

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

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE GÖRSEL
UYARILMA POTANSİYEL DEĞİŞİKLİKLERİNE
iNOS ve nNOS’UN ETKİSİ**

Sinem ARAS

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2012

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

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE GÖRSEL
UYARILMA POTANSİYEL DEĞİŞİKLİKLERİNE
iNOS ve nNOS'UN ETKİSİ**

Sinem ARAS

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aysel AĞAR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2010.02.0122.007)

‘Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir’

Antalya, 2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 13/ 07 / 2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



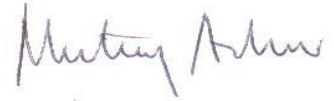
Üye: Prof. Dr. V. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Filiz BASRALI
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü 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'nda görülen en temel patoloji, nigrostriatal dopaminerjik sistemin dejenerasyonu ve bazal ganglionlarda dopaminin azalmasıdır. Parkinson Hastalığı Substansiya Nigra'nın Pars Kompakta (SNpc) parçasındaki dopaminerjik nöronların seçici kaybı ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hastalıkta görsel uyarılma potansiyelleri (VEPs)'nde görülen değişiklikler, görsel sistemin önemli ölçüde etkilendiğinin göstergesidir. Bu değişikliklerin mekanizması tam bilinmemektedir. Deneysel Parkinsonda NO'nın önemli rolü olduğu, nitrik oksit sentezinde rolü olan nNOS ve iNOS aktivitelerinin arttığı bilinmektedir. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan farelerde meydana gelen VEP değişikliklerine nNOS ve iNOS inhibitörlerinin düzeltici etkisinin olup olmadığını ve olası etkide lipid peroksidasyon ve apoptozis ile ilişkisini aydınlatmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

3 aylık erkek C57BL/6 fareler rastgele olarak 6 gruba ayrılmıştır. Bunlar; Kontrol (K), spesifik nNOS enzim inhibitörü 7-Nitraindazol (7-NI) , spesifik iNOS inhibitörü S-methylisothiourea (SMT), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ile deneysel Parkinson oluşturulan grup, 7-NI+MPTP , SMT+MPTP verilen gruptur. MPTP toksini (4x20 mg/kg) 12 saatlik intervaller ile 2 gün boyunca uygulanırken, 7-NI (50mg/kg) fıstık yağında çözülerek MPTP uygulamasından 1 saat önce, SMT (10mg/kg) serum fizyolojikte çözülerek MPTP uygulamasından 15 dakika önce i.p. olarak uygulanmıştır.

Farelerin motor aktivitesi lokomotor aktivite ve çubuk testleri ile değerlendirilmiştir. Deney süresinin sonunda farelerin görsel uyarılma potansiyelleri (VEPs) kaydedilmiş, biyokimyasal analizler için beyin ve retina dokuları çıkartılmıştır. SN'deki dopaminerjik hücre ölümü Tirozin Hidroksilaz (TH) ile, iNOS, nNOS enzim aktiviteleri spesifik NOS immünreaktif hücrelerin immünohistokimyasal analizi ile tespit edilmiştir.

Deneysel Parkinson modeli oluşturulan farelerde çubuk testinde total iniş sürelerinin uzadığı, NOS inhibitörleri verilen gruplarda bu sürenin kısaldığı gözlenmiştir. Parkinson modeli oluşturulan farelerde dopaminerjik hücre ölümü NOS inhibitörleri varlığında azalma göstermiştir. Bununla birlikte MPTP uygulanan farelerde artan NOS enzim aktivitesinin enzim inhibitörleri yardımı ile bloklanıp apoptozisi azalttığı saptanmıştır. SN'daki kazpaz-3 enzim aktivitesi, Nitrit/Nitrat ve 4-HNE düzeyleri, MPTP verildiğinde kontrole göre artış gösterirken, inhibitör verilen gruplarda azalma olduğu bulunmuştur. Aynı etki retina dokularında gözlenmemiştir. MPTP grubunda VEP'in tüm komponent latenslerinin önemli ölçüde uzadığı, iNOS ve nNOS verilmesinin ise bazı komponentleri etkilemezken, bazılarını düzelttiği tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, MPTP ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde spesifik iNOS ve nNOS enzim inhibitör uygulamasının dopaminerjik nöronları apoptotik hücre ölümüne karşı koruduğunu ve bozulan VEP latensleri üzerinde düzeltici etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Parkinson, MPTP, iNOS, nNOS, VEPs

ABSTRACT

The main pathology in Parkinson's Disease (PD) is degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system and the reduction of dopamine in the basal ganglia. The selective loss of dopaminergic neurons at pars compacta of substantia nigra (SNpc) leads to PD. Visual evoked potentials (VEPs) have been shown to be a sensitive marker in visual system changes of PD. The exact mechanism of these changes are unknown. Nitric oxide (NO) plays an important role in experimental PD. Increased activity of neuronal (n) and inducible (i) nitric oxide synthase (NOS) play a role in elevated nitric oxide synthesis. The present study aimed to elucidate VEP changes in MPTP induced PD and investigate the possible beneficial effects of nNOS and iNOS inhibitors on altered VEPs, lipid peroxidation and apoptosis occurring in experimental mice model of the disease.

3 months old C57BL/6 mice were randomly divided into 6 groups which included control (c), 7-nitro indazole treated (7-NI), S-methylisothiourea (SMT) treated, 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) treated, 7-NI+MPTP treated, SMT+MPTP treated. The MPTP toxin was applied twice daily with 12 hours intervals for two days with a total given dose of 4x20 mg/kg. The nNOS inhibitor, 7-NI, was dissolved in peanut oil and given at a dose of 50 mg/kg, 1 hour before MPTP administration. The iNOS inhibitor, SMT, was dissolved in physiological saline and administered i.p. at a dose of 10 mg/kg, 15 minutes before MPTP administration.

Motor activity of mice was evaluated via the pole test. At the end of the experimental period VEPs were recorded, brain and retina tissues were removed for biochemical analysis. Dopaminergic neuron death at SN was determined by immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase (TH). Immunohistochemical staining was also performed to determine iNOS and nNOS in all tissue sections.

Mice with experimental PD exhibited decreased motor activity. Dopaminergic cell death in SNpc was significantly increased in MPTP treated group compared to control. Diminished Parkinsonism symptoms were observed in 7-NI+MPTP and SMT+MPTP groups. Treatment with 7-NI and SMT decreased dopaminergic cell death in MPTP treated mice. Caspase-3 activity, nitrite/ nitrate and 4-hydroxynonenal (4-HNE) levels were significantly increased in SN of MPTP treated mice compared to control. Treatment with 7-NI and SMT significantly decreased elevated caspase-3 activity, nitrite/nitrate and 4-HNE levels in SN of MPTP treated mice. No significant difference in above parameters were observed in the retina of experimental groups.

VEP latencies were significantly prolonged in MPTP group compared to control group. 7-NI and SMT treatment caused a significant decrease in VEP latencies in MPTP treated mice compared to none treated MPTP group. This data shows that 7-NI and SMT improves prolonged VEP latencies in MPTP group. The protective effects of 7-NI and SMT on VEP alterations can be related to decreased dopaminergic cell death and reduced lipid peroxidation.

Key words: Parkinson, MPTP, iNOS, nNOS, VEPs

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Parkinson Hastalığı	3
2.1.1. Parkinson Hastalığının Tanısı ve Klinik Özellikleri	3
2.1.1.1. İstirahat Tremoru	3
2.1.1.2. Bradikinezi	4
2.1.1.3. Rijidite	4
2.1.1.4. Postural Dengesizlik	4
2.1.1.5. Donma	5
2.1.2. Parkinson Hastalığının Patogenezi	5
2.1.2.1. Reaktif Oksijen Türleri	6
2.1.2.2. Reaktif Nitrojen Türleri	6
2.1.3. Apoptoz	10
2.1.3.1. Nöron Ölüm Mekanizması	11
2.1.4. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi	13
2.1.5. Parkinson Hastalığının Nöranatomik Mekanizmaları	13
2.1.6. Dopaminerjik Sistem	15
2.1.7. Deneysel Parkinson Modelleri	17
2.1.7.1. MPTP	18
2.2. Görsel Sistem ve Görsel Uyarılma Potansiyelleri	20
2.2.1. Görme	20
2.2.2. Görme Sistemi	20
2.2.3. Retina	21
2.2.4. Fototransdüksiyon Kaskatı	24
2.2.5. Retina ve Dopamin İlişkisi	27
2.2.6. Görsel Sistemin Nöral Yolağı	27
2.3. Uyarılmış Potansiyeller	29
2.3.1. Görsel Uyarılmış Potansiyeller	30
2.3.2. Görsel Uyarılmış Potansiyelleri Etkileyen Faktörler	32
2.4. Nitrik Oksit	33
2.4.1. Nitrik Oksit Sentezi	35
2.4.2. Nitrik Oksit Sentez Çeşitleri	36
2.4.2.1. eNOS	37

2.4.2.2. iNOS	38
2.4.2.3. nNOS	38
2.4.3. Nitrik Oksitin Fotoreseptörlerdeki Etki Mekanizması	40
2.5. Hipotez	41
GEREÇ VE YÖNTEMLER	
3.1. Gruplandırma	42
3.2. Deney Protokolü	42
3.2.1. Deneysel Parkinson Oluşturulması	42
3.2.2. NOS İnhibitörlerinin Uygulanması	42
3.3. Parametreler	43
3.3.1. Ağırlık Takibi	43
3.3.2. Motor Aktivite Tayini	43
3.3.3. Görsel Uyarılma Potansiyelleri Kayıtları	44
3.3.4. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılması	44
3.3.5. İmmunohistokimyasal Protokol	44
3.3.6. Biyokimyasal Ölçümler	45
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi	48
BULGULAR	
4.1. Genel Görünüm	49
4.2. Ağırlık Değişimi	49
4.3. Motor Aktivite Tayini	49
4.3.1. VEP Sonuçları	50
4.3.2. Biyokimyasal Parametreler	54
4.3.3. Substansiya Nigra ve Retina Kaspaz-3 Aktivite Sonuçları	54
4.4. Substansiya Nigra ve Retina Nitrit/Nitrat Sonuçları	55
4.5. Substansiya Nigra ve Retina 4-HNE Sonuçları	57
4.6. TH İçeren Nöron Sayısı	58
4.7. TH immunreaktivitesi	59
4.8. NOS immunreaktiviteleri	61
TARTIŞMA	64
SONUÇLAR	69
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3-MT	: 3-metoksitiramin
3-NT	: 3-nitrotirozin
4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
5'GMP	: 5' guanozin mono fosfat
6-OHDA	: 6-hidroksi dopamin
7-NI	: 7-nitroindazole
8-OHDG	: 8-hidroksi-2-deoksi guanozin
Ag-Cl	: Gümüş klörür
AIF	: Apoptoz indükleyen faktör
ANT	: Adenin nükleotit taşıyıcıları
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive eden faktör
ATP	: Adenozin trifosfat
BAEP	: Beyin sapı duysal uyarılmış potansiyeli
BH₄	: Tetra hidrobiyopterin
Ca⁺²	: Kalsiyum
CaBP	: Kalsiyum bağlayıcı protein
CaM	: Kalmodulin
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
Cl⁻	: Klor
COMT	: Katekol-O-metiltransferaz
COX-2	: Siklooksigenaz-2
DA	: Dopamin
DAB	: 3-Diamino benzidin
dLGN	: Dorsal genikülat nükleus
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DOPAC	: 3,4-dihidroksifenilasetik asit
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
EEG	: Elektroensefalogram
EndoG	: Endonükleaz G

eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
EP	: Uyarılmış potansiyel
ER	: Endoplazmik retikulum
ETS	: Elektron transport zinciri
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
FADD	: Fas bağımlı ölüm domain proteini
FADH₂	: Flavin adenin dinükleotid
FAS (CD95)	: Apoptoz antijen-1
FAS-L	: FAS ligandı
FMN	: Flavin mono nükleotid
GABA	: Gama amino bitürik asit
GC	: Guanilat siklaz
GPe	: Globus pallidus eksterna
GPi	: Globus pallidus internal
GSH	: Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HH	: Huntington Hastalığı
HVA	: Homovanilik asit
İ.P.	: İntra peritoneal
IFN-γ	: İnterferon-γ
IL-1	: İnterlökin 1
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
K⁺	: Potasyum
LC	: Lewy cisimcikleri
L-DOPA	: 3,4- dihidroksi- L-fenilalanin
LED	: Işık yayan diod
LPS	: Lipopolisakkarit
MAO	: Monoamin oksidaz
MAP kinaz	: Mitojen aktive protein kinazlar
MDA	: Malon di aldehit
MFB	: Orta ön beyin demeti
MPDP	: 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum

MPP⁺	: 1-metil-4-fenil piridin
MPPP	: 4-propioniloksi-4-fenil-N-metilpiperidin
MPTP	: 1-metil 4-fenil 1,2,3,6- tetrahidropiridin
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
mtNOS	: Mitokondrial nitrik oksit sentaz
MTT	: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
Na⁺	: Sodyum
NAD:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH₂	: Hidroksilamin redüktaz
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NMDA	: N-Metil-D-aspartat
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Azot dioksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂⁻	: Süperoksit radikali
OH⁻	: Hidroksil radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PARK-1	: Alfa sinüklein
PARK-2	: Parkin
PARP	: Poli ADP riboz polimeraz
PARS	: Poli-ADP riboz sentaz
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PC	: Fosfotidilserin
PDZ	: Postsinaptik dansite proteini
pGC	: Partiküler guanilat siklaz
PH	: Parkinson Hastalığı
PI3K	: Fosfoinozitol-3-kinaz
PKA	: Protein kinaz A
PKC:	Protein kinaz C

PUMA	: p53'ü upregüle eden apoptoz modölatörü
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPE	: Retina pigment epiteli
SF	: Serum fizyolojik
sGC	: Çözülebilir guanilat siklaz
siRNA	: Küçük inhibe edici ribonükleik asit
SNpc	: Substansiya nigra pars kompakta
SOD	: Süperoksit dismutaz
SEP	: Somatosensöryel uyarılmış potansiyel
STN	: Subtalamik nükleus
TGF -β	: Transformin büyüme faktörü- β
TH	: Tirozin hidroksilaz
TNF	: Tümör nekroz edici faktör
TNF-R1	: Tümör nekroz edici faktör reseptör-1
UCH-L1	: Ubikutin karboksi terminal hidrolaz-L1
VECP	: Görsel uyarılma kortikal potansiyel
VEP	: Görsel uyarılma potansiyelleri
VER	: Görsel uyarılma cevabı
VIP	: Vazoaktif intestinal peptit
VMAT	: Veziküler mono amin taşıyıcılara

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Apoptozda içsel ve dışsal yolaklar	10
2.2. Apoptozda AIF faktörlerinin etkileri	12
2.3. PH'nın nöranatomik mekanizmaları	14
2.4. DA'nın spesifik reseptörleri	16
2.5. DA sentezi ve yıkımı	17
2.6. 6-OHDA'nın yapısal formülü	18
2.7. Deneysel Parkinson'da MPTP'nin etki mekanizması	19
2.8. Gözün anatomik kısımları	20
2.9. Retinanın gözdeki konumu	22
2.10. Fotoreseptör hücreler	23
2.11. Fototransdüksiyon kaskatı	25
2.12. cGMP'nin görmedeki yeri	25
2.13. Gözlerden görme korteksine giden temel görme yolları	28
2.14. M, P, K, hücrelerinin dLGN'deki konumları	29
2.15. Sıçandan alınmış örnek bir VEP kaydı	31
2.17. NO sentezi	35
2.18. NO sentezinde etkin faktörler	36
2.19. nNOS izoformları	39
2.20. Retinada NO'nun bulunduğu alanlar	40
3.1. Çubuk testi	43
4.1. Çubuk testi sonuçları	50
4.2. SN kaspaz-3 aktivite değerleri	54
4.3. Retina kaspaz-3 aktivite değerleri	55
4.4. SN nitrit/nitrat düzeyleri	55
4.5. Retina nitrit/nitrat düzeyleri	56
4.6. SN 4-HNE değerleri	57
4.7. Retina 4-HNE değerleri	57
4.8. Birim alandaki TH+ hücre sayısı	58
4.9. Deney gruplarında TH için gözlenen immünreaktivite	60
4.10. Deney gruplarında NOS için gözlenen immünreaktivite	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. NOS izoformları	37
4.1. Çubuk testi sonuçları	49
4.2. Deney gruplarından kaydedilen VEP genlikleri	52
4.3. Deney gruplarından kaydedilen VEP latensleri	53

GİRİŞ

Parkinson Hastalığı (PH) ilk kez 1817 yılında Dr. James Parkinson tarafından tanımlanmış ilerleyici nitelikte nörodejeneratif bir hastalıktır (1). PH, substansiya nigranın pars kompakta (SNpc) parçasındaki nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların yaygın harabiyeti sonucunda ortaya çıkar (1-3). Bu bölgede dopamin (DA) miktarının azalması diğer striatal yapılarda da DA düşmesine neden olur. PH'nın semptomları kaslarda rijidite, istirahat tremoru ve akinezdır. Semptomların görülmesi için dopaminerjik nöronlarda kaybın %80 olması gerekir (1). Normal koşullar altında SN'de üretilen DA, n. kaudatus ve n. putamene etki ederek motor hareketlerin uyarılmasında ve koordinasyonunda rol oynar (1). PH'da SN'deki DA üreten nöronların kaybı sonucunda motor hareketlerin düzenleme kapasitesinde azalma görülür (1). Bu nöron ölümlerinin sebebi tam bilinmemekle birlikte PH'da serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonun arttığı bilinmektedir (4).

Lipid peroksidasyonu arttıran birçok faktör içerisinde Nitrik oksit'in (NO) de önemli rolü olduğu bildirilmiştir (5-6). NO bir serbest radikal olduğu, oksijen varlığında nitrit/nitrat, gibi çeşitli nitrojen türleri oluşturduğu bilinmektedir (7-8). Oto-oksidasyon sonucu oluşan oksijen radikalleri ile NO'nun reaksiyona girerek peroksinitriti (ONOO⁻) oluşturduğu saptanmıştır (9-10). ONOO⁻'in birçok biyolojik molekülü tahrip edebilen ve metal katalizinden bağımsız olarak hidroksil radikalleri (OH[•])'ne ayrışabilen güçlü bir oksidan olduğu gösterilmiştir (9-10). NO sentezinde üç tip enzim izoformunun olduğu bilinmektedir (11). Bunlar; nöronlarda bulunan nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS-NOS I), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS-NOS II) ve endotelde bulunan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS-NOS III)'tür (10). 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropridin (MPTP) ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile oluşturulan deneysel Parkinson modellerinde, çeşitli iNOS ve nNOS enzimlerinin ekspresyonunda ve etkinliğinde artış olduğu gösterilmiştir (12). Çeşitli çalışmalarda nörodejenerasyonda nNOS ve iNOS enzimlerin rol aldığı gösterilmiştir (12). iNOS ve nNOS inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda nörodejenerasyonun azaldığı saptanmıştır (12).

DA ve NO nörotransmitter olarak görsel yolak ve santral sinir sisteminde bol miktarda bulunmaktadır (11-12). Parkinson hastalarında görsel sistemin de etkilendiği bilinmektedir. Canlı sisteminde birçok bölgede bulunan NO görsel sistemde de bulunmaktadır. Retinada nNOS ve iNOS enzimlerinin bulunduğu gösterilmiştir. Retinada NO retinal kan dolaşımının bazal seviyede devam etmesini sağlamaktadır. DA NO salınımından etkilenir. NO direkt olarak oksidasyon yolu ile DA'yı indirger (13-14). Bu bilgilerle paralel olarak NOS inhibisyonunun retinada bazal DA seviyesini arttırdığı bunu da cGMP yolağından bağımsız bir şekilde gerçekleştiğini belirtilmektedir (15).

Görsel uyarılma potansiyelleri (VEP) kaydının, görsel sistemin fonksiyonel değerlendirilmesinde kullanılan güvenilir bir yöntem olduğu dikkate alındığında (16-17), daha önce yaptığımız deneysel Parkinson modellerinde VEP latenslerinin değişmesi PH'da görsel sistemin etkilendiğinin öncelikli kanıtıdır. Bu bilgilere

ilaveten VEP latenslerinin lipid peroksidasyondan etkilendiği daha önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir (18).

Yapılan çalışmalarda SN'deki nöron ölümlerinde NO'nun rolü olduğu, bunda iNOS'la birlikte nNOS'un önemli rolü olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler ışığı altında çalışmamız, görsel sistemde oluşan değışikliklerin mekanizmasında iNOS ve nNOS'un rolünü, bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak deneysel Parkinson modelinde oluşan görsel sistem bozukluklarını VEP'lerde göstermektedir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

PH, yaş ortalaması artan toplumlarda Alzheimer Hastalığı'ndan (AH) sonra, ikinci sıklıkla görülen nörodejeneratif bir hastalıktır (19-20). PH görülme sıklığı genellikle 60 yaş üstüdür (21). Erkek ve kadın dağılımına bakıldığında erkeklerin bu hastalığa daha sıklıkla yakalandığı görülmektedir (22). PH, bazal gangliyon hastalığıdır. SNpc parçasında nöromelanin içeren nöronlarda başlayıp, beyin sapı nöronlarını da etkileyen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır.

Hastalığın temel klinik belirtileri istirahat tremoru, bradikinezi, rijidite ve postüral refleks bozukluğudur. PH, hareketlerin ve çizgili kas tonusunun istem dışı kontrolünden ve en uygun duruma getirilmesinde rolü olan ekstrapiramidal motor sistemi doğrudan etkileyen, son aşamada da ölüme kadar götüren bir hastalıktır.

PH ilk kez İngiliz bilim adamı James Parkinson'un 1817 yılında The London Medical and Physical Journal adlı dergide yayımlanan "Essay on the Shaking Palsy" başlıklı çalışmasında tanımlanmıştır (23). PH etyolojisinde çevresel toksinler, travma, yaşlılık, genetik yatkınlık, çevresel faktörlere duyarlılıkta artış, alfa sinüklein ve endojen toksisite ile ilişkide artış yer almaktadır (24). Genetik mutasyonların, yanlış katlanmış proteinlerin ubiquitin-proteozom ve otofaji-lizozomal sistemler tarafından anormal işlenmesi, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, inflamasyon ve diğer patojenik mekanizmaların Parkinson hastalarında dopaminerjik hücrelerin ölümüne yol açtığı bilinmektedir (24).

2.1.1. Parkinson Hastalığı'nın Tanısı ve Klinik Özellikleri

Hastalık genellikle sinsi bir şekilde başlar ve ilerler. Semptomlar başlangıçta vücutta tek taraflıyken, zamanla vücudun diğer yarısında da görülmeye başlar. PH'da gözlenen temel motor bozukluklar, istirahat tremoru, hareketlerin yavaşlaması (bradikinezi), rijidite ve hastalığın daha ileri evrelerinde ortaya çıkan postüral bozukluklar (postüral reflekslerin kaybı) olarak sıralanabilir.

2.1.1.1. İstirahat Tremoru

PH'nın en özgün bulgusu olup hastaların %50-75'inde ilk ortaya çıkan bulgudur. Hastalık sırasında tremor saptanma sıklığı %85'dir (25). Tremor gün içinde değişen şiddetlerde, farklı zaman aralıklarında ortaya çıkabilir ve uykuda kaybolup duygusal stres varlığında şiddetlenir (26). Klasik olarak 4-6 Hz. frekanstadır ve istirahat tremoru her zaman ekstremitelerin distalinde belirgindir (24). En sık ellerde görülmekle beraber, bazen de ayaklar, dil, çene ya da dudakta olabilir. İstirahat tremoru uykuda ve aksiyon sırasında kaybolur, karşı ekstremitte hareketi ve yürüme ile artar. Bu sebeple bu özelliğin istirahat tremoru şeklinde adlandırılmasının sebebi motor aktivite ile kaybolmasındandır. Genellikle hastalık süresince asimetrik seyir sürer. Belirtilerdeki ilk başlangıç üst ekstremitelerde, el yazısındaki bozukluk gibi ince el becerisi gerektiren fonksiyonlardaki kayıp olarak kendini gösterir. Bu tremor klasik olarak "parasayma" hareketi olarak adlandırılır.

2.1.1.2. Bradikinezi

Parkinson hastalarında görülen en önemli işlevsel bozukluklardan biridir. Belirgin olarak yavaşlık ile karakterize bir hareket bozukluğudur. Bu durum genel olarak bradikinezi olarak adlandırılmakta olup aslında bradikinezi ve akinezi olarak belirtilen iki farklı bileşeni bulunmaktadır (27). Bradikinezi sürmekte olan hareketin yavaşlığıdır. Akinezi ise istemli hareketin oluşturulamamasıdır. Parkinson hastaları ile yapılan çalışmalar, bu hastalarda hem reaksiyon zamanının hem de hareket zamanının uzamış olduğunu doğrulamıştır. Bradikinezi başlangıçta günlük yaşam aktivitelerinin yavaşlaması ve reaksiyon zamanı uzaması olarak ortaya çıkabilir (28). Örneğin hastalar sandalyeden veya yataktan kalkma, arabaya inip binme gibi eylemleri yaparken zorlanırlar. Bradikinezide ince motor hareketlerin bozulmasına ek olarak diğer belirtiler tükürük yutulamamasına bağlı salya akması, monoton ve hipofonik dizartri (kelimelerin hatalı seslendirilmesi veya söylenmesi), yüz ifadesinin kaybolması maske yüz (hipomimi) ve yürüyüşe eşlik eden kol hareketlerinin azalmasıdır. Parkinson hastalarında "paradoksal kinezi" (duran bir hastanın ani bir uyarı ile hızlı bir hareketi gerçekleştirmesi) denilen ilginç bir olgu motor programların sağlam olduğunu fakat hastanın dış uyarı olmadan bu programları kullanma ve onlara ulaşmada güçlük çektiğini göstermektedir. Bradikinezinin patofizyolojisinde DA eksikliğinin normal olan motor kortikal aktiviteyi bozarak bradikineziye neden olmaktadır. Parkinson hastalarında yapılan çalışmalar bradikinezinin subtalamik nükleusta (STN) ve globus pallidus internal (GPi) segmentinde aşırı aktiviteden kaynaklandığını düşündüren bilgileri sağlamıştır (29).

2.1.1.3. Rijidite

PH'da rijidite görülme sıklığı %89-99 arasında değişmektedir (30). Rijidite, agonist ve antagonist kasların eş zamanlı kasılmasıdır ve pasif olarak ekstremitenin eklem boyunca hareketi sırasında dirençle karşılaşılması olarak ortaya çıkar. Klinikte "dişli çark belirtisi" olarak da adlandırılır. Rijiditenin derecesi değişkendir ve genellikle tremor gibi tek taraflı başlar, daha sonra karşı tarafa yayılabilir (31). Karşı ekstremitenin kuvvetle aktive edilmesi sırasında rijidite artar (32). Rijidite tüm kas gruplarını (ekstremiteler, aksiyel, fleksör, ekstansör) etkileyebilir. Rijidite PH'na özgü bir semptom değildir, sadece farklı hareket bozukluklarının önde gelen özelliklerinden biridir.

2.1.1.4. Postural Dengesizlik

Postüral refleksler dik durmamızı ve herhangi bir postürü sürdürürken dengemizi korumamızı, dönüşlerde veya yürüyüş sırasında yön değiştirirken dengemizi sürdürebilmemizi sağlar. Postural dengesizlik dopaminerjik tedaviye en dirençli klinik bulgudur (33). PH'nın en az spesifik, ancak en fazla özüllülük yaratan ve en önemli bulgusudur. Postüral dengesizlik veya bozukluk, semptomlar içinde en son ortaya çıkan ve semptomatik tedaviye en az yanıt verenidir. Postüral refleks kaybı PH'daki düşmelerin en sık nedenlerinden biri olarak gösterilir ve daha az spesifiktir (24). Özellikle bradikinezi ve rijidite ile birleşince hastada gözle görülür eksiklikler ortaya çıkar. Bu semptomlardan etkilenen hastalarda düşme ve sonucunda yaralanma riski artmıştır. (31, 34). Hastalarda propulsiyon (öne düşme eğilimi) yada retropulsiyon (arkaya düşme eğilimi) ile bağlantılı olarak denge kaybı da

gelişmektedir. Hastalarda festination adı verilen yürüyüşte değişiklik görülür. Bu durumun sebebi gövdenin öne eğik fleksiyon pozisyonunda olmasıdır. Hastalar denge merkezini koruyabilmek ve düşmemek için öne adım atarken sanki arkadan itiliyormuş gibi git gide dahada hızlanarak yürür (27, 35). Postural refleksleri azalmış bir hasta sandalyeye oturma sırasında aniden, kontrolsüz bir biçimde sandalyeye çöker. Bu belirtiyeye sitting enbloc adı verilir (32). Korunmaya yönelik tepkilerin kaybı düşmelere bağlı yaralanmaları daha da kolaylaştırır. Patofizyolojisinde spinal, retiküler ve limbik bağlantıları olan pedinkülopontin nükleusun rol oynadığı düşünülmektedir. Postural bozulmanın derecesini değerlendirmek için çekme (pull) testi kullanılır. Bu test ile hastanın omuzlarına uygulanan ani bir çekmeye verdiği postural cevap değerlendirilir.

2.1.1.5. Donma

PH'da hastaların fazlaca olumsuz etkilenmelerine sebep olan bir semptom da donmadır. Donma ani, geçici, genellikle 10 sn'den kısa süreli bir akinezi türüdür. Sıklıkla yürürken bacakları etkilemesine rağmen üst ekstremiteleri veya göz kapaklarını da etkileyebilir (göz kapağı açma veya kapama apraksisi). Tipik olarak yürüme başlatılırken donmaya, dönerken veya dar geçitlerde yürürken, yoğun trafikte karşıdan karşıya geçerken veya bir hedefe ulaşırken aniden ayağı hareket ettirememek gibi durumlara yol açar. PH'da motor semptomların dışında da belirtiler mevcut olup bunlar da en az diğerleri kadar belirgindir ve hastanın yaşam kalitesinde azalmaya neden olmaktadır. Bu semptomların başlıcaları arasında otonomik disfonksiyonlar (hipotansiyon, mesane sorunları, ısı regülasyon problemleri), duyu rahatsızlıklar (ağrı, parastezi), uyku bozuklukları (REM uyku bozukluğu), psikiyatrik problemler (depresyon, halüsinasyon) ve bilişsel disfonksiyonlar (demans) sayılabilir.

2.1.2. Parkinson Hastalığı'nın Patogenezi

PH patogenezi, nörodejenerasyonun ve dopaminerjik nöron kaybının gerçekleştiği mekanizmalarla açıklanmaktadır. Azalmış enerji metabolizması, oksidatif stres, glutamat salınımı (ekzotoksiste), bozulmuş kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazi, enzim üretilmesinin artırılması ya da yavaşlatılması PH'nın patogenezinde etkin faktörlerdendir. Artan serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres, PH'da nörodejenerasyon oluşumu ve ilerleme sürecinde önemli rol oynamaktadır. Mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile moleküler oksijenin suya redüksiyonu sırasında reaktif oksijen türleri oluşur. Serbest radikaller dış yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan moleküllerdir. Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Oluşan radikaller stabil değildir ve çok reaktiftir. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar.

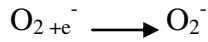
Serbest radikaller yüksek oranda reaktif olarak diğer molekülleri oksitlemektedirler ve bu yolla serbest radikaller, deoksiribonükleik asit (DNA), yağ asitleri ve enzimlerde hasar meydana getirebilmektedir. Vücudun doğal savunma mekanizmaları ile serbest radikallerin üretimi bir dengededir. Bu dengenin bozulup serbest radikallerin aşırı üretilmesi sonucunda oksidatif stres meydana gelmektedir (36).

2.1.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

ROS, serbest radikallerin dış orbital yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron ile bir oksijen atomu bulunan moleküllerdir. Oksijenin indirgenmesi ya da oksijene iyonize radyasyonun etki etmesi ile oluşurlar. En önemlileri şunlardır:

O₂⁻ (Süperoksit) radikali

Moleküler oksijenin bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan O₂⁻ radikali oluşur. İn vivo olarak adrenalin, flavin nükleotidleri, tiyol içeren bileşikler, glukoz ile demir ve bakır gibi geçiş metallerinin oksijene etkisiyle meydana gelmektedir.



H₂O₂ (Hidrojen Peroksit)

O₂⁻'ye bir elektron transferi süperoksit dismutasyon (SOD) ya da O₂⁻'ye iki elektronun eklenmesi (indirgenme) ile veya glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz ile direkt olarak meydana gelir.

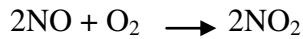


2.1.2.2. Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)

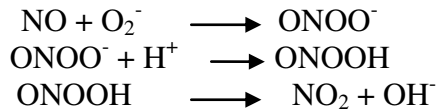
Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türlerinin en önemlisi NO'dur.

Nitrik Oksit (NO)

Bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp azot dioksit (NO₂) oluşturur.



NO'nun vücuttaki ROS'lar ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan ONOO⁻ oluşturduğu ve bunun da ileri ayrışmayla OH⁻ radikali meydana getirdiği ifade edilmektedir.



OH⁻ ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, ONOO⁻ de tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrozilleyerek toksik nitro türevleri (nitrotirozin) oluşturmaktadır.

