

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEONTİCE SMİRNOWİİ'NİN
MUHTEMEL NÖROPROTEKTİF VE NÖRODEJENERATİF
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Kimyager Tufan ŞAHAN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Farmakoloji Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

BOLU
2010

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEONTİCE SMİRNOWİİ’NİN
MUHTEMEL NÖROPROTEKTİF VE NÖRODEJENERATİF
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Kimyager Tufan ŞAHAN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Farmakoloji Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Akçahan GEPEİREMEN

BOLU
2010

Abant İzzet Baysal Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Tufan ŞAHAN tarafından hazırlanan ve 22/01/2010 tarihinde savunulan
“Leontice Smirnowii’nin Muhtemel Nöroprotektif ve Nörodejeneratif
Potansiyellerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından
Farmakoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı Prof.Dr. Akçahan GEPDİREMEN
(AİBÜ)

Üye Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU
(AİBÜ)

Üye Yrd. Doç. Dr. Güler BUĞDAYCI
(AİBÜ)

ONAY

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri
üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu’nun kararıyla kabul
edilmiştir.

Doç. Dr. Serap KÖYBAŞI ŞANAL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tezimin hazırlanması ile ilgili çalışmalarında bilgi, deneyim ve yardımlarından yararlandığım ve bunun yanı sıra sosyal anlamda kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam ve danışmanım, Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Akçahan GEPDİREMEN'e;

Tezimin deney kısmının her aşamasında yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Grv. Dr. Recep BAYRAM'a; tezimin deney kısmının yapılmasının çeşitli aşamalarında yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Güler BUĞDAYCI'ya, Biyolog Dilek DOĞRUER'e, Arş.Grv.Dr. Tülin FIRAT'a ve Arş.Grv.Dr. Fatih ÖZCAN'a;

İstatistiksel analizde yardımcı olan; Uzm. Dr. Şeref VARDI ve Yrd.Doç.Dr. Yalçın KARAGÖZ'e;

Tezimin hazırlanmasında büyük yardımları dokunan, hayatımda çok önemli bir yeri olan, ayrıca yüksek lisans dönemimde manevi desteğini hiç esirgemeyen, değerli hocam Prof.Dr. Harika ÇELEBİ'ye;

Literatür taramasında ve çevirilerimde yardımcı olan ve her zaman destek olan arkadaşım Aysel BİNLER'e;

Manevi desteği ile her zaman yanımda olan Annem Gülüstan GÜNDAY ve Ablam Berrin ARAS'a;

Sonsuz Teşekkür ederim.

ÖZET

Gürcistan'ın doğu bölgesinde yetişen *Leontice smirnowii*'nin (LS) antioksidan, oksijen radikali süpürücü ve antiinflamatuvar etkileri literatürde gösterilmiştir. Genellikle antioksidan maddeler aynı zamanda nöroprotektif etki de göstermektedir.

Bu çalışmada, LS'nin potansiyel nörodejeneratif ve nöroprotektif etkileri, erişkin sıçan serebellum ve korteks doku homojenatlarında WST-1, TUNEL boyama ve subG1 faz DNA fragmentasyon testi ile araştırıldı. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve kimyasal adı cis-diamminedichloroplatinum (II) olan cisplatin (CP) kullanılarak homojenatlarda dejenerasyon oluşturuldu. WST-1 testinden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Üç farklı yöntem ile elde edilen sonuçlar kendi aralarında tutarlılık göstermiştir. LS, H_2O_2 ile oluşturulan nörodejenerasyonda etkisiz iken, cisplatin ile oluşturulan nörodejenerasyonda görece düşük dozlarda koruyucu etki göstermiştir. Fakat bu etki artan LS dozlarında kaybolmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Leontice smirnowii*, nöroproteksiyon, nörodejenerasyon, TUNEL, WST-1

ABSTRACT

Anti-oxidant and oxygen radical scavenging effects of *Leontice smirnowii* that grows in the eastern part of Georgia have been shown in the literature. In the literature anti-inflammatory effects of *Leontice smirnowii* also have been shown. Generally substances showing antioxidant properties also shows neuroprotective effects.

In this study, potential neurodegenerative and neuroprotective effects of this substance was investigated in adult rat cerebellum and cortex tissue homogenates with WST-1, TUNEL staining and subG1 phase DNA fragmentation tests. To generate degeneration in the homogenates, Hydrogen peroxide (H_2O_2) and diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) was used. Findings obtained from WST-1 test was subjected to statistical analysis.

Results obtained from three different methods showed consistence between themselves. While *Leontice smirnowii* had no effect in the neurodegeneration generated with H_2O_2 , it shown little effect in cisplatin. However this effect disappeared with increasing doses of *Leontice smirnowii*.

Key words: *Leontice smirnowii*, neuroprotection, nörodegeneration, TUNEL, WST-

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	x
TABLOLAR.....	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Nörodejenerasyon.....	3
2.2 Nörodejeneratif Hastalıklar.....	9
2.3 Nöroprotektif İlaçlar.....	15
2.4 Leontice Smirnowii.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
7. KAYNAKLAR.....	53

EKLER

EK- 1: Tıbbi Etik Kurul Sonucu

SİMGELER ve KISALTMALAR

2-AG:	2-araşidonoil gliserol
ACh:	Asetilkolin
AChaz:	Asetilkolinesteraz
AH:	Alzheimer hastalığı
AIF:	Apoptoz indükleme faktörü
ALS:	Amiyotrofik Lateral Skleroz
AMPA:	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propiyonik asit
APC:	Aktif protein C
API:	Apoptoz protein inhibitörü
ATP:	Adenozin trifosfat
COX:	Siklooksijenaz
CP:	Cisplatin
CsA:	Siklosporin A
CSF:	Serebrospinal sıvı
DA:	Dopamin
DAT:	Dopamin transporter
DM:	Dekstrometorfan
DMEM:	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DOPAC:	3,4-dihidroksifenilasetik asit
DX:	Dekstrofan
EPCR:	Endotel protein C reseptörü
ER:	Endoplazmik retikulum
GFAP:	Gliyal fibriler asidik protein
GP:	Glikoprotein
GSH:	Glutasyon
GSH-PX:	Glutasyon peroksidaz
HH:	Huntington hastalığı
IGF:	İnsülin benzeri büyüme faktörü

IOB:	İntraoküler basınç
KBB:	Kan beyin bariyeri
LRRK2:	Lösin-zengin repeat kinaz 2
LS:	Leontice Smirnowii
MAO:	Monoamin oksidaz
MPP ⁺ :	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropidin
MPTP:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropidin
NADH:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NF:	Nükleer faktör
NMDA:	N-metil D-aspartat
NOS:	Nitrik oksidaz
NSAİİ:	Steroid olmayan anti inflamatuvar ilaç
OHÖ:	Otofajik hücre ölümü
PAR-1:	Proteaz-aktif reseptör 1
PH:	Parkinson hastalığı
PINK1:	PTEN tarafından indüklenen kinaz 1
RGC:	Retinal gangliyon hücre
ROT:	Reaktif oksijen türleri
SA:	Sodyum Salisilat
t-PA:	Trombolitik doku plazminojen aktivatörü
TdT:	Terminal deoksinukleotidil transferaz
THC:	Tetrahidrokannabinol
TNF:	Tümör nekroz faktörü
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin insitu nick-end labelling
UCHL1:	Ubikuitin karboksi-terminal hidrolaz L1
UPS:	Ubikuitin-proteazom sistemi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Nekroz oluşumu	4
2.2. Nekroz oluşumu 2	4
2.3 Apoptoz oluşumu	6
2.4. Nekroz ve apoptoz oluşum yolları	6
2.5. Otofajik hücre ölümü	8
4.1. LS için doz cevap görüntüsü	38
4.2. CP için doz cevap görüntüsü	38
4.3. H ₂ O ₂ için doz cevap görüntüsü	39
4.4. H ₂ O ₂ için LS koruyuculuk çalışma görüntüsü	40
4.5. CP için LS koruyuculuk çalışma görüntüsü	40
4.6. 100µL hücre homojenatı + 900 µL DMEM TUNEL görüntüsü	41
4.7. 100µL hücre homojenatı + 5µL CP + 895µL DMEM TUNEL görüntüsü	42
4.8. 100µL hücre homojenatı + 5µL CP + 25µL LS + 870 µL DMEM TUNEL görüntüsü	42
4.9. 100µL hücre homojenatı + 50µL H ₂ O ₂ + 850 µL DMEM TUNEL görüntüsü	43
4.10. 100µL hücre homojenatı + 50µL H ₂ O ₂ + 25µL LS + 825 µL DMEM TUNEL görüntüsü	43
4.11. 100µL hücre homojenatı + 25µL LS + 875 µL DMEM TUNEL görüntüsü	44
4.12. H ₂ O ₂ için WST-1 absorbans ölçüm grafiği	47
4.13. CP için WST-1 absorbans ölçüm grafiği	47

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
4.1. H ₂ O ₂ ile yapılan WST-1 testinden elde edilen değerler.	45
4.2. CP ile yapılan WST-1 testinden elde edilen değerler.	45
4.3. H ₂ O ₂ ile yapılan testten elde edilen istatistiksel değerler	46
4.4. H ₂ O ₂ ile yapılan testte Friedman testi ile elde edilen değerler	46
4.5. CP ile yapılan testten elde edilen istatistiksel değerler	46
4.6. CP ile yapılan testte Friedman testi ile elde edilen değerler	46

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Leontice Smirnowii

Leontice smirnowii (LS); Gürcistan'ın doğu bölümünde bulunan, endemik bir bitki olan *Berberidaceae* ailesinin bir üyesidir. Bu bitki ailesi geleneksel Gürcü tıbbında farklı hastalıklarda kullanılmaktadır⁽¹⁾.

LS ürünlerinin 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil radikal süpürücü, süperoksit anyon radikali süpürücü, hidrojen peroksit süpürücü, indirgeme gücü ve metal bağlayıcı etkileri gösterilmiştir⁽²⁾. Ayrıca LS'nin ham ekstresinin ve monodezmozlarının saflaştırılmış ekstresinin, deniz yosunlarından üretilen, önemli miktarda selüloz içeren ve kıvam artırıcı emülgatör özellikleri olan ve kimyasal bir katkı maddesi olarak kullanılan karagenin tarafından indüklenen inflamasyonun etkili inhibitörleri oldukları da gösterilmiştir⁽³⁾.

Nörodejenerasyon

Belirli beyin bölgelerinde ortak özelliklere sahip nöron gruplarının ölümü sonucunda nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklar, farklı klinik fenotiplere ve genetik etiyolojiye sahip bir grup heterojen hastalıktır. Bunlar arasında Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH) gibi nörodejeneratif hastalıklarla birlikte, epilepsi, Friedrich ataksisi, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) yer almaktadır.

Bu hastalıklara karşı kullanılan nöroprotektif ilaçların büyük çoğunluğu güçlü bir etkinliğe sahipken aynı zamanda farklı ve ciddi yan etkileri de bulunmaktadır. Bu yüzden kimyasal terapötik ilaçlar yerine daha az yan etkiye sahip doğal kaynaklı ajanlar tercih edilmelidir⁽⁴⁾.

Pek çok nörodejeneratif bozukluk ve sendrom, reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimi ve oksidatif stresle ilişkilidir⁽⁵⁾. Çalışmada, apoptotik hücre hasarı oluşturmak için kullanılan hidrojen peroksit (H₂O₂), nörodejeneratif bozuklukların patofizyolojisinde yer alan ROT'un en yaygın formlarından birisidir. Çalışmada kullanılan diğer madde olan cisplatinin (CP) de nörotoksik olduğu bilinmektedir.

Çeşitli antioksidanların, nörodejenerasyonun çeşitli biçimlerinde nöroprotektif oldukları bildirilmiştir⁽⁶⁾.

Bu çalışma, antioksidan olduğu bilinen bitkisel kaynaklı LS'nin öncelikle nörodejeneratif olup olmadığını belirlemek, eğer nörodejeneratif değilse H₂O₂ ve CP nörotoksisitesinde, nöroprotektif etkisini in vitro olarak belirlemek için yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 NÖRODEJENERASYON

Sinir sistemi karmaşık fizyolojik, anatomik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Nöronlar arası iletim, elektriksel veya kimyasal haberci moleküller tarafından sağlanmaktadır. Bu iletişim sisteminin düzenlenebilmesi için beyinde enerji ihtiyacının sağlıklı olarak sağlanabilmesi gerekmektedir⁽⁷⁾.

Nörodejeneratif hastalıklar, nöronların belirli gruplarının veya fonksiyonlarının kaybı olarak nitelendirilebilirler. Nöronal fonksiyon bozuklukları mutlaka nöronal hücre ölümünün sonucu olmayabilirler. Sinaptik kayıp, uzun süreli potansiyalizasyon veya hastalık patolojisine bağlı olarak nöronal sinyalizasyonun kesilmesinden kaynaklanabilirler⁽⁸⁾. Nöronal strese bağlı oksidatif ürünlerin zamanla birikmesi hücre ölümüne neden olur, bu nedenle yaşlanma bu hastalıklarda etkindir. Ancak normal yaşlanma sırasında nörodejeneratif hastalıklarda görülen yüksek seviyedeki nöronal ölümün aksine, göreceli olarak daha düşük nöronal kayıp vardır⁽⁹⁾.

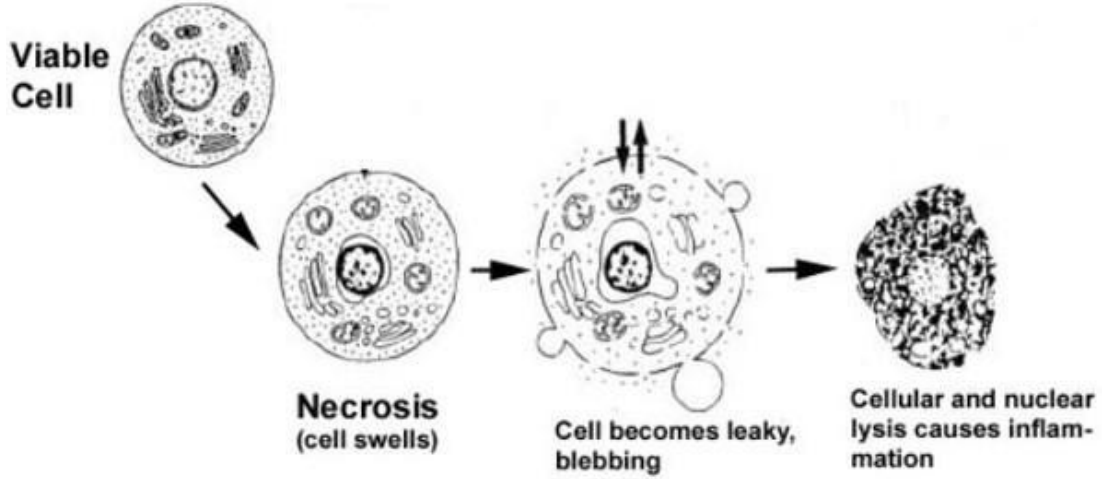
Nöronal Hücrelerde Hücre Ölüm Mekanizmaları

Nörodejeneratif hastalıklarda nöronların öldüğü bilinmesine rağmen, hücre ölüm mekanizması genelde bilinmemektedir. Nöronal hücre ölümüne neden olduğu bilinen yollar şunlardır; apoptoz, nekroz, otofajik hücre ölümü ve eksitotoksisite. Onkozis ve paraptosis gibi hücre ölümünün diğer şekilleri nöronlarda pek fazla çalışılmamıştır ve nörodejeneratif hastalıklardaki hücre ölümünde bu mekanizmaların rolü bilinmemektedir⁽⁸⁾.

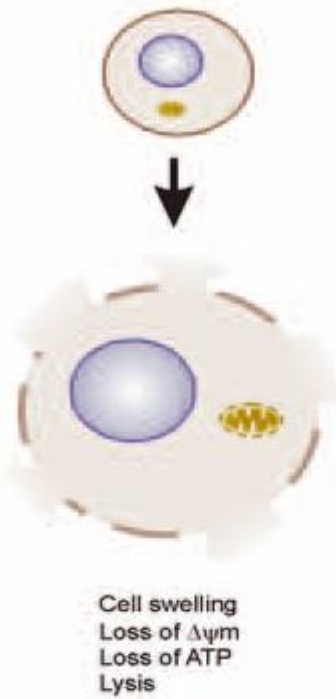
Nekroz

Nekroz hücre ölümünün akut şeklidir. Dışarıdan gelen hasarla plazma membranında oluşan değişiklikler sonucu meydana gelir. Adenozin trifosfat (ATP) kaybı, iyon gradiyentlerinin yok olması, hücre şişmesi ve sonuç olarak hücre lizisiyle karakterizedir. Böylece nekroz; hücre içeriklerinin çevreye salınımına bağlı olarak, çevreleyen bölgede inflamasyona neden olur (Şekil 2.1 ve 2.2). Hücre zedelenmesi sonucu hücrede gelişen geri dönüşü olmayan hasar, hücrenin ölümüne neden olur.

Nekrotik hücre ölümüne genellikle yüksek toksin seviyeleri gibi, ciddi hücresel stres neden olur. Nekroz programlanmış bir hücre ölümü değildir ve oluşmasında tanımlanabilen biyokimyasal bir yolak yoktur. Nekroz başladığında, terapötik müdahaleler için çok fazla olasılık yoktur.



Şekil 2.1: Nekroz oluşumu.



Şekil 2.2: Nekroz oluşumu 2.

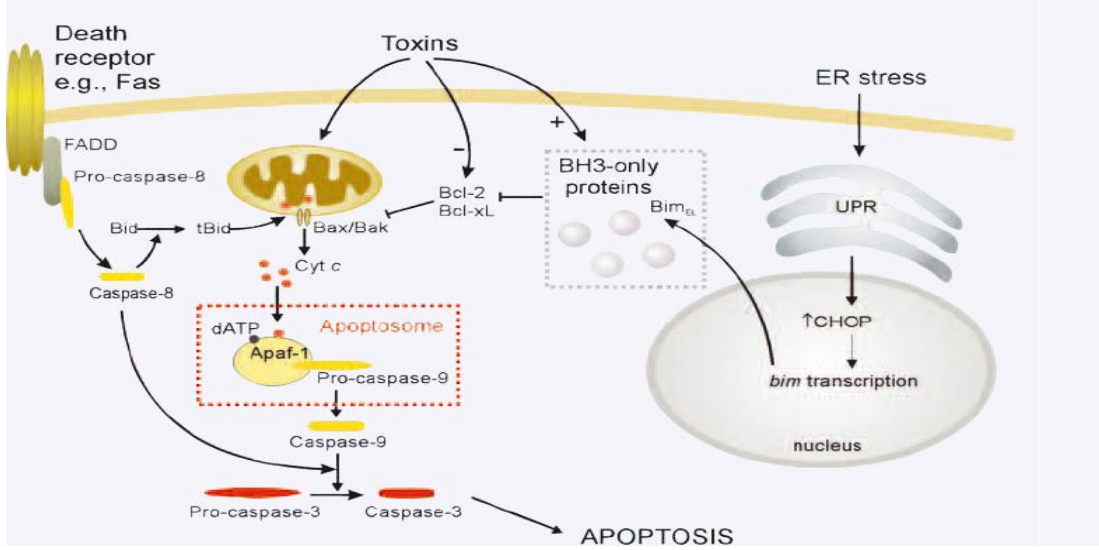
Apoptoz

Apoptoz nekrozun aksine, hücre ATP'nin devam etmesi ve hücre büzülmesine, apoptotik gövdelerin tomurcuklanmasına ve bu hücre parçacıklarının fagositozuna neden olan biyokimyasal bir yolağın başlatılması ile karakterizedir. İlişkili herhangi bir hücre lizisi veya inflamasyonu yoktur. Biyokimyasal olarak, apoptoz başlatan ve sonraki efektör kaspazların fonksiyonel hiyerarşisinde yer alan kaspaz proteazlarının aktivasyonu ile ilişkilidir (Şekil 2.3). Efektör kaspazlar hücrenin degradasyonuna ve ölümüne neden olan protein substrat çeşitlerinin büyük bir kısmını parçalar⁽¹⁰⁾. Memeli hücrelerinde kaspaz aktivasyonunu başlatan, en az iki tane iyi tanımlanmış yol vardır. Bunlar intrinsik (veya mitokondrial) yolak ve ekstrinsik (veya ölüm reseptörü) yolaktır.

