

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı

DENEYSEL PARKİNSON MODELİNE
GLUTATYON İZOPROPİL ESTERİN
ETKİSİ ve MEKANİZMASI

Özlem ÖZSOY

Doktora Tezi

Antalya, 2012

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNE
GLUTATYON İZOPROPİL ESTERİN
ETKİSİ ve MEKANİZMASI**

Özlem ÖZSOY

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aysel AĞAR**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2009.03.0122.010)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Enstitü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22.06.2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurulu kararı ve 23.05.2003 tarih ve 04/44 sayılı Akdeniz Üniversitesi Senato kararı gereğince “Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği” ilkesi gereğince yapılan yayın aşağıda belirtilmiştir (Orijinali ekte sunulmuştur).

Ozsoy O, Tanrıover G, Derin N, Uysal N, Demir N, Gemici B, Kencebay C, Yargıoğlu P, Agar A, Aslan M. The Effect of Docosahexaenoic Acid on Visual Evoked Potentials in a Mouse Model of Parkinson’s Disease: The Role of Cyclooxygenase-2 and Nuclear Factor Kappa-B. Neurotox Res., 20:250–262, 2011.

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir./....../2012

- Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
- Üye** : Prof. Dr. V. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
- Üye** : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Emriyoloji Anabilim Dalı
- Üye** : Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
- Üye** : Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ONAY: Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2012 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Parkinson hastalığı (PH), beynin substansia nigra (SN) bölgesindeki dopaminerjik nöronların seçici kaybı ve ilerleyici motor yetmezlik ile karakterize bir hastalıktır. PH'da en erken görülen biyokimyasal değişikliklerden biri, hücre için önemli bir antioksidan olan total glutatyon (GSH)'un azalışıdır. GSH sentezinin artışıyla ya da yıkımının inhibisyonuyla sonuçlanacak uygulamaların PH'nın ilerlemesini yavaşlatabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmanın amacı, kan beyin bariyerini geçtiği bilinen ve sıçanlarda lipid peroksidasyonunu inhibe ederek beyin iskemisine karşı koruyucu etkisi gösterilen GSH analogu N-(N-r-L-glutamil-L-sisteinil) glisin l-izopropil ester sülfat monohidrat (YM737)'in deneysel PH üzerine olası koruyucu etkisini ve etki mekanizmasını ortaya koymaktır.

3 aylık erkek Wistar sıçanlar rasgele olarak 4 gruba ayrılmıştır: Kontrol (K) grubu, YM737 verilen grup (Y), deneysel Parkinson oluşturulan grup (P), deneysel Parkinson oluşturulan + YM737 verilen grup (PY). Deneysel Parkinson modeli, 6-hidroksidopamin (6-OHDA) nörotoksininin medial ön beyin demeti (MFB)'ne, tek taraflı infüzyonu (3x4µg/µl dozda, 1µl/d hızla) ile oluşturulmuştur. YM737, stereotaksik cerrahiden hemen sonra, 0,1ml/100g hacimde, tek dozda (300mg/kg), intraperitonel yolla uygulanmıştır. Motor aktivite, katalepsi, lokomotor aktivite ve rotasyon testleri ile değerlendirilmiştir. SN'deki dopaminerjik hücre sayısı Tirozin Hidroksilaz (TH) immünreaktif (IR) hücrelerin stereotaksik analizi ile tespit edilmiştir. SN'deki apoptoz, DNA kırıklarının enzimatik olarak işaretlendiği Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) yöntemiyle belirlenmiştir. B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2) ve apoptoz sinyal regüle edici kinaz 1 (ASK1) proteinlerinin ekspresyon düzeyleri immünohistokimyasal analiz ile değerlendirilmiştir. Nigral GSH, 4-hidroksinoneal (4-HNE) ve sitokrom-c (sit-c) düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür.

P grubunda belirgin katalepsi cevabı, lokomotor aktivite azalışı ve rotasyon gözlenmiştir. Bu grupta nigral TH-pozitif nöronların ve Bcl-2 protein yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte SN'de TUNEL-pozitif hücreler belirlenmiş, ASK-1 ekspresyonunda ise bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca bu grupta kontrol grubuna göre nigral GSH düzeyinin azaldığı, 4-HNE düzeyinin arttığı, sit-c düzeyinin ise değişmediği saptanmıştır. PY grubunda tüm bu parametreler açısından P grubundan bir fark tespit edilemezken Y grubunda kontrol grubuna göre nigral GSH miktarında azalış ve 4-HNE düzeyinde artış gözlenmiştir. Ayrıca Y grubunda nigral TUNEL-pozitif hücrelere rastlanmıştır.

Sonuç olarak 6-OHDA ile oluşturduğumuz deneysel Parkinson modelinde gözlenen davranışsal, histolojik ve biyokimyasal değişikliklerde GSH analogu YM737'nin düzeltici etkisi gözlenmezken, sağlıklı hayvanlarda bazı toksik etkileri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, 6-OHDA, GSH, YM737, Apoptoz

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive motor decline and loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra (SN). One of the earliest biochemical changes seen in PD is a reduction in the levels of total glutathione (GSH), a key cellular antioxidant. Treatments that lead to enhanced synthesis of GSH or that inhibit its degradation may result in a slowing of disease progression. The aim of this study was to investigate the protective effect and the metabolism of N-(N-r-L-glutamyl-L-cysteinyl) glycine 1-isopropyl ester sulfate monohydrate (YM737), a GSH analog which penetrates blood-brain barrier and provides protection against cerebral ischemia in rats by inhibiting lipid peroxidation.

Three month old Wistar male rats were randomly divided into 4 groups as follows; control (C), YM737-treated (Y), experimental Parkinson induced (P), experimental Parkinson induced + YM737-treated (PY). Experimental model of PD was created by unilateral infusion of a neurotoxin, 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (3x4µg/µl, 1µl/min), into the medial forebrain bundle (MFB). YM737 was administered i.p. (300mg/kg), in a volume of 0,1ml/100g. Motor activity of rats was evaluated via catalepsy, locomotor activity, and rotation tests. Apoptosis in SN was detected by enzymatic labeling of DNA strand breaks using Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) method. B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) protein expression were evaluated by immunohistochemistry. Nigral GSH, 4-hydroxynoneal (4-HNE) and cytochrome-c (cyt-c) levels were determined by spectrophotometric assays.

Animals in P group exhibited catalepsy, decreased locomotor activity and rotation. Decreased nigral TH-positive neuron number and decreased Bcl-2 protein density were detected in this group compared to control group. TUNEL-positive cells were detected in experimental Parkinson group. No change was observed between groups in ASK1 immunoreactivity. Additionally, P group exhibited lower concentration of GSH, higher levels of 4-HNE and unchanged levels of cyt-c compared to control. However there was no difference in PY group versus P group with respect to the all these parameters. Y group exhibited decreased GSH and increased 4-HNE levels compared to control group. Moreover, nigral TUNEL-positive cells were detected in Y group.

In conclusion, we did not observe any protective effect of YM737, a GSH analogue, on behavioral, histological and biochemical alterations which were detected in 6-OHDA Parkinson model. However YM737 exerts some toxic effect on non-lesioned animals.

Keywords: Parkinson's Disease, 6-OHDA, GSH, YM737, Apoptosis

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığı	3
2.2. Parkinson Hastalığının Nöroanatomik Mekanizmaları	3
2.2.1. Bazal Gangliyon Devresi	3
2.2.2. Parkinson Hastalığında Motor Devre	6
2.3. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri	6
2.3.1. Motor Semptomlar	7
2.3.2. Motor Dışı Semptomlar	8
2.4. Parkinson Hastalığının Patolojik Özellikleri	8
2.5. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi	9
2.6. Parkinson Hastalığı Patogenezi	10
2.7. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri	10
2.7.1. Farmakolojik Modeller	11
2.7.2. Toksik Modeller	11
2.7.3. Genetik Modeller	14
2.7.4. Gelecekteki Yönlenmeler	15
2.8. Glutasyonun Parkinson Hastalığındaki Rolü ve Önemi	15
2.8.1. Glutasyon Fonksiyonları ve Metabolizması	15
2.8.2. Glutasyon Azalışının Nedenleri	16
2.8.3. Parkinson Hastalığında Glutasyon Sentezi ve Mekanizmasında Meydana Gelen Değişiklikler	17
2.8.4. Parkinson Hastalığında Oksidatif ve Nitrozatif Stres Kaynakları	18
2.8.5. Glutasyon Azalışı ve Mitokondriyal Kompleks I İnhibisyonu	20
2.8.6. Glutasyon Azalışı ve Ubikuitin-Proteozom Sistemi (UPS) Fonksiyon Bozukluğu	21
2.8.7. Glutasyon Azalışı ve İnflamasyon	22
2.8.8. Tedavi Stratejileri	23
2.9. YM737	24
2.10. Hücre Ölüm Yolakları	25
2.10.1. Nekroz	26
2.10.2. Programlanmış Hücre Ölümü	26
2.11. Amaç ve Hipotez	31
GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1. Gruplandırma	33
3.2. Deneysel Parkinson Modelinin Oluşturulması	33
3.3. YM737 Uygulaması	33
3.4. Deneyin Solandırılması ve Dokuların Çıkarılması	34
3.5. Parametreler	34

3.5.1 Davranışsal Parametreler	34
3.5.2. Histolojik Parametreler	35
3.5.3. Biyokimyasal Parametreler	37
3.6. İstatistik	40
BULGULAR	41
4.1. Genel Görünüm	41
4.2. Davranışsal Parametreler	41
4.2.1. Lokomotor Aktivite Düzeyi	41
4.2.2. Katalepsi Düzeyi	42
4.2.3. Rotasyon Düzeyi	43
4.3. Histolojik Parametreler	43
4.3.1. TH İmmünreaktivitesi	43
4.3.2. Bcl-2 İmmünreaktivitesi	45
4.3.3. ASK1 İmmünreaktivitesi	46
4.3.4. TUNEL Analizi	48
4.4. Biyokimyasal Parametreler	49
4.4.1. GSH Düzeyi	49
4.4.2. 4-HNE Düzeyi	49
4.4.3. Sit-c Düzeyi	49
TARTIŞMA	51
5.1. Davranışsal Değişiklikler	52
5.2. Histolojik Değişiklikler	54
5.3. Biyokimyasal Değişiklikler	56
SONUÇLAR	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	79
EK	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
ADP	: Adenozin difosfat
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
Apaf1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ASK1	: Apoptoz sinyal regüle edici kinaz 1
ATP	: Adenozin trifosfat
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl	: B-hücre lenfoma
BG	: Bazal gangliyon
BSA	: Bovin serum albumin
BSO	: L-bütionin (S,R)-sülfoksimin
Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu
CAT	: Katalaz
COMT	: Katekol-O-metil-transferaz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CPPA	: Coomassie Plus Protein Assay
DAB	: Diamino benzidin
DAT	: Dopamin taşıyıcısı
DF45	: Fragmentasyon faktörü 45
DISC	: Ölümle indüklenen sinyal kompleksi
DLPFC	: Dorsolateral prefrontal korteks
DTNB	: 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
EAAC1	: Uyarıcı amino asit taşıyıcı 1
EDTA	: Etilendiamin tetrasetik asit dipotasyum tuzu
Enk	: Enfefalin
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ER	: Endoplazmik retikulum
ETZ	: Elektron taşıma zinciri
Fe	: Demir
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GCL	: L-glutamat:L-sistein γ -ligaz
GPe	: Globus pallidusun eksternal segmenti
GPI	: Globus pallidusun internal segmenti
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
Grx	: Glutaredoksin
GS	: Glutasyon sentaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidrojen klorür
HRP	: Horse radish peroksidaz
IAP	: Apoptozu inhibe edici protein
IL	: İnterlökin

iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	: c-jun N-terminal kinaz
K	: Kontrol grubu
K₂HPO₄	: Dipotasyum hidrojen fosfat
LB	: Lewy cisimcikleri
LC	: Lokus korelus
L-DOPA	: L-dihidroksifenilalanin
LN	: Lewy nöritleri
LPS	: Lipopolisakkarit
LRRK-2	: Lösinden zengin tekrarlayan kinaz-2
MAC	: Apoptoz ile uyarılmış mitokondriyal kanal
MAO	: Monoamin oksidaz
MDA	: Malondialdehit
Mdm2	: Murine double minute
MFB	: Mediyal ön beyin demeti
MPA	: Meta fosforik asit
MPP⁺	: 1-metil-4-fenilpiridinyum
mPT	: Mitokondriyal permeabilite değişimi
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MSS	: Merkezi sinir sistemi
Na⁺	: Sodyum iyonu
NAC	: N-asetilsistein
NAcc	: Nükleus akkumbens
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NAIP	: Nöronal apoptoz inhibe edici protein
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NOX2	: NADPH oksidaz 2
NT	: Nörotransmitter
O₂	: Moleküler oksijen
OCT-3	: Organik katyon taşıyıcısı-3
OFC	: Orbitofrontal korteks
P	: Deneysel parkinson modeli oluşturulan grup
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PCD	: Programlanmış hücre ölümü
PCOOH	: Fosfotidilkolin hidroperoksit
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PGE2	: Prostaglandin E2
PH	: Parkinson hastalığı
PI3	: Fosfotidilinositol 3
PINK1	: PTEN indüklü putatif kinaz
PPN	: Pedinkülopontin nükleus
Prx	: Peroksiredoksin
PTEN	: Fosfataz ve tensin homoloğu
PY	: Deneysel parkinson modeli oluşturulan + YM737 uygulanan grup
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri

sGC	: Çözünebilir guanilaz siklaz
Sit-c	: Sitokrom c
SMA	: Suplementuar motor alan
Smac	: Kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü
SN	: Substansia nigra
SNpc	: Substansia nigra pars kompakta
SNr	: Substansia nigra pars retikülata
SOD	: Süperoksit dismutaz
TdT	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
SP	: Substans P
STN	: Subtalamik nükleus
TEAM	: Trietanolamin
TH	: Tirozin hidroksilaz
TNB	: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
Trx	: Tiyoredoksin
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling
UPS	: Ubikuitin-proteozom sistemi
VDAC	: Voltaj bağımlı anyon kanalı
VMAT2	: Veziküler monoamin taşıyıcısı 2
XIAP	: X kromozomuna-bağılı IAP
VTA	: Ventral tegmental alan
Y	: YM737 uygulanan grup
YM737	: N-(N-r-L-glutamil-L-sisteinil) glisin l-izopropil ester sülfat monohidrat
γ-GT	: γ -glutamil transpeptidaz
α-sinüklein	: Alfa-sinüklein

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Bazal Ganliyön Devresi	4
Şekil 2.2. Direkt ve İndirekt Devre	5
Şekil 2.3. Motor Devrenin Şematize Gösterimi	7
Şekil 2.4. Deneysel Parkinson Oluşturucu Nörotoksinlerin Etki Mekanizmaları	13
Şekil 2.5. Glutasyon Fonksiyonları ve Metabolizması	16
Şekil 2.6. Parkinson Hastalığında Oksidatif ve Nitrozatif Stres Kaynakları	19
Şekil 2.7. Glutasyon Azalışı ve Ubikuitin-Proteozom Sistemi Fonksiyon Bozukluğu	22
Şekil 2.8. GSH Azalışı ve Hücresele Etkileri	24
Şekil 2.9. Hücre Ölüm Yolakları	27
Şekil 4.1. Lokomotor Aktivite Testi	42
Şekil 4.2. Katalepsi Testi	43
Şekil 4.3. Rotasyon Testi	43
Şekil 4.4. TH immünreaktivitesi	44
Şekil 4.5. Nigral Dopaminerjik Nöronların Stereolojik Sayımı	45
Şekil 4.6. Bcl-2 immünreaktivitesi	46
Şekil 4.7. ASK-1 İmmünreaktivitesi	47
Şekil 4.8. TUNEL Analizi	48
Şekil 4.9. Biyokimyasal Parametreler	50

GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından sonra gelen en yaygın nörodejeneratif hastalıktır [1]. Tüm dünyada, tüm ırklar ve etnik gruplarda görüldüğü bilinen hastalığın total populasyonda ortaya çıkma sıklığı 1/1000'dir. PH hem motor hem de motor dışı belirtileri olan, kronik ve ilerleyici karakterde bir hastalıktır. Motor hareketlerin yavaşlaması, yürüme bozukluğu, konuşma bozukluğu gibi motor semptomların yanında depresyon, psikoz, demans ve uyku bozuklukları gibi nöropsikiyatrik semptomlar hastanın günlük yaşamını devam ettirmesini büyük ölçüde engellemektedir. Batı Avrupa'nın en kalabalık 5 ve dünyanın en kalabalık 10 ülkesinde 50 yaş üstündeki popülasyonda yapılan araştırmalar 2005 yılı itibariyle dünyada 4.1-4.6 milyon Parkinson hastası olduğunu, bu sayının 2030 yılında 8.7-9.3 milyon hastaya ulaşacağını göstermektedir. Oluşum sebebi bilinmeyen PH'nin semptomatik tedavileri dışında kesin bir tedavisi yoktur.

PH'da en erken görülen biyokimyasal değişikliklerden biri, hücre için önemli bir antioksidan olan glutatyon (GSH)'un azalışıdır [2]. Nigral dopaminerjik nöronlarda gözlenen bu azalışın Parkinson hastalarında %40-50 oranında olduğu bildirilmiştir [3-4]. Substantia nigra (SN)'daki GSH azalışının sebebi bilinmemektedir. Bu konu ile ilgili genel kanı, GSH seviyelerindeki bu azalışın PH patogenezinin katılan oksidatif stresin bir sonucu olduğuydu. Ancak son zamanlarda elde edilen veriler GSH azalışının bizzat PH patogenezinde aktif rol alabileceği yönündedir [2].

GSH sentezinin artışıyla ya da yıkımının inhibisyonuyla sonuçlanacak uygulamaların PH'nin ilerlemesini yavaşlatabileceği öne sürülmüştür. Ancak birkaç istisna [5] dışında nöronları da kapsayan pek çok hücre GSH taşıma kapasitesine sahip değildir [6-7]. GSH'ın kan beyin bariyerinden bir miktar geçişi gösterilmiş olsa da [8] bu oldukça düşük kapasitededir [9]. Bu durum sıçanlara 50mg/kg/gün dozda kronik periferik GSH uygulamasının beyinde neden hücre içi ve hücre dışı kompartmanlardaki GSH düzeyini arttırmadığını açıklamaktadır [7]. Bu nedenlerle hücre GSH düzeyini arttırmak amacıyla insanlarda ve hayvan modellerinde çoğunlukla GSH monoetil ester, GSH öncülleri ya da GSH analogları kullanılmıştır [10]. GSH'ın aksine GSH etil ester türevlerinin hücreye etkin bir şekilde alınabildiği gösterilmiştir [11]. Aktif transport ile hücrelere alınan GSH etil esterinin etil grubu esterazlar tarafından koparılır ve geriye serbest GSH ve etanol kalır [11]. GSH'ın etil ester türevlerinin hem sitozolik [7, 12-13] hem de mitokondriyal [12-13] GSH seviyelerini etkin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca GSH etil esterinin, MPP⁺ ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde, nigral GSH düzeyini arttırdığı ve dopaminerjik nöronları oksidatif strese karşı koruduğu bildirilmiştir [7]. GSH etil ester türevlerinin dezavantajlarından biri beyin GSH seviyelerini arttırmak için santral (stereotaksik yolla) verilme gerekliliğidir [7]. N-(N-r-L-glutamil-L-sisteinil) glisin l-izopropil ester sülfat monohidrat (YM737), GSH'ın glisin karbonil grubunun esterlendiği bir GSH monoesteridir [14]. YM737'nin sıçanlarda serebral iskemiyeye

karşı koruyucu etkiler sergilediği gösterilmiştir [15]. Bu GSH analogunun avantajı intraperitoneal yolla uygulanması, dolayısıyla non-invaziv bir tedavi umudu vermesidir. Periferal YM737 uygulamasının deneysel Parkinson modelinde nigral GSH düzeyini arttırma yeteneği daha önce çalışılmamıştır. Nigral GSH azalışının Parkinson patolojisine katkısı göz önüne alındığında, kan beyin bariyerini geçme özelliğinden dolayı intraperitoneal yolla uygulanabilen GSH analogu YM737 kullanımının Parkinson klinik semptomlarını azaltmada etkili olacağını düşündürmektedir.

Çalışmamızın amacı 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile oluşturduğumuz deneysel Parkinson modelinde GSH analogu YM737'nin olası koruyucu etkisini ve mekanizmasını ortaya koymaktır. Bu amaç doğrultusunda, davranışsal parametre olarak katalepsi, lokomotor aktivite ve rotasyon testleri, histolojik parametre olarak Tirozin hidroksilaz (TH), B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2), apoptoz sinyal regüle edici kinaz 1 (ASK1) immünreaktivite ve TUNEL analizi, biyokimyasal parametre olarak nigral GSH, 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve sitokrom-c (sit-c) ölçümü uygulanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

PH, 65 yaş üzeri popülasyonun %1-2'sinde görülen, Alzheimer hastalığından sonra en yaygın nörodejeneratif hastalıktır [1]. Yaş ile birlikte insidansı artan bu hastalık, toplumlara hem sosyal hem de ekonomik olarak büyük bir sorumluluk yüklemektedir. PH, patolojik olarak SN bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve yaşayan nöronlarda Lewy cisimcikleri (LB)'nin görülmesi ile karakterizedir [1]. Nigral nöronların kaybı striatumda dramatik bir dopamin (DA) azalışına neden olmaktadır. Hastalığı tanımlayan klinik semptomlar, rijidite, bradikinezi, dinlenme tremoru ve postürel bozukluktur [1]. Dopaminerjik nöronların dejenerasyonunda çevresel ve genetik faktörlerin etkinliği öne sürülse de PH'nın patogenezi halen çok açık değildir.

Günümüzde PH'nın tedavisi için geçerli olan yaklaşım, DA sentezinin ara molekülü olan L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) kullanımınıdır [16]. L-DOPA, başarı yüzdesi en yüksek olan tedavi yaklaşımı olsa da ilerlemesi durdurulamayan ve ölümcül olan bu hastalık üzerine yalnızca semptomatik bir etki göstermektedir. Sonuç olarak PH'da meydana gelen hücre ölümünün patolojik mekanizmalarını engelleyecek yeni protektif ajanların keşfedilme gerekliliği oldukça açıktır.

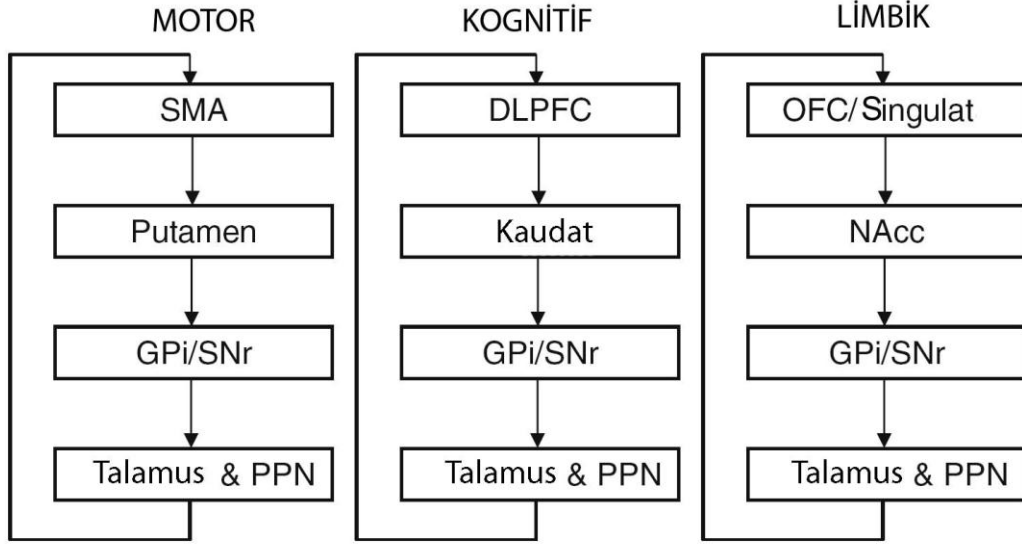
2.2. Parkinson Hastalığının Nöroanatomik Mekanizmaları

2.2.1. Bazal Gangliyon Devresi

Sağlıklı insanlarda fiziksel hareketlerin, kognisyonun ve limbik işlevlerin kontrolü bazal gangliyon (BG)'lar ve serebral korteks arasında bulunan paralel kortikostriatal yollar aracılığıyla kurulan fonksiyonel bağlantılar ile sağlanmaktadır. DA, bu devrelerin regülasyonunda anahtar rol oynamaktadır. BG devresinde meydana gelen bozukluk PH patolojisinde anahtar rol oynamaktadır.

BG'ler, BG nükleusları, serebral korteksin çeşitli bölgeleri, talamus ve beyin sapını birbirine bağlayan ve bu bölgelerin fonksiyonlarını düzenleyen yapılardır. Koordineli bir nöronal aktivite, BG'den geçen birbirine paralel sayısız nöronal ağa bağlıdır [17]. Bu kompleks kontrol seviyesini elde etmek için çeşitli anatomik yapılar serebral korteksin farklı bölgeleri ile BG nükleusları arasında bağlantı kurar (Şekil 2.1). Fonksiyonel bir veri oluşabilmesi için BG devresindeki her yolak spesifik nörotransmitter (NT) bağlantıları aracılığıyla organize bir ağ oluşturmaktadır. Bu yollar içerisinde en iyi tanımlanmış olan devre motor devredir. Motor ve premotor kortikal alanlardan orijin alan yollar somatotopik patern içinde postolateral putamene projekte olurlar. Burada uyarıcı glutamaterjik nöronlar orta dikensi striatal nöronlar ile sinaps yapar. Bu striatal nöronlar başlıca NT olarak gama-aminobütirik asit (GABA)'i, yardımcı NT olarak da substans P (SP) veya enkefalin (Enk)'i kullanırlar ve "direkt" ve "indirekt yollar"ı organize ederler (Şekil 2.2a). Her iki

yolak da BG'nin ana çıkış nükleusunu temsil eden globus pallidusun internal segment (GPi)'i ve substansiya nigra pars retikülata (SNr) ile birleşir. Bu birbirini tamamlayan yolların ortaya çıkardığı dopaminerjik stimülasyonun dinamik dengesi hareket miktarını düzenlemektedir.



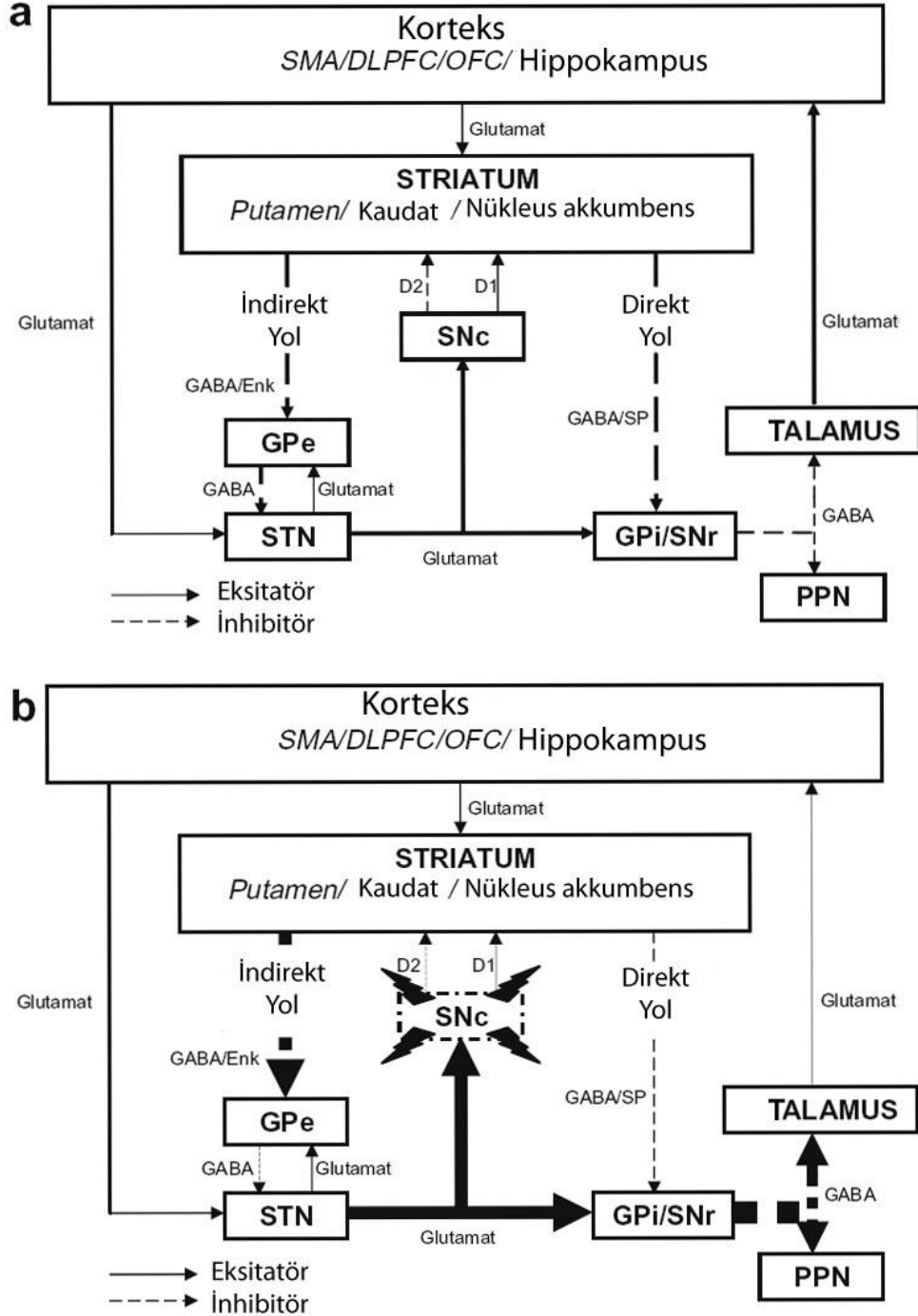
Şekil 2.1. Bazal Ganliyon Devresi [18]

Direkt yol, striatumu GPi ve SNr'ye bağlamaktadır. GPi ve SNr, inhibe edici GABAerjik nöronlarını hem talamusa hem de beyin sapındaki pedinkülopontin nükleus (PPN)'a göndermektedir. Glutamaterjik lifler aracılığıyla ortaya çıkan talamik çıktı uyarıcıdır ve prefrontal ve motor korteksi uyarır. PPN, lokomasyon sürecine etki eden başlıca beyin sapı nükleusudur.

İndirekt yol da striatumu BG'nin çıkış nükleusları (GPi ve SNr)'na bağlamaktadır ancak bu yolda inhibe edici lifler öncelikle globus pallidusun eksternal segmenti (GPe)'nde sinaptik bağlantı yaparlar. GPe, GABAerjik bağlantılar aracılığıyla subtalamik nükleus (STN) üzerinde inhibitör etki ortaya koyar. İndirekt yolağın son aşaması STN'den çıkan uyarıcı glutamaterjik liflerin çıkış nükleusu olan GPi/SNr'ye girmesidir.

Bu kompleks yollar striatal nöronlarda bulunan dopaminerjik reseptörler boyunca ortaya çıkan sinyalizasyon vasıtasıyla fonksiyonel entegrasyonu korumaktadır. Striatumun aktivasyonu SNC'den gelen dopaminerjik projeksiyonla düzenlenmektedir. Direkt yolağın striatal nöronları çoğunlukla DA'nın D1 reseptörünü taşıırken, indirekt yolak D2 reseptörlerini taşımaktadır. Direkt yolağın striatal nöronlarının D1 reseptörlerinin uyarılması GPi'nin inhibisyonunun artmasına, dolayısıyla talamus ve PPN üzerindeki inhibitör tonun azalmasına neden olmaktadır. Bu da sırasıyla korteksin uyarılmasını ve hareketi kolaylaştırmaktadır. Alternatif olarak indirekt yolağın (Şekil 2.2a) striatal nöronlarının D2 reseptörlerinin uyarılması GPe'nin inhibisyonunun azalmasına, dolayısıyla STN'nin daha fazla inhibisyonuna ve GPi'nin daha az aktivasyonuna neden olmaktadır. Düşük GPi aktivitesi talamusun daha fazla aktif olmasına izin vermekte ve hareketi kolaylaştırmaktadır.

Sonuç olarak striatumdan salınan DA, hareketi kolaylaştırmak için hem direkt hem de indirekt yollara etki etmekte, bu DA salınımının regülasyonu ise uygulanan motor hareketin ince ayarını yapmaktadır.



Şekil 2.2. Direkt ve İndirekt Devre [18]

2.2.2. Parkinson Hastalığında Motor Devre

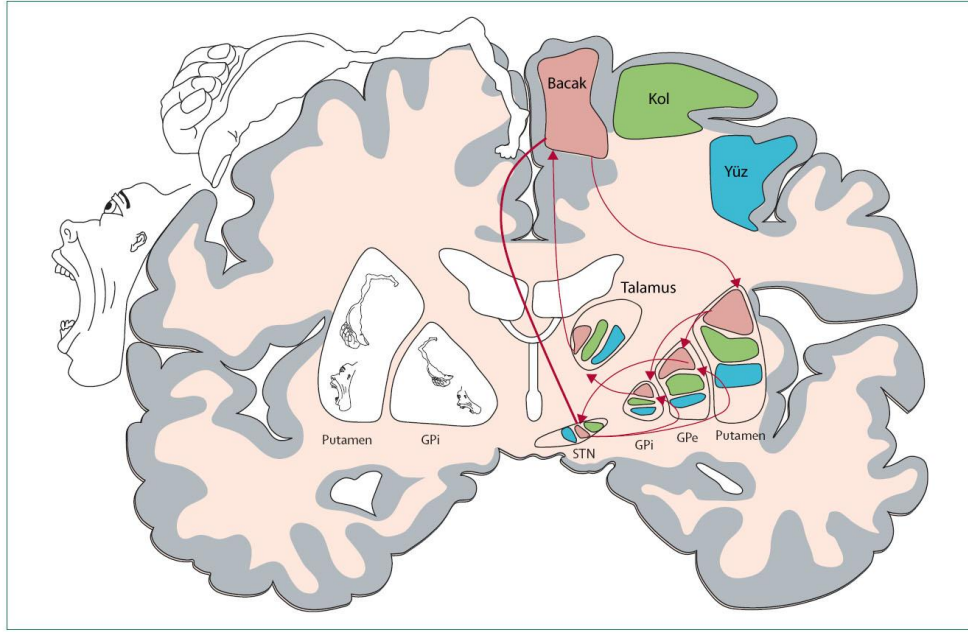
Striatumdaki DA kaybından dolayı PH'da motor devredeki doğal denge bozulmaktadır (Şekil 2.2b). Dopaminerjik stimülasyondaki azalma GPi/SNr çıkış nükleusunda aktivite artışına ve dolayısıyla hem talamus hem de PPN'nin inhibisyonuna neden olmaktadır. Daha spesifik olarak direkt yolda striatal nöronların D1 reseptörleri üzerindeki stimülasyon kaybı GPi seviyesinde ortaya çıkan inhibisyon derecesini azaltmakta, bu da daha aktif olmasına sebep olmaktadır. Benzer şekilde indirekt yoldaki striatal liflerin inhibe edici D2 stimülasyonunun azalması STN'nin fazla aktivasyonuna ve sonuç olarak BG'nin çıkış nükleusunun fazla aktif olmasına neden olmaktadır. GPi/SNr'nin bu düzensiz aktivasyonu, sırasıyla talamus ve PPN'nin inhibisyonuna, inen ve çıkan yolların bozulmasına ve motor aktivitenin azalmasına neden olmaktadır.

BG'nin bu motor devre modeli biyokimyasal, elektrofizyolojik, fonksiyonel görüntüleme ve klinik çalışmalar ile kanıtlanmış [19-23] ve hastalığın akinetik özellikleri ile ilgili patofizyolojiyi ortaya koymuştur.

2.3. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri

1960'lı yıllarda nigrostriatal dopaminerjik yolağın tanımlanması ve striatuma DA kaybının keşfedilmesi hastalığın klinik özellikleri ve biyokimyasal patolojisi arasında bir korelasyon kurulmasını sağlamıştır [24]. PH'nın klinik semptomları motor ve motor dışı olmak üzere 2 grupta toplanmıştır. Dopaminerjik striatal kayıp ile doğrudan ilişkili olan en belirgin semptomlar akinezi, rijidite ve tremor olarak tanımlanan motor semptomlardır. PH'nın motor semptomlarından önce başlayan semptomları ise koklama duyusunun azalması, uyku bozuklukları, konstipasyon, depresyon ve anksiyetedir. PH'nın klinik tanısı semptomlara ek olarak L-DOPA ya da apomorfine testleriyle desteklenebilir. Çeşitli görüntüleme sistemleri ile hastalığın formları ve temel tremordan farkı ayırt edilebilir.

Striatumdaki DA miktarı %60-70 oranında düştüğü zaman PH'nın motor semptomları ortaya çıkmaktadır. Motor belirtilerin başlangıcı, striatumun motor bölgesi olan posterior putamendeki DA kaybı ile korelasyon göstermektedir (Şekil 2.2). Akinezi, rijidite ve tremor gibi başlıca semptomlar ağırlıklı olarak motor devredeki fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Motor Devrenin Şematize Gösterimi [25]

2.3.1. Motor Semptomlar

2.3.1.1. Akinezi

Hareket eksikliği olarak tanımlanan akinezi, altında farklı patolojik mekanizmalar yatan pek çok klinik özelliği kapsamaktadır. Bunlardan biri olan “hipokinezi” özellikle otomatik hareketlerde göze çarpan spontan hareketlerin amplitüd ve frekanslarındaki düşüş anlamına gelmektedir. Klinik belirtiler, göz kırpmada hızında yavaşlama, yüz ifadelerinde azalma, kol sallamada azalma ya da tamamen durma, sandalyeden kalkamama şeklinde ortaya çıkmaktadır. Parkinsonlu hastaların yürüyüş biçimi kısa adım, ayakların yerden fazla yükselmemesi ve ayakların sürünmesi gibi pek çok hipokinetik özellik taşımaktadır. PH'nın tanısında en önemli özellik olan “bradikinezi” ise bir harekete başlama ya da uygulama hızının yavaşlaması, hareket amplitüdünün ilerleyici bir şekilde düşmesi ve basit tekrarlı hareketlerde duraksama ile karakterizedir [26]. Ardışık ve eş zamanlı hareketleri yapma girişimi sıklıkla engellendiği için günlük yaşam kalitesi anlamlı derecede bozulmaktadır [27]. Bradikinezi, genellikle yüzün tek bir tarafında mimik azalması, kol sallamada azalma, yazı yazma ve besinleri kesmede problemler ile kendini gösterir. Bradikinezi şiddeti dopaminerjik nöron hasarı ile güçlü bir korelasyon göstermektedir [28]. Hipokinezi beyin sapı, bradikinezi ise kortikal mekanizmalarla düzenlenmektedir.

2.3.1.2. Rijidite

Dinlenim durumunda kas tonusunun artması, pasif hareketlere karşı gerimin düşmesi, germeye karşı direncin artması ile karakterizedir. Özellikle asimetrik rijidite, PH'nın güçlü bir göstergesidir. Hem fleksör hem de ektansör kas gruplarını kapsadığı halde hastalığın erken evrelerinde bacak fleksör kasları daha fazla etkilenmektedir [29].

2.3.1.3.Tremor

Çoğunlukla üst ekstremitelerin distalinde ve tek taraflı olarak başlayan, 4-6 Hz'lik titreme aktivitesidir. Tipik olarak dinlenim durumunda ortaya çıksa da aktivite tremoru sergileyen hastalar da rapor edilmiştir. Yaygın olarak parmaklar etkilendiği için “para sayma hareketi” olarak tanımlanan harekete neden olmaktadır. Çene kasları, dil ve eksen kaslarında (karın, sırt ve kalça) tremor nadiren ortaya çıkmaktadır. Diğer vücut parçalarının istemli manevraları, aritmetik hesaplama ve stres durumunda tremor tetiklenebilmekte ya da amplitüdü artmaktadır. Başlangıçta tremor belirli aralıklarla ortaya çıkmaktadır. L-DOPA ve diğer dopaminerjik ilaçlar, diğer semptomlara göre tremor üzerine daha az etkili olmaktadır. Pozitron emisyon tomografisi (PET) çalışmaları tremorun DA'nın üretiminin azalması ile yakından ilişkili olmadığını göstermiştir [28]. Hastalığın son evresinde tremor tamamen kaybolabilmektedir.

2.3.1.4.Postürel Bozukluk

PH'nın ileri aşamalarında ortaya çıktığı için hastalığın erken safhalarında tanı için kullanışlı bir semptom değildir. Postürel bozukluk, ortalama olarak hastalık başladıktan 5 sene sonra ortaya çıkmaktadır [30].

2.3.2. Motor Dışı Semptomlar

Parkinson hastalarının %90'ından fazlasında hastalık seyri boyunca motor dışı semptomlar izlenmektedir [31]. Hastaların yaşam kalitelerini negatif yönde etkileyen bu semptomlar nöroanatomik olarak korteks, BG, beyin sapı, omurilik ve periferik sinir sistemi ile ilişkilidir. PH, dopaminerjik nöronların yanında glutamaterjik, kolinerjik, serotonerjik ve adrenerjik nöronları da etkilemektedir [32]. Motor dışı semptomların dopaminerjik tedaviye çok az yanıt verdikleri, patofizyolojik mekanizmaların adrenerjik ve serotonerjikleri kapsadığı bildirilmiştir [33].