Oksidatif stres reaksiyonları, normal metabolizmanın bir yan ürünü olarak oluşan O_2^- ile başlar. O_2^- , H_2O_2 'yi oluşturmak için SOD'un katalize ettiği bir reaksiyon olan spontan dismutasyona uğrar. Hidrojen peroksit ise katalazın etkisiyle ortadan kaldırılır. H_2O_2 ile NO arasındaki reaksiyon sonucunda $ONOO^-$ oluşur. $ONOO^-$ ve bozulma ürünleri sinir sistemi üzerinde oldukça toksik etkiye sahiptir. Demir ve diğer metal iyonları oldukça reaktif olan OH^- oluşumuna katkıda bulunur (37-38).

Serbest radikallerin patolojik etkisiyle iki yoldan hücre hasarı gelişir. Lipidlerin peroksidasyonu ile hücre zarının geçirgenliği bozulur ve oluşan serbest radikaller çevrelerindeki zincirleme reaksiyonun yayılmasıyla daha uzaktaki biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasar oluşturur. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Bu etkilerden ilki hücre membranında gözlenir. Hücre zarında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Peroksidasyon, membranın lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest O_2 radikallerinin hücrenin diğer bileşenlerine etkisi ile vasküler geçirgenlikte artma, inflamasyon, ödem, kemotaksis ile sekonder hücre hasarına yol açar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir, çok zararlıdır ve geri dönüşümsüzdür (39).

Lipid peroksidasyon son ürün olarak malonil di aldehyd (MDA) meydana getirir. MDA hücre zarından kolayca geçer ve hücre içinde Schiff bazlarıyla birleşerek, lipo fuksin şeklinde sitoplazma içinde toplanır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar, MDA'nın genotoksik ve mutajenik etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehyt ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona erer. Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenmesi ise aminoasit dizilimine bağlılık gösterir. Doymamış bağ veya sülfür içeren amino asitler serbest radikaller için önemli birer hedef oluşturarak sülfür ve karbon merkezli radikallerin oluşumuna neden olurlar. Özellikle hem proteinleri serbest radikaller için önemli bir hedeftir (39).

Mitokondri, enerji akışının yönlendirildiği ve adenosin tri fosfat'ın (ATP) elde edildiği organel olarak tüm vücut hücrelerinde olduğu gibi nöronlarda da önemli bir yer tutmaktadır. Mitokondri, iki membran, bir membranlar arası boşluk ve bir iç matriksten oluşur (38). Mitokondrinin önemli görevleri arasında oksidatif fosforilasyon, yağ asidi oksidasyonu, redoks ve kalsiyum sinyalizasyonunun düzenlenmesi yoluyla ATP sentezi ve apoptozun kontrolü vardır. Krebs döngüsünde oluşan elektronlar hidroksilamin redüktaz ($NADH_2$) ile flavin adenin dinükleotid ($FADH_2$)'de toplanır ve mitokondri iç zarında yer alan enzim yapısında proteinler üzerinden elektrokimyasal gradyanın oluşturulmasına katkıda bulunurlar. Bu enzim sisteminde yer alan NADH dehidrogenaz (Kompleks-I) ve süksinat dehidrogenaz (kompleks-II) elektron transport zincirinde başlangıç yolunu oluşturur. Elektronlar bu sisteme flavin mono nükleotidler (FMN) ve kompleks I ve II'nin demir-sülfür merkezlerinden giriş yaparak, ubiquinona (koenzim Q) taşınırlar. Koenzim Q' dan

kompleks III'e transfer olan elektronlar, bakır içeren ve enzim olan sitokrom-c oksidaza (kompleks IV) geçerler. Son olarak da elektronlar oksijen molekülüne aktararak, ATP sentazdan (kompleks V) bir molekül ATP'nin sentezini gerçekleştirirler. Elektronlar kompleks I-II'den III. ve IV. komplekslere geçiş yaparken protonlar da mitokondriyal iç zardan geçerek, bir elektro kimyasal gradyan oluşumuna katkıda bulunurlar (40-41). PH nedeniyle hayatını kaybeden hastaların beyin dokularında gerçekleştirilen post-mortem araştırmalarda sadece SNpc kompleks-I aktivitesinde azalma saptanmıştır (42). Mitokondriyal iç membranın elektron transport komplekslerinin inhibitörü olan MPTP gibi nörotoksinler, insan ve hayvan modellerinde PH'ya benzer semptomlar oluşturur. Bir başka Kompleks-I inhibitörü olan rotenon, sıçanlarda benzer bir etkiyi oluşturur. Mitokondriyal Kompleks-I hasarı apoptozun tetiklenmesinde merkezi rolü oynamaktadır. Mitokondriyal solunum zincirinin Kompleks I ile inhibisyonu sonucu oksidatif stres oluşmakta, ortaya çıkan serbest radikaller ve 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE), MDA ve 8-hidroksi-2-deoksi guanozin (8-OHDG) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumuna (43) ve kaspaz kaskadının aktivasyonu ile apoptoz oluşmasına neden olur. Beyinde oksidatif stres oluşumuna sebep olan başlıca etkenler şunlardır: Asidoz, geçişmetalleri, β -amiloid, katekolaminlerin oksidasyon ürünleri, kainik asit ile oluşan nöbetler, N-Metil-D-aspartat (NMDA) tipi glutamat reseptörlerinin etkinleşmesi, NO, etkinleşmiş nötrofiller, hipoglisemi, uzun süren hipoksi, beyin sinir hücrelerinin mitokondrilerinde ayrılmamış elektron taşınması (44). Ayrıca DA metabolizması ve otooksidasyonu sonrası oluşan ROS ve RNS'ler de oksidatif strese yol açmaktadır (45). Parkinson hastalarının beyinlerinde yapılan postmortem incelemelerde SN bölgesinde oksidatif stresin göstergesi olarak,

- Mitokondrilerde kompleks I enzim etkinliğinde anlamlı derecede azalma (46),
- Glutasyon gibi endojen antioksidanların düzeylerinde azalma (47),
- Protein, lipid, DNA ve ribonükleik asit (RNA)'in oksidasyon ürünlerinin düzeylerinde anlamlı derecede artma gözlenmiştir (48).

Yaşlı hayvanlarda genç hayvanlara kıyasla ROS üretiminin daha fazla olması, mitokondrilerinde lipid peroksit düzeylerinin yüksek ve çoklu doymamış yağ asitlerinin ise düşük olması ileri yaşlarda oksidatif stresin arttığını göstermektedir (38). Böylece PH ve AH gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojik mekanizmalarında yaşlanmanın önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (38).

Glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması nöronlarda hasara veya ölüme neden olmaktadır. Sinir hücrelerinde meydana gelen bu nörotoksik olaya "eksitotoksikite" adı verilmiştir (49). Eksitator amino asitlerden L-glutamat ve L-aspartat sinir sistemindeki sinaptik bağlantıların gelişimsel plastisitesinden sorumludur. L-glutamat omurgalı canlıların santral sinir sisteminde bulunan başlıca eksitator nörotransmitterlerden biridir. Normal koşullarda glutamat beyinde kavrama, hafıza, hareket ve duyarlılık gibi farklı işlevlerin yerine getirilmesinden sorumludur ve bu fonksiyonları kendi reseptörleri ile etkileşerek yapar (49).

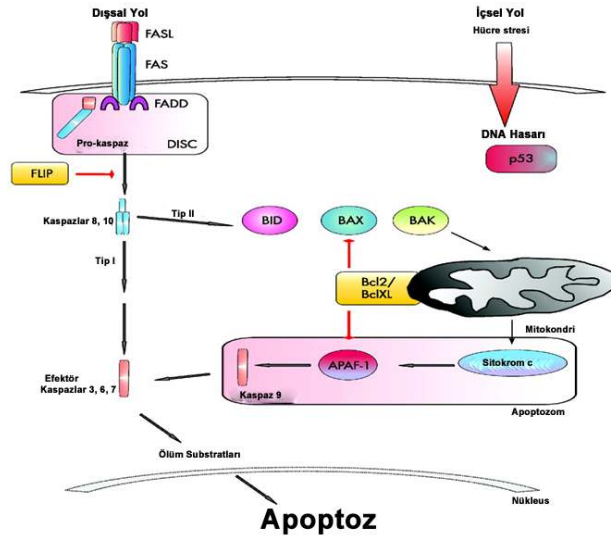
Eksitotoksik hasarlanmanın kısmen NO aracılı olduğu düşünülmektedir (50). NO, NOS tarafından katalize edilen arjininin sitriline dönüşümü ile oluşmaktadır. Glutamat aracılı sitozolik kalsiyum artışı, NOS aktivitesi ile birlikte NO üretiminde

artışa neden olur. NO her ikisi de güçlü oksitleyici ajanlar olan ONOO^- ve OH^- ile reaksiyona girer. NO fenton reaksiyonu ve mitokondrial kompleks IV inhibisyonu vasıtasıyla hücre dejenerasyonuna katkıda bulunabilir (51). Balanos ve ark. NO sürekli maruz kalınmasıyla mitokondrial solunum zincirinde hasarlanma olduğunu ve glutatyonun (GSH) önemli bir savunma mekanizması olduğunu göstermişlerdir (52). GSH düzeylerinin düşüklüğü PH'yı da kapsamaktadır. NO aracılı toksisite, MPTP tarafından indüklenen nigral hasarlamaya karışmaktadır. NO oluşumunu bloke eden NOS inhibitörü olan 7-nitroindazole (7-NI), maymunlar ve ratlarda, dopaminerjik nöronları MPTP toksisitesinden korumaktadır (53). Benzer bir çalışmada, NOS knockout farelerde, MPTP toksisitesinin azaldığını gösterilmiştir (54). 7-NI'nın monoamin oksidaz-B (MAO-B) inhibisyonu yaptığı rapor edilmiştir. Bu da MPTP'nin 1-metil-4-fenil piridin (MPP^+) dönüşümünü engelleyerek etki etme olasılığını arttırmaktadır. Ancak, yapılan daha ileri çalışmalar, 7-NI'nın MPP^+ toksisitesinin engellenmesinde de etkili olduğunu göstermektedir. NO'nun neden olduğu hasar, hücrel proteinler üzerinde ONOO^- tarafından indüklenen ve bir tirozin nitrasyon artışı olan 3-nitrotirozin (3-NT) düzeyi ölçülerek tahmin edilebilir (55). MPTP ile tedavi edilen fare ve maymunlarda 3-NT düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (56). Bir başka çalışmada, Parkinson hastalarının Lewy cisimciklerinin (LC) merkezinde 3-NT immün boyanmasında artış oluşu gösterilmiştir (57).

İntrasellüler Ca^{+2} homeostazının devamlılığı nöronların yaşamaları açısından önemlidir. Ca^{+2} birbirinden bağımsız ve farklı pek çok fizyolojik ve metabolik aktiviteden sorumludur (58). En önemli görevlerinden biri de intrasellüler mesajcı rolüdür. Ca^{+2} intrasellüler (endoplazmik retikulum ve mitokondri) ve ekstrasellüler olmak üzere iki kaynaktan açığa çıkmakta, hücreye sinyal iletebilmekte ve bu sinyalin derecesini kontrol edebilmektedir (58). Endoplazmik retikulumdan salınım ve mitokondriyal depolamada artış nedeniyle intrasellüler kalsiyum konsantrasyonlarında yükselme sonucunda protein fosforilasyonu, proteoliz, DNA fragmentasyonu ve membran yapışması ile sonuçlanan çok sayıda enzim sisteminin nonspesifik indüksiyonu gerçekleşir. Eksitotoksik mekanizmada ve oksidatif fosforilasyon sisteminde meydana gelebilecek bozukluklar nöronun kronik toksisiteye maruz kalmasına neden olacaktır. Eksitotoksik mekanizmada N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörleri Ca^{+2} iyonlarının hücre içine göçünü arttırmakta, mitokondriyal elektron transport zincirindeki defektler intrasellüler enerji açığına neden olmaktadır. Bu sorunlar sodyum/potasyum (Na^+/K^+) ATPaz aktivitesini düşürmekte ve membran potansiyelini bozmaktadır. Na^+/K^+ ATPaz'ın azalmış fonksiyonu voltaj bağımlı kanalların daha uzun süre açık kalmasını sağlar ve hücre içine Ca^{+2} iyonlarının akışını artırır. Hücre içindeki Ca^{+2} iyonlarının aşırı yükselişi solunum zincirini geriye dönüşümsüz olarak bloke etmekte, önce mitokondriyal fosfolipazları, ardından sitoplazmik fosfolipazları, proteazları ve endonükleazları aktifleyerek, kendini yok etmektedir (49, 58).

2.1.3. Apoptoz

Hücre ölümü süreçleri piknozis, karyoliz, karyoreksis, büzülme nekrozu, programlanmış hücre ölümü, hücrenin intiharı, kendini tahrip etme ve apoptoz gibi farklı terim ve isimler kullanılarak tanımlanmıştır (59). Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de J.F.K. Kerr tarafından (60) tanımlanmıştır. Apoptoz yunanca bir kelime olup, ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir. Bu fizyolojik ölüm şekli embriyogenezde, metamorfozda, proliferasyon ve homeostaziste, immün sistemin regülasyonu ve fonksiyonunda, hasarlı hücrelerin ortamdan uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır (61). Programlı hücre ölümü, bazı durumlarda mitoz bölünme için gereklidir. Apoptoz mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Hücre içi uyarılardan büyüme faktörleri, onkogenler ve tümör hücrelerini baskılayan genlerin apoptozu etkilediği bilinmektedir. Bu uyarıların bazıları, büyüme faktörlerinin salınımının durdurulması, sitokinler, hücre içi Ca^{+2} miktarındaki artış, tümör nekroz edici faktör (TNF), transformin büyüme faktörü- β (TGF- β), apoptoz antijen-1 bir diğer adıyla Fas(CD95)/FasL (Fas Ligand) sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral, bakteriyel enfeksiyonlar, iskemi, glukokortikoidler ve reaktif oksijen radikalleri olarak sayılabilmektedir (62).



Şekil.2.1. Apoptozda içsel ve dışsal yollar

Apoptozda hücreler tek tek etkilenir. Hücreler hacimce küçülür, komşu hücreler ile temasını kaybederler. Mikrovillus gibi özel yüzey farklılaşmaları ve diğer hücrelerle olan bağlantı yapıları bozulur., Na^+ , K^+ , klor (Cl^-) taşıyıcı sisteminin durması ve hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmaması hücrelerin büzülmesinin nedenidir. Hücrede değişik yüzey çıkıntıları ve kıvrıntıları oluşur. Bunların membranla çevrili olarak hücreden ayrılmasıyla apoptotik cisimler

meydana gelir (63-64). Endoplazmik retikulum (ER) genişler, hücre zarının bütünlüğü bu aşamada henüz bozulmamıştır ve bütün önemli yapısal değişiklik çekirdekte başlar. Çekirdek zarının altında kromatin yoğunlaşır (pynosis), büyük kümeler oluşturur ve nükleer porlar kaybolur. Çekirdek düzensizleşir ve ileri evrelerde nükleer parçalara bölünür (karyorexis). Çekirdekçik genişler ve granülleri kümeler halinde dağılır (65). Birçok hücrede apoptozun erken döneminde, sitozol içerisinde Ca^{+2} devamlı yükselir. Ca^{+2} apoptozda yapısal değişikliklere neden olan enzimleri aktive eder. Bu enzimlerden biri Ca^{+2} 'ya bağlı nükleer endonükleazdır. DNA zincirini 180-200 bp'lik nükleozomlara parçalar. Apoptozun ilk aşamalarında, plazma membranının sitoplazmaya bakan yüzeyinde yer alan fosfatidilserin (PC)'in, plazma membranının dış yüzeyine salınması, hücrenin makrofajlar ve diğer fagositler fagosit edilmelerini tetikler. Bu şekilde apoptotik cisimciklerin komşu hücrelerce fagosit edilmesiyle ölen hücre ortamdan uzaklaştırılır (66). Apoptoz sonucu, kanser, otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar, artmış apoptozda ise, myelodisplastik sendrom, nörodejeneratif hastalıklar, AIDS, kalp hastalıkları, yaşa bağlı atrofiler ortaya çıkar.

2.1.3.1. Nöron Ölüm Mekanizması

Memeli hücrelerinde apoptoz ölüm sinyalinin kaynağına bağlı olmak üzere iki yolla gerçekleştirilir; içsel yol ve dışsal yol. İçsel yol hücreden kaynaklanan çok çeşitli sinyaller tarafından (onkogen aktivasyonu, DNA hasarı gibi) tetiklenen bir yoldur. Dışsal yolda ise, apoptozu tetikleyen sinyal moleküllerinin hücre zarında bulunan ilgili almaçlara bağlanması apoptozu başlatır (67).

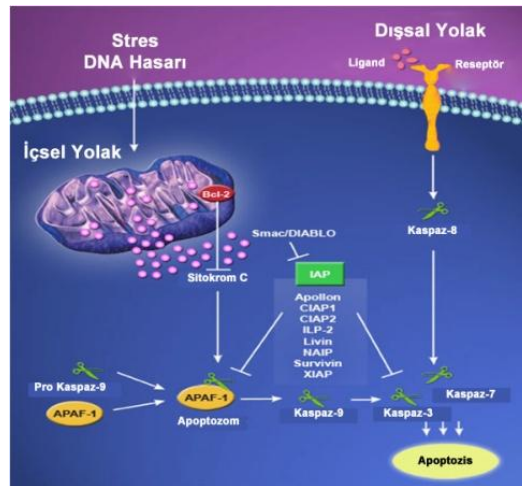
İçsel Yol

İçsel yolla apoptozun başlaması büyüme faktörlerinin yokluğu, radyasyon, kemoterapötik ajanlar tarafından olabilir. İçsel yollarla hücre ölümünün başlamasında temel rolü üstlenen organel mitokondridir. Matriks, matriksi çevreleyen iç zar, membranlar arası boşluk ve bunu çevreleyen dış membran olmak üzere farklı iki bölümden oluşan mitokondride, apoptozda rol alan pek çok molekül lokalize durumdadır. İç membranda, normal fizyolojik koşullarda membran potansiyelinin korunmasında sorumlu olan, ATP sentaz, elektron transport zinciri (ETS), adenin nükleotit taşıyıcıları (ANT) bulunmaktadır. Mitokondrial potansiyelin korunmasında oldukça önemli rolü olan protein Bcl-2 de, dış membranda lokalize olmuştur. Dış membranda voltaj-bağımlı anyon kanalları lokalize olurken mitokondri iç membranında elektron transport zincirinde bulunan sitokrom-c, prokaspazlar, apoptoz indükleyen faktör (AIF) proteinlerini içermektedir. Sitokrom-c AIF ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitoplazma proteini apoptotik proteaz aktive eden faktör (Apaf-1) ve ATP ile birleşir, apoptozomu oluşturur (67).

Çeşitli apoptotik uyaranlar mitokondrinin dış zarının geçirgenliğini artırarak intermembran boşluğunda bulunan bazı proteinlerin sitoplazmaya geçişine neden olur. Bunlardan başlıcaları sitokrom-c, SMAC/DIABLO, AIF, endonükleaz G (EndoG) ve OMI/HTRA2'dir. Apoptozun ilerlemesinde kritik aşama olan mitokondrinin dış zarında meydana gelen geçirgenlik artışı Bcl-2 protein ailesinde bulunan pro ve antiapoptotik proteinlerin karşılıklı etkileşimleri sonucu oluşmaktadır. Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w gibi antiapoptotik proteinler Bax, Bim, Bid, Bak, Noxa gibi pro-apoptotik proteinlerin aktivitelerini dengeler. Bu denge proapoptotik

proteinlerin yönünde bozulduğu anda söz konusu proteinler mitokondrinin dış zarında bir delik oluşturarak yukarıda adı geçen inter membran boşluğunda bulunan proteinlerin sitoplazmaya geçmelerini sağlarlar. Bu proteinler arasında en önemlilerinden biri sitokrom-c'dir. Sitokrom-c sitoplazmada monomerik APAF-1 ile birleşerek ATP katılımı ile apoptozomu oluşturur. Proteinin konformasyonunda değişikliğe neden olur ve bu yapı da inaktif durumdaki kaspaz-9 enzimini aktif kaspaz-9'a çevirir. Apoptozomda kaspaz-9 kaspaz enzimleri sıralamasında bulunan diğer kaspazları yine aktive eder. Bu kaspazlar içinde en önemlileri kaspaz-3 ve kaspaz-7'dir. Bu enzimler hücredeki birçok yapıyı enzimatik olarak tahrip ederler ve apoptozun son aşamasında kilit rol oynarlar (67).

Apoptoz'un ilerlemesindeki bir diğer kritik aşama ise normalde sitoplazmada bulunan apoptoz inhibitörlerinin (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP/livin, ILP2, NAIP, Bruce/Apollon ve survivin) inaktifleştirilmesidir. Bu inaktifleştirme süreci mitokondrinin inter membran boşluğundan salınan SMAC/DIABLO ve OMI/HTRA2 gibi proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir (68).



Şekil 2.2. Apoptozda AIF faktörlerinin etkileri

Dışsal Yol

Dışsal yolda hücre dışından gelen sinyal molekülleri, örneğin FasL, ilgili reseptörüne (Fas) bağlanır ve birlikte bir kompleks oluştururlar. Hücre zarında oluşan bu kompleksin hücre içindeki uzantısı Fas bağımlı ölüm domain proteini (FADD) ve inaktif kaspaz-8 gibi molekülleri bağlar ve oluşan yapı (DISC) kaspaz-8'i aktive eder. Aktif hale gelen kaspaz-8 bir proapoptotik protein olan Bid'i proteolitik olarak aktive eder ve tBid de diğer pro-apoptotik proteinlerle beraber mitokondrinin dış zarında delik oluşturur. Apoptozun bundan sonraki aşamaları, kaspazların aktivasyonu gibi, her iki yolda da ortaktır (67).

Apoptoz, PH'da SNpc'deki dopaminerjik nöronların ölümü olarak nitelendirilir. Yapılan çalışmalarda Parkinson hastalarında beyin dokularında kaspaz-1, kaspaz-3 ve (TNF-R1) düzeylerinin SN'de, hasta olmayan bireylere göre arttığı gözlenmiştir (69). Hastaların beyin dokuları kullanılarak yapılan bir çalışmada ise, beyinin SNpc

bölgesinde kaspaz-1, kaspaz-3 ve TNF-R1 düzeylerinin kontrol örneklerine göre anlamlı bir şekilde artmış olduğu gözlenmiştir. Parkinson ve apoptoz ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada ise farelerde MPTP kullanılarak elde edilen PH modelinde bir proapoptotik protein olan Bax'ın hem mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ve hem de protein düzeylerinde artış olduğu gözlenmiş, buna zıt olarak anti apoptotik bir protein olan Bcl-2 düzeyinin düştüğü, Bax geni ortadan kaldırdığında ise MPTP'ye dopaminerjik nöronların dirençli oldukları gösterilmiştir (70). Bir diğer Parkinson modelinde ise, SN bölgesindeki dopaminerjik nöronlarda APAF-1 geni elimine edilmiş fareler kullanılmış ve MPTP uygulaması sonucu oluşan nöron ölümüne, kontrol örneklerine göre, daha dirençli oldukları bulunmuştur (70).

PC12 hücrelerinde 6-OHDA kullanılarak oluşturulan Parkinson modelinde ise mitokondriden sitokrom-c ve Smac/Diablo'nun salındığı, kaspaz-3'ün aktive olduğu poli ADP riboz polimeraz'ın (PARP) kesildiği ve nükleer yoğunlaşmanın olduğu gösterilmiştir (71). PC12 hücrelerinin ve 6-OHDA'nın kullanıldığı bir başka çalışmada ise, 6-OHDA uygulamasının proapoptotik bir protein olan Puma (p53'ü upregüle eden apoptoz modülatörü)'nın hem mRNA, hem de protein düzeyinde arttırdığı bulunmuş, buna ek olarak bir diğer proapoptotik protein olan Bim'in de protein düzeyinde arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada 6-OHDA ile tetiklenen hücre ölüm mekanizmasında Puma'nın kilit bir rol üstlendiği siRNA'lar (small interference RNA) kullanılarak da ispatlanmıştır. MPTP kullanılarak oluşturulan bir diğer hayvan modelinde mitokondriyel kompleks-I'in yetersiz olduğu görülmüş, bunun da apoptotik yolu tetiklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada farelerin beyinlerinden izole edilmiş mitokondriler kullanıldığında ise kompleks I yetersizliğinin doğrudan apoptoza yol açmadığı, ancak yarattığı oksidatif stres sonucu intermembran boşluğundaki sitokrom-c konsantrasyonunu yükselttiği ve Bax'a bağlı olarak gelişen apoptozun ortaya çıkma olasılığını arttırdığı bulunmuştur (72).

2.1.4. Parkinson Hastalığı'nın Etiyolojisi

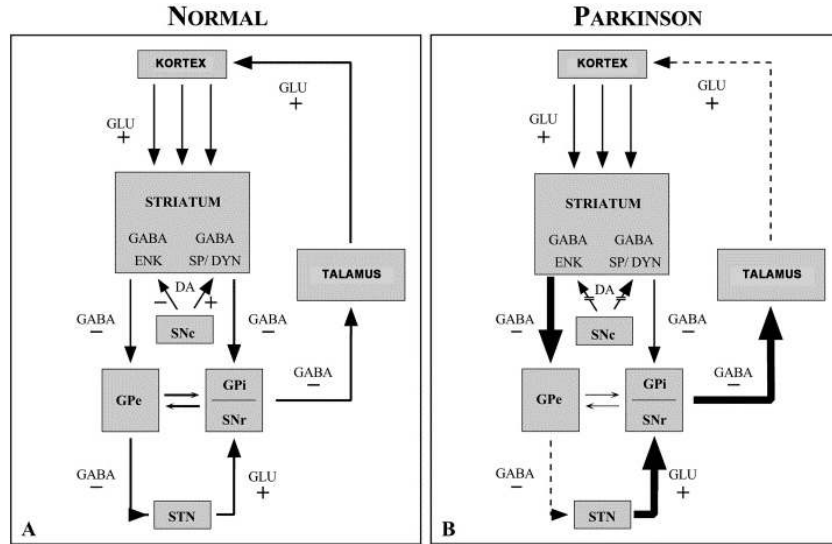
PH'da bir takım genetik faktörlerin rol oynadığına ait bulgular mevcuttur. PH'nın etiyolojisinde genetik (73-74) ve çevresel (75-76) faktörler rol oynamaktadır. Özellikle, çiftçiler gibi tarım ilaçlarını yoğun kullanan veya bu ilaçlara devamlı maruz kalan kişilerde PH daha sık saptanmıştır. MPTP kimyasal yapı olarak böcek ilacı olan parakuata çok benzer ve potansiyel bir şekilde hızlı gelişen PH'ya sebep olmaktadır. Ailesinde PH olanlarda, hastalığa yakalanma riski %5 oranında daha fazla bulunmuştur (74, 77). Her ne kadar genetik sebepli PH hastaların sadece %5'ini oluştursa da yapılan araştırmalarda PH ile ilgili bir takım genlerin bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu genler kısaca alfa sinüklein (PARK-1), parkin (PARK-2), ubikutin karboksi terminal hidrolaz-L1 (UCH-L1), DJ-1 (Park7) ve NR4A2'dir. Ayrıca Parkinson hastalarının sinir hücrelerinde görülen LC'lerde yoğun miktarda alfa sinüklein bulunmaktadır (74, 77).

2.1.5. Parkinson Hastalığı'nın Nöroanatomi Mekanizmaları

Bazal gangliyonlar, birbirleri ile bağlantılı birtakım gri madde nükleuslarının derin beyaz cevher içerisinde yerleşmesinden oluşmuştur. Bazal gangliyonlar subkortikal nükleuslardır. Kaudat nükleus, putamen ve globus pallidus olmak üzere üç bölümden oluşur. Kaudat nükleus lateral ventriküle uzanan baş, talamusa uzanan gövde, temporal loba uzanan kuyruk kısımlarından oluşur. Putamen ve globus

pallidus, internal ve eksternal kapsüllerin arasında uzanır, ancak putamen daha lateral yerleşimlidir. Globus pallidus lateral ve mediyal segmentlerden oluşmuştur. SN ortabeyinde, tegmentumda yerleşmiştir. Pars kompakta adı verilen pigmentten zengin ve pars retikülata adı verilen hücre yönünden fakir iki bölgeye ayrılır. Pars kompaktadaki nöronlar DA üretiminden sorumludur. Hareket oluşturma yeteneği SN, bazal gangliyonlar, subtalamik nükleus, talamus ve serebral korteksi içeren kompleks bir motor döngüye bağlıdır (78). Yapılan çalışmalar bazal gangliyonların sadece motor değil aynı zamanda motor olmayan (duyusal, ve kognitif) fonksiyonları olduğunu göstermiştir (79). Bazal gangliyonlar tarafından korteksten alınan bilgilerin çoğu striatumda sonlanır. Bazal gangliyonlara katkıda bulunan üç ana yapı serebral korteks, talamusun intralaminar çekirdekleri ve mezensefalondaki dopaminerjik yollardır. Bazal gangliyonlar kortekse major eferentlerini talamus yoluyla gönderir. Talamustan bazal gangliyonlara giden iletiler esas olarak serebral korteksten lif demetleri alan talamik kortikomedian çekirdekten çıkar ve putamende sonlanır (79).

Ekstrapiramidal sistem içerisinde iki yol vardır; direkt ve indirekt yol. Direkt yolda uyarıcı kortikofugal lifler striatuma (putamen ve kaudat nükleus) uzanırken striatumdan çıkan inhibitör lifler globus pallidusun internal segmenti (GPi) ve SNr'yi inhibe eder (79) ve bu inhibitör lifler talamusa projekte olurlar. Talamus da kortekse geriye uyarıcı lifler gönderir. İndirekt yol ise striatum ve globus pallidus eksterna (GPe) ile GPe ve STN arasında inhibe edici lifleri içerir. STN'nin GPi ve SNR üzerine eksitator etkisi vardır. GPi/SNr, talamusun ventro lateral nükleusunu inhibe edici eferentler gönderir. D1 reseptörlerini içeren putaminal nöronlar direkt yolu oluşturur ve GPi'ye yönelirler. D2 reseptörleri içeren putaminal nöronlar indirekt yolun bir parçasıdır ve GPe'ye yönelirler. DA direkt yoldaki reseptörü aktive edici D1 reseptörüdür, indirekt yoldaki reseptörü ise D2 inhibe edici reseptördür (80).



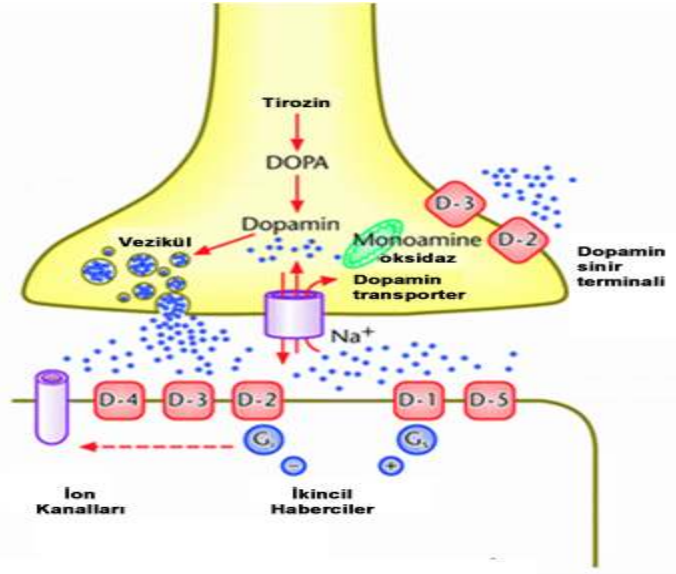
Şekil.2.3. PH'nın nöranatomik mekanizmaları

- (a). Bazal gangliyonların normal işleyiş mekanizmaları.
- (b). SNc' deki dopaminerjik çıkışların kesintiye uğraması ve striatal gama amino GABAerjik nöronların hasarı

PH'da, SNpc'de azalan DA üretimi GPi/SNr'den gelen inhibitör çıktının artmasına neden olur. Bu durum talamokortikal yolun artan inhibisyonuna ve hareketin baskılanmasına yol açar. DA azalmasına bağlı olarak, direkt yol aracılığı ile talamusun aşırı inhibisyonuna neden olarak GPi/SNr'nin inhibisyonunu azaltır. Semptomlar, striyatal dopaminerjik terminallerdeki kayıp %80'e ulaştınca ortaya çıkar. PH'da SNpc azalan DA üretimi, GPi/SNr'den gelen inhibitör çıktının artmasına neden olur. Yine düşük DA seviyesi indirekt yol ile GPe'nin inhibisyonunu arttırarak STN'nin disinhibisyonuna neden olur. Artan STN çıktısı, GPi/SNr inhibisyonunu kolaylaştırır (60). PH'da SN'de yeralan dopaminerjik hücrelerde dejenerasyon gelişir. Bunun sonucunda talamokortikal yolun inhibisyonu artar ve hareketler baskılanır (78). PH'da hücre kaybı sadece SN ile sınırlı değildir. Aynı zamanda talamus, serebral korteks ve otonom sinir sistemi de etkilenir. Nörotransmitter anormallikleri dopaminerjik sistem kadar adrenerjik, kolinerjik ve serotonerjik sistemi de kapsar. SNpc'deki melanin içeren dopaminerjik hücrelerin kaybı ve kalan hücrelerin içinde de LC olarak adlandırılan, ağırlıklı olarak ubiquitin denen bir protein içeren küresel inklüzyon cisimciklerinin varlığı PH için tanımlayıcı sayılır (81-82). PH'nın patolojik belirleyicisi olan LC, ilk kez 1912 yılında Lewy tarafından tanımlanmıştır. (83-84). Tipik klinik özelliklerle birlikte bu patolojik bulguların gözlemlendiği hastalarda tanı nettir.