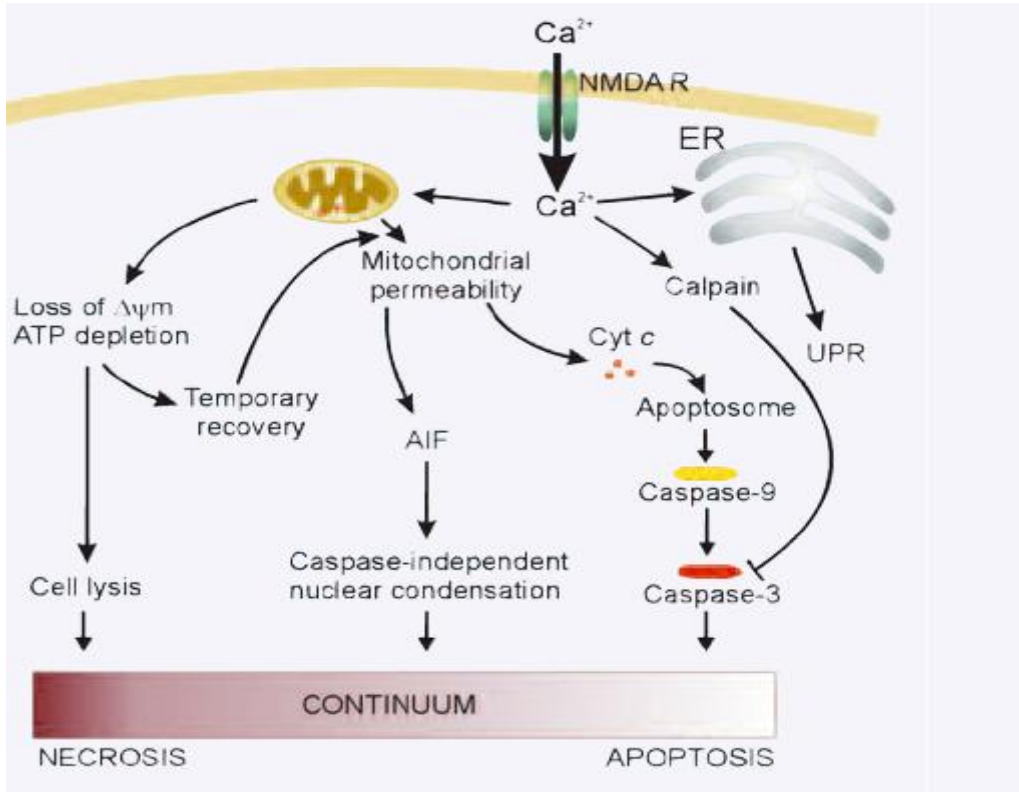
İntrinsik yolakta, kaspaz aktivasyonu sitozol içine mitokondriden sitokrom c'nin serbest bırakılmasıyla başlatılır. Sitozol içinde, sitokrom c apoptozom olarak adlandırılan bir çeşit multimerik kaspaz aktivasyon kompleksi oluşmasında temel rol oynar⁽¹¹⁾. Belirli bir biçimde, sitozolik sitokrom c, dATP varlığında Apaf-1 ile etkileşir. Bu, kümelenmeye ve başlatıcı kaspaz-9'un otoaktivasyonuna neden olur⁽¹²⁾. Aktif kaspaz-9 bölünmeye ve kaspaz-3 gibi sonraki efektör kaspazların aktivasyonuna yol açar. Bu durum, kolşisin, glutamat, 6-hidroksidopamin gibi nörotoksinleri içeren çeşitli apoptotik uyaranlara yanıt olarak meydana gelir⁽¹³⁾. Smac/Diablo, apoptoz indüklemeye faktörü (AIF) ve Omi/Htra2 gibi diğer pro-apoptotik faktörler de apoptoz sırasında mitokondriden serbest bırakılır⁽¹⁴⁾. Bunlardan AIF kaspaz aktivasyonu olmaksızın kromatin kondensasyonunu indükleyebilir. Aslında, nöronal hücrelerdeki apoptotik nükleer morfoloji her zaman kaspaz aktivite ile ilişkili değildir⁽¹⁵⁾ (Şekil 2.4). Ekstrinsik yolakta, ölüm reseptörlerinin (örneğin: Fas, TNF-reseptörü, TRAIL reseptörleri) ligand bağlanmaları bu reseptörlerin trimerizasyonuna ve hücre içi multiprotein kompleksinin oluşumuna neden olur. Bu kompleksin parçaları olan başlangıç kaspazları -8 veya -10, çevre tarafından indüklenen otoaktivasyon sonucu bölünme ve aktivasyona uğrarlar⁽¹⁶⁾ (Şekil 2.3).

Apoptoz, yolaktaki farklı noktalarda düzenlenebilir. Mitokondrial bütünlük ve böylece intrinsik yolak, Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenir, bu hem pro- (örn: Bax, Bak) hem de anti-apoptotik (örn: Bcl-2, Bcl-x_L) üyelerini içerir. Mitokondriyal

bütünlük, sitozol içine pro-apoptotik faktörlerin salınımını ile düzenlenir veya inhibe edilir⁽¹⁷⁾. Sitokrom c'nin salınımının akışı, kaspaz aktivasyonu ve etkinliği apoptoz protein inhibitörü (API) ile düzenlenir⁽¹⁸⁾.



Şekil 2.3: Apoptoz oluşumu.



Şekil 2.4: Nekroz ve apoptoz oluşum yolları.

Eksitotoksisite

Glutamat santral sinir sisteminde ana eksitatör nörotransmitterdir. Aktivasyonu ile nöronlar depolarize olur, oluşan aksiyon potansiyeli sayısı artar. Eksitatör etkiler oluşturan üç ana iyonotropik glutamat reseptörü vardır. Bunlar; α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propiyonik asit (AMPA), kainat ve N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörleridir. Metabotropik glutamat reseptörleri ise hem eksitatör hem de inhibitör etkiler oluşturur.

AMPA reseptörlerinin GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 alt tipleri ve Kainat reseptörlerinin GluR4, GluR5, GluR7, KA1 ve KA2 alt tipleri vardır. AMPA ve Kainat reseptörleri hızlı sinaptik aşırımda rol oynarlar.

NMDA reseptörü ligandla açılıp kapanan iyon kanalı üzerindeki iki farklı protein alt birimi olan NMDAR1 ve NMDAR2 (NR 2A, 2B, 2C ve 2D)'den oluşur. Bu reseptörler beyin ve omurilikteki belirli nöronlarda yaygın olarak dağılmışlardır. Özellikle hipokampus ve serebral kortekste yüksek yoğunlukta bulunurlar. Aşırı ve/veya uzamış NMDA reseptör aktivasyonu hedef nöronları öldürür. Bu sürece eksitotoksisite denir.

Eksitotoksisite yoluyla ölüm nöronal hücrelere özgüdür, eksitotoksisite glutamat reseptörlerinin NMDA alt tipinin aşırı stimülasyonundan kaynaklanan toksisitedir. Nöronal hücre ölümünün bu şekli, iskemi sırasında meydana gelen ATP kaybının bir sonucudur. ATP kaybı, nöronların genel depolarizasyonuna, nörotransmitter salınımının uyarılmasına ve ATP-bağımlı nörotransmitter geri alım sistemlerinin bozulmasına neden olur. Glutamat, beyinde en fazla bulunan uyarıcı nörotransmitter olması nedeniyle NMDA reseptörlerinin aşırı eksitasyonuna neden olur (Bkz. Şekil 2.4). Bu ligand-kapılı iyon kanalları hücre içine Ca^{2+} girişine izin verir. Daha sonra sitozolik Ca^{2+} , mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) tarafından tecrit edilir. Ancak Ca^{2+} miktarı fazlalaşırsa, bu ER stresine ve/veya mitokondriyal geçirgenlik artışına neden olur⁽¹⁹⁾. Hücre içi Ca^{2+} 'nin fazla miktarları, nöronal işlev bozukluğuna ve hücre ölümüne yol açabilir. Nöronal Ca^{2+} artışı ATPaz, fosfolipazlar, proteazlar, endonükleazlar gibi bir çok enzimi aktive edebilir. Bu enzimlerin aktivitesindeki artış, geri dönüşümsüz nöronal hasara yol açar.

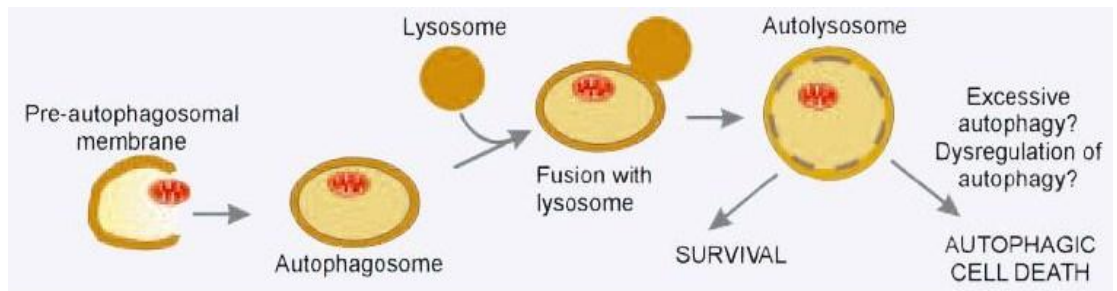
Eksitotoksisitenin gerçekten hücre ölümünün ayrı bir şekli olarak düşünülüp düşünülemeyeceği tartışmaya açıktır, çünkü hem apoptozun hem de nekrozun

aktivasyonuna bağlıdır (Şekil 2.4). Örneğin, in vitro bulgular, glutamatın nöronlarda hem erken nekroza hem de geç apoptoza neden olabileceğini göstermiştir⁽²⁰⁾.

Otofajik hücre ölümü

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin lizozomlarda parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteazom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve aminoasitler gibi yapıtaşları hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar. Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, besin elde etmek için hücre içindeki yapıları nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği gösterilmiştir.

Aşırı otofajiye bağlı olduğu düşünülen otofajik hücre ölümü (OHÖ), hücre ölümünün bir yolağı olabilir (Şekil 2.5). OHÖ, organel şişmesi, sitoplazmada boşluk oluşması ve lokal inflamasyona neden olan membran parçalanmasını içeren belirgin bir morfolojidir⁽²¹⁾. OHÖ temel olarak gelişimsel hücre ölümüyle ilişkilidir. Gelişimsel hücre ölümünde masif otofaji, çok sayıda hücre ölümünün yol açarak geri dönüşümsüz hücrel atrofiye neden olur⁽²²⁾. Atg7 veya Beclin1 gibi otofaji genlerine (Atg) bağlı, hücre ölümü indüksiyonu bildirilmiştir⁽²³⁾.



Şekil 2.5: Otofajik hücre ölümü.

2.2 NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR

Nörodejeneratif bozukluklar beynin spesifik bölgelerindeki nöronların ilerleyici ve geri döndürülemez kaybı ile tanımlanan bir grup patolojiyi içermektedir. Pek çok tipi olan bu patolojilerin en çok bilinenleri; Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığı (AH), Huntington hastalığı (HH) ve Amyotrofik Lateral Skleroz'dur (ALS). Ayrıca iskemi de nörodejenerasyona neden olan sebepler arasında önemlidir.

Alzheimer Hastalığı

AH en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Klinik olarak, ciddi demansla sonuçlanan ilerleyici hafıza kaybı ve bilişsel fonksiyon bozukluğuyla karakterizedir. AH'nın patolojisi, hipokampal bölgelerden orta ve geniş piramidal nöronların kaybını⁽²⁴⁾ ve aşırı fosforlanmış tau proteininden oluşmuş intraselüler nörofibiler yumaklar ve amiloid iplikçikler içeren ekstraselüler plakların varlığını⁽⁴²⁾ içerir. Ailevi AH'na amiloid prekürsör protein veya presenilin-1 veya -2'deki mutasyonlar neden olur. Presenilinler γ -sekretaz aktivitede önemli rol oynarlar, γ -sekretaz aktivite β -amiloid peptid üreterek amiloid prekürsör proteinin proteolitik işleminden sorumludur⁽²⁵⁾. AH mutasyonları, fibriller ve plaklar üreterek, oligomerizasyona eğilimi olan, biraz daha büyük peptidin, β -amiloid-42, artmış üretimi ile birlikte bozulmuş işleme neden olur⁽²⁶⁾. AH'da nöronal hücre ölümüne neyin neden olduğu tam olarak belli değildir.

Post-mortem beyin dokusu çalışmaları, AH'da nöronal apoptozun meydana geldiğini göstermiştir⁽²⁷⁾. AH beyinlerinden alınan post-mortem dokularda aktif kaspazlar tespit edilmiştir⁽²⁸⁾. Ama bu görüşe, AH vakalarında apoptotik morfoloji bildirmeyenler tarafından itiraz edilmiştir⁽²⁹⁾. In vitro modeller, β -amiloid'in apoptozu indükleyebileceğini göstermiştir⁽³⁰⁾. Presenilin mutasyonları nöronları apoptozun indüksiyonuna ve eksitotoksisteye hassaslaştırır⁽³¹⁾. β -amiloid birikiminin, AH'daki eksitotoksisteye duyarlılığın artmasına neden olduğu⁽³²⁾ ve NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun, spesifik olarak β -amiloid tarafından indüklenen dejenerasyonla spesifik olarak ilişkili olduğu⁽³³⁾ ileri sürülmektedir. Eksitotoksistenin, AH'nın sonraki aşamalarında daha önemli bir rolü olduğu da ileri

sürülmektedir⁽³⁴⁾. Otofajinin, AH modelleriyle ilişkisi olmasına rağmen, hücre ölüm yolağının bu bölümü hakkında yeterli bulgu yoktur⁽³⁵⁾.

Parkinson Hastalığı

PH en sık 55 yaş üzerindeki kişileri etkileyen, ikinci en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıktır. Patolojik olarak, substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve geride kalan nöronların içinde eozinofilik intrasitoplazmik inklüzyonların (Lewy gövdeleri) varlığı ile karakterizedir. Bu durum, bradikinezi, istirahat tremoru ve rijidite klinik özelliklerinin doğrudan nedeni olan striatumda dopamin depleksiyonuna neden olur. PH'nın klinik semptomları, substantia nigra içindeki dopaminerjik nöronların yaklaşık %50-%60'ı kaybedildiği zaman belirgindir. Bu nedenle PH, nöronal hücre kaybının doğrudan gözlemlenen klinik özelliklerden sorumlu olduğu nörodejeneratif hastalığın güzel bir örneğidir. PH'nın sebebi, çok büyük ihtimalle multifaktöryeldir; genetik yatkınlık, çevresel toksinler ve yaşlanma hem herediter hem de sporadik PH için başlangıç ve ilerlemesindeki önemli faktörlerdir. Günümüzde, en az 13 PARK genindeki mutasyonlar, ailevi PH'nın patojeneziyle ilişkilidir⁽³⁶⁾. Bunlar, α -sinüklein, parkin, PTEN tarafından indüklenen kinaz 1 (PINK1), DJ-1, lösin-zengin repeat kinaz2 (LRRK2) ve ubiquitin karboksi-terminal hidrolaz L1 (UCHL1) proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonları kapsar⁽³⁶⁾. Bu genlerden, parkin ve UCHL1, zarar görmüş veya yanlış katlanmış proteinleri parçalayan ubiquitin-proteazom sistemi (UPS) ile ilişkilidir⁽³⁷⁾. İlâveten, parkin, PINK1, DJ-1, ve Omi/Htra2'nin dahil olduğu bu genlerden birkaçı oksidatif strese dirençte ve mitokondriyal fonksiyonda rol oynuyor olabilir⁽³⁸⁾. PH'da dopaminerjik nöron kaybını başlatan moleküler mekanizmalar bilinmemektedir. Farklı kaynaklardaki bilgiler, toksin tarafından indüklenen ölüm, oksidatif stres, mitokondriyal kompleks I, protein agregasyonu ve UPS'deki bozulmanın rol oynadığını göstermektedir⁽³⁹⁾.

Substantia nigra PH post-mortem dokudaki nöromelanin-içeren hücrelerde TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin insitu nick-end labelling) boyama ile birlikte apoptotik kromatin kümelerin varlığı, apoptotik hücre ölümünün PH'daki nöronal kayba katkıda bulunduğunu göstermektedir⁽⁴⁰⁾. Ama bu bulguları desteklemeyen çalışmalar da bulunmaktadır⁽⁴¹⁾.

Ayrıca, bu hücrelerde aktive olmuş kaspaz-3 de gözlemlenmiştir⁽⁴²⁾. Bunun yanı sıra PH beyninin post-mortem çalışmalarında ekstrinsik apoptotik yolağın da rol oynadığına dair bulgular da bulunmaktadır. Bunlar, PH hastalarının orta beyinde TNF α , çözünür Fas ve Fas adaptör protein FADD'nin artmış seviyeleriyle ilişkilidir⁽⁴³⁾. PH beyinlerindeki nöromelanin-içeren substantia nigra nöronlarında önemli biçimde artmış aktif kaspaz-8 tespit edilmiştir⁽⁴⁴⁾. Parkinson mimetikleri MPP⁺ (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropridin) ve 6-hidroksidopamin kullanılan PH'nın in vitro modelleri hem apoptoz hem de nekroz göstermiştir⁽⁴⁵⁾. Pestisid rotenon, karın mezenkefalik dopaminerjik nöronlardaki kaspaz-3-bağımlı apoptozu indükler. Mutant α -sinüklein'nin indüklenebilir ekstensörü protezom aktivitesini düşürür ve mitokondriya-bağılı apoptoza duyarlılığı artırır⁽⁴⁶⁾. Nigrostriatal sistemdeki α -sinükleinin hedeflenmiş overekspresyonu, Parkinson hastalığında yeni bir hayvan modeli sağladı⁽⁴⁷⁾. Bu modelde, kaspaz-9'un aktivasyonu ile nigral dopamin nöronlarının selektif dejenerasyonu vardı⁽⁴⁸⁾. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda PH'da eksitotoksisitenin rolü olduğu ileri sürülmüş ancak daha sonraki çalışmalar bu hipotezi desteklememiştir⁽⁴⁹⁾. Ama PH'da otofajik hücre ölümü rol oynuyor olabilir. Ultrastrüktürel inceleme, PH hastalarında substantia nigranın melanize edilmiş nöronlarındaki otofagozom-benzeri yapıları ortaya çıkarmıştır⁽⁵⁰⁾. Substantia nigranın katekolaminerjik nöronlarındaki nöromelanin granüllerinin, çift membranlar ile sınırlandırıldığını ve aslında sitozoldeki letal akümülyasyondan hücreyi korumak için otofagozom tecrit edici dopamin ve metabolitleri olabileceği bildirilmiştir⁽⁵¹⁾. Bu bilgilerin ışığında, dopamin ve MPP⁺'nin insan nöroblastom hücrelerinde otofajik hücre ölümünü indükledikleri gösterilmiştir⁽⁵²⁾.

Huntington Hastalığı

HH trinükleit tekrarlayan bozukluklardan birisidir. Sebebi Huntingtin proteininin N-terminusunda çevrilmiş CAG tekrarının dominant olarak kalıtsal ekspansiyonudur. CAG ekspansiyonunun uzunluğu, hastalık bulgularının başlangıç yaşıyla ters ilişkilidir⁽⁵³⁾. Ana klinik bulgu, neostriatumda ki projektör nöronların selektif kaybının sonucu olan, jeneralize istemsiz hareketlerin varlığıdır⁽⁵³⁾. Hastalık patolojisi; mutant huntingtin içeren nükleer inklüzyonların varlığı ile karakterizedir⁽⁵⁴⁾. HH'de nöronal hücre ölümü toksik mutasyona uğramış huntingtin

fragmanların birikmesiyle ilişkili olabilir, çünkü CAG tekrarının 35'in üzerinde ekspansiyonu nöronal hücre ölümüyle sonuçlanır⁽⁵⁵⁾. Etkileşen proteinlerin birkaçı tanımlanmasına rağmen, huntingtinin fizyolojik rolü bilinmemektedir.

Kaspazların HH beyinlerinde aktifleşmiş olduğu gösterilmiştir⁽⁵⁶⁾. İlginç olarak, huntingtin'in kendisi, toksik olabilecek poliglutamin sistemi içeren trunkat fragmanları yaratarak, kaspazlar için bir substrattır⁽⁵⁷⁾. Eksitotoksisitenin, HH'nin patojenezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür. HH'de kayıp olan projeksiyon nöronları, korteksten glutamat-salgılayan nöronlarla sinir sistemine bağlanırlar ve sıçan striatumu içinde glutamat reseptör agonistlerinin uygulanması üzerine selektif olarak dejenere olurlar⁽⁵⁸⁾. Erken evre HH hasta beyinlerinin post mortem analizi, NMDA reseptör agonisti, kuinolinik asit ve HH'de bir endojen eksitotoksin olarak davranabileceğini ileri sürerek kuinolinik asidin öncülü 3-hidroksi-kinurenin'in artmış seviyelerini gösterir⁽⁵⁹⁾. Bunun yanı sıra, mutant huntingtin'in ekspresyonu, azalmış glutamat alımı, glutamat reseptörlerinin bozulmuş trafiği ve fonksiyonluğunun dahil olduğu, glutamat nörotransmisyonundaki bozulmalarla ilişkilidir⁽⁶⁰⁾. Huntingtin'de farklı mutasyonları gösteren transjenik farelerden kültürlenmiş projektör nöronlarının, eksitotoksik hasara daha duyarlı olduğu ileri sürülürken⁽⁶¹⁾, in vivo deneyler çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur⁽⁶²⁾. HH hastalarında mutant huntingtin ekspresyonu ve eksitotoksisite arasında doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmemiştir. Otofaji, huntingtin ile stimüle olurken, bunun OHÖ ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir⁽⁶³⁾. Paradoksal olarak, belirli huntingtin mutant formları nöronları hücre ölümünden korurlar⁽⁶⁴⁾.

Amyotrofik Lateral Skleroz

ALS spinal kord, motor korteks ve beyin sapındaki motor nöronlarının nörodejeneratif bozukluğudur. Eksitotoksisite tarafından takip edilen artmış glutamat seviyeleri, ALS'de meydana gelen olası bir patolojik olay olarak gösterilmiştir⁽⁶⁵⁾. ALS hastalarının postmortem beyinlerinden elde edilen motor kortekste, artmış glutamat alımı ve glutamat taşıyıcı EAAT2'nin kaybı gözlemlenmiştir⁽⁶⁵⁾. Benzer olarak, ALS'nin transjenik fare modellerinin spinal kordunda, ekstraselüler glutamat seviyelerindeki bir artışa ek olarak, EAAT2'de bir azalma da bulunmuştur⁽⁶⁶⁾. Bu durum, motor nöron dejenerasyonuna giden yolda yaygın bir bileşen olan glutamat

iletim bozukluluğunu gösterir. ALS’de, EATT2 kaybına neden olan moleküler mekanizmalar henüz anlaşılmamıştır. EATT2 mRNA’nın seviyelerinin değişmemesi, EATT2’nin azalmasının translasyon veya post-translasyon seviyelerinde kararsız bir durumdan ziyade mRNA’nın azalmış transkripsiyonuna bağlı olmadığını gösterir⁽⁶⁷⁾. Sporadik ALS hastalarının bir alt grubunda, açık dominant negatif özelliklerle beraber aberant bağlı formların varlığı ve anormal EATT2 mRNA düzelmesi saptandı⁽⁶⁸⁾. Ancak diğer araştırmacılar, aberant EAAT2 transkriptlerinin varlığı ve ALS arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını saptadılar, çünkü aynı zamanda bu transkriptler kontrol ve AH öznelerinden elde edilen doku örneklerinde de tespit edilmiştir⁽⁶⁹⁾. ALS vakası, aynı zamanda oksidatif stres tarafından da karakterize edilen nörodejeneratif patolojideki glutamat taşıyıcılarının tutulumunu örnekler. Rosen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma⁽⁷⁰⁾, ailevi ALS vakalarının yaklaşık %20’sinin, gen kodlama $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ süperoksit dizmutazda (SOD1) hatalı duyu (missense) mutasyonları taşıdığını göstermiştir. SOD1’deki mutasyonlar hidroksil radikal veya peroksinitritler gibi zararlı antioksidanların oluşumunu katalize ederler. Çeşitli bulgular SOD1 mutantları ve eksitotoksisite aracılı nöronal ölüm arasında bir ilişki olduğunu akla getirmektedir. Transjenik ALS fare ve sıçanların spinal kordunda EAAT2’nin kaybı bildirildi. Bir *Xenopus* oocyte modelinde, insan SOD1 protein ve EATT2’nin mutant formlarının bazısının koekspresyonu taşıyıcı molekülün inaktivasyonuna neden olmuştur⁽⁷¹⁾. Bu yüzden, EAAT2’nin inaktivasyonunun ve kaybının SOD1 mutasyonunun özellikleriyle ilişkili olabilmesi muhtemeldir.