2.4. Parkinson Hastalığının Patolojik Özellikleri

PH'nın en önemli nöropatolojik özelliği SN'deki dopaminerjik nöronların dejenerasyonudur [1]. Nigral dopaminerjik nöronların %60'ının dejenerasyonu ve beraberinde striatal DA düzeyinin %60-70'inin kaybı sonucunda PH'nın motor semptomları klinik olarak teşhis edilmektedir [1].

Hastalığın ikinci patolojik belirteci ise nöronal hücre gövdelerinde ve nöron uzantılarında, LB ve Lewy nöritleri (LN) olarak adlandırılan proteinden zengin inklüzyonların gelişimidir. LB, ilk kez 1912 yılında Friedrich Lewy tarafından, koyu renkte bir çekirdeğe ve onun etrafında açık renkli bir halkaya sahip tipik küresel yapılar olarak tanımlanmıştır. Ancak LN iplikli bir yapı sergilemektedir. LB ve LN'nin ana bileşeni, alfa-sinüklein (α -sinüklein) proteininin hatalı katlanmış versiyonlarından biridir. LB'nin çekirdeğini ağırlıklı olarak α -sinüklein agregatları oluşturmaktadır. Parkinsonlu hastaların beyin otopsileri sonucunda hem hücre gövdelerinde hem de uzantılarında α -sinüklein birikimi tespit edilmiştir. α -sinüklein patolojisi ve bununla ilişkili olan nigral hücre kaybı striatal DA azalmasına neden olmaktadır. 2003 yılında Braak ve arkadaşları PH'da α -sinüklein patolojisinin ilerleme seyrini ve klinik semptomların başlaması ile bu inklüzyonların dağılımı arasındaki ilişkiyi açıklamak için bir şema öne sürmüşlerdir [34]. Bu çalışmaya göre, LB'nin, PH'nın klasik motor semptomları belirmeden önce, ilk olarak olfaktör

bulbus ve beyin sapında ortaya çıktığı ve kademeli olarak beyin diğer bölgelerine yayıldığı bildirilmiştir [34].

2.5. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi

PH'nın sebebi sinirbilimcilerin uzun zamandır araştırdıkları bir konudur. Son 25 yılda genetik ve çevresel faktörlerin nigral dopaminerjik nöron kaybına etkisine ilişkin pek çok bilgi elde edilmiştir. Ancak hastalığın etiyolojisi halen açık değildir.

PH'nın başlangıcı ile son derece ilişkili olan faktörlerden biri yaş ya da yaşlanma sürecidir. Hastalığın prevalansı yaş ile birlikte katlanarak artmaktadır. Yaşlanan dünya popülasyonu nedeniyle Parkinsonlu hasta sayısının 2050'de ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir. Bu kesin etkiye rağmen yaş ya da yaşlanma sürecinin hastalığa nasıl etki ettiğini anlamaya yönelik çok az çalışma yapılmıştır [35]. Bununla ilgili genel açıklama normal fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerdeki yetmezlikten dolayı dopaminerjik nöronların toksik saldırıya karşı hassasiyetlerinin artmasıdır. Aslında pek çok görüş, yaş ve yaşlanmanın hücre ölümüne katılımını göz ardı etmekte ve deneysel çalışmaların büyük çoğunluğunda genç hayvanlar kullanılmaktadır [36].

PH'nın genetiği ile ilgili edinilen bilgiler hastalığın etiyolojisine katkıda bulunmuştur. Otozomal dominant ve resesif PH'ya neden olan pek çok gen mutasyonu tanımlanmıştır. Gen mutasyonları proteinlerin işlenmesi, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon ile ilişkili proteinlerde tespit edilmiştir. Bu işlevler birbirleriyle oldukça yakından ilişkilidir.

Epidemiyolojik çalışmalar PH riskini arttıran veya azaltan pek çok faktör öne sürmektedir. PH oluşumu üzerine etkili olma potansiyeline sahip çevresel faktörler içerisinde sanayileşme, kırsal çevre, su, bitki kökenli toksinler, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, organik solventler, karbon monoksit ve karbon disülfid sayılmaktadır [37]. Çelişkili sonuçlara rağmen son zamanlarda pestisit maruziyeti ve PH riski ile ilgili çalışmalara ilgi artmıştır [38]. Birer tarım kimyasalı olan parakuat ve rotenonun kemirgenlerde nigral dopaminerjik nöron ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [39-40]. Bununla birlikte 95 Parkinsonlu olgu parakuat toksisitesine bağlanmıştır [41]. Metallerin, diğer kimyasalların ve manyetik alanların rolleri ile ilgili kanıtlar oldukça sınırlıdır.

PH riskinin meslekler ile ilişkisi de araştırılmış, öğretmenler ve tıp çalışanlarında gözlenen yüksek riskin viral enfeksiyonlara daha fazla maruziyet, inşaat çalışanları arasındaki düşük riskin ise yüksek fiziksel aktivite ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [42].

PH gelişim riskini azaltan faktörler de hastalığın etiyolojisi hakkında önemli ipuçları sağlayabilir. Mekanizması açık olmamasına rağmen sigara (doza bağımlı) ve kafein kullanımının hastalık riskini düşürücü etkisi kesin gibi gözükse de egzersiz, anti-inflamatuar, anti-hipertansif ve anti-lipidemikler gibi diğer faktörlerin etkisi henüz net değildir [43-44]. Alkol kullanımının düşük bir koruyucu etki sağlayabileceği öne sürülmüştür. Oksidatif stres hipotezine bağlı olarak C, E, A, B6

ve B12 vitamini ve folat gibi pek çok antioksidanın PH üzerine etkisi araştırılmasına rağmen çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.

PH riski ve kişilerin hastalık öncesi sağlık durumu arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Koklama duyusuna ait fonksiyon bozukluğu Parkinson hastalarının ortak bir özelliğidir [45]. Aynı zamanda Parkinsonlu hastaların olfaktör bulbuslarında LB tanımlanmıştır [46]. Bu nedenlerle koklama bozukluğu olan kişilerde PH riski araştırılmış ve pozitif bir ilişki (2-7 yıl arayla semptomlar gözlenmiş) saptanmıştır. REM uykusunda anormal davranışlar ile kendini gösteren REM uykusu davranış hastalığı, Parkinsonlu hastalarda da rapor edilmiştir. Uyku bozukluğu yaşayan bu hastaların SN ve lokus korelus (LC) bölgelerinde LB ve dejenerasyon görülmüştür [47]. Bu hastalığa sahip 29 kişiden 11'inde 13 yıl sonra PH teşhisi konmuştur [48]. İnflamasyon ve PH riski arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla sıçanların SN'lerine bakteriyel endotoksin lipopolisakkarit (LPS) enjekte edilmiş ve sonrasında mikroglia aktivasyonu ve dopaminerjik nöron dejenerasyonu gözlenmiştir [49]. Depresyon ve anksiyete hastalıkları Parkinson hastalarında yaygın olarak görüldüğü için PH ile psikiyatrik hastalıkların etiyolojik komponentleri paylaşabileceği öne sürülmüştür. Alternatif olarak ise depresyonun PH'nın erken klinik tablosu olabileceği düşünülmüştür. Demans ve PH arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalar çelişkilidir. Aksini savunan çalışmalar olsa da Parkinsonlu hastaların düşük kanser riski taşıdıkları fikri yaygındır. Ancak genel popülasyona oranla Parkinsonlu hastaların sigara içme prevalansının düşük olmasının kanser riskini azalttığı düşünülmüştür. Kafa travması ve PH arasında bir ilişki olduğu öne sürülse de bunu gösteren prospektif çalışmalar mevcut değildir. Vasküler hastalıklar ile diyabetin PH ile ilişkisini ortaya koyan epidemiyolojik kanıtlar yeterli değildir. Erkeklere göre kadınlarda PH insidansı ve prevalansının düşük olmasına bağlı olarak östrojenin koruyucu rolü öne sürülmüş, östrojenin dopaminerjik nöronlar üzerine nöroprotektif ve antioksidan özelliği deneysel olarak gösterilmiştir [31]. Ayrıca, menapoz sonrası dönemde östrojen tedavisinin hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir [50-51]. Son olarak, güçlü bir antioksidan olan ürik asitin Parkinsonlu hastaların SN ve serumlarında azaldığı bilinmektedir. Serumdaki ürik asit seviyesinin arttığı gut hastalığında PH riskinin azaldığı gösterilmiştir [52].

2.6. Parkinson Hastalığı Patogenezi

Deneysel toksin uygulamaları, post-mortem araştırmalar ve genetik bulgulara bağlı olarak PH'da meydana gelen nöron kaybına katılan hücre ölüm mekanizmaları ile ilgili genel bir fikir birliği mevcuttur. Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, proteinlerin işlenmesindeki değişiklikler ve inflamasyonun, apoptoz ya da otofaji aracılığıyla hücre fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu mekanizmalardan hiçbirinin PH'da meydana gelen nigral dopaminerjik nöron ölümüne tek başına kesin bir şekilde neden olduğu kanıtlanamamıştır [53].

2.7. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri

PH nörobiyolojisine ışık tutmak amacıyla özellikle son 25 yılda pek çok deneysel hayvan modeli geliştirilmiştir. Hastalığın süreci, etiyolojisi, patolojisi ve moleküler mekanizmaları ile ilgili elde edilen veriler, çok nadir değerlendirilebilen otopsi materyallerinden ziyade hayvan modellerinden kaynaklanmaktadır. Bu

modeller; farmakolojik, toksik ve genetik modeller olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır.

2.7.1. Farmakolojik Modeller

Rezerpin ve alfa-metil-para-tirozin gibi farmakolojik ajanlarla oluşturulan bu deneysel hayvan modellerinde amaç dopaminerjik nöronlar sağlamken hızlı ve geri dönüşümlü bir şekilde striatal DA kaybı sağlamaktır [16]. Rezerpin, veziküler monoamin taşıyıcısı (VMAT2)'ni inhibe ederek monoaminlerin (DA, noradrenalin ve serotonin) sinaptik veziküllerde depolanmasını engeller. Alfa-metil-para-tirozin ise katekolaminlerin sentez basamağındaki hız kısıtlayıcı enzim olan TH'yi inhibe ederek beyinde DA kaybına neden olur. Her iki farmakolojik ajan da yalnızca uygulama periyodu süresince devam eden hızlı bir DA ve katekolamin kaybı oluşturabilmektedir. Striatal DA kaybının maymunlarda [54] ve kemirgenlerde [16] spontan motor aktivite azalışına (hipokinezi gibi) neden olduğu, kas tonusunu arttırdığı, tremoru andıran anormal ardışık hareketlere neden olduğu gösterilmiştir. Bu ajanlardan hiçbiri PH'da görülen nörodejenerasyonu oluşturamasa da hastalığın nörokimyasının ilkel bir taklidi olan rezerpin modeli, tedavide halen altın standart olarak kabul edilen L-DOPA'nın terapötik etkinliğinin ilk kez kanıtlanmasını sağlamıştır [16].

2.7.2. Toksik Modeller

2.7.2.1. 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) Modeli:

PH'yi modelleme yolunda ilk büyük atılım 1970 yılında yapılmış [55], DA'nın hidroksillenmiş analogu olan 6-OHDA intaserebral yolla sıçanlara uygulanarak nörodejeneratif Parkinson modeli oluşturulmuştur. 6-OHDA, yalnızca sıçanlarda değil, fare, kedi, köpek ve maymunlarda da kullanılmaktadır [56]. Bununla birlikte bu türlerden herhangi biri diğerine göre bilimsel avantaj sergilememiştir. 6-OHDA modeli, nöronları koruyucu ya da tamir edici stratejileri değerlendirmek için oldukça elverişli bir modeldir.

6-OHDA, kan beyin bariyerini kolaylıkla geçemediği için santral katekolaminerjik sistem hasarı oluşturmak amacıyla intraventriküler, intrasisternal ya da intraserebral yolla uygulanmalıdır [57]. Hem intraventriküler hem de intrasisternal uygulamada çift taraflı katekolaminerjik hasar meydana gelmektedir [56]. Bununla birlikte çift taraflı 6-OHDA modelinde, belirgin afaji, adipsi ve krizler [58-59] nedeniyle deney hayvanlarında sıklıkla ölüm görülmüş, bu da araştırmacıların bu modele inancını yitirmesine neden olmuştur. Bu nedenle tek taraflı olarak 6-OHDA uygulaması "altın standart" olarak kabul edilmiştir [60]. Bu modelde 6-OHDA uygulanmayan diğer hemisfer internal kontrol olarak kullanılabilir. Ayrıca bu modelde, oluşturulan dopaminerjik lezyonun derecesine bağlı olarak değişen asimetric rotasyon davranışı gözlenmekte [55], bu davranış tedavi amaçlı araştırılan yeni ilaçların özelliklerini ve lezyon oluşun yolakların onarımında transplantasyon ve gen terapi başarısının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte çift taraflı modeli kullanan araştırmacılar da mevcuttur.

6-OHDA, nigrostriatal yolakta 3 farklı bölgeye enjekte edilebilmektedir; substansia nigra pars kompakta (SNpc) (dopaminerjik nöron gövdelerinin bulunduğu bölge), medial ön beyin demeti (MFB) (dopaminerjik ve serotonerjik uzantıları ön

beyine taşıyan bölge), striatum (terminal bölge). Enjeksiyon bölgesinin seçimi ihtiyaçlara bağlı olarak değişmektedir. Örneğin SNpc'nin direkt olarak mekanik hasara uğratılmaması için MFB ya da striatum tercih edilmektedir. 6-OHDA'nın MFB'ye enjeksiyonunun dopaminerjik nöronları hasara uğrattığı gösterilmiştir [61]. 6-OHDA, MFB'ye enjekte edildikten 24 saat sonra dopaminerjik nöronlar dejenere olmaya başlar [62]. Bu dejenerasyonun lezyon oluşumundan 1-3 hafta sonrasına kadar devam ettiği, ölen nöronların apoptozu andıran farklılaşmış bir morfoloji sergiledikleri bildirilmiştir. Dopaminerjik sistem lezyonuna ek olarak gliosis de 6-OHDA modelinin belirgin bir özelliğidir. Bu modelde LB oluşumunu gösteren ikna edici bir veri bulunmamaktadır.

6-OHDA, beyne enjekte edildikten sonra DA taşıyıcısı (DAT) aracılığıyla dopaminerjik nöron tarafından alınır (Şekil 2.4). Hücre içerisinde 6-OHDA hemen oto-oksidasyona uğrar [63] ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS)'ni oluşturur, GSH ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidanların striatal düzeylerini düşürür [64-65], SN'de demir (Fe) seviyesini yükseltir [66], mitokondri elektron taşıma zinciri (ETZ) elemanlarından kompleks I ve IV ile direkt etkileşime girerek solunumu inhibe eder ve daha fazla oksidatif strese neden olur [67]. Bunlara ek olarak 6-OHDA ile lezyon oluşumu sonucunda SN ve striatumda mikrogliya aktivasyonu tespit edilmiştir [68]. 6-OHDA modeli ayrıca, striatal DA ve TH seviyelerinde azalma gibi PH'nın pek çok biyokimyasal özelliğini taklit etmektedir. PH'nın, 6-OHDA modeli ile güçlü bir şekilde sergilenen en belirgin patolojik özelliklerinden biri nigrostriatal yolun dejenerasyonudur. Dejenerasyonun boyutu, post-mortem olarak SNpc'de Nissl-boyanmış hücrelerin veya TH-pozitif nöronların sayılarının, striatumda TH enzim seviyesinin veya DAT immünreaktivitesinin değerlendirilmesi ile tespit edilebilir. Davranışsal indeksler de lezyon büyüklüğü ile ilgili bilgi verebilmektedir. Sonuç olarak 6-OHDA modeli pek çok açıdan PH ile benzer özellikleri taşımaktadır. Ancak Parkinson hastalarında etkilendiği bilinen diğer beyin bölgelerine (LC ve rafe nükleusu) 6-OHDA nörotoksininin herhangi bir patolojik etkisi tespit edilememiştir. Ayrıca pek çok diğer hayvan modellerinde olduğu gibi 6-OHDA modelinde LB gözlenememiştir. Bunun yanında, 6-OHDA ile oluşturulan modellerin çoğunda PH'ya göre oldukça hızlı bir hücre ölümü gözlenmektedir.

kinaz (MAPK) [75], c-jun N-terminal kinaz (JNK) [76] ve Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax) [77] gibi hücre ölümü ile ilişkili sinyal yollarının aktive olduğu gösterilmiştir. Düşük hücrese ATP ve yüksek ROS üretiminin bu yolları tetiklediği düşünülmektedir.

2.7.2.3. Rotenon, Parakuat, Maneb ve Metamfetamin

Herbisit olarak kullanımının yanında böcek ve balık zehri olarak bilinen doğal sitotoksik bileşik rotenonun 1990'lı yıllarda potansiyel bir Parkinson oluşturu çevresel toksin olduğu ortaya çıkmıştır. Oldukça lipofilik olan rotenon kan beyin bariyerini kolaylıkla geçmektedir. Mitokondri içerisinde biriken rotenon ETZ'nin kompleks I ünitesini bloklar. ROS üretimi ve GSH azalışının oksidatif stresi indüklediği düşünülmektedir [78]. Bununla birlikte davranışsal değişiklikler, inflamasyon, α -sinüklein agregasyonu ve Lewy benzeri cisimcik oluşumu, oksidatif stres ve gastrointestinal problemler gibi PH'nın pek çok ayırıcı özelliğini taklit ettiği öne sürülmektedir. [79]. Stereotaksik yolla sıçanların MFB'lerine uygulanan rotenonun striatal DA kaybına neden olduğu tespit edilmiştir [80]. Ancak bu husustaki veriler zayıf bulunmaktadır. Fareler ve maymunlarla yapılan girişimler ise çok verimli sonuçlar sağlamamıştır.

Güçlü bir herbisit olan ve pek çok organa zararlı olduğu bilinen parakuatın, MPTP'nin aktif metabolitine olan yapısal benzerliği ilgi uyandırmıştır. Sodyum bağımlı taşıyıcı ile hücre içine alınan parakuat, kompleks I inhibisyonu ile mitokondriyal toksisiteye neden olmaktadır [81] (Şekil 2.4). Farelere sistemik uygulanan bu nörotoksin ile elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Bazı çalışmalarda düşük motor aktivite, striatal dopaminerjik sinir liflerinde ve nigral nöronlarda kayıp tespit edilirken [40], bazılarında yalnızca nöron sayısında hafif bir azalma belirlenmiş [82], bazılarında ise hiçbir fark bulunamamıştır [83-84].

Fungusit olarak kullanılan manebin kompleks III'ü inhibe ederek dopaminerjik nöronları hasara uğrattığı gösterilmiştir [85].

Amfetaminler psikostimülan olarak bilinse de metamfetamin gibi bazı derivatifler, sinir sisteminde hem fonksiyonel bozukluk hem de yapısal değişikliklerle sonuçlanan nörotoksik etki göstermektedir. Yüksek dozda metamfetamin uygulanan kemirgenlerin özellikle nigral nöronlarında anlamlı bir kayıp gözlenirse de [86-87] bu model çok güvenilir değildir.

2.7.3. Genetik Modeller

PH uzun zamandır genetik tabanlı olmayan, sporadik orijinli bir hastalık olarak düşünülse de hastaların %5-10'unda genetik mutasyonlar gözlenmektedir. α -sinüklein veya lösinden zengin tekrarlayan kinaz-2 (LRRK-2) mutasyonlarını taşıyan pek çok otozomal dominant transgenik model tanımlanmıştır. Bu modellerin pek çoğunda inklüzyonlar eksprese edilse de güçlü bir nörodejenerasyon gözlenememiştir. Fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) indüklü putatif kinaz (PINK1), Parkin veya DJ-1'den yoksun otozomal resesif modeller de tanımlanmış fakat bu modeller de nigrostriatal patolojiyi sergileyememiştir. İlerleyici bir dopaminerjik nöron kaybı gerçekleşmediği için mevcut genetik modellerin hiçbiri tam olarak PH'yı yansıtmamaktadır.

2.7.4. Gelecekteki Yönlenmeler

Şimdiye kadar PH'nın tüm ayırıcı özelliklerini taklit eden bir model oluşturulamamıştır. Bunu gerçekleştirebilmek için son zamanlarda aynı hayvan üzerinde hem genetik mutasyon hem de nörotoksinler birlikte uygulanmıştır [88]. Gelecekte, yaşa bağımlı Parkinson fenotipini, α -sinüklein inklüzyon patolojisini ve PH patofizyolojisini sergileyen hayvan modellerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

2.8. Glutasyonun Parkinson Hastalığındaki Rolü ve Önemi

GSH, hücrel antioksidan savunmanın ana bileşenlerindedir. PH'da GSH azalışı ise en erken meydana gelen biyokimyasal değişikliklerden biridir [2]. Yakın zamana kadar genel kanı, GSH seviyesindeki bu düşüşün PH patogenezi katılan oksidatif stresin bir sonucu olduğuydu. Ancak ortaya çıkan yeni kanıtlar, GSH azalışının Parkinson patogenezi bizzat aktif rol oynayabileceği yönündedir [2].

2.8.1. Glutasyon Fonksiyonları ve Metabolizması

Glutasyon (γ -L-Glu-L-Cys-Gly), memeli hücrelerinde en fazla (0,5-10 mmol/L) bulunan, hücre içi protein olmayan tiyol bileşimidir [89-90]. GSH'nın beyin hücrelerindeki dağılımı eşit değildir. Astroitler, nöronlara oranla daha fazla GSH içermektedir [91]. Hücrel GSH'nın büyük bir çoğunluğu (%85-90) sitozolde, geri kalanı ise mitokondri, nükleer matriks ve peroksizomlarda bulunmaktadır [92]. İmmünohistokimyasal veriler ise nöron içinde GSH'nın çoğunlukla sinir sonlanmalarında bulunduğunu göstermektedir. Hücre dışı GSH konsantrasyonu ise oransal olarak daha düşüktür (plazmada 2-20 μ mol/L) [93-94]. GSH hücreyi ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS)'ni de kapsayan endojen ve ekzojen toksinlere karşı korur. Serbest radikaller GSH'nın enzimatik olmayan redüksiyonu ile uzaklaştırılırken, hidroperoksitlerin uzaklaştırılması için glutasyon peroksidaz (GPx)'in enzimatik reaksiyonu gerekmektedir (Şekil 2.5) [89-91, 93]. Her iki reaksiyon da glutasyon disülfid (GSSG, okside glutasyon) oluşumu ile sonuçlanır. GSSG ise pentoz fosfat şantından elde edilen Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ı kullanan Glutasyon redüktaz (GR) enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a indirgenir [89]. GSH ayrıca, protein sülfenik asitlerin indirgenmesi, protein mixed disülfidlerin oluşumu ve takip eden indirgenmeleri gibi pek çok reaksiyon ile proteinlerin sülfidril gruplarını modifiye eder. Glutasyon-S-transferaz (GST) enzimi GSH ve elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu sağlar. Bu konjugatların hücre dışına çıkarılması toksinlere karşı koruma sağlamaktadır [89-91, 93].

Bir hücrenin redoks düzeyi değiştiği zaman, fazla GSH kullanımı ortaya çıkmaktadır. GSSG'nin GSH'a geri indirgenmesine rağmen, GSH konjugat oluşumu ve hücre dışına atılımı nedeniyle GSH azalışı meydana gelmektedir. Bu azalış *de novo* GSH sentezi ile hafifletilmektedir [89, 93]. Nöronlarda ve glia hücrelerinde GSH sentezi, diğer hücrelerde olduğu gibi ATP bağımlı iki basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.5) [89-91, 93]. Bu basamakların ilki glutamat ve sisteinden γ -glutamilsistein oluşumudur. Hız kısıtlayıcı olan bu basamakta sistein miktarı kritik faktör [90, 93] olmasına rağmen reaksiyon GSH düzeyinden de etkilenmektedir. Zira bu reaksiyonu gerçekleştiren L-glutamat:L-sistein γ -ligaz (GCL) enzimi negatif geri bildirim yoluyla GSH tarafından inhibe edilmektedir. İkinci basamakta GSH'ı oluşturmak

2.8.3. Parkinson Hastalığında Glutatyon Sentezi ve Mekanizmasında Meydana Gelen Değişiklikler

PH'da meydana gelen GSH azalışı, GSH'nin normal redoks koşulları altında sentezinde ya da geri kazanımındaki bir azalmanın sonucu olabilir. Bu ihtimali test etmek için GSH sentez ve metabolizmasına katılan enzim ve substratların değerlendirilmesi gereklidir.

Söz konusu GSH azalışından, GSH sentezindeki hız kısıtlayıcı enzim olan GCL'nin aktivite azalışının sorumlu olabileceği öngörülmüştür. Tüm beyinde GCL aktivite seviyelerinin yaşlanma sürecinin bir sonucu olarak azaldığı bilinmektedir [100]. Bu azalış GCL enziminin substratlarına afinitesini modüle eden hafif alt ünitesinin [93] seviyesindeki azalışa atfedilmektedir [100]. GCL inhibitörü L-bütionin (S,R)-sülfoksimin (BSO) uygulaması ile GSH düzeyinin azaldığı bilinmektedir [101]. BSO uygulaması ile mitokondrilerin hasara uğradığı [102], nigrostriatal nöronlarda lipid peroksidasyonun arttığı ve distrofik uzantıların oluştuğu gösterilmiştir [103]. BSO uygulamasının mezensefalik dopaminerjik kültürlerde de GSH azalışına neden olduğu ve bu azalışın hücre ölümü ile sonuçlandığı gösterilmiştir [104-105]. Bununla birlikte, mezensefalik dopaminerjik nöronlar 6 ve 12 saat süreyle deneysel Parkinson oluşturuvcu nörotoksin MPP⁺'ye maruz bırakılınca GCL aktiviteleri düşmüş, fakat bu düşüş uygulamadan 24 saat sonra ortadan kalkmıştır [106]. Ayrıca Parkinsonlu hastaların beyinlerinde yapılan post-mortem bir çalışmada GCL aktivitesinde bir değişiklik tespit edilememiştir [107]. Düşük GCL aktivitesinin Parkinsonda meydana gelen GSH azalışının temelini oluşturması muhtemel görünmese de, hastalığın insidansının yaşlanmayla neden arttığını açıklamaya yardımcı olabilir [108].

GSH sentezi için gerekli olan sisteinin sağlanmasında meydana gelen bir değişikliğin GSH azalışına neden olabileceği öne sürülmüştür [90]. Dolaşımdaki sistein seviyesi yaşlanmayla birlikte azalmakta [109], PH insidansı ise yaşlanmayla birlikte artmaktadır [108]. Ayrıca MPTP uygulaması, sisteinin nöronlara alınmasını sağlayan uyarıcı amino asit taşıyıcı 1 (EAAC1)'in dopaminerjik nöronların hücre membranına translokasyonuna neden olmuştur. Bu sonuç dopaminerjik nöronların GSH homeostazisini devam ettirme girişiminde bulunduğunu göstermektedir [110]. Bununla birlikte MPTP uygulaması EAAC1'in nitrasyonunu da arttırmış, bu artış EAAC1'in inaktivasyonu ve dolayısıyla sistein alınımının azalışından sorumlu tutulmuştur [110].

GSH azalışı, GSSG ve GSH konjugatlarının fazla miktarda hücre dışına atılmasından da kaynaklanıyor olabilir [111]. Ancak, GST aktivitesi değişmediği için en azından enzimatik konjugasyonun artmadığı söylenebilir [107]. Ayrıca MPP⁺ uygulanan mezensefalik hücrelerde GSH düzeyi %30 oranında azaldığı halde GSH konjugat atılımında bir artış olmamıştır [106].

GSH'nin GSSG'ye enzimatik olmayan yolla oksidasyonunun artması olasıdır ve bunun için en muhtemel substrat ROS ve RNS'lerdir. *De novo* senteze ek olarak GSSG'nin GSH'a geri indirgenmesi GSH'ın hücresel düzeyinin devam ettirilebilmesi için önemlidir. Bu indirgenmeden sorumlu olan GR enzim seviyelerinin Parkinson hastalarında arttığı bildirilmiştir [89]. Bu çalışma, GSSG

seviyelerinin artmış olabileceğini ya da nigral hücrelerin GSH seviyesini sürdürebilmek için girişimde bulunduğunu göstermektedir. Bu bulgular aynı zamanda, MPP⁺ uygulanan mezensefalik dopaminerjik nöronlardaki GR enzim aktivite artışı [106] ile de uyum göstermektedir. Bununla birlikte GR enzimi, aktivite artışı göstermeden önce geçici süreyle düşmüştür [106]. GR aktivitesindeki bu düşüş oksidatif strese yol açan GSSG:2GSH oran değişimine neden olabilir. Bu oksidatif stres, GSH sentezi ve metabolizmasını sağlayan enzimlerin seviyeleri normale dönene kadar devam edecek olan nörodejenerasyonun başlaması için yeterli olabilir.

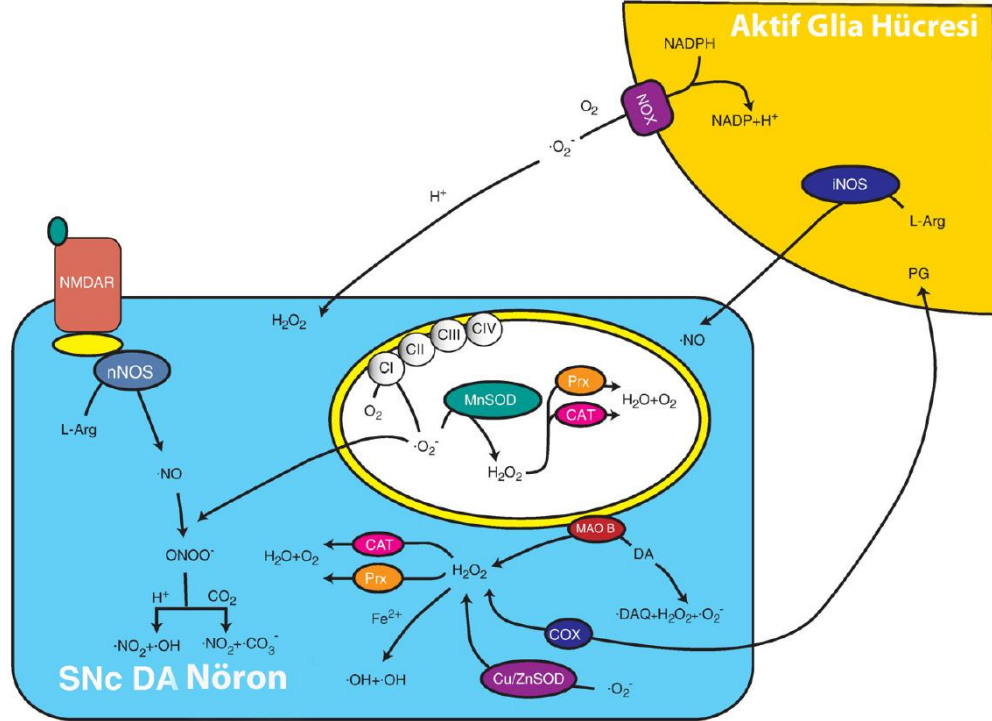
2.8.4. Parkinson Hastalığında Oksidatif ve Nitrozatif Stres Kaynakları

Parkinsonlu hastaların post-mortem beyin dokularında yapılan pek çok çalışma oksidatif ve nitrozatif stresin dopaminerjik nöron dejenerasyonuna katıldığını göstermektedir [112]. Bu hastaların beyinlerinde katalaz (CAT), SOD ve GPx gibi başlıca antioksidan enzimlerin ve GSH'ın azaldığı bildirilmiştir [107, 113-114]. Daha sonra lipid, protein ve DNA'nın oksidatif hasara uğradığı tespit edilmiş, bu da oksidatif stresin PH'da fonksiyonel önem taşıdığını doğrulamıştır [97-98, 115]. Ancak, PH'da oksidatif stres yalnızca beyinle sınırlı değildir. Oksidatif hasar belirteçlerinin periferde de tespit edilmesi daha genellenmiş bir hastalık sürecini göstermektedir [116].

Mitokondri, nitrik oksit sentaz (NOS), araşidonik asit metabolizması, ksantin oksidaz, MAO ve P450 enzimleri beyindeki ROS kaynaklarıdır. Beyin total vücut ağırlığının %2'sini oluştursa da dinlenme durumunda total vücut oksijeninin %20'sini kullanır. Nöronlar, enerji üretimi için öncelikli olarak oksidatif fosforilasyona tabi oldukları için genel olarak diğer hücrelere oranla oksijen metabolizmasının toksik ürünlerine daha fazla maruz kalırlar. Diğer dokulara göre daha az antioksidan ve serbest radikal yok edici ajana sahip olan beyin oksidatif strese karşı hassastır. Dopaminerjik nöronlar ise ek bir oksidatif strese maruz kalmaktadır [117].

Dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron taşıyan moleküller olarak tanımlanan ROS'un oluşumu oksijene bağımlı (aerobik) solunumun kaçınılmaz bir sonucudur. Ökaryotlarda enerji mitokondrielerde Krebs siklusu ve ETZ aracılığıyla ATP formunda üretilir. Krebs siklusunun son ürünlerinden NADH ve FADH₂, ETZ üzerindeki bir seri elektron taşıyıcısına elektronları verir. Bu da iç mitokondri membranı boyunca bir proton gradiyenti oluşturur. Bu gradient ise ATP sentaz enzimi aracılığıyla Adenozin difosfat (ADP)'in ATP'ye oksidatif fosforilasyonunda kullanılır. NADH ve FADH₂ tarafından verilen elektronlar bir seri elektron taşıyıcısını geçtikten sonra oksijen moleküllerini H₂O'ya indirger [118]. ETZ zinciri, kompleks I (NADH dehidrogenaz, kompleks II (süksinat dehidrogenaz), koenzim Q, kompleks III (sitokrom *bc1* kompleks), sit-c ve kompleks IV (sitokrom c oksidaz)'ten oluşmaktadır. Bu komponentler moleküler oksijen (O₂)'i H₂O₂'ye indirger [118]. ETZ zincirinden elektron kaçağı olduğu zaman O₂'nin süperoksite kısmi redüksiyonu gerçekleşir. Elektron kaçağı başlıca kompleks I'de olmak üzere kompleks III ve kompleks IV'de meydana gelmektedir [119-123]. Çeşitli hücresel komponentleri oksidatif hasardan korumak için SOD enzimi süperoksiti H₂O₂'ye metabolize edebilir, CAT enzimi ise H₂O₂'yi su (H₂O) ve O₂'ye dönüştürebilir (Şekil 2.6). Bu reaksiyonlar hücre yaşayabilirliği için çok önemlidir, çünkü süperoksit ve H₂O₂ hücre için son derece toksik olan ek ROS'ları oluşturmak üzere diğer

moleküller ile reaksiyona girebilir. Örneğin eğer H_2O_2 , CAT enzimi aracılığıyla metabolize edilmezse Fenton reaksiyonu aracılığıyla hidroksil radikali ya da hidroksil anyonuna dönüşebilir (Şekil 2.6) [124-125].



Şekil 2.6. Parkinson Hastalığında Oksidatif ve Nitrozatif Stres Kaynakları [126]

Dopaminerjik nöronların oksidatif strese karşı özellikle hassas olmalarının sebeplerinden biri ROS ve H_2O_2 üretimine neden olan DA metabolizmasıdır [117]. DA'nın enzimatik olmayan oto-oksidasyonu reaktif kuinonları oluştururken, MAO ve katekol-O-metil-transferaz (COMT) tarafından enzimatik metabolizması ise H_2O_2 'yi oluşturur [117]. DA'nın Siklooksijenaz-2 (COX-2) tarafından metabolize edilmesi ise reaktif kuinonları ve semikuinonları oluşturmaktadır [127-128]. MPTP fare modelinde COX-2'nin genetik veya farmakolojik olarak ablasyonunun nöroprotektif etki gösterdiği tespit edilmiştir [129]. Kuinonlar ve semikuinonlar, protein sulfidril grupları ve GSH ile etkileşime girerek GSH düzeyinin düşmesine neden olmaktadır [117]. H_2O_2 'nin detoksifikasyonu GPx enzimini gerektirmektedir, ancak Parkinsonlu hastalarda bu enzim aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir [130]. GPx enzimi ko-substrat olarak GSH'yı kullandığı için aktivite azalışına düşük GSH'ın neden olduğu öne sürülmüştür. H_2O_2 geçiş metalleri varlığında, lipid, protein ve DNA'ya hasar verdiği bilinen, oldukça zararlı olan hidroksil radikale dönüşebilmektedir. 6-OHDA uygulanan sıçanlarda Fe, çinko, manganaz ve bakır gibi geçiş metallerinin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir [131]. Yaklaşık olarak 2,5 kat olmak üzere en fazla artış toplam Fe'de gözlenmiş, ayrıca benzer oranda toplam Fe artışı Parkinsonlu hastalarda da tespit edilmiştir [132]. Bununla birlikte bu artışın spesifik olmadığı, hemen hemen tüm nörodejeneratif hastalıklarda tespit edildiği bildirilmiştir [133]. DA metabolizması, detoksifikasyonu için GSH'a ihtiyaç duyulan pek çok radikal türünü üretmektedir. Sonuç olarak dopaminerjik nöronlarda GSH'a bazal gereklilik yüksek olduğu için GSH veya ROS/RNS'deki küçük değişikliklerin

büyük etkileri olabilmektedir. Bununla birlikte ventral tegmental alan (VTA) gibi beyin sapındaki pek çok diğer alanda bulunan dopaminerjik nöronlar PH'da etkilenmemektedir. Bu da nigral dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna DA metabolizmasıyla ilişkili olmayan başka faktörlerin katılabildiğini göstermektedir.

İnflamasyon sırasında defans mekanizması olarak da ROS üretilmektedir [124]. Örneğin NADPH oksidaz 2 (NOX2) ve fagositlerdeki diğer fagozomal enzimler, hücreyi istila eden patojenleri öldürmek için inflamasyon sürecinde süperoksit ve hipokloröz asit gibi ROS'ları oluştururlar [124]. Fagositler tarafından ROS oluşumu önemli bir defans mekanizması olsa da kronik inflamatuvar cevap sırasında oluşan fazla miktardaki ROS üretimi çeşitli patolojik durumlara katılıyor olabilir [124].

Oksidatif strese katkıda bulunan diğer bir unsur ise nitrik oksit (NO) metabolizmasıdır. NO, uzun zaman önce vazodilatasyon ve nörotransmisyonunda görevli bir sinyal molekülü olarak tanımlanmıştır. Sinyal transdüksiyonu sırasında NO, çözünebilir guanilaz siklaz (sGC)'ı aktive ederek vazodilatasyonu indükleyen ikincil haberci siklik GMP (cGMP)'nin oluşumuna neden olur [134-135]. NO, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) olmak üzere nitrik oksit sentaz enziminin üç izoformu tarafından üretilmektedir [136]. NO, önemli bir sinyal molekülü olmasına rağmen oldukça toksik olan RNS'leri oluşturmak üzere ROS'lar ile reaksiyona girebilir. Örneğin NO, süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturabilir. Peroksinitrit ise nitrojen dioksit, karbonat ve hidroksil radikali gibi daha toksik moleküllere dönüşebilir [137-138] (Şekil 2.6).

Mikroglialarda bulunan NOX ve NOS enzimlerinin genetik veya farmakolojik ablasyonunun MPTP toksisitesine karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir [139-143]. Bu da, GSH azalışı ve Parkinson patogenezi için mikrogliaların önemli bir ROS/RNS kaynağı olabileceğini göstermektedir. Mikroglia ve PH patogenezi arasındaki ilişki Parkinsonlu hastalarda ve MPTP uygulaması sonrası farelerde görülen glial aktivasyon reaksiyonu ile desteklenmiştir. Bu glial reaksiyonun maksimal dopaminerjik nöron ölümü gözlenmeden önce pik yapması yalnızca bir cevap olmadığını göstermektedir [141]. Mikroglia aktivasyonunun inhibisyonu MPTP nörotoksitesini azaltmıştır [144]. Ayrıca tüm beyinde en fazla mikroglia içeren bölgenin SN olduğu tespit edilmiştir [145]. GSH azalışı ile ROS/RNS oluşumunun oldukça yakından ilişkili olduğu bilinmektedir, ancak hangisinin daha önce meydana geldiğini belirlemek zordur.

2.8.5. Glutasyon Azalışı ve Mitokondriyal Kompleks I İnhibisyonu

Mitokondriyal kompleks I, ETZ'nin ilk ve en komplike elemanıdır. Kompleks I, NADH'ı oksitler ve elektronları ubikinona transfer eder. Parkinson hastaları aynı yaştaki kontrolleri ile kıyaslandığında nigral kompleks I fonksiyonlarında bir bozukluk gözlenmiştir [122]. Takip eden çalışmalarda ise iskelet kası, trombosit ve lenfoblastlarda da mitokondriyal defekt rapor edilmiştir [146]. PH'da kompleks I defektinin rolü, kompleks I'i inhibe ettiği bilinen MPP⁺, 6-OHDA ve rotenonun dopaminerjik nöron ölümünü indüklemesi ile desteklenmiştir [147-148].