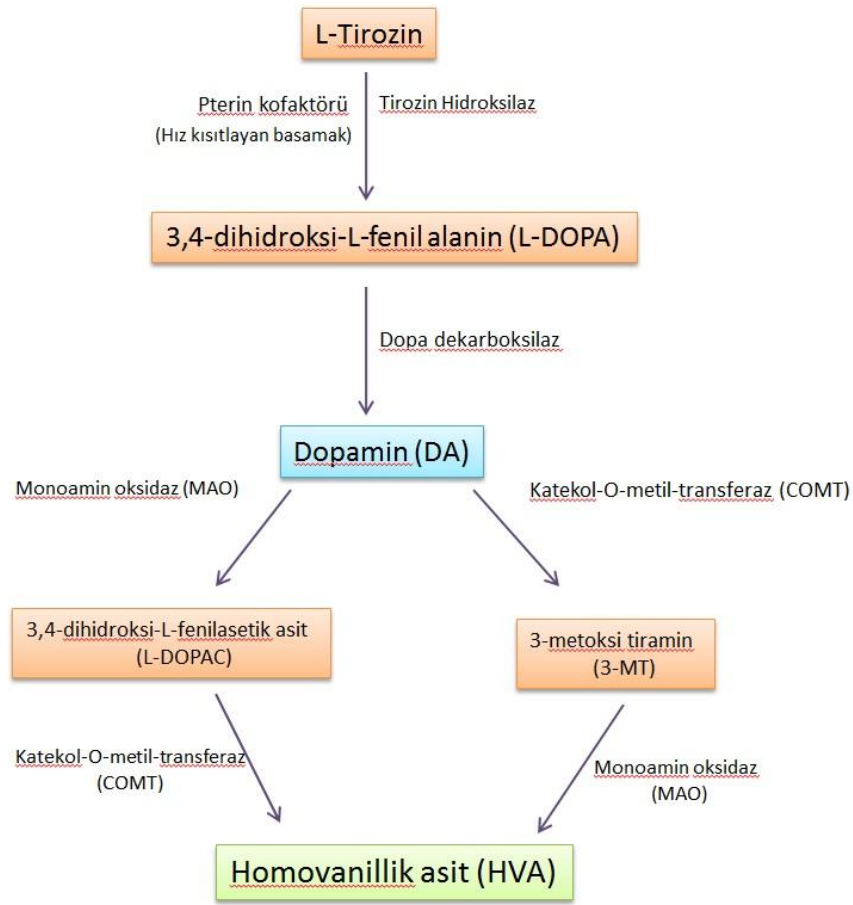
2.1.6.Dopaminerjik Sistem

DA beyinde nöronlar tarafından sentezlenen ve sinyal iletiminde görev yapan önemli bir nörotransmitterdir. DA diğer katekolamin nörotransmitterler gibi, bir tranporter aracılığı ile kan beyin bariyerinden dopaminerjik hücre içine alınan fenil alanin veya tirozinden sentezlenir. L-tirozinin tirozin hidroksilaz ile 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) hidroksilasyonu DA sentezindeki hız kısıtlayan basamaktır. DA, pterin kofaktörünün tirozin hidroksilaza (TH) afinitesini azaltır. DA sentez hızı tirozin hidroksilazın aktivitesine bağlıdır. L-DOPA daha sonra dopa dekarboksilaz ile hücrenin sitoplazmasında DA'ya çevrilir. Yeni sentezlenmiş DA bir aktif taşıyıcı ile molekülün katabolik enzimlerden korunduğu sinaptik veziküllere taşınır. Nöron terminallerindeki presinaptik veziküllerden DA salınımı aksiyon potansiyeli nöron terminaline ulaştığı zaman Ca^{+2} bağımlı bir şekilde ekzositozla olur. Sinaptik aralığa salınan DA'nın büyük bir kısmı spesifik DA taşıyıcıları ile nöron terminalinden geri alınır.Yeniden döngüye giren DA sinaptik veziküller içine tekrar alınabilir ve transmitter olarak kullanılabilir. Sinaptik alana salınmış olan DA, postsinaptik membranda yer alan DA reseptörlerine bağlanır. Şimdiye kadar tanımlanmış en az beş tip DA reseptörü vardır. D1 ve D5 reseptörleri uzun bir intraselüler karboksi terminal kuyruğa sahiptirler. Genel olarak D1 sınıfı reseptörler olarak adlandırılırlar (85). Bu reseptörler adenilat siklazı (cAMP) aktive edip sentezini uyarır. D2, D3, D4 reseptörlerinin üçüncü parçası diğer grup reseptörlere göre daha uzundur. Bu reseptörler de D2 sınıfı reseptörlerdir. Bu reseptörler cAMP yapımını azaltır, K^{+} ve Ca^{+2} akışını düzenler. DA reseptörleri beyinde geniş dağılım gösterirler. D1 ve D2 reseptörleri striatumda bol miktarda eksprese edilir, PH'nın tedavisi açısından önemlidir. D4, D5 reseptörleri ekstrasriatal olarak geniş bir dağılım gösterirler. D3 reseptörü nükleus akumbens ve olfaktör tüberkülda bol miktardadır.



Şekil 2.4. DA'nın spesifik reseptörleri

DA metabolizması sinaptik aralıkta, sinir terminali sitoplazmasında ve glial hücre içersinde gerçekleşir. DA'yı katabolize eden en önemli enzim katekol-O-metiltransferaz (COMT) ve MAO'dur. COMT hem membrana bağlı hemde sitoplazmada serbest olarak bulunur. Serbest COMT glial hücrede ve membrana bağlı COMT postsinaptik nöronda bulunur. MAO intranöral ve ektranöral olarak bulunur. MAO'nun tüm memeli türlerinde A ve B olarak iki izo enzimi vardır, DA her iki enzimin de substratıdır. Dopaminerjik sinir ucunda DA MAO tarafından aldehide, aldehid de aldehid dehidrogenaz aracılığıyla 3,4-dihidroksifenilasetik aside (DOPAC) okside edilir. Nöron dışına çıkması sonrası DOPAC COMT tarafından homovanilik aside (HVA) metabolize edilir. Sinaptik aralığa salıverilen DA, dopaminerjik sinir ucuna geri alım ve COMT ile inaktif olur. Ektranöral olarak 3-metoksitiramin (3-MT) COMT ile DA'dan oluşturulur ve MAO ve aldehid dehidrogenaz tarafından HVA'ya ileri metabolize edilir (85).



Şekil.2.5. DA sentezi ve yıkımı

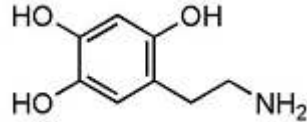
2.1.7. Deneysel Parkinson Modelleri

Deneysel Parkinson modelleri, hastalığın patofizyolojisini hayvanlar üzerinde taklit ederek, hastalık boyunca görülen klinik ve histopatolojik değişiklikleri ayrıntılı bir şekilde tanıma ve farklı tedavi yöntemlerinin etkinliğini tespit etme şansı vermektedir. Deneysel PH modellerinde bulunması gereken bazı temel patoloji ve davranışsal özellikler vardır. Bunlar;

1. Dopaminerjik nöron hasarı oluşturması,
2. Sağlam nöronlarda LC görülmesi,
3. Striatumda DA düzeyinde azalmaya neden olması,
4. Hareketlerde yavaşlama, kaslarda sertlik ve tremor görülmesine neden olmasıdır.

•Nörotoksin uygulaması, •Çevresel toksin uygulaması, • Genetik olarak değiştirilmiş hayvan kullanma (transgenik hayvan) deneysel Parkinson oluşturmak için kullanılan yöntemlerden bazılarıdır (86-87). 6-OHDA ve MPTP Parkinson modeli oluşturmak için en çok kullanılmış olan nörotoksik ajanlardır. Çevresel toksinler ise rotenon, paraquat ve maneb uygulamasını içerir. Bahsedilen bu toksinlerin ortak özelliği mitokondri kompleks enzimlerinin fonksiyonlarını inhibe ederek dopaminerjik sisteme zarar vermeleridir (88). Sıçanlarda 6-OHDA uygulaması ile oluşturulan deneysel Parkinson modeli en çok kullanılan yöntemdir. 6-OHDA PH'da ilk olarak 1968 yılında SNpc'ye enjekte edildiğinde dopaminerjik hasara sebep olduğu

görülmüş ve böylece PH modelinde kullanılan bir madde olmuştur (89). 6-OHDA sistemik olarak uygulandığında kan beyin bariyerini geçemez. Bu nedenle nigrostriatal dopaminerjik yolağa ulaşabilmek amacıyla SN'ye, Orta ön beyin demeti'ne (MFB) ya da striatuma stereotaksik enjeksiyon ile uygulanması gerekmektedir (88, 90). Uygulama yolları direkt olarak striatuma verilerek, intrasisternal veya ventriküler şekildedir. Striatum uygulaması özellikle tek taraflı Parkinson modeli oluşturulacaksa tercih edilir. Santral sinir sisteminde noradrenerjik hücreleri koruyarak, selektif DA hücre hasarı oluşturmak için 6-OHDA'nın noradrenerjik nöronlara alınması engellenebilir. Bu madde DA'nın hidrosillenmiş bir analogudur ve santral sinir sistemine uygulandığında nigrostriatal sistemi de içeren katekolaminerjik nöronlarda dejenerasyona sebep olmaktadır (87-88, 91). Dolayısıyla noradrenerjik ve dopaminerjik nöronlar üzerine toksik etkisi vardır. Santral sinir sistemine uygulanan 6-OHDA DA ve noradrenerjik taşıyıcı moleküllerle hücre içine alınmakta, sitoplazmada birikmekte ve hücrenin ölümüne yolaçmaktadır. 6-OHDA hücre içine alınır alınmaz okside olarak parakuinon ve H_2O_2 'ye dönüşerek ve OH^- oluşması ile ilk toksik etkiyi oluşturur (88). Ayrıca 6-OHDA oksidatif strese bağlıdır. 6-OHDA mitokondriyal kompleks-I üzerinde de etkili olup süperoksit serbest radikallerinin oluşumuna da sebep olmaktadır (87-88, 91) 6-OHDA'nın striatuma glutasyon ve SOD etkinliğini azalttığı ve MDA düzeylerini yükselttiği bildirilmiştir. 6-OHDA'nın stereotaksik olarak enjekte edildiği sıçanların beyinlerinde, nigrostriatal yolakta mikrogliya etkinliği anlamlı derecede artmıştır (92). Böylece mikrogliya etkinliği ile oluşan inflamasyonun, nöron hasarı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (92). 6-OHDA'nın oluşturduğu nöron hasarının apoptoz mekanizmasına bağlı olduğunu ileri süren çalışmalar olduğu gibi (93) apoptoz dışında bir mekanizmaya bağlı olduğunu da ileri süren çalışmalar mevcuttur (94).

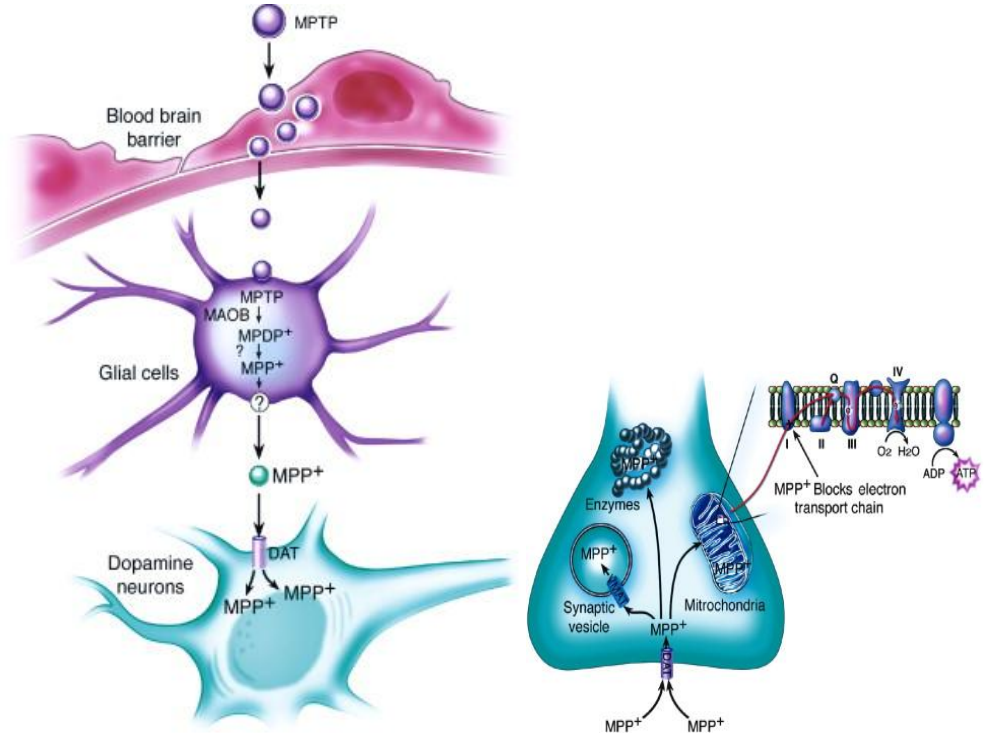


Şekil.2.6. 6-OHDA'nın yapısal formülü

2.1.7.1. 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetra hidropiridin (MPTP)

Narkotik bağımlılığı olan kişilerde MPPP (4-propiyoniloksi-4-fenil-N-metilpiperidin)'nin intravenöz enjeksiyonu sonrasında bazı kişilerde PH'ya benzeyen bir tablo geliştiği ve PH'ya özgü semptomların olduğu gözlemlenmiştir (95). MPPP kullanımına bağlı olarak bağımlıların SNpc bölgesindeki nöronlarında hasar meydana geldiği ve bu nörotoksik etkiden MPPP'nin laboratuvar ortamında sentezi sırasında meydana gelen bir yan ürün olan MPTP'nin sorumlu olduğu keşfedilmiştir. Bu bulguyu takiben yapılan pek çok araştırmanın sonucunda MPTP'nin SNpc alanındaki dopaminerjik nöronların hasarına sebep olarak PH semptomları oluşturan bir nörotoksin olduğu kesinlik kazanmıştır. MPTP'nin kendisi oldukça lipofilik yapıdadır ve kan beyin bariyerini geçer, MAO-B ile 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum (MPDP) etkin metaboliti olan MPP^+ 'ye dönüşür. MPP^+ , DA, noradrenalin ve serotonin taşıyıcı moleküllere yüksek afinite gösterir. DA taşıyıcı moleküller aracılığı ile dopaminerjik nöron içerisine giren MPP^+ önce veziküler mono amin taşıyıcılara (VMAT) daha sonra DA içeren sinaptik veziküllere bağlanır. MPP^+ mitokondri içerisinde birikir ve mitokondrilerdeki kompleks-I enzimini inhibe

ederek oksidatif stres oluşturur, böylece nigrostriatal dopaminerjik nöron hasarına yol açar. Ayrıca MPP^+ sitoplazma içerisinde kalarak bir takım sitozolik enzimlerle de etkileşebilmektedir (88).



Şekil.2.7. Deneysel Parkinsonda MPTP'nin etki mekanizması

MPTP, PH semptomlarına neden olmasından dolayı deneysel hastalık modelleri oluşturmak için kullanılmıştır (96). Bu nedenle MPTP modeli primat, fare, sıçan ayrıca köpek, kedi, koyun gibi hayvanlar üzerinde denenmiştir. En kullanışlı modelin sıçan ve farelerle oluşturulduğu ancak sıçanların MPTP'ye fareler kadar duyarlı olmamasından dolayı bu modelin farelerde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (88, 97).

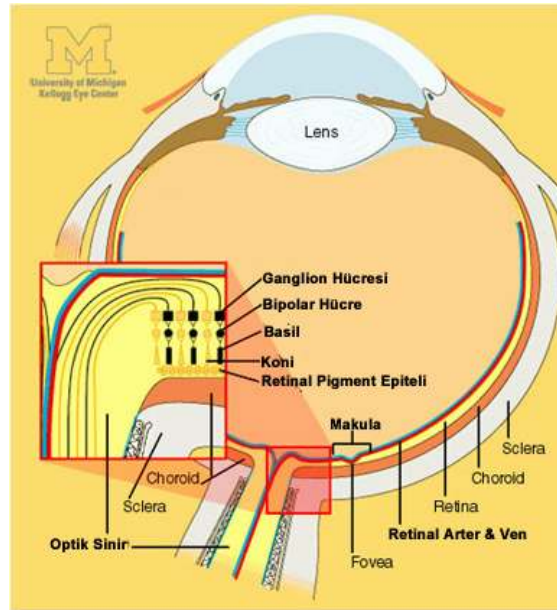
2.2. Görsel Sistem ve Görsel Uyarılma Potansiyelleri

2.2.1. Görme

Görme, gözden başlayıp, beyinde görme korteksine kadar uzanan bir takım olaylar topluluğudur. İnsan gözü üç tabakadan meydana gelen ve farklı dokuları içeren karmaşık bir organdır. Görme ışık ile, beyin embriyolojik uzantısı olarak kabul edilen retinanın etkileşimi sonucu oluşan, bilginin optik sinir aracılığı ile beyine (görme korteksine) gönderilmesini içeren karmaşık bir eylemdir.

2.2.2. Görme Sistemi

Göz hem optik hem de nöronal bir aygıt olarak özelleşmiş bir yapıdır. Retina gözün arka bölümünü kaplayan nöronal bir membrandır. Göz, ışığı odaklayacak mercek sistemine, bu ışığı algılayan reseptör tabakasına ve bu uyarıları merkeze iletecek sinir sistemine sahip bir organdır (98). Göz, dıştan içe doğru sklera, koroid ve retina olmak üzere üç tabakaya sahiptir.



Şekil.2.8. Gözün anatomik kısımları

Sklera gözün ön tarafında korneayı oluşturur. Göze giren ışık retinaya ulaşmak için kornea, aköz humor, lens ve vitreusdan oluşan saydam bir ortamdan geçmek zorundadır. Göz merceği ve kornea gelen ışığı kırarak retinanın üzerine düşmesini sağlarlar. Retinaya ulaşan ışık bütün tabakalardan geçerek fotoreseptörlere ulaşmak zorundadır. Işığı retinanın üzerine düşürmek için merceğin şeklini değiştirmesine akomodasyon denir. Merceğin şekli zonular liflerle bağlı siliyer kaslarla kontrol edilir. Yakın cisimlerde kaslar kasılır ve merceğin küreselliği artar (99). Siliyer kaslar, beyin sapındaki üçüncü kafa çiftinin çekirdeğinden (edinger westpal) göze iletilen parasempatik sinir sinyalleri ile kontrol edilir. Parasempatik sinirlerin

uyarılması ile siliyer kasların kasılmasına ve mercek bağlarının gevşemesiyle merceğin kırma gücü artar. Kırma gücünün artması ile göz, yakın nesnelere kolaylıkla odaklanabilir (98).

Göze giren ışığın miktarı ise pigmentli bir kas olan iris tarafından kontrol edilir. İrisin ortasında ışığın göze girdiği bölge olan pupila (göz bebeği) vardır. Göze fazla ışık geldiği zaman pupila daralarak fazla ışık girmesini engeller, az ışık geldiği zaman ise genişler. Görsel algı retinada başlar (98). Korneadan giren ışık, gözün arka tarafına doğru gider, retinadaki özelleşmiş duyu organları (fotoreseptörler) tarafından elektriksel sinyale çevirilir. Sinyaller optik sinirle yüksek merkezlere gönderilir.

2.2.3. Retina

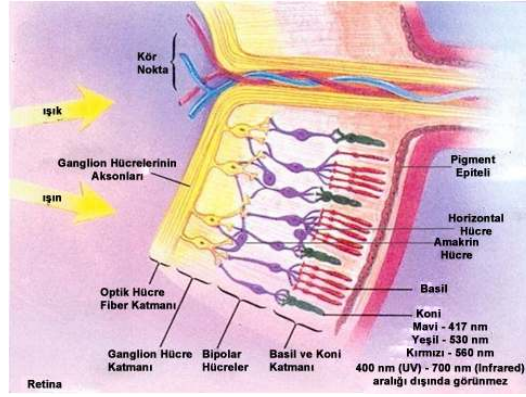
Gözün reseptör tabakası retinada bulunur. Korneadan geçen ışık lens ve vitreusu geçerek retinaya ulaşır. Retina pigment tabakasının önünde bulunur. Melaninin görevi tüm ışığı emip, ışığın yeniden retinaya yansımalarını önlemektir (98). Göz küresinin en içteki üçüncü katmanı olan retina, önemli kimyasal ve fiziksel olayların merkezidir. Retinada renkli görmeden sorumlu olan koniler ve esas olarak karanlıkta görmeden sorumlu olan basiller bulunur ve bu alan gözün ışığa duyarlı bölümüdür. Basil ve koniler uyarıldıklarında, sinyaller retinadaki ardışık nöronlara takiben optik sinir liflerine ve buradan da beyin korteksine iletilir ve görmenin nöral yolağı tamamlanır.(98)

Retinada dışarıdan içeriye doğru 10 tabaka bulunmaktadır.

1. Retina pigment epitel
2. Koni ve Basil tabakası: Fotoreseptör hücrelerin dış ve iç segmentlerini içerir.
3. Dış sınırlayıcı membran: Aslında bir membran olmayıp Müller hücrelerini birbirlerine ve fotoreseptör hücrelere bağlayan bir sıra “zonula adherentes” den oluşur.
4. Dış nükleer tabaka: Fotoreseptör hücrelerin hücre gövdeleri ve lifleri bulunur.
5. Dış pleksiform tabaka: Fotoreseptör, horizontal ve bipolar hücrelerin birbirleri ile sinaps yaptıkları bölgedir.
6. İç nükleer tabaka: Horizontal, bipolar, amakrin ve interpleksiform hücrelerin gövdeleri bulunur.
7. İç pleksiform tabaka: Bipolar, amakrin ve gangliyon hücrelerinin birbirleri ile sinaps yaptıkları bölgedir.
8. Gangliyon hücre tabakası: Gangliyon hücrelerinin gövdeleri ve yer değiştirmiş amakrin hücreler bulunur.
9. Optik sinir lifleri tabakası
10. İç sınırlayıcı membran: Müller hücrelerinin ayakları çıkıntılarını vitreusa bağlayan bir bazal laminadır (98).

Nöral retina ise altı tip hücre grubu içermektedir.

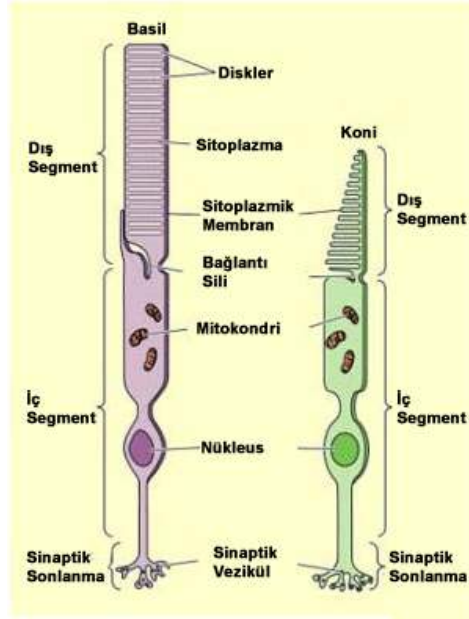
- 1.Koni ve Basiller
- 2.Horizontal hücreler
- 3.Bipolar hücreler
- 4.Amakrin hücreler
- 5.İnterpileksiform hücreler
- 6.Gangliyon hücreleri



Şekil.2.9. Retinanın gözdeki konumu

Koni ve Basiller (Fotoreseptör hücreler)

Fotoreseptör hücreleri gözün kırıcı ortamı tarafından yönlendirilen görüntüyü nöral sinyallere çevirerek görme olayını başlatan özelleşmiş hücrelerdir. Bunlar yüksek derecede özelleşmiş birinci sıra nöronlar olup koni ve basil olmak üzere iki tip fotoreseptör vardır. Koniler yüksek ışık şiddetinde (fotopik şartlar) fonksiyon görerek renkli görme ve ince detayların algılanmasını sağlar. Basiller düşük ışık şiddetinde (skotopik şartlarda) fonksiyon görür ve renkleri belirleyemez (99). Retinanın merkezinde hiç basil hücresi bulunmamaktadır. Bununla birlikte bu merkezde koniler, en yüksek konsantrasyona sahiptir. Basil ve koni hücreleri benzer subselüler yapılara sahiptir, ancak isimleri fotoreseptör dış segmentlerinin farklı şekillerinden türetilmiştir. Basil hücresi dış segmentleri silindirik bir şekile sahipken, konilerde, dış segmentin uzak ucuna doğru incelerek koni şeklini almıştır (100). Genel olarak basiller konilere kıyasla daha dar ve uzundur.



Şekil.2.10. Fotoreseptör hücreler

Bir fotoreseptör hücresi;

- dış segment,
- iç segment,
- çekirdek
- sinaptik sonlanma

olmak üzere dört kısımdan oluşur.

Dış Segment

Fototransdüksiyondan sorumludur. Dendritik son kısım olup, yassı membranöz, hücrenin eksenine dik lameller bulunur. Her lamel, plazma membranının iç içe girmesi ile oluşur. Membranlarda basillerde ışık duyarlı pigment olan rodopsin bulunurken, konilerde benzer başka bir fotokimyasal bileşen olan iodopsin (konopsin) vardır. Dış segmentte birbiri üzerine yığılmış halde birçok disk membran parçacığı bulunur. Bunlar basillerde intraselüler veziküller halindeyken, konilerde plazma membranıyla birlikte seyredir. Disk membranlarda her hücrede 108'den fazla olmak üzere bol miktarda görme pigmenti bulunur (101).

İç Segment

Hücre çekirdeğinin bulunduğu ve biyosentezlerin yapıldığı yerdir. Modifiye bir bağlayıcı sap (cilium) ile dış segmente bağlıdır. Granüllü endoplazmik retikulum, mitokondri gibi organellerde görme için fotoreseptör hücrelerin ihtiyaç duydukları enerji ve protein üretimi gerçekleşir. Bu enerji dış segmente iletilir. Burada dış segmentin apeksinden koparak pigment hücrelerine iner (101).

Sinaptik Sonlanma

Fotoreseptörlerle hedef hücrelerin bağlantı yaptığı sinaptik terminaldir. Koni ya da basil hücrelerinden sonraki sinir hücreleri olan horizontal ve bipolar hücreler ile

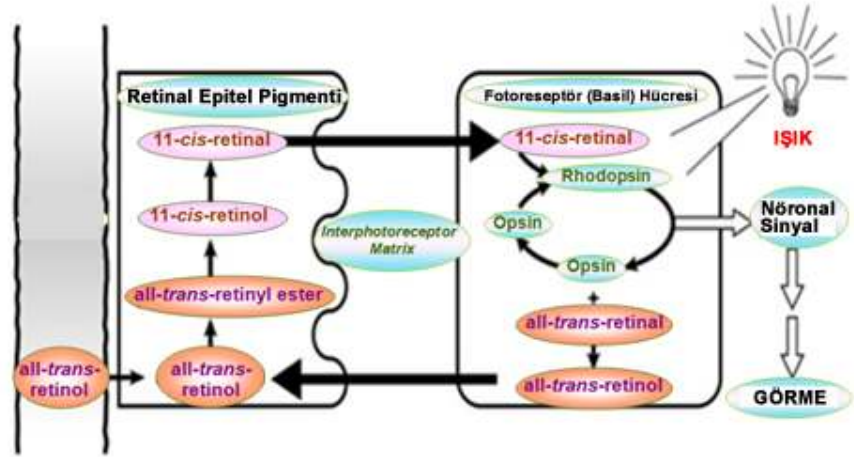
bağlantısını sağlayan bölümdür ve görme zincirindeki bir sonraki aşamayı gösterir (101).

Konilerde, her bir disk katlanmış hücre zarından oluşmuş bir raftır. Bu basillerde hücre tabanına yakın bölümler için geçerlidir. Bununla beraber basil hücrelerinde tepeye doğru diskler zardan ayrılırlar ve tümüyle hücrenin içerisinde uzanan yassı çantacıklar halinde bulunurlar. Rodopsin ve renk pigmentleri disklerin zarına transmembran proteinler şeklinde katılırlar. Disklerdeki bu ışığa duyarlı pigmentlerin konsantrasyonları yüksektir, sadece pigmentler tüm fotoreseptör hücre kütesinin % 40 kadarını oluştururlar (102). İnsanda koni pigmentleri 419 nm (mavi), 531 nm (yeşil) ve 558 nm (kırmızı) olmak üzere ışık spektrumunun üç bölgesindeki fotonları maksimum olarak absorbe ederler. Koniler keskin görmeden, ışıktaki renk ayırımında ve aydınlıkta görmeden sorumludur. Koniler, horizontal ve bipolar hücrelerle olduğu kadar, diğer basil ve konilerle de sinaps yaparlar. Konilerin toplam sayısı yaklaşık 6,5 milyondur, merkezden periferiye doğru gidildikçe koni sayısında hızlı bir düşüş gözlenir. Basiller ise karanlıkta görmeden sorumludurlar. Bir basil hücresinde ortalama 6.000 -10.000 adet disk bulunur. Bir basil hücresi iki horizontal veya çok sayıda bipolar hücre dendriti ile sinaps yapma yeteneğindedir. Retinada toplam basil hücre sayısı, yaklaşık 120 milyondur. Koni ve basil hücrelerinin dış segmentleri mukopolisakkarid bir örtüyle kaplıdır ve pigment epiteli ile temas halindedir (102).

Karanlıkta basillerin metabolizmasına bağlı olarak oksijen tüketimi artar. Koniler az ışığı saptamak haricinde görme işinde basillerden daha iyidirler. Renkli görme ve çözünürlüğü daha iyi görme ile hareketi algılamayı sağlayan hızlı yanıt özelliğine sahiptir. Bir basilde bir tek foton bile saptanabilir, elektriksel yanıt oluşturabilir. Koniler renkli görmeye aracılık ederler. Konilerde üç tip opsin vardır. Bunlar kırmızı ışığa duyarlı (L) tipi, yeşil ışığa duyarlı (M) ve mavi ışığa duyarlı (S) tipi opsin türleridir. Beyin renge ait bilgileri bu 3 tip koninin yanıtlarının karşılaştırılmasıyla elde eder. Basiller ise tek tip pigment içerir ve bu yüzden farklı dalga boylarındaki ışığa aynı yanıtı oluştururlar. Fotoreseptörler diğer duysal reseptörler gibi aksiyon potansiyeli üretmezler. Bunun yerine membran potansiyelinde dereceli değişiklikler ile ışığa yanıt verirler.

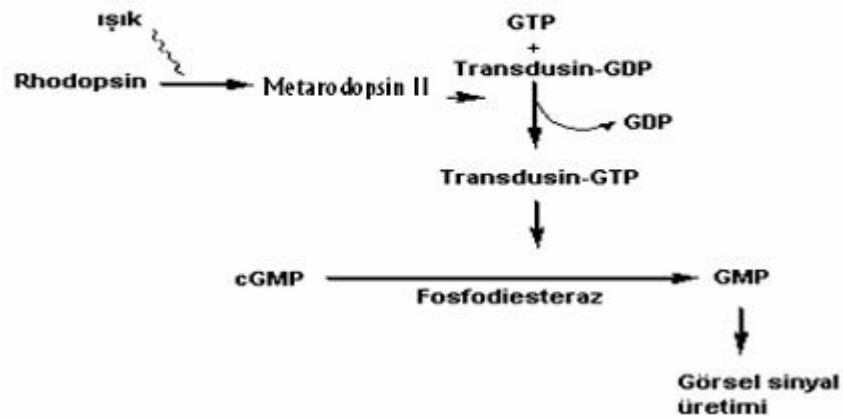
2.2.4.Fototransdüksiyon Kaskadı

Rodopsinin aktivasyonu ışığın absorpsiyonu ile başlar. Bu retinalin 11-cis formundan all-trans formuna geçmesidir. Bu reaksiyon görme sırasında gerçekleşen tek ışığa bağımlı basamaktır. Bu konformasyonel değişiklik ile retinal artık opsindeki bağlanma bölgesine uymaz. Bu yüzden opsinde konformasyonel değişiklik ile Metarodopsin II oluşur. Metarodopsin II stabil değildir, dakikalar içinde opsin ve all-trans-retinale ayrılır. Daha sonra all-trans retinal basilden pigment epiteline transfer edilir. Pigment epiteline all-trans retinal ve all-trans retinolden (A vitamini) 11 cis-retinal yapılıdır. 11cis-retinal tekrar basile geçer. Bu maddelerden insanda sentezi yapılmayan all-trans retinoldür. Eksikliğinde gece körlüğü oluşur. Tedavi edilmezse dış segmentlerin bozulmasına bağlı olarak körlük oluşur (103).



