yapılan bir çalışmada VIP ve ADNP/NAP sistemlerinin fonksiyonel önemi göz önünde tutularak, kortikal astrositlerin gelişiminde VIP'in hangi reseptörler yoluyla ADNP ekspresyonunu artırdığı ve ADNP ekspresyonunun astrogial hücrelerin yaşıyla ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. VIP'in astrositlerden VPAC2 reseptörü aracılığı ile ADNP salınımını uyardığı, VPAC2 reseptörünün beyin gelişimi için gerekli sinyal iletiminde çok önemli olduğu, astrositlerde ADNP ekspresyonunun yaşa bağlı olduğu gösterilmiştir (Zusev & Gozes, 2004). ADNP'nin nörotrofik ve nöron koruyucu özellikleri nedeniyle özellikle astrositlerden VIP tarafından salıverilmesi ile nörodejeneratif hastalıklarda

önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (Bassan vd., 1999; Montesinos vd., 2010).

Astrositlerden salıverilen bir diğer molekül, beyinde ana inhibitör nörotransmitter olan GABA'dır. Yapılan çalışmalar GABA'nın sadece GABAerjik nöronlardan sentezlenip salıverilmediğini, astrositlerin de GABAerjik ve GABAseptif olduklarını göstermiştir (Angulo vd., 2008; Araque vd., 1999; Yoon, Woo & Lee, 2012). Astrositlerin GABAerjik olmaları nedeniyle GABA bir gliotransmitter olarak da tanımlanmaktadır (Angulo vd., 2008; Araque vd., 1999; Yoon, Woo & Lee, 2012). Astrositlerden salıverilen GABA üçlü sinaps yapısına bağlı olarak nöronlardaki GABA reseptörlerini de aktive edebilmektedir (Angulo vd., 2008; Araque vd., 1999; Lee vd., 2011; Verkhratsky vd., 2010; Yoon vd., 2012). Astrositlerden salıverilen GABA nöronlarda tonik inhibisyon yapmaktadır (Glykys & Mody, 2007; Héja László vd., 2012; Lee vd., 2011; Yoon vd., 2012). Astrositler tarafından nöronal aktivitenin tonik inhibisyon ile düzenlenmesi fizyolojik öneme sahiptir. Nöronların GABAerjik inhibisyonu fazik ve tonik olmak üzere ikiye ayrılır. Fazik ve tonik inhibisyon, sinaptik ve ekstrasinaptik alanda bulunan düşük ve yüksek affiniteli GABA_A reseptörlerinin uyarılması ile olmaktadır. Ekstrasinaptik alanda bulunan yüksek afiniteli, yavaş duyarısızlaşan reseptörler düşük GABA konsantrasyonlarında tonik inhibisyondan sorumludurlar (Belelli vd., 2009; Brickley & Mody, 2012; Héja vd.,2012; Semyanov, Walker, Kullmann & Silver, 2004). Astrositlerden GABA salıverilmesinin ekstrasinaptik GABA_A reseptörlerinin uyarılması için önemli bir kaynak oluşturduğu ileri sürülmektedir (Héja vd.,2012; Soghomonian & Martin, 1998; Wu, Wang & Richerson, 2006). Bu nedenle GABA tarafından oluşturulan tonik inhibisyon, PH da dahil olmak üzere epilepsi ve stroke gibi patofizyolojik rahatsızlıkların tedavisinde artan bir öneme sahiptir (Coulter & Tore, 2012; Glykys & Mody, 2007; Héja vd.,2012).

GABA beyinde iki yolla sentezlenmektedir. Bu sentez yollarından birincisi glutamattan GAD enzimi aracılığı ile gerçekleşirken, diğeri ise poliamin grubundan spermin ve spermidin prekürsörü olan putresinin monoasetilasyonu ile oluşmaktadır (Angulo vd., 2008). Putresinin asetillenmesi sonucu oluşan monoasetil putresinin, MAO ile degradasyonu sonucunda GABA sentezi gerçekleşmektedir. Bu tip GABA sentezi daha çok immatür nöron ve astrositlerde görülmektedir (Angulo vd., 2008). Erişkin nöron ve astrositlerde GABA sentezi, klasik olarak bilinen GAD enzimi yoluyla gerçekleşmektedir. GAD enziminin bilinen iki çeşidi vardır. Bunlardan birisi 67k-Da ağırlığında olan GAD1 veya GAD 67, diğeri ise 65k-Da ağırlığında olan GAD2 veya GAD 65'dir (Angulo vd., 2008; Erlander, Tillakaratne, Feldblum, Patel & Tobin 1991; Soghomonian & Martin, 1998; Yoon vd., 2012). Nöronların büyük çoğunluğu her iki tip enzimi de bulundurmaktadır. GAD 67 daha çok sitoplazmada GAD 65 ise akson

terminallerinde bulunmaktadır (Soghomonian & Laprade, 1997; Soghomonian & Martin, 1998). GAD 67 sinaptik bilgi taşınmasının yanısıra, daha çok sinaptogenez için trofik faktör, nöron koruyucu, enerji kaynağı ve oksidatif stres esnasında redoks potansiyeli düzenleyicisi gibi genel metabolik aktivite gösteren GABA'nın sentezlenmesinde, GAD 65 ise başlıca nörotransmitter olarak davranan GABA'nın sentezinde işlev görmektedir (Buddhala, Hsu & Wu , 2009; Soghomonian & Martin, 1998; Yoon vd., 2012). GABA'nın A, B ve C olmak üzere üç tip reseptörü bulunmaktadır. GABA_A ve GABA_C iyonotropik, GABA_B ise metabotropiktir (Ganong, 2010). Yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda astrositlerde daha çok GABA_A reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir (Fraser vd., 1995; MacVicar, Tse, Crichton & Kettenman, 1989). Astrositlerdeki GABA_A reseptörlerinin aktivasyonu sinaptik iletimde, sinaps şekillenmesi ve stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Matsuani & Yamamoto, 1998). Astrositler, sinaptik aralığa nöronlar tarafından salıverilen GABA ve glutamat gibi nörotransmitterleri, membranlarında bulunan taşıyıcı moleküller aracılığıyla geri alırlar. Bu durumda, nörotransmitterlerin hücre dışı sıvıdaki düzeylerinin bazal seviyede kalmaları sağlanmaktadır. Astrositlerdeki, hem glutamat hem de GABA taşıyıcılarının taşıma güçleri, hücre içi ve dışındaki Na iyonunun konsantrasyon gradientine bağlıdır (Kanner, 2006; Wu vd., 2006). GABA'nın GAT1, GAT2 ve GAT3 olmak üzere üç tipi taşıyıcısı bulunmaktadır, bunlardan GAT1 ve GAT3 astrositlerde oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır (Héja vd.,2012; Lee vd., 2011). GABA astrositlere alındıktan sonra hızlı bir şekilde GABA-Transaminaz (GABA-T) ile süksinik asite katalize edilerek Krebs siklusuna katılmakta ve buradan tekrar glutamat sentezlenmektedir. Astrositlerdeki bu glutamat, direkt olarak astrositlerden salıverilebildiği gibi, GSH ve tekrar GABA sentezinde kullanılabilir. (Angulo vd., 2008; Buddhala vd.,2009; Coulter & Tore, 2012; Lee vd., 2011)

GABA, SSS'de önemli inhibitör bir nörotransmitter olmakla birlikte, antiinflamatuvar özellik de gösteren bir moleküldür (Angulo vd., 2008; Lee vd., 2011a; Lee vd., 2011b). Yapılan bir çalışmada GABA'nın astrositlerde ve mikroglialarda NF κ B ve P-38 MAP kinaz inflamatuvar yollarını inhibe ederek TNF- α , IL-6, lipopolisakkarit ve IF- γ 'nın salıverilmelerini engellediği ve böylece antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmektedir (Lee vd., 2011a; Lee vd., 2011b). Beyinde PH ile ilişkilendirilmiş GABA seviyelerini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Coune vd., 2013; Hossain & Weiner 1995; Korkmaz vd., 2010; Lindefors, Brodin, Tossman, Segovia & Ungerstedt, 1989; Robertson ,Graham, Sambrook & Crossman, 1991; Wu vd.,2006; Yeung vd., 2003). Bir çalışmada sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan PH modelinde, VATH de GABA seviyelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Korkmaz vd., 2010). Lindefors ve ark. ise sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada 6-OHDA ile oluşturdukları Parkinson modelinde striatumda GABA düzeyinde artış bildirirken, SN'da herhangi bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir (Lindefors vd., 1989). Maymunlarda MPTP ile oluşturulan Parkinson

modelinde ise GP'da GABA seviyelerinde artış bildirilmiştir (Robertson vd.,1991).

Bu bilgiler çerçevesinde GABA, PH'nın patoloji ve tedavisinde dikkate alınması gereken önemli bir nörotransmitter olarak görülmektedir. Burada astrosit kaynaklı GABA'nın da, BG devresinin normal çalışmasında ve PH'ndaki önemi ayrıca düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:

Çalışmamızda her iki cinsiyet grubundan toplam 30 adet, 200-250 gr. ağırlığında, yetişkin Sprague-Dawley türü sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma öncesinde gerekli olan etik kurul onayı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi(TİCAM)'nden 17.11.2011 tarihinde 242 karar numarası ile alınmıştır.

Araştırmalarımızda stereotaksimetrik cerrahi, motor fonksiyon testi (Rotasyonmetri), perfüzyon fiksasyonu mikrodializ ve immünohistokimya yöntemleri kullanılmıştır.

Çalışmalarımızda Rotasyonmetrik veriler, ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar, Kruskal-Wallis testiyle gerçekleştirilmiştir. GABA, glutamat, GSH ve laktat konsantrasyon sonuçları ile immünohistokimyasal işaretleme verileri ANOVA testi ile değerlendirilmiş, gruplar arası farklılıkların karşılaştırılmaları ise Tukey çoklu karşılaştırmalı test ile gerçekleştirilmiştir. İstatiksel analizler Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA) kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. $p < 0,05$, istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Araştırmalarımız, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na 201211028-B projemiz ile talepte bulunduğumuz malzemelerin temin edilmesini takiben 2012-2014 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarımızın stereotaksimetrik cerrahi, motor fonksiyon testi, perfüzyon fiksasyonu ve mikrodializ bölümleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji laboratuvarı'nda, HPLC işlemi Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik kimya laboratuvarı'nda ve immünohistokimya kısmı ise Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Materyaller:

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler:

GSH	:Taufkirchen, Almanya
L-Glutamat	:Taufkirchen, Almanya
o-ftalaldehit (OPA)	:Taufkirchen, Almanya
β -merkaptotanol (β ME)	:Taufkirchen, Almanya
Sodyum tetraborat	:Taufkirchen, Almanya
Potasyum fosfat	:Taufkirchen, Almanya
Fosforik asit	:Taufkirchen, Almanya
Borat tamponu	:Taufkirchen, Almanya
Laktik asit Sigma	:Taufkirchen, Almanya
Asetonitril	:Merck GmbH; Darmstadt, Almanya

Metanol	:Merck GmbH; Darmstadt, Almanya
Etanol	:MEY, Türkiye
GABA	:Acros Organiks; New Jersey, NY, ABD
Paraformaldehit	:Merck, Almanya
PBS	:Santa Cruz, İspanya
Ultra saf su	:Millipore Synergy Water Purification System; Rotterdam, Hollanda
Uretan	:Sigma, A. B. D.
Ketamin	:Bayer, Almanya
Ksilazin	:Bayer, Almanya
6-OHDA	:Sigma, A. B. D.
Askorbik asit	:Merck, Almanya
Apomorfin	:Sigma, A. B. D.
VİP	:Sigma, A. B. D.
antiGAD	:abcam, Cambridge, İngiltere
antiADNP	:abcam, Cambridge, İngiltere
antiGFAP	:calbiochem, Darmstadt, Almanya

3.1.2. Kullanılan cihazlar:

Hassas terazi	:E12139, Ohaus, İsviçre
Buzdolabı	:Arçelik, Türkiye
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
Stereotaksimetrelik düzenek	:Kopf 5600, David Kopf Ins. , A. B. D.
Vorteks	:NM110, Nuvemix, Türkiye
HPLC cihazı	:Agilent 1260 Waldbornn, Germany
HPLC oto örnekleyici	:Agilent 1260 Waldbornn, Germany
HPLC kolon fırını	:Agilent 1260 Waldbornn, Germany
HPLC pompası	:Agilent 1260 Waldbornn, Germany
HPLC dedektörü (floresans)	:Agilent 1260 Waldbornn, Germany
HPLC dedektörü (dizi diyot)	:Agilent 1260 Waldbornn, Germany
HPLC kolonu	:Zorbax, Extend-C18 Waldbornn, Germany
HPLC kolonu	:Phenomenex, Synergi Hydro-RP 80 Å A.B.D
HPLC data programı	:ChemStation, LC3D systems, Rev. B.04.03Waldbornn, Germany
Isıtıcı ped	:CMA 149, 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 cinsiyet grubundan toplam 30 adet, 200-250 gr. ağırlığında, yetişkin, Sprague-Dawley türü sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 3 gruba ayrıldı. Gruplar:

Grup 1 (Sham (Taklit Operasyon) grubu, n=10): Bu grup kontrol grubu olup, hayvanın korpus striatumuna intrastriatal olarak % 0.3'lük 2 µL askorbik asit çözeltisi ve % 0.9'luk tuz çözeltisi (serum fizyolojik (SF)) stereotaksimetrik sistem kullanılarak verilmiştir. Daha sonra 14 gün boyunca SF uygulaması 2 günde bir, i.p. olarak devam etmiştir.

Grup 2 (6-OHDA verilen grup, n=10): Bu grup, Parkinson modeli oluşturulan grup olup, hayvanlara intrastriatal olarak 2 µL % 0.3'lük askorbik asit ve SF çözeltisi içerisinde hazırlanmış olan 12 µg 6-OHDA (6 µg/µL), stereotaksimetrik sistem kullanılarak verilmiştir. Daha sonra bu gruba da, 14 gün boyunca SF uygulaması 2 günde bir, i.p. olarak devam etmiştir.

Grup 3 (6-OHDA verilen ve VİP tedavisine alınmış olan grup, n=10): Bu grup, Parkinson modeli oluşturulduktan sonra VİP tedavisine alınmış olan gruptur. Parkinson modeli oluşturulduktan 1 saat sonra başlamak üzere SF içerisinde hazırlanmış olan VİP, 25 ng/kg olacak şekilde i.p. olarak uygulanmıştır. VİP tedavisi 14 gün süreyle iki günde bir devam etmiştir.

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 içerisinde çözülmüş 2 µL % 0.3'lük askorbik asit çözeltisi içerisinde 12 µg/sıçan olacak şekilde hazırlandı. Kontrol grubu (1.grup) için, SF içerisinde çözülmüş 2µL % 0.3'lük askorbik asit çözeltisi, 3. grup için VİP, 25 ng/kg olacak şekilde SF içerisinde hazırlandı. Mikrodiyaliz işleminde perfüzyon sıvısı olarak yapay beyin-omurilik sıvısı (BOS) (Ringer) kullanıldı.

Korpus Striatum'da 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 miktarda anestezi derinliğine ulaşıldıktan sonra, sıçanlarda lezyon oluşturma aşamasına geçildi. Bu aşamada stereotaksimetrik sistem (Kopf) yardımıyla sıçan beyinde korpus striatuma girilip (Stereotaksimetrik koordinatlar striatum için: Anterior-Posterior (AP):1.60; Lateral (L):2.6; Vertikal (V):5.1, Bregmaya göre, Watson-Paxinos sıçan beyin atlasından (Paxinos & Watson, 1997) faydalanılarak) Hamilton mikroenjeksiyon enjektörü aracılığı ile Sham

grupları için 2 µL askorbik asit çözeltisi, Parkinson modeli oluşturulacak gruplar için 2 µL 6-OHDA çözeltisi enjekte edildi. Enjektörün korpus striatuma yerleştirilmesi işlemi, dokuya daha az zarar vermek amacıyla yavaş bir şekilde 2 dk.'lık bir sürede gerçekleştirildikten sonra, 6-OHDA ve askorbik asit enjeksiyonu işlemi emilimin daha iyi sağlanması için 3dk.'da gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin enjeksiyonundan sonra enjektör iğnesi çıkarılmadan önce korpus striatumda 3 dk. bekletildi. Enjektörün çıkarılması işlemi ise bu esnadaki vakumlama etkisinin önüne geçebilmek için 2dk.'lık bir sürede gerçekleştirilmiştir. Operasyon sırasında sıçanların vücut ısıları rektal termometre ve ısıtıcı ped (CMA 149) aracılığı ile 37 ± 0.5 C°'de sabit tutuldu. İn vivo işlemler hayvanlardaki gün içi ritim değişiklikleri göz önünde bulundurularak her sıçan için günün aynı saatlerine denk getirilerek gerçekleştirildi. Operasyon sonrası kafatası üzerindeki kesi steril koşullarda dikkatlice dikilerek, sıçanlar özel koşullarda farklı kafeslerde bakıma alındı.