PH'da GSH azalışının mı yoksa kompleks I inhibisyonunun mu daha önce meydana geldiği bir tartışma konusudur. Uzun süreli orta derecede kompleks I inhibisyonunun ROS üretiminde artışa ve GSH seviyelerinde azalışa neden olduğu öne sürülmüştür [149]. Bununla birlikte pek çok çalışmada GSH azalışının kompleks I fonksiyonlarını bozabildiği gösterilmiş dolayısıyla GSH'nin kompleks I inhibisyonundan önce azaldığı öne sürülmüştür. Hsu ve arkadaşları dopaminerjik PC12 hücrelerinde GSH düzeyinin %50 oranında düşürülmesinin kompleks I aktivitesinde %50 azalışa neden olduğunu göstermişlerdir [150]. Bu etki, GCL inhibitörü BSO uygulanan N27 hücrelerinde pekiştirilmiştir [151]. Bu çalışmalarda kompleks I inhibisyonunun RNS bağımlı olduğu öne sürülmüştür [151]. Bu hipotez ile uyumlu olarak uzun süreli NO maruziyetinin sürekli bir kompleks I inhibisyonuna neden olduğu, ve bu durumun GSH yokluğu ile hızlandığı gösterilmiştir [152]. Bu inhibisyonun GSH gibi indirgeyici ajanların eklenmesi ile geri dönmesi, nitrozotiyol grubunun oluşmuş olduğuna işaret etmektedir [152]. Ayrıca, nitrozatif stresin mitokondriyal proteinlerde nitrozotiyol grup oluşumunu arttırdığı kanıtlanmıştır [153]. Bu nitrozotiyollerin normalde GSH tarafından uzaklaştırılabileceği önerilmiştir. Ayrıca GSH azaltılmış hücrelerde nitrotirozin immünreaktivitesinin arttığı gösterilmiştir [154]. Bu çalışmalar GSH'nin normalde kompleks I'ni nitrozatif stresten koruduğu, dolayısıyla PH'da meydana gelen GSH azalışının kompleks I inhibisyonuna neden olabileceğine işaret etmektedir.

GSH azalışının kompleks I aktivitesi üzerine negatif etkisine ilişkin diğer bir mekanizma PH'da görülen γ -GT aktivite artışıdır [107, 155]. γ -GT aktivite artışının, DA ile reaksiyona girerek 5-sisteinil DA kuinonlarını oluşturabilen sisteinin nöron içi düzeyinin artmasına neden olacağı, oluşan kuinonların kompleks I'ni inhibe edeceği öne sürülmüştür [156]. Ancak, γ -GT enziminin inhibisyonu GSH azalışıyla indüklenen kompleks I aktivite azalışını şiddetlendirmiştir [151]. Bu sonuçlar γ -GT enzim aktivitesinde görülen artışın, kompleks I aktivite azalışına neden olacak GSH azalışını hafifletmek için kompensatuar bir cevap olduğunu göstermektedir.

Seaton ve arkadaşları GCL inhibitörü BSO uygulanan ratların serebral kortekslerinde kompleks I aktivitesinin değişmediğini göstermişlerdir [157]. Ayrıca dopaminerjik nöronların tersine glial kültürlerde GSH azalışı kompleks I aktivite artışına neden olmaktadır [158]. Dolayısıyla GSH azalışının kompleks I'ni inhibe etme yeteneği dopaminerjik nöronlara spesifiktir ve bu özellik belki de PH'da bu nöronların hassas olmalarının nedenlerinden biri olabilir. Eğer kompleks I inhibisyonu GSH azalışından sonra meydana geliyorsa akla gelen soru GSH azalış mekanizmasının nasıl olduğudur. GSH azalışı ve oksidatif stres karışık bir şekilde birbirleriyle bağlı olduğu için kompleks I aktivitesine etki eden GSH azalışı pek çok mekanizma sonucu meydana geliyor olabilir. Kompleks I aktivitesinin inhibisyonunun, GSH azalışını şiddetlendiren ROS üretiminin artması ve ETZ ile ATP üretiminde azalma gibi pek çok etkisi vardır. Tüm bu etkiler PH ile sonuçlanan diğer süreçlere etki etmektedir.

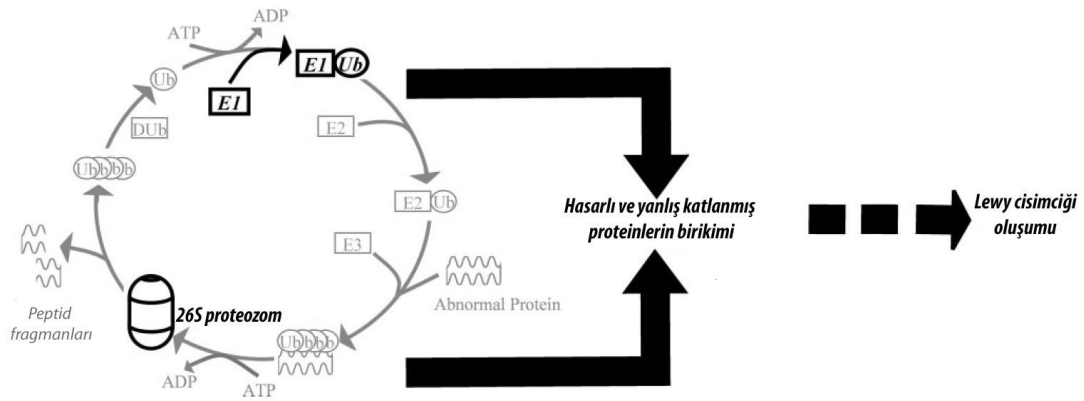
2.8.6. Glutatyon Azalışı ve Ubikuitin-Proteozom Sistemi (UPS) Fonksiyon Bozukluğu

UPS, hatalı katlanmış ve hasarlanmış proteinleri parçalanmaları için, ubiquitin monomerleri ekleyerek 26S proteozoma yönlendirir (Şekil 2.7).

Ubikuitinasyon ATP bağımlı bir süreçtir. GSH azalışı, UPS sistemini direkt olarak ya da sonuçta ATP azalışına neden olan kompleks I inhibisyonu ile dolaylı yoldan etkileyebilir [159].

GSH azalışının UPS'ye direkt etkisi, hem E1 ubikuitin ligaz hem de proteozom üzerinden olmaktadır. E1 ubikuitin ligaz, ubikuitini hedefine bağlayan bir sülfidril gruba sahiptir ve bu grup ayrıca GSH ile eşleniktir [160]. GSH seviyeleri %50'nin altına indiği zaman E1 ubikuitine bağlanamamaktadır. Jha ve arkadaşları GSH'ın düşürüldüğü PC12 hücrelerinde proteinlerin ubikuitinasyonunun azaldığını göstermişlerdir [161]. GSH'ın normal seviyelere restorasyonu ubikuitinasyonu da restore etmektedir. GSH'ın fonksiyonlarından biri tiyol gruplarını indirgenmiş (fonksiyonel) formda tutmak olduğu için ubikuitinasyon azalışının geri dönüşebilir olması tiyol oksidasyonuna bağlı olduğu anlamına gelmektedir.

GSH azalışı direkt olarak 26S proteozom üzerine de etki etmektedir. MPP⁺ uygulanmış kültür hücrelerinde proteozom inhibisyonunun, GSH seviyeleri %50'nin altına inmeden gözlenmediği bildirilmiştir [162].



Şekil 2.7. Glutasyon Azalışı ve Ubikuitin-Proteozom Sistemi Fonksiyon Bozukluğu [2]

2.8.7. Glutasyon Azalışı ve İnflamasyon

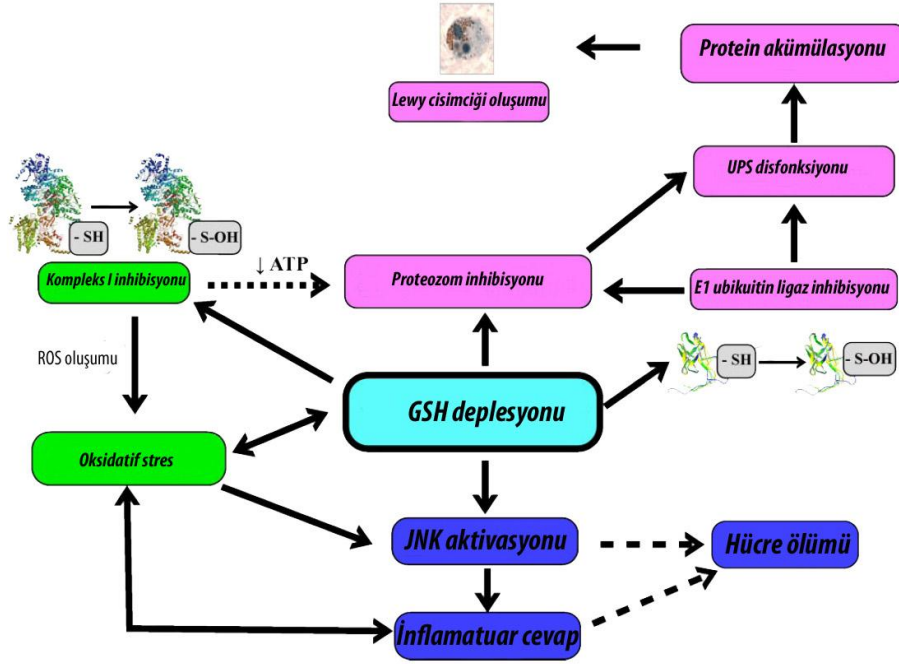
PH'da görülen inflamasyon sürecine GSH azalışının etkileri çok iyi bilinmese de elde edilen kanıtlar GSH ile sitokin regülasyonunun oldukça bağlantılı olduğunu göstermektedir. Hücrel redoks düzeyi, interlökin-1 (IL-1), IL-6 ve Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) transkripsiyonu ve bu sitokinler tarafından tetiklenen sinyal yollarının regülasyonu üzerine önemli bir role sahiptir. Bu sitokinler PH patogenezinde rol almaktadır. Nitekim Parkinson hastalarının beyin omurilik sıvısı, periferik kan ve beyinlerinde bu pro-inflamatuar sitokinlerin arttığı gösterilmiştir [163-166].

Çalışmalardan elde edilen kanıtlar GSH azalışının immün cevapları baskılayabileceği yönündedir [167-170]. GSH azalışı, inflamasyonda pek çok rolü olan JNK yolağını etkileyerek PH'da gözlenen inflamasyon süreçlerini değiştirebilir. Normalde glutaredoksin (Grx) ile birleşik olan apoptoz sinyal regüle edici kinaz1 (ASK1), JNK yolağını aktive edebilmektedir. GSH düzeyi düştüğü

zaman Grx'in ASK1'den ayrıldığı ve JNK yolağının aktive olduğu tespit edilmiştir [90, 171]. JNK'nın aktivasyonu DA'yı oksitleyerek reaktif kuinonları oluşturan COX-2'yi indüklemektedir [172]. COX-2, başta prostaglandin E2 (PGE2) olmak üzere protaglandinlerin ana kaynağıdır. 15-deoksi- Δ -12,14-prostaglandin-J2, GSH'ya bağımlı bir biçimde COX-2'yi up-regüle edebilmektedir [173]. Sonuç olarak GSH'ın azaldığı durumlarda COX-2 aktivasyonu artıyor gibi görünmektedir. Bu durumun PH patogenezinin katılıp katılmadığı bilinmese de COX-2'yi inhibe eden steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların uzun süre kullanımının PH gelişim riskini azalttığı bilinmektedir [173].

2.8.8. Tedavi Stratejileri

Düşük GSH seviyelerinin, PH'da etkilendiği bilinen pek çok hücrel süreçle bağlantılı olduğu açıktır (Şekil 2.8). GSH azalışının erken dönemde meydana gelmesi, bu azalışın dopaminerjik nörodejenerasyonda kritik faktör olabileceğine ve GSH'ın yerine koyulmasının tedavi için bir seçenek olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte GSH'ın yerine koyulmasının, Parkinson tanısı tespit edildiğinde görülen dejenerasyon üzerine tedavi edici etkisinin olup olmadığı belirlenmelidir. Yalnızca 9 Parkinson hastasını içeren klinik bir çalışmada, intravenöz uygulanan GSH'ın hastaların klinik yetersizliklerini %40 oranında azalttığı gösterilmiştir [174]. Ancak bu etkinin biyokimyasal mekanizması açık değildir. GSH'ı yerine koymanın terapötik yararları olabilir, ancak dopaminerjik nöronlara dağılımı oldukça zordur. Nitekim nöronlar GSH taşıyıcısına sahip olmadıkları için GSH'ın kendisinin nöronlara penetre olamayacağı görüşü hakimdir [90]. Bu nedenle GSH yerine GSH türevleri, analogları ya da öncüllerinin uygulanması daha iyi bir tedavi yolu olabilir. GSH'ın etil ester türevleri hücrel GSH düzeyini arttırabilmektedir ancak santral verilme zorunluluğu söz konusudur. Nitekim subkutan yolla ratlara GSH etil ester uygulanmış, fakat beyin GSH seviyelerinde bir artış gözlenememiştir [7]. En yaygın GSH öncülü olan N-asetilsistein (NAC), kan beyin bariyerini önemli düzeyde geçememektedir [175]. Buna rağmen, rat ve gerbillere intraperitonel yolla uygulanan NAC'ın, beyin protein ve lipidlerini oksidatif hasara karşı koruduğu [176-177] gösterilmiştir. Bununla birlikte NAC'ın beyne penetre olabilen versiyonu NAC amid (AD4) geliştirilmiş [178] ve bu versiyonun PC12 hücrelerini rotenon indüklü toksisiteye karşı koruduğu gösterilmiştir. Daha sonra bu koruyucu etki in-vivo deneylerle desteklenmiştir [179]. Mezensefalik kültürlerine uygulanan γ -glutamilsistein ve sisteinilglisin, GSH azalışını hafifletmiş, MPP⁺ ve oksidatif strese karşı nöroprotektif etki göstermiştir [90]. GSH'ın diğer bir dipeptid öncülü γ -glutamilsistein etil ester farelere intraperitonel yolla uygulanmış, yağda çözünebilir olduğu için kan beyin bariyerinden geçebilmiş ve MPTP indüklü dopaminerjik nöron kaybına karşı bir derece koruma sağlamıştır [151].



Şekil 2.8. GSH Azalışı ve Hücresel Etkileri. [2]

2.9. YM737

YM737, GSH'ın glisin karbonil grubunun esterlendiği bir GSH monoesteridir [14]. Uhlig ve Wendel, intraperitoneal yolla farelere uygulanan GSH izopropil esterinin beyin de dahil olmak üzere pek çok organda GSH düzeylerini arttırdığını göstermiştir [180]. GSH esterler, GSH'a oranla hücelere daha etkili bir şekilde taşınabilmektedir [11, 181-182]. YM737'nin insan deri fibroblastlarına GSH'dan daha etkin bir şekilde girdiği tespit edilmiştir [183]. Ayrıca, hücelere taşınmış olan GSH monoesterler, hücre içi hidroliz yoluyla GSH'a dönüşebilmektedir [11]. Bu bilgilere dayanarak, YM737 uygulamasının GSH'dan daha güçlü farmakolojik etkiler sağlayabileceği önerilmiştir [183-184].

Beyin iskemisi, GSSG'de bir artış olmaksızın GSH düzeyinin düşmesi ile karakterizedir. GSH azalışının, hippocampusta serbest radikallerin neden olduğu elektrofizyolojik cevapların düzelmesini engellediği rapor edilmiştir [185]. Ayrıca GSH'ın, kültür hücrelerinde glutamat indüklü sitotoksositeye karşı belirgin koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [186]. 2-deoksiglukoz alınımı sinir terminallerinin aktivitesini yansıtmaktadır [187]. GSH ağırlıklı olarak sinir terminallerinde ve dendritik çıkıntılarda bulunduğu için sinaptik mekanizmaları etkilemektedir. Bu bilgilere dayanarak hipoksi/hipogliseminin neden olduğu presinaptik potansiyellerinde ve 2-deoksiglukoz alınımındaki azalışlar üzerine GSH ve YM737'nin etkinliği araştırılmış, YM737'nin daha koruyucu etki sergilediği tespit edilmiştir [14]. YM737'nin hippocampal kesitlerdeki bu fonksiyon düzeltici etkisinin lipid peroksidaz cevabını azaltarak yaptığı önerilmiştir [14]. Ayrıca, YM737'nin GSH'a göre daha güçlü bir radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir

[11]. Bilateral karotid arter oklüzyonu yapılan sıçanlarda düşük GSH seviyelerinin YM737 uygulaması ile tamamen restore edilmesi, GSH uygulamasının ise etki etmemesi [188] YM737'nin hücrelere daha iyi taşındığını göstermektedir. Bunlara ek olarak, orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan beyin iskemide YM737 uygulaması hem ödem gelişimini hem de GSH azalışını hafifletmiştir [189]. Yamamoto ve arkadaşları YM737'nin sıçanlarda serebral iskemiyeye karşı koruyucu etkiler sergilediğini, mortaliteyi azalttığını, malondialdehit (MDA) düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir [15]. Maeno tarafından yapılan çalışmaya göre YM737 ve GSH, hipoksantin-ksantin oksidaz sisteminde benzer radikal süpürücü aktivite sergilemişlerdir [183]. Bu nedenle YM737'nin GSH'a göre daha güçlü anti-oksidan etki göstermesi, hücrelere daha kolay girebilmesine ve GSH azalışını hafifletebilmesine bağlanmıştır [15]. Aynı araştırmacıların yaptığı bir başka çalışmada YM737 uygulamasının, serebral hematoma oluşturulan sıçanlarda meydana gelen nörolojik bozuklukları azalttığı, MDA artışını hafiflettiği gösterilmiştir [184].

Sol inen arterin bağlanmasıyla kalbin sol ventrikülünde meydana gelen iskemik alanlarda GSH düzeyinin azaldığı gösterilmiştir [190]. Buna dayanarak, izole kalp çalışmasında, kardiyoplejik solüsyona serbest radikal süpürücü olarak YM737 eklenmiş, özellikle izovolumetrik sol ventrikül fonksiyonu ve ventrikül kompliansı açısından korunma sağladığı gözlenmiştir [191].

Yaşlı insanlarda gözlenen katarakt hastalığının lenste meydana gelen GSH azalışı ile ilişkili olduğu bilinmektedir [192]. Ancak dokuya etkili bir şekilde nüfuz edemediği için GSH uygulaması başarılı bir tedavi sağlayamamıştır. Ratlara intraperitoneal yolla 500 mg/kg dozda YM737 uygulandıktan 15 dakika sonra plazma ve aköz humörde GSH-ester tespit edilmiştir. Enjeksiyondan 4 saat sonra ise sıçanların lenslerinde GSH düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu GSH-esterin aköz humörden lense taşındığını ve burada GSH'a çevrildiğini göstermektedir. Aynı çalışmada YM737 uygulamasının, X-ray indüklü lens opaklaşmasını geciktirdiği, 27 hafta boyunca lensteki GSH düzeylerini normal seviyede tuttuğu gösterilmiştir [193]. GSH-etil ester uygulamasının insan kültür hücrelerini X-ray ışınına karşı koruduğu gösterilmiştir [182]. GSH-izopropil ester uygulanan farelerin kadmiyum indüklü böbrek hasarına [194], parasetamol ve allil alkol indüklü karaciğer hasarına [180] karşı koruyuculuk sağladığı da tespit edilmiştir. Bu bulgular GSH izopropil esterinin terapötik ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Bir GSH analogu olan YM737'nin avantajı intraperitoneal olarak uygulanabilmesi, dolayısıyla non-invaziv bir tedavi umudu vermesidir. Periferik YM737 uygulamasının deneysel Parkinson modelinde nigral GSH düzeyini artırma yeteneği daha önce çalışılmamıştır.

2.10. Hücre Ölüm Yolakları

Nörolojik hastalıkların pek çoğu istenmeyen nöron ölümü ile karakterizedir. Bu hastalıkların tedavisinde amaç hücre ölümünü durdurmaktır. Dolayısıyla hücre ölüm mekanizmalarının araştırılması hedefe ulaşmak için önemlidir.

2.10.1.Nekroz

Hücrenin stoplazmasının şişmesi, çekirdeğinin ayrışması, organellerde boşlukların oluşması ve nihayetinde parçalanma süreci “nekroz” olarak tanımlanmaktadır [195-196]. Nekroz tek bir hücrenin ya da bir hücre grubunun litik yıkımıdır. Metabolik inhibisyon, anoksi ve oksidatif stres nekrozu tetikleyebilmektedir. Hücre nekrozu, özellikle hücre hacim kontrolü olmak üzere hücre homeostazisinin hızlı ve şiddetli bir şekilde bozulması sonucu meydana gelebilir [197]. Nekroz sürecinde, Na-K ATPaz enzimi gibi membran ile ilişkili enzimlerin ve plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünün bozulduğu, ani akış nedeniyle sodyum (Na^+) ve kalsiyum (Ca^{2+}) gibi iyonların ve suyun arttığı, mitokondrilerin hasar gördüğü ve biyoenerjetik çöküşün meydana geldiği bildirilmiştir [198-201]. Nekroz sonrası meydana gelen hücresel artıklar dokuda inflamasyonu tetiklemektedir. Nekrozda membrana bağlı fragmanların oluşumu söz konusu değildir. Nekrozda çekirdeğin karyolizi, kromatinin pek çok şekilsiz küçük kümelere yoğunlaşması ile gerçekleşmektedir. Nekroza giden hücrelerde, proteazlar ve DNAaz'lar aktive olduğu için DNA değişik büyüklüklerde fragmanlara parçalanmaktadır. Bu stoplazmik ve nükleer değişiklikler nekroz için oldukça tanısaldır.

2.10.2. Programlanmış Hücre Ölümü

Clarke, 1990 yılında programlanmış hücre ölümü (PCD)'nü morfolojik olarak 4 ayrı kategoride sınıflandırmıştır [202]. Tip I hücre ölümü, kaspazlar ile yürütülen, hücre ölüm reseptörleri ya da mitokondri/sit-c sinyal kaskadları ile regüle edilen klasik apoptoza karşılık gelmektedir. Tip I hücre ölümü ayrıca, apoptotik faktörlerin (Bax, Bim ve Fas reseptörü) ve pek çok transkripsiyon faktörünün [203] gen regülasyonu ile karakterizedir. Tip II ya da otofajik hücre ölümü, mitokondri gibi organelleri yutan ve bunların degradasyonunu tetikleyen çift membranlı stoplazmik veziküllerin varlığı ile karakterizedir. Tip III (A ve B) hücre ölümü ise lizozomal olmayan veziküler degradasyon olarak tanımlanmaktadır.

2.10.2.1. Otofaji

Otofaji, ökaryotik hücrelerin kendi stoplazma ve organellerini indirgediği bir mekanizmadır [204]. Otofaji, hücreye az besin sağlandığı zaman proteinlerin geri dönüşümü için ölümcül olmayan homeostatik stres cevap mekanizması olarak ya da hücre ölüm mekanizması olarak fonksiyon görür. Otofaji bir PCD tipi olarak da tanımlanmaktadır. Organellerin ve proteinlerin degradasyonu lizozomal sistem tarafından gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla otofajinin belirteçlerinden biri lizozomal orijinli otofajik vakuollerin birikimidir. Otofaji hem gelişim sırasında hem de patolojik durumlarda görülmektedir. Tor kinaz, fosfotidilinositol 3 (PI3)-kinaz ve otofajinler olarak adlandırılan sistein proteaz ailesi otofajide fonksiyon üstlenmiştir [205-206].

2.10.2.2.Apoptoz

Apoptoz sistemli bir şekilde bir hücre ya da hücre grubunun parçalanmasıdır. Apoptoz, kaspaz olarak adlandırılan enzimlerin görev aldığı, ATP-bağımlı bir hücre intihar formu olan PCD örneğidir. Ancak, kaspazlara bağlı olmayan apoptotik ve apoptotik olmayan PCD formları da tanımlanmıştır [207]. Bu nedenle apoptoz ve PCD terimleri eş anlamlı olarak kullanılmamalıdır. Apoptoz spesifik moleküller içeren, intrensek transkripsiyon bağımlı [208] ya da transkripsiyon bağımsız [209]

2.10.4.1. Apoptozun Hücresel ve Moleküler Regülasyonu

Memelilerde apoptozla ilgili olarak, Bcl-2 ailesi [217-219], sistein içeren kaspaz ailesi ve aspartat spesifik proteazları [220] kapsayan pek çok gen tanımlanmıştır. Pek çoğu mitokondriyal protein olan ya da mitokondriyi etkileyen, apoptotik hücre ölümünün diğer regülatörleri, p53 gen ailesi, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri, sit-c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü (Smac), apoptozu inhibe edici protein (IAP) ve HtrA2/Omi'dir [97, 221-226].

Mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) gibi spesifik organellerin apoptoz süreci için kritik olduğu tespit edilmiştir. 1996'da mitokondrinin Bcl-2 ailesi proteinleri ile ölüm sinyallerini entegre ettiği ve sit-c'yi stoplazmaya saldırdığı keşfedilmiştir. Stoplazmada sit-c, bir stoplazmik protein olan apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf1) ile kompleks yapar ve DNA kırılması ile sonuçlanan kaspaz aktivasyonunu başlatır (Şekil 2.9) [97, 225]. Hücre içi Ca^{2+} seviyesini regüle eden ER, mitokondri ile birlikte, Bcl-2 protein ailesi üyelerinin etkisi aracılığıyla mitokondriyal permeabilite değişimini (mPT) ve sit-c salınımını düzenleyen döngüde yer alır (Şekil 2.9) [227].

2.10.4.2. Bcl-2 Ailesi: Hücre Yaşam ve Hücre Ölüm Proteinleri

Mitokondri, sit-c'nin mitokondriden stoplazmaya salınımını modüle ederek sağladığı apoptoz regülasyonunda Bcl-2 aile üyelerini kullanır (Şekil 2.9). Bu süreçten iki model sorumludur; Bax/Bak1 kanal modeli ve apoptoz ile uyarılmış mitokondriyal kanal (MAC) modeli (Şekil 2.9).

Bcl-2 proto-onkogen ailesi, yaklaşık 20 proteini kodlayan geniş bir apoptoz regüle edici gen grubudur. Bu proteinler, protein-protein etkileşiminde fonksiyon gören, amino asit sekanslarındaki 1-4 korunmuş Bcl homoloji domaini (BH1-BH4) ile tanımlanırlar [217-219]. Bazı proteinler (Bcl-2, Bcl-xL, ve Mcl-1, vb.) BH1-BH4 domainlerinin hepsine sahiptirler ve anti-apoptotik özellik taşımaktadırlar. Pro-apoptotik olan diğer proteinler ise BH1-BH3 sekanslarına (Bax, Bak1, vb.) veya sadece BH3 domainine (Bad, Bid, Bim, Bik, Noxa, Puma, vb.) sahiptirler. Bcl-2 aile üyeleri, diğer aile üyeleri ile homodimer, heterodimer ve multimer oluşturabilir. Bax/Bak1'in hem Bcl-2 hem de Bcl-xL ile heterodimerizasyonu pro-apoptotik aktivitesini ortadan kaldırmaktadır. Bax ve Bak1 düzeyi arttığı zaman, Bcl-2 ve Bcl-xL'nin anti-apoptotik etkisi antagonize edilmekte ve apoptoz artmaktadır.

Bu proteinlerin pek çoğunun ekspresyonu gelişmeye yönelik şekilde regüle edilmiştir ve dokulardaki dağılımları ve hücre içi lokalizasyonları farklıdır. Bu proteinlerin çoğu merkezi sinir sistemi (MSS)'nde bulunmaktadır. Bax, Bad ve Bcl-2 başlıca sitozolde, Bak1 ise ağırlıklı olarak mitokondride bulunmaktadır.

Mitokondriden sit-c salınımı, Bax veya Bak1 [228] ve Bax ve voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC) [229]'ndan oluşan membran kanal oluşumunu içeren mekanizmalarla meydana gelebilir (Şekil 2.9). Bax/Bak1 kanal modelinde (Şekil 2.9), hücre ölümünü tetikleyen spesifik bir uyarandan sonra, Bax konformasyonel bir değişime uğrar ve yer değiştirerek mitokondri dış membranına girer. Benzer bir pro-apoptotik protein olan Bak-1 mitokondri dış membranına

lokalize olur. Bax/Bak1 monomerleri sit-c'ye geçirgen olan oligomerik ya da heteromerik kanalları oluşturmak üzere fiziksel etkileşime girer. Bu kanalların oluşumu pek çok bölgede Bcl-2 ve Bcl-xL tarafından bloklanır. Yalnızca BH3 domaini içeren üyeler (Bad, Bid, Noxa, Puma) pro-apoptotiktirler ve Bax/Bak1 kanalın duyarlılığını arttırmak için konformasyonunu modüle edebilirler. MAC, Bax/Bak1'e benzer bir kanal olabilir, ancak VDAC gibi ek komponentleri olabilir.

Salınmış olan sit-c stoplazmik apoptozomların toplanmasını tetikler. Apoptozom, Apaf-1, sit-c ve prokaspaz-9'dan oluşur ve memeli hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonunu başlatan motordur (Şekil 2.9) [97]. Bcl-2 ve Bcl-xL, mitokondriden sit-c salınımını, dolayısıyla kaspaz-3 aktivasyonunu bloklamaktadır (Şekil 2.9) [230-231]. Bu engelleme, Bax'ın dış mitokondri membranında kanal oluşturma aktivitesinin inhibisyonuyla [228] veya mitokondri membran potansiyeli ve hacim homeostazsinin değiştirilmesiyle [232] gerçekleşmektedir. Yalnızca BH3 domainini taşıyan Bim, Bid, Puma ve Noxa proteinleri ise Bax'ın konformasyonel değişimini indüklüyor ya da Bax'ın dış mitokondriyal membranda delik oluşturabilmesi için Bcl-xL'ye tuzak olarak hizmet ediyor olabilir [233]. Bax ve Bak genlerinden yoksun hücrelerin apoptoz sırasında sit-c salınımına karşı dirençli olduğu gösterilmiştir [234].

Bazı anti-apoptotik proteinler mitokondriden sonraki basamaklarda da fonksiyon görürler. Örneğin Bcl-xL, Apaf1 ve kaspaz-9 ile etkileşerek kaspaz-9'un Apaf1 aracılı otokatalitik maturasyonunu engeller [235].

2.10.4.3.Kaspaz Ailesi: Hücre yıkım proteazları

Kaspazlar (sisteinil aspartat-spesifik proteinazlar), peptid zincirinin P1 pozisyonunda hemen hemen mutlak suretle aspartata gereksinim duyan sistein proteazlardır. Memelilerde 14 kaspaz geni tanımlanmıştır [236]. Kaspazlar sağlıklı hücrelerde inaktif pro-enzim (30–50 kDa) olarak eksprese edilir. Kaspaz zimojenleri hücrenin farklı lokasyonlarında farklı oranlarda bulunur. Zimojenler, bir amino-terminal pro-domaini, bir büyük alt ünite (~20 kDa) ve bir küçük alt ünite (~10 kDa) olmak üzere 3 domain içerir. Kaspazlar, "infazcı" kaspazların aktive ettiği "başlatıcı" kaspazların pro-enzimi kesmesi ile aktive olmaktadır (Şekil 2.9).

Başlatıcı kaspazların pro-domainleri, aktivitelerini düzenleyen diğer moleküller ile etkileşimini sağlayacak özel amino asit sekansına sahiptir. Domainler arasındaki proteolitik süreçten sonra büyük ve küçük alt ünite bir heterodimer oluşturur. İki heterodimerin etkileşimi ile meydana gelen tetramer birbirinden bağımsız fonksiyon gören 2 katalitik bölgeye sahip olur. Aktif kaspazların pek çok hedef proteini vardır. Kaspazlar, nükleer proteinleri, hücre iskelet proteinlerini ve sitozolik proteinleri parçalar.

Apaf1, 130kDa'luk bir stoplazmik proteindir ve prokaspaz-9 ve sit-c için kenetleme rolü oynar [97]. Sitozolik ATP, sit-c indüklü kaspaz aktivasyonu için kofaktördür [97]. Apaf1, ATP bağlanıp hidrolize olduğu zaman aktive olur, daha sonra sit-c'nin de bağlanmasıyla Apaf1 oligomerizasyonu gelişir. Bu oligomerik kompleks apoptozomu oluşturmak üzere prokaspaz-9'u toplar ve böylece kaspaz-9'un oto-katalitik aktivasyonunu sağlar. Aktive olan kaspaz-9 kompleksten ayrılır ve

kaspaz-3'ü aktive eder (Şekil 2.9). Kaspaz-3'ün DNAaz aktivitesi genomik DNA'nın fragmanlara ayrılması ile sonuçlanan bir süreci başlatır [211].

Apoptoz ile sonuçlanan 3 adet kaspaz ile ilişkili sinyal yolağı tanımlanmıştır [97, 211, 225, 237]. İntrensek mitokondri aracılı yolak, Bcl-2 ailesine ait proteinlerle kontrol edilmektedir. Mitokondriden sit-c salınması ile düzenlenen bu yolakta, Apaf1 aracılığıyla kaspaz-9 ve akabinde kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleşmektedir. Ektrensek ölüm reseptör yolağı, Fas ve TNF reseptörlerini kapsayan hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu reseptörler aktive olunca, ölümle indüklenen sinyal kompleksi (DISC) oluşmakta, kaspaz-8 aktive olmaktadır. Aktif kaspaz-8, kaspaz-3, -6 ve -7'yi aktive eder. Kaspaz-8 ayrıca, Bax ve Bak1'in translokasyonunu, oligomerizasyonunu ve mitokondriyal membrandan girişini sağlar. Diğer yolak ise DNA hasarı veya ER stresi nedeniyle kaspaz-2'nin mitokondri öncesi sinyal olarak aktive olmasıdır [238].

2.10.4.4. Apoptozu İnhibe Edici Protein (IAP) Ailesi

Bu aile X kromozomuna-bağlı IAP (XIAP), IAP1, IAP2, nöronal apoptoz inhibe edici protein (NAIP), Survivin, Livin ve Apollon'dan oluşmaktadır. Başta prokaspaz-9 ve prokaspaz-3 olmak üzere kaspazların aktivasyonunu baskılayarak anti-apoptotik etki gösterirler [239].

2.10.4.5. Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF)

Bir flavoprotein oksidoredüktaz olarak tanımlanan AIF mitokondriyal bir proteindir. Fizyolojik koşullar altında ROS süpürücüsü olarak ya da redoks siklusunda görev alır. Apoptotik bir uyarı sonucunda AIF mitokondriden salınır (Şekil 2.9) ve nükleusa transloke olur. Kültür hücrelerinde AIF'nin fazla ekspresyonunun apoptozu indüklediği gösterilmiştir [240].

2.10.4.6. p53/p63/p73 Ailesi

Apoptoz ile hücre ölümü, DNA hasarı ile tetiklenebilmektedir. p53, p63 ve p73 olarak adlandırılan DNA bağlayıcı proteinler bu sürece katılmaktadır [223]. Bu proteinler normalde büyümenin durdurulması ve tamirde görev alırlar. Ancak, ROS, ışın ya da diğer genotoksik stresler nedeniyle DNA'da uzun süreli bir hasar meydana geldiğinde hücreyi ölüme adarlar [223]. p53 bu aileye ait en çok çalışılan proteindir. Kısa ömürlü bir protein olan p53, DNA hasarına cevap olarak hızla birikir. p53 protein seviyelerindeki yükselme, ortadan kaldırılmasının engellenmesi yoluyla gerçekleştirilir. p53 ubikuitin bağımlı proteozomal yolakla parçalanır. "Murine double minute" (Mdm2) (insanda human double minute) p53'ün DNA hasarına karşı cevabının hem miktarını hem de süresini kısıtlar [241]. Mdm2 bunu p53'ün N-terminal transkripsiyon aktivasyon domainine bağlanarak ve DNA'ya bağlanma aktivitesini regüle ederek yapar. Ayrıca Mdm2'nin p53 için ubikuitin ligaz aktivitesi mevcuttur. DNA hasarı durumunda Mdm2-p53 kompleks oluşumu inhibe edilir. Aktive olan p53, hücre büyümesi, hücre siklusu kontrol noktaları ve apoptoz (Bax, Bcl-2, Bcl-xL ve Fas, vb.) ile ilişkili pek çok proteini kodlayan genlerin promotor bölgelerine bağlanır. Puma ve Noxa proteinleri de p53-aracılı apoptozun kritik mediyatörleridir [229].

2.10.4.7. ASK1/JNK/p38 Yolağı

JNK ve p38 kinaz yolakları, mitojen ile aktive olan kinaz kinaz kinaz (MAPKKK), MAP kinaz kinaz (MAPKK) ve MAP kinaz (MAPK)'dan oluşan MAPK sinyal yolağına aittir [242-244]. Hiyerarşik fosforilasyon sonucunda MAPK'in aktive olmasıyla gen ekspresyonunu düzenlemek üzere transkripsiyon faktörleri ya da diğer kinazlar aktiflenir.

MAP3K ailesinin bir üyesi olan ASK1 (MAPKKK5) 160 kDA ağırlığında olup bir serin treonin kinaz olarak fonksiyon görür. ASK1 proteininin N ve C terminal uçlarında birer düzenleyici bölge, ortasında ise kinaz aktivitesine sahip bölge bulunmaktadır. ASK1, sırasıyla JNK ve p38 kinazı indükleyen MKK4/MKK7 ve MKK3/MKK6'yı fosforiller ve aktive eder [242]. JNK ve p38 yolaklarının ASK1 tarafından aktivasyonu sonucunda [245] apoptoz gerçekleşir [246]. ASK1'den yoksun farelerden elde edilen primer nöronların JNK ve p38 aktivasyonuna ve oksidatif stres indüklü apoptoza daha dirençli olduğu gösterilmiştir [247].

ASK1, glial hücreler de dahil olmak üzere neredeyse tüm beyin hücrelerinde eksprese edilir [248]. Kritik tiyollerin redoks modifikasyonu, normal olmayan sinyalizasyona ve ASK1 tarafından ölüm sinyal kaskadının başlatılmasına neden olmaktadır [249]. Daxx, Fas ölüm reseptörü ile etkileşime girerek ASK1'i dolayısıyla JNK'yı aktive eden bir proteindir [250]. Fas indüklü, Daxx aracılı aktivasyona [245] ek olarak ASK1, oksidatif stres [246, 251], ER stresi [252] ve TNF- α [253]'yı da içeren pek çok uyarıcı tarafından aktive edilmektedir. H₂O₂ de ASK1'i aktive eden oksidan ajanlardan biridir [254]. Normal koşullarda ASK1, negatif regülatörü olan Tiyoredoksin (Trx) ile bağlı halde bulunur. Bir protein disülfid oksidoredüktaz olan Trx, ASK1'in serin 845 bölgesinden otofosforilasyonunu engeller. Peroksiredoksin 4 (Prx-4) dışındaki bilinen tüm Prx'ler, oksitlenmiş Prx'lerin fonksiyonel ve koruyucu formlarına geri indirgenmeleri için Trx'leri elektron donörü olarak kullanırlar [255]. Hücrel oksidanlar ile Trx'in sistein tiyollerinin oksidasyonu sonucunda Trx, ASK1'den ayrılır, ASK1 aktive olur ve sonrasında JNK ve p38 aracılı hücre ölümü meydana gelir [256]. ASK1/p38/JNK yolağının anandamid ve NO'nun indüklediği PC12 hücre ölümüne [257-258] ve insan pulmoner vasküler endotelial hücrelerinde H₂O₂'nin indüklediği apoptoza katıldığı [259] bilinmektedir. H₂O₂'nin, ASK1'in dimerik formunu arttırdığı, ROS aracılı ASK1 dimerizasyonunun ASK1 aktivasyonuna ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [260].

2.11. Amaç ve Hipotez

Bir GSH analoğu olan YM737'nin çeşitli hayvan modellerinde sistemik yolla uygulanmasını takiben beyin hücrelerine etkin bir şekilde alındığı, hücrel GSH düzeyini yükselttiği, hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu ve fonksiyonel iyileşme sağladığı bilinmektedir. Periferik YM737 uygulamasının deneysel Parkinson modelinde nigral GSH düzeyini artırma yeteneği daha önce çalışılmamıştır. Nigral GSH azalışının Parkinson patolojisine katkısı göz önüne alındığında, kan beyin bariyerini geçme özelliğinden dolayı intraperitonel yolla uygulanabilen GSH analoğu YM737 kullanımının Parkinson klinik semptomlarını azaltmada etkili olacağını düşündürmektedir. Bu çalışma 6-OHDA nörotoksini ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde ortaya çıkan davranışsal, histolojik ve

biyokimyasal değişiklikler üzerine YM737 uygulaması düzeltici etki gösterir hipotezinin test edilmesi ve olası etkinin mekanizmasının ortaya koyulması amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji, Biyokimya, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları, Nöroloji Anabilim Dalı Deneysel Beyin Araştırmaları Laboratuvarı, Merkez Laboratuvarı, Deney Hayvanları Ünitesi ve Hacettepe Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen ortalama 350-400 g ağırlığında, 3 aylık, erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, ortam ısısı, 23 ± 2 °C olan ve 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngü otomasyonuna sahip Deney Hayvanları Ünitesi'nde barındırılmış, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile serbest yem ve su tüketimi sağlanmıştır.