Şekil.2.11. Fototransdüksiyon kaskatı

Basil hücreleri üzerindeki membranöz disklerin membranlarına gömülmüş olan rodopsin fotopigmenti içerisinde ışığa duyalı olan retinal molekülü yer almaktadır. Bu disklerin dış membranlarında cGMP bağlantılı Na^+ kanalları bulunur. cGMP bağlı durumdayken bu kanallar açıktır ve Na^+ membran içerisine girer ve hücre membranını polarize eder. Rodopsine bir ışık fotonu çarptığı zaman, retinalin konformasyonel değişikliği rodopsini aktive eder. Aktif rodopsine transdusin G proteinini bağlanır ve transdusini aktif hale getirir. Aktif transdusin ise membran bağlı başka bir protein olan cGMP-fosfodiesteraz'ı aktive eder. cGMP-fosfodiesteraz sürekli halde bulunan cGMP moleküllerini non sürekli hali olan 5'-GMP haline dönüştürür. Böylece ortamda cGMP azalır ve cGMP bağlantılı Na^+ kanalları kapanır. Na^+ hücreye artık giremediği için membranda bir hiperpolarizasyon oluşur. Hiperpolarizasyon fotoreseptörün ucuna pasif olarak iletilir ve hücrelerden nörotransmitter salınımı azalır (98).



Şekil.2.12. cGMP'nin görmedeki yeri

Horizontal hücreler

Basil ve koni hücrelerinin terminal uçlarına yakın yerleşimli, multipolar hücrelerdir. Çoğu memelilerin retinasında aksonlu ve aksonsuz olmak üzere iki tip horizontal hücre bulunur. Primatlar ve insanlarda bulunan tüm horizontal hücreler aksonludur. İnsanlardaki horizontal hücrelerin dendritleri koniler ile, akson terminalleri ise basil ile bağlantılıdır (104). Yapılan çalışmalarda memeli horizontal hücrelerinin (GABA)'erjik olduğunu göstermektedir (105). Horizontal hücreler birbirlerine gap junctionlar aracılığı ile yaygın şekilde bağlanmışlardır. Bu bağlanma gücünün skotopik ve fotopik şartlarda değişken miktarlarda salınan DA ile modüle edildiği düşünülmektedir. DA, horizontal hücrelerdeki D1 reseptörüne bağlanır ve cAMP bağımlı bir protein kinaz aracılığı ile gap junction kanallarının açık kalma süresini azaltır (106).

Bipolar hücreler

Bu hücreler, fotoreseptör terminali ile sinaps yaptıktan sonra tek bir aksonu ile gangliyon veya amakrin hücrelerle sinaps yaparak, sinyal iletiminde rol oynarlar. Bipolar hücreler fotoreseptörlerden gangliyon hücrelerine direkt veya indirekt olarak sinyal iletirler (98).

Amakrin hücreler

Bipolar hücrelerden gangliyon hücrelerine ışık sinyallerinin transferini sağlayan internöronlardır. Büyük bir çoğunluğunun aksonu yoktur. Farklı tipte amakrin hücrelerinde GABA, glisin, asetil kolin ve DA gibi nörotransmitterler ve somatostatin, vazoaaktif intestinal peptit (VIP), substans P, nörotensin, ve kolesistokinin gibi peptitlerin bulunduğu saptanmıştır. Dopaminerjik amakrin hücreleri DA içerir ve bağlantı paternleri nedeni ile fotopik yolağtan skotopik yolağa bilgi transferi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (98).

İnterpleksiform hücreler

DA veya GABA içerirler. Belirli amakrin hücrelerden bipolar ve diğer amakrin hücrelere görüntü bilgisinin transferini sağlarlar. (107)

Gangliyon hücreleri

Bipolar ve amakrin hücrelerden sinaps alır ve aksonları ile optik siniri oluştururlar. Gangliyon hücreleri, retinanın iç kısmında yer alırlar. Gangliyon hücreleri multipolardır, dendritleri bipolar ve amakrin hücrelerin aksonları ile sinaps yapar. Gangliyon hücrelerinin miyelinsiz aksonları vardır, bu aksonlar retina yüzeyine ulaşınca 90° açı yaparak optik sinirde toplanır ve gözün içini terk ederler. Lamina kribrozadan geçtikten sonra oligodendrisit hücreler tarafından miyelin kılıfları oluşturulur, bu aksonlar lateral genikulat cisimde sonlanırlar. Bunlarla beraber destek görevi gören Müller hücreleri, neredeyse tüm retinal katmanları kat eden uzantıları olan soluk boyanan ince uzun hücrelerdir. Müller hücreleri, retinada nöral hücreler tarafından doldurulmayan boşlukları doldurur. İç ve dış sınırlayıcı membranı oluştururlar. Müller hücreleri dışında retinada destek hücreleri olarak astrositler, perivasküler glial hücreler ve mikroglial hücrelerde tariflenmiştir (101).

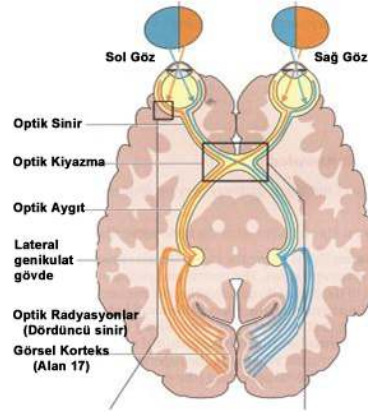
2.2.5. Retina ve Dopamin İlişkisi

DA retinada bulunan temel katilokamin olup amakrin ve interpleksiform hücrelerin olası transmitteridir (108). DA, retina pigment epiteli (RPE) fonksiyonunda da özel önem taşır, çünkü retinal nöronlar tarafından kullanılan bir transmitterdir. Retinada DA seviyesinde ışık ile uyarılan değışiklikler RPE tarafından algılanır. Alt vertebralılarda DA, RPE hücrelerindeki pigment migrasyonunu düzenler (109). Retinada DA sentez ve yıkımı ile ilgili enzimlerde bulunur ve yapılmış çalışmalarda, retinada bulunan DA reseptörlerinin beyinde bulunanlar ile aynı olduklarını göstermiştir (110). Vertebralıların retinası ışık ile uyarıldığında bir dizi amakrin veya interpleksiform hücre tarafından DA salgılanır ve bu salınım ışığa karşı nöral adaptasyon için modölatör bir yanıttır (111). Günün ilk ışıkları ile birlikte DA sentez ve kullanımında aşırı bir artış olur ve bu olayı başlatan sirkadiyen bir saat olmayıp tamamen ışık uyarısıdır. Sabit olarak karanlıkta tutulan farelerde DA sentez ve kullanımında sirkadiyen bir ritm gözlenmez (112). Memeli olmayan vertebralılarda retinal melatonin ve DA sırası ile gece melatonin, gündüz DA olacak şekilde inhibitör parakrin sinyaller ile karşılıklı etkileşirler. Günümüzde bu karşılıklı inhibitör etkileşimin memelilerde de bulunduğı gösterilmiştir. Memeli retinasında DA'nın melatonin baskıladığı ve bunu D2 ve D4 dopaminerjik reseptörler aracılığı ile gerçekleştirdiğı gösterilmiştir (113). Hemen hemen tüm retina hücreleri DA reseptörleri taşımaktadırlar. Örnek olarak, D1 reseptörü RPE tarafından gerçekleştirilen fagositoz işleminin modölyasyonunda rol oynar. D4 reseptörü fotoreseptörlerdeki melatonin sentezinin inhibisyonu ile ilgilidir. DA D1 veya benzeri reseptörler aracılığı ile horizontal ve amakrin hücre gap junctionlarının bağlantılarını ortadan kaldırır. DA D2 otoreseptörleri aracılığı ile bazı amakrin hücre alt grupları tarafından diğler tansmitterlerin salınmasını modöle eder. Rollerini tam olarak bilinmese de gangliyon hücrelerinde de DA reseptörleri bulunur. Müller hücreleri de DA'dan etkilenmektedir. Retinada gerçekleşen ritmik regölyasyonlarda da DA'nın çoklu etkilerinin olması düşünölmüştür (114).

2.2.6. Görsel Sisteminin Nöral Yolağı

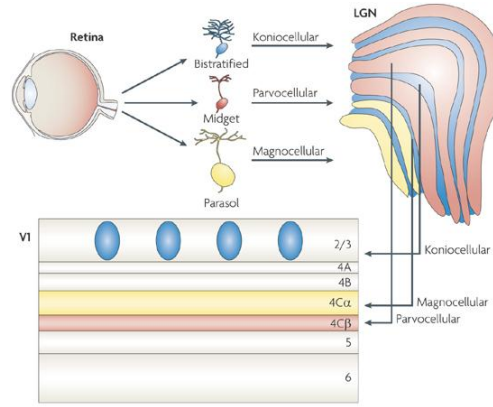
Basil ve koniler sinyalleri dış pleksiform tabakaya iletirken bipolar hücreler ve horizontal hücreler ile sinaps yaparlar. Gangliyon hücreleri ise çıkış sinyallerini retinadan optik sinir aracılığıyla beyine iletirler (115). Retinal gangliyon hücreleri, kontrast, ani değışimler, görüntünün renk, şekil ve hareket gibi farklı özelliklerine bağılı gelişen sinyalleri iletirler. Bu özellikler görme korteksinde paralel yollarda işlenmektedir. Bu paralel süreç, paralel gangliyon hücreleri ağı aracılığı ile retinada başlar. Retinanın her bölgesinde, aynı fotoreseptörlerden sinyalleri paralel yollarla ileten, fonksiyonel olarak farklı gangliyon hücresi alt grupları vardır. Retinadaki gangliyon hücreler üç fonksiyonel sınıfa ayrılır: M (magnosölüler), büyük) ve P (parvosölüler, küçük) ve K (koniosölüler) hücreler. M hücrelerinin büyük alıcı alanları vardır ve cisimlerin kenarındaki hareketli ve büyük uyarıları ve bunlardaki ani değışiklikleri algılayabilirler. Daha küçük olan P hücreleri, hareketsiz uyarılardan, görüntüdeki yapı ve ince detaylardan sorumlu olarak kabul edilir. Koniosölüler hücreler fonksiyonel ve kimyasal olarak M ve P hücrelerinden farklıdırlar. Tam olarak görevleri bilinmese de K hücrelerinin görsel algı ve renkli görmeden sorumlu olduğı düşünölmektedir. Bu hücreler mitokondriyal bir enzim olan sitokrom oksidazı bol miktarda içeren ve renk damlaları (blob) adı verilen

bölgelerde (17. bölge) sonlanır.



Şekil.2.13. Gözlerden görme korteksine giden temel görme yolları

Gangliyon hücrelerinin aksonları beyine giden optik siniri (kranial sinir II) oluştururlar. İki optik sinirin çapraz yaptığı yere optik kiazma denir. Retinanın nazal yarımından gelen lifler optik kiazmada çapraz yaparak, temporal yarımdan gelenler ise çapraz yapmadan dorsal genikülat nükleus (dLGN)'a girerler ve burada sinaps yaparlar. dLGN altı nükleer tabakadan oluşmuştur. 2, 3 ve 5. tabakalar sinyalleri retinanın temporal bölgesinden alırken 1, 4 ve 6. tabakalar sinyalleri karşı gözün nazal retinasından alırlar. dLGN'de P hücrelerinden sinyalleri alan parvoselüler (3,4, 5 ve 6. tabakalar), M hücrelerinden sinyalleri alan magnoselüler tabaka (1.ve 2.tabakalar) Konioselüler tabaka olmak üzere 3 alt tabaka bulunmaktadır. Magno sistem hareket ve derinlik algılanmasından, parvo sistem şekillerin ayırt edilmesinden ve hızlı yersel değişikliklerin algılanmasından, Koniosistem ise renkli görmeden sorumludur (116). Optik traktusun görsel bilgisini, optik radyasyon (genikülo kalkarin traktus) yolu ile görme korteksine iletmek ve görsel bilgi sinyallerinin ne kadarının kortekse geçeceğini kontrol etmek dLGN'nin en temel görevlerindendir. dLGN bu işleri yürütürken iki temel kaynaktan sinyal alır. İlki primer görme korteksinden lateral genikülat uzanan kortikofugal lifler, ikincisi ise mezensefalonun retiküler alanlarından gelen liflerdir. dLGN'den çıkan görsel bilgi sinyalleri optik radyasyon yolu ile oksipital lobun kalkarin bölgesindeki primer görme korteksine ulaşır. Primer görme korteksi altı tabakadan oluşmuştur. dLGN'den gelen aksonlar genellikle 4. tabakada sonlanır. Bu tabakada a,b,c alfa, c beta olmak üzere 4 farklı katman ayırt edilir. dLGN'nin parvoselüler tabakasından gelen aksonlar katman 4c'nin derin bölgelerinde sonlanırken magnoselüler tabakadan gelen aksonlar ise genellikle daha yüzeyel bölümlerinde sonlanır (102).



Nature Reviews | Neuroscience

Şekil.2.14. M, P, K hücrelerinin dLGN'deki konumları

Bunlara ek olarak görme liflerinin, sirkadyen ritmin kontrolünü sağlamak üzere hipotalamusun suprakiazmatik nükleusu, gözün odaklanması ve göz bebeğinin ışık refleksini sağlamak için pretektal çekirdekler, iki gözün hızlı doğrusal hareketlerini kontrol etmek için süperior kollikulus, vücudun bazı davranışsal işlevlerini kontrole yardım etmek için talamusun ventral lateral genikülat nükleusu gibi farklı beyin bölgelerine gittiği gösterilmiştir (117). Diğer duysal sistemlerin kortikal temsilde olduğu gibi görme kortekside primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır.

Primer Görme Korteksi

Primer görme korteksi kalkarin fissür alanında her bir korteksinmedial bölümünde oksipital kutba doğru uzanır. Bu bölge Brodman'ın 17. kortikal alanıdır ve primer görme alanı-V-1 olarak adlandırılır. Aynı zamanda çizgili görünüşünden dolayı striat korteks de denir (101, 117).

Sekonder Görme Korteksi

Sekonder görme korteksine görsel asosiyasyon alanları da denir. Primer görme korteksinin lateral, anterior, süperior ve inferiorunda uzanır. Görsel uyarıların analizi için primer görme korteksinden gelen sinyallerin iletildiği alanlardır. Primer görme korteksini çepeçevre saran Brodman'ın 18.alanı sekonder görme alanı-V-2 olarak adlandırılır. Ayrıca V-3, V-4 gibi yarım düzineden fazla uzak sekonder görme alanları vardır (101, 117).

2.3. Uyarılmış Potansiyeller

Beynin elektriksel aktivitesi ilk olarak 1875 yılında Caton adlı araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Bu ilk çalışma, beynin çalışma prensiplerini açıklamaya yönelik birçok çalışmaya da öncü niteliktedir. Kasıtlı bir uyarı olmadan yüzeysel veya derin elektrotlarla insan veya hayvan beyninden kaydedilen elektriksel aktiviteye Elektroensefalogram (EEG) denilir (118). Beyinde dış uyarılardan bağımsız ve EEG olarak bilinen spontan aktivitenin yanında, dışarıdan verilen her türlü uyarana cevap olarak ürettiği bir biyoelektriksel bir aktivite de vardır. Özellikleri bilinen bir uyarı sonucunda beyinin göstermiş olduğu ek elektriksel cevap aktivitesi uyarılmış potansiyel-evoked potential (EP) olarak isimlendirilir.(119) Bir EP'yi oluşturan dalgaların tanımlanmalarında kullanılan belli başı tanımlar vardır.

Bunlar;

- Dalgı Şekli (wave form) : Bir dalgalının Őekliini (yayvan , sivri , keskin v.b) tanımlamak amacıyla kullanılır.

- Latens : Bir dalgalının, uyarının verilmesinden ne kadar zaman sonra çıktığını göstermektedir.Uyarının Şiddeti ile ters orantılıdır.

- Polarite : Pozitif veya negatif olacak Şekilde bir dalgalının yđnđnđ ifade eder.Dalgalının yđnđ elektrotların (aktif ve referans elektrot) yerleŐtirilme yerine gđre değişiklik gđsterir.

- Genlik (amplitude) : Cevabın elektriksel bđyđklđđnđ gđsterir.Uyarının Şiddeti ile doğru orantı gđsterir. Hesaplama olarak iki tđrdđr. Bunlar; peak-to-peak (tepeden tepeye) ve peak-to-base (tepeden sıfır hattına) ‘dir.

- Dağılım : Kafatası đzerinde bir dalgalının kaydedildiği bđlgeyi ve genliği gđsterir.

Bir EP’nin kayıtını belirleyen temel đđeler ise Şunlardır ;

- Uyarı geniŐliđi (duration) : Her bir uyarının verilmesi ile kesilmesi arasındaki sđre.

- Uyarı Şiddeti : Genlik đzerine doğrudan etkilidir.

- Uyarı tipi : Uyarının hangi duyuya yđnelik olduğunu, uyarının hangi sistemle ve ne Şekilde uygulandığını gđsterir.

- Uyarı sıklığı (inter-stimulus interval): Takip eden iki uyarı arasındaki zaman aralığını ifade eder. Birim zamanda verilen uyarı sayısı ile ters orantılıdır.

- Uyarı sayısı : Bir EP’nin spontan EEG’den ayrıŐtırılarak belirgin hale gelebilmesi iÇin alınan ortalama sayısı (120-121).

Uyarılmış potansiyeller đĥ Şekilde uygulanır. Gđrsel uyarılmış potansiyeller (visually evoked potentials-VEP), beyin sapı iŐitsel uyarılmış potansiyeller (brain stem auditory evoked potentials-BAEP) somatosensoriyal uyarılmış potansiyeller (somatosensory evoked potentials-SEP). SEP, duysal kortex ve dorso spinal kolonun bđtđnlđđnđ değerlendirmede kullanılır. BAEP ise 8. Kranial sinir ve ponsun đzerindeki iŐitme yollarını değerlendirmede iş gđrđr (122).

2.3.1. Gđrsel Uyarılmış Potansiyeller (VEP)

Gđrme yollarının ışık uyarısı ile uyarılması sırasında oksipital bđlgede kafatası đzerinden kaydedilen yanıtlar gđrsel uyarılma potansiyeller (visually evoked potentials-VEP) adı verilir. Gđrsel uyarılma yanıtı (visually evoked response-VER), gđrsel uyarılmış kortikal potansiyeller (visually evoked cortical potentials- VECp) diğer isimleridir (123). İlk kez 1934 yılında Adrian ve Matthews tarafından ortaya konmuştur (124). Gđrsel uyarılmış potansiyeller, gđrme yollarının gđzden baŐlayarak beyine kadar olan mesafedeki olayların gđrsel uyarı verilerek incelenmesi esasına dayanan bir yđntemdir. Esas olarak iki tđr ışık uyarısı cinsi vardır;

- Pattern VEP: Dama tahtası Şeklinde siyah ve beyaz karelerdenoluŐur. Siyah ve beyaz karelerin saniyede 1-3 kez sıklıkla yer deđiŐtirdiđi gđrsel uyarılara karşı elde edilir.Patter uyarın sıklıkla bir bilgisayar monitđrđ aracılığıyla deneklere uygulanmaktadır.

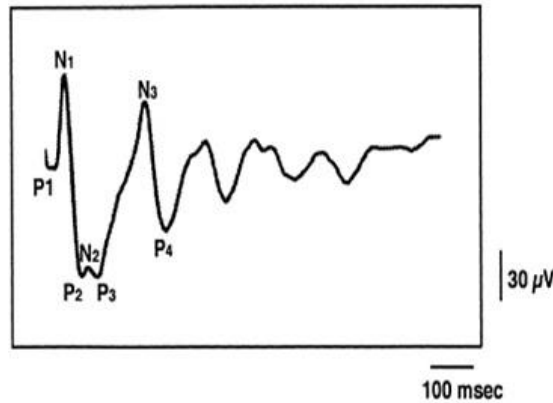
- Flaş VEP: Xenon, Light Emitting Diode (LED) gibi fotostimđlatđrler ile uygulanan flaş uyarana karşı yanıt olarak oluşur. Fotostimđlatđrle verilen flaŐın ışık

şiddeti , sıklığı ve dalga boyu değişiklik gösterir (125). VEP’lerde ortaya çıkan dalga formları polaritelerine ve ortaya çıkış zamanlarına göre isimlendirilmektedir. Görsel uyarımı takiben ortaya çıkan dalgalar polaritelerine göre, negatif (N) ve pozitif (P) olarak gösterilmektedir. Ortaya çıkış zamanlarına göre ise üç gruba ayrılır.

- Kısa latens (erken): Görsel uyarımı takiben ilk 10ms’lik zaman içinde oluşan dalgalar.
- Orta latens: 10-50 ms’lik süre içinde oluşan dalgalar.
- Uzun latens: 50-300 ms’lik süre içinde oluşan dalgalar (126).

VEP’lerin değerlendirilmesi için kullanılan en önemli parametreler dalgaların tepeden tepeye genlik değerleri ve latensleridir. VEP kayıtlarında, ilk ortaya çıkan dalga formunun pozitif olması nedeniyle ilk bileşen P1 olarak, diğerleri ise ortaya çıkış sürelerine göre N1, P2, N2, P3, N3 olarak isimlendirilir. P1 bileşenin nereden kaynaklandığı henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bununla birlikte 17 ve 18a’da bulunan görsel alanların üst nazal kısımlarında olabileceği düşüncesi oldukça kabul görmüştür (127).Yapılan çalışmalarda N1 ve P2 bileşenlerinin genikulokortikal afferent girişlerinin oluşturduğu kortikal cevaplar olduğu, lamina IV’deki stellate hücrelerinin hiperpolarizasyonu sonucu P2’nin, depolarizasyonu sonucu ise N2’nin oluştuğu ileri sürülmüştür (128-129). Bunun yanında, P3’ün üst laminadaki piramidal hücrelerin eksitator postsinaptik cevaplarını yansıttığı gösterilmiştir (129).

N3’ün jeneratörlerin yüzeysel tabakaları boyunca dik olarak yayıldığı ve gövdeleri derin tabakalarda bulunan nöronların apikal dendritleri boyunca oluşan depolarizasyonunu gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir (130).



Şekil.2.15. Sıçandan alınmış örnek bir VEP kaydı

VEP kayıtlarının yapılabilmesi için bazı alet ve elektrotlar gereklidir. Bunlar;

Bilgisayar: Sinyallerin ortalamasını almak için toplama cihazı ve sinyalleri görüntülemek ve kaydetmek için gereklidir.

Diferensiyel amplifikatör: VEP sinyallerini yükseltmek için kullanılır.

Elektrotlar: Genellikle gümüş klorür (AgCl) EEG disk veya iğne elektrotları VEP kayıtları için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (131). VEP kayıtlarında kullanılan iki tip elektrot düzeneği vardır. Bunlar referansın konumuna göre monopolar veya bipolar kayıt adını alırlar. Monopolar kayıta elektrotlardan aktif elektrot kortikal bölgeye, referans elektrot ise kulak veya mastoid gibi kortikal olmayan bir bölgeye yerleştirilir. Bipolar kayıta ise elektrotların ikisi de kortikal bölgeye yerleştirilir ve sonuçta oluşan dalga bu iki kortikal kaynak arasındaki farkı gösterir.

Pattern VEP kayıtlarında N75 ,P100 ve N135 olarak isimlendirilen başlıca üç bileşen gözlenir. Daha önce de söylendiği gibi P ve N harfleri, referans elektroda göre oksipitaldeki aktif elektrottan kaydedilen voltajın negatif veya pozitifliğini göstermektedir. P100 genliği N75 ile P100 arasında tepeden tepeye ölçülür. P100 dalga latensi bireyler arasında kısmen daha az değişkenlik gösterir. İki göz arasındaki farklılığı ve zaman içinde aynı kişiden alınan tekrarlayan ölçümlerdeki değişkenliği daha azdır. Bu nedenle P100 latensi VEP'lerin değerlendirilmesinde en kullanılan parametrelerdendir. Pattern VEP'de kullanılan dama tahtası şeklindeki pattern uyarılardaki karelerin büyüklüğü alınan kaydın amacına göre değişkenlik gösterir. Pattern VEP'de sıklıkla iki farklı ebatta karelerin kullanıldığı görsel uyarılar kullanılır. Küçük kareler daha çok fovea bölgesini, büyük kareler ise retinanın periferik alanlarını uyarır (132).

Flaş VEP ise N1, P1, N2, P2, N3, P3 olarak isimlendirilen pozitif ve negatif bileşenlerden oluşur. Bu isimlendirme flaş VEP'in pattern VEP'den otomatik olarak ayırt edilmesini sağlar. Kısa latensli ve daha küçük genlikli olan N1, P1 dalgaları kayıtlarda daha zor seçildiği için klinik uygulamalarda gözlenmesi daha kolay ve stabil olan N2 ve P2 dalgaları daha sıklıkla değerlendirilirler. N2'nin latensi yaklaşık 90ms iken P2'nin latensi 120 ms'dir (132).

2.3.2. Görsel Uyarılmış Potansiyellerini Etkileyen Faktörler

Flaş uyarımında, saniyede gönderilen uyarı sayısı, elde edilen aydınlık oranı, dalga boyu, ortamın aydınlık veya karanlık oluşu VEP kayıtlarını etkileyen parametrelerdir. Pattern uyarımda ise, uyarının yoğunluğu, şekil seçimi (dama tahtası veya ızgara gibi), şekillerin büyüklükleri, uyarılan toplam alanın ölçüsü, kontrast ayarlanması, ortam aydınlığının sabit olup olmaması ve şekillerin gösterilme oranı VEP kayıtlarını etkileyen başlıca unsurlardır (123). Pattern veya flaş uyarımda normal VEP cevabını etkileyen faktörlerde farklılık gösterir. Şekilli uyarılar kullanıldığında retina üzerine düşen görüntünün netliği, optik sinirden oksipital kortekse kadar olan ileti hızı, kortikal görme merkezi ve üst merkezlerle olan bağlantılar, hastanın teste ve fiksasyona gösterdiği dikkat gibi çeşitli faktörler, flaş

uyarımda ise retinanın ışığa duyarlılığı, optik sinirden oksipital kortekse kadar olan ileti hızı, kortikal görme merkezi ve üst merkezlerle bağlantılar VEP cevaplarını etkiler (123). Pattern VEP'lerde elde edilen latensler ve nispeten genlikler flaş VEP'lere göre daha uzun ve büyüktür. Bunun sebebi, pattern uyarımlarda görme olayının işe karışması, kenar, köşe ve kontrast değerlendirmelerinin yapılmasıdır (133).

Klinik testlerde daha çok pattern uyaran kullanılır. Çünkü bu potansiyeller görsel yol lezyonlarını göstermede daha duyarlı olup, denekler arasında çok fazla değişkenlik göstermezler. Ayrıca, insanın görme fonksiyonlarından biri şekilleri ve kenarlarını analiz etmek olduğundan, şekil değişmeli VEP (PR-VEP)'lerin bazı özellikleri değiştirilerek, bunlar hakkında daha fazla bilgi elde edilebilmektedir. Şekil değişmeli VEP'ler insanda temel olarak fovea ve konilerin aktivitesini göstermektedir (115). Diğer yandan, PR-VEP'lerde 100ms latenste oluşan P100 bileşeni optik nöropatilerde, retrobulbar nöropatilerde ve multipl sklerozda (131, 134) daha klinik semptomlar ortaya çıkmadan uzaması, bu hastalıkların erken teşhisi yönünden önemli bir parametre olduğunu gösterir.

2.4. Nitrik Oksit

NO ilk olarak 17. yüzyılda çalışılmaya başlanmıştır ve canlılardaki varlığı son 20-25 yıldır bilinmektedir. NO, renksiz, aşırı derecede toksiteye sahip, suda erime özelliğinde olan, yarı ömrü kısa ve serbest radikal yapısında bir gazdır. NO'nun canlılarla olan ilişkisinde 1977 yılında Robert Furchgott, Ferid Murad ve Louis Ignarro isimli araştırmacılar NO'nun sinyal molekülü olarak görev yapan nitrogliserinden salınan bir molekül olduğunu ve neredeyse tüm vücut bölgelerinde ve dokularda kimyasal bir haberci olduğunu göstermişlerdir (135). Araştırmacılar bu bilgiler ışığında 1979'da hücre içi siklik guanozin mono fosfat (cGMP) seviyesinin, damar duvarındaki düz kas hücrelerinin, gliseril trinitrit veya nitroprussid gibi dilatörler ile gevşetildiğinde arttığını göstermişlerdir. 1984 yılında Furchgott ve Zawadski, asetilkolin uyarısıyla oluşan gevşemenin endotele bağımlı olduğunu bildirmişler bu maddeyi endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF: Endotel Derived Relaxing Factor) olarak tanımlamışlardır (136). Daha sonra 1987 yılında EDRF olarak tanımlanan molekülün NO olduğu ayrı ayrı yapılan çalışmalarda Furchgott ve Ignarro tarafından gösterilmiştir (137-138).

NO'nun ilk keşfedilen etkisi, kan basıncı ve damar tonusu üzerindeki düzenleyiciliğidir (136, 139). Molekül düşük molekül ağırlığı ve lipofilik yapısı sebebiyle üretildiği hücre zarlarından kolayca dışarı çıkarak direkt olarak hedef hücrelerine yönelmektedir. Hedef hücrelerine bağlanan NO etkisini enzim aktivitesi aracılığıyla veya direkt olarak göstermektedir (140). NO'nun belirlenmiş en önemli hedefi kükürt ve oksijen türevi yapılardır. Sinyal iletmeye yolağı demir içeren proteinlere bağlanmasıyla tetiklenir. GC enziminin hem grubuna bağlanan NO bu şekilde molekülü aktifleştirir. Böylelikle cGMP düzeyi artar ve cGMP'ye bağımlı protein kinazlar da aktifleşmiş olurlar. NO sayesinde demir içeren birçok enzim türü aktifleşir ve proteinlerdeki sülfidril ve tirozin grupları NO ile reaksiyona girerek farklı enzimlerin aktivitesinde görev alır (141-142).

Sabit koşullarda NO hücrelerde az miktarda üretilip salınmaktadır. NO'nun

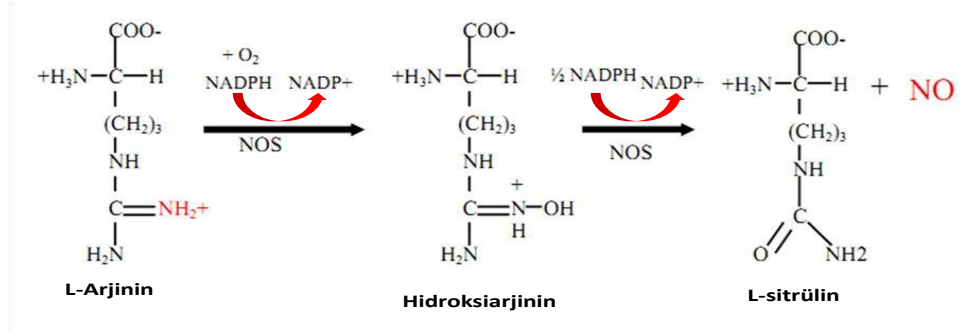
olağan miktarlardan fazla üretimi, üretildiği hücrelerde birçok biyokimyasal olaya neden olup bununla birlikte toksik etkiler gösterebilmektedir (143-144). NO'nun serbest radikal özelliği son yörüngesinde eşleşmemiş elektrona sahip olmasından ileri gelir. Böylelikle canlının yaşamında çok önemli yeri olan ROS, DNA, proteinler gibi çeşitli özellikte moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilmektedir.

NO'nun en önemli etkilerinden biri mitokondriyal solunumu bozmasıdır. Hücrede oranı fazlaca artan NO O_2^- ile reaksiyona girer ve ONOO⁻ oluşur. Bu molekül lipid, nükleik asitler ve proteinler üzerine toksik etki gösterir. ONOO⁻ poli-ADP riboz sentaz (PARS)'ı aktifleştirir. Bu olay ise zincir reaksiyonlar şeklinde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'ın azalmasını sağlar ve glikolizis, elektron transportu ve ATP üretimi gibi olayların yavaşlamasına sebep olur (144-145). NO, hücre membranındaki çift katmanlı lipid katmanından hızla geçebilmektedir. Bu özelliği sayesinde hücrede hızlı bir şekilde yayılır. NO'nun hızlı okside olan kararsız bir bileşik yapısında olması beyindeki miktarın fazlaca olabileceğini düşündürmektedir (146). Oksidatif strese ek olarak NO'nun da PH'da toksik etkisiyle ön plana çıktığı gösterilmiştir (147). NO bazı beyin sapı yapıları, hipotalamus gibi beyin bölgelerinde de görev almakta olup merkezi sinir sisteminde glutamat, GABA, asetilkolin, noradrenalin, DA ve seratonin gibi nörotransmitterlerin modülatör görevleri üzerinde etkisi bulunmaktadır (146, 148). Merkezi ve periferik sinir sisteminde NO cGMP bağımlı mekanizmalarla beraber nörotransmitter özelliği gösterir. NMDA reseptörlerinin aktive olmasıyla NO salınımı yapılmış olur (149). Diğer bilinen nörotransmitterlerin özelliklerinden farklı olarak NO, NMDA reseptörleri uyarıldığında postsinaptik nörondan salınan ve presinaptik nörona difüze olan bir retrograd nörotransmitter olarak davranır. Hücredeki konsantrasyon oranına bağlı olarak NO cGMP aracılığı ile glutamat salınımını sağlar ancak cGMP'nin glutamat salınımı üzerine bifazik etkisinden dolayı (150) NO'nun düşük konsantrasyonda olduğu andan cGMP düzeyi artsa bile glutamat salınımının azaldığı, bununla birlikte NO'nun cGMP düzeylerini arttırdığı durumda glutamatın üzerindeki inhibitör etki ortadan kalkar. Glutamat ve GABA salınımına NO etkisi çift yönlüdür ve GABA salınım miktarı NO ile doğru orantılı olarak artar (151).