3.2.2. Rotasyonmetrik Ölçüm:

Sıçanlara korpus striatuma 6-OHDA ve SF enjekte edilmesinden sonraki ondördüncü günde, SF içerisinde çözülen 0.05 mg/kg apomorfine i.p. olarak enjekte edildi. Apomorfine enjeksiyonundan 10 dk. sonra bilgisayar destekli rotasyonmetri cihazına (Columbus Instruments Inc.) bağlanarak motor fonksiyonları 90 dk. süresince kaydedildi. Rotasyonmetrik veriler; saat yönü (CW), saat yönünün tersine (CCW), yarı saat yönü (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. Mikrodializ:

Rotasyonmetrik ölçümden 1 gün sonra, sıçanlar ürethan anestezisi (1.5 g/kg i.p) altında stereotaksimetre cihazına yerleştirilerek, GABA, glutamat, GSH ve laktat ölçümü için, korpus striatumdan (AP:1.60; L:2.6; V:5.1, Bregmaya göre) mikrodializatlar toplandı (Paxinos & Watson, 1997) Mikrodializ işlemi için CMA/12 PAES membranlı (maksimum por çapı 20.000 dalton, membran uzunluğu 3 mm, membran çapı 1mm olan) problar kullanıldı. Prob Korpus Striatuma yerleştirildikten sonra, yapay BOS çözeltisi ile, perfüzyon hızı 2 µL/dk olacak şekilde perfüzyona başlandı. Ölçüm için ilk seksen dk. dan sonra toplanan numuneler kullanılmıştır. Ölçüm numuneleri, yirmi dk ara ile 4 kez toplanmıştır. Mikrodializatlar, soğutuculu oto-dializat (CMA 170) toplayıcı ile +4 °C'de kapaklı polipropilen tüplere toplanmıştır ve toplanan numuneler -70 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Ekstraselluler GSH, Laktat, Glutamat ve GABA düzeylerinin ölçümü:

Kullanılan cihazlar:

GSH, glutamat ve GABA analizleri için floresans detektör, oto örnekleyici, kolon fırını ve ikili pompadan oluşan Agilent 1260 Infinity sıvı kromatografisi (Waldbornn, Almanya) kullanılmıştır. Veri değerlendirilmesi ve piklerin integrasyonu için ChemStation, LC 3D systems, Rev. B. 04. 03 yazılımı kullanılmıştır.

Analizlerin gerçekleştirildiği analitik kolon olarak Zorbax, Extend-C18 (149 x 3 mm, partikül çapı 3.5 µm) kullanılmıştır.

Laktat analizleri için dizi diyot detektör, oto örnekleyici, kolon fırını ve ikili pompadan oluşan Agilent 1260 Infinity sıvı kromatografisi (Waldbornn, Germany) kullanılmış olup, veri değerlendirilmesi ve piklerin integrasyonu için ise; Chem Station, LC 3D systems, Rev. B. 04. 03 yazılımı kullanılmıştır.

Analizlerin gerçekleştirildiği analitik kolon olarak Phenomenex, Synergi Hydro-RP 80 Å (250 x 4,6 mm, partikül çapı 4 µm) kullanılmıştır.

Kullanılan kimyasallar:

GSH, L-Glutamat, o-ftalaldehit (OPA), β-merkaptoetanol (βME), sodium tetraborat, potasyum fosfat, fosforik asit ve Laktik asit Sigma (Taufkirchen, Almanya), Asetonitril ve metanol Merck GmbH (Darmstadt, Almanya), 4-γ aminobutirik asit (GABA), Acros Organics (New Jersey, NY, ABD) firmalarından temin edilmiştir.

Kullanılan ultra saf su Millipore Synergy Water Purification System (Rotterdam, Hollanda) kullanılarak üretilmiştir.

Türev işlemleri:

Bileşikler OPA/βME türevleri şeklinde detekte edilmişlerdir (Lunn & Hellwig, 1998). Türev işlemleri için 9 µL türev çözeltisi (5 mM OPA and 2 mM βME in 0.1 M borat tamponu; pH 9.3) 12 µL mikrodiyalizat ile karıştırılmış ve kromatografik analiz öncesi 1 dakika bekletilmiştir. Tüm türev işlemleri otomatik olarak HPLC nin oto örnekleyicisinde gerçekleştirilmiştir. Türevler floresans detektör ile 230 nm eksitasyon ve 450 nm eksitasyon dalga boylarında detekte edilmiştir.

3.2.4.1. GSH, Glutamat ve GABA' nın kromatografi analizi:

Bileşenler ikili gradient elusyon kullanılarak kromatografik olarak ayrılmışlardır. A hareketli fazı olarak (metanol: asetonitril: 40 mM potasyum fosfat tamponu; pH 6.7), (20:2:78); B hareketli fazı olarak (metanol: asetonitril: 40 mM potasyum fosfat tamponu; pH 6.7), (50:10:40) kullanılmıştır.

Uygulanan gradient program:

0-4 dak, % 0 B; 4-15 dak. doğrusal şekilde % 0 dan % 100 B; 15-20 dak. , % 100 B sabit; 20-25 dak, doğrusal şekilde % 100 den % 0 B; 25-28 dak, kolonun bir sonraki analiz için başlangıç koşullarına gelmesi için (% 0 B) geçirilmiştir.

Bileşenlerin optimal ayrımı ve simetrik pikleri 30 °C kolon sıcaklığında 0,6 mL. min⁻¹ akış hızında gözlenmiştir. Türev sonrası toplam karışımdan 20 µL örnek enjekte edilmiştir (Lunn & Hellwig, 1998).

3.2.4.2. Laktik asit'in kromatografi analizi:

Bileşenler ikili gradient elusyon kullanılarak kromatografik olarak ayrılmışlardır. A hareketli fazı olarak (% 0.1 fosforik asit-Su); B hareketli fazı olarak (% 0.1 fosforik asit-metanol) kullanılmıştır.

Uygulanan gradient program:

0 - 5,5 dak. % 0 B; 5,5 - 7,5 dak. doğrusal şekilde % 0 dan % 100 B; 7,5 - 12 dak. % 100B sabit; 12-14 dak. doğrusal şekilde % 100 den % 0 B; 14-25 dak. kolonun bir sonraki analiz için başlangıç koşullarına gelmesi için (% 0 B) geçirilmiştir.

Bileşenlerin optimal ayrımı ve simetrik pikleri 40 °C kolon sıcaklığında 1 mL.min⁻¹ akış hızında gözlenmiştir. Türev sonrası toplam karışımdan 20 µL örnek enjekte edilmiştir.

Detektör olarak dizi diyot detektörü kullanılmış ve sinyaller 210 nm dalga boyunda kayıt edilmiştir (Hallström, Carlsson, Hillered & Ungerstedt, 1989).

3.2.5. Histolojik incelemeler için yapılan işlemler:

3.2.5.1. Perfüzyon Fiksasyonu:

Mikrodiyaliz işleminin tamamlanmasından sonra prob beyinden çıkarılarak, sıçan stereotaksimetrik düzenden alındı ve daha sonra bir küvetin içerisine sırt üstü yatırılıp ekstremitelerinden bantla sabitlendi. Anestezi derinliği kontrol edilerek ksifoid kıkırdaktan başlanarak göğüs kafesi açıldı. Bu işlem gerçekleştirilirken göğüs kafesi içerisindeki organlara zarar verilmemesine dikkat edildi. Kalp, etrafındaki dokular uzaklaştırılarak açığa çıkarıldı. Peristaltik bir pompaya bağlı olan kateter kalbin sol ventrikülüne yerleştirildikten sonra kalbin sağ atriumuna bir kesi atılarak, perfüzyon sıvısının çıkmasına olanak sağlayacak yol açıldı ve perfüzyon işlemine başlandı.

Perfüzyon işlemi için 37,5 C°'de fosfat tamponlu salin (PBS, pH:7,4) ve fiksatif (%4 Paraformaldehit) çözeltileri kullanıldı. Tampon çözelti vücuttaki kan boşalınca kadar (5dk., 100 mL.) verildi. Fiksatif çözelti ise tüm vücut istenen sertliğe ulaşınca kadar (10dk., 100 mL) uygulandı. Fiksasyon işleminin tamamlanmasının ardından sıçanın baş kısmı vücuttan ayrıldı ve kafatası içerisindeki beyin dokusu bir bütün olarak çıkarıldı. Beyin blokerine (Kopf PA-001) yerleştirilen beyin dokusundan striatal bölgeler kesilerek fiksatif çözeltiye alındı ve fiksatif çözelti içerisinde 1 gün bekletildi.

3.2.5.2. İmmünohistokimyasal İşlemler:

Fiksasyonu yapılan dokulardan donduruculu mikrotom cihazı ile 30 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve her altı kesitten biri pozitif şarjlı lamlara yerleştirildi. Alınan kesitlerde farklı işaretlemeler (GFAP, GAD, ADNP, GFAP+GAD ve GFAP+ADNP) yapıldı. GFAP işaretlemesi astrositleri, GFAP+GAD işaretlemesi astrosit kaynaklı GAD'ı, GFAP+ADNP işaretlemesi ise, astrosit kaynaklı ADNP'yi belirtmektedir. Kesitlere aşağıdaki immünohistokimya protokolü uygulandı.

3.2.5.2.1. İmmünohistokimyasal (İHK) Boyama:

Antijenin Açığa Çıkarılması:

Doku fiksasyonu sırasında kullanılan paraformaldehit, antijenin maskelenmesine neden olduğu için, yüksek ısı ve basınçlı ortamda Sitrata tamponlu (0.01 M, pH:6) solüsyonda antijenin açığa çıkarılması sağlandı. Daha sonra kesitler oda ısısına gelinceye kadar soğutuldu.

İmmünohistokimyasal tekli boyama:

- Kesitlerin etrafı doku sınırlama kalemi (Pap Pen) ile çizildi. Yapılan boyama işlemleri sırasıyla şöyledir:
- Tris Tamponlu Salin (TBS) ile yıkama :3x10dk.

- Hidrojen peroksit (%3 Aqueouse) ile yıkama :10dk. (Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla)
- TBS (Triton-X, % 0.3, pH:7. 6) ile yıkama :3x10dk.
- Arka planın bloklanması (%5 normal goat serumu): Oda ısısında 30dk. süreyle uygulandı.
- Primer Antikor :antiGAD (rabbit, 1/100 dilue) + antiADNP (rabbit, 1/100dilue) + antiGFAP (mouse, 1/100 dilue) :Bir gece +4 C°'de bekletildi.
- TBS ile yıkama :3x10dk.
- Sekonder antikor : GAD ve ADNP için anti-rabbit, 1/200 dilue; GFAP için anti-mouse, 1/100 dilue,(sekonder antikor-biotin ile konjuge edilmiş): 2 saat oda ısısında bekletildi.
- TBS ile yıkama :3x10dk.
- Streptavidin Peroksidaz uygulaması :30dk.
- TBS ile yıkama :3x10dk.
- Alkalen Fosfat (AP) (GFAP) Novared peroksidaz kromojen (ADNP-GAD), (Vector, ABC Elite Kit) ile boyama :3 dk.

Boyama işleminin tamamlanmasından sonra lama vectastain- mounting medium 2 damla damlatılarak lamel ile kapatıldı. Buraya kadar olan işlemler her 3 antikor için aynı şekilde yapılmıştır.

İmmünohistokimyasal ikili boyama:

- Kesitlerin etrafı doku sınırlama kalemi (Pap Pen) ile çizildi.
- TBS ile yıkama :3x10dk.
- GFAP-GAD:
 - Primer Antikor GFAP (Mouse, 1/100 dilue):+4 C°'de 1 gece bekletildi
 - TBS ile yıkama :3x10dk
 - Goat-anti mouse sekonder antikor (AP ile konjuge edilmiş):3 saat oda ısısında bekletildi.
 - TBS ile yıkama :3x10dk.
 - Vectastain AP developer (5 ml. Buffer+2 damla A+ 2 damla B) uygulaması
 - TBS ile yıkama :3x10dk.
 - Primer Antikor GAD (Rabbit, 1/100 dilue):+4 C°'de1 gece bekletildi
 - TBS ile yıkama :3x10dk.
 - Goat-anti rabbit sekonder Antikor (novared peroksidaz ile konjuge edilmiş) :3 saat oda ısısında bekletildi
 - TBS ile yıkama :3x10dk.
 - ABC Elite kit (vector) (10 ml. 3 damla) uygulaması:30 dk. Oda ısısında bekletildi.
 - TBS ile yıkama :3x10dk.

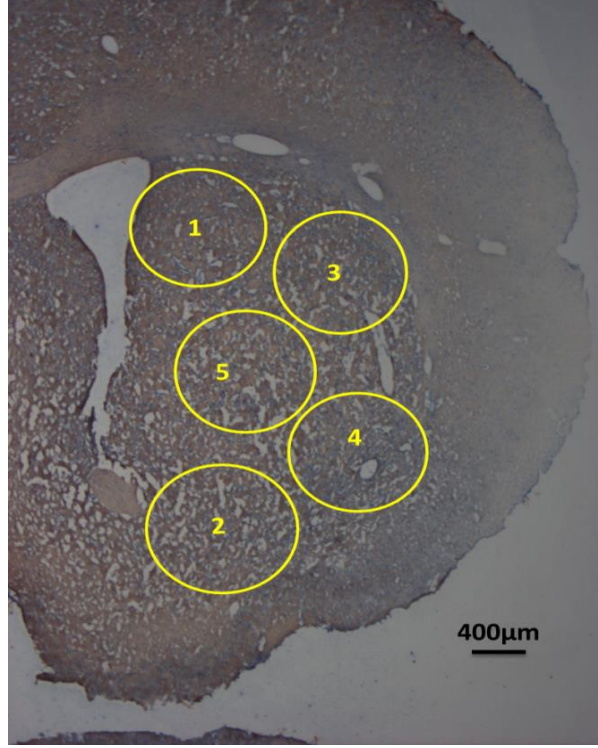
Boyama işleminin tamamlanmasından sonra lama aqueous-mounting medium 2 damla damlatılarak lamel ile kapatıldı.

GFAP-ADNP:

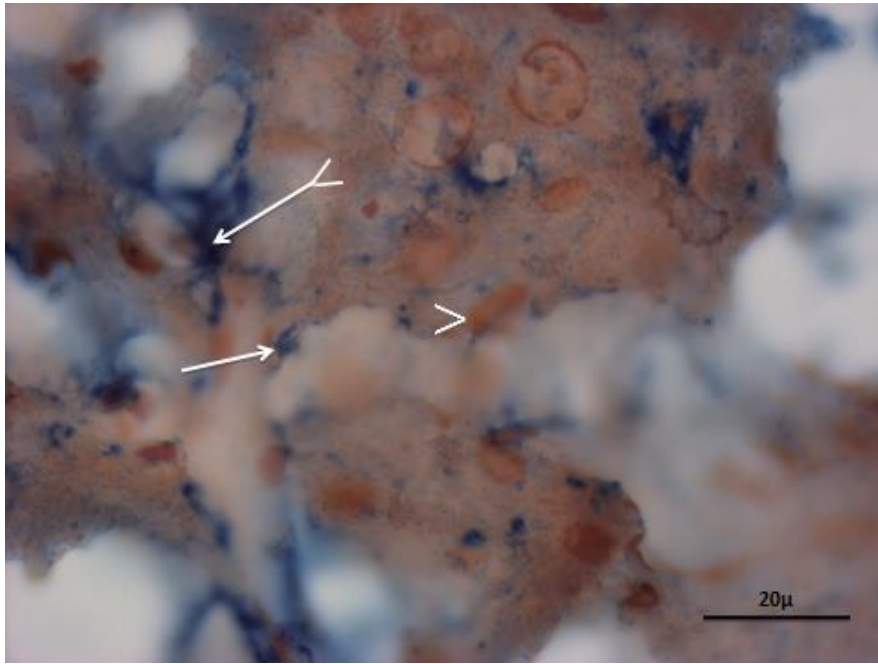
- Primer Antikor GFAP (Mouse, 1/100 dilue):+4 C°'de 1 gece bekletildi
- TBS ile yıkama :3x10 dk
- Goat-anti mouse sekonder antikor (AP ile konjuge edilmiş):3 saat oda ısısında bekletildi.
- TBS ile yıkama :3x10 dk
- Vectastain AP developer (5 ml. Buffer +2 damla A + 2 damla B) uygulaması.
- Primer Antikor ADNP (Rabbit, 1/100 dilue):+4 C°'de 1 gece bekletildi
- TBS ile yıkama :3x10 dk.
- Goat-anti rabbit sekonder Antikor (novared peroksidaz ile konjuge edilmiş) :3 saat oda ısısında bekletildi
- TBS ile yıkama :3x10 dk.
- ABC Elite kit (vector) (10 ml. 3 damla) :30 dk. Oda ısısında bekletildi.
- TBS ile yıkama :3x10dk.

Boyama işleminin tamamlanmasından sonra lama aqueous- mounting medium 2 damla damlatılarak lamel ile kapatıldı.