Genomik DNA’nın tek-yollu konformasyon polimorfizm analizi kullanılarak, sporadik ALS ile ilişkili EAAT2 geninde bir mutasyon raporlanmıştır. Bu mutasyon, pozisyon 206’da (N206S) serin ile asparjini yer değiştirir⁽⁷²⁾. Ayrıca, EAAT2-N206S mutantı, transport oranında önemli bir düşüşe ve normal etkinlikte anlamlı dominant negatif etkiye sahiptir. Transportun azalma oranı, mutasyona uğramış taşıyıcının plazma membranına azalmış akışıyla ilişkilidir. Bunun yanı sıra, EAAT2-N206S artmış ters transport kapasitesi gösterir⁽⁷³⁾. Bu kombine etkiler EAAT2’nin, nöronların sinaptik yarığında glutamatı süpürme yeteneğini bozar.

İskemi

İskemi veya felç beyinde besleyici destek, glukoz ve oksijenin lokalize azalmasına neden olan, kan akımının kesilmenin neden olduğu akut bir durumdur. Nöronlar ATP üretmek için glukoz ve oksijenin sabit teminine bağımlı olduğu için, iskemi sırasında ATP kaybı iyon gradiyentlerinin hızlı kaybına neden olur. Bu durum da su alınımına, hücre şişmesine, lizise ve hücre ölümüne yol açar.

İskemi, akut nöronal hücre ölümü ve ilk travmadan günler sonra meydana gelen geç ölümle karakterizedir⁽⁷⁴⁾. Hücre ölümünün ilk fazı nekrotik iken geç ölüm apoptotiktir. İskemik çekirdekteki nöronal hücre ölümü nekrotik olma eğilimindedir, penumbra bölgesinde ise apoptotiktir, bu durum travmanın ciddiyetini hücre ölümünün mekanizmasının belirlediğini gösterir⁽⁷⁴⁾. Hücre ölümünün her iki fazı da NMDA reseptörlerinin antagonizması yoluyla bloke edilebilir⁽⁷⁵⁾. Bu hücre ölümü eksitotoksiktir ve bu yüzden indüklenmiş nekroz ve apoptozun bütünlüğü açısından aynı özellikleri paylaşır. Beclin 1'in upregülasyonu iskemik penumbrada otofajik belirteç, iskemik nöronlardaki vakuolik yapılara LC3'ün hücre içi yeniden dağılımı ile birlikte gözlemlenir⁽⁷⁶⁾. Bu durum iskemi sırasında otofajinin indüklendiğini gösterir. Ama otofajik hücre ölümü kesin olarak gösterilememiştir.

2.3 NÖROPROTEKTİF İLAÇLAR

Hücre Dejenerasyonuna Karşı Protektif Ajanlar

Memantin

Alzheimer hastalığı olan vakalarda, β -amiloid plaklar nöronal yolların zarar verici araları olarak bilinirler, ama bu vakalarda hipokampal N-metil-D-aspartat (NMDA)-tip glutamat reseptörlerinde anlamlı bir azalma vardır⁽⁷⁷⁾. Glutamat reseptörlerinin sabit aktivasyonu, gözlemlenen nöronal hasara bir miktar katkıda bulunabilirler. AH vakalarının nöronları, yetersiz metabolizmayı ve enerjinin azalmasını açıklar⁽⁷⁸⁾ ve her iki aktivite depolarizasyonun korunması ve hücre dışı glutamatın sağlanması için gereklidir, bunu daha fazla depolarizasyona sebep olarak gerçekleştirirler⁽⁷⁹⁾. Sabit depolarizasyon, NMDA reseptörlerini bloklayan ve hücre içi Na^+ ve Ca^{2+} ’nın miktarlarını artıran Mg^{2+} ’yı serbest bırakır. Bu iyonların sağlanması fonksiyonel bozulmaya ve bunu takiben de nöronal ölüme neden olur⁽⁸⁰⁾.

Memantin [3, 5-dimetiltrisiklo [3.3.1.1^{3,7}]dekan-1-amin] kompetitif olmayan bir NMDA antagonisti olup AH’nın tedavisi için araştırılmaktadır. Miguel-Hidalgo ve arkadaşları, sıçanlarda memantin sürekli infüzyonunun, hipokampusun CA1 alt alanının nöronlarının, β -amiloid (1-40) [$\text{A}\beta(1-40)$] indüklenmiş dejenerasyondan korunduğunu göstermişlerdir⁽⁸¹⁾. Bu durum β -amiloid tarafından indüklenmiş NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna karşı memantin’in antagonistik etkilerinden kaynaklanır. Aktivasyon, $\text{A}\beta$ ’nin direkt toksik etkilerinden kaynaklanan hücre dışı glutamatın takviyesini takip edebilir.

AH vakalarındaki nöronal dejenerasyon, inflamasyondan da kaynaklanabilir⁽⁸²⁾. Beyin içindeki inflamatuvar moleküller, daha sonraki nöronal ölümle sonuçlanan hücre dışı glutamat seviyelerinde artışı stimüle edebilirler⁽⁸³⁾ ve böylece nöroinflamasyondan kaynaklanan nöronal hasarı azaltabilirler. Willard ve arkadaşları, memantin bazal önbeyin nöronlarında nöronal hasarı azalttığını göstermişlerdir⁽⁸⁴⁾. Bu çalışmada, hasarın lipopolisakkarit tarafından indüklenen inflamasyondan kaynaklandığı görülmüştür. Miguel-Hidago ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, gliyal fibriler asidik protein (GFAP) ve ED1 için immünoreaktiviteyi düşürmede, memantin’in rolü fark edilmiştir⁽⁸¹⁾.

Gliyal hücreler herhangi bir nörolojik hasarın erken cevap vericilerdir⁽⁸⁵⁾. Hasara astrositlerin reaksiyonu, astrositler için özgün bir belirteç olan, GFAP'nın aşırı ekspresyonuyla karakterize edilen, reaktif gliyozistir⁽⁸⁶⁾. Bu astrositler nöronların canlı kalmasına yardım ederler ve uygun nöronal çalışma için gerekli olan iyonik çevrenin düzenlenmesinde görev alırlar⁽⁸⁷⁾.

İnsülin-benzeri büyüme faktörü (IGF)-I

(HIV)-1 enfeksiyonu vakalarında, HIV ilişkili demans gibi SSS hastalıkları AIDS vakalarının en azından üçte ikisinde sıklıkla görülür. Nörolojik hasar genelde hastalığın gidişatında geç ortaya çıktığından, HIV enfekte hücrelerin nörolojik varlığı nöronal hücre fonksiyon bozukluğu ve daha sonraki ölümün tek nedeni olmayabilirler. Bu nörolojik hasar, gp120 ve Tat gibi viral proteinlere maruziyetinden sonra makrofajlar/mikrogliyadan salınan inflamatuvar tümör nekroz faktörü (TNF)- α gibi birkaç farklı sitokine bağlı olabilir. Bu sitokinler, ayrıca beyin dokusundaki metabolizmayı bozabilirler⁽⁸⁸⁾. TNF- α mRNA ve proteinin ekspresyonu, HIV tarafından indüklenen nörolojik bozukluklarda daha yüksek seviyelerde saptanmıştır⁽⁸⁹⁾. Tükenme sendromu olan HIV vakalarında ve gelişme geriliği olan çocuklarda, IGF-I serum seviyelerinin düşük olduğu gösterilmiştir^(90,91).

Çok fonksiyonlu tirozin kinaz olan IGF-I reseptörü çok sayıda hücre tipinde aktiftir ve değişik rollere sahiptir. Onun sinyali, nöronları iskemiden kaynaklanan yaralanmalardan korur. Aynı zamanda, serebellar granül nöronlarındaki düşük K⁺ seviyeleri ile indüklenen apoptozu inhibe eder. Ayrıca, beyin tümör hücre çizgilerini, ankoraj-bağımsız kültür koşulları tarafından neden olunan apoptozdan koruyabilir. Wang ve arkadaşları, HIV-enfekte makrofajlardan oluşturulan ortama maruziyetten sonra, farklılaşmış nöronların daha sonraki akıbetiyle birlikte hem TNF- α hem de IGF-I'nin katkılarını incelediler⁽⁹²⁾. Sonuçlar; IGF-I stimülasyonu olmaksızın, TNF- α 'nın HIV-enfekte makrofajlardan şartlandırılan ortamla temastan kaynaklanan hasara katkıda bulunduğunu gösterdi. Ancak IGF-I tedavisi, koşullandırılan nöronları, HIV/CM ve TNF- α tarafından verilen hasardan korur. IGF-I, IGF-I reseptöründen elde edilen anti-apoptotik moleküllerin aktive edilmesinde nöronlara olanak sağlar⁽⁹²⁾.

İzofloran

İzofloran [2-kloro-2-(diflorometoksi)-1, 1, 1-trifloroetan] özellikle nöroanestezi için, sıklıkla kullanılan volatil bir anestetikdir. İskemi tarafından indüklenen nöronal hasarı azalttığı bulunmuştur⁽⁹³⁾. Popovic ve arkadaşları, simüle edilmiş iskemiden kaynaklanan hipokampal dilimlerdeki nöronal ölümün esas olarak glutamat reseptör aktivasyonundan dolayı olduğunu göstermişlerdir⁽³⁾. Sodyum pentotal, izofloran, MK-801, bir NMDA reseptör antagonisti ve hafif hipoterminin hepsi benzer verimlilikle hücre ölümünü engellerler. İzofloran durumunda mekanizma, azalmış glutamat toksisitesini içerir. Kawaguchi ve arkadaşları ise, izofloranın fokal iskemiden kaynaklanan serebral infarktüsü azalttığını ama korumadığını ileri sürmüşlerdir⁽⁹⁴⁾.

Li ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, izofloranın, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propiyonik asit (AMPA) enjeksiyonundan önce ve beş saat sonra izofloranın değişen konsantrasyonlarıyla (%1-3) sıçanları tedavi ederek sıçan serebral korteksine in vivo AMPA enjeksiyonundan kaynaklanan nöronal nekrozun enfarktüs boyutunu azaltabileceğini gösterdiler⁽⁹⁵⁾. Bu çalışma, AMPA dozuna bağlı olarak farklı zamanlarda uygulanan izofloranın, nöroprotektif olarak kaldığını ve bu etkilerin zamana bağlı olduğunu ancak doza bağlı olmadığını ortaya gösterdi. Olası etki mekanizmaları, azalmış koyu renkli hücre dejenerasyonu ve Purkinje nöronlarındaki ödemli hasardır.

Anestetiklerin kesin nöroprotektif mekanizmaları bilinmezken, volatil anestetiklerin eksitotoksik hasarı inhibe edebilecekleri ve iskemi tarafından indüklenen nöronal hasarı azaltabilecekleri hakkında bulgular vardır⁽⁹⁴⁾. Bu durum, eğer hücre dışı konsantrasyonları mikromolar seviyeye ulaşırsa eksitotoksik nöronal yaralanmaya neden olabilecek eksitator nörotransmitter glutamattaki etkilerinden kaynaklanır. Tanımlanan glutamat reseptörlerinin başlıca üç familyasının, AMPA/kainit ve NMDA reseptörleri glutamat nörotoksitesine aracılık edebilir ve metabotropik reseptörleri glutamat nörotoksitesini düzenleyebilir. Hücre dışı glutamat seviyelerindeki artış, iskemi tarafından indüklenebilir. Glutamat reseptörlerinin aşırı stimülasyonu, NMDA-reseptör aracılık edici hücre ölümünün primer mekanizması olan ödemli nekrozla sonuçlanan nöronlarda Ca^{2+} birikmesini meydana getirir.

Dopaminerjik Koruyucu Ajanlar

Parkinson hastalığı dopamin eksikliğine sebep olan, dopaminerjik nöronların dejenerasyonunun sonucu meydana gelen bir hastalıktır. Ama dopamin replasmanı nörodejenerasyonu durdurmaz. PH, MPTP [1-metil-4-fenil-1,2, 3, 6-tetrahidropridin] ile indüklenebilir⁽⁹⁶⁾. Monoamin oksidaz (MAO)-B ile nörotoksik bileşik MPP⁺ ya [1-metil-4-fenilpridinyum] metabolize edilir. Dopaminerjik nöronal hücrelerin mitokondrisinde bu toksik metabolitin takviyesi elektron transport zincirinin nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) dehidrojenazının (kompleks I) inhibisyonuna neden olur. İlave olarak, sürekli vasküler endotel hücre tabakası olan kan beyin bariyeri (KBB) fiziksel olarak yük, çözünürlük, spesifik taşıma sistemleri ve moleküler boyuta istinaden çok sayıda molekülün beyine geçmesini veya beyinden çıkmasını engeller. Bu hücreler serebral kapillerin içinde yerleşik oldukları zaman, diğer dokularda transvasküler taşıyıcı sistemleri olduklarına inanılan pinositotik veziküllerden yoksun kalırlar⁽⁹⁷⁾.

ONO-2506

Araştırmalar, astrositlerin nöronların mikro çevrelerinin homeostazisinin devamında yardımcı olduklarını göstermiştir⁽⁹⁸⁾. MPTP'nin sebep olduğu dopaminerjik nörotoksisitedeki rolleri tam olarak anlaşılmamıştır. ONO-2506'nın bu astrositleri modüle ettiği bulunmuştur ve bu nöroproteksiyonun hedefi olabileceğini gösterir⁽⁹⁹⁾. Kato ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmayla ONO-2506'nın nöroprotektif etkilerini belirlemeyi amaçladılar⁽¹⁰⁰⁾. Kato ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada, MPTP'ye maruz kalan farelerde, ONO-2506'nın 3 gün sonra striatumda, dopamin ve onun metaboliti DOPAC'ın [3, 4-dihidroksifenilasetik asit] azaldığını ve bir hafta sonra substantia nigrada içerilen dopaminerjik nöronların kaybını engellediğini gösterdiler⁽¹⁰¹⁾. Aynı zamanda, MPTP dozundan sonra saatlerce devam eden terapötik bir etki belirlenmiştir⁽¹⁰⁰⁾. Ancak bu etki MPTP'nin metabolizması sırasında aktif değildir, daha sonra astrositler aktifleştiği zaman aktiftir. Bu şekilde, ONO-2506, astrosit düzenlemesinin Parkinson hastalığının tedavisinde yeni bir tedavi olduğunu kanıtlayabilir.

Polifenoller

Doğal bitki türlerinden çok sayıda faydalı ilaç elde edilmiştir veya bunların sentetik türevlerin hazırlanması için kurşun bileşikleri kullanılmaktadır. Pan ve arkadaşları, yeşil çaydan elde edilen polifenollerin dopamin transporter (DAT) yoluyla [³H]-dopaminin geri alımını inhibe ettiğini göstermişlerdir⁽¹⁰²⁾. Bu etki aynı zamanda MPP⁺ alımının blokajı ile sonuçlanır ve böylece dopaminerjik nöronları korur.

Sodyum Salisilat ve Aspirin

Araştırmalar, Parkinson hastalığında NO seviyeleri kadar siklooksijenaz (COX) etkinliğinin de arttığını göstermiştir⁽¹⁰³⁾. İnflamasyonun dopamin nöronlarına zarar vermede katkısı bulunduğu bildirilmiştir. Sairam ve arkadaşları, anti inflamatuvar ajan olan sodyum salisilatın (SA) nöroprotektif etkisinin de olduğunu saptamışlardır⁽¹⁰⁴⁾. Bu etkisi COX inhibisyonuna değil antioksidan etkisine bağlıdır. Diğer çalışmalar, SA'nın, glutamat tarafından indüklenen ve hidroksil radikalının ($\cdot$ OH) neden olduğu nöronal dejenerasyondan koruduğunu göstermiştir⁽¹⁰⁵⁾.

Aspirin, [O-asetilsalisilik asit], serbest radikalleri temizleyerek Δ -9-tetrahidrokannabinol (9-THC)- indüklenmiş hipokampal nöron toksisitesini geri çevirebilir⁽¹⁰⁶⁾. Ayrıca, glutamat salınımı aspirin tarafından inhibe edilir. Bu COX yolağının inhibe edilmesine ek olarak diğer etki mekanizmasıyla beyin ATP seviyelerinde artışa neden olur. Castillo ve arkadaşları, inme bulgularının başlangıcında verilen düşük doz aspirinin serebrospinal sıvıda (CSF) glutamat konsantrasyonlarında azalmaya neden olduğunu saptamışlardır⁽¹⁰⁷⁾. Daha yüksek dozlarda, hem aspirin hem de SA, nöroprotektif etkiye sahip olan nükleer faktör (NF)- κ B aktivasyonunu inhibe ederler. Ama nonsteroid anti inflamatuvar ilaçların (NSAİİ) hepsi nöroprotektif etkiye sahip değildir ve SA, COX aktivitesini engellemez.

Retinal Koruyucular

Brimonidin

Brimonidin [5-bromo-6-(2-imidazolin-2-ylamino)kuinoksalin] oküler hipertansiyonun tedavisinde kullanılan bir α 2-adrenoseptör agonistidir. Klonidin ve

ksilazin gibi diğer $\alpha 2$ -agonistlerine benzer şekilde, gözde $\alpha 2$ reseptörlerine bağlanır, bu durum fotoreseptörlerine ışıkla indüklenmiş zarardan nöroproteksiyon sağlar. Aynı zamanda, brimonidinin sıçan optik sinirine ölçülü bir yaralanmadan sonra retinal gangliyon hücrenin (RGC) sağ kalma şansını artırdığı bulunmuştur⁽¹⁰⁸⁾. $\alpha 2$ -agonistleri: 1) optik sinir ezilme yaralama modelinden ve intraoküler basınçta (IOB) episkleral ven fotokoagülasyon tarafından indüklenen artışlardan sonra RGC'lerde⁽¹⁰⁹⁾, 2) retinal iske mi ile indüklenen IOB'nin geçici artışından sonra iç çekirdek yüzeyinin nöronlarında⁽¹¹⁰⁾, 3) oftalmik damarların selektif ligatüründen kaynaklanan retinal iskemiden sonra hem RGC'lerde hem de nöronlarda nöroprotektif etkiyi ortaya koyar⁽¹¹¹⁾.

Agonistlerin muhtemel etki mekanizmaları, bir fibroblast büyüme faktörü olan β FGF'nin retina içerisinde endojen upregülasyonu ve eksitator amino asitlerin intra oküler olarak salımının azalmasıdır.

Timolol

Timolol [S-(-)-1-(*t*-bütilam, no)-3-[(4-morfolino-1, 2, 5-tiyadiazol-3-il)oksi]-2-propanol] selektif olmayan bir β -adrenoseptör antagonistidir. Uzun zamandır antihipertansif olarak kullanılmaktadır. Oftalmik etkileri optik-disk çukurluğu, azalmış retinal kalınlığı ve görme alanı kaybının ilerlemesinin engellenmesini içerir. Timolol'un IOB'nin azaltılmasında doğrudan veya dolaylı nöroproteksiyon sağladığı kesin değildir.

Betaksolol ve nipradilol gibi diğer β -adrenoseptör antagonistlerinin nöroprotektif etkileri vardır ve retinal hasarı azaltırlar. Goto ve arkadaşları, timololun L-tipi Ca^{2+} kanalları, K^+ kanalları, Na^+ kanalları ve γ -aminobütirik asit A reseptörleri ($GABA_A$) için bir miktar afinitesi olduğunu bulmuşlardır⁽¹¹²⁾. Ca^{2+} kanallarının retinadaki iskemik nöronal hasarın oluşmasında rolü vardır. L-tip Ca^{2+} kanallarının bloklanması, iskemik zedelenmede retinal nöronların duyarlılığını azaltır⁽¹¹³⁾. $GABA_A$ reseptörü gibi K^+ ve Na^+ kanalları da retinada ve beyinde nöronal hasarın primer mekanizmaları ile bağlantılıdır⁽¹¹⁴⁾.

MCI-9042

Nörotransmitter serotonin çok sayıda reseptör alt tipiyle birlikte (5-HT) anksiyete, anjina ve diğer pek çok hastalıkta rol oynar. 5-HT tavşanlarda IOB'yi

artırabilir veya azaltabilir⁽¹¹⁵⁾. Erken çalışmalarda 5-HT reseptörlerinin bir sınıfı olan 5-HT₂ antagonistlerinin nöroprotektif etkileri gösterilirken, MCI-9042 retinada etkileri gösterilen ilk 5-HT₂-selektif antagonistidir⁽¹¹⁶⁾. Inoue-Matsuhisa ve arkadaşları MCI-9042'nin metaboliti olan M-1'in glutamat ile indüklenen nörotoksisitede potent etkisi olduğunu göstermişlerdir⁽¹¹⁷⁾. Ana bileşik, iskemi-reperfüzyon sonrası iç retinal değişiklikleri önemli ölçüde azaltır.