3.1. Gruplandırma

Çalışmanın başında sıçanlar rastgele dört gruba ayrılmıştır:

1. Kontrol grubu (K, n=40)
2. YM737 uygulanan grup (Y, n=40)
3. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan grup (P, n=40)
4. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan + YM737 uygulanan grup (PY, n=40)

3.2. Deneysel Parkinson Modelinin Oluşturulması

P ve PY gruplarına ait hayvanlara kloralhidrat (Chloral hydrate, #1024251000, Merck, Darmstadt, Germany) (400mg/kg, ip.) anestezisi uygulanmıştır. Gerekli durumlarda anestezisi takviyesi eter (Diethyl ether, #G4509S, Ak Kimya, İstanbul, Türkiye) ile sağlanmıştır. Hayvanlar stereotaksik cihaza (Stoelting) yerleştirilmiş ve kafaları sabitlenmiştir. Ardından orta hat kesisi yapılmış, periost temizlenerek bregma açığa çıkarılmıştır. MFB için ilgili koordinatlar (AP-2,2 mm, L±1,5mm, DV-8mm) Pellegrino atlasına göre belirlenmiştir [261]. 6-OHDA (6-hydroxydopamine, #H4381, Sigma, Steinheim, Germany) (3x4µg/µl dozda, 1µl/d hızla) nörotoksini, % 0.1 askorbik asit (L-Ascorbic acid, #A-0278, Sigma, Steinheim, Germany) içeren salinde çözülerek, stereotaksik cerrahi yöntemle, tek taraflı olarak enjekte edilmiş, nörotoksinin daha iyi difüze olabilmesi için Hamilton şırıngası 3dk daha bölge içerisinde bekletilmiştir [262]. Nörotoksin uygulamasından sonra, hayvanların kafa derisine açılan kesi dikiş atılarak kapatılmıştır. Vücut sıcaklıklarını sabit tutmak amacıyla hayvanlar 37°C'lik küveze alınmıştır.

3.3. YM737 Uygulaması

YM737 (Glutathione monoisopropyl ester, #08169, Chem-Impex International, Inc., Illinois, USA), 1N NaOH (Sodium hydroxide, #C647762, Merck, Darmstadt, Germany)'da çözüldükten sonra, pH'sı 6.5'e ayarlanmıştır. %0,9'lük salin ile dilüe edilmiştir. YM737, stereotaksik cerrahiden hemen sonra, 0,1ml/100g hacimde, tek dozda (300mg/kg), intraperitoneal yolla uygulanmıştır [184]. Kontrol hayvanlarına aynı hacimde çözgen enjekte edilmiştir.

3.4. Deneyin Solandırılması ve Dokuların Çıkarılması

Stereotaksik cerrahi işleminden ve YM737 uygulamasından 3 gün sonra, motor aktivite testlerini takiben hayvanlar 1,5g/kg dozda üretanın (Urethane, #U2500, Sigma, Steinheim, Germany) periton içine uygulanması ile anesteziye alındıktan sonra orta hat kesisi yapılarak abdomen ve göğüs kafesi açılmıştır. İmmünohistokimyasal parametreler için hayvanların beyinleri 100ml fosfat tuzu tamponu (PBS; pH 7.4) ve 100ml paraformaldehit (Paraformaldehyde, #1040051000, Merck, Darmstadt, Germany) (%4'lük; pH 7.4) ile perfüze edilmiştir. Bunun için aortanın iliak bölgesine yerleştirilen bir kateterden heparinli PBS ve sonrasında paraformaldehit verilmiş, bu esnada sağ atrium kesilerek boşalma sağlanmıştır. Daha sonra beyin dokuları çıkarılmış, SN'yi içeren beyin bölgesi paraformaldehite alınıp 1 gece fikse edilmiştir. Biyokimyasal parametreler için hayvanların beyinleri yalnızca PBS ile perfüze edilmiştir. Daha sonra hızla çıkarılan beyinlerden SN dokuları buz üzerinde izole edilmiş, sıvı nitrojene alındıktan sonra ölçüm gününe adar -80°C'de saklanmıştır.

3.5. Parametreler

3.5.1 Davranışsal Parametreler

3.5.1.2.Motor aktivite tayini:

Motor aktivite testleri, stereotaksik cerrahi işleminden ve YM737 uygulamasından 3 gün sonra gerçekleştirilmiştir.

3.5.1.3.Apomorfin ile rotasyon testi:

%1'lik askorbik asit içeren salinde çözülmüş olan 0,2mg/kg dozda apomorfin hidroklorik (R-(-)-Apomorphine hydrochloride hemihydrate, #A4393, Sigma, Steinheim, Germany), subkutan yolla hayvanlara enjekte edilmiş, 4 dakika sonra hayvanlar camdan hemisferik bir hazneye alınarak lezyon yönünde (ipsilateral) ve lezyonun tersi yönde (kontrolateral) dönme hareketleri sayılmıştır [262].

3.5.1.4.Katalepsi testi:

Katalepsi, kemirgenlerde belirgin bir postür bozukluğu ve “donup kalma” şeklinde tanımlanan, testin tipine ve hassasiyetine göre değişen, bir süre deney hayvanının hiç hareket etmeden test ortamına bırakıldığı duruş biçimini koruması ile karakterize bir davranıştır. Bu duruş biçiminin korunduğu süre bir kronometre yardımı ile ölçülerek kaydedilir. Sürenin uzaması katalepsi şiddetinin arttığını gösterir. Katalepsi ölçümleri için dikey tel testi sık kullanılan, basit ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir [263-264]. 90° dikey olarak yerleştirilmiş bir tel (56,5 × 23,5 cm; 2 mm) üzerine bırakılan hayvanının pozisyonunu değiştirmeden hareketsiz olarak kaldığı süre (harekete başlama latensi) kaydedilmiştir. Bu test 3 kez uygulanmış, elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır.

3.5.1.5.Lokomotor aktivite testi:

Lokomotor aktivite, açık alan aktivite görüntüleyici sistem (MAY 9908 model Aktivite Görüntüleyici Sistem: Commat Ltd, Türkiye) ile ölçülmüştür [265]. Bu sistem, kızılötesi fotoseller ile donatılmış sekiz plastik cam kafesten (42 cm x 42 cm x 30 cm) oluşmaktadır. Kafeslerin yan bloklarında, yerden 4,5 cm yükseklikte ve 2,5 cm aralıklarla on beş yayıcı ve algılayıcı fotosel çifti bulunmaktadır. Diğer on beş

fotosel çifti ise yerden 11,5 cm yukarıya yerleştirilmiştir. Fotosel ışınlarının kesilmesi IBM-uyumlu bir bilgisayar sistemi ile belirlenmektedir. Deney hayvanının lokasyonu ise 0,1 s hassasiyetteki yazılım ile hesaplamaktadır. Eğer deney hayvanının lokasyonu tamamen değişirse bu durum ambulatuvar aktivite olarak ifade edilmektedir. Işınlardan kesilmesine neden olan fakat lokasyonu değiştirmeyen diğer davranışsal cevaplar horizontal aktivite olarak ifade edilmektedir. Yükselme gibi vertikal hareketler ise yerden 11,5 cm yukarıya yerleştirilen fotoseller aracılığıyla belirlenmektedir. Sistem ayrıca, toplam lokomotor aktivite ve alınan mesafeyi de vermektedir. Tüm parametreleri test etmek için deney hayvanı açık alanın tam ortasına koyulmuş ve 5 dakika boyunca kayıt alınmıştır.

3.5.2. Histolojik Parametreler

3.5.2.1. Dokuların Hazırlanması

Bir gece boyunca paraformaldehitte fikse edilen beyin dokuları 3 saat süreyle akan suda yıkandıktan sonra sırasıyla %70, %80 ve %90'lık alkol serilerinde birer gece, %100'lük alkolde (Ethanol, #1009862500, Merck, Darmstadt, Germany) ise 3 saat bekletilerek dehidratasyon sağlanmıştır. Dokular üçer kez üçer dakika ksilol (Xylol, #1086852500, Merck, Darmstadt, Germany) serilerinden geçirelerek şeffaflaştırma işlemi uygulanmıştır. 56°C'lik etüvde birer saat parafin (Paraffin, #1073371000, Merck, Darmstadt, Germany) serilerinden geçirilen dokular parafin bloklara gömülmüştür. TH enziminin immünohistokimyasal analizi için 30µm kalınlığında parafin kesitler kızaklı mikrotomda (Sliding Microtome, SM2000 R, Leica, Nussloch, Germany) kesilerek jelatin (Gelatin, #G6650, Sigma, Missouri, ABD) kaplı lamlara, Bcl-2, ASK1 ve TUNEL analizleri için ise 10µm kalınlığında parafin kesitler rotary mikrotomda (Rotary Microtome, #RM2125RT, Leica, Nussloch, Germany) kesilerek Poly-L-Lizin (Poly-L-Lysine, #P8920, Sigma, Steinheim, Germany) kaplı lamlara alınmıştır.

3.5.2.2. İmmünohistokimyasal Protokol

İmmünohistokimyasal protokol için ayrılmış parafin kesitler bir gece 56°C'lik etüvde bekletilmiştir. Kesitler, deparafinizasyon için iki kere onar dakika ksilollerde bekletilmiş ve her birinde beşer dakika olmak kaydıyla azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Daha sonra kesitler distile suda çalkalanmıştır. Bcl-2 ve ASK1 analizi için ayrılan kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için 200 ml sitrat tamponuna (1M, pH: 6.0) (Sitric acid monohydrate, #1002441000, Merck, Darmstadt, Germany) konularak mikrodalga fırında on dakika muamele edilmiş ve fırın dışında yirmi dakika soğumaya bırakılmıştır. Kesitler PBS'de (pH: 7.2 -7.4) beş dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitenin giderilmesi için metanol (Methanol, #1060082500, Merck, Darmstadt, Germany) ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ (Hydrogene Peroxide 30%, #1085972500, Merck, Darmstadt, Germany) ile yirmi dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. PBS ile tekrar yıkama yapıldıktan sonra kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle (Pap Pen, #IM3580, Beckman Coulter, California, USA) çizilmiştir. Bu işlemi takiben lamalar oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immünooglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (Large Volume Ultra V Block, #TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, USA) ile yedi dakika muamele edilmiş, sonrasında serumun fazlası alınarak TH analizi için ayrılan kesitler, tavşan poliklonal anti-TH (#ab112, 1/400, Abcam, Cambridge, USA) antikoruyla doksan dakika süreyle, Bcl-2 ve ASK1 analizi için ayrılan kesitler ise

tavşan poliklonal anti-Bcl-2 (#ab7973, 1/50, Abcam, Cambridge, USA) ve tavşan poliklonal anti-ASK1 (#sc-7931, 1/50, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) antikolarıyla gece boyu 4°C’de nemli ortamda inkübe edilmiştir. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor yerine normal tavşan immünoglobulinleri uygulanmıştır. Lamlar inkübasyon sonunda iki kez beşer dakika PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra kesitlere otuz dakika boyunca biyotinli sekonder antikor (LSAB+System-HRP, #K0690, Dako, CA, USA) uygulanmış ardından iki kez beşer dakika PBS ile yıkanmıştır. Otuz dakika süresince streptavidin–peroksidaz kompleksi (LSAB+System-HRP, #K0690, Dako, CA, USA) uygulanan kesitler iki kez beşer dakika PBS ile yıkanmıştır. Ardından sinyali geliştirmek için dokular 3’ Diamino benzidin (DAB) kromojeni (3,3’-Diaminobenzidine Tablets, #D4168, Sigma, MO, USA) ile muamele edilmiş ve musluk suyunda yıkanmıştır. Hematoksilende (Mayer’s hemalum solution, #1092491000, Merck, Darmstadt, Germany) on saniye zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler tekrar artan alkol serilerinde dehidrate edilip ksilole alınmış ve ardından entellan kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır. Boyanmış kesitler ışık mikroskopunda değerlendirilmiş ve sonrasında fotoğraflandırılmıştır.

3.5.2.3.Stereolojik Yöntemle Tirozin Hidroksilaz Pozitif Hücrelerin Değerlendirilmesi

SN’deki dopaminerjik nöronların sayısını belirlemek için TH pozitif nöronlar Optik Fraksiyon probu ile dizayn temelli stereolojik yöntem kullanılarak sayılmıştır. Stereolojik verileri toplamak ve analiz etmek için, Heidenheim Z axis kodlayıcılı ve 1600×1200 çözünürlüklü, Ludl motorize aşamalı, Optronics Microfire renkli dijital kamera donanımlı, Nikon Eclipse 80i mikroskopla koordineli StereoInvestigator (MicroBright-Field, Colchester, VT) bilgisayar yazılım paketi kullanılmıştır. SN bölgesinin sınırları x10 büyütmede çizilmiştir. Sayma çerçevesinin büyüklüğü 100x100 µm ve sayma alanı (XY)= 10000 µm² olarak belirlenmiştir. Hücre sayma işlemi x40 büyütme objektif kullanılarak yapılmıştır. Yalnızca, çapları 15µm ya da daha büyük olan, çekirdeği dahil tutulan sınırlara değen ve çekirdeği hariç tutulan sınırlara değmeyen hücreler sayılmıştır.

3.5.2.4.TUNEL

SN’deki apoptozun belirlenmesi için DNA zincirindeki kırıkların enzimatik olarak işaretlenmesini sağlayan TUNEL metodu ticari bir kit (In Situ Cell Death Detection Kit, AP, #11684809910, Roche, Indianapolis, USA) kullanılarak uygulanmıştır [266].

TUNEL protokolü için ayrılmış parafin kesitler bir gece 45°C’lik etüvde, ardından bir saat 60°C’lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere beşer dakika ksilollerden geçirilmiş ve her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80 ve %70’lik alçalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Daha sonra, distile suda çalkalanıp PBS (pH: 7.2-7.4)’te üç kere beşer dakika yıkanmıştır. Ardından kesitler permeabilizasyon solüsyonu (%0.1 Sodyum sitrat (Sodium citrate monobasic, #71498, Sigma, MO, USA) solüsyonu içinde %0.1 Triton X-100 (Triton X-100, #1086031000, Merck, Darmstadt, Germany)) ile 4°C’de 8 dakika boyunca muamele edilmiş ve iki defa PBS ile yıkanmıştır. İşaretleme reaksiyonu, her bir örnek için TUNEL dilüsyon tamponu (TUNEL Dilution Buffer, #11966006001,

Roche, Mannheim, Germany) ile 1:1 oranda sulandırılan TUNEL karışımı (enzim + işaretleme solüsyonu) (total 50 µl), negatif kesitler için ise enzimsiz TUNEL karışım dilüsyonu kullanarak 37°C'de 1 saat süreyle yapılmıştır. PBS ile yıkamayı takiben, kesitler dönüştürücü ajan (streptaavidin-alkalen fosfataz kompleksi) ile 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yıkama işleminden sonra, işaretli DNA kırıklarını içeren hücrelerin lokalizasyonu için örnekler 10 dakika süreyle 2ml, 0,1M Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochloride, #1082190100, Merck, Darmstadt, Germany) solüsyonu içinde çözünen Fast Red (Fast Red Tablets, #11496549001, Roche, Indianapolis, USA) tablet ile muamele edilmiştir. Hematoksilende (Mayer) iki saniye zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler gliserin (Kaiser Glycerin gelatine, #1092420100, Merck, Darmstadt, Germany) kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır. Boyanmış kesitler ışık mikroskobunda değerlendirilmiş ve sonrasında fotoğraflandırılmıştır.

3.5.3. Biyokimyasal Parametreler

3.5.3.1. Glutatyon Düzeyinin Belirlenmesi

SN dokusunda total GSH düzeyi ticari bir kit (Glutathione Assay Kit, #703002, Cayman Chemical Company, Ann, Arbor, MI, USA) kullanılarak belirlenmiştir [267].

Prensip: GSH'nin sülfidril grubu, DTNB (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit, Ellman's reagent) ile reaksiyona girer ve ürün olarak sarı renkli TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) oluşur. Oluşan TNB miktarı örnekteki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu nedenle 405nm'de TNB absorbansını tayin etmek örnekteki GSH düzeyinin kesin olarak ölçülmesini sağlar.

Reaktifler:

1. MES Tamponu (2X)
2. GSSG Standardı
3. Kofaktör Karışımı (NADP⁺ ve glikoz 6-fosfat içerir)
4. Enzim Karışımı (GR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içerir)
5. DTNB
6. MPA (Meta-phosphoric acid, #1005460500, Merck, Darmstadt, Germany) Reaktifi
7. TEAM (Triethanolamine, #1083771000, Merck, Darmstadt, Germany) Reaktifi, 4M

İşlemler: SN dokuları 1mM EDTA (Ethylenediamine teraacetic acid dipotassium salt dihydrate, #ED2P, Sigma, Missouri, USA) içeren K₂HPO₄ (di-Potassium hydrogen phosphate, #1051041000, Merck, Darmstadt, Germany) tamponunda (pH: 6-7), buz üzerinde homojenize edildi (Biofugel 5R, Heroeus, Germany). Bu işlemde bir doku için 150µl fosfat tamponu kullanıldı. Homojenat, 4°C'de 10000 x g'de 15 dakika süresince santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant buz üzerine alındı. Doku süpernatantı üzerine aynı miktarda MPA reaktifi ilave edilerek oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Bu işlemi takiben, 5000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ayrı bir tüpe alındı. 100µl süpernatant üzerine 5µl TEAM reaktifi ilave edilerek karıştırıldı. Karışımdan alınan 50µl numune üzerine, MES tamponu, kofaktör karışımı, enzim karışımı, DTNB ve distile su içeren 150µl ölçüm kokteyli

ilave edilerek 25 dakika süresince karanlıkta inkübe edildi. Absorbans değerleri 405nm’de okundu.

GSH Miktarının Hesaplanması: GSSG standardı aynen numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturuldu. Dokulardaki GSH miktarları bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.5.3.2. 4-Hidroksinonenal Düzeyinin Belirlenmesi

SN dokusunda 4-HNE düzeyi ticari bir kit (OxiSelect HNE-His Adduct ELISA Kit, #STA-334, Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA) kullanılarak belirlenmiştir [268].

Prensip: Bovin serum albumin (BSA) standartları ve protein örnekleri (10µg/ml), 37°C’de 2 saat boyunca 96 kuyucuklu plate’e adsorbe edilir. Standart ya da örneklerde bulunan HNE-proteini, anti-HNE-His antikoru ve horse radish peroksidaz (HRP) bağlı sekonder antikor ile araştırılır.

Reaktifler:

1. 96-kuyucuklu protein bağlayıcı plate
2. Anti-HNE-His antikoru (1:1000)
3. HRP bağlı sekonder antikor (1:1000)
4. Dilüsyon tamponu
5. Yıkama tamponu
6. Substrat solüsyonu
7. Durdurma solüsyonu
8. İndirgenmiş BSA standardı
9. HNE-BSA standardı
10. PBS (1mM, pH:7.4)

İşlemler: Her bir SN dokusu proteaz inhibitör kokteyli (Protease Inhibitor Cocktail, #P8340, Sigma, MO, USA) (25µl) içeren PBS (250µl) tamponunda, buz üzerinde homojenize edildi (Biofugel 5R, Heroeus, Germany). Homojenat 12000 x g’de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ayrı bir tüpe alındı. Anti-HNE-His antikoru ve HRP bağlı sekonder antikor, dilüsyon tamponu kullanılarak 1:1000 oranında sulandırıldı. İndirgenmiş BSA ve HNE-BSA standartları PBS kullanılarak 10µg/ml konsantrasyonda sulandırıldı. Bu standartlar kullanılarak farklı konsantrasyonlarda HNE-BSA standart serisi hazırlandı. Numuneler de PBS kullanılarak 10µg/ml konsantrasyonda sulandırıldı. 96-kuyucuklu plate’e sırasıyla 100’er µl standart serisi ve örnekler ilave edildi. 4°C’de gece boyu inkübasyonu takiben her kuyucuk 2 kez 250µl PBS ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 200µl dilüsyon tamponu eklendi ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Ardından kuyucuklar üç kez, 250µl yıkama tamponu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100µl Anti-HNE-His antikoru eklendi ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklar üç kez 250µl yıkama tamponu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100µl HRP-bağlı sekonder antikor eklendi ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Ardından kuyucuklar beş kez 250µl yıkama tamponu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100µl substrat solüsyonu eklendi ve oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Durdurma solüsyonunun tüm kuyucuklara eklenmesiyle reaksiyon durduruldu ve 450nm’de absorbanslar okundu.

4-HNE Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki 4-HNE düzeyleri standart grafiği yardımıyla hesaplandıktan sonra µg/ml olarak ifade edildi.

3.5.3.3 Sitokrom-c Düzeyinin Belirlenmesi

SN dokusunda sit-c düzeyi ticari bir kit (Cytochrome c Immunoassay Rat/Mouse, #MCTC0, R&D Systems, Quantikine, Minneapolis, USA) kullanılarak belirlenmiştir [269].

Prezisp: Bu yöntem niceliksel sandviç enzim immünoassay tekniğine dayanır ve Western-blot yöntemine muadil olarak dizayn edilmiştir. Sıçan ve fare için spesifik olan poliklonal sit-c antikoru 96-kuyucuklu plate üzerine kaplanmıştır. Konjugat, standartlar, kontrol ve örnekler kuyucuklara pipetlenir ve var olan sit-c, sıçan ve fareye spesifik olan bağlı antikor ve enzim bağlı monoklonal antikor tarafından bağlanır. Bağlanmayan maddeleri uzaklaştırmak için yıkama yapıldıktan sonra substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Enzim reaksiyonu mavi renkte ürün oluşturur. Durdurma solüsyonunun eklenmesiyle mavi renk sarıya dönüşür. Ölçülen renk yoğunluğu ilk aşamada bağlanan sit-c miktarı ile orantılıdır. Örneklere ait değerler standart eğrisi kullanılarak okunur.

Reaktifler:

1. Plate (Sıçan ve fareye spesifik monoklonal sit-c antikoruyla kaplanmıştır)
2. Konjugat (HRP enzimi ile konjuge edilmiş olan sıçan ve fareye spesifik monoklonal sit-c antikoru)
3. Standart (doğal sıçan sit-c'si içerir)
4. Kontrol (doğal sıçan sit-c'si içerir)
5. Kalibratör sulandırıcı
6. Yıkama tamponu
7. A Renk reaktifi (H₂O₂ içerir)
8. B renk reaktifi (kromojen –tetrametilbenzidin- içerir)
9. Durdurma solüsyonu (HCl içerir)
10. PBS (1mM, pH:7.4)

İşlemler: Her bir SN dokusu proteaz inhibitör kokteyli (Protease Inhibitor Cocktail, #P8340, Sigma, MO, USA) (15µl) içeren soğuk PBS (150µl) tamponunda, buz üzerinde homojenize (SilentCrusher M, Heidolph, Schwabach, Germany) edildi. Homojenat 4°C'de 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve 4°C'de 105000 x g'de 1 saat süresince santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ayrı bir tüpe alındı. Kalibratör sulandırıcı ile gerekli dilüsyonlar yapılarak standart serisi hazırlandı. Tüm kuyucuklara sit-c konjugatı eklendi. Standartlar, kontrol ve numuneler kuyucuklara eklendi ve 2 saat süresince oda ısısında inkübe edildi. Her kuyucuk 400µl yıkama tamponu ile beş kez yıkandı. A ve B renk reaktifleri eşit hacimde karıştırılarak substrat solüsyonu elde edildi. Tüm kuyucuklara 100µl substrat solüsyonu eklendi ve 30 dakika süresince oda ısısında inkübe edildi. Tüm kuyucuklara 100µl durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450nm'de absorbanslar okundu.

Sitokrom-c Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki sit-c düzeyleri standart grafiği yardımıyla hesaplandıktan sonra ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.5.3.4. Protein Tayini

SN dokularında protein tayini modifiye Bradford yöntemine dayanan bir kit ile yapıldı [270].

Reaktifler:

1. Standart solüsyon: 2mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin, #23209, Pierce, Rockford, IL, USA)
2. CPPA Reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, #1856210, Pierce, Rockford, IL, USA)

İşlemler: 1µl doku süpernatantı 999µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklendi ve 595 nm’de absorbans spektrofotometrik olarak okundu. Standart çalışması ise numune yerine artan konsantrasyolarda sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapıldı.

Protein Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki protein miktarları standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.6. İstatistik

İstatistiksel değerlendirme Graph-Pad paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak gösterildi, anlamlılık düzeyi $\alpha = 0.05$ olarak belirlendi. Her değişken için normallik testi uygulandı, normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan ‘Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)’ ve takiben ‘Tukey Post Hoc Testi’, uymayanlar için ise nonparametrik olan ‘Kruskal Wallis Varyans Analiz’ ve takiben ‘Mann-Whitney U Testi’ kullanıldı.

4. BULGULAR

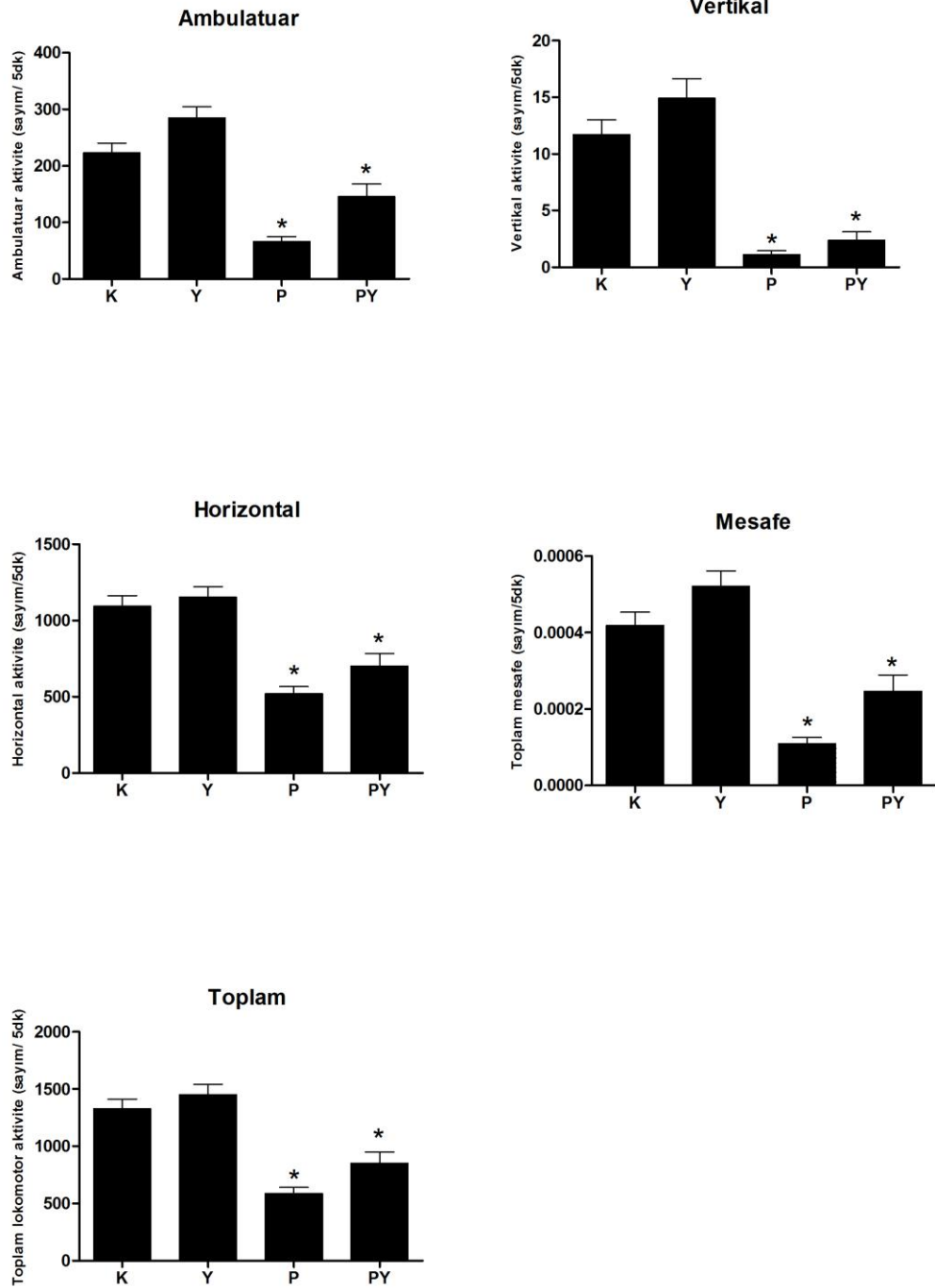
4.1. Genel Görünüm

Deneye alınan hayvanlarda genel görünüm ve sağlık açısından herhangi bir farklılık izlenmemiştir.

4.2. Davranışsal Parametreler

4.2.1. Lokomotor Aktivite Düzeyi

Lokomotor aktivite düzeyleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Lokomotor aktivite testi uygulaması ile ambulatuar, vertikal, horizontal, alınan mesafe ve toplam lokomotor aktivite olmak üzere beş parametre elde edilmektedir. Ölçülen tüm parametrelerde lokomotor aktivite düzeyleri, P ve PY gruplarında K ve Y gruplarına göre önemli düzeyde azalmıştır. P ve PY grupları arasında ise tüm parametreler açısından istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilememiştir.



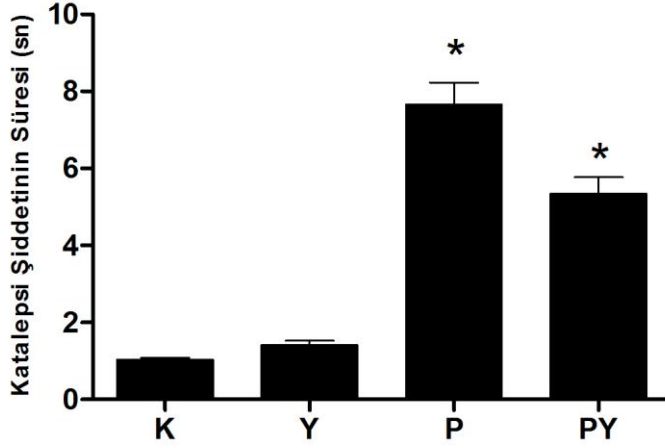
Şekil 4.1. Locomotor Aktivite Testi

*: $p < 0,05$ düzeyinde K ve Y gruplarından fark

4.2.2. Katalepsi Düzeyi

Katalepsi düzeyleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. “Dik tel” testi ile değerlendirilen katalepsi şiddeti P ve PY gruplarında K ve Y gruplarına göre önemli

düzyeyde artmıştır. P ve PY grupları arasında ise katalepsi şiddeti açısından istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilememiştir.

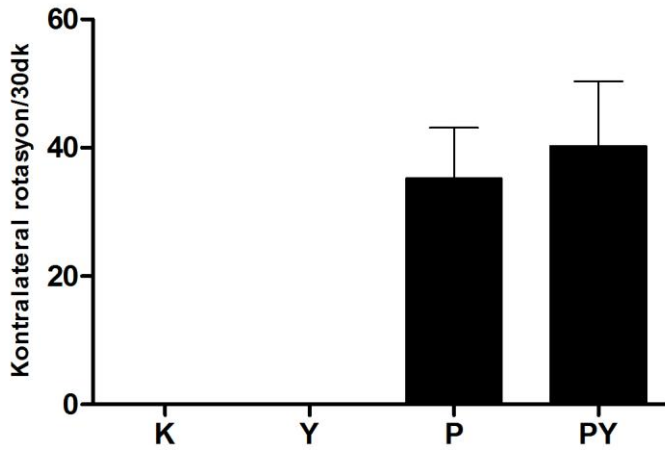


Şekil 4.2. Katalepsi Testi

*: $p < 0,05$ düzeyinde K ve Y gruplarından fark

4.2.3. Rotasyon Düzeyi

Rotasyon düzeyleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Apomorfın uygulamasını takiben lezyon yönünde ve lezyonun tersi yönünde gerçekleşen rotasyon davranışları, beklendiği üzere K ve Y gruplarında gözlenmemiştir. Deneysel Parkinson uygulanan hayvanlarda ise bahsedilen dönme davranışları tespit edilmiştir. Bununla birlikte P ve PY grupları arasında ise rotasyon sayısı bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilememiştir.

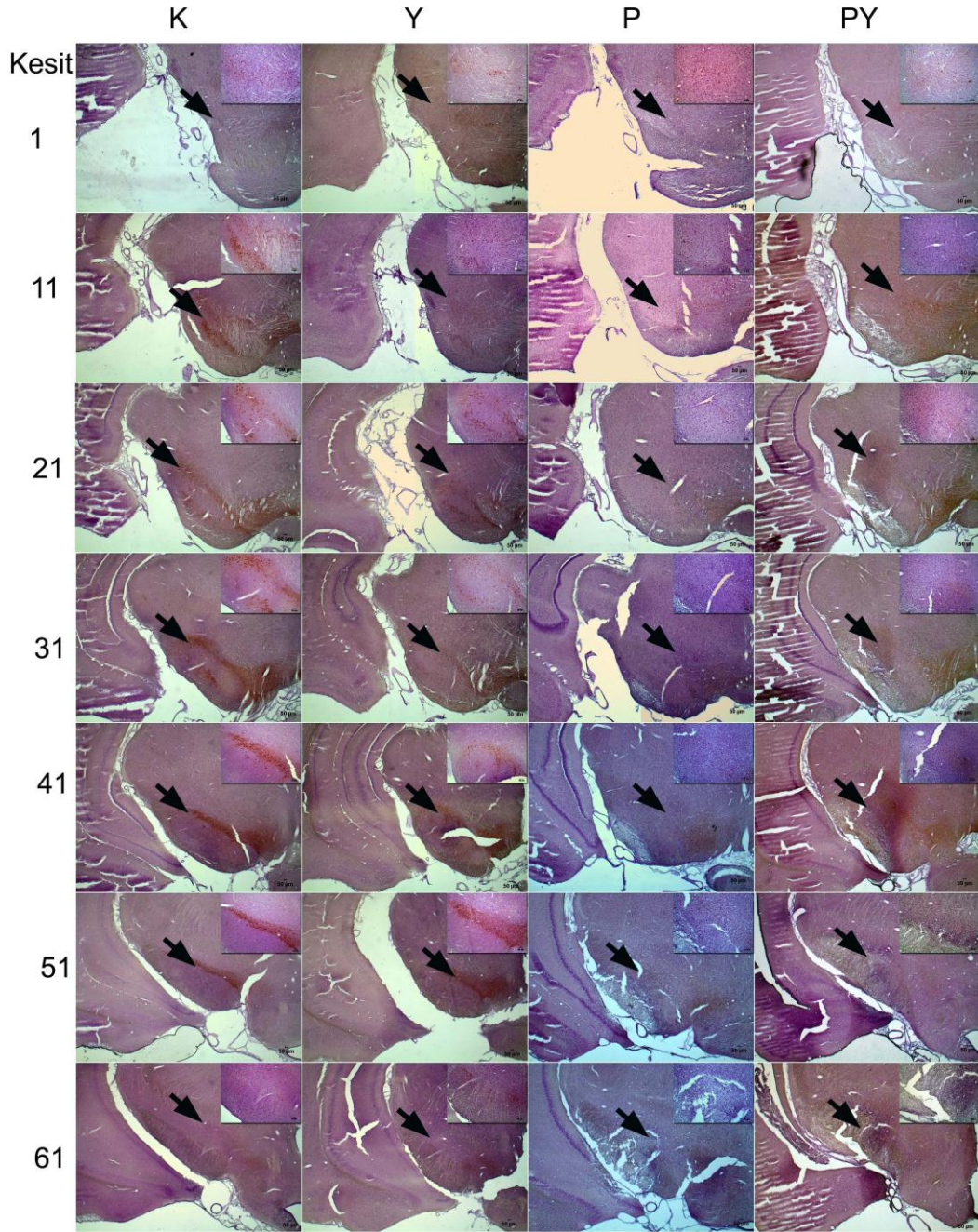


Şekil 4.3. Rotasyon Testi

4.3. Histolojik Parametreler

4.3.1. TH İmmünreaktivitesi

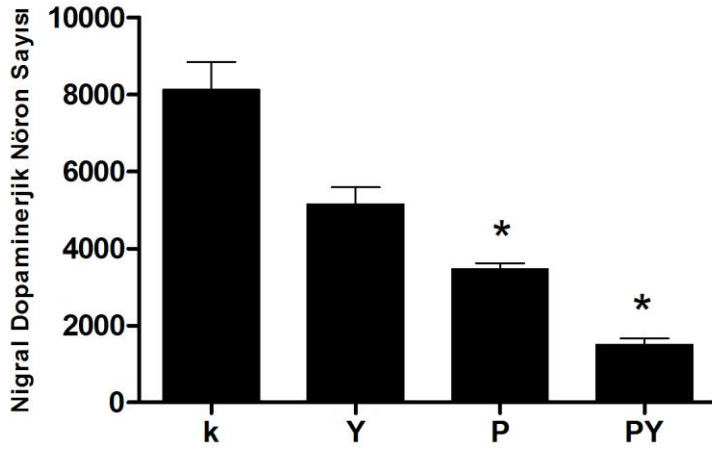
TH'nin tüm gruplarda dopaminerjik nöronların gövde ve uzantılarında immünpozitif olduğu gözlenmiştir. TH-IR, Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. TH immünreaktivitesi.
Büyük resim 5x, küçük resim 10x büyütme.