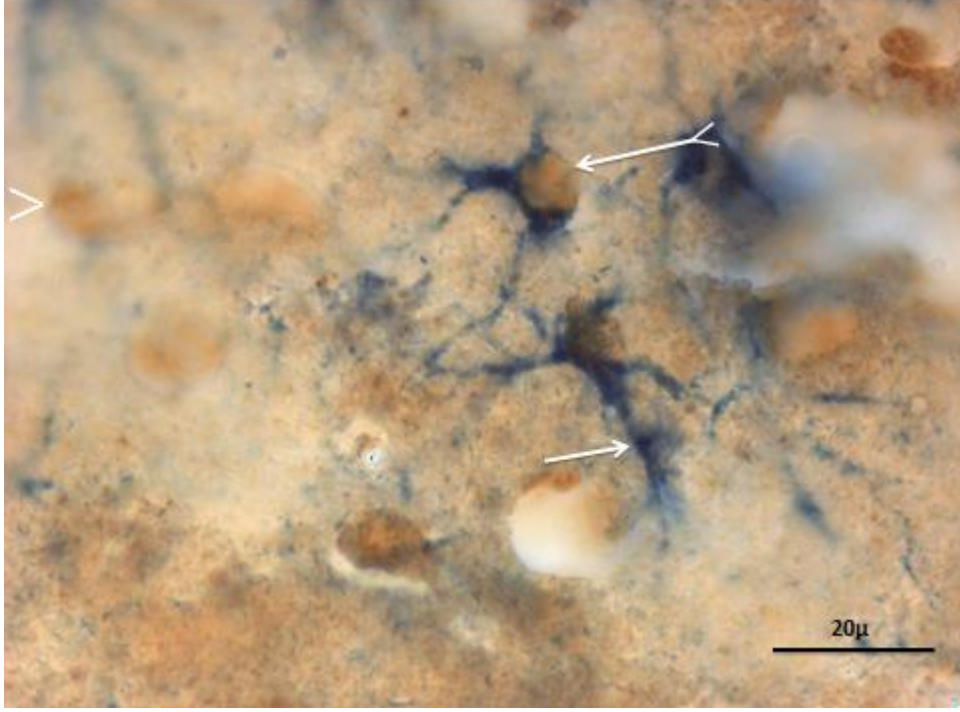
İşaretlemelemlerden sonra ışık mikroskobu altında korpus striatumdaki GFAP (+), GAD (+), ADNP (+) hücre sayımları, korpus striatuma ait beş bölgeden yapıldı (Şekil 3.1). Bu sayımlar; her üç grupta GFAP için iki yüz yetmiş, GAD için yüz seksen ve ADNP için doksan kesitte yapılmıştır. Hücreler, tekli (GFAP (+), GAD (+), ADNP (+)) ve ikili (GFAP (+)/GAD (+), GFAP (+)/ADNP (+)) işaretlemelemlere göre sayılmıştır (Şekil 3.2 ve 3.3).



Şekil 3.1. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde Korpus striatumda GFAP(+), ADNP(+) ve GAD(+) hücre sayımlarının yapıldığı bölgeler. Skala= 400µm.



Şekil 3.2. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde Korpus striatumda İmmünohistokimyasal olarak ikili işaretlenmiş hücreler. \rightarrow : GFAP (+)/GAD(+), $>$: GAD (+), \rightarrow : GFAP (+). Skala= 20µm.



Şekil 3.3. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde Korpus striatumda immünohistokimyasal olarak ikili işaretlenmiş hücreler.
>→ : GFAP (+)/ADNP (+), >: ADNP (+) →: GFAP (+). Skala= 20µm.

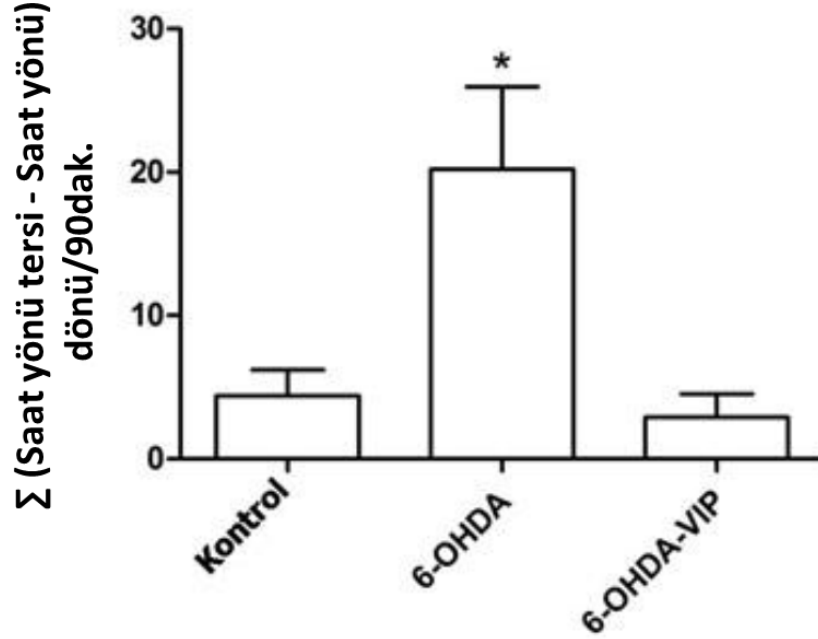
3.2.6. İstatistiksel değerlendirme:

Tüm sonuçlar ortalama değerler \pm standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA) kullanılarak yapılmıştır. Rotasyonmetrik veriler, ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar, Kruskal-Wallis testiyle gerçekleştirilmiştir. GABA, glutamat, GSH ve laktat konsantrasyon sonuçları ile immünohistokimyasal işaretleme verileri ANOVA testi ile değerlendirilmiş, gruplar arası farklılıkların karşılaştırılmaları ise Tukey çoklu karşılaştırmalı test ile gerçekleştirilmiştir. $p < 0,05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Rotasyonmetrik veriler:

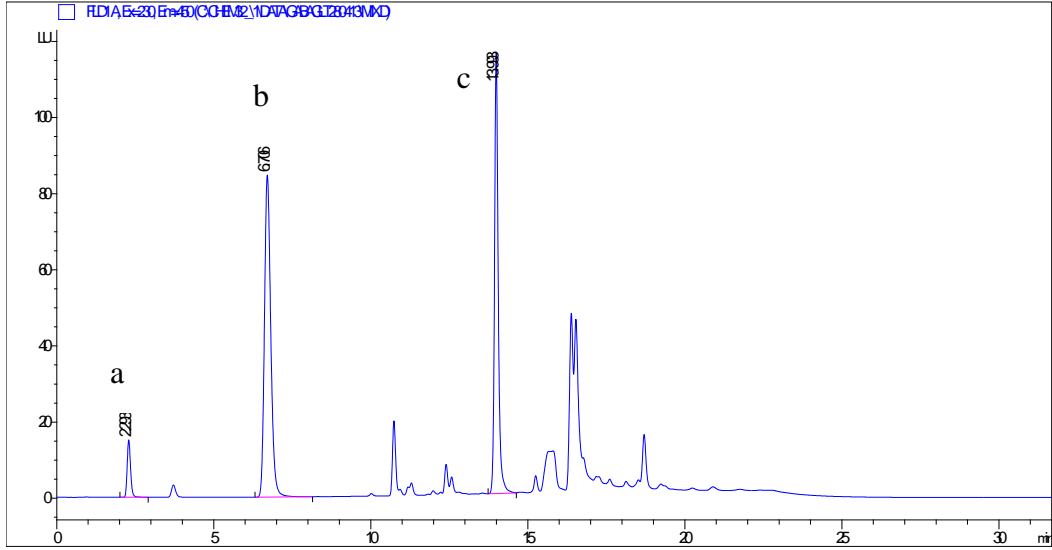
Şekil 4.1, ondördüncü günde yapılan apomorfin enjeksiyonunu takiben kaydedilen motor fonksiyon test verilerini göstermektedir. 6-OHDA ile oluşturulan nörodejenerasyon sonucunda sıçanlarda motor fonksiyon bozukluğu meydana gelmiştir. VIP ile tedavi, oluşan motor fonksiyon bozukluğunu, kontrol değerleri düzeyine geri döndürmüştür.



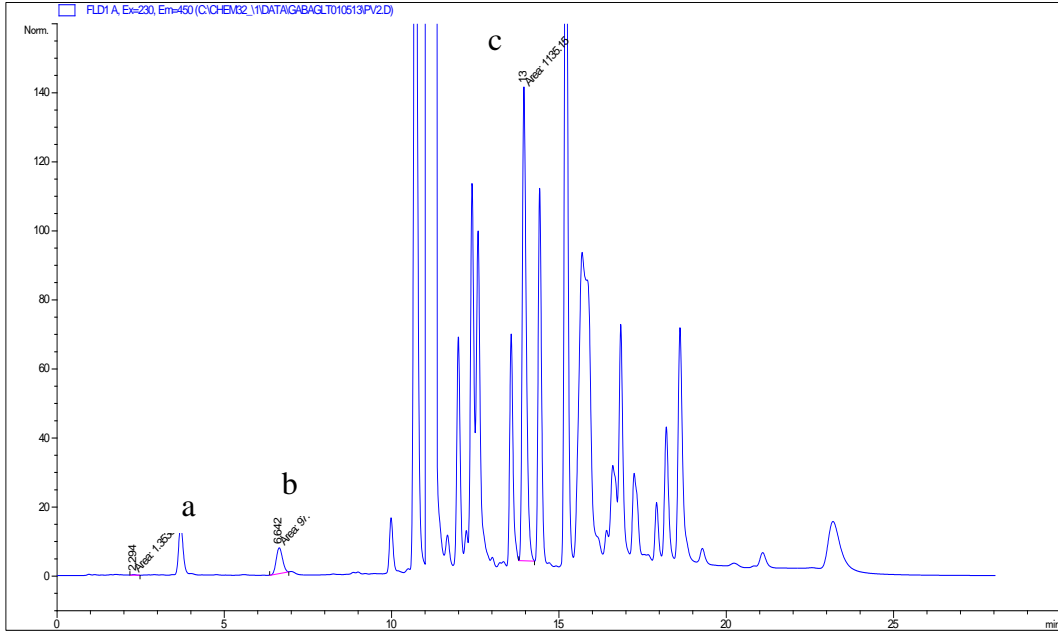
Şekil 4.1. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde Rotasyonmetrik verilerin bar grafik görüntüsü. 6-OHDA grubundaki toplam dönüş farkı, kontrol ve 6-OHDA+VIP grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, * p<0,05).

4.2. Mikrodiyaliz örneklerinden HPLC yöntemi ile yapılan ölçümler:

Şekil 4.2 ve 4.3; GSH, glutamat ve GABA'nın standart ve mikrodiyaliz çözeltilerinden elde edilen birer kromatogram örneğini göstermektedir.

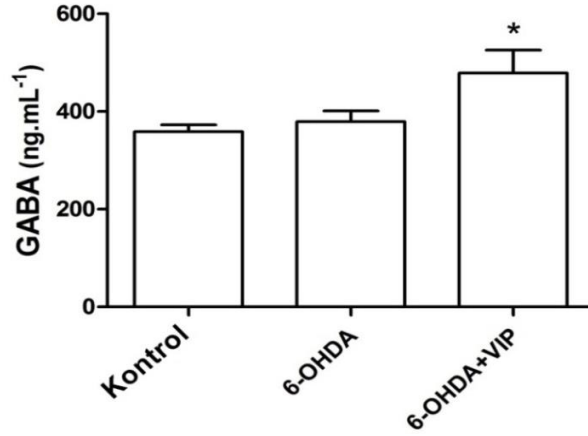


Şekil 4.2. GSH, glutamat, GABA standart numunelerinin HPLC yöntemiyle ölçülen analitik kromatogram sonuçları a: GSH, b: glutamat, c: GABA

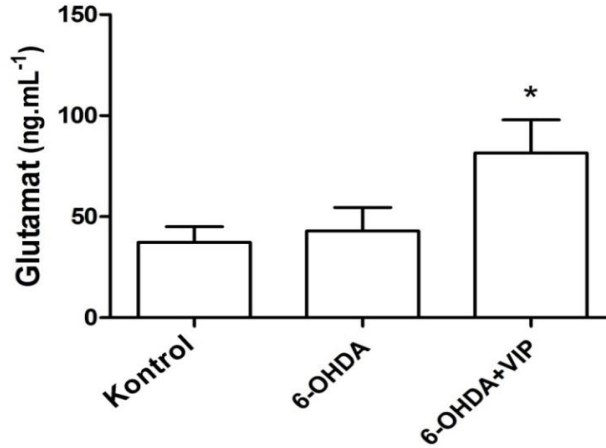


Şekil 4.3. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda GSH, glutamat, GABA örnek mikrodializ numunelerinin HPLC yöntemiyle ölçülen analitik kromatogram sonuçları. a: GSH, b: glutamat, c: GABA

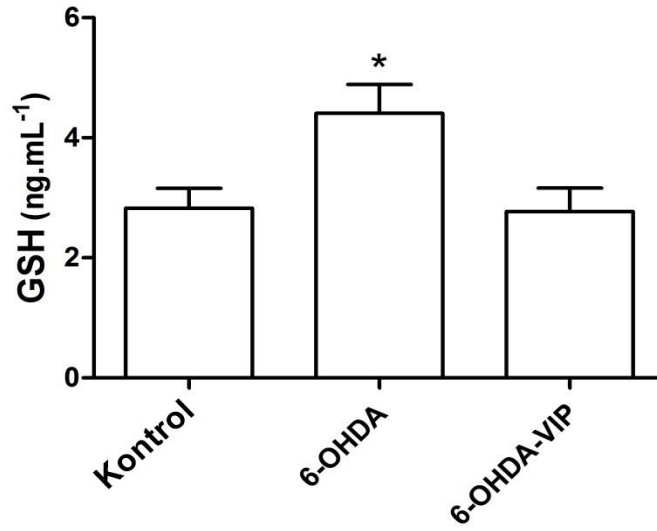
6-OHDA ile oluşturulan Parkinson modelinde striatumdaki ekstrasellüler GABA ve glutamat düzeyleri anlamlı derecede değişmemekle birlikte, GSH düzeylerinde anlamlı derecede artış gözlenmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). VİP ile tedavi sonucunda GABA ve glutamat düzeyleri anlamlı derecede artış gösterirken, GSH düzeyleri kontrol grubu düzeylerine inmiştir.



Şekil 4.4. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda ölçülen GABA sonuçları. 6-OHDA+VİP grubunda striatal GABA düzeyi, kontrol ve 6-OHDA grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, * p<0,05).

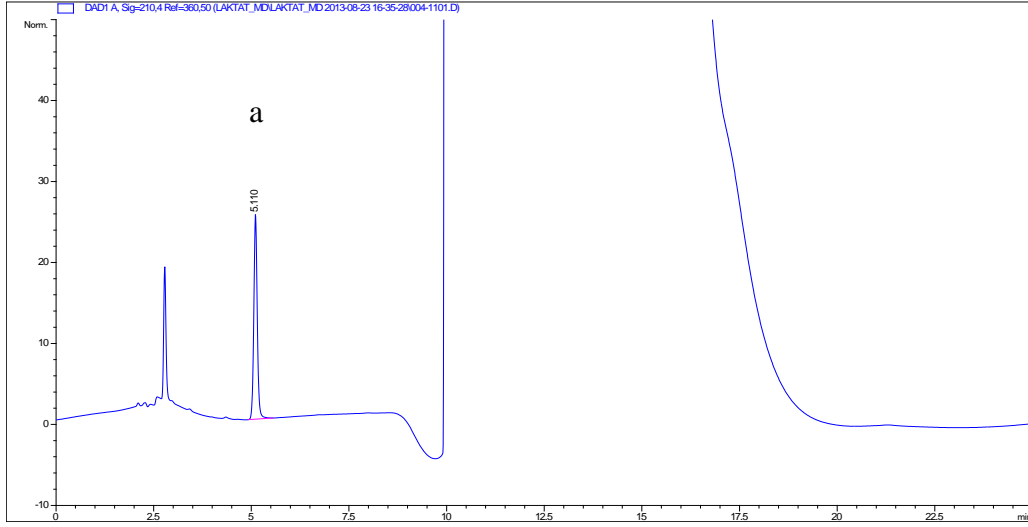


Şekil 4.5. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda ölçülen glutamat sonuçları. 6-OHDA+VİP grubunda striatal glutamat düzeyi, kontrol ve 6-OHDA grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, * p<0,05).