Kalsinörin İnhibitörü: Siklosporin A

İmmünsüpresan olarak kullanılan siklosporin A'nın (CsA) sıçan transituvar orta serebral arter oklüzyonunda klinik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir⁽¹¹⁸⁾. Butcher ve arkadaşları, rejyonel olarak enjekte edilen endotelin ile indüklenen sıçan fokal iskemi vakalarında CsA'nın nöroprotektif etkisini göstermişlerdir⁽¹¹⁹⁾. Sıçan genel iskemili model kullanımında, CsA'nın CA1 gecikmiş nöronal ölümü önemli ölçüde azalttığı bulundu⁽¹²⁰⁾. CsA kan beyin bariyerini iyi geçemez, bu durum nöroproteksiyonda kullanımında önemli bir sorundur. İmmünsüpresan olarak, CsA kalsinörin blokajı yoluyla T-hücre aktivasyonunu inhibe eder. Kalsinörin Bcl-2 proteinleri familyasının pro-apoptotik üyesi olan BAD'nin defosforilasyonu ile hücre ölümünü indükleyebilir. CsA'nın nöroprotektif etkisine mitokondriyal permeabilite transisyon deliklerini inhibe etmesi kadar kalsinörin aktivasyonunu bloklaması da katkıda bulunabilir.

Antioksidanlar

Melatonin

Melatonin'in [*N*-asetil-5-metoksitriptamin] vücut içerisinde çok sayıda protektif rolü olduğu bulunmuştur. Oksidatif nörotoksisiteyi azaltırken, singlet oksijen (O[•]), peroksil radikali (O₂[•]) ve hidroksil radikali (•OH) gibi serbest radikalleri temizler. Ayrıca, süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}) ve nitrik oksitden (NO) üretilen ve öncülünden veya ilgili peroksinitröz asitten (OONOH) daha reaktif ve güçlü olan peroksinitrit anyonunu (OONO⁻) sönmeler. Nükleik asitler ve proteinler gibi makromoleküller melatoninin farmakolojik etkileriyle oksidatif hasardan korunurlar. Melatonin'in, iki molekül O₂^{•-}den H₂O₂ ve O₂ üreten süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidazı (GSH-Px) stimüle ettiği bulunmuştur⁽¹²¹⁾.

Nikotin

Sigara içmenin toksisitesi hakkındaki bütün araştırmaların yanı sıra, bağımlılık yapan bileşik nikotin [(+)-1-metil-2-(3-piridil)pirolidin] bazı durumlarda SSS’de nöroprotektif etkilere sahiptir. Kemirgenlere uygulanan nikotin, post-sinaptik dopamin reseptör aktivasyonu ile sonuçlanan presinaptik dopamin salınımını stimüle eder⁽¹²²⁾. Bu yüzden nikotin Parkinson hastalığının tedavisinde terapötik etkilere sahip olabilir ve transdermal ve oral nikotinin Parkinson hastalığına bağlı bulguları düzelttiği gösterilmiştir⁽¹²³⁾. Parain ve arkadaşları, nikotinin MPTP tarafından indüklenen dejenerasyona karşı fare dopamin nöronlarına kısmi koruma sağladığını bulmuşlardır⁽¹²⁴⁾. Alzheimer hastalığı tedavisinde, nikotinin bilişsel performansı artırdığı bulunmuştur⁽¹²⁵⁾. Başka çalışmalarda, nikotinin ana metaboliti nornikotin ve nikotindeki kotininin bilişsel ve nöroprotektif etkileri gösterilmiştir.

Asetilkolin

Alzheimer hastalığı olan vakalarda, β -amiloid proteini, teorik olarak nöronal hücrelerin içine Ca^{2+} girişini ve serbest radikallerin üretimini artırarak nörotoksositeye neden olur. Kolinerjik nöronların degradasyonu, bir nörotransmitter olmasına rağmen, antioksidan özelliklere sahip olduğu varsayılan asetilkolinin (ACh) önemli derecede seviyelerinin azalmasına neden olur. Pillay ve arkadaşları asetilkolinin CN^- tarafından indüklenen serbest radikallerin üretilmesine karşı nöroproteksiyon sağladığını belirlemişlerdir⁽¹²⁶⁾. Serbest radikallerin düzeyleri, asetilkolinesteraz (AChaz) tarafından, ACh metabolize edilirken bile ACh tarafından azaltılır⁽¹²⁶⁾. Bir AChaz inhibitörü metabolizmayı engellerken, aynı zamanda serbest radikalleri de temizleyebilir. Bu gözlem, azalmış ACh seviyelerinin serbest radikal hasarına beyinin duyarlılığındaki artışı açıklayabilir.

Huperzin A

Huperzia serrata’dan *Lycopodium* alkaloidi olan Huperzin A geri döndürülebilir bir AChaz inhibitörüdür. Huperzin A’nın, toksisiteye aracı olan $\text{A}\beta_{25-35}$ tarafından indüklenen ROS seviyelerinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur⁽¹²⁷⁾. Huperzin A, NMDA reseptör antagonizması, anti-AChaz etkinliği ve antiiskemik yaralanmadaki diğer etkileri aracılığıyla antiapoptotik olabilir⁽¹²⁸⁾.

Huperzin A'nın ayrıca, apoptozda önemli rolleri olan sistein proteazları ailesinin üyesi olan kaspaz-3'ü inhibe ettiği bulunmuştur⁽¹²⁷⁾. Kaspaz-3 nöronal yaralanmayı takip eden nöronal hücre ölümünden sorumlu olabilir.

α -Tokoferol

Tokoferollerin ve tokotrienollerin bir grubu ortaklaşa olarak vitamin E olarak bilinirler. Sano ve arkadaşlarının yaptığı klinik bir çalışmada E vitamini verilmesinden sonra Alzheimer hastalığının ilerlemesinin yavaşladığını gösterilmiştir⁽¹²⁹⁾. Başka bir araştırmada da α -tokoferolün parakuat [1, 1'-dimetil-4, 4'-bipridinyum diklorür] tarafından verilen $O_2^{\cdot-}$ ile indüklenen sitotoksisteyi önlediği bulundu⁽¹³⁰⁾. H_2O_2 tarafından yapımı artırılan $\cdot OH$ sitotoksitesi ise etkilenmedi. α -Tokoferol ayrıca NO'nın sitotoksitesini de inhibe etti. NO'nın nörotoksitesi, $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyonu ile oluşan ONOO⁻'den kaynaklanır. Bu yüzden, nöroproteksiyon $O_2^{\cdot-}$ seviyelerindeki azalma ile sağlanır.

WR-2721

WR-2721 [2-[(3-aminopropil)aminoetanetiylol]-dihidrojenfosfat (ester)] nükleer saldırı durumunda zarar verici ROS'ların konsantrasyonlarını azaltmak için radyoprotektant olarak geliştirildi. Ön ilaç olan WR-2721'in defosforilasyonu WR-1065 üretir. Dokular içinde, H iyonlarını verir ve böylece onu disülfide oksidize eder ve oksidan türlerine indirger. Yapılan bir çalışmada, WR-2721'nin radyoproteksiyonunun kan beyin bariyerini geçemediği için iyi olmadığını gösterilmiştir⁽¹³¹⁾. Başka bir çalışmada ise, sıçanlarda nöroproteksiyon bulgusu saptandı⁽¹³²⁾. Ayrıca, serbest radikallerin aşırı üretiminden kaynaklanan zararı sınırlayarak, radyasyon tarafından indüklenen motor ve morfolojik anormalliklerin kısmen önlendiği de gösterildi⁽¹³³⁾.

Quercetin Flavonoidleri

Opuntia ficus-indica var. *Saboten* türünden üç flavonoidin, fare kortikal kültürlerinde serbest radikaller tarafından indüklenen nöronal hasarı inhibe ettikleri bulundu⁽¹³⁴⁾. Bitkinin geleneksel kullanımı diyabet, ödem, yaralanmalar, bronşiyel astım ve diğer rahatsızlıkları içerir. Bitkinin ekstrelerinden ve kökünden elde edilen 10 bileşen tanımlandı. Üç aktif bileşen quercetin, (+)-dihidroquercetin ve quercetin

3- metil eterdir. Bu üç bileşenin antioksidan olduğu ve quercetin 3-metil eter kültürlenmiş sıçan kortikal hücrelerinde H₂O₂ veya ksantin (X)/ ksantin oksidaz (XO) tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı en potent nöroprotektan olduğu gösterilmiştir⁽¹³⁵⁾.

Uncaria Alkaloidleri

Uncaria sinensis (Oliv.) Havil.'den izole edilen çok sayıda oksindol alkaloidi vazodilatatif etkiye, Ca²⁺-kanal-bloker aktivitesine ve glutamat tarafından indüklenen konvülsiyon etkiye sahiptir. Corynoxienne, isocorynoxienne, rhynchophylline ve isorhynchophylline oksindol alkaloidleridir. Geissoschizine metil eter, hirsuetine ve hirsutine indol alkaloidleridir. Shimada ve arkadaşları, hirsuetine ve hirsutin indol alkaloidlerinin ve isocorynoxienne, rhynchophylline ve isorhynchophylline oksindol alkaloidlerinin nöronları glutamat tarafından indüklenen ölümden korumada etkin olduğunu gösterdiler⁽¹³⁶⁾. Bu alkaloidlerin hücrelere Ca²⁺ enflaksını inhibe etmelerinin, onların etki mekanizmalarına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Kabergolin

Parkinson hastalığı tedavisinde, potansiyel olarak nörotoksik olan levodopa halen en etkili semptomatik tedavidir. Dopamin D₂ (DA D₂) reseptör agonistleri, levodopa tarafından indüklenen nörotoksik etkileri engellemek ve bulguları düzeltmek için klinik kullanıma girmiştir. Oral DA agonistlerinin büyük kısmı, çok kısa etki süreleri nedeniyle ihtiyaç duyulan sürekli dopaminerjik stimülasyonu sağlamakta yetersizdirler. Kabergolin [N-[3-(dimetilamino)propil]-N-[(etilamino)karbo-nil]-6-(2-propenil)-(8β)-ergolin-8-karboksamid] potent, uzun süreli DA D₂ agonist etkileri olan ergolin türevidir. Kabergolinin yarı ömrü 63-68 saattir ve bu tek başına veya levodopa ile kombinasyonda, Parkinson hastalığında tedavi etkinliğini artırır⁽¹³⁷⁾. Nöronların oksidatif stresten korunması Parkinson hastalığında önemlidir. Çünkü zarar verici serbest radikaller nigrostriatal dopaminerjik nörodejenerasyonunun muhtemel önemli mekanizmasıdır⁽¹³⁸⁾.

Lombardi ve arkadaşları, kabergolinin, *t*-BuOOH tarafından indüklenen oksidatif strese maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerinin korunmasını sağladığını belirlemişlerdir⁽¹³⁹⁾. İn vivo etkinliğin oksidan hasarın azalması (lipid peroksidasyon) ve hücre içi glutatyon (GSH) deplesyonu kadar dopaminomimetik

etkilerden olduğu sonucu çıkartılmıştır. Finotti ve arkadaşları kabergolinin lipid peroksitlerin in vivo bazal seviyelerini azalttığını belirlediler⁽¹⁴⁰⁾. Yoshioka ve arkadaşları kabergolinin hem in vivo hem de in vitro olarak GSH sistemini aktive ettiğini ve serbest radikalleri temizlediğini göstermişlerdir⁽¹⁴¹⁾.

NOS İnhibitörü: Spiramin T

Spiramin T *Spiraea japonica* var. *Acuta* (Rosaceae)'dan izole edilen bir atizin-tip diterpenoid alkaloiddir. Bu bitkiler geleneksel Çin tıbbında öksürük, baş ağrısı, diş ağrısı ve inflamasyon tedavisinde kullanıldığı gibi diüretik, analjezik ve detoksikan olarak da kullanılırlar. Li ve arkadaşları, nimodipin gibi spiramin T'nin de oksijen radikallerinin üretiminin azaltılması veya silinmesinin artması ile sonuçlarak, bazı Ca^{2+} kanallarını blokladığını belirlemişlerdir⁽¹⁴²⁾. Ama nimodipin serebrovasküler sistem için periferikvasküler sistemden daha spesifiktir. Daha sonra yapılan bir çalışmada, Li ve arkadaşları spiramin T'nin etkinliğinin, bir H_2O_2 süpürücüsü olan glutatyon peroksidazın (GSH-PX) etkinliğinin artmasına bağlı olduğunu belirlemişlerdir⁽¹⁴³⁾. Hem spiramin T hem de nimodipin nöronal Ca^{2+} seviyelerini azaltarak nitrik oksidaz (NOS) aktivitesini inhibe ederler. Ama spiramin T, NOS'un çok daha güçlü bir inhibitörüdür. Spiramin T'nin nöroprotektif etkileri, NOS etkinliğini azaltırken GSH-PX etkinliğindeki artıştan kaynaklanır.

α -1 Modülatörü: Dekstrometorfan

Dekstrometorfan (DM) [(+)-3-metoksi-17-metilmorfinan] opioid olmayan bir öksürük baskılayıcısı olarak tasarlanmış ve senelerdir bu amaçla kullanılmaktadır. DM ve onun majör metaboliti dekstrofanın (DX) her ikisi de σ -1 bölgesine bağlanırlar. DM, kainik asit (KA) ve BAY k-8644 (L-tip Ca^{2+} kanal blokeri) tarafından indüklenen nöbetlerin engellenmesinde DX'den daha etkindir⁽¹⁴⁴⁾. Bazı σ bölgeleri presinaptik olarak dopamin terminalinde yerleşiktir. Araştırmalar, DM'nin σ -1 bölgesine DX'den 2-5 kat daha fazla afinite ile bağlandığını ve en azından bir yüksek afinite bağlanma bölgesinin σ -1'e özdeş olduğunu göstermiştir. Bu durum DM'nin bulunma problemlerine neden olur⁽¹⁴⁵⁾. Bu yüksek afinite DM bölgeleri, sıklıkla NMDA reseptör katyon kanal kompleksinin aktive olmasıyla ilişkili olan yüksek afinite DX bölgelerinden farklıdır. Kim ve arkadaşları, DX'in, DM'nin antikonvülzif/nöroprotektif etkileri için gerekli olmadığını göstermişlerdir⁽¹⁴⁶⁾.

Ayrıca DM'nin KA tarafından indüklenen nörotoksositeyi, σ -1 bölgesini modüle ederek engellediği belirlenmiştir. Bu durum, DM'nin bazı nöbetlerin oluşmasını engelleyebileceğini gösterir.

AMPA Antagonisti: YM872

Günümüzde, iskemik inme tedavisinde kullanılan mevcut tek ilaç, 527 amino asit proteini olan trombolitik doku plazminojen aktivatörüdür (t-PA). t-PA'nın etkinliği NBQX gibi bir AMPA antagonistinin ilavesi ile artırılabilir. Yakın tarihte geliştirilen ikinci jenerasyon AMPA antagonisti, YM872 [(2, 3-diokso-7-(1H-imidazol-1-il)-6-nitro-1, 2, 3, 4-tetrahidrokuinoksalin-1-il)asetik asit) reseptör seçiciliği, potansi ve su çözünürlüğü gösterir, nörotoksik değildir ve nöronlar içine AMPA tarafından indüklenen Ca^{2+} enflaksının inhibisyonu ile etki gösterir. YM872'nin serebral enfarktüsli modellerde nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir⁽¹⁴⁷⁾. YM872 iskemik inmenin akut fazında etki gösterir ve bu yüzden t-PA ile beraber uygulandığında daha potenttir.

Ca^{2+} Kanal Blokeri: Vinkonat

Catharansus rosea'dan izole edilen vinka alkaloidlerinin nörolojik semptomlarda ve serebral dolaşımında etkileri vardır. Vinkristin ve vinblastin bazı kemoterapi protokollerinde kullanılmaktadır. Vinkonat serebral metabolizmayı düzenlemek için geliştirilmiş bir vinka türevidir. Araki ve arkadaşları, vinkonat'ın kan beyin bariyerini kolaylıkla geçtiğini ve hipokampusa ulaştığını belirlemişlerdir⁽¹⁴⁸⁾. İskemik nöronal hasarda protektif etki göstererek hipokampal CA1 nöronlarında doğrudan etki gösterebilir. Anormal Ca^{2+} birikmesini azaltır, böylece Ca^{2+} kanal inhibitör etkilerini gösterir. Araştırmalar, vinkonat'ın dopaminin anormal metabolizmasından kaynaklanan serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir⁽¹⁴⁹⁾.

Östrojen: Östradiol-17 β

En güçlü dişi cinsiyet hormonu östradiol-17 β [(17 β)-estra-1, 3, 5(10)-trien-3, 17-diol] çok sayıda etkinliğe sahiptir. Bunlardan birisi beyindeki aminojik bağlantıların gelişimidir. Rao ve Kölsch'ün gözden geçirmesi östradiol-17 β 'nin

nöroprotektif özelliklerini ve reseptörleri ve taşıyıcıları etkileyerek şizofrenideki etkilerini içermektedir⁽¹⁵⁰⁾.

Glikoprotein (GP) IIB/IIIA Antagonistleri: Absiksimab ve Tirofiban

Aktive edilmiş GP IIB/IIIA reseptörleri fibrinojen aracılığı ile trombosit agregasyonunu kolaylaştırır. Tirofiban gibi antagonistler azalmış mikrotrombüsten kaynaklanan enfarkt boyutunu azaltırlar. İnsan/fare rekombinant monoklonal antikorunun, kimerik Fab fragmanı olan absiksimabın da, akut inme tedavisinde etkili olduğu klinik bir çalışmada gösterilmiştir⁽¹⁵¹⁾. Tirofiban kullanılabılır bir ajan olmasına rağmen çok kısa yarılanma ömrüne (yaklaşık 2 saat) sahiptir. Yapılan bir çalışmada, tirofiban'ın enfarktın içine geçerek iskemik beyin dokusunu koruduğu gösterilmiştir⁽¹⁵²⁾.

Diğer Nöroprotektif Ajanlar

Mescengricin

Mescengricin *Streptomyces griseoflavus* 2853-SVS4'den izole edilen bir α -karbolindir. Cıvcıv primer mesensefalik nöronlarında L-glutamat toksisitesini azalttığı gösterilmiştir⁽¹⁵³⁾.

Staurosporin

Staurosporin, K-252a ve K252b mikrobik orijinli alkaloidlerdir, nörolojik büyüme faktörlerinin etkilerinin antagonistleri ve inhibitörleridir. Cheng ve arkadaşları, staurosporin, K-252a ve K252b'nin, siklik nükleotid kinazları, trozin kinazları ve protein kinaz C'yi inhibe etmek için çok düşük olan konsantrasyonlarda, nöronları glukoz deprivasyon tarafından indüklenen hasardan koruduğunu göstermişlerdir⁽¹⁵⁴⁾. H-7 gibi bilinen protein kinaz C inhibitörleri, bu proteksiyonu sağlamaz⁽¹⁵⁵⁾.

2- Araşidonoil Gliserol

2- Araşidonoil Gliserol (2-AG), beyinde ve periferde bulunan ve etkileri kısmen bilinen endojen bir kannabinoidtir. CB₁ kannabinoid reseptörü beyinde, CB₂ reseptörleri ise perifer dokularda bulunmaktadır. 2-AG'nin bazı ROT ve TNF- α 'nın

oluşumunu engellediği gösterilmiştir⁽¹⁵⁶⁾. Panikashvili ve arkadaşları, 2-AG'nin etki bölgesini araştırdıkları bir çalışmada, kannabinoid antagonisti olan SR 1741716A'nın 2-AG'nin protektif etkilerini geri çevirdiğini, bunun hem 2-AG hem de CB₁ reseptörünün nöroproteksiyonunda rol alabileceğini belirlediler⁽¹⁵⁷⁾. Ancak, 2-AG'nin protektif etkisini engellemek için yüksek doz antagonist gerekmesi nedeniyle 2-AG, CB₁ reseptörüne bağlanmayabilir.

Peptidler

Anneksinler

Nörotoksitede anneksinlerin katılımı ile nörodejeneratif hastalıklarda rolü Ca²⁺ ile düzenlenir, hücre ölümü/sağkalımı ise Bcl-2 ile düzenlenir⁽¹⁵⁸⁾.

Aktif Protein C (APC)

APC anti inflamatuvar bir faktör olmasının yanı sıra sistemik antikoagülan etkinliğe de sahiptir. İnmeli, iskemik yaralanmalı ve sepsisli hayvan modellerinde, organ hasarını azalttığı gösterilmiştir. APC'nin nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir⁽¹⁵⁹⁾. APC'nin hipoksik insan beyin endotelinde, pro-apoptotik Bax/Bcl 2 oranını normalize ederek, kaspaz-3 sinyalleşmesini azaltarak ve tümör süpresor protein p53'ü inhibe ederek apoptozu doğrudan engellediği bulunmuştur⁽¹⁶⁰⁾. Proteaz-aktif reseptör 1 (PAR-1) ve endotel protein C reseptörü (EPCR) endotel sitoproteksiyon için gereklidirler.