Bunun yanında NO, sadece nörotransmitter salınımı uyarmakla kalmayıp nörotransmitterlerin sinaptik düzeylerini sinaptik aralıktan geri alınmalarını engelleyerek etkilerini artırır. Buna örnek olarak DA ve glutamatın geri alınımı örnek gösterilebilir (152-153).

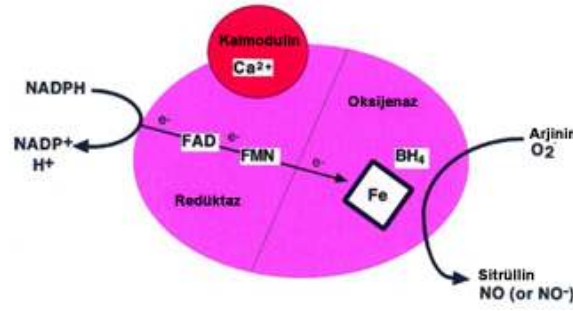
2.4.1. Nitrik Oksit Sentezi

L-arjininin NOS enzimi ile L-sitrüline dönüşmesi sırasında NO açığa çıkmaktadır (154).



Şekil.2.17. NO sentezi

NOS damar endoteli, makrofajlar, üriner sistem dokuları, beyin gibi vücudun farklı dokularında bulunabilmektedir. NOS enzimi L-arjininin terminal guanodin nitrojenlerinin beş elektronunu, oksijeni kullanarak okside ederler. Bu tepkimede nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), oksijen, CaM ve dört kofaktöre (hem, FMN, FAD-flavin adenin dinükleotit ve BH $_4$ -tetra hidro biyopterin) ihtiyaç duyulmaktadır (155). Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), NO sentezi için temel elektron taşıyıcısıdır. Eş zamanlı olarak iki elektronu alıp verir. NOS yapısal ve fonksiyonel olarak farklı şekilde olan N-terminal oksijenaz ve C-terminal redüktaz bölgelerine sahiptir (156-157). NOS'un redüktaz bölgesinin bir enzime sıkıca bağlanan kofaktör grupları olan FAD ve FMN, her birinde 2 tane olmak üzere 4 elektronu, NADPH'dan alır ve hem grubuna verir. FAD koenzimleri, NO sentezi için elektron deposu vazifesi görür. NOS'dan NO sentezi için elektronların, redüktaz bölgesinden oksidaz bölgesinin üzerindeki hem grubuna aktarılması gereklidir. CaM bağlanan bu elektronların hem grubu ile bağlantısını kontrol eder. Eğer ki enzime CaM bağlanmamış olursa elektronlar hem grubu yerine oksijen, ferrisiyanid, sitokrom-c gibi başka bir elektron alıcısına bağlanabilir. Bu durum NO sentezlenirken O $_2^-$ sentezine sebep olabilmektedir. Hücrede NO ve O $_2^-$ 'nin aynı anda sentezi, reaktivitesi OH $^-$ eş olan ONOO $^-$ 'yu oluşturur. Arjinin aminoasiti O $_2^-$ 'nin ne kadar oluşacağını belirler. Sentez ortamında arjinin miktarı azsa, elektronlar NO sentezi yerine O $_2^-$ yapımında kullanılırlar (158). NOS enziminin n-terminal oksijenaz bölgesinde bulunan BH $_4$, enzimin dimerizasyonu ve arjininin bağlanması için uygun konformasyonu sağlar (149, 158).



Şekil.2.18. NO sentezinde etkin faktörler

NO'nun sentezlenmesi için NOS'ların ligandlarının bağlanıp uygun bir şekilde katlandıktan sonra dimer oluşturması gerekir. Enzim oksidaz bölgeleri birbirine geçtikten sonra her alt birimin oksidaz bölgesi diğer alt birimin redüktaz bölgesi ile etkileşir. NOS enziminin aktif halinde NO sentezi için, bir alt birimin redüktaz bölgesi elektronlarını FMN sayesinde yakınındaki diğer altbirimin hem demirine aktarır. Oksidaz ve redüktaz bölgeleri arasında elektron transferi bu şekilde gerçekleşir (158).

2.4.2. Nitrik Oksit Sentaz Çeşitleri

NOS enzimi kinetik ve fizikokimyasal özelliklerine göre indüklenebilir ve konstitutif (yapısal) olarak temelde iki şekilde gruplandırılır. NOS'ların sentezinde görevli 3 tip gen vardır ve bu genlerin her biri farklı bir NOS izoformunu oluşturur. Bu izoformlar; nöronal NOS (nNOS, tip 1), indüklenebilir NOS (iNOS, tip 2), endotelial NOS (eNOS, tip 3). eNOS ve nNOS yapısal enzim özelliği gösterirken, iNOS çeşitli uyarılarla indüklenebilmektedir. İnsandaki NOS enzimleri arasında %51-57'lik bir homoloji bulunmaktadır (149, 158-159).

nNOS enzimi 12. , e NOS enzimi ise hücrede 7. Kromozom tarafından kodlanır. nNOS ve eNOS enzimleri ilgili reseptörlerinin uyarılmasına cevaben aktif hale geçerler. Bu enzimler aktifleşebilmek için Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duyar. Yapısal NOS enzim olarak adlandırılmalarının nedeni bu ihtiyaçlarından dolayıdır. Nöron ve endotelial hücrelerden izole edilen yapısal NOS'un sentez süresi kısadır ve üretilen NO miktarı da çok düşüktür. Bunun sebebi, hücre içi iyonize kalsiyumun konsantrasyon oranının azalmasına bağlı olarak enzimin inaktif duruma geçmesidir. 17. kromozom tarafından kodlanan iNOS, diğer NOS enzimlerinden farklı olarak hücre içinde bulunmamaktadır. Genin transkripsiyonu gelen dışsal ve içsel uyarılara bağlı olarak düzenlenir (160-161). Endotoksin veya değişik sitokinlere cevap olarak makrofaj ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla Ca^{+2} 'dan bağımsız olarak salgılanmaktadır. Bu NOS enzimine aynı zamanda immunolojik NOS adı da verilmektedir. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve IFN- γ ile uyarılan makrofajlar bu uyarının sonucunda yüksek oranda NO üretirler. Bu üretim saatlerce veya günlerce devam edebilmektedir (162).

Tablo 2.1. NOS izoformları (155)

NOS İzoformları	Kromozom Lokasyonu	Protein büyüklüğü ve Aminoasit sayısı	Genin yapısı ve Büyüklüğü
İndüklenebilir NOS (iNOS, NOS 2)	17cen-q11,2 (kromozom 17)	131 kDa 1153aa	26 ekzon, 25intron 37kb
Nöronal NOS (nNOS, NOS1)	12q 24,2-12q 24,3 (kromozom 12)	161 kDa 1434 aa	29 ekzon, 28intron >200 kb
Endotelyal NOS (eNOS ,NOS3)	7q35- 7q36 (kromozom 7)	133kda 1203aa	26 ekzon, 25intron 21-22 kb

Bilinen bu 3 NOS izoformunun yanında diğer bir NOS izoformu olan mitokondrial NOS (mtNOS) da bazı doku tiplerinde mitokondri içinde bulunmaktadır (163-164). Bu NOS türünün de nNOS ve eNOS gibi Ca^{+2} bağımlı olduğu düşünülmektedir. Fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda karaciğer, iskelet kası, beyin, timus, kalp gibi organların dokularında mtNOS'un mitokondriyal biyogenezin devamlılığını sağladığı gösterilmiştir (165).

2.4.2.1. Endotelyal NOS (eNOS, tip 3)

İlk olarak endotel hücrelerinde gösterilen ve hidrofobik bağlanma bölgelerine sahip olduğundan %90 oranında zarda bulunan bir NOS enzimidir. 1203 aminoasitten oluşan 133 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve 7. kromozomda lokalize durumdadır. Temel olarak endotel ve kalp kası hücrelerinde bulunmaktadır. Ayrıca insan nöronal hücrelerinde (149, 166), insan T hücrelerinde (149, 167), insan ve sıçan astrositlerinde (168) insan kemik iliği hücrelerindeki osteoklastlar ve osteoblastlarda (169), insan deri fibroblastlarında (170), sıçan kardiyak miyositleri (171) ve sıçan hepatositlerinde eNOS enzimi bulunmaktadır (172). eNOS enzimi Ca^{+2} -CaM bağımlı bir enzimidir ve bununla bağlantılı olarak hücre içi Ca^{+2} derişimini arttıran agonistler tarafından aktive olmaktadır (143). eNOS ekspresyonu damarda shear stress olarak da adlandırılan mekanik uyarım ile, endotelyal muskarin, kinin, substance P gibi faktörler ile uyarılır (173). Hormonlardan östrojen ve Angiotensin-II eNOS sentezini arttırmaktadır (174). Epicatechinin de Ca^{+2} 'ya bağlı faktörlerle ilişkili olarak eNOS sentezini arttırdığı yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (175). Aktive olmuş fagositlerin ürünleri eNOS fonksiyonunu ve ekspresyonunu engeller (143). Endotel ve plateletler tarafından üretilen eNOS diğer özelliklerinin yanında platelet ve lökosit kümelenmesi ve adezyonunu engellerken düz kas hücrelerinin farklılaşmasında da rol oynarlar (176). eNOS tarafından sentezlenen NO'nun etkisi doğrudan ve kısa süreli olup miktarı pikomolar seviyededir (177).

eNOS beyinin kanlanmasını sürekli kontrol ederek beyinin az kanlanmasını engeller ve kanın pıhtılaşmasını önler (178). Kardiyovasküler sistemde, eNOS'un genel olarak koruyucu etkisi olduğu söylenmektedir. Damar endotel hücrelerindeki eNOS ile üretilen NO, vazodilatör olarak iş görür ve kan akışını, kan basıncını

düzenler. eNOS enzimi ile bağlantılı olarak NO sentezindeki değişim hipertansiyon, diyabet ve kalp gibi rahatsızlıklarda belirgin olarak gözlenebilmektedir (179). eNOS ile üretilen NO redoks özelliği gösterir ve bu özelliğinden dolayı hücre koruyucu olarak iş yapar (155).

2.4.2.2. İndüklenebilir NOS (iNOS, tip 2)

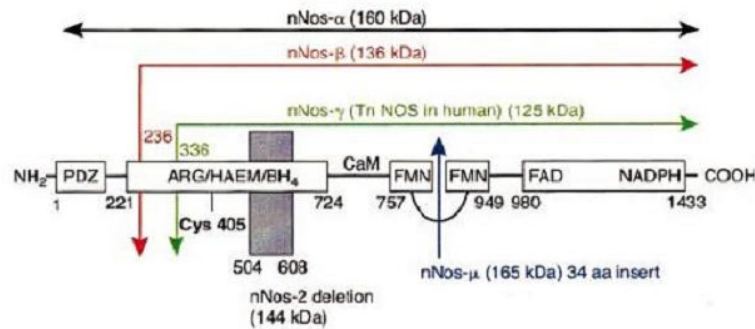
İlk kez makrofajlardan izole edilerek gösterilen bir NOS izoformu olan iNOS , değişik türlere göre 130-131 kDa molekül ağırlığında, 1153 aminoasitten oluşmuş, hücrede 17. kromozomdan eksprese edilen sitoplazmik bir enzimdir (180). iNOS hem membrana bağlı hem de sitosolik formda bulunabilmektedir. Diğer NOS izoformlarından farklı olarak iNOS aktivitesi Ca^{+2} 'dan bağımsızdır. Uyarana bağlı olarak uzun süreli NO üretebilir (149, 180). iNOS tarafından üretilen NO nanomolar seviyede üretilmektedir (177). iNOS bağışıklık sistemini düzenleyici etki gösterir. Endotel hücrelerinde, damar düz kas hücrelerinde, hepatositlerde, kondrositlerde, keratinositlerde (181), mast hücreleri ile monosit, makrofaj, mikroglia, Kupffer hücreleri, eozinofil ve nötrofilleri de içeren fagositik hücrelerde de üretilmektedir (143). iNOS tarafından üretilen makrofaj kökenli NO, hedef hücrelerinin aktifliğini bozar ve öldürür. NO'ya birçok N_3 ve O_2 ara ürünleri katkıda bulunur. Vazodilatasyon ve inflamasyonun meydana gelmesi için gereklidir. Normal koşullarda dinlenme halindeki hücrelerde bulunmaz. Fagosit NADPH oksidaz ve NO ile birleşerek ONOO⁻ ve birçok toksik ürün oluşturan O_2^{-} 'yi üretir. Bu ara ürünler DNA zincirlerinin deaminasyon sonucu kopması gibi DNA'yı direkt etkileyecek birçok olaya neden olabilmektedir. Reaktif azot, elektron kopararak veya bağ yaparak proteinlerin modifikasyonunu ve metal içeren enzimlerin inaktivasyonunu sağlar. Bu değişiklikler proteinlerin birçok metabolik enzimin ve membran taşıyıcılarının etkilenmesine yol açar. NO'nun bu şekildeki sitotoksik etkisi kanser hücresi gibi yapıları da etkileyebilmektedir (182).

iNOS enzimi normal koşullarda vücutta sentezlenmez. Lipopolisakkarit (LPS), sitokinler (interferon γ -IFN γ , interlekin-1- IL-1, TNF- α v.b.) gibi faktörler iNOS enzimini uyarıp aktif hale getirmektedir. Enzim uzun süreli etkisini gösterir. LPS, IFN γ , IL-1, TNF- α en önemli fizyolojik indükleyici olarak görev yaparlar. iNOS'un aktivitesi transkripsiyon- transkripsiyon sonrası, translasyon-translasyon sonrası düzeylerde kontrol edilmektedir (183). iNOS, uyarıcısına ve hücre tipine bağlı olarak , farklı sinyal yollarını ve transkripsiyonel faktörleri aktive edebilir. PKC, tirozin kinaz, Janus kinazlar, raf-1 protein kinaz, mitojen aktive protein kinazlar (MAP kinaz) gibi enzimler iNOS'u aktive edici etki gösterirken, protein tirozin fosfataz, fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K) enzimleri inaktive edici etki gösterirler. iNOS geninin promotö bölgesi, birçok transkripsiyonel faktör bağlanma bölgesi içerir. Nükleer faktör kappa B (NF-kB), STAT'lar gibi transkripsiyonel faktörler, bu bölge ile etkileşen önemli yapılardır (184).

2.4.2.3. Nöronal NOS (nNOS, tip 1)

İlk olarak beyinde keşfedilen NOS türüdür. Çoğunlukla santral sinir sisteminde bulunmaktadır. Merkezi sinir sisteminde nNOS nöromodülatör ve nörotransmitter olarak görev yapar. Nörotransmitterler içinde en düşük molekül ağırlıklığa sahip bir

enzimdir. Presinaptik uçtan salgılanan glutamat NMDA reseptörlerine bağlanır, NMDA reseptörleri hücre içi Ca^{+2} miktarını arttırdığı için nNOS aktif hale gelerek NO yapımını artırır. Öğrenme ve bellekte retrograd mesajcı olan NO, uzun süre kuvvetlendirmede (LTP) ve yeni sinaps oluşumunda önemlidir. nNOS sinapsların şekillenmesine yardımcı olur. Koku alma, görme, ağrı duyusunu algılama ve hafıza oluşumunda görev alır (185). nNOS sinir sisteminde serebellum, korteks, striatum, olfaktor bulbus, dentat girus, dağınık olarak amigdala, bazal ön beyin ve beyin sapındaki nöron topluluklarında bulunmaktadır. Vincent (186), Bredt ve Snyder (187) yapmış oldukları çalışmalarda nNOS'un gelişmekte olan ve olgun nöronlarda bulunduğunu, ve Ca^{+2} -CaM bağımlı olduğunu göstermiştir (149). İntrensek bir membran proteini olan nNOS deterjan uygulamasıyla çözünebilir. Bunların yanında nNOS'un hücre içindeki organellerden ER ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (188). nNOS aktivasyonu için gerekli olan mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Bazı nöronlarda glutamatın NMDA reseptörlerini aktive ederek tetiklemektedir. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücrede Ca^{+2} konsantrasyonunu arttıracak şekilde Ca^{+2} miktarı artar böylece CaM nNOS'a bağlanır ve bunun sonucunda NO oluşur (189). Glutamat reseptörleri uyarıldığında nNOS aktivitesi ile O_2 oluşur. 10-15 dakika içerisinde L-arjinin düzeyleri azaldıkça bu reaksiyonlar sona erer (149). nNOS un aktive olmasında esas tetikleyici rolü Ca^{+2} oynar. Cinsiyet hormonları nNOS ekspresyonu direk olarak etkileyebilir. Cinsiyet hormonlarında biri olan 17 β -östradiol, nNOS'un sentezini artırmaktadır (149). nNOS'ların aktivitesinin ve sentezinin düzenlenmesi CaM bağlı kinazlar, protein kinaz C (PKC) ve protein kinaz A (PKA) fosforilasyonu ile düzenlenir (149). Merkezi ve periferik sinir sistemindeki nöronların stoplazmasında bulunur. Bunun dışında böbrek medullası ve korteks tübülleri (190-191), makula densa (191), nötrofiller, pankreas hücreleri, endometriyum ve solunum epiteli (192), iskelet kası fibrilleri çok çeşitli vücut yapısında bulunabilmektedir. Migren, felç, epilepsi, Huntington Hastalığı (HH) ve sinir sistemi bozukluklarına dayalı birçok hastalıkta nNOS'un etkin bir enzim olduğu belirtilmiştir (180). nNOS çeşitli nörodejeneratif hastalıklara sebep olur (149, 180).

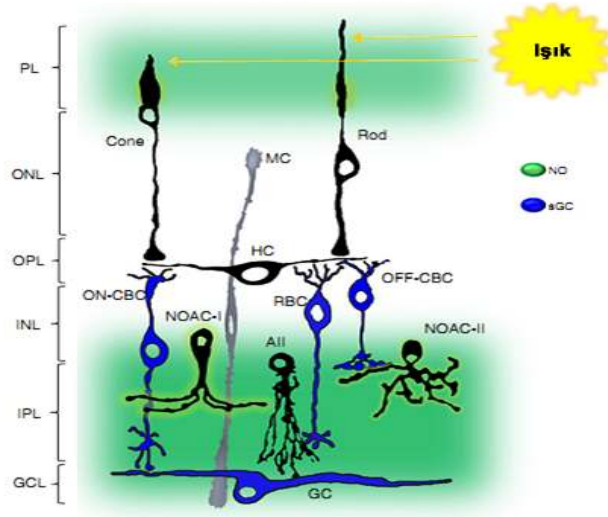


Şekil.2.19. nNOS iziformları

N-terminal bölgelerindeki olan farklılıklar nedeniyle nNOS'un 4 farklı izoformu vardır. Bunlar; nNOS α (160 kDa), nNOS μ (165 kDa), nNOS β (136 kDa) ve nNOS γ (125 kDa)'dır. nNOS α ve nNOS μ , postsinaptik dansite proteini (PDZ) bölgesiyle subsellülerdir ve nNOS β ve nNOS γ stoplazmikdir. nNOS'un PDZ bölgesi, NMDA

reseptörü ile ilişkilidir. nNOS aracılığı ile üretilen NO'nun transkripsiyonun glia hücrelerinden salınan IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar olarak görev yapan mediatörler tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (149).

Canlı sisteminde birçok bölgede bulunan NO görsel sistemde de bulunmaktadır. Retinada nNOS ve iNOS enzimlerinin bulunduğu gösterilmiştir. nNOS çoğunlukla inner nükleer ve gangliyon hücre tabakaları arasında bulunmaktadır. nNOS retinada fotoreseptör ve bipolar hücrelerde NO üretiminden sorumludur. NO basil hücrelerinde guanilat siklaz (GC) salınımını sitümüle eder ve Ca^{+2} kanalından iyon geçişini artırır. iNOS enzimi Müller hücrelerinde ve RPE'de bulunmaktadır. iNOS bu alanda retinal dış segmentte enfeksiyon veya iskemik koşullarda fagositoz olayına katkıda bulunur. Retinada NO retinal kan dolaşımının bazal seviyede devam etmesini sağlar. Oksijen veya glukoz eksikliğininin yaşandığı durumlarda NO, kan akışını artırıp, platelet agregasyonunu engeller. Bu olumlu etkilerinin yanında eksitator amino asitlerin salınarak toksik etki göstermesini sağlar.



Şekil.2.20. Retinada NO'nun bulunduğu alanlar.(193)

DA, somatostatin, melatonin gibi nöromodülatörler NO salınımından etkilenirler. Sıçanlarda ve tavşanlarda yapılan çalışmalar NO'nun DA salınımını azalttığını göstermektedir. Ek olarak NO direkt olarak oksidasyon yolu ile DA'yı indirger (13-14). Bu bilgilerle paralel olarak NOS inhibisyonunun retinada bazal DA seviyesini arttırdığı bunu da cGMP yolağından bağımsız bir şekilde gerçekleştiğini belirtilmektedir (15). nNOS knockout farelerde gangliyon hücrelerde görsel cevabın yabanıl tip farelere göre düştüğü söylenmiştir (194).

2.4.3. Nitrik Oksitin Fotoreseptörlerdeki Etki Mekanizması

NO basil ve koni hücrelerinden bipolar ve horizontal hücelere sinaptik iletimin modülasyonunda görevlidir. Basil hücresinin dış segmentinde ışık uyarımı ile Ca^{+2} konsantrasyonunda düşüş olur ve bu düşüş partiküler guanilat siklaz (pGC)'nin aktive olmasını sağlar. Bu basamak Ca^{+2} bağlayıcı protein (CaBP) ile kontrol edilir. NOS enziminin aktif hale gelmesi, basil hücresinin iç segmentlerinde Ca^{+2} miktarındaki artış ve kalmodulin (CaM) etkisiyle olmaktadır. NOS enzimi ile oluşan NO, sGC'yi uyarır ve basil hücreindeki sinaptik iletimin modülasyonunu sağlar. NO görsel sistemin tüm yolağında yer almaktadır (195).

2.5. Hipotez

PH'da VEP latenslerinin uzadığı, SN'de apoptozun indüklendiği, SN'de lipid peroksidasyonunun ve nitrit/nitrat miktarının arttığı saptanmıştır. Lipid peroksidasyonunu arttıran birçok faktör içerisinde NO'nun da önemli rolü olduğu bildirilmiştir. NO'nun beyin ve görsel sistemde de bulunduğu tespit edilmiştir. Deneysel Parkinson modelinde kullanılan MPTP toksininin farelerde uygulanması sonucunda PH'da iNOS ve nNOS ekspresyonunda önemli bir artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte farklı çalışmalarda PH'da görsel yolağın olumsuz etkilendiği ve VEP latenslerinin uzadığı saptanmıştır. Ancak görsel yolağın etkilenme mekanizması tam olarak bilinmemektedir. MPTP ile oluşturulan deneysel Parkinson modeli oluşturulan farelerde, iNOS ve nNOS enzim inhibitörleri kullanılarak NO sentezi inhibe edilmiştir. SN'deki hücre harabiyetinin azalmasına paralel olarak görsel sistem bozukluklarında iNOS ve nNOS'un rolü aydınlatılmaya çalışılacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ve Biyofizik Anabilim Dalı, Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen ağırlıkları ortalama 25-30 gr arasında değişen 180 adet erkek C57BL/6 fare kullanılmıştır. Fareler 6 tanesi bir kafeste olmak üzere polipropilen hijyenik kafeslerde, 21-23⁰C'lik sabit ısıda 12 saat aydınlık 12 saat karanlık (07.00-19.00 aydınlık süresi) periyotların sağlandığı laboratuvar koşullarında barındırıldı. Çalışma süresince hayvanların yem ve su alımını serbest bırakıldı.

3.1. Gruplandırma

Alınan 180 adet fare her bir kafeste 6, her grupta 30 hayvan olmak üzere rasgele 6 gruba ayrıldı.

1.) Kontrol grubu (K)

2.) nNOS inhibitörü 7-Nitro Indazol verilen grup (7-NI)

3.) iNOS inhibitörü S-methylisothiourea verilen grup (SMT)

4.) 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine verilen grup (MPTP)

5.) nNOS inhibitörü ve 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine verilen grup (7-NI+MPTP)

6.) iNOS inhibitörü ve 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine verilen grup (SMT+MPTP) şeklinde gruplar oluşturulmuştur.

3.2. Deney Protokolü

3.2.1. Deneysel Parkinson Oluşturulması

Hayvanların ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü. MPTP (Sigma-M 0896) toksini, MPTP, 7-NI+MPTP ve SMT+MPTP gruplarına 3 mg/ml doz hesaplanarak serum fizyolojik (SF) içinde çözüldü ve 20mg/kg dozda 12 saatlik aralıklarla günde 2 sefer ve 2 gün boyunca intraperitoneal (İ.P.) yolla uygulandı (196).

3.2.2. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörlerinin Uygulanması

iNOS inhibötörü olan SMT (Alrich-M84445) 12 saatlik aralıklarla ile 10 mg/kg dozda SF içinde çözüldü ve günde 2 kere 2 gün boyunca i.p. olarak uygulandı. SMT grubuna yalnızca iNOS inhibitörü (197) verilirken SMT+MPTP grubuna MPTP uygulamasında 15 dakika önce iNOS inhibitörü verildi. nNOS inhibitörü olan 7-NI (Sigma-N778) 50 mg/kg dozda 12 saatlik aralıklar ile günde 2 sefer 2 gün boyunca fındık yağı (Zade marka) içinde çözülerek i.p. olarak hayvanlara verildi (198), 7-NI grubuna yalnızca nNOS inhibitörü verilirken 7-NI+MPTP grubuna inhibitör MPTP uygulamalarından bir saat önce verildi. Gruplar arası farklılığı önlemek için kontrol

grubuna da fıstık yağı i.p. olarak verildi.

3.3. Parametreler

3.3.1. Ağırlık Takibi

Deney süresi boyunca kimyasal uygulamalardan ve fedalardan önce hayvanların ağırlık değişimleri takip edilmiştir.

3.3.2. Motor Aktivite Tayini

Parkinson ve tedavi modeli oluşturulduktan 7 gün sonra motor aktiviteyi belirlemek için PH'nın spesifik semptomlarından bradikinezi değerlendirildi. Bradiknezinin derecesini ölçmek için üzerinde değişiklik yapılmış Ogawa ve arkadaşlarının 'Pole test=Çubuk Testi' metodu kullanıldı (199). PH'da bradikinezi etkisini hareketin başlama süresinde olan gecikme ile kendini gösterir. Bu gecikme süresinin uzaması bradikinezi şiddetinin arttığını göstermektedir. Test için 0,8 cm çapında ve 50 cm uzunluğunda metal çubuk bez ile sarılarak hayvanın daha iyi tutunabilmesi için uygun hale getirildi. Fare çubuğun en üst noktasına başı yukarıya bakacak şekilde bırakıldı ve bu konumda iken tamamen geriye dönüp (t turn hareketi) zemine hareket etme anına kadar geçen süre (total iniş süresi) kronometre ile ölçüldü ve test anı kamera yardımı ile kayıta alındı.



Şekil 3.1. Çubuk testi

3.3.3. Görsel Uyarılma Potansiyelleri (VEP) Kayıtları

Çubuk testinin ardından hayvanlar VEP kayıtları için özel karanlık bir odaya alınmıştır. Hayvanlara i.p. olarak 80 mg/kg dozda ketamin (%10'luk Alfamine, Alfasan International B.V) ve 16 mg/kg dozda ksilazin (%2'lik Alfazyne, Alfasan International B.V) karışımı verilerek anestezi uygulandı (200). Ek anestezi gerektiği zaman ilk dozun %20' si kullanıldı. Hayvanların vücut sıcaklıkları dijital bir termometre ile devamlı kontrol edildi ve vücut sıcaklığı ısıtıcı battaniye yardımıyla 37,5-38⁰ C olacak şekilde korundu. Kayıt için 7mm uzunluğundaki platin metal alaşımlı iğne elektrotlar (NE-223S, Nihon Kohden) kullanıldı ve elektrotların uzunluğunun fare kafasına uygun olabilmesi için iğneler 5mm'ye kısaltıldı. Elektrotların yerleşimi 10-20 sistemi EEG elektrot yerleştirme haritasında belirlenen koordinatlara göre yapıldı. Aktif elektrot (-) F_{pz}'ye (iki gözün ortası), referans elektrot (+) O_z (ense tepesi)'ye yerleştirildi (201). Toprak elektrodu ise hayvanın kuyruk köküne pasta yardımı ile yapıştırıldı. Flaş uyarısı Nova strobe AB stroskobu ile farelerin pupillalarının tümünü aydınlatacak şekilde 15 cm mesafeden uygulandı. Flaş uyarısı saniyede bir kere ve 0.1 J (en düşük şiddet) olacak şekilde ayarlandı. Kayıtlar Biopac MP100 Data Acquisition cihazında alındı. Flaşla oluşturulan görsel uyarılma potansiyelleri sağ ve sol göz olmak üzere monooküler olarak kaydedildi. Deney süresince kayıt alınmayan diğer göz karbon kağıdı sarılmış pamuk yardımı ile kapatıldı. Kayıtlarda kullanılan cihazın amplifikatörünün frekans limitleri 1-100 Hz, kazancı 50.000, analiz zamanı 300 ms ayarlandı ve 200 kez ortalama alınarak kayıt edildi. Her kayıt tekrarlanabilirliğini sağlamak amacı ile en az iki kez alındı. İzoelektrik çizginin üzerindeki potansiyel tepeleri (pikler) negatif (N), aşağısındakiler ise pozitif (P) kabul edildi. Tepe latensleri stimulus artefaktından itibaren milisaniye (ms) birimi, birbirini izleyen ters polaritedeki dalgaların genlikleri ise tepeden tepeye mikrovolt (μ V) birimiyle hesaplandı.

3.3.4. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılması

Deney süresinin 7. günü motor aktivite ve VEP kayıtlarını takiben hayvanlar 80mg/kg dozda ketamin ve 16mg/kg dozda ksilazin karışımının intraperitoneal uygulanması ile anesteziye alındıktan sonra orta hat kesisi yapılarak abdomeni ve göğüs kafesi açıldı. Torasik aortadan branül (no:26) yardımıyla soğuk heparinli SF verilerek dokuların perfüzyonu sağlandı. Biyokimyasal parametreler ve histolojik analizler için beyin ve göz dokuları hasarsız ve hızlı bir şekilde çıkarılarak deneye son verildi. SN'ler Richard J. Smeyne ve arkadaşlarının gösterdiği şekilde (202) beyin dokusundan buz üzerinde izole edildi. Retinalar buz üzerinde bistüri yardımı ile kazındı. Histolojik analizler için ayrılan beyinlerden doku izolasyonu hemen gerçekleştirilirken diğer dokular biyokimyasal ölçümler yapılabilecek şekilde saklandı.

3.3.5. İmmünohistokimyasal Protokol

İmmünohistokimya için ayrılan beyin dokuları % 10'luk formaline (Formalin, ADR-Advanced Diagnostic Research- 12010742500) alındı ve formalin içinde bir gece fikse edildi. Daha sonra akan suda 3 saat boyunca yıkandı ve %70, %80, %90 ve %100'lük artan alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Ksilol (Xylol, Merck-K33776585441) ile şeffaflaştırma işlemi uygulandıktan sonra dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan kesit aleti (Leica RM2125RT) ile alınan 5 mikron kalınlığında kesitler Poly-L-Lizin kaplı lamlara alındıktan sonra kesitlerde

SN bölgesindeki Tirozin Hidroksilaz ve NOS enzimlerinin aktivitesine bakıldı. Poly-L-Lizin kaplı lamlara alınan immünohistokimyasal protokol için ayrılmış parafin kesitler bir saat 56°C'lik etüvde bekletildi. Kesitler, deparafinizasyon için 2 kere 5'er dakika ksilolde bekletildi ve her birinde 3 dakika olmak kaydıyla azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra, distile suda çalkalanan kesitler fosfat tuzu tamponunda (PBS, pH: 7.2-7.4) üç kere beşer dakika yıkandı. Sadece NOS grubuna ait olan kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için 200 ml sitrat tamponuna (1M, pH: 6.0) (Sitric Acid, Merck-K91217044 122) konularak mikrodalga fırında 5 dakika kaynatıldı ve fırın dışında 20 dakika soğumaya bırakıldı. NOS ve TH kesitleri PBS'te yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitenin giderilmesi için % 3'lük H₂O₂ (%35'lik Hydrogene Peroxide, Merck-K 33052400421) ile 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkama yapıldıktan sonra kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle (Pap Pen-Beckman Coulter, Immunoteck-IM3580) çizildi. Bu işlemi takiben lamalar oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immünoglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklayıcı serumu (TA-125-UB, LabVision Ultra V Block-THERMO) ile 7 dakika muamele edildi. TH kesitlerine rabbit polyclonal primer TH antikoru (Abcam-ab112) 1:400 oranında dilüsyon tamponu ile (TA-125-UD, LabVision Ultra Antibody Diluent-THERMO) dilüe edilerek damlatıldı ve kesitler bir saat süreyle oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor yerine PBS damlatıldı. NOS grubu kesitlere spesifik iNOS ve nNOS primer antikorları (4236-4231-CELL SIGNALING) sırasıyla 1:500, 1:200 oranlarında dilüsyon tamponu ile dilüe edildi ve kesitlere damlatıldı. Kesitler gece boyu +4C⁰'de inkübe edildi. Lamlar inkübasyonları sonunda PBS ile yıkandı. Yıkanan TH ve NOS kesitlerine biyotinlenmiş anti-rabbit seconder antikor (BA-1000, Anti-rabbit sekonder ab-VECTOR) 1:400 oranında dilüe edilerek damlatıldı ve 45 dakika oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. PBS yıkamasının ardından lamlara streptavidin (PK400, Vector ABC kit- VECTOR) damlatıldı 20 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonunda kesitler PBS ile yıkandı ve sinyali geliştirmek için dokular 3'Diamino benzidin (DAB) kromojeni (TA-125-HD, DAB kromojen Substrate System-THERMO) ile muamele edildi ve musluk suyunda yıkandı. Hematoksilende otuz saniye zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler kaiser jelatin (1.092.420.100-MERCK) ile kapatıldı. Bütün gruplar aynı gün aynı muamelelerden geçirilerek boyandı ve böylece teknik nedenlerden doğabilecek etkiler ortadan kaldırıldı. Boyanmış kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi ve sonrasında fotoğrafları çekildi.