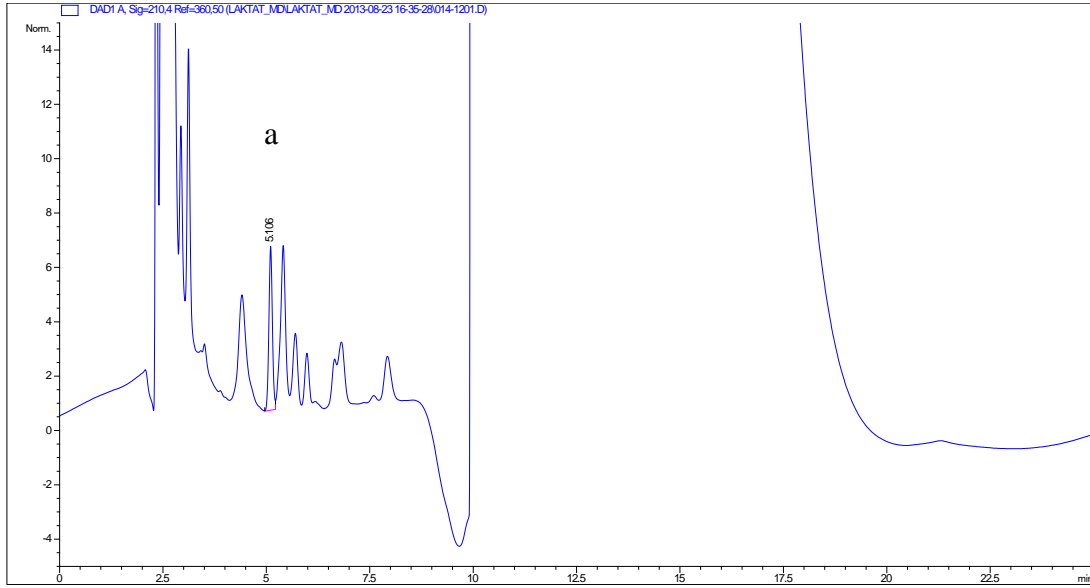


Şekil 4.6. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda ölçülen GSH sonuçları. 6-OHDA grubunda striatal GSH düzeyi, kontrol ve 6-OHDA+VİP grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, * p<0,05).

Şekil 4.7A ve B; ekstrasellüler laktat ölçümleri ile ilgili olarak standart ve mikrodializ numune ölçümlerinden elde edilen birer kromatogram örneğini göstermektedir.

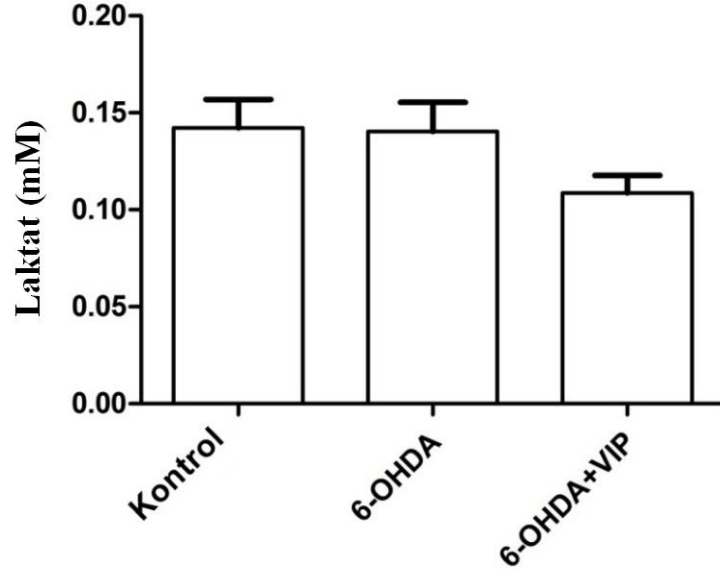


Şekil 4.7A. HPLC yöntemiyle ölçülen Laktik asit standart numunelerinin analitik kromatogram sonuçları. a: Laktik asit



Şekil 4.7B. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatuma ait mikrodiyaliz numunelerinde HPLC yöntemiyle ölçülen Laktik asit analitik kromatogram sonuçları. a: Laktik asit

6-OHDA ile oluşturulan Parkinson modelinde striatumdaki laktat düzeyi, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 4.8). VIP ile tedavi sonucunda korpus striatumdaki laktat düzeyinde bir miktar azalma gözlenirse de, bu azalma istatistiki olarak anlamlı seviyede bulunmamıştır.



Şekil 4.8. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda ölçülen laktat sonuçları. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (n= 10).

4.3. Histolojik veriler:

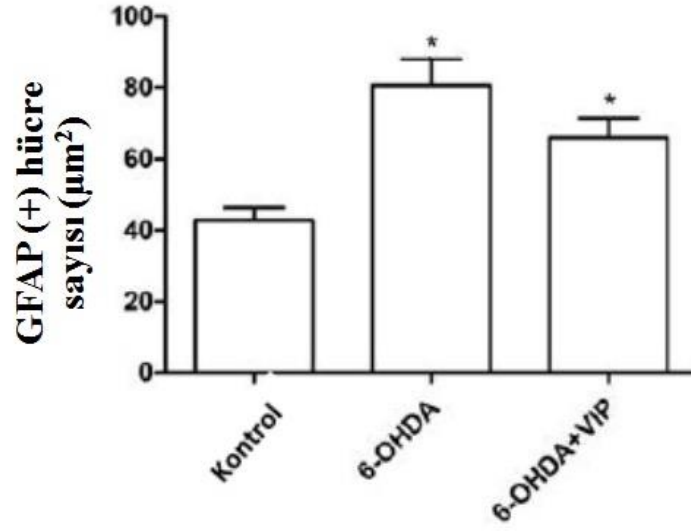
İmmünohistokimyasal veriler:

KS'dan alınan kesitlerde yapılan tekli ve ikili immünohistokimyasal işaretlemelere bağlı olarak, birim alanda (μm^2) elde ettiğimiz hücre sayılarının ortalama değerleri Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. İmmünohistokimyasal olarak tekli ve ikili işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları

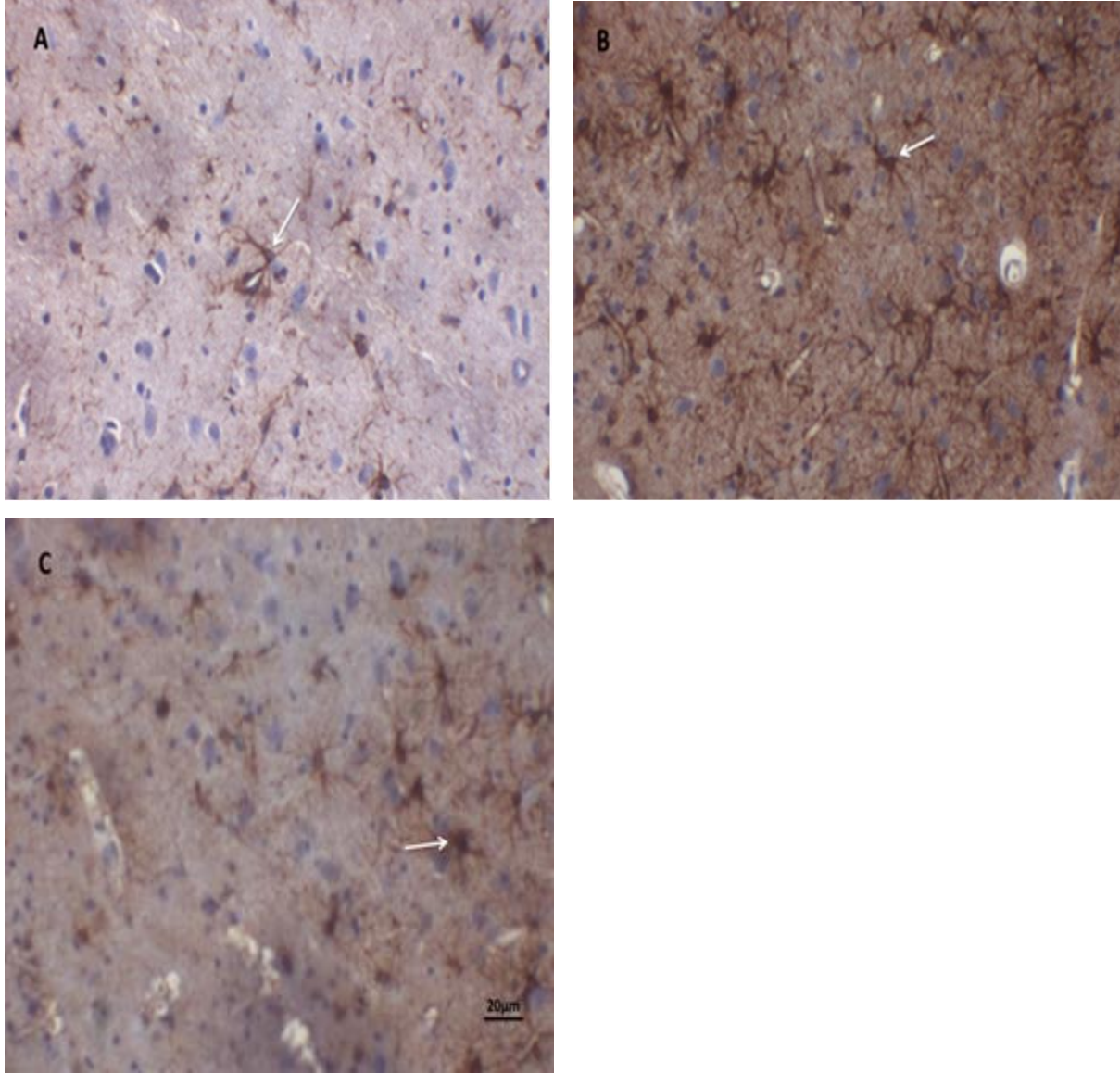
GRUP	GAD(+) hücre sayısı/ μm^2	GFAP(+) hücre sayısı/ μm^2	GFAP(+)+GAD(+) hücre sayısı/ μm^2	ADNP(+) hücre sayısı/ μm^2	GFAP(+)+ADNP(+) hücre sayısı/ μm^2
KONTROL (n=10)	211,44	43,21	22,47	149,24	19,62
6-OHDA (n=10)	244,16	81,01	46,09	248,37	45,85
6-OHDA+VİP (n=10)	289,93	66,51	35,3	304,02	57,4

Tablo 1'de gösterilen verilere bağlı olarak yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda striatumda GFAP(+) hücre sayısı, hem 6-OHDA ile oluşturulan parkinson modeli hem de VİP ile tedavi edilen gruptaki sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 6-OHDA striatumda astrosit sayısını ve yoğunluğunu artırmıştır(reaktif astrogliozis) (Şekil 4.9). VİP ile tedavi, astrogliozisi bir miktar azaltsa da kontrol düzeylerine indirememiştir.



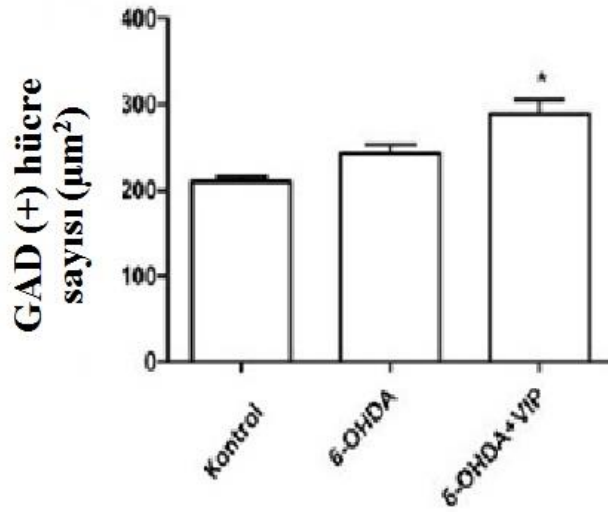
Şekil 4.9. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (μm^2) GFAP(+) hücre sayıları. 6-OHDA ve 6-OHDA+VIP grubu, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, *p<0,05).

GFAP (+) astrosit hücrelerin fotomikrografları da, şekil 4.10 (A,B,C) da gösterilmiştir.

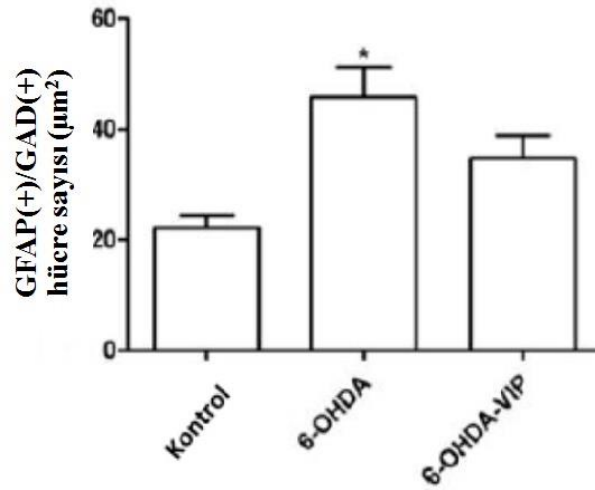


Şekil 4.10. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumdaki GFAP(+) hücre görüntüleri (beyaz oklar). A. Kontrol, B. 6-OHDA, C. 6-OHDA+VİP grubu. 6-OHDA ve 6-OHDA+VİP gruplarında GFAP (+) astrosit hücrelerinin hacim ve sayıca artışları dikkat çekmektedir. Skala=20µm.

GAD (+) hücre sayısı ise 6-OHDA ile oluşturulan parkinson modelinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermemektedir (şekil 4.11). VİP ile tedavi, GAD (+) hücre sayısını gerek kontrol gerekse parkinson modeli grubuna kıyasla anlamlı derecede artırmıştır. Bu artışta GAD (+) astrosit hücrelerinin payı ise, şekil 4.12'den anlaşılmaktadır.



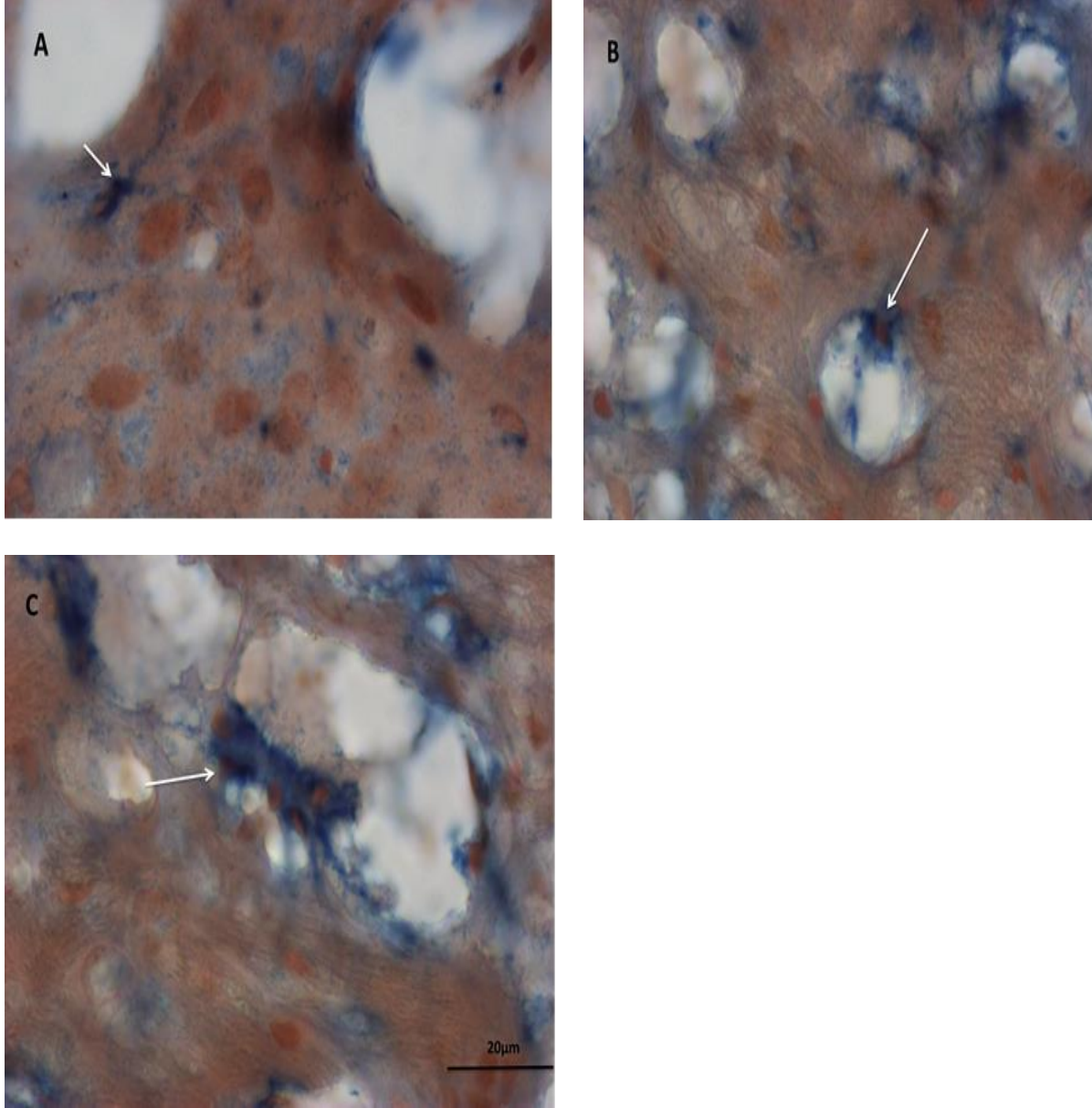
Şekil 4.11. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (µm²) GAD(+) hücre sayıları. 6-OHDA+VIP grubu, kontrol ve 6-OHDA grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, * p<0,05).