4.3.1.1. Nigral Dopaminerjik Nöronların Stereolojik Sayımı

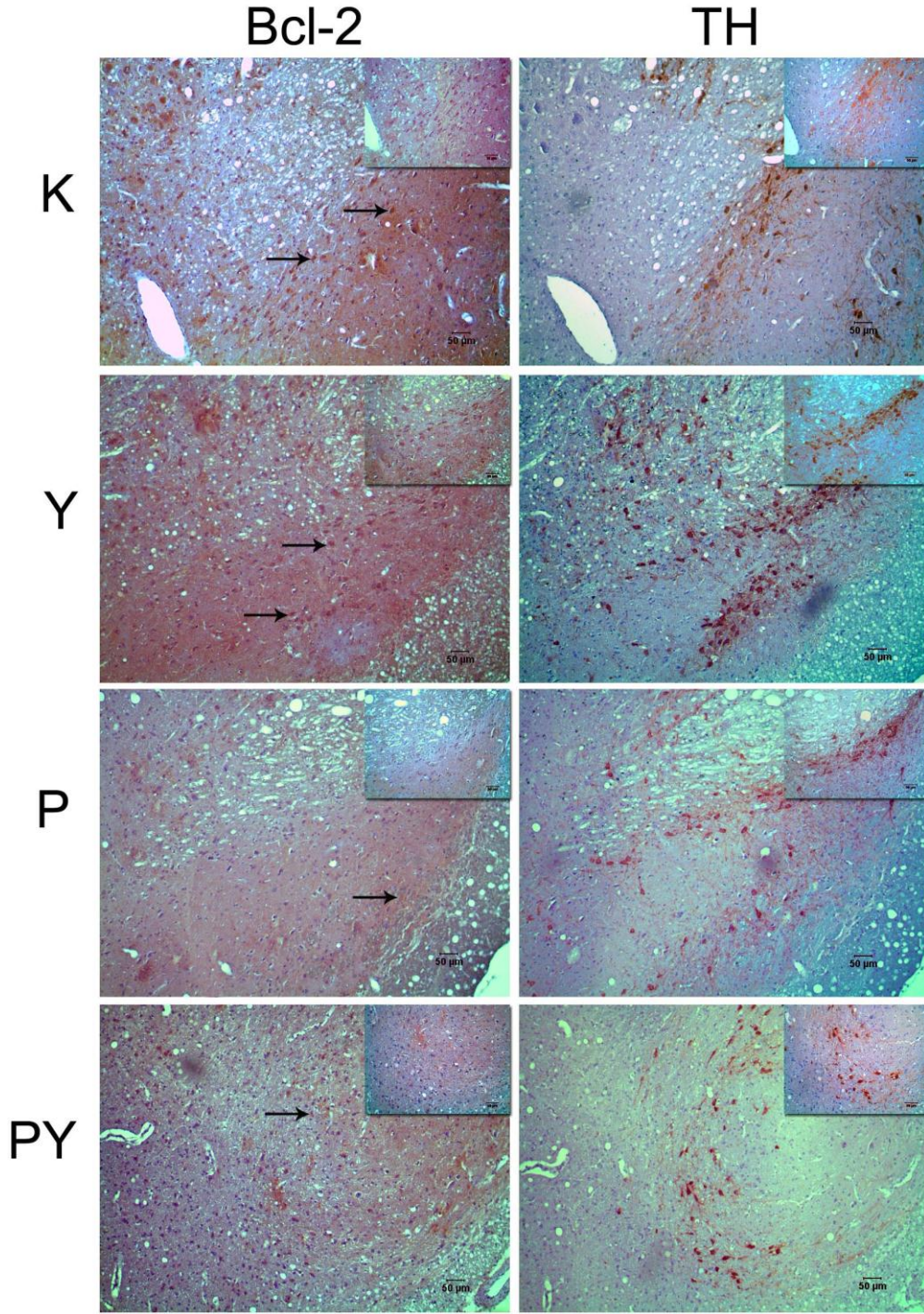
Nigral dopaminerjik nöron sayıları Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Deneklerin sağ SN’lerinde, dizayn temelli stereolojik yöntem kullanılarak sayılan dopaminerjik nöronlar beklendiği üzere P grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır. PY grubunda Y grubuna oranla önemli bir azalış tespit edilirken, P grubundan farklı olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.5. Nigral Dopaminergic Nöronların Stereolojik Sayımı
*: $p < 0,05$ düzeyinde P ve K grupları arasında fark,
 $p < 0,05$ düzeyinde PY ve Y grupları arasında fark

4.3.2. Bcl-2 İmmünreaktivitesi

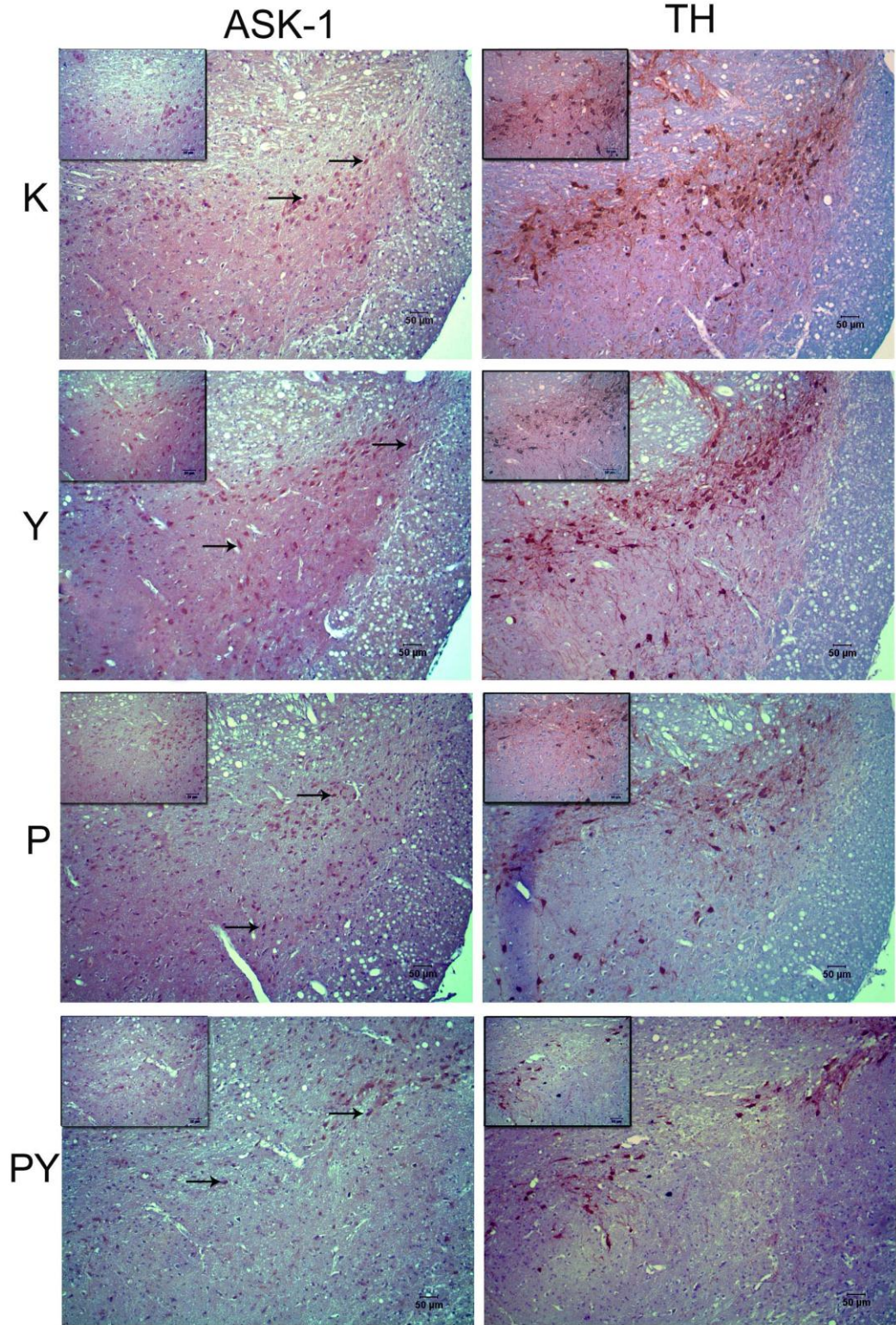
Bcl-2 immünreaktivitesi Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Bcl-2 proteini P grubunda kontrol grubuna kıyasla daha düşük immünreaktivite göstermiştir. P ve PY grupları arasında Bcl-2 immünreaktivitesi açısından bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.6. Bcl-2 immünreaktivitesi.
Büyük resim 10x, küçük resim 20x büyütme.

4.3.3. ASK1 İmmünreaktivitesi

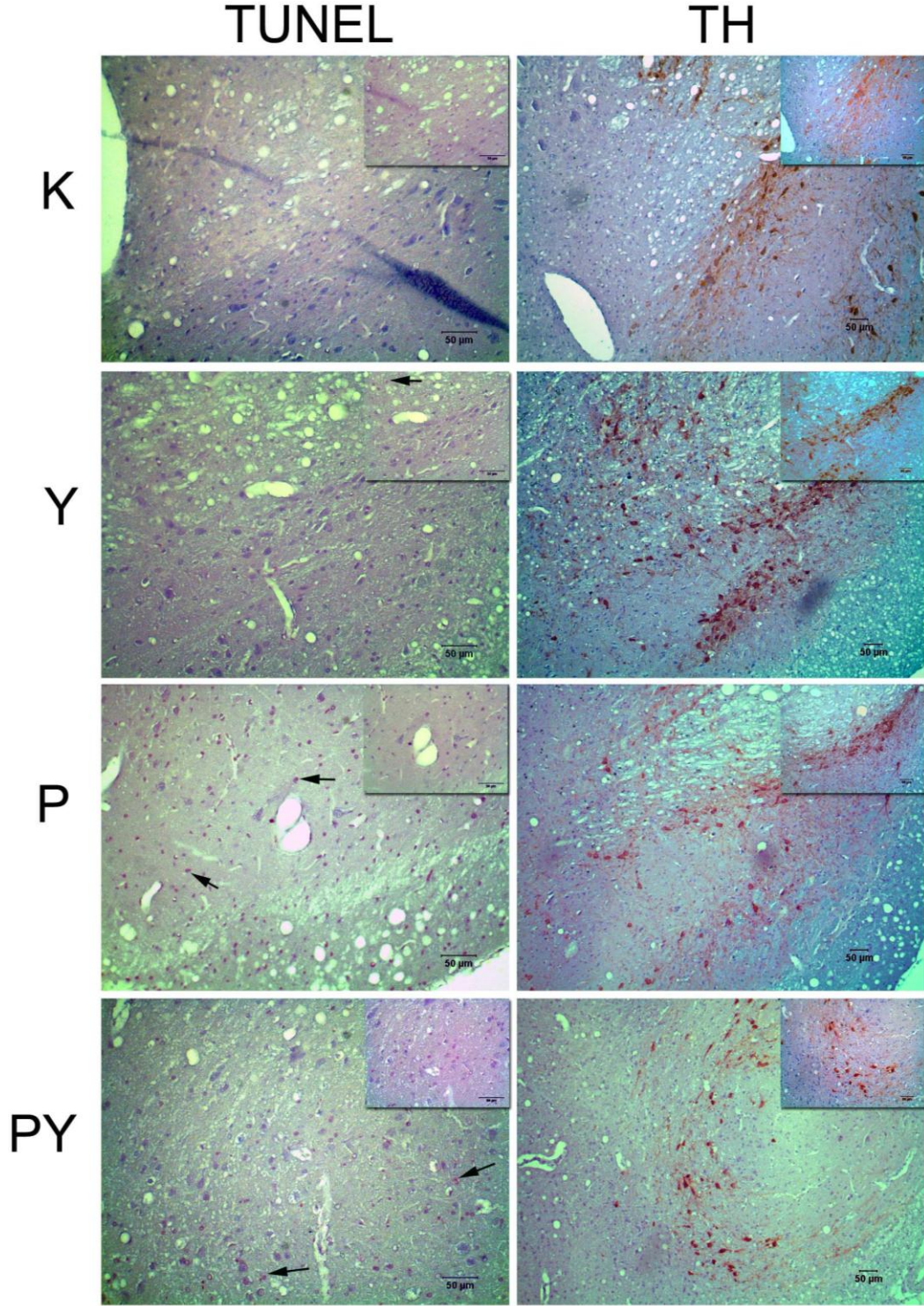
ASK1 immünreaktivitesi Şekil 4.7’de gösterilmiştir. ASK1 immünreaktivitesi açısından gruplar arasında bir fark tespit edilememiştir.



Şekil 4.7. ASK-1 İmmünreaktivitesi.
Büyük resim 10x, küçük resim 20x büyütülmeli.

4.3.4. TUNEL Analizi

TUNEL analizi sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmiştir. TUNEL testi Y, P ve PY gruplarında pozitif sonuç vermiştir. Kontrol grubunda ise TUNEL pozitif hücelere rastlanılmamıştır.



Şekil 4.8 TUNEL Analizi.

Büyük resim 20x, küçük resim 40x büyütmeli.

4.4. Biyokimyasal Parametreler

4.4.1. GSH Düzeyi

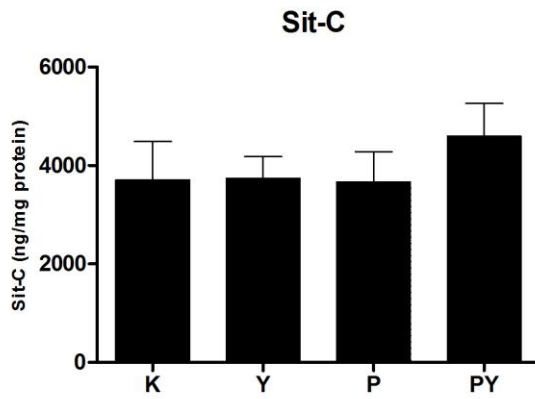
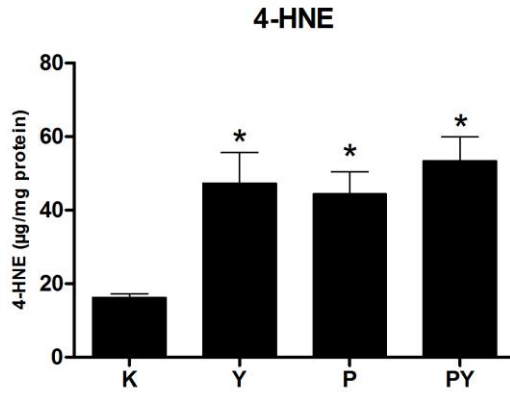
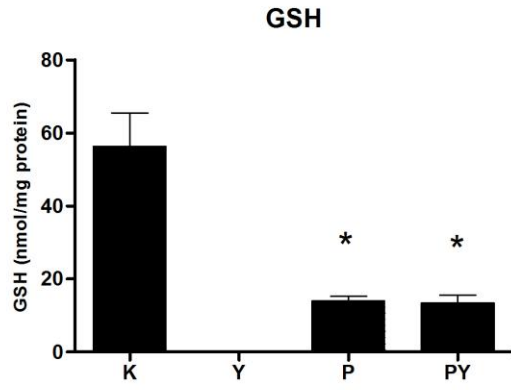
GSH düzeyleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. PH'da düştüğü bilinen nigral GSH düzeyleri beklendiği üzere P grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır. PY grubunda da K grubuna göre azalma gözlenirken, P grubundan farklı olmadığı tespit edilmiştir. Y grubuna ait GSH değerleri ise kitin ölçüm aralığının altında kalmıştır.

4.4.2. 4-HNE Düzeyi

4-HNE düzeyleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Y, P ve PY gruplarında K grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde artma tespit edilmiştir. P ve PY grupları arasında ise istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir.

4.4.3. Sit-c Düzeyi

Sit-c düzeyleri Şekil 4.9'de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanamamıştır.



Şekil 4.9. Biyokimyasal Parametreler
*: $p < 0,05$ düzeyinde K grubundan fark

TARTIŞMA

Bu çalışma sonucunda, 6-OHDA ile deneysel Parkinson modeli oluşturulan hayvanlarda kontrol grubuna göre belirgin lokomotor aktivite azalışı, katalepsi ve rotasyon gözlenmiştir. Nigral TH-pozitif nöron sayılarının ve Bcl-2 protein ekspresyonunun deneysel Parkinson grubunda kontrol grubuna oranla önemli oranda azaldığı, TUNEL-pozitif hücre sayısının ise arttığı tespit edilmiştir. ASK1 immünreaktivitesi açısından gruplar arasında bir fark tespit edilememiştir. Nigral GSH düzeyinin deneysel Parkinson grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde azaldığı, 4-HNE miktarının arttığı, sit-c seviyesinin ise değişmediği saptanmıştır. YM737 uygulanan deneysel Parkinson grubunda ise tüm bu parametreler açısından bir fark tespit edilememiştir. Bununla birlikte lezyonsuz hayvanlarda YM737 uygulaması TUNEL pozitif hücre oluşumuna, nigral GSH azalışına ve 4-HNE artışına neden olmuştur.

Deneysel Parkinson modelleri, PH'da meydana gelen nöronal hasarın patojenik doğasını kavramak, hastalığın tedavisi için yeni farmakolojik yaklaşımlar tasarlamak ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek için anahtar rol oynamaktadır. Bu modellerin bir takım eksiklikleri olsa da PH ile ilgili çalışma alanına sağladığı katkılar yadsınamaz. Özellikle son yirmi yılda, hastalığın etiyolojisi, patolojisi ve moleküler mekanizmaları hakkında edinilen bilgiler hayvan modellerine dayanmaktadır, çünkü Parkinson hastalarından otopsi materyali elde edilerek yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada deneysel Parkinson modeli oluşturmak için 6-OHDA nörotoksini tercih edilmiştir. Doğal nörotransmitter DA'nın hidroksilenmiş analogu olan 6-OHDA [271], deneysel Parkinson modeli oluşturmak için kullanılan ilk nörotoksindir [272]. 6-OHDA modeli, nöronları koruyucu ya da tamir edici stratejileri değerlendirmek için oldukça elverişli bir modeldir. 6-OHDA kan beyin bariyerini geçemediği için stereotaksik yolla uygulamayı gerektirmektedir. Çift hemisfere lezyon uygulaması PH'nın patolojisini daha iyi yansıtsa da, çalışmamızda, daha düşük ölüm riski nedeniyle, literatürde oldukça sık rastlanılan tek taraflı lezyon modeli kullanılmıştır. 6-OHDA, nigrostriatal yolakta, SN'deki hücre gövdeleri, MFB'deki aksonlar ve striatumdaki terminaller olmak üzere 3 bölgeye uygulanabilmektedir. Çalışmamızda SN'yi direkt olarak mekanik hasara uğratmamak amacıyla MFB enjeksiyon alanı olarak tercih edilmiştir. MFB lezyon modeli en çok tercih edilen modeldir, çünkü tama yakın nigrostriatal dejenerasyon ve kararlı kontralateral motor bozukluklara neden olmaktadır [55, 272-273]. Truong ve arkadaşları, PH'nın prelinik, orta ve şiddetli safhalarını taklit etmek amacıyla sıçanların MFB bölgelerine sırasıyla 4µl, 8µl ve 16µl 6-OHDA uygulamışlardır [274]. Çalışmamızda seçmiş olduğumuz 6-OHDA dozu [275], orta-şiddetli aşamaya tekabül etmektedir.

5.1. Davranışsal Değişiklikler

Motor bozukluklar PH'nın başlıca özelliklerinden biridir ve nöronal fonksiyon bozukluğunun derecesi ile davranışsal parametreler yakından bağlantılıdır [276]. Çalışmamızda lokomotor aktivite, katalepsi ve rotasyon testleri 6-OHDA ile oluşturduğumuz deneysel Parkinson modelinde davranışsal parametreler olarak irdelenmiştir.

Katalepsi, kemirgenlerde süregelen bir postür bozukluğu [264] ve istemli hareketin kaybı şeklinde tanımlanan bir motor belirtidir. Katalepsi sırasında kemirgenlerin ayakları tipik olmayan bir şekilde bir süre buldukları pozisyonda kalır. Katalepsi çoğunlukla nöroleptik ilaçların ekstrapiramidal yan etkilerinin önceden tespit edilmesinde kullanılmaktadır [263, 277]. Ancak deneysel Parkinson modellerinde de kullanılabilir bir parametre olduğu tespit edilmiştir [278]. Katalepsi davranışı, Parkinson hastalarının kas katılığı (rijidite)'na tekabül eden bir model olarak düşünülmüş, nitekim EMG kayıtlarının her iki durumda benzer olduğu gözlenmiştir [264]. Katalepsi süresinin değerlendirilmesinde yaygın olarak tel ve bar testleri kullanılmaktadır. Bu testlerin kolay uygulanabilir olması ve lezyondan sonra az miktarda geri dönüşüm göstermesi en önemli avantajlarından [278]. Bu çalışmada ise tel testi tercih edilmiş, 6-OHDA enjeksiyonu sonrasında belirgin bir katalepsi davranışı gözlenmiştir. Pek çok çalışmada, 6-OHDA'nın katalepsiye indüklediği gösterilmiştir [278-282]. Katalepsi şiddetinin 6-OHDA dozuna bağlı olduğu, lezyondan 1 gün sonra ortaya çıktığı ve çok az bir geri dönüş ile 3 aya kadar devam ettiği gösterilmiştir [278]. Çalışmamızda katalepsi şiddeti 6-OHDA enjeksiyonundan 3 gün sonra değerlendirilmiştir. Katalepsinin direkt olarak dopaminerjik hücre dejenerasyonu ile ilgili olduğu öne sürülmüştür [278]. Striatumun katalepsi davranışıyla ilgili başlıca bölge olduğu düşünülmektedir. Nitekim, bu bölgeye DA antagonistleri uygulandığında katalepsi gözlenmiştir [283-285]. 6-OHDA ile indüklenen katalepsi davranışının, dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve sonrasında striatal DA'nın azalışı ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [278]. Birer DA ajanı olan L-DOPA ve D-amfetaminin, 6-OHDA ile lezyon oluşturulmuş sıçanlarda anti-kataleptik etki gösterdiği saptanmıştır [281]. MFB'de 6µg 6-OHDA ile lezyon oluşturulan hayvanlarda belirgin bir DA azalışı (%78) ve güçlü bir katalepsi cevabı gözlenirken, 2µg 6-OHDA ile lezyon oluşturulan hayvanlarda ise kısmi bir DA azalışı (%48) tespit edilmiş, ancak katalepsi davranışına rastlanmamıştır [282]. Çalışmamızda P ve PY grupları arasında katalepsi şiddeti açısından istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir.

6-OHDA dopaminerjik nöronları hasara uğratarak belirgin bir lokomotor aktivite azalmasına neden olmaktadır. Bu etkinin dopaminerjik nöronların fonksiyon yetersizliğinin derecesi ve motor performans bozukluğu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [276]. Locomotor aktivitenin DA transmitter fonksiyonundaki değişikliklere duyarlı olduğu, DA artışının hiperaktiviteye, DA azalışının ise hipoaktiviteye neden olduğu bilinmektedir [286]. Çalışmamızda lokomotor aktivite, oluşturulan lezyon modelinin ve tedavi etkinliğinin göstergesi olarak belirlenmiş, bunun için tüm gruplar lokomotor aktivite kafeslerinde monitörize edilmiştir. Locomotor aktivite testi, duvara asılma, lokomosyon, dinlenme, yükselme, stereotipik davranış, rotasyon ve alınan mesafe gibi parametreleri içermektedir [287-

288]. Bizim çalışmamızda hayvanların lokomotor aktiviteleri, ambulatuar aktivite, vertikal aktivite, horizontal aktivite, katedilen mesafe ve toplam aktivite olarak ifade edilmiştir. Literatür incelendiğinde lokomotor aktivite testlerinin lezyon oluşturulmasından itibaren 21 gün [287] ve 30 gün [288] gibi farklı zamanlarda uygulandığı görülmektedir. Çalışmamızda lokomotor aktivite testi 6-OHDA enjeksiyonundan 3 gün sonra değerlendirilmiştir. Bortolozzi ve arkadaşları MFB'ye 6-OHDA enjeksiyonundan 3 gün sonra motor davranışın önemli düzeyde azaldığını göstermişlerdir [289]. Çalışmamızda 6-OHDA lezyonu oluşturulmuş sıçanlarda lokomotor aktivitenin azaldığı, ancak YM737 uygulamasının bu azalışa etki etmediği gözlenmiştir.

Seçici olmayan DA agonisti apomorfının enjeksiyonunu takiben gözlenen kontralateral (lezyon yönünün tersi yönünde) rotasyon davranışı [55, 290], sıçanlarda tek taraflı oluşturulan 6-OHDA lezyon modelinin güçlü bir göstergesidir [291]. Apomorfin, hem D1 hem de D2 reseptörlerine bağlanmakta, etkisi kısa sürede başlayıp 3 saat içerisinde sona ermektedir [292-293]. Striatal sinaptik çıkışta meydana gelen bir asimetri, daha az aktif olan striatonigral yolağın bulunduğu hemisfer yönünde rotasyon davranışı ile sonuçlanmaktadır [291, 294]. Apomorfin DA'nın D1 reseptörlerinin aktivasyonu ile striatonigral yolağı aktive etmekte, ancak kontrol sıçanlarında striatonigral terminallerden GABA salınımında meydana gelen artış beynin her iki hemisferinde de simetrik olduğu için herhangi bir rotasyon davranışı ortaya çıkmamaktadır. 6-OHDA ile oluşturulan tek taraflı lezyon modelinde ise lezyon oluşturulan hemisferin striatal GABAerjik projeksiyon nöronlarında bulunan DA reseptörlerinin aşırı duyarlılaşması söz konusudur [291]. D2 reseptörlerinin sayısı artarken, D1 reseptörlerindeki duyarlılaşma sinyal ileti mekanizmaları seviyesinde olup Gas-aracılı adenilaz siklaz stimülasyonuna bağlı olarak cAMP oluşumu üzerindedir [291, 294]. Rotasyon davranışı D2 ve D1 reseptörlerinin aktivasyonunu gerektirmektedir ve seçici olmayan DA agonisti apomorfının uygulanması bunu yerine getirmektedir [291]. Bununla birlikte apomorfının etkisi duyarlılaşmış striatumda daha güçlü olmakta, striatonigral nöronların D1 reseptör aracılı ateşlemeleri artmaktadır. Bu da lezyon oluşturulan hemisferdeki SNr'de bulunan sinir terminallerinden GABA salınımının artmasına neden olmaktadır [295]. Bu etkiler de SNr sinaptik çıkışında bir asimetriye ve sonuçta kontralateral rotasyon davranışına neden olmaktadır [291, 294]. Rotasyon şiddeti ile lezyon büyüklüğü arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır [274]. Nigral dopaminerjik nöronların %60'ının dejenerasyonu DA reseptörlerinin up-regülasyonuna denenebilir [296-297] güçlü bir kontralateral rotasyon için %90'ın üzerinde DA kaybının olması gerektiği bildirilmiştir [291]. Ancak başka bir çalışmada apomorfın indüklü rotasyon davranışı, %40'ın altında hücre kaybı gösteren kısmi lezyonlu hayvanlarda da gözlenmiştir [274]. Bu farklılık 0,2mg/kg [274] ve 0,5mg/kg [298] gibi daha yüksek uygulanan apomorfın dozlarına bağlanmış, düşük dozda apomorfın uygulamasının hücre kaybı az olan hayvanlarda davranışsal aşırı duyarlılaşmayı yansıtamayabileceği yorumu getirilmiştir [274]. MFB'ye 6-OHDA uygulanan sıçanlarda striatal DA düzeyleri şiddetli bir şekilde azalmış (kalan DA seviyesi < %5), belirgin kontralateral rotasyon davranışı gözlenmiş ve bu davranış denerve bölgedeki aşırı duyarlılaşmış dopaminerjik reseptörlerin uyarılmasına bağlanmıştır [289]. Bu sonuç Ungerstedt tarafından 1971'de öngörülen dönme davranışının paterninin DA denervasyon derecesiyle

ilişkili olduğu fikrini desteklemektedir. 6-OHDA lezyonu oluşturulan sıçanlarda DA'nın D2 reseptörü aracılı rotasyon cevabına NMDA reseptörlerinin katıldığı gösterilmiştir [299]. Çalışmamızda, beklendiği üzere, tek taraflı 6-OHDA lezyonundan sonra apomorfine bağlı olarak sıçanlar belirgin bir dönme davranışı sergilemişlerdir. Ancak P ve PY grubu arasında bu test açısından bir fark tespit edilememiştir.

5.2. Histolojik Değişiklikler

Histolojik parametreler deneysel Parkinson modellerinde hem modelin başarısını sınamak hem de nöroprotektif ajanların etkinliğini test etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda TH, ASK1 ve Bcl-2 immünreaktivite ve TUNEL testi 6-OHDA ile oluşturduğumuz deneysel Parkinson modelinde histolojik parametreler olarak irdelenmiştir.

TH enzimi katekolamin sentezindeki hız kısıtlayıcı enzimdir. Tirozin aminoasitiyle başlayan DA sentez basamaklarında L-tirozinden L-DOPA oluşumu TH enzimi tarafından katalizlenmektedir. L-DOPA ise aromatik L-aminoasit dekarboksilaz enzimi tarafından hızla DA'ya dönüştürülmektedir. Beyinde TH-pozitif hücrelerin en yoğun toplandığı alan SN'dir [300]. SN'deki hücre gövdelerinin çözünebilir TH enzimini içerdiği gösterildikten sonra dopaminerjik nöron sayılarının belirlenmesinde sık sık kullanılan TH, nöronal kaybı belirleyebilmek için hem biyokimyasal hem de immünohistokimyasal yöntemlerle ölçülebilmektedir [301-302]. Çalışmamızda nigral dopaminerjik nöronların sayısını belirlemek amacıyla TH immünreaktif (TH-IR) nöronlar Optik Fraksiyon probu ile dizayn temelli stereolojik yöntem kullanılarak sayılmıştır. Stereoloji metodu, tekrarlanabilirlik ve zaman kazandırıcı özelliklerinden dolayı oldukça kabul gören niceliksel bir metottur [303-304]. Daha önce SN üzerine yapılan stereolojik çalışmalar, sıçan, primat ve Parkinson hastası olan ya da olmayan insanları kapsamakta [303, 305-309] ve fraksiyoner ya da optik dissektör metoduna dayanmaktadır. Ayrıca 6-OHDA ile lezyon oluşturulan sıçanlarda da nigral dopaminerjik nöron sayısını belirlemek amacıyla bu metod kullanılmaktadır [310-312]. Çalışmamızda MFB'ye 6-OHDA enjeksiyonu, SN'de TH-IR hücre sayısını kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde (%57) azaltmıştır. Lezyon oluşturulan hayvanlara YM737 uygulaması ise TH-IR nöron sayısına etki göstermemiştir. Janson ve Moller 1993'de ilk olarak SN'de TH immünreaktivitesini stereolojik yöntemle değerlendirmiş, daha sonra immünohistokimyanın stereolojik çalışmalardaki kullanımı yaygınlaşmıştır [305, 309]. Stereolojik teknikler için immünohistokimya uygulaması teorik olarak basit olmasına rağmen, çok iyi kesit kalitesi gerektirmektedir. Kullanılan antikorun tüm kesite yayılabilmesi ve kesitte ilgilenilen nöronlardan boyanmayan nöron kalmaması önemlidir. Zaman alıcı özelliğine rağmen iyi bir nöron morfolojisi sağladığı için parafin kesitler stereolojik sayım için tercih edilmektedir [313].

Apoptoz oldukça iyi düzenlenen bir hücresel süreçtir ve iki alternatif mekanizma içermektedir. Bunlardan biri ölüm reseptörü aracılı "ektrensek apoptotik yolak", diğeri ise mitokondri aracılı "intrensek apoptotik yolak"tır. Bcl-2 ailesi hem

pro-apoptotik hem de anti-apoptotik özellikteki proteinleri kapsamakta ve bu üyelerin birbirleriyle etkileşimi mitokondriyal ölüm yolağını kontrol etmektedir [217]. Bcl-2, ER membranları, nükleer kılıf ve mitokondri dış membranına yerleşmiş olan bir integral membran proteindir [314]. Bcl-2, mitokondri membran potansiyelini düzenler, mitokondriyal geçirgenliği, sit-c salınımını [315] ve akabinde meydana gelen kaspaz aktivasyonunu [316] engeller. Kaspazların inaktivasyonu, çekirdek ve stoplazmanın başlıca yapısal peptidlerinin parçalanmasını ve bunun sonucunda meydana gelecek morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri engeller [316]. Bcl-2, pro-apoptotik Bax ile bağlanarak Bax:Bcl-2 heterodimerini oluşturur, ve böylece Bax'ın fonksiyonunu engeller [317]. Ayrıca anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin, GSH azalışını önleyerek 6-OHDA toksisitesini engellediği bilinmektedir [318]. Bcl-2 proteininin oksidatif stres ile ilişkisi de ortaya konmuştur. Chung ve arkadaşları Bcl-2 ekspresyonunun ROS oluşumunu inhibe ettiğini göstermişlerdir [319]. Ayrıca PC12 hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunun artırılması H₂O₂ uygulaması sonucu oluşan lipid peroksidasyonu azaltmış [320], Bcl-2'den yoksun fareler ise yüksek oksidatif stres indeksi sergilemişlerdir [321]. 21kDa ağırlığındaki pro-apoptotik protein Bax ise p53 indüklü apoptoza aracılık etmektedir. Belirli bir apoptotik uyarana maruziyet sonucunda stoplazmik Bax'ın mitokondriyal membrana translokasyonu mitokondriyal membran potansiyelinde azalışa ve mitokondri geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır [322]. Pro-apoptotik Bax ve Bak proteinlerinin sit-c salınımını uyardığı gösterilmiştir [323]. Dolayısıyla hücrenin Bcl-2/Bax ekspresyon oranı apoptoz için önemli role sahiptir [324]. Çalışmamızda nigral dopaminerjik nöronlarda Bcl-2 proteininin eksprese edildiği immünohistokimyasal yöntem ile gösterilmiştir. Bu ekspresyon düzeyi 6-OHDA uygulamasından 3 gün sonra düşmüştür. Bcl-2 ekspresyonunda meydana gelen bu azalış zamanlama açısından literatür bilgisi ile uyum göstermektedir [325]. Nigral Bcl-2 proteininin ve gen ekspresyonunun 6-OHDA uygulaması ile azaldığı sıçanlarda [326] ve PC12 hücrelerinde [327] gösterilmiştir. Ayrıca Bcl-2 azalışına ek olarak 6-OHDA uygulaması ile Bax ekspresyonunun arttığı dolayısıyla Bcl-2/Bax oranının azaldığı tespit edilmiştir [327]. Bununla birlikte, farelerde ve PC12 hücrelerinde fazla Bcl-2 ekspresyonunun hücreyi nörotoksin indüklü nörodejenerasyona karşı koruduğu gösterilmiştir [328]. Çalışmamızda YM737 uygulamasının 6-OHDA'nın Bcl-2'yi azaltıcı etkisini değiştirmediği tespit edilmiştir.

Resesif kalıtsal PH'da, antioksidan aktiviteye sahip nöroprotektif özellikteki DJ-1 proteinini kodlayan DJ-1 geninin mutasyona uğradığı bilinmektedir [329]. Redoksa duyarlı DJ-1 proteini, hücreyi ASK1 sinyal yolağının aktivasyonunu engelleyerek koruduğu [330] için, ASK1 yolağının Parkinson patogenezi katılımlı öne sürülmüştür. Mitokondriyal apoptoz yolaklarının iki üst düzenleyicisi olan JNK ve p38 yolaklarının oksidatif stres ile aktive olduğu kültür hücreleri [331], hayvan modelleri [332] ve postmortem beyinlerde [172, 333] gösterilmiştir. Dolayısıyla PH'da meydana gelen dopaminerjik nöron ölümünde bu yolakların kritik olduğu düşünülmektedir. Dopaminerjik nöronlarda JNK ve p38 aktivasyonuna neden olan üst mekanizma tam olarak bilinmese de ASK1 anahtar enzim gibi görünmektedir [334]. MPTP, 6-OHDA ve parakuat ile oluşturulan deneysel Parkinson modellerinde ASK1'in aktive olduğu tespit edilmiştir [249, 334-335]. Yapılan postmortem bir çalışmada Parkinsonlu hastaların nigral p-ASK1 ekspresyonlarının normal bireylere kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir [336]. Ayrıca ASK1 ekspresyonu düşürülmüş

farelerde 6-OHDA toksisitesinin azaldığı tespit edilmiştir [336]. Farede ASK1 ekspresyonu bloklandığında, MPTP intoksikasyonunu takiben meydana gelen dopaminerjik nöron kaybının hafiflediği, striatum ve SN'de glial aktivasyonun baskılandığı gösterilmiştir [337]. Çalışmamızda ASK1 immünreaktivitesi açısından gruplar arasında bir fark tespit edilememiştir. ASK1 ekspresyonunun MPTP uygulamasından 12 saat sonra arttığı gösterilmiş olsa da [249] ASK1'in aktif formu olan p-ASK1'in immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

Çalışmamızda nigral apoptozu belirleyebilmek için SN dokusunu içeren beyin kesitlerinde TUNEL analizi uygulanmıştır. Apoptotik hücreleri belirlemede morfolojik kriter "altın standart" olarak kabul edilmektedir [338]. Apoptotik hücre morfolojisi, hücrelerde büzülme, kromatin yoğunlaşması ve küresel ya da hilal şeklinde kromatin kümelerinin oluşumu olmak üzere 3 özellik ile tanımlanmaktadır. TUNEL metodu da apoptotik çekirdekleri belirleyebilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [339]. TUNEL-pozitif hücrelerin çekirdekleri genellikle biraz büzülmüş ve yuvarlak, diğer nöronların çekirdeklerinden daha küçük, bazen de fragmanlara ayrılmış bir morfoloji sergiler [340]. Kontrol kesitlerinde birkaç TUNEL pozitif hücreye rastlanmaktadır. TUNEL analizi, serbest 3'-OH ucun modifiye nükleotidlerle işaretlenmesiyle düşük moleküler ağırlıklı DNA fragmanları ya da tek zincirli kırıkların belirlenmesine dayanmaktadır. Enzimatik reaksiyon, nükleotidlerin DNA'nın serbest 3'-OH uçlarına polimerizasyonunu sağlayan terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile katalizlenmektedir. Bu metod DNA zincirindeki kırıkları işaretlemektedir. Daha sonra birleşmiş nükleotidler peroksidaz ile konjuge edilmiş bir antikor ile belirlenebilmektedir. Substrat reaksiyonundan sonra boyanmış hücreler ışık mikroskopunda gözlenebilmektedir. Çalışmamızda 6-OHDA uygulanan hayvanların SN bölgelerinde apoptotik morfoloji sergileyen TUNEL pozitif hücreler gözlenmiştir. Bu gözlem 6-OHDA modelinde dopaminerjik nöronal ölümün apoptotik olduğu görüşünü desteklemektedir. Nöronal nekrotik ölümün (şok, travma, enfeksiyon) tersine apoptotik hücreler içeriklerini çevre dokuya boşaltmadıkları için apoptozun indüklediği inflamatuvar cevap sınırlıdır. Parkinsonlu hastaların beyinlerinde yapılan post-mortem çalışmalarda nöronal popülasyonun geniş bir bölümünün (%5-11) apoptoz belirtileri sergilediği tespit edilmiştir [341]. 6-OHDA'nın MFB'ye enjeksiyonundan sonra kısa süreli morfolojik etkilerini araştıran bir çalışmada TUNEL boyanmasının lezyondan 6 saat sonra gözlendiği, 48 saat sonra ise nörotoksitenin pik yaptığı bildirilmiştir [342]. Ancak 6-OHDA uygulamasından 3 hafta sonra bile SN'de TUNEL pozitif nöronlar tespit edilebilmiştir [343]. Bunların yanında striatuma 6-OHDA enjeksiyonu sonrasında 1-14 gün [325] ve 3 gün-12 hafta [344] gibi farklı zaman aralıklarında SN'de TUNEL pozitif nöronlar araştırılmış ancak tespit edilememiştir. Çalışmamızda YM737'nin lezyonlu hayvanlarda apoptotik hücre oluşumunu engelleyici bir etkisinin olmadığı, bununla birlikte sağlıklı hayvanlarda TUNEL-pozitif hücre oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir.

5.3. Biyokimyasal Değişiklikler

Çalışmamızda nigral GSH, 4-HNE ve sit-c düzeyleri, 6-OHDA ile oluşturduğumuz deneysel Parkinson modelinde biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir.