2.4 LEONTİCE SMİRNOWİİ

Fitoterapi

Fitoterapi, bitkilerin ve bitki ekstraktlarının (özellikle de normal diyetin bir parçası olmayan bitkilerin) tıbbi amaçlarla kullanımıdır. Geleneksel tıpta bitkilerin kullanılması ile ilgili ilk yazılı belgeler M.Ö. 3.000 yıllarında Ninova tabletlerinde bulunmuştur. Geleneksel Çin, Hint ve Mısır tıp uygulamalarında da bitkisel tedaviler kullanılmıştır. Yunan tıbbının önemli isimlerinden Eskulap ve modern tıbbın babası sayılan Hipokrat kitaplarında 400 civarında bitkisel ilaçtan bahsetmişlerdir. Ebu Reyhan, İbni Sina ve Al Gafani de bitkisel tıp konusunda önemli eserlere imza atmışlardır. Fitoterapi teriminin ilk kez, 1870-1953 yılları arasında yaşamış Fransız hekimi Henri Leclerc tarafından La Presse Medical adlı dergide kullanıldığı iddia edilmiştir. Günümüzde fitoterapi, Eczacılığın Farmakognozi ana bilim dalı altında ele alınmaktadır. Nöroprotektif ilaçların büyük bölümü potent aktiviteye sahipken, aynı zamanda bu ilaçların farklı ve ciddi yan etkileri de vardır. Bu nedenler kimyasal terapötik ilaçlar yerine daha az yan etkiye sahip doğal kaynaklı ajanlar tercih edilmelidir ⁽⁴⁾.

Berberidaceae

Berberidaceae sıklıkla barberry ailesi olarak adlandırılan 15 çeşit çiçekli bitkiden oluşan bir ailedir. Bu aile Ranuncules takımı içerisindedir. Aile yaklaşık 570 tür içerir, bu türlerin yaklaşık 450'si Berberis içerisindedir. Türler ağaçları, çalıları ve çok yıllık otsu bitkileri içerir. Berberidaceae cinsleri şunlardır:

- Achlys
- Berberis - Barberry
- Bongardia
- Caulophyllum
- Diphylleia
- Dysosma
- Epimedium
- Gymnospermium
- Jeffersonia - Twinleaf
- Leontice

- Mahonia
- Nandina
- Podophyllum - Mayapple
- Ranzania
- Vancouveria

Bazı kaynaklar Plagierhegma ve Sinopodophyllum'u da Berberidaceae cinsleri olarak kabul etmektedir.

Leontice

Leontice'nin 28 alt grubu vardır. Bunlar; Leontice alberti, Leontice alpina, Leontice apiifolia, Leontice armeniaca, Leontice brevibracteata, Leontice chrysogonia, Leontice chrysogonium, Leontice darwasica, Leontice eversmanni, Leontice incerta, Leontice kiangnanensis, Leontice leontopetaloides, Leontice leontopetalum, Leontice microrrhyncha, Leontice minor, Leontice odessana, Leontice oliverii, Leontice robusta, Leontice robustum, Leontice secunda, Leontice silvatica, Leontice smirnowii, Leontice tempskyana, Leontice thalictrifolium, Leontice thalictroides, Leontice triphylla ve Leontice vesicaria'dır. Sağlık alanında an fazla kullanılan Leontice türü, halk arasında arslan pençesi ve kırkbaş otu adıyla bilinen Leontice leontopetalum'dur. Sigarayı bıraktırıcı, bazı kanserleri önleyici, menopoz dönemi şikayetlerini önleyici ve epilepsi nöbetlerini engelleyici etkileri olduğu iddia edilmektedir.

Leontice leontopetalum ve onun alkaloid petalin klorürü gine domuzunun izole edilmiş düz kasında ve kalbinde test edilmiştir. Petalin klorürün düşük konsantrasyonlarının epinefrin ile kasılmış aortun gevşemesine, ileumun kasılmasına neden olduğu ve nefes borusunda hiçbir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarının aortun ve soluk borusunun sürekli geniş kasılmasına ve ileumun fazik kasılmalarının genişlemesinde artışa neden olmadığı saptanmıştır⁽¹⁶¹⁾.

Leontice kiangnanensis'in etanolik ekstresinin farede kulak inflamasyonu ve abdominal kapillerlerin geçirgenliğini inhibe ettiği gösterildi. Ayrıca sıçanların pamuk peletlerle indüklenmiş granülomanın proliferasyonunu ve pençe ödemi de inhibe ettiği bulundu⁽¹⁶²⁾.

Leontice Smirnowii

Leontice Smirnowii Gürcistan'ın doğu kısmında yetişen endemik bir bitkidir. Yumru kökleri geleneksel Gürcü tıbbında birkaç hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır⁽¹⁾.

LS rnlerinin, 1,1- difenil-2-pikril-hidrazil radikali, süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit süpürücü, indirgeyici gücü ve metal bağlayıcı etkinlikleri ile toplam antioksidan etkinlikleri gösterilmiştir⁽²⁾. Ayrıca LS'nin ham ekstresinin ve monodezmozlarının saflaştırılmış ekstresinin, önemli miktarda selüloz içeren bir kimyasal katkı maddesi olan karagenin (deniz yosunlarından üretilen, kıvam artırııcı ve emülgatör özellikleri olan bir madde) tarafından indüklenen inflamasyonun etkili inhibitörleri oldukları da gösterilmiştir ⁽³⁾.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız Abant İzzet Baysal Üniversitesi etik kurulu tarafından onaylandı (Bkz.Ek:1) ve çalışma süresince etik kurallara tümüyle uyuldu. Bu çalışmadaki amaç sıçan serebellum ve korteksinde LS'nin nörodejeneratif ve nöroprotektif etkilerini belirlemektir. Bu nedenle mutlaka canlı hayvan kullanılması gerekiyordu. Abant İzzet Baysal Tıp Fakültesi Etik Kurulu Yönergesi, Deney Hayvanları Araştırma İlkeleri ve 1974 Paris Hayvan Hakları Evrensel Bildirisi okunmuş ve imzalanmıştır. Mümkün olan en az sayıda hayvan kullanılmış, hayvanlara acı çektilmemiştir.

Bitki materyali Gürcistan'ın Shiraki bölgesinden toplandı (07.2000) ve karanlıkta kurutuldu. Kanıt numune Gürcistan Tiflis'de ki Farmakokimya Enstitüsü Farmakobotanik bölümünde tutulmaktadır. (Yumru kök No: 73700). Ezilmiş kökler (500 gram) MeOH ile ekstre edildi Konsantrasyondan sonra, sulu tabaka saponinlerin ham ekstresini elde etmek için BuOH ile muamele edildi (100 gram). %5 sulu KOH (5 ml) içinde saponinlerin ham ekstresi 90 dakika sızdırmaz tüpde 100°C'da ısıtıldı. %10'luk HCl (pH =5) ile nötralizasyondan sonra, prosapogeninler (monodezmozlar) BuOH ile ekstre edildi, 120 mg açık sarı toz monodezmoz elde edildi.

Toplamda, ağırlıkları 140-180 gram arasında değişen 5 Wistar albino sıçanı kullanıldı. Standart yiyecek ve musluk suyuyla beslendiler, 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüde 22°C oda ısısında tutuldular. Çalışmaya başlamadan hemen önce operasyon odasına getirilip eter anestezisi altında sakrifiye edildiler. Çıkarılan korteks ve serebellum, standart besiyer çözeltisi olan 3 ml DMEM'e (Dulbecco's modified eagle's medium) konuldu. Homojenizatör ile homojenize edildi ve vortekslendi. Doz belirlemesi sub-G1 faz DNA ekstraksiyonunda yatay agoroz jel elektroforezi kullanılarak yapıldı. Toksik doz belirlendikten sonra Sub-G1 faz DNA fragmentasyon testi ve TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin insitu nick-end labelling) boyama ile apoptozun varlığı, WST-1 metodu ile spektrofotometrik ölçüm yapılarak mitokondrial aktivite gösterildi.

Sub-G1 faz DNA fragmentasyon testi

Sub-G1 faz DNA fragmentasyonunda apoptozun varlığını saptamak için yatay %1,5'luk agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Bu yöntem agaroz jel içerisinde elektriksel alana maruz bırakılan, DNA ve RNA parçalarının büyüklüklerine göre ayrıştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Agaroz kırmızı bir alg türü olan agar agar'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür. Agarozların saflık dereceleri farklı olabilmektedir. Bu durum DNA'nın göç hızını etkiler. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu flüoresan etki göstermesi ile olur. Agaroz jel elektroforezinde apoptoz halinde kırılmalar görülür. Doz belirleme ve LS'nin nöroprotektif olup olmadığını belirlemek için yapılan test işlemleri aşağıda belirtildiği gibi uygulandı:

Doz belirlemek için:

- 10 seri 200 µL hücre homojenatı alındı. Bir tanesi kontrol olarak bırakılırken kalan 9 tanesi 3'erli olarak gruplandı. Bir seriye konsantrasyonu sırasıyla 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM olacak şekilde H₂O₂ ilave edildi. Diğer bir seriye konsantrasyonu sırasıyla 0,025 mM, 0,05 mM ve 0,1 mM olacak şekilde cisplatin ilave edildi. Son seriye ise 5 µL, 10 µL ve 20 µL LS ekstresi ilave edildi. LS çözeltisi, 30 mg LS monodekzmoz 1,5 mL DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde hazırlandı.
- 4.000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve saf su ile yıkandı.
- Her bir örneğe, 98 µL reaktif B ve 2 µL proteinaz K ile elde edilen 100 µL çözelti ilave edildi.
- 50°C'da 6 saat bekletildi.
- 100µL 25:24:1 oranında hazırlanmış fenol, kloroform, izoamilalkol çözeltisi eklendi. 10 saniye çalkalandı ve 11.000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki faz alındı.
- Yukarıdaki basamak tekrar edildi.

- 2 hacim %100'lük etanol ve 1/10 hacim 3M sodyum asetat pH:5,0 eklendi.
- 10 dakika 11.000 rpm devirde santrifüj edildi. Etanol alındı.
- 100µL %70'lik etanol eklendi. 11.000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildi. Etanol pipetlenerek ortamdan alındı.
- Elde edilen pellet kurutuldu.
- 100µL ultra saf H₂O ilave edildi. Milli Q ile 1,5 saat 56°C'da arada vortekslenerek homojenize edildi.
- Jele 4µL boya ve 6µL homojenat olarak ekildi.
- 70 V akım altında 60 dakika %1,5'luk agaroz jelde yürütüldü.
- Lambda marker için 1µL DNA ladder, 1µL boya ve 4µL su ile hazırlanan karışım yürütüldü.
- Wealtec marka dolphin UV görüntüleyici ile görüntülendi.

LS'nin nöroprotektif etkisini test etmek için:

- 10 seri 200 µL hücre homojenatı alındı ve iki gruba bölündü. Her bir seride birer tanesi kontrol olarak bırakıldıktan sonra bir seride kalan dört örneğe konsantrasyonu 1mM olacak şekilde H₂O₂ ilave edildi. Toksik etkinin görülmesi için 37°C'da 30 dakika bekletildikten sonra üç örneğe sırasıyla 1µL, 3µL ve 5µL LS eklendi. Diğer seride kalan dört örneğe konsantrasyonu 0,1mM olacak şekilde CP ilave edildi. Toksik etkinin görülmesi için 37°C'da 30 dakika bekletildikten sonra üç örneğe sırasıyla 1µL, 3µL ve 5µL LS eklendi.
- 4.000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve saf su ile yıkandı.
- Her bir örneğe, 98µL reaktif B ve 2µL proteinaz K ile elde edilen 100µL çözelti ilave edildi.
- 50°C'da 6 saat bekletildi.
- 100µL 25:24:1 oranında fenol, kloroform, izoamilalkol çözeltisi eklendi. 10 saniye çalkalandı ve 11.000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki faz alındı.
- Yukarıdaki basamak tekrar edildi.
- 2 hacim %100'lük etanol ve 1/10 hacim 3M sodyum asetat pH:5,0 eklendi.

- 10 dakika 11.000 rpm devirde santrifüj edildi. Etanol alındı.
- 100µL %70'lik etanol eklendi. 11.000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildi. Etanol pipetlenerek ortamdan alındı.
- Elde edilen pellet kurutuldu.
- 100µL ultra saf H₂O ilave edildi. Milli Q ile 1,5 saat 56°C'da arada vortekslenerek homojenize edildi.
- Jele 4µL boya ve 6µL homojenat olarak ekildi.
- 70 V akım altında 60 dakika %1,5'luk agaroz jelde yürütüldü.
- Wealtec marka dolphin UV görüntüleyici ile görüntülendi.

TUNEL boyama

TUNEL yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya plakalara ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozun varlığı bu metodla saptanabilir. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinukleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nukleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Işık mikroskopu altında incelemede apoptotik hücreler boyanmış olarak görünür. Testte Promega marka dead end kolorimetrik TUNEL boyama ekipmanı kullanıldı Test işlemleri aşağıda anlatıldığı gibi uygulandı:

- 6 adet hücre çözeltisi hazırlandı;
 - i 100µL hücre homojenatı + 900µL DMEM
 - ii 100µL hücre homojenatı + 5µL Cisplatin + 895µL DMEM
 - iii 100µL hücre homojenatı + 50µL H₂O₂ + 850µL DMEM
 - iv 100µL hücre homojenatı + 25µL LS + 875µL DMEM
 - v 100µL hücre homojenatı + 50µL H₂O₂ + 25µL LS + 825µL DMEM
 - vi 100µL hücre homojenatı + 5µL cisplatin + 25µL LS + 870µL DMEM
- Hücreler santrifüj edildi ve 1 x PBS ile iki sefer yıkandı.

- 50µL PBS eklenip polilizinli lamlara yayıldılar. 15 dakika kurutuldular.
- 2 defa PBS ile yıkandı.
- %10'luk tampon formaldehid ile 25 dakika şaleye koyuldular.
- PBS ile 5 dakika bekletildiler. Bu işlem tekrarlandı.
- Fazla sıvı alındı. 100µL denge tamponuyla lamlar kaplandı ve 5-10 dakika oda ısısında bekletildi.
- Kurutma kağıdıyla fazla denge tamponu alındı ve rTdT reaksiyon karışımı konuldu.
- Üzeri kapatıldı ve 60 dakika 37°C'da tutuldu.
- 2 x SSC (300 mM sodyum klorür ve 30 mM sodyum sitrat, pH 7,4) içinde şaleye konuldu ve 15 dakika bekletildi.
- PBS ile 3 sefer 5 dakika yıkandı.
- %0,3 'lük H₂O₂'da (PBS içinde) 3-5 dakika bekletildi.
- PBS ile 3 sefer 5 dakika yıkandı.
- 1:500 olacak şekilde Streptavidin HRP (horseradish peroxidase-labeled streptavidin) PBS içinde çözüldü, bu çözeltiden her bir lama 100 µL eklendi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
- PBS ile 3 sefer 5 dakika yıkandı.
- 100µL DAB (3,3'-diaminobenzidine) çözeltisi (Çözelti için 50µL DAB substrat 20x tampona 950µL deiyonize su eklendi. Bu çözeltiye 50µL DAB 20x chromogen ve 50µL %30'luk H₂O₂ ilave edilerek hazırlandı) lamlara koyuldu ve 10 dakika bekletildi.
- Deiyonize su ile 3-4 sefer yıkanıldı.
- Etrafı oje ile işaretlenip entellan ortama konuldu.
- Kurutulduktan sonra OLYMPUS marka ışık mikroskobu ile incelendi.

WST-1

WST-1 testi mitokondrilerdeki veya hücrelerdeki dehidrojenaz enzim aktivitesini gösteren bir testtir. WST-1 elektron bağlayabilen ajan içeren bir çeşit tetrazolyum boyasıdır. Mitokonriyal dehidrojenaz tarafından 490 nm'deki absorbansda izlenen formazan boyasına dönüşür. Absorbansı canlı hücre sayılarıyla

güçlü bir korelasyona sahiptir. Benzer testler olan MTT ve XTT testlerinden daha duyarlıdır. WST-1 testinde canlı hücre sayısı arttıkça absorbans değeri daha yüksek çıkmaktadır. Test işlemleri aşağıda anlatıldığı gibi uygulandı:

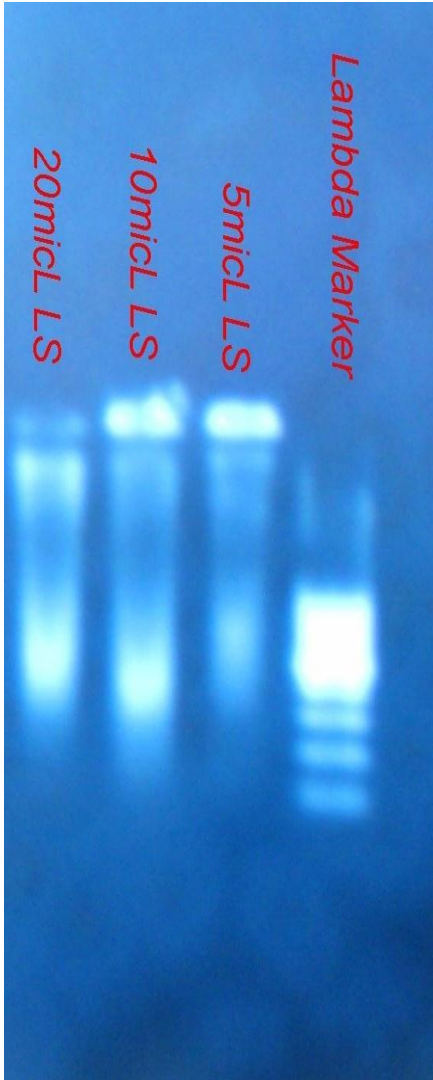
- Beşerli iki grup hücre çözeltisi hazırlandı. Birinci grupta bütün testler için 100µL hücre homojenatı koyuldu. Birinci örnek kontrol için bu şekilde bırakıldı. Diğer dört örneğe konsantrasyonu 0,1mM olacak şekilde cisplatin eklendi. Toksik etkinin görülmesi için 30 dakika beklendikten sonra üçüncü örneğe 1µL, dördüncü örneğe 3µL beşinci örneğe 5µL LS eklendi. İkinci grupta bütün testler için 100µL hücre homojenatı koyuldu. Birinci örnek kontrol için bu şekilde bırakıldı. Diğer dört örneğe konsantrasyonu 1mM olacak şekilde H₂O₂ eklendi. Toksik etkinin görülmesi için 30 dakika beklendikten sonra üçüncü örneğe 1µL, dördüncü örneğe 3µL beşinci örneğe 5µL LS eklendi.
- Örnekler 24 saat oda ısısında bekletildi.
- Bütün örneklerle 10µL WST-1 çözeltisi ilave edildi.
- 4 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'li ortamda arada vorteksenerek bekletildi.
- 4.000 rpm devirde 6 dakika santrifüj edildi.
- Mikroplate kuyucuklara 20µL çözeltilerden koyuldu.
- Bio-Rad Benchmark Plus mikroplate spektrofotometre ile 480 nm'de 690 nm referans olarak absorbans ölçümleri yapıldı.
- Üçer farklı seri için ölçümler yapıldı, her ölçüm kontrol amaçlı iki sefer tekrarlandı.

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS-11.0 programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler, ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. Veri sayısının az olması nedeniyle istatistiksel değerlendirmede nonparametrik test olan Friedman testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

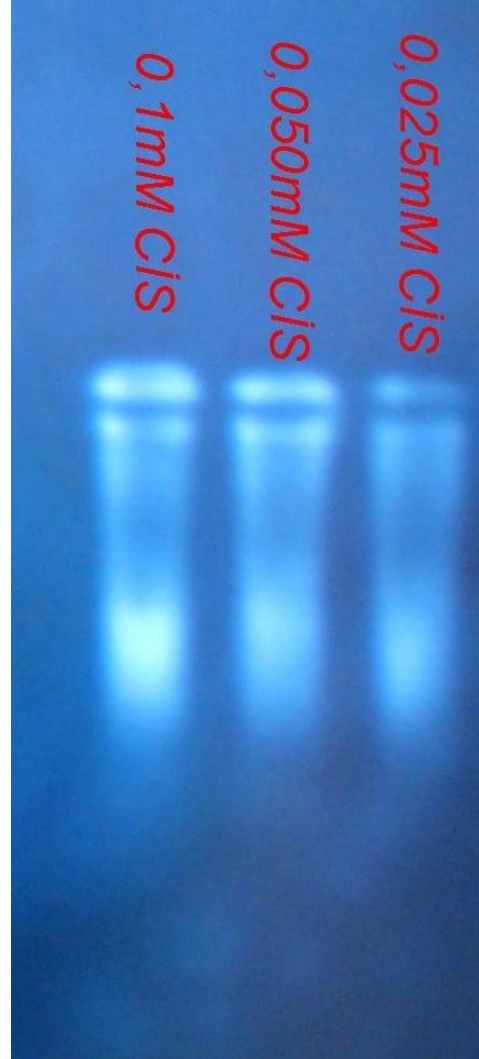
4. BULGULAR

Yatay agaroz jel elektroforezi kullanılarak, *Leontice Smirnowii*'nin nörodejeneratif olup olmadığını belirlemek ve H_2O_2 ile cisplatin'in (CP) nörodejeneratif dozları araştırıldı. Bu çalışmada LS'nin herhangi bir nörodejeneratif etkisi saptanmazken, CP için 0,1mM dozu, H_2O_2 için ise 1mM dozu nörodejeneratif doz olarak saptandı.