Şekil 4.12. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (µm²) GFAP(+)/GAD(+) hücre sayıları. 6-OHDA grubundaki ikili boyanan hücre sayısı, kontrol ve 6-OHDA+VIP grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, *p<0,05).

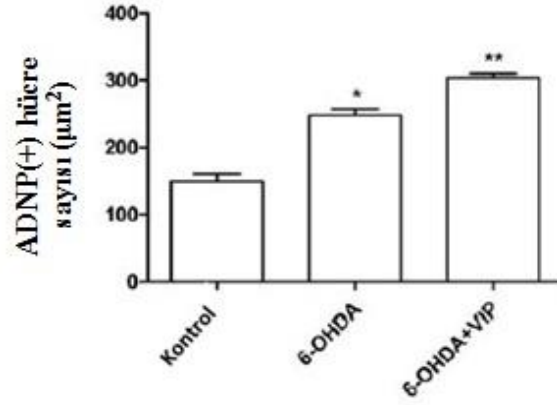
Şekil 4.12, GFAP(+)/GAD(+) ikili işaretli hücre sayılarıyla ilgili istatistik verileri göstermektedir. Burada ikili olarak işaretli hücreler GAD ekspresyonu yapan astrosit hücre sayısını bildirmektedir. Parkinsonlu modelde GAD ekspresyonu yapan astrosit hücre sayısı, kontrol ve VİP ile tedavi edilen gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. VİP, GAD işaretli hücre sayısını artırmakla birlikte striatumdaki GAD ekspresyonu yapan astrosit hücre sayısını azaltmaktadır (Şekil 4.11, 4.12). Bu durum VİP'in olasılıkla GAD ekspresyonunu astrositler yerine nöronlarda artırdığını düşündürmektedir.

Her üç grup için GAD(+) ve GFAP(+)/GAD(+) astrosit hücre fotomikrografları Şekil 4.13 (A,B,C)'de gösterilmektedir.

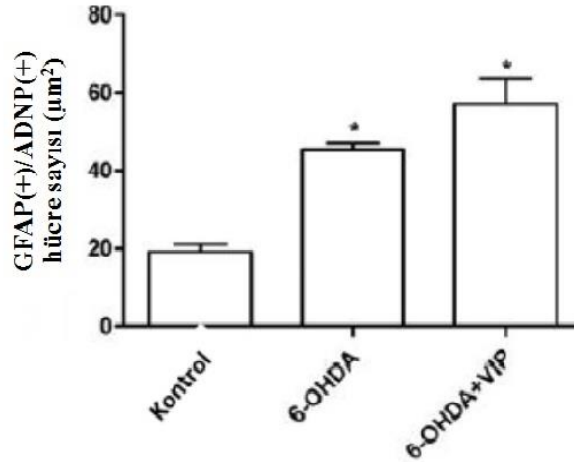


Şekil 4.13. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumdaki GFAP(+)/GAD(+) ikili işaretli hücre görüntüleri (beyaz oklar). A.Kontrol, B. 6-OHDA, C. 6-OHDA+VIP grubu, skala= 20µm.

Şekil 4.14, ADNP (+) hücre sayıları ile ilgili istatistik verileri göstermektedir. Striatumda ADNP (+) hücre sayısı Parkinson modeli oluşturulan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. VIP ile tedavi edilen grupta ise bu artış devam etmiş ve ADNP (+) hücre sayısı hem kontrol hem de parkinson modeli grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu artışta astrositlerin payı ise, Şekil 4.15'den anlaşılmaktadır.



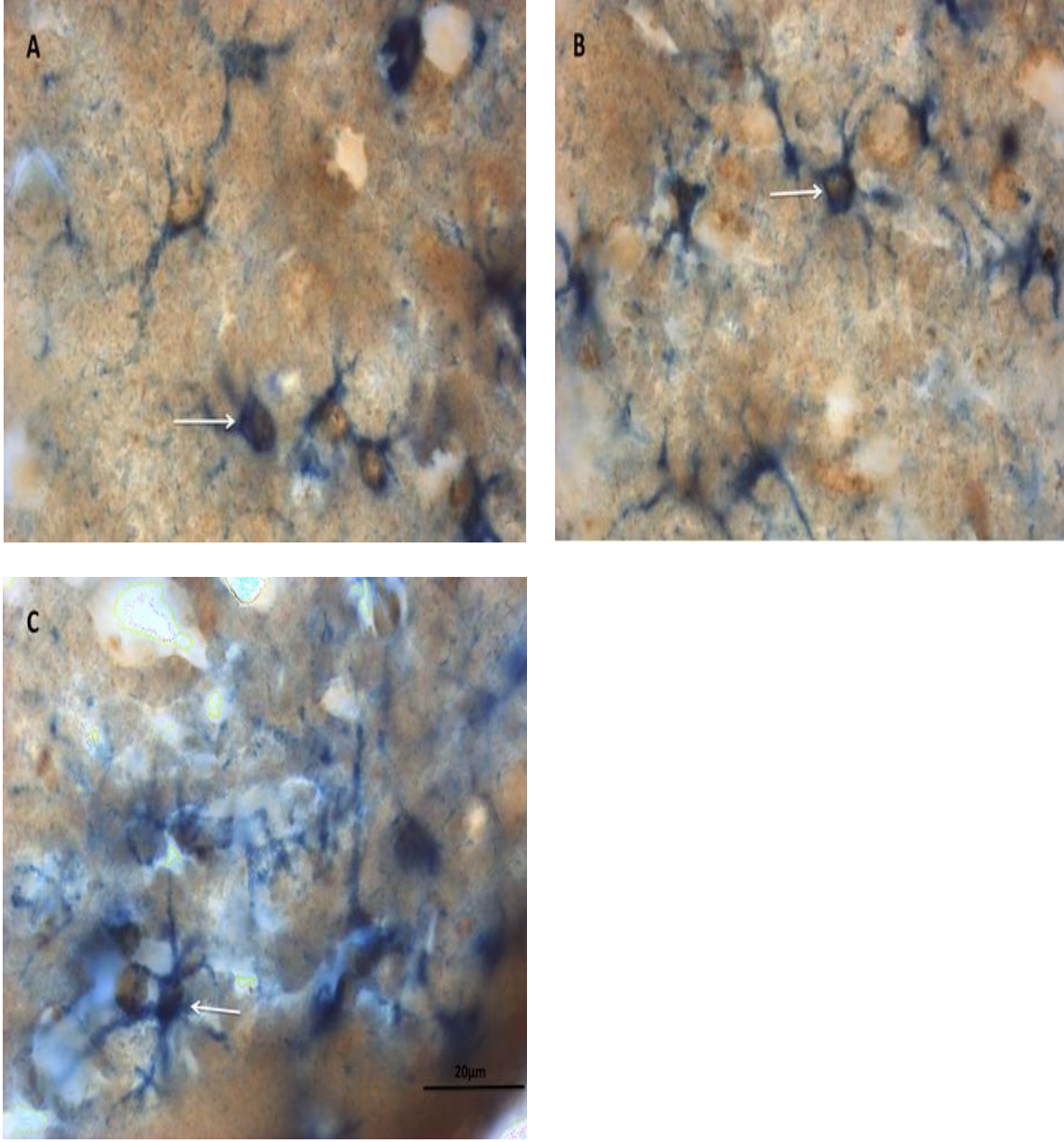
Şekil 4.14. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (µm²) ADNP(+) hücre sayıları. 6-OHDA+VIP grubu, kontrol ve 6-OHDA grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, ** p<0,05). 6-OHDA grubu, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, *p<0,05).



Şekil 4.15. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VIP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korpus striatumda birim alandaki (µm²) GFAP(+)/ADNP(+) hücre sayıları. 6-OHDA ve 6-OHDA+VIP grubunda ikili boyanan hücre sayısı, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (n=10, *p<0,05).

Şekil 4.15, hem GFAP hem de ADNP ekspresyonu yapan hücre sayıları ile ilgili istatistik verileri göstermektedir. Parkinson modeli oluşturulan grupta ADNP ekspresyonu yapan astrosit hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. VIP ile tedavi, Parkinson modelindeki ADNP ekspresyonu artışını devam ettirmiştir. Ancak bu artış Parkinson modeline kıyasla anlamlı bulunmamıştır. Bu durum VIP'in ADNP ekspresyonu artışını astrositlerden ziyade büyük olasılıkla nöronlarda gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Her üç grup için ADNP (+) ve GFAP (+) / ADNP (+) astrosit hücre fotomikrografları Şekil 4.16 (A,B,C)'de gösterilmektedir.



Şekil 4.16. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve VİP ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde korus striatumdaki GFAP(+)/ADNP(+) ikili işaretli hücre görüntüleri (beyaz oklar). A. Kontrol, B. 6-OHDA, C. 6-OHDA+VİP grubu. Skala= 20µm.

5- TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında 6-OHDA ile oluşturulan nörodejenerasyonun korpus striatumda astrogliozise neden olduğu, astrosit sayısı ve yoğunluğundaki bu artışa paralel olarak güçlü bir antioksidan olan GSH'ın hücreleri korumaya yönelik yükseldiği gözlenmiştir. 6-OHDA'ya maruziyet GSH düzeyinde artışa neden olurken GABA, glutamat ve laktat düzeylerinde bir değişikliğe neden olamamıştır. Bu moleküllerin düzeylerinin kontrol değerlerine yakın tutulmaları da astrosit aktivitesindeki artış ile ilişkilendirebilir. VIP ile tedavi sonucunda ise reaktif astrogliosis devam ederken GSH düzeyleri kontrol değerlerine döndürülmüştür. Bu durum, VIP'in güçlü antioksidan etkisinin devreye girmesi nedeniyle astrosit kaynaklı GSH'a gereksinim kalmadığı izlenimini oluşturmaktadır. VIP astrositler yerine, nöron kaynaklı GABA ve ADNP'yi artırmıştır. VIP'in neden olduğu hücre dışı GABA artışına glutamat eşlik etmiştir. Bu bağlamda VIP'in astrositleri devreye sokarak glutamin-glutamat-GABA döngüsünü hızlandırdığı düşünülmektedir. Korpus striatumdaki laktat düzeyleri, ne nörodejenerasyon sırasında ne de VIP ile tedavi sonrasında değişmemiştir. Laktat düzeylerindeki değişmezlik 6-OHDA ile oluşturulan nörodejenerasyon sırasında astrosit aktivitesindeki artışa, VIP ile tedavide ise glutamin-glutamat-GABA döngüsünün hızlandırılmasına bağlanabilir.

6-OHDA, dopamin nörotransmitterinin doğal halinin hidrosillenmiş bir analogu olup nörotoksiktir (Blum vd., 2001). Dopaminerjik nöronlara alındığında burada birikerek nöronların yapısını hasara uğratmaktadır. 6-OHDA, nöronlarda mitokondrial kompleks I'ı inhibe etmekte süperoksit ve OH radikalleri üreterek, nöronu ölüme götürmektedir (Blum vd., 2001; Rappold & Tieu, 2010; Rebecca vd., 2009; Schober, 2004). 6-OHDA ile oluşturulan PH modelinde motor komplikasyonlar meydana gelmektedir. 6-OHDA nörotoksini ile Parkinson modeli oluşturulan sıçanlarda çeşitli dopamin agonistlerinin (apomorfin gibi) uygulanmasıyla kontralateral rotasyon hareketleri, yani motor hareket bozuklukları gözlenmektedir. Unilateral oluşturulan lezyon sonrasında gözlenen bu davranış biçimi, motor fonksiyon bozukluklarının tesbitinde önemli bir kriterdir. Rotasyonel motor anomaliler, 6-OHDA ve MPTP gibi çeşitli nörotoksinlerin Korpus Stiatumdaki dopamin düzeylerini azaltmaları sonucunda gelişmektedir (Blum vd., 2001; Delgado & Ganea, 2003a; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd., 2012; Robinson & Becker, 1983; Tunçel vd., 2005). Tunçel ve ark. yaptıkları çalışmada sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde VIP'in, nöron ölümünü azalttığı ve korpus striatumda azalan dopamin düzeylerini artırmadan motor bozuklukları dramatik şekilde normale çevirdiği, myelin kaybını engellediği gözlenmiştir (Tunçel vd., 2005). Bunu takiben Korkmaz ve ark. 6-OHDA ile oluşturdukları deneysel Parkinson modellerinde bir dopamin metaboliti olan 3,4-dihidroksifenil-asetikasit (DOPAC)'ın striatumdaki düzeyleri ve

dopamin/DOPAC oranını ölçmüşler ve VİP'in motor fonksiyonları geri getirirken dopamin/DOPAC oranında bir değişiklik yapmadığını, striatal dopamin metabolizmasını artırıcı bir etki göstermediğini, korpus striatumdaki mast hücrelerinden NGF salıverilmesini uyararak nöron koruyucu etkisine beyin mast hücrelerinin aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir (Korkmaz vd., 2010). Bu tez çalışmasındaki rotasyonmetrik sonuçlar da VİP'in motor anomalileri güçlü bir şekilde geriye döndürdüğünü bir kez daha ortaya koymaktadır.

6-OHDA ve MPTP ile oluşturulan Parkinson modellerinde, striatumdaki hücre dışı GABA ve glutamat düzeylerinin kontrole kıyasla değişmediği, NMDA reseptör ekspresyonunda artış olduğunu bildiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Abarca & Bustos, 1999; Dervan vd., 2004; Gan , Qi , Mao & Liu, 2014). Mir Ahamed Hossain ve ark. 6-OHDA ile sıçanlarda yaptıkları Parkinson modeli çalışmasında korpus striatumda ve Substantia Nigra'da GABA sentezinin değişmediğini gözlemişlerdir (Hossain & Weiner, 1995). Coune ve arkadaşları ise sıçanlarda iki farklı şekilde Parkinson modeli oluşturmuşlar ve 6-OHDA ile oluşturdukları modelde ipsilateral striatumda kontralaterale kıyasla GABA düzeylerinde artma, glutamatta ise azalma gözlemişlerdir. SN içine alfa-sinüklein AAV verilmesiyle oluşturdukları modelde ise striatumda belirgin bir GABA artışı gözlediklerini rapor etmişlerdir (Coune vd.,2013). GABA ve glutamat BG'a giriş ve çıkış sinyallerini düzenleyen iki önemli nörotransmitterdir. Glutamat korpus striatuma korteksten yaygın bir şekilde ulaşan afferent sinyallerin nörotransmitteridir ve glutamaterjik sinyaller, BG'ın en önemli bilgi çıktısını oluşturan GABAerjik MSN'lar üzerinde toplanarak değerlendirilmektedir. Doğru ve dengeli bilgi integrasyonunu ise SN'dan gelen dopaminerjik sinyaller sağlamaktadır (Galvan & Wichmann, 2008; Obeso vd., 2008; Yelnik, 2002). Bu nedenle, gerek bizim çalışmamızdan gerekse diğer çalışmalardan, Parkinson modellerinde, nörotoksisite sırasında, striatumdaki GABA ve glutamat dengesinin korunmaya çalışıldığı izlenimi elde edilmektedir. Bu dengenin korunmasına da olasılıkla, nörodejenerasyon sırasında aktive olan astrositler katılmaktadır.

Astrositler sayıları nöronlardan çok fazla olan, nöronlara metabolik ve yapısal destek sağlayan hücrelerdir (Bélanger & Magistretti, 2009; Rappold & Tieu, 2010; Sofroniew & Vinters, 2010; Taner, 2007; Verkhratsky vd., 2010). Astrositler ve nöronlar aynı nöral kök hücreden oluşmaktadır. Bu kök hücrelerinden nöron mu yoksa astrosit mi oluşacağı, başta JAK/STAT sinyal yolağı olmak üzere farklı sinyal yollarından alınan uyarılara göre gerçekleşmektedir (Kanski vd., 2014). Astrosit hücreleri, hücre dışı sıvıdaki iyon konsantrasyonunun dengelenmesinde, suyun hücre içi ve dışına hareketinin sağlanmasında, sinaptik fonksiyonun formasyonunda, çeşitli toksik moleküllerin hücre dışı ortamdan uzaklaşmasında diğer bir deyişle beyin homeostazisinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadırlar (Bélanger & Magistretti., 2009; Rappold & Tieu, 2010; Sofroniew & Vinters, 2010;

Verkhatsky vd., 2010). Astrosit hücreleri çok sayıda molekül sentezleyip salıverirler. Nöronlarda bulunan birçok nörotransmitter molekülleri başta GABA olmak üzere astrositlerden de salıverilmektedir. Astrositlerde bulunan bu moleküllere gliotransmitter adı verilmektedir. Astrositler nöronları koruyucu etkilerini iki şekilde gösterirler (Rappold & Tieu, 2010). Etkilerinden birini, koruyucu çözünebilir molekülleri salıvererek yaparlar. Bu moleküller, başta GSH olmak üzere H₂S, ADNP ve GDNF gibi trofik moleküllerdir. İkinci etkileri ise toksik molekülleri içlerine alarak ortamdan süpürme-uzaklaştırma şeklindedir. Bizim çalışmamızda da, 6-OHDA toksisitesini takiben astrogliozise paralel olarak GSH artışı görülmesi, ADNP(+) ve GAD(+) toplam hücre sayısında artış gözlenmesi, glutamat ve laktat düzeylerinde azalma gözlenmemesi astrosit hücrelerinin en başta nöronları korumaya yönelik mücadeleyi başlattığının bir göstergesi olabilir. ADNP nörotrofik bir moleküldür (Mandel vd., 2008). GSH güçlü bir antioksidandır ve astrositler hücre dışı GSH düzeyine katkıda bulunan birincil hücrelerdir (Bélanger & Magistretti, 2009; Dringen, 2000; Rappold & Tieu, 2010;) GABA nörotransmitter olmanın yanında antiinflamatuvar ve nörotrofik bir moleküldür. Glutamat, astrositlerden hem GSH sentezi için hem de GABA serbestleşmesi için gerekli, önemli bir moleküldür (Dringen, 2000; Lee vd., 2011b) Nöronların birincil enerji sağlayıcı molekülü olan laktat ise astrositlerde, glutamatla birlikte glukozdan sentezlenmektedir. Tüm bunlar ele alındığında, sonuçlarımızdan, astrositlerin GSH seviyesini yükselterek, GABA, glutamat ve laktat düzeylerini ise kontrol düzeylerinde tutarak, 6-OHDA toksisitesine karşı nöronları korumaya çalıştığı izlenimi oluşmaktadır.