3.3.6. Biyokimyasal Ölçümler

Nitrit/nitrat ölçümü

NO, son ürünleri olan nitrit veya nitrata dönüşür. Nitrat direk ölçülemez. Bu yöntemde nitrat, nitrat redüktaz yardımıyla nitrite indirgenir. Sonuçta örnekteki nitrat nitrite dönüştüğünden ortamdaki total nitrit miktarı ölçülerek nitrit ve nitrat saptanmış olur. SN ve retinadaki nitrit/nitrat miktarı ticari bir kit ile ölçüldü (CAYMAN-780001).

Reaktifler

1. Nitrit /nitrat ölçüm tamponu
2. Nitrat redüktaz enzim ve kofaktörü
3. Nitrit/nitrat standartı
4. Griess reaktifleri (R1 ve R2)

Deneyin yapılışı

Retina ve SN dokularına 200µL PBS eklenerek dokular buz üzerinde homojenize edildi. 10,000 g'de 15 dk santrifüj edilen homojenatların süpernatantları alınarak deney gününe kadar -80⁰C'de saklandı. Deney gününde elde edilen doku süpernatantları milipore marka (UFC503096) 30 kDa'luk cut-off filtreler kullanılarak 14,000 g'de 30 dakika santrifüj edilerek filtre edildi. Böylelikle proteinden arındırılmış filtratlar ölçümde kullanıldı. Ölçümlerin öncesinde ölçüm tamponu, nitrat redüktaz, enzim kofaktörleri, nitrat standartı kit prosedürüne uygun olarak hazırlandı. Hazırlanan örnek tablosuna göre mikropalak kuyucuklarının ilk iki sırasına kit prosedüründe belirtilen miktarlarda assay buffer ve nitrat standartı kondu. Diğer kuyucuklara 80µL SN veya retina süpernatantı kondu. Sonrasında tüm kuyucuklara 10 µL enzim kofaktör ve 10 µL nitrat redüktaz karışımı ilave edildi. Plak kapatılıp 3 saat boyunca oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuklara 50 µL R1 reaktifi hemen sonrasında 50 µL R2 reaktifi eklendi. 10 dakikalık oda ısısında inkübasyonun ardından örneklerin absorbansı microplate okuyucu (BioTek ELx808) ile 540 nm'de okundu.

Kaspaz-3 aktivite ölçümü

Kaspaz -3 DEVD (asp-glu-val-asp) aminoasit sekansını tanır. DEVD, kaspaz 3'ün Poli (ADP riboz) polimerazı (PARP) kırıdığı yerdeki aminoasit sekansdır. Substrat olan DEVD-pNA, p-nitroanilide (p-NA) kromoforu ve sentetik bir tetrapeptit DEVD aminoasit sekansını içermektedir. DEVD-pNA substratının kaspaz-3 tarafından kırılması sonucu açığa çıkan serbest pNA, 405 nm'de absorbans artışına neden olur. Bu artış apoptoz uyarımının yapılmadığı kontrol hücrelerinin kaspaz-3 aktivite seviyesi ile karşılaştırılarak belirlenir. Çalışmamızda SN ve retina dokularında apoptoz olup olmadığını belirlemek için kaspaz 3 aktivite kiti kullanıldı (İnvitrogen-KHZ220).

Reaktifler

1. Hücre lizis tamponu (100 mL); deterjan içeren tris tamponlu serum fizyolojik.
2. Reaksiyon tamponu (16 mL); serum fizyolojik, gliserol ve deterjan içeren tampon
3. Substrat (1000µL): DMSO içerisinde pNA kromoforuna konjuge edilmiş 4mM sentetik peptit (sekans: DEVD)
4. Dilüsyon Tamponu (200 mL): HEPES, Tris ve NaCl içeren tampon solüsyonu
5. DTT(800µL); 1M dithiothreitol

Deneyin Yapılışı

Retina ve SN doku örneklerine 200 µL hücre lizis tamponu ilave edilip dokular buz üzerinde homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 10,000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar buz üzerine alındı. Her örnek için protein

konsantrasyonu Bradford yöntemi ile (203) ölçüldü. Doku süpernatantları 50 µL lizis tamponunda 1-4 mg/mL protein konsantrasyonu olacak şekilde dilüsyon tamponu ile dilüe edildi. Çalışılacak her bir örnek için, reaksiyon tamponundan 50 µL cam tüplere aktarıldı ve üzerine DTT eklendi. Her örneğe 10 mM DTT içeren reaksiyon tamponundan 50 µL aktarıldı. 4 mM DEVD-pNA substratından 5 µL eklenerek 37°C'de 2 saat karanlıkta inkübe edildi. 2 saat sonunda örnekler 405 nm'de microplate okuyucuda ölçüldü.

4-HNE ölçümü

Trans-4-hidroksi alkenaller veya trans-4-hidroksi-2,3-nonenal olarak isimlendirilen alkenaller membrandaki çoklu doymamış yağ asitlerinin ve lipoprotein fosfolipidlerin, lipid peroksidasyonları sonucu oluşan, bir takım genotoksik ve sitotoksik etkileri gösterilmiş son ürünlerdir. Fizyolojik koşullarda HNE, hücrede belirli seviyelerde bulunur. Bununla birlikte, HNE yapımı, pek çok patolojik durumu lipid peroksidasyonun artışı ile ilişkili olarak tetikler. 4-HNE'nin hücre içi düzeylerinin kontrolü, HNE'nin metabolize edilmesi ile düzenlenir. Hücre içi konsantrasyonundaki artış apoptotik sinyalleri tetikler. SN ve retina dokularındaki lipid peroksidasyon ticari bir kit ile değerlendirildi (Cell Bio Labs, STA-334).

Reaktifler

1. Anti-HNE-his antikoru
2. HRP konjugat sekonder antikor
3. Ölçüm dilüenti
4. 10X yıkama tamponu
5. Substrat solüsyonu
6. Stop solüsyonu
7. Redüklenmiş BSA standardı
8. HNE-BSA standardı

Deneyin yapılışı

Retina ve SN dokuları üzerlerine 200 µL PBS eklenerek dokular buz üzerinde homojenize edildi. Homojenize edilen doku örnekleri 10,000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. Reaktifler ve standart eğri deney öncesinde kit prosedüründe yazıldığı şekilde hazırlandı ve 10 µg/ml olacak şekilde PBS ile dilüe edildi. Hazırlanan redükte BSA ve HNE-BSA standartları ve örnekler kit prosedürüne uygun şekilde microplate kuyucuklarına ilave edildi. +4C⁰de gece boyu inkübe edildi. Her kuyucuk 2 kere 250µL PBS ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 200µL ölçüm dilüenti eklendi ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Kuyucuklar 250 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µL anti-HNE His antikoru eklendi ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Tekrar 250 µL wash buffer ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µL sekonder antibody-HRP konjugat eklendi tekrar oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklar 5 kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 100 µL substrat solüsyonu eklenerek 20 dk oda ısısında inkübe edildi. Kuyucuklarda hafif mavi renk oluşması gözlemlendiği anda kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Sarı renk gözlemlendiği anda 450 nm'de microplate okuyucu ile ölçüm yapıldı.

3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatiksel değerlendirme SPSS paket programı (versiyon 20) kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan “Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)” ve takiben “Tukey Post Hoc Testi” kullanılmıştır.

BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

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

4.2. Ağırlık Değişimi

Deney gruplarının deney süresince vücut ağırlıkları takip edilmiş, grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Fıstık yağı verilmesinin ağırlık değişimi üzerine bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

4.3. Motor Aktivite Tayini

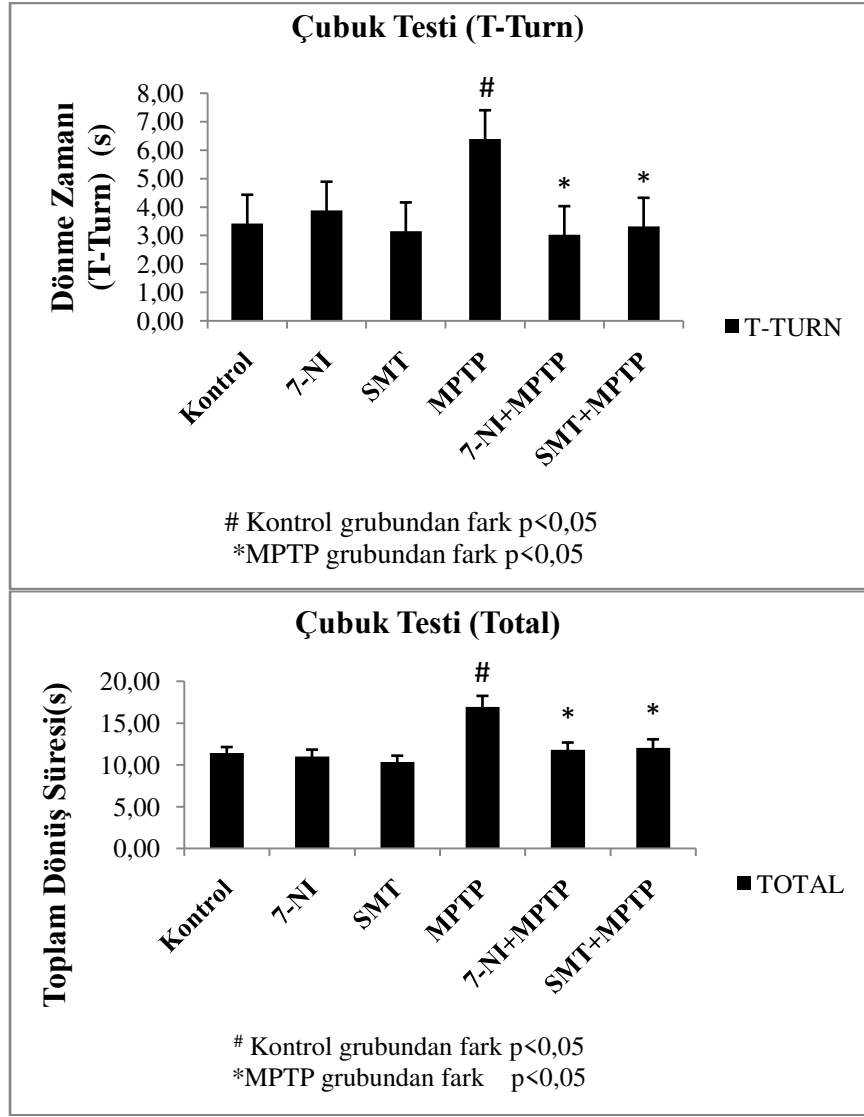
Motor aktivite tayini için çubuk testi kullanılmıştır. PH'nın spesifik bir semptomu olan bradikinezi değerlendirildiğinde dönüş zamanının MPTP grubunda kontrole göre uzadığı saptanmıştır. MPTP grubuna nNOS (7-NI) ve iNOS (SMT) inhibitörleri verildiğinde dönüş zamanının kısaldığı, kontrol düzeyine düştüğü görülmüştür. Total iniş süreleri incelendiğinde MPTP verilmesinin kontrole göre iniş süresini arttırdığı, 7NI+MPTP ve SMT+MPTP verildiğinde ise bu sürenin kısaldığı kontrol değerine ulaştığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1.). Sonuç olarak deneysel Parkinson'da bozulan motor aktivite bulgularının yanında, NOS inhibitörlerinin kullanılmasının motor aktiviteyi düzeltici etkisi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Çubuk testi sonuçları

Gruplar	T-Turn (s)	Total İniş Süresi (s)
KONTROL	3,43 ± 0,44	11,44 ± 0,69
7-NI	3,88 ± 0,58	11,00 ± 0,83
SMT	3,16 ± 0,43	10,34 ± 0,76
MPTP	6,40 ± 0,87 3 #	16,95 ± 1,31 #
7-NI+MPTP	3,03 ± 0,18*	11,79 ± 0,88*
SMT+MPTP	3,32 ± 0,46*	12,03 ± 1,03*

Kontrol grubundan fark p<0.05

* MPTP grubundan fark p<0.05



Şekil 4.1. Çubuk testi sonuçları

4.4. VEP Sonuçları

VEP'ler sağ ve sol gözler flaş uyararı ile ayrı ayrı uyarılarak monooküler olarak kaydedilmiştir. VEP parametrelerinin sağ, sol göz ve grup farklılıkları varyans analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. VEP'lerin latens ve genlikleri karşılaştırıldığında aynı grup için sağ ve sol gözdeki VEP'ler arasında fark gözlenmemiş, ancak gruplar arasında farklar olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, daha sonraki istatistiksel analizler sağ ve sol gözden kaydedilen VEP parametrelerinin ortalaması alınarak yapılmış ve değerlendirilmiştir. VEP'lerin latens ve genliklerin ortalama değerleri standart sapmaları ve Tukey testi sonuçları tabloda görülmektedir. Bu sonuçlara göre spesifik iNOS ve nNOS inhibitörü verilen grupların P1, N1, P2, N2, P3, N3, P4, N4, P5 komponentlerinin tepe latenslerinin kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. MPTP grubunda P1, N1, P2, N2, P3, N3 ve P5 bileşenlerinin tepe latenslerinin kontrole göre uzadığı tespit edilmiştir. 7-NI+MPTP grubunda ise P1, N1, N2, P3, N3 ve P5 bileşenlerinin tepe latenslerinin kontrole göre anlamlı ölçüde uzadığı tespit edilmiştir. 7-NI+MPTP grubu MPTP ile karşılaştırıldığında P1 latensinin kısaldığı tespit edilmiştir. SMT+MPTP grubunda ise tüm VEP komponentlerinin (P1, N1, P2, N2, P3, N3, P4, N4, P5) tepe

latenslerinin kontrole göre anlamlı olarak uzadığı saptanmıştır. Ancak MPTP grubuyla karşılaştırıldığında P1 latensinin kısaldığı buna karşın P5 latensinin ise uzadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.3.). Tepeden tepeye genlik değerleri incelendiğinde P1N1, N2P3 genliklerinin kontrole göre SMT grubunda yükseldiği 7-NI+MPTP grubunda ise P2N2, P4N4, N4P5 genliklerinin MPTP grubuna yükseldiği tespit edilmiştir. SMT+MPTP grubunda ise P2N2, N3P4, N4P5 komponentlerinin genlikleri MPTP grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yükseldiği gözlenmiştir. Diğer grupların genliklerinde herhangi bir değişiklik bulunmamıştır (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Deney gruplarından kaydedilen VEP genlikleri (μV)

Gruplar	P1N1(μV)	N1P2 (μV)	P2N2 (μV)	N2P3 (μV)	P3N3 (μV)	N3P4 (μV)	P4N4 (μV)	N4P5 (μV)
KONTROL	$8,80 \pm 2,88$	$5,71 \pm 1,34$	$9,34 \pm 2,06$	$5,90 \pm 1,65$	$8,41 \pm 3,18$	$18,14 \pm 4,72$	$3,79 \pm 1,03$	$11,38 \pm 2,70$
7-NI	$15,21 \pm 3,49$	$6,13 \pm 1,26$	$8,45 \pm 2,07$	$12,17 \pm 3,10$	$4,70 \pm 1,70$	$8,93 \pm 2,06$	$5,79 \pm 1,10$	$13,65 \pm 2,15$
SMT	$19,26 \pm 3,96^{\#}$	$5,31 \pm 1,41$	$10,74 \pm 3,03$	$15,23 \pm 3,79^{\#}$	$6,69 \pm 1,47$	$11,57 \pm 3,66$	$5,44 \pm 1,73$	$18,64 \pm 4,59$
MPTP	$7,97 \pm 1,90$	$5,12 \pm 1,39$	$7,69 \pm 1,68$	$3,82 \pm 0,68$	$3,65 \pm 0,88$	$14,34 \pm 3,08$	$2,85 \pm 0,50$	$8,92 \pm 1,84$
7-NI+MPTP	$13,99 \pm 3,54$	$3,63 \pm 0,89$	$15,79 \pm 3,30^*$	$6,29 \pm 1,80$	$5,65 \pm 1,36$	$9,57 \pm 2,97$	$6,15 \pm 1,58^*$	$17,97 \pm 4,24^*$
SMT+MPTP	$13,17 \pm 2,82$	$4,41 \pm 1,12$	$14,20 \pm 2,85^*$	$10,22 \pm 2,73$	$6,77 \pm 1,86$	$17,33 \pm 4,04$	$2,64 \pm 0,66^*$	$14,30 \pm 2,18^*$

$\#$ KONTROL grubundan fark $p < 0,05$

$*$ MPTP grubundan fark $p < 0,05$

Tablo 4.3. Deney gruplarından kaydedilen VEP latensleri (ms)

Gruplar	P1 (ms)	N1(ms)	P2(ms)	N2(ms)	P3(ms)	N3(ms)	P4(ms)	N4(ms)	P5(ms)
K	22,71± 0,73	30,58 ± 1,27	34,67 ± 1,41	43,21 ± 1,29	50,04 ± 1,92	58,79 ± 2,27	82,21 ± 4,50	90,92 ± 4,23	111,58 ± 2,95
7NI	30,21 ± 1,34 [#]	45,00 ± 2,47 [#]	53,42 ± 2,78 [#]	62,92 ± 2,72 [#]	78,08 ± 3,80 [#]	87,38 ± 4,38 [#]	103,88± 3,40 [#]	120,04± 3,95 [#]	157,08 ±5,53 [#]
SMT	28,50 ± 1,27 [#]	42,42 ± 1,89 [#]	48,21 ± 1,95 [#]	57,92 ± 2,31 [#]	72,88 ± 4,00 [#]	80,87 ± 4,07 [#]	97,33 ± 4,08 [#]	110,04± 3,94 [#]	146,71 ±3,93 [#]
MPTP	33,96 ± 1,24 [#]	40,38 ± 1,32 [#]	45,88 ± 1,57 [#]	54,67 ± 1,86 [#]	60,58 ± 2,20 [#]	67,67 ± 2,03 [#]	88,96 ± 2,65 [#]	95,54 ± 2,90 [#]	130,50± 2,12 [#]
7NI+MPTP	26,08 ± 1,00 [#]	35,33 ± 1,73 [#]	40,25 ± 1,94 [#]	52,38 ± 2,04 [#]	56,92 ± 4,23 [#]	65,58 ± 5,05 [#]	77,08 ± 6,03 [*]	84,38 ± 8,39 [*]	124,67±6,30 ^{#*}
SMT+MPTP	27,21 ± 0,93 ^{#*}	37,71 ± 1,78 [#]	43,54 ± 2,19 [#]	54,33 ± 2,76 [#]	64,58 ± 3,76 [#]	73,67 ± 3,87 [#]	90,88 ±6,59 [#]	101,63± 7,49 [#]	146,25±5,75 ^{#*}

KONTROL grubundan fark p<0,05

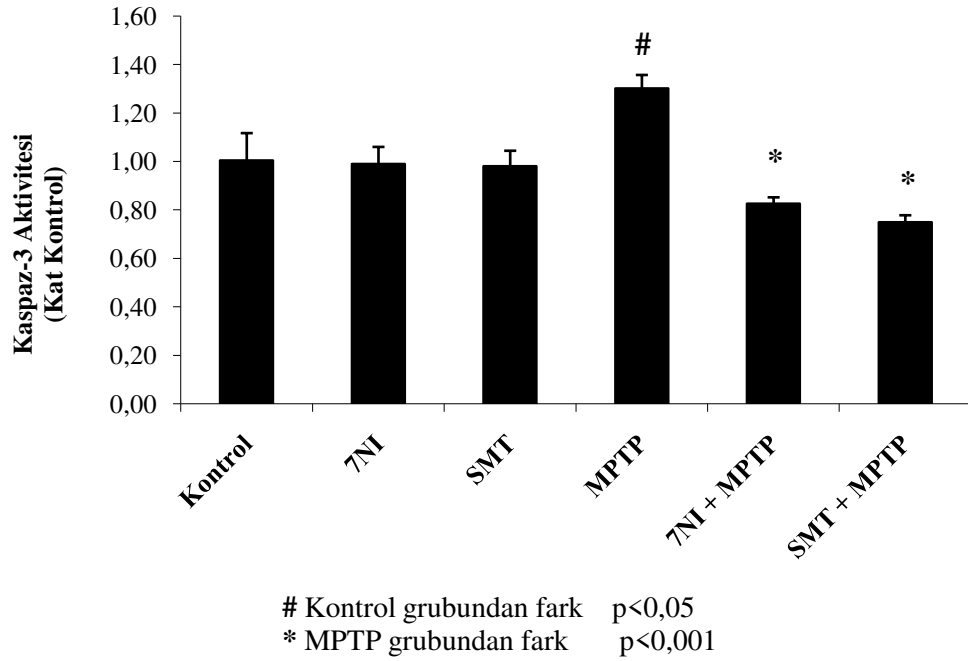
* MPTP grubundan fark p<0,05

4.5. Biyokimyasal Parametreler

Deney gruplarına ait hayvanların SN ve retina dokularında kaspaz-3, nitrit/nitrat, 4-HNE enzim aktivite değişikliklerine ilişkin grafikler sırasıyla aşağıda verilmiştir.

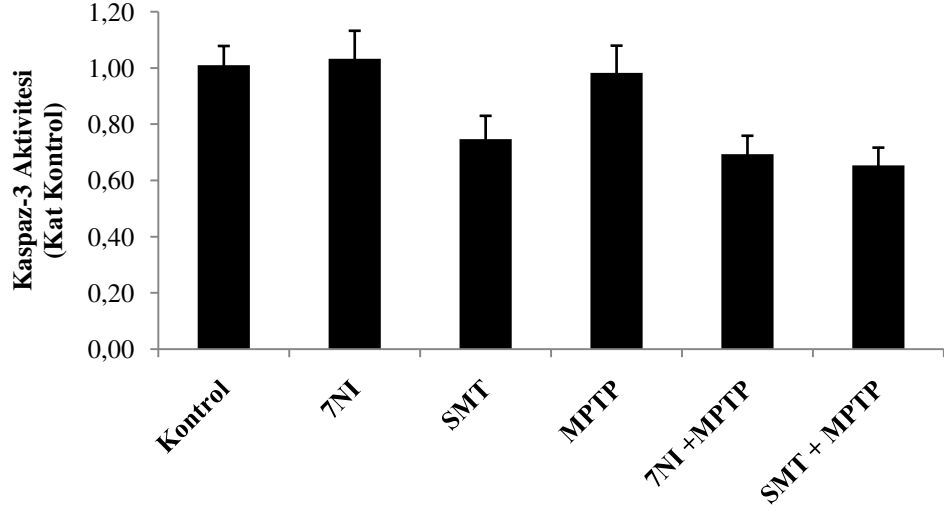
4.5.1. SN ve Retina Kaspaz-3 Aktivite Sonuçları

SN'de kaspaz-3 aktivitesi şekilde gösterilmiştir. MPTP grubundaki kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre arttığı, 7-NI ve SMT grupları kontrol grubuyla kıyaslandığında herhangi bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte inhibitörlerin MPTP ile verildiği gruplarda kaspaz-3 aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. SN kaspaz-3 aktivite değerleri

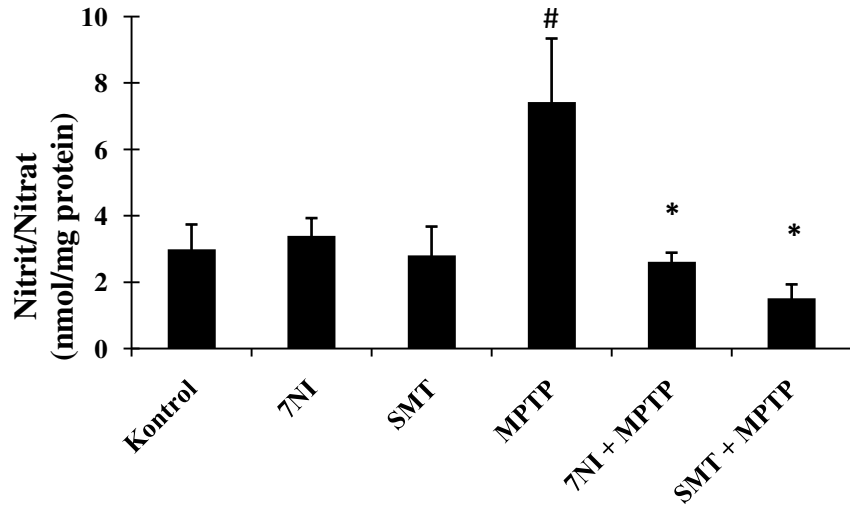
Retinada ise kaspaz-3 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Retina Kaspaz-3 aktivite değerleri

4.5.2. SN ve Retina nitrit/nitrat Sonuçları

SN Nitrit-Nitrat değerleri Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.

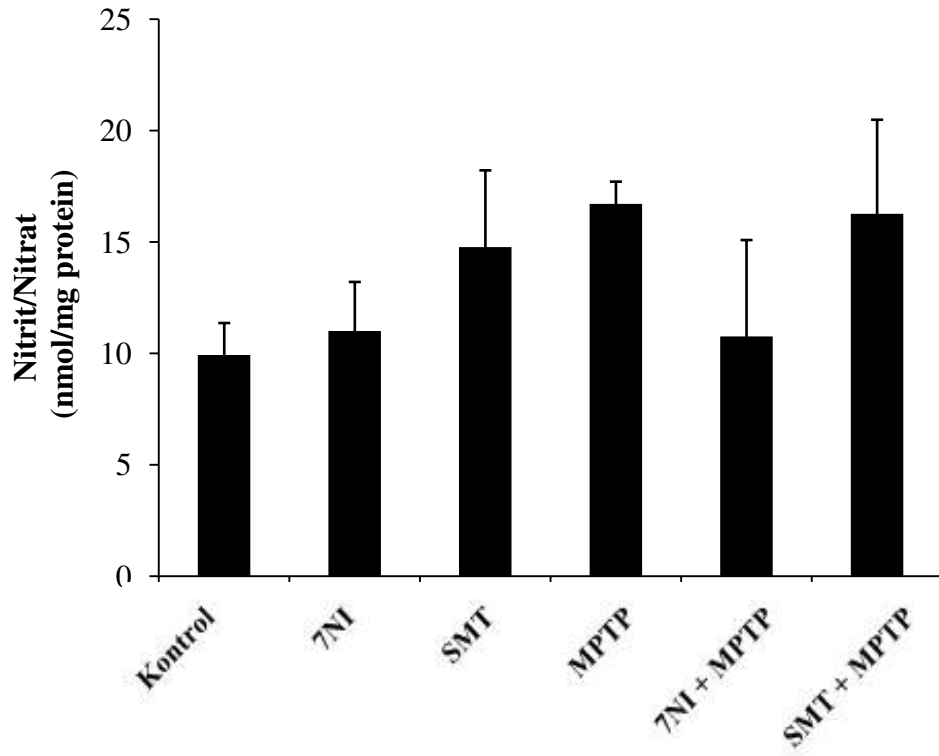


Kontrol grubundan fark $p < 0.05$

* MPTP grubundan fark $p < 0.05$

Şekil 4.4. SN nitrit/nitrat değerleri

Nitrit/nitrat düzeylerinin MPTP verildiğinde kontrole göre arttığı saptanmıştır. 7-NI ve SMT enzimleri verildiğinde, kontrole göre bir fark bulunamamıştır. MPTP grubuna 7-NI ve SMT verildiğinde nitrit/nitrat düzeylerinin MPTP grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgu MPTP'nin arttırdığı nitrit/nitrat düzeylerini kontrol düzeyine düşürdüğü saptanmıştır (Şekil 4.4.).

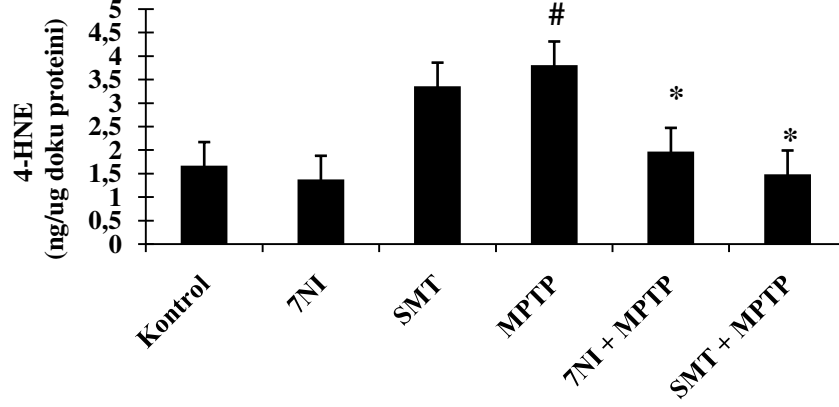


Şekil 4.5. Retina nitrit/nitrat değerleri

MPTP, 7-NI ve SMT verilmesinin gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.5.).

4.5.3. Substansiya Nigra ve Retina 4-HNE Sonuçları

Lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan 4-HNE miktarı SN'de MPTP grubunda anlamlı olarak artmıştır. Spesifik NOS inhibitörleri ve MPTP verilen gruplarda 4-HNE miktarının düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.6.).

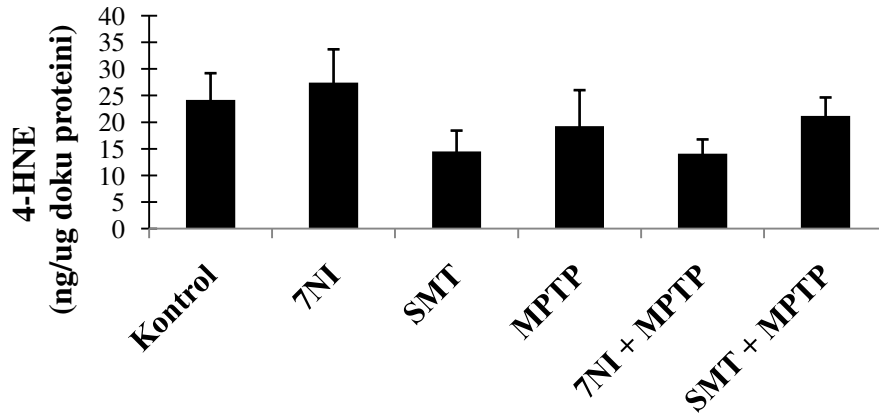


#Kontrol grubundan fark $p < 0,05$

*MPTP grubundan fark $p < 0,05$

Şekil 4.6. SN 4-HNE değerleri

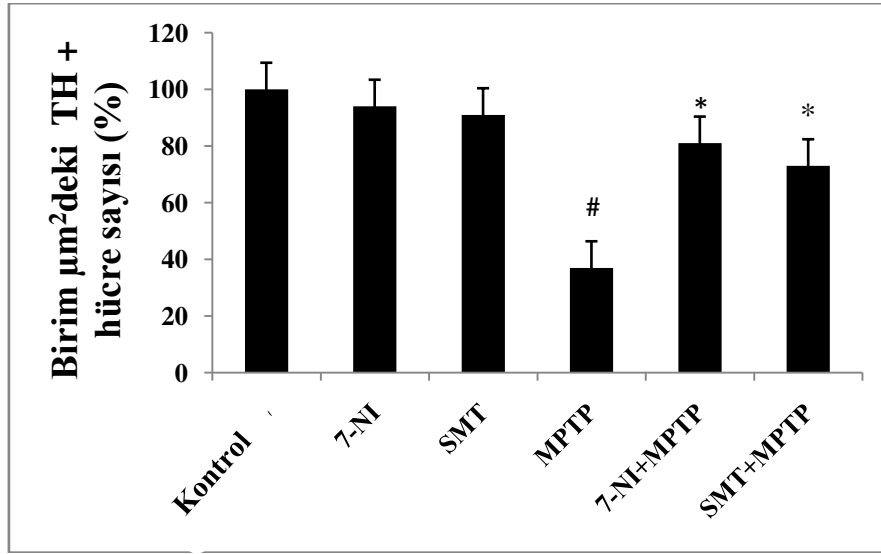
Retinada ise MPTP ve spesifik NOS inhibitörlerinin verilmesinin 4-HNE miktarında herhangi bir değişiklik oluşturmadığı saptanmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Retina 4-HNE değerleri

4.6. TH içeren nöron sayısı

TH, immünohistokimyasal yöntem ile fare beyinde SN'de kolaylıkla ayırt edilmiştir. TH varlığının tüm gruplarda dopaminerjik nöronların gövdelerinde immünopozitif olduğu gözlenmiştir. Glia hücreleri ve endotelde TH için herhangi bir immünreaksiyon görülmemiştir (Şekil 4.9). MPTP ile oluşturulan deneysel Parkinson grubunda nöron sayısının %63 azaldığı saptanmıştır. MPTP ile birlikte iNOS verilen grupta ise azalma sadece %22'dir. MPTP ile karşılaştırıldığında nöron sayısını 2 katından daha fazla olduğu ve kontrole yaklaştığı saptanmıştır. iNOS inhibitörü verilen deneysel Parkinson grubunda ise nöron sayısının MPTP verilen gruba göre iki kat olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8.).



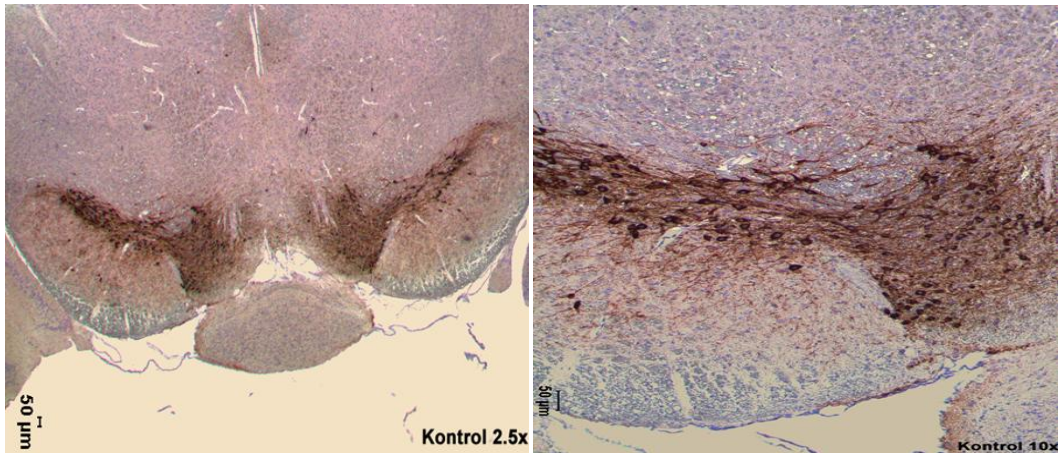
Kontrol grubundan fark $p < 0.05$

* MPTP grubundan fark $p < 0.05$

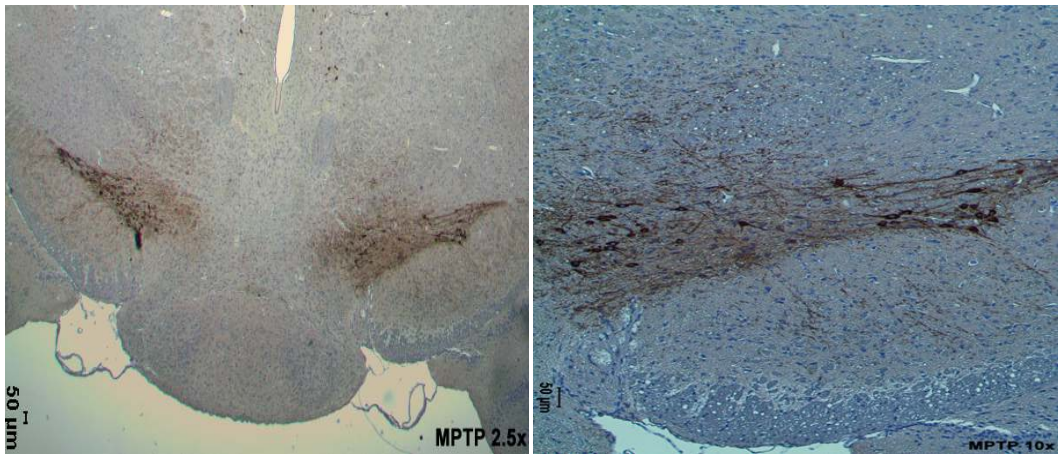
Şekil 4.8. Birim alandaki TH+ hücre sayısı (%)

4.6.Tirozin Hidroksilaz İmmunoreaktivitesi (SN)

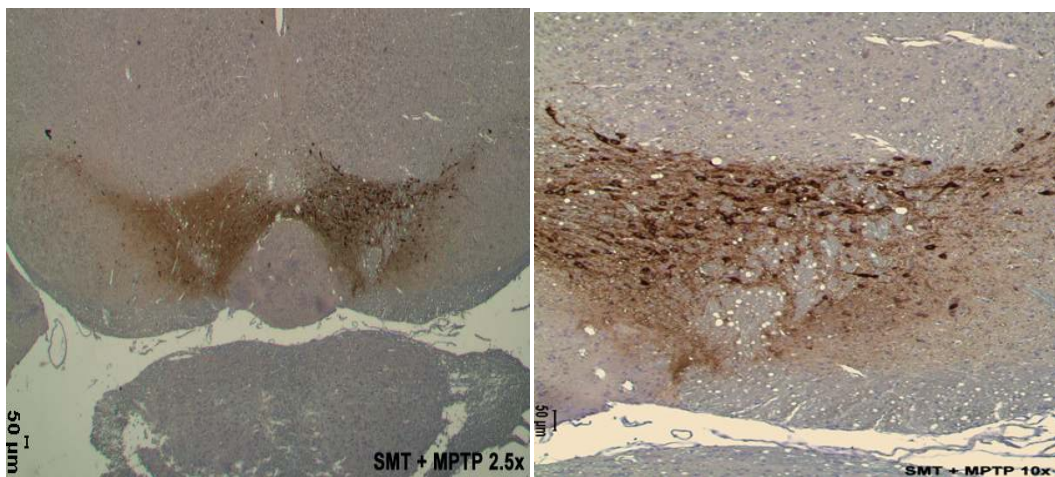
TH KONTROL



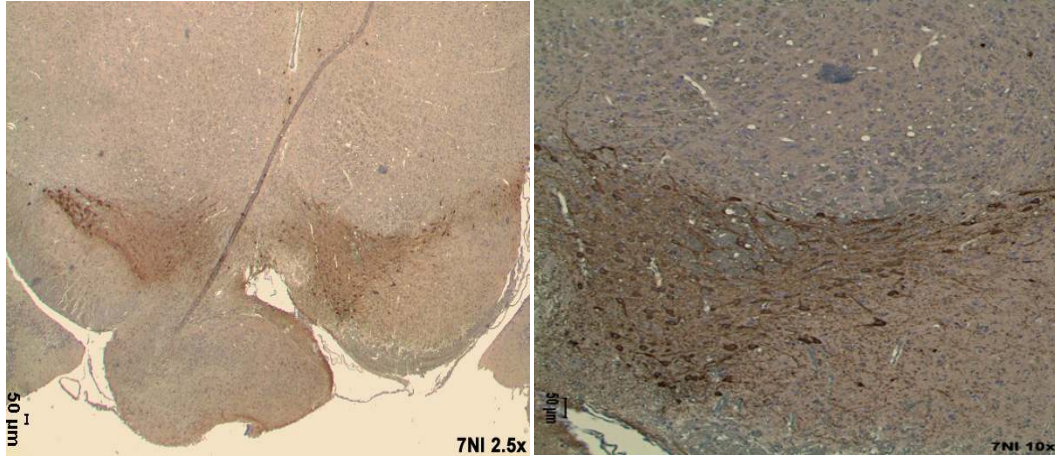
TH MPTP



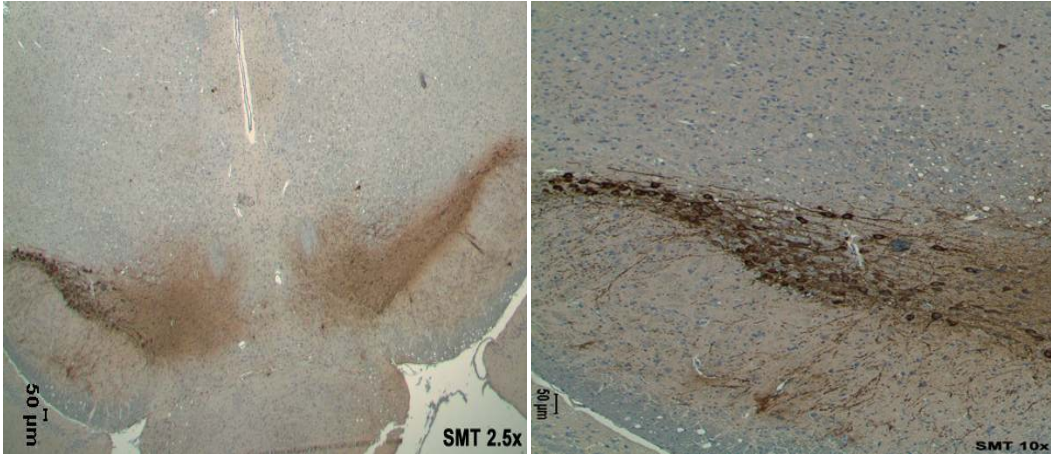
TH 7-NI



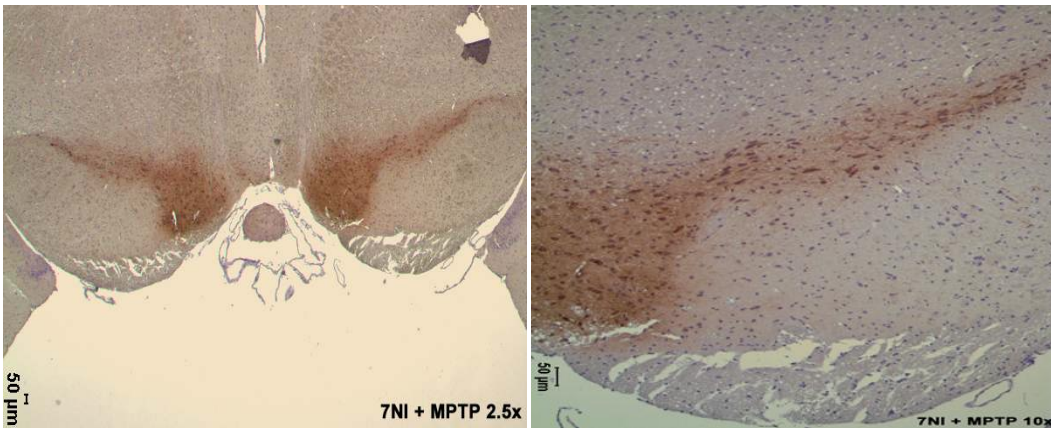
TH SMT



TH 7NI+MPTP



TH SMT+MPTP

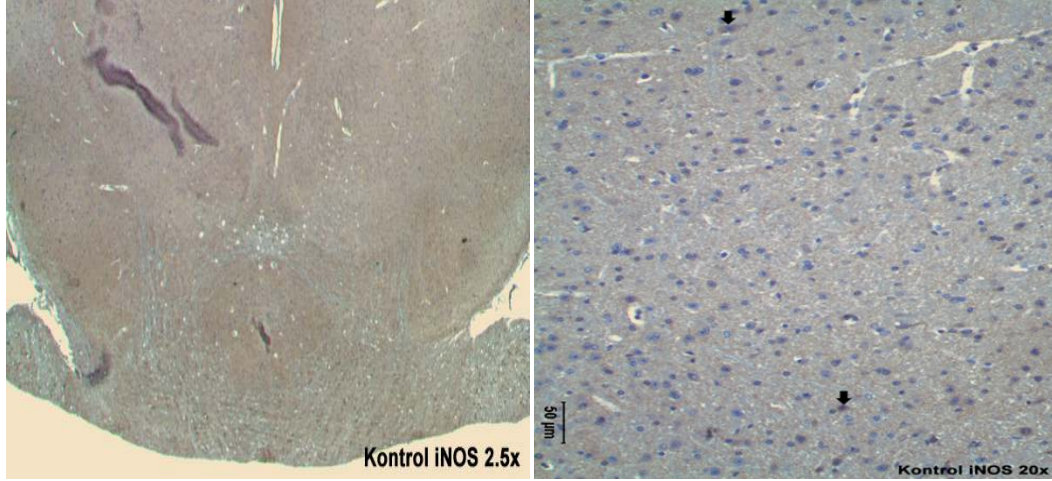


Şekil 4.9. Deney gruplarında TH için gözlenen immünreaktivite

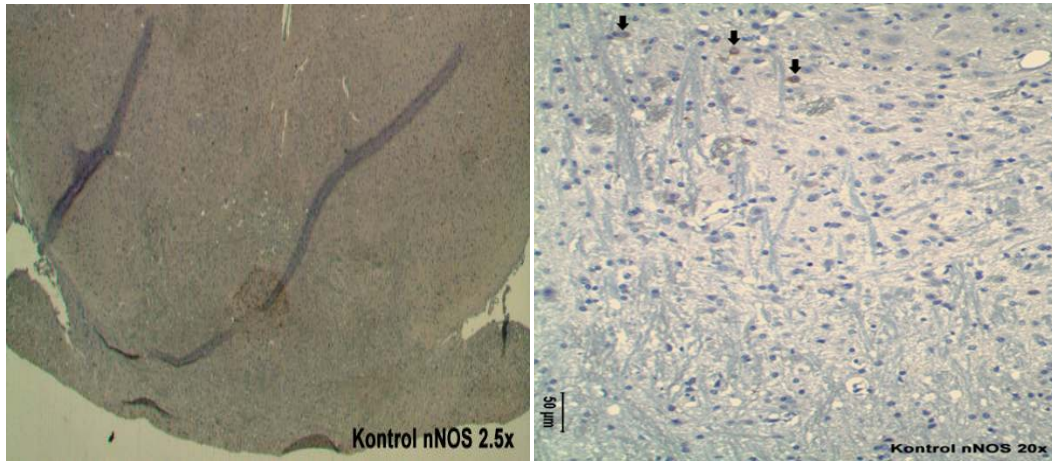
4.7.NOS immunoreaktiviteleri

iNOS ve nNOS enzim immunoreaktivitesi tüm gruplarda nöron gövdeleri, uzantıları ve endotelde izlenmiştir. iNOS ve nNOS enzim aktiviteyi değerlendirildiğinde, Parkinson grubunda iNOS ve nNOS enzim aktiviteyi diğer tüm gruplara kıyasla daha kuvvetli olduğu gözlenmiştir. Parkinson oluşturulup iNOS ve nNOS enzim inhibitörleri verilen gruplarda iNOS ve nNOS enzim aktiviteyi belirgin bir biçimde düşük ve zayıf şiddette izlenmiştir (Şekil 4.10).

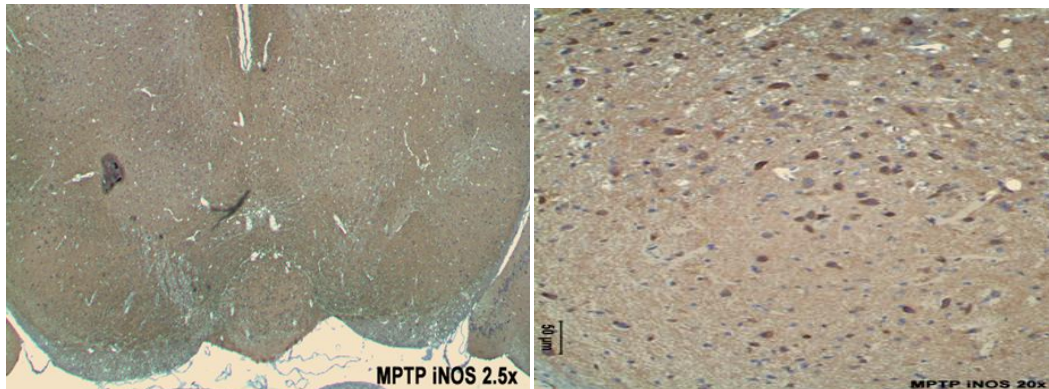
iNOS KONTROL



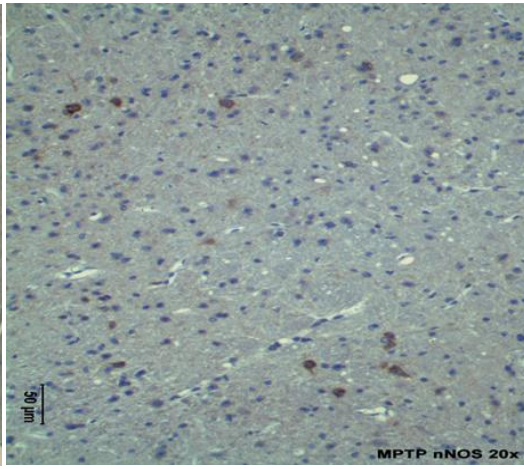
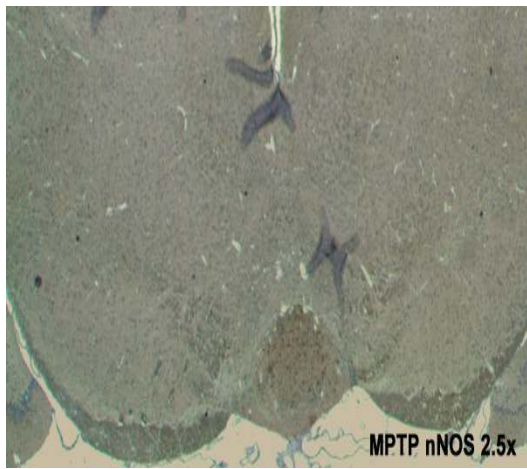
nNOS KONTROL



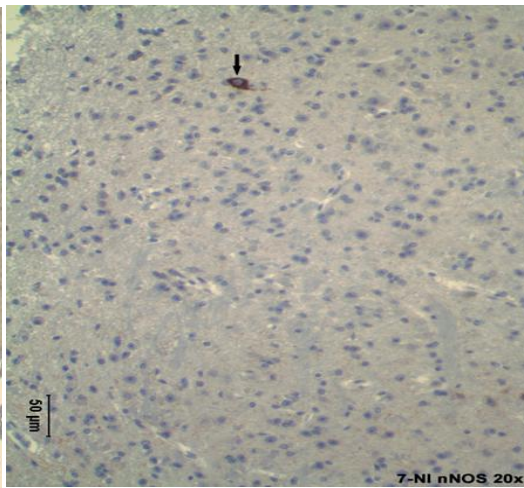
iNOS MPTP



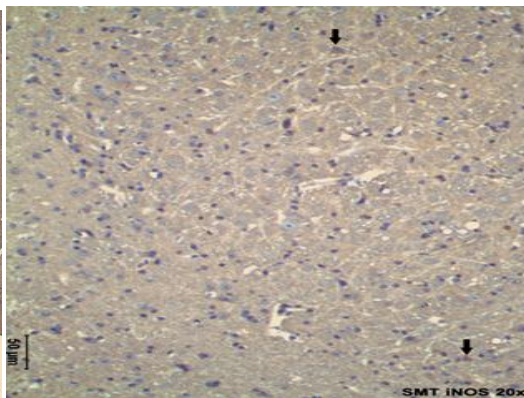
nNOS MPTP



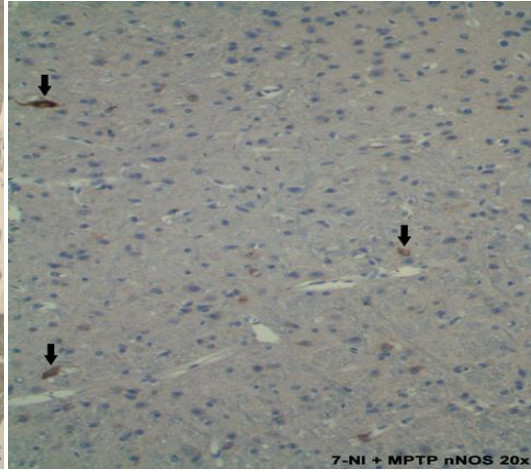
nNOS 7-NI



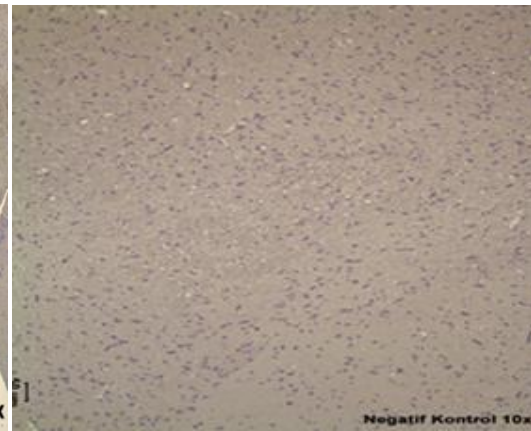
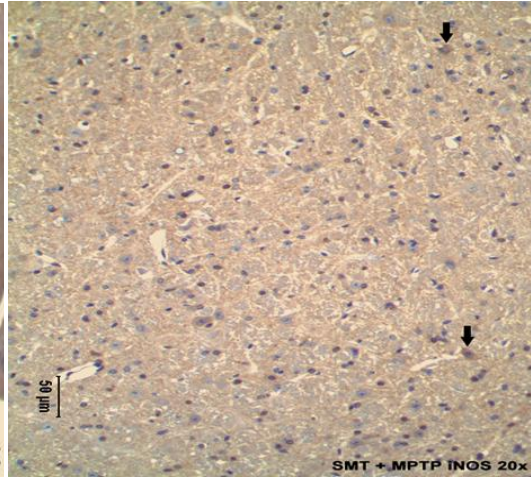
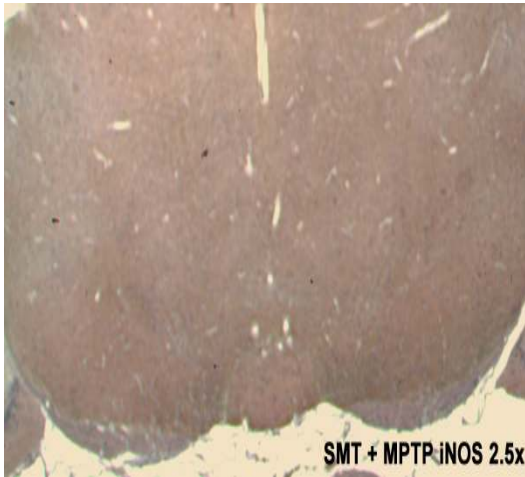
iNOS SMT



nNOS 7-NI+MPTP



iNOS SMT+MPTP



Şekil 4.10. Deney gruplarında NOS için gözlenen immünreaktivite

TARTIŞMA

PH'da görsel sistem etkilenmektedir ve görsel sistemin etkilendiğini gösteren güvenilir bir parametre olan VEP latenslerinin uzadığı bulunmuştur (204). Çalışmamızda spesifik iNOS ve nNOS inhibitörleri kullanılarak düzelme sağlandığı görülmüştür. Bu bulgular biyokimyasal parametrelerle desteklenmiştir.

İnsanlarda Parkinson hastalığı oluşturmak mümkün olmadığı için tedaviye dönük mekanizmaları aydınlatmak için deney hayvanlarında Parkinson modelleri oluşturulmuştur. 6-OHDA, MPTP, paraquat, rotenon ve manneb gibi kimyasallar bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nörotoksinler, mitokondride kompleks-I veya III'ü inhibe ederek mitokondrilerin bozulmalarını sağlarlar. 6-OHDA, DA'nın hidroksillenmiş analogudur. Dopaminerjik nöronların neredeyse tamamını tahrip ederek yok etmektedir. İlaveten serotonerjik ve adrenerjik nöronları da tahrip etmektedir. 6-OHDA kan beyin bariyerini geçemediği için SNc'ye Medial Forebrain Bundle (MFB)'a stereotaksik yöntemle unilateral veya bilateral verilmektedir (205).

Primatlara uygulanan ve MPTP ile oluşturulan Parkinson modeli nörokimyasal ve nöropatolojik değişiklikleri incelemek için en yaygın kullanılan, insana en yakın ve Parkinson'un ilk evresini gösteren hayvan modelidir (206). Araştırmacılar fare ve sıçan üzerinde de MPTP aracılı Parkinson modeli deneyleri yapmaktadırlar (207). MPTP seçici olarak dopaminerjik nöronlar üzerinde toksik etki göstermektedir. MPTP, sıçanlarda stereotaksik yöntemle uygulanabilmektedir. Bunun yanında fare SN dopaminerjik nöronlarında da ölüm olduğu görülmüştür (205). Uygulanan MPTP dozu lezyon oluşturmada önemlidir, ancak sıçanlara uygulanan MPTP'nin dopaminerjik nöron hasarında başarısız olduğu bilinmektedir (205). MPTP farelere gavaj, subkutan, intravenöz ,intraperitoneal veya intramusküler olarak verilebilir (207). Dopaminerjik hasar, doza ve uygulama protokolüne bağlıdır. Farelerden C57BL/6 fare ırkının sistemik MPTP uygulamasına diğer ırklardan daha duyarlı olduğu, dopaminerjik nöronların seçici hasar gördüğü daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (208). Buna bağlı olarak deneyimizde MPTP'nin intraperitoneal olarak 4x20 mg/kg dozunda 12 saat aralıklı olarak 2 günde verilmesi tercih edilmiştir (209). Bunun nedeni hayvanlarda ölüm riskini azaltmaktır. Yapılan denemelerde diğer dozlar verildiğinde ölüm oranı artmıştır.

Deney hayvanlarında özellikle dopaminerjik ve adrenerjik nöronlarda oluşan harabiyet motor performans testleri ile incelenmektedir. Çalışmamızda Parkinson modeli oluşturulduktan sonra motor aktiviteyi belirlemek için çubuk testi kullanılmıştır. Çubuk testi ile Parkinson semptomlarından bradikinezi şiddeti değerlendirilmiştir. Harekete geçme zamanındaki gecikme bradikinezi şiddetini göstermektedir (199). Parkinsonda hem harekete geçişte hem de geri dönüş süresinde uzama olmuştur. Bu bulgu yapmış olduğumuz Parkinson modelinin başarılı bir şekilde oluştuğunu, MPTP ile iNOS ve nNOS inhibitörleri verildiğinde

ise oluşan bradikinezinin, kontrol seviyesine döndüğünü göstermiştir. Bu bulgu iNOS ve nNOS'un Parkinson'da motor hareket bozukluğunda rolünün olduğunu vurgulamaktadır.

Ayrıca modelin başarısını immunohistokimya ile desteklemek amacıyla TH immunoreaktif hücrelerin sayısını gösteren immunohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır. SN'de TH hücrelerinin MPTP grubunda azaldığı, bu azalmanın %63 olduğu gösterilmiştir. Bu oran modelin başarıya ulaştığını göstermektedir. iNOS ve nNOS inhibitörlerinin ise koruyucu etki yaptığı görülmektedir. Bu bulgumuz biyokimyasal parametrelerle desteklenmektedir.

Parkinson mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bu güne kadar yapılan çalışmalarda birçok hastalığın mekanizmasında olduğu gibi Parkinson'da da lipid peroksidasyonunun rolü olduğu saptanmıştır (210). Lipid peroksidasyonuna yol açan birçok ajan içerisinde, oldukça reaktif ve kararsız bir gaz olan NO da yer almaktadır (211). NO'nun serbest radikal oluşturmada ve nörodejenerasyonda rolü olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (211). NO'nun santral sinir sistemine (hippokampus, striatum) ilaveten görsel sistemde de bulunduğu bilinmektedir (193). Parkinson'da nNOS ve iNOS aktivitelerinin ve ekspresyonlarının arttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (212). Bu bulgulara dayanarak Parkinson'da oluşan görsel sistem değişikliklerinde NO'nun rolü olup olmadığı çalışmamızda araştırılmıştır. Bunun için nNOS ve iNOS inhibitörleri kullanılmıştır. Uygulanan dozlar ve inhibitörlerin veriliş şekilleri literatürdeki diğer çalışmalar göz önüne alınarak seçilmiştir (54, 213).

NO, oksijen aracılığıyla kolaylıkla nitrit ve nitrata yükseltgenen yarı ömrü çok kısa olan moleküldür. Bu nedenle biyolojik dokularda doğrudan ölçülmesi zordur. Son yıllarda anında ölçüm yapan sensörler geliştirilmesine rağmen hala NO yıkım ürünü olan nitrit/nitrat ölçmeye dayanan yöntemler, yayınlarda görülmektedir (214). Bu nedenle çalışmamızda NO indeksi olarak nitrit/nitrat kullanılmıştır. Kontrol grubu ile MPTP grubu karşılaştırıldığında SN'da nitrit/nitrat seviyesinin MPTP grubunda anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Bu bulgumuz MPTP'nin nNOS ve iNOS'u indüklediğini göstermektedir ve MPTP ve 6-OHDA kullanılan modellerde nitrit/nitrat düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalarla uyum içindedir (215). Ayrıca yalnızca nNOS ve iNOS inhibitörü verilen gruplarda bazal seviye değişmezken, MPTP ile birlikte uygulanan iNOS ve nNOS'un nitrit/nitrat düzeylerini azalttığı görülmektedir. Bu da daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir (212). Bu verimiz nöronların apoptozunda nNOS ve iNOS'un önemli olduğunu göstergesidir. Retinada ise nitrit/nitrat düzeylerinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Dolayısıyla sonucumuz, retinada MPTP verilmesiyle nörotransmitter olan NO ve üretiminde rolü olan iNOS ve nNOS'un SN'deki kadar fazla ekspresyonunun artmadığını işaret etmekte veya nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların retinada SN kadar yoğun bulunmadığını göstermektedir. Bu bulgu MPTP retinada MPP⁺ haline çevrilememektedir şeklinde de yorumlanabilir. Çünkü

MPTP'nin etkili şekli serbest radikal olan MPP^+ şeklidir. MPP^+ 'ye dönüşüm ise glialardaki MAO-B ile gerçekleşir (216). Bu mekanizma retinada yeterli olmayabilir veya diğer mekanizmalar daha etkin olabilir.

Bu çalışmamızda VEP değişikliklerinin oksidatif hasar ile ilişkisini değerlendirmek için 4-HNE ölçümü yapılarak lipid peroksidasyon düzeyleri belirlenmiştir. Lipid hidro peroksitlerin ayrılma reaksiyonları ile bozulmaları alkenler, 2-alkenler, 2,4-alkenler ve 4-hidroksialkenler gibi aldehitlerin oluşmasına yol açar. Omega-6 yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan hekzonal ve 4-HNE en başta gelen aldehitlerdir. 4-HNE sitotoksik, mutajenik ve genotoksik özelliklere sahiptir (217). Oksijen radikalleri lipid peroksidasyonun ikincil toksik mesajcısıdır. Lipid peroksidasyonunun belirli patolojilerin oluşmasında rolleri olduğu bilinmektedir. Parkinson'da lipid peroksidasyonunun arttığı ve SN'de 4-HNE seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir (218). 4-HNE artışının kaspaz 3-8-9 aktivasyonunu arttırarak apoptoza neden olduğu bilinmektedir (219). Bu bilgilere ilaveten 4-HNE'nin α -sinüklein aggregasyonuna (220) ve DNA fragmentasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (221). Çalışmamız, MPTP verilmesi durumunda, 4-HNE miktarının arttığını ortaya koymuştur. MPTP'nin etkisinin de nNOS ve iNOS aracılığı olduğu literatürde gösterilmektedir (212). nNOS ve iNOS'un, ürettiği NO ve serbest radikallerin bu artışa aracılık ettiği gösterilmiştir (212). Bu düşünceye paralel olarak çalışmamızda iNOS ve nNOS inhibitörü kullanılan gruplarda 4-HNE miktarının SN'de anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Fakat bu azalmanın retinada önemlilik derecesine ulaşmadığı tespit edilmiştir. Bu da lipid peroksidasyonunda iNOS ve nNOS 'un rolünün olduğu, fakat COX-2 yolağının ve diğer yolların da rollerinin olabileceğini göstermektedir. Önceki çalışmamızda MPTP verilmesinin COX-2 aktivitesinin artmasına ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (222). Retinada ise 4-HNE düzeylerinde gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Bu durum retinanın, MPTP'den SN kadar fazla etkilenmediğinin göstergesidir. Literatürde MPTP'nin gözde 4-HNE ve nitrit/nitrat düzeyini etkilediğini gösteren bir çalışmaya raslanmamıştır.

Apoptozun göstergesi olan kaspaz-3 aktivitesi, SN ve retinada incelendiğinde MPTP ile deneysel Parkinson oluşturulan grupta kaspaz-3 aktivitesinin retinada herhangi bir değişiklik göstermediği, bununla birlikte SN'de MPTP verilen gruplarda kaspaz-3 aktivitesinin arttığı, nNOS ve iNOS inhibitörü verilen gruplarda ise MPTP'ye göre azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamız Brzozowski ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış oldukları çalışma ile uygunluk göstermektedir (223). iNOS ve nNOS'un apoptozda rolü olduğu, iNOS inhibe edildiğinde kaspaz-3 aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (224). Bu bulgular çalışmamızı destekler niteliktedir. iNOS ve nNOS inhibisyonunun koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (223).