PH'da nigral GSH seviyelerinin %50 oranında azaldığı 20 yıldır bilinmektedir [3, 132] ve pek çok laboratuvar tarafından doğrulanmıştır. Parkinsonda GSH azalışının mekanizması açık olmadığından GSH düzeyini sürdürülebilmek için hangi yaklaşımın en doğru olacağı tartışma konusudur. Tedavi için ilk akla gelen periferik GSH uygulamasıdır. Ancak GSH yapısında bulunan sistein-SH grubu nedeniyle kan beyin bariyerini kolayca geçemez ve beyinde nöronal hücreler tarafından etkili bir şekilde alınmaz. YM737 ve GSH uygulamalarının etkinlikleri GSH düzeyinin azaldığı pek çok patolojik durumda karşılaştırılmıştır. Hipoksi/hipogliseminin neden olduğu presinaptik potansiyellerdeki ve sinir terminallerinin aktivitesini yansıtan [187] 2-deoksiglukoz alınımındaki azalışlar üzerine YM737'nin GSH'a göre daha koruyucu etki sergilediği tespit edilmiştir [14]. YM737'nin hippokampal kesitlerdeki bu fonksiyon düzeltici etkisinin lipid peroksidaz cevabını azaltarak yaptığı gösterilmiştir [14]. Ayrıca, YM737'nin GSH'a göre daha güçlü radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [11]. Bilateral karotid arter oklüzyonu yapılan sıçanlarda düşük GSH seviyelerinin YM737 uygulaması ile tamamen restore edilmesi, GSH uygulamasının ise etki etmemesi [188] YM737'nin hücrelere daha iyi taşındığını göstermektedir. Bunlara ek olarak, orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan beyin iskemi modelinde YM737 uygulaması hem ödem gelişimini hem de GSH azalışını hafifletmiştir [189]. Yamamoto ve arkadaşları YM737'nin sıçanlarda serebral iskemiye karşı koruyucu etkiler sergilediğini, mortaliteyi azalttığını, MDA düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir [15]. Maeno tarafından yapılan çalışmaya göre YM737 ve GSH, hipoksantin-ksantin oksidaz sisteminde benzer radikal süpürücü aktivite sergilemişlerdir [183]. Bu nedenle YM737'nin GSH'a göre daha güçlü anti-oksidan etki göstermesi, hücrelere daha kolay girebilmesine ve GSH azalışını hafifletebilmesine bağlanmıştır [15]. Ayrıca, YM737 uygulamasının, serebral hematoma oluşturulan sıçanlarda meydana gelen nörolojik bozuklukları azalttığı, MDA artışını hafiflettiği gösterilmiştir [184]. Sol inen arterin bağlanmasıyla kalbin sol ventrikülünde meydana gelen iskemik alanlarda GSH düzeyinin azaldığı gösterilmiştir [190]. Buna dayanarak, izole kalp çalışmasında, kardiyoplejik solüsyona serbest radikal süpürücü olarak YM737 eklenmiş, özellikle izovolumetrik sol ventrikül fonksiyonu ve ventrikül kompliansı açısından korunma sağladığı gözlenmiştir [191]. Yaşlı insanlarda gözlenen katarakt hastalığının lenste meydana gelen GSH azalışı ile ilişkili olduğu bilinmektedir [192]. Ancak dokuya etkili bir şekilde nüfuz edemediği için GSH uygulaması başarılı bir tedavi sağlayamamıştır. Ratlara intraperitoneal yolla 500mg/kg dozda YM737 uygulandıktan 15 dakika sonra plazma ve aköz humörde GSH-ester tespit edilmiştir. Enjeksiyondan 4 saat sonra ise sıçanların lenslerinde GSH düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu GSH-esterin aköz humörden lense taşındığını ve burada GSH'a çevrildiğini göstermektedir. Aynı çalışmada YM737 uygulamasının, X-ray indüklü lens opaklaşmasını geciktirdiği, 27 hafta boyunca lensteki GSH düzeylerini normal seviyede tuttuğu gösterilmiştir [193]. Tüm bu olumlu etkilerinden dolayı çalışmamızda YM737 deneysel Parkinson modelinde nigral GSH düzeyini yükseltebilecek ajan olarak seçilmiştir. Çalışmamızda YM737 literatürdeki genel uygulama biçimine uygun olarak intraperitoneal yolla, serebral iskemiye karşı koruyucu etki gösteren ve MDA'yı

azatan dozda (300mg/kg) [15] uygulanmıştır. Çalışmamızda nigral GSH düzeyi beklendiği üzere 6-OHDA uygulamasının ardından kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalmıştır. YM737 uygulaması lezyonlu hayvanlarda GSH azalışını engelleyememiş, dahası sağlıklı hayvanlarda GSH düzeyini ölçülemeyecek düzeyde azaltmıştır. Yapılan bir çalışmada sıçanlara intravenöz yolla 300mg/kg dozda GSH ve GSH izopropil ester uygulanmış ve 30 dakika sonra BOS'ta bu tiyollerin ve metabolitlerinin seviyeleri ölçülerek BOS'a taşınımları değerlendirilmiştir [345]. GSH izopropil ester uygulaması ile BOS'ta GSH seviyesinin %32 oranında arttığı, GSH uygulamasının ise BOS'ta GSH'ı arttırmadığı, ancak GSH metabolitlerinden sisteinilglisin ve sistein artışına neden olduğu tespit edilmiştir [345]. GSH izopropil esterinin, koroid pleksusta GSH metabolizmasından sorumlu enzim olan γ -GT enzimine afinitesinin düşük olduğu, GSH'a göre daha az metabolize olduğu ve BOS'ta daha stabil kaldığı bildirilmiştir [345]. Ancak glutasyon izopropil esterinin dopaminerjik nöronlara taşınımı ve bu hücrelerde GSH düzeyleri üzerine etkisi bilinmemektedir. Literatürde, nigral GSH düzeyini arttırmak için yapılan girişimlerin çeşitli toksik etkiler içerdiği görülmektedir. Hücresel GSH düzeyini hızla yükselten GSH etil ester türevinin toksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir [11, 194, 346-347]. Aynı miktarda GSH uygulaması toksisiteye neden olmadığı için GSH etil esterinin toksik etkisi etil ester motifine bağlanmıştır. Bir çalışmada ise GSH etil esterinin toksisitesi etanol oluşumundan çok ester grubuna atfedilmiştir [348]. GSH etil esterinin bu toksik etkileri in-vivo kullanımı için sınırlamaları göstermektedir [7]. Bununla birlikte GSH substratlarından sisteinin öncülü NAC'ın yüksek dozlarda uygulandığında nöronal kayıp ve glial aktivasyon gibi toksik etkiler yarattığı gösterilmiştir [349]. Bizim çalışmamızda YM737 uygulaması nigral GSH düzeyini beklenenin aksine azaltmıştır. Çeşitli nedenlerle bu toksisite ortaya çıkmış olabilir. Bunlardan biri YM737'nin bir kısmının γ -GT enzimi tarafından metabolize olması olabilir. Bu reaksiyon ekstraselüler sisteinilglisin ve sistein düzeyini arttıracaktır. Sisteinin glutamatın NMDA reseptörlerine bağlanarak eksitotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda YM737 uygulanan grupta TUNEL pozitif hücrelerin gözlenmesi bu toksisiteden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca YM737 uygulaması sonrasında dopaminerjik hücrelere alınan YM737 hücresel GSH düzeyini yükselterek GSH yapımından sorumlu olan GCL enzimini inhibe ediyor olabilir. *De novo* GSH yapımındaki bu inhibisyon GSH sentezinde kullanılan glutamatın hücresel düzeyinin artışına neden olabilir. Glutamat ve sistein hücre membranında bulunan Xc- aminoasit taşıyıcı sistem ile karşılıklı taşınmaktadır [92]. Hücre içerisindeki glutamat artışı ve aynı zamanda ekstraselüler kompartmanda sistein artışı Xc- taşıyıcısından hücre içine sistein hücre dışına ise glutamat taşınmasına neden olabilir. Bununla birlikte kanser, HIV enfeksiyonu, omurilik ve beyin hasarı gibi durumlarda ya da yüksek seviyede glutamat içeren hücre kültürü ortamında sistein alınımının glutamat ile inhibe edildiği, bunun da GSH sentezinde azalışa neden olduğu bildirilmiştir [350]. Glutamat eksitotoksitesinin astrositlerde hücresel GSH düzeyini azalttığı ancak hücreyi ölüme götürmediği gösterilmiştir [351]. Bizim çalışmamızda YM737 uygulaması ile meydana gelen GSH azalışı da glutamat eksitotoksitesinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca ekstraselüler GSH seviyesinde meydana gelen bir artışın NMDA-aracılı eksitotoksisiteyi [352] ve deneysel iskemiye karşı hücre hassasiyetini [353] arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı GSH seviyesini yükseltmek yerine normal fizyolojik seviyelerin sürdürülmesinin amaç olması gerektiği bildirilmiştir [90].

Lipidlerin oksidatif hasarı sırasında oluşan aldehitlerin başında 4-HNE gelmektedir. Lipid peroksidasyonun birincil ürünlerinden fosfotidilkolin hidroperoksit (PCOOH), enzimatik olmayan bir reaksiyonla ikincil ürünlerden 4-HNE [354] ve MDA'ya [355] dönüşür. Düşük konsantrasyonlardaki 4-HNE, kısa bir sürede düşük toksisiteli ya da toksik olmayan metabolitlere çevrilmiştir [356-357]. Oksidatif stres altında ortaya çıkan sitotoksik etkilerin pek çoğundan 4-HNE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir [355, 358]. 4-HNE çeşitli zararlı etkilerini, DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ederek, belirli enzim aktivitelerini (Na-K ATPaz gibi) engelleyerek ve ısı-şok proteinlerini indükleyerek göstermektedir [355]. 4-HNE'nin membran ile kaynaştığı ve dolayısıyla membran akışkanlığını etkilediği öne sürülmektedir. Ayrıca 4-HNE, proteinlerle reaksiyona girerek kararlı bileşikler oluşturur. Bu modifiye proteinler, oksidatif stres kaynaklı hücre hasar göstergelerinden biridir ve hücre birikimleri çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir [359-360]. Ayrıca 4-HNE'nin en güvenilir lipid peroksidasyon indeksi olduğu düşünülmektedir. PLA2 tarafından oluşturulan metabolitler içinde en sitotoksik olanı 4-HNE'dir [361]. 4-HNE'nin apoptotik hücre ölümü ile ilişkili olduğu [362], Alzheimer ve PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda ve iskemi, omurilik hasarlanması ve kafa travmasında belirgin düzeyde arttığı bilinmektedir. Çalışmamızda YM737'nin dopaminerjik nöronları oksidatif strese karşı koruyup korumadığını belirlemek için oksidatif stres göstergesi olarak nigral 4-HNE düzeyi ölçülmüştür. Beklendiği üzere 6-OHDA enjeksiyonu nigral 4-HNE düzeylerini arttırmıştır. Ancak lezyonlu hayvanlara YM737 uygulaması artan 4-HNE düzeyi üzerine düzeltici bir etki göstermemiştir. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak, 6-OHDA uygulanan sıçanların SN kesitlerinde güçlü bir 4-HNE immünreaktivitesi gözlenmiştir [363]. MPTP uygulanan farelerin nigrostriatal yolaklarında 4-HNE birikimi [364] ve orta beyin bölgesinde 4-HNE protein artışı [365-366] bildirilmiştir. Ayrıca, Parkinsonlu hastaların post-mortem analizinde nigral dopaminerjik nöronlarda proteinlere bağlı 4-HNE'nin aynı yaştaki kontrollere kıyasla arttığı gösterilmiştir [99]. 4-HNE düzeyinde meydana gelen bu artış, nigral GSH seviyelerinde meydana gelen azalışı yansıtıyor olabilir. Nitekim GSH'nin 4-HNE'yi de kapsayan aldehitlerin detoksifikasyonunda önemli bir rolü olduğu bilinmektedir [366]. GSH'nin GST katalizörülüğünde 4-HNE ile reaksiyona girerek daha az reaktif bir konjugat oluşturduğu ve böylece 4-HNE'nin membrana kaynaşmasını engellediği [366-368], aynı zamanda 4-HNE ile protein konjugasyonunu blokladığı gösterilmiştir [369]. Bizim çalışmamızda 6-OHDA uygulaması sonrasında nigral GSH seviyesinde meydana gelen azalma ve 4-HNE düzeyinde meydana gelen artma bu düşüncüyü desteklemektedir. Hücre GSH düzeyinde yapılan manipülasyonların kardiyovasküler hücrelerdeki 4-HNE toksisitesini dramatik bir şekilde değiştirdiği gösterilmiştir [370-371]. Bizim çalışmamızda yalnızca YM737 uygulanan hayvanlarda GSH düzeyinin tespit edilemeyecek düzeyde azalması ve 4-HNE düzeylerinin de kontrole oranla belirgin düzeyde artması GSH ve 4-HNE arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu iki veriden anlaşılacağı üzere sağlıklı hayvanlara seçilen dozda YM737 uygulaması sitotoksik etki oluşturmuştur.

Mitokondri bağımlı hücre ölümü için kaspaz proteazların aktivasyonu önemlidir. Kaspaz aktivasyonu, nörotoksinleri de kapsayan pek çok apoptotik sinyale cevap olarak salınan sit-c tarafından tetiklenebilir [372-373]. Fizyolojik koşullarda

ETZ'de elektronların kompleks III'den kompleks IV'e aktarılmasını sağlayan sit-c sitozolde kaspaz aktivasyonu için kofaktör özellik kazanır. Bcl-2 ailesi üyeleri sit-c salınımını kontrol etmektedir. Bunun için iki mekanizma öne sürülmektedir. İlki pro-apoptotik proteinlerin mitokondri dış membranında, sit-c'nin sitozole salınımını sağlayan bir protein kanalı oluşturmaları [374-375] ikincisi ise pro-apoptotik proteinlerin, VDAC içeren ve iç ve dış mitokondri membranları boyunca uzanan permeabilite geçiş kanal (PTP) kompleksi ile etkileşimidir [376-378]. Sitozolde ATP varlığında sit-c, Apaf-1 ve pro-kaspaz-9'un etkileşmesiyle kaspaz-9 aktive olur [372-373]. Aktive olan kaspaz-9, kaspaz-3 ve diğer kaspazların aktifleşmesini sağlar. Kaspazlar, hücre iskelet proteinleri, fodrin ve DNA tamir enzimi poly(ADP riboz) polimeraz gibi hücre homeostazisi için önemli olan pek çok proteininin degradasyonuna neden olur [379]. Ayrıca aktif ASK1'in de sit-c salınımı ve kaspaz aktivasyonuna neden olduğu, dolayısıyla mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir [380]. PH'da sit-c aracılı nöronal ölüm hem Parkinsonlu hasta beyinlerinde hem de deneysel murin modellerinde gösterilmiştir [381-382]. 6-OHDA uygulaması sonrası hücre ölümü kaspaz bağımlı (mitokondriden sit-c salınımı ile) veya kaspaz bağımsız olabilir [383]. In-vitro bir çalışmada, 6-OHDA varlığında hücre içi sit-c düzeyinin ve kaspaz-3 enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiştir [384]. PC12 hücrelerinde 6-OHDA indüklü sit-c salınımında JNK2'nin merkezi düzenleyici olduğu tespit edilmiştir [385]. Çalışmamızda nigral sit-c seviyeleri açısından gruplar arasında bir fark tespit edilememiştir. Literatür incelendiğinde sit-c'nin genellikle partikülatta (mitokondri ile birlikte) ve sitozolde olmak üzere 2 fraksiyonda ölçüldüğü görülmektedir. Dolayısıyla denekler feda edildikten hemen sonra mitokondriyel ve sitozolik fraksiyonların ayrılması ve bu fraksiyonlarda ölçülen sit-c seviyelerinin birlikte yorumlanması daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Çalışmamızda gruplar arasında önemli bir fark bulamamamızın nedeni bu faktöre bağlı olabilir. Elde ettiğimiz sonuç ile ilgili ikinci bir ihtimal hayvanların fedası ile ilgili zamanlama olabilir. 6-OHDA'ya maruz bırakılan MN9D hücrelerinde sitozole sit-c salınımı zamana bağlı bir biçimde gerçekleştiği gösterilmiştir [386]. Bununla birlikte Kouroku ve arkadaşları sit-c salınımının ve kaspaz-3 aktivasyonunun inhibe edilmesinin her zaman hücreyi ölümden korumadığını göstermişlerdir [387].

Sonuç olarak bu çalışma ile periferik YM737 uygulamasının, 6-OHDA nörotoksini ile oluşturduğumuz deneysel Parkinson modelinde ortaya çıkan davranışsal, histolojik ve biyokimyasal değişikliklere düzeltici etkisinin olmadığı, sağlıklı hayvanlarda GSH ve 4-HNE gibi biyokimyasal ve TUNEL gibi histolojik parametreler açısından zararlı etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Çalışmamız, literatürde çeşitli patolojilere karşı koruyucu etkileri gösterilen YM737'nin bir GSH analogu olarak deneysel Parkinsonda etkinliğini test eden ve kullanılan dozda nigral nöronlar için zararlı olabileceğini gösteren ilk çalışma olmasından dolayı önem taşımaktadır. PH'da meydana gelen nigral GSH azalışını engelleyecek yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

SONUÇLAR

1. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan grupta belirgin lokomotor aktivite azalışı, katalepsi ve rotasyon gözlenmiştir.
2. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan grupta nigral TH-pozitif nöronların kontrol grubuna göre önemli bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.
3. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan grupta Bcl-2 protein yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir.
4. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan grupta TUNEL-pozitif hücreler belirlenmiştir.
5. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan grupta GSH düzeyinin kontrol grubuna göre önemli bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.
6. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan grupta 4-HNE düzeyinin kontrol grubuna göre önemli bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.
7. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan grupta sit-c düzeyinin ise değişmediği saptanmıştır.
8. YM737 uygulanan deneysel Parkinson grubunda ise tüm bu parametreler açısından deneysel Parkinson modeli oluşturulan gruba göre bir fark tespit edilememiştir.
9. Sağlıklı hayvanlarda YM737 uygulaması sonucunda TUNEL-pozitif hücreler gözlenmiş, GSH düzeyi ölçülemeyecek düzeyde azalmış, 4-HNE düzeyi artmıştır. Daha önce gösterilmemiş olan YM737'nin kullanılan dozdaki toksik etkileri literatüre kazandırılmıştır.
10. Sonuç olarak 6-OHDA ile oluşturduğumuz deneysel Parkinson modelinde gözlenen davranışsal, histolojik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine bir GSH analogu olan YM737'nin düzeltici etkisi gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Przedborski, S., *Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2005. **11 Suppl 1**: p. S3-7.
2. Martin, H.L. and P. Teismann, *Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease*. FASEB J, 2009. **23**(10): p. 3263-72.
3. Riederer, P., et al., *Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains*. J Neurochem, 1989. **52**(2): p. 515-20.
4. Sofic, E., et al., *Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 1992. **142**(2): p. 128-30.
5. Lash, L.H., *Role of glutathione transport processes in kidney function*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **204**(3): p. 329-42.
6. Dolphin, D., R. Poulson, and O. Avramovic, *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*. 1989, New York: Wiley.
7. Zeevalk, G.D., et al., *Characterization of intracellular elevation of glutathione (GSH) with glutathione monoethyl ester and GSH in brain and neuronal cultures: relevance to Parkinson's disease*. Exp Neurol, 2007. **203**(2): p. 512-20.
8. Kannan, R., et al., *Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat*. J Clin Invest, 1990. **85**(6): p. 2009-13.
9. Cornford, E.M., et al., *Blood-brain barrier restriction of peptides and the low uptake of enkephalins*. Endocrinology, 1978. **103**(4): p. 1297-303.
10. Schulz, J.B., et al., *Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration*. Eur J Biochem, 2000. **267**(16): p. 4904-11.
11. Anderson, M.E., et al., *Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione*. Arch Biochem Biophys, 1985. **239**(2): p. 538-48.
12. Anderson, M.F., M. Nilsson, and N.R. Sims, *Glutathione monoethylester prevents mitochondrial glutathione depletion during focal cerebral ischemia*. Neurochem Int, 2004. **44**(3): p. 153-9.
13. Martensson, J. and A. Meister, *Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione and is prevented by giving glutathione monoester*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 471-5.
14. Shibata, S., K. Tominaga, and S. Watanabe, *Glutathione protects against hypoxic/hypoglycemic decreases in 2-deoxyglucose uptake and presynaptic spikes in hippocampal slices*. Eur J Pharmacol, 1995. **273**(1-2): p. 191-5.
15. Yamamoto, M., et al., *Protective actions of YM737, a new glutathione analog, against cerebral ischemia in rats*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1993. **81**(2): p. 221-32.
16. Carlsson, A., M. Lindqvist, and T. Magnusson, *3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists*. Nature, 1957. **180**(4596): p. 1200.
17. Alexander, G.E., M.R. DeLong, and P.L. Strick, *Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex*. Annu Rev Neurosci, 1986. **9**: p. 357-81.
18. Lewis, S.J. and R.A. Barker, *Understanding the dopaminergic deficits in Parkinson's disease: insights into disease heterogeneity*. J Clin Neurosci, 2009. **16**(5): p. 620-5.
19. Bergman, H., et al., *The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism*. J Neurophysiol, 1994. **72**(2): p. 507-20.
20. Jahanshahi, M., et al., *Self-initiated versus externally triggered movements. I. An investigation using measurement of regional cerebral blood flow with PET and movement-related potentials in normal and Parkinson's disease subjects*. Brain, 1995. **118 (Pt 4)**: p. 913-33.
21. Jenkins, I.H., et al., *Impaired activation of the supplementary motor area in Parkinson's disease is reversed when akinesia is treated with apomorphine*. Ann Neurol, 1992. **32**(6): p. 749-57.

22. Mitchell, I.J., et al., *Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. Neuroscience, 1989. **32**(1): p. 213-26.
23. Playford, E.D., et al., *Impaired mesial frontal and putamen activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study*. Ann Neurol, 1992. **32**(2): p. 151-61.
24. Hornykiewicz, O., *Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness*. Neurodegener Dis, 2008. **5**(3-4): p. 114-7.
25. Rodriguez-Oroz, M.C., et al., *Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms*. Lancet Neurol, 2009. **8**(12): p. 1128-39.
26. Marsden, C.D., *The mysterious motor function of the basal ganglia: the Robert Wartenberg Lecture*. Neurology, 1982. **32**(5): p. 514-39.
27. Schwab, R.S., A.C. England, and E. Peterson, *Akinesia in Parkinson's disease*. Neurology, 1959. **9**(1): p. 65-72.
28. Antonini, A., et al., *Complementary positron emission tomographic studies of the striatal dopaminergic system in Parkinson's disease*. Arch Neurol, 1995. **52**(12): p. 1183-90.
29. Andrews, C.J., D. Burke, and J.W. Lance, *The response to muscle stretch and shortening in Parkinsonian rigidity*. Brain, 1972. **95**(4): p. 795-812.
30. Marttila, R.J. and U.K. Rinne, *Disability and progression in Parkinson's disease*. Acta Neurol Scand, 1977. **56**(2): p. 159-69.
31. Shulman, L.M., *Is there a connection between estrogen and Parkinson's disease?* Parkinsonism Relat Disord, 2002. **8**(5): p. 289-95.
32. Braak, H. and K. Del Tredici, *Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease*. Neurology, 2008. **70**(20): p. 1916-25.
33. Zgaljardic, D.J., N.S. Foldi, and J.C. Borod, *Cognitive and behavioral dysfunction in Parkinson's disease: neurochemical and clinicopathological contributions*. J Neural Transm, 2004. **111**(10-11): p. 1287-301.
34. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
35. Obeso, J.A., et al., *Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle*. Nat Med, 2010. **16**(6): p. 653-61.
36. Hindle, J.V., *Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease*. Age Ageing, 2010. **39**(2): p. 156-61.
37. Corrigan, F.M., et al., *Diorthosubstituted polychlorinated biphenyls in caudate nucleus in Parkinson's disease*. Exp Neurol, 1998. **150**(2): p. 339-42.
38. Richardson, J.R., et al., *Elevated serum pesticide levels and risk of Parkinson disease*. Arch Neurol, 2009. **66**(7): p. 870-5.
39. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat Neurosci, 2000. **3**(12): p. 1301-6.
40. Brooks, A.I., et al., *Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss*. Brain Res, 1999. **823**(1-2): p. 1-10.
41. Berry, C., C. La Vecchia, and P. Nicotera, *Paraquat and Parkinson's disease*. Cell Death Differ, 2010. **17**(7): p. 1115-25.
42. Tsui, J.K., et al., *Occupational risk factors in Parkinson's disease*. Can J Public Health, 1999. **90**(5): p. 334-7.
43. Ascherio, A., et al., *Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women*. Ann Neurol, 2001. **50**(1): p. 56-63.
44. Warner, T.T. and A.H. Schapira, *Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S16-23; discussion S23-5.
45. Doty, R.L., D.A. Deems, and S. Stellar, *Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration*. Neurology, 1988. **38**(8): p. 1237-44.
46. Hawkes, C.H., B.C. Shephard, and S.E. Daniel, *Olfactory dysfunction in Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1997. **62**(5): p. 436-46.
47. Gagnon, J.F., et al., *Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases*. Lancet Neurol, 2006. **5**(5): p. 424-32.

48. Schenck, C.H., S.R. Bundlie, and M.W. Mahowald, *Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder*. *Neurology*, 1996. **46**(2): p. 388-93.
49. Gao, H.M., et al., *Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease*. *J Neurochem*, 2002. **81**(6): p. 1285-97.
50. Marder, K., et al., *Postmenopausal estrogen use and Parkinson's disease with and without dementia*. *Neurology*, 1998. **50**(4): p. 1141-3.
51. Saunders-Pullman, R., et al., *The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease*. *Neurology*, 1999. **52**(7): p. 1417-21.
52. Alonso, A., et al., *Gout and risk of Parkinson disease: a prospective study*. *Neurology*, 2007. **69**(17): p. 1696-700.
53. Sulzer, D., *Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease*. *Trends Neurosci*, 2007. **30**(5): p. 244-50.
54. Windle, W.F. and J. Cammermeyer, *Not Available*. *Science*, 1958. **127**(3313): p. 1503-4.
55. Ungerstedt, U. and G.W. Arbuthnott, *Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system*. *Brain Res*, 1970. **24**(3): p. 485-93.
56. Bezard, E., C. Imbert, and C.E. Gross, *Experimental models of Parkinson's disease: from the static to the dynamic*. *Rev Neurosci*, 1998. **9**(2): p. 71-90.
57. Jonsson, G., *Chemical lesioning techniques: monoamine neurotoxins*, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Methods in Chemical Neuroanatomy*, A. Björklund and T. Hökfelt, Editors. 1983, The Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V: Amsterdam. p. 463-507.
58. Smith, G.P. and R.C. Young, *A new experimental model of hypokinesia*. *Adv Neurol*, 1974. **5**: p. 427-32.
59. Ungerstedt, U., *Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system*. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1971. **367**: p. 95-122.
60. Ungerstedt, U., et al., *Animal models of parkinsonism*. *Adv Neurol*, 1973. **3**: p. 257-270.
61. Javoy, F., et al., *Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system*. *Brain Res*, 1976. **102**(2): p. 201-15.
62. Jeon, B.S., V. Jackson-Lewis, and R.E. Burke, *6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death*. *Neurodegeneration*, 1995. **4**(2): p. 131-7.
63. Mazziro, E.A., R.R. Reams, and K.F. Soliman, *The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro*. *Brain Res*, 2004. **1004**(1-2): p. 29-44.
64. Kunikowska, G. and P. Jenner, *6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase*. *Brain Res*, 2001. **922**(1): p. 51-64.
65. Perumal, A.S., et al., *Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain*. *Brain Res Bull*, 1992. **29**(5): p. 699-701.
66. Oestreicher, E., et al., *Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study*. *Brain Res*, 1994. **660**(1): p. 8-18.
67. Glinka, Y., M. Gassen, and M.B. Youdim, *Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity*. *J Neural Transm Suppl*, 1997. **50**: p. 55-66.
68. Cicchetti, F., et al., *Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging*. *Eur J Neurosci*, 2002. **15**(6): p. 991-8.
69. Duty, S. and P. Jenner, *Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(4): p. 1357-91.
70. Chiueh, C.C., et al., *Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey*. *Psychopharmacol Bull*, 1984. **20**(3): p. 548-53.
71. Langston, J.W., et al., *Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey*. *Brain Res*, 1984. **292**(2): p. 390-4.

72. Heikkila, R.E., A. Hess, and R.C. Duvoisin, *Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice*. Science, 1984. **224**(4656): p. 1451-3.
73. Cui, M., et al., *The organic cation transporter-3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(19): p. 8043-8.
74. Nicklas, W.J., et al., *MPTP, MPP+ and mitochondrial function*. Life Sci, 1987. **40**(8): p. 721-9.
75. Karunakaran, S., et al., *Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase in dopaminergic neurons of substantia nigra leads to nuclear translocation of p53 in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice*. J Neurosci, 2008. **28**(47): p. 12500-9.
76. Saporito, M.S., B.A. Thomas, and R.W. Scott, *MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo*. J Neurochem, 2000. **75**(3): p. 1200-8.
77. Vila, M., et al., *Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2837-42.
78. Sherer, T.B., et al., *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2003. **23**(34): p. 10756-64.
79. Greenamyre, J.T., et al., *Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(4): p. 141-2; author reply 142-3.
80. Heikkila, R.E., et al., *Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity*. Neurosci Lett, 1985. **62**(3): p. 389-94.
81. Miller, G.W., *Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research*. Toxicol Sci, 2007. **100**(1): p. 1-2.
82. McCormack, A.L., et al., *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat*. Neurobiol Dis, 2002. **10**(2): p. 119-27.
83. Thiruchelvam, M., et al., *Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?* Brain Res, 2000. **873**(2): p. 225-34.
84. Thiruchelvam, M., et al., *The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 9207-14.
85. Zhang, J., et al., *Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction*. J Neurochem, 2003. **84**(2): p. 336-46.
86. Sonsalla, P.K., et al., *Treatment of mice with methamphetamine produces cell loss in the substantia nigra*. Brain Res, 1996. **738**(1): p. 172-5.
87. Trulsson, M.E., et al., *Effects of chronic methamphetamine on the nigral-striatal dopamine system in rat brain: tyrosine hydroxylase immunocytochemistry and quantitative light microscopic studies*. Brain Res Bull, 1985. **15**(6): p. 569-77.
88. Peng, J., M.L. Oo, and J.K. Andersen, *Synergistic effects of environmental risk factors and gene mutations in Parkinson's disease accelerate age-related neurodegeneration*. J Neurochem, 2010. **115**(6): p. 1363-73.
89. Dickinson, D.A. and H.J. Forman, *Cellular glutathione and thiols metabolism*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 1019-26.
90. Zeevalk, G.D., R. Razmpour, and L.P. Bernard, *Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room?* Biomed Pharmacother, 2008. **62**(4): p. 236-49.
91. Dringen, R., J.M. Gutterer, and J. Hirrlinger, *Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. Eur J Biochem, 2000. **267**(16): p. 4912-6.
92. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis*. Curr Top Cell Regul, 2000. **36**: p. 95-116.
93. Griffith, O.W., *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 922-35.
94. Jones, D.P., *Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance*. Methods Enzymol, 2002. **348**: p. 93-112.

95. Schafer, F.Q. and G.R. Buettner, *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(11): p. 1191-212.
96. Genestra, M., *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants*. Cell Signal, 2007. **19**(9): p. 1807-19.
97. Alam, Z.I., et al., *A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease*. J Neurochem, 1997. **69**(3): p. 1326-9.
98. Alam, Z.I., et al., *Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra*. J Neurochem, 1997. **69**(3): p. 1196-203.
99. Yoritaka, A., et al., *Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 2696-701.
100. Zhu, Y., P.M. Carvey, and Z. Ling, *Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain*. Brain Res, 2006. **1090**(1): p. 35-44.
101. Griffith, O.W. and A. Meister, *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine)*. J Biol Chem, 1979. **254**(16): p. 7558-60.
102. Jain, A., et al., *Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 1913-7.
103. Andersen, J.K., et al., *Effect of buthionine sulfoximine, a synthesis inhibitor of the antioxidant glutathione, on the murine nigrostriatal neurons*. J Neurochem, 1996. **67**(5): p. 2164-71.
104. Mytilineou, C., et al., *Glial cells mediate toxicity in glutathione-depleted mesencephalic cultures*. J Neurochem, 1999. **73**(1): p. 112-9.
105. Mytilineou, C., et al., *Deprenyl and desmethylselegiline protect mesencephalic neurons from toxicity induced by glutathione depletion*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(2): p. 700-6.
106. Drechsel, D.A., L.P. Liang, and M. Patel, *1-methyl-4-phenylpyridinium-induced alterations of glutathione status in immortalized rat dopaminergic neurons*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **220**(3): p. 341-8.
107. Sian, J., et al., *Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 1994. **36**(3): p. 356-61.
108. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 889-909.
109. Droge, W. and H.M. Schipper, *Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline*. Aging Cell, 2007. **6**(3): p. 361-70.
110. Aoyama, K., et al., *Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction*. Eur J Neurosci, 2008. **27**(1): p. 20-30.
111. Sian, J., et al., *Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia*. Ann Neurol, 1994. **36**(3): p. 348-55.
112. Danielson, S.R. and J.K. Andersen, *Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(10): p. 1787-94.
113. Hornykiewicz, O. and S.J. Kish, *Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease*. Adv Neurol, 1987. **45**: p. 19-34.
114. Saggu, H., et al., *A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra*. J Neurochem, 1989. **53**(3): p. 692-7.
115. Dexter, D.T., et al., *Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study*. Mov Disord, 1994. **9**(1): p. 92-7.
116. Kikuchi, A., et al., *Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy*. Neurobiol Dis, 2002. **9**(2): p. 244-8.
117. Hald, A. and J. Lotharius, *Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link?* Exp Neurol, 2005. **193**(2): p. 279-90.
118. Cadenas, E. and K.J. Davies, *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 222-30.
119. Fosslie, E., *Mitochondrial medicine--molecular pathology of defective oxidative phosphorylation*. Ann Clin Lab Sci, 2001. **31**(1): p. 25-67.
120. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.

121. Olanow, C.W., *The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007*. *Mov Disord*, 2007. **22 Suppl 17**: p. S335-42.
122. Schapira, A.H., et al., *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. *Lancet*, 1989. **1**(8649): p. 1269.
123. Swerdlow, R.H., et al., *Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 1996. **40**(4): p. 663-71.
124. Chinta, S.J. and J.K. Andersen, *Redox imbalance in Parkinson's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780**(11): p. 1362-7.
125. Winterbourn, C.C., *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species*. *Nat Chem Biol*, 2008. **4**(5): p. 278-86.
126. Tsang, A.H. and K.K. Chung, *Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1792**(7): p. 643-50.
127. Hastings, T.G., *Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase*. *J Neurochem*, 1995. **64**(2): p. 919-24.
128. Mattammal, M.B., et al., *Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease*. *J Neurochem*, 1995. **64**(4): p. 1645-54.
129. Teismann, P., et al., *Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5473-8.
130. Kish, S.J., C. Morito, and O. Hornykiewicz, *Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain*. *Neurosci Lett*, 1985. **58**(3): p. 343-6.
131. Tarohda, T., et al., *Regional distributions of manganese, iron, copper, and zinc in the brains of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats*. *Anal Bioanal Chem*, 2005. **383**(2): p. 224-34.
132. Sofic, E., et al., *Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain*. *J Neural Transm*, 1988. **74**(3): p. 199-205.
133. Dexter, D.T., et al., *Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia*. *Brain*, 1991. **114 (Pt 4)**: p. 1953-75.
134. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
135. Murad, F., *Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation*. *J Clin Invest*, 1986. **78**(1): p. 1-5.
136. Kavya, R., et al., *Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease*. *Nitric Oxide*, 2006. **15**(4): p. 280-94.
137. Reynolds, M.R., R.W. Berry, and L.I. Binder, *Nitration in neurodegeneration: deciphering the "Hows" "nYs"*. *Biochemistry*, 2007. **46**(25): p. 7325-36.
138. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(8): p. 662-80.
139. Anantharam, V., et al., *Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells*. *Neurotoxicology*, 2007. **28**(5): p. 988-97.
140. Gao, H.M., et al., *Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease*. *FASEB J*, 2003. **17**(13): p. 1954-6.
141. Liberatore, G.T., et al., *Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease*. *Nat Med*, 1999. **5**(12): p. 1403-9.
142. Przedborski, S., et al., *Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(10): p. 4565-71.
143. Wu, D.C., et al., *NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(10): p. 6145-50.
144. Du, Y., et al., *Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(25): p. 14669-74.
145. Kim, W.G., et al., *Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia*. *J Neurosci*, 2000. **20**(16): p. 6309-16.
146. Schapira, A.H., *Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease--a critical appraisal*. *Mov Disord*, 1994. **9**(2): p. 125-38.

147. Beal, M.F., *Experimental models of Parkinson's disease*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(5): p. 325-34.
148. Glinka, Y., K.F. Tipton, and M.B. Youdim, *Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine*. Eur J Pharmacol, 1998. **351**(1): p. 121-9.
149. Greenamyre, J.T., et al., *Complex I and Parkinson's disease*. IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 135-41.
150. Hsu, M., et al., *Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease*. J Neurochem, 2005. **92**(5): p. 1091-103.
151. Chinta, S.J. and J.K. Andersen, *Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(9): p. 1442-8.
152. Clementi, E., et al., *Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7631-6.
153. Dahm, C.C., K. Moore, and M.P. Murphy, *Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10056-65.
154. Bharath, S. and J.K. Andersen, *Glutathione depletion in a midbrain-derived immortalized dopaminergic cell line results in limited tyrosine nitration of mitochondrial complex I subunits: implications for Parkinson's disease*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(7-8): p. 900-10.
155. Chinta, S.J., et al., *In vitro and in vivo neuroprotection by gamma-glutamylcysteine ethyl ester against MPTP: relevance to the role of glutathione in Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 2006. **402**(1-2): p. 137-41.
156. Zhang, F. and G. Dryhurst, *Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease*. J Med Chem, 1994. **37**(8): p. 1084-98.
157. Seaton, T.A., P. Jenner, and C.D. Marsden, *Mitochondrial respiratory enzyme function and superoxide dismutase activity following brain glutathione depletion in the rat*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(11): p. 1657-63.
158. Vasquez, O.L., A. Almeida, and J.P. Bolanos, *Depletion of glutathione up-regulates mitochondrial complex I expression in glial cells*. J Neurochem, 2001. **76**(5): p. 1593-6.
159. Moore, D.J., et al., *Molecular pathophysiology of Parkinson's disease*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 57-87.
160. Jahngen-Hodge, J., et al., *Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28218-26.
161. Jha, N., et al., *Glutathione decreases in dopaminergic PC12 cells interfere with the ubiquitin protein degradation pathway: relevance for Parkinson's disease?* J Neurochem, 2002. **80**(4): p. 555-61.
162. Caneda-Ferron, B., et al., *Assessment of the direct and indirect effects of MPP+ and dopamine on the human proteasome: implications for Parkinson's disease aetiology*. J Neurochem, 2008. **105**(1): p. 225-38.
163. Blum-Degen, D., et al., *Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients*. Neurosci Lett, 1995. **202**(1-2): p. 17-20.
164. Brodacki, B., et al., *Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism*. Neurosci Lett, 2008. **441**(2): p. 158-62.
165. Mogi, M., et al., *Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients*. Neurosci Lett, 1994. **180**(2): p. 147-50.
166. Mogi, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients*. Neurosci Lett, 1994. **165**(1-2): p. 208-10.

167. Komatsu, H., et al., *Oxidative modulation of the glutathione-redox couple enhances lipopolysaccharide-induced interleukin 12 P40 production by a mouse macrophage cell line, J774A.1*. Free Radic Res, 2003. **37**(3): p. 293-9.
168. Nikulina, M.A., et al., *Glutathione depletion inhibits IL-1 beta-stimulated nitric oxide production by reducing inducible nitric oxide synthase gene expression*. Cytokine, 2000. **12**(9): p. 1391-4.
169. Peristeris, P., et al., *N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production*. Cell Immunol, 1992. **140**(2): p. 390-9.
170. Robinson, M.K., et al., *Glutathione depletion in rats impairs T-cell and macrophage immune function*. Arch Surg, 1993. **128**(1): p. 29-34; discussion 34-5.
171. Shen, H.M. and Z.G. Liu, *JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(6): p. 928-39.
172. Hunot, S., et al., *JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 665-70.
173. Esposito, E., et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease*. Exp Neurol, 2007. **205**(2): p. 295-312.
174. Sechi, G., et al., *Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1996. **20**(7): p. 1159-70.
175. McLellan, L.I., et al., *Uptake and distribution of N-acetylcysteine in mice: tissue-specific effects on glutathione concentrations*. Carcinogenesis, 1995. **16**(9): p. 2099-106.
176. Pocernich, C.B., et al., *Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease*. Neurochem Int, 2001. **39**(2): p. 141-9.
177. Pocernich, C.B., M. La Fontaine, and D.A. Butterfield, *In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain*. Neurochem Int, 2000. **36**(3): p. 185-91.
178. Offen, D., et al., *A low molecular weight copper chelator crosses the blood-brain barrier and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurochem, 2004. **89**(5): p. 1241-51.
179. Bahat-Stroomza, M., et al., *A novel thiol antioxidant that crosses the blood brain barrier protects dopaminergic neurons in experimental models of Parkinson's disease*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(3): p. 637-46.
180. Uhlig, S. and A. Wendel, *Glutathione enhancement in various mouse organs and protection by glutathione isopropyl ester against liver injury*. Biochem Pharmacol, 1990. **39**(12): p. 1877-81.
181. Puri, R.N. and A. Meister, *Transport of glutathione, as gamma-glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(17): p. 5258-60.
182. Wellner, V.P., et al., *Radioprotection by glutathione ester: transport of glutathione ester into human lymphoid cells and fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(15): p. 4732-5.
183. Maeno, H., et al., *Effects of glutathione and glutathione isopropyl ester on vasospasm in subarachnoid hemorrhage*, in *Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Implications*, Y. Sakamoto, et al., Editors. 1989, Academic Press: San Diego. p. 317-331.
184. Yamamoto, M., N. Sakamoto, and A. Iwai, *Pharmacological action of YM737, a new glutathione analogue, in rats with experimental hematoma*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1990. **308**: p. 178-84.
185. Pellmar, T.C., D. Roney, and D.L. Lepinski, *Role of glutathione in repair of free radical damage in hippocampus in vitro*. Brain Res, 1992. **583**(1-2): p. 194-200.
186. Miyamoto, M., et al., *Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **250**(3): p. 1132-40.
187. Kadarkar, M., et al., *Effects of antidromic stimulation of the ventral root on glucose utilization in the ventral horn of the spinal cord in the rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5492-5.
188. Noguchi, K., S. Higuchi, and H. Matsui, *Effects of glutathione isopropyl ester on glutathione concentration in ischemic rat brain*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1989. **64**(1): p. 165-8.
189. Gotoh, O., et al., *Effect of YM737, a new glutathione analogue, on ischemic brain edema*. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1994. **60**: p. 318-20.

190. Roth, E., et al., *Free radical mediated injuries after coronary artery occlusion*. Basic Res Cardiol, 1989. **84**(4): p. 388-95.
191. Okada, H., H. Tsuboi, and K. Esato, *The addition of glutathione (YM737) to a crystalloid cardioplegic solution enhances myocardial protection*. Surg Today, 1994. **24**(3): p. 241-6.
192. Pau, H., P. Graf, and H. Sies, *Glutathione levels in human lens: regional distribution in different forms of cataract*. Exp Eye Res, 1990. **50**(1): p. 17-20.
193. Kobayashi, S., et al., *Glutathione isopropyl ester (YM737) inhibits the progression of X-ray-induced cataract in rats*. Curr Eye Res, 1993. **12**(2): p. 115-22.
194. Gale, G.R., et al., *Glutathione status, glutathione monoisopropyl ester, and cadmium metabolism in mice*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1990. **70**(1): p. 71-91.
195. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
196. Trump, B.F. and I.K. Berezesky, *The role of altered [Ca²⁺]_i regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1313**(3): p. 173-8.
197. Trump, B.F., P.J. Goldblatt, and R.E. Stowell, *Studies on Necrosis of Mouse Liver in Vitro. Ultrastructural Alterations in the Mitochondria of Hepatic Parenchymal Cells*. Lab Invest, 1965. **14**: p. 343-71.
198. Bonfoco, E., et al., *Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7162-6.
199. Golden, W.C., et al., *Failure to sustain recovery of Na,K-ATPase function is a possible mechanism for striatal neurodegeneration in hypoxic-ischemic newborn piglets*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **88**(1-2): p. 94-102.
200. Leist, M., et al., *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1481-6.
201. Martin, L.J., *Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review)*. Int J Mol Med, 2001. **7**(5): p. 455-78.
202. Clarke, P.G., *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. Anat Embryol (Berl), 1990. **181**(3): p. 195-213.
203. Offen, D., H. Elkon, and E. Melamed, *Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases*. J Neural Transm Suppl, 2000(58): p. 153-66.
204. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.
205. Bursch, W., *The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2001. **8**(6): p. 569-81.
206. Inbal, B., et al., *DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death*. J Cell Biol, 2002. **157**(3): p. 455-68.
207. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Caspase-independent cell deaths*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(6): p. 727-33.
208. Tata, J.R., *Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture*. Dev Biol, 1966. **13**(1): p. 77-94.
209. Chipuk, J.E. and D.R. Green, *p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death*. J Clin Immunol, 2003. **23**(5): p. 355-61.
210. Gilbert, S.F., *Developmental Biology*. 8 ed. 2006, Sunderland, MA: Sinauer Associates.
211. Liu, X., et al., *DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis*. Cell, 1997. **89**(2): p. 175-84.
212. Wyllie, A.H., *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. Nature, 1980. **284**(5756): p. 555-6.
213. Sakahira, H., et al., *Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation*. Curr Biol, 1999. **9**(10): p. 543-6.
214. Pilar, G. and L. Landmesser, *Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia*. J Cell Biol, 1976. **68**(2): p. 339-56.
215. Portera-Cailliau, C., D.L. Price, and L.J. Martin, *Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum*. J Comp Neurol, 1997. **378**(1): p. 70-87.
216. Portera-Cailliau, C., D.L. Price, and L.J. Martin, *Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum*. J Comp Neurol, 1997. **378**(1): p. 88-104.

217. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-56.
218. Merry, D.E. and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 gene family in the nervous system*. Annu Rev Neurosci, 1997. **20**: p. 245-67.
219. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
220. Wolf, B.B. and D.R. Green, *Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20049-52.
221. Hegde, R., et al., *Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 432-8.
222. Klein, J.A., et al., *The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 367-74.
223. Levrero, M., et al., *The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 10): p. 1661-70.
224. Liston, P., et al., *Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 349-53.
225. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
226. Nagata, S., *Fas ligand-induced apoptosis*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 29-55.
227. Scorrano, L., et al., *BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis*. Science, 2003. **300**(5616): p. 135-9.
228. Antonsson, B., et al., *Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2*. Science, 1997. **277**(5324): p. 370-2.
229. Shimizu, S., et al., *Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12321-5.
230. Kluck, R.M., et al., *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1132-6.
231. Yang, J., et al., *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1129-32.
232. Vander Heiden, M.G., et al., *Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria*. Cell, 1997. **91**(5): p. 627-37.
233. Letai, A., et al., *Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 183-92.
234. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. Science, 2001. **292**(5517): p. 727-30.
235. Hu, Y., et al., *Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4386-91.
236. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(1): p. 10-27.
237. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
238. Robertson, J.D., et al., *Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29803-9.
239. Deveraux, Q.L., et al., *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. EMBO J, 1998. **17**(8): p. 2215-23.
240. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
241. Shieh, S.Y., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2*. Cell, 1997. **91**(3): p. 325-34.
242. Davis, R.J., *MAPKs: new JNK expands the group*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(11): p. 470-3.
243. Waskiewicz, A.J. and J.A. Cooper, *Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 798-805.
244. Widmann, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 143-80.

245. Chang, H.Y., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx*. *Science*, 1998. **281**(5384): p. 1860-3.
246. Saitoh, M., et al., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. *EMBO J*, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
247. Kadowaki, H., et al., *Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation*. *Cell Death Differ*, 2005. **12**(1): p. 19-24.
248. Faigle, R., et al., *ASK1 inhibits astroglial development via p38 mitogen-activated protein kinase and promotes neuronal differentiation in adult hippocampus-derived progenitor cells*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(1): p. 280-93.
249. Karunakaran, S., et al., *Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) and translocation of death-associated protein, Daxx, in substantia nigra pars compacta in a mouse model of Parkinson's disease: protection by alpha-lipoic acid*. *FASEB J*, 2007. **21**(9): p. 2226-36.
250. Yang, X., et al., *Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis*. *Cell*, 1997. **89**(7): p. 1067-76.
251. Song, J.J., et al., *Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H2O2*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(48): p. 46566-75.
252. Nishitoh, H., et al., *ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats*. *Genes Dev*, 2002. **16**(11): p. 1345-55.
253. Liu, H., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(6): p. 2198-208.
254. Yoon, S.O., et al., *Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI3-K/Akt pathways*. *FASEB J*, 2002. **16**(1): p. 111-3.
255. Low, F.M., M.B. Hampton, and C.C. Winterbourn, *Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(9): p. 1621-30.
256. Fujino, G., et al., *Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(23): p. 8152-63.
257. Sarker, K.P., et al., *Ebselen inhibits NO-induced apoptosis of differentiated PC12 cells via inhibition of ASK1-p38 MAPK-p53 and JNK signaling and activation of p44/42 MAPK and Bcl-2*. *J Neurochem*, 2003. **87**(6): p. 1345-53.
258. Sarker, K.P., et al., *ASK1-p38 MAPK/JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death*. *J Neurochem*, 2003. **85**(1): p. 50-61.
259. Machino, T., et al., *Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates hydrogen peroxide-induced apoptosis in human pulmonary vascular endothelial cells*. *Crit Care Med*, 2003. **31**(12): p. 2776-81.
260. Gotoh, Y. and J.A. Cooper, *Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(28): p. 17477-82.
261. Pellegrino, L.J., A.S. Pellegrino, and A.J. Cushman, *Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. 1979, New York: Plenum Press.
262. Henderson, J.M. and S.H. Watson, *Convulsive and postural effects of lesioning the mid-substantia nigra pars reticulata in naive and 6-hydroxydopamine lesioned rats*. *Brain Res Bull*, 2003. **60**(1-2): p. 179-85.
263. Hoffman, D.C. and H. Donovan, *Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995. **120**(2): p. 128-33.
264. Lorenc-Koci, E., S. Wolfarth, and K. Ossowska, *Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of parkinsonian rigidity*. *Exp Brain Res*, 1996. **109**(2): p. 268-76.
265. Kayir, H., et al., *Clozapine inhibits development and expression of nicotine-induced locomotor sensitization in rats*. *Synapse*, 2009. **63**(1): p. 15-21.
266. Selam, B., et al., *Regulation of fas ligand expression by IL-8 in human endometrium*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(8): p. 3921-7.
267. Baker, M.A., G.J. Cerniglia, and A. Zaman, *Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples*. *Anal Biochem*, 1990. **190**(2): p. 360-5.

268. Resende, R., et al., *Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(12): p. 2051-7.
269. Carlson, S.S., et al., *Primary structure of mouse, rat, and guinea pig cytochrome c*. Biochemistry, 1977. **16**(7): p. 1437-42.
270. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
271. Blum, D., et al., *Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(2): p. 135-72.
272. Ungerstedt, U., *6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons*. Eur J Pharmacol, 1968. **5**(1): p. 107-10.
273. Hokfelt, T. and U. Ungerstedt, *Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurones: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system*. Brain Res, 1973. **60**(2): p. 269-97.
274. Truong, L., et al., *Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions*. Behav Brain Res, 2006. **169**(1): p. 1-9.
275. Grealish, S., et al., *Unilateral axonal or terminal injection of 6-hydroxydopamine causes rapid-onset nigrostriatal degeneration and contralateral motor impairments in the rat*. Brain Res Bull, 2008. **77**(5): p. 312-9.
276. Schwarting, R.K., et al., *Relationships between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-hydroxydopamine injections*. Brain Res, 1991. **554**(1-2): p. 46-55.
277. Casey, D.E., *Clozapine: neuroleptic-induced EPS and tardive dyskinesia*. Psychopharmacology (Berl), 1989. **99 Suppl**: p. S47-53.
278. Rodriguez Diaz, M., et al., *Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease*. Behav Brain Res, 2001. **122**(1): p. 79-92.
279. Srinivasan, J. and W.J. Schmidt, *Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(12): p. 2586-92.
280. Srinivasan, J. and W.J. Schmidt, *Treatment with alpha2-adrenoceptor antagonist, 2-methoxy idazoxan, protects 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian symptoms in rats: neurochemical and behavioral evidence*. Behav Brain Res, 2004. **154**(2): p. 353-63.
281. Srinivasan, J. and W.J. Schmidt, *Behavioral and neurochemical effects of noradrenergic depletions with N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine in 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease*. Behav Brain Res, 2004. **151**(1-2): p. 191-9.
282. Srinivasan, J. and W.J. Schmidt, *Intensification of cataleptic response in 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration of substantia nigra is not dependent on the degree of dopamine depletion*. Synapse, 2004. **51**(3): p. 213-8.
283. Costall, B., R.J. Naylor, and J.E. Olley, *Catalepsy and circling behaviour after intracerebral injections of neuroleptic, cholinergic and anticholinergic agents into the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra of rat brain*. Neuropharmacology, 1972. **11**(5): p. 645-63.
284. Fletcher, G.H. and M.S. Starr, *Intracerebral SCH 23390 and catalepsy in the rat*. Eur J Pharmacol, 1988. **149**(1-2): p. 175-8.
285. Ossowska, K., et al., *Striatal and nucleus accumbens D1/D2 dopamine receptors in neuroleptic catalepsy*. Eur J Pharmacol, 1990. **182**(2): p. 327-34.
286. Meredith, G.E. and U.J. Kang, *Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem*. Mov Disord, 2006. **21**(10): p. 1595-606.
287. Ahmad, M., et al., *Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences*. J Neurochem, 2005. **93**(1): p. 94-104.
288. Wang, J.Y., et al., *Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats*. Brain Res, 2001. **904**(1): p. 67-75.
289. Bortolozzi, A., et al., *Intracerebral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain*. Neurotoxicology, 2001. **22**(2): p. 221-32.

290. Henderson, J.M., et al., *Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat*. Behav Brain Res, 2003. **139**(1-2): p. 105-13.
291. Schwarting, R.K. and J.P. Huston, *The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments*. Prog Neurobiol, 1996. **50**(2-3): p. 275-331.
292. LeWitt, P. and W. Oertel, *Parkinson's disease the treatment options*. 1999, London Martin Dunitz Ltd.
293. Marshall, J.F. and U. Ungerstedt, *Supersensitivity to apomorphine following destruction of the ascending dopamine neurons: quantification using the rotational model*. Eur J Pharmacol, 1977. **41**(4): p. 361-7.
294. Schwarting, R.K. and J.P. Huston, *Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae*. Prog Neurobiol, 1996. **49**(3): p. 215-66.
295. Garcia, M., et al., *Histamine H3 receptor activation selectively inhibits dopamine D1 receptor-dependent [3H]GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata*. Neuroscience, 1997. **80**(1): p. 241-9.
296. Schmitz, Y., et al., *Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission*. J Neurochem, 2003. **87**(2): p. 273-89.
297. Zigmond, M.J. and E.M. Stricker, *Supersensitivity after intraventricular 6-hydroxydopamine: relation to dopamine depletion*. Experientia, 1980. **36**(4): p. 436-8.
298. Przedborski, S., et al., *Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine*. Neuroscience, 1995. **67**(3): p. 631-47.
299. Pollack, A.E. and E.C. Haisley, *NMDA glutamate receptor stimulation is required for the expression of D2 dopamine mediated responses in apomorphine primed 6-hydroxydopamine lesioned rats*. Brain Res, 2001. **897**(1-2): p. 213-6.
300. Grofova, I., *Extrinsic connections of the neostriatum*, in *The Neostriatum*. 1979, Pergamon Press: Oxford.
301. Hamre, K., et al., *Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of Mus musculus*. Brain Res, 1999. **828**(1-2): p. 91-103.
302. Jackson-Lewis, V., et al., *Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. Neurodegeneration, 1995. **4**(3): p. 257-69.
303. Pakkenberg, B., et al., *The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1991. **54**(1): p. 30-3.
304. West, M.J., *Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias*. Trends Neurosci, 1999. **22**(2): p. 51-61.
305. Hardman, C.D., et al., *Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons, and humans: volume and neuronal number for the output, internal relay, and striatal modulating nuclei*. J Comp Neurol, 2002. **445**(3): p. 238-55.
306. Janson, A.M. and A. Moller, *Chronic nicotine treatment counteracts nigral cell loss induced by a partial mesodiencephalic hemitranssection: an analysis of the total number and mean volume of neurons and glia in substantia nigra of the male rat*. Neuroscience, 1993. **57**(4): p. 931-41.
307. Oorschot, D.E., *Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods*. J Comp Neurol, 1996. **366**(4): p. 580-99.
308. Pakkenberg, H., et al., *A stereological study of substantia nigra in young and old rhesus monkeys*. Brain Res, 1995. **693**(1-2): p. 201-6.
309. Rudow, G., et al., *Morphometry of the human substantia nigra in ageing and Parkinson's disease*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(4): p. 461-70.
310. Koprlich, J.B., et al., *Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease*. J Neuroinflammation, 2008. **5**: p. 8.
311. Mencarelli, C., et al., *Unchanged expression of the ceramide transfer protein in the acute 6-OHDA neurodegenerative model*. Neurosci Lett, 2012. **506**(1): p. 39-43.

312. Temel, Y., et al., *Protection of nigral cell death by bilateral subthalamic nucleus stimulation*. Brain Res, 2006. **1120**(1): p. 100-5.
313. Nielsen, M.S., J.C. Sorensen, and C.R. Bjarkam, *The substantia nigra pars compacta of the Gottingen minipig: an anatomical and stereological study*. Brain Struct Funct, 2009. **213**(4-5): p. 481-8.
314. Tyurina, Y.Y., et al., *Direct evidence for antioxidant effect of Bcl-2 in PC12 rat pheochromocytoma cells*. Arch Biochem Biophys, 1997. **344**(2): p. 413-23.
315. Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto, *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 483-7.
316. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
317. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 609-19.
318. Jordan, J., et al., *Bcl-x L blocks mitochondrial multiple conductance channel activation and inhibits 6-OHDA-induced death in SH-SY5Y cells*. J Neurochem, 2004. **89**(1): p. 124-33.
319. Chung, Y.M., Y.S. Bae, and S.Y. Lee, *Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(4): p. 434-42.
320. Bruce-Keller, A.J., et al., *Bcl-2 protects isolated plasma and mitochondrial membranes against lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide*. J Neurochem, 1998. **70**(1): p. 31-9.
321. Hochman, A., et al., *Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice*. J Neurochem, 1998. **71**(2): p. 741-8.
322. Wei, H., et al., *Isoflurane and sevoflurane affect cell survival and BCL-2/BAX ratio differently*. Brain Res, 2005. **1037**(1-2): p. 139-47.
323. Vander Heiden, M.G. and C.B. Thompson, *Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?* Nat Cell Biol, 1999. **1**(8): p. E209-16.
324. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
325. Kramer, B.C. and C. Mytilineou, *Alterations in the cellular distribution of bcl-2, bcl-x and bax in the adult rat substantia nigra following striatal 6-hydroxydopamine lesions*. J Neurocytol, 2004. **33**(2): p. 213-23.
326. Xu, L., W.F. Chen, and M.S. Wong, *Ginsenoside Rg1 protects dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease through the IGF-I receptor signalling pathway*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(3): p. 738-48.
327. Feng, L., et al., *Olfactory ensheathing cells conditioned medium prevented apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells through modulation of intrinsic apoptotic pathways*. Int J Dev Neurosci, 2008. **26**(3-4): p. 323-9.
328. Youdim, M.B., et al., *The essentiality of Bcl-2, PKC and proteasome-ubiquitin complex activations in the neuroprotective-antiapoptotic action of the anti-Parkinson drug, rasagiline*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1635-41.
329. Cookson, M.R., *The biochemistry of Parkinson's disease*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 29-52.
330. Junn, E., et al., *Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9691-6.
331. Cassarino, D.S., et al., *Interaction among mitochondria, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB in cellular models of Parkinson's disease*. J Neurochem, 2000. **74**(4): p. 1384-92.
332. Pan, J., et al., *Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease*. Neurosci Lett, 2007. **428**(2-3): p. 82-7.
333. Ferrer, I., et al., *Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies*. J Neural Transm, 2001. **108**(12): p. 1383-96.

334. Ouyang, M. and X. Shen, *Critical role of ASK1 in the 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells*. J Neurochem, 2006. **97**(1): p. 234-44.
335. Niso-Santano, M., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 is a key factor in paraquat-induced cell death: modulation by the Nrf2/Trx axis*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(10): p. 1370-81.
336. Hu, X., et al., *Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) signaling cascade*. J Neurosci, 2011. **31**(1): p. 247-61.
337. Lee, Y.M., et al., *Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 9986-98.
338. Duke, R.C. and J.J. Cohen, *Morphological and biochemical assays of apoptosis*, in *Current Protocols in Immunology*, J.E. Coligan, et al., Editors. 1992, Green Publishing and Wiley-Interscience: New York. p. 3.17.1-3.17.16.
339. Migheli, A., et al., *A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks*. J Neuropathol Exp Neurol, 1994. **53**(6): p. 606-16.
340. Liang, Z.Q., et al., *NF-kappaB contributes to 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of nigral dopaminergic neurons through p53*. Brain Res, 2007. **1145**: p. 190-203.
341. Tompkins, M.M., et al., *Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons*. Am J Pathol, 1997. **150**(1): p. 119-31.
342. Zuch, C.L., et al., *Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion*. J Comp Neurol, 2000. **427**(3): p. 440-54.
343. Guo, S., et al., *Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway*. Biol Psychiatry, 2007. **62**(12): p. 1353-62.
344. Winter, C., et al., *Subthalamic nucleus lesioning inhibits expression and phosphorylation of c-Jun in nigral neurons in the rat's 6-OHDA model of Parkinson's disease*. Synapse, 2006. **60**(1): p. 69-80.
345. Shikama, H., et al., *Transport and metabolism of glutathione isopropyl ester in cerebrospinal fluid*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1995. **88**(3): p. 349-57.
346. Scaduto, R.C., Jr., et al., *Effect of an altered glutathione content on renal ischemic injury*. Am J Physiol, 1988. **255**(5 Pt 2): p. F911-21.
347. Tsan, M.F., J.E. White, and C.L. Rosano, *Modulation of endothelial GSH concentrations: effect of exogenous GSH and GSH monoethyl ester*. J Appl Physiol, 1989. **66**(3): p. 1029-34.
348. Meister, A., *Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy*. Pharmacol Ther, 1991. **51**(2): p. 155-94.
349. Munoz, A.M., et al., *Systemic administration of N-acetylcysteine protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine-induced degeneration*. J Neurosci Res, 2004. **76**(4): p. 551-62.
350. Tapiero, H., et al., *II. Glutamine and glutamate*. Biomed Pharmacother, 2002. **56**(9): p. 446-57.
351. Caccamo, D., et al., *Glutamate promotes NF-kappaB pathway in primary astrocytes: protective effects of IRFI 016, a synthetic vitamin E analogue*. Exp Neurol, 2005. **193**(2): p. 377-83.
352. Regan, R.F. and Y.P. Guo, *Potentiation of excitotoxic injury by high concentrations of extracellular reduced glutathione*. Neuroscience, 1999. **91**(2): p. 463-70.
353. Regan, R.F. and Y. Guo, *Extracellular reduced glutathione increases neuronal vulnerability to combined chemical hypoxia and glucose deprivation*. Brain Res, 1999. **817**(1-2): p. 145-50.
354. Uchida, K., *4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(4): p. 318-43.
355. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.
356. Duarte, A.I., et al., *Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons--involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(7): p. 876-89.

357. Finkelstein, E.I., et al., *Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the alpha,beta-unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(6): p. L1019-28.
358. Toyokuni, S., et al., *Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2616-20.
359. Pedersen, W.A., et al., *Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients*. Ann Neurol, 1998. **44**(5): p. 819-24.
360. Smith, R.G., et al., *Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol, 1998. **44**(4): p. 696-9.
361. Farooqui, A.A. and L.A. Horrocks, *Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly*. Neuroscientist, 2006. **12**(3): p. 245-60.
362. Awasthi, Y.C., et al., *Self-regulatory role of 4-hydroxynonenal in signaling for stress-induced programmed cell death*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(2): p. 111-8.
363. Inden, M., et al., *Serofendic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced nigral neurodegeneration and drug-induced rotational asymmetry in hemi-parkinsonian rats*. J Neurochem, 2005. **95**(4): p. 950-61.
364. Fujita, K., et al., *Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7247.
365. Liang, L.P., et al., *An orally active catalytic metalloporphyrin protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in vivo*. J Neurosci, 2007. **27**(16): p. 4326-33.
366. Selley, M.L., *(E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 1998. **25**(2): p. 169-74.
367. Chen, J.J. and B.P. Yu, *Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products*. Free Radic Biol Med, 1994. **17**(5): p. 411-8.
368. Chen, J.J. and B.P. Yu, *Detoxification of reactive aldehydes in mitochondria: effects of age and dietary restriction*. Aging (Milano), 1996. **8**(5): p. 334-40.
369. Subramaniam, R., et al., *The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins*. J Neurochem, 1997. **69**(3): p. 1161-9.
370. Cao, Z., et al., *The role of chemically induced glutathione and glutathione S-transferase in protecting against 4-hydroxy-2-nonenal-mediated cytotoxicity in vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Toxicol, 2003. **3**(2): p. 165-77.
371. Cao, Z., et al., *Antioxidants and phase 2 enzymes in cardiomyocytes: Chemical inducibility and chemoprotection against oxidant and simulated ischemia-reperfusion injury*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(8): p. 1353-64.
372. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
373. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
374. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
375. Scorrano, L. and S.J. Korsmeyer, *Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 437-44.
376. George, D.A., *The mitochondria and apoptosis*. Innov in Cell Dynam, 2002. **1**: p. 6-10.
377. Petrosillo, G., F.M. Ruggiero, and G. Paradies, *Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria*. FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2202-8.
378. Preston, T.J., et al., *Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **49**(1-2): p. 45-61.
379. Stroh, C. and K. Schulze-Osthoff, *Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates*. Cell Death Differ, 1998. **5**(12): p. 997-1000.
380. Hatai, T., et al., *Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26576-81.

381. Hartmann, A., et al., *Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2875-80.
382. Viswanath, V., et al., *Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease*. J Neurosci, 2001. **21**(24): p. 9519-28.
383. Han, B.S., et al., *Caspase-dependent and -independent cell death pathways in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons after neurotoxin treatment*. J Neurosci, 2003. **23**(12): p. 5069-78.
384. Noelker, C., et al., *The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity*. Neurosci Lett, 2005. **383**(1-2): p. 39-43.
385. Eminel, S., et al., *JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55385-92.
386. Weng, Z., et al., *Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34479-91.
387. Kouroku, Y., et al., *Caspases that are activated during generation of nuclear polyglutamine aggregates are necessary for DNA fragmentation but not sufficient for cell death*. J Neurosci Res, 2000. **62**(4): p. 547-56.

ÖZGEÇMİŞ

16.11.1981 tarihinde Konya’da dünyaya gelen Özlem ÖZSOY, ilk, orta ve lise öğrenimini Konya’nın Seydişehir ilçesinde tamamladı. 1999 yılında Seydişehir Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yüksek öğrenimine başladı. 2003 yılında lisans diplomasını aldı. Aynı yıl içinde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı ve 2006 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda doktora programına başladı. 2010 yılında gittiği Almanya-Köln Üniversitesi’nde sekiz ay süreyle çalıştı. Umut ÖZSOY ile evli olan Özlem ÖZSOY, halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir.

EK

The Effect of Docosahexaenoic Acid on Visual Evoked Potentials in a Mouse Model of Parkinson's Disease: The Role of Cyclooxygenase-2 and Nuclear Factor Kappa-B

Ozlem Ozsoy · Gamze Tanriover · Narin Derin · Nimet Uysal ·
Necdet Demir · Burcu Gemici · Ceren Kencebay · Piraye Yargicoglu ·
Aysel Agar · Mutay Aslan

Received: 6 October 2010 / Revised: 26 December 2010 / Accepted: 3 January 2011 / Published online: 14 January 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract This study aimed to investigate the effect of docosahexaenoic acid (DHA) on visual evoked potentials (VEPs) in a mice model of Parkinson's disease (PD). Mice model was created by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and DHA was given by gavage. Cyclooxygenase-2 (COX-2), caspase-3 activities, nuclear factor kappa-B (NF- κ B) and prostaglandin E2 (PGE2) levels were determined in substantia nigra (SN) and retina. Cyclooxygenase-2 intensities were also determined immunohistochemically. The tyrosine hydroxylase (TH) immunolabelling was significantly decreased in MPTP group compared to control. Docosahexaenoic acid decreased dopaminergic neuron death in MPTP + DHA group when compared to MPTP group. Mice treated with MPTP showed motor deficits as compared to control. Significant improvement was observed in MPTP + DHA group when compared to MPTP group. Treatment with MPTP significantly increased the activity of COX-2 and total COX in SN when compared to the control group. Docosahexaenoic acid caused a significant decrease in total

COX and COX-2 activity in SN of mice given MPTP. Cyclooxygenase-2 showed strong immunostaining in MPTP group when compared to other groups in SN. Levels of PGE2 increased in MPTP group when compared to control in SN. Docosahexaenoic acid treatment in MPTP group reduced PGE2 in SN. Nuclear factor kappa-B levels were found to be decreased in SN of MPTP group. The mean latencies of P1, N1, P2, N2, P3, N3, P4, N4, and P5 VEP components were significantly prolonged in MPTP group when compared to control. In MPTP + DHA group, the mean latencies of all components except P5 returned to control values. Current data shows that DHA treatment improves prolonged VEPs latencies and locomotor activity.

Keywords Parkinson's disease · 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine · Visual evoked potentials · Docosahexaenoic acid · Cyclooxygenase-2 · Nuclear factor kappa-B

Introduction

Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative disorder that affects movement, balance, and fine motor control (Disshon and Dluzen 1997; Kidd 2000). This impairment is the loss of nigrostriatal dopamine (DA) containing neurons, whose cell bodies located in substantia nigra pars compacta (SNpc) and project their axons up to the striatum (Meissner et al. 2004; Reksidler et al. 2007). The cause of dopaminergic cell death in PD remains unknown. Over years, several pathogenic hypotheses have been proposed in attempts to explain the mechanism of neuronal loss in PD (Bernheimer et al. 1973; Barbeau et al. 1987; Schapira et al. 1990; Lockwood 2000; Gasser 2001). Important factors include formation of free radicals,

O. Ozsoy · N. Uysal · B. Gemici · A. Agar (✉)
Department of Physiology, Faculty of Medicine, Akdeniz
University, Arapsuyu, 07070 Antalya, Turkey
e-mail: ayagar@akdeniz.edu.tr

G. Tanriover · N. Demir
Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine,
Akdeniz University, Antalya, Turkey

N. Derin · C. Kencebay · P. Yargicoglu
Department of Biophysics, Faculty of Medicine, Akdeniz
University, Antalya, Turkey

M. Aslan
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Akdeniz
University, Antalya, Turkey

impaired mitochondrial activity, increased sensitivity to apoptosis, excitotoxicity, and inflammation (Teismann et al. 2003; de Meira Santos Lima et al. 2006; Kang et al. 2007). However, a large amount of evidence suggested an important role for oxygen free radical and oxidative stress in the pathogenesis of PD (Schapira et al. 1990). Increased levels of reactive oxygen species (ROS) which in turn activates redox-sensitive transcriptional factors such as nuclear factor kappa-B (NF- κ B) (Lee et al. 2009a) leads to expression of many pro-inflammatory genes including inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). Increased nuclear translocation of NF- κ Bp65 has previously been demonstrated in dopaminergic neurons of PD mice (Hunot et al. 2004; Ghosh et al. 2007). Increased expression of COX and elevated Prostaglandin E2 (PGE2) levels have also been reported in the cascade of deleterious events that lead to neurodegeneration in a variety of pathological settings (Teismann et al. 2003; Kang et al. 2007). Cyclooxygenase activity is the rate-limiting activity in the biosynthesis of prostaglandins (PGs). Two isoforms, COX-1 and COX-2, convert arachidonic acid to hydroxyendoperoxide. Cyclooxygenase-1 is primarily involved in the production of prostanoids relevant to physiological process, whereas COX-2 is mainly responsible for the production of prostanoids linked to pathologic events (Teismann et al. 2003; Przybylkowski et al. 2004). Previous studies indicate that the neurodegenerative process in PD is associated with increased expression of COX-2 and elevated levels of PGE2 (Teismann et al. 2003; Kang et al. 2007).

In early 1980s, the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) was discovered accidentally. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is converted to 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺) by astroglia. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine can selectively damage dopaminergic neurons of SNpc and produce the clinical symptoms of PD in human and non-human primate and mice. For this reason, MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mouse is a valuable model for PD research. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine leads to the activation of microglia in the SNpc. This activation plays a crucial role in neurodegeneration of experimental PD and is thought to be associated with increased COX-2 expression and subsequent elevated levels of PGE2 (Przybylkowski et al. 2004; Wang et al. 2005; Vijithruth et al. 2006; Kang et al. 2007). Activation of NF- κ B is necessary for COX-2 expression (Ghosh et al. 2009). Previous studies indicated that NF- κ B is activated in MPTP-intoxicated mice (Ghosh et al. 2007, 2009). It appears that NF- κ B activation regulates these pathological features either directly or indirectly.

In addition to the loss of dopaminergic neurons in the SN, PD has also been associated with a reduction in the level of DA in the retina (Harnois and Di Paolo 1990).

Thus, dopaminergic activity in the visual system could be diminished in PD (Langheinrich et al. 2000). Treatment with dopaminergic drugs was shown to reverse the delays in visual evoked potentials (VEPs) in PD patients (Bodis-Wollner and Yahr 1978; Onofrij et al. 1986; Bodis-Wollner et al. 1987; Bulens et al. 1987; Barbatto et al. 1994). Therefore, initially, retinal dopaminergic alterations were claimed to be responsible for the visual changes in Parkinsonians, but later evidence appeared that there might be some additional pathology beyond the retina affecting the visual responses (Onofrij et al. 1986; Bulens et al. 1987; Buttner et al. 1996; Bodis-Wollner 1997).

On the other hand, brain and retina have a very high content of essential polyunsaturated fatty acids (PUFA) which depend on alimentation (Puskas et al. 2004). Animals raised on diets deficient in omega-3 PUFAs all had decreased levels of docosahexaenoic acid (DHA) in brain and retina which were associated with impairments in neural and visual function (Weisinger et al. 1999; Uauy et al. 2001; Catalan et al. 2002). Polyunsaturated fatty acids show anti-angiogenic, anti-vasoproliferative, and neuroprotective actions on factors and processes involved in the pathogenesis of degenerative neuronal disease (Puskas et al. 2004). Docosahexaenoic acid, a major dietary omega-3 PUFA, is also a major structural lipid of different regions of the brain (Puskas et al. 2004; Michael-Titus 2007; Bazan 2009).

Studies on experimental models demonstrate that omega-3 PUFAs also have the capacity to affect production and activation of arachidonic acid-based eicosanoids. Docosahexaenoic acid has been shown to decrease Phospholipase A2 (PLA₂) activity in nerve growth cones. Nuclear factor kappa-B is nuclear transcription factor that up-regulates COX-2 expression which is associated with vascular instability. Cyclooxygenase-2 is found in the central nervous system (CNS), is activated by cytokines, mitogens and acts in the formation of PGs in inflammatory response. It was demonstrated that DHA is effective in inhibiting COX-1 and COX-2 catalyzed PG synthesis and was activated in response to PLA₂ activation. Cyclooxygenase-2 activation is also associated with ischemia, oxidative stress, inflammation, neuroactive cell signaling molecules, and developmental processes associated with aging (Mattammal et al. 1995; McLaughlin et al. 2006; Lee et al. 2009b).

Therefore, in this study, we used a mouse model of MPTP-induced PD to examine whether DHA inhibited the loss of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons as a result of its anti-inflammatory effects. Prostaglandin E2 levels were also determined as an indicator of inflammatory events and the role of COX-2 was defined in changes observed in the visual system following DHA treatment and MPTP-toxication. In this context, the main objective of this study was to investigate the signaling pathways in the mechanism of DHA neuroprotection observed in

MPTP-toxication. Additionally, we examined the alterations in latencies and amplitudes of VEPs related to MPTP intoxication and DHA treatment.

Materials and Methods

Male C57BL/6 mice (10 months old, weighing 25–30 g) were used throughout all experiments. The animals were housed in stainless steel cages (10 per cage) in an air-conditioned room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 12:12 h light:dark cycle). All experimental protocols conducted on mice were performed in accordance with the standards established by the Institutional Animal Care and Use Committee at Akdeniz University Medical School.

Experimental Design

Mice were randomly divided into four experimental groups as follows: control ($n = 15$); DHA-treated (DHA) ($n = 15$); MPTP-injected (MPTP) ($n = 15$), and DHA-treated + MPTP-injected (MPTP + DHA) ($n = 15$). Docosahexaenoic acid (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) was dissolved in corn oil at a concentration of 0.046 M and was given to the treatment groups for 30 days (36 mg/kg/day) by gavage (Simopoulos 1989; Kremer et al. 1990; Hacioglu et al. 2006, 2007; Tanriover et al. 2010). In order to eliminate the effects of daily gavage and vehicle; other groups received a similar volume of corn oil alone. Food and water were provided ad libitum through the experiments.

Treatment of Mice with 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

On the 23rd day of gavage treatment, animals in MPTP and MPTP + DHA groups received four intraperitoneal injections (20×4 mg/kg) of freshly prepared MPTP-HCl (M-0896, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) in saline at 2-h intervals for MPTP intoxication (Hunot et al. 2004; Boyd et al. 2007). Control and DHA groups received equivalent volume injections of saline. All four groups of animals continued to receive their usual diets for an additional week after treatment.

VEPs Recordings

On the 29th day of gavage treatment, VEPs were recorded in a darkened room. The mice were anesthetized with a combination of ketamine (80 mg/kg, ip) and xylazine (16 mg/kg, ip) diluted in saline. For longer recording session, supplemental anesthesia (20% of initial dose) was given when required (Peachey and Ball 2003). Recordings were collected with stainless steel sub-dermal electrodes

(Nihon Kohden NE-223S, Tokyo Japan) shortened to 7 mm in length, resharpended and inserted along the longitudinal axis of the mouse. Electrode placements were Fpz (midline, just distal to the interorbital line; negative electrode) and Oz (midline, nuchal crest; positive electrode), with a ground electrode placed on the tail of the mouse (Strain and Tedford 1993). After 5 min of dark adaptation, a photic stimulator (Biopac System; Nova-Strobe AB, Santa Barbara, California, USA) at the lowest intensity setting was used to provide the flash stimulus at a distance of 10 cm, which allowed the lighting of the entire pupilla from the temporal visual field. The repetition rate of the flash stimulus was 0.1 J. Throughout the experiments, the eye not under investigation was occluded by black carbon paper and cotton, allowing VEP recordings for both right and left eyes to be obtained. Meanwhile, the body temperature was maintained at $37.5\text{--}38^\circ\text{C}$ by a heating pad (Hetzler et al. 1988; Strain and Tedford 1993). The averaging of 100 responses was accomplished with the averager in the Biopac MP100 data acquisition equipment. Analysis time was 300 ms. The frequency bandwidth of the amplifier was 1–100 Hz. The gain was selected as 20–50 $\mu\text{V}/\text{div}$. The microprocessor was programmed to reject any sweeps contaminated with larger artifacts, and at least two averages were obtained to ensure response reproducibility. Peak latencies of the components were measured from the stimulus artifact to the peak in millisecond. Amplitudes were measured as the voltage between successive peaks.

Motor Performance Test

To determine the degree of bradykinesia, a typical sign of Parkinsonism, pole test was performed according to the method of Ogawa et al. (1987) with minor modifications (Kobayashi et al. 1997; Araki et al. 2001). At week 1 (day 7) post-intoxication each mouse was placed head upward at the top of a rough-surfaced pole (8 mm in diameter and 50 cm in height) double wrapped with gauze to prevent slipping. Mice travelled the pole freely and came down to the floor (pre-trial). After two or three pre-trials for habituation to the test system the time that each mouse needed for turn down and climbing down the pole for 50 cm was recorded and analyzed (real trial).

Tissue Collection

After motor performance test, at the end of the treatment period, mice were anesthetized with a combination of ketamine (80 mg/kg, ip) and xylazine (16 mg/kg, ip) diluted in saline. Mice were perfused transcardially with heparinized saline and their brain and retina tissues were removed immediately and stored at -80°C for later biochemical analysis. For immunohistochemical studies, brain

tissues containing SN were fixed in 10% formaldehyde for 24 h and washed with tap water for approximately 6 h.

Immunohistochemistry

We used TH immunoreactivity to mark dopaminergic neurons in SN of experimental model of PD. For TH and COX-2 immunohistochemistry, sections were deparaffinized and blocked for endogenous peroxidase activity with methanol containing 3% H₂O₂ for 15 min and for nonspecific binding with universal blocking reagent (BioGenex, San Ramon, CA, USA) for 7 min at room temperature. Anti-mouse TH (Calbiochem CA, USA #657010) diluted in dilution buffer 1/400 and anti-rabbit COX-2 (murine) polyclonal antibody (Cayman Chemical MI, USA #160106) diluted in dilution buffer 1/250 (LabVision, Fremont, CA, USA) were applied for 1 h at room temperature. For negative controls the primary antibodies were replaced by normal rabbit and mouse IgG serum (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) at the same concentration. After several washes in PBS, sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG or anti-mouse secondary antibody (Dako, Carpinteria, CA, USA) for 30 min followed by LSAB streptavidin–peroxidase complex (Dako, Carpinteria, CA, USA) incubation for 30 min and were rinsed with PBS. Antibody complexes were visualized by incubation with diaminobenzidine (DAB) chromogen (BioGenex). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Dako), dehydrated, mounted, and examined on a Zeiss-Axioplan, microscope (Oberkochen, Germany).

Cyclooxygenase-2 Activity Assay

To measure the COX-2 activity in SN and retina tissues, COX activity assay kit (Cayman Chemical, USA) was used (Temma et al. 2004). This kit measures the peroxidase activity of COX. The peroxidase activity is assayed colorimetrically by monitoring the appearance of oxidized *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine at 590 nm. The peroxidase activity of COX-2 was assayed colorimetrically using COX-1-specific inhibitors. The kit can assay samples containing COX activity between 3 and 80 nmol/min/ml.

Caspase-3 Activity Assay

Substantia nigra and retina tissues were resuspended in lysis buffer and incubated on ice for 10 min. After centrifugation for 5 min at 10,000×*g*, supernatant was transferred to a fresh tube. Caspase-3 activity in tissue lysate treated was determined by a Chemicon caspase colorimetric activity assay kit (Yao et al. 2007). The assay is based on spectrophotometric detection of the chromophore

p-nitroaniline (pNA) after cleavage from the labeled substrate LEHD-pNA. The free pNA can be quantified using a microtiter plate reader at 405 nm.

Determination of Prostaglandin E2 Tissue Content

Prostaglandin E2 levels were determined by the method described previously (Gemici et al. 2010; Carlton et al. 2002). Whole SN and retina tissues were homogenized in 0.25 ml Tris–HCl buffer (pH: 7.5) with 0.02 M EDTA and 5 mg/ml of indomethacin. Prostaglandin E2 collection and purification was done according to a modified protocol supplied with the PGE2 enzyme immunoassay system (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Briefly, 0.25 ml of cold water:ethanol (1:4 vol/vol) solution was added to 0.25 ml of tissue homogenate; 5 ml of glacial acetic acid was added to each sample followed by 5 min incubation at room temperature. Samples were then centrifuged at 2500×*g* for 2 min. The supernatants were then applied to C18 minicolumns (Amersham Pharmacia Biotech) and the columns were washed with distilled water and hexane. Prostaglandin E2 was eluted into siliconized glass vials with two 0.75 ml volumes of ethyl acetate. This fraction was lyophilized to dryness and stored at –80°C. According to the protocol provided with the EIA kit, samples were brought up in 1 ml of assay buffer and assayed in 96-well plates. Prostaglandin E2 standards ranged from 50 to 6400 pg/ml. The relative concentration of PGE2 was normalized against protein content of the tissue samples. Results are expressed as pg/g protein.

Nuclear factor Kappa-B immunoassay

To measure the NF-κB in SN and retina tissues, a solid phase sandwich Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) NF-κBp65 kit (Invitrogen) was used (Adams 2001). A monoclonal antibody specific for NF-κBp65 (regardless of phosphorylation state) has been coated onto the wells of the microtiter strips provided. Samples, including a standard containing NF-κBp65, control specimens, and unknowns, are pipetted into these wells. During the first incubation, the NF-κBp65 antigen binds to the immobilized (capture) antibody. After washing, a rabbit antibody, specific for NF-κBp65, is added to the wells. During the second incubation, this antibody serves as a detector by binding to the immobilized NF-κBp65 protein captured during the first incubation. After removal of excess detection antibody, a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (Anti-Rabbit IgG-HRP) is added. A substrate solution is added, which is acted upon by the bound enzyme to produce color. The intensity of this colored product is directly proportional to the concentration of NF-κBp65 present in the original specimen.

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed on all parameters of VEPs for the factors of side (right and left) and groups. Differences of other data were also analyzed by ANOVA followed up with Tukey's Post Hoc Test for suit with normal dispersion and Kruskal–Wallis followed up Mann–Whitney *U* test for not suit with normal dispersion. Significance levels were set at $P < 0.05$.

Results

Bradykinesia by Pole Test

Changes in motor activity (bradykinesia: slow-down of voluntary movements) are shown in Fig. 1. Time required to turn (TT) (s) (Fig. 1a) and time required to locomotor activity (TLA) (s) (Fig. 1b) were determined for all groups. MPTP mice showed marked motor deficits in the pole test, as compared with control and DHA-treated animals.