Astrogliosis, Parkinson, Alzheimer, Amyotrofik Lateral Skleroz, Multiple Skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda görülmektedir (Bélanger & Magistretti, 2009; Johansson, Engler & Blomquist, 2007; 2007; Rappold & Tieu, 2010; Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhatsky vd., 2010). Temporal lobe epilepsilerinde astrogliosis ise sıklıkla görülen ve bilinen bir olgudur. Bu gözlenen astrogliosisin hücre dışı glutamat/GABA homeostazisi için çok önem arzettiği bildirilmektedir (Coulter & Tore, 2012). Alzheimer Hastalığı'nda histopatolojik olarak distrofik nörit ve intraselüler karmaşık nörofibriller içeren amiloid- β (A β) plaklarının reaktif astrositler tarafından ortamdan içlerine alınarak parçalandığı belirtilmiştir (Bélanger & Magistretti, 2009; Frautschy, 1992, Nagele, D'Andrea, Lee, Venkataraman & Wang, 2003;). Benzer şekilde, astrositler, Parkinsonlu beyinlerde biriken α -sinüklein molekülünü de ortamdan uzaklaştırmaktadır (Rappold & Tieu, 2010). Reaktif astrogliazis, aynı zamanda astrositlerin içerdikleri nöron koruyucu moleküllerle savunmaya aktif olarak katıldıklarını göstermektedir (Colangelo, Alberghinaa, Papab, 2014; Verkhatsky vd., 2010; Waschek, 2013). Jill R. Faulkner ve ark. transgenik farelerde deneysel olarak yaptıkları spinal kord yaralanmalarının, reaktif astrogliazis engellenmesi sonucunda daha da şiddetlendiğini ve reaktif astrogliazisin yara iyileşmesinde, motor fonksiyonların düzelmesinde olumlu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir.

Aynı çalışmada astrositlerin oligodendrositleri koruduğu da gösterilmiştir (Faulkner, 2004). Okada ve ark. transgenik farelerde benzer bir çalışma sonucunda astrogliyozise müdahale edilmesinin SSS hasarlarının gidişatını daha da kötüye götürebileceğini göstermişlerdir (Okada vd., 2006). Bu çalışmaların hepsi nörodejeneratif hastalıklarda, reaktif astrogliyozis meydana geldiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da Parkinson grubu sıçanlarda belirgin bir şekilde reaktif astrogliyozis gözlemiş olmak, nöronların korunmasına yönelik bir ilk adımın astrositler tarafından atıldığının göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Parkinson modeli sıçanları VİP ile tedavi ettiğimizde astrosit sayı ve yoğunluğu bir miktar azalmasına rağmen, tamamiyle kontrol grubu seviyelerine inmemiştir. VİP'in nöron koruyucu etkisi tanımlanırken astrosit mitozunu artırdığı ve ADNP gibi astrosit kaynaklı nörotrofik moleküllerin saliverilmesini uyardığı bildirilmektedir (Brenneman vd.,1997; Brenneman vd., 2007; Gozes, 2007; Gozes, 2012; Kouki, 2007; Said, 2000). Zupan ve ark. farelerde VİP antagonistleri vererek yaptıkları in vivo bir çalışmada, neokortekste dramatik bir şekilde astrosit kaybı olduğunu, VİP uygulaması ile neokortikal astrogenezis meydana gelerek bu kaybın geri döndüğünü göstermişlerdir (Zupan, 1998). Delgado ve ark. ise farelerde yaptıkları bir çalışmada VİP'in travmaya bağlı olarak gelişen astrogliyozisi azalttığını göstermişlerdir (Delgado & Ganea, 2003b). VİP güçlü modülatör etkiye sahip bir moleküldür, bizim çalışmamızda da astrogliosisi biraz aşağılara çekmiş ancak kontrol düzeylerine getirmemiştir. VİP'in astositler üzerindeki modülatör etkisinin en iyi göstergesi GSH düzeylerine yapmış olduğu etkidir. VİP ile tedavi GSH düzeylerini kontrol düzeylerine getirmiştir. Astrogliosisi çok azaltmadan, GSH saliverilmesini azaltması kendi güçlü antioksidan etkisiyle birlikte glutamat düzeylerini de artırmaya bağlanabilir.

VİP, ksantin/ksantin oksidazı inhibe ederek süperoksid anyon oluşumunu engeller. Ayrıca OH radikali ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini süpürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır (Said, 2000). Tunçel ve ark. yaptıkları bir çalışmada VİP'in antioksidan etkisini 6-OHDA ile oluşturulmuş Parkinson modelinde göstermişlerdir. 6-OHDA nörotoksini uygulanması ile sıçan striatumunda oluşan lipid peroksidasyon ve DNA fragmantasyonu VİP tedavisi ile azaltılmıştır (Tunçel, 2012).

VİP ile tedavi, hücre dışı GSH düzeylerinde normal düzeylere doğru azalma yaratırken, glutamat ve GABA düzeylerinde artışa neden olmuştur. Laktat düzeylerine ise VİP'in belirgin bir etkisi gözlenmemiştir. VİP olasılıkla glutamin-glutamat-GABA döngüsünü hızlandırmış ve striatumdaki MSN'larda ADNP ekspresyonunu artırarak bu nöronları korumuş ve GABAerjik olan bu nöronlardan GABA saliverilmesini artırmış olabilir. Daha önce yapılan bir çalışmada VİP'in 6-OHDA ile oluşturulan Parkinson modelinde dopaminerjik nöronları korurken MSN'da dendritik spinleri artırdığı belirtilmiştir (Korkmaz vd., 2012). VİP'in GAD ve ADNP ekspresyonunu da artırmış olması artan

GABA düzeyleri ile paraleldir. VİP'in bu etkisini astrositlerden daha çok nöronlarda göstermesi de koruyucu etkisini büyük oranda nöronlara direkt etki ile oluşturduğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Wang ve ark. VİP'in sıçan hipokampal nöron kültüründe GABAerjik sinaptik transmisyonu ve GABA salınımını artırdığını göstermişlerdir (Wang vd., 1997). VİP'in sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturdukları deneysel Parkinson modelinde azalmış olan VATH GABA düzeylerini normale getirdiği bildirilmiştir (Korkmaz vd., 2010). Bu tez çalışmasında da VİP'in gerek astrositlerde gerekse nöronlarda GABA sentez ve salınımını artırdığı sonucu elde edilmiştir.

GABA, inhibitör bir nörotransmitter olarak görev yapmasının yanı sıra sinaptogenez için trofik faktör, nöronal yaralanma sonrası koruma, enerji kaynağı, oksidatif stres sonrası redoks potansiyeli regülatörü gibi çeşitli amaçlara yönelik olarak da kullanılmaktadır (Buddhala vd., 2009; Coulter & Tore, 2012; Héja vd., 2012; Soghomonian & Martin, 1998). Yapılan bir takım çalışmalarda GABA'nın antienflamatuar özellik gösterdiği bildirilmiştir (Angulo vd., 2008; Héja vd., 2012; Lee vd., 2011a). Lee ve ark. bir çalışmada astrosit ve mikrogliaların GABAseptif hücreler olduğunu ve GABA'nın astrositlerde ve mikroglialarda NF κ B ve P-38 MAP kinaz inflammatuar yollarını inhibe etmek suretiyle TNF- α , IL-6, Lipopolisakkarit (LPS) ve IF- γ 'nın salıverilmelerini engelleyerek antienflamatuar etki gösterdiğini ve ayrıca astrositlerin GABAerjik olmaları nedeniyle mikroglial fonksiyonları modüle ettiklerini bildirmişlerdir (Lee vd., 2011a). Aynı çalışmada astrosit kültüründe hücre içi GABA seviyelerinin sürekli olarak yüksek olduğunu ve GABA'nın hücre dışı alana salıverildiğini göstermişlerdir. Yapılan bir çalışmada, astrosit kültüründe GABA taşıyıcı inhibitörlerinin GABA'nın hücre dışı alana taşınmasını belirgin bir şekilde azalttığı, GABA-T inhibitörlerinin ise hücre içi GABA seviyesini artırdığı bildirilmektedir (Héja vd., 2012).

ADNP nöroprotektif ve nörotrofik özellik gösteren bir molekül olup, beyin gelişiminde önemli rol oynayan bir peptittir (Bassan vd., 1999; Brenneman vd., 1997; Montesinos vd., 2010). Bassan ve ark. embriyonik fare kanser hücrelerinde (P19) yaptıkları bir çalışmada ADNP geninin VİP ile aktif hale geldiğini ilk olarak göstermişlerdir. Bu çalışmada fare serebral kortikal nöron ve astrosit kültüründe VİP uygulaması ile astrositlerden ADNP salıverildiğini göstermişlerdir (Bassan vd., 1999). Bassan ve ark.'nın yaptıkları çalışmaya benzer bir çalışmayı Zamostiano ve ark. fetal insan beyinde yapmışlar ve VİP'in astrositlerden ADNP salıverilmesini sağladığını göstermişlerdir (Zamostiano vd., 2001). Fare embriyo glial hücrelerinde yapılan bir çalışmada ADNP'nin VİP duyarlı protein ve bir transkripsiyon faktörü olduğu belirtilmiştir (Pinhasov vd., 2003). ADNP'nin nöron ve glial hücrelerin hem nükleus hem de stoplazmalarında bulunduğu ve özellikle nöronların farklılaşma dönemlerinde strese maruz kalmaları durumunda önemli nöroprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Mandel vd., 2008). Offen

ve ark. yaptıkları in vitro bir çalışmada ADNP'nin metaboliti olan NAP'ın belirgin bir şekilde apoptozisi engellediğini ve oksidatif strese karşı koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada bir GSH sentez inhibitörü olan buthionine sulfoximine (BSO)'nun nöroblastoma kültür ortamına eklenmesi ile artan dopamin ve azalan GSH düzeylerine bağlı oluşan toksisite, NAP eklenmesi sonucunda GSH seviyesinin artması ile ortadan kalkmış ve nöroprotektif etki görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada VİP'in PH'da meydana gelen nigral dejenerasyonu yavaşlattığı gösterilmiştir (Offen vd., 2000). Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan fare hipokampal nöron kültürüne önceden ADNF-9 eklenmesi, glutamat toksisitesi ile oluşabilecek oksijen radikallerinin üretimini engellenmiştir (Offen vd., 2000). Ayrıca, hücre içerisine aşırı miktarda Ca^{+2} girişi engellenerek nöronlar apoptozise karşı da korunmuştur (Offen vd., 2000). Quintana ve ark. yaptıkları bir çalışmada, aktive olmuş fare makrofajlarında TNF- α , IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin arttığı ve NAP'ın azaldığını, VİP tarafından ADNP üretiminin uyarıldığını rapor etmişlerdir (Quintana vd., 2006). Sıçan serebral korteksinde yapılan bir çalışmada, astrositlerdeki VPAC2 reseptörlerinin beyin gelişiminde önemli oldukları belirtilmiştir (Ashur-Fabian, Giladi, Brenneman & Gozes, 1997). Sıçanlarda yapılan diğer bir çalışmada VİP'in astrositlerde VPAC2 reseptörleri aracılığı ile ADNP ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Zusev & Gozes, 2004). Bu çalışmada, sıçan serebral kortikal astrosit kültüründe VİP'in dört günlük astrosit kültürlerinde ADNP ekspresyonunu artırırken, sekiz günlük astrosit kültüründe azalttığını gözlemlenmiştir (Zusev & Gozes, 2004). ADNP metaboliti olan NAP'ın NMDA toksisitesine karşı da nöron koruyucu olduğu gösterilmiştir (Lipton vd., 1991). Yapılan kaynak taramasında birçok çalışmada VİP'in astrosit kaynaklı ADNP'yi uyararak nöronları koruduğu ileri sürülmektedir. Bizim çalışmamız ise VİP'in aynı zamanda hem astrositlerde hem de nöronlardaki ADNP ekspresyonuna etkisini göstermektedir. Bu bağlamda sonuçlarımız VİP'in nöron koruyucu etkisini, astrositlerden ziyade nöronlardaki ADNP ekspresyonunu artırmayı tercih ederek gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Nöron ve astrositler karşılıklı çok karmaşık bir ilişki ile beyin fonksiyonlarını etkin bir şekilde desteklerler. Nöronlarla astrositler arasında kurulan üçlü sinaptik bağlantılar, nöronların sinaptik aktivitelerini modüle etmektedir. Ayrıca astrositler nöronların enerji metabolizmaları için hayati öneme sahiptir. Bu bağlamda ANLS çok önemlidir. Astrositler glutamat varlığında glukoz tüketimini artırır. Bu bağlamda astrositlerde glikoliz ile laktat salınması artar. Laktat nöronlar tarafından alınır ve enerji eldesi için kullanılır. Bu günkü bilgiler çerçevesinde beyindeki laktatın hücrel kaynakları olarak sadece astrositlerden söz edilmektedir. Laktat sentezi glutamata bağlıdır. Bizim çalışmamızda, Parkinsonlu sıçanlarda astroglisis laktat ve glutamat düzeylerini kontrol değerlerinde tutmuş olabilir. Benzer bir sonuç P.G.Coune ve ark. tarafından da bildirilmiştir (Coune vd., 2013). 6-OHDA ve α -sinüklein AAV ile oluşturulan Parkinson modellerinde striatumun

laktat değerleri kontrole göre bir değişim göstermemiştir (Coune vd., 2013). VIP, glutamat düzeylerinde artışa neden olurken laktat düzeylerinde önemli bir değişiklik yaratmamıştır. Bu bize VIP'in ANLS'yi hızlandırıcı bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Magistretti ve ark. farelerde yaptıkları bir çalışmada VIP'in serebral kortekste glikojenolizi tetiklediğini bildirilmişlerdir (Magistretti, 1990) Diğer bir deyişle, VIP glukoz oluşmasını hızlandırmaktadır. Hücre dışı glutamat artışının glukozdan laktat oluşumunu hızlandırdığı dikkate alınacak olursa, VIP'in glutamati artırarak laktat oluşmasını ve laktatın nronlarca kullanılmasını hızlandırmış olabileceği düşünülmektedir.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; çalışmamızda sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturduğumuz nörodejenerasyon sonrasında striatal astrositlerin öncelikle savunmaya yönelik olarak aktive olduklarını, VIP ile tedavi sonrasında ise VIP'in nöronlara daha çok direkt etki göstererek koruyucu etki gösterdiği izlenimi elde edilmiştir. Ayrıca, VIP'in antioksidan özelliğine ilaveten nöronlarda GABA ve ADNP salıverilmesini artırarak nörotrofik ve antienflamatuar etki gösterdiğini, glutamin-glutamat-GABA döngüsünü hızlandırarak korpus striatumun kimyasının düzenlenmesine, olası ANLS hızlandırıcı etkisi ile nöronların enerji gereksinmelerinin karşılanmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız ayrıca, VIP'in sıçan Parkinson modelinde striatumun GABA, glutamat, GSH ve laktat düzeylerine etkisini ve nöron koruyuculuğunda astrositlerle bağlantıyı araştırması yönünden bir ilki oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın ve daha önce yapılmış çalışmaların sonuçları neticesinde nöronların hayatta kalmasında son derece önemli olan astrositlerin nöronların korunmasına yönelik olarak araştırmaların artırılması gerektiği düşüncesindeyiz. Burada VIP'in çok iyi bilinen güçlü nöron koruyucu etkisinde astrositleri de aktive ettiği görülmüş olmakla birlikte VIP-astrodit ilişkili çalışmaların da artırılarak, bu mekanizmanın bilinmeyen yönlerinin ortaya çıkarılmasının bilime önemli katkı sağlayacağını umuyoruz.