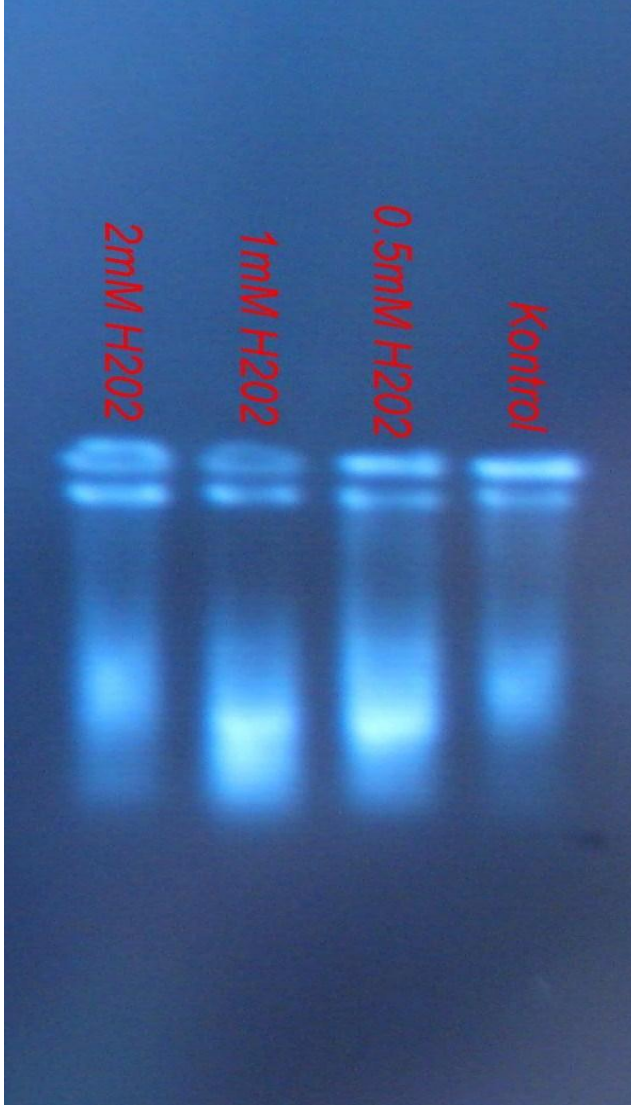
Şekil 4.1'de LS için, şekil 4.2'de CP için ve şekil 4.3'de ise H_2O_2 için doz cevap görüntüsü izlenmektedir. LS için olan görüntüde DNA kırığı görülmezken, CP için olan görüntüde 0,1mM konsantrasyonunda DNA hasarı belirgin bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.1: LS için doz cevap görüntüsü.



Şekil 4.2: CP için doz cevap görüntüsü.



Şekil 4.3: H_2O_2 için doz cevap görüntüsü.

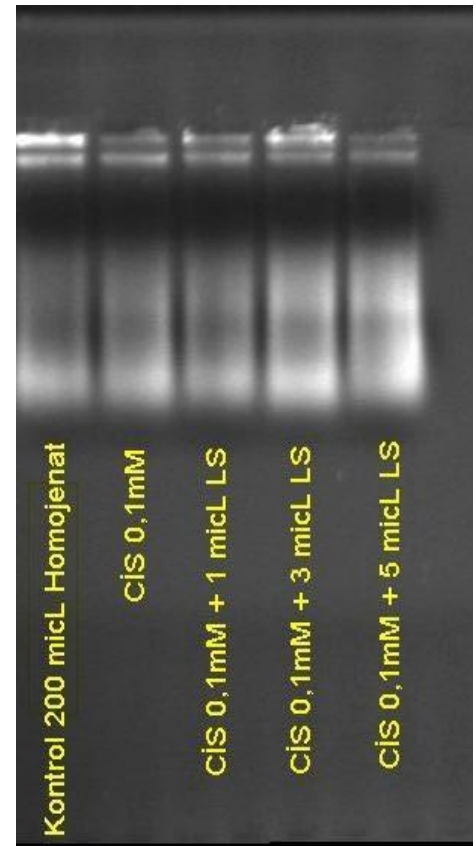
1mM konsantrasyonda belirgin olarak DNA hasarı görülmektedir.

CP ve H₂O₂ toksisitesine karşı LS'nin koruyucu etkisinin olup olmadığını ve eğer varsa dozlarını belirlemek amacıyla yatay agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Sub-G1 faz DNA fragmentasyon testi sonucunda; H₂O₂ toksisitesi için LS'nin herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığı saptandı. CP toksitesi için ise 1µL dozunda LS eklendiğinde hafif bir koruyucu etki görülürken, bu etkinin artan LS dozlarında bu etkinin kaybolduğu görüldü.

Şekil 4.4'de H₂O₂ ve şekil 4.5'de CP için LP'nin koruyuculuk görüntüleri izlenmektedir.



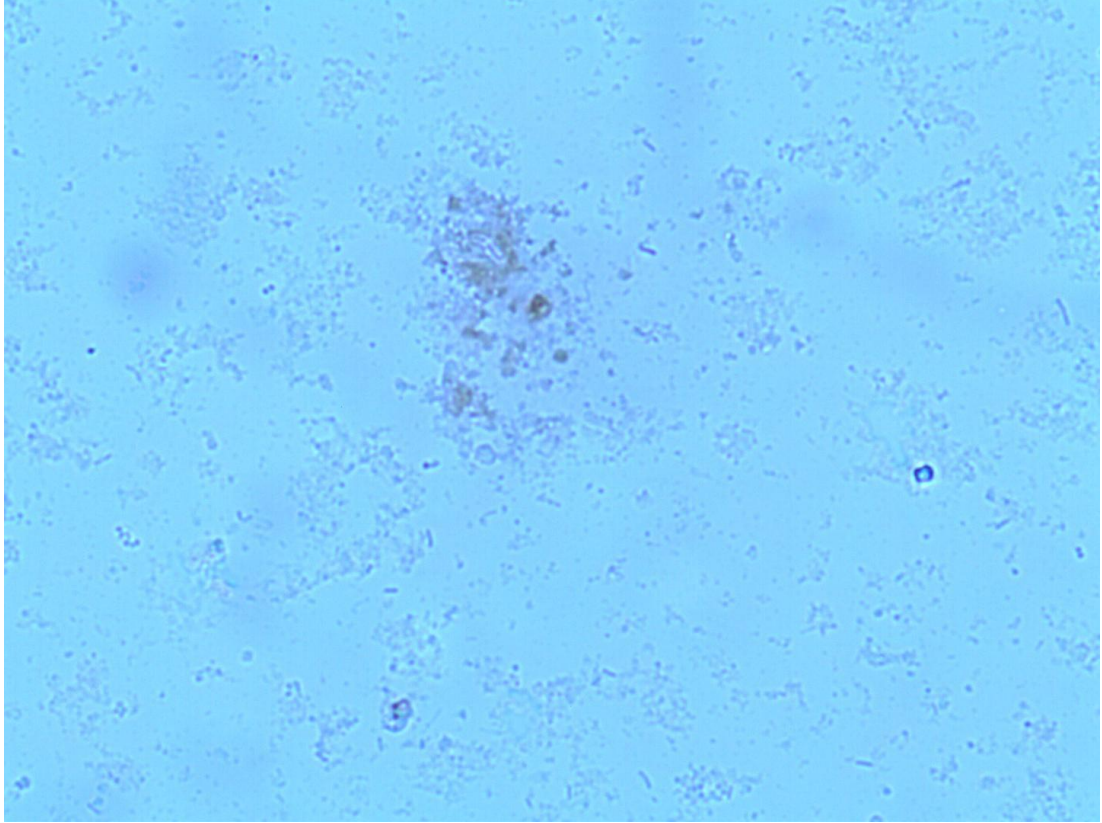
Şekil 4.4: H₂O₂ için LS koruyuculuk çalışma görüntüsü.



Şekil 4.5: CP için LS koruyuculuk çalışma görüntüsü.

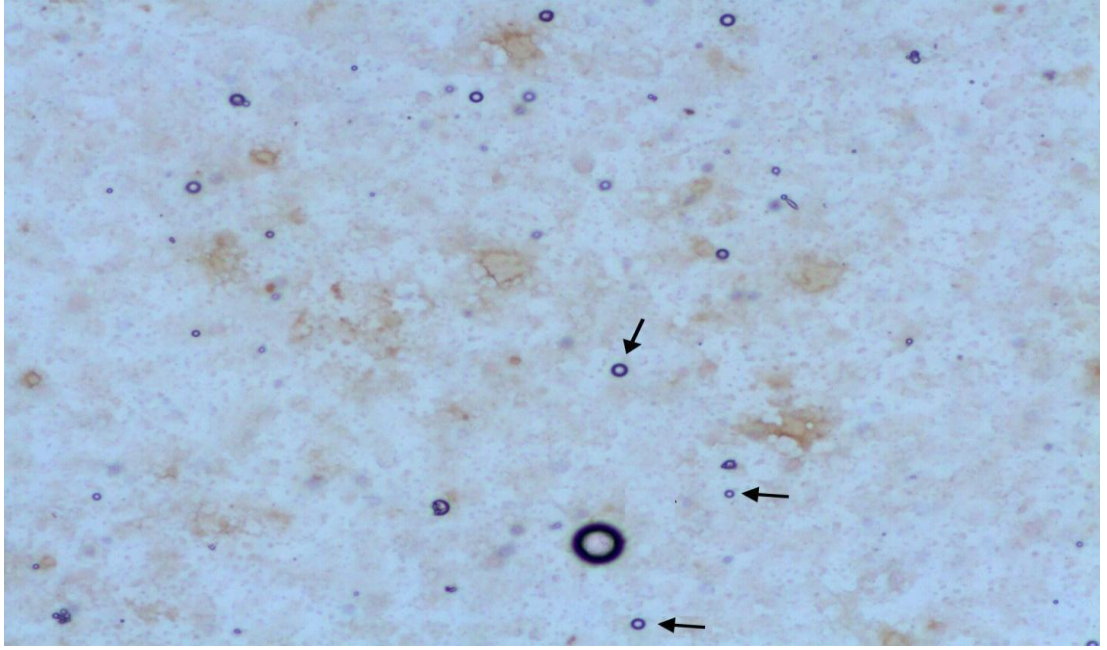
TUNEL Boyama

Apoptotik hücre ölümünü göstermek amacıyla TUNEL boyama tekniği de kullanıldı. Aşağıdaki şekillerde apoptotik hücrelerle ilgili görüntüler izlenmektedir.

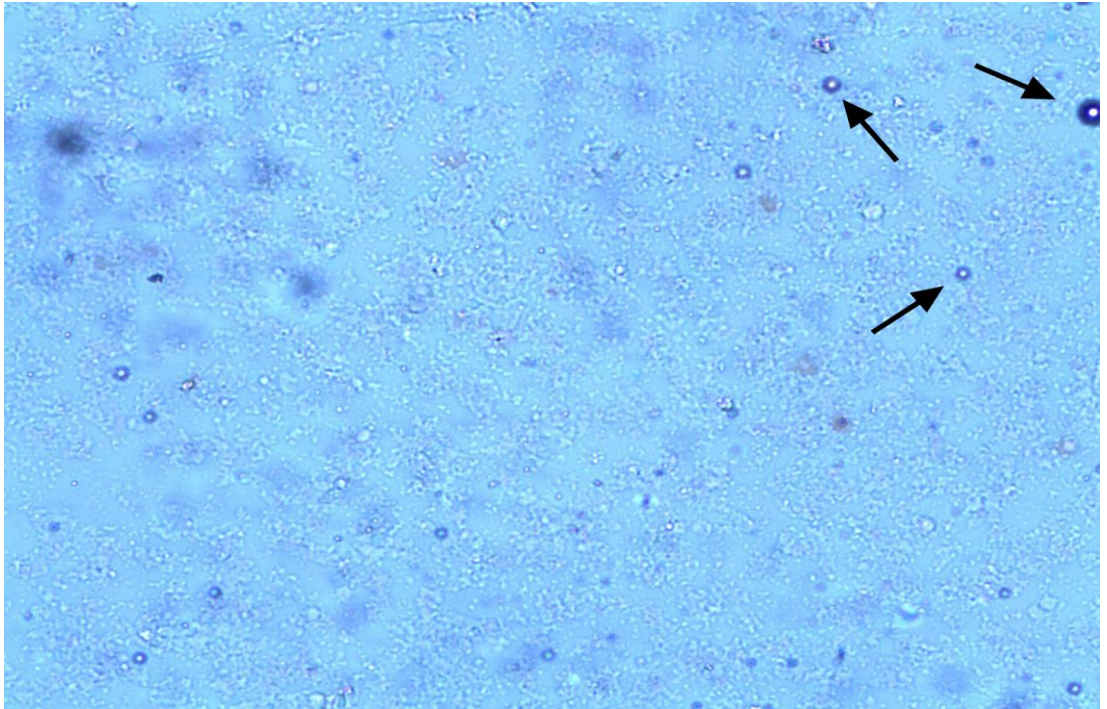


Şekil 4.6: 100µL hücre homojenatı + 900 µL DMEM TUNEL görüntüsü.

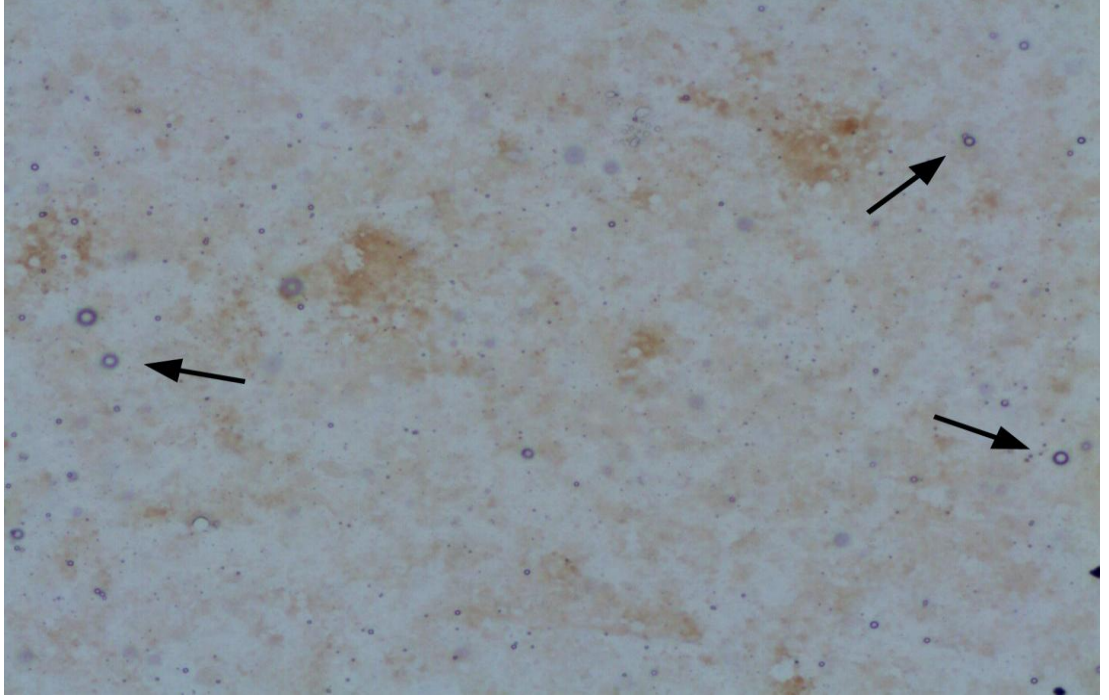
Apoptotik hücre görülmedi.



Şekil 4.7: 100 μ L hücre homojenatı + 5 μ L CP + 895 μ L DMEM TUNEL görüntüsü.
Apoptotik hücreler resimde okla gösterildi.

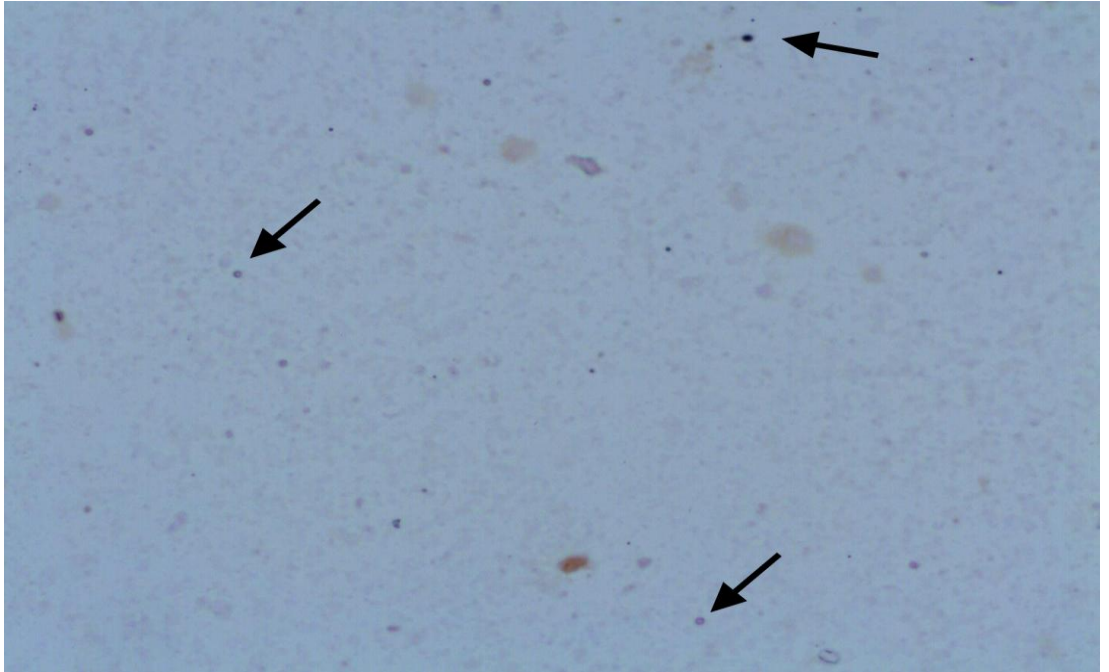


Şekil 4.8: 100 μ L hücre homojenatı + 5 μ L CP + 25 μ L LS + 870 μ L DMEM TUNEL
görüntüsü.
Apoptotik hücreler resimde okla gösterildi.



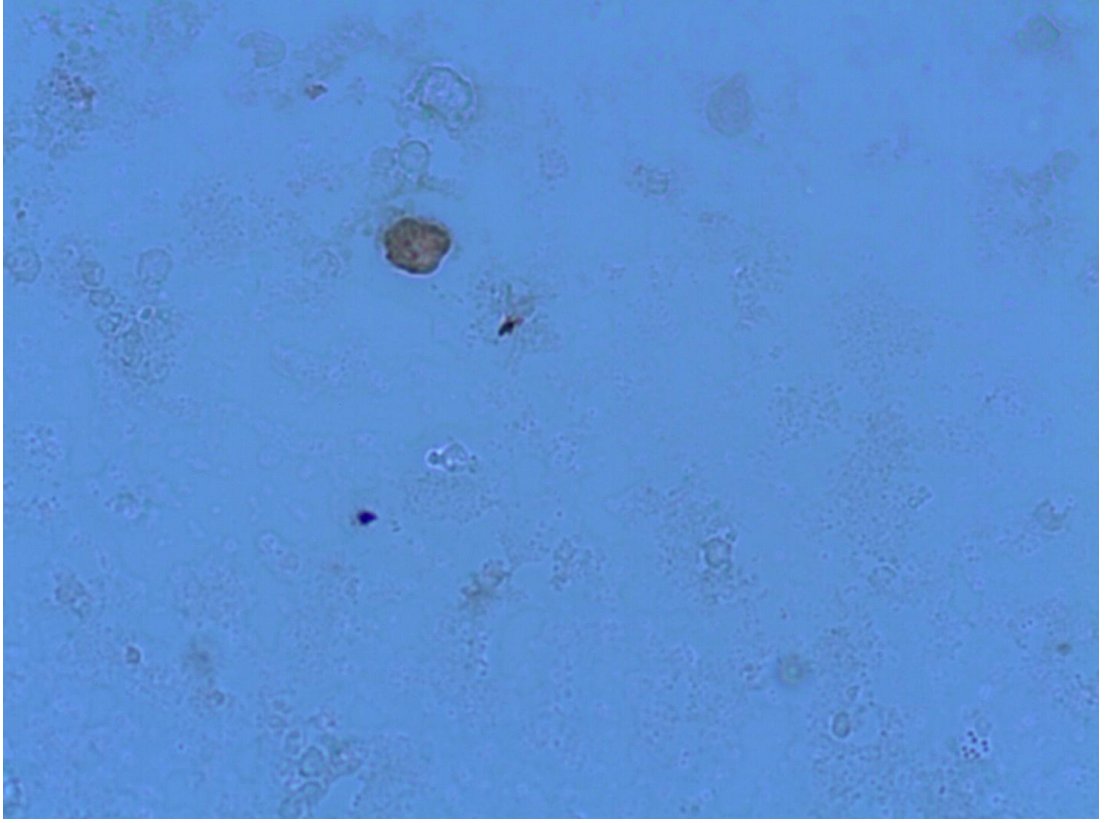
Şekil 4.9: 100µL hücre homojenatı + 50µL H₂O₂ + 850 µL DMEM TUNEL görüntüsü

Apoptotik hücreler resimde okla gösterildi.



Şekil 4.10: 100µL hücre homojenatı + 50µL H₂O₂ + 25µL LS + 825 µL DMEM TUNEL görüntüsü.

Apoptotik hücreler resimde okla gösterildi.



Şekil 4.11: 100µL hücre homojenatı + 25µL LS + 875 µL DMEM TUNEL görüntüsü.

Apoptotik hücreler görülmedi.

WST-1 testi

Hücre yaşayabilirliğini mitokondriyal aktivite yoluyla göstermek amacıyla WST-1 tekniği kullanıldı. Elde edilen absorbans sonuçlarının ortalaması alındı. Kontrol için absorbans değeri 100 kabul edilerek toksik madde ve LS ilavelerinden sonra absorbanslarda oluşan değişim yüzde (%) olarak hesaplandı. Tablo 4.1’de H₂O₂ ile Tablo 4.2’de CP ile yapılan WST-1 testlerinde elde edilen sonuçlar gösterilmiştir.

Tablo 4.1: H₂O₂ ile yapılan WST-1 testinden elde edilen değerler.

	Kontrol	1 mM H ₂ O ₂	1 mM H ₂ O ₂ + 1µL LS	1 mM H ₂ O ₂ + 3µL LS	1 mM H ₂ O ₂ + 5µL LS
Ortalama Absorbans	2,63633	1,48050	1,36050	1,417	1,14133
% Absorbans	100	56,16	51,61	53,75	43,29
% değişim	-	-43,84	-48,39	-46,25	-56,71

Hücre yaşayabilirliği arttıkça elde edilen absorbans değeri daha yüksek çıkmaktadır. Kontrol hücrelerinde absorbans değerleri yüksek iken H₂O₂ ilavesiyle bu değerler düşmüştür. LS eklenmesi herhangi bir düzeltici etki göstermemiştir.