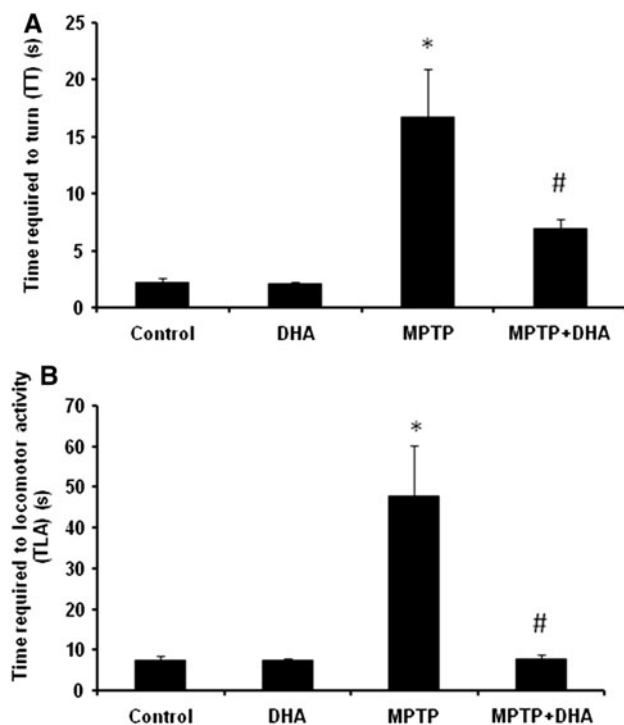


Fig. 1 Determination of bradykinesia by pole test. At week 1 (day 7) post-intoxication each mouse was placed head upward at the top of a rough-surfaced pole (8 mm in diameter and 50 cm in height) double wrapped with gauze to prevent slipping. Mice travelled the pole freely and came down to the floor (pre-trial). After two or three pre-trials for habituation to the test system the time that each mouse needed for **a** turn down and **b** climbing down the pole for 50 cm was recorded and analyzed (real trial). Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control, # $P < 0.05$ vs. MPTP group

Additionally, MPTP + DHA group had improved TT and TLA times compared with MPTP group.

Tyrosine Hydroxylase Expression in the Substantia Nigra

The compact, reticular and lateral parts of mice SN were easily distinguished by TH immunohistochemistry. The immunoreactivity for TH was observed in neuron bodies and processes. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine caused an obvious reduction in TH positive dopaminergic neuron viability as determined. The immunolabelling was significantly decreased in the MPTP group that were found to be sparse and disorganized when compared to the other groups (Fig. 2d). Moreover, in the MPTP + DHA group, the neuron processes were more organized when compared to the MPTP group (Fig. 2g). DHA supplementation decreased dopaminergic neuron death in MPTP + DHA group (Fig. 2g) and also, the neuron numbers were higher in MPTP + DHA group compare to MPTP group (Fig. 2d). The neuron numbers of the DHA group (Fig. 2l) were almost equivalent to the control group (Fig. 2a). No staining was observed in the negative sections in all groups (Fig. 2c, f, k, n).

Cyclooxygenase-2 Expression in the Substantia Nigra and Retina

Cyclooxygenase-2 expressions were observed in the cytoplasm of dopaminergic neurons in MPTP and MPTP + DHA groups. Cyclooxygenase-2 (Fig. 2e) showed strong immunostaining intensity in MPTP group, which was lower than the COX-2 immunostaining intensity in MPTP + DHA group (Fig. 2h). Dopaminergic neuron processes of MPTP group were found to be sparse, disorganized and most of the neurons were died when compared to the other groups. Therefore, the intensity of the COX-2 was higher in the MPTP + DHA group (Fig. 2h). Moreover, some of the glial cells were also immunopositive for COX-2 in MPTP and MPTP + DHA groups. No immunoreactivity was observed in control and DHA groups for COX-2 (Fig. 2b, m). No immunoreactivity was observed on the slides where primary antibodies were replaced with normal mouse and rabbit IgG (Fig. 2c, f, k, n).

No immunoreactivity was observed in all four groups for COX-2 expression in the retina.

Total Cyclooxygenase/Cyclooxygenase-2 Activity in Substantia Nigra and Retina

The mean activation of total COX and COX-2 in SN is shown in Fig. 3a. Administration of MPTP significantly increased the activation levels of total COX and COX-2

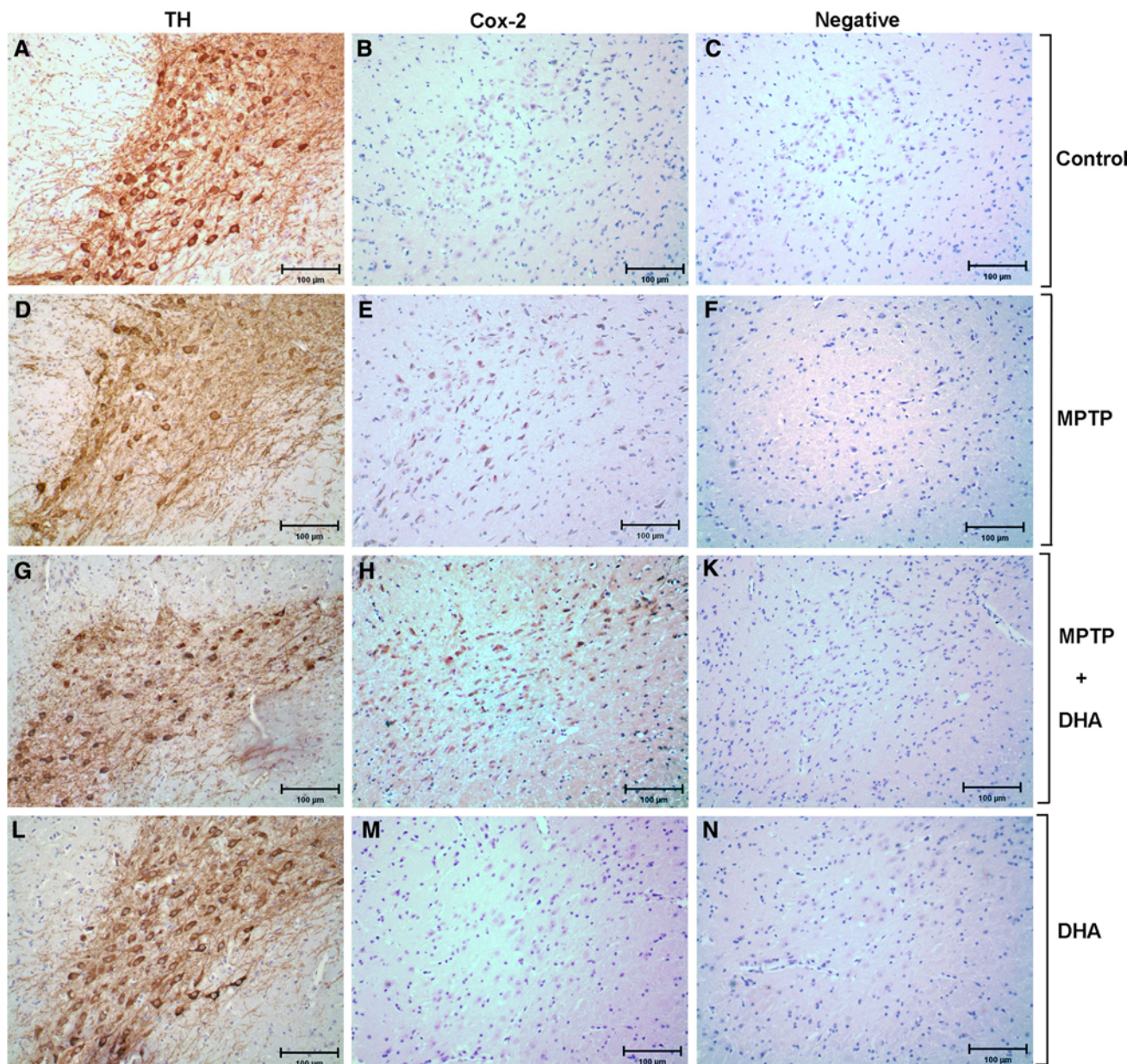


Fig. 2 Representative figure of TH and COX-2 immunoreaction of dopaminergic neurons in control, MPTP, MPTP + DHA and DHA groups. **a, b, c** Control; **d, e, f**: MPTP; **g, h, k**: MPTP + DHA; **l, m, n**: DHA groups. Localization of TH (**a, d, g, l**) and COX-2 (**b, e, h, m**) protein expressions in the SN. Notice the neuronal morphological

alterations; the loss of dopaminergic neurons and the disorganized fibers in MPTP group. No immunoreactivity was observed on the slides where primary antibodies were replaced with normal mouse and rabbit IgG (**c, f, k, n**). Scale bar represents 100 µm

when compared to the control group. DHA treatment significantly decreased the activation of total COX and COX-2 in MPTP + DHA group when compared with MPTP group.

We did not observe any changes in the activity of total COX and COX-2 in retina (Fig. 3b).

Activation of Caspase-3 in Substantia Nigra and Retina

Nigral caspase-3 activity was significantly increased in MPTP and MPTP + DHA group when compared with

control group (Fig. 4). Activity of retinal caspase-3 was not changed in all groups (Fig. 4).

Prostaglandin E2 Tissue Content in Substantia Nigra and Retina

Compared with mice in the control group, PGE2 content was not different in SN in DHA-treated mice. We determined levels of PGE2, a major inflammatory mediator increased in MPTP rats. Docosahexaenoic acid treatment in

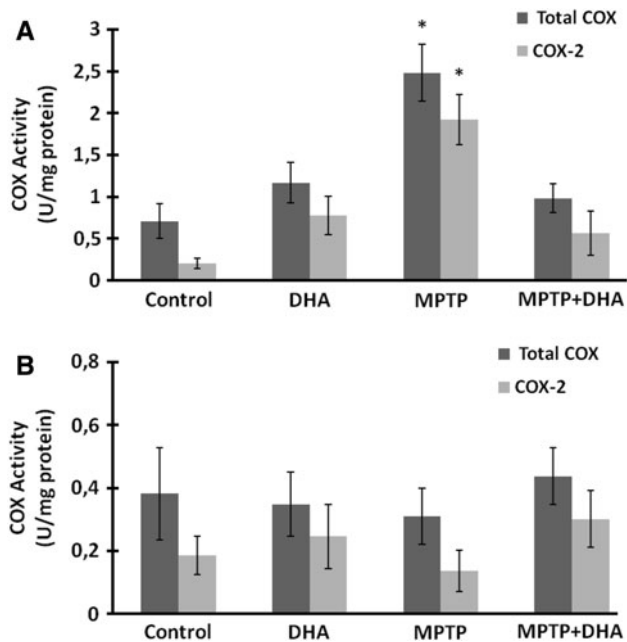


Fig. 3 The effect of DHA on total COX and COX-2 activities in the control and MPTP treated groups in **a** SN and **b** retina tissues. COX-2 activities in groups measured by a Cayman colorimetric activity assay kit. * $P < 0.01$ vs. control, DHA and MPTP + DHA group of total COX and COX-2. Data represents mean \pm SEM

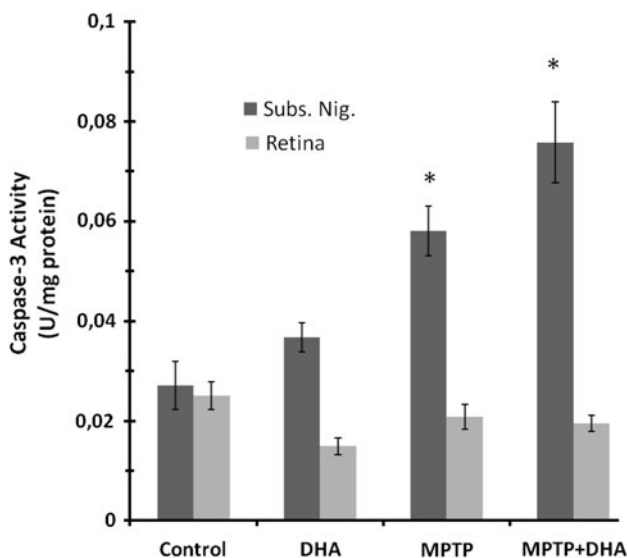


Fig. 4 The effect of DHA on caspase-3 activity in the control and MPTP treated groups in SN and retina tissues. Caspase-3 activities in groups were measured by a Chemicon caspase colorimetric activity assay kit. * $P < 0.001$ vs. control group. Data represents mean \pm SEM

MPTP group reduced production of proinflammatory mediator PGE2 in SN (Fig. 5a). However, there was no difference in PGE2 content of retina between control and experimental groups (Fig. 5b).

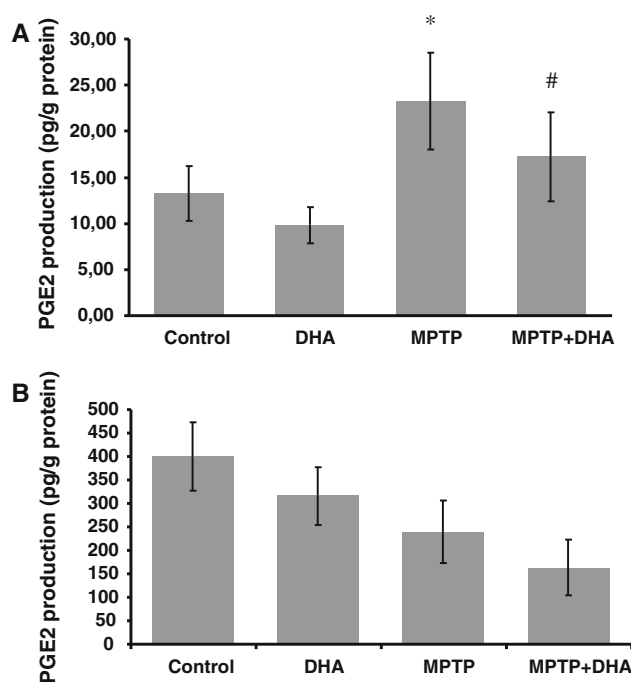


Fig. 5 The effect of DHA on PGE2 production in the control and MPTP treated groups in **a** SN and **b** retina tissues. The PGE2 tissue content was measured by an Amersham PGE2 enzyme immunoassay kit. * $P < 0.05$ compared to control group; # $P < 0.05$ vs. MPTP group. Data represents mean \pm SEM

Nuclear Factor Kappa-B Protein Levels in Sunstantia Nigra and Retina

Nuclear factor kappa-B protein level was examined 7 days after the last injection of MPTP. Nuclear factor kappa-B values of SN in studied groups are summarized in Fig. 6a. Nuclear factor kappa-B protein level was found to be decrease in SN of MPTP group. However, NF- κ Bp65 protein level of SN was unaltered in MPTP + DHA group when compared with MPTP group. Nuclear factor kappa-B protein level of retina remained unchanged in all the groups. These results are shown in Fig. 6b.

Latency and Amplitude Values of VEP Components

Differences of VEP parameters were analyzed by repeated measures of ANOVA. We did not find significant differences in latencies and amplitudes between right and left eyes. But we did between groups. Based on the analysis, data obtained from stimulating each eye were averaged. The means and standard deviations of peak latencies of VEP components of all the groups are shown in Table 1. The mean latencies of P1, N1, P2, N2, P3, N3, P4, N4, and P5 components were significantly prolonged in MPTP-intoxicated group when compared with the control group. On the other hand, in MPTP + DHA group the mean

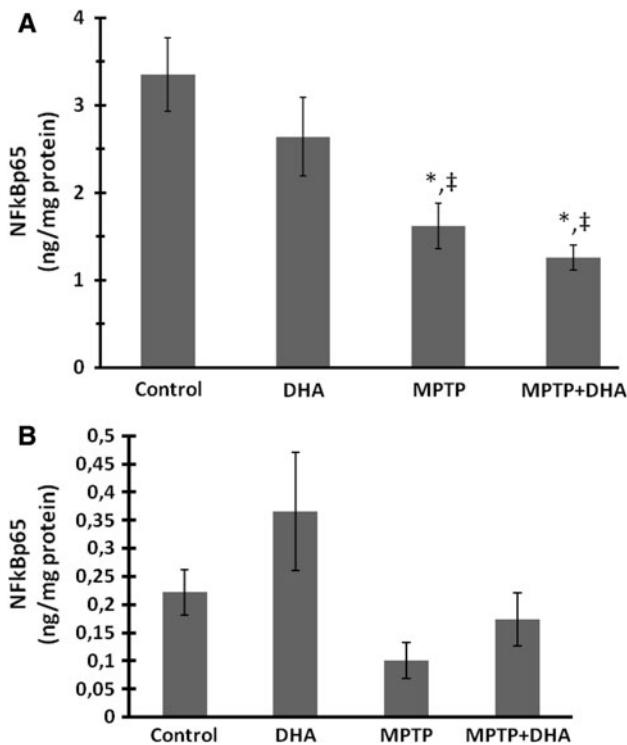


Fig. 6 The effect of DHA on NF-κBp65 protein levels in the control and MPTP treated groups in **a** SN and **b** retina tissues. The NF-κBp65 protein level was measured by an Invitrogen NF-κBp65 immunoassay kit. **P* < 0.01 vs. control group; †*P* < 0.01 vs. DHA group. Data represents mean ± SEM

latencies of P1, N1, P2, N2, P3, N3, P4, and N4 were unchanged with respect to control group. In MPTP + DHA group, only the mean latency of P5 component was prolonged when compared with control value. Docosahexaenoic acid treatment had improved the mean latencies of VEP components, which had prolonged because of the effect of MPTP.

Discussion

The etiology of PD is complex. It could be explained by combination of environmental and genetic factors. Understanding the mechanism of the disease process may help in the development of effective neuroprotective therapeutic approaches to halt the disease progression.

The most important and most frequently used parkinsonian toxin applied in animal models is MPTP. This toxin is mainly used in non-human primates, in mice, and in rats (Gerlach and Riederer 1996; Przedborski et al. 2001). The MPTP mouse model is particularly useful in testing new therapeutic intervention in PD. In contrast to primates, rodents are less sensitive to MPTP toxicity (Schmidt and Ferger 2001). Nevertheless, the C57BL/6 mice strain was

Table 1 The means and SDs of peak latencies (ms) for each VEP component

Groups	P ₁ (ms)	N ₁ (ms)	P ₂ (ms)	N ₂ (ms)	P ₃ (ms)	N ₃ (ms)	P ₄ (ms)	N ₄ (ms)	P ₅ (ms)
Control	15.76 ± 1.97	23.38 ± 2.59	28.33 ± 3.05	35.71 ± 4.44	42.8 ± 5.51	55.52 ± 8.93	72.95 ± 5.93	83.52 ± 8.32	96.95 ± 7.96
DHA	16.3 ± 2.9	23.2 ± 3.27	28.6 ± 2.52	37.55 ± 4.79	44.9 ± 5.69	55.95 ± 5.68	79.15 ± 7.56	89.4 ± 8.32	102.45 ± 7.16
MPTP	23.77 ± 2.06*	30.38 ± 2.17*	36.18 ± 3.67*	42.93 ± 3.78*	49.09 ± 4.16*	58.62 ± 3.84*	79.27 ± 5.07*	94.45 ± 7.62*	112.18 ± 10.95*
MPTP + DHA	15.95 ± 3.28	22.68 ± 3.8	29 ± 4.37	38.25 ± 4.78	44.35 ± 4.91	54.55 ± 6.09	75.45 ± 8.72	89.55 ± 8.98	104.19 ± 10.47*

The mean value of each component was determined by averaging the data of both eyes

Values are expressed as means ± SDM, n = 10 in each group

* *P* < 0.05 vs. control group

found to be sensitive to a systemic injection of MPTP and was significantly more selective than other mice strains in terms of affecting mesencephalic dopaminergic neurons (Schober 2004). Currently, the MPTP mouse model provides the most useful animal model of PD to study neuropathological and neurochemical changes (Schmidt and Ferger 2001). In principle, MPTP can be given by a variety of regimens such as gavage or stereotactical injection, but the most common and reproducible form is still systemic administration, e.g., subcutaneous, intravenous, intraperitoneal, or intramuscular (Przedborski et al. 2001). Administration of MPTP leads to the loss of dopaminergic neurons in SN. The MPTP model affects mitochondria, either by inhibiting mitochondrial complex I or complex III (Nicklas et al. 1985) which leads to a significant reduction in the number of neurons in the SNpc (Beal 2001). Previous studies have shown that MPTP caused oxidative stress and energy crisis. Mitochondrial defect induced by MPTP may play a role in development of apoptosis (Wallace 2005; Chipuk et al. 2006; Mills et al. 2008). In this study, SN degeneration was confirmed to have occurred at 7 days after the final MPTP injection.

It was concluded that PUFA levels were reduced in parkinsonian SN when compared to other brain regions and to control tissue (Dexter et al. 1989). Docosahexaenoic acid cannot synthesize *de novo* in mammals. Therefore, it must be obtained through the diet. Studies in animals clearly show that oral intake of DHA can alter brain DHA concentrations and thereby modify brain functions (Galli et al. 1971; Bourre et al. 1993; Pawlosky et al. 2001; Murthy et al. 2002; Levant et al. 2007). This provides us with an opportunity to use DHA as a nutraceutical or pharmaceutical tool in PD.

In this study, DHA treated for 23 days before and 7 days after (totally 30 days) intraperitoneal injection of MPTP. It was previously observed that chronic oral administration of DHA could increase neuronal levels of the phosphatides and of specific proteins that characterize synaptic membranes (Wurtman et al. 2006), as well as the numbers of dendritic spines, in rodent brain (Sakamoto et al. 2007). Cansev et al. (2008) shown that reductions in TH protein levels in lesioned striata were partially restored, increasing by 21% following 28 days DHA supplementation. In the same study, they also concluded that DHA did not diminish the initial toxic responses to the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) as 3 days (Cansev et al. 2008). Hence, in our study animals killed 30 days after starting DHA, a period previously shown to reliably increase membrane phosphatides, synaptic proteins (Wurtman et al. 2006) and dendritic spines (Sakamoto et al. 2007). Cansev et al. (2008) estimated that DHA restores nigral TH levels possibly by increasing the number and/or size of nigrostriatal terminals and synapses. In the PD research field, it has been recently demonstrated

that 1-month administration of DHA (100 mg/kg) before MPTP intoxication reduced by about 40% the extent of levodopa-induced dyskinesias in a non-human primate model of Parkinsonism (Samadi et al. 2006). The authors proposed that this effect of DHA could be explained by the activation of nuclear receptors that operate as transcription factors, such as retinoid X receptors. Moreover, a neuroprotective action of DHA has been observed in a mice model of PD that treated with a diet high in n-3 PUFA for 10 months before MPTP injection (Bousquet et al. 2008).

In this study, in all cases, the neuroprotective effect of DHA against MPTP in the mice was apparent. The results of these immunohistochemical examination indicated that DHA protected dopaminergic neurons against MPTP-induced cell death in the mouse model of PD. Previous studies support that high n-3 PUFA diet prevented the MPTP-induced decrease of TH-labeled nigral cells (Bousquet et al. 2008; Cansev et al. 2008).

In this study, the DHA dose was selected according to previous studies (Simopoulos 1989; Kremer et al. 1990; Hacıoglu et al. 2006; Hacıoglu et al. 2007; Tanriover et al. 2010). Daily intake of DHA was used with various doses in experimental studies. While DHA is reported generally to have neuroprotective effects both *in vitro* and *in vivo*, Kabuto et al. (2009) showed that DHA ethyl ester treatment resulted in worsening of 6-OHDA-induced neuronal damage with lipid peroxidation. The high content of long chain PUFAs in the cell membrane of brain tissue cells is considered the principal target for oxygen free radicals and for accumulation of lipid peroxides (Halliwell 1992). This discrepancy with our study may be related with diversity of DHA dose and treatment schedule or animal model that studied.

Degeneration of SN was associated with motor dysfunctions (akinesia, rigidity, and catalepsy) (Haobam et al. 2005). There was a high degree of correlation between dopaminergic neuron degeneration and motor impairment in MPTP-induced Parkinson model (Haobam et al. 2005). We have also evaluated motor activity in experimental PD mice. Measurement of motor activity in experimental Parkinson models depends on the performance of animals in well-defined tasks. The results of these tests confirmed that the created model of PD was reliable. In this study, MPTP-treated mice displayed typical behavioral characteristics of PD in the vertical pole test. The results of this study demonstrated that motor activity was significantly impaired in MPTP-induced experimental PD. The present findings are in agreement with results from previous studies which demonstrate the impairment of motor activity in MPTP-induced Parkinson models (Mitra et al. 1992; Sedelis et al. 2001; Kato et al. 2004). It is important to note that DHA administration reduced this sign of Parkinsonism in MPTP-treated group.

Caspase-3 enzyme activity increased in MPTP-treated group when compared to control. On the other hand, a number of reports have shown a very pronounced DHA treatment partially decreased caspase-3 activity and DHA prevented neuron death (Green et al. 2001; German et al. 2006; Bousquet et al. 2008). This protection prevented the exit of death factors from mitochondria. Our results indicated that DHA treatment had a clear neuroprotective effect in MPTP toxicity. This finding may be associated with increased neuron number in the SN following DHA treatment in MPTP administered mice.

In this study, MPTP administration lead to an increase of in COX -2 activity which strongly suggests that it plays a detrimental role in neurodegeneration and stimulation of an inflammatory process following neuronal death (Przybylkowski et al. 2004; Boyd et al. 2007). Cyclooxygenase-2 may aggravate the degeneration process (Hoang et al. 2009) which also plays an important role in MPTP toxicity. The expression COX-2 mRNA and COX-2 protein increased as quickly as 24 h after MPTP injection achieving maximum on day 7 (Przybylkowski et al. 2004). This result is in agreement with those of previous studies (Feng et al. 2003; Teismann et al. 2003; de Meira Santos Lima et al. 2006; Reksidler et al. 2007; Hoang et al. 2009). Increased COX-2 catalytic activity was associated with increased PGE2 tissue content in SN (Vijitruth et al. 2006). Prostaglandin E2 reflects COX-1 activity. As well we showed that total COX activity increased in SN. It is indicated that PGE2 reduction and COX-2 inhibition are indicative of the anti-inflammatory and neuroprotective action by DHA. Our findings support the previous studies that show DHA inhibited COX-2 expression and activity (Boudrault et al. 2010; Singh et al. 1997; Bazan 2009; Lee et al. 2009b). Cyclooxygenase-2 protein expression is regulated by NF κ B. Nuclear factor kappa-B protein level was examined 7 days after the last injection of MPTP and NF- κ Bp65 protein level decreased significantly in SN of MPTP group when compared to control. This result is time-dependent. Previous studies demonstrated that nuclear translocation of NF- κ Bp65 in dopaminergic neurons of SN increased 24 h after MPTP toxicity (Ghosh et al. 2007; Ghosh et al. 2009). Docosahexaenoic acid has been shown to inhibit the activity of NF- κ Bp65 protein. The mechanism of action of DHA on NF- κ B was affected by its concentration. Lower concentration of DHA may cause activation of NF- κ B transcription factor (Lee et al. 2009b). Docosahexanoic acid was significantly inhibited NF- κ B activity in a dose-dependent manner (Lee et al. 2009b). Retina COX-2 expression and activation is unchanged by MPTP toxication. DHA administration did not affect on caspase-3 activity of retina. NF- κ Bp65 is unchanged in retina of MPTP + DHA group.

In the experimental Parkinson mice model, we also studied visual abnormalities assessed by VEPs. VEPs were recorded from mice exposed to MPTP that were treated with DHA. The measured latencies and amplitudes of VEP components were in considerable agreement with those in other laboratory regarding general normative data (Strain and Tedford 1993). Many earlier studies have reported abnormalities of pattern electroretinograms (ERGs) and VEPs abnormalities of visual perception in Parkinson patients (Bodis-Wollner and Yahr 1978; Bodis-Wollner and Onofrj 1982, 1987; Onofrj et al. 1986; Matsui et al. 2005). Moreover, administration of DA precursors (Bodis-Wollner and Yahr 1978; Gawel et al. 1981), l-Dopa or apomorphine (Bodis-Wollner and Onofrj 1982; Onofrj and Bodis-Wollner 1982; Onofrj et al. 1986; Ghilardi et al. 1988a; Buttner et al. 2000) restored normal VEP latency in parkinsonian patients. Experimental models with MPTP-treated animals or DA blockers or depleting agents confirm the effects on the visual system (Onofrj and Bodis-Wollner 1982; Ghilardi et al. 1988a, b). It is concluded that depletion of retinal DA impairs the timing of retinal responses to light (Dyer et al. 1981).

Our results indicated that MPTP-induced increase in VEP latencies may be due to delayed input to visual cortex or alterations at cortical levels. MPTP caused an increase in COX expression and activity process and this was accompanied by changes in VEPs. Therefore, it could be concluded that COX-2 and COX-1 might be one possible factor affecting VEP components. Supplementation with DHA produced a significant decrease in total COX and COX-2 activities and markedly shortened the latencies of all VEP components. Interpretation of this DHA-induced effect on VEP parameters is difficult because little is known about the neuronal processes responsible for peak generation. Although species difference in neural generators of these VEP components may exist, they appear to be generated in cortex. Therefore, the changes in all peak latencies that occurred after DHA supplementation may be related to alter visual processing at cortical level. The beneficial effects of DHA could be explained by release of nitric oxide (NO). Nitric oxide may also play an important role in electrophysiological alterations. Although NO has been demonstrated at all levels of the sensory CNS and across many modalities, there is a large amount of evidence supporting its presence and action in visual system (Cudeiro and Rivadulla 1999). Additionally, DHA can affect membrane order, voltage-dependent calcium channels, or may act as a second messenger in the modulation of synaptic signal transduction pathways (Bousquet et al. 2008).

In conclusion, this study demonstrates an improvement of VEP components following DHA supplementation in MPTP toxicity. These affirmative changes may be related

to Caspase-3, COX-2 activity lowering effect of DHA, which may prevent the neurotoxic effect of MPTP. Further studies are required to clarify these aspects.

Acknowledgments This study was supported by Akdeniz University Research Projects Unit (Project no: 2007.01.0103.016).

References

- Adams J (2001) Proteasome inhibition in cancer: development of PS-341. *Semin Oncol* 28:613–619
- Araki T, Mizutani H, Matsubara M, Imai Y, Mizugaki M, Itoyama Y (2001) Nitric oxide synthase inhibitors cause motor deficits in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 11:125–133
- Barbato L, Rinalduzzi S, Laurenti M, Ruggieri S, Accornero N (1994) Color VEPs in Parkinson's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 92:169–172
- Barbeau A, Roy M, Bernier G, Campanella G, Paris S (1987) Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas. *Can J Neurol Sci* 14:36–41
- Bazan NG (2009) Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 81:205–211
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325–334
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20:415–455
- Bodis-Wollner I (1997) Visual electrophysiology in Parkinson's disease: PERG, VEP and visual P300. *Clin Electroencephalogr* 28:143–147
- Bodis-Wollner I, Onofrij M (1982) System diseases and visual evoked potential diagnosis in neurology: changes due to synaptic malfunction. *Ann N Y Acad Sci* 388:327–348
- Bodis-Wollner I, Onofrij M (1987) The visual system in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 45:323–327
- Bodis-Wollner I, Yahr MD (1978) Measurements of visual evoked potentials in Parkinson's disease. *Brain* 101:661–671
- Bodis-Wollner I, Marx MS, Mitra S, Bobak P, Mylin L, Yahr M (1987) Visual dysfunction in Parkinson's disease. Loss in spatiotemporal contrast sensitivity. *Brain* 110(Pt 6):1675–1698
- Boudraut C, Bazinet RP, Kang JX, Ma DW (2010) Cyclooxygenase-2 and n-6 PUFA are lower and DHA is higher in the cortex of fat-1 mice. *Neurochem Int* 56:585–589
- Bourre JM, Bonneil M, Clement M, Dumont O, Durand G, Lafont H, Nalbone G, Piciotti M (1993) Function of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 48:5–15
- Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, Salem N Jr, Cicchetti F, Calon F (2008) Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 22:1213–1225
- Boyd JD, Jang H, Shepherd KR, Faherty C, Slack S, Jiao Y, Smeyne RJ (2007) Response to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) differs in mouse strains and reveals a divergence in JNK signaling and COX-2 induction prior to loss of neurons in the substantia nigra pars compacta. *Brain Res* 1175:107–116
- Bulens C, Meerwaldt JD, Van der Wildt GJ, Van Deursen JB (1987) Effect of levodopa treatment on contrast sensitivity in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 22:365–369
- Buttner T, Kuhn W, Muller T, Heinze T, Puhl C, Przuntek H (1996) Chromatic and achromatic visual evoked potentials in Parkinson's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 100:443–447
- Buttner T, Muller T, Kuhn W (2000) Effects of apomorphine on visual functions in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 107:87–94
- Cansev M, Ulus IH, Wang L, Maher TJ, Wurtman RJ (2008) Restorative effects of uridine plus docosahexaenoic acid in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 62:206–209
- Carlton PS, Gopalakrishnan R, Gupta A, Liston BW, Habib S, Morse MA, Stoner GD (2002) Piroxicam is an ineffective inhibitor of N-nitrosomethylbenzylamine-induced tumorigenesis in the rat esophagus. *Cancer Res* 62:4376–4382
- Catalan J, Moriguchi T, Slotnick B, Murthy M, Greiner RS, Salem N Jr (2002) Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci* 116:1022–1031
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13:1396–1402
- Cudeiro J, Rivadulla C (1999) Sight and insight—on the physiological role of nitric oxide in the visual system. *Trends Neurosci* 22:109–116
- de Meira Santos Lima M, Braga Reksidler A, Marques Zanata S, Bueno Machado H, Tufik S, Vital MA (2006) Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res* 1101:117–125
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52:381–389
- Disshon KA, Dluzen DE (1997) Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release. *Brain Res* 764:9–16
- Dyer RS, Howell WE, MacPhail RC (1981) Dopamine depletion slows retinal transmission. *Exp Neurol* 71:326–340
- Feng Z, Li D, Fung PC, Pei Z, Ramsden DB, Ho SL (2003) COX-2-deficient mice are less prone to MPTP-neurotoxicity than wild-type mice. *Neuroreport* 14:1927–1929
- Galli C, White HB Jr, Paoletti R (1971) Lipid alterations and their reversion in the central nervous system of growing rats deficient in essential fatty acids. *Lipids* 6:378–387
- Gasser T (2001) Molecular genetics of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86:23–32
- Gawel MJ, Das P, Vincent S, Rose FC (1981) Visual and auditory evoked responses in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44:227–232
- Gemicci B, Tan R, Ongut G, Izgut-Uysal VN (2010) Expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric ischemia-reperfusion: role of angiotensin II. *J Surg Res* 161:126–133
- Gerlach M, Riederer P (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103:987–1041
- German OL, Insua MF, Gentili C, Rotstein NP, Politi LE (2006) Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *J Neurochem* 98:1507–1520
- Ghilardi MF, Bodis-Wollner I, Onofrij MC, Marx MS, Glover AA (1988a) Spatial frequency-dependent abnormalities of the pattern electroretinogram and visual evoked potentials in a parkinsonian monkey model. *Brain* 111(Pt 1):131–149
- Ghilardi MF, Chung E, Bodis-Wollner I, Dvorzaniak M, Glover A, Onofrij M (1988b) Systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2-3-6-tetrahydropyridine (MPTP) administration decreases retinal dopamine content in primates. *Life Sci* 43:255–262

- Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K (2007) Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18754–18759
- Ghosh A, Roy A, Matras J, Brahmachari S, Gendelman HE, Pahan K (2009) Simvastatin inhibits the activation of p21ras and prevents the loss of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 29:13543–13556
- Green P, Glozman S, Yavin E (2001) Ethyl docosahexaenoate-associated decrease in fetal brain lipid peroxide production is mediated by activation of prostanoid and nitric oxide pathways. *Biochim Biophys Acta* 1531:156–164
- Hacioglu G, Agar A, Yargicoglu P (2006) The role of docosahexaenoic acid on visual evoked potentials in one kidney-one clip hypertension. *Acta Ophthalmol Scand* 84:488–494
- Hacioglu G, Kose O, Aslan M, Agar A (2007) Beneficial effects of docosahexaenoic acid on active avoidance performance in 1K-1C hypertensive rats. *Neurobiol Learn Mem* 87:159–165
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609–1623
- Haobam R, Sindhu KM, Chandra G, Mohanakumar KP (2005) Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. *Behav Brain Res* 163:159–167
- Harnois C, Di Paolo T (1990) Decreased dopamine in the retinas of patients with Parkinson's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:2473–2475
- Hetzler BE, Boyes WK, Creason JP, Dyer RS (1988) Temperature-dependent changes in visual evoked potentials of rats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 70:137–154
- Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF, Przedborski S (2009) Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 47:1049–1056
- Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA (2004) JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:665–670
- Kabuto H, Amakawa M, Mankura M, Yamanushi TT, Mori A (2009) Docosahexaenoic acid ethyl ester enhances 6-hydroxydopamine-induced neuronal damage by induction of lipid peroxidation in mouse striatum. *Neurochem Res* 34:1299–1303
- Kang JM, Park HJ, Choi YG, Choe IH, Park JH, Kim YS, Lim S (2007) Acupuncture inhibits microglial activation and inflammatory events in the MPTP-induced mouse model. *Brain Res* 1131:211–219
- Kato H, Kurosaki R, Oki C, Araki T (2004) Arundic acid, an astrocyte-modulating agent, protects dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity in mice. *Brain Res* 1030:66–73
- Kidd PM (2000) Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev* 5:502–529
- Kobayashi T, Araki T, Itoyama Y, Takeshita M, Ohta T, Oshima Y (1997) Effects of L-dopa and bromocriptine on haloperidol-induced motor deficits in mice. *Life Sci* 61:2529–2538
- Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, Sherman M (1990) Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum* 33:810–820
- Langheinrich T, Tebartz van Elst L, Lagreze WA, Bach M, Lucking CH, Greenlee MW (2000) Visual contrast response functions in Parkinson's disease: evidence from electroretinograms, visually evoked potentials and psychophysics. *Clin Neurophysiol* 111:66–74
- Lee JA, Song HY, Ju SM, Lee SJ, Kwon HJ, Eum WS, Jang SH, Choi SY, Park JS (2009a) Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by superoxide dismutase in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells. *Exp Mol Med* 41:629–637
- Lee SA, Kim HJ, Chang KC, Baek JC, Park JK, Shin JK, Choi WJ, Lee JH, Paik WY (2009b) DHA and EPA down-regulate COX-2 expression through suppression of NF-kappaB activity in LPS-treated human umbilical vein endothelial cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 13:301–307
- Levant B, Ozias MK, Carlson SE (2007) Specific brain regions of female rats are differentially depleted of docosahexaenoic acid by reproductive activity and an (n-3) fatty acid-deficient diet. *J Nutr* 137:130–134
- Lockwood AH (2000) Pesticides and parkinsonism: is there an etiological link? *Curr Opin Neurol* 13:687–690
- Matsui H, Udaoka F, Tamura A, Oda M, Kubori T, Nishinaka K, Kameyama M (2005) The relation between visual hallucinations and visual evoked potential in Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 28:79–82
- Mattammal MB, Strong R, Lakshmi VM, Chung HD, Stephenson AH (1995) Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease. *J Neurochem* 64:1645–1654
- McLaughlin P, Zhou Y, Ma T, Liu J, Zhang W, Hong JS, Kovacs M, Zhang J (2006) Proteomic analysis of microglial contribution to mouse strain-dependent dopaminergic neurotoxicity. *Glia* 53:567–582
- Meissner W, Hill MP, Tison F, Gross CE, Bezdard E (2004) Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials. *Trends Pharmacol Sci* 25:249–253
- Michael-Titus AT (2007) Omega-3 fatty acids and neurological injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77:295–300
- Mills RD, Sim CH, Mok SS, Mulhern TD, Culvenor JG, Cheng HC (2008) Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem* 105:18–33
- Mitra N, Mohanakumar KP, Ganguly DK (1992) Dissociation of serotonergic and dopaminergic components in acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Brain Res Bull* 28:355–364
- Murthy M, Hamilton J, Greiner RS, Moriguchi T, Salem N Jr, Kim HY (2002) Differential effects of n-3 fatty acid deficiency on phospholipid molecular species composition in the rat hippocampus. *J Lipid Res* 43:611–617
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36:2503–2508
- Ogawa N, Mizukawa K, Hirose Y, Kajita S, Ohara S, Watanabe Y (1987) MPTP-induced parkinsonian model in mice: biochemistry, pharmacology and behavior. *Eur Neurol* 26(Suppl 1):16–23
- Onofrj M, Bodis-Wollner I (1982) Dopaminergic deficiency causes delayed visual evoked potentials in rats. *Ann Neurol* 11:484–490
- Onofrj M, Ghilardi MF, Basciani M, Gambi D (1986) Visual evoked potentials in parkinsonism and dopamine blockade reveal a stimulus-dependent dopamine function in humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49:1150–1159
- Pawlosky RJ, Bacher J, Salem N Jr (2001) Ethanol consumption alters electroretinograms and depletes neural tissues of docosahexaenoic acid in rhesus monkeys: nutritional consequences of a low n-3 fatty acid diet. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1758–1765
- Peachey NS, Ball SL (2003) Electrophysiological analysis of visual function in mutant mice. *Doc Ophthalmol* 107:13–36
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M (2001) The parkinsonian toxin 1-methyl-4-