Bu bağlamda gelecekte yapılacak çalışmalar ile; ViP'in hücre dışı glutamatın astrositlere alımını sağlayan EAAT'ler, astrosit kaynaklı laktatın hücre dışına taşınmasını sağlayan MCT1 ve presinaptik nöronlara alımını sağlayan MCT2'lerin çalışmalarına olası katkılarının araştırılması ve böylece VIP-astrodit ilişkisinin daha iyi anlaşılması sağlanacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M et al. (2003). Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124: 961-971

Abad Catalina, Niewiadomski Pawel, Loh Dawn Hsiao-Wei and Waschek James A. (2006). Neurotransmitter and Immunomodulatory Actions of VIP and PACAP: Lessons from Knockout Mice. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 12: 297-310.

Abarca Jorge , Bustos Gonzalo. (1999). Differential regulation of glutamate, aspartate and γ -amino-butyrate release by *N*-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum after partial and extensive lesions to the nigro-striatal dopamine pathway. *Neurochemistry International* 35 (1): 19-33

Abe K, Kimura H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 16: 1066-1071.

Angulo MC, Le Meur K, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. (2008). GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog. Neurobiol.* 86(3): 297-303

Antonawich, F. J., Said, S. I. (2002). Vasoactive intestinal peptide attenuates cytochrome-C translocation, and apoptosis, in rat hippocampal stem cells. *Neuroscience Letters.* 325: 150-153

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22: 208-215

Ashur-Fabian,O., Giladi,E., Brenneman,D.E., and Gozes,I. (1997). Identification of VIP/PACAP receptors on rat astrocytes using antisense oligodeoxynucleotides. *J. Mol. Neurosci.* 9: 211-222.

Bandyopadhyay, A., Dickman, K., Mathew S. M. & Said S. I. (1998). Vasoactive intestinal peptide (VIP) as an anti-apoptotic agent in the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: A6.

Barres Barbara A., Chunn LL, Corey DP, (1989), Calcium current in cortical astrocytes: induction by Camp and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *J. Neurosci.* 9: 3169-3175

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Barres Ben A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60: 430-440

Bassan, M. , Zamostiano, R. , Davidson, A. , Pinhasov, A. , Giladi, E., Perl, O. et al. (1999). Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *Journal of Neurochemistry* 72: 1283-1293.

Bélangier Mireille, Magistretti Pierre J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection *Dialogues Clin Neurosci.* 11: 281-295.

Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW. (2009). Extrasynaptic GABA-A receptors: form, pharmacology, and function. *J. Neurosci.* 29: 12757-12763.

Berthet Carole. (2009). Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 29: 1780-1789

Blum David, Sakina Torch, Lambeng Nathalie, Nissou Marie-France, Benabid Alim-Louis, Sadoul Remi, Verna Jean-Marc. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinsons disease. *Progress in Neurobiology.* 65: 135-17

Bove Jordi, Prou Delphine, Perier Céline and Przedborski Serge. (2005). Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2: 484-494

Brenneman DE, Phillips TM, Festoff BW, Gozes I. (1997). Identity of neurotrophic molecules released from astroglia by vasoactive intestinal peptide. *Ann NY Acad Sci.* 814: 167-173.

Brenneman, Douglas E. (2007). Neuroprotection: A comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide peptides. 28: 1720 - 1726

Brickley Stephen G. and Mody Istvan. (2012). Extrasynaptic GABA_A Receptors: Their Function in the CNS and Implications for Disease. *Neuron.* 73(1): 23-34

Buddhala C, Hsu CC, Wu JY. (2009). A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochem Int.* 55: 9-12.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Casetta I., Govoni V. and Granieri E. (2005). Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des.* 11(16): 2033-2052.

Cater HL, Benham CD, Sundstrom LE. (2001). Neuroprotective role of monocarboxylate transport during glucose deprivation in slice cultures of rat hippocampus. *J. Physiol.* 531: 459-466.

Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron.* 6: 983-992

Chase TN, Oh JD. (2000). Striatal dopamine- and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *TINS.* 23: 86-91.

Ciechanover Aaron. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO Journal.* 17(24): 7150-7160

Cochav Holtser M., Divinski I, Gozes I. (2006). Tubulin is the target binding site for nap-related peptides: ADNF-9, D-NAP, and D-SAL. *J. Mol. Neurosci.* 28: 303-307

Colangelo Anna Maria, Alberghinaa Lilia, Papab Michele. (2014). Astroglial as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters.* 565: 59-64

Cosgrave A. Siobhan, McKay Jennifer S., Morris Richard, Quinn John P. and Thippeswamy Thimmasettappa. (2010). The effects of nitric oxide inhibition prior to kainic acid treatment on neuro- and gliogenesis in the rat dentate gyrus in vivo and in vitro. *Histol Histopathol.* 25: 841-856

Coulter Douglas A and Tore Eid. (2012). Astrocytic Regulation of Glutamate Homeostasis in Epilepsy. *Glia.* 60(8): 1215-1226

Coune PG, Craveiro M, Gaugler MN, Mlynárik V, Schneider BL, Aebischer P, Gruetter R. (2013). An in vivo ultrahigh field 14.1 T (1) H-MRS study on 6-OHDA and α -synuclein-based rat models of Parkinson's disease: GABA as an early disease marker. *NMR Biomed.* 26(1): 43-50.

De Lau LML, Breteler MMB. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5: 525-535.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Delgado Mario and Ganea Doina. (2003a). Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J.* 17: 944-946

Delgado Mario and Ganea Doina. (2003b), Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB J.* 17: 1922-1924

Dervan AG, Meshul CK, Beales M, McBean GJ, Moore C, Totterdell S, Snyder AK, Meredith GE. (2004). Astroglial plasticity and glutamate function in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 190(1):145-156.

Dickman, K., Mathew S., Berisha H. I, Bratut M. & Said S. I. (2000). Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits caspase-3 activation: a basis for anti-apoptotic activity. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 161: A97.

Dickson Dennis W. (2012). Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology, Cold Spring Harb Perspect Med, doi:10.1101/chspect.a009258 <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/cgi/collection/>

DiNuzzo M, Maraviglia B, Giove F. (2011). Why does the brain (not) have glycogen? *Bioessays.* 33(5): 319-326.

Dipasquale B, Marini AM, Youle RJ. (1991). Apoptosis and DNA degradation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1432-1438.

Dogrukol-Ak D, Banks WA, Tuncel N, Tuncel M. (2003). Passage of vasoactive intestinal peptide across the blood-brain barrier. *Peptides.* 24: 437-444

Dogrukol-Ak D, Tore F, Tuncel N. (2004). Passage of VIP/PACAP/Secretin Family Across the Blood-Brain Barrier: Therapeutic Effects. *Curr. Pharm. Des.* 10: 1325-1340

Dringen R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62: 649-671.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Enokido Y, Suzuki E, Iwasawa K, Namekata K, Okazawa H, Kimura H. (2005). Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *FASEB J.* 19: 1854-1856

Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron.* 7: 91-100

Fahn S., Jankovic J., Hallet M., (2011). *Principles and Practice of Movement Disorders.* 2nd. Edition. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.

Fahrenkrug J. (1993). Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacol. Toxicol.* 72: 354-363.

Faulkner Jill R., Julia E. Herrmann, Michael J. Woo, Keith E. Tansey, Ngan B. Doan, and Michael V. Sofroniew. (2004). Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience.* 24(9): 2143–2155

Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenman H, MacVicar BA. (1995). GABA-A/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* 15: 2720-2732

Frautschy SA, Cole GM, Baird A. (1992). Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am. J. Pathol.* 140: 1389-1399.

Furman, S., Steingart, R. A., Mandel, S., Hauser, J.M., Brenneman, D. E. & Gozes, I. (2004). Subcellular localization and secretion of activity-dependent neuroprotective protein in astrocytes. *Neuron Glia Biology I:*193-199.

Galvan Adriana and Wichmann Thomas. (2008). Pathophysiology of Parkinsonism. *Clin. Neurophysiol.* 119(7): 1449-1464.

Gan J, Qi C, Mao LM, Liu Z. (2014). Changes in surface expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the striatum in a rat model of Parkinson's disease. *Drug Des. Deve. Ther.* 17(8): 165-173

Ganong, W.F. (2010). *Review of Medical Physiology.* 23rd Ed. McGraw-Hill Education, Singapore. The McGraw Hill Companies

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Giaume C., Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A and Verkhratsky A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death and Differentiation*. 14: 1314-1325

Glykys J, Mody I. (2007). The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J. Physiol*. 582: 1163-1178.

Goetz G Christopher. (2011). *The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies*, Cold Spring Harb Perspect Med. doi:10.1101/chsperspect.a008862.
<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/cgi/collection/>

Gomariz, R.P., Martinez, C., Abad, C., Leceta J. and Delgado M. (2001). Immunology of VIP: A Review and Therapeutical Perspectives. *Current Pharmaceutical Design*. 7: 89-111

Gozes I, Brenneman DE. (1989). VIP: molecular biology and neurobiological function. *Mol. Neurobiol*. 3: 201-236.

Gozes I, Zamastiano R, Pinhasov A, Bassan M, Giladi E, Steingart RA, Brenneman DE. (2000). A novel VIP responsive gene. Activity dependent neuroprotective protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 921:115-118.

Gozes I. (2007). Activity-dependent neuroprotective protein: from gene to drug candidate. *Pharmacol. Ther*. 114: 145-153

Gozes I. (2012). Neuropeptide GPCRs in neuroendocrinology: the case of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) *Frontiers in Endocrinology. Neuroendocrine Science* 3(133): 1-4 doi:10.3389/fendo.2012.00134, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/article/PMC3499767/B17>

Gressens P, Marret S, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M et al. (1997). Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J. Clin. Invest*. 100: 390-397.

Guyton Arthur C. and Hall John E., (2006), *Tıbbi Fizyoloji*, 11. Baskı. İstanbul: YÜCE yayımları ve Nobel Tıp Kitabevleri.

Haddad JJ. (2002). Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir. Res*. (3):26.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* 13: 54-63

Halliwell Barry. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry.* 97: 1634-1658

Hallström Å., Carlsson A., Hillered L., and Ungerstedt U. (1989). Simultaneous determination of lactate, pyruvate and ascorbate in microdialysis samples from rat brain, blood, fat and muscle using high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmacological methods.* 22: 113-124.

Harmar Anthony J. (2012). Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *IUPHAR Review 1 British Journal of Pharmacology.* 166: 4–17

Héja László, Gabriella Nyitrai, Orsolya Kékesi, Árpád Dobolyi, Pál Szabó, Richárd Fiáth, István Ulbert, Borbála Pál-Szente, Miklós Palkovits and Julianna Kardos. (2012). Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons *BMC Biology.* <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/26>

Hernandez A. Martinez, Bell KP, Norenberg MD. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.* 195: 1346-1348

Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.* 11(6): 747-752.

Hisahara Shin and Shimohama Shun. (2011). Dopamine Receptors and Parkinson's Disease. Hindawi Publishing Corporation *International Journal of Medicinal Chemistry* Article ID 403039, 16 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2011/403039>

Hossain MA, Weiner N. (1995). Interaction of Dopaminergic and GABAergic neurotransmission: impact of 6-hydroxydopamine lesions into the substantia nigra of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275(1): 237-244.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Hu LF, Wong PT, Moore PK, Bian JS. (2007). Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *J. Neurochem.* 100: 1121-1128.

Hu LF, Lu M, Wu ZY, Wong PT, Bian JS. (2009). Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function. *Mol. Pharmacol.* 75: 27-34.

Hu LF, Lu M, Tiong CX, Dawe GS, Hu G, Bian JS. (2010). Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging Cell.* 9: 135-146.

Hu LF, Lu M, Hon Wong PT, Bian JS. , (2011), Hydrogen Sulfide: Neurophysiology and Neuropathology. *Antioxid. Redox Signal.* 15: 405-419.

Iadecola C, Nedergaard M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 10:1359-1366.

Jankovic J, Tolosa E. (2007). *Parkinson's Disease and Movement Disorders.5th edition.* Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins.

Jankovic J, Aguilar LG. , (2008), Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis. Treat.* 4(4):743-757.

Johansson A, Engler H, Blomquist G, et al. (2007). Evidence for astrocytosis in ALS demonstrated by [11C](L)-deprenyl-D2 PET. *J. Neurol Sci.* 255: 17-22.

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

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

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kalfin, R., Maulik N., Engelman R. M., Cordis G. A., Milenov K., Kasakov L. & Das K.D. (1994). Protective role of intracoronary vasoactive intestinal peptide in ischemic and reperfused myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 952-958

Kanner BI. (2006). Structure and function of sodium-coupled GABA and glutamate transporters. *J. Membr. Biol.* 213: 89-100.

Kanski Regina, Miriam E. van Strien, Paula van Tijn, Elly M. Hol. (2014). A star is born: new insights into the mechanism of astrogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 71: 433-447

Kathleen A. Maguire-Zeiss, Timothy R. Mhyre, Federoff Howard J. (2008). Gazing into the future: Parkinson's disease gene therapeutics to modify natural history. *Experimental Neurology.* 209: 101-113.

Keane P.C., Kurzawa M., Blain P.G. and Morris C. M. (2011). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *SAGE-Hindawi Access to Research Parkinson's Disease.* Article ID 716871, 18 pages. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/716871>

Kida K, Yamada M, Tokuda K, Marutani E, Kakinohana M, Kaneki M, et al. (2011). Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 15: 343-352.

Kimura Y., Kimura H. (2004). Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* 18: 1165-1167

Korkmaz OT, Tunçel N, Tunçel M, Oncü EM, Sahintürk V, Celik M. (2010). Vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment of Parkinsonian rats increases thalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) levels and alters the release of nerve growth factor (NGF) by mast cells. *J. Mol. Neurosci.* 41(2): 278-287.

Korkmaz OT, Ay H, Ulupınar E, Tunçel N. (2012). Vasoactive Intestinal Peptide Enhances Striatal Plasticity and Prevents Dopaminergic Cell Loss in Parkinsonian Rats. *J. Mol. Neurosci.* 48(3): 565-573

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kouki Olfa Masmoudi, Pierrick Gandolfo, Helene Castel, Jerome Leprince, Alain Fournier, Agnieszka Dejda, Hubert Vaudry , Marie-Christine Tonon. (2007). Role of PACAP and VIP in astroglial functions. *Peptides*. 28: 1753-1760

Lang AE. (2007). The progression of Parkinson disease: A hypothesis. *Neurology*. 68: 948-952.

Lee M, Sparatore A, Del Soldato P, McGeer E, McGeer PL. (2010). Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation. *Glia*. 58: 103-113.

Lee Moonhee, Schwab Claudia and McGeer Patrick L. (2011a). Astrocytes Are GABAergic Cells That Modulate Microglial Activity. *GLIA*. 59: 152-165

Lee M, McGeer EG, McGeer PL. (2011b). Mechanisms of GABA release from human astrocytes. *Glia*. 59: 1600-1611

Leisman G., Melillo R. and Carrick F.R. (2013). *Clinical Motor and Cognitive Neurobehavioral Relationships in the Basal Ganglia*. Neuroscience "Basal Ganglia—An Integrative View", book edited by Fernando A. , Barrios and Clemens Bauer, Chapter 1 <http://dx.doi.org/10.5772/55227>

Leung Kevin, Shek Allen, Lo Keras. (2007). Management of Parkinson disease: Current treatments, recent advances, and future development. *Formulary J*. 42: 529-544

Li Yi, Liu Zhongwu, Xin Hongqi and Chopp Michael. (2014). The Role of Astrocytes in Mediating Exogenous Cell-Based Restorative Therapy for Stroke. *GLIA*. 62: 1–16

Lim Kah-Leong and Jeanne MM Tan. (2007). Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochemistry* 8(Suppl 1): S13, <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/8/S1/S13>

Lindefors N, Brodin E, Tossman U, Segovia J, Ungerstedt U. (1989) Tissue levels and in vivo release of tachykinins and GABA in striatum and substantia nigra of rat brain after unilateral striatal dopamine denervation. *Exp. Brain Res*. 74(3): 527-34.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Lipton S.A., Sucher N.J., Kaiser P.K., and Dreyer E.B. (1991). Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor mediated neurotoxicity. *Neuron*. 7: 111–118.

Lu M, Hu LF, Hu G, Bian JS. (2008). Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic. Biol. Med.* 45: 1705-1713.

Luginger E, Wenning GK, Bösch S, et al. (2000). Beneficial effects of amantadine on dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 15: 873-878.

Lunn G., Hellwig L.C. (1998). *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC, Amino Acids*. Wiley. p: 625

MacVicar BA, Tse FW, Crichton SA, Kettenman H. (1989). GABA-activated Cl-channels in astrocytes of hippocampal slices. *J Neurosci* 9:3577-3583

Magistretti PJ. (1990). VIP neurons in the cerebral cortex. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 250–254.