Tablo 4.2: CP ile yapılan WST-1 testinden elde edilen değerler.

	Kontrol	1 mM CP	0,1 mM CP + 1µL LS	0,1 mM CP + 3µL LS	1 mM CP + 5µL LS
Ortalama Absorbans	2,49350	1,61317	2,07200	1,44300	1,18167
% Absorbans	100	64,69	83,09	57,87	47,39
% değişim	-	-35,31	-16,91	-42,13	-52,61

Elde edilen absorbans değeri hücre yaşayabilirliği arttıkça daha yüksek çıkmaktadır. Kontrol hücrelerinde absorbans değerleri yüksek iken CP ilave edilince bu değerler düşmüştür. 1µL dozunda LS eklenmesi hücre yaşayabilirliğinde bir artış saptanırken dozun artırılması ile bu etki ortadan kalkmıştır.

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4.3’de H₂O₂ ve Tablo 4.5’de CP için verilmiştir.

Tablo 4.3: H₂O₂ ile yapılan testten elde edilen veriler.

	N	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	6	2,63633	0,327497	2,362	3,051
H ₂ O ₂	6	1,48050	0,232287	1,292	1,823
H ₂ O ₂ +1 ml LS	6	1,36050	0,396338	,979	1,904
H ₂ O ₂ +3 ml LS	6	1,41700	0,338990	1,099	1,870
H ₂ O ₂ +5 ml LS	6	1,14133	0,337275	,715	1,465

Tablo 4.4: H₂O₂ ile yapılan test sonucu elde edilen verilerin Friedman testi ile değerlendirilmesi.

N	6
Chi-Square	20,133
df	4
Asymp. Sig. (p)	,000

H₂O₂ ile yapılan çalışmada kontrol hücre homojenatı, H₂O₂ eklenmiş hücre homojenatı ve LS eklenmiş H₂O₂’lu hücre homojenatları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı (p<0.05).

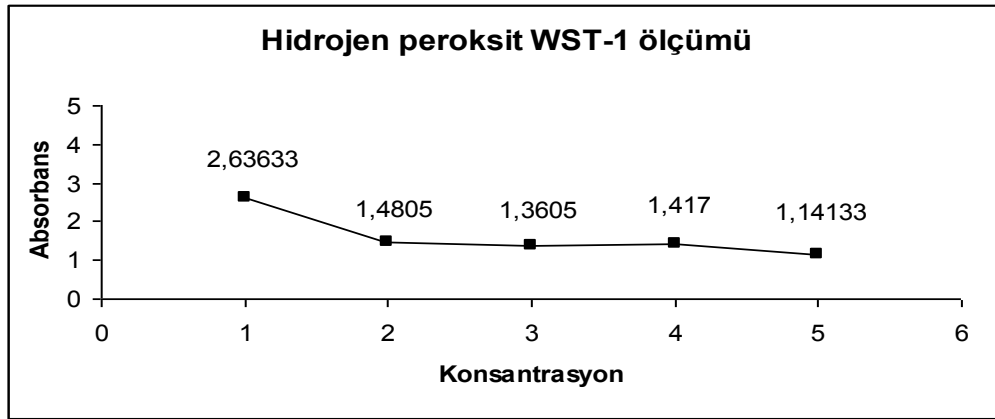
Tablo 4.5. CP ile yapılan testten elde edilen veriler.

	N	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	6	2,49350	,434595	2,131	3,051
CP	6	1,61317	,276608	1,273	1,882
CP +1 ml LS	6	2,07200	,086930	1,967	2,192
CP +3 ml LS	6	1,44300	,100564	1,307	1,551
CP +5 ml LS	6	1,18167	,108271	1,103	1,329

Tablo 4.6: CP ile yapılan test sonucu elde edilen verilerin Friedman testi ile değerlendirilmesi.

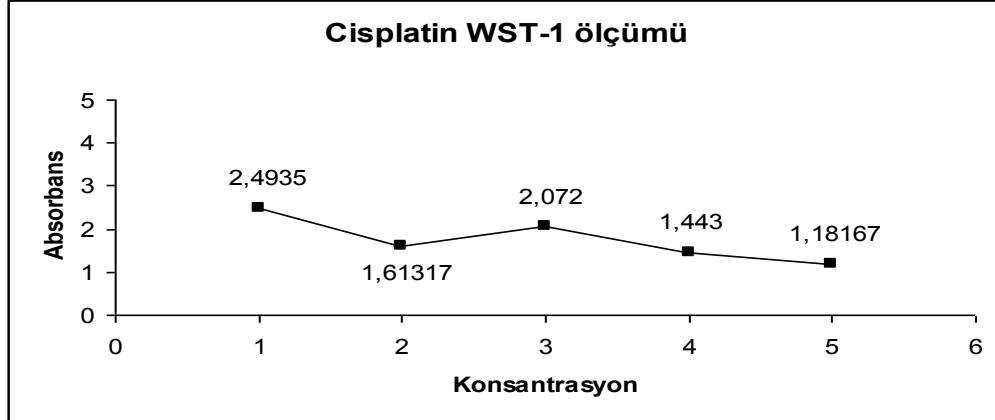
N	6
Chi-Square	18,267
df	4
Asymp. Sig. (p)	,001

CP ile yapılan çalışmada kontrol hücre homojenatı, CP eklenmiş hücre homojenatı ve LS eklenmiş CP’li hücre homojenatları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı (p<0.05).



Şekil 4.12: H₂O₂ için WST-1 absorban ölçüm grafiği.

Konsantrasyon ekseninde 1 noktası kontrol, 2 noktası 1mM H₂O₂, 3 noktası 1mM H₂O₂ + 1µL LS, 4 noktası 1mM H₂O₂ + 3µL LS ve 5 noktası 1mM H₂O₂ + 5µL LS konsantrasyonuna denk gelmektedir. Grafikte görüldüğü gibi hücre homojenatına H₂O₂ eklenmesi ile absorbansta önemli bir düşüş meydana gelirken, LS ilavesi absorbansta önemli bir değişiklik oluşturmamaktadır.



Şekil 4.13: CP için WST-1 ölçümü grafiği.

Konsantrasyon ekseninde 1 noktası kontrol, 2 noktası 0,1mM CP, 3 noktası 1mM CP + 1µL LS, 4 noktası 0,1mM CP + 3µL LS ve 5 noktası 0,1mM CP + 5µL LS konsantrasyonuna denk gelmektedir. Grafikte görüldüğü gibi hücre homojenatına CP eklenmesi ile absorbansta önemli bir düşüş meydana gelmektedir. 1µL LS ilavesi absorbansta bir düzelme meydana getirirken LS'nin dozunun artırılması bu etkiyi ortadan kaldırmaktadır.

5.TARTIŞMA

Nörodejenerasyon nöronların ölümünü de içeren, nöronların fonksiyonlarının veya yapısının ilerleyici kaybıyla karakterize bir tablodur⁽⁸⁾. Normal yaşlanma sırasında da nöron kayıpları görülmektedir ancak nörodejeneratif hastalıklarda ki nöron kaybı, normal yaşlanma sırasında görülenden daha fazladır⁽⁹⁾.

Nöronal hücrelerin ölümüne neden olan ve bu yolla nörodejeneratif hastalıklara yol açan farklı mekanizmalar bilinmektedir. Bu mekanizmalar; nekroz, apoptoz, otofajik hücre ölümü ve eksitotoksisiteyi içermektedir. Bizim çalışmamızda nörodejenerasyon için apoptotik hücre ölümü çalışıldı.

Nekroz dışarıdan gelen hasarla meydana gelen hücre ölüm şeklidir. Programlanmış bir ölüm değildir. Tanımlanabilen herhangi bir biyokimyasal yolak olmaması nedeniyle terapötik müdahaleye imkan tanımaz.

Apoptoz programlanmış hücre ölümünün ana biçimlerinden birisidir. Memeli hücrelerinde tanımlanmış iki apoptoz yolağı vardır. Ekstrinsik apoptotik yolak, hücre dışındaki faktörlerin hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerini aktive etmeleriyle meydana gelir. Bu, kaspaz 8 veya 10'un aktivasyonu ile gerçekleşir⁽¹⁶⁾. İntrinsik apoptotik yolak ise kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olan, sitokrom c'nin mitokondriyal salınımı veya endoplazmik retikulum işlev bozukluğuna bağlıdır^(11,12). Apoptoz, yolaktaki farklı noktalarda düzenlenebilir⁽¹⁷⁾.

Eksitotoksite sadece nöronal hücrelere özgü bir ölüm şeklidir. İskemi sırasında, ATP'nin azalmasıyla meydana gelir. Eksitotoksisitenin meydana gelmesi için hem apoptozun hem nekrozun aktivasyonu gerektiği için ayrı bir hücre ölüm şekli olup olmadığı tartışmalıdır⁽²⁰⁾.

Otofaji kelimesinin Yunanca anlamı “kendini yeme”dir. Hücrenin, kendi salgıladığı enzimlerle yok olması anlamına gelmektedir.

Nörodejeneratif hastalıkların pek çok tipi tanımlanmıştır. Bunların en önemlileri; Parkinson, Alzheimer, Huntington ve Amyotrofik Lateral Skleroz hastalığıdır.

Alzheimer, en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Ortalama olarak 65 yaşın üzerindeki kişilerde %10 oranında görülürken. 85 yaşın üzerinde bu oran %50'ye çıkmaktadır. Bu hastalıkta nöronal hücre ölümüne neyin neden olduğu tam olarak bilinmemektedir.

En yaygın ikinci nörodejeneratif hastalık Parkinson hastalığıdır. Elli yaş üzerindeki kişilerde görülme oranı %1 iken yaşla birlikte bu oran artmakta ve 85 yaş üzerinde bu %50'ye çıkmaktadır.

Huntington hastalığı, genetik geçiş gösteren bir hastalık olup görülme sıklığı 5/100.000'dir. Genellikle 30-50 yaşları arasında görülmekte olup semptomların ortaya çıkmasından sonraki 4-20 yıl içerisinde hasta kaybedilmektedir.

Amyotrofik Lateral Skleroz'un görülme sıklığı 1/100.000 – 3/100.000 olup genellikle 55 yaş üzeri erkeklerde görülmektedir. Beklenen yaşam süresi tanıdan sonra 2-5 yıldır.

Nörodejeneratif hastalıklar, hastanın ve hasta yakınlarının yaşam kalitesini düşürmektedir. Günümüzde bu hastalıklarda ki ortalama yaşam süresinin uzaması ile birlikte hem ailede ki hem de sağlık sisteminde ki ekonomik giderlerde önemli artışa neden olmaktadır. Ayrıca hem hastalarda hem de yakınlarında birtakım psikolojik problemler ortaya çıkarmakta, bu da mali yükün artmasına neden olmaktadır.

Hemen hemen nörodejeneratif hastalıkların hiçbirisinin kesin tedavisi olmamakla birlikte hastaların yaşam kalitelerini artırmak ve yaşam sürelerini uzatmak için çok sayıda ilaç kullanılmaktadır. Bu ilaçların bazıları şunlardır; memantin, IGF-I, izofloran, dopaminerjik koruyucu ajanlar, ONO-2506, polifenoller, sodyum salisilat ve aspirin, brimonidin, timolol, MCI-9042, siklosporin A, melatonin, nikotin, asetilkolin, huperzin A, α - tokoferol, WR-2721, quercetin flavonoidleri, uncaria alkaloidleri, kabergolin, spiramin T, dekstrometorfan, YM872, vinkonat, östradiol-17 β , absiksimab, tirofiban, mescengricin, staurosporin, 2- arasıdonoil gliserol, anneksinler ve aktif protein C.

Bu ilaçların bir kısmının güçlü nöroprotektif etkilerinin olmasının yanında ciddi yan etkileri de bulunmaktadır. Bu nedenle kimyasal sentezle elde edilen ilaçlar yerine, yan etkileri daha az olan bitkisel kaynaklı ekstraktların kullanımı tercih edilmektedir. Antioksidan ilaçların sıklıkla nöroprotektif etkilerinin de olduğu daha önce de bilinmektedir. Çalışmamızda kullanılan LS'nin antioksidan etkisi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle biz çalışmamızda bitkisel kaynaklı LS'nin nöroprotektif etkilerini araştırdık.

Nöroprotektif etkisini araştırmadan önce, LS'nin nörodejeneratif olup olmadığının gösterilmesi gerekiyordu. Bu amaçla Sub-G1 faz DNA fragmentasyon

testi kullanıldı. Bu test ile LS'nin herhangi bir DNA kırığı oluşturmadığı saptandı (bkz. Şekil 4.1). DNA kırığı saptanmaması, LS'nin herhangi bir nörodejeneratif etkisinin olmadığını gösteriyordu.

Daha sonra nörodejenerasyona neden olduğu bilinen ve bu nedenle çalışmamızda nörodejeneratif ajan olarak kullanılan H_2O_2 ve CP'nin nörodejenerasyona neden olan dozlarını saptamak amacıyla yine Sub-G1 faz DNA fragmentasyon testi kullanıldı. H_2O_2 için nörodejeneratif dozun 1mM (Bkz. Şekil 4.3) ve CP için bu dozun 0,1mM olduğu saptandı (Bkz. Şekil 4.2).

Belirlenen dozlar kullanılarak oluşturulan nörodejenerasyonda farklı dozlarda LS kullanılarak yapılan çalışmayla LS'nin nöroprotektif etkisinin olup olmadığı ve eğer varsa bu etkinin dozla ilişkili olup olmadığı incelendi. Bunun için üç farklı test kullanıldı, DNA fragmentasyonu için Sub-G1 faz DNA fragmentasyon ve TUNEL boyama testi, hücre yaşayabilirliğini incelemek için de WST-1 testi uygulandı.

Sub-G1 faz DNA fragmentasyon testinde LS'nin H_2O_2 toksisitesinde herhangi bir koruyucu etkisi saptanmazken (Bkz. Şekil 4.4) CP toksisitesinde, 1 μ L dozunda LS kullanıldığı zaman koruyucu etkisinin olduğu saptandı. Fakat LS dozu artırıldığında bu koruyucu etkinin de ortadan kalktığı gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.5).

Bu sonucu doğrulamak amacıyla TUNEL boyama testi de kullanıldı. Test sonucunda elde edilen görüntüler incelendiğinde elde edilen sonuçların, Sub-G1 faz DNA fragmentasyon testi ile uyumlu olduğu görüldü. Kontrol amacıyla sadece hücre homojenatı kullanılan ve yalnızca LS ilave edilen örnekler dışında, diğer bütün örneklerde apoptotik hücreler gözlemlendi. Test niceliksel değil niteliksel amaç için yapıldığından herhangi bir sayısal karşılaştırma yapılmadı.

Hücre yaşayabilirliğini test etmek amacıyla WST-1 testi kullanıldı. Bu testte sayısal sonuçlar elde edilmesi nedeniyle değerlendirilmesi daha kolaydı. Testte her bir toksik madde için 3 farklı seri hücre homojenatı kullanıldı ve her bir seri için 2 ölçüm yapıldı. Sonuç olarak toksik maddelerin her ikisi için de toplam 6'şar adet veri elde edildi. Bu ölçümlerin her birisi, kendi içinde ve kullanılan diğer iki test sonuçlarıyla uyumluydu. Kontrol hücre homojenatı 100 kabul edilerek toksik madde ve LS ilaveleri yüzde olarak hesaplandı. Bu hesaplama sonucunda H_2O_2 ve CP için mitokondriyal aktivite yoluyla gösterilen hücre yaşayabilirliğinde yüksek oranda azalma olduğu belirlendi. Sonuçların istatistiksel analizleri için verilerin ortalamaları

ve standart sapmaları hesaplandı. Elde edilen ortalamalar esas alınarak çizilen grafik de bunu desteklemektedir. Son olarak elde edilen verilere Friedman testi uygulandı. Bu test sonucunda her iki seri için de p değeri 0,05'den küçük bulundu. Bu sonuç kontrol hücre homojenitesiyle toksik madde eklenen örnekler arasında farklılık olduğunu ve LS eklenmesinin bu farklılığı ortadan kaldırmadığını gösterdi

Yapılan her üç testin sonuçları da birbiriyle uyumluydu. TUNEL boyama ve DNA fragmentasyon testlerinin her ikisi de DNA kırıklarını göstermek amacıyla kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda TUNEL testi, DNA fragmentasyon testinden elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla kullanıldı. Her iki testten elde edilen görüntüler karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edildiği bulgular bölümünde görülebilir. WST-1 testi, diğer iki testten farklı olarak mitokondriyal aktivite yoluyla hücre yaşayabilirliğini gösterir. Bu testin, diğer iki teste göre avantajı sayısal değerler elde edilebilmesi ve istatistiksel değerlendirme yapılabilmesidir. Diğer iki test ile apoptoza uğramış hücreler tespit edilirken bu test ile apoptoza uğramamış hücreler saptanmaktadır.

Sonuç olarak; LS'nin H₂O₂ toksisitesinde herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığı, CP toksisitesinde ise 1µL dozlarında kullanıldığında kısmi koruyucu etkisinin olduğu ve bu etkinin artan dozlarda kaybolduğu saptanmıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen bulgular değerlendirildiğinde LS'nin;

- Nörodejenerasyona yol açmadığı,
- H₂O₂ nörotoksisitesine karşı herhangi bir koruyucu etkisi olmadığı,
- CP nörotoksisitesinde belirli dozlarda koruyucu etkisi olduğu ancak artan dozlarda bu etkisinin ortadan kalktığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; LS, CP'nin neden olduğu nörotoksisitelerde ve belirli dozlarda nöroprotektif olarak bulundu. Daha farklı nörotoksik ajanlarla yapılacak çalışmaların ve doz belirlemek için yapılacak daha fazla çalışmanın faydalı olabileceği düşünülmektedir.

7.KAYNAKLAR

1. **Dekanosidze GE, Aneli NA, Loladze MS.** Hystochemical investigations of localisation of saponins in the tubers of *Leontice smirnowii* Trautv. *Bull Acad Sci Georgia.* **1973**; 70(1): 113-115.
2. **Gülçin İ, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R.** Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine.* **2006**; 13: 343-351.
3. **Gepdiremen A, Mshvildadze V, Bakuridze K, Elias R.** Effects of *Leontice smirnowii* tuber monodesmosides and crude extract in carageenan- and histamin-induced acute inflammation model of rats. *Phytomedicine.* **2006**; 13: 728-731.
4. **Verpoorte R.** Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov Today.* **1999**; 3: 232-238.
5. **Behl C, Moosmann B.** Oxidative Nerve Cell Death in Alzheimers Disease and Stroke: Antioxidants as Neuroprotective Compounds. *Biological Chemistry.* **2002**; 383 (3-4): 521-536.
6. **Wang JY, Wen LL, Huang YN, Chen YT, Ku MC.** Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr Pharm Des.* **2006**; 12(27): 3521-23.
7. **Evans PH.** Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Med Bull.* **1993**; 49:577-287.
8. **Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P.** Cell death in the nervous system. *Nature.* **2006**; 443:796-802.
9. **Yankner BA, Lu T, Loerch P.** The aging brain. *Annu Rev Pathol.* **2008**; 3: 41-66.
10. **Stroh C, Schulze-Osthoff K.** Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **1998**; 5:997-1000.
11. **Zou H, Li Y, Liu X, Wang X.** An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* **1999**; 274: 11549-56.
12. **Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X.** Apaf-1, a human protein homologous to *C. Elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* **1997**; 90: 405-413.
13. **Gorman AM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Ceccatelli S.** Cytochrome c release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci.* **1999**; 11: 1067-1072.
14. **Ekert PG, Vaux DL.** The mitochondrial death squad: hardened killer or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol.* **2005**; 17: 626-630.
15. **Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* **1999**; 397: 441-446.

16. **Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME.** Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* **1998**; 254: 439-459.
17. **Galonek HL, Hardwick JM.** Upgrading the BCL-2 Network. *Nat Cell Biol.* **2006**; 8:1317-1319.
18. **Liston P, Ypung SS, Mackenzie AE, Korneluk RG.** Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis.* **1997**; 2: 423-441.
19. **Nicholis DG, Budd SL.** Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria. *BioFactors.* **1998**; 8: 287-299.
20. **Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P.** Glutamat-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* **1995**; 15: 961-973.
21. **Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kromer G.** Self eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**; 8: 741-752.
22. **Clarke PG.** Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.* **1990**; 181: 195-213.
23. **Berry DL, Baehrecke EH.** Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila. *Cell.* **2007**; 131:1137-1148.
24. **Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC.** Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Archives of neurology.* **2001**; 58: 1395-1402.
25. **Selkoe DJ.** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* **2001**; 81: 741-766.
26. **Podlisny MB, Ostaszewski BL, Squazzo SL, Koo EH, Rydell RE, Teplow DB, Selkoe DJ.** Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J Biol Chem.* **1995**; 270: 9564-9570.
27. **Colurso GJ, Nilson JE, Vervoort LG.** Quantitative assessment of DNA fragmentation and beta-amyloid deposition in insular cortex and midfrontal gyrus from patients with Alzheimer's disease. *Life Sci.* **2003**; 73: 1795-1803.
28. **Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E.** Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis.* **2002**; 11: 341-54.
29. **Woodhouse A, Dickson TC, West AK, McLean CA, Vickers JC.** No difference in expression of apoptosis-related proteins and apoptotic morphology in control, pathologically aged and Alzheimer's disease cases. *Neurobiol Dis.* **2006**; 22: 323-33.
30. **Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SK.** Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SHSY5Y cells. *Brain Res.* **1996**; 738: 196-204.
31. **Guo Q, Fu W, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP.** Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med.* **1999**; 5: 101-6.
32. **Olney JW, Wozniak DE, Farber NB.** Glutamate receptor dysfunction and Alzheimer's disease. *Restorat Neurol Neurosci.* **1998**; 13: 75-83.