İmmunohistokimya sonuçları ve biyokimyasal parametrelerimiz deneysel PH varlığında iNOS ve nNOS inhibisyonunun düzeltici etkisini desteklemektedir. SN'de

TH ile boyanan dopaminerjik nöronlar incelendiğinde, MPTP uygulaması ile TH boyanan nöron sayısının azaldığı bulunmuştur. Bu sonuç literatürdeki bilgilerle uyum içerisindedir (225). iNOS enziminin spesifik inhibitörü olan SMT ve nNOS enziminin spesifik inhibitörü 7-NI'nın MPTP ile verilmesi sonucunda azalan nöron sayısında artış olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu iNOS ve nNOS'un apoptozda ve nörodejenerasyonda önemli rollerinin olduğunu göstermektedir. Fakat nNOS ve iNOS inhibitörlerinin hiçbir zaman nöron sayısını kontrol seviyesine çıkarmadığı görülmektedir. Bu da apoptozda diğer mekanizmaların da rolü olduğunu işaret etmektedir. MPTP'nin MPP⁺'ye dönüşerek apoptozu oluşturduğu bilinmektedir. MPTP, MPP⁺'ye dönüşürken mitokondri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT)'yi bozar, NO yapımını artırır. Redoks dengesini bozarak dopaminerjik nöron ölümüne neden olur. Aşırı NO yapımı mitokondri membran potansiyeli kaybına ve sitokrom-c salınmasına, APAF-1 ile birleşmesine neden olur. Bu da kaspaz-3 aktivitesini artırır (226).

nNOS, iNOS ve eNOS normal koşullarda da exprese edilirler. MPTP, MPP⁺ ye dönüştüğünde hücre içi Ca⁺²'nin arttığı, bunun da nNOS aktivitesini arttırdığı, NO üretiminin arttığı, ayrıca mikrogliya ve astrositlerden salgılanan faktörlerle iNOS ekspresyonunun arttığı, MPP⁺ oluşturduğu ve apoptozda rollerinin olduğu bilinmektedir. Bulgularımızda iNOS ve nNOS inhibisyonun apoptozu önlediği fakat kontrol seviyesine getiremediği görülmektedir. Hücre içinde Ca⁺² birikiminin mitokondriyal fonksiyonları bozduğu, fosfolipaz, proteaz ve endonükleazı aktive ettiği, ayrıca COX-2 yolağında apoptozun rolü olduğu bilinmektedir (227). Dolayısıyla iNOS ve nNOS inhibitörleri apoptozu bir miktar önlemiş, kaspaz-3 aktivitesini azaltmış, 4-HNE miktarını düşürmüştür, fakat bu düşüşlerde sadece iNOS ve nNOS rolünün olmadığı diğer yolların da etken olduğu düşünülmektedir. Retinada apoptozu gösteren herhangi bir değişiklik olmadığı için kaspaz-3 aktivitesi, 4-HNE, nitrit/nitrat değerlerinde immunohistokimyasal olarak değerlendirme yapılmamıştır. Daha önceki yayıнымızda Parkinson'da immunohistokimyasal olarak bir değişiklik bulunmamıştır (222).

Parkinson hastalarında görsel sistemde bozuklukların olduğu gösterilmiştir (228). PH'nın şiddeti ve süresi ile ilişkili olarak, görsel uyarılma potansiyellerinde P100 latensinin uzadığı genliklerinde değişiklik olduğu tespit edilmiştir (229). ERG amplitüdlerinin azaldığı eşik değerlerin yükseldiği bulunmuştur (230). Özellikle P100 latensinin uzadığı, bu latensin hayvanların P3 latensleri ile aynı olduğu görülmüştür.

NO ve sGC, fotoreseptörlerde ve retinada, Müller, amakrin, bipolar, horizontal ve gangliyon hücrelerinde bol miktarda bulunur. Retinada nNOS ve iNOS bulunmaktadır. NO'nun ışığa bağlı gap junctionların regülasyonunda rolü vardır (193, 231). NO fototransdüksiyon kaskatını ve nörotransmitter salınımını modüle ederken, DA salınımını inhibe eder.

iNOS ve nNOS inhibitörü verildiğinde kontrole göre tüm VEP komponent latenslerinin uzadığı görülmektedir. MPTP'nin VEP komponent latenslerinde uzamaya neden olduğu saptanmıştır. Bu, literatürdeki bilgilerle uyumludur (222). nNOS inhibitörü verildiğinde P1, P4, N4, P5 latenslerinde düzelme olduğu görülürken, iNOS inhibitörünün sadece P1 latensinde düzelme yaptığı, P5 latensinde ise uzamanın olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda MPTP'nin görsel sistemde nNOS ekspresyonunu arttırdığı, inhibe edildiğinde birçok komponentin düzeldiğini göstermektedir. Görsel sistemde nNOS ve iNOS'un önemli bir nörotransmitter olan NO'yu ürettiği, bunun görsel sistemde nörotransmitter ve nöromodülatör olduğunu gösteren bir bulgudur. Bu bulgular ışığı altında nNOS ve iNOS'un retinadan ziyade santral sinir sisteminde etkili olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak oluşturulan bu çalışmada MPTP ile deneysel Parkinson modeli oluşturulan farelerde görsel sistemin etkilendiği, iNOS ve nNOS inhibitörlerinin dopaminerjik nöronlarda hasara karşı koruyucu etki sağladığı ortaya konmuştur. Bununla birlikte tedavi gruplarında VEP değerlerinin kontrol değerlerine ulaşamaması görsel sistem tutulum mekanizmasında başka yolların da olabileceğini göstermektedir. Bunun için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

1. Parkinsonda bradikinezinin arttığı, iNOS ve nNOS inhibitörlerinin verilmesi ile bradikinezi şiddetinin azaldığı tespit edilmiştir.
2. Parkinson grubunda diğer gruplara göre SN'deki dopaminerjik nöron sayısı azalmıştır. Parkinson oluşturulan farelere iNOS ve nNOS inhibitörü verildiğinde nöron sayısının kontrol grubuna yaklaştığı bulunmuştur.
3. Kaspaz-3 aktivitesi, SN'de MPTP verilen grupta artmış, iNOS, nNOS inhibitörü verildiğinde kaspaz-3 aktivitesinde azalma görülmüştür. Bu da iNOS ve nNOS'un apoptozda rolünün olduğunu göstermektedir. Retina kaspaz-3 aktivitesinde değişiklik gözlenmemiştir.
4. Deneysel Parkinson modeli oluşturulan farelerde SN'da lipid peroksidasyonun arttığı belirlenirken retinanın etkilenmediği saptanmıştır. Benzer şekilde nitrit/nitrat düzeylerinin deneysel Parkinson modeli oluşturulan farelerde arttığı, retinada değişmediği saptanmıştır.
5. Deneysel PH'da VEP latenslerinin uzadığı, verilen iNOS ve nNOS inhibitörlerinin meydana gelen uzamayı düzelttiği görülmüştür. Bu bulgu NO'nun görsel sistemde önemli bir nörotransmitter olduğunu işaret etmektedir. Fakat kontrol durumuna gelmemesi başka mekanizmaların da rol aldığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Kidd PM. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev*. 2000;5(6):502-29.
2. Bourre JM, Bonneil M, Dumont O, Piciotti M, Calaf R, Portugal H, et al. Effect of increasing amounts of dietary fish oil on brain and liver fatty composition. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1043(2):149-52.
3. Disshon KA, Dluzen DE. Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release. *Brain Res*. 1997;764(1-2):9-16.
4. Baraboi VA. [The role of lipid peroxidation in the mechanism of stress]. *Fiziol Zh*. 1989;35(5):85-97.
5. Krukoff TL. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999;30(1):52-65.
6. Kishimoto J, Tsuchiya T, Emson PC, Nakayama Y. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Res*. 1996;720(1-2):159-71.
7. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 1994;91(2-3):133-40.
8. O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-USmar VM, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry*. 1997;36(49):15216-23.
9. Hesslinger C, Strub A, Boer R, Ulrich WR, Lehner MD, Braun C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 4):886-91.
10. Tieu K, Ischiropoulos H, Przedborski S. Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life*. 2003;55(6):329-35.
11. Sener HO, Akbostanci MC, Yucesan C, Dora B, Selcuki D. Visual evoked potentials in Parkinson's disease-correlation with clinical involvement. *Clin Neurol Neurosurg*. 2001;103(3):147-50.
12. Langheinrich T, Tebartz van Elst L, Lagreze WA, Bach M, Lucking CH, Greenlee MW. Visual contrast response functions in Parkinson's disease: evidence from electroretinograms, visually evoked potentials and psychophysics. *Clin Neurophysiol*. 2000;111(1):66-74.
13. Djamgoz MB, Cunningham JR, Davenport SL, Neal MJ. Nitric oxide inhibits depolarization-induced release of endogenous dopamine in the rabbit retina. *Neurosci Lett*. 1995;198(1):33-6.

14. Neal MJ, Cunningham JR, Matthews KL. Release of endogenous ascorbic acid preserves extracellular dopamine in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(12):2983-7.
15. Bugnon O, Schaad NC, Schorderet M. Nitric oxide modulates endogenous dopamine release in bovine retina. *Neuroreport.* 1994;5(4):401-4.
16. Bodis-Wollner I, Yahr MD. Measurements of visual evoked potentials in Parkinson's disease. *Brain.* 1978;101(4):661-71.
17. Celesia GG. Evoked potential techniques in the evaluation of visual function. *J Clin Neurophysiol.* 1984;1(1):55-76.
18. Kucukatay V, Hacıoglu G, Savcioglu F, Yargicoglu P, Agar A. Visual evoked potentials in normal and sulfite oxidase deficient rats exposed to ingested sulfite. *Neurotoxicology.* 2006;27(1):93-100.
19. Alves G, Wentzel-Larsen T, Aarsland D, Larsen JP. Progression of motor impairment and disability in Parkinson disease: a population-based study. *Neurology.* 2005;65(9):1436-41.
20. Twelves D, Perkins KS, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2003;18(1):19-31.
21. Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK. Changing epidemiology of Parkinson's disease in southwestern Finland. *Neurology.* 1999;52(2):302-8.
22. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 2003;157(11):1015-22.
23. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002;14(2):223-36; discussion 2.
24. Jankovich J. Pathophysiology and Clinical Assessment of Parkinsonian Symptoms and signs. . In: PahtaR LK, Koller WC, editor. *Handbook of Parkinson's Disease*, 3rd edition. New York: Marcel Dekker Inc; 2003. p. 71-107
25. Martin WE, Loewenson RB, Resch JA, Baker AB. Parkinson's disease. Clinical analysis of 100 patients. *Neurology.* 1973;23(8):783-90.
26. Ertan S. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Nörolog Olmayanlar İçin Nöroloji Sempozyum Dizisi 2005;No: 42:249-54
27. Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, Hallett M. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain.* 2001;124(Pt 11):2131-46.

28. Cooper JA, Sagar HJ, Tidswell P, Jordan N. Slowed central processing in simple and go/no-go reaction time tasks in Parkinson's disease. *Brain*. 1994;117 (Pt 3):517-29.
29. Dostrovsky JO, Hutchison WD, Lozano AM. The globus pallidus, deep brain stimulation, and Parkinson's disease. *Neuroscientist*. 2002;8(3):284-90.
30. Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. The clinical features of Parkinson's disease in 100 histologically proven cases. *Adv Neurol*. 1993;60:595-9.
31. Pallone JA. Introduction to Parkinson's disease. *Dis Mon*. 2007;53(4):195-9.
32. Çakmur R. Parkinson hastalığının epidemiyolojisi ve klinik özellikleri. . *Türkiye klinikleri Nöroloji Dergisi* 2003;1(3):15-7.
33. Rajput AH, Birdi S. Epidemiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 1997;3(4):175-86.
34. Katzenschlager R, Head J, Schrag A, Ben-Shlomo Y, Evans A, Lees AJ. Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology*. 2008;71(7):474-80.
35. Carpenter MG, Allum JH, Honegger F, Adkin AL, Bloem BR. Postural abnormalities to multidirectional stance perturbations in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(9):1245-54. PMCID: 1739252.
36. Clarke C. Klinik pratikte Parkinson hastalığı. İstanbul: Royal Society Medicine Press; 2008.
37. Çaylak e. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*. 2011;9(1):73-83.
38. Ebadi M, Govitrapong P, Sharma S, Muralikrishnan D, Shavali S, Pellett L, et al. Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of parkinson's disease. *Biol Signals Recept*. 2001;10(3-4):224-53.
39. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke*. 1990;21(7):1086-90.
40. Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):211-23.
41. Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*. 2008;33(12):2502-9.
42. C.W. Olenow . WGT, P.Jener Mechanisms of cell death in Parkinson's disease. In: J.J.Jankovic ET, editor. *Parkinson's disease and movement disorders*. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2002. p. 38-59.

43. Moosmann B, Behl C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11(10):1407-35.
44. Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*. 1996;380(6571):252-5.
45. Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama*. 2008;62(3):141-50.
46. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990;54(3):823-7.
47. Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, et al. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem*. 1989;52(2):515-20.
48. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1989;52(2):381-9.
49. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*. 1994;330(9):613-22.
50. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6368-71. PMID: 52084.
51. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1620-4. PMID: 53527.
52. Bolanos JP, Heales SJ, Peuchen S, Barker JE, Land JM, Clark JB. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(7):995-1001.
53. Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med*. 1996;2(9):1017-21.
54. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4565-71. PMID: 39317.
55. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298(2):431-7.

56. Schulz JB, Matthews RT, Muqit MM, Browne SE, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem.* 1995;64(2):936-9.
57. Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(4):338-42.
58. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature.* 1998;395(6703):645-8.
59. M.Ozansoy ANB. Parkinson Hastalığında Programlanmış Hücre Ölümü Parkinson Hast Hareket Boz Der,. 2006;9(1):54-61.
60. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57. PMID: 2008650.
61. Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Hum Pathol.* 2001;32(10):1029-38.
62. Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett.* 2004;577(3):427-33.
63. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. PMID: 2117903.
64. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116(2):205-19.
65. Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch Biochem Biophys.* 2007;462(2):220-30.
66. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells.* 1999;17(5):306-13.
67. Offen D, Elkon H, Melamed E. Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm Suppl.* 2000(58):153-66.
68. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(11):897-907.
69. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, et al. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 2000;107(3):335-41.
70. Mochizuki H, Hayakawa H, Migita M, Shibata M, Tanaka R, Suzuki A, et al. An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity

as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10918-23. PMID: 58574.

71. Gorman AM, Szegezdi E, Quigney DJ, Samali A. Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;327(3):801-10.
72. Perier C, Tieu K, Guegan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, et al. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):19126-31. PMID: 1323177.
73. Gasser T. Genetics of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1998;44(3 Suppl 1):S53-7.
74. Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2007;16 Spec No. 2:R183-94.
75. Thrash B, Uthayathas S, Karuppagounder SS, Suppiramaniam V, Dhanasekaran M. Paraquat and maneb induced neurotoxicity. *Proc West Pharmacol Soc*. 2007;50:31-42.
76. McCormack AL, Atienza JG, Johnston LC, Andersen JK, Vu S, Di Monte DA. Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *J Neurochem*. 2005;93(4):1030-7.
77. Lev N, Melamed E. Heredity in Parkinson's disease: new findings. *Isr Med Assoc J*. 2001;3(6):435-8.
78. Hauser R. Parkinson Hastalığı Sorular ve Cevaplar. Merit Publishing International. 2007:9-23.
79. Brown LL, Schneider JS, Lidsky TI. Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol*. 1997;7(2):157-63.
80. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2000;23(10 Suppl):S8-19.
81. Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, Yoshimura M, Ihara Y. Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol*. 1988;75(4):345-53.
82. Gibb WR. Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. *Neurol Clin*. 1992;10(2):361-76.
83. Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C. Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993;52(3):183-91.

84. Duyckaerts C, Verny M, Hauw JJ. [Recent neuropathology of parkinsonian syndromes]. *Rev Neurol (Paris)*. 2003;159(5 Pt 2):3S11-8.
85. Yang HY, Neff NH. The monoamine oxidases of brain: selective inhibition with drugs and the consequences for the metabolism of the biogenic amines. *J Pharmacol Exp Ther*. 1974;189(3):733-40.
86. Harvey BK, Wang Y, Hoffer BJ. Transgenic rodent models of Parkinson's disease. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;101:89-92. PMID: 2613245.
87. Tolwani RJ, Jakowec MW, Petzinger GM, Green S, Waggle K. Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models. *Lab Anim Sci*. 1999;49(4):363-71.
88. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*. 2004;318(1):215-24.
89. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968;5(1):107-10.
90. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*. 2005;2(3):484-94. PMID: 1144492.
91. Orth M, Tabrizi SJ. Models of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2003;18(7):729-37.
92. Blandini F, Armentero MT, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14 Suppl 2:S124-9.
93. He Y, Lee T, Leong SK. 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Res*. 2000;858(1):163-6.
94. Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration*. 1995;4(2):131-7.
95. Langston JW, Ballard PA, Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*. 1983;309(5):310.
96. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
97. Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;134(1):57-66.
98. Vander AJ SJ, Luciano DS. The sensory systems. *Human Physiology*, 1994. p. 249-57.

99. Celesia GG, Kaufman D. Pattern ERGs and visual evoked potentials in maculopathies and optic nerve diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985;26(5):726-35.
100. Pugh EN, Jr., Nikonov S, Lamb TD. Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9(4):410-8.
101. Kandel E.R. SJH, Jessel T.M., Principles Of Neural Science. In: McGraw-Hill, editor. *Principles of Neural Science*,. 4th ed., ed. New York. 2000.
102. Guyton AC HJ. *Textbook of Medical Physiology.* 9th edition ed1996.
103. Lamb TD, Pugh EN, Jr. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23(3):307-80.
104. Dacheux RF RE. Functional anatomy of the neural retina. In: Albert DM JF, Azar DT, Gragoudas ES eds, editor. *Principles and Practice of Ophthalmology.* Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p. 1601-24.
105. Vardi N, Kaufman DL, Sterling P. Horizontal cells in cat and monkey retina express different isoforms of glutamic acid decarboxylase. *Vis Neurosci.* 1994;11(1):135-42.
106. McMahon DG, Knapp AG, Dowling JE. Horizontal cell gap junctions: single-channel conductance and modulation by dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(19):7639-43. PMID: 298122.
107. Ryan MK, Hendrickson AE. Interplexiform cells in macaque monkey retina. *Exp Eye Res.* 1987;45(1):57-66.
108. Ehinger B. Functional role for dopamine in the retina. . In: Osborne NN CG, eds, editor. *Progress in Retinal Research.* Oxford: Pergamon Press; 1983. p. 213-32.
109. Dearry A, Burnside B. Stimulation of distinct D2 dopaminergic and alpha 2-adrenergic receptors induces light-adaptive pigment dispersion in teleost retinal pigment epithelium. *J Neurochem.* 1988;51(5):1516-23.
110. Osborne NN, Patel S, Vigny A. Dopaminergic neurones in various retinas and the postnatal development of tyrosine-hydroxylase immunoreactivity in the rabbit retina. *Histochemistry.* 1984;80(4):389-93.
111. Feigenspan A, Gustincich S, Raviola E. Pharmacology of GABA(A) receptors of retinal dopaminergic neurons. *J Neurophysiol.* 2000;84(4):1697-707.
112. Nir I, Haque R, Iuvone PM. Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina. *Brain Res.* 2000;870(1-2):118-25.

113. Tosini G, Dirden JC. Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence. *Neurosci Lett.* 2000;286(2):119-22.
114. Nguyen-Legros J, Versaux-Botteri C, Vernier P. Dopamine receptor localization in the mammalian retina. *Mol Neurobiol.* 1999;19(3):181-204.
115. Guyton AC. Özel duyular. In: H Ç, editor. *Tıbbi fizyoloji* 2001. p. 566-602.
116. Taylor WR, Vaney DI. New directions in retinal research. *Trends Neurosci.* 2003;26(7):379-85.
117. Ganong WF. *Vision. Review of Medical Physiology* 1996.
118. Berger H, Jankowicz E, Rzeznicka-Glinka Z, Czerwinska-Ciechan K, Slizewska I. [Estimation of the influence of hyperventilation on paroxysmal EEG activity in children with epilepsy]. *Rocz Akad Med Im Juliana Marchlewskiego Białymst.* 1975;20:235-44.
119. Reyes V, Henry GC, Baird H, Wycis HT, Spiegel EA. Localization of centripetal pathways of the human brain by recording of evoked potentials. *Trans Am Neurol Assoc.* 1951;56:246-8.
120. Picton T, Hink, RF., Perez-Abalo, M. Evoked potentials: how now? *J Electrophysiol Tech.* 1984;10:177-221.
121. Spehlmann R. *Evoked Potential Primer.* Butterworth Publishers USA. 1985.
122. Ogden TE. *Clinical electrophysiology.* Stephen JR *Retina*, Vol1, CV Mosby Company, St Louis Baltimore-Toronto. 1989:285-96.
123. Sanaç AŞ. Visual evoked potentials. *Türk Oftalmoloji Gazetesi.* 1988;18:84-107.
124. Adrian ED, Matthews BH. The interpretation of potential waves in the cortex. *J Physiol.* 1934;81(4):440-71. PMID: 1394145.
125. Brigell MG. The Visual Evoked Potential, Electrophysiologic Testing in Disorders of the Retina. In: Fishman GA, Birch, D.G., Holder, G.E., Brigell, M.G., editor. *Optic Nerve and Visual Pathway.* Singapore: The Foundation of the American Academy of Ophthalmology; 2001. p. 237-78.
126. Halliday AM, McDonald WI, Mushin J. Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet.* 1972;1(7758):982-5.
127. Espinoza SG, Thomas HC. Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the hooded rat. *Brain Res.* 1983;272(1):137-44.
128. Herr DW, King D, Barone S, Jr., Crofton KM. Alterations in flash evoked potentials (FEPs) in rats produced by 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN). *Neurotoxicol Teratol.* 1995;17(6):645-56.

129. Kraut MA, Arezzo JC, Vaughan HG, Jr. Intracortical generators of the flash VEP in monkeys. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1985;62(4):300-12.
130. Dyer RS, Jensen KF, Boyes WK. Focal lesions of visual cortex--effects on visual evoked potentials in rats. *Exp Neurol*. 1987;95(1):100-15.
131. Sokol S. Visually evoked potentials: theory, techniques and clinical applications. *Surv Ophthalmol*. 1976;21(1):18-44.
132. Odom JV, Bach M, Barber C, Brigell M, Marmor MF, Tormene AP, et al. Visual evoked potentials standard (2004). *Doc Ophthalmol*. 2004;108(2):115-23.
133. Gücükoglu A. Retrobulber nevrinin VER ile tanısı ve klinik değeri. *Türk Oftalmoloji Gazetesi*. 1988;16:424-35.
134. Halliday AM. Visually evoked responses in optic nerve disease. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1976;96(3):372-6.
135. Murad F, Arnold WP, Mittal CK, Braughler JM. Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1979;11:175-204.
136. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984;6 Suppl 2:S336-43.
137. Furchgott RF, Carvalho MH, Khan MT, Matsunaga K. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels*. 1987;24(3):145-9.
138. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9265-9. PMID: 299734.
139. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
140. Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol*. 1991;41(4):485-90.
141. Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1178(2):153-75.
142. Lane P, Gross SS. Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol*. 1999;19(3):215-29.

143. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001;2(10):907-16.
144. Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol.* 1997;29(2):159-66.
145. Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 1997;100(3):723-35. PMCID: 508242.
146. Wang S, Paton JF, Kasparov S. The challenge of real-time measurements of nitric oxide release in the brain. *Auton Neurosci.* 2006;126-127:59-67.
147. Del-Bel E, Padovan-Neto FE, Raisman-Vozari R, Lazzarini M. Role of nitric oxide in motor control: implications for Parkinson's disease pathophysiology and treatment. *Curr Pharm Des.* 2011;17(5):471-88.
148. Stern JE. Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration? *Prog Biophys Mol Biol.* 2004;84(2-3):197-215.
149. Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol.* 2005;76(2):126-52.
150. Sequeira SM, Ambrosio AF, Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM. Modulation of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by nitric oxide. *Nitric Oxide.* 1997;1(4):315-29.
151. Getting SJ, Segieth J, Ahmad S, Biggs CS, Whitton PS. Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. *Brain Res.* 1996;717(1-2):196-9.
152. Pogun S, Baumann MH, Kuhar MJ. Nitric oxide inhibits [3H]dopamine uptake. *Brain Res.* 1994;641(1):83-91.
153. Pogun S, Dawson V, Kuhar MJ. Nitric oxide inhibits 3H-glutamate transport in synaptosomes. *Synapse.* 1994;18(1):21-6.
154. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1993;28:97-9.
155. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2):3-31.
156. Sennequier N, Stuehr DJ. Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry.* 1996;35(18):5883-92.

157. Lane P, Gross SS. The autoinhibitory control element and calmodulin conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity. *Acta Physiol Scand*. 2000;168(1):53-63.
158. Poulos TL. Structural biology of heme monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(1):337-45.
159. Lloyd-Jones DM, Bloch KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*. 1996;47:365-75.
160. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)*. 1998;63(7):766-81.
161. Titheradge MA. The enzymatic measurement of nitrate and nitrite. *Methods Mol Biol*. 1998;100:83-91.
162. ALADAG M, TURKOZ, Y., OZEROL, IH. Nitric oxide and its neurophysiopathological effects. *T Klin Med sci*. 2000(20):107-11.
163. Schild L RT, Reiser M., Horn T.F., Wolf G., Augustin W. Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *FASEB Journal*. 2002(17):2194-201.
164. Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, Horvath EM, Figueroa JP, Szabo C, et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(10):1217-28.
165. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2002;277(41):38079-86.
166. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update*. 1998;4(1):3-24.
167. Reiling N, Kroncke R, Ulmer AJ, Gerdes J, Flad HD, Hauschildt S. Nitric oxide synthase: expression of the endothelial, Ca²⁺/calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1996;26(3):511-6.
168. Colasanti M, Persichini T, Fabrizi C, Cavalieri E, Venturini G, Ascenzi P, et al. Expression of a NOS-III-like protein in human astroglial cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252(3):552-5.
169. Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res*. 1997;12(7):1108-15.
170. Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol*. 1996;106(3):419-27.

171. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14582-6.
172. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(4 Suppl):S99-103.
173. Thiropeswamy T. MJS, Quinn J.P., Morris R. Nitric oxide, a biological double-faced janus- Is this good or bad? *Histology and Histopathology.* 2006(21):445-58.
174. Navar LG, Ichihara A, Chin SY, Imig JD. Nitric oxide-angiotensin II interactions in angiotensin II-dependent hypertension. *Acta Physiol Scand.* 2000;168(1):139-47.
175. Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (-)-Epicatechin induces calcium and translocation independent eNOS activation in arterial endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;300(4):C880-7. PMID: 3074631.
176. Furchgott RF. The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand.* 1990;139(2):257-70.
177. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* 1994;343(8907):1199-206.
178. Huang PL, Lo EH. Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals. *Prog Brain Res.* 1998;118:13-25.
179. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med.* 1999;92(4):164-9. PMID: 1297136.
180. SMUTZER G. Research tools for nitric oxide. A wide variety of reagent are available for nitric oxide research. *The Scientist.* 2001;6(15):23-9.
181. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994;269(19):13725-8.
182. Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17(1):39-53.
183. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 2004;75(6):639-53.
184. Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production. *Eur J Pharmacol.* 2002;454(2-3):115-23.

185. Çekmen B, M., Turkoz, Y., Turgut, M., Gozukara, M., E. Nitrik oksit ve nitrik oksit sentaz: Fizyolojik ve patolojik özellikleri. Fizyolojik ve patolojik özellikleri T Klin Pediatr. 2001;10:226-36.
186. Vincent SR. Localization of Nitric Oxide Neurons in the Central Nervous System. Nitric Oxide in the Nervous System. 1995:86-96.
187. Bredt DS, Snyder SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. Neuron. 1994;13(2):301-13.
188. Van Geldre LA, Fraeyman NH, Lefebvre RA. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. Biochem Pharmacol. 2000;60(1):145-53.
189. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86(22):9030-3. PMID: 298426.
190. Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F. Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments. J Clin Invest. 1992;90(2):659-65. PMID: 443148.
191. Wilcox CS, Welch WJ. Macula densa nitric oxide synthase: expression, regulation, and function. Kidney Int Suppl. 1998;67:S53-7.
192. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell. 1994;78(6):915-8.
193. Vielma AH, Retamal MA, Schmachtenberg O. Nitric oxide signaling in the retina: what have we learned in two decades? Brain Res. 2012;1430:112-25.
194. Wang GY, van der List DA, Nemargut JP, Coombs JL, Chalupa LM. The sensitivity of light-evoked responses of retinal ganglion cells is decreased in nitric oxide synthase gene knockout mice. J Vis. 2007;7(14):7 1-13.
195. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. Vision Res. 1996;36(18):2979-94.
196. Yokoyama H, Kuroiwa H, Kasahara J, Araki T. Neuropharmacological approach against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine)-induced mouse model of Parkinson's disease. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2011;71(2):269-80.
197. Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. Neuroscience. 2002;110(1):49-58.

198. Di Matteo V, Pierucci M, Benigno A, Crescimanno G, Esposito E, Di Giovanni G. Involvement of nitric oxide in nigrostriatal dopaminergic system degeneration: a neurochemical study. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1155:309-15.
199. Ogawa N. Dopamine neurotransmission and treatments for Parkinson's disease in the molecular biology era. *Eur Neurol.* 1997;38 Suppl 1:2-5.
200. Peachey NS, Ball SL. Electrophysiological analysis of visual function in mutant mice. *Doc Ophthalmol.* 2003;107(1):13-36.
201. Strain GM, Tedford BL. Flash and pattern reversal visual evoked potentials in C57BL/6J and B6CBAF1/J mice. *Brain Res Bull.* 1993;32(1):57-63.
202. Smeyne M, Smeyne RJ. Method for culturing postnatal substantia nigra as an in vitro model of experimental Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002;9(2):105-11.
203. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
204. O'Mahony D, Rowan M, Feely J, O'Neill D, Walsh JB, Coakley D. Parkinson's dementia and Alzheimer's dementia: an evoked potential comparison. *Gerontology.* 1993;39(4):228-40.
205. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays.* 2002;24(4):308-18.
206. Wichmann T, DeLong MR. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;991:199-213.
207. Bazzu G, Calia G, Puggioni G, Spissu Y, Rocchitta G, Debetto P, et al. alpha-Synuclein- and MPTP-generated rodent models of Parkinson's disease and the study of extracellular striatal dopamine dynamics: a microdialysis approach. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010;9(4):482-90.
208. Castagnoli KP, Steyn SJ, Petzer JP, Van der Schyf CJ, Castagnoli N, Jr. Neuroprotection in the MPTP Parkinsonian C57BL/6 mouse model by a compound isolated from tobacco. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(5):523-7.
209. Date I, Felten DL, Felten SY. Long-term effect of MPTP in the mouse brain in relation to aging: neurochemical and immunocytochemical analysis. *Brain Res.* 1990;519(1-2):266-76.
210. Pall HS, Williams AC, Blake DR, Winyard P, Lunec J. Lipid peroxidation and Parkinson's disease. *Lancet.* 1986;2(8511):870-1.
211. Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1998;13 Suppl 1:24-34.

212. Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal JS, Amouyel P, et al. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Hum Mol Genet.* 2003;12(1):79-86.
213. Tran MH, Yamada K, Olariu A, Mizuno M, Ren XH, Nabeshima T. Amyloid beta-peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *FASEB J.* 2001;15(8):1407-9.
214. Boo YC, Tressel SL, Jo H. An improved method to measure nitrate/nitrite with an NO-selective electrochemical sensor. *Nitric Oxide.* 2007;16(2):306-12. PMID: 1850282.
215. Guo S, Yan J, Yang T, Yang X, Bezard E, Zhao B. 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):1353-62.
216. Kalgutkar AS, Castagnoli N, Jr. Synthesis of novel MPTP analogs as potential monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitors. *J Med Chem.* 1992;35(22):4165-74.
217. Soulere L, Queneau Y, Doutheau A. An expeditious synthesis of 4-hydroxy-2E-nonenal (4-HNE), its dimethyl acetal and of related compounds. *Chem Phys Lipids.* 2007;150(2):239-43.
218. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S18-25.
219. Ji C, Amarnath V, Pietenpol JA, Marnett LJ. 4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(8):1090-6.
220. Hattoria N, Wanga M, Taka H, Fujimura T, Yoritaka A, Kubo S, et al. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15 Suppl 1:S35-8.
221. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide.* 2009;20(4):223-30.
222. Ozsoy O, Tanriover G, Derin N, Uysal N, Demir N, Gemici B, et al. 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.* 2011;20(3):250-62.
223. Brzozowski MJ, Alcantara SL, Iravani MM, Rose S, Jenner P. The effect of nNOS inhibitors on toxin-induced cell death in dopaminergic cell lines depends on the extent of enzyme expression. *Brain Res.* 2011;1404:21-30.

224. Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, 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):14669-74. PMID: 64739.
225. Kastner A, Herrero MT, Hirsch EC, Guillen J, Luquin MR, Javoy-Agid F, et al. Decreased tyrosine hydroxylase content in the dopaminergic neurons of MPTP-intoxicated monkeys: effect of levodopa and GM1 ganglioside therapy. *Ann Neurol*. 1994;36(2):206-14.
226. Eberhardt O, Schulz JB. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett*. 2003;139(2-3):135-51.
227. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*. 2010;23(3):153-65.
228. Buttner T, Kuhn W, Muller T, Heinze T, Puhl C, Przuntek H. Chromatic and achromatic visual evoked potentials in Parkinson's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1996;100(5):443-7.
229. Okuda B, Tachibana H, Kawabata K, Takeda M, Sugita M. Visual evoked potentials (VEPs) in Parkinson's disease: correlation of pattern VEPs abnormality with dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1995;9(2):68-72.
230. Nightingale S, Mitchell KW, Howe JW. Visual evoked cortical potentials and pattern electroretinograms in Parkinson's disease and control subjects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1986;49(11):1280-7. PMID: 1029077.
231. Pang JJ, Gao F, Wu SM. Light responses and morphology of bNOS-immunoreactive neurons in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 2010;518(13):2456-74. PMID: 3000797.

ÖZGEÇMİŞ

Sinem ARAS 14.10.1987 tarihinde Zonguldak'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Başöğretmen Atatürk İlköğretim Okulunda tamamlayıp Hacı Malike-Mehmet Bileydi Anadolu Lisesi'nden 2005 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2009 yılında lisans eğitimini tamamlayıp Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen burada araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili ingilizcedir. Evlidir.