Mandel S, Rechavi G, Gozes I. (2007). Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) differentially interacts with chromatin to regulate genes essential for embryogenesis. *Dev. Biol.* 303: 814-824

Mandel S, Spivak-Pohis I, Gozes I. (2008). ADNP differential nucleus/cytoplasm localization in neurons suggests multiple roles in neuronal differentiation and maintenance. *J. Mol. Neurosci.* 35(2):.127-141.

Martin HL, Teismann P. (2009). Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J.* 10:3263-3272.

Massano João and Kailash P. Bhatia. (2012). *Clinical Approach to Parkinson's Disease: Features, Diagnosis, and Principles of Management*. Cold Spring Harb Perspect Med. <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/cgi/collection/>

Matsuani S, Yamamoto N. (1998). GABAergic neuron-to-astrocyte signaling regulates dendritic branching in coculture. *J. Neurobiol.* 37: 251-264

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Matsuoka, Y., Gray, A.J., Hirata-Fukae, C., Minami, S.S., Waterhouse, E.G. Mattson, M.P. et all. (2007). Intranasal NAP administration reduces accumulation of amyloid peptide and tau hyperphosphorylation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease at early pathological stage. *Journal of Molecular Neuroscience*. 31: 165-170.

Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, Premont J. (1999). Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci*. 11: 3215-3224.

McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, Burn D, Chiu H, Cohen- Mansfield J, Dickson D, Dubois B, Duda JE, Feldman H, et al. , 2004, Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 3: 19-28.

Misra, B.R. & Misra H.P. (1990). $\dot{V}IP$, a singlet oxygen quencher. *J. Biol. Chem*. 265: 15271-15274.

Montesinos Rafael-Fernandez, Torres Manuel, David Baglietto-Vargas, Gutierrez Antonia, Gozes Illana, Vitorica Javier, Pozo David. (2010). Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP) Expression in the Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci*. 41: 114-120

Mora F, Segovia G, Del Arco A. (2008). Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res. Rev*. 2: 340-353

Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H. (2004). Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J*. 18: 557-559.

Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY. (2003). Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res*. 971: 197-209.

Nakao N, Nakai T, Nakai K, et al. (1999). Ablation of the subthalamic nucleus supports the survival of nigral dopaminergic neurons after nigrostriatal lesions induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Ann. Neurol*. 45: 640-651.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 26: 523-530

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Obeso Jose A., Rodriguez-Oroz Maria Cruz, Beatriz Benitez-Temino, Blesa Francisco J., Guridi Jorge, Marin Concepcio´ and Rodriguez Manuel. (2008). Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. 23: 548-559

O'Connor William T. (1998). *Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia as Studied by Dual-Probe Microdialysis*. Elsevier Science Inc. *Nuclear Medicine & Biology*. 25: 743-746

Offen Daniel, Sherki Yossi, Melamed Eldad, Fridkin Mati, Brenneman Douglas E., Gozes Illana. (2000). Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Research*. 854: 257-262

Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K et al. (2006). Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med*. 12: 829-83

Orellana Juan A. and Stehberg Jimmy. (2014). Hemichannels: new roles in astroglial function *Frontiers in Physiology Membrane Physiology and Membrane Biophysics*. 5: Art. 193. doi:10.3389/fphys2014.00193, [http:// www. ncbi.nlm.nih.gov/m/ pubmed/24987373](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/24987373)

Orwar,O., Li, X., Andine, P., Bergström, C.-M., Hagberg, H., Folestad, S., Sandberg, M. (1994). Increased intra- and extra-cellular concentration of γ -glutamylglutamate and related dipeptides in the ischemic rat striatum: involvement of γ -glutamyl transpeptidase. *J. Neurochem*. 63: 1371-1376

Pascual, M. & Guerri, C. (2007). The peptide NAP promotes neuronal growth and differentiation through extracellular signal- regulated protein kinase and Akt pathways, and protects neurons co-cultured with astrocytes damaged by ethanol. *Journal of Neurochemistry*. 103(2): 557-568

Paxinos G, Watson C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic

Pekny M, Pekna M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol*. 204: 428-437

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Pellerin Luc and Magistretti Pierre J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization Proc. Natd. Acad. Sci. USA Neurobiology. 91: 10625-10629

Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, et al. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*. 55: 1251-1262.

Pellerin Luc and Magistretti Pierre J. (2012). Sweet sixteen for ANLS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 32: 1152–1166

Perea G, Navvarette M, Araque A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 32: 421-431

Peters A, Palay SL, Webster HD. (1991). *The fine structure of the nervous system*, Third edn. New York. Oxford University Press

Pinhasov A, Shmuel Mandel S, Arkady Torchinsky A, Eliezer Giladi E, Zipora Pittel Z, Goldsweig AM et. al. (2003). Activity-dependent neuroprotective protein: a novel gene essential for brain formation. *Dev. Brain Res*. 143: 83–90

Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., Lazzarini, A.M., Nussbaum, R.L., Duvoisin, R.C. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*. 274: 1197-1199.

Quintana FJ, Zaltzman R, Fernandez-Montesinos R, Herrera JL, Gozes I, Cohen IR et al. (2006). NAP, a peptide derived from the activitydependent neuroprotective protein, modulates macrophage function. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1070: 500-506

Ramon Y, Cajal S. (1909). *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Maloine, Paris

Rangon CM, Goursaud S, Medja F, Lelievre V, Mounien L, Husson I et al. (2005). VPAC2 receptors mediate vasoactive intestinal peptide-induced neuroprotection against neonatal excitotoxic brain lesions in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 314: 745-752.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Rappold M. Phillip and Tieu Kim. (2010). Astrocytes and Therapeutics for Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics*. 7(4): 413-423

Rebecca L. Miller, James-Kracke Marilyn, Grace Y. Sun, Albert Y. Sun. (2009). Oxidative and Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease, *Neurochem Res*. 34: 55-65

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

Rice M.E. and Russo-Menna I. (1998). Differential Compartmentalization Of Brain Ascorbate And Glutathione Between Neurons and Glia. *Neuroscience* 82: 1213-1223

Robertson RG, Graham WC, Sambrook MA, Crossman AR. (1991). Further investigations into the pathophysiology of MPTP-induced parkinsonism in the primate: an intracerebral microdialysis study of gamma-aminobutyric acid in the lateral segment of the globus pallidus. *Brain Res*. 563(1-2): 278-280

Robinson Terry E. and Becker Jill B. (1983). The rotational behavior model: asymmetry in the effects of unilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra in rats. *Brain Research*. 264: 127-131

Ros J. (2000). Secondary cerebral injury; glutamate-Induced lesion in vivo. Lesion characterization and effect of lactate and hypoxia. PhD Thesis, University of Basel, Switzerland.

Ros J, Pecinska N, Alessandri B, Landolt H, Fillenz M. (2001). Lactate Reduces Glutamate-Induced Neurotoxicity in Rat Cortex. *Journal of Neuroscience Research*. 66: 790-794

Said, S. I.& Mutt V. (1970). Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*. 169: 1217-1218.

Said SI, Mutt V. (1972). Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. *Eur J Biochem*. 28(2):199-204

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Said, S.I., Berisha, 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*. 65(4): 943-946

Said SI. (2000) The Viktor Mutt Memorial Lecture. Protection by VIP and related peptides against cell death and tissue injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921: 264-74.

Said SI, Rattan S. (2004). The multiple mediators of neurogenic smooth muscle relaxation. *Trends Endocrinol. Metab.* 15: 189-191.

Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54: 823-827.

Schapira AH., 2008, Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 7(1):97-109.

Schober A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318(1): 215-24.

Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM. (1997). Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: further in vitro validation. *J. Neurochem.* 69: 423-426

Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Tseng MT, Rigor BM. (2001). Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia. *Brain Res.* 895:268-272.

Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. (2004). Tonically active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci.* 27: 262-269

Simon J.G. Lewis, Caldwell Maeve A. and Barker Roger A. (2003). Basal ganglia circuitry in Parkinson's disease, *Expert Reviews in Molecular Medicine*: 5: 28, <http://www.expertreviews.org>

Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ., 2007, Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27: 1766-1791

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Sofroniew Michael V., Vinters Harry V., 2010, Astrocytes: biology and pathology. Acta. Neuropathol. 119: 7-35

Soghomonian Jean-Jacques and Laprade Nathalie. (1997). Glutamate Decarboxylase (GAD 67 and GAD 65) Gene Expression Is Increased in a Subpopulation of Neurons in the Putamen of Parkinsonian Monkeys. Synapse 27:122-132p

Soghomonian JJ, Martin DL. (1998). Two isoform of glutamate decarboxylases : why? Trends Pharmacol. Sci. 19: 500-505

Song Min, Xiong Jia-xiang, Wang Yan-yan, Tang Jun, Zhang Bo, Bai Yun, 2012, VIP Enhances Phagocytosis of Fibrillar Beta-Amyloid by Microglia and Attenuates Amyloid Deposition in the Brain of APP/PS1 Mice. plos one j. 7(2): 1-13

Stobart JL, Anderson CM, 2013, Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply, Front Cell Neurosci. 7(38): 1-21

Swanson RA, Kettenmann H, Ransom B. (2005). *Astrocyte neurotransmitter uptake*. Neuroglia. 2nd ed. New York: Oxford University Press. 346 -354.

Taner D, 2007, *Fonksiyonel Nöroanatomi*, 6. Baskı Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş. Yayınları

Tatemoto K, Mutt V. (1981). Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon - secretin family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6603-6607.

Tıkız H., Tuncel N., Akın M. Z., Gurer F., (1992). The effect of VIP and Naloxone combination on survival rates an rats exposed to severe hemorrhage. Peptides. 12: 83-89

Töre 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. 133: 1357-1364

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Tunçel N, Basmak H, Uzuner K, Tuncel M, Altıokka G, Zaimoğlu V, et al. (1996a). 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. NY. Acad. Sci.* 805: 489-497

Tunçel N., Erden S., Uzuner K., Altıokka G., Tuncel M., (1996b), Ischemic-Reperfused rat skeletal muscle: the effect of VIP on contractile force, oxygenation and antioxidant enzyme systems, *Peptides*, Vol. 18, No. 2, 269-275 p.

Tunçel N., Tore F. (1998). The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Inhibition of Nitric Oxide Synthase on Survival Rate in Rats Exposed to Endotoxin Shock. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 865: 586-589

Tunçel N., Tore F., Sahintürk V., Ak D., Tuncel M. (2000). Vasoactive intestinal peptide inhibits degranulation and changes granular content of mast cells: a potential therapeutic strategy in controlling septic shock, *Peptides.* 21: 81-89

Tunçel N., Sener E., Cerit C., Karasu U., Gurer F., Sahintürk 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

Tunçel N, Korkmaz OT, Tekin N, Şener E, Akyüz F, Inal M. (2012). Antioxidant and Antiapoptotic activity of vasoactive intestinal peptide (VIP) against 6 hydroxy dopamine toxicity in the rat corpus striatum. *J Mol Neurosci.* 46 (1): 51-7

Venderova Katerina and Park David S. (2012). Programmed Cell Death in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* doi:10.1101/chsperspect.a009258 <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/cgi/collection/>

Verhagen L. Metman, Dotto PD, Le Poole K, et al. (1999). Amantadine for levodopa-induced dyskinesias. A 1-year follow up study. *Arch Neurol.* 56: 1373-1376.

Verkhatsky A, Kirchhoff F. (2007). Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J. Anat.* 210: 651-660.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Verkhatsky Alexei, Olabarria Markel, Noristani Harun N., Yeh Chia-Yu, and Rodriguez Jose Julio. (2010). Astrocytes in Alzheimer's Disease, Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 7(4): 399-412

Wang R., 2002, Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J. 16: 1792-1798.

Wang HL, Li A, Wu T. (1997). Vasoactive intestinal polypeptide enhances the GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. Brain Res. 746(1-2): 294-300

Waschek JA. (2013). VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair. British Journal of Pharmacology 169: 512-523

Wu Y, Wang W, Richerson GB, 2006, The transmembrane sodium gradient influences ambient GABA concentration by altering the equilibrium of GABA transporters. J. Neurophysiol. 96: 2425-2436.

Yelnik J., 2002, Functional Anatomy of the Basal Ganglia. Movement Disorders Vol. 17: S15-S21

Yeung JY, Canning KJ, Zhu G, Pennefather P, MacDonald JF, Orser BA. (2003). Tonically activated GABA-A receptors in hippocampal neurons are high-affinity, low-conductance sensors for extracellular GABA. Mol. Pharmacol. 63: 2-8

Yoon Bo-Eun , Woo Junsung , Lee C. Justin. (2012). Astrocytes as GABA-ergic and GABA-ceptive Cells. Neurochemical Research. 37: 2474-2479

Zamostiano R, Pinhasov A, Gelber E, Steingart RA, Seroussi E, Giladi E et al. (2001). Cloning and characterization of the human activity-dependent neuroprotective protein. Journal of Biological Chemistry. 276: 708-714.

Zhou Cheng-fang and Tang Xiao-qing. (2011). Hydrogen sulfide and nervous system regulation. Chin Med. J. 124(21): 3576-3582

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Zupan V, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Robberecht P, et al. (1998). Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide II vasoactive intestinal peptide 2 receptor in mouse neocortical astrocytogenesis. *J. Neurochem.* 70: 2165-73.

Zusev M, Gozes I. (2004). Differential regulation of activity dependent neuroprotective protein in rat astrocytes by VIP and PACAP. *Regul. Pept.* 123: 33-41.

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : İbrahim Halil YELKENLİ
Doğum tarihi ve yeri : 1970 / Şanlıurfa
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
İletişim adresleri : ESOGÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı.

Eğitim Durum

İlkokul : İsmail Erez ilkokulu, 1976-1981, Ankara
Ortaokul-Lise : Demetevler (Mimar Sinan) Lisesi,1981-1987, Ankara

Üniversite

1. Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 1987-1992, Ankara
2. Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi, Kamu Yönetimi, 2006-2010, Eskişehir

Doktora

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 2009-2014, Eskişehir.

Yabancı dil

: İngilizce

Mesleki Deneyim

Serbest Diş Hekimi : 1993-1994, Ankara
Askerlik : Diş Tbp. Atgm.1994-1995, KTBK Kıbrıs Türk Kuvvetleri Alay Komutanlığı 30 yataklı işeli revir Diş Tabibi
Serbest Diş Hekimi : 1995-2001, Ankara
Kurum Diş Hekimi : 2001- Eskişehir Trafik Polis Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Eskişehir

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar :

Türk Diş Hekimleri Birliği, Eskişehir Diş Hekimleri Odası

Poster

Tuncel N, **Yelkenli İ**, Ulupınar E, Korkmaz OT, Sener E, Kus G, Critical Role Of Astrocytes On Striatal Neurochemistry In VIP Treated Parkinsonian Rats. The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. Pecs, Hungary, Aug. 2013

Yayınlar (Özet)

Tuncel N, **Yelkenli İ**, Ulupınar E, Korkmaz OT, Sener E, Kus G, Critical Role Of Astrocytes On Striatal Neurochemistry In VIP Treated Parkinsonian Rats. Journal of Molecular Neuroscience 51: 212. Eilat, Israel Nov. 2013

Bilimsel Etkinlikler

PROJELER:

Projeyi Destekleyen Kuruluş	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu
Proje No	: 201211028
Proje Adı	: Deneysel Parkinson modelinde Vazoaktif İntestinal Peptid'in nöron koruyucu etkisine astrosit hücrelerinin katkısı
Projenin Kapanma Yılı	: 2014
Projenin Bütçesi	: 111.660,03 TL
Projenin Yürütücüsü	: Prof. Dr. Neşe TUNÇEL

Proje Çalışanları:

Prof. Dr. Emel ULUPINAR (ESOGÜ Tıp Fakültesi Anatomi AbD)
Doç. Dr. Erol ŞENER (Anadolu Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya AbD)
Yrd. Doç. Dr. Orhan Tansel KORKMAZ (ESOGÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji AbD)
Yrd. Doç. Dr. Gökhan KUŞ (Anadolu Ü. Açıköğretim Fak. Sağlık Programları)
Dt. İbrahim Halil YELKENLİ (ESOGÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji AbD)

Kurslar ve Eğitim Programları:

- TICAM-Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu,“Deney Hayvanları Kullanımı ile ilgili Eğitim Programı” Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2011
- “Eğiticilerin Eğitimi Formasyonu” Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi, 2003
- “Polis Eğiticilerinin Eğitimi Kursu” İçişleri Bakanlığı Emniyet Genel Müdürlüğü , 2007
- “İlk Yardım CPR (Cardiopulmonary Resuscitation) Eğitim Mankeni Kullanımı Eğitimi” 2006
- “Bilgisayar İşletmenliği (Windows, Microsoft Office)” Eskişehir Tepebaşı Milli Eğitim Müdürlüğü, Özel Eskişehir Yaklaşım Kursu, 2002
- “İmplant Uygulamalarında Cerrahi ve Protetik Yaklaşımlar” tfi,2014
- “Advance Surgery in Implantology” Implant Direct,2013
- “Advanced Protocols in Oral Implantology Seminar”,PIEG,2013
- “Advanced Protocols in Oral Implantology Hands On Course”,PIEG,2013