33. **Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G.** Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1–40). *Brain Res.* **2002**; 958: 210–21.
34. **Ikonomic MD, Mizukami K, Warde D, Sheffield R, Hamilton R, Wenthold RJ, Armstrong DM.** Distribution of glutamate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of normal elderly and patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* **1999**; 160: 194–204.
35. **Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA.** Macroautophagy—a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol.* **2005**; 171: 87–98.
36. **Mochizuki H.** Gene therapy for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurotherap.* **2007**; 7: 957–960.
37. **Farrer MJ.** Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev.* **2006**; 7: 306–18.
38. **Dodson MW, Guo M.** Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol.* **2007**; 17: 331–7.
39. **Gandhi S, Wood NW.** Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* **2005**; 14: 2749–55.
40. **Sulzer D.** Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **2007**; 30: 244–50.
41. **Kosel S, Egensperger R, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB.** On the question of apoptosis in the Parkinsonian substantia nigra. *Acta Neuropathologica.* **1997**; 93: 105–8.
42. **Tatton NA.** Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* **2000**; 166: 29–43.
43. **Hartmann A, Mouatt-Prigent A, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC.** FADD: a link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. *Neurology.* **2002**; 58: 308–310.
44. **Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC.** Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci.* **2001**; 21: 2247–55.
45. **Quigney DJ, Gorman AM, Samali A.** Heat shock protects PC12 cells against MPP₊ toxicity. *Brain Res.* **2003**; 993: 133–139.
46. **Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE, Sawa A, V LD, Dawson TM, Ross CA.** Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondriadependent apoptosis. *Hum Mol Genet.* **2001**; 10: 919–926.
47. **Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A.** Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci.* **2002**; 22: 2780–91.
48. **Mochizuki H, Yamada M, Mizuno Y.** Alpha-synuclein overexpression model. *J Neural Transm Suppl.* **2006**; 281–4.

49. **Beal MF.** Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol.* **1998**; 44: S110–4.
49. **Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y.** Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* **1997**; 12: 25–31.
51. **Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Krantz D, Edwards RH, Greene LA, Zecca L.** Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2000**; 97: 11869–74.
52. **Gomez-Santos C, Ferrer I, Santidrian AF, Barrachina M, Gil J, Ambrosio S.** Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res.* **2003**; 73: 341–50.
53. **Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr.** Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **1985**; 44: 559–77.
54. **DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N.** Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science.* **1997**; 277: 1990–3.
55. **Zhou H, Cao F, Wang Z, Yu ZX, Nguyen HP, Evans J, Li SH, Li XJ.** Huntingtin forms toxic NH₂-terminal fragment complexes that are promoted by the age-dependent decrease in proteasome activity. *J Cell Biol.* **2003**; 163: 109–18.
56. **Kiechle T, Dedeoglu A, Kubilus J, Kowall NW, Beal MF, Friedlander RM, Hersch SM, Ferrante RJ.** Cytochrome C and caspase-9 expression in Huntington's disease. *Neuromolecular Med.* **2002**; 1: 183–95.
57. **Wellington CL, Ellerby LM, Gutekunst CA, Rogers D, Warby S, Graham RK, Loubser O, van Raamsdonk J, Singaraja R, Yang YZ, Gafni J, Bredesen D, Hersch SM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW, Hayden MR.** Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci.* **2002**; 22: 7862–72.
58. **McGeer EG, McGeer PL.** Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature.* **1976**; 263: 517–9.
59. **Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R.** Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* **2004**; 17: 455–61.
60. **Estrada Sanchez AM, Mejia-Toiber J, Massieu L.** Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res.* **2008**; 39: 265–76.
61. **Zeron MM, Fernandes HB, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, Baimbridge KG, Hayden MR, Raymond LA.** Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci.* **2004**; 25: 469–79.
62. **Hansson O, Petersen A, Leist M, Nicotera P, Castilho RF, Brundin P.** Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**; 96: 8727–32.
63. **Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, DiFiglia M.** Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci.* **2000**; 20: 7268–78.

64. **Zuchner T, Brundin P.** Mutant huntingtin can paradoxically protect neurons from death. *Cell Death Differ.* **2008**; 15: 435–42.
65. **Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW.** Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* **1995**;38(1):73-84.
66. **Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW.** ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* **1997**;18(2):327-38.
67. **Bristol LA, Rothstein JD.** Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann Neurol.* **1996**; 39:676-679.
68. **Lin CLG, Bristol LA, Jin L.** Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EATT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron.* **1998**; 20: 589-602.
69. **Flowers JM, Powell JE, Leigh PN, Anderson P, Shaw CE.** Intron 7 retention and exon 9 skipping EATT2 mRNA variants are not associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* **2001**; 49: 643-649.
70. **Rosen DR, Siddique T, Patterson D.** Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* **1993**; 362: 59-62.
71. **Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH Jr, Hediger MA.** SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat MNeurosci.* **1999**; 2: 427-433.
72. **Aoki M, Lin CL, Rothstein JD.** Mutations in the glutamate transporter EATT2 gene do not cause abnormal EATT2 transcripts in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* **1998**; 43: 645-653.
73. **Trotti D, Aoki M, Pasinelli P.** Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J Biol Chem.* **2000**; 276: 576-582.
74. **Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW.** Very delayed infarction after mild focal cerebral ischaemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab.* **1996**; 16: 195–201.
75. **Sauer D, Allegrini PR, Cosenti A, Pataki A, Amacker H, Fagg GE.** Characterization of the cerebroprotective efficacy of the competitive NMDA receptor antagonist CGP40116 in a rat model of focal cerebral ischaemia: an in vivo magnetic resonance imaging study. *J Cereb Blood Flow Metab.* **1993**; 13: 595–602.
76. **Rami A.** Upregulation of Beclin 1 in the ischemic penumbra. *Autophagy.* **2008**; 4: 227–9.
77. **Greenamyre JT, Maragos EF, Albin RL, Penney JB, Young AB.** Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog. Neuro-Psych. Biol. Psych.,* **1988**; 12: 421-430.
78. **Beal, M.F.** Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* **1992**; 31: 119-130.
79. **Hoyer S.** Oxidative metabolism deficiencies in brains of patients with Alzheimer disease. *Acta Neurol Scand* **1996**;165: 18-24.

80. **Dyken, J.A.** Isolated cerebellar and cerebral mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^+ : implicatio for degeneration. *J. Neurochem*, **1994**; 63: 584-591.
81. **Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G.** Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by β -amyloid(1-40). *Brain Res.* **2002**; 958: 210-221.
82. **McGeer PL, McGeer EG, Yasojima K.** Alzheimer disease and neuroinflammation. *J Neural Transm Suppl* **2000**; 59: 53-57.
83. **Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW.** Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1993**; 15: 90(14):6591–6595.
84. **Willard LB, Hauss-Wegrzyniak B, Danysz W, Wenk GL.** The cytotoxicity of chronic neuroinflammation upon basal forebrain cholinergic neurons of rats can be attenuated by glutamatergic antagonism or cyclooxygenase-2 inhibition. *Experimental brain research.* **2000**;134(1): 58-65.
85. **Papadopoulos MC, Koumenis IL, Yuan TY, Giffard RG.** Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience.* **1998**;82(3): 915-925.
86. **Janeczko K.** Spatiotemporal patterns of the astroglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development: a combined immunocytochemical and autoradiographic study. *Brain Res.* **1989**; 485(2): 236–243.
87. **Moonen G, Rogister B, Leprince P, Rigo JM, Delree P, Lefebvre PP, Schoenen J.** Neuroon-glia interactions and neural plasticity. *J. Prog. Brain Res.* **1990**; 86: 63-73.
88. **Rimaniol AC, Boussin FD, Dormont D, Bach JF, Zavala F.** Mechanisms of downmodulation and release of tumour necrosis factor receptor induced by human immunodeficiency virus type 1 in human monocytes. *Cytokine.* **1997**;9(1): 9-18.
89. **Kaul M, Lipton SA.** Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *PNAS.* **1999**; 96(14): 8212-8216.
90. **Laue L, Pizzo PA, Butler K, Cutler GB Jr.** Growth and neuroendocrine dysfunction in children with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Pediatr.* **1990**; 117: 541-545.
91. **Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME.** Insulin-Like Growth Factor-I Resistance. *Endocr. Rev.* **1998**; 19: 625-646.
92. **Wang JY, Peruzzi F, Lassak A, Del Valle L, Radhakrishnan S, Rappaport J, Khalili K, Amini S, Reiss K.** Neuroprotective effects of IGF-I against TNF α -induced neuronal damage in HIV-associated dementia. *Virology.* **2003**;305(1):66-76.
93. **Popovic R, Liniger R, Bickler PE.** Anesthetics and mild hypothermia similarly prevent hippocampal neuron death in an *in vitro* model of cerebral ischemia. *Anesthesiology.* **2000**; 92: 1343–1349.
94. **Kawaguchi M, Kimbro JR, Drummond JC, Cole DJ, Kelly PJ, Patel PM.** Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected to focal ischemia. *Anesthesiology* **2000**; 92(5):1335-42.
95. **Li J, Zheng S, Zuo Z.** Isoflurane decreases AMPA-induced dark cell degeneration and edematous damage of Purkinje neurons in the rat cerebellar slices. *Brain Res.* **2002**;958:399–404.

96. **Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I.** Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science*, **1983**; 219: 979-980.
97. **Cooper JR, Bloom FE, Roth RH.** *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Oxford Univ. Press: Oxford, **2003**.
98. **Walz W.** Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol.* **1989**; 33(4):309–333.
99. **Tateishi N, Mori T, Kagamiishi Y, Satoh S, Katsube N, Morikawa E, Morimoto T, Matsui T, Asano T.** Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part II: suppression of astrocytic activation by a novel agent (R)-(-)-2-propyloctanoic acid (ONO-2506) leads to mitigation of delayed infarct expansion and early improvement of neurologic deficits. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2002**;22: 723–734.
100. **Kato H, Araki T, Imai Y, Takahashi A, Itoyama Y.** Protection of dopaminergic neurons with a novel astrocyte modulating agent (R)-(-)-2-propyloctanoic acid (ONO-2506) in an MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* **2003**; 208 (2): 9-12.
101. **Araki T, Kumagai T, Tanaka K, Matsubara M, Kato, H, Itoyama Y.** Neuroprotective effect of riluzole in MPTP-treated mice. *Brain Res*, **2001**; 918: 176-181.
102. **Pan T, Fei J, Zhou Z, Jankovic J, Le W.** Effects of green tea polyphenols on dopamine uptake and on MPP⁺-induced dopamine neuron injury. *Life Sci.* **2003**, 72: 1073-1083.
103. **Knott G, Stern GP, Wilkin P.** Inflammatory Regulators in Parkinson's Disease: iNOS, Lipocortin-1, and Cyclooxygenases-1 and -2. *Mol. Sci. Neurosci.* **2000**; 16: 724-739.
104. **Sairam K, Saravanan KS, Banerjee R, Mohanakumar KP.** Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Brain Res.* **2003**; 966: 245-252.
105. **Yang CS, Tsai PJ, Lin NN, Kuo JS.** Elevated extracellular glutamate levels increased the formation of hydroxyl radical in the striatum of anesthetized rat. *Free Radic.Biol. Med.* **1995**; 19(4): 453-459.
106. **Chang YH, Lee ST, Lin WW.** Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J. Cell. Biochem.* **2001**; 81: 715–723.
107. **Castillo J, Leira R, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Davalos A.** Neuroprotective effects of aspirin in patients with acute cerebral infarction, *Neurosci. Lett.* **2003**; 339: 248–250.
108. **Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, de Imperial JM, Villegas-Perez MP.** Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol.* **2001**;45 (suppl 3): 261–267.
109. **Yoles E, Wheeler LA, Schwartz, M.** Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **1999**; 40: 65-73.
110. **Wheeler LA, Lai R, Woldemussie E.** From the lab to the clinic: activation of an alpha-2 agonist pathway is neuroprotective in models of retinal and optic nerve injury. *Eur. J. Ophthalmol.* **1999**, 9 (Suppl. 1): 17-21.

111. **Villegas-Pérez MP, Rodríguez ME, García A.** Transient ischemia of the retina: long-term neuroprotection of inner retinal layers with a selective alpha-2 agonist (AGN190342, brimonidine). *Ophthalmic Res.* **2000**; 32(suppl 2): 48-52.
112. **Goto W, Ota T, Morikawa N, Otori Y, Hara H, Kawazu K, Miyawaki N, Tano Y.** Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina. *Brain Research.* **2002**; 958: 10-19.
113. **Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H, Zhang S, Kashii S, Honda Y, Shimazawa M, Hara H.** Lomerizine, a Ca^{2+} Channel Blocker, Reduces Glutamate-induced Neurotoxicity and Ischemia/Reperfusion Damage in Rat Retina. *Exp Eye Res.* **2000**; 70: 475-484.
114. **Hara H, Sukamoto T, Kogure K.** Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog Neurobiol.* **1993**; 40: 645-670.
115. **Meyer-Bothling U, Bron AJ, Osborne NN.** Invest Ophthalmol. Vis. Sci. Topical application of serotonin or the 5-HT1-agonist 5-CT intraocular pressure in rabbits. **1993**; 34, 3035-3042.
116. **Klisch J, Bode-Greuel KM.** Ketanserin reduces neuronal calcium accumulation and cell death in the hippocampus of the Mongolian gerbil after transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1992; 578(1-2):1-7.
117. **Inoue-Matsuhisa E, Sogo S, Mizota A, Taniai M, Takenaka H, Mano T.** Effect of MCI-9042, a 5-HT2 receptor antagonist, on retinal ganglion cell death and retinal ischemia. *Exp Eye Res.* **2003**; 76(4): 445-52.
118. **Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, Kogure K.** Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res.* **1992**; 595:145-148.
119. **Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y, Iwasaki K, Sharkey J.** Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. *J Neurosci.* **1997**; 17: 6939-6946.
120. **Uchino H, Elmér E, Uchino K, Li PA, He QP, Smith ML, Siesjö BK.** Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res.* **1998**; 812 (1-2): 216-226.
121. **Aydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, Canatan H.** Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett.* **2003**; 137(3):169-174.
122. **Imperato A, Mulas A, Di Chiara G.** Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol.* **1986**; 132(2-3):337-338.
123. **Kelton MC, Kahn HJ, Conrath CL, Newhouse PA.** The effects of nicotine on Parkinson's disease. *Brain and cognition.* **2000**; 43(1-3):274-82.
124. **Parain K, Marchand V, Dumery B, Hirsch E.** Nicotine, but not cotinine, partially protects dopaminergic neurons against MPTP-induced degeneration in mice. *Brain research.* **2001**; 890(2):347-350.
125. **Sahakian B, Jones G, Levy R, Gray J, Warburton D.** The effects of nicotine on attention, information processing, and short-term memory in patients with dementia of the Alzheimer type. *Br J Psychiatry.* **1989**; 154: 797-800.

126. **Pillay R, Maharaj DS, Daniel S, Daya S.** Acetylcholine reduces cyanide-induced superoxide anion generation and lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2003**; 27(1): 61-64.
127. **Xiao XQ, Zhang HY, Tang XC.** Huperzine A attenuates amyloid β -peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *J Neurosci Res*. **2002**; 67:30-36.
128. **Wang LM, Han YF, Tang XC.** Huperzine A improves cognitive deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Eur J Pharmacol*. **2000**; 398: 65–72.
129. **Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ.** A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med*. **1997**;336(17):1216-1222.
130. **Osakada F, Hashino A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A.** Neuroprotective effects of alpha-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. *Eur J Pharmacol*. **2003**; 465: 15-22.
131. **Alaoui F, Pratt J, Trocherie S, Court L, Stutzmann JM.** Acute effects of irradiation on the rat brain: protection by glutamate blockade. *Eur J Pharmacol*. **1995**;276(1-2):55-60.
132. **Guelman LR, Zorrilla Zubilete MA, Rios H, Zieher LM.** WR-2721 (amifostine, ethylol) prevents motor and morphological changes induced by neonatal X-irradiation. *Neurochemistry international*. **2003**;42(5):385-391.
133. **Santini V, Giles FJ.** The potential of Amifostine: from cytoprotectant to therapeutic agent. *Haematologica*. **1999**;84: 1035–1042.
134. **M.-B. Wie.** Protective effects of *Opuntia ficus-indica* and *Saururus Chinensis* on free-radical induced neuronal injury in mouse cortical cell cultures.. *Yakhak Hoiiji*. **2000**; 40: 613–619.
135. **Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS, Cho .:** Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)- dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res* **2003**; 965: 130-136.
136. **Shimada Y, Goto H, Itoh T, Sakakibara I, Kubo M, Sasaki H, Terasawa K.** Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. **1999**;51(6):715-22.
137. **Baas HK, Schueler P.** Efficacy of cabergoline in long-term use: results of three observational studies in 1,500 patients with Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 2001;46 (Suppl 1):18-23.
138. **Lipton SA, Rosenberg PA.** Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. *N. Engl. J. Med*. **1994**; 330: 613-622.
139. **Lombardi G, Varsaldi F, Miglio G, Papini MG, Battaglia A, Canonico PL.** Cabergoline prevents necrotic neuronal death in an in vitro model of oxidative stress. *Eur J Pharmacol*. **2002**;457(2-3): 95-98.
140. **Finotti N, Castagna L, Moretti A, Marzatico F.** Reduction of lipid peroxidation in different rat brain areas after cabergoline treatment. *Pharmacol Res*. **2000**; 42(4): 287-291.

141. **Yoshioka M, Tanaka K, Miyazaki I, Fujita N, Higashi Y, Asanuma M.** The dopamine agonist cabergoline provides neuroprotection by activation of the glutathione system and scavenging free radicals. *Neurosci Res.* **2002**; 43:259–267.
142. **Li L, Nie J, Shen Z, Wu W, Chen Z, Hao X.** Neuroprotective effects in gerbils of spiramine T from *Spiraea japonica* var. *acuta*. *Planta Med.* **2001**;67(2): 142-145.
143. **Li L, Shen YM, Yang XS, Wu WL, Wang BG, Chen ZH, and Hao XJ.** Effects of spiramine T on antioxidant enzymatic activities and nitric oxide production in cerebral ischemia-reperfusion gerbils. *Brain Res.* **2002**; 944: 205–209.
144. **Kim HC, Ko KH, Kim WK, Shin EJ, Kang KS, Shin CY, Jhoo WK.** Effects of dextromethorphan on the seizures induced by kainate and the calcium channel agonist BAY k-8644: comparison with the effects of dextrophan. *Behavioural brain research.* **2001**;120(2):169-175.
145. **Quirion R, Bowen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio JM, Rothman RB, Su TP, Tam SW, Taylor DP.** A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol Sci.* **1992**;13(3): 85–86.
146. **Kim HC, Bing G, Jhoo WK, Kim WK, Shin EJ, Im DH, Kang KS, Ko KH.** Metabolism to dextrophan is not essential for dextromethorphan's anticonvulsant activity against kainate in mice. *Life sciences.* **2003**;72(7):769-783.
147. **Takahashi M, Ni JW, Kawasaki-Yatsugi S, Toya T, Ichiki C, Yatsugi SI, Koshiya K, Shimizu-Sasamata M, Yamaguchi T.** Neuroprotective Efficacy of YM872, an alpha - Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptor Antagonist, after Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **1998**;287:559-566.
148. **Araki T, Kogure K, Murakami M.** Prevention of abnormal calcium accumulation in postischemic gerbil brain by vinconate. *Acta Neurol Scand.* **1991**; 83 : 155-160.
149. **Murakami F, Araki T, Kanai Y, Kogure K.** Effect of vinconate against alterations in [3H]naloxone, [3H]MK-801 and [3H]muscimol bindings after transient cerebral ischemia in gerbils. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, **1993**; 325:21-34.
150. **Rao ML, Kölsch H.** Effects of estrogen on brain development and neuroprotection-implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology.* **2003**;28 (Suppl 2):83-96.
151. **Abciximab in Ischemic Stroke Investigators.** A randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation study. The Abciximab in Ischemic Stroke Investigators. *Stroke.* **2000**; 31: 601-609.
152. **Junghans U, Seitz RJ, Ritzl A, Wittsack HJ, Fink GR, Freund HJ, Siebler M.** Ischemic brain tissue salvaged from infarction by the GP IIb/IIIa platelet antagonist tirofiban. *Neurology.* **2002**; 58: 474–476.
153. **Kim J-S, Shin-ya K, Furihata K, Hayakawa Y, Seto H.** Structure of Mescengricin, A Novel Neuronal Cell Protecting Substance Produced by *Streptomyces griseoflavus*. *Tetrahedron Letters.* **1997**; 38: 3431-3434.
154. **Cheng B, Barger SW, Mattson MP.** Staurosporine, K-252a and K-252b stabilize calcium homeostasis and promote survival of CNS neurons in the absence of glucose. *J. Neurochem.* **1994**; 62: 1319–1329.

155. **Cheng, B.; Mattson, M.P.** IGF-I and IGF II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *J. Neurosci.* **1992**; 12: 1558-1566.
156. **Gallily R, Breuer A, Mechoulam R.** 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor- α production in murine macrophages, and in mice. *Eur J Pharmacol.* **2000**; 406(1): 5-7.
157. **Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E.** An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature.* **2001**;413:527–531.
158. **J. Banderowicz-Pikula.** Annexins as neuroprotective agents in the central nervous system. *Curr. Med. Chem. - Central Nervous System Agents.* **2002**; 2: 87-107.
159. **Shibata, M, Kumar SR, Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH, Zlokovic BV.** Anti-inflammatory, antithrombotic and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation.* **2001**; 103: 1799-1805.
160. **Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV.** Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective in a murine stroke model through EPCR and PAR-1. *Nature Medicine.* **2003**; 9:338-342.
161. **Abdalla S, Abu-Zarga M, Sabri S.** Preliminary observations on the pharmacology of petaline chloride, a quaternary alkaloid from *Leontice leonpetalum*. *Gen Pharmacol.* **1989**; 205: 565-569.
162. **Liu Q, Zhu G, Huang O.** Anti-inflammatory, analgesic and sedative effects of *Leontice kiangnanensis* P.L. *Chiu Zhongguo Yao Za Zhi.* **1991**; 161: 50